

201019047A

厚生労働科学研究費補助金  
第3次対がん総合戦略研究事業

肺がんの浸潤・転移を抑制可能な分子標的の同定に基づく  
革新的テーラーメイド治療法の開発

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 高橋 隆

平成23年(2011)3月

## 目次

I. 研究組織	1
II. 総括研究報告書	2
研究代表者 高橋 隆	
III. 分担研究報告書	
1. CLCP1に関する研究開発	10
研究分担者 長田啓隆	
2. CIMに関する研究開発及び新規標的分子の探索・同定	16
研究分担者 柳澤 聖	
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	21
V. 研究成果の刊行物・別刷	24



## 1. 研究組織

平成 22 年度厚生労働科学研究費補助金（第 3 次対がん総合戦略研究事業）

【肺がんの浸潤・転移を抑制可能な分子標的の同定に基づく

革新的テーラーメイド治療法の開発】研究組織表

役割	氏名	所属・職名
研究代表者	高橋隆	名古屋大学大学院医学系研究科分子腫瘍学分野
研究分担者	長田啓隆	愛知県がんセンター研究所分子腫瘍学部
	柳澤聖	名古屋大学高等研究院



## II. 総括研究報告書

## 厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）

### 総括研究報告書

研究課題名： 肺がんの浸潤・転移を抑制可能な分子標的の同定に基づく  
革新的テーラーメイド治療法の開発

研究代表者： 高橋隆（名古屋大学大学院医学系研究科分子腫瘍学分野・教授）

#### 研究要旨

肺がん死に至る病態の本態たる浸潤と転移の分子機構の解明と、得られた成果に基づいた革新的なテーラーメイド分子診断・治療法の開発を目指し、我々が同定した転移関連分子 CLCP1 及び CIM について詳細な検討を加えた。

CLCP1 細胞外ドメインを免疫源として作成したモノクローナル抗体による免疫組織学的検討によって、CLCP1 の発現と不良な予後の有意な関連を明らかとするとともに、作成した抗体の免疫沈降物のタンデム質量分析によって、CLCP1 と共沈降する蛋白として non-muscle myosin IIA 及び  $\beta$ -actin を同定した。また、CLCP1 の過剰発現によって変動する遺伝子群を *in silico* 解析し、幹細胞性維持や細胞運動等のがん悪性化への寄与を示唆するパスウェイへの関与の描出に成功した。

CIM の分子機能を解明すべく、プロテオミクス・バイオインフォマティクス解析を統合して進めた。その結果 CIM は、微小環境における低酸素ストレス応答に重要な HIF-1 $\alpha$  を負に制御する OS-9 に結合して機能を抑制しており、結果的に HIF-1 $\alpha$  の発現を正に制御していることが明らかとなった。また、CIM が小胞体ストレス応答のシグナル伝達制御 (unfolded protein response, UPR) の鍵を握る BiP と結合し、UPR シグナル伝達を正に制御することを明らかとした。さらに、新たな転移関連標的分子の探索を、我々が樹立した高転移性ヒト肺がん細胞株 LNM35 株を対象としたリン酸化タンパク質の網羅的発現解析によって展開し、候補分子同定へ向けた基盤情報を得た。

## A. 研究目的

肺がんはがん死亡原因の第一位であり、革新的な治療法の開発が希求されている。本研究の目的は、プロテオミクス解析とバイオインフォマティクス解析を駆使して、肺がん死に至る病態の本態である浸潤と転移の分子機構の解明を進め、革新的なテーラーメイド分子診断・治療法を開発を目指すことにある。

我々は LNM35 株を用いてがんの浸潤・転移の抑制を可能とする新たな分子標的探索を進めて、肺がんで過剰発現され、がん抑制遺伝子ファミリーに属する SEMA4B による負の制御を受けている細胞膜受容体 CLCP1 と、ER に局在し低酸素・低栄養などに起因する ER ストレス応答に重要な CIM の単離・同定に成功している。本研究課題においては、両分子の分子機能解明を目指した解析を進めて、当該シグナルの阻害による革新的がん治療法の開発へと道を拓くことを目指す。また、我々の膨大な網羅的遺伝子発現解析データを活用して、CLCP1、CIM 或いはその結合・シグナリング分子の発現と転移・再発などの病態との関連を検討し、テーラーメイド医療に資する分子診断法の構築を併せて進める。

さらに、LNM35 株という比類無いヒト肺がんの転移研究モデル系と、最新のプロテオミクス解析技術を持つ当該研究グループの優位性を生かし、さらなる分子標的の探索・同定を進める。とくに、分子標的薬の創薬開発に有利なキナーゼ等に焦点を絞ったプロテオミクス解析による探索・同定を進めて、分子標的薬の創薬開発基盤を築く。

## B. 方法

I-i) CLCP1 及びそのシグナリング分子を標的とした検討：

ヒト CLCP1 の細胞外ドメインの断片を、293T で発現・精製し、免疫原として用いてマウスを免疫した。型通りにハイブリドーマを作成し免疫源でスクリーニングしモノクローナル抗体を取得した。さらに、得られた CLCP1 特異的抗体を用いて、肺癌腫瘍組織のホルマリン固定パラフィン包埋切片に対して、常法に従って免疫組織学的な検討を加えた。なお、膜蛋白である CLCP1 が細胞膜に沿って染色像を示すものを、CLCP1 発現陽性とした。

LNM35 細胞及び CLCP1 ノックダウン株由来の細胞融解液に、上記抗 CLCP1 抗体を加えて免疫沈降し、SDS-PAGE を施行し、CLCP1 と共沈降するバンドを同定した。これらの CLCP1 と共沈降するバンド 250kD と 45kD の 2 本をゲル断片として切り出し、トリプシン消化し、ナノフロー液体クロマトグラフィーにて展開しタンデム型質量分析装置による解析を施行しペプチドを同定した。

CLCP1 を発現させるレンチウイルスベクターを作成し、ウイルスを LNM35 及び、LNM35 の親株で CLCP1 低発現・低転移性の N15 株に感染させ、ベクター由来の blasticidine 耐性遺伝子により獲得された blasticidine 耐性細胞群を選択後に、セルソーターにより安定して CLCP1 を過剰発現する細胞群を選択した。この CLCP1 過剰発現細胞群および、Empty ベクター由来ウイルスを感染させた対照細胞群をから total RNA を抽出した。遺伝子発現解析用 Microarray (Agilent) にハイブリし、網羅的な遺伝子発現解析を行った。解析データを IPA ソフトウェアを用いて検討し、CLCP1 発現亢進によって発現が変動する遺伝子群が有意に関与するシグナルパスウェイを検出し、CLCP1 が果たす機能を探索した。

I-ii) CIM 及びそのシグナリング分子を標

## 的とした検討：

CIM 遺伝子の shRNA 発現ベクター或いはスクランブル shRNA を導入した LNM35 株トランスフェクタントから抽出した蛋白に対して、還元・アルキル化処理後にトリプシンを用いたタンパク質消化を行って、それぞれのペプチド試料を得た後に、非放射性安定同位体ペプチド標識試薬である iTRAQ を用いて標識化を行った。ナノフロー液体クロマトグラフィーとタンデム型質量分析装置による網羅的発現プロファイルの比較定量解析を行った。取得された発現プロファイル解析データを用いて、CIM 発現の抑制により差異を認めるタンパク質群が形成する CIM 制御パスウェイの探索を、KeyMolnet ソフトウェアを用いたネットワーク解析によって進めた。さらに、網羅的タンパク発現プロファイルデータを用いた Gene Ontology term 解析を進める事により、CIM の有する分子機能に関する探索的な検討を進めた。

## II. LNM35 株のプロテオミクス解析による新規分子標的の探索・同定と応用：

高転移性肺癌細胞株 LNM35 株と低転移性亜株 NCI-H460-N15 株（以下 N15 株）を用いて、網羅的にリン酸化タンパク質発現プロファイルの比較定量解析を進めた。LNM35 並びに N15 株よりタンパク質を抽出し、還元・アルキル化処理後に、トリプシンを用いたタンパク質消化を行って、それぞれのペプチド試料を得た。iMAC (immobility metal affinity column) を用いて、それぞれのペプチド試料より、リン酸化ペプチドの精製・濃縮を行った。精製・濃縮リン酸化ペプチド試料は、さらに、iTRAQ 試薬を用いて標識化され、ナノフロー液体クロマトグラフィーと質量分析装置を用いて網羅的比較定量発現プロファイルの取得を進めた。

## C. 結果

### I-i) CLCP1 及びそのシグナリング分子を標的とした検討：

CLCP1 は、LNM35 株の高転移性獲得に伴って過剰発現されている分子として同定し、これまでに LNM35 株において高い運動能・転移能の付与に深く関わっていることを明らかとしている。本年度の研究においては、抗 CLCP1 抗体を作成してより詳細な機能に関する検討を加えた。作成した抗 CLCP1 抗体を用いて、肺癌患者腫瘍組織検体における発現を免疫組織化学的に検討したところ、正常肺においては発現が見られず、腫瘍組織特異的に高頻度に CLCP1 蛋白が過剰発現していることを確認した。また、これまでに CLCP1 が細胞膜貫通型受容体としてがん抑制遺伝子ファミリーに属する SEMA4B をリガンドとし、それによる負の制御を受けていることを明らかとしてきたが (Nagai H, et al. Oncogene 2007)、本年度は CLCP1 の伝えるシグナルを解明すべく、CLCP1 と相互作用する分子群について検討を加えた。その結果、作成した CLCP1 特異的抗体を用いた解析によって、約 250kD と約 45kD の分子が CLCP1 と共沈降することを見出した。これらは、LC-MS/MS 解析による同定を行ったところ、250kD の分子量を持つ分子は non-muscle myosin IIA (MYH9) であった。一方、45kD の分子量を持つ分子は  $\beta$ -actin であった。これらの細胞骨格に関わる分子と CLCP1 が結合することを示す結果は、CLCP1 が細胞運動に重要な actomyosin 系との相互作用を介して、浸潤・転移能の付与に関わっている可能性を示唆する。

さらに、細胞膜貫通型受容体として



CLCP1 が伝えるシグナルを理解することを目指し、網羅的遺伝子発現解析とパスウェイ解析を組み合わせた検討を行った。CLCP1 の発現ベクターを LNM35 株の親株に当たる低転移性の N15 株に導入し、安定して CLCP1 を過剰発現するトランスフェクタントを得た。インサートを含まない発現ベクターを投入したトランスフェクタントを対照とした網羅的遺伝子発現プロファイルの比較検討を、Ingenuity Pathway Analysis ソフトウェアを用いて行った。その結果、CLCP1 の過剰発現が関連する Gene Ontology term として、axonal guidance signaling、human embryonic stem cell pluripotency、leukocyte extravasation signaling などが抽出されたことは、CLCP1 の運動能や転移能の付与への寄与を考えるに興味深い。

#### **I-ii) CIM 及びそのシグナリング分子を標的とした検討：**

高転移性肺癌細胞株 LNM35 が *in vivo* 選択を経て高転移株として樹立される過程において過剰発現を示すようになった遺伝子として同定した CIM が、LNM35 株の高い運動能と転移能の付与に関わっており、また、小胞体 (ER) に局在して ER ストレス応答に関わることをこれまでに示してきた。本年度の研究においては、CIM の機能の詳細を明らかにすることによって、転移抑制を目指した創薬研究開発へとつなげる基盤を構築するべく検討を進めた。CIM 遺伝子を特異的且つ恒常的にノックダウンするべく CIM 遺伝子の shRNA の発現ベクターを導入した LNM35 細胞株のトランスフェクタントを作成した。スクランブル shRNA を発現させたトランスフェクタントを対照としつつ、iTRAQ 法によって安定同位体

によるペプチド標識を行い、ナノスケールの液体クロマトグラフィーとタンデム質量分析器を応用した網羅的タンパク質発現解析を行った。得られた解析データを用いて、両者の発現に差異のあるタンパクが形成する、CIM によって制御されるパスウェイの探索をネットワーク解析によって進めた。その結果 CIM 遺伝子産物が、微小環境における低酸素ストレス応答に重要な HIF-1 $\alpha$  の発現を正に制御することが示唆された。さらに、CIM による HIF-1 $\alpha$  制御機序の解明を目指した検討を進めた結果、CIM は HIF-1 $\alpha$  を負に制御する OS-9 に結合して、その機能を抑制することを通じて HIF-1 $\alpha$  発現を正に制御していることが明らかとなった。

さて、前述の網羅的タンパク発現プロファイル解析によって得られたデータを用いて、Gene Ontology term 解析を行ったところ、CIM 遺伝子産物が、小胞体ストレス応答シグナル伝達 (UPR, unfolded protein response) において重要な働きを有することを示唆する結果が得られた。UPR は微小環境からの低グルコース、アミノ酸ストレスに対する細胞保護応答として極めて重要な働きを有するものである。そこで、UPR に関連する分子群と CIM との相互作用を検討したところ、UPR の制御において重要な鍵を握る BiP と結合することが明らかとなった。さらに、CIM の発現抑制により、UPR シグナル伝達の障害が認められることなどより、この BiP との相互作用を通じて、CIM は UPR シグナル伝達を正に制御する機能を持つことが明らかとなった。

#### **II. LNM35 株のプロテオミクス解析による新規分子標的の探索・同定と応用：**

LNM35 株という極めて有用なヒト肺がんの転移研究モデル系と、最新のプロテオミ

クス解析技術の両者を併せ持つ本研究グループの優位性を生かし、さらなる分子標的の探索・同定を進める。本年度はとくに分子標的薬の創薬開発に有利なキナーゼに焦点を絞り、LNM35 株と N15 株を用いてリン酸化蛋白の網羅的発現プロファイル比較を進めた。これまでに 30,000 以上のペプチドのリン酸化に関する発現情報の取得を完了した。その結果、数百個の発現に差異のあるリン酸化サイトの存在が同定され、LNM35 株における高転移性獲得にリン酸化シグナルが寄与している可能性が示唆された。

### III. 研究成果の意義及び今後の発展性

肺がんは、年間 6 万 5 千人を超える生命を奪うがん死亡原因の第 1 位である。したがって、肺がん死亡の主因である浸潤・転移の本態に関わる CLCP1 と CIM という 2 つの独自性の高い分子標的に対して、充実した基盤となる研究成果をもとにテーラーメイド医療へ道を拓く革新的治療法を開発する本研究課題は、難治がんの代表例でありつづける肺がん治療に大きなインパクトを与えることが期待される。

本年度の研究を進める過程で抗 CLCP1 抗体を作成した。CLCP1 分子に対してはこれまで有用な抗体が存在しなかったために、蛋白レベルの解析ができなかったが、それによって詳細な臨床病理学的或いは生化学的検討を行うことが可能となった。その結果、CLCP1 蛋白の過剰発現は、極めて腫瘍特異性が高いことが明らかとなり、分子標的としての有用性の高さが裏打ちされた。さらに、CLCP1 の細胞骨格系制御への関与の可能性が示唆されたので、今後さらに詳細な相互作用の機序に迫る検討を進めるよていである。また、興味深いことに CLCP1 と他の細

胞膜受容体との複合体形成を示唆する予備的な検討結果が本年度の研究において得られているので、来年度により詳細な検討を加える予定としている。

CIM 分子が OS-9 との結合を介した HIF-1 $\alpha$  を正に制御するとともに、BiP との結合を介して ER ストレスに対する UPR を正に制御して、がん細胞が転移先でコロニー形成をする過程で遭遇すると考えられる劣悪な低酸素・低栄養などに起因する ER ストレスへの耐性を付与して転移能の獲得に寄与していることを示唆する結果が得られた。一方で、CIM のノックダウンによって、ER ストレス非存在下においても癌細胞の顕著な運動能・浸潤能の低下が生じ、ER ストレス耐性の付与とは独立した機能が存在することが明らかである。そこで、来年度は運動能・浸潤能の付与に直接関わる未知の分子機序について、プロテオミクス解析によるアプローチを中心に取り組む予定である。

また、LNM35 株を用いたプロテオミクス解析をとくにリン酸化タンパクを中心に進めることによって、転移能獲得と関連すると考えられる数百個のリン酸化サイトを同定したので、来年度はそのキーとなる分子の探索を進める予定としている。

### D. 健康危険情報

特記すべき事項無し

### E. 研究発表

1. Yanagisawa K, Konishi H, Arima C, Tomida S, Takeuchi T, Shimada Y, Yatabe Y, Mitsudomi T, Osada H, and Takahashi T. Novel metastasis-related gene CIM functions in the regulation of multiple

- cellular stress response pathways. **Cancer Res.** 70:9949-9958, 2010.
2. Osada H and Takahashi T. let-7 and miR-17-92: Small-sized major players in lung cancer development. **Cancer Sci.** 102:9-17, 2011. (review)
  3. Huang QA, Tomida S, Masuda Y, Arima C, Cao K, Kishihara T, Osada H, Yatabe Y, Kamiya K, Takahashi T and Suzuki, M. Regulation of DNA polymerase POLD4 influences genomic instability in lung cancer. **Cancer Res.** 70:8407-8416, 2010.
  4. Matsuyama Y, Suzuki M, Arima C, Huang QM, Tomida S, Takeuchi T, Sugiyama R, Itoh Y, Yatabe Y, Goto H and Takahashi T. Proteasomal non-catalytic subunit PSMD2 as a potential therapeutic target in association with various clinicopathologic features in lung adenocarcinomas. **Mol. Carcinogenesis** (in press).
  5. Tanaka, S., Cao, K., Niimi, A., Limsirichaikul, S., Huang, Q., Nakamura, N., Murate, T., Hasegawa, Y., Takahashi, T. and Suzuki M. Functions of base selection step in human DNA polymerase alpha. **DNA Repair** 9:534-541, 2010.
  6. Huang QA, Akashi T, Matsuda Y, Kamiya K, Takahashi T and Suzuki M. Roles of POLD4, smallest subunit of DNA polymerase  $\delta$ , in nuclear structures and genomic stability of human cells. **Biochem. Biophys. Res. Comm.** 391:542-546, 2010.
  7. Miki D, Kubo M, Takahashi A, Yoon K-A, Kim J, Lee GK, Zo JI, Lee JS, Hosono N, Morizono T, Tsunoda T, Kamatani N, Chayama K, Takahashi T, Inazawa J, Nakamura Y, and Daigo Y. Variation in TP63 is associated with lung adenocarcinoma susceptibility in Japanese and Korean populations. **Nature Genet.** 42:893-896, 2010.
  8. Hu Q, Akatsuka S, Yamashita Y, Ohara H, Nagai H, Okazaki Y, Takahashi T, and Toyokuni S. Homozygous deletion of CDKN2A/2B is a hallmark of iron-induced high-grade rat mesothelioma. **Lab. Invest.** 90:360-373, 2010.
  9. Sadej R, Romanska H, Kavanagh D, Baldwin G, Takahashi T, Kalia N, Berditchevski F. Tetraspanin CD151 regulates TGF- $\beta$  signalling: implication in tumour metastasis. **Cancer Res.** 70:6059-6070, 2010.
  10. Bryant CM, Albertus DL, Kim S, Guedj M, Travis WD, Yatabe Y, Takahashi T, Brambilla E and Beer DG. Clinically relevant characterization of lung adenocarcinoma subtypes based on cellular pathways. **PLoS One** 5: e11712, 2010. doi:10.1371/journal.pone.0011712.
  11. Sides M, Klingsberg RC, Shan B, Gordon KA, Nguyen HT, Lin Z, Takahashi T, Flemington EK and Lasky JA. The Epstein-Barr virus LMP 1 and TGF- $\beta$ 1 synergistically induce EMT in lung epithelial cells. **Am. J. Resp. Cell Mol. Biol.** (in press)
  12. Alifano M, Souzaé F, Dupouy S, Camilleri-Broët S, Takahashi T, Ahmed-Zaïd S, Cancellieri A, Damiani S, Boaron M, Broët P, Miller LD, Gespach G, Regnard JF and Forgez P. Neurotensin receptor 1 determines the outcome of non-small cell lung cancer. **Clin. Cancer Res.** 16: 4401-4410, 2010.



13. Heishi T, Hosaka T, Suzuki H, Suzuki Y, Miyashita H, Oike Y, Takahashi T, Nakamura T, Arioka S, Mitsuda Y, Takakura T, Hojo K, Matsumoto M, Yamauchi C, Ohta H, Sonoda H and Sato Y. Endogenous angiogenesis inhibitor vasohibin1 exhibits a broad-spectrum anti-lymphangiogenic activity and suppresses lymph node metastasis. **Am. J. Pathol.** 176:1950-1958, 2010.
14. Attoub S, Hassan AH, Vanhoecke B, Itratni R, Takahashi T, Gaben AM, Bracke M, Awad S, Kamalboor JA, Al Sultan MAH, Arafat K, Gespach C and Petroianu G. Inhibition of cell survival, tumor growth and histone deacetylase (HDAC) activity by the dietary flavonoid luteolin in human epithelioid cancer cells. **Eur. J. Pharmacol.** 651:18-25, 2011
15. Mulder JE, Brien JF, Racz WJ, Takahashi T and Massey T. Mechanisms of amiodarone and desethylamiodarone cytotoxicity in non-transformed human peripheral lung epithelial cells. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 336:551-559, 2011
16. Suda K, Murakami I, Katayama T, Tomizawa K, Osada H, Sekido Y, Maehara Y, Yatabe Y, Mitsudomi T. Reciprocal and complementary role of MET amplification and EGFR T790M mutation in acquired resistance to kinase inhibitors in lung cancer. **Clin Cancer Res.** 16:5489-5498, 2010.
17. An B, Kondo Y, Okamoto Y, Shinjo K, Kanemitsu Y, Komori K, Hirai T, Sawaki A, Tajika M, Nakamura T, Yamao K, Yatabe Y, Fujii M, Murakami H, Osada H, Tani T, Matsuo K, Shen L, Issa JP, Sekido Y. Characteristic methylation profile in CpG island methylator phenotype-negative distal colorectal cancers. **Int J Cancer** 127:2095-2105, 2010.
18. Horio Y, Osada H, Shimizu J, Ogawa S, Hida T, Sekido Y. Relationship of mRNA expressions of RanBP2 and topoisomerase II isoforms to cytotoxicity of amrubicin in human lung cancer cell lines. **Cancer Chemother Pharmacol.** 66:237-243, 2010.
- F. 学会発表
- 1 Takahashi T. MicroRNA alterations in the pathogenesis of lung cancers. 1<sup>st</sup> AACR-IASLC Joint Conference: Molecular Origins of Lung Cancer: Prospects for Personalized Prevention and Therapy. San Diego, USA. January 11-14, 2010.
- 2 Takahashi T. MicroRNA alterations in the pathogenesis of lung cancers. 8<sup>th</sup> AACR-JCA Joint Conference. Waikoloa, USA. February 5-9, 2010.
- 3 高橋隆 「ヒトがんにおけるマイクロRNAの異常」第69回日本癌学会総会がん研究入門コース2 大阪、2010年9月22-24日
1. 柳澤 聖、小西博之、有馬千夏、富田秀太、長田啓隆、高橋 隆 “新規肺癌転移関連遺伝子 CIM の機能解析” 第69回日本癌学会学術総会 ワークショップ10-1 浸潤・転移 (1) 大阪、2010年9月22-24日
2. 長田啓隆 「Roles of ASH1-regulated miRNAs in lung cancer development.」第69回日本癌学会総会 International Sessions-8. microRNA dysregulation

in cancers and its clinical application. 大阪、2010年9月22-24日

3. 長田啓隆 「肺癌における microRNA 異常」 第51回日本肺癌学会総会（シンポジウム2：肺癌の分子生物学的研究—基礎から臨床へ） 2010年11月3-4日、広島
4. 長田啓隆 「Roles of ASH1-regulated miRNAs in lung cancer development.」 第33回日本分子生物学会年会（口演） 2010年12月7-10日 神戸

## G. 知的財産権の出願・登録状況

- a. 特許出願  
特記すべき事項無し
- b. 実用新案登録  
特記すべき事項無し
- c. その他  
特記すべき事項無し

### III. 分担研究報告書



## 厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）

### 分担研究報告書

分担研究者： 長田啓隆（愛知県がんセンター研究所分子腫瘍学部・室長）

分担研究項目： CLCP1 に関する研究開発

#### 研究要旨

本分担研究では、転移関連新規遺伝子 CLCP1 の機能解析を進め、その知見を新規のがん診断治療法へ応用することを目的とし、CLCP1 結合分子や CLCP1 下流シグナルの同定等を通じて、CLCP1 の機能解析を進めた。初めに CLCP1 細胞外ドメインを免疫原としてモノクローナル抗体を作成した。この抗体を用いて、肺癌組織検体を免疫組織化学的に検討し、細胞膜染色陽性肺癌症例が有意に予後不良であることが判明した。またこの抗体の免疫沈降物を LC-MS/MS 解析し、CLCP1 と共沈降する蛋白として non-muscle myosin IIA 及び  $\beta$ -actin を同定した。更に LNM35 や親株に CLCP1 を過剰発現させて、変動する遺伝子群の機能を解析したところ、幹細胞維持・細胞運動等の癌悪性化への寄与を示唆するパスウェイが検出された。以上の研究結果は、CLCP1 が肺癌細胞の運動制御やシグナル伝達に関わり、肺癌の転移・悪性化に寄与し、肺癌予後不良因子となることを強く示唆した。

#### A. 研究目的

本研究の目的は、我が国をはじめとする先進諸国の癌死亡原因第1位である肺癌を対象に、がん死に至る病態の本態である浸潤と転移の分子機構の解明研究と革新的なテーラーメイド分子診断・治療法の開発を目指すことにある。そのために本分担者は、我々の研究グループが単離・同定した転移関連新規遺伝子 CLCP1 の解析を進め、その知見を新規のがん診断治療法へ応用することを目指している。

CLCP1 は、がん抑制遺伝子ファミリーに属する SEMA4B が結合し、負に制御する細胞膜受容体蛋白であり、細胞外から細胞内への

シグナル伝達に関与することが示唆される。そこで CLCP1 結合分子の網羅的探索・同定や、CLCP1 によって制御される下流遺伝子群・パスウェイの *in silico* 同定等を通じて、CLCP1 の機能解析を進めて、当該シグナルの阻害による革新的がん治療法の開発を目指した。

#### B. 方法

CLCP1 特異的抗体

ヒト CLCP1 の細胞外ドメインの断片を、293T で発現・精製し、免疫原として用いてマウスを免疫した。型通りにハイブリドーマを作成し免疫原でスクリーニングしモノ

クローラ抗体を取得した。

### 免疫組織化学

上記で得られた CLCP1 特異的抗体を用いて、パラフィン包埋された肺癌患者由来肺組織を、通常通りに免疫組織化学的手法を用いて染色した。細胞膜に沿って染色像を示すものを CLCP1 発現陽性とした。

### 免疫沈降

LNM35 細胞及び CLCP1 ノックダウン株由来の細胞融解液に、上記抗 CLCP1 抗体を加えて免疫沈降し、SDS-PAGE を施行し、CLCP1 と共沈降するバンドを同定した。

### LC-MS/MS 解析

SDS-PAGE にて同定された、CLCP1 と共沈降するバンド 250kd と 45kd の 2 本をゲル断片として切り出し、トリプシン消化した。その消化物を nanoLC にて展開し ABI 4800 を用いて MS/MS 解析し、Mascot 解析を施行してペプチドを同定した。

網羅的遺伝子発現解析およびパスイェ解析

CLCP1 を発現させるレンチウイルスベクターを作成し、ウイルスを LNM35 及び、LNM35 の親株で CLCP1 低発現・低転移性の N15 株に感染させ、ベクター由来の blasticidine 耐性遺伝子により獲得された blasticidine 耐性細胞群を選択後に、セルソーターにより安定して CLCP1 を過剰発現する細胞群を選択した。この CLCP1 過剰発現細胞群および、Empty ベクター由来ウイルスを感染させた対照細胞群を通常環境(血清 10%)と低血清環境(血清 0.5%)とで培養し、total RNA を抽出して probe として用いた。遺伝子発現解析用 Microarray (Agilent) にハイブリし、網羅的な遺伝子発現解析を行った。解析データを IPA ソフトウェアを用いて検討し、CLCP1 発現亢進によって発現が変動する遺伝子群が有意に関与するシグナルパスウ

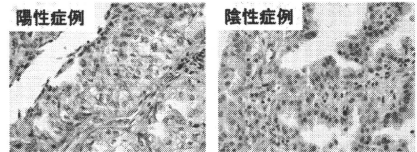
エイを検出し、CLCP1 が果たす機能を探索した。

### C. 結果

CLCP1 の細胞外ドメインを用いて免疫したところ、保存された FA58C ドメイン近傍の非保存領域に対するモノクローナル抗体を作成できた。作成したモノクローナル抗体は、FACS 解析にて親株に比して LNM35 で強い陽性シグナルが見られ、Western blot 解析にても親株に比して LNM35 で約 130kd のバンドの発現量の亢進が検出でき、CLCP1 を認識していることが確認された。

次に、この抗 CLCP1 抗体を用いて、肺癌患者腫瘍組織検体における発現を免疫組織化学的に検討した。抗 CLCP1 抗体は通常のパラフィン包埋標本で使用でき、多くの肺癌組織では細胞膜が染色され、一方周辺の正常肺組織においては染色陰性であった。

図1 抗CLCP1抗体による肺癌組織の免疫染色

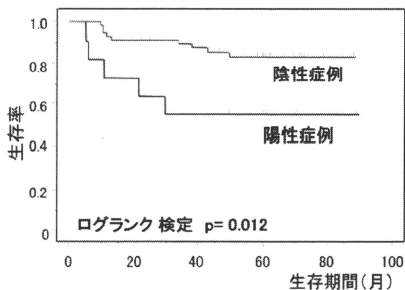


左)陽性症例:細胞膜に沿って染色が見られる。右)陰性症例:細胞質が弱く染色されるが細胞膜は染色されない。

そこで、この抗体を用いて肺癌患者 70 症例の腫瘍組織検体につき、免疫組織化学染色を施行し、細胞膜染色陽性症例と陰性症例とで、肺癌切除手術後の予後を比較検討した。すると、細胞膜染色陽性症例が有意に予後不良であることが判明した。このような、CLCP1 が肺癌において高頻度に過剰発現し、不良予後と相関するという結果は、以前の mRNA 発現に基づく解析結果 (未発表)

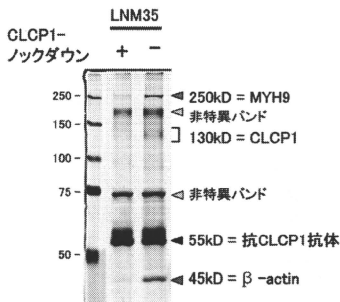
と一致する結果であり、CLCP1 高発現が肺癌の転移・悪性化等に関与する可能性を強く示唆した。

図2 Kaplan-Meier 解析による肺癌組織の CLCP1 染色所見と術後予後の相関



一方、CLCP1 の関与するシグナル伝達を解明すべく、CLCP1 と相互作用する分子群について検討を加えた。LNM35 細胞及び CLCP1 ノックダウン株由来の細胞融解液に抗 CLCP1 抗体を加えて免疫沈降した。それを SDS-PAGE にて分離し、LNM35 細胞特異的に CLCP1 と共沈降するバンドを検査し、2 本のバンド 250kD と 45kD 同定した。

図3 抗CLCP1抗体による免疫沈降



免疫沈降物をSDS-PAGE後に銀染色した。CLCP1のノックダウンに伴い、CLCP1自身の130kDバンドと共に、250kD、45kDのバンドが著減している。Mass解析によりこれらのバンドはMYH9及びβ-actinに由来すると判明した。

この2本のバンド250kDと45kDをゲル断片として切り出し、トリプシン消化した。その消化物をnanoLCにて展開しABI 4800を用いてMS/MS解析し、Mascot解析を施行してペプチドを同定した。その結果、250kDの分子量を持つ分子はnon-muscle myosin IIA (MYH9)であった。一方、45kDの分子量を持つ分子はβ-actinであった。これらの細胞骨格に関わる分子とCLCP1が結合することを示す結果は、CLCP1が細胞運動に重要なactomyosin系との相互作用を介して、浸潤・転移能の付与に関わっている可能性を示唆した。



#### 図4 250kDバンドのMascot解析結果1

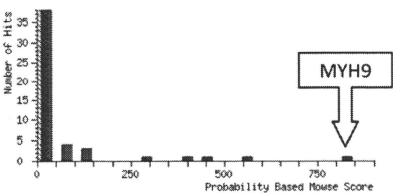
Match to: MYH9\_HUMAN Score: 129

```

1 MAQQAAYKLV YVDKFNINP LAQADIAAKK LVVVPDSQSG FEPASLKEEV
5 GEEAIVELVE NGKKVYKNDQ DIOKMPPFK SKVEDEALTE GLNEMSLVHN
101 LKERYEPGLI YTYSGLFVY INPKYKLPYI SEEI VEMVYK KKRHEAPSHI
151 YA1DTAYRS MMDGDRDPSI LCTGEGSAGK TENTKRIYIV LAYVASSHKS
201 KDDQDELRO LLOANP1EA FQKATKEND NSGFRKFR LNFYDNTLV
251 GANETITLLE KSRAIQAKE ERTHIFITYL LSGAHELTK DLLEPYMY
301 RFLSNQHYTI PGDDQKDMFQ ETMEAMRIMG IPEEONGMLL RIVSGLQLG
351 N1VFKKERDI DQASMPDNTA AOKVSHLGI NVDTFTRGIL TPRIKVRGDI
401 VOKAQKTEQA DFA1EALAKA TYERNFRVLV LRINKALDKI KRGGSF1GI
451 LD1AGFE1FD LNSFEQLGIN YTNEKLOLF NHTFM1LEGE EYOREG1EWN
501 F10FG1OLFQ CIDL1EKPAQ FQKATKEND NSGFRKFR PLNDNIATLL
551 G1MFKFQKPK QLRQKDFG1 IHVAGVMSYI ADQW1MMDI
601 HSDSKFVLYE LNKQVDR1IG LDQVAGKSTP ALPGAFAKTRK GMFRTVGYLE
651 KEQALKMATL LRNTNPNFVR CI1PNHEKKA GKLD1PHL1VD QLRNGVLEG
701 IRI1ROGFPN RVYFQEFQR YE1LTPNS1P KGFMDGKQAC VLM1KALELD
751 SNL1YRTGSK VFRAG1VAH LEERDLK1TI DVI1GFQAC RYLRAR1KAF
801 KRQDGLTAMK VLORNGAATL KLRN1QWRRL FTKVPLQ1V SRGEEEMMAK
851 EEL1VWVKEK QLAJENR1TE METLGSQ1MA EKLG1QDGLQ AETELCAEAE
901 ELR1ARL1TAKK QELEE1LCHD EARVEE1EER COHLQAEKK MOONI1QELE
951 QLEEEESARO KLQLEK1VITE AKLK1LEEEO I1LEDONCKL AKEK1LEDR
1001 IAFT1TN1TE EEEKS1SLAK LKNK1EAM1I DLEER1RREE KORG1ELEKTR
1051 RKL1EGD1TDL SDI1AE1LQD IAELK1KOLAK KEFE1QALAA RVEE1EAAKN
1101 WALK1RELEI SDI1AE1LQD ESERAS1MKA EKQKRD1GEE LEAL1KTELD
1151 TLDS1AQDQ LRSKRE1QVN TLK1LEEFEEA KTHAE1Q1QEM ROKHS1QAVVE
1201 LAQLEQ1TRK VKANLE1KAKQ ILTENEG1LA NEVKV1LLOG GDSER1KRKV
1251 EAQLEQ1LOVK FNEGER1VTE LADQV1TKLV ELDNV1TGLS QDSK1SKLT
1301 KDF1SALESOL QD1Q1LOE NRQK1LS1TK LKQVE1DENS FREL1EEEEE
1351 AKHL1EKQ1A TLHAW1ADMK KMKDE1SVGL E1AE1EVRKRL QND1EGL1SOR
1401 HEKV1AYVK LK1TK1RLQD EL1DLD1VLD H0RGS1QANLE KKKK1D1LL
1451 AEEK1ISAKY AEERDRA1EAE ARKE1TKALS LARALE1EAM QKAE1LERLNK
1501 OF1ETEM1DLN SKSD0V1GKSV HELEK1SRAL E00VE1MKTO LEELE1DE1QA
1551 TDDAK1RLEV N1QAM1QAF E RDL0GDR1EQS ECKK1RQLVR VREME1AELD
1601 ERKORS1MAVA ARKLE1NDLK DLE1CAH1DSAN KH0DE11KQL RKL1DQMKDC
1651 MREL1D0TAS REE1L1AQAE NFKLK1SMXA EMT1Q1LELA AEA1RKRQDQ
1701 D0RDEL1ADE1 ANSSQ1GALA LEEKR1RL1EAR IAQL1EE1LEE EQGENT1IND
1751 RLK1KAN1LDI Q1NTDL1NLER SHAKN1MER QOL1EROMKEL KYK10EMEGT
1801 VKSY1KASIT1 ALEAK1IAQE EQLNDE1TKER QAAEK1QV1RTE EKRL1QDVLQ
1851 VED1ETAD1NAO YKDQD1KAST RLK1QLK1RAE EAAE1EAG1RAN EKRL1QREL
1901 EDARTE1RME NREVS1LKNK LRR1DGL1PFVY PPR1M1ARKVAG DGS1DEVDGK
1951 ADGA1EAKPAE
    
```

250kDのバンドのMascot解析結果を示す。Mr=226のヒトMYH9 (non-muscle myosin IIa) 蛋白と同定された。Mass解析で検出されたペプチドを赤太字で示す。

#### 図5 250kDバンドのMascot解析結果2

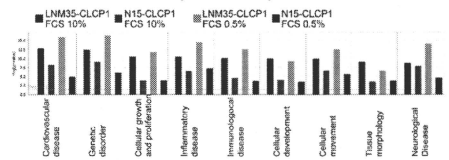


非常に高い信頼度で、250kDのバンドがヒトMYH9と同定された。

さらに、細胞膜貫通型受容体として CLCP1 が伝えるシグナルを理解することを目指し、網羅的遺伝子発現解析とパスウェイ解析を組み合わせた検討を行った。CLCP1 過剰発現により変動する遺伝子群の関与する機能やシグナルを解明するために、Ingenuity

Pathway Analysis (IPA) ソフトウェアを用いて解析を行った。IPA では遺伝子セットの機能として BioFunction 及び Canonical Pathway を用いて表示されるが、解析の結果、BioFunction としては、Cardiovascular disease, Genetic disorder, Cellular growth and proliferation, Inflammatory disease, Immunological disease, Cellular development, Cellular movement, Tissue morphology, Neurological Disease 等の有意な関与が見られた。

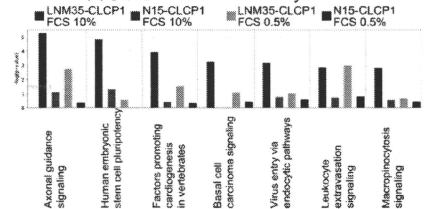
図6 IPAによって同定されたCLCP1によって発現変動する遺伝子群の機能(BioFunction)



関与の強さを-log(p-value)で表す。LNM35の方が親株N15よりも有意に強い関与を示し、CLCP1シグナルがより効率的に伝達されると考えられる。

Canonical Pathway としては、Axonal guidance signaling, Human embryonic stem cell pluripotency, Factors promoting cardiogenesis in vertebrates, Basal cell carcinoma signaling, Virus entry via endocytic pathways, Leukocyte extravasation signaling, Macropinocytosis signaling 等の有意な関与が見られた。

図7 CLCP1によって発現変動する遺伝子群の関与するCanonical Pathways



関与の強さを-log(p-value)で表す。LNM35の方が親株N15よりも有意に強い関与を示し、CLCP1シグナルがより効率的に伝達されると考えられる。

このような機能は、N15 よりも LNM35 で有意に検出されることが多く、LNM35 では CLCP1 が関与するシグナル系が活性化しており、外来性 CLCP1 の誘導により更に、そのシグナルが活性化すると考えられる。このように CLCP1 の過剰発現が関連する Canonical Pathway として、axonal guidance signaling、human embryonic stem cell pluripotency、Basal cell carcinoma signaling、leukocyte extravasation signaling などが抽出されたことは、CLCP1 の運動能・転移能の付与や癌悪性化への寄与を示唆しており興味深く、更に研究を進める必要がある。

本年度の研究を進める過程で抗 CLCP1 抗体を作成した。CLCP1 分子に対してはこれまで有用な抗体が存在しなかったために、蛋白レベルの解析ができなかったが、それによって詳細な臨床病理学的或いは生化学的検討を行うことが可能となった。その結果、CLCP1 蛋白の過剰発現は、極めて腫瘍特異性が高いことが明らかとなり、分子標的としての有用性の高さが裏打ちされた。さらに、CLCP1 の細胞骨格系制御への関与の可能性が示唆されたので、今後さらに詳細な相互作用の機序に迫る検討を進める予定である。

## D. 健康危険情報

特記すべき事項無し

## E. 研究発表

1. [Osada H](#) and [Takahashi T](#), let-7 and miR-17-92: Small-sized major players in lung cancer development. **Cancer Sci**. 102:9-17, 2011. (review)
2. [Yanagisawa K](#), Konishi H, Arima C, Tomida S, Takeuchi T, Shimada Y, Yatabe Y, Mitsudomi T, [Osada H](#), and [Takahashi T](#). Novel metastasis-related gene CIM

functions in the regulation of multiple cellular stress response pathways. **Cancer Res**. 70:9949-9958, 2010

3. Huang QA, Tomida S, Masuda Y, Arima C, Cao K, Kisahara T, [Osada H](#), Yatabe Y, Kamiya K, [Takahashi T](#) and Suzuki M. Regulation of DNA polymerase POLD4 influences genomic instability in lung cancer. **Cancer Res**. 70:8407-8416, 2010.
  4. Suda K, Murakami I, Katayama T, Tomizawa K, [Osada H](#), Sekido Y, Maehara Y, Yatabe Y, Mitsudomi T. Reciprocal and complementary role of MET amplification and EGFR T790M mutation in acquired resistance to kinase inhibitors in lung cancer. **Clin Cancer Res**. 16:5489-5498, 2010.
  5. An B, Kondo Y, Okamoto Y, Shinjo K, Kanemitsu Y, Komori K, Hirai T, Sawaki A, Tajika M, Nakamura T, Yamao K, Yatabe Y, Fujii M, Murakami H, [Osada H](#), Tani T, Matsuo K, Shen L, Issa JP, Sekido Y. Characteristic methylation profile in CpG island methylator phenotype-negative distal colorectal cancers. **Int J Cancer** 127:2095-2105, 2010.
  6. Horio Y, [Osada H](#), Shimizu J, Ogawa S, Hida T, Sekido Y. Relationship of mRNA expressions of RanBP2 and topoisomerase II isoforms to cytotoxicity of amrubicin in human lung cancer cell lines. **Cancer Chemother Pharmacol**. 66:237-243, 2010.
- ## F. 学会発表
5. [長田啓隆](#) 「Roles of ASH1-regulated miRNAs in lung cancer development.」第 69 回日本癌学会 International Sessions-8. microRNA dysregulation

in cancers and its clinical application. (大阪)

6. 長田啓隆 「肺癌における microRNA 異常」 第 51 回日本肺癌学会総会 (シンポジウム 2 : 肺癌の分子生物学的研究—基礎から臨床へ) (広島)
7. 長田啓隆 「Roles of ASH1-regulated miRNAs in lung cancer development.」 第 33 回日本分子生物学会年会 (口演) (神戸)

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

- a. 特許出願  
特記すべき事項無し
- b. 実用新案登録  
特記すべき事項無し
- c. その他  
特記すべき事項無し