

201220029A

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24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 高橋 隆

平成25(2013)年3月

目 次

I. 総括研究報告	
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に関する研究	----- 1
高橋 隆	
II. 分担研究報告	
1. CLCP1 に関する研究開発	----- 9
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	
柳澤 聖	----- 15
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 21
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 24

I. 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

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に関する研究

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

肺がんの浸潤と転移の分子機構の解明にもとづく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 と、肺がんの病態に重要な役割を担う受容体型チロシンキナーゼ分子（RTK）の EGFR 及び MET との間に見出した相互作用について、その制御機序に関する解析を進めた。その結果、CLCP1 のリン酸化修飾が両者の結合の制御に関わることや、CLCP1 のリン酸化が EGFR からのシグナル伝達の制御へ関与することを示唆する結果を得た。CIM については、プロテオミクス解析による網羅的結合蛋白探索を通じて見出した4種類の CIM 結合分子中の2分子が、肺がん術後予後と有意な相関を示すことを明らかとするとともに、CIM によるがん細胞の運動・浸潤能の付与への機能的な関与を示唆する結果を得た。一方、新たな転移関連分子の探索を我々が樹立した高転移性ヒト肺がん細胞亜株 NCI-H460-LNM35（以下、LNM35）株と、典型的な難治がんである膵臓がんの組織試料の横断的な網羅的蛋白発現解析を通じて進め、OEP1（OverExpression in Pancreatic cancer 1）を同定した。さらに、OEP1 によるがん細胞の運動・浸潤・転移能の付与が、OEP1 と Ezrin との結合を介した c-Src による Ezrin のリン酸化の促進による可能性を示唆する結果を得た。

研究分担者

長田啓隆：愛知県がんセンター研究所分
子腫瘍学分野・室長
柳澤聖：名古屋大学大学院医学系研究科
分子腫瘍学分野・講師

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 によって負に制御される細胞膜受容体 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、両分子のさらなる分子機能解明を進めて、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、我々の持つ網羅的発現解析技術を駆使して、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・同定も進め、分子標的薬の創薬開発基盤を築く。

B. 研究方法

I-i) CLCP1 及びそのシグナリング分子を標的とした検討：

CLCP1 の細胞外領域の各ドメイン及び細胞内領域の各種欠失変異体、及び、CLCP1 のチロシン残基をアラニンに置換したリン酸化部位変異体を、inverse PCR を用いて作成し、全長のシーケンスを確認後に実験に用いた。

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、CLCP1 に付加した HA-tag に対する抗 HA 抗体を用いて免疫沈降を行った。また内因性の CLCP1 と EGFR の相互作用を検討は、抗 CLCP1 抗体による免疫沈降産物の抗 EGFR 抗体を用いたウェスタンブロット解析を行った。

また、CLCP1 発現レンチウイルスを PC-9 株、NCI-H1975 株等の肺がん細胞株に感染させて作成した CLCP1 強制発現細胞群と対照細胞群間を用いて得た網羅的な遺伝子発現プロファイルデータを用い、Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) 等のバイオインフォマティクス解析による CLCP1 の機能に関する検討を加えた。

I-ii) CIM 及びそのシグナリング分子を標的とした検討：

免疫沈降・ウェスタンブロット法による CIM との結合の検証は、LNM35 株に CIM 発現コンストラクトをトランスフェクションし、CIM に付加されている myc-tag に対する抗体を用いて免疫沈降を行った。この免疫沈降物を、4 種類の CIM 結合候補蛋白 (A - D) に対する特異抗体を用いてウェスタンブロット法にて解析した。

CIM 結合分子のがん細胞の運動能と浸潤能の付与への関与について、蛋白 A と蛋白 B のそれぞれを規定する遺伝子を標的とする siRNA を LNM35 株にトランスフェクションし、トランスウェルチャンバーを用いた motility assay と invasion assay によって解析した。

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 株と低転移性亜株 N15 株間、及び、新鮮凍結臓がん外科摘出組織試料と正常主

膵管組織間の横断的比較検討は、非放射性安定同位体標識試薬 (iTRAQ) によるペプチド標識と質量分析を用い、両群試料間の網羅的蛋白発現プロファイルの比較定量解析することによって行った。

新規転移制御候補分子 OEP1 の機能解析は、OEP1 を高発現する LNM35 細胞に、OEP1 siRNA を導入し、細胞運動能と浸潤能についてトランスウェルチャンバーを用いて検討した。また、OEP1 結合分子の探索を、OEP1 高発現膵臓がん細胞株 CFPAC1 より抽出した蛋白試料を、Sf9 細胞を用いて大量精製した GST 蛋白融合 OEP1 のアフィニティーカラムにかけて OEP1 結合分子群を精製し、質量分析装置を用いて同定を進めた。また、OEP1 を高発現する CFPAC1 株への siRNA の導入、或いは、OEP1 低発現の Panc-1 株への OEP1 の導入を行い、OEP1 関連蛋白群の発現量や結合及びリン酸化状態への影響について検討を行った。

C. 研究結果

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、高転移性肺がん細胞株 LNM35 株の示す高い運動能・転移能の付与に深く関わる。これまでに、CLCP1 が受容体型チロシンキナーゼ分子 (RTK) の EGFR 或いは MET と結合することや、EGFR 或いは MET により CLCP1 の細胞内領域のチロシンリン酸化修飾を受けることや、CLCP1 の強制発現が EGFR 及び MET の活性化に関連するリン酸化修飾を増強することを明らかとし、相互のクロストークの存在を示唆する結果を得てきた。

今年度はさらに、CLCP1 と EGFR との複合体形成の制御機構を検討するために、CLCP1

の各種欠失変異体を作成し解析を加え、蛋白間相互作用に関わる FA58C ドメインが CLCP1 の EGFR との結合に関わることを明らかとした。また、CLCP1 のリン酸化部位の非リン酸化変異体を EGFR とともに 293T 細胞へ導入し、CLCP1 の免疫沈降を行って、EGFR との共沈降への影響を検討し、CLCP1 と EGFR との結合が CLCP1 のリン酸化によって減弱することを示す結果を得た。さらに、内因性の CLCP1 と EGFR との相互作用が、EGF 添加により EGFR を活性化すると検出されなくなることを明らかとした。これらの検討によって、CLCP1 のリン酸化修飾が EGFR との相互作用を負に制御していることが示唆された。

また、CLCP1 の機能について検討を加えるべく、CLCP1 野生型或いはリン酸化部位変異体を肺がん細胞株に導入し、網羅的遺伝子発現解析を加えた。肺腺がん細胞株 PC9 株への CLCP1 野生型の導入により、浸潤・転移への関与が示唆されている CXCR4 の発現誘導が検出された一方、リン酸化部位変異体では CXCR4 の発現誘導は見られなかった。また、肺腺がん細胞株 NCI-H1975 株に野生型 CLCP1 導入により発現変動する遺伝子群に関して GSEA 解析を行い、CLCP1 が EGFR 下流の遺伝子群を正に発現制御することを強く示唆する結果を得た。一方、非リン酸化型 CLCP1 変異体を用いた検討を通じて、CLCP1 のリン酸化が EGFR シグナルを正に制御している可能性を示唆する結果を得た。

I-ii) CIM 及びそのシグナリング分子を標的とした検討:

CIMの機能解明を目指したCIM結合蛋白のプロテオミクス解析を用いた網羅的な探索によって、これまでに11種類のCIM結合候補分子を得ている。そこで、myc標識

CIMを導入したLNM35株を用いて、抗myc抗体を用いたプルダウンとウェスタンブロット解析を加え、CIMと4種類の候補分子との結合を確認した。これらの分子の発現と肺がん臨床病態との関連について、詳細な臨床情報が付随する70例の肺腺癌症例のマイクロアレイ解析データを用いた検討を行ったところ、2分子が高発現群が低発現群症例に比して有意に不良な術後予後を示した。一方、これらの2分子のsiRNAを用いた発現抑制は、高転移性ヒト肺癌細胞株LNM35株が示す高い運動能と浸潤能を有意に抑制した。

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：

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株のプロテオミクス解析を通じた、転移関連分子のさらなる探索・同定を進めた。肺がんと同じく早期に転移を来し、極めて予後不良な代表的難治がんである膵臓がん組織と、LNM株において共通して高発現を認める蛋白として、OEP1 (Overexpressed in pancreatic cancer) とOEP2を同定した。

本年度はOEP1について機能解析を進めた。LNM35株において、OEP1の発現抑制が細胞運動能と浸潤能の両者を減弱させることを明らかとした。逆に、OEP1低発現の膵臓がん細胞株Panc-1株にOEP1を導入し安定発現細胞株を樹立し検討を行ったところ、細胞運動能と浸潤能のいずれについてもOEP1導入細胞株において亢進を認めた。

そこでOEP1の機能について示唆を得るべく、OEP1固相化カラムと質量分析装置を用いた結合蛋白の網羅的探索を行った結果、11種類のOEP1結合蛋白候補分子を同定した。

これらの候補分子群のうち、解析系の不可避なノイズと考え得るヒストンとケラチンを除いた9分子について、質量分析による精密蛋白定量法であるMRM解析を用いて、OEP1との結合について検証解析を進めた結果、細胞膜とアクチンを結合するERM蛋白の一つであるEzrinを含む5分子について、OEP1との結合が確認された。Ezrinは接着斑の構成分子として細胞接着性の制御に関わると共に、細胞運動性に関わるシグナル伝達の制御にも役割を担うことが知られている。さらに、膵臓がん細胞株における内因性のOEP1とEzrinの結合について、免疫沈降-ウェスタンブロット法を用いて結合を確認した。また、OEP1のsiRNAによる発現抑制が、接着斑の形成不全と細胞接着性の減弱を惹起するとともに、c-SrcによるEzrinのリン酸化を減弱させることを明らかとした。

D. 考察及び結論

我が国において肺がんは、年間6万7千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極めて大きい。本研究課題は、肺癌の浸潤・転移に関わるCLCP1とCIMという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な治療法開発の基盤を確立することを目指すものであり、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。

本研究において、CLCP1が既に誌上発表した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のEGFR及びMET

とも、相互作用を示すことを見出している。本年度の研究によって、蛋白相互作用を行う機能ドメインとして知られている FA58C ドメインが、CLCP1 の EGFR との相互作用部位であることを明らかとすることができた。また、CLCP1 のリン酸化部位の変異体を用いた解析を通じて、EGF 刺激が内因性の CLCP1 と EGFR 間の結合の乖離を惹起していることが明らかとなり、CLCP1 の EGFR との複合体形成の制御機序へのリン酸化修飾の関与が示された。また、CLCP1 の野生型及びリン酸化変異体導入により誘導される遺伝子発現プロファイルの比較検討を通じて、CLCP1 の EGFR 下流シグナルとのクロストークと CLCP1 のリン酸化修飾による制御の存在を示唆する結果を得た。さらに、CLCP1 が相互作用する分子として、新たに細胞運動能に深く関与する分子群を同定した。これらの本年度の研究成果は、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。

本研究課題におけるこれまでの研究成果は、がん細胞が転移巣の微小環境で晒される低酸素や小胞体ストレスに対する耐性を、CIM が付与することを明らかとした。一方で、CIM が細胞運動能・浸潤能の制御に深く関与することを示唆する結果を得ていたものの、その分子機序については全く未解明であった。本年度の研究においてプロテオミクス解析による網羅的な CIM 結合蛋白の探索・同定を進めた結果、CIM によるがん細胞の運動能・浸潤能の付与に関わると考えられる複数の CIM 結合分子を同定することに成功し、がん転移の制御に向け道を拓くための

重要な手掛かりを得るに至った。今後は、これまでの成果をさらに発展させることにより、多面的にがん細胞の浸潤・転移を支える CIM の分子機能の全貌解明から、難治癌の転移抑制法の開発へと繋げていきたい。

また、転移に関わる新規分子の探索・同定を目指した検討においては、高転移性肺癌細胞亜株 LNM35 株を用いたプロテオミクス解析による網羅的な蛋白発現解析データと、臨床検体から取得した網羅的蛋白発現情報との統合的な解析により、難治がんの運動能・浸潤能の獲得に関わる新規分子 OEP1 の同定に成功し、さらにその分子機序として OEP1 が Ezrin との結合を介して c-Src による Ezrin のリン酸化を促進し、Ezrin の構造変化と接着斑の構成分子との会合を正に制御していることを示唆する結果を得た。今後さらに検討を進め、OEP1 を分子標的とする転移抑制法の開発の基盤を築いていきたい。

E. 健康危険情報

特記すべき事項無し

F. 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* 21: 348-361, 2012.
3. Hosono Y, Usukura J, Yamaguchi T, Yanagisawa K, Suzuki M, Takahashi T: MYBPH inhibits NM IIA assembly via direct interaction with NMHC IIA and reduces cell motility. *Biochem Biophys Res Commun* 428 : 173-178, 2012.
 4. Yanagisawa K, Tomida, S, Matsuo K, Arima C, Kusumegi M, Yokoyama Y, Ko SBH., Mizuno N, Kuroyanagi Y, Kawahara T, Takeuchi T, Goto H, Yamao K, Nagino M, Tajima K, Takahashi T: Seven-signal proteomic signature for detection of operable pancreatic cancer and their discrimination from autoimmune pancreatitis. *Int. J. Proteomics*. 2012 (doi:10.1155/2012/510397).
 5. Kalari S, Jung M, Kernstine KH, Takahashi T, Pfeifer GP: The DNA methylation landscape of small cell lung cancer suggests a differentiation defect of neuroendocrine cells. *Oncogene* 1-10. doi: 10.1038/onc.2012.362, 2012
 6. Cao K, Tanaka K, Komizu Y, Tamiya-Koizumi K, Murate T, Ueoka R, Kyogashima M, Usukura J, Takahashi T, Suzuki M. Hybrid liposomes affect cellular lipid constituents and caveolae structures. *Bioorg Med Chem Lett*. 22:1731-1733, 2012.
 7. 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: Tumor cell-derived angiopoietin-like protein 2 in metastasis. *Cancer Res*. 72: 1784-1794, 2012.
 8. Akatsuka S, Yamashita Y, Ohara H, Liu Y-T, Izumiya M, Abe K, Ochiai M, Jiang L, Nagai H, Okazaki Y, Murakami H, Sekido Y, Arai E, Kanai Y, Hino O, Takahashi T, Nakagama H, Toyokuni S: Fenton reaction induced cancer in wild type rats recapitulates genomics alterations observed in human cancer. *PLoS ONE* 7: e43403. doi:10.1371/journal.pone.0043403
 9. Jiang L Akatsuka S, Nagai H, Chew S-H, Ohara H, Okazaki Y, Yamashita Y, Yoshikawa Y, Yasui H, Ikuta K, Sasaki K, Kohgo Y, Hirano S, Shinohara Y, Kohyama N, Takahashi T, Toyokuni S: Iron overload signature in chrysotile-induced malignant mesothelioma. *J Pathol*. 228: 366-377, 2012.
 10. 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- β synergizes with defects in the Hippo pathway to stimulate human malignant mesothelioma growth. *J Exp Med*, 209: 479-94, 2012.
 11. 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*, 31: 5117-22, 2012.
 12. Shinjo K, Okamoto Y, An B, Yokoyama T, Takeuchi I, Fujii M, Osada H, Usami U, Hasegawa Y, Ito H, Hida T, Fujimoto N, Kishimoto T, Sekido S, Kondo Y: Integrated analysis of genetic and epigenetic alterations reveals CpG island methylator phenotype associated with distinct clinical characters of lung adenocarcinoma. *Carcinogenesis*, 33: 1277-85. 2012.
 13. Katsushima K, Shinjo K, Natsume A, Ohka F, Fujii F, Osada H, Sekido Y, Kondo Y:

Contribution of microRNA-1275 to Claudin11 expression via polycomb-mediated silencing mechanism in human glioma stem-like cells. *J Biol Chem*, 287: 27396-27406. 2012.

14. Attoub S, Sperandio O, Raza H, Arafat K, Al-Salam S, Al Sultan MA, Al Safi M, Takahashi T, Adem A: Thymoquinone as an anticancer agent: evidence from inhibition of cancer cells viability and invasion in vitro and tumor growth in vivo. *Fundam Clin Pharmacol*. 2012 doi: 10.1111/j.1472-8206.2012.01056.x.
15. Attoub S, Arafat K, Gelaude A, Sultan MAA, Bracke M, Collin, P, Takahashi T, Adrian, T, De Wever O: Fronodoside A suppressive effects on lung cancer survival, tumor growth, angiogenesis, invasion, and metastasis. *PLoS ONE* 8:e53087, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0053087.
16. 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*, 76: 292-9, 2012.
17. 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*, 7: 890-899, 2012.
18. Elshazley M, Sato M, Hase T, Takeyama Y, Yamashita R, Yoshida K, Toyokuni S, Ishiguro F, Osada H, Sekido Y, Yokoi K, Usami N, Shames DS, Kondo M, Gazdar AF, Minna JD, Hasegawa Y: The circadian clock gene BMAL1 is a novel therapeutic target for malignant mesothelioma. *Int J Cancer*, 131: 2820-31. 2012.

G. 学会発表

1. 高橋隆「肺腺癌の分子病態と TTF-1 リネジ生存がん遺伝子」第 53 回日本肺癌学会総会（ワークショップ）2012 年 11 月 8 日～9 日、岡山
2. Proteomic identification of potential biomarkers of malignant pulmonary mesothelioma. Kiyoshi Yanagisawa, Noriyasu Usami, Kenichiro Ono, Masashi Kondo, Tetsunori Hase, Seiichi Kato, Kasumi Yagi, Naoe Hotta, Shigeo Nakamura, Yoshinori Hasegawa, Kohei Yokoi, Takashi Takahashi. 71st Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (Symposia), Sapporo, September 19-21, 2012.
3. Quantitative Proteomic Profiling Identifies CKAP4 as a Malignant Pulmonary Mesothelioma-Associated Molecule that Regulates Metabolic Stress Kiyoshi Yanagisawa, Seiichi Kato, Naoe Hotta, Shigeo Nakamura, Takashi Takahashi. Cold Spring Harbor Meeting 2012 [Mechanisms&Models of Cancer] , 2012. Aug14-18, Cold Spring Harbor Labotaroty NY
4. Osada H, Yagi K, Yanagisawa K, Akatsuka J, Tatematsu Y, Kato S, Yatabe Y, Ono K, Sekido Y, Takahashi T: Functional analysis of CLCP1 as a potential target for lung cancer diagnostics and therapeutics. 71st Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (Oral Session), Sapporo, September 19-21, 2012.

H. 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

II. 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

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に関する研究

研究分担項目： CLCP1 に関する研究開発

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・室長

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。これまでに細胞膜貫通分子 CLCP1 が、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 (RTK) 分子 EGFR 及び c-MET と相互作用することや、相互の機能的クロストークを示唆する知見も得ている。今年度は、この CLCP1 複合体形成の制御機構を明らかにすべく、ドメイン欠失変異体やリン酸化部位変異体の CLCP1 を用いて解析を行った。その結果、EGFR と相互作用する CLCP1 のドメインの同定、相互作用に対する CLCP1 のリン酸化修飾による制御等を解明した。また、肺がん細胞株に CLCP1 を過剰発現させて得た網羅的遺伝子発現データをバイオインフォマティク解析することで、CLCP1 と EGFR 下流シグナルとの密接な関連を強く示唆する結果を得た。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 RTK シグナル伝達に関わり、肺がんの転移・悪性化に寄与す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。昨年度まで CLCP1 結合分子の探索を進め、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。また 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、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ている。

今年度は CLCP1 のドメイン欠失変異体やリン酸化部位変異体の発現コンストラクトを作成し、RTK との相互作用の制御機構の解明を目指した。また、RTK との相互作用と RTK シグナルとのクロストークとの関連等を探索した。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. 研究方法

発現コンストラクト

CLCP1 の細胞外領域 CUB、LCCL、FA58C という各種ドメイン及び細胞内領域(IC) の各種欠失変異体を、inverse PCR 法を用いて作成し、全長シーケンスを確認して実験に用いた。また、CLCP1 のチロシン残基をアラニンに置換したリン酸化部位変異体も、変異を導入した配列を持つ primer を用いて、同様に inverse PCR を用いて作成した。

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。また内因性の CLCP1-EGFR 相互作用を検討は、抗 CLCP1 抗体を用いて免疫沈降した。この免疫沈降産物を、抗 EGFR 抗体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 PC-9、H1975 等の肺がん細胞株に感染させ、ベクター由来の薬剤耐性で選択後した。この CLCP1 強制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 Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) 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相関する遺伝子セットを検出し、CLCP1 が果たす機能を探索した。

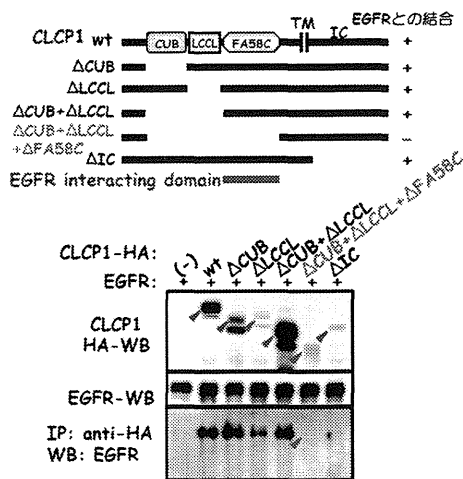
C. 研究結果

CLCP1 は、高転移性肺がん細胞株 LNM35 株の示す高い運動能・転移能の付与に深く関わる。CLCP1 の機能を明らかにすべく、CLCP1 結合分子の探索・同定を進めた。これまでの解析から、CLCP1 が EGFR 或いは MET と結合することを明らかとした。また、CLCP1 が、CLCP1 と類似構造を有し VEGFR と共作用する neuropilin ファミリーとを構造的に分ける特徴の一つである、特定のドメイン構造を有さない長い細胞内領域において、チロシン残基にリン酸化修飾を受けていることを見出した。興味深いことに、逆に CLCP1 の強制発現が、EGFR 及び MET の活性化に関連するリン酸化修飾を増強することも明らかとなり、相互のクロストークの存在が示唆された。

そこで更に、CLCP1 と EGFR との複合体形成の制御機構に関してについて詳細に検討するために、まず欠失変異体を作成して、複合体形成にかかわるドメインを探索した。細胞外領域の CUB、LCCL、FA58C という各

種ドメイン及び細胞内領域(IC)の欠失変異体を作成して免疫沈降法によって解析を加えた。FA58C 単独の欠失では発現レベルが低かったために解析できなかった、N 末側から CUB、LCCL、FA58C と順に削っていったところ、FA58C まで削ると EGFR の共沈降が見られなくなった。また、細胞内領域(IC)を欠失させても EGFR 共沈降は保たれていた。その結果、凝固因子 V/VIII の C-末端ドメインに相同性を持つ FA58C ドメインが、CLCP1 の EGFR 結合に関わる主たるドメインと考えられた (図 1)。FA58C ドメインは、CLCP1 と類似構造を有する neuropilin が VEGF と結合するドメインであり、蛋白相互作用に関わる重要な機能ドメインと考えられており、この CLCP1 ドメイン解析の結果は興味深い。

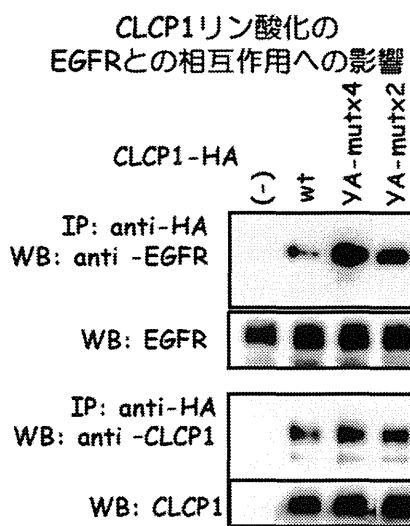
図 1. CLCP1 の EGFR との相互作用ドメインの検索



また、CLCP1 のチロシンリン酸化が、CLCP1 と EGFR 相互作用に与える影響についても検討を加えた。CLCP1 のチロシン残基をアラニンに置換したリン酸化部位変異体を用い、この CLCP1 リン酸化変異体と EGFR を 293T 細胞へ導入し、CLCP1 の免疫沈降を行い、EGFR の共沈降を検討することにより解析し

た。すると、CLCP1 免疫沈降による EGFR の共沈降は、野生型 CLCP1 に比してリン酸化変異体において、共沈降バンドの増強が見られ、CLCP1 と EGFR との結合が、CLCP1 のリン酸化の低下により増強することが示唆された (図 2)。これらの知見は、運動・浸潤・転移に関わる CLCP1 の機能が、EGFR との結合を介したチロシンリン酸化による制御を受けている可能性を示唆する。

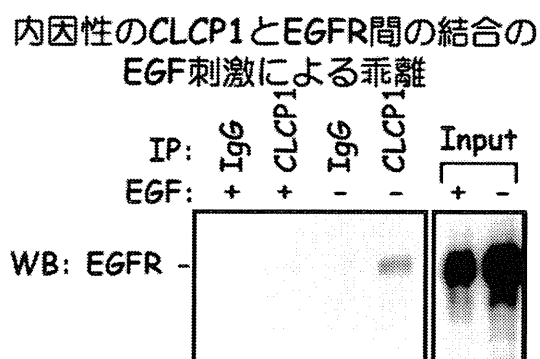
図 2. CLCP1 のリン酸化が EGFR との結合に及ぼす影響の検討



更に、内因性の CLCP1 と EGFR の相互作用についても検討した。通常培養条件下、CLCP1 抗体で免疫沈降すると EGFR の共沈降が見られ、CLCP1 と EGFR の相互作用が生理的意義を持つことが示唆された。この生理的相互作用に対するリン酸化の関与を検討するために、EGF 添加により EGFR を活性化した後、CLCP1 免疫沈降を行ったところ、EGFR の共沈降は全く見られなくなった (図 3)。この結果は、活性化 EGFR による CLCP1 リン酸化修飾が、EGFR との相互作用を抑制することを示唆しており、前述の 293T 細胞に於いて CLCP1 リン酸化変異体を用いた実

験結果とよく一致している。また、EGFR のリン酸化修飾も CLCP1 との相互作用を制御している可能性もあり、今後の検討を要する。

図 3. EGF 刺激の内因性 CLCP1 と EGFR の相互作用への作用に関する検討



さらに、CLCP1 野生型或いはリン酸化部位変異体を導入した際に生じる下流の変化についても、マイクロアレイ法による網羅的遺伝子発現解析によって検討を加えた。CLCP1 導入によって EGFR や MET の活性化に関わるリン酸化の亢進が観察される肺腺がん細胞株 PC9 株において、CLCP1 を導入したところ、種々のがんにおいて浸潤・転移への関与が示唆されている CXCL12-CXCR4 (chemokinereceptor 4) 軸の CXCR4 が、CLCP1 野生型の導入により発現誘導された。一方、CLCP1 のリン酸化部位の変異体では CXCR4 の発現誘導は見られなかった。ちなみに、CXCR4 は MET の下流で発現誘導されることが報告されており、CLCP1 と受容体型チロシンキナーゼとのクロストークの存在を示唆する結果としても興味深い。

また、肺腺がん細胞株 NCI-H1975 株にも、CLCP1 野生型及びリン酸化部位変異体を導入し、網羅的遺伝子発現解析を施行した。対照ウイルス導入時と比して野生型 CLCP1 導入により発現亢進する遺伝子群及び発現

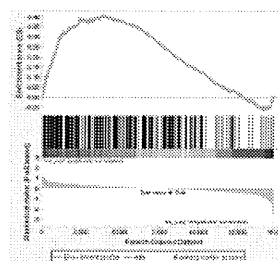
低下する遺伝子群に関して、GSEA 解析を施行した。その結果、いくつか興味深い遺伝子セットが抽出されたが、その中でも注目される点として、発現亢進する遺伝子群により、EGFR 阻害剤処理で発現低下する遺伝子セットが抽出され、一方発現低下する遺伝子群から、EGFR 阻害剤処理により発現亢進する遺伝子セットが抽出された (図 4)。

この GSEA 解析結果は、CLCP1 が EGFR 下流の遺伝子群の発現制御に深くかかわることを強く示唆し、やはり CLCP1 と受容体型チロシンキナーゼとのクロストークの存在が考えられた。

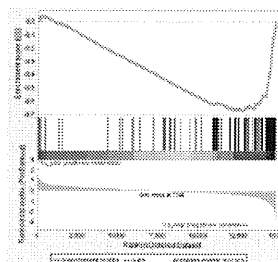
図 4. CLCP1 と EGFR との関連を示す GSEA 解析

H1975 GSEA: CLCP1 wt vs. VC

CLCP1 導入で発現亢進する遺伝子群
= EGFR 阻害剤により発現低下する遺伝子セット



CLCP1 導入で発現低下する遺伝子群
= EGFR 阻害剤により発現亢進する遺伝子セット



一方、CLCP1 リン酸化変異体に関して、野生型 CLCP1 に比べて、リン酸化変異体の方が強く発現誘導する遺伝子群を抽出して、GSEA 解析を施行した。その結果、EGFR 活性阻害により発現亢進する遺伝子セットが抽

出された。以上の結果は、野生型 CLCP1 が EGFR シグナルを正に制御し、リン酸化変異体 CLCP1 は EGFR シグナルを負に制御する可能性を示唆する。

D. 考察及び結論

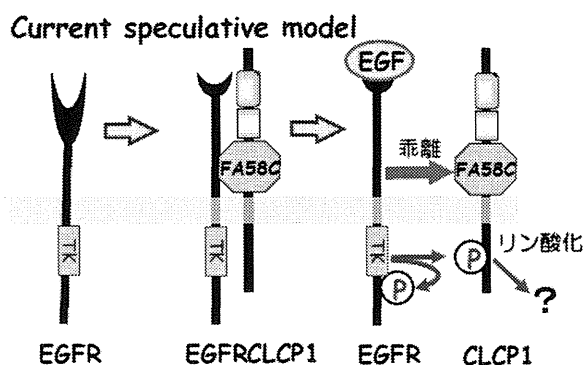
今年度の EGFR との相互作用・クロストークに関する解析では、CLCP1 全長にわたる各種ドメイン欠失コンストラクトにより EGFR との相互作用ドメインが明確になった。また、リン酸化部位変異体により、CLCP1 と EGFR との相互作用が CLCP1 非リン酸化状態で起こり、リン酸化により相互作用が抑制されるという、細胞膜上での CLCP1 の複合体形成制御の一端が明らかとなった。

また、CLCP1 の野生型及びリン酸化変異体導入により誘導される遺伝子発現プロファイルも採取し比較検討することで、RTK とのクロストークを含めた CLCP1 下流シグナルと EGFR 下流シグナルとのクロストークおよび、それに対する CLCP1 リン酸化修飾による制御が明らかとなってきた (図 5)。リン酸化依存的な CLCP1 結合分子の存在も想定されるので、今後、EGFR を代表とする RTK と CLCP1 との複合体形成機構をさらに解析を進める。特に、RTK-CLCP1 複合体の形成分子の全容を明らかにすることを目指す。

さらに、これまで CLCP1 の浸潤・転移への関与に関して、CLCP1 の細胞骨格系制御への関与の可能性が示唆されてきたが、新たに細胞運動能に直接的に関与する分子と CLCP1 との相互作用を示唆する結果も得つつある。今後、これらの分子との相互作用に基づき、CLCP1 の細胞運動能制御機構、及びその運動能制御と CLCP1-RTK 相互作用との関係にも注目して解析を進めていく。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、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予定である。

図 5. CLCP1 と EGFR の複合体形成の制御機構



E. 研究発表

1. 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*. 21: 348-61, 2012.
2. 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- β synergizes with defects in the Hippo pathway to stimulate human malignant mesothelioma growth. *J Exp Med*, 209: 479-94, 2012.
3. Shinjo K, Okamoto Y, An B, Yokoyama T, Takeuchi I, Fujii M, Osada H, Usami U, Hasegawa Y, Ito H, Hida T, Fujimoto N, Kishimoto T, Sekido S, Kondo Y.:

Integrated analysis of genetic and epigenetic alterations reveals CpG island methylator phenotype associated with distinct clinical characters of lung adenocarcinoma. *Carcinogenesis*, 33: 1277-85. 2012.

4. Katsushima K, Shinjo K, Natsume A, Ohka F, Fujii F, Osada H, Sekido Y, Kondo Y.: Contribution of microRNA-1275 to Claudin11 expression via polycomb-mediated silencing mechanism in human glioma stem-like cells. *J Biol Chem*, 287: 27396-27406. 2012.
5. 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*, 31: 5117-22, 2012.
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*, 7: 890-899, 2012.
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*, 76: 292-9, 2012.

8. Elshazley M, Sato M, Hase T, Takeyama Y, Yamashita R, Yoshida K, Toyokuni S, Ishiguro F, Osada H, Sekido Y, Yokoi K, Usami N, Shames DS, Kondo M, Gazdar AF, Minna JD, Hasegawa Y.: The circadian clock gene BMAL1 is a novel therapeutic target for malignant mesothelioma. *Int J Cancer*, 131: 2820-31. 2012.

F. 学会発表

1. Osada H, Yagi K, Yanagisawa K, Akatsuka J, Tatematsu Y, Kato S, Yatabe Y, Ono K, Sekido Y, Takahashi T: Functional analysis of CLCP1 as a potential target for lung cancer diagnostics and therapeutics. 71st Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (Oral Session), Sapporo, September 19-21, 2012.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願
2. 実用新案登録
3. その他
いずれも特記すべき事項無し

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

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に関する研究

研究分担項目：CIMに関する研究開発及び新規標的分子の探索・同定

研究分担者：柳澤聖 名古屋大学大学院医学系研究科

分子腫瘍学分野・講師

研究要旨

肺がんの浸潤・転移関連分子として同定したCIMについて、プロテオミクス技術を応用した網羅的結合蛋白探索を進めた。CIMとの結合を見出した4分子に関して、肺がん術後予後との関連を検討し、そのうちの2分子の発現と術後予後との間に有意な相関を認めた。ヒト肺癌細胞株から我々が樹立した高転移性亜株 NCI-H460-LNM35(以下、LNM35)を用いて、siRNAによる発現を抑制したところ、細胞運動能・浸潤能が顕著に減弱する事が明らかとなり、これら2分子とCIMとの結合が、CIMが付与する肺がん細胞の転移能の制御に関わっている可能性が示唆された。

また、新たながん転移関連分子の探索を、LNM35株と膵がん組織の両者の横断的なプロテオミクス解析によって進め、OEP1 (OverExpression in Pancreatic cancer 1) を同定した。LNM35株におけるOEP1特異的siRNAによる発現抑制は、細胞運動能・浸潤能の著明な減弱を惹起し、逆にOEP1低発現のPanc-1膵がん細胞株にOEP1を過剰発現させると、細胞運動能が亢進した。また、OEP1結合蛋白の網羅的探索を行い、細胞膜とアクチンを結合するERM蛋白の一つのEzrinを同定した。さらに、両者の結合を実験的に検証するとともに、OEP1のsiRNAによる発現抑制によって、Ezrinを含むadhesion complexの形成不全と細胞接着性の減弱が惹起されることを明らかとした。また、OEP1とEzrinの結合が、c-SrcによるEzrinのリン酸化を促進し、Ezrinの構造変化とadhesion complex構成分子との会合を正に制御していることを示唆する結果を得た。

A. 研究目的

先進諸国におけるがん死亡原因の第一位を占める代表的な難治がんである肺がんは、早期に浸潤・転移をきたす事が、治療に抵抗性を示す病態の本態と言える。す

なわち、転移成立の分子機構に基づいた診断・治療法の開発を進める事は、この難治がんの飛躍的な治癒率向上につながる事が期待される。

これまで我々は、先進的なプロテオミク

ス技術やバイオインフォマティクス技術を駆使し、我々が確立した極めて高い血行性及びリンパ行性転移を再現可能なヒト肺がん転移研究モデル (NCI-H460-LNM35株。以下LNM35株) (Kozaki K, et al. Cancer Res 2000; Kozaki K, et al. Oncogene 2001; Tomida S, et al. Oncogene 2007) を最大限に活用する事により、新規肺がん転移関連遺伝子 CIM (cancer invasion and metastasis) の単離・同定に成功すると共に、CIMが、低酸素ストレス応答並びに小胞体ストレス応答シグナル伝達 (UPR, unfolded protein response) を制御する事により、不良な微小環境における遠隔転移腫瘍細胞の生存に深く寄与する事を明らかとしてきた (Yanagisawa K, et al. Cancer Res 2010)。

本研究は、CIMが制御する転移成立の分子機構に関して、特に細胞運動能・浸潤能獲得の過程における重要な機能を明らかとすることを通じて、それらの知見を新規のがん診断治療法へ応用することを目指すものである。また、さらなる分子標的の探索・同定を、臨床試料と実験試料を用いた横断的なプロテオミクス解析により進め、さらには、生化学的・細胞生物学的な機能の検証により、新たな分子標的薬開発の基盤構築を目指している。

B. 研究方法

免疫沈降 - ウェスタンブロット法による CIM との結合の検証:

LNM35細胞にCIM発現コンストラクトを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。CIMに付加されている myc-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 CIM 結合候補蛋白 A - D 抗体を用いてウェスタンブロットにて解析した。

CIM 結合分子を標的とした検討:

CIMを高発現するLNM35細胞を対象として、蛋白 A と蛋白 B を標的とする siRNA をトランスフェクションし、細胞運動能と浸潤能を、トランスウェルチャンバーを用いた motility assay と、チャンバー内をマトリゲルで処理して行う invasion assay により検討した。チャンバー下面に移動した細胞は、ギムザ染色液を用いて染色し、位相差顕微鏡を用いて観察した。

膵臓がん試料を対象とした網羅的蛋白発現解析:

新鮮凍結膵臓がん外科摘出組織 7 試料から、薄切切片を作成して、膵臓がん細胞の割合が 70%以上の領域から蛋白を抽出した。対照として、他臓器がんにて手術摘出された正常主膵管組織から抽出された蛋白を解析した。抽出蛋白は還元・アルキル化処理の後に、トリプシンを用いた消化が行われ、それぞれの蛋白試料からペプチド試料を得た。非放射性安定同位体ペプチド標識試薬である iTRAQ を用いて取得されたペプチド試料の標識化を行い、ナノフロー液体クロマトグラフィーと質量分析装置を応用することにより、両群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 (図 1 左)。

OEPI を標的とした検討:

OEPIを高発現するLNM35細胞を対象として、特異的 siRNA をトランスフェクションし、細胞運動能と浸潤能を、トランスウェルチャンバーを用いた motility assay と、チャンバー内をマトリゲルで処理して行う