

2013/3020A

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25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 高橋 隆

平成26(2014)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	----- 14
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	----- 23

## 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に関わる新規分子として同定した CLCP1 及び CIM を分子標的とする、革新的な分子診断・治療法の開発に資するための基盤の構築を目指した研究を進めた。本年度は、内因性の CLCP1 と、肺がんの発生・進展に重要な役割を持つ EGFR 及び MET 受容体型チロシンキナーゼ (RTK) との結合、及び、CLCP1 と RTK のリン酸化修飾への影響について検討を加え、CLCP1 と RTK の結合と互いのシグナルに対するクロストークの存在を明確に支持する結果を得た。また、CLCP1 の発現抑制によって、がん細胞の運動と浸潤及び転移に加えて、*in vitro* 及び *in vivo* における腫瘍の増殖も抑制し得ることを明らかとした。

一方、CIM に関しては、がん細胞の細胞運動能・浸潤能の獲得における機能的な役割について、プロテオミクス解析を通じて見出した2つの CIM 結合分子 (CD2AP 及び SH3KBP1) がともに、CIM の C 末に存在する OS-9 相同領域を介して結合することを明らかとした。

また、高転移性肺がん細胞垂株 NCI-H460-LNM35 (LNM35) 株と低転移性親株 NCI-H460-N15 (N15) 株間で有意な発現差を示す約 300 種類の蛋白をプロテオミクス解析によって同定し、肺がん患者試料の解析を通じて得た情報との統合的な解析を進めた。さらに、そのうちの一つの DPYSL3 (dihydropyrimidinase-like 3) が、肺がんと並ぶ難治がんで高転移性な膵がんにおいて高発現していることを見出すとともに、膵がん及び肺がんの実験転移モデル系を用いて、がん細胞への転移能付与における DPYSL3 の機能的な関与を明らかとした。

### 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

我が国におけるがん死亡原因の第一位の座を長く占める肺がんは、難治がんの代表でもあり、革新的な治療法の開発が喫緊の課題となっている。本研究は、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つつ、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ることによって、革新的なテーラーメイド分子診断・治療法の開発の基盤を確立することを目指したものである。

我々は、本研究グループが樹立した高転移性ヒト肺癌細胞株 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、これまでに肺がんで過剰発現されている CLCP1 と CIM の二つの転移関連分子の単離・同定に成功している。CLCP1 は、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であり、一方 CIM は、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役割を担う分子であることも明らかとなってきた。そこで、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同定を進めて、その転移・再発等における機能的役割について検討を進めて、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して研究を進めた。また、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つつ、分子標的薬の創薬開発のさらなる分子標的の探索・同定を併せて進めた。

## 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 と、肺がんの分子病態に深く関わる受容体型チロシンキナーゼ (RTK) の EGFR

及び MET との間の相互作用とその機能的な意義について、proximity ligation assay (PLA) 法による分子間相互作用の検討、phos-tag を用いたウェスタンブロット法等を用いた生化学的な検討、CLCP1 ノックダウンによる増殖と転移抑制に関する細胞生物学的な検討を行った。

*I-ii) CIM 及びそのシグナリング分子を標的とした検討：*

CIM と候補 CIM 結合分子との結合については、LNM35 株に野生型及び、2 種類の OS-9 相同領域欠失変異体 CIM 発現コンストラクトを導入し、CIM 結合蛋白である CD2AP 及び SH3KBP1 に対する抗体を用いて免疫沈降・ウェスタンブロット法により検討を加えた。

*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：*

DPYSK3 の膵がん腫瘍組織及び正常主膵管における発現について、ウェスタンブロット法による検討を行った。また、DPYSK3 の転移能獲得への関与について、DPYSL3 を発現する膵がん細胞株 CFPAC-1 と高転移性肺癌細胞株 LNM35 を用いた検討を加えた。コントロール siRNA 或いは、DPYSL3 に対する siRNA を導入し、24 時間後にカルセインによる生細胞染色を行った後に、 $1.0 \times 10^6$  個の細胞を SCID マウス (6 週齢、♀) の尾静脈から注入した。2 日後に安楽死を行い PBS で右心室から還流して非浸潤細胞を除去後に OCT 包埋し、蛍光顕微鏡にて肺に生着した標識細胞を観察・計測した。

## 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：*

本年度は昨年度までの解析結果をさらに

発展させて、内因性のCLCP1とRTKとの間の相互作用の機能的な意義について検討を加えた。免疫沈降-ウェスタンブロット法によって、EGFR及びMETがCLCP1と共沈降することが検出され、内因性のCLCP1-RTK相互作用が確認された。そこで、CLCP1-MET間の相互作用について、HGF存在下で抗MET抗体と抗リン酸化MET抗体を用いて検出されるシグナルを陽性対照としつつ、proximity ligation assay (PLA)法によっても検討した。その結果、抗CLCP1抗体と抗MET抗体を用いた検討においては、HGFの有無にかかわらずPLAシグナルが得られ、HGF非依存性の内因性CLCP1-MET結合が示された。

また、CLCP1とRTKとの間の機能的相互作用について、内因性CLCP1がEGFR或いはMETとリン酸化修飾に関して、相互に及ぼす作用を中心に検討を加えた。HPL1株及びPC9株において、EGF或いはHGF添加によってEGFRとMETのそれぞれを活性化した状態における内因性CLCP1のリン酸化をphos-tag法にて検討した結果、内因性CLCP1のリン酸化の亢進が観察された。一方、EGFR或いはMETのチロシンキナーゼ阻害剤 (EGFR-I、MET-I)によりCLCP1のリン酸化は低下することが明らかとなった。逆に、肺がん細胞株PC9において、予めCLCP1をsiRNAによってノックダウンした後にHGF添加によりMETを刺激したところ、対照siRNAに比して、CLCP1-siRNAではMETの活性化を反映するリン酸化が抑制されることが観察され、ligandによるRTKの活性化にCLCP1が関与することが強く示唆された

さらに、高転移性肺がん細胞株 LNM35 株のマウス移植腫瘍の増殖と遠隔転移に対して、CLCP1のノックダウンが及ぼす影響について検討を加えた結果、LNM35株のマウス移

植腫瘍の増殖と、肺及びリンパ節への転移の抑制が観察された。また、CLCP1のノックダウンは、LNM35株以外の複数の肺がん細胞株においても、有意な増殖抑制を惹起し、CLCP1の分子標的候補としての有用性が示唆された。

*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N末とC末に存在するOS-9と相同性を有するドメインと、CIMと複合体を形成し細胞運動能の付与に関わると考えられるCD2AP或いはSH3KBP1との複合体形成に関し検討するために、これらの相同領域の欠失変異体を作成し免疫沈降法による解析を加えた。その結果マンノース6リン酸受容体と高い相同性を示すC末側の相同領域を介して結合する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:*

がん転移の制御につながる新規候補標的分子として同定したDPYSL3の発現について、手術摘出腫がん組織検体を用いた検討を行った。その結果、正常主膵管組織と比較して、膵がん症例22検体中16検体(72.7%)においてDPYSL3の高発現を認めた。さらに、*in vivo*におけるDPYSL3の転移への関わりを検討するべく、DPYSL3をsiRNAを用いて発現抑制した際の実験的肺転移能について検討を行った。まず、DPYSL3高発現膵がん細胞株であるCFPAC-1細胞を用いて、*in vitro*にてsiRNAによるDPYSL3発現の抑制を行った後に、マウス尾静脈から注入したところ、コントロールsiRNA処理群と比較して、顕著な肺への転移能の抑制が認められた。同様にDPYSL3を高発現するLNM35細胞株を用いた検討は、DPYSL3の発現抑制による肺転移能の減弱を明らかとした。

一方、新たな転移関連分子の探索においては、肺がん手術摘出腫瘍組織 119 検体のプロテオミクス解析を通じて、これまでに術後予後と関連する約 500 種類の蛋白を同定している。さらに、得られた情報について、LNM35 株と N15 株間で有意な発現差を示す約 300 種類の蛋白群との比較検討を加えた。その結果、DPYSL3 を含む約 50 種類の蛋白が共通していることが明らかとなった。

#### D. 考察及び結論

肺がんは我が国を始めとする先進諸国におけるがん死亡原因第一位であり、我が国では年間 7 万を超える生命を奪っている。本研究課題は、我々が肺癌の浸潤・転移に関わる新規分子として見出した CLCP1 と CIM を分子標的とする革新的な治療法の開発基盤を確立することを目指すものであり、難治がんの代表例たる肺がんの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 SEMA4B 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きた。CLCP1 の発現は極めて高い腫瘍特異性を持っており、これまでに得られた情報をもとに、分泌型 SEMA4B 及び分泌型 CLCP1 や、抗 CLCP1 抗体等を用いた分子標的薬の開発が可能と考えている。例えば、膜貫通型分子である SEMA4B の細胞外領域を IgG-Fc ドメインと融合した分泌型 SEMA4B-Fc によって、CLCP1 のプロテアソーム依存的分解の惹起による発現抑制が可能なることを明らかとしている。また、CLCP1 の細胞外領域を IgG-Fc ドメインと融合した分泌型 CLCP1-Fc の発現コンストラクトを用いた内因性 CLCP1 と RTK との間の相互作用に対する抑制

効果、さらには肺がん細胞の運動・浸潤及び転移に対する抑制活性についても、検討を進めたいと考えている。一方、抗 CLCP1 抗体を用いた予備的検討は、抗 CLCP1 抗体の細胞内への取り込み (internalization) を強く示唆しており、現在その診断や治療への応用を目指してさらなる検討を始めつつある。このような CLCP1 を分子標的とする研究開発は、高い独自性を持つ新規診断・治療法の実現につながる成果をもたらすことが期待される。

本研究において我々はこれまでに、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てきた。本年度の研究成果は、CIM の運動能・浸潤能の制御機序に関わる CIM 結合分子として昨年度に同定した CD2AP 及び SH3KBP1 との相互作用について、さらに詳細な情報をもたらした。CIM と両分子との結合に関わる領域は、マンノース 6 リン酸受容体相同領域を含む。現在これらの分子間の結合を阻害する化合物を探索するためのスクリーニング法の樹立を進めつつある。また、マンノース 6 リン酸受容体相同ドメインの結晶構造解析が最近報告されているので、阻害活性を持つ化合物の *in silico* スクリーニングについても考慮したいと考えている。

一方、新たな転移関連分子の探索・同定を目指した検討は、高転移性 LNM35 株のプロテオミクス解析データと、肺がん並びに膵がんの患者試料から得た情報との統合的な解析を通じて、これらの難治がんの運動能・浸潤能獲得への DPYSL3 の関与を明らかとした。さらに、プロテオミクス解析を通じて、50 種類余りの候補転移関連分子を同定している。今後さらに研究を進展させ、

DPYSL3 を分子標的とする転移抑制法の開発の基盤を築くとともに、典型的な難治がんである肺がん及び膵がんの転移・浸潤の分子機序の解明と、得られた基盤情報にもとづく革新的な診断・治療法の開発を目指していきたい。

## E. 健康危険情報

特記すべき事項無し

## F. 研究発表

- 1 Tanaka I, Osada H, Fujii M, Fukatsu A, Hida T, Horio Y, Kondo Y, Sato A, Hasegawa Y, Tsujimura T, Sekido Y. LIM-domain protein AJUBA suppresses malignant mesothelioma cell proliferation via Hippo signaling cascade. **Oncogene** (in press).
- 2 Kawahara T, Hotta N, Ozawa Y, Kato S, Kano K, Yokoyama Y, Nagino M, Takahashi T, Yanagisawa K. Quantitative proteomic profiling identifies DPYSL3 as pancreatic ductal adenocarcinoma-associated molecule that regulates cell adhesion and migration by stabilization of focal adhesion complex. **PLoS ONE** 8(12):e79654, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0079654.
- 3 Yamaguchi T, Hosono Y, Yanagisawa K, Takahashi T. NKX2-1/TTF-1: an enigmatic oncogene that functions as a double-edged sword for cancer cell survival and progression. **Cancer Cell** 23:718-723, 2013.
- 4 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.** 27: 557-569, 2013.
- 5 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.
- 6 Matsuura S, Kahyo T, Shinmura K, Iwaizumi M, Yamada H, Funai K, Kobayashi J, Tanahashi M, Niwa H, Ogawa H, Takahashi T, Inui N, Suda T, Chida K, Watanabe Y, Sugimura H. SGOL1 variant B induces abnormal mitosis and resistance to taxane in non-small cell lung cancers. **Sci Rep.** 3: 2013. doi: 10.1038/srep03012.
- 7 Arafat K, Iratni R, Takahashi T, Parekh K, Al Dhaheri Y, Adrian TE, Attoub S. Inhibitory effects of salinomycin on cell survival, colony growth, migration, and invasion of human non-small cell lung cancer A549 and LNM35: Involvement of NAG-1. **PLoS ONE**, 8:e66931, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0066931
- 8 Roth FC, Mulder JE, Brien JF, Takahashi T, Massey TE. Cytotoxic interaction between amiodarone and desethylamiodarone in human peripheral lung epithelial cells. **Chem Biol Interact.** 204:135-139, 2013.
- 9 Yamashita Y, Akatsuka S, Shinjo K, Yatabe Y, Kobayashi H, Seko H, Kajiyama H, Kikkawa F, Takahashi T, Toyokuni S. Met is the most frequently amplified gene in endometriosis-associated ovarian clear cell adenocarcinoma and correlates with worsened prognosis. **PLoS ONE.** 8:e57724, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0057724.
- 10 Ishiguro F, Murakami H, Mizuno T, Fujii M, Kondo Y, Usami N, Taniguchi T, Yokoi K, Osada H, Sekido Y. Membranous expression of activated leukocyte cell adhesion molecule contributes to poor prognosis and malignant phenotypes of non-small-cell lung cancer. **J Surg Res.** 179: 24-32, 2013.



- 11 Shinjo K, Yamashita Y, Yamamoto E, Akatsuka S, Uno N, Kamiya A, Niimi K, Sakaguchi Y, Nagasaka T, Takahashi T, Shibata K, Kajiyama H, Kikkawa F, Toyokuni S. Expression of chromobox homolog 7 (CBX7) is associated with poor prognosis in ovarian clear cell adenocarcinoma via TRAIL-induced apoptotic pathway regulation. **Int J Cancer**. (in press)
- 12 Chew SH, Okazaki Y, Nagai H, Misawa N, Akatsuka S, Yamashita K, Jiang L, Yamashita Y, Noguchi M, Hosoda K, Sekido Y, Takahashi T, Toyokuni S. Cancer-promoting role of adipocytes in asbestos-induced mesothelial carcinogenesis through dysregulated adipocytokine production. **Carcinogenesis** 35:164-172, 2014. DOI: 10.1093/carcin/bgt267
- 13 Fukatsu A, Ishiguro F, Tanaka I, Kudo T, Nakagawa K, Shinjo K, Kondo Y, Fujii M, Hasegawa Y, Tomizawa K, Mitsudomi T, Osada H, Hata Y, Sekido Y. RASSF3 downregulation increases malignant phenotypes of non-small cell lung cancer. **Lung Cancer**. 83: 23-9, 2014.
- 14 Okamoto Y, Shinjo K, Shimizu Y, Sano T, Yamao K, Gao W, Fujii M, Osada H, Sekido Y, Murakami S, Tanaka Y, Joh T, Sato S, Takahashi S, Wakita T, Zhu J, Issa JP, Kondo Y. Hepatitis virus infection affects DNA methylation in mice with humanized livers. **Gastroenterol**. 146: 562-72, 2014.
- 15 Fernandez-Cuesta L, Plenker D, Osada H, Sun R, Menon R, Leenders F, Ortiz-Cuaran S, Peifer M, Bos M, DaBler J, Malchers F, Schottle J, Vogel W, Dahmen I, Koker M, Ullrich RT, Wright GM, Russell PA, Wainer Z, Solomon B, Brambilla E, Nagy-Mignotte H, Moro-Sibilot D, Brambilla CG, Lantuejoul S, Altmuller J, Becker C, Nurnberg P, Heuckmann JM, Stoelben E, Petersen I, Clement JH, Sanger J, Muscarella LA, la Torre A, Fazio VM, Lahortiga I, Perera T, Ogata S, Parade M, Brehmer D, Vingron M, Heukamp LC, Buettner R, Zander T, Wolf J, Perner S, Ansen S, Haas SA, Yatabe Y, Thomas RK. CD74-NRG1 fusions in lung adenocarcinoma. **Cancer Discov**. 4: 415-22, 2014
- G. 学会発表**
- 1 Takahashi T: TTF-1/NKX2-1: an enigmatic oncogene that functions as a double-edged sword in lung adenocarcinoma. SNUCRI & SNUCH Cancer Symposium. Jeju, Korea. May 2-4, 2013.
  - 2 Takahashi T: Multifaceted dissection of genetic regulatory circuitry involved in the pathogenesis of lung cancers.第 72 回日本癌学会学術総会 (シンポジウム)、横浜、2013 年 10 月 3 日-5 日.
  - 3 Yanagisawa K, Takahashi T: Proteomic identification of potential biomarkers of human lung malignancies.第 72 回日本癌学会学術総会 (シンポジウム)、横浜、2013 年 10 月 3 日-5 日.
  - 4 Suzuki M, Kato S, Komizu Y, Ueoka R, Arima C, Yanagisawa K, Tamiya-Koizumi K, Murate T, Kyogashima M, Takahashi T: Targeting ceramide homeostasis and metastasis-prone phenotypes in human lung cancer cells.第 72 回日本癌学会学術総会 (ポスター)、横浜、2013 年 10 月 3 日-5 日.
  - 5 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 potential target for lung cancer diagnostics and therapeutics. 第 72 回日本癌学会学術総会 (口演)、横浜、2013 年

10月3日-5日.

6 Takahashi T: Multifaceted dissection of regulatory circuitry involved in pathogenesis of lung cancer. 第36回日本分子生物学会年会 (ワークショップ)、神戸、2013年12月3日 - 6日.

7 Osada H, Yagi K, Yanagisawa K, Akatsuka J, Tatematsu Y, Kato S, Yatabe Y, Ono K, Sekido Y, Takahashi T: Analysis of CLCP1, a potential target for lung cancer diagnostics and therapeutics. 第36回日本分子生物学

会年会 (ポスター)、神戸、2013年12月3日 - 6日.

#### 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、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 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きた。今年度は、これらの知見に基づき、内因性の CLCP1 と RTK の相互作用の機能的な制御関係を中心に CLCP1 の機能解析を更に進めた。まず免疫沈降法と Proximity ligation assay (PLA) 法により CLCP1-RTK 複合体形成を確認した。更に Phos-tag ゲル解析により内因性 CLCP1 のリン酸化が相互作用する RTK の活性により強く制御されていることが判明した。また、CLCP1 ノックダウンによって、HGF による MET の活性化が抑制されることが示された。更に CLCP1 ノックダウンが細胞運動能・浸潤能だけでなく細胞増殖にも関与することを示す結果も得た。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 MET が CLCP1 結合分子であることを同定した。また 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。更に 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 との機能的相互作用や RTK シグナルとのクロストーク等を探索した。

今年度は、この CLCP1 と RTK の機能的相互作用を更に検討した。Proximity ligation assay (PLA)法による CLCP1-RTK 複合体形成の確認、Phos-tag ゲルによる内因性 CLCP1 のリン酸化制御、CLCP1 ノックダウンによる MET の活性化制御等を検討した。また CLCP1 ノックダウンによる細胞生物学的作用も検討した。さらに、これらの知見を CLCP1 を分子標的とする革新的ながんの診断・治療法の樹立へと結び付けるべく、当該シグナルの新規阻害法の開発を目指した検討を進めた。

## B. 研究方法

### *Proximity ligation assay (PLA)法*

肺がん細胞をスライドガラスで培養し、宿主種の異なる 2 種の一次抗体を用いて、Duolink in situ (Olink 社)のプロトコールに従い、Duolink PLA probe 反応・PLA probe のハイブリダイゼーション・伸長反応を行い、標識プローブにて PLA シグナルを検出した。PLA シグナルにより 2 種の一次抗体の隣接が示される。

### *Phos-tag* ウェスタンブロット

Phos-tag® Acrylamide 50  $\mu$ M、MnCl<sub>2</sub> 100  $\mu$ M を添加した SDS-PAGE ゲルでウェスタンブロットを行った。得られたシグナル強

度を Densitometer で定量化し、リン酸化/非リン酸化率を算出した。また、対照として、PC9 の lysate を  $\lambda$ -フォスファターゼ処理にて脱リン酸化したサンプルを用いた。

### *CLCP1* ノックダウン

CLCP1 に対するノックダウン効率が保障された siRNA を購入し、Lipofectamine RNAiMAX を用いて、肺がん細胞株内に導入した。ノックダウンによる生物学的効果は複数の siRNA を用いて確認した。LNM35 の Xenograft 実験に於いては、CLCP1 に対する shRNA 発現ベクターを導入し、恒常的に CLCP1 が発現抑制されている亜株を選択して用いた。

## C. 研究結果

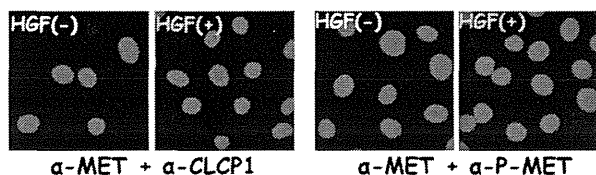
本研究において、CLCP1 が SEMA4B に加えて受容体型チロシンキナーゼ (RTK) である EGFR 及び MET と相互作用することを見出し、昨年度までの検討で、293T 細胞における強制発現系を用いて CLCP1 とこれらの RTK 間の相互作用に関する検討を進めた。その結果、CLCP1-EGFR 結合ドメインの同定、CLCP1 リン酸化部位変異や EGFR 活性による CLCP1-EGFR 結合制御、CLCP1 下流シグナルと EGFR 下流シグナルの密接な関連、等が明らかとなり、CLCP1 と RTK との結合が種々の制御を受け、また機能的な相互作用であることが示唆されてきた。本年度は、肺がん細胞の分子病態形成への関わりをより良く反映する、内因性の CLCP1 と RTK との間の相互作用の機能的な意義について更に検討を加えた。

最初に CLCP1 と EGFR 及び MET の RTK との内因性の相互作用を検討した。免疫沈降-ウェスタンブロット法によって、EGFR 及び MET が CLCP1 と共沈降することが検出され、内因

性のCLCP1-RTK相互作用が確認された。また、その知見をさらに確認するために、CLCP1-MET間の相互作用についてproximity ligation assay (PLA)法によっても検討した。対照として、抗MET抗体と抗Phospho-MET抗体を用いた検討では、MET ligandのHGF刺激下でのみPLAシグナルが得られ、PLA法が2種の抗体の隣接を特異的に検出していることが示された。次に抗CLCP1抗体と抗MET抗体でPLAシグナルを検討したところ、HGFの有無にかかわらずPLAシグナルが得られ、HGF非依存性の内因性CLCP1-MET結合が示された(図1)。

図1 PLA法によるCLCP1とMETの相互作用の

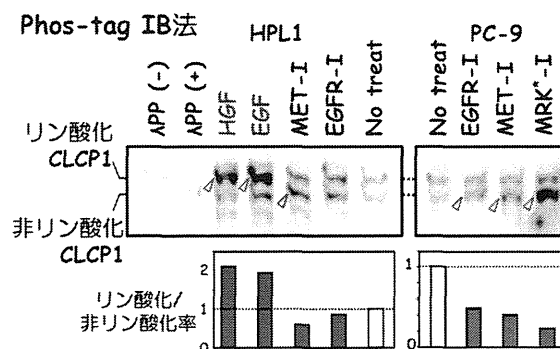
検討



また、CLCP1とRTKとの間の機能的相互作用について、内因性CLCP1がEGFR及びMETとの間において、そのリン酸化修飾に対し相互に及ぼす作用を中心に検討を加えた。HPL1株及びPC9株において、RTK ligandであるEGF或いはHGFを添加して、EGFR或いはMETを活性化し、Phos-tag法にて内因性CLCP1のリン酸化を検討した。その結果、Phos-tagゲルで低泳動性のリン酸化CLCP1シグナルの増強が見られ、内因性CLCP1のリン酸化の亢進が観察された。一方、逆にEGFR或いはMETのチロシンキナーゼ阻害剤(EGFR-I、MET-I)によりCLCP1のリン酸化は低下することが明らかとなった(図2)。

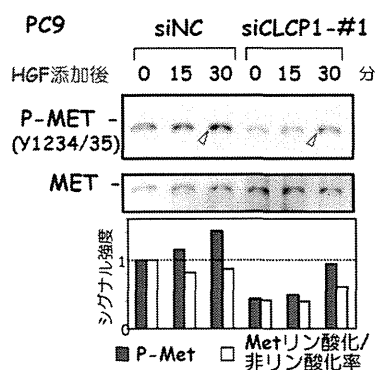
さらに、肺がん細胞株PC9において、予めCLCP1をsiRNAによってノックダウンした後

図2 RTK活性と相関する内因性CLCP1のリン酸化の制御



に、HGF添加によりMETを刺激したところ、対照siRNAに比して、CLCP1-siRNAではMETの活性化を反映するリン酸化が抑制されることが観察され、ligandによるRTKの活性化にCLCP1が関与することが強く示唆された(図3)。これらの結果から、肺がん細胞株の細胞内において、内因性のCLCP1がRTKと機能的に相互作用していることが強く示唆された。

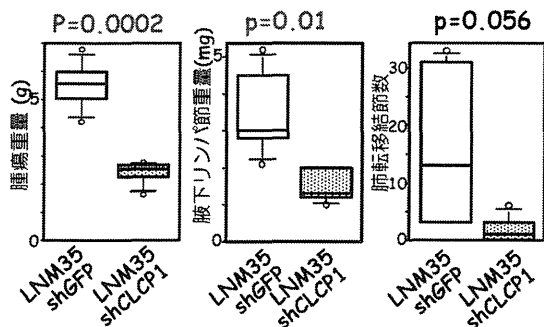
図3 CLCP1 ノックダウンで引き起こされる、HGFによるMET活性化の抑制



このようなCLCP1の機能解析の知見から、CLCP1ががんの診断・治療において有用な標的分子であることが示唆される。がん治療への応用を目指し、これまでにCLCP1のノックダウンが、高転移性肺がん細胞株LNM35株の遠隔転移能を抑制するとともに、腫瘍増

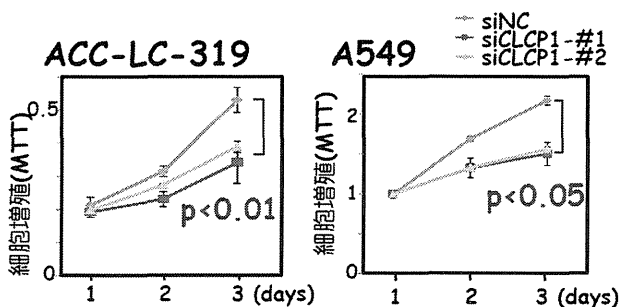
殖も抑制させる結果が得られており、CLCP1 ががんの治療標的分子候補である事を示してきた (図4)。

図4 CLCP1 ノックダウンによる LNM35 の腫瘍増殖能・転移能の制御



また本研究のこれまでの解析から、CLCP1 ノックダウンが複数の他の肺がん細胞株においても有意な増殖抑制を引き起こすことが明らかとなってきた (図5)。その分子機序の一つとして、これらの内因性のCLCP1とRTKとの相互作用が関与している可能性が考えられるので、CLCP1ノックダウンによる細胞内シグナル経路の活性の変化等を含め、さらに検討を進めつつある。

図5 CLCP1 ノックダウンによる肺癌細胞株の増殖抑制



#### D. 考察及び結論

本研究で得られた研究成果は、CLCP1 の極めて腫瘍特異的な発現と相まって、分子標的候補としての有望性を強く示唆している。

これまでに得られた成果にもとづいて、分泌型 SEMA4B 及び分泌型 CLCP1 や、抗 CLCP1 抗体等を用いた、CLCP1 を分子標的とする創薬開発が可能であると考えている。

例えば、これまでに CLCP1 のリガンドとして同定した、膜貫通型分子である SEMA4B の細胞外領域を IgG-Fc ドメインと融合した分泌型 SEMA4B-Fc によって、CLCP1 のプロテアソーム依存的分解の惹起による発現抑制が可能であることを明らかとしている。さらに、本研究過程の中で、膜貫通型分子である CLCP1 の細胞外領域を IgG-Fc ドメインと融合した分泌型 CLCP1-Fc の発現コンストラクトの作成を終了し、その内因性 CLCP1 と RTK との間の相互作用に対する抑制効果、さらには肺がん細胞の運動・浸潤及び転移に対する抑制活性について検討を進める予定である。また、CLCP1 を標的とした抗体を用いた現在までの予備的な検討の結果は、CLCP1 に結合した抗 CLCP1 抗体の細胞内への取り込み (internalization) を強く示唆しており、現在その診断や治療への応用を目指してさらなる検討を始めつつある。

このような CLCP1 を分子標的とする研究開発は、高い独自性を持つ新規診断・治療法の実現につながる成果をもたらすことが期待される。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1 Tanaka I, Osada H, Fujii M, Fukatsu A, Hida T, Horio Y, Kondo Y, Sato A, Hasegawa Y, Tsujimura T, Sekido Y. LIM-domain protein AJUBA suppresses malignant mesothelioma cell proliferation via Hippo signaling cascade. **Oncogene** (in press).
- 2 Ishiguro F, Murakami H, Mizuno T, Fujii M,

- Kondo Y, Usami N, Taniguchi T, Yokoi K, Osada H, Sekido Y. Membranous expression of activated leukocyte cell adhesion molecule contributes to poor prognosis and malignant phenotypes of non-small-cell lung cancer. **J Surg Res**, 179: 24-32, 2013.
- 3 Fukatsu A, Ishiguro F, Tanaka I, Kudo T, Nakagawa K, Shinjo K, Kondo Y, Fujii M, Hasegawa Y, Tomizawa K, Mitsudomi T, Osada H, Hata Y, Sekido Y. RASSF3 downregulation increases malignant phenotypes of non-small cell lung cancer. **Lung Cancer**, 83: 23-9, 2014.
- 4 Okamoto Y, Shinjo K, Shimizu Y, Sano T, Yamao K, Gao W, Fujii M, Osada H, Sekido Y, Murakami S, Tanaka Y, Joh T, Sato S, Takahashi S, Wakita T, Zhu J, Issa JP, Kondo Y. Hepatitis virus infection affects DNA methylation in mice with humanized livers. **Gastroenterol**, 146: 562-72, 2014.
- 5 Fernandez-Cuesta L, Plenker D, Osada H, Sun R, Menon R, Leenders F, Ortiz-Cuaran S, Peifer M, Bos M, DaBler J, Malchers F, Schottle J, Vogel W, Dahmen I, Koker M, Ullrich RT, Wright GM, Russell PA, Wainer Z, Solomon B, Brambilla E, Nagy-Mignotte H, Moro-Sibilot D, Brambilla CG, Lantuejoul S, Altmuller J, Becker C, Nurnberg P, Heuckmann JM, Stoelben E, Petersen I, Clement JH, Sanger J, Muscarella LA, la Torre A, Fazio VM, Lahortiga I,

Perera T, Ogata S, Parade M, Brehmer D, Vingron M, Heukamp LC, Buettner R, Zander T, Wolf J, Perner S, Ansen S, Haas SA, Yatabe Y, Thomas RK. CD74-NRG1 fusions in lung adenocarcinoma. **Cancer Discovery**. 4: 415-22, 2014

## 2. 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 potential target for lung cancer diagnostics and therapeutics. 72nd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (Oral Session), Yokohama, October 3-5, 2013.
- 2 Osada H, Yagi K, Yanagisawa K, Akatsuka J, Tatematsu Y, Kato S, Yatabe Y, Ono K, Sekido Y, Takahashi T: Analysis of CLCP1, a potential target for lung cancer diagnostics and therapeutics (Poster Session), 36<sup>th</sup> Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan. Kobe, December 3-6, 2013.

## 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

本研究を通じて、我々が同定した肺がん浸潤・転移に関わる新規分子 CIM (cancer invasion and metastasis) の機能解析を進めて、微小環境における低酸素ストレス応答に重要な HIF-1 $\alpha$  発現を正に制御していること、及び、小胞体ストレス応答シグナル伝達 (UPR, unfolded protein response) の制御に重要な BiP と結合し UPR シグナル伝達を正に制御することを示してきた。本年度は、プロテオミクス解析を通じて同定した、CIM によるがん細胞の運動能・浸潤能の付与に関わる2つの候補 CIM 結合分子について、CIM の C 末に存在する OS-9 相同領域を介した結合を明らかとした。また、がん転移の制御につながる新規標的分子の探索・同定を目指した検討においては、高転移性肺がん細胞亜株 NCI-H460-LNM35 株と低転移性親株である NCI-H460-N15 株間で有意な発現差を示す約 300 種類の蛋白を同定してきた。それらの中に、肺がんと並ぶ難治がんであり高転移性を示す膵がん腫瘍組織においても高発現を示す DPYSL3 (dihydropyrimidinase-like 3) を見出し、さらに DPYSL3 が膵がん及び肺がん細胞の転移形成に重要な役割を担っていることを明らかとした。

#### A. 研究目的

肺がんは我が国を含む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り、膵がんもまた、この20年間治療成績の向上が認められない、典型的な難治がんと言える。肺がん・膵がんによる現病死を引き起こす病態は、がん細胞の浸潤・転移の結果生じる多臓器不全による

ものである。この事から、浸潤と転移の分子機構の解明とその機序に基づいた革新的な診断・治療法の開発は、これら難治がん克服の喫緊の課題と考えられる。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) と、長年に渡って詳細な臨床情報とともに蓄積してきた試料バンクを最大限に活用し、浸潤と転移の分子機構の解明と、得られた知見の臨床への応用基盤構築を目指している。

これまでの本研究を通じて、我々が単離・同定した新規肺がん転移関連遺伝子CIM (cancer invasion and metastasis) 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)。本年度の研究においては、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・浸潤能の獲得に関わる機能に焦点を当てて検討を行った。また、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って新規分子標的の探索・同定を進めて同定した、新規転移関連分子DPYSL3 (dihydropyrimidinase-like 3) について、その機能解析をさらに進めた。

## 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:

NCI-H460-LNM35 細胞に、野生型及び、2種類の OS-9 相同領域欠失変異体 CIM 発現コンストラクトをトランスフェクションし、48時間培養後に、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、CIM 結合蛋白である

CD2AP、並びに SH3KBP1 抗体 (ともにシグマアルドリッチ社) を用いてウェスタンブロットにて解析した。

膵臓がん試料を対象とし DPYSL3 蛋白発現解析:

新鮮凍結膵臓がん外科摘出組織 22 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抽出し、抗 DPYSL3 抗体 (ミリポア社) を用いてウェスタンブロット法により解析した。

マウスを用いた *in vivo* 実験的転移能解析法による DPYSL3 の機能解析:

DPYSL3 を発現する膵がん細胞株 CFPAC-1 と高転移性肺癌細胞株 NCI-H460-LNM35 にコントロール siRNA (siCont) あるいは、DPYSL3 を標的とする siRNA (siDPY #1) をトランスフェクションする。24時間後にカルセイン (BD バイオサイエンス社) を用いて1時間染色を行った後に、細胞を回収する。1.0 x 10<sup>6</sup> 個の細胞を 0.1 ml の PBS に溶解して、SCID マウス (6週齢、♀) の尾静脈から注入する。2日後に安楽死を行い、6ml の PBS を右心室に注入した後に、OCT 包埋し蛍光顕微鏡にて、肺に生着した標識細胞を観察・計測した。

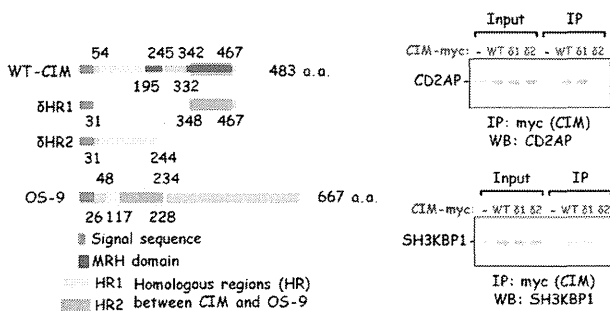
## C. 研究結果

I. CIM 結合分子の探索とその機能解析:

CIM 分子内には、OS-9 分子と相同性を有するドメイン構造が N 末と C 末にそれぞれ 1箇所ずつ存在する。CIM と CD2AP 或いは SH3KBP1 との複合体形成の制御機構に関して詳細に検討するために、これらの相同領

域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。CIM と複合体を形成し細胞運動能の付与に関わると考えられる 2 つの候補分子と CIM の結合は、CIM の存在する OS-9 相同領域のうち、マンノース 6 リン酸受容体と高い相同性を示す C 末側の相同領域を介して結合することが明らかとなった (図 1)。

図 1 CIM 蛋白上の結合分子 CD2AP 及び SH3KBP1 結合領域の決定

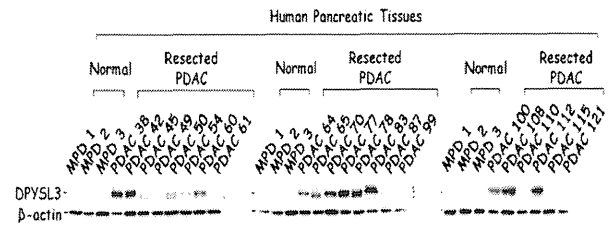


細胞運動能制御を担う分子との結合に関わる機能ドメインとしてマンノース 6 リン酸受容体相同ドメインを同定することができたので、現在これらの分子間の結合を阻害する化合物を探索するためのスクリーニング法の樹立を進めつつある。

## 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:

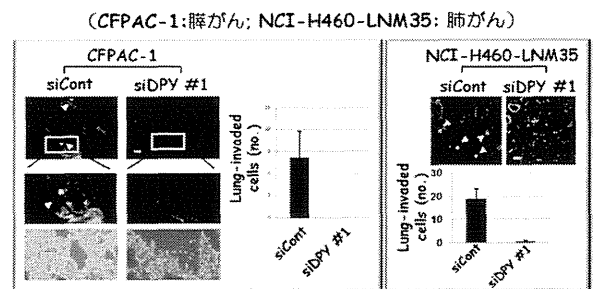
がん転移の制御につながる新規候補標的分子として同定した DPYSL3 の発現について、手術摘出膵がん組織検体を用いた検討を行った。その結果、正常主膵管組織と比較して、膵がん症例 22 検体中 16 検体 (72.7%) において DPYSL3 の高発現を認めた (図 2)。さらに、*in vivo* における DPYSL3 の転移の制御に関わる機能を明らかとする目的で、DPYSL3 を発現抑制した際の実験的肺転移能

図 2 手術摘出試料をもちいた DPYSL3 の発現の検討



について検討を行った。まず、DPYSL3 高発現膵がん細胞株である CFPAC-1 細胞を用いて、*in vitro* にて siRNA による DPYSL3 発現の抑制を行った後に、マウス尾静脈から注入したところ、コントロール siRNA 処理群に比較して、顕著な肺への転移能の抑制が認められた (図 3 左)。同様にして、DPYSL3 を高発現する LNM35 細胞株を用いた検討を行った結果、DPYSL3 の発現抑制により、肺転移能の減弱が認められることが明らかとなった (図 3 右)。

図 3 DPYSL3 発現抑制による転移能の低下



これまでに我々は、膵がん手術摘出腫瘍組織 119 検体のプロテオミクス解析を通じて、術後予後と関連する約 500 種類の蛋白を同定している。そこで得られた情報について今後のさらなる候補転移関連分子の探索・同定に向けた重要な基盤情報を得るべく、上述の約 300 種類の LNM35 株と N15 株間で有意な発現差を示す蛋白群との比較検討を加えた。その結果、約 50 種類 (DPYSL3

を含む)の蛋白が共通していることが明らかとなった。

#### D. 考察及び結論

今年度の CIM と結合分子 CD2AP 並びに SH3KBP1 との相互作用に関する解析では、CIM の OS-9 相同領域欠失コンストラクトにより、それぞれの分子間相互作用ドメインが明確になった。この分子間結合領域には、リソソーム加水分解酵素などと結合して、リソソームへ輸送する機能を持つマンノース 6 リン酸受容体相同領域が含まれている。予備解析の結果、CIM 遺伝子の導入により、CD2AP 或いは SH3KBP1 の細胞内蛋白量の増加が認められていることから、リソソームにおける CD2AP 或いは SH3KBP1 の分解制御機構に、CIM が抑制的に関与することによって細胞運動能、浸潤能の調節が行われている可能性が示唆された。今後さらに検討を進め、複合体機能の全容を明らかにすることを目指したい。

本年度の研究によって、細胞運動能制御を担う分子との結合に関わる機能ドメインとして、マンノース 6 リン酸受容体相同ドメインを同定することができたので、現在これらの分子間の結合を阻害する化合物を探索するためのスクリーニング法の樹立を進めつつある。マンノース 6 リン酸受容体相同ドメインの結晶構造解析が最近報告されているので、阻害活性を持つ化合物の *in silico* スクリーニングについても考慮したいと考えている。

高転移性肺癌細胞垂株 NCI-H460-LNM35 株を用いたプロテオミクス解析データと、肺癌並びに膵がん臨床検体から取得した情報との統合的な解析により、これらの難治

がんの運動能・浸潤能獲得への DPYSL3 の関与を明らかとした。さらに、プロテオミクス解析を通じて、50 種類にも及ぶ候補転移関連分子の同定に至っており、それらには spindle/membrane organization や protein/vesicle mediated transport などに関わる分子群が含まれていた。今後さらに研究を進展させ、DPYSL3 を分子標的とする転移抑制法の開発の基盤を築くとともに、典型的な難治がんである肺癌及び膵がんの転移・浸潤の分子機構解明と得られた基盤情報にもとづく革新的な診断・治療法の開発を目指していきたい。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1 Kawahara T, Hotta N, Ozawa Y, Kato S, Kano K, Yokoyama Y, Nagino M, Takahashi T, Yanagisawa K. Quantitative proteomic profiling identifies DPYSL3 as pancreatic ductal adenocarcinoma-associated molecule that regulates cell adhesion and migration by stabilization of focal adhesion complex. **PLoS ONE** 8(12):e79654, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0079654.
- 2 Yamaguchi T, Hosono Y, Yanagisawa K, Takahashi T. NKX2-1/TTF-1: an enigmatic oncogene that functions as a double-edged sword for cancer cell survival and progression. **Cancer Cell** 23:718-723, 2013.
- 3 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.** 27: 557-569, 2013.
- 4 Attoub S, Arafat K, Gelaude A, Sultan MAA, Bracke M, Collin, P, Takahashi T,