

博士論文

遺伝子欠損マウスを用いた *CADM1* の
肺腫瘍抑制における役割の解析

伊東 剛

目次

	頁
要旨 -----	1
序文 -----	2
方法 -----	15
結果 -----	25
考察 -----	45
謝辞 -----	57
参考文献 -----	58

要旨

CADM1 遺伝子の肺腫瘍抑制における役割を解明するために、*Cadm1* 遺伝子欠損マウスと肺腺がんのモデルマウスである *K-ras*^{+/*LSL-G12D*} マウスを交配した。このマウスに生じる肺腺腫・腺がんについて、*Cadm1* 遺伝子の欠失により発生する腫瘍の個数は変化しなかったが、腫瘍の増大および組織学的異型度の増悪が認められた。また *K-ras*^{+/*LSL-G12D*} マウスに発生する腫瘍の一部では *CADM1* の発現が低下しており、特に浸潤性の腺がんに顕著であった。したがって *Cadm1* の欠損は肺腺がんの進展に寄与することが示唆された。

序文

肺がんは日本および世界でがん死の第一位を占めるがんである [1,2]。肺がんは組織学的に小細胞肺がん (small cell lung cancer; SCLC) と非小細胞肺がん (non-small cell lung cancer; NSCLC) の 2 つに大別され、それぞれ肺がん全体の約 15-20%、約 80-85%を占める。非小細胞がんはさらに腺がん (adenocarcinoma)、扁平上皮がん (squamous cell carcinoma)、大細胞がん (large cell carcinoma) などに細分類される [3]。腺がんは日本において発生頻度が最も高い組織型であり男性の肺がんの約 40%、女性の肺がんの約 70% を占め、また喫煙との関連が低く非喫煙者にも多く発生する [4]。

肺腺がんのほとんどは末梢の細気管支や肺胞に発生し、その起源となる細胞はクララ細胞および肺胞 II 型細胞であると考えられている。気管支および肺胞上皮を構成する細胞に関して、気管支には基底細胞 (basal cell)、繊毛細胞 (ciliated cell)、杯細胞 (goblet cell)、クララ細胞 (Clara cell)、神経内分泌細胞 (neuroendocrine cell) の 5 種類、肺胞には肺胞 I 型細胞 (type I pneumocyte)、肺胞 II 型細胞 (type II pneumocyte) の 2 種類が存在する。クララ細胞、肺胞 II 型細胞はそれぞれ繊毛細胞、肺胞 I 型細胞の前駆細胞であり、自己複製能を併せ持つ [5,6]。加えてマウスにはクララ細胞と肺胞 II 型細胞の両方に分化することのできる細気管支肺胞幹細胞 (bronchioalveolar stem cell; BASC) が存在し、この細胞も腺がんの起源となり得ることが示されている [7] (図 1)。

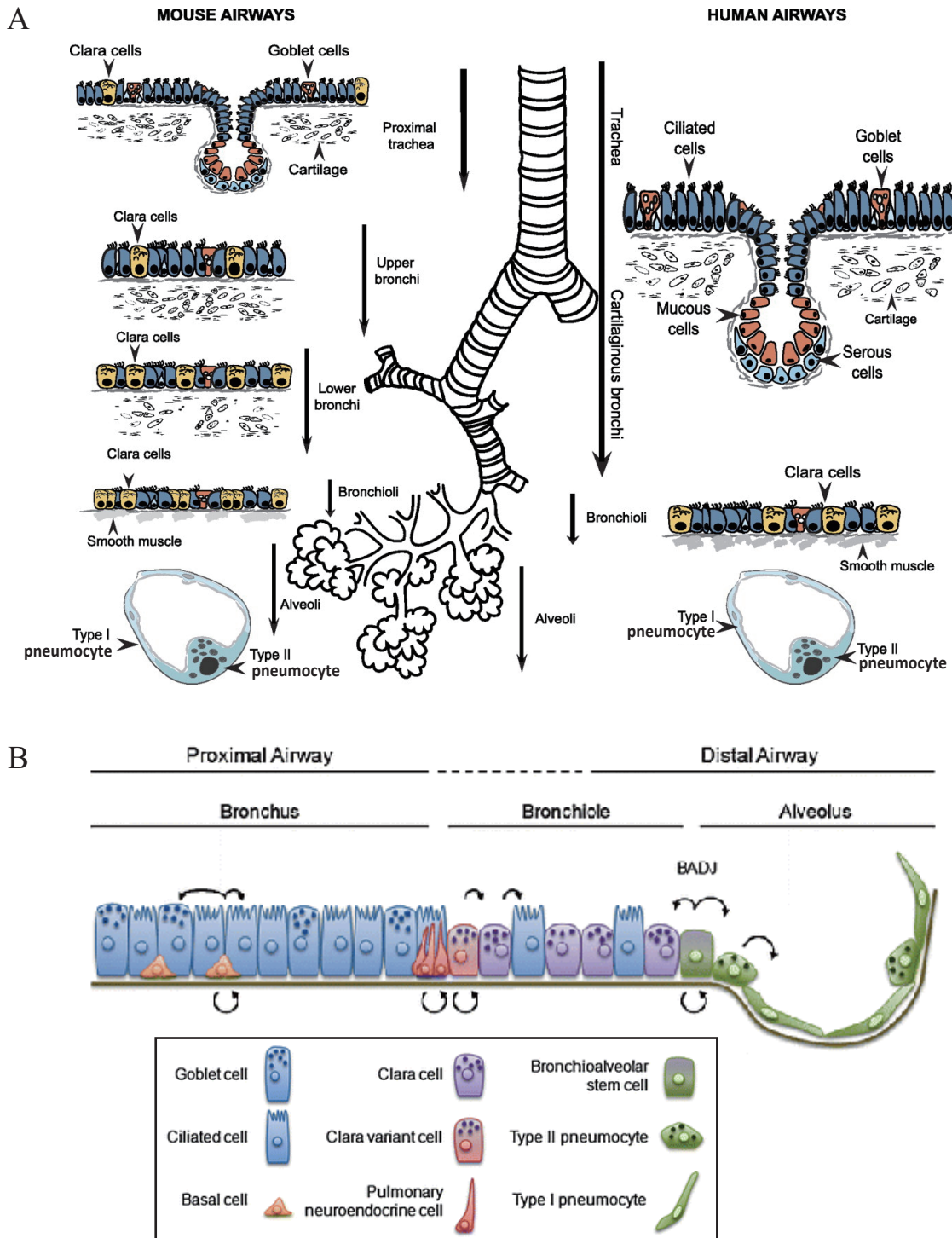


図 1. マウスとヒトにおける下気道の概略図 (文献 8 および 9、一部改変)

(A) 下気道および粘膜下腺 [submucosal gland、漿液腺 (serous gland) と粘液腺 (mucous gland) から成る] の表面に並ぶ上皮細胞には多様な型が存在する。マウスにはクララ細胞が下気道全体に存在し、細気管支において特に数が多い。また粘膜下腺は近位気管 (proximal trachea) にのみ認められる。一方ヒトでは粘膜下腺が気道の軟骨部 (cartilaginous airways、気管および気管支の総称) 全体に存在し、クララ細胞は細気管支にのみ認められる。肺胞はマウス、ヒトともに肺胞 I 型細胞と肺胞 II 型細胞から成る。肺胞 I 型細胞が肺胞表面のほとんどを占め、肺胞 II 型細胞は肺胞サーファクタントを分泌する。(B) 肺の上皮細胞のうち基底細胞、神経内分泌細胞、クララ細胞、肺胞 II 型細胞は自己複製能を有する。マウスの肺には細気管支肺胞道接合部 (bronchioalveolar duct junction; BADJ) に細気管支肺胞幹細胞が存在する。図中の矢印は自己複製もしくは分化することを示す。

これらの上皮細胞における原がん遺伝子の活性化およびがん抑制遺伝子の不活性化が積み重なることにより、前がん病変である異型腺腫様過形成 (atypical adenomatous hyperplasia; AAH)、非浸潤性の上皮内腺がん (adenocarcinoma in situ; AIS) を経て多段階的に浸潤性の腺がんを発症すると考えられている [10]。肺腺がんにおいて高頻度に変異が認められるがん遺伝子は *EGFR* および *K-RAS* であり、それぞれ全体の約 30-40%、約 15%を占め、且つこれらの変異は相互排他的である [11,12]。さらにがんの進展に伴ってがん遺伝子 *EGFR*、*ERBB2*、*MET* の遺伝子増幅ならびに発現上昇、あるいはがん抑制遺伝子 *TP53*、*RBI*、*P16INK4A*、*LKB1/STK11*、*TSLC1/CADMI* などの不活化が起こることが報告されている [13-17] (表 1、図 2A)。

ここで肺腺がんにおける主要ながん遺伝子、がん抑制遺伝子の機能について説明する。*EGFR* (上皮成長因子受容体、epidermal growth factor receptor) は受容体型チロシンキナーゼであり、リガンドである EGF との結合により二量体を形成し増殖シグナルを下流の分子へ伝達する。肺腺がんにおける変異はチロシンキナーゼ領域をコードする exon 18-21 に認められ、そのほとんどが exon 19 における欠失変異あるいは exon 21 における L858R 変異である。これらの変異により *EGFR* はリガンド非依存的に活性化しがん化を引き起こす [22]。*EGFR* の第 1068 残基のチロシンが自己リン酸化されると、その部位にアダプタータンパク質 *GRB2* が結合し、さらにグアニンヌクレオチド交換因子 *SOS* がリクルートさ

表 1. 肺腺がんにおける遺伝子変化とその頻度 (文献 13-17)

遺伝子名	機能	機序	頻度 (%)
がん遺伝子			
<i>EGFR/ERBB1</i>	受容体型チロシンキナーゼ	変異、増幅、発現上昇	50
<i>KRAS</i>	低分子量 G タンパク質	変異、増幅	20
<i>EML4-ALK</i>	融合チロシンキナーゼ	転座（逆位）	5
<i>HER2/ERBB2</i>	受容体型チロシンキナーゼ	発現上昇、増幅、変異	25-60
<i>MET</i>	受容体型チロシンキナーゼ	発現上昇、増幅、変異	2-20
<i>CCND1</i>	細胞周期促進因子	発現上昇	50
がん抑制遺伝子			
<i>TP53</i>	細胞周期抑制因子	変異、欠失	60
<i>RB1</i>	細胞周期抑制因子	欠失、変異	4
<i>P16INK4A</i>	サイクリン依存性キナーゼ阻害因子 CDKN2A	欠失、変異、メチル化	40
<i>P14ARF</i>		メチル化	8 *
<i>CADMI/TSLC1</i>	細胞接着分子	メチル化、欠失	60
<i>LKB1/STK11</i>	セリン・スレオニン脱リン酸化酵素	欠失、変異	33
<i>PTEN</i>	PIP ₃ 脱リン酸化酵素	欠失、変異	<10 *

* 非小細胞肺がんにおける頻度

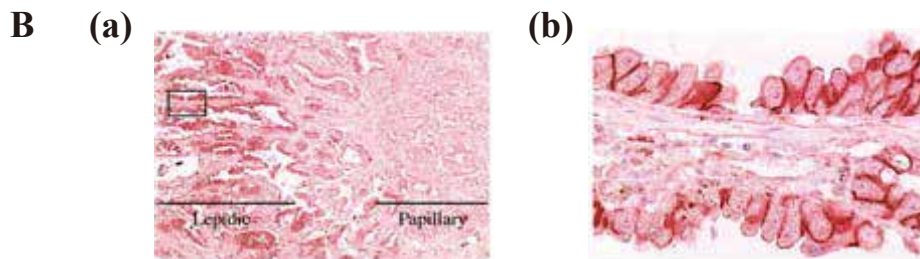
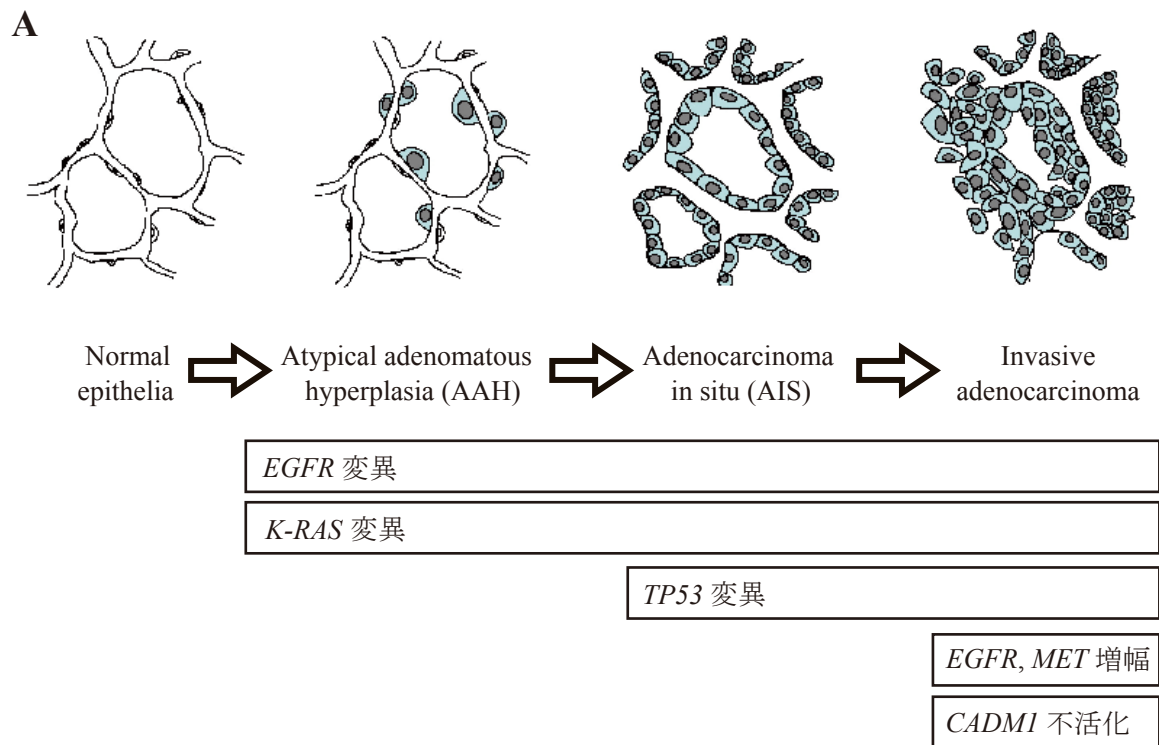


図 2. 肺腺がんの多段階発がんモデル

(A) 異型腺腫様過形成 (AAH) は上皮細胞に *EGFR*、*K-RAS* などの変異が起こることにより発生し、さらに上皮内腺がん (AIS) を経て浸潤性腺がんへと段階的に進展する。がん抑制遺伝子 *TP53* は AIS の段階で変異が認められるのに対し、原がん遺伝子 *EGFR* および *MET* の増幅は浸潤性腺がんでは高頻度に認められる。がん抑制遺伝子 *CADM1* の不活化は浸潤がんでは高頻度に認められる(文献 30、一部改変)。(B) (a) 肺腺がんにおける *CADM1* の発現を免疫組織化学にて検出したところ、同一腫瘍内において AIS 成分 (Lepidic) では *CADM1* のシグナルを認めたが、乳頭状の浸潤成分 (Papillary) では認められない。(b) (a) において四角で囲まれた部分の拡大図。細胞膜に *CADM1* の発現を認める。顕微鏡の拡大倍率は a: $\times 40$ 、b: $\times 400$ である (文献 20)。

れる [23]。SOS は低分子量 G タンパク質である RAS を活性化するが、K-RAS はこの RAS ファミリーに属する分子の 1 つである。不活性型の RAS-GDP は SOS により活性型の RAS-GTP に変換され、その下流の MAP キナーゼ経路 (mitogen-activated protein kinase pathway) を活性化し細胞分裂を促進する。活性型 RAS には GTPase-activating protein (GAP) が作用し、RAS 自身が有する GTPase 活性により GTP を GDP へ加水分解し不活性型に戻る。肺腺がんにおいて認められる *K-RAS* の変異は GTPase 活性制御部位のコドン 12、13、61 であり、これらの変異により GTPase 活性が低下し GTP 結合型に留まるため活性が持続し、細胞増殖を引き起こす [24]。

がん抑制遺伝子 *TP53* は非小細胞肺がんの約 50-60%において変異が認められ、その多くは遺伝子産物である転写因子 p53 の DNA 結合部位における点突然変異である。変異を受けた p53 は細胞周期やアポトーシス制御などに関与する標的遺伝子の転写を活性化することができなくなり、細胞の増殖促進および不死化が誘導される [15]。また、がん抑制遺伝子 *RB1* は非小細胞肺がんにおける遺伝子変異はほとんど認められないが、約 10-30% の症例で発現低下が見られる [25]。遺伝子産物 RB は転写因子 E2F と結合して G₀期から G₁期への細胞周期の移行を抑制するが、CDK (Cyclin-dependent kinase) によるリン酸化を受けると E2F との結合が解離し不活化される。この性質から、RB が発現している場合でも非小細胞肺がんでは高頻度にかかる Cyclin D1 の過剰発現や CDK を阻害する

p16^{INK4a} の不活化が認められる場合、RB はリン酸化による不活化を受ける [26]。

この RB 経路の異常、すなわち *P16INK4A* の不活化、Cyclin D1 の過剰発現、RB の発現低下のいずれかを認める非小細胞肺癌症例は約 80%にのぼる [27]。

加えて、がん抑制遺伝子 *CADM1* (*Cell adhesion molecule 1*)/*TSLC1* (*Tumor suppressor in lung cancer 1*) は肺腺がんの約 60%で発現の低下または欠如が見られ [20,28]、アレルの欠失あるいはプロモーターのメチル化による不活化を受ける [29]。CADM1 の不活化は特に進行がんにおいて著明であり (図 2B)、予後、臨床病期の進行度、リンパ管浸潤、脈管浸潤と相関することが報告されている [30]。CADM1 は免疫グロブリンスーパーファミリーに属する 1 回膜貫通型の細胞接着分子であり、発現はほぼ全ての上皮組織、特に肺、脳、精巣において強く認められる [31]。また CADM1 は細胞の側細胞膜に局在し、隣接細胞の CADM1 分子と細胞外ドメインを介して結合する [32]。細胞内ドメインには FERM 結合モチーフおよび PDZ 結合モチーフを有し、それぞれに裏打ちタンパク質である 4.1 タンパク質および膜結合性グアニル酸キナーゼが結合する (図 3)。CADM1 は接着分子であり、その不活化は上皮細胞接着の破綻をきたし浸潤、転移の契機となる。細胞株を用いた実験において CADM1 は実験的肝転移の抑制[33]、細胞周期の進行阻害 [34]、アポトーシス誘導 [35]、上皮間葉転換の抑制 [36]、ERBB2 の不活性化 [37] などに関与し、多面的ながん抑制能を有すると考えられている。さらに *Cadm1* 遺伝子欠損マウスが所属研究室の先行研究によって作成され [38]、

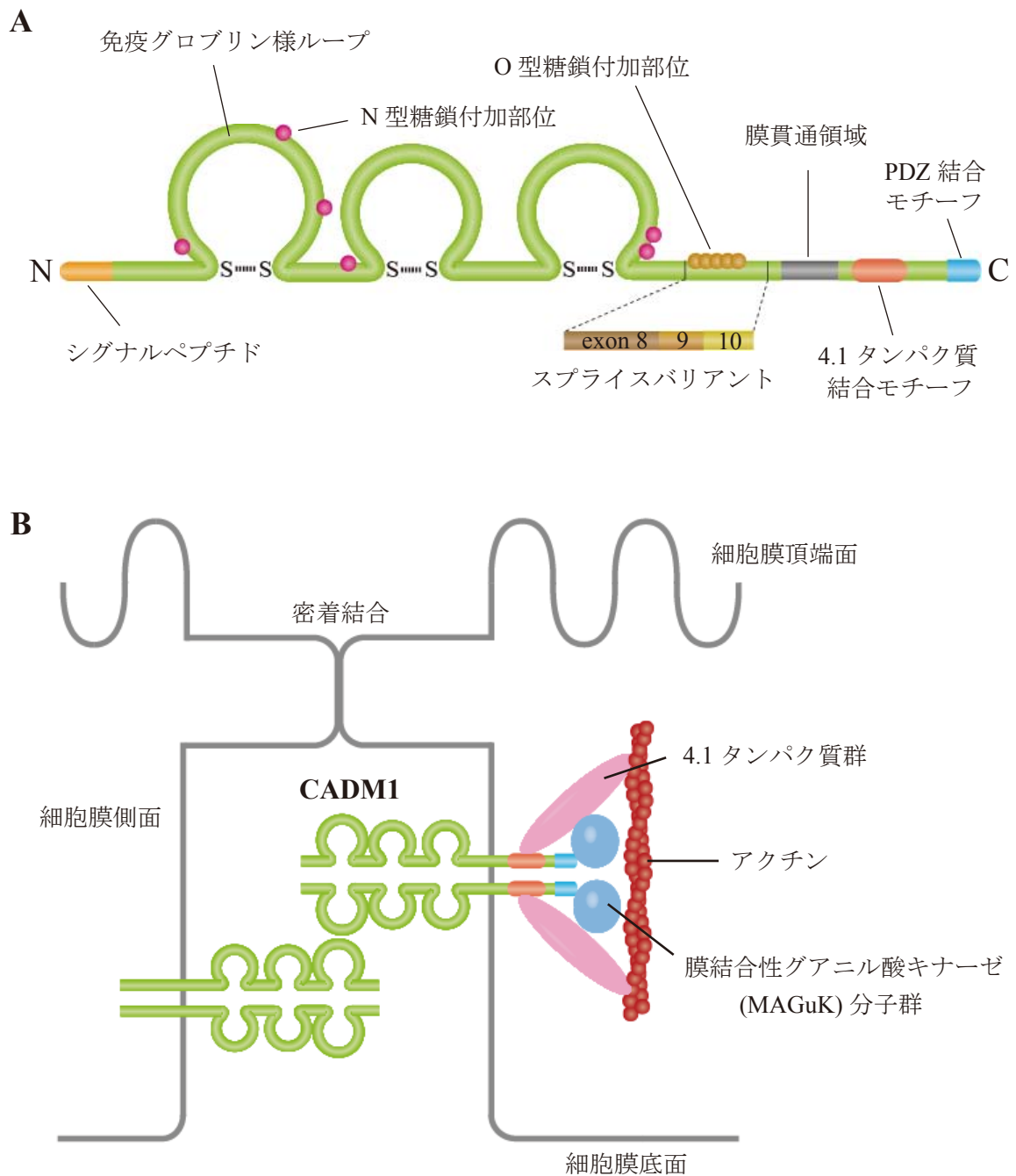


図 3. CADM1 タンパク質の構造と局在

(A) CADM1 は免疫グロブリンスーパーファミリーに属する細胞接着分子であり、442 アミノ酸から成る。1回膜貫通型の糖タンパク質であり、免疫グロブリン様ループを3つ有する。

(B) CADM1 は上皮細胞の細胞膜側面においてホモ二量体を形成し、隣接細胞の CADM1 分子とトランス結合を形成する。CADM1 は細胞内領域において、足場タンパク質である 4.1 ファミリータンパク質および膜結合性グアニル酸キナーゼ分子群と結合し、アクチン細胞骨格とつながっている。

生後 15 か月以降に約 30%の個体において肺腺腫および肺腺がんの自然発生を認めた [39]。これらの肺腫瘍は全例において *Egfr* や *K-ras*、*p53* に変異を有さず、ヒト肺腺がんにおける既知の分子経路とは異なる機序でがん化が起きていると考えられた。これらの報告は *CADMI* が肺腫瘍抑制において重要な役割を果たしていることを示唆している。

このように肺腺がんの発生および進展に関与する遺伝子群が多数同定され、その機能について解析が行われてきたが、がんは複数の遺伝子異常の蓄積の上に起こる疾患であり、各々の遺伝子のがんの発生および進展にどのように寄与しているかを個別に明らかにするためには、遺伝子改変動物における発がんを検討することが不可欠である。これに関し、ヒトの肺腺がんにおいて高頻度に認められる原がん遺伝子変異をマウスの肺に導入すると、ヒトと同様に肺腺がんを発症することが複数の遺伝子改変マウスで証明されている。具体的には doxycycline 誘導性にヒトの変異 *EGFR* (exon 19 の欠失変異および L858R 変異) を肺胞 II 型細胞に発現させたマウス [40,41]、ヒトの変異 *EGFR* (exon 19 の欠失変異) に対応するマウス変異 *Egfr* を肺胞 II 型細胞へ恒常的に発現させたマウス [41]、doxycycline 誘導性に *K-ras*^{G12D} をクララ細胞に発現させたマウス [42]、細胞の自発的な相同組み換えにより *K-ras*^{G12D} が発現するマウス [43] など様々なマウスにおいて肺腺がんの発生が認められたが、その中で最もよくヒト肺腺がんの発生を再現したモデルとして現在でも広く使用されているものは *K-*

ras^{+/*LSL-G12D*} マウスである [44]。

K-ras^{+/*LSL-G12D*} マウスは一方の *K-ras* アレルを、変異 *K-ras* 遺伝子上流に *loxP*-STOP element-*loxP* (LSL) 配列を組み込んだアレルに置換したノックインマウスであり、Cre 組換え酵素を発現するアデノウィルスベクター (Ad-Cre) を鼻腔から経気道的に肺へ投与し、感染が成立した細胞において *loxP* 配列に挟まれた STOP element が取り除かれ、変異 *K-ras* が発現し、がん化を引き起こす (図 4A)。このマウスに発生する肺腺がんの遺伝子発現パターンはヒト肺腺がんと非常によく相関することが示されている [45]。さらに変異 *K-ras* が本来の *K-ras* プロモーターの制御下でかつ肺に限局して散発的に発現するという条件が自然発がんに近い、発がんのタイミングを制御でき、投与する Ad-Cre の量により腫瘍数を調節できるなどの利点がある。*K-ras*^{+/*LSL-G12D*} マウスを作成した Jackson らの報告によれば、Ad-Cre 投与後 2 週間で異型腺腫様過形成 (AAH) が発生し、6 週で AAH から腺腫 (adenoma) への移行が認められ、12 週で腺腫が AAH の数を上回り、16 週では AAH はほぼ見られず、腺がんが認められるようになる。またこの期間に一貫して細気管支に上皮過形成 (epithelial hyperplasia of bronchioles; EH) が見られる (図 4B)。EH はがんへの進展を認めず、またこれに相当するヒトの病変は存在しない [44]。

さらにがん抑制遺伝子の欠損マウスを *K-ras*^{+/*LSL-G12D*} マウスと交配させることにより、個々のがん抑制遺伝子の不活化が肺腺がんの発生および進展にどのよ

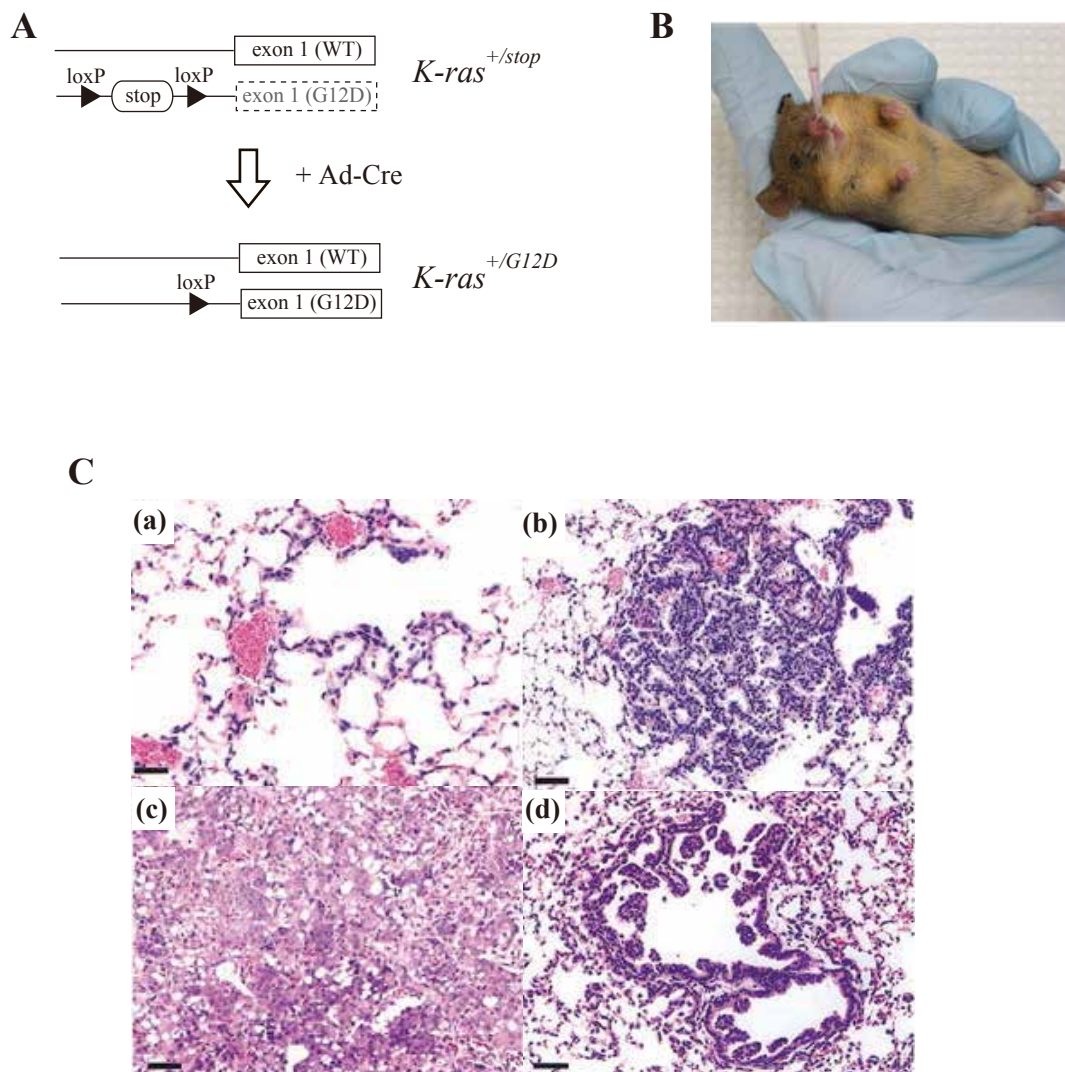


図 4. *K-ras*^{+/LSL-G12D} マウスにおける肺腫瘍の発生 (文献 43 および 45、一部改変)

(A) *K-ras*^{LSL-G12D} アレルの概略図。Cre を発現するアデノウィルスベクター (Ad-Cre) の投与により loxP 配列に挟まれた stop element が除去され、変異 K-ras が発現する。(B) Ad-Cre の経鼻的投与法。麻酔下でウィルス液を鼻腔から吸入させ、気管支および肺胞の上皮細胞へウィルスを感染させる。(C) *K-ras*^{+/LSL-G12D} マウスに発生する腫瘍性病変の病理組織像。(a) Ad-Cre 投与 2 週後に生じた異型腺腫様過形成 (AAH)。(b) Ad-Cre 投与 6 週後に生じた腺腫 (adenoma)。(c) Ad-Cre 投与 16 週後に生じた腺がん (adenocarcinoma)。(d) Ad-Cre 投与 12 週後に生じた、呼吸細気管支 (上) および終末細気管支 (下) に生じた細気管支上皮過形成 (EH)。スケールバーは 50 μ m。

うな役割を果たすかについて解析が行われてきた。例を挙げると、p53 の欠如は腫瘍数の増大、腫瘍の浸潤・転移の促進を起こしたが [47]、RB の欠如は腫瘍の悪性化に関与する一方で細胞増殖には影響を与えなかった [48]。また p16^{Ink4a} および LKB1 の欠如は転移を促進し [49]、PTEN の欠如は腫瘍の増殖、進展を促進した [50] (表 2)。

そこで本研究ではがん抑制遺伝子 *CADMI* の肺腫瘍、特に肺腺がんの抑制における役割について明らかにするために、まず *Cadm1* 遺伝子欠損マウスと *K-ras*^{+/*LSL-G12D*} マウスの交配により *K-ras*^{+/*LSL-G12D*}/*Cadm1*^{-/-} マウスを作成し、生じた肺腫瘍に関して *K-ras*^{+/*LSL-G12D*}/*Cadm1*^{+/+} マウスとの間で比較検討を行った。さらに、肺腫瘍における遺伝子発現解析の結果から *Cadm1* 遺伝子の欠損により発現が変動する遺伝子群の同定を試みた。また、変異 *K-ras* の発現により生じるマウスの肺腫瘍に関して、染色体コピー数変化を有する腫瘍は、コピー数が正常な腫瘍と比較して *Cadm1* の発現が有意に低いことが報告されていることから [51]、*K-ras*^{+/*LSL-G12D*} マウスの肺腫瘍における *CADM1* タンパク質の発現について解析を行った。

表 2. *K-ras*^{+/*LSL-G12D*} マウスと主要ながん抑制遺伝子欠損マウスとの交配により作成されたマウスに発生する肺腫瘍の個数、大きさ、悪性度、転移性、寿命の比較 (文献 47-50)

遺伝子名	個数	大きさ	悪性度	転移	寿命	備考
<i>Trp53</i>	NE ^{*1}	増大	増大	あり	短縮	副鼻腔がんを併発
<i>Rb1</i>	増加	不変	増大	なし	短縮	増殖、アポトーシスに変化なし
<i>p16Ink4a</i>	不変	NE	増大 ^{*2}	あり	不変	<i>Ink4a-Arf</i> ^{-/-} は転移を認めない
<i>Lkb1</i>	増加	NE	増大 ^{*2}	あり	短縮	肺扁平上皮がんを併発
<i>Pten</i> ^{*3}	増加	NE	増大	なし	短縮	肺が肥大化

*1 NE: Not evaluated

*2 論文に記述はないが、転移を起こすことから高悪性度と判断

*3 Ad-Cre を用いず CCSP-Cre Tg マウスを交配させてクララ細胞特異的に Cre を発現

方法

K-ras^{+/*LSL-G12D*}/*Cadm1*^{-/-} マウスの作成

K-ras^{+/*LSL-G12D*} マウスはマサチューセッツ工科大学の Tyler Jacks 博士らのグループにより作製され [44]、ライセンスを購入して使用した。*Cadm1*^{-/-} マウスは所属研究室の先行研究にて作製された exon 1 を欠損したコンベンショナルノックアウトマウスを使用した [38]。*K-ras*^{*LSL-G12D*/*LSL-G12D*} マウスは胎生致死、*Cadm1*^{-/-} マウスは雄性不妊であることに留意して交配を行い、*K-ras*^{+/*LSL-G12D*} /*Cadm1*^{-/-} マウスを得た。遺伝子型の決定は離乳時に採取した尾または耳から抽出した DNA を用い PCR にて行った。*K-ras* アレルの識別には STOP element region forward (5'-AGCTAGCCACAATGGCTTGAGTAAGTCTGCA-3')、Wild type forward (5'-GTCGACAAGCTCATGCGGGTG-3') および Common reverse (5'-CCTTTACAAGCGCACGCAGACTGTAGA-3') を用いた [52]。*Cadm1* 野生型アレルの検出には WT2 forward (5'-TCCCTGTTTGTTCGCCGCTTATCAG-3') および SA7 reverse (5'-TGGCCCCTTCTAAGAAATACCCTC-3')、*Cadm1* ノックアウトアレルの検出には N1 forward (5'-TGCGAGGCCAGAGGCCACTTGTGTAGC-3') および SA5 reverse (5'-CCCAATAAGTCTCATAGAACTGATTGTC-3') を用いた。なおマウスの飼育および遺伝子型の決定は日本チャールズリバー社 (茨城、日本) に委託して行った。また実験に使用したマウスはすべて C57BL6/J および 129Sv 系統がそれぞれ 3:1 に交雑された遺伝子背景を有する。

変異 K-ras による肺腫瘍の形成

K-ras^{LSL-G12D} 変異アレルを有するマウスに Cre 組換え酵素を発現するアデノウイルスベクター (Ad-Cre) を鼻から経気道的に肺へ注入し、気管支および肺胞の上皮細胞へ感染させ、*LoxP* 配列の相同組換えにより変異 K-ras を発現させることにより腫瘍を発生させた。実験は DuPage らのプロトコルに準じて行った [46]。まず Ad-Cre を力価 1.0×10^7 PFU (plaque-forming unit) / mL、CaCl₂ を終濃度 10 mM となるように DMEM (Invitrogen 社、Carlsbad、CA、USA) に加え、室温で 20 分間静置しリン酸カルシウムの沈殿を形成させた。次にトリブロモエタノール (Avertin) を用いてマウスに麻酔を施し、ピペットを用いて片側の鼻孔に 50 μ L のウイルス液 (5.0×10^5 PFU) を滴下し、肺へ吸入させた。Ad-Cre の感染実験後、腫瘍の増殖に起因する衰弱傾向が明らかになった時点で一斉に解剖を行った。なお、これらの実験は万有製薬つくば研究所 (茨城、日本) にて行い、すべての実験手技は万有製薬動物実験委員会にて承認されたものである。

X 線コンピュータ断層撮影 (Computed Tomography: CT)

X 線 CT による肺の断面図の撮影は Fushiki らのプロトコルに準じて行った [53]。マウスに 1-3% イソフルラン/酸素の混合ガスを 2 L/min の流量で投与することにより麻酔を施し、GE eXplore Locus micro-CT scanner (GE Healthcare 社、Buckinghamshire、England) を用いて胸部の X 線 CT を行った。X 線管の設定値

は 80 kV、450 μ A とした。一回約 10 分間の測定で 400 枚の撮影を行い、MicroView analysis + version 2.2 software (GE Healthcare 社) を用いて画像を再構築した。なお、これらの実験は万有製薬つくば研究所にて行い、すべての実験手技は万有製薬動物実験委員会にて承認されたものである。

マウス検体標本作製

肺を含むマウスの主要臓器は解剖時に肉眼的観察を行った後、10% ホルマリン (和光純薬工業株式会社、大阪、日本) にて固定した。肺組織は気管と一塊にして摘出し、気管よりホルマリンを注入して固定した。24 時間室温にてホルマリン固定した後、肺は右肺の 4 葉 (前葉、中葉、後葉、副葉) を分離し、左肺 (前葉のみ 1 葉) は 4 つに横割して合計 8 つに分割した。その後、70% エタノールにて洗浄し、パラフィンブロックを作製した。ブロックは約 3 μ m の厚さで薄切し、顕微鏡パラフィン切片標本作製した。パラフィン切片標本は病理診断用ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色およびエラスチカ・ワンギーソン染色 (EVG) 染色を東京大学医科学研究所病理組織サービス室に依頼して行い、病理専門医の指導のもとに腫瘍性病変の組織およびグレードの分類を行った。マウスの肺腫瘍の組織分類およびグレード分類の基準は表 3 および表 4 に記載した。肺の割断面における腫瘍の面積の測定は Image J ソフトウェアを用いて行った。

表 3. マウス肺腫瘍の組織学的分類 (文献 54)

組織型	定義
上皮過形成	異型を含まない立方細胞、円柱細胞、繊毛細胞、粘液細胞の数の増加。細胞は細気管支あるいは肺胞の正常構造を保つ。
腺腫	肺胞に並ぶ立方ないし円柱細胞からなる限局した領域を指す。大きさは直径 5 mm 以下で元の肺胞の構造を保つ。現存する動物モデルでは多発する傾向にある。線維血管性間質や上皮細胞の丸みが無いいためヒトとマウスでは外見が異なる。小さい腺腫と局所の過形成の区別は難しく、また大きい腺腫と分化の良い腺がんを区別する絶対的な基準は存在しない。
腺がん	腺腫と比較して腺がんはより強い細胞学的異型を示し、分裂の頻度が高く、増殖様式が局所によって異なり、乳頭状の構造が多く、直径 5 mm 以上の大きさを有し、血管、気道、胸膜への浸潤さらにはリンパ行性、血行性の転移を示す。

表 4. マウス肺腫瘍のグレード分類 (文献 47)

グレード	定義
グレード 1	充実性腫瘍を形成するが、正常な核を有するもの。
グレード 2	わずかに不規則な核、わずかに明瞭な核小体を有するもの。
グレード 3	多型性核、鋳型状核、明瞭な核小体を有するもの。
グレード 4	肥大した多形性核、異常分裂、腫瘍性巨細胞を有し、さらに血管侵襲、胸膜侵襲を有するまたは腫瘍細胞が線維形成性の間質細胞に囲まれているもの。

抗体

免疫組織化学およびウェスタンブロット法には以下の抗体を使用した。抗 SPC (FL-197)、Actin (C-2) 抗体は Santa Cruz Biotechnology 社 (Santa Cruz, CA, USA) より、抗 CCSP 抗体は Upstate Biotechnology 社 (Lake Placid, NY, USA) より、抗 Sox2 抗体は Seven Hills Bioreagents 社 (Cincinnati, OH, USA) より、抗 SynCAM (CADM1) 抗体は Sigma-Aldrich 社 (St. Louis, MO, USA) より購入した。ウサギポリクローナル抗体である抗 CADM1 抗体 (C-18) は、CADM1 の C 末端の 18 ペプチドをハプテン、keyhole limpet hemocyanin (KLH) をキャリアーとしてウサギに対して免疫し、アフィニティーカラム (旭硝子, 東京, 日本) で精製することにより作製した [55]。ウェスタンブロットの 2 次抗体として用いたホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) 標識抗体は GE Healthcare 社より購入した。

免疫組織化学的解析

各マウス肺腫瘍のパラフィン切片標本に対し、65°C で 30 分間静置した後、キシレンに浸してパラフィンを除去し、続いてエタノールに浸してキシレンを除去し、さらに 5 分間水洗した。その後 HISTOFINE pH9 (ニチレイバイオサイエンス社, 東京, 日本) に浸しオートクレーブで 121°C、20 分間処理して抗原を賦活化した。室温に戻した後、0.3% H₂O₂/H₂O に室温で 30 分浸すことにより内因性ペルオキシダーゼを除去した。次に、非特異的反応を抑えるために 5% 正常

ロバ血清 (NDS) /PBS-T (0.1% Tween20/PBS) を加え室温で 30 分間反応させた。

一次抗体の希釈液には 1% NDS/PBS-T を用い、抗 SynCAM (CADM1) 抗体は 1:5000、抗 CCSP 抗体は 1:1000、抗 SP-C 抗体は 1:500、抗 Sox2 抗体は 1:1000 の濃度で希釈し、4°C にて 12 時間反応させた。PBST を用いて洗浄後、Labeled Polymer (DAKO ENVISION kit/HRP、DAKO 社、Glostrup、Denmark) をそれぞれのプレパラートへ滴下し室温で 1 時間反応させた。さらに PBS-T にて洗浄し、Liquid DAB diluted Mix Buffered Substrate (DAKO 社) で発色させた。最後にヘマトキシリンで対比染色を行い、マリノールを用いて封入した。

肺腫瘍における CADM1 の発現の判定は、各標本においてがんが最も浸潤した部位で判定した。また盲検対策として、全ての免疫組織化学的解析が終了した後に各肺腫瘍の病理診断との照合を行い、病理診断の結果が免疫組織化学の結果に影響を及ぼさないように配慮した。

マイクロアレイ解析

肺腫瘍および正常肺組織は切除後迅速に RNA Stabilization Reagent (QIAGEN 社) に浸して保存し、total RNA を RNeasy Mini Kit (QIAGEN 社) を用いて推奨条件に従って抽出した。マイクロアレイは Whole Mouse Genome 4×44K (Agilent 社、Santa Clara、CA、USA) を用いて一色法で行い、RNA のラベル化、ハイブリダイゼーション、スキャンは株式会社 DNA チップ研究所 (横浜、日本) に委託し

て行った。生データは R ソフトウェアを用いて全プローブの 75 percentile 値にてサンプル間の補正を行い、また各遺伝子の発現のサンプル間でのばらつきを中央値が 0、標準偏差が 1 となるように正規化を行った。階層的クラスタリングの計算は Cluster 3.0 ソフトウェアを、ヒートマップの描画は Java Treeview ソフトウェアを用いて行った。

リアルタイム定量的 PCR

マウスの肺腫瘍の total RNA を RNeasy Mini Kit (Qiagen Science 社, Germantown, MD, USA) を用いて抽出し、Transcriptor 1st strand cDNA Synthesis Kit (Roche 社, Basel, Switzerland) を用いて一本鎖 cDNA の合成を行った。リアルタイム定量的 PCR は FastStart Universal SYBR Green Master (Roche 社) を用いて LightCycler® (Roche 社) にて行った。PCR は、95°C 10 分間の変性に続いて 95°C 10 秒、60°C 30 秒の反応を 55 回繰り返すという条件で行った。定量分析は Light Cycler® Software Ver. 3.5 を使用し Second Derivative Maximum 法にて行い、目的遺伝子 (*Pbk* および *Ccnb1*) の測定値を *Gapdh* の測定値で補正した相対値を用いて比較を行った。なお、各々の遺伝子の検出に用いた PCR プライマーの配列は、*Pbk* forward (5'-AAATGCGCGCGCCCTAAACG-3'), *Pbk* reverse (5'-CGCTGACCCCAGTCCCAAAGC-3'), *Ccnb1* forward (5'-AGGGTCGTGAAGTGAAGTGGAAAC-3'), *Ccnb1* reverse (5'-TTGGGCACACAAGTGTCTGC-3'), *Gapdh* forward (5'-CCACT

CTTCCACCTTCGATG-3'), Gapdh reverse (5'-GGAGGGAGATGTCAGTGTTG-3')
である。

ウェスタンブロット法

K-ras^{+/*LSL-G12D*} マウスから切り出した肺腫瘍における CADM1 のタンパク質の発現をウェスタンブロット法にて解析した。腫瘍および正常肺組織約 20 mg に Homogenization buffer [50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 200 μ M AEBSF, 10 μ M leupeptin, 1 μ M pepstatin A, 1 mM DTT] を加え氷上にてポッター型ホモジナイザーを用いてホモジナイズを行い、600 \times g にて 4°C で 10 分間遠心し上清を回収した。上清の一部を Protein Assay Reagent (Bio-Rad 社, Hercules, CA, USA) と混合し、595 nm における吸光度を Model 680 Microplate Reader (Bio-Rad 社) で測定し、濃度を定量した。上清に 3 \times SDS sample buffer [0.2 M Tris-HCl (pH 6.8), 30% glycerol, 6% SDS, 15% β -ME, 0.03% BPB] を加えて 100°C で 5 分間煮沸し、氷上で急冷することによりウェスタンブロット用の試料を得た。SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) には濃度 7.5% のゲルを使用し、各レーンに試料を 10 μ g ずつ注入した後、SDS-PAGE electrode buffer (25 mM Tris, 0.2 M Glycine, 0.1% SDS) にて定電流 15 mA で約 15 分間、続いて 30 mA で約 60 分間電気泳動を行った。ブロッティングにはセミドライ方式を用い、あらかじめメタノール、続いて Transfer buffer (50 mM Tris, 40

mM Glycine, 20% メタノール, 0.1% SDS) に浸した PVDF 膜へトランスブロット SD セル (Bio-Rad 社) にて定電流 100 mA で 50 分間ブロッティングした。次に PVDF 膜を 5% スキムミルク/PBS-T に浸してブロッキングを行った。一次抗体は 1% スキムミルク/PBS-T を用いて以下の濃度で希釈し、室温で約 1 時間反応させた。ウサギポリクローナル抗 CADM1 抗体 (C-18) は 1: 3000, ヤギポリクローナル抗 GAPDH 抗体は 1:1000 とした。PBS-T で 3 回洗浄した後、二次抗体として各々の動物種の HRP 標識抗 IgG 抗体を 1% スキムミルク/PBS-T で 1: 2000 に希釈して加え、室温で約 1 時間反応させた。再び PBS-T で 3 回洗浄した後、ECL™ Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare 社) および Amersham Hyperfilm™ ECL (GE Healthcare 社) を用いて検出を行った。

統計解析

データは統計ソフトウェア R (<http://www.R-project.org>) を用いて解析を行った。

全ての検定において P 値が 0.05 未満の場合に有意差ありと判定した。

結果

$K-ras^{+/LSL-G12D}/Cadm1^{-/-}$ マウスは $K-ras^{+/LSL-G12D}$ マウスよりも肺表面に大きい腫瘍を生じる。

CADM1 が肺腫瘍抑制にどのような役割を果たしているか明らかにするため、 $Cadm1^{-/-}$ マウスと肺腺がんのモデルマウスである $K-ras^{+/LSL-G12D}$ マウスを交配し、発生させた肺腫瘍について解析を行った。実験には 4 種類の遺伝子型のマウス、即ち $K-ras^{+/LSL-G12D}/Cadm1^{+/+}$ (n = 10)、 $K-ras^{+/LSL-G12D}/Cadm1^{-/-}$ (n = 11) 及びコントロールとして $K-ras^{+/+}/Cadm1^{+/+}$ (n = 4)、 $K-ras^{+/+}/Cadm1^{-/-}$ (n = 8) マウスを用意した。これらのマウスが 6 週齢に達した時点で、 5.0×10^5 PFU の Cre 発現アデノウィルスベクター (Ad-Cre) を経鼻的に肺へ投与した。その後 4 週おきに CT 画像の撮影を行って肺腫瘍の増殖をモニターし (図 5A)、腫瘍が大きくなり一部の個体に衰弱が見られ始めた 25 週目に予定解剖して肺腫瘍を比較検討した。ただし、Ad-Cre を投与する際の麻酔あるいは CT 撮影時の麻酔の影響により $K-ras^{+/LSL-G12D}/Cadm1^{+/+}$ マウス 1 匹、 $K-ras^{+/LSL-G12D}/Cadm1^{-/-}$ マウス 3 匹が死亡し、また $K-ras^{+/LSL-G12D}/Cadm1^{-/-}$ マウス 1 匹が予定解剖前の 21 週目に衰弱死したためこれらの個体は解析から除いた。なお 21 週目において死亡したマウスは、解剖の結果肺全体に多数の腫瘍および強い炎症が認められたため、がん死または肺炎による死亡であると考えられた。

$K-ras^{LSL-G12D}$ アレルを持たない $K-ras^{+/+}/Cadm1^{+/+}$ および $K-ras^{+/+}/Cadm1^{-/-}$ 両

遺伝子型のマウスには全例において肺腫瘍を認めなかった。一方で、 $K-ras^{+/LSL-G12D}/Cadm1^{+/+}$ マウスは 9 匹中 8 匹、 $K-ras^{+/LSL-G12D}/Cadm1^{-/-}$ マウスは 7 匹中 6 匹において肺の表面に多数の腫瘍を認めた。 $K-ras^{LSL-G12D}$ アレルを有するにもかかわらず腫瘍を生じなかったマウスは、Ad-Cre の投与に失敗したものと考え、解析から除外した。したがって、最終的に解析可能な個体は $K-ras^{+/LSL-G12D}/Cadm1^{+/+}$ マウス 8 匹、 $K-ras^{+/LSL-G12D}/Cadm1^{-/-}$ マウス 6 匹であった。なお、以降簡単のため $K-ras^{+/LSL-G12D}/Cadm1^{+/+}$ マウスを「K マウス」、 $K-ras^{+/LSL-G12D}/Cadm1^{-/-}$ マウスを「KC マウス」と呼ぶこととする。

まず K マウスおよび KC マウスの肺表面に認められた腫瘍について肉眼的観察を行ったところ、腫瘍は透明で境界明瞭な膨隆型であり、周囲には強い炎症が認められた (図 5B)。腫瘍の個数は 1 匹あたり K マウスが 6.1 ± 2.7 個、KC マウスが 8.5 ± 2.6 個であり、統計学的有意差は認められなかった ($p = 0.12$; t -test、図 5C)。腫瘍の大きさを腫瘍長径で比較すると K マウスが 1.5 ± 1.7 mm ($n = 49$ 、中央値 1.0 mm)、KC マウスが 2.5 ± 2.5 mm ($n = 51$ 、中央値 2.0 mm) となり、KC マウスの肺表面に生じた腫瘍の方が有意に大きかった ($p = 0.002$; Wilcoxon rank sum test、図 5D)。なお、鼻腔から気管にかけての気道の上皮細胞にも Ad-Cre が感染していると考えられるが、腫瘍は肺においてのみ認められた。また、肺以外の主要臓器への明らかな転移は認められなかった。

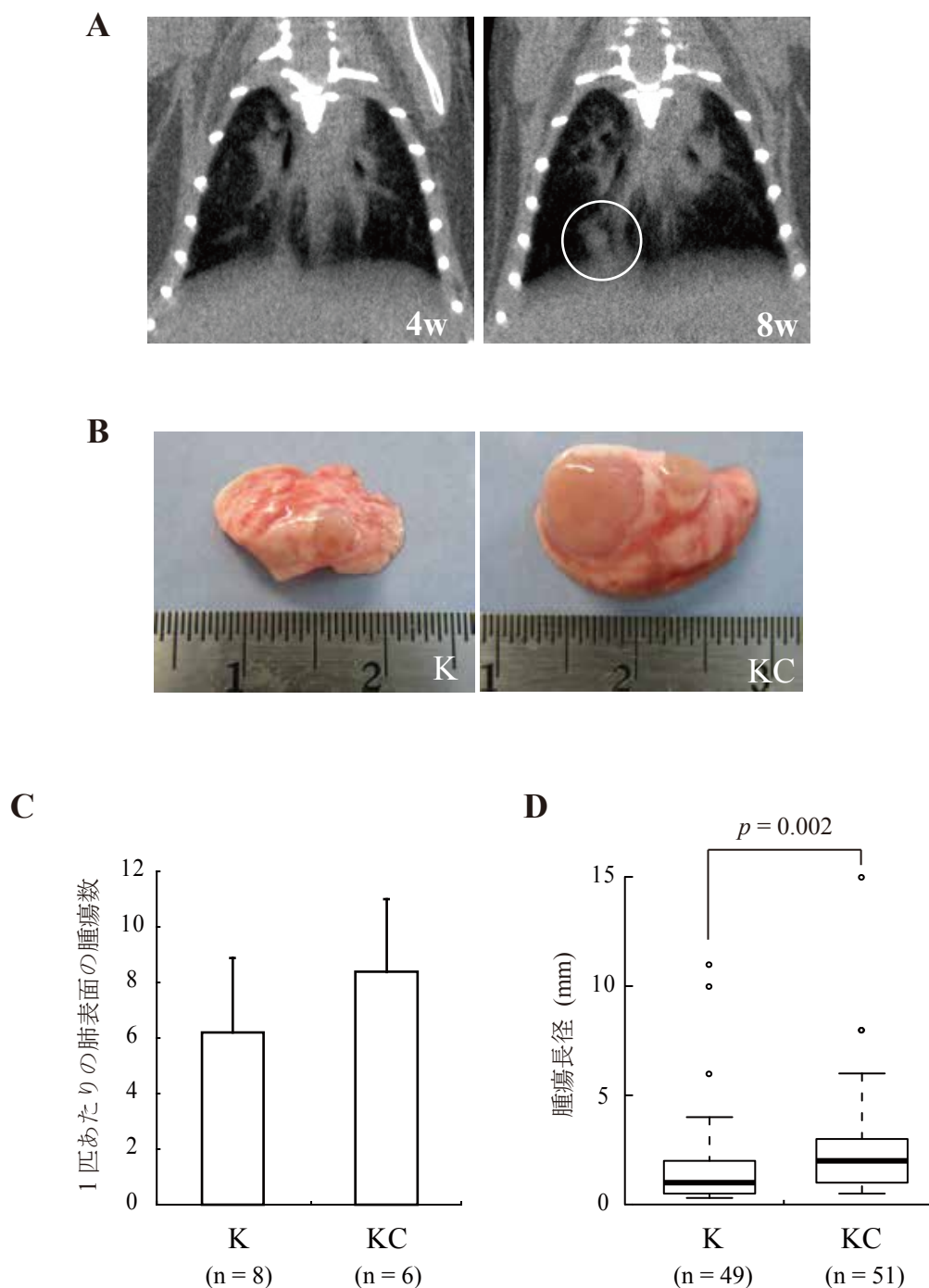


図 5. K マウスおよび KC マウスの肺表面に生じた腫瘍の個数、大きさに関する比較

(A) Cre 発現アデノウィルスベクター投与後 4 週および 8 週における KC マウスの肺の CT 画像。8 週目の画像において気管支末端に変異が見られた (丸印)。(B) K マウスおよび KC マウスに生じた肺腫瘍。膨隆性で境界明瞭な腫瘍であり、周囲への明らかな浸潤は見られない。また肺全体に強い炎症が認められる。(C) 肺表面の腫瘍数に有意差は認められなかった ($p = 0.11$, t test)。(D) 腫瘍長径は KC マウスに生じた腫瘍の方が有意に大きかった ($p = 0.002$, Wilcoxon rank sum test)。

K-ras^{+/*LSL-G12D*}/*Cadm1*^{-/-} マウスに生じる腺腫・腺がんは *K-ras*^{+/*LSL-G12D*} マウスと比較して大きく悪性度が高い一方で、細気管支上皮過形成は小さい。

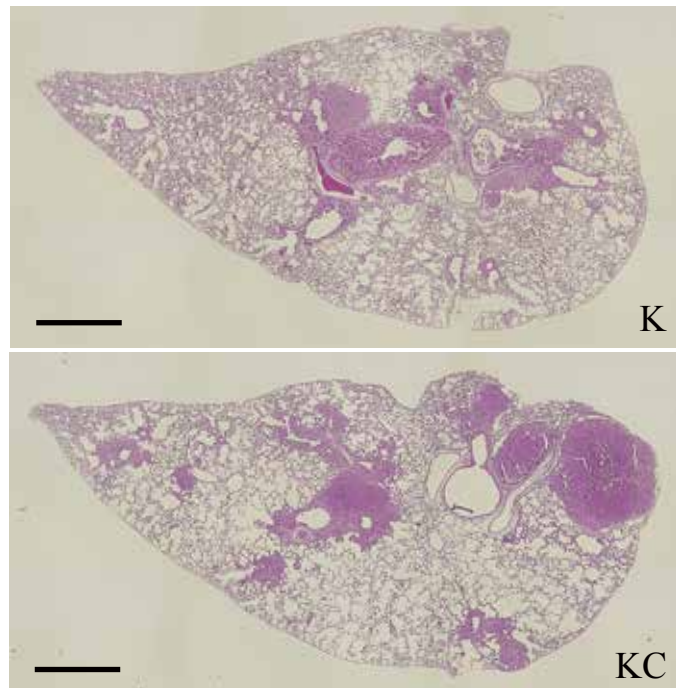
続いて肺の HE 染色標本の顕微鏡観察を行った。*K-ras*^{+/*LSL-G12D*} マウスに生じる腫瘍性病変は肺胞に生じる異型腺腫様過形成 (atypical adenomatous hyperplasia; AAH)、腺腫 (adenoma)、腺がん (adenocarcinoma) と細気管支に生じる細気管支上皮過形成 (epithelial hyperplasia of bronchioles; EH) に分類され [44]、これに従って K マウスと KC マウスに認められた腫瘍性病変を区分し、それぞれについて比較検討を行った。

ここで、ヒトとマウスの腫瘍性病変の性質の違いについて説明する。ヒトの肺における AAH は腺がんの前がん病変として捉えられているが、肺腺腫は進行が緩徐であり肺腺がんに至る症例は少ないと考えられている [56]。一方で、*K-ras*^{+/*LSL-G12D*} マウスでは Ad-Cre 投与後の経時的な観察から、AAH が肺腺腫を経て肺腺がんに至ることが示唆されている [44]。加えて、マウスの EH に相当するヒトの病変は存在せず、EH はがんへ進行しないと考えられている [44]。

K マウスおよび KC マウスにおける肺の腫瘍性病変について観察したところ、主として腺腫・腺がんおよび EH が認められた (図 6A)。ここで、マウスの腺腫と腺がんの区別には絶対的な基準が存在しないため、区別が必要な場合を除いて腺腫・腺がんと併記するものとする。

腺腫・腺がん と EH を明瞭に判別するために、肺胞上皮に存在する肺胞 II 型

A



B

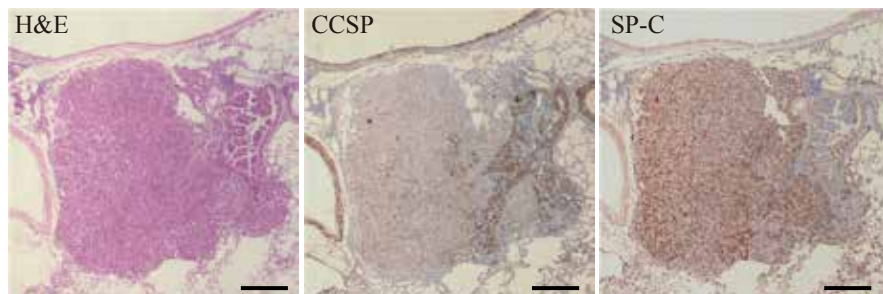


図 6. 細気管支上皮過形成と腺腫・腺がんの判別

(A) K マウスと KC マウスの肺の断面の HE 染色標本。気管支内部に乳頭状に増殖する細気管支上皮過形成と、肺胞に実質組織として広がる腺腫・腺がんの 2 種類の病変が存在する。HE 染色は核を青紫色、細胞質を赤色に染色する。Bar: 1 mm。 (B) 細気管支上皮過形成と腺腫が隣接している腫瘍の拡大図。SPC および CCSP の染色性は相互排他的であり、気管支の腫瘍と肺胞の腫瘍を明確に区別できる。Bar: 50 μ m。

細胞のマーカー Surfactant Protein C (SPC/Sftpc) および気管支上皮に存在するクララ細胞のマーカー Clara cell secretory protein (CCSP、別名 CC10/CCA/Scgb1a1) を免疫組織化学にて検出した。SPC および CCSP の染色性は相互排他的であり、腺腫・腺がんは SPC (+)/CCSP (-)、EH は SPC (-)/CCSP (+) として区別された (図 6B)。そこで K マウスおよび KC マウスの肺に生じた腫瘍性病変を SPC および CCSP の染色性により腺腫・腺がんおよび EH に分類し、HE 染色標本における個数および面積を測定した。

まず腺腫・腺がんについて、個数は 1 標本あたり K マウスが 20.4 ± 12.2 個、KC マウスが 32.7 ± 15.6 個であり、統計学的有意差は認められなかった ($p = 0.17$; t -test、図 7A)。腫瘍の面積は K マウスが $0.261 \pm 0.558 \text{ mm}^2$ ($n = 174$ 、中央値 0.098 mm^2)、KC マウスが $0.455 \pm 0.865 \text{ mm}^2$ ($n = 196$ 、中央値 0.217 mm^2) となり、KC マウスの方が有意に大きい腺腫・腺がんを生じた ($p = 5.7 \times 10^{-10}$; Wilcoxon rank sum test、図 7B)。さらに Jackson らの報告 [47] をもとに腺腫・腺がんの組織学的異型度を 1~4 の 4 段階のグレードで評価したところ、KC マウスの腫瘍の方が有意に高いグレードを示し、より悪性度の高い腫瘍であった ($p = 5.0 \times 10^{-3}$; Wilcoxon rank sum test、図 7C、7D)。また腫瘍細胞の浸潤を EVG 染色標本にて確認したところ、血管侵襲および胸膜侵襲が KC マウスにおいてのみ認められた (図 7E)。

次に EH について、個数は 1 標本あたり K マウスが 30.7 ± 5.9 個、KC マウス

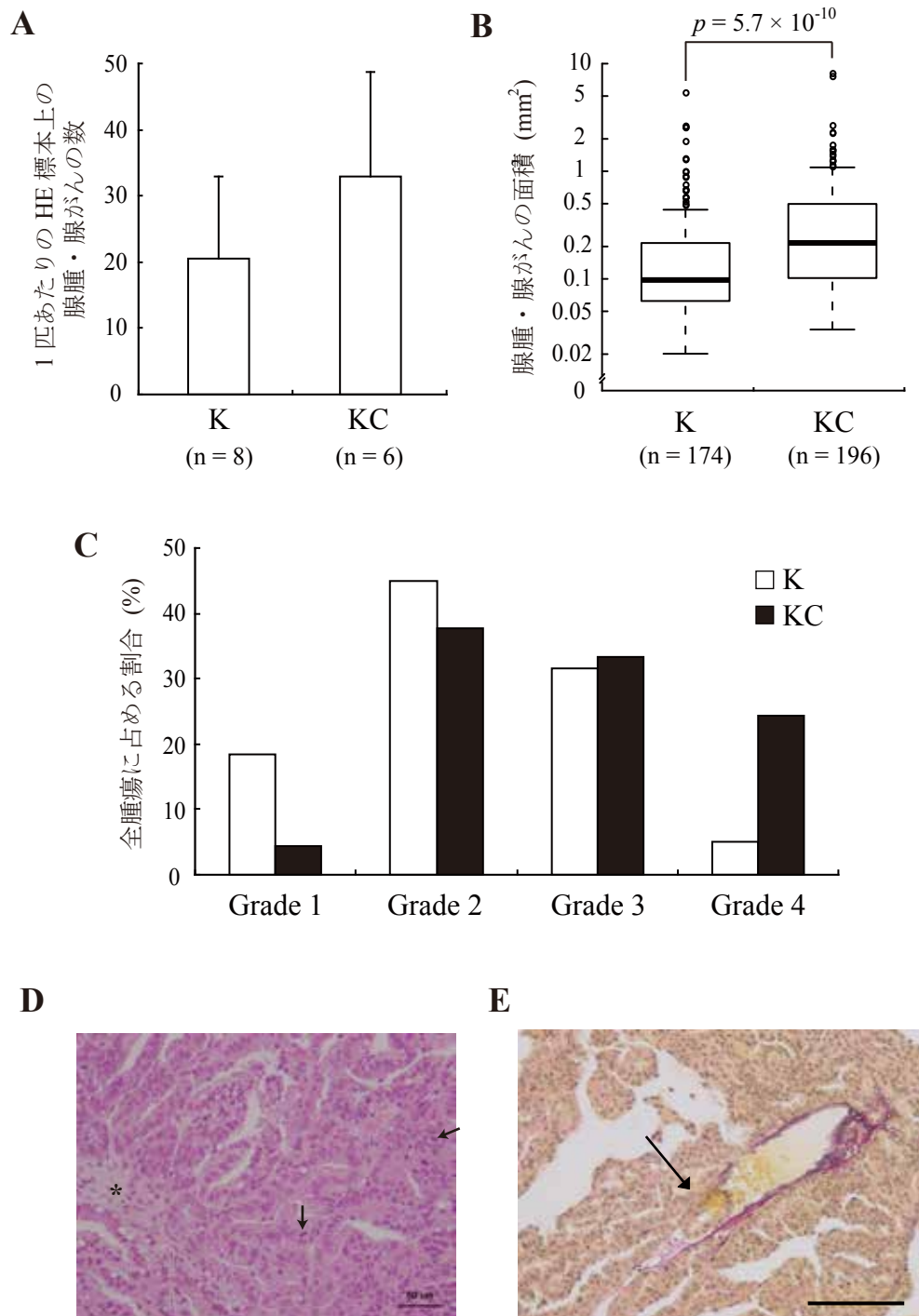


図 7. K マウス、KC マウスに生じた腺腫・腺がんの個数、大きさ、悪性度に関する比較
(A) マウス 1 匹あたりの腺腫・腺がんの個数。**(B)** 腺腫・腺がんの面積は K マウスより KC マウスの方が有意に大きい。**(C)** 腺腫・腺がんのグレードは K マウスより KC マウスの方が有意に高い。**(D)** 代表的なグレード 4 の腫瘍の HE 染色標本。異常分裂像 (矢印) および線維形成性の間質 (*) を認める。Bar: 50 μ m。**(E)** グレード 4 の腫瘍の EVG 染色標本。腫瘍細胞の血管への浸潤が認められる (矢印)。EVG 染色では弾性線維が黒紫色、膠原線維が赤色、細胞質が黄色、核が黒色に染色される。Bar: 100 μ m。

が 22.3 ± 17.3 個であり、統計学的有意差は認められなかった ($p = 0.29$; t -test、図 8A)。過形成の面積は K マウスが $0.123 \pm 0.141 \text{ mm}^2$ ($n = 184$ 、中央値 0.071 mm^2)、KC マウスが $0.084 \pm 0.104 \text{ mm}^2$ ($n = 134$ 、中央値 0.053 mm^2) となり、K マウスの方が有意に大きい EH を生じた ($p = 1.3 \times 10^{-3}$; Wilcoxon rank sum test、図 8B)。

以上の結果から、KC マウスに生じる腫瘍性病変に関して、腺腫・腺がんは K マウスより大きい一方で EH は K マウスより小さいことが示唆された。

***K-ras*^{+/*LSL-G12D*}/*Cadm1*^{-/-} 肺腫瘍と *K-ras*^{+/*LSL-G12D*} 肺腫瘍との Sox2 発現比較**

K マウスに生じる EH が KC マウスと比較して大きいという事実は、*Cadm1* のがん抑制遺伝子としての機能と矛盾するように思われた。そこで、まず EH の発症機序および腺腫・腺がんとの関連性について検討した。

K-ras^{+/*LSL-G12D*} マウスに生じる腺腫・腺がんについては詳細な解析が行われており、その起源は肺胞 II 型細胞 (alveolar type II cells) および細気管支肺胞幹細胞 (bronchioalveolar stem cells; BASCs) であることが示されている [7,57,58]。肺胞 II 型細胞は、自身が分化して生じる肺胞 I 型細胞とともに肺胞上皮を形成している。BASC は細気管支肺胞道接合部 (bronchioalveolar duct junction) に存在する SPC、CCSP 共陽性の細胞として定義され、気管支上皮と肺胞上皮両方への分化能を有する幹細胞様の細胞である。一方で EH は末梢の細気管支 (終末細気管支および呼吸細気管支) に生じ、起源細胞は BASC もしくは末梢の細気管

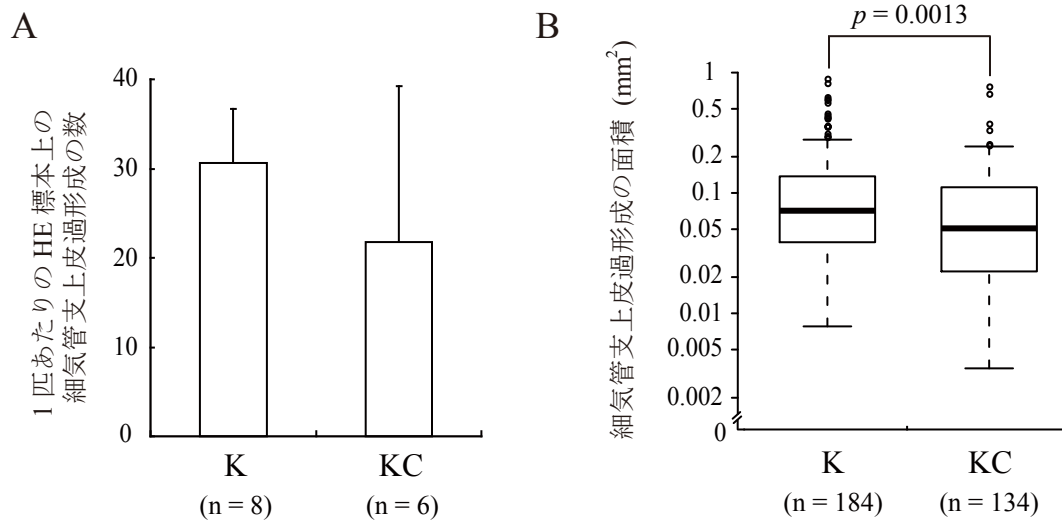


図 8. K マウス、KC マウスに生じた細気管支上皮過形成の個数、大きさに関する比較
(A) マウス 1 匹あたりの細気管支上皮過形成の個数。 **(B)** 細気管支上皮過形成の面積は KC マウスより K マウスの方が有意に大きい。

支に存在する一部のクララ細胞であると考えられている [57,59]。クララ細胞は気管支全体に分布している粘液細胞であり、自身が分化して生じる繊毛細胞とともに気管支上皮を形成している。

K マウス、KC マウスに発生した EH および腺腫・腺がんの起源細胞を明らかにするためには、識別のためのマーカーが必要である。過去の報告からマーカーの候補を探したところ、EH に関しては報告を見つけることができなかったが、腺腫・腺がんに関しては Sox2 の発現により起源細胞を識別し得ると考えられた。Xu らは、Sox2 は気管支上皮に発現する一方で肺胞上皮には発現を認めず、*CCSP-Cre/K-ras^{+/LSL-G12D}* マウスに生じる（主に BASC を起源とする）腺がんは *SPC-Cre/K-ras^{+/LSL-G12D}* マウスに生じる（肺胞 II 型細胞または BASC を起源とする）腺がんと比較して Sox2 を高発現することを報告している [57]。ゆえに BASC から生じた腺腫・腺がんは肺胞 II 型細胞由来のものと比較して Sox2 の発現が高いことが示唆される。したがって Sox2 の染色性により腺腫・腺がんの起源を判別することができると予想された。

K マウスおよび KC マウスの肺腫瘍標本に関して抗 Sox2 抗体を用いて免疫染色を行ったところ、正常な気管支上皮は陽性であるのに対し肺胞上皮は陰性であり、腫瘍性病変では全ての EH および一部の腺腫・腺がんが陽性であった (図 9A)。まず Sox2 陽性の腫瘍性病変の総面積を測定したところ、1 匹あたり K マウスでは $3.92 \pm 2.56 \text{ mm}^2$ (n = 8)、KC マウスでは $3.92 \pm 2.30 \text{ mm}^2$ (n = 6) であ

り、両者の面積はほぼ同等であった (図 9B)。続いて Sox2 陽性の腺腫・腺がんに着目して面積を測定したところ、1 匹あたり K マウスでは $0.105 \pm 0.169 \text{ mm}^2$ ($n = 8$)、KC マウスでは $0.740 \pm 0.777 \text{ mm}^2$ ($n = 6$) であり、KC マウスの方が有意に大きい Sox2 陽性の腺腫・腺がんを生じた ($p = 0.043$; t -test、図 9C)。

以上の結果から、EH と Sox2 陽性の腺腫・腺がんを合わせた腫瘍性病変の大きさは K マウスと KC マウスの間でほぼ等しいが、Sox2 陽性の腺腫・腺がんのみに着目すると KC マウスの方が大きいことが示唆された。すなわち、BASC から生じる腫瘍性病変の大きさに関して K マウスと KC マウスの間に差はほとんどないが、腺腫・腺がんの大きさは KC マウスの方が有意に大きいことから BASC から生じる腺腫・腺がん と EH との間の生育競争 (growth competition) の結果として、KC マウスにおける EH が K マウスより小さくなる可能性が考えられた。

***K-ras*^{+/*LSL-G12D*} マウスに生じる肺腫瘍のうち、*CADM1* の発現が低下している腫瘍はサイズが大きく悪性度が高い。**

マウスの肺における *K-ras*^{G12D} 変異により生じる肺腫瘍に関して、染色体コピー数変化を有する腫瘍とコピー数が正常な腫瘍における遺伝子発現をマイクロアレイにて比較した場合に、コピー数変化を有する腫瘍において *Cadm1* の発現が低いことが報告されている [51]。そこで *K-ras*^{+/*LSL-G12D*} マウスの肺腫瘍におけ

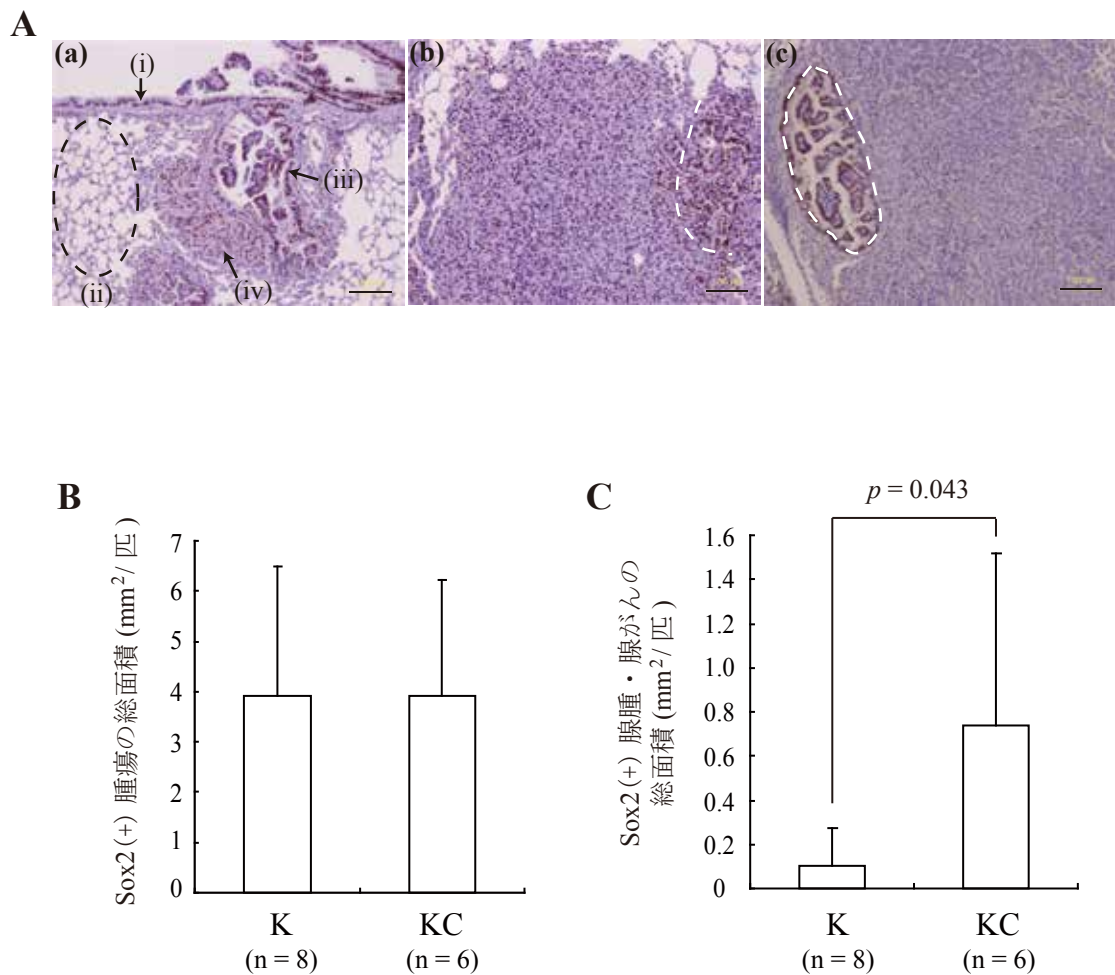


図 9. Sox2 の免疫組織化学的解析

(A) (a) Sox2 の発現は正常な気管支上皮に認められるが (i)、肺胞上皮には認められない (ii)。Sox2 は細気管支の腫瘍 (iii)、またそれに隣接する肺胞の腫瘍 (iv) において発現が見られる。(b) KC マウスに発生した Sox2 陽性の肺胞の腫瘍。(c) KC マウスに発生した Sox2 陰性の肺胞の腫瘍。白い点線は細気管支と肺胞の境界を示す。Bar: 100 μ m。(B) マウス 1 匹あたりの Sox2 陽性の腫瘍の面積。(C) マウス 1 匹あたりの Sox2 陽性の腺腫・腺がんの面積は K マウスより KC マウスの方が有意に大きい。

る CADM1 タンパク質の発現を評価するため、免疫組織化学的解析を行った。

CADM1 は正常な気管支上皮と肺胞上皮の両方に発現を認めた。腫瘍性病変では細気管支上皮過形成ではほぼ全例において細胞膜に発現が見られたが、腺腫・腺がんでは一部に発現低下または欠如を認めた (図 10A)。そこで腺腫・腺がんに関し、周囲の非がん部と比較して CADM1 の発現が同等である群 (CADM1^{high}) と低下している群 (CADM1^{low}) の 2 群に分類した。CADM1 の発現低下は 37.3% (28/75) の腺腫・腺がんにおいて見られた。腫瘍の面積を 2 群間で比較したところ、CADM1^{low} 群の腺腫・腺がんの方が有意に大きいことが示唆された ($p=7.6 \times 10^{-4}$; Wilcoxon rank sum test、図 10B)。加えて、解剖時に切り出した HE 標本には含まれない腫瘍に関しても CADM1 の発現低下がウェスタンブロットにより示唆された (図 10C)。さらに組織学的異型度を 2 群間で比較したところ、CADM1^{low} 群の腺腫・腺がんの方が有意に高いグレードを示した ($p=4.2 \times 10^{-5}$; Fisher's exact test、図 10D)。

以上の結果から、*K-ras*^{+/*LSL-G12D*} マウスに発生する肺腺腫・腺がんにおいて CADM1 は高頻度に発現の低下を認め、その傾向は特にサイズが大きく組織学的異型度の高い腫瘍において顕著であることが示された。

肺腫瘍に加齢がもたらす影響

ヒトの肺がんは年齢に比例して罹患率が上昇することが知られているが [60]、

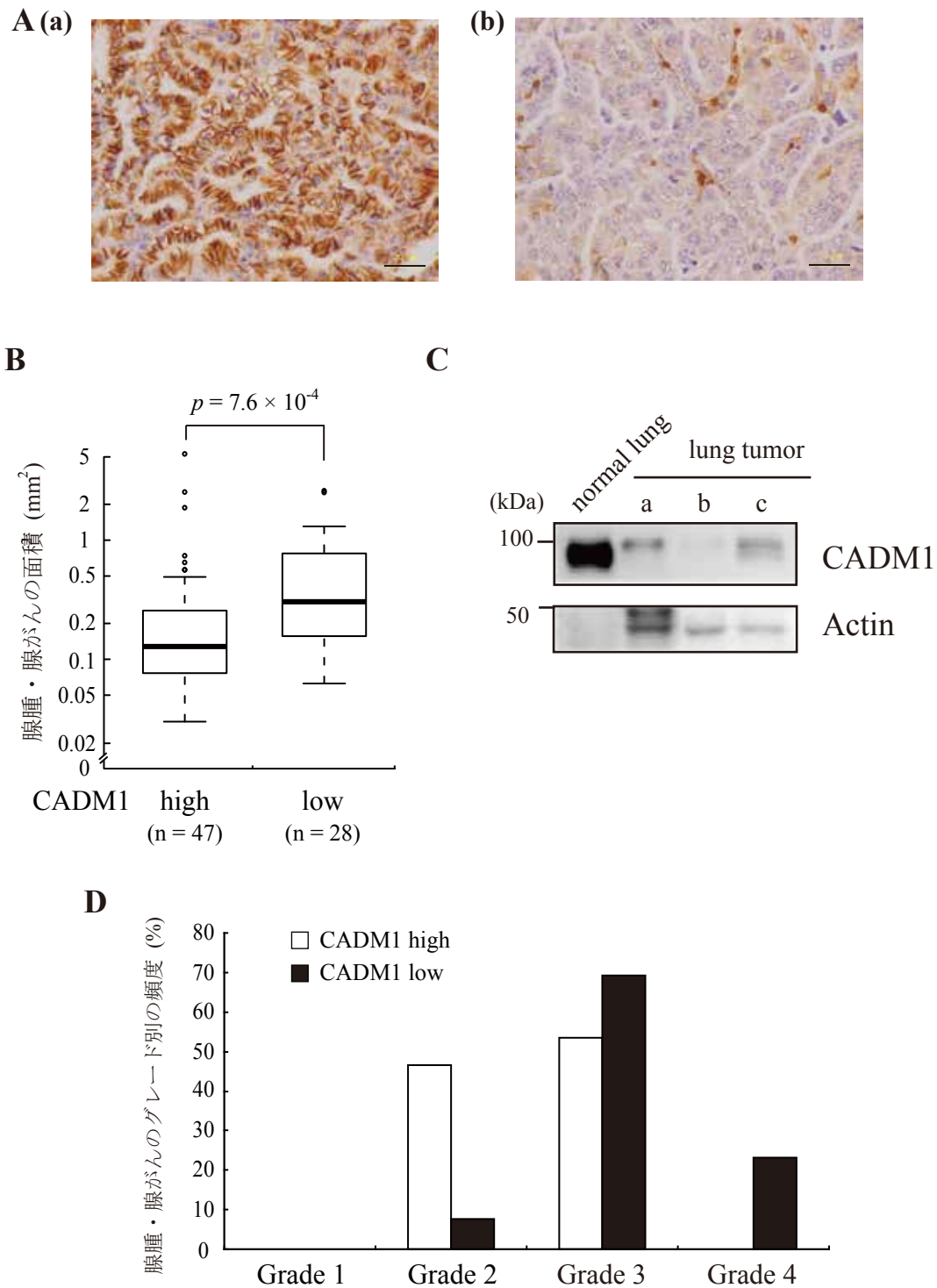


図 10. K マウスに生じた腺腫・腺がんにおける CADM1 の発現と大きさ、悪性度との相関
(A) K マウスに生じた腺腫・腺がんにおける CADM1 の免疫組織化学的解析。多くの腺腫・腺がんにおいて CADM1 は細胞膜に発現を認めたが **(a)**、一部に発現の低下または欠如を認めた **(b)**。Bar: 20 μm 。 **(B)** CADM1 の発現が低い腺腫・腺がんは、発現の高いものと比べて有意に面積が大きかった。 **(C)** K マウスの肺から切り出した 3 つの腫瘍 **(a, b, c)** からタンパク質を抽出し、各サンプル 10 μg を用いてウェスタンブロットを行った。正常な肺組織と比べて腫瘍において CADM1 タンパク質の発現低下が認められた。 **(D)** CADM1 の発現が低い腺腫・腺がん (CADM1 low) は、発現の高いもの (CADM1 high) と比べて有意にグレードが高かった。

実験に用いたモデルマウスは 6 週齢と若く加齢の影響を考慮していない。そこで、モデルマウスにおける肺腫瘍の発生をヒトでの生理的条件に近づけることを目的とし、6 か月齢のマウスを用いて実験を行った。4 種類の遺伝子型 $K-ras^{+/LSL-G12D}/Cadm1^{+/+}$ (n = 8)、 $K-ras^{+/LSL-G12D}/Cadm1^{-/-}$ (n = 12)、 $K-ras^{+/+}/Cadm1^{+/+}$ (n = 8)、 $K-ras^{+/+}/Cadm1^{-/-}$ (n = 9) マウスを用意し、 5.0×10^5 PFU の Cre 発現アデノウィルスベクター (Ad-Cre) を経鼻的に肺へ投与後 4 週おきに CT 画像の撮影を行って肺腫瘍の増殖をモニターした。腫瘍が大きくなり一部の個体に衰弱が見られ始めた 16 週目に予定解剖して肺腫瘍を比較検討した。ただし、 $K-ras^{+/LSL-G12D}/Cadm1^{-/-}$ マウス 1 匹が 3 週目に死亡し、 $K-ras^{+/LSL-G12D}/Cadm1^{+/+}$ マウス 3 匹が 12 週目における CT 撮影時の麻酔の影響により死亡したため、これらの個体は解析から除いた。 $K-ras^{LSL-G12D}$ アレルを持たないマウスに関して $K-ras^{+/+}/Cadm1^{+/+}$ マウス 1 匹に腫瘍の自然発生が 1 つ認められたが、他の個体には腫瘍を認めなかった。一方で $K-ras^{LSL-G12D}$ アレルを有するマウスはすべて肺腫瘍を発生し、解析可能な個体は $K-ras^{+/LSL-G12D}/Cadm1^{+/+}$ マウス 5 匹、 $K-ras^{+/LSL-G12D}/Cadm1^{-/-}$ マウス 11 匹であった。なお、前項までに示した 6 週齢のマウスに Ad-Cre を投与し 25 週後に解剖した実験を「実験 1」、本項に示す 6 か月齢のマウスに Ad-Cre を投与し 16 週後に解剖した実験を「実験 2」と呼ぶこととする。

まず K マウスおよび KC マウスの肺表面に認められた腫瘍について肉眼的観察を行ったところ、境界が明瞭な腫瘍と不明瞭なびまん性の腫瘍の両方が認め

られた (図 11A)。腫瘍の個数は 1 匹あたり K マウスが 5.8 ± 3.2 個、KC マウスが 5.0 ± 2.2 個であった ($p = 0.57$; t -test、図 11B)。腫瘍の大きさを腫瘍長径で比較すると K マウスが 2.0 ± 1.7 mm ($n = 29$ 、中央値 1.5 mm)、KC マウスが 2.3 ± 2.7 mm ($n = 55$ 、中央値 1.0 mm) となり、両マウスの間に有意な差は存在しなかった ($p = 0.98$; Wilcoxon rank sum test、図 11C)。なお、腫瘍は肺においてのみ認められ、主要臓器への明らかな転移は認められなかった。

続いて HE 標本の顕微鏡観察を行い、腺腫・腺がんについて解析した。個数は 1 標本あたり K マウスが 10.6 ± 4.8 個、KC マウスが 13.0 ± 8.9 個であり、両マウスの間に統計学的有意差は認められなかった ($p = 0.58$; t -test、図 11D)。腫瘍の面積は K マウスが 0.655 ± 1.01 mm² ($n = 53$ 、中央値 0.263 mm²)、KC マウスが 0.475 ± 0.647 mm² ($n = 143$ 、中央値 0.238 mm²) となり、両マウスの間に有意な差は存在しなかった ($p = 0.71$; Wilcoxon rank sum test、図 11E)。

以上の結果から、*K-ras*^{+/*LSL-G12D*} マウスの肺発がん実験に 6 か月齢のマウスを用いた場合、6 週齢のマウスを用いた場合と比較して腫瘍が大きくなりマウスが衰弱するまでの期間が大幅に短くなり、加えてびまん性の腫瘍が認められるようになった。また 6 か月齢のマウスを用いた場合、K マウスと KC マウスの間で肺表面の腫瘍および腺腫・腺がんの個数、大きさともに差は認められなかった。

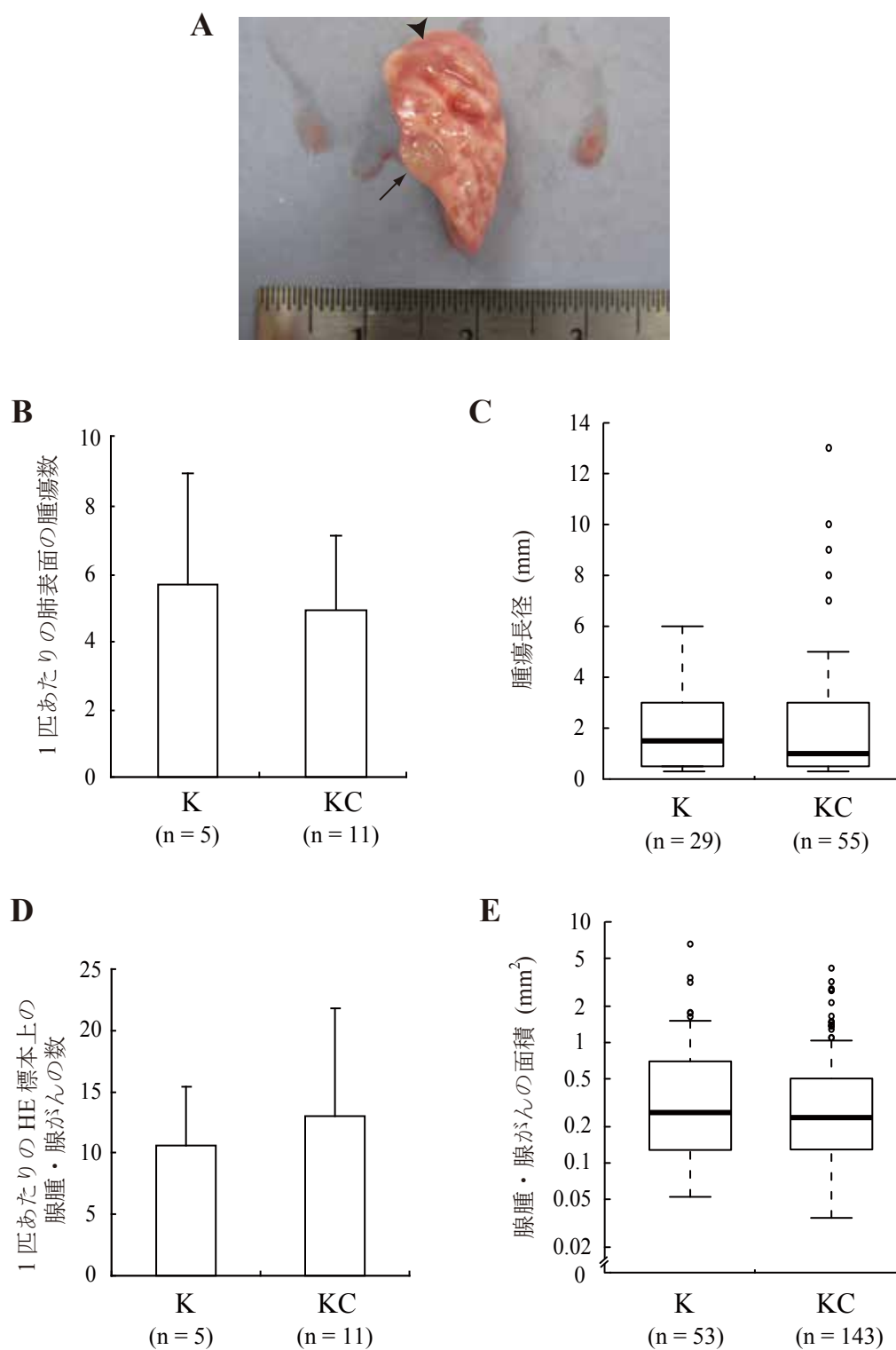


図 11. 6 か月齢のマウスを用いた場合における K マウスおよび KC マウスの肺腫瘍の個数、大きさに関する比較

(A) KC マウスに生じた肺腫瘍。周囲への浸潤が見られない境界明瞭な腫瘍 (矢印) と、非がん部との境界が不明瞭なびまん性の腫瘍 (矢頭) の両方が認められる。(B, C) 肺表面の腫瘍の個数および長径は K マウスと KC マウスで同程度であった。(D, E) 肺腺腫・肺腺がんの HE 標本上における個数および面積は K マウスと KC マウスで同程度であった。

***K-ras*^{+/*LSL-G12D*}/*Cadm1*^{-/-} 肺腫瘍と *K-ras*^{+/*LSL-G12D*} 肺腫瘍のマイクロアレイ解析**

Cadm1 遺伝子の欠損がどのような機序で肺腺腫・肺腺がんの悪性化に関与しているかを明らかにするため、K マウスおよび KC マウスから切り出した肺腫瘍から RNA を抽出しマイクロアレイ解析を行った。実験 1 および実験 2 の両方において K マウスおよび KC マウスから肺腫瘍を 3 例、肺非がん部を 1 例ずつ、合計 16 サンプルを用いて解析を行った。なお KC マウスの腫瘍 1 例に関して、遺伝子発現データが異常な値を示していたため解析から除外した。

マイクロアレイデータを用いて階層的クラスタリングを行った結果、腫瘍と非がん部で大きく 2 つのクラスターに分かれた。非がん部のクラスターに K マウスの腫瘍が 1 例含まれているが (K2-1)、これは RNA を抽出する際に腫瘍周囲の非がん部を多く含んでいたためだと考えられる。腫瘍および非がん部のクラスターは、さらに実験 1 と実験 2 のクラスターに分かれた。この結果は加齢により遺伝子発現パターンが大きく変化することを示唆する一方で、K マウスと KC マウスの腫瘍の間には遺伝子発現パターンに大きな違いが見られないことを示している (図 12A)。

Cadm1 遺伝子の欠損により発現に影響を受ける候補遺伝子、すなわち K マウスの腫瘍と比較して KC マウスの腫瘍で発現が変化している遺伝子の絞り込みは以下の方法で行った。まずマイクロアレイデータにおいて K マウスの腫瘍と比較して KC マウスの腫瘍群で発現が有意に変動している遺伝子を抽出し、そ

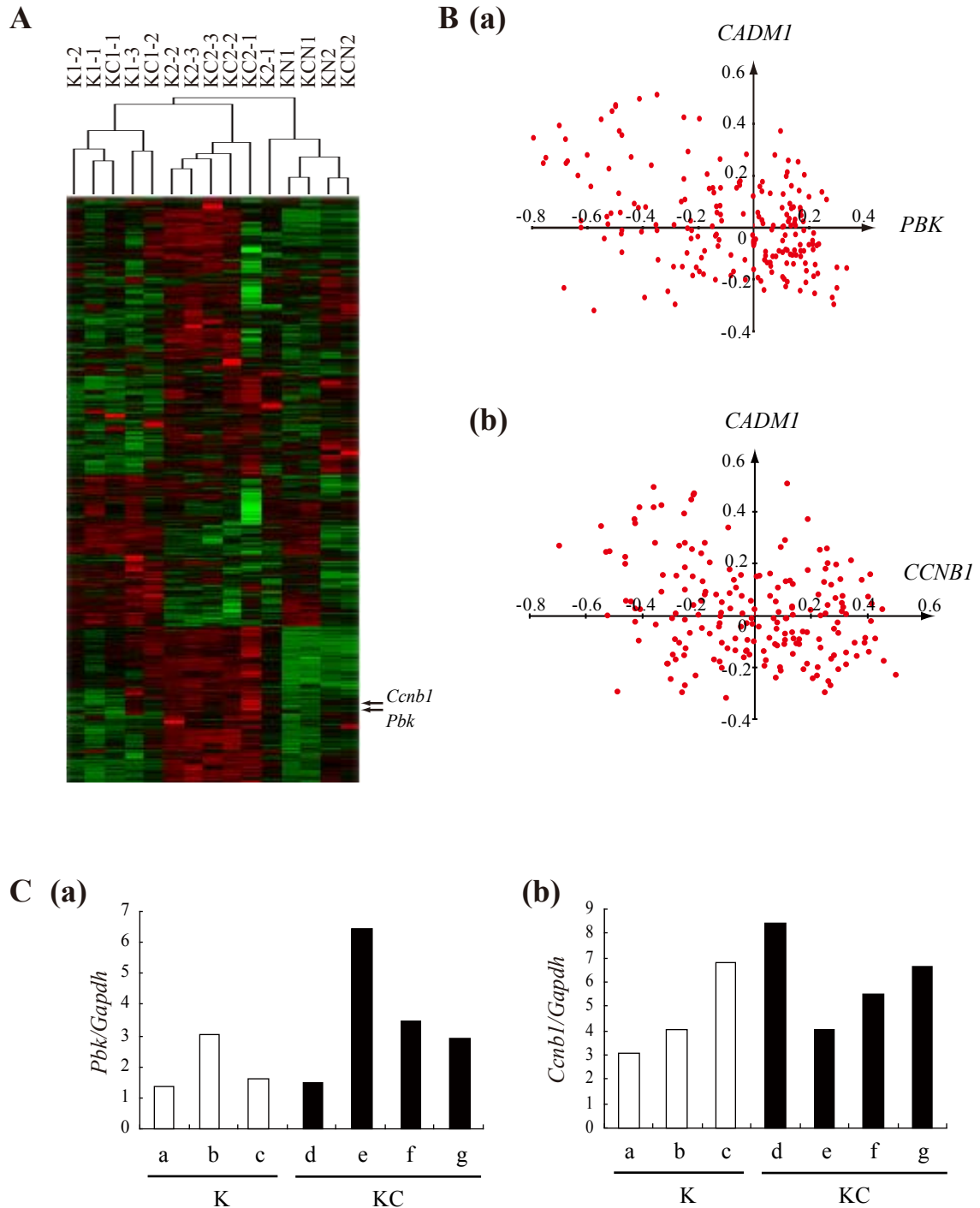


図 12. K マウスおよび KC マウスに生じた肺腫瘍のマイクロアレイ解析

(A) K マウス、KC マウスに生じた腫瘍の遺伝子発現の階層的クラスタリング。サンプル名は「遺伝子型-実験番号-サンプル番号」の順で表記し、N は非がん部を表す。(B) ヒト肺腺がんの遺伝子発現データを用いた候補遺伝子の絞り込み。各々の肺腺がん症例は、*PBK* (a) または *CCNB1* (b) の発現の相対値を X 座標、*CADM1* の発現の相対値を Y 座標とする点として表される。値は \log_2 ratio である。(C) K マウスおよび KC マウスから切り出したそれぞれ 3 つ (a, b, c) と 4 つ (d, e, f, g) の肺腫瘍を用いて *Pbk* (a) および *Ccnb1* (b) のリアルタイム PCR 解析を行い、マイクロアレイ解析によって得られたデータの再現性を確認した。

の中でがん関連遺伝子に着目した。次にこれらの遺伝子のヒトオーソログの発現がヒト肺腺がんにおいて *CADMI* 遺伝子の発現と相関しているかどうか確かめる為に、Chitale らが公開したヒト肺腺がん 199 症例の遺伝子発現データを用いて *CADMI* 遺伝子の発現との相関係数を求め [61]、相関の高い遺伝子として *Pbk* (*PDZ binding kinase*)、*Ccnb1* (*Cyclin B1*) を見出した (図 12B)。PBK は MAP2K に類似した分子で、PI3 キナーゼ依存的に Akt をリン酸化し、肺がん細胞株の浸潤を促進する [62]。Cyclin B1 は細胞周期促進の他に、PBK をリン酸化して活性化する役割を有している [63]。 *Pbk* および *Ccnb1* の発現をリアルタイム PCR で確認したところ、KC マウスの腫瘍において強い発現が見られた (図 12C)。ゆえに *Cadm1* の欠損により Cyclin B1-PBK 経路が活性化する可能性が考えられた。

考察

本研究では、がん抑制遺伝子 *CADMI* の肺腫瘍抑制に果たす役割について解析するため、*Cadm1*^{-/-} マウスと *K-ras*^{+/*LSL-G12D*} 肺発がんモデルマウスを交配して *K-ras*^{+/*LSL-G12D*}/*Cadm1*^{-/-} マウスを作成し、Cre 発現アデノウィルスベクターの投与により変異型 *K-ras* を発現させ、発生した肺腫瘍の解析を行った。まず各々の遺伝子のマウスとヒトにおける差異について、マウス *Cadm1* とヒト *CADMI*、マウス *K-ras* とヒト *K-RAS* とのアミノ酸配列の相同性はそれぞれ 98%、99%と非常に高く [64]、分子としての機能はほぼ同一であると考えられる。ゆえに *K-ras*^{+/*LSL-G12D*}/*Cadm1*^{-/-} マウスに発生した腺腫・腺がんは、*K-RAS* 変異を有し *CADMI* の不活化したヒト腺がんの特徴を反映したモデルとなることが予想される。ただし *CADMI* は多くの場合多段階発がんの後期において不活化されるが、本実験は *Cadm1* 遺伝子欠損マウスを使用しているためがん化の初期段階から発現が欠如している点、また腫瘍だけでなく周囲の正常細胞にも発現が無い点が生理的に大きく異なる。

K-ras^{+/*LSL-G12D*} マウスの腫瘍は *Cadm1* 遺伝子の欠損により肺表面の腫瘍の大きさ、肺の切断面における腺腫・腺がんの面積および組織学的異型度が増大した (図 5、図 7)。細気管支上皮過形成は細気管支の外には認められないため、肺表面の腫瘍はすべて腺腫・腺がんであり、これらの結果は *CADMI* が腺腫・腺がんの進展を抑制することを示している。特筆すべき点として、KC マウスの腺が

んにのみ血管侵襲 2 か所、胸膜侵襲 1 か所が見つかった。血管および胸膜侵襲は腺がんの典型的な特徴であり、*CADM1* は腺腫から腺がんへの進展を抑制することを示唆している。今回の解析では他の臓器への明らかな転移は認めなかったが、血管侵襲あるいは胸膜侵襲の箇所から腫瘍細胞が遊出し、微小転移を起こしていることが予想される。また、腺腫・腺がんの発生する頻度は K マウスと KC マウスの間に有意差を認めないことから、腺がんの発生に関与する可能性は低いことが示唆された。実際に *CADM1* は非浸潤性のヒト上皮内腺がんでは発現低下が認められず [20]、腫瘍発生への関与は少ないと考えられる。

一方で、細気管支上皮過形成は *Cadm1* 遺伝子の欠損により肺の断面に占める面積が減少した (図 7)。この結果を以て *CADM1* が細気管支上皮過形成の増殖促進に働いていると直接的に解釈すべきではないと考える。他の原因として考えられるのは、*Cadm1* の欠損によるアデノウィルスベクターの感染効率の変化である。本研究ではアデノウィルスの感染した細胞種について検討をおこなっていないため、アデノウィルスの感染に関与している可能性を否定することはできない。また、*CADM1* は樹状細胞など一部の免疫細胞にも発現しており [65]、*Cadm1* の欠損がアデノウィルスに対する自然免疫応答に何らかの影響を与えている可能性もある。これらの懸念に対しては GFP 発現アデノウィルスベクターなどを用いて、感染した細胞の種類に K マウスと KC マウスとの間で差がないかどうか確かめることによって解決できると考えられる。さらに、*CADM1* が

BASC から発生した腫瘍性病変の分化に関与している可能性もある。BASC は表面マーカーを用いて Sca-1^{pos} CD45^{neg} Pecam^{neg} CD34^{pos} の細胞として分取することができ [7]、K マウスおよび KC マウスから BASC を採取し肺胞上皮あるいは気管支上皮への分化能を *in vitro* で評価することにより、CADM1 が BASC の分化に与える影響を明らかにすることができると考えられる。

本研究では、気管支と肺胞の腫瘍が隣接して見られることから、気管支と肺胞の共通の幹細胞である細気管支肺胞幹細胞 (BASC) のがん化に着目した。*K-ras*^{+/LSL-G12D} マウスに生じる肺腺がんの起源細胞は BASC および肺胞 II 型細胞 (alveolar type II cell) であるとされている。BASC は気管支および肺胞上皮の両方に分化できる組織幹細胞であり、変異 *K-ras* の発現によりがん化した場合に細気管支上皮過形成 (EH) と腺腫・腺がんの両方を発生すると考えられる。異なる二つの表現型の腫瘍性病変が一つの起源細胞から発症することは、ヒトの腫瘍では稀であるが、これを支持する知見として Jackson らは腺腫の大部分 (～80%) が隣接する EH とつながっていることを報告しており [44]、本研究においても約 70%の腺腫・腺がんが EH と隣接していた。個々の EH の面積は KC マウスよりも K マウスの方が大きい (図 8)、EH と Sox2 陽性の腺腫・腺がんの総面積は K マウスと KC マウスでほぼ等しく、Sox2 陽性の腺腫・腺がんの面積は K マウスよりも KC マウスの方が大きい。このことから、近接する EH と腺腫・腺がんに関して、*Cadm1* の欠損により腺腫・腺がんの増殖が促進されるこ

とによる生育競争が起こり、EH の増殖が K マウスと比較して遅くなったのではないかと考えた。その模式図を図 13 に示す。

しかし、Sox2 が BASC 由来の腺がんの信頼できるマーカーであるかどうかには疑問が残る。Xu らはクララ細胞に変異 K-ras を発現させる *CCSP-Cre /K-ras^{+/LSL-G12D}* マウスと肺胞 II 型細胞に発現させる *SPC-Cre/K-ras^{+/LSL-G12D}* マウスに生じた腺腫・腺がんの遺伝子発現を比較した際に、発現に差がある遺伝子として Sox2 を挙げた。しかし、Xu らは実際には 10% 程度の肺胞 II 型細胞でも CCSP を弱く発現しており Cre による組換えが起こること、また Sox2 は EH および小さい腺腫では発現が見られるが、大きい腺腫・腺がんでは免疫染色によるシグナルが検出できなくなることを同論文で報告している。KC マウスにおいて Sox2 の発現を認めた腺腫・腺がんは 10.2% (20/196) であったが、これが BASC から発生した腺腫・腺がんの割合を反映しているのかには疑問が残る。また、Sox2 は幹細胞性に深く関与している遺伝子であり、非小細胞肺がんの悪性化との関与も報告されている [66]。そのため細胞の起源とは無関係に悪性化に伴って発現してきた可能性も考えられるが、Sox2 を発現する腺腫・腺がんはグレード 3 以下でそれほど大きくないものであった。したがって、Sox2 の発現により BASC から発生した腺腫・腺がんの一部を区別できるものと考えられた。

Cadm1 遺伝子と同様に、*p65/RelA* 遺伝子もその欠損により気管支と肺胞の腫瘍の割合が変化する [67]。p65/RelA は NF- κ B 複合体の構成要素であるが、NF-

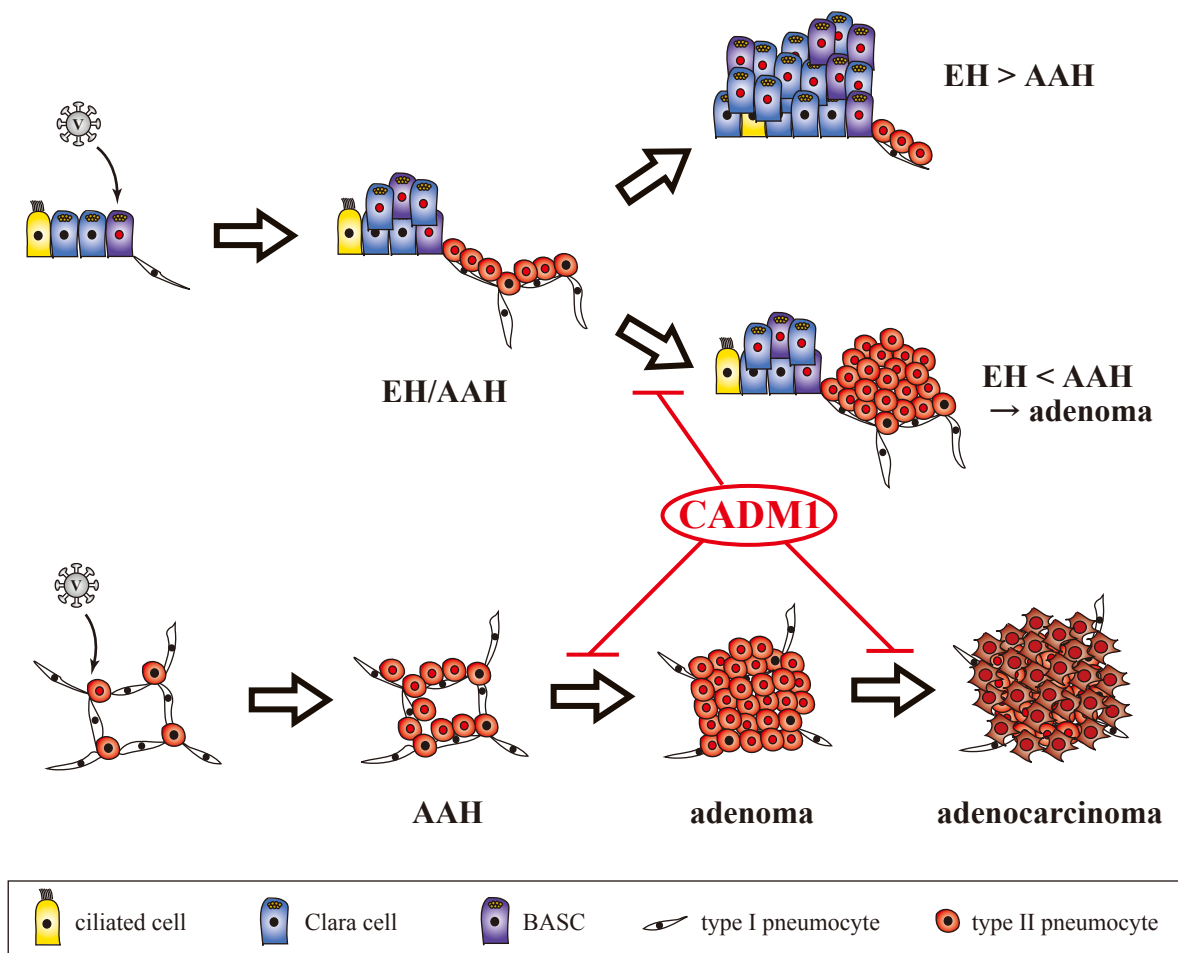


図 13. $K\text{-ras}^{+/LSL\text{-}G12D}$ マウスに生じる肺腫瘍に対して **CADM1** が果たす役割

$Cadm1$ 遺伝子の欠損により $K\text{-ras}^{+/LSL\text{-}G12D}$ マウスに生じる腺腫・腺がんのグレードが増大したことから、**CADM1** は腺腫 (adenoma) から腺がん (adenocarcinoma)、あるいは異型腺腫様過形成 (AAH) から腺腫への進展を抑制していることが示唆される。 $Cadm1$ 遺伝子の欠損により細気管支上皮過形成 (EH) が減少するのは、細気管支肺胞幹細胞のがん化により EH と AAH の両方が発生した場合に、AAH の進展が促進されることにより生育競争が起こるためであると考えられる。

κ B は RAS の下流で活性化され $K-ras^{+/LSL-G12D}$ マウスの発がんに関与していることが示されている [68]。Basseres らは $p65^{fl/fl}$ マウス、すなわち $p65$ 遺伝子の exon 5-8 を挟むように *loxP* 配列を同方向に挿入したアレルを有するマウスと $K-ras^{+/LSL-G12D}$ マウスを交配させて $K-ras^{+/LSL-G12D}/p65^{fl/fl}$ マウスを作成し、Ad-Cre を用いて肺腫瘍を発生させたところ、 $K-ras^{+/LSL-G12D}$ マウスと比較して腫瘍数が減少し、気管支に発生する腫瘍すなわち EH の占める割合が増加したことを報告している。EH の割合が増加した理由については言及されていないが、NF- κ B は BASC から EH と AAH が生じた際に、AAH が増殖する方への選択圧を有していると推測される。 $K-ras^{+/LSL-G12D}$ マウスにおける肺腫瘍の形成に関して *Cadm1* の欠損と $p65$ の欠損は逆の表現型を示すことから、CADM1 が何らかの機構で NF- κ B の活性を抑制している可能性が考えられる。

6 週齢のマウスを用いて実験を行った場合には、K マウスと KC マウスの間で肺表面の腫瘍および腺腫・腺がんの大きさに有意差を認めたが、6 か月齢のマウスを用いた場合には差が認められなかった。 $K-ras^{+/LSL-G12D}$ マウスを用いた実験は一般的に 6-8 週齢において Cre を導入するプロトコルであり、高齢マウスを使用した論文を見つけることはできなかった。6 週齢のマウスではがんによる衰弱が見られるまでに 25 週を要したが、6 か月齢のマウスでは 16 週に短縮された。解剖時における腺腫・腺がんの大きさは、KC マウスでは両者でほぼ同じであったが、K マウスでは 6 か月齢のマウスを使用した方が大きかった (図 7 および図

11)。ゆえに K マウスでは加齢により腫瘍の増殖が大きく促進されていることが示唆される。加齢のがん化に与える代表的な影響として DNA 修復機構の異常が挙げられる。6 か月齢のマウスには変異が入りやすいため、がん遺伝子の活性化あるいはがん抑制遺伝子の不活性化が起こりやすく、KC マウスの腫瘍における *Cadm1* 欠損という growth advantage が過小評価されている可能性が考えられる。

ヒト肺がんの罹患率の男女比は約 4:1 と男性の方が高い一方で、肺がん全体に占める腺がんの割合は男性約 40%、女性約 70%と女性の方が高く、男女差が存在する。また、ヒト肺腺がんにおいて *CADM1* の発現が欠如した症例は、男性において著明に予後が悪い一方で、女性においては予後不良因子とならないことが報告されている [28]。ここで K マウス、KC マウスの両系統において腺がんの個数および大きさに性差が存在するかどうかに関して、実験 1 のデータを用いて確かめた。K マウスに関して、個数は 1 標本あたり雄が 19.8 ± 12.4 個 ($n = 4$)、雌が 23.8 ± 13.5 個 ($n = 4$) であり、統計学的有意差を認めない ($p = 0.68$; *t*-test)。面積は 1 標本あたり雄が $0.28 \pm 0.51 \text{ mm}^2$ ($n = 79$ 、中央値 0.10 mm^2)、雌が $0.25 \pm 0.60 \text{ mm}^2$ ($n = 95$ 、中央値 0.096 mm^2) であり、有意差を認めなかった ($p = 0.68$ 、Wilcoxon rank sum test)。また KC マウスに関して、面積は 1 標本あたり雄が $0.38 \pm 0.79 \text{ mm}^2$ ($n = 103$ 、中央値 0.20 mm^2)、雌が $0.53 \pm 0.94 \text{ mm}^2$ ($n = 93$ 、中央値 0.26 mm^2) であり有意差を認めなかったが ($p = 0.12$ 、Wilcoxon rank sum test)、個数は 1 標本あたり雄が平均 50.5 個 ($n = 2$)、雌が 23.3 ± 7.1 個 ($n = 4$) であり、

平均値で 2 倍以上と大きい差を認めた (図 14)。ゆえに *Cadm1* の欠損は雄の個体においてより顕著に肺腺がんの悪性化に関与していることが予想され、またヒト肺腺がんと同じ表現型であることから、肺腺がんの性差に CADM1 が関与している可能性が考えられる。

さらに本研究では K マウスと KC マウスに生じた肺腫瘍の遺伝子発現を比較することにより、*Cadm1* の欠損による腫瘍の悪性化に伴って変化する分子機構について明らかにしようと考えた。まず K マウスと KC マウスの腫瘍の遺伝子発現パターンに関して階層的クラスタリングを行ったところ、K マウスと KC マウスは同一のクラスターに属し、両者のパターンが近いことが示唆された (図 12A)。さらに K マウスと比較して KC マウスにおいて発現が変化している遺伝子のうち、がん関連遺伝子であり、ヒト肺腺がんの遺伝子発現データにおいて *CADM1* の発現と相関が高い遺伝子として *Pbk* を同定し、さらに PBK を活性化する *Cyclin B1* の発現も同様に KC マウスで上昇していた。CADM1 は膜タンパク質であるため直接ではなく結合タンパク質を介して遺伝子発現を制御すると考えられ、一例として ERBB2 受容体と結合してそのシグナルを制御することが挙げられる [37]。この Cyclin B1-PBK 経路が CADM1 によって制御されているかどうかを明らかにするためには分子生物学的な解析を行う必要がある。ただし PBK は膜結合性グアニル酸キナーゼである hDlg と結合し [69]、hDlg は CADM1 と複合体を形成することから [未発表データ]、PBK と CADM1 は細

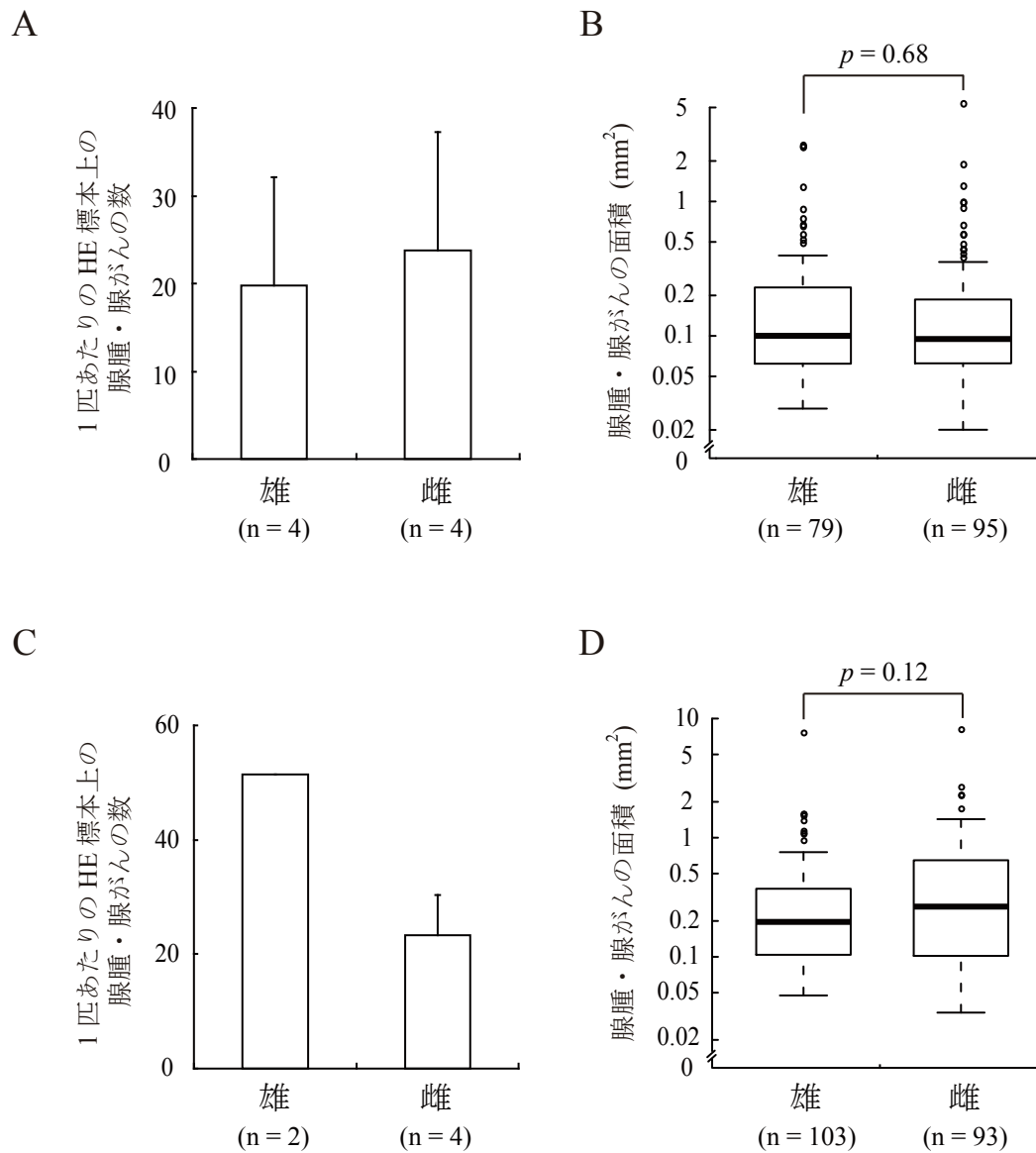


図 14. K マウスおよび KC マウスに生じる肺腺腫・肺腺がんの性差

(A) K マウスにおけるマウス 1 匹あたりの腺腫・腺がんの雌雄別の個数。(B) K マウスにおける腺腫・腺がんの面積の雌雄差。(C) KC マウスにおけるマウス 1 匹あたりの腺腫・腺がんの雌雄別の個数。(D) KC マウスにおける腺腫・腺がんの面積の雌雄差。

胞膜上にて相互作用する可能性があり、両者の関係は非常に興味深い。

CADM1 はヒト肺腺がんの特に進行がんにおいて著明に不活化されるが、*K-ras^{+/LSL-G12D}* マウスに生じた肺腺腫・腺がんにおいても 37.3% で発現の低下または欠如が認められ、*CADM1* の発現が低下した腫瘍は体積が大きく、悪性度も高いことが示された (図 13)。特筆すべき点として、グレード 4 と判定された腫瘍ではすべて *CADM1* の発現が低下または欠如していた。グレード 4 の定義は浸潤性腺がんの定義とほぼ重なることから (表 3-4)、浸潤性腺がんにおいて *CADM1* の発現は低下していることが示唆された。ヒトとマウスの両方の肺腺がんにおいて高頻度に *CADM1* の発現低下が見られたということは、*CADM1* 遺伝子の不活化が肺腺がんへの進展に本質的に重要であることを示している。*K-ras^{+/LSL-G12D}/Cadm1^{-/-}* マウスに生じた肺腫瘍は、がん抑制遺伝子としての機能が確立されている *Rb1* や *Pten* の遺伝子欠損マウスと *K-ras^{+/LSL-G12D}* マウスを掛け合わせたマウスに生じる肺腫瘍と同程度の悪性度を示すことから、*CADM1* は肺腺がんにおける有力ながん抑制遺伝子であることが示唆される (表 5)。したがって *CADM1* は積極的にがんを抑制する機能を有していることが予想されるが、細胞接着以外の有力な機能は未だ見つかっておらず、その解明は今後の課題としたい。

本研究により得られた *K-ras^{+/LSL-G12D}/Cadm1^{-/-}* マウスは、以下の三点において *K-ras^{+/LSL-G12D}* マウスよりもヒトの肺腺がんモデルとして優れていると考える。

まずヒトに発生しない EH の割合が低く、腺腫・腺がんの割合が高いこと。次に大きい腺腫・腺がんが得られるため、より短期間で実験が行えること。さらに、腺腫・腺がんは **Grade3** および **Grade4** すなわち初期の浸潤癌の割合が高く、これはヒト肺腺がんが臨床的に最も診断されやすい段階であること。加えて、*Cadm1* の欠損は腫瘍の遺伝子発現パターンに大きい影響を与えないことから、遺伝子発現におけるヒトとの類似性は保たれる。したがって、*K-ras^{+/LSL-G12D}/Cadm1^{-/-}* マウスは *K-ras^{+/LSL-G12D}* マウスよりもヒトの肺腺がんのモデルとして優れており、肺腺がんに対する抗がん剤のスクリーニングや予防効果の検討を迅速かつ効果的に進めることができるモデルになるものと期待される。

表 5. *K-ras*^{+LSL-G12D} マウスと主要ながん抑制遺伝子欠損マウスとの交配により作成されたマウスに発生する肺腫瘍の個数、大きさ、悪性度、転移性、寿命の比較 (文献 46-49)

遺伝子名	個数	大きさ	悪性度	転移	寿命	備考
<i>Trp53</i>	NE ^{*1}	増大	増大	あり	短縮	副鼻腔がんを併発
<i>Rb1</i>	増加	不変	増大	なし	短縮	増殖、アポトーシスに変化なし
<i>p16Ink4a</i>	不変	NE	増大 ^{*2}	あり	不変	<i>Ink4a-Arf</i> ^{-/-} は転移を認めない
<i>Lkb1</i>	増加	NE	増大 ^{*2}	あり	短縮	肺扁平上皮がんを併発
<i>Pten</i> ^{*3}	増加	NE	増大	なし	短縮	肺が肥大化
<i>Cadm1</i>	増加	増大	増大	なし	NE	細気管支上皮過形成は減少

*1 NE: Not evaluated

*2 論文に記述はないが、転移を起こすことから高悪性度と判断

*3 Ad-Cre を用いず CCSP-Cre Tg マウスを交配させてクララ細胞特異的に Cre を発現

謝辞

本研究を遂行するにあたり研究の基礎から丁寧にご指導いただきました東京大学医科学研究所人癌病因遺伝子分野の村上善則 教授に深謝申し上げます。またマウス肺腫瘍の病理診断に関してご指導いただきました松原大祐 講師に心より感謝申し上げます。本研究の遂行にお力添えいただきました永田政義 博士、川合剛人 博士、増田智子 氏、市原博美 氏に感謝申し上げます。動物実験に関してご協力いただきました旧万有製薬つくば研究所の玉井淑貴 博士 (現 国立精神・神経医療研究センター神経研究所実験動物管理室 室長)、早川芳弘 博士 (現 富山大学和漢医薬学総合研究所病態生化学分野 准教授) に感謝申し上げます。最後に日々の研究生活において様々な面でご協力いただいた東京大学医科学研究所人癌病因遺伝子分野の皆様に感謝いたします。

参考文献

- [1] K. Katanoda, T. Matsuda, A. Matsuda, A. Shibata, Y. Nishino, M. Fujita, M. Soda, A. Ioka, T. Sobue, H. Nishimoto, An updated report of the trends in cancer incidence and mortality in Japan, *Jpn. J. Clin. Oncol.* 43 (2013) 492-507.
- [2] A. Jemal, F. Bray, M.M. Center, J. Ferlay, E. Ward, D. Forman, Global cancer statistics, *CA Cancer. J. Clin.* 61 (2011) 69-90.
- [3] W.D. Travis, Classification of lung cancer, *Semin. Roentgenol.* 46 (2011) 178-186.
- [4] T. Sobue, S. Yamamoto, M. Hara, S. Sasazuki, S. Sasaki, S. Tsugane, JPHC Study Group. Japanese Public Health Center, Cigarette smoking and subsequent risk of lung cancer by histologic type in middle-aged Japanese men and women: the JPHC study, *Int. J. Cancer.* 99 (2002) 245-251.
- [5] M.J. Evans, L.J. Cabral-Anderson, G. Freeman, Role of the Clara cell in renewal of the bronchiolar epithelium, *Lab. Invest.* 38 (1978) 648-653.
- [6] M.J. Evans, L.J. Cabral, R.J. Stephens, G. Freeman, Transformation of alveolar type 2 cells to type 1 cells following exposure to NO₂, *Exp. Mol. Pathol.* 22 (1975) 142-150.

- [7] C.F. Kim, E.L. Jackson, A.E. Woolfenden, S. Lawrence, I. Babar, S. Vogel, D. Crowley, R.T. Bronson, T. Jacks, Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer, *Cell*. 121 (2005) 823-835.
- [8] J.F. Collawn, A. Lazrak, Z. Bebok, S. Matalon, The CFTR and ENaC debate: how important is ENaC in CF lung disease? *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 302 (2012) L1141-6.
- [9] J.P. Sullivan, J.D. Minna, J.W. Shay, Evidence for self-renewing lung cancer stem cells and their implications in tumor initiation, progression, and targeted therapy, *Cancer Metastasis Rev.* 29 (2010) 61-72.
- [10] M. Noguchi, Stepwise progression of pulmonary adenocarcinoma--clinical and molecular implications, *Cancer Metastasis Rev.* 29 (2010) 15-21.
- [11] T. Kosaka, Y. Yatabe, H. Endoh, H. Kuwano, T. Takahashi, T. Mitsudomi, Mutations of the epidermal growth factor receptor gene in lung cancer: biological and clinical implications, *Cancer Res.* 64 (2004) 8919-8923.
- [12] H. Shigematsu, A.F. Gazdar, Somatic mutations of epidermal growth factor receptor signaling pathway in lung cancers, *Int. J. Cancer.* 118 (2006) 257-262.

- [13] S. Toyooka, T. Mitsudomi, J. Soh, K. Aokage, M. Yamane, T. Oto, K. Kiura, S. Miyoshi, Molecular oncology of lung cancer, *Gen. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 59 (2011) 527-537.
- [14] L. Ding, G. Getz, D.A. Wheeler, E.R. Mardis, M.D. McLellan, K. Cibulskis, C. Sougnez, H. Greulich, D.M. Muzny, M.B. Morgan, L. Fulton, R.S. Fulton, Q. Zhang, M.C. Wendl, M.S. Lawrence, D.E. Larson, K. Chen, D.J. Dooling, A. Sabo, A.C. Hawes, H. Shen, S.N. Jhangiani, L.R. Lewis, O. Hall, Y. Zhu, T. Mathew, Y. Ren, J. Yao, S.E. Scherer, K. Clerc, G.A. Metcalf, B. Ng, A. Milosavljevic, M.L. Gonzalez-Garay, J.R. Osborne, R. Meyer, X. Shi, Y. Tang, D.C. Koboldt, L. Lin, R. Abbott, T.L. Miner, C. Pohl, G. Fewell, C. Haipek, H. Schmidt, B.H. Dunford-Shore, A. Kraja, S.D. Crosby, C.S. Sawyer, T. Vickery, S. Sander, J. Robinson, W. Winckler, J. Baldwin, L.R. Chirieac, A. Dutt, T. Fennell, M. Hanna, B.E. Johnson, R.C. Onofrio, R.K. Thomas, G. Tonon, B.A. Weir, X. Zhao, L. Ziaugra, M.C. Zody, T. Giordano, M.B. Orringer, J.A. Roth, M.R. Spitz, I.I. Wistuba, B. Ozenberger, P.J. Good, A.C. Chang, D.G. Beer, M.A. Watson, M. Ladanyi, S. Broderick, A. Yoshizawa, W.D. Travis, W. Pao, M.A. Province, G.M. Weinstock, H.E. Varmus, S.B. Gabriel, E.S. Lander, R.A. Gibbs, M. Meyerson, R.K. Wilson, Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma, *Nature*. 455 (2008) 1069-1075.

- [15] A. Mogi, H. Kuwano, TP53 mutations in nonsmall cell lung cancer, *J. Biomed. Biotechnol.* 2011 (2011) 583929.
- [16] R. Tanaka, D. Wang, Y. Morishita, Y. Inadome, Y. Minami, T. Iijima, S. Fukai, T. Goya, M. Noguchi, Loss of function of p16 gene and prognosis of pulmonary adenocarcinoma, *Cancer*. 103 (2005) 608-615.
- [17] M. Sanchez-Cespedes, P. Parrella, M. Esteller, S. Nomoto, B. Trink, J.M. Engles, W.H. Westra, J.G. Herman, D. Sidransky, Inactivation of LKB1/STK11 is a common event in adenocarcinomas of the lung, *Cancer Res.* 62 (2002) 3659-3662.
- [18] M. Yamasaki, Y. Takeshima, S. Fujii, S. Kitaguchi, M. Matsuura, K. Tagawa, K. Inai, Correlation between genetic alterations and histopathological subtypes in bronchiolo-alveolar carcinoma and atypical adenomatous hyperplasia of the lung, *Pathol. Int.* 50 (2000) 778-785.
- [19] Y. Nakamura, T. Niki, A. Goto, T. Morikawa, K. Miyazawa, J. Nakajima, M. Fukayama, c-Met activation in lung adenocarcinoma tissues: an immunohistochemical analysis, *Cancer. Sci.* 98 (2007) 1006-1013.
- [20] A. Ito, M. Okada, K. Uchino, T. Wakayama, Y. Koma, S. Iseki, N. Tsubota, Y. Okita, Y. Kitamura, Expression of the TSLC1 adhesion molecule in pulmonary epithelium and

its down-regulation in pulmonary adenocarcinoma other than bronchioloalveolar carcinoma, *Lab. Invest.* 83 (2003) 1175-1183.

[21] Y. Yatabe, A.C. Borczuk, C.A. Powell, Do all lung adenocarcinomas follow a stepwise progression? *Lung Cancer.* 74 (2011) 7-11.

[22] J.G. Paez, P.A. Janne, J.C. Lee, S. Tracy, H. Greulich, S. Gabriel, P. Herman, F.J. Kaye, N. Lindeman, T.J. Boggon, K. Naoki, H. Sasaki, Y. Fujii, M.J. Eck, W.R. Sellers, B.E. Johnson, M. Meyerson, EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy, *Science.* 304 (2004) 1497-1500.

[23] S.E. Egan, B.W. Giddings, M.W. Brooks, L. Buday, A.M. Sizeland, R.A. Weinberg, Association of Sos Ras exchange protein with Grb2 is implicated in tyrosine kinase signal transduction and transformation, *Nature.* 363 (1993) 45-51.

[24] G.J. Riely, J. Marks, W. Pao, KRAS mutations in non-small cell lung cancer, *Proc. Am. Thorac. Soc.* 6 (2009) 201-205.

[25] P.T. Reissmann, H. Koga, R. Takahashi, R.A. Figlin, E.C. Holmes, S. Piantadosi, C. Cordon-Cardo, D.J. Slamon, Inactivation of the retinoblastoma susceptibility gene in non-small-cell lung cancer. The Lung Cancer Study Group, *Oncogene.* 8 (1993) 1913-1919.

- [26] C.J. Sherr, Cancer cell cycles, *Science*. 274 (1996) 1672-1677.
- [27] E. Brambilla, D. Moro, S. Gazzeri, C. Brambilla, Alterations of expression of Rb, p16(INK4A) and cyclin D1 in non-small cell lung carcinoma and their clinical significance, *J. Pathol.* 188 (1999) 351-360.
- [28] A. Goto, T. Niki, L. Chi-Pin, D. Matsubara, Y. Murakami, N. Funata, M. Fukayama, Loss of TSLC1 expression in lung adenocarcinoma: relationships with histological subtypes, sex and prognostic significance, *Cancer. Sci.* 96 (2005) 480-486.
- [29] Y. Murakami, Functional cloning of a tumor suppressor gene, TSLC1, in human non-small cell lung cancer, *Oncogene*. 21 (2002) 6936-6948.
- [30] K. Uchino, A. Ito, T. Wakayama, Y. Koma, T. Okada, C. Ohbayashi, S. Iseki, Y. Kitamura, N. Tsubota, Y. Okita, M. Okada, Clinical implication and prognostic significance of the tumor suppressor TSLC1 gene detected in adenocarcinoma of the lung, *Cancer*. 98 (2003) 1002-1007.
- [31] M. Kuramochi, H. Fukuhara, T. Nobukuni, T. Kanbe, T. Maruyama, H.P. Ghosh, M. Pletcher, M. Isomura, M. Onizuka, T. Kitamura, T. Sekiya, R.H. Reeves, Y. Murakami, TSLC1 is a tumor-suppressor gene in human non-small-cell lung cancer, *Nat. Genet.* 27 (2001) 427-430.

- [32] M. Masuda, M. Yageta, H. Fukuhara, M. Kuramochi, T. Maruyama, A. Nomoto, Y. Murakami, The tumor suppressor protein TSLC1 is involved in cell-cell adhesion, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 31014-31019.
- [33] M. Yageta, M. Kuramochi, M. Masuda, T. Fukami, H. Fukuhara, T. Maruyama, M. Shibuya, Y. Murakami, Direct association of TSLC1 and DAL-1, two distinct tumor suppressor proteins in lung cancer, *Cancer Res.* 62 (2002) 5129-5133.
- [34] T. Ito, Y. Shimada, Y. Hashimoto, J. Kaganoi, T. Kan, G. Watanabe, Y. Murakami, M. Imamura, Involvement of TSLC1 in progression of esophageal squamous cell carcinoma, *Cancer Res.* 63 (2003) 6320-6326.
- [35] X. Mao, E. Seidlitz, R. Truant, M. Hitt, H.P. Ghosh, Re-expression of TSLC1 in a non-small-cell lung cancer cell line induces apoptosis and inhibits tumor growth, *Oncogene.* 23 (2004) 5632-5642.
- [36] M. Masuda, S. Kikuchi, T. Maruyama, M. Sakurai-Yageta, Y.N. Williams, H.P. Ghosh, Y. Murakami, Tumor suppressor in lung cancer (TSLC)1 suppresses epithelial cell scattering and tubulogenesis, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 42164-42171.
- [37] S. Kawano, W. Ikeda, M. Kishimoto, H. Ogita, Y. Takai, Silencing of ErbB3/ErbB2 signaling by immunoglobulin-like Necl-2, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 23793-23805.

- [38] D. Yamada, M. Yoshida, Y.N. Williams, T. Fukami, S. Kikuchi, M. Masuda, T. Maruyama, T. Ohta, D. Nakae, A. Maekawa, T. Kitamura, Y. Murakami, Disruption of spermatogenic cell adhesion and male infertility in mice lacking TSLC1/IGSF4, an immunoglobulin superfamily cell adhesion molecule, *Mol. Cell. Biol.* 26 (2006) 3610-3624.
- [39] M. Nagata, M. Sakurai-Yageta, D. Yamada, T. Kawai, Y. Tsuboi, T. Ito, A. Ito, M. Yoshida, Y. Murakami, Spontaneous development of lung adenocarcinoma in the *CADM1* gene-deficient mice, *BMC Proceedings*. 4 (2010) O18.
- [40] K. Politi, M.F. Zakowski, P.D. Fan, E.A. Schonfeld, W. Pao, H.E. Varmus, Lung adenocarcinomas induced in mice by mutant EGF receptors found in human lung cancers respond to a tyrosine kinase inhibitor or to down-regulation of the receptors, *Genes Dev.* 20 (2006) 1496-1510.
- [41] K. Ohashi, K. Rai, Y. Fujiwara, M. Osawa, S. Hirano, K. Takata, E. Kondo, T. Yoshino, M. Takata, M. Tanimoto, K. Kiura, Induction of lung adenocarcinoma in transgenic mice expressing activated EGFR driven by the SP-C promoter, *Cancer. Sci.* 99 (2008) 1747-1753.

- [42] G.H. Fisher, S.L. Wellen, D. Klimstra, J.M. Lenczowski, J.W. Tichelaar, M.J. Lizak, J.A. Whitsett, A. Koretsky, H.E. Varmus, Induction and apoptotic regression of lung adenocarcinomas by regulation of a K-Ras transgene in the presence and absence of tumor suppressor genes, *Genes Dev.* 15 (2001) 3249-3262.
- [43] L. Johnson, K. Mercer, D. Greenbaum, R.T. Bronson, D. Crowley, D.A. Tuveson, T. Jacks, Somatic activation of the K-ras oncogene causes early onset lung cancer in mice, *Nature.* 410 (2001) 1111-1116.
- [44] E.L. Jackson, N. Willis, K. Mercer, R.T. Bronson, D. Crowley, R. Montoya, T. Jacks, D.A. Tuveson, Analysis of lung tumor initiation and progression using conditional expression of oncogenic K-ras, *Genes Dev.* 15 (2001) 3243-3248.
- [45] A. Sweet-Cordero, S. Mukherjee, A. Subramanian, H. You, J.J. Roix, C. Ladd-Acosta, J. Mesirov, T.R. Golub, T. Jacks, An oncogenic KRAS2 expression signature identified by cross-species gene-expression analysis, *Nat. Genet.* 37 (2005) 48-55.
- [46] M. DuPage, A.L. Dooley, T. Jacks, Conditional mouse lung cancer models using adenoviral or lentiviral delivery of Cre recombinase, *Nat. Protoc.* 4 (2009) 1064-1072.

- [47] E.L. Jackson, K.P. Olive, D.A. Tuveson, R. Bronson, D. Crowley, M. Brown, T. Jacks, The differential effects of mutant p53 alleles on advanced murine lung cancer, *Cancer Res.* 65 (2005) 10280-10288.
- [48] V.M. Ho, B.E. Schaffer, A.N. Karnezis, K.S. Park, J. Sage, The retinoblastoma gene Rb and its family member p130 suppress lung adenocarcinoma induced by oncogenic K-Ras, *Oncogene.* 28 (2009) 1393-1399.
- [49] H. Ji, M.R. Ramsey, D.N. Hayes, C. Fan, K. McNamara, P. Kozlowski, C. Torrice, M.C. Wu, T. Shimamura, S.A. Perera, M.C. Liang, D. Cai, G.N. Naumov, L. Bao, C.M. Contreras, D. Li, L. Chen, J. Krishnamurthy, J. Koivunen, L.R. Chirieac, R.F. Padera, R.T. Bronson, N.I. Lindeman, D.C. Christiani, X. Lin, G.I. Shapiro, P.A. Janne, B.E. Johnson, M. Meyerson, D.J. Kwiatkowski, D.H. Castrillon, N. Bardeesy, N.E. Sharpless, K.K. Wong, LKB1 modulates lung cancer differentiation and metastasis, *Nature.* 448 (2007) 807-810.
- [50] K. Iwanaga, Y. Yang, M.G. Raso, L. Ma, A.E. Hanna, N. Thilaganathan, S. Moghaddam, C.M. Evans, H. Li, W.W. Cai, M. Sato, J.D. Minna, H. Wu, C.J. Creighton, F.J. Demayo, I.I. Wistuba, J.M. Kurie, Pten inactivation accelerates oncogenic K-ras-initiated tumorigenesis in a mouse model of lung cancer, *Cancer Res.* 68 (2008) 1119-1127.

- [51] A. Sweet-Cordero, G.C. Tseng, H. You, M. Douglass, B. Huey, D. Albertson, T. Jacks, Comparison of gene expression and DNA copy number changes in a murine model of lung cancer, *Genes Chromosomes Cancer*. 45 (2006) 338-348.
- [52] H.C. Cho, C.Y. Lai, L.E. Shao, J. Yu, Identification of tumorigenic cells in Kras(G12D)-induced lung adenocarcinoma, *Cancer Res*. 71 (2011) 7250-7258.
- [53] H. Fushiki, T. Kanoh-Azuma, M. Katoh, K. Kawabata, J. Jiang, N. Tsuchiya, A. Satow, Y. Tamai, Y. Hayakawa, Quantification of mouse pulmonary cancer models by microcomputed tomography imaging, *Cancer. Sci*. 100 (2009) 1544-1549.
- [54] A.Y. Nikitin, A. Alcaraz, M.R. Anver, R.T. Bronson, R.D. Cardiff, D. Dixon, A.E. Fraire, E.W. Gabrielson, W.T. Gunning, D.C. Haines, M.H. Kaufman, R.I. Linnoila, R.R. Maronpot, A.S. Rabson, R.L. Reddick, S. Rehm, N. Rozengurt, H.M. Schuller, E.N. Schmidt, W.D. Travis, J.M. Ward, T. Jacks, Classification of proliferative pulmonary lesions of the mouse: recommendations of the mouse models of human cancers consortium, *Cancer Res*. 64 (2004) 2307-2316.
- [55] T. Ito, Y. Williams-Nate, M. Iwai, Y. Tsuboi, M. Hagiyaama, A. Ito, M. Sakurai-Yageta, Y. Murakami, Transcriptional regulation of the CADM1 gene by retinoic acid

during the neural differentiation of murine embryonal carcinoma P19 cells, *Genes Cells*. 16 (2011) 791-802.

[56] M. Mori, S.K. Rao, H.H. Popper, P.T. Cagle, A.E. Fraire, Atypical adenomatous hyperplasia of the lung: a probable forerunner in the development of adenocarcinoma of the lung, *Mod. Pathol.* 14 (2001) 72-84.

[57] X. Xu, J.R. Rock, Y. Lu, C. Futtner, B. Schwab, J. Guinney, B.L. Hogan, M.W. Onaitis, Evidence for type II cells as cells of origin of K-Ras-induced distal lung adenocarcinoma, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 (2012) 4910-4915.

[58] C. Lin, H. Song, C. Huang, E. Yao, R. Gacayan, S.M. Xu, P.T. Chuang, Alveolar type II cells possess the capability of initiating lung tumor development, *PLoS One*. 7 (2012) e53817.

[59] H. Ji, A.M. Houghton, T.J. Mariani, S. Perera, C.B. Kim, R. Padera, G. Tonon, K. McNamara, L.A. Marconcini, A. Hezel, N. El-Bardeesy, R.T. Bronson, D. Sugarbaker, R.S. Maser, S.D. Shapiro, K.K. Wong, K-ras activation generates an inflammatory response in lung tumors, *Oncogene*. 25 (2006) 2105-2112.

[60] J.P. de Magalhaes, How ageing processes influence cancer, *Nat. Rev. Cancer*. 13 (2013) 357-365.

- [61] D. Chitale, Y. Gong, B.S. Taylor, S. Broderick, C. Brennan, R. Somwar, B. Golas, L. Wang, N. Motoi, J. Szoke, J.M. Reinersman, J. Major, C. Sander, V.E. Seshan, M.F. Zakowski, V. Rusch, W. Pao, W. Gerald, M. Ladanyi, An integrated genomic analysis of lung cancer reveals loss of DUSP4 in EGFR-mutant tumors, *Oncogene*. 28 (2009) 2773-2783.
- [62] M.C. Shih, J.Y. Chen, Y.C. Wu, Y.H. Jan, B.M. Yang, P.J. Lu, H.C. Cheng, M.S. Huang, C.J. Yang, M. Hsiao, J.M. Lai, TOPK/PBK promotes cell migration via modulation of the PI3K/PTEN/AKT pathway and is associated with poor prognosis in lung cancer, *Oncogene*. 31 (2012) 2389-2400.
- [63] S. Matsumoto, Y. Abe, T. Fujibuchi, T. Takeuchi, K. Kito, N. Ueda, K. Shigemoto, K. Gyo, Characterization of a MAPKK-like protein kinase TOPK, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 325 (2004) 997-1004.
- [64] T. Fukami, H. Satoh, E. Fujita, T. Maruyama, H. Fukuhara, M. Kuramochi, S. Takamoto, T. Momoi, Y. Murakami, Identification of the Tslc1 gene, a mouse orthologue of the human tumor suppressor TSLC1 gene, *Gene*. 295 (2002) 7-12.
- [65] L. Galibert, G.S. Diemer, Z. Liu, R.S. Johnson, J.L. Smith, T. Walzer, M.R. Comeau, C.T. Rauch, M.F. Wolfson, R.A. Sorensen, Van der Vuurst de Vries, A.R., D.G.

Branstetter, R.M. Koelling, J. Scholler, W.C. Fanslow, P.R. Baum, J.M. Derry, W. Yan, Nectin-like protein 2 defines a subset of T-cell zone dendritic cells and is a ligand for class-I-restricted T-cell-associated molecule, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 21955-21964.

[66] L.M. Sholl, J.A. Barletta, B.Y. Yeap, L.R. Chirieac, J.L. Hornick, Sox2 protein expression is an independent poor prognostic indicator in stage I lung adenocarcinoma, *Am. J. Surg. Pathol.* 34 (2010) 1193-1198.

[67] D.S. Basseres, A. Ebbs, E. Levantini, A.S. Baldwin, Requirement of the NF-kappaB subunit p65/RelA for K-Ras-induced lung tumorigenesis, *Cancer Res.* 70 (2010) 3537-3546.

[68] E. Meylan, A.L. Dooley, D.M. Feldser, L. Shen, E. Turk, C. Ouyang, T. Jacks, Requirement for NF-kappaB signalling in a mouse model of lung adenocarcinoma, *Nature.* 462 (2009) 104-107.

[69] S. Gaudet, D. Branton, R.A. Lue, Characterization of PDZ-binding kinase, a mitotic kinase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (2000) 5167-5172.