

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 革新的がん医療実用化研究事業
(英語) Practical research for innovative cancer control
- 研究開発課題名： (日本語) クリニカルプロテオミクス解析を基盤とする肺がんの分子病態の解明と革新的分子標的治療の開発
(英語) Clinical proteomics-based elucidation of molecular pathogenesis of lung cancer and development of novel molecular therapeutics
- 研究開発担当者 (日本語) 医学系研究科分子腫瘍学分野 教授 高橋隆
所属 役職 氏名： (英語) Takashi Takahashi, Professor, Division of Molecular Carcinogenesis, Graduate School of Medicine
- 実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日
- 分担研究 (日本語) プロテオミクス解析による新規候補分子標的の探索・同定と機能解明
開発課題名： (英語) Proteomics-based search for novel molecular targets and mechanistic investigation
- 研究開発分担者 (日本語) 名古屋大学大学院医学系研究科 講師 柳澤 聖
所属 役職 氏名： (英語) Kiyoshi Yanagisawa, Associate Professor, Division of Molecular Carcinogenesis, Graduate School of Medicine
- 分担研究 (日本語) CLCP1 の機能解明と新規治療法の開発
開発課題名： (英語) Functional analysis of CLCP1 and development of novel therapeutic means
- 研究開発分担者 (日本語) 愛知県がんセンター 研究所 室長 長田啓隆
所属 役職 氏名： (英語) Hirotaka Osada, Section Chief, Division of Molecular Oncology, Aichi Cancer Center Research Institute

II. 成果の概要（総括研究報告）

本研究開発課題において、我々は、詳細な臨床情報が付帯する肺がん腫瘍組織を対象としたクリニカルプロテオミクス解析データを基盤としたリバーストランスクリプションを目指して、肺がん腫瘍組織の解析から得た網羅的な蛋白質発現情報と臨床病態との関連性と、我々が樹立した高転移性ヒト非小細胞肺がん亜株 LNM35 株と低転移性親株 N15 株を用いた網羅的な蛋白質発現情報を、統合的に解析して新規分子標的候補の探索・同定を進めた。173 例の非小細胞肺がん患者において臨床病態と有意な関連性を示す 514 種類の蛋白質と、LNM35 株と N15 株間に 2 倍以上の発現差を認める 385 種類の蛋白質に共通する 18 種類の蛋白質を同定した。新規性や機能面からとくに興味深い 5 種類を選択し、各遺伝子の発現を抑制した際の肺がん細胞株の運動・浸潤、細胞増殖等に与える影響を検討し、機能的な関与が強く示唆される 3 個の遺伝子を同定した。さらに、その一つについて詳細な分子細胞生物学的及び生化学的な機能解析を加えて、分子標的治療の研究開発に資する基盤的な情報を得た。

また、我々がこれまでに同定した肺がんの転移関連分子 CLCP1 を標的とする、革新的分子標的治療法の研究開発に資する基盤情報を得るための研究開発を並行して進めた。CLCP1 の高発現は、肺がん患者における外科切除後の予後不良と有意に関連していた。高転移性 LNM35 株で CLCP1 を shRNA によって発現抑制すると、免疫不全マウス皮下移植腫瘍の増殖と転移が抑制された。裏打ちする分子機序の解明を進めて、CLCP1 と EGFR 等の受容体型チロシンキナーゼ (RTK) との相互作用を見出した。そこで、CLCP1 上のリン酸化候補部位の変異体を作成し、EGFR 変異陽性・阻害剤感受性の肺がん細胞株に導入したところ、有意な増殖抑制が観察された。また、遺伝子発現プロファイルを取得して gene set enrichment analysis (GSEA) 法によって検討し、CLCP1 変異体の導入による発現プロファイルの変化は、EGFR 阻害剤によって EGFR シグナルを抑制した際に変動する遺伝子セットと有意な関連性を示すことを明らかとした。一方、CLCP1 遺伝子を CRISPR/Cas9 システムを用いてノックアウトした肺がん細胞株を作成して行った検討においては、MET の自己リン酸化の著減と、HGF 添加に対する反応性の減弱の惹起を見出した。これらの研究成果によって、CLCP1 上のリン酸化部位の機能的な重要性とともに、CLCP1 と EGFR や MET 等の RTK との間に機能的なクロストークが存在することが明らかとなった。また、本研究においては、がん細胞における CLCP1 の高発現が、アノキスの抑制を介して足場非依存性増殖能の付与に関わることや、paxillin と p130CAS の CLCP1 細胞内ドメインへの結合を明らかとした。さらに、ヒト肺がん細胞株の運動・浸潤を、抗 CLCP1 抗体を用いて抑制し得ることを示すとともに、免疫不全マウスの皮下に移植した CLCP1 陽性ヒト肺がん細胞株への特異的な取り込みを明らかとした。

なお、本研究を推進するにあたっては、研究代表者と研究分担者らの所属機関が同一市内に所在する地の利を最大限に生かして、随時研究進捗に関わる情報を交換するためのミーティングを開催し、密接な相互協力のもとに研究開発を円滑かつ効率的に推進した。

In this project aimed at clinical proteomics-based reverse translation, we have conducted integrative analyses of protein expression profiles between those obtained in patient tumors and those of highly metastatic and non-metastatic sublines of a human lung cancer cell line. As a result, 514 proteins were identified as those significantly associated postoperative prognosis, which 385 proteins were found to showed more than two-fold differences between highly metastatic and low metastatic sublines. Consequently, 18 proteins were observed in both lists of the proteins of potential interest. Based on their known or possible functions as well as on their novelty in the field of cancer metastasis, we selected five and validated for their involvement in cancer phenotypes such as motility, invasion and proliferation. We were able to single out a protein, which were associated with patients' outcome after surgery as well as motility, invasion and metastasis in a model system, for further functional analyses to fully elucidate the underlying mechanisms.

This study also aimed at elucidating molecular mechanisms of how CLCP1, a metastasis-related gene identified by our group, confers selective advantages to lung cancer cells. Firstly, we observed that CLCP1 knockdown resulted in significant reduction of metastasis in human lung cancer cell line xenografts *in vivo*, while high expression of CLCP1 was found to be associated with poor prognosis in lung cancer patients who underwent potentially curative resection. We found that CLCP1 dimerizes with EGFR and MET and that CLCP1 contains several tyrosine residues, which are phosphorylated by EGFR-mediated signaling. Conversely, introduction of CLCP1, which were unable to be phosphorylated, inhibited EGFR-mediated signaling, suggesting the existence of crosstalk between the two receptors. Furthermore, we found CLCP1 contributes to suppression of anoikis, which CLCP1 binds with paxillin and p130CAS at its intracellular domain. Finally, we have shown that anti-CLCP1 antibody treatment reduces motility and invasion, and can be internalized into cancer cells of a mouse xenograft of a human lung cancer cell line.

In this project, the participated researches worked closely together by mutually exchanging information in order to carry it out effectively./

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0件、国際誌 9件）

1. Tai MC, Kajino T, Nakatochi M, Arima C, Shimada Y, Suzuki M, Miyoshi H, Yatabe Y, Yanagisawa K, Takahashi T. miR-342-3p regulates MYC transcriptional activity via direct repression of E2F1 in human lung cancer. **Carcinogenesis** 2015, 36, 1464-73. doi: 10.1093/carcin/bgv152. Epub 2015 Oct 18.
2. Hakiri S, Osada H, Ishiguro F, Murakami H, Murakami-Tonami Y, Yokoi K, Sekido Y. Functional differences between wild-type and mutant-type BRCA1-associated protein 1 tumor suppressor against malignant mesothelioma cells. **Cancer Science**, 2015 Aug;106, 990-9. doi: 10.1111/cas.12698. Epub 2015 Jun 25.

3. Yamaguchi T, Lu C, Ida L, Yanagisawa K, Usukura J, Cheng J, Hotta N, Shimada Y, Isomura H, Suzuki M, Fujimoto T, Takahashi T. ROR1 sustains caveolae and survival signaling as a scaffold of cavin-1 and caveolin-1. **Nature Communications**, 2016 Jan 4;7:10060. doi: 10.1038/ncomms10060.
4. Suzuki, M, Cao K, Kato S, Komizu Y, Mizutani N, Tanaka K, Arima C, Chee TM, Yanagisawa K, Tagawa N, Shiraishi T, Usami N, Taniguchi T, Fukui T, Yokoi K, Wakahara K, Hasegawa Y, Mizutani Y, Igarashi Y, Inokuchi J, Iwaki S, Fujii S, Satou A, Matsumoto Y, Ueoka R, Tamiya-Koizumi K, Murate T, Nakamura M, Kyogashima M, Takahashi T. Targeting CERS6-dependent metastasis-prone phenotype in lung cancer cells. **Journal of Clinical Investigation**, 2016 126, 254-65. doi: 10.1172/JCI79775. Epub 2015 Dec 7.
5. Kakiuchi T, Takahara T, Kasugai Y, Arita K, Yoshida N, Karube K, Suguro M, Matsuo K, Nakanishi H, Kiyono T, Nakamura S, Osada H, Sekido Y, Seto M, Tsuzuki S. Modeling mesothelioma utilizing human mesothelial cells reveals involvement of phospholipase-C beta 4 in YAP-active mesothelioma cell proliferation. **Carcinogenesis**, 2016 37, 1098-109. doi: 10.1093/carcin/bgw084
6. Tanaka K, Osada H, Murakami-Tonami Y, Horio Y, Hida T, Sekido Y. Statin suppresses Hippo pathway-inactivated malignant mesothelioma cells and blocks the YAP/CD44 growth stimulatory axis. **Cancer Letter**, 2017 28, 385:215-24. doi: 10.1016/j.canlet.2016.10.020.
7. Ida L, Yamaguchi, T, Yanagisawa K, Kajino T, Shimada Y, Suzuki M, Takahashi T. Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1, a target of NKX2-1/TTF-1 lineage-survival oncogene, inhibits apoptosis signal-regulating kinase 1-mediated pro-apoptotic signaling in lung adenocarcinoma. **Cancer Science**, 2016 107, 155-61. doi: 10.1111/cas.12858. Epub 2016 Feb 8.
8. Tai MC, Yanagisawa K, Nakatochi M, Hotta N, Hosono Y, Kawaguchi K, Naito M, Taniguchi H, Wakai K, Yokoi K, Takahashi T. Blood-borne miRNA profile-based diagnostic classifier for lung adenocarcinoma. **Scientific Reports**, 2016 6, 31389. doi: 10.1038/srep31389.
9. Liu Z, Yanagisawa K, Griesing S, Iwai M, Kano K, Hotta N, Kajino T, Suzuki M, *Takahashi T. TTF-1/NKX2-1 binds to DDB1 and confers replication stress resistance to lung adenocarcinomas. **Oncogene**, 2017 Feb 13. doi: 10.1038/onc.2016.524. [Epub ahead of print]

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. TTF-1/NKX2-1: An Enigmatic Double-Edged Sword in Lung Adenocarcinoma, (Symposium), Takahashi T. The 2017 Japan-NIH joint Symposium on Advances in Biomedical Research and Diseases, 平成 29 年 2 月 17 日, 国内.
2. Identification of non-coding RNAs modulating MYC activity in human lung cancers, (シンポジウム) Takahashi T. 第 75 回日本癌学会総会, 平成 28 年 10 月 6 日.
3. 肺癌の発生と進展の分子機構の解明: 基礎研究のこれまでとこれから, (教育講演) 高橋隆 第 56 回日本肺癌学会学術集会, 平成 27 年 11 月 26 日-28 日, 国内.

4. Identification of non-coding RNAs modulating MYC activity in human lung cancers, (JCA-AACR Joint Symposium) Takahashi T. 第 74 回日本癌学会総会.平成 27 年 10 月 8 日-10 日, 国内.
5. ROR1 functions as a scaffold of cavin-1 and CAV1, sustaining caveolae and RTK-mediated survival signaling in lung cancer. (シンポジウム)Yamaguchi T, Yanagisawa K, Lu C, Ida L, Isomura H, Suzuki M, Fujimoto T, Takahashi T. 第 74 回日本癌学会総会,平成 27 年 10 月 8 日-10 日.
6. ROR1, a transcriptional target of TTF-1/NKX2-1 oncogene, sustains lineage-survival signaling in lung adenocarcinoma, (Invited talk) Takahashi T. Japanese-German Cancer Workshop. 平成 26 年 11 月 14-16 日, 国外 (ドイツ) .
7. Elucidation of transcriptional regulatory circuitry involved in the molecular pathogenesis of lung cancer, (シンポジウム) Takahashi T. 第 73 回日本癌学会総会.平成 26 年 9 月 25 日-27 日, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 医学を研究するということ, 高橋, 四日市高校 SGH リーダー授業, 平成 28 年年 6 月 18 日, 国内.
2. MYC の転写活性を修飾する long non-coding RNA の探索と同定. 高橋隆 (がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動・公開シンポジウム 平成 28 年 2 月 8 日-9 日, 国内
3. スパコンを使ってゲノムの未開のジャングルから鍵遺伝子を探す, 高橋隆, 一般向け講演会 (人工知能とスーパーコンピュータでがんにチャレンジ) , 平成 28 年 12 月 25 日, 国内

(4) 特許出願

なし