

**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 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垂株 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、肺がんとは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、4 8 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 2 2 試料から、薄切切片を作成して、膵臓がん細胞の割合が 7 0 % 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。2 4 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 10⁶ 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。

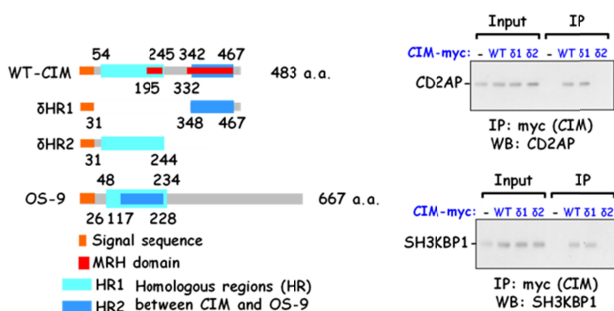
C. 研究結果

1. 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

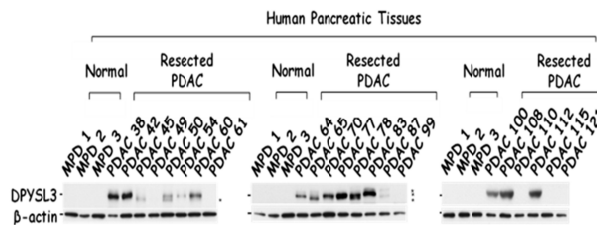


細胞運動能制御を担う分子との結合に関わる機能ドメインとしてマンノース 6 リン酸受容体相同ドメインを同定することができたので、現在これらの分子間の結合を阻害する化合物を探索するためのスクリーニング法の樹立を進めつつある。

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：

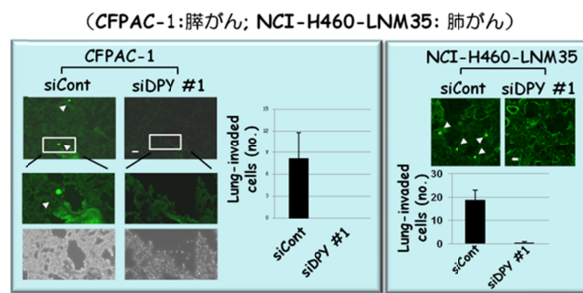
がん転移の制御につながる新規候補標的分子として同定した DPYSL3 の発現について、手術摘出膵がん組織検体を用いた検討を行った。その結果、正常主膵管組織と比較して、膵がん症例 22 検体中 16 検体 (72.7%) において DPYSL3 の高発現を認めた (図 2)。さらに、*in vivo* における DPYSL3 の転移の制御に関わる機能を明らかとする目的で、DPYSL3 を発現抑制した際の実験的肺転移能

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 DPYSL 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、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、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。

高転移性肺癌細胞亜株 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,

- Adrian, T, De Wever O. Frondoside A suppressive effects on lung cancer survival, tumor growth, angiogenesis, invasion, and metastasis. **PLoS ONE**8:e53087, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0053087.
- 5 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.
 - 6 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
 - 7 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.
 - 8 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.
 - 9 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.
 - 10 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)
 - 11 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
 - 12 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.
 - 13 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.
 - 14 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).
 - 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

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.

F. 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

1 2. 学会発表

- 2 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.
- 3 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.
- 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 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.
- 5 Osada H, Yagi K, Yanagisawa K, Akatsuka J, Tatematsu Y, Kato S, Yatabe Y, Ono K, Sekido Y, Takahashi T: Analysis of CLCP1,

