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・分担）研究報告書

細胞接着・運動性経路を標的とした ATL 細胞の浸潤、増殖抑制医薬品開発のための基礎研究

研究代表者　村上　善則　東京大学教授

研究要旨

ATL で高発現する細胞接着分子 TSLC1/CADM1 に注目し、CADM1 の機能阻害による ATL 細胞の浸潤、増殖抑制医薬品の開発を目指す基礎研究を行った。本年度は、PI3K が CADM1 下流で機能する知見に基づき、ATL 細胞の増殖が PI3K 阻害剤により抑制されることを見出した。また、ATL 細胞での CADM1 の N-型、O-型糖鎖構造を解析し、CADM1 機能を阻害する単クローン抗体の作成を進めた。さらに、ATL 細胞にレンチウイルスを用いて CADM1shRNA を導入する実験系を確立した。

A. 研究目的

ATL で異所性発現を示す細胞接着分子 TSLC1/CADM1 に注目し、ATL の特異的分子経路の異常の同定と、これを標的として ATL の浸潤、増殖能を抑制する新規治療法の開発を目的とし、1) ATL における CADM1 経路の解明と新規分子標的の同定、2) CADM1 経路を阻害し ATL の浸潤能を抑制する低分子化合物の同定と評価、3) CADM1, Tiam1 等の発現を抑制する miRNA の同定と核酸医薬としての評価、の３課題を行う。

B. 研究方法

1. CADM1 経路の阻害による ATL 細胞の浸潤、増殖抑制低分子化合物の解析：

前年度までに開発した、固相化 CADM1 細胞外ドメインに CADM1 発現 MDCK 細胞、または ATL 細胞を重層し、細胞接着、細胞伸長を指標とする検定法を用いて、既知の低分子阻害化合物の CADM1 経路阻害効果の阻害の有無を検討した。

2. ATL で発現する CADM1 の N, O-糖鎖修飾の実態解明：

CADM1 に特徴的な糖鎖構造は、CADM1 を過剰発現する ATL 細胞の抽出物から抗体を用いた免疫沈降により濃縮した CADM1 タンパク質、または免疫グロブリン Fc ドメインと融合させ分泌型に改変した CADM1 細胞外ドメインを当該細胞に発現させ、培養上清をカラムにて精製したタンパク質を用いて行った。即ち、タンパク質をトリプシンで消化し、島津製作所と共

同研究により、質量分析法により構造を決定した。

3. CADM1 に対する中和抗体の作成:

CADM1 の細胞外ドメインに対する高親和性抗体を、遺伝子改変マウスに免疫して、単クローン抗体を作成した。CADM1 を介した細胞接着、細胞伸長活性を中和する活性をもつ抗体は作成後に選択する方針とした。

4. CADM1 経路分子の発現を抑制する RNA の核酸医薬としての評価：

CADM1 の発現を抑制する shRNA、並びに GFP をレンチウイルスにクローニングした。shRNA は２種類の別個の塩基配列を用いて２種類作成した。レンチウイルスに細胞への感染効率は、GFP 陽性細胞の肉眼的観察、GFP を測定する FACS 解析により評価した。

C. 研究結果

1. CADM1 経路の阻害による ATL 細胞の浸潤、増殖抑制低分子化合物の解析：

固相化 CADM1 細胞外断片上に、CADM1 発現 MDCK 細胞を重層し、その伸長性を指標として CADM1 経路の活性を評価し、この系に低分子化合物を添加することにより、細胞の接着活性、伸長活性の阻害の有無を検討した。この結果、前年度までに２種の PI3K 阻害剤（２種）、AKT 阻害剤。RAC1 阻害剤の添加により、CADM1 経路の活性化による細胞接着、細胞伸長が抑制されることが示された。また、本年度は MDCK 細胞ではなく数種の ATL 細胞をこの細胞接着・伸長アッセイに加えて同様の検討を行い、PI3K 阻害剤に細胞接着抑制活性があることを確認した。そこで本年度は、PI3K 阻害剤である LY290004, Wortmannin を ATL 細胞を含む様々ながん細胞に添加して、その効果を検討した。その結果、ATL 細胞である ATN1、HTLV-1 感染 T 細胞である MT2 では、他のがん細胞と比較して強い感受性を示し、10-100 uM の濃度で増殖が強く抑制された。また、他のがん細胞との比較では、CADM1 の発現量が最も高い Caco-2 細胞が最も PI3K 阻害剤に対する感受性が高く、一方、CADM1 を発現しない SBC5 細胞では最も感受性が低かった。

次に、ATL 症例における PI3K のアルファー (PI3KCA)、ベータ (PI3KCB)、ガンマ (PI3KCG)、デルタ (PI3KCD) の４種の触媒サブユニット、並びに制御サブユニット (PI3KR) の発現を検討した。この結果、PI3KG の発現は ATL では全く認められなかった。一方、PI3KCA, PI3KR は正常リンパ球と比較して、ATL 細胞で高発現する傾向が示された。

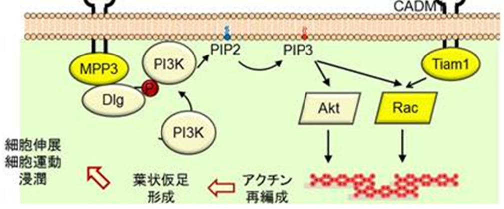

図１．CADM1 と PI3K を含む分子経路

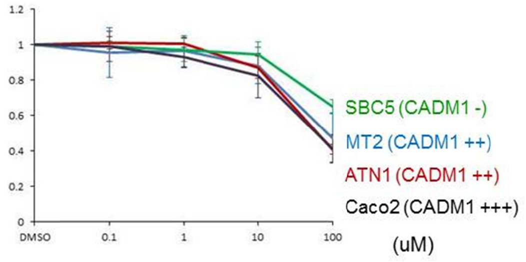

図２．ATL 細胞等の PI3K 阻害剤による増殖抑制

2. ATL 細胞で発現する CADM1 の N, O-糖鎖修飾の実態解明：

前年度まで解析により、ヒト胎児腎由来 HEK293 細胞に発現させた分泌型 CADM1 タンパク質では、N-型糖鎖として４分岐構造をもつ糖鎖が主な構成要素であることを見出した。今年度は、培養 ATL 細胞の抽出物の免疫沈降物に含まれる CADM1 タンパク質について質量分析を行い、ATL 細胞では、上記４分岐構造の N-型糖鎖は主たる成分ではなく、別個の N-型糖鎖構造を特徴的に認めた。一方、O-型糖鎖の解析では、CADM1 のエクソン８に相当するスレオニンに富む領域の O-型糖鎖の構造を、質量分析によって解析した。その結果、ATL で発現する CADM1 の O 型糖鎖のコア構造を決定するとともに、各スレオニン残基を修飾する O 型糖鎖の繰り返し構造は大きくないことが明らかになった。

3. CADM1 に対する中和抗体の作成:

CADM1 の細胞外ドメインに対する高親和性抗体の作成を目指した。前者を作成する目的では、CADM1 細胞外ドメインを免疫グロブリン Fc 断片と融合させたプラスミドを HEK293 細胞の導入、発現させ、培養上清に分泌、精製した抗原を、*Cadm1* 遺伝子欠損マウスに免疫し、ハイブリドーマを作成した。期間内に中和活性を示す高特異性抗体、高親和性抗体を得ることはできなかったが、現在順調に作成中である。

4. CADM1 経路分子の発現を抑制する RNA の同定と核酸医薬としての評価：

CADM1 の発現を強く抑制する siRNA, shRNA を２種ずつ同定した。予備的に ATL 細胞に CADM1 siRNA を導入したところ、ATL 細胞の繊維芽細胞への接着能や細胞伸展能が強く抑制された。次にこれら shRNA を U6 発現カセットとしてレンチウイルスベクターに組み込み、shCADM1、GFP を発現するレンチウイルスを作成した。これを種々の ATL 細胞に導入し、CADM1 の発現の低下した細胞群を得た。CADM1 の発現低下は FACS にて確認した。

D. 考察

ATL で特異的に発現し、細胞浸潤を促進する免疫グロブリン・スーパーファミリー細胞接着分子 CADM1 を標的として、ATL の新規治療薬を開発する目的で、1. 下流分子経路を阻害する低分子化合物、2. 中和抗体、3. CADM1 の発現を抑制する shRNA, miRNA を同定し、実用化につなげる基礎研究を行った。固相化 CADM1 上に CADM1 発現細胞を重層する細胞アッセイは、細胞の接着や伸展を半定量化して示すことが可

能であり、貴重な手法である。

本研究ではこのアッセイを用いて、CADM1の下流にPI3Kが作用することを見出し、前年度までの研究により、CADM1 – MPP3 – DLG – PI3Kp85 – AKT or RAC1 の分子経路を見出した。ATL ではCADM1が特異的に高発現を示すが、MPP3 も正常 T 細胞と比較して顕著に発現が増加する 20 個の遺伝子の中に入っており、この経路がATL 細胞でも機能していることが示唆される。本年度の実験で、PI3K 阻害剤として LY290004, Wortmannin を ATL 細胞 ATN1 や、CADM1を高発現する HTLV-1 感染細胞 MT2、その他種々の腫瘍細胞に添加したところ、ATN1, MT2 では 10-100 uM の濃度で強い増殖抑制が認められ、他の腫瘍細胞と比較して、PI3K 阻害剤に対する感受性が高いと判断された。また、11 種の腫瘍細胞の中で、PI3K 阻害剤に対して最も感受性の高いのは CADM1 を最も高発現する Caco-2 細胞であり、最も抵抗性を示したのは CADM1の発現を欠如した SBC5 細胞であったことから、PI3K 阻害剤の感受性が、少なくとも一部は CADM1 の発現量と相関する可能性が示唆された。最近 PI3K 阻害剤は、4 種類の PI3K 触媒サブユニットであるPI3KCA, PI3KCB, PI3KCD, PI3KCG に各々特異的な阻害作用を示す薬剤が開発されて再評価され、臨床応用が進んでいる。ATL では結果の項で示したように、PI3KCA の発現が、正常 T 細胞と比較して増加する傾向を示し、一方で PI3KCG の発現は全く認められなかった。今後は、CADM1 の下流で機能するサブユニット特異的な PI3K の解析と、各個別阻害剤の効果を検証する必要がある。

本研究では第２の目的として、CADM1を標的とする診断、治療薬の開発のための基礎研究を掲げた。まず、CADM1 が N-型、O-型糖鎖修飾を受ける膜タンパク質であること、糖鎖修飾に組織、癌種に依存してある程度の特徴的修飾が認められ得ること、組織特異的なスプライシング・バリアントが O-型糖鎖修飾付加部位であるエクソン８の領域に認められることなどから、まず糖鎖構造の解析を質量分析により行った。前年度までの基礎的検討を受けて、今年度は、実際の ATL 細胞の N-型、O-型糖鎖構造を解析し、N-型糖鎖としては、上皮と異なる糖鎖修飾を特徴的に認めた。一方、O-型糖鎖については、ATL で発現する CADM1 の O 型糖鎖のコア構造を決定するとともに、抗体作成に関してより重要な事実として、各スレオニン残基を修飾する O 型糖鎖の繰り返し構造が大きくないことを明らかにした。このことから、エクソン８に相当する断片のペプチド配列は、抗原性を保持している可能性が高いことが示唆された。

そこで、次に ATL に発現する CADM1 に特異性の高い単クローン性抗体の作成を試みた。抗 CADM1 抗体を用いた FACS による ATL 細胞の血液での診断法は、分担研究者の内丸が示したように、ほぼ実用化している。ここでは ATL の治療を目指して、中和抗体の作成を、CADM1 細胞外ドメイ

ン全体を抗原とする方法を採用した。CADM1 分子は種間の相同性が高く、これまでにウサギでは有効な抗体が作成できず、現在使われている単クローン抗体はトリで作成したものである。本研究では、前年度までに *Cadm1* の遺伝子欠損マウスを、C57BL6 の系統から Balb/c の系統に２年をかけて１０回戻し交配を行い、Balb/c の *Cadm1* 遺伝子欠損マウスを作成してきた。*Cadm1* 遺伝子欠損マウスは内在性の CADM1 タンパク質を発現しないことから、CADM1 タンパク質を生体の異物と認識するはずである。そこで、CADM1 細胞外ドメインに免疫グロブリン Fc 断片を融合したタンパク質を HEK293 細胞に導入、発現、分泌させて、培養上清から CADM1 v8-Fc を精製して抗原とし、*Cadm1* 遺伝子欠損マウスを免疫した。現在、ハイブリドーマを作成中であり、CADM1 に対する親和性、中和活性の高い抗体を選別する予定である。

　第３のプロジェクトは核酸医薬を用いて、ATL 細胞の CADM1 の発現を抑制し、細胞接着能、細胞伸長能の抑制を in vitro の活性、ヌードマウスでの腫瘍形成能、転移能を in vivo の活性として評価する研究である。前年度までに CADM1, Tiam1 の発現を抑制する siRNA を各々２種同定し、これをトランスフェクションにて ATL 細胞 ATL-3I に導入することにより、in vitro でのヒト正常繊維芽細胞上に重層させた細胞の接着性、細胞伸展性が顕著に抑制されることを示してきた。しかし、ATL-3I 細胞はマウスでの腫瘍原生が強くなく、ヌードマウスには腫瘍を形成せず、SKID マウスでもほとんど腫瘍を形成しないことから、in vivo の実験は、より適合する細胞系の樹立が必要である。本年度は、CADM1 shRNA を発現するレンチウイルスを作成した。細胞への導入の指標として、GFP 発現カセットも同じレンチウイルスに組み込ませた。これを ATL 細胞に導入し一過性の GFP 発現、並びに CADM1 発現を FACS を用いて解析したところ、GFP を発現し、かつ CADM1 の発現が顕著に低下した一群の細胞を分離することができた。今後、これらの細胞の接着性、伸長性、SKID マウスでの腫瘍原性や転移性を評価する予定である。

E．結論

ATL の浸潤抑制の標的分子として CADM1 下流で機能する PI3K を同定し、Pi3K 阻害剤が ATL 細胞の増殖を抑制することを示した。また CADM1 に特徴的な糖鎖構造を見出し、CADM1 の中和抗体の作成を試みた。さらに CADM1 の発現を抑制する shRNA を組み込んだレンチウイルスを作成し、ATL 細胞に導入可能であることを示した。

F．健康危険情報

特になし。

G．研究発表

１．論文発表

1. Ebihara Y, Iwai M, Akashi K, Ito T, Omura G, Saito Y, Yoshida M, Ando M,

Asakage T, Yamasoba T, Murakami Y. High incidence of null-type mutations of the TP53 gene in Japanese patients with head and neck squamous cell carcinoma. ***Journal of Cancer Therapy***, in press.

2. Wang F, Akashi K, Murakami Y, Inoue Y, Furuta T, Yamada H, Ohtomo K, Kiryu S. Detection of lung tumors in mice using a 1-Tesla compact magnetic resonance imaging system. ***PLoS One***, in press.
3. Ibrahim R, Matsubara D, Osman W, Morikawa T, Goto A, Morita S, Ishikawa S, Aburatani H, Takai D, Nakajima J, Fukayama M, Niki T, Murakami Y. Expression of PRMT5 in lung adenocarcinoma and its significance in epithelial-mesenchymal transition. ***Human Pathology***, in press.
4. Cortez VS, Cervantes-Barragan L, Song C, Gilfillan S, McDonald KG, Edelson BT, Murakami Y, Newberry RD, Sibley LD, Colonna M. CRTAM controls residency of gut CD4+CD8+T cells in the steady state and maintenance of gut CD4 TH17 during parasitic infection. ***J Exp. Med.***, in press.
5. Mimae T, Hagiyama M, Inoue T, Yoneshige A, Kato T, Okada M, Murakami Y, Ito A. Increased ectodomain shedding of lung-epithelial cell adhesion molecule 1 as a cause of increased alveolar cell apoptosis in emphysema. ***Thorax***, in press.
6. Murakami S, Sakurai-Yageta M, Maruyama T, Murakami Y. Intercellular adhesion of CADM1 activates PI3K by forming a complex with MAGuK-family proteins MPP3 and Dlg. ***PLoS One***, 9:e82894, 2014. (doi: 10.1371/journal.pone.0082894.)
7. Ito A, Ichiyanagi N, Ikeda Y, Hagiyama M, Inoue T, Kimura KB, Sakurai MA, Hamaguchi K, Murakami Y. Adhesion molecule CADM1 contributes to gap junctional communication among pancreatic islet α-cells and prevents their excessive secretion of glucagon. ***Islets***, in press.
8. Matsubara D, Kishaba Y, Ishikawa S, Sakatani T, Oguni S, Tamura T, Hoshino H, Sugiyama Y, Endo S, Murakami Y, Aburatani H, Fukayama M and Niki T. Lung cancer with loss of BRG1/BRM, shows epithelial mesenchymal transition phenotype and distinct histologic and genetic features. ***Cancer Sci***, 104: 266-273, 2013. (DOI: 10.1111/cas.12065)
9. Murakami Y, Yamamoto M. International collaboration to control cholangiocarcinoma. ***J Hepato-Biliary and Pancreatic Science,*** in press.
10. Ito T, Sakurai M, Goto A, Pairojkul C, Yongvanit P, Murakami Y. Genomic and

transcriptional alterations of cholangiocarcinoma. ***J Hepato-Biliary and Pancreatic Science,*** in press.

２．２．学会発表

1. Kogai H, Sakurai-Yageta M, Delloye-Bourgeois C, Tauszig-Delamasure S, Mehlen P, Murakami Y. A cell adhesion molecule, CADM1, as a new type of dependence receptor. The 5th Dependence Receptor Meeting. Les Menuires, France, Jan. 16, 2013.
2. Murakami Y. Genomic and transcriptional alterations of cholangiocarcinoma. LFCRC Forum at Khon Kaen Univesity. Khon Kaen, Thailand, Dec. 1, 2013.
3. 村上善則、斎藤光江、江見充。Copy Number Variation (CNV)の網羅的検索による癌のゲノム異常の解析。第 58 回日本人類遺伝学会年会、シンポジウム、仙台市、2013 年 11 月 20 日。
4. Ito T, Sakurai M, Matsubara D, Murakami Y. Dual roles of a cell adhesion molecule, CADM1, in human oncogenesis. Pathogenesis, Gene Regulation and Signal Transduction. The 9th China-Japan Joint Laboratory Workshop. Beijing, China, Nov. 1, 2013.
5. 小粥浩之、桜井美佳、村上善則。CADM1 は新しいタイプの dependence receptor として、がん細胞の転移を抑制する。第 72 回日本癌学会総会、横浜市、2013 年 10 月 5 日。
6. Murakami Y. Roles of a cell adhesion molecule CADM1 in epithelial integrity, invasion and metastasis. Symposium 9 “Research on Tumor Invasion and Metastasis toward Clinical Application. The 72th Annual Meeting of Japanese Cancer Association. Yokohama, Oct. 4, 2013.
7. 平郁、高橋由佳、齊藤光江、金谷淳志、明石健、伊東剛、村上 善則。乳がんにおけるコピー数多型(CNV)異常の解析。第 72 回日本癌学会学術総会、2013 年、横浜、10 月 4 日。
8. Ibrahim RA, Matsubara D, Osman W, Morikawa T, Morita S, Ishikawa S, Aburatani H, Fukayama M, Niki T, Murakami Y.. Expression of PRMT5 in lung adenocarcinoma: correlation with pathological features and prognosis. 第 72 回日本癌学会総会、横浜市、2013 年 10 月 4 日。
9. 許淑真、桜井美佳、坪井裕見、村上善則。細胞接着分子 CADM1 による EGF 受容体の分解制御機構の解明。第 72 回日本癌学会総会、横浜市、2013 年 10 月 3 日。
10. 坪井裕見、尾山大明、秦裕子、伊藤彰彦、村上善則。がん抑制遺伝子 CADM1 による Cbp を介した Src 経路抑制機構の解明。第 72 回日本癌学会総会、横浜市、2013 年 10 月 3 日。

11. 花岡有紀、坪井裕見、松原大祐、村上善則。潰瘍性大腸炎の上皮再生機構における細胞接着分子 CADM1 の意義の解明。第 72 回日本癌学会総会、横浜市、2013 年 10 月 3 日。
12. 平郁、高橋由佳、齋藤光江、金谷淳志、明石健、伊東剛、村上善則。High incidence of copy number alterations in breast cancer.第 11 回日本臨床腫瘍学会学術集会、仙台市、2013 年 8 月 30 日。
13. 平郁、高橋由佳、齊藤光江、村上善則。乳癌における DNA コピー数多型の解析。第 21 回乳癌学会総会，浜松市，2013 年 6 月 27-29 日。
14. Sakurai-Yageta M, Maruyama T, Kaneshiro K, Sekiya S, Iwamoto S, Tanaka K, Murakami Y. MALDI MS analysis of N-glycan structures of a cell adhesion molecule, CADM1, in various cancer cells. Annual Meeting of the American Society of Mass Spectrometry. June 9-13, 2013, Minneapolis, MN, USA.
15. 花岡有紀、松原大祐、村上善則。潰瘍性大腸炎における細胞接着分子 CADM1 による上皮再生機構の解明。第 102 回日本病理学会総会、仙台市、2013 年 4 月 29 日。

H. 知的財産権の出願・登録状況
（予定を含む。）

1. 特許取得：なし

2. 実用新案登録：なし

3. その他：なし