

## 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参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参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グラスで培養し、ホスト種の異なる 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-ライゲーション・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 -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*

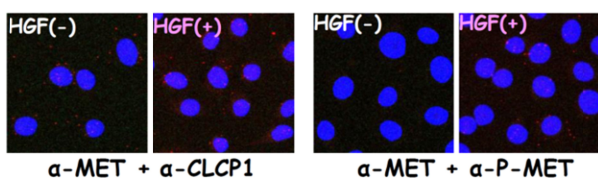
CLCP1 に対するノックダウン効率が保障された siRNA を購入し、Lipofectamine RNAiMAX を用いて、肺がん細胞株内に導入した。ノックダウンによる生物学的効果は複数の siRNA を用いて確認した。LNM35 の Xenograft 実験に於いては、CLCP1 に対する shRNA 発現ベクターを導入し、恒常的に CLCP1 が発現抑制されている垂株を選択して用いた。

## 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**

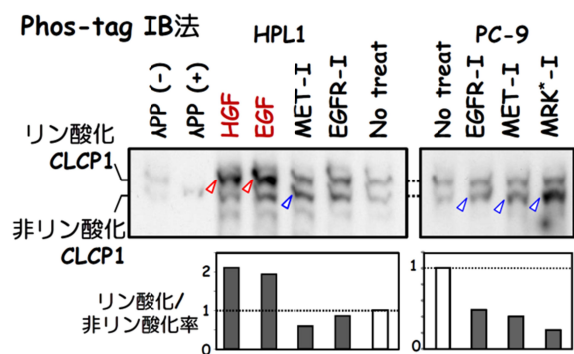


また、CLCP1とRTKとの間の機能的相互作用について、内因性CLCP1がEGFR及びMETとの間において、そのリン酸化修飾に対し相互に及ぼす作用を中心に検討を加えた。HPL1株及びPC9株において、RTK ligandであるEGF或いはHGFを添加して、EGFR或いはMETを活性化し、Phos-tag法にて内因性CLCP1のリン酸化を検討した。その結果、Phos-tagゲルで低泳動性のリン酸化CLCP1シグナルの増強が見られ、内因性CLCP1のリン酸化の亢進が観察された。一方、逆にEGFR或いはMETのチロシンキナーゼ阻害剤(EGFR-I、

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)。

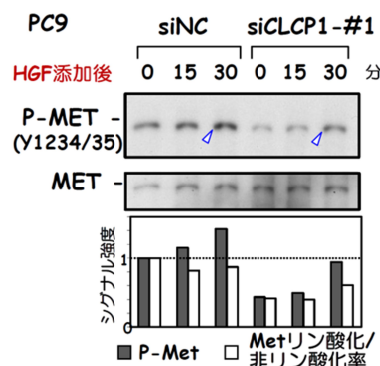
さらに、肺癌細胞株PC9において、予めCLCP1をsiRNAによってノックダウンした後

**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、肺癌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。

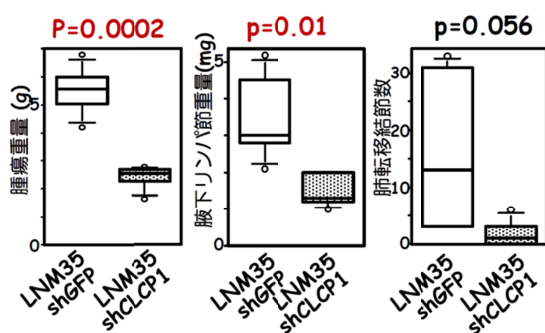
**図3 CLCP1ノックダウンで引き起こされる、HGFによるMET活性化の抑制**



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

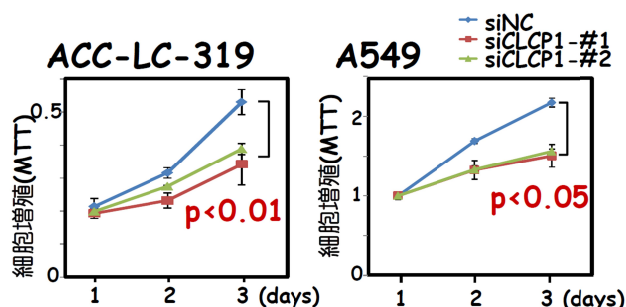
的分子であることが示唆される。がん治療への応用を目指し、これまでにCLCP1のノックダウンが、高転移性肺がん細胞株LNM35株の遠隔転移能を抑制するとともに、腫瘍増殖も抑制させる結果が得られており、CLCP1ががんの治療標的分子候補である事を示してきた(図4)。

**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