

1. 總括研究報告書

**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亜株 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、肺がんとは並ぶ難治がんが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

1-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。

1-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 の隣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 を発現する隣がん細胞株 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、 1.0×10^6 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

1-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 Maus 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 Maus 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。

1-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。

11. 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、手術摘出肺がん組織検体を用いた検討を行った。その結果、正常主肺管組織と比較して、肺がん症例 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 高発現肺がん細胞株である 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 リン酸受領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

