

20118045A

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23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 高橋 隆

平成24年(2012)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	25

## I. 研究組織

平成 23 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	名古屋大学大学院医学系研究科分子腫瘍学分野

## 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 については、細胞膜貫通分子の CLCP1 の細胞内配列及び他の細胞膜分子との相互作用に注目して検討することにより、肺がんの病態に重要な寄与をする受容体型チロシンキナーゼ分子 (RTK) の EGFR 及び MET との相互作用及びクロストークを示唆する知見を得た。また、CLCP1 の過剰発現により変動する遺伝子発現プロファイルという実験的データと、当研究グループが持つ肺がん臨床検体の遺伝子発現プロファイルデータとの統合的なバイオインフォマティクス解析において、CLCP1 の発現はとくにがんの増殖・進展との関わりが知られているパスウェイに影響を与えることが示唆された。

CIM の持つ細胞運動能の制御機能の詳細を明らかとすることによって、転移抑制を目指した創薬研究開発への基盤を構築すべく検討を進めた。バキュロウイルスに発現させた CIM を精製して作成したカラムを用いて、LNM35 株より抽出した蛋白試料中に存在する CIM 結合分子の探索を進めた。タンデムナノ液体クロマトグラフィーとタンデム質量分析器を用いた網羅的な蛋白発現解析の結果、複数の CIM 結合候補分子の探索を進めた。その結果、アクチン重合や細胞骨格の構成に関わる複数の蛋白を、CIM 結合分子として同定することに成功した。

#### 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・治療法の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：

CLCP1 と EGFR/MET 発現ベクターを 293T 細胞にトランスフェクションし、CLCP1 に付加した HA-tag に対する抗体で CLCP1 を免疫沈降した。その免疫沈降産物を、抗リン酸化チロシン抗体にてウェスタンブロット解析して CLCP1 のリン酸化を検討した。同様に抗 EGFR 抗体或いは抗 MET 抗体を用いて、CLCP1 との相互作用を検討した。

また、CLCP1 を発現するレンチウイルスを作成し、肺がん細胞株 PC-9 に感染させて、EGFR・MET の活性に関連するリン酸化部位に対する抗体のウェスタンブロット解析で、CLCP1 と RTK とのクロストークを検討した。

さらに、CLCP1 発現レンチウイルスを

LNM35 株及び低転移性親株 N15 株に感染させ、CLCP1 を恒常的に過剰発現する株を樹立し、この CLCP1 過剰発現細胞群及び対照細胞群間で、Microarray (Agilent) を用いた網羅的な遺伝子発現解析を行った。その解析データを用いて、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について、Ingenuity Pathway Analysis ソフトウェアを用いた検討を行った。また、これらのパスウェイのトップ 20 に関して、当研究グループがすでに採取した肺がん外科切除検体の網羅的遺伝子発現プロファイルデータを用いて、肺がん臨床検体における活性度を数値化した。さらに、その活性度と外科切除後の全生存期間或いは無再発生存期間との関連について検討を加え、CLCP1 の影響下にあつて肺がんの臨床病態に関わるパスウェイを抽出した。

### I-ii) CIM 及びそのシグナリング分子を標的とした検討：

Sf9 細胞を用いて GST 融合 CIM 蛋白の大量精製系を確立し、グルタチオンビーズと結合させた CIM アフィニティーカラムを作成した。高転移性 LNM35 株の蛋白抽出試料から CIM アフィニティーカラムを用いて単離した、CIM 結合蛋白を還元・アルキル化処理の後に、トリプシンを用いた蛋白消化を行ってペプチド試料を得た。なお、グルタチオンビーズに LNM35 細胞抽出液を添加した後に、同手順に従い精製したものを対象試料として用いた。それぞれを iTRAQ 法によって異なった非放射性安定同位体によるペプチドの標識化を行い、さらにナノフロー液体クロマトグラフィーとタンデム質量分析装置を応用することにより、両試料における網羅的発現プロファイルの比較定量解析を行った。

上記の解析によって同定した CIM 結合候補分子群について、質量分析装置を応用した精密定量法である MRM 解析系を用いて、まず CIM アフィニティーカラムにより LNM35 株から精製した試料に対する検証を進めた。さらに、LNM35 株に myc 標識 CIM を外来性に発現させ、抗 myc 抗体を用いたプルダウンを行った。CIM 共沈分子に対して MRM 解析系を用いた精密定量解析を行い、細胞内における CIM と CIM 結合候補蛋白のけつごうに付いて検証を行った。

## 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：

高転移性 LNM35 株並びに低転移性親株 N15 株より蛋白を抽出し、還元・アルキル化処理の後に、トリプシンを用いた蛋白消化を行って、それぞれのペプチド試料を得た。独自に調整した鉄結合ビーズを用いて iMAC (immobility metal affinity column) を作成し、それぞれのペプチド試料より、リン酸化ペプチドの大量精製・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を行い、ナノフロー液体クロマトグラフィーと質量分析装置を駆使した解析を行うことにより、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 が、高転移性肺がん細胞亜株 LNM35 株における高い運動能・転移能の付与に深く関わることを、我々はこれまでに明らかとしてきた。さらに CLCP1 が、がん抑制遺伝子と示唆される SEMA ファミリーに属する SEMA4B をリガンドとする、細胞膜貫通型受容体であることを明らかとしてきた。本年度は、さらに CLCP1 の機能解析を進めるべく、CLCP1 結合分子の探索・同定を進

めた。CLCP1 は、特定のドメイン構造を持たない、長い細胞内領域を有するので、そのアミノ酸配列における機能モチーフの存在を探索したところ、EGFR によってリン酸化されるチロシン残基の存在が示唆された。そこで、肺がんの発生・進展に深くかかわるレセプター型チロシンキナーゼである EGFR 及び MET と CLCP1 との相互作用について検討した。その結果、CLCP1 は EGFR 及び MET と結合して、チロシンリン酸化を受けることが明らかとなった。この CLCP1 のチロシンリン酸化は、両 RTK の酵素阻害剤によって消失した。したがって、CLCP1 は SEMA4B をリガンドとする受容体として機能するだけでなく、EGFR・MET からシグナルを受け、細胞内にシグナル伝搬することが想定される。また、興味深いことに CLCP1 を導入した肺がん細胞株 PC-9 において、EGFR・MET のリン酸化の増強が見られ、CLCP1 と RTK との間のクロストークの存在が示唆された。

また、昨年度から継続して、CLCP1 が伝搬するシグナルの解析を進めており、CLCP1 発現レンチウイルス感染により LNM35 株及び低転移性親株 N15 株の CLCP1 安定過剰発現細胞株を得た。それら細胞からマイクロアレイにより網羅的遺伝子発現データを得て IPA ソフトウェアによるパスウェイ解析を行い、CLCP1 の過剰発現によって影響を受ける canonical パスウェイを抽出した。さらに、この CLCP1 が関連する canonical パスウェイのトップ 20 について、我々が採取済みの肺がん症例の網羅的遺伝子発現解析データを用い、肺がん術後症例の全生存率及び無再発生存率との関連性について検討した。その結果、トップ 20 のパスウェイの中から、axonal guidance signaling、linoleic acid signaling、arachidonic acid signaling、CCR3 signal、human embryonic stem cell pluripotency、leukocyte extravasation signaling の 6 種のパスウェイが、全生存率及び無再発生存率に関連するパスウェイとして絞り込まれた。また、その他 4 種



のパスウェイが全生存率に有意な関連性を示した。これらに含まれる遺伝子には、Wntファミリー、phospholipaseA2及びCOX2、cytochrome P450ファミリー等が含まれていた。

#### I-ii) CIM及びそのシグナリング分子を標的とした検討：

CIMを標的とするショートヘアピンRNA発現ベクターを用いて、高転移性LNM35細胞において、恒常的にCIMの発現を抑制すると、顕著な細胞運動能及び浸潤能の抑制が引き起こされる。この現象は、これまでの研究で我々が明らかとしたCIMの機能、即ち、小胞体(ER)に局在して、がん細胞が周囲の微小環境から絶えず受け続ける低酸素或いは低栄養などのストレスに対する耐性の付与では説明がつかず、CIMには他の未知の機能があることが示唆される。

そこで、CIMを標的とする転移抑制を目指した創薬研究開発の基盤の構築を進めるために、CIMによる細胞運動能や浸潤能の付与・維持機構について、以下の検討を進めた。まず、バキュロウィルス・Sf9細胞を用いて精製したCIM遺伝子産物のカラムを作成し、LNM35細胞より抽出した蛋白試料中に存在するCIM結合分子の精製を行った。酵素消化後にタンデムナノ液体クロマトグラフィーとタンデム質量分析器を用いた網羅的な蛋白発現解析を行った結果、45種類のCIM結合候補分子を同定した。引き続き、これらの分子群を対象として、質量分析装置を応用した精密定量法であるMRM解析系の構築を行い、上記と同様のバキュロウィルス・Sf9細胞を用いて作成したCIMアフィニティーカラムにより、LNM35株から精製した試料に対する検証を進め、11種類の分子とCIMとの結合を確認することに成功した。これら分子群が共通して有する機能を推定する目的で、GO解析を進め

た結果、細胞骨格制御、或いは細胞運動能の制御機構との関連性が示唆され、CIMがこれらの分子群と共作用して、浸潤・転移の制御に寄与する事が示唆された。

さらなる検証として、myc標識CIMを外来性にLNM35株で発現させ、抗myc抗体を用いたプルダウンを行い、共沈分子に対してMRM解析を加えて、細胞内におけるCIMと複数の候補分子群との結合の確認にも成功した。現在、これらの分子をノックダウン或いは遺伝子導入することによって、肺がん細胞の運動・浸潤能にどのような影響を及ぼすかについて検討を進めると共に、肺がん臨床検体におけるこれら分子群の発現と臨床情報との関連についても検討を進めつつある。また、機能阻害の標的となり得るドメインを同定すべく、CIM部分欠失変異体を用いた分子間結合に関する検討を進めつつある。

#### 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：

皮下腫瘍から安定した血行性及びリンパ行性転移を示すLNM35株は、ヒト肺がんの転移研究モデル系として極めて有用である。そこで、LNM35株に対して、我々が持つ最新のプロテオミクス解析技術を適用することによって、さらなる転移抑制につながる事が期待される分子標的の探索・同定も進めた。本年度は、分子標的薬の創薬開発に有利なキナーゼを念頭に、高転移性亜株LNM35株と低転移性親株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、リン酸化レベルに有意な差異のある数百か所のリン酸化サイトを同定することに成功している。今後、基質のモチーフ解析などを進める事により、転移能の獲得に関わるキナーゼ及びフォスファターゼの同定へと結び付け、新たな肺がん治療開発へと発展させることを目

指す。

### III. 研究成果の意義及び今後の発展性

我が国において肺がんは、年間 6 万 5 千人を超える生命を奪っており、がん死亡原因の第 1 位である。肺がん死亡の主因である浸潤・転移の本態解明の持つ意義は論ずるまでもない。したがって、浸潤・転移に関わる CLCP1 と CIM という 2 つの独自性の高い分子標的に対し、テーラーメイド医療への道を拓く革新的治療法開発の基盤の確立を目指す本研究課題は、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。

本年度の研究によって、CLCP1 がこれまでに示してきた SEMA4B をリガンドとするのみならず、肺がんの発生・進展に重要な役割を担う受容体型チロシンキナーゼである EGFR 及び MET とも、機能的に相互作用を示すことが明らかとなった。このことは、CLCP1 が肺がんの発生・進展において果たしている役割の重要性を強く示唆しており、CLCP1 の細胞膜貫通型受容体としての機能の全貌を解明するべく、引き続き展開中の研究の進展が大いに期待される。

また、本年度の研究は、CLCP1 が発現レベルの調節に関わるパスウェイの同定につながった。また、実験的な網羅的発現解析データと肺がん患者サンプルの網羅的遺伝子発現解析データとの統合的な解析によって、それらのパスウェイがヒト肺がん患者の術後再発や予後に深く関連していることが示唆された。昨年度に示した高い腫瘍特異性ととともに、これらの研究成果は CLCP1 の治療標的候補分子としての極めて高い有用性を示唆する。

現在、CLCP1 の部分欠失変異体やリン酸化部位欠失変異体を用いて、受容体型チロシンキナーゼとの相互作用機構の検討を進めている。またリン酸化部位欠失変異 CLCP1 を強発現させた際の、上述のパスウェイに属する遺伝子群の発現への影響を検討しつつあり、今回見出した受容体型チロシンキナーゼとのクロストークが、

CLCP1 が制御するパスウェイに及ぼす影響についても、今後検討を加えたい。

CIM に関しては、これまで細胞の運動・浸潤能の付与に深く関与することは明確に示してきたが、その背後にある分子機序は未解明なままであった。本年度の研究において、CIM が細胞骨格の制御に関わる複数の分子と結合して細胞運動に重要な actin を制御し、運動、浸潤、転移能の付与に関与している可能性が示唆された。昨年度までに示したように、CIM は OS-9 との結合を介し HIF-1 $\alpha$  を、また、BiP との結合を介して ER ストレス応答を、ともに正に制御することによって、がん細胞が転移先で晒される低酸素・低栄養などのストレスに対する耐性を付与し、転移能の亢進をもたらしていると考えられる。CIM によるがん細胞の運動能・浸潤能の付与の分子機序解明に端緒を開いた、本年度の研究によって、がん細胞が浸潤・転移の成立に必要とする複数の適応反応を制御している CIM が、非常に有用な分子標的であることをさらに明確に示すことができた。今後は、CIM とこれらの分子間の結合が、細胞骨格の制御やストレス応答におけるシグナル伝達において果たす役割について、さらに詳細な検討を加えて、転移・浸潤を制御するための戦略構築の基盤としていきたい。

また、高転移性 LNM35 株を用いた、リン酸化タンパクを中心とするプロテオミクス解析を推進することによって、転移・浸潤能の獲得において中心的役割を担う複数のキナーゼの存在が示唆されつつあることは、CLCP1 及び CIM に続く新たな分子標的の同定として結実し、創薬開発へとつながることが期待される。

### D. 健康危険情報

特記すべき事項無し

## E. 研究発表

- 1 Hosono Y, Yamaguchi T, Mizutani E, Yanagisawa K, Arima C, Tomida S, Shimada Y, Hiraoka M, Kato S, Yokoi K, Suzuki M, Takahashi T: MYBPH, a transcriptional target of TTF-1, inhibits ROCK1, and reduces cell motility and metastasis. *EMBO J*, 31: 481-493, 2012.
- 2 Yamaguchi T, Yanagisawa K, Sugiyama R, Hosono Y, Shimada Y, Arima C, Kato S, Tomida S, Suzuki M, Osada H, Takahashi T: NKX2-1/TITF1/TTF-1-induced ROR1 is required to sustain EGFR survival signaling in lung adenocarcinoma. *Cancer Cell* (in press).
- 3 Fujii M, Toyoda T, Nakanishi H, Yatabe Y, Sato A, Matsudaira Y, Ito H, Murakami H, Kondo Y, Kondo E, Hida T, Tsujimura T, Osada H, Sekido Y: TGF- $\beta$  synergizes with defects in the Hippo pathway to stimulate human malignant mesothelioma growth. *J Exp Med* (in press).
- 4 Mizuno T, Murakami H, Fujii M, Ishiguro F, Tanaka I, Kondo Y, Akatsuka S, Toyokuni S, Yokoi K, Osada H, Sekido Y: YAP induces malignant mesothelioma cell proliferation by upregulating transcription of cell cycle promoting genes. *Oncogene* (in press)
- 5 Endo M, Nakano M, Kadomatsu T, Fukuhara S, Kuroda H, Mikami S, Hato T, Aoi J, Horiguchi H, Miyata K, Odagiri H, Masuda T, Harada M, Horio H, Hishima T, Nomori H, Ito T, Yamamoto Y, Minami T, Okada S, Takahashi T, Mochizuki N, Iwase H, Oike Y. A critical role for tumor cell-derived angiotensin-like protein 2 in metastasis. *Cancer Res* (in press).
- 6 Ishiguro F, Murakami H, Mizuno T, Fujii M, Kondo Y, Usami N, Yokoi K, Osada H, Sekido Y: Activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM) promotes malignant phenotypes of malignant mesothelioma. *J Thorac Oncol*, (in press)
- 7 Suda K, Tomizawa K, Osada H, Maehara Y, Yatabe Y, Sekido Y, Mitsudomi T: Conversion from the "oncogene addiction" to "drug addiction" by intensive inhibition of the EGFR and MET in lung cancer with activating EGFR mutation. *Lung Cancer*, (in press)
- 8 Nishikawa E\*, Osada H\*, Okazaki Y, Arima C, Tomida S, Tatematsu Y, Taguchi A, Shimada Y, Yanagisawa K, Yatabe Y, Toyokuni S, Sekido Y, Takahashi T: miR-375 is activated by ASH1 and inhibits YAP1 in a lineage-dependent manner in lung cancer. *Cancer Res*, 71:6165-6173, 2011. (\*equal contributors)
- 9 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 Carcinog*, 50: 301-309, 2011.
- 10 Shimamura T, Imoto S, Shimada Y, Hosono, Y., Niida, A., Nagasaki, M., Yamaguchi, R., Takahashi, T., Miyano, S. A novel network profiling analysis reveals system changes in epithelial-mesenchymal transition. *PLoS ONE*, 6: e20804. doi:10.1371/journal.pone.0020804, 2011
- 11 Osada H, Takahashi T: let-7 and miR-17-92: small-sized major players in

- lung cancer development. *Cancer Sci*, 102: 9-17, 2011.
- 12 Murakami H, Mizuno T, Taniguchi T, Fujii M, Ishiguro F, Fukui T, Akatsuka S, Horio Y, Hida T, Kondo Y, Toyokuni S, Osada H, Sekido Y: LATS2 is a tumor suppressor gene of malignant mesothelioma. *Cancer Res*, 71: 873-883, 2011.
  - 13 Sides M, Klingsberg RC, Shan B, Gordon KA, Nguyen HT, Lin Z, Takahashi T: Flemington, E.K., and Lasky, J.A. The Epstein-Barr virus LMP 1 and TGF- $\beta$ 1 synergistically induce EMT in lung epithelial cells. *Am J Resp Cell Mol Biol*, 44:852-862, 2011.
  - 14 Ju HX, An B, Okamoto Y, Shinjo K, Kanemitsu Y, Komori K, Hirai T, Shimizu Y, Sano T, Sawaki A, Tajika M, Yamao K, Fujii M, Murakami H, Osada H, Ito H, Takeuchi I, Sekido Y, Kondo Y: Distinct profiles of epigenetic evolution between colorectal cancers with and without metastasis. *Am J Pathol*, 178: 1835-1846, 2011.
  - 15 Attoub S, Hassan AH, Vanhoecke B, Iratni R, Takahashi T, Gaben AM, Bracke M, Awad S, Kamalboor JA, Al Sultan MAH, Arafat K, Gespach C, Petroianu G: Inhibition of cell survival, invasion, tumor growth and histone deacetylase activity by the dietary flavonoid luteolin in human epithelioid cancer cells. *Eur J Pharmacol*, 651: 18-25, 2011
  - 16 Mulder JE, Brien JF, Racz WJ, Takahashi T, Massey T: Mechanisms of amiodarone and desethylamiodarone cytotoxicity in non-transformed human peripheral lung epithelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* 336:551-559, 20011.
  - 17 Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger KR, Yatabe Y, Beer DG, Powell CA, Eiely GJ, Van Schil PE, Garg, K, Austin JHM, Asamura H, Rusch, VW, Hirsch FR, Scagliotti G, Misudomi T, Huber RM, Ishikawa Y, Jett, J, Sanchez-Cespedes, M, Sculier, JP, Takahashi T, Tsuboi, M, Vansteenkiste J, Wistuba I, Yang, P-C, Aberle D, Brambilla C, Flieder D, Franklin W, Johnson B, Johnson D, Kerr K, Kuriyama K, Lee JS, Miller VA, pertersen I, Roggli V, Rosell R, Saijo N, Thunnissen E, Tsao M, Yankelewitz D: International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Classification of lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol*, 6: 244-285, 2011.
  - 18 Suda K, Tomizawa K, Fujii M, Murakami H, Osada H, Maehara Y, Yatabe Y, Sekido Y, Mitsudomi T: Epithelial to mesenchymal transition in an EGFR-mutant lung cancer cell line with acquired resistance to erlotinib. *J Thorac Oncol*, 6: 1152-1161, 2011.
  - 19 Okamoto Y, Sawaki A, Ito S, Nishida T, Takahashi T, Toyota M, Suzuki H, Shinomura Y, Takeuchi I, Shinjo K, An B, Ito H, Yamao K, Fujii M, Murakami H, Osada H, Kataoka H, Joh T, Sekido Y, Kondo Y: Aberrant DNA methylation associated with aggressiveness of gastrointestinal stromal tumour. *GUT*, 61: 392-401, 2012.

## F. 学会発表

- 1 Takahashi T: Metastasis-suppressing MYBPH as a novel transcriptional target of TTF-1 lineage-survival oncogene in lung adenocarcinoma. US-Japan Cancer Genomics Workshop (Invited presentation). Kyoto, Japan. October 24-26, 2011.
- 2 Takahashi T: miRNA alterations in the pathogenesis of human lung cancer. The 8th Nikko International Symposium (Invited presentation). Shimotsuke, Japan. October 21, 2011.
- 3 Takahashi T: TTF-1 lineage-survival oncogene in the pathogenesis of lung adenocarcinoma. 70<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (Symposium), Nagoya, Japan. October 3-5, 2011.
- 4 Osada H, Takahashi T: Roles of ASH1-regulated miRNAs and lincRNAs in lung cancer development. 70<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (Symposium), Nagoya, October 3-5, 2011.
- 5 Yanagisawa K, Kato S, Hotta N, Nakamura S, Takahashi T: CKAP4, novel malignant pulmonary mesothelioma-related gene, regulates eIF2 $\alpha$  and cellular stress-response. 70<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (English oral session), Nagoya, October 3-5, 2011.
- 6 Hosono Y, Yamaguchi T, Mizutani E, Yanagisawa K, Arima C, Tomida S, Shimada Y, Hiraoka M, Kato S, Yokoi K, Suzuki M, Takahashi T: 102nd Annual Meeting of the American Association for Cancer Research (Late-breaking session). Orlando, USA, April 2-6, 2011.
- 7 Osada H, Nishikawa E, Arima C, Okazaki Y, Tomida S, Tatematsu Y, Taguchi A, Shimada Y, Yanagisawa K, Toyokuni S, Sekido Y, Takahashi T: Roles of ASH1-miR-375 pathway in development of lung cancers with neuroendocrine features. 102nd Annual Meeting of the American Association for Cancer Research (Poster). Orlando, USA, April 2-6, 2011.

## G. 知的財産権の出願・登録状況

- a. 特許出願
- b. 実用新案登録
- c. その他  
いずれも特記すべき事項

### 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。今年度は、細胞膜貫通分子 CLCP1 の細胞内配列及び他の細胞膜分子との相互作用に注目して検討することにより、肺がんの病態に重要な寄与をする受容体型チロシンキナーゼ分子 EGFR 及び c-MET を CLCP1 結合分子として同定し、相互の機能的クロストークを示唆する知見も得た。また、LNM35や親株に CLCP1 を過剰発現させて得た網羅的遺伝子発現データと、当研究グループが持つ肺がん臨床検体の遺伝子発現プロファイルデータとを、統合的にバイオインフォマティク解析することで、CLCP1 下流遺伝子群が関連するパスウェイの中から、肺がん悪性化への寄与を示唆するパスウェイの選別描出に成功した。以上の研究結果は、CLCP1 が肺がん細胞の病態に深く関与するシグナル伝達に関わり、肺がんの転移・悪性化に寄与し、肺がん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がん死亡原因第1位である肺がんを対象に、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。昨年度から CLCP1 結合分子の探索・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* 同定等を進めており、今年度は更にそれを発展させ、受容体型チロシンキナーゼ (RTK) の EGFR 及び c-MET が CLCP1 結合分子であることを同定した。CLCP1 下流遺伝子群が関連するパスウェイが肺がん予後にも関与することが示唆された。このような 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

### モチーフ解析

CLCP1 の細胞内領域のアミノ酸配列を、NetPhosK (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK/>)、Motif Scan ([http://scansite.mit.edu/motifscan\\_seq.phtml](http://scansite.mit.edu/motifscan_seq.phtml))、PhosphoMotif Finder ([http://www.hprd.org/PhosphoMotif\\_finder](http://www.hprd.org/PhosphoMotif_finder))等のWeb siteにてOn-line解析を行い、リン酸化モチーフを検索した。可能性の高いチロシン部位から順に変異を導入したコンストラクトを作成していく。

### ウェスタンブロット及び免疫沈降

293T 細胞に発現コンストラクトを各種組み合わせでトランスフェクションし培養後に、NP-40 による細胞溶解液を作成した。CLCP1 に付加されている HA-tag に対する抗体を添加し、更にプロテイン G-セファロースを加えて免疫沈降を行った。この免疫沈降産物を、抗 EGFR 抗体、抗 c-MET 抗体、抗リン酸化チロシン抗体を用いてウェスタンブロットにて解析した。

RTK リン酸化に関しては、肺癌細胞株 PC-9 に CLCP1 恒常発現するレンチウイルスを感染させて、酵素活性に関連する抗リン酸化 Y1068-EGFR 抗体、抗リン酸化 Y1234/35-c-MET 抗体等を用いて、ウェスタンブロットにて解析した。

### 網羅的遺伝子発現解析およびパスウェイ解析

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、低転移性親株 N15 に感染させ、ベクター由来の薬剤耐性で選択後に、セルソーターにより CLCP1 過剰発現細胞群を選別した。この

CLCP1 過剰発現細胞群及び対照細胞群間で遺伝子発現解析用 Microarray (Agilent)を用いた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。

次に検出されたトップ 20 の Canonical pathway に属する遺伝子群を各パスウェイモジュールとし、当研究グループの保有する肺癌の網羅的な遺伝子発現解析データの中での各モジュール活性を、遺伝子発現変動の Z-score の平均値として求めた。この各モジュール活性に基づき、肺癌症例を高値群・低値群の 2 群にわけて、全生存率及び無再発生存率を検討した。

## C. 結果

細胞膜貫通型分子で SEMA4B 受容体として機能すると考えられる CLCP1 シグナルに関して、細胞膜上での他の分子との相互作用の面から探索を行った。

CLCP1 は、Neuropilin に類似の構造を持つが、Neuropilin が 44 アミノ酸長 (全長の 5%) とごく短い細胞内領域を持つのに対して、CLCP1 は 226 アミノ酸長 (全長の 30%) と長い細胞内領域を持つ。CLCP1 の特徴的な機能やシグナル伝達経路を検討する上で、この細胞内領域は重要な役割を果たすと考えられる。しかし、この細胞内領域は明瞭なドメイン構造を持たない。そこで、この領域内のモチーフを検討した。複数の予測プログラムで EGFR によるリン酸化部位と予想されたチロシン残基は 3 個 (Y621, Y677, Y750) 検出された。

例えば、621 番目のチロシンは、616-ADSAEYAQPL-625 という配列であり、



EGFR kinase substrate motif: X[E/D]pYX  
 SH2 domain binding motif: pYXXP  
 というモチーフが有る事から、EGFR によりリン酸化を受け、そこに SH2 ドメインを持つ分子が結合して、シグナル伝達に関わることが予想される。細胞膜に局在する CLCP1 が同様に細胞膜に局在する受容体型チロシンキナーゼ (RTK) である EGFR との機能的な関わりが示唆されて興味深い。このような機能的なリン酸化部位と予想されるチロシンが複数見出された。この知見は、CLCP1 の機能を検索していく上で重要である。

以上のような知見を元に次に、肺がんの病態に重要な役割を果たしている受容体型チロシンキナーゼ EGFR 及び c-MET と CLCP1 との機能的な関連を検索した。

まず初めに、293T 細胞に各種の発現ベクターを導入して、CLCP1 を免疫沈降して、EGFR 及び c-MET が共沈降してくるかを検討した。すると、EGFR、c-MET 共に、CLCP1 と共沈降することが認められた (図 1)。

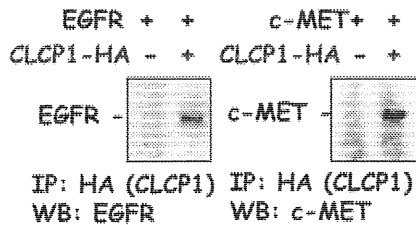


図 1. CLCP1 と RTK との結合。293T 細胞強制発現系で CLCP1 を免疫沈降し、EGFR・c-MET の共沈降を認めた。

そこで次に、CLCP1 がこれら RTK によってリン酸化されるかを検討した。同様に 293T 細胞に各種ベクターを導入し CLCP1 を免疫沈降して、抗リン酸化チロシン抗体でウェスタンブロットして CLCP1 のリン酸化を検討した。すると CLCP1 単独導入時に比して、EGFR、c-MET を共導入することによって CLCP1 のチロシンリン酸化が強く誘導された。しかも、EGFR 阻害剤 Gefitinib や c-MET 阻害剤 SU11274 で処理することにより、こ

のリン酸化は強く抑制された。したがって、CLCP1 は EGFR 及び c-MET により基質として直接リン酸化されると考えられた (図 2)。

### RTKからCLCP1へのシグナル

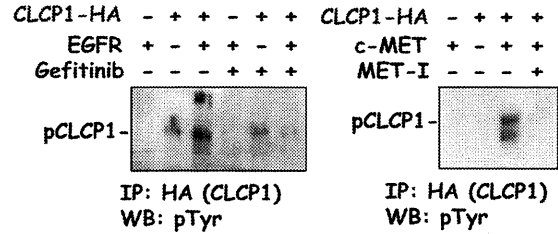
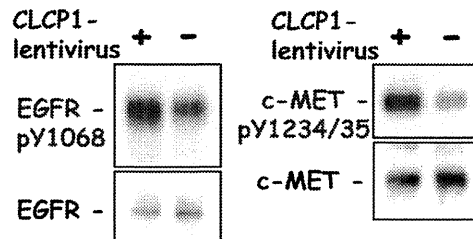


図 2. RTK による CLCP1 リン酸化。RTK の共導入で CLCP1 リン酸化が誘導され、それは RTK 阻害剤で抑制された。

さらに、CLCP1 と RTK とが相互作用することから、CLCP1 が RTK の機能を制御する可能性も考えた。N15 及び LNM35 にレンチウイルスにより CLCP1 を恒常的に発現させると、c-MET のリン酸化の亢進が見られた。この知見を更に他の肺がん細胞でも確認すべく、EGFR 変異と c-MET 発現亢進があり、これらの RTK が活性化していると考えられる肺がん細胞株 PC-9 に、同様に CLCP1 を恒常的に発現させると、キナーゼ活性に関わる EGFR Y1068、c-MET Y1234/1235 のリン酸化が著明に亢進し、RTK の更なる活性化が誘導されていることが見出された (図 3)。



これらの解析から、SEMA4B をリガンドと

図 3. CLCP1 の RTK 活性制御。PC-9 細胞にて、CLCP1 強制発現により酵素活性に関連する RTK リン酸化が増強した。

する受容体としての CLCP1 シグナル伝達が、RTK によるリン酸化により制御されている可能性が有り、CLCP1 が RTK の下流シグナルの一つを形成している可能性も考えられた。

一方、肺がんの病態に重要な RTK の活性を CLCP1 が亢進させていると考えられる。したがって、CLCP1 シグナルと RTK のシグナルとの間で、密接なクロストークが存在すると考えられ、今後このようなクロストークが肺がん転移や増殖進展にどのように関与するか検討することが至急必要である。

また昨年度から、網羅的遺伝子発現プロファイルデータ解析により細胞膜貫通型受容体である CLCP1 が伝搬するシグナルの理解を目指しており、LNM35 株及び低転移性親株 N15 株を用いて実験的に得られた CLCP1 シグナルデータに関して、当研究グループが保有する遺伝子発現プロファイルデータを用いたバイオインフォマティック解析を行い、肺がん発症進展に重要な役割を果たす pathway の絞り込みを行った。

CLCP1 発現レンチウイルスベクターを LNM35 株及び低転移性親株 N15 株に導入しソーティングして樹立した、CLCP1 安定過剰発現細胞株を用いてマイクロアレイ解析を行い、得られた網羅的遺伝子発現データについてパスウェイ解析を行ったところ、CLCP1 過剰発現が関連する canonical パスウェイとして、axonal guidance signaling、human embryonic stem cell pluripotency、basal cell carcinoma signaling、leukocyte extravasation signaling などが抽出され、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結果が得られた。

そこでさらに、我々がこれまでに得た肺がん症例の網羅的遺伝子発現解析データを用い、実験的に CLCP1 の影響下にあることを示したこれらトップ20の canonical パスウェイについて、そのパスウェイのモジュール活性によって肺がん症例を活性高値群と低値群の2群に分けて、全生存率及び無再発生存率との関連性について検討した。その結果20種類のパスウェイ中から、axonal

guidance signaling、linoleic acid signaling、arachidonic acid signaling、CCR3 signal、human embryonic stem cell pluripotency、leukocyte extravasation signaling の6種類のパスウェイが、全生存率及び無再発生存率ともに有意な関連性を示すパスウェイとして絞り込まれた。また、その他の4種類のパスウェイが全生存率と有意な関連性を示した(図4、図5)。

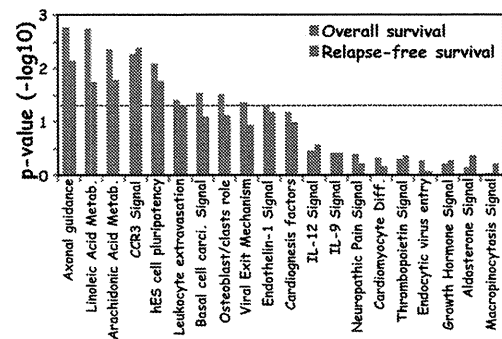


図4. Canonical pathway の肺がん予後との関連

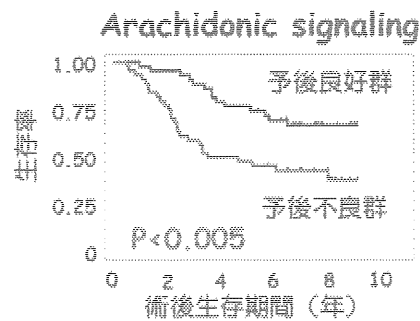


図5. Canonical pathway の中の Arachidonic signal の肺がん予後との関連

これら予後と有意な関連を示したパスウェイに含まれる遺伝子には、Wnt ファミリー、phospholipaseA2 及び COX2、cytochrome P450 ファミリー等が含まれていた。実際、CLCP1 遺伝子の導入が、これらの遺伝子の発現を制御することを確認している。我々は、LNM35 株を樹立した後の初期の解析において CLCP1 と COX2 の発現亢進を見出して報告しているが、治療標的でもある COX2 が CLCP1

導入によって発現誘導されるという機能的関連が見出されたことは興味深い。

今後 RTK との相互作用・クロストークに関しては、CLCP1 全長にわたって各種ドメイン欠失コンストラクトも作成しており、詳細な RTK との相互作用の機序に迫る検討を進める。また、予想されるリン酸化部位のアラニン変異体を順次作成しており、変異体と wild type との間で比較解析することで、CLCP1 と RTK との相互作用のリン酸化依存性、リン酸化依存的な CLCP1 結合分子等、細胞膜上での CLCP1 の複合体形成制御の詳細を明らかにする。同時に、リン酸化変異体強制発現により誘導される遺伝子発現プロファイルも採取し、wild type による発現プロファイルと比較することで、RTK とのクロストークを含めた CLCP1 シグナルの解明を進めていく。更に、昨年度の解析で 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、この細胞骨格系制御と CLCP1 による e-MET 活性化との関係にも注目して解析する。

また今後、CLCP1 強制発現に惹起される実験的遺伝子発現解析データと、肺がん臨床検体の網羅的遺伝子発現解析データとの統合的なバイオインフォマティクス解析を更に進めていくが、CLCP1 強制発現が惹起する遺伝子発現制御は、発現誘導・発現抑制の両方向の制御であり、このようなモジュールの最適な活性評価方法を検討していく。そのような詳細な解析に基づき CLCP1 が関わる肺がんの転移・悪性化関連パスウェイの探索・同定をさらに推進していく。

#### D. 健康危険情報

特記すべき事項無し

#### E. 研究発表

- 1 Nishikawa E, Osada H, Okazaki Y, Arima C, Tomida S, Tatematsu Y, Taguchi A, Shimada Y, Yanagisawa K, Yatabe Y, Toyokuni S, Sekido Y, Takahashi T: miR-375 is activated by ASH1 and inhibits YAP1 in a lineage dependent manner in lung cancer. *Cancer Res*, 71: 6165-6173, 2011.
- 2 Osada H, Takahashi T: let-7 and miR-17-92: small-sized major players in lung cancer development. *Cancer Sci*, 102: 9-17, 2011.
- 3 Murakami H, Mizuno T, Taniguchi T, Fujii M, Ishiguro F, Fukui T, Akatsuka S, Horio Y, Hida T, Kondo Y, Toyokuni S, Osada H, Sekido Y: LATS2 is a tumor suppressor gene of malignant mesothelioma. *Cancer Res*, 71: 873-883, 2011.
- 4 Suda K, Tomizawa K, Fujii M, Murakami H, Osada H, Maehara Y, Yatabe Y, Sekido Y, Mitsudomi T: Epithelial to mesenchymal transition in an EGFR-mutant lung cancer cell line with acquired resistance to erlotinib. *J Thorac Oncol*, 6: 1152-1161, 2011.
- 5 Okamoto Y, Sawaki A, Ito S, Nishida T, Takahashi T, Toyota M, Suzuki H, Shinomura Y, Takeuchi I, Shinjo K, An B, Ito H, Yamao K, Fujii M, Murakami H, Osada H, Kataoka H, Joh T, Sekido Y, Kondo Y: Aberrant DNA methylation associated with aggressiveness of gastrointestinal stromal tumour. *GUT*, 61: 392-401, 2012.
- 6 Ju HX, An B, Okamoto Y, Shinjo K, Kanemitsu Y, Komori K, Hirai T, Shimizu Y, Sano T, Sawaki A, Tajika M, Yamao K, Fujii M, Murakami H, Osada H, Ito H, Takeuchi I, Sekido Y, Kondo Y: Distinct profiles of

epigenetic evolution between colorectal cancers with and without metastasis. *Am J Pathol*, 178: 1835-1846, 2011.

- 7 Mizuno T, Murakami H, Fujii M, Ishiguro F, Tanaka I, Kondo Y, Akatsuka S, Toyokuni S, Yokoi K, Osada H, Sekido Y: YAP induces malignant mesothelioma cell proliferation by upregulating transcription of cell cycle promoting genes. *Oncogene*, (in press)
- 8 Ishiguro F, Murakami H, Mizuno T, Fujii M, Kondo Y, Usami N, Yokoi K, Osada H, Sekido Y: Activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM) promotes malignant phenotypes of malignant mesothelioma. *J Thorac Oncol*, (in press)
- 9 Fujii M, Toyoda T, Nakanishi H, Yatabe Y, Sato A, Matsudaira Y, Ito H, Murakami H, Kondo Y, Kondo E, Hida T, Tsujimura T, Osada H, Sekido Y: TGF- $\beta$  synergizes with defects in the Hippo pathway to stimulate human malignant mesothelioma growth. *J Exp Med*, (in press)
- 10 Suda K, Tomizawa K, Osada H, Maehara Y, Yatabe Y, Sekido Y, Mitsudomi T: Conversion from the "oncogene addiction" to "drug addiction" by intensive inhibition of the EGFR and MET in lung cancer with activating EGFR mutation. *Lung Cancer*, (in press)

## F. 学会発表

1. Osada H, Nishikawa E, Arima C, Okazaki Y, Tomida S, Tatematsu Y, Taguchi A, Shimada Y, Yanagisawa K, Toyokuni S, Sekido Y, Takahashi, T: Roles of ASH1-miR-375 pathway in development of lung cancers with neuroendocrine features.

102nd Annual Meeting of the American Association for Cancer Research (Poster). Orlando, USA, April 2-6, 2011.

2. Osada H, Takahashi T: Roles of ASH1-regulated miRNAs and lincRNAs in lung cancer development. 70<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (Symposium), Nagoya, October 3-5, 2011.

## G. 知的財産権の出願・登録状況

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