

201313020B

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に関する研究

平成 22 年度～25 年度 総合研究報告書

研究代表者 高橋 隆

平成 26 (2014) 年 5 月

目 次

I. 総合研究報告	
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	----- 1
高橋 隆	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 21
III. 研究成果の刊行物・別刷	----- 27

I. 総合研究報告

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）
総合研究報告書

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

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

本研究において、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。

CLCP1 と、EGFR 及び MET 受容体型チロシンキナーゼ (RTK) との結合を同定し、さらに CLCP1 と RTK 間のクロストークの存在を明らかとした。また、RTK 以外の CLCP1 結合分子のプロテオミクス解析による探索を行って、non-muscle myosin IIA 及び β -actin を同定した。さらに、CLCP1 の発現抑制によって、運動能・浸潤能のみならず増殖能も低下させ得ることや、CLCP1 の極めて高い腫瘍特異性を明らかとし、武装化抗体等の開発に向けた分子標的として最適であることを示唆する結果を得た。

一方、CIM に関しては、HIF-1 α を負に制御する OS-9 に結合して抑制し、HIF-1 α を正に制御すること、及び、BiP と結合し、小胞体ストレス応答を正に制御することを明らかとした。また、プロテオミクス解析による CIM 結合タンパクの探索を進めて、CD2AP と SH3KBP1 の 2 つの分子を同定し、その結合が CIM による肺がん細胞の運動能と転移能の付与に関わっていることを示唆する結果を得た。

また、LNM35 株のプロテオミクス解析を通じて、新規がん転移関連分子の探索を進めた。DPYSL3 (dihydropyrimidinase-like 3) を同定し、運動能・浸潤能、及び、転移能の制御への関与を明らかとした。DPYSL3 結合蛋白の網羅的探索において、ERM 蛋白の一つの Ezrin を同定するとともに、DPYSL3 と Ezrin の結合が、c-Src による Ezrin のリン酸化を促進し、Ezrin と adhesion complex 構成分子との会合を正に制御することを示した。

本研究成果を基盤として、CLCP1 と CIM を分子標的とする革新的肺がん治療法の開発へ向けた研究を、今後さらに加速するとともに、新たに見出した DPYSL3 や他の分子標的候補についても詳細な検討を進めていきたい。

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。我々は、独自に樹立した高転移性ヒト肺癌細胞垂株 NCI-H460-LNM35（以下、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、これまでに肺がんが過剰発現されている CLCP1（CUB, LCCL-homology, coagulation factor V/VIII homology domains protein）と CIM（cancer invasion and metastasis）の二つの転移関連分子を単離・同定してきた。本研究においては、これらの分子を中心に、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となる情報を得ることを目指した。

CLCP1 は、がん抑制遺伝子ファミリーに属する SEMA4B と結合して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を示唆する知見を得ていた。そこで、CLCP1 結合分子の網羅的探索・同定や、CLCP1 によって制御される下流遺伝子群・パスウェイの同定等を通じた機能解析を目指した。一方、CIM は、ER に局在し ER ストレス応答に関与することを示唆する知見を得ていた。本研究においては、プロテオミクス解

析を応用した CIM 結合分子の網羅的探索・同定を通じた分子機能の詳細解明を目指した。また、さらなる分子標的の探索・同定を、LNM35 株と臨床組織試料を活用した横断的プロテオミクス解析によって進めるとともに、同定した新規転移関連分子について、その分子機能の解明を目指した。

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 の細胞膜外領域に対して作成されたモノクローナル抗体（医学生物学研究所より供与）と、パラフィン包埋された肺がん腫瘍組織試料及び、各種臓器の正常組織試料を用いて、CLCP1 の腫瘍及び正常組織における発現について、免疫組織化学的解析を行い、細胞膜に沿って染色像を示すものを CLCP1 発現陽性とした。CLCP1 のシグナル伝達に関する示唆を得るため、CLCP1 の細胞内領域のアミノ酸配列を対象として、NetPhosK (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK/>)、Motif Scan (http://scansite.mit.edu/motifscan_seq.phtml)、PhosphoMotif Finder (http://www.hprd.org/PhosphoMotif_finder)等の on-line 解析を行い、リン酸化モチーフを検索した。プラスミド及びレンチウイルスベクターを用いて、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等の各種発現ベクターを構築して、以下の解析に用いた。CLCP1 と EGFR 及び MET との in vitro における相互作用の解析は、293T 細胞に HA タグ付き CLCP1 と各種変異体の発現コンストラクトをコトランスフェクションし、免疫沈降-ウェスタンブロット法により行った。また、内因性の CLCP1 との相互作用の検討は、抗 CLCP1 抗体を用いて免疫沈降し、免疫沈降産

物のウェスタンブロット解析を抗 EGFR 或いは抗 MET 抗体等を用いて行った。また、Duolink in situ キット (Olink 社) を用いた PLA シグナルの検出によっても、CLCP1 と EGFR 等の RTK の極めて近接した局在に関して検証を加えた。さらに、EGFR や MET のリン酸化に関しては、酵素活性に関連する抗リン酸化 Y1068-EGFR 抗体、抗リン酸化 Y1234/35-c-MET 抗体等を用いた解析を行った。CLCP1 のリン酸化については、phos-tag アクリルアミド試薬を用いたウェスタンブロット解析によって行った。なお、陰性対照には、PC9 株の細胞融解液を λ -フォスファターゼ処理して用いた。LNM35 株を用いたマウス皮下移植腫瘍の増殖及び転移に関する実験は、CLCP1 に対する shRNA 発現ベクターを導入し、恒常的に CLCP1 が発現抑制された亜株を選択して用いた。

新たな CLCP1 結合タンパクの探索は、CLCP1 或いは、コントロール siRNA を導入した LNM35 株の細胞融解液の、抗 CLCP1 抗体を用いた免疫沈降と SDS-PAGE による比較検討をもとに、ナノ液体クロマトグラフィーとタンデム質量分析器を用いて行った。また、CLCP1 下流のシグナルパスウェイの解析は、CLCP1 のレンチウイルスベクターを PC-9 や H1975 等の肺がん細胞株及び、LNM35 株とその低転移親株の N15 株に導入し、マイクロアレイ解析を行い、IPA ソフトウェアや Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) 解析によって検討した。また、同定したトップ 20 の CLCP1 関連 canonical pathway に属する遺伝子群を各パスウェイモジュールとし、当研究グループの保有する肺がんの網羅的な遺伝子発現解析データの中での各モジュール活性を算出し、全生存率及び無再発生存率との関連性を検討した。

I-ii) CIM 及びそのシグナリング分子を標

的とした検討:

CIM 遺伝子の特異的且つ恒常的に発現抑制するために、LNM35 株に CIM 遺伝子の shRNA 発現ベクター或いは、スクランブル shRNA を導入したトランスフェクタントを樹立した。両株間の蛋白発現プロファイルについて、非放射性安定同位体ペプチド標識試薬である iTRAQ によるペプチド試料の標識化の後に、ナノフロー液体クロマトグラフィーと質量分析器を用いた網羅的発現プロファイルの比較定量解析を行った。CIM の発現抑制により発現量に差異を認める蛋白群について、KeyMolnet ソフトウェアを用いたネットワーク解析を行った。

GST 蛋白融合 CIM 発現バキュロウィルスベクターを作成し、Sf9 細胞を用いた CIM 遺伝子産物の大量精製系を確立した。グルタチオンビーズと結合させて作成した CIM アフィニティーカラムと LNM35 細胞の細胞融解液を用いて、CIM 結合分子群の精製を行った。グルタチオンビーズを用いて同様に精製した試料を対照として、両方の精製試料を iTRAQ を用いて標識して網羅的発現プロファイルの比較定量解析を行った。CIM との結合の検証は、myc タグを付加した CIM を外来性に発現させて抗 myc 抗体を用いた pull down を行い、CIM と共沈する分子に対するウェスタンブロット解析によって行った。また、同定した候補分子の細胞運動能と浸潤能への関与については、CIM を高発現する LNM35 株を対象に、候補 CIM 結合分子に対する siRNA を導入して検討した。

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 株と低転移性親株 N15 株を用いて、iTRAQ 標識したペプチドを質量分析器によって網羅的に比較定量解析を行った。また同様に、新鮮凍結膵臓がん外科摘出組織試

料と、対照として正常主膵管組織試料を用いて、網羅的蛋白発現プロファイルの比較定量解析を行った。

DPYSL3 の機能解析は、高発現する LNM35 株に特異的 siRNA を導入し、運動能と浸潤能への影響を検討した。また、GST 蛋白融合 DPYSL3 発現バキュロウィルスを感染させた Sf9 細胞を用いて作成した、DPYSL3 遺伝子産物のアフィニティーカラムを使用して、DPYSL3 高発現膵臓がん細胞株 CFPAC1 の細胞融解試料から DPYSL3 結合分子群を分離し、質量分析法によって同定した。

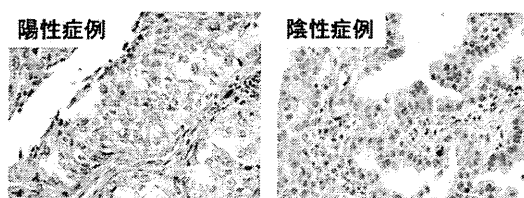
DPYSL3 低発現膵臓がん細胞株の Panc-1 株に myc 標識 DPYSL3 を外来性に発現させ、DPYSL3 安定発現膵臓がん細胞株 Panc-1-DPYSL3-myc 細胞を樹立し、抗 myc 抗体を用いた pull down を行った。DPYSL3 共沈分子に対してウェスタンブロット法を用いた解析を行い、DPYSL3 結合候補蛋白の検証を行った。また、DPYSL3 を高発現する CFPAC1 細胞に特異的 siRNA を導入し、DPYSL3 結合蛋白群のリン酸化状態の変化について検討を行った。

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 については、これまで特異性が高く、パラフィン包埋の病理標本で染色可能な抗体が存在せず、その発現の詳細な免疫組織

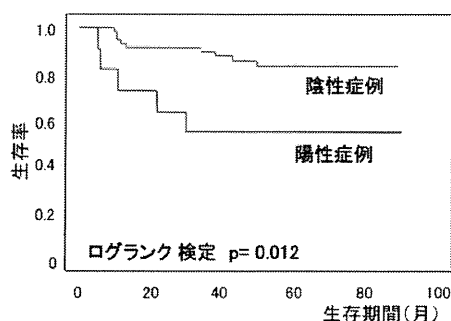
図1 ヒト膵臓がん組織における CLCP1 発現に関する免疫組織学的検討



左)陽性症例:細胞膜に沿って染色が見られる。右)陰性症例:細胞質が弱く染色されるが細胞膜は染色されない。

学的検討は成し得なかった。本研究においては、新たに作成された極めて有用性の高い CLCP1 の細胞外ドメインに対するモノクローナル抗体を用いて、膵臓がん患者腫瘍組織試料における発現を免疫組織化学的に検討した。膵臓がん患者 70 症例の腫瘍組織試料において、CLCP1 は細胞膜の陽性染色像を示し (図 1)、細胞膜染色陽性例は有意に不良な予後を示すことが明らかとなり (図 2)、CLCP1 高発現の膵臓がん症例における増悪・転移への関与が示唆された。

図2 Kaplan-Meier 解析が示す CLCP1 発現と不良な術後予後との有意な相関

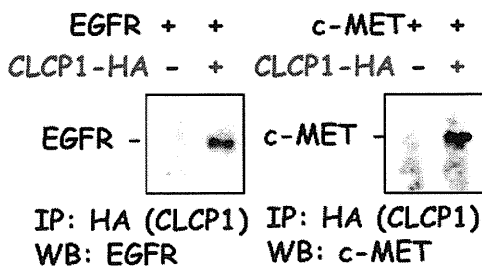


CLCP1は細胞膜貫通型分子であり、SEMA4B 受容体として機能すると考えられるが、細胞膜上でSEMA4B以外の分子と相互作用する可能性について検討を進めた。CLCP1は neuropilinに類似の構造を持つが、興味深いことに、neuropilinが44アミノ酸(全長の5%)の極く短い細胞内領域を持つのに対して、CLCP1は226アミノ酸(全長の30%)の長い細胞内領域を持つ。CLCP1の特徴的な機能やシグナル伝達経路を検討する上で、この細胞内領域は重要な役割を果たすと予想されるが、この細胞内領域は明瞭なドメイン構造を持たない。そこで、この領域内のモチーフを検討したところ、複数の予測プログラムで、EGFRを含むキナーゼによるリン酸化部位の存在が予想され、CLCP1が同様に細胞膜に局在する受容体型チロシンキナーゼ (RTK) であるEGFRと機能的な関わりを持つ

という興味深い可能性が示唆された。

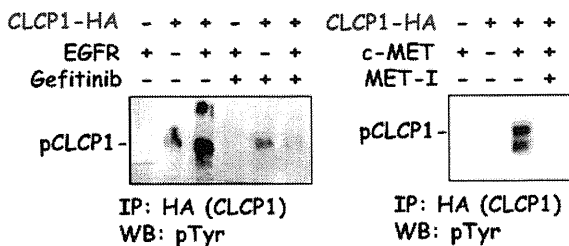
そこで、肺がんの病態に重要な役割を果たす RTK である EGFR 及び MET と、CLCP1 との機能的な関連性について検討を加えた。293T 細胞に導入した CLCP1 を免疫沈降し、EGFR 及び c-MET との結合について検討したところ、CLCP1 と RTK との共沈降が検出された (図 3)。

図 3 293T 細胞を用いた強制発現系における CLCP1 と RTK との結合



次に、CLCP1 がこれら RTK によってリン酸化されている可能性を、同様に 293T 細胞に各種発現ベクターを導入し CLCP1 を免疫沈降して、抗リン酸化チロシン抗体でウェスタンブロットして検討した。その結果、CLCP1 単独導入時に比して、EGFR、c-MET を共導入することによって CLCP1 のチロシンリン酸化が強く誘導された。逆に、EGFR 阻害剤 gefitinib や c-MET 阻害剤 SU11274 で処理すると、このリン酸化は強く抑制され (図 4)、CLCP1 のリン酸化が肺がんの発生・進展に深く関わる RTK によって制御されて

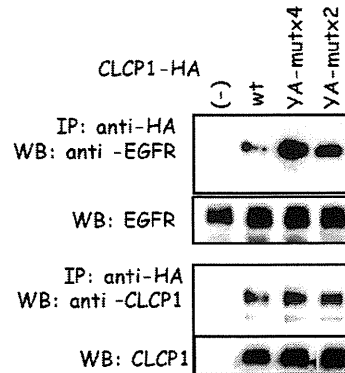
図 4 RTK 活性による CLCP1 リン酸化制御



いることが明らかとなった。

また、CLCP1 のチロシンリン酸化が、CLCP1 と EGFR との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 を免疫沈降して、EGFR との共沈降を検討した。その結果、CLCP1 と EGFR との結合は CLCP1 のリン酸化の阻害で増強されることが明らかとなり (図 5)、CLCP1 の機能が EGFR との結合を介

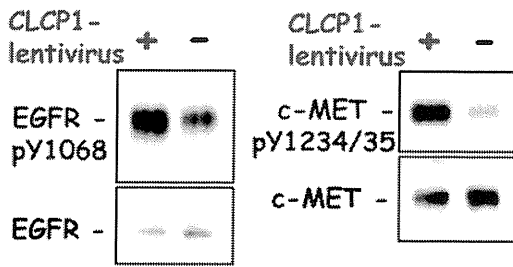
図 5 CLCP1 のリン酸化が EGFR との結合に及ぼす影響に関する検討



したチロシンリン酸化による制御を受けている可能性が示唆された。

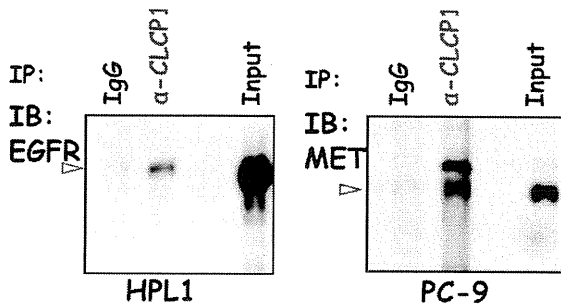
さらに、逆に CLCP1 が RTK の機能を制御する可能性についても検討した。LNM35 株及び N15 株にレンチウイルスにより CLCP1 を恒常的に発現させると、c-MET のリン酸化の亢進が見られた。この知見を更に他の肺がん細胞株でも確認すべく、EGFR 変異と c-MET 発現亢進があり、これらの RTK が活性化していると考えられる肺がん細胞株 PC-9 に、同様に CLCP1 を恒常的に発現させると、キナーゼ活性に関わる EGFR Y1068、c-MET Y1234/1235 のリン酸化が著明に亢進し、RTK の更なる活性化が誘導されていることが見出された (図 6)。

図6 CLCP1によるRTK活性制御



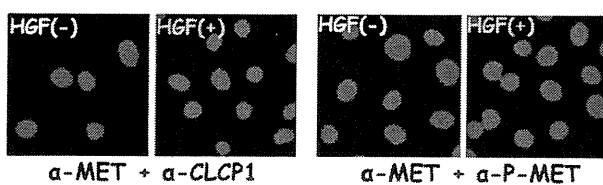
内因性のCLCP1とEGFR及びMETとの相互作用についても検討を加えた。免疫沈降-ウェスタンブロット法によって、EGFR及びMETがCLCP1と共沈降することが検出され、内因性のCLCP1-RTK相互作用が確認された(図7)。さらに、CLCP1-MET間の相互作用につ

図7 内因性のCLCP1とRTK(EGFR・MET)との間の相互作用に関する検討



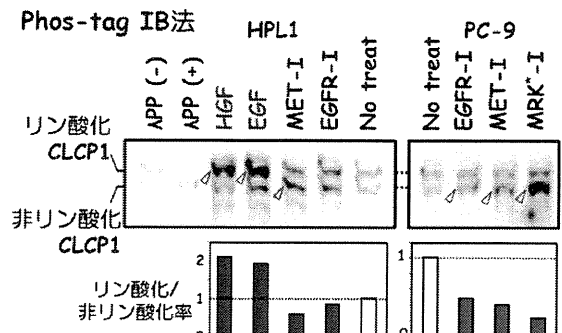
いてproximity ligation assay (PLA)法によっても検討した。アッセイの陽性コントロールとして、抗MET抗体と抗リン酸化MET抗体を用いた。次に抗CLCP1抗体と抗MET抗体でPLAシグナルを検討したところ、HGFの有無にかかわらずPLAシグナルが得られ、HGF非依存性の内因性CLCP1-MET結合が示された(図8)。

図8 PLA法によるCLCP1とMETとの間の相互作用に関する検討



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について検討を行った。HPL1株及びPC9株において、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ゲルでリン酸化CLCP1に対応するバンドの増強が見られ、RTKの活性化に伴い内因性CLCP1のリン酸化が亢進すること観察された。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)によって、CLCP1のリン酸化が低下することが

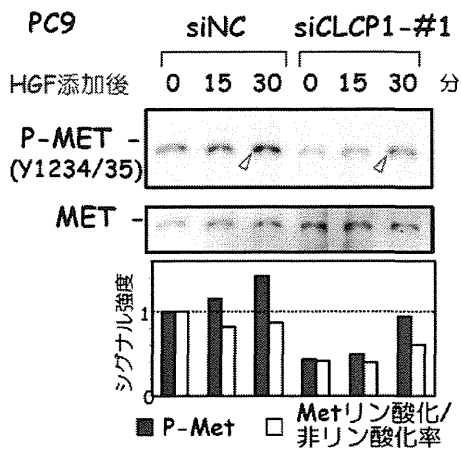
図9 RTK活性による内因性CLCP1のリン酸化の制御



明らかとなった(図9)。

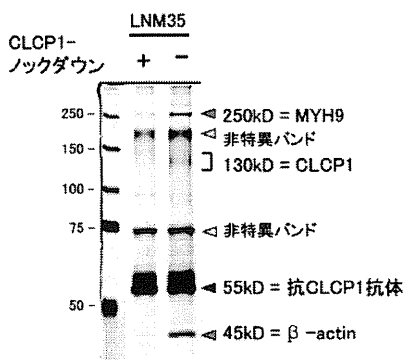
また、PC9株において、予めCLCP1をsiRNAによってノックダウンした後に、HGFで刺激すると、対照siRNAに比して、CLCP1-siRNAではMETの活性化を反映するリン酸化が抑制され、RTKの活性化にCLCP1が関与することが強く示唆された(図10)。これらの結果から、肺癌細胞株の細胞内において、内因性のCLCP1がRTKと機能的に相互作用していることが強く示唆された。

図 10 CLCP1 ノックダウンによって惹起される HGF による MET 活性化の抑制



CLCP1 が関与するシグナル伝達を網羅的に解明すべく、CLCP1 と相互作用する他の分子群の探索も行った。LNM35 株において CLCP1 をノックダウンし、抗 CLCP1 抗体による免疫沈降を行い SDS-PAGE にて分離し、CLCP1 の存在下で特異的に共沈降 250kD と 45kD のバンドを同定した(図 11)。

図 11 抗 CLCP1 抗体による免疫沈降産物の銀染色



免疫沈降物を SDS-PAGE 後に銀染色した。CLCP1 のノックダウンに伴い、CLCP1 自身の 130kD バンドと共に、250kD、45kD のバンドが著減している。Mass 解析によりこれらのバンドは MYH9 及び β -actin に由来すると判明した。

この 2 本のバンド 250kD と 45kD をゲル断片として切り出し質量分析を加えた結果、250kD の分子量を持つ分子は non-muscle myosin IIA (MYH9) であった。一方、45kD の分子量を持つ分子は β -actin であった。こ

れらの細胞骨格に関わる分子と CLCP1 が結合することを示す結果は、CLCP1 が細胞運動に重要な actomyosin 系との相互作用を介して、浸潤・転移能の付与に関わっている可能性を示唆する。

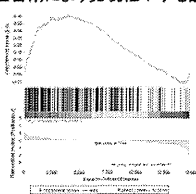
また、別の観点から CLCP1 が伝えるシグナルを理解することを目指し、CLCP1 発現レンチウイルスを LNM35 株及び低転移性親株 N15 株に導入して樹立した、CLCP1 安定過剰発現細胞株を用いて網羅的遺伝子発現解析とパスウェイ解析を組み合わせた検討を行った。Ingenuity Pathway Analysis (IPA) ソフトウェアを用いた解析の結果、BioFunction としては、cardiovascular disease, genetic disorder, cellular growth and proliferation, inflammatory disease, immunological disease, cellular development, cellular movement, tissue morphology, neurological disease 等との有意な関連が、また canonical pathway としては、axonal guidance signaling, human embryonic stem cell pluripotency, factors promoting cardiogenesis in vertebrates, basal cell carcinoma signaling, virus entry via endocytic pathways, leukocyte extravasation signaling, macropinocytosis signaling 等との有意な関連が描出された。これらのうち、とくに予後と有意な関連を示したパスウェイに含まれる遺伝子には、Wnt ファミリー、phospholipaseA2 及び COX2、cytochrome P450 ファミリー等が含まれていたが、CLCP1 遺伝子の導入が実際にこれらの遺伝子の発現に影響することを確認している。我々は、LNM35 株を樹立した後の初期の解析において COX2 の発現亢進を報告しているが、治療標的でもある COX2 と CLCP1 との機能的な関連が見出されたことは興味深い。

また、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 CLCP1 を導入した PC9 株を用いて検討を加えた。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で、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反映する結果としても興味深い。

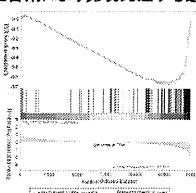
さらに、肺腺がん細胞株 NCI-H1975 株においても、CLCP1 野生型及びリン酸化部位変異体を導入し、GSEA 解析を行った結果、発現亢進する遺伝子群により、EGFR 阻害剤処理で発現低下する遺伝子セットが抽出され、一方発現低下する遺伝子群から、EGFR 阻害剤処理により発現亢進する遺伝子セットが抽出された (図 12)。また、CLCP1 リン酸化変異体を導入して、野生型 CLCP1 に比べてリン酸化変異体の方が強く発現誘導する遺伝子群を抽出し、GSEA 解析を施行した。その結果、EGFR 活性阻害により発現亢進する遺伝子セットが抽出された。以上の結果

図 12 GSEA 解析を通じて示唆された CLCP1 と EGFR との関連性

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



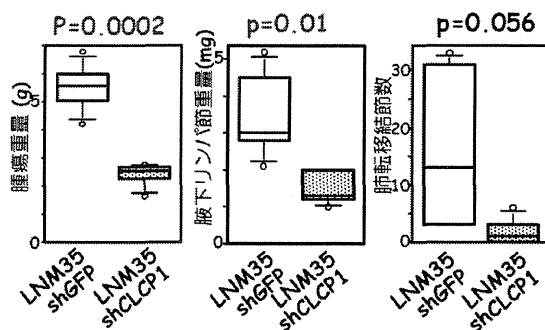
CLCP1 導入で発現低下する遺伝子群
= EGFR 阻害剤により発現亢進する遺伝子セット



は、野生型 CLCP1 は EGFR シグナルを正に制御しており、その制御は CLCP1 のリン酸化によって影響をうけることを示唆する。

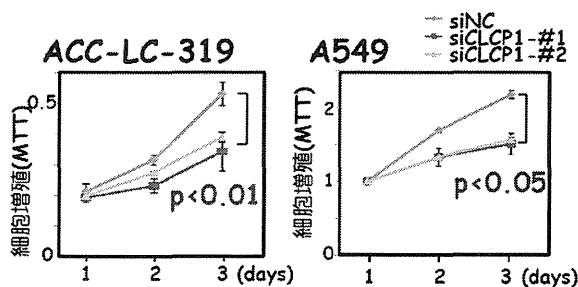
CLCP1 についてはこれまで浸潤能・転移能の付与に焦点を絞って検討を加えてきたが、本研究においては肺癌細胞の増殖に関わる可能性についても検討を加えた。その結果、CLCP1 のノックダウンは LNM35 株の遠隔転移能を抑制するとともに、腫瘍増殖も抑制させるという結果が得られた (図 13)。また、

図 13 CLCP1 ノックダウンによる LNM35 の腫瘍増殖能・転移能の制御



複数の他の肺がん細胞株においても CLCP1 のノックダウンが、有意な増殖抑制を引き起こすことも明らかとなった (図 14)。その分子機序の一つとして、内因性の CLCP1 と RTK との相互作用の破綻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。

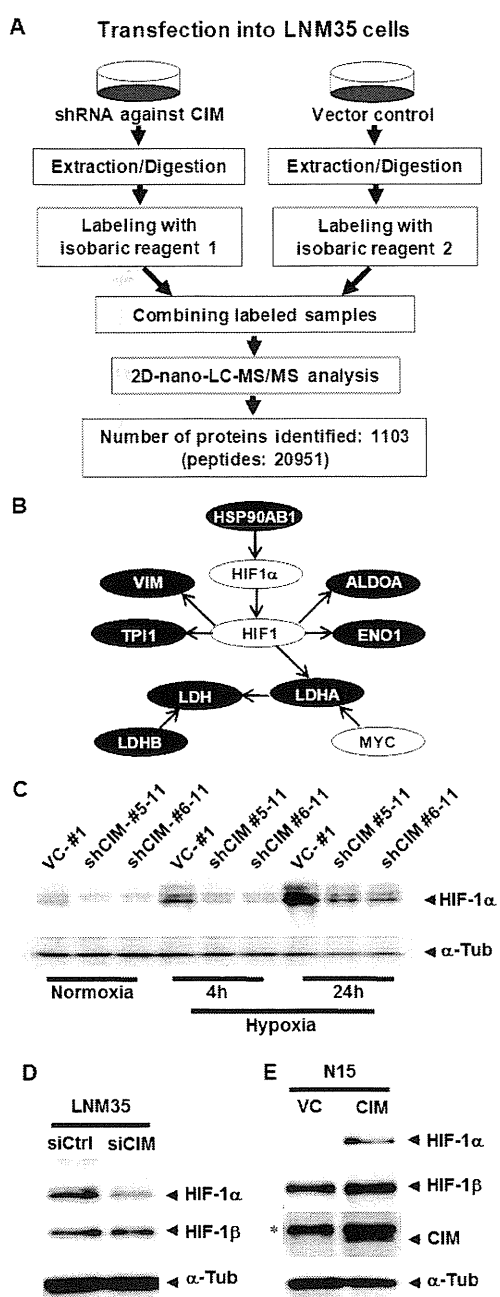
図 14 CLCP1 ノックダウンによる肺癌細胞株の増殖抑制



I-ii) CIM 及びそのシグナリング分子を標的とした検討:

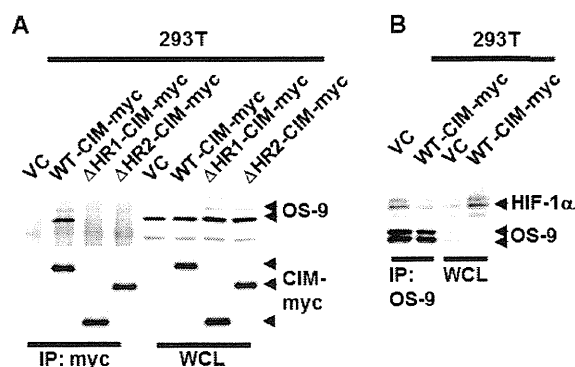
CIM遺伝子産物が担う機能を探索する目的で進めた網羅的タンパク質発現プロファイル解析 (図15-A) と、その結果に基づくパスウェイ解析の結果からは、CIMが、転移成立に関わる低酸素ストレス応答に重要なHIF-1 α の発現制御に関わることが明らかとなった (図15-B)。CIMをノック

図 15 CIMの標的としてのHIF-1 α の



ダウンするとHIF-1 α の発現量が減少し (図15-C、-D)、逆にCIM遺伝子の過剰発現するとHIF-1 α の発現量が増加した (図15-E)。CIMによるHIF-1 α 制御機序の解明を目指して、HIF-1 α を負に制御するOS-9との結合を検討したところ、両分子間の複合体形成が確認され (図16-A)、また、CIMの導入によってOS-9とHIF-1 α との複合体形成の低下が確認された (図16-B)。OS-9はPHD2とともにHIF-1 α と複合体を形成してプロリル化を促進し、HIF-1 α のユビキチン化とVHLによる分解を促進することが知られている。本研究を通じて、CIMがOS-9と結合し、その機能を抑制して、HIF-1 α 発現を正に制御することが強く示唆された。

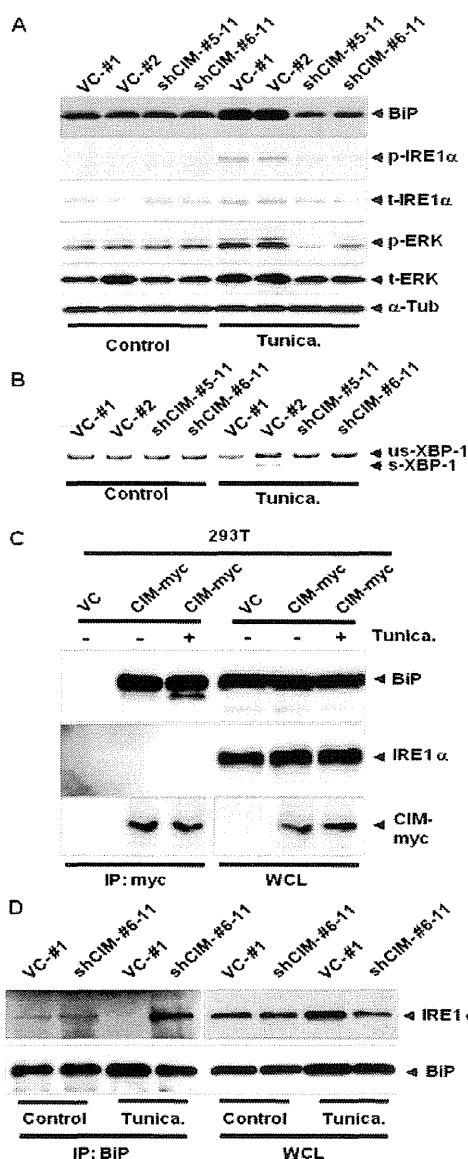
図 16 CIMとOS-9結合によるHIF-1 α 発現の制御



さらにCIMの分子機能の解明を目指し、CIMの発現の有無と関連するタンパク質発現プロファイルの変化について、gene ontology term解析を行った。その結果、CIMが小胞体ストレス応答シグナル伝達 (UPR, unfolded protein response) に重要な働きを担っている可能性が示唆された。UPRは、グルコース・アミノ酸供給量減少やpH変化など、細胞周囲微小環境からのストレスに応答して惹起される小胞体から核へのシグナル伝達経路であり、劣悪な微小環境下で細胞を保護する働きをも

つ。そこで、LNM35株においてを用いて、UPR関連分子群の発現変化を進めたところ、IRE1- α のリン酸化（IRE1- α の活性化）と、その下流シグナルの障害（XBP-1プロセッシング障害によるのs-XBP-1発現量の低下）が認められた（図17-A, -B）。

図 17 CIMによるUPR 応答の制御

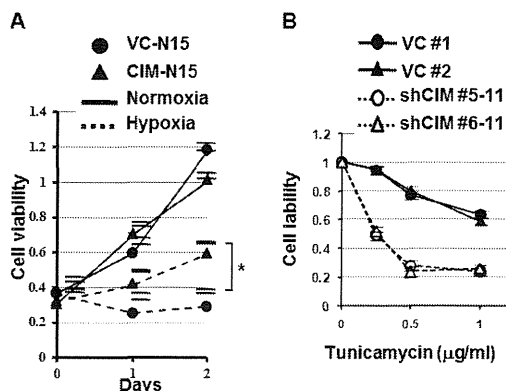


引き続き、その分子機構を明らかとすべく、UPRに関連する分子群とCIMとの相互作用に関する検討を行った。その結果、UPRのシグナル伝達制御において中心的な役割を担う分子シャペロンであるBiPとの相互作用が確認されるとともに（図17-C）、

この2分子間の結合が、UPRシグナル伝達の極めて重要なトリガーである、IRE1- α からのBiPの乖離を阻害することが明らかとなった（図17-D）。

これらの結果から、CIMが低酸素、小胞体ストレスなどの応答に深く関与することが示されたため、最後に、CIM発現調節による、低酸素、並びに小胞体ストレス誘導化合物であるツニカマイシンに対する感受性の変化に関する検討を行った。図18-Aに示すように、コントロール細胞と比較して、CIM発現N15株において有意に低酸素環境に対する耐性能が獲得される事が確認されるとともに、CIM発現抑制は小胞体ストレスに対する感受性亢進につながる事が確認された（図18-B）。

図 18 CIMによるストレス感受性の制御

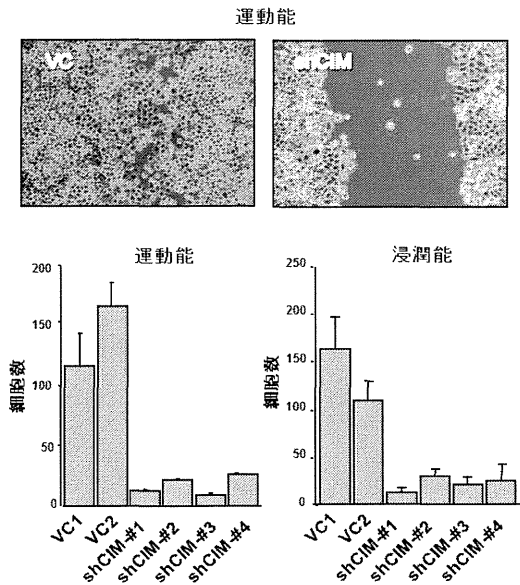


したがって、小胞体(ER)に局在する蛋白のCIMは、低酸素への応答に必須なHIF-1 α の分解を阻害し発現調節するとともに、グルコース・アミノ酸などの栄養供給の低下やpH変化などによって惹起される小胞体ストレス応答の調節にも関わっており、癌細胞の転移成立過程における不十分な微小環境への適応に寄与することで、癌転移能を賦与している可能性が示唆された。

上述の低酸素、小胞体ストレスなどに対する応答に関わる機能に加えて、CIMががん

細胞の運動・浸潤に関わることが示唆されていたが(図 19)、その分子機序は不明であった。

図 19 CIM の運動・浸潤への関与



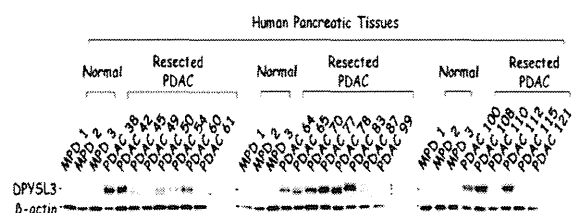
そこで、バキュロウィルス・Sf9 細胞を用いて、CIM 遺伝子産物を大量精製してアフィニティークラムを作成し、LNM35 株より抽出した蛋白試料中に存在する CIM 結合分子の精製を行った。質量分析器を用いた網羅的な蛋白発現解析によって、45 種類の CIM 結合候補分子を同定した。さらに、質量分析器を用いた MRM 解析によって検証を進めた結果、CIM と 4 つの候補分子との結合が確認された。これらの分子の発現と肺がん臨床病態との関連について、我々の 70 例の肺腺癌腫瘍組織のマイクロアレイ解析データセットを用いて検討したところ、4 種類の結合分子中の 2 分子 (CD2AP と SH3KBP1) において、高発現群が低発現群症例に比して有意に術後予後不良であることが明らかとなった。CD2AP 或いは SH3KBP1 との複合体形成に関わる領域を限定化すべく、CIM 分子内の N 末と C 末にそれぞれ 1 箇所ずつ存在する OS-9 分子と同一性を有するドメインの欠失変異体を作成し、免疫沈降法によって解析を加えた。その結果、CIM 上の OS-9 相同領域のうち、マンノース 6 リ

ン酸受容体と高い同一性を示す C 末側の相同領域が結合に関わることが明らかとなった。さらに、LNM35 株が示す高い運動能と浸潤能は、CD2AP と SH3KBP1 の siRNA を用いた発現抑制によっても有意に減弱することが明らかとなり、これらの分子との結合を介した制御が、CIM の転移能付与に寄与している可能性が示唆された。以上の検討により、細胞運動能制御を担う分子との結合に関わる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:

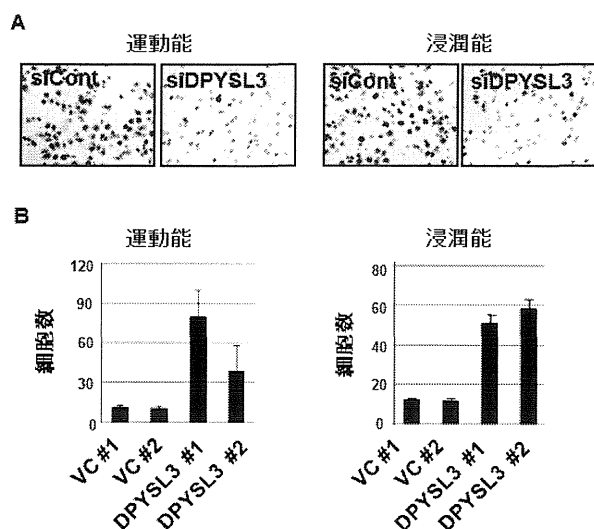
さらなる新規分子標的の探索・同定を目指して、LNM35 株という極めて有用なヒト肺がんの転移研究モデル系に対して、最新のプロテオミクス解析を適用して得たデータと、肺がんと同じく早期に転移を来し極めて予後不良な代表的難治がんである膵がん組織の網羅的蛋白発現解析データとの統合的解析を進めた。膵がん組織と正常主膵管で 2 倍以上の発現差を認め、且つ LNM35 株で高発現を認める蛋白として DPYSL3 (dihydropyrimidinase-like 3) を同定した。DPYSL3 の発現をウェスタンブロット解析によって検証したところ、正常主膵管組織と比較して、膵がん症例 22 検体中 16 検体 (72.7%) において DPYSL3 の高発現を認

図 20 手術摘出試料における DPYSL3 の発現の検討



めた (図 20)。また、DPYSL3 を高発現する LNM35 株において、siRNA による DPYSL3 の発現抑制は、運動能と浸潤能の両者を減弱させた (図 21-A)。一方、DPYSL3 低発現の膵がん細胞株 Panc-1 株に DPYSL3 を導入し安定発現細胞株を樹立し、細胞運動能、並びに浸潤能への影響を検討したところ、その顕著な亢進を認めた (図 21-B)。さらに、

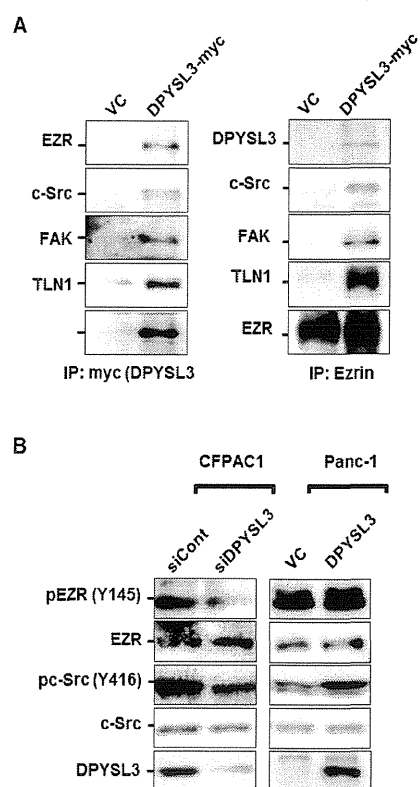
図 21 新規転移関連分子 DPYSL3 の機能解析



DPYSL3 を発現抑制した際の実験的肺転移能の変化について検討を行った。DPYSL3 高発現膵がん細胞株である CFPAC-1 細胞を用いて、*in vitro*で siRNA によって DPYSL をノックダウンした後に、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、顕著な肺転移の抑制が認められた。また、DPYSL3 を高発現する LNM35 株においても、同様に肺転移能の減弱を認め、DPYSL3 のがん細胞の転移能の制御への関与が示唆された。そこで、DPYSL3 の分子機能について示唆を得るべく、DPYSL3 固相化カラムと質量分析器を用いた結合蛋白の網羅的探索を行った結果、9 個の DPYSL3 結合蛋白候補分子を同定するに至った。さらに、MRM 解析を用いた検証解析を行った結果、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 つの分子について、DPYSL3 との結合が確認された。Ezrin は adhesion complex の構成分子として細胞接着性の制御に関わると共に、細胞内シグナル伝達においても重要な働きを担い、細胞運動性の制御にも深く関わっている。DPYSL3 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確認するとともに (図 22-A)、DPYSL3 の siRNA による発現抑制が、c-Src による Ezrin のリン酸化を減弱させるとともに、focal adhesion complex の形成不全と細胞接着性の減弱を惹起することが明らかとなった (図 22-B)。

図 22 DPYSL3 と EZR の結合の同定と DPYSL3 の担うシグナル伝達の検討



以上より、DPYSL3 は、がん細胞の運動・浸潤・転移に機能的に関与しており、その分子機序として、DPYSL3 の Ezrin との結合を通じた c-Src による Ezrin のリン酸化の促進と adhesion complex の安定化が重要であることが示唆された。

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得ることを目指して推進された。

抗 CLCP1 モノクローナル抗体を用いた詳細な免疫組織化学的解析により、CLCP1 蛋白の過剰発現は、極めて腫瘍特異性が高いこと、及び、肺癌患者における外科切除後の予後不良と相関することが明らかとなり、分子標的としての有用性の高さが、さらに裏打ちされた。また、CLCP1 が、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 (RTK) である EGFR 及び MET と機能的に相互作用を示し、CLCP1 と RTK の双方に起因するシグナル間で、密接なクロストークを示すことも明らかとなった。CLCP1 のシグナルに関わるパスウェイについての検討は、それらがヒト肺がん患者の術後再発や予後にも深く関連していることを示唆した。また、LNM35 以外の肺癌細胞株への 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、そのクロストークに対する CLCP1 のリン酸化修飾による制御の関わりを示唆する結果が得られた。このような研究成果は、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、上述の高い腫瘍特異性と相まって、CLCP1 の治療標的候補分子としての極めて高い有用性を示唆している。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、引き続き鋭意研究を展開中である。なお、我々はこれまでに

得てきた知見にもとづいて、分泌型 SEMA4B や分泌型 CLCP1 並びに、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おり、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。

CIM について、低酸素への応答、或いはグルコース・アミノ酸などの栄養供給の低下や pH 変化などによって惹起される小胞体ストレスの調節に関わり、癌細胞の転移成立過程における不十分な微小環境への適応に寄与することで、がん細胞に転移能を賦与していることを示すことができた。また、CIM によるがん細胞への運動能・浸潤能の賦与に関わる分子機序についても、プロテオミクス技術を応用した網羅的結合蛋白の探索・同定を通じて、重要な示唆を得ることができた。これらの CIM の分子機能に関わる結合分子は、いずれも OS-9 相同性領域、とくにマンノース 6 リン酸受領体との相同ドメインに結合することを明らかにできたので、今後のがん細胞の転移能阻害活性を持つ化合物の *in silico* スクリーニング法の確立につなげて行きたい。

本研究においては、CLCP1 と CIM に続く有望な分子標的となり得る新規転移関連分子の同定を並行して目指した。LNM35 株を用いたプロテオミクス解析データと、肺がん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 の関与を明らかとすることができた。同時に、50 種類余りの他の候補転移関連分子も同定しており、今後さらにこれらの分子についても、肺がん及び膵がんの転移・浸潤における機能の解明を進めて、これらの代表的難治がんに対する革新的な診断・治療法の開発基盤の確立につなげて行きたいと考えている。

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 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**, 135:308-318, 2014.
- 3 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.
- 4 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.
- 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 Discov**, 4: 415-22, 2014
- 6 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.
- 7 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.
- 8 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**, 32:3559-3568, 2013.
- 9 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.

- 10 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.
- 11 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.
- 12 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.
- 13 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.
- 14 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.
- 15 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.
- 16 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.
- 17 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.
- 18 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.
- 19 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.
- 20 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.
- 21 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.
- 22 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, 2012.
- 23 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.
- 24 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.
- 25 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.
- 26 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.
- 27 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.
- 28 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.
- 29 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.
- 30 Nishikawa E*, Osada H*, Okazaki Y, Arima C, Tomida S, Tatematsu Y, Taguchi A, Shimada Y, Yanagisawa K, Yatabe Y, Toyokuni S, Sekido Y, Takahashi T: miR-375 is activated by ASH1 and inhibits YAP1 in a

- lineage-dependent manner in lung cancer. **Cancer Res**, 71:6165-6173, 2011. (*equal contributors)
- 31 Matsuyama Y, Suzuki M, Arima C, Huang QM, Tomida S, Takeuchi T, Sugiyama R, Itoh Y, Yatabe Y, Goto H, Takahashi T: Proteasomal non-catalytic subunit PSMD2 as a potential therapeutic target in association with various clinicopathologic features in lung adenocarcinomas. **Mol Carcinogenesis**, 50: 301-309, 2011.
- 32 Shimamura T, Imoto S, Shimada Y, Hosono Y, Niida A, Nagasaki M, Yamaguchi R, Takahashi T, Miyano S: A novel network profiling analysis reveals system changes in epithelial-mesenchymal transition. **PLoS ONE**, 6: e20804, 2011
- 33 Osada H, Takahashi T: let-7 and miR-17-92: small-sized major players in lung cancer development. **Cancer Sci**, 102: 9-17, 2011.
- 34 Murakami H, Mizuno T, Taniguchi T, Fujii M, Ishiguro F, Fukui T, Akatsuka S, Horio Y, Hida T, Kondo Y, Toyokuni S, Osada H, Sekido Y: LATS2 is a tumor suppressor gene of malignant mesothelioma. **Cancer Res**, 71: 873-883, 2011.
- 35 Sides M, Klingsberg RC, Shan B, Gordon KA, Nguyen HT, Lin Z, Takahashi T, Flemington EK, Lasky JA: The Epstein-Barr virus LMP 1 and TGF- β 1 synergistically induce EMT in lung epithelial cells. **Am J Resp Cell Mol Biol**, 44:852-862, 2011.
- 36 Mulder JE, Brien JF, Racz WJ, Takahashi T, Massey T: Mechanisms of amiodarone and desethylamiodarone cytotoxicity in non-transformed human peripheral lung epithelial cells. **J Pharmacol Exp Ther** 336:551-559, 2011.
- 37 Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger KR, Yatabe Y, Beer DG, Powell CA, Eiely GJ, Van Schil PE, Garg, K, Austin JHM, Asamura H, Rusch, VW, Hirsch FR, Scagliotti G, Mitsudomi T, Huber RM, Ishikawa Y, Jett, J, Sanchez-Cespedes, M, Sculier, JP, Takahashi T, Tsuboi, M, Vansteenkiste J, Wistuba I, Yang, P-C, Aberle D, Brambilla C, Flieder D, Franklin W, Johnson B, Johnson D, Kerr K, Kuriyama K, Lee JS, Miller VA, pertersen I, Roggli V, Rosell R, Saijo N, Thunnissen E, Tsao M, Yankelewitz D: International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Classification of lung adenocarcinoma. **J Thorac Oncol**, 6: 244-285, 2011.
- 38 Suda K, Tomizawa K, Fujii M, Murakami H, Osada H, Maehara Y, Yatabe Y, Sekido Y, Mitsudomi T: Epithelial to mesenchymal transition in an EGFR-mutant lung cancer cell line with acquired resistance to erlotinib. **J Thorac Oncol**, 6: 1152-1161, 2011.
- 39 Yanagisawa K, Konishi H, Arima C, Tomida S, Takeuchi T, Shimada Y, Yatabe Y, Mitsudomi T, Osada H, Takahashi T: Novel metastasis-related gene CIM functions in the regulation of multiple cellular stress response pathways. **Cancer Res**. 70:9949-58, 2010.
- 40 Huang QA, Tomida S, Masuda Y, Arima C, Cao K, Kishihara T, Osada H, Yatabe Y, Kamiya K, Takahashi T, Suzuki, M: Regulation of DNA polymerase POLD4 influences genomic instability in lung cancer. **Cancer Res**. 70:8407-8416, 2010.
- 41 Tanaka S, Cao K, Niimi A, Limsirichaikul S,