

細胞接着分子 CADM1/TSLC1 による腫瘍抑制と精子形成の分子機構

村上善則

マウス皮下の腫瘍原性の抑制を指標として新規がん抑制遺伝子 *CADM1/TSLC1* を同定した。*CADM1/TSLC1* は1回膜貫通型の免疫グロブリンスーパーファミリー細胞接着分子 (IgCAM) であり, 肺, 脳, 精巣等で上皮細胞間接着に関わる。一方, 肺がん等多くのがんの進展に伴い, 遺伝子のメチル化により不活化する。細胞内ではアクチン結合タンパク質 4.1 群, 並びに裏打ちタンパク質 MAGuK 群と結合して上皮様形態形成に必須の分子経路を形成し, 実験的に上皮間葉転換を抑制する。また, 活性化NK細胞に認識される抗原としても働き, がん細胞の免疫監視の見地からもがん抑制タンパク質として機能する。さらに, 精子形成, シナプス形成, マスト細胞の間質細胞等との接着等にも関わり, 不妊, 神経炎, 腹膜炎, 喘息等への関与が示唆される。*IgCAM* の分子特性が多様な細胞認識を生み, 多彩な病態に関わると考えられる。

はじめに

がんは多段階を経て発生, 進展し, がん遺伝子, がん抑制遺伝子, DNA 修復酵素遺伝子などの遺伝子異常, エピゲノム異常がこの各過程に対応する。進行したがんではさらに広範なゲノム, エピゲノム, 遺伝子発現異常などが蓄積し, がんの複雑な病態や治療反応性を修飾するが, その鍵となるのは比較的限られた数の遺伝子群の異常であると考えられる。従ってこれらの遺伝子を同定し, 異常の有無を把握し, 多段階発がんの実態を明らかにすることは, がんの予防, 診断, 治療を考える上で重要な課題である。特にがんの浸潤, 転移の有無はがん患者の生命予後を決定的に左右することから, その分子機構の解明は人のがんの制御につながると期待される。

がんの基礎研究のもう一つの大きな魅力は, がんが正常

細胞の増殖, 分化, 細胞死, 宿主のホメオスタシスなどからの逸脱の結果であるがゆえに, その異常の起源を辿ることにより, 正常とは何かという生命現象の本質に迫ることができることである。実際, がん研究から同定された SRC に始まるチロシンキナーゼ群, Ras を端緒とする G タンパク質群, RB を含む転写因子, 細胞周期制御因子群, p53 をはじめとする修復と細胞死の制御因子群, APC, カテニンなどの形態・増殖制御因子群, PTEN などのホスファターゼ群, 各種 DNA 修復酵素群などは, まさに細胞の増殖, 分化, 細胞死, 宿主のホメオスタシスの研究を切り開く鍵となってきた。細胞接着は E-カドヘリン, claudin, occludin, nectin など日本発の基礎研究が世界の研究を牽引してきたが, E-カドヘリンの異常が家族性胃がんの原因で, 散発性の瀰漫型胃がんや他の多くのがんの進展にも関わるように, やはりその異常, 逸脱ががん, とくに浸潤, 転移に関わることが示されている。筆者らががん抑制遺伝子として 2001 年に同定し解析を進めている *CADM1/TSLC1* は免疫グロブリンスーパーファミリー細胞接着分子をコードし, 様々な腫瘍でその進展に伴い不活化する。その後わずか数年間に同一の分子が, がん以外にも精子形成, シナプス接着, マスト細胞を介する腹膜炎, 神経炎, 喘息, 成人 T 細胞白血病 (ATL) の浸潤, ナチュ

東京大学医科学研究所 人癌病因遺伝子分野 (〒108-8639 東京都港区白金台 4-6-1)

Involvement of a cell adhesion molecule, *CADM1/TSLC1* in oncogenesis and spermatogenesis

Yoshinori Murakami (Division of Molecular Pathology, Institute of Medical Science, The University of Tokyo, 4-6-1, Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo 108-8639, Japan)

ラルキラー細胞を介する腫瘍免疫など、様々な生理現象と病態に関わる可能性が全く独立に示されて、多くの領域の研究者の注目を集めている。2006年7月には内外の研究者が北海道の苫小牧に会して第一回国際会議を開催して相互理解と親睦を深め、これを契機として遺伝子名を *Cell adhesion molecule 1 (CADM1)* に統一した。ここでは、筆者らが *CADM1/TSLC1* を同定した過程まで遡ってがん抑制遺伝子の研究の流れを紹介し、細胞接着分子のがん、並びに他の病態における意義について、各研究の展開を俯瞰したい。

1. ヒト非小細胞肺がんの新規がん抑制遺伝子 *CADM1/TSLC1* の機能的クローニング

肺がんは日本人のがん死の第一位を占めるがんで、年間6万人近くが命を落とす。神経内分泌由来の性質を示す小細胞肺がん、扁平上皮がん、腺がんを主体とする非小細胞肺がんの二つに大別されるが、ともに難治がんの範疇に入る。非小細胞肺がんでは、がん遺伝子 *K-ras* や *EGFR* の変異や増幅、がん抑制遺伝子 *TP53*, *CDKN4A*, *RB1* 遺伝子の不活化等が、そのがん化、進展に関わることが、これまでに明らかにされてきた。非小細胞肺がんでは、これらの異常に加えて3p (第3染色体短腕), 9p, 11q (第11染色体長腕), 13q, 17p などの染色体領域のヘテロ接合性の消失 (loss of heterozygosity : LOH) が高頻度に認められ、非小細胞肺がんの発生、進展に関わる未知のがん抑制遺伝子がこれらの領域に存在することが示唆されていた。これまでに9p, 13q, 17p の LOH は、それぞれ *CDKN4A*, *RB1*, *TP53* 遺伝子の不活化に対応することが明らかにされた¹⁾。また3pについても、多数の非小細胞肺がん手術組織DNAに関する詳細な構造異常の解析により、*RASSF1A* がその責任遺伝子であることが明らかにされた²⁾。筆者らは11q23に位置するがん抑制遺伝子を機能的相補法により同定することを試みた。

ヒトで最初に単離されたがん抑制遺伝子は、遺伝性網膜芽細胞腫の *RB1* 遺伝子で1986年のことである。この時用いられた方法は、遺伝性腫瘍の家系の連鎖解析から特定の染色体領域を絞り込み、その領域の構造解析と遺伝子変異の検索とを大規模に進める、いわゆるポジショナルクローニング法である。その後1998年頃まで、原則的に同じ方法、すなわち連鎖解析とポジショナルクローニング法を用いて、様々な遺伝性腫瘍のがん抑制遺伝子が単離された。網膜芽細胞腫の *RB1* に加え、神経線維腫症の *NF1*, *NF2*, 家族性大腸ポリポーシスの *APC*, 家族性乳がんの *BRCA1*, *BRCA2* 遺伝子などがその代表例である³⁾。これに対し、非小細胞肺がんを含む大部分のヒトの腫瘍は明確な遺伝性を認めないことから、連鎖解析の手法を用いることは不可能であった。このような散発性腫瘍のがん抑制

遺伝子を同定する方法として、腫瘍DNAにおいてLOHを示す共通領域を限定し、この領域に存在する遺伝子の異常を網羅的に検索する方法が用いられた。しかしながら、大部分のヒトのがん細胞ではゲノムやエピゲノムの不安定性が顕著に認められ、がん化の直接の原因となる変異に加えて、染色体、遺伝子、塩基配列、メチル化状態などの極めて多様で複雑な異常が高頻度に認められる。従って、腫瘍組織のDNAの構造解析のみによって多数の候補遺伝子群の中から単一の原因遺伝子を同定する試みは、大規模に行われたにもかかわらず、成功例は *RASSF1A* などきわめてわずかしかなかった⁴⁾。これに対し、がん細胞に長い正常ゲノムDNA断片を導入し、その悪性形質が遺伝学的に相補されることを指標として、遺伝子を同定する機能的相補法も理論的には可能と考えられてきた⁵⁾。

機能的相補法による遺伝子単離・同定は、上述のゲノム構造解析を基盤とするポジショナルクローニング法と比較すると地味な手段ではあるが、研究の歴史は古く、これまでにがんの遺伝学的研究に様々な面で貢献してきた (表1)。その端緒は、1965年の岡田らによるセンダイウイルスを用いた全細胞融合法⁶⁾、並びに、それを用いてがん細胞を正常線維芽細胞と融合すると、その悪性形質が抑制されるという1969年のHarrisらの実験であり⁶⁾、がん形質が劣性であることの最初の報告となった。次いで、1977年にコルヒチンとサイトカラシンを用いた微小核融合法 (microcell fusion) が開発され、細胞に外来の単一染色体を移入することが可能になると、特定の染色体ががん形質を抑制する、すなわちその領域にがん抑制遺伝子が存在する実験の根拠が得られるようになった⁷⁻⁹⁾。さらに、微小核に放射線を照射し染色体を断片化して移入することにより、がん抑制遺伝子の座位を2-20センチモルガン (cM) 程度の領域に局限化することが1990年代初頭に可能となった^{10,11)}。しかし2-20cMの領域といっても、理論上は20-200個の遺伝子が含まれることになり、1990年代前半の時点では、原因遺伝子に到達できる可能性は低かった。一方、この難点を克服する大きな技術的進歩として、酵母人工染色体 (yeast artificial chromosome : YAC) の哺乳類細

表1 ヒト細胞への遺伝子導入技術 (文献4)

ベクター	DNA断片長	遺伝子数	プロモーター	DNAコピー数	ポジション効果	報告
全細胞	3Gb	30,000<	内在性	2	-	(5)
染色体	50Mb<	1,000<	内在性	1	-	(7-9)
染色体断片	~10Mb	~100	内在性	1	-	(10, 11)
YAC	~1Mb	~10	内在性	1	+/-	(12, 14, 76)
断片化YAC	~100kb	数個	内在性	1	+/-	(14)
PAC	~200kb	数個	内在性	1-10<	+/-	(77)
プラスミド	~10kb	1	人工的	1-10<	+	多数

胞への移入法が1990年に開発された¹²⁾。YACの場合、酵母スフェロプラスト融合、マイクロインジェクション、リポフェクション等を用いることにより、数百キロ塩基対(kb)から約1メガ塩基対(Mb)程度の長さのゲノムDNA断片を細胞に導入することができ、直ちに遺伝子同定へと進むことが可能である。さらに注目すべきは、染色体やYACの移入実験において、染色体やYACの大部分は原則として細胞に1コピーのみ組み込まれ、また断片上の遺伝子は自身の内在性プロモーターの制御下で発現することである。従ってゲノムDNA断片上の遺伝子は移入細胞中で過剰に発現することなく、内在性遺伝子と同様の生理的発現様式をとると期待されるが、これは、染色体やYACの移入実験の大きな利点の一つである。とりわけ、がん抑制遺伝子のように増殖の抑制を検定する場合には、過剰発現しないという点が特に重要となる⁴⁾。

さて、第11染色体上に非小細胞肺がんの抑制遺伝子が存在することは、1992年Satoらにより、ヒト非小細胞肺がん培養細胞A549に微小核融合法により第11染色体を移入すると、そのヌードマウス皮下における腫瘍原性が抑制されることにより示唆された¹³⁾。A549細胞はヌードマウス皮下に移植した場合に強い造腫瘍性を示し、また第11染色体長腕の片側が欠損している。一方、手術摘出非小細胞肺がん組織79例のLOH解析からは、その共通欠損部位が11q23の約5cMの領域に限定されることが示された¹⁴⁾。この染色体領域は五つのYACで網羅される¹⁵⁾。そこで筆者らは、これらのYACを個別にA549細胞にスフェロプラスト融合法によって移入したところ、約1.6

MbのゲノムDNAを含む一つのYACクローンに、A549細胞の腫瘍原性を抑制する活性が認められた。しかし、1997年の時点で1.6Mbの未知の領域の塩基配列を決定して原因遺伝子を単離することは、筆者らのような小規模のグループでは困難であった。そこで、次にYACクローンの断片化を試みた。すなわち、クローン化されたヒトゲノムDNA断片上のAlu繰り返し配列を標的として、Alu配列、酵母のテロメア、酵母の別種の選択マーカー遺伝子を含むプラスミドを作製してYACを含む酵母細胞に導入した。そして、Alu配列部位で遺伝子相同組換えが生じて断片化されたYACを含む酵母細胞を、別種のマーカーで選択すると、一端から漸次、挿入DNA断片を欠失した一連のYACが得られた。そして、これらのYACを個別にA549細胞に移入して、その腫瘍原性を検討することにより、腫瘍抑制活性に必須の領域を11q23の約100キロ塩基対(kb)の断片にまで限局化した¹⁶⁾。そして、この領域の構造解析から候補遺伝子*CADM1/TSLC1* (tumor suppressor in lung cancer 1)を同定した(図1)¹⁷⁾。

*CADM1*は免疫グロブリンスーパーファミリーに属する1回膜貫通型タンパク質をコードする^{17,18)}。mRNAの発現はリンパ球を除くほぼ全ての臓器で認められる。遺伝子全長は約200kb、10個のエクソンからなる。全長*CADM1* cDNAをA549細胞に発現させると、マウスでの腫瘍原性が顕著に抑制されたが、N端部分を欠いた変異cDNA、並びにベクター自身には、この腫瘍抑制活性は認められなかった。また、手術摘出非小細胞肺がん組織のDNAの一部で、*CADM1*遺伝子のアレル欠失とフレームシフト変異

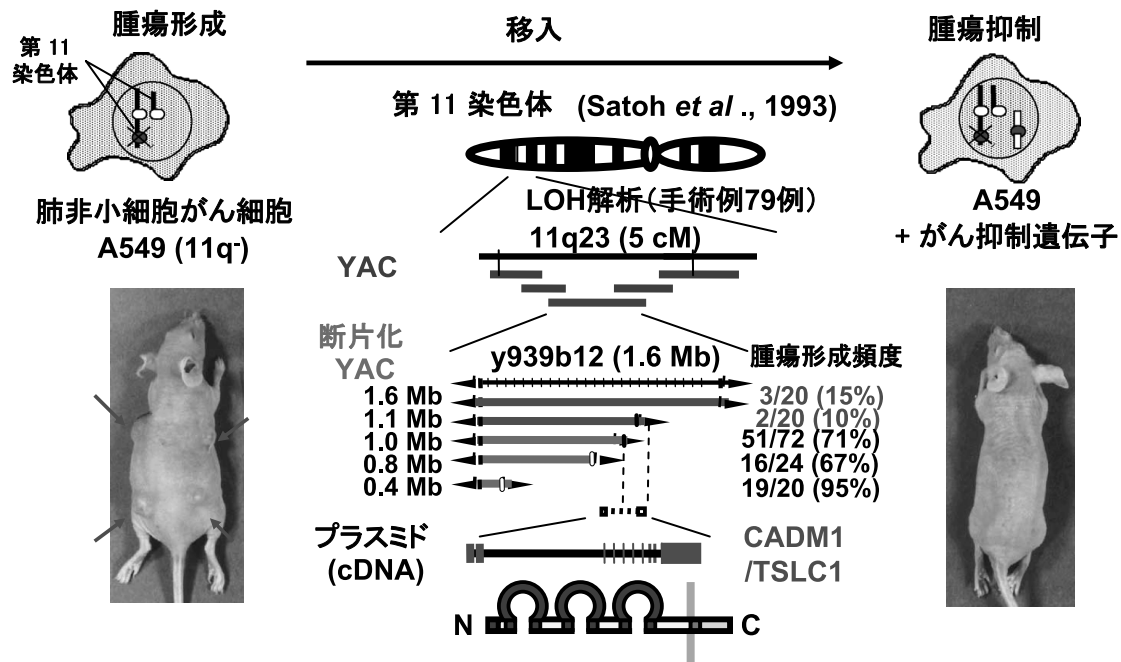


図1 機能的相補法による第11染色体q23上のがん抑制遺伝子*CADM1/TSLC1*の同定(文献75)

による2ヒットが認められた。さらに、遺伝子プロモーターのメチル化による発現欠如が非小細胞肺がんの約40%に認められ、一方 *CADM1* 遺伝子のプロモーターのメチル化を示す培養非小細胞肺がん細胞に脱メチル化剤である5-アザシトシンを加えると、その発現の回復が見られた。以上の結果から、*CADM1* がヒト非小細胞肺がんの抑制遺伝子であると結論づけた¹⁷⁾。

2. がん抑制タンパク質 *CADM1*/TSLC1 とその分子経路

CADM1/TSLC1 は、V-型、C2-型、C2-型の3個の免疫グロブリン様ループをもち442アミノ酸からなる1回膜貫通型糖タンパク質である¹⁹⁾ (図2A)。抗体を用いたウエスタンブロット解析では脳、精巣、肺などで強い発現が認められる。膜直上の部位に当たるエクソン8(8A)には二つのエクストラエクソン(8B, 8C)を含むスプライスバリエントが認められ、上皮、ATLでは8A型、脳・神経では8(-)型、精巣では8A及び8A+8B型が発現する。細胞接着の形成に重要なnectin分子群とも高い相同性を示し、Nectin-2とも呼ばれる²⁰⁾。この他にも、五つの類似分子群が脊椎動物間で種間を越えて存在し、それぞれ *CADM1*/TSLC1/Nectin-2/SynCAM1/SgIGSF/IGSF4A, *CADM2*/Nectin-3/SynCAM2/IGSF4D, *CADM3*/TSLC1/Nectin-1/SynCAM3/IGSF4B, *CADM4*/TSLC2/Nectin-4/SynCAM4/IGSF4Cとも呼ばれる²¹⁻²⁶⁾。*CADM1* を過剰発現させた細胞では Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 非依存的な細胞凝集能が亢進することから、*CADM1*

が基本的に細胞接着分子の活性をもつことが示唆される¹⁹⁾。また、上皮ではホモ二量体を形成し、隣接細胞との接着部位、特に極性細胞ではその側面に発現し、隣接細胞のホモ二量体とトランス結合を形成することを Masuda らは示している(図2B)¹⁹⁾。Shingai らは *CADM1*/Nectin-2 がマウス胆嚢上皮の側底面に発現するが、タイトジャンクションやアドヘレンスジャンクション、デスモソームには局在しないことを示している²⁵⁾。

CADM1 タンパク質の細胞内ドメインは46アミノ酸と比較的短く、リン酸化される部位は確認されていないが、二つの重要なタンパク質結合モチーフをもつ。一つは膜直下に存在する4.1結合モチーフであり、この部位を介してアクチン結合性タンパク質4.1B/DAL-1と結合する。また、*CADM1*, 4.1Bを細胞で共発現させると、それぞれ膜の接着部位で共局在することが共焦点顕微鏡を用いた解析により明らかになった²⁷⁾。4.1Bは当初、肺腺がんの手術組織で特異的に発現が低下する分子(differentially expressed in adenocarcinoma of the lung: DAL-1)としてディファレンシャルディスプレイ法によって単離された1,087アミノ酸からなる分子で、スペクトリン・アクチン結合ドメインを介してアクチン細胞骨格と連結する²⁸⁾。4.1Bタンパク質は、4.1R, 4.1N, 4.1Gとともに4.1群タンパク質に属し、さらにERMタンパク質群として知られるエズリン、ラディキシン、モエシン、さらにmerlinとも高い相同性を示すが、特にmerlinは家族性腫瘍である神経線維腫症2

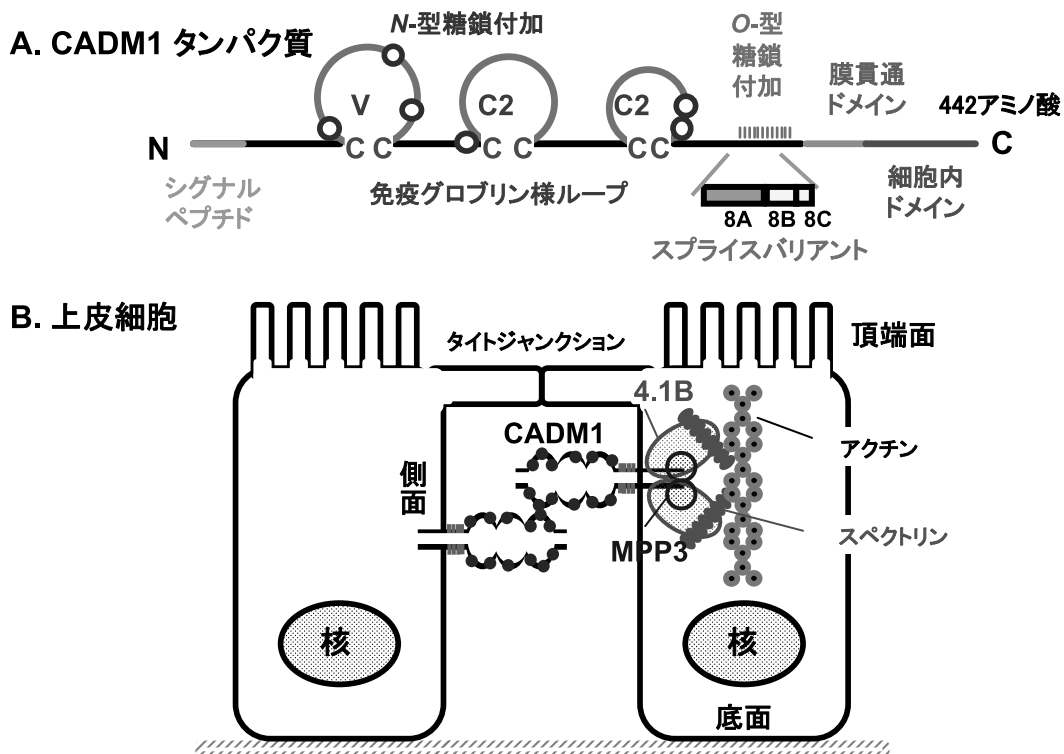


図2 *CADM1* タンパク質の構造と上皮細胞における *CADM1* タンパク質の関わる分子経路 (文献75)

型 (NF2) の原因タンパク質でもあり、類似の経路に働くと考えられる²⁹⁾。現在までのところ、CADM1 は 4.1B, 4.1N と直接結合することが示されているが、ERM, merlin とは直接結合しない。4.1B は肺腺がんで発現が低下する事実に加えて、その発現を欠如した肺腺がん細胞に導入すると、*in vitro*, *in vivo* での増殖を抑制することからがん抑制遺伝子候補と考えられる²⁸⁾。

一方、CADM1 タンパク質の細胞内ドメイン C 端にはクラス 2 の PDZ 結合モチーフが存在する。この部位を介して、細胞の極性形成に関わる膜結合性グアニレートキナーゼ (MAGuKs) 分子群に属する MPP3, CASK, Pals2, syntenin 等のタンパク質が CADM1 に結合することが酵母ツーハイブリッド法を用いて、Fukuhara ら、Shingai ら、Biederer らにより示されている (図 2B)^{25,30,31)}。MPP3 は細胞極性を制御するショウジョウバエのタンパク質 Stardust のヒト相同体であると考えられ、さらにショウジョウバエのがん抑制タンパク質として有名な Dlg とも共通の起源を示すことは興味深い。最近 Sakurai らは、4.1B と MAGuK の二つの分子も直接結合し、CADM1, 4.1B, MAGuK が細胞接着部位の細胞膜に沿って三者複合体を形成することを見出している。そして、4.1 結合モチーフ、PDZ 結合モチーフ、或いは細胞内領域全体を欠失させた CADM1 変異体は、A549 細胞のマウスにおける腫瘍原性抑制活性を失うという Mao らの知見から、CADM1, 4.1B MAGuK 分子からなる分子経路全体が腫瘍抑制に必須であると考えられる³²⁾。さらに、CADM1 の細胞内領域は、赤血球の膜タンパク質で、その形態や変形能に関与するグリコホリン C やショウジョウバエのシナプス接着に働く neurexin IV 等の細胞内領域とも高い相同性を示し、これらの膜タンパク質がいずれも、4.1, MAGuK と複合体を形成することか

ら、この三者複合体は接着と細胞骨格、極性を共役し、進化的にも高度に保存された重要な分子装置であることが示唆される²¹⁻²³⁾。

3. ヒトがんにおける CADM1/TSLC1 不活化

CADM1/TSLC1 遺伝子をヒトの非小細胞肺がんの抑制遺伝子であると結論づけた根拠の一つは、この遺伝子の 2 ヒットの不活化が、非小細胞肺がんの組織由来の DNA で示されたことである。がん抑制遺伝子はがん化に劣性に働く遺伝子のことで、常染色体上の二つの対立遺伝子がともに不活化されたときに細胞がん化を一段階進める。遺伝子不活化の分子機構としては、染色体欠損や遺伝子欠失などの遺伝子座の欠失と、ナンセンス変異、フレームシフト、スプライシング変異、ミスセンス変異などの塩基配列変異が、以前から知られてきた。そして、これら遺伝性の変異は、様々な家族性腫瘍における原因遺伝子の胚細胞性変異としても同定されてきた³⁾。一方、1992年に、重亜硫酸処理-塩基配列決定法により DNA 断片内のあらゆるシトシン残基のメチル化の有無を詳細かつ簡便に検出する方法が開発された³³⁾。そしてこの方法により、遺伝子上流に位置するプロモーター領域の CpG アイランドのメチル化が、ヒストンの脱アセチル化や染色体の高次構造の変化を伴って、遺伝子発現を抑制 (サイレンシング) する機構が、がん細胞で見出された。現在では、遺伝子プロモーター領域のメチル化を含むエピジェネティックな変化は、がん細胞における獲得性変異の重要な範疇の一つと考えられ、アレルの欠失+塩基配列異常に加えて、アレルの欠失+メチル化や両アレルのメチル化は、がん抑制遺伝子不活化の代表的な分子機構として認められるようになった (図 3)³⁴⁾。そして、CADM1 遺伝子の不活化機構の検討はこのような理

遺伝子不活化の分子機構

- ・ アレルの欠失
- ・ 不活化塩基配列変異
- ・ プロモーターメチル化

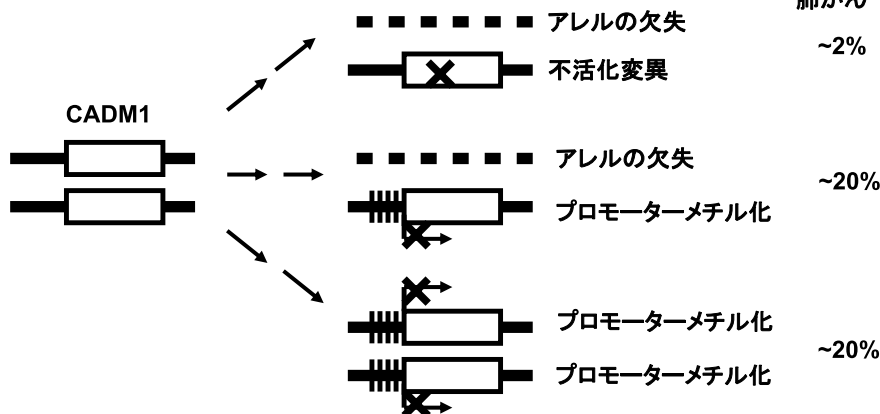


図 3 がん抑制遺伝子 CADM1/TSLC1 の 2 ヒットによる不活化 (文献 4)

解の端緒の一つとなった⁴⁾。

Fukami, Kikuchi らは、重亜硫酸処理—塩基配列決定法に加えて、重亜硫酸処理—SSCP (single-strand conformational polymorphism) 解析により、*CADM1* 遺伝子上流の CpG アイランドのメチル化、とりわけ転写開始点直上の6箇所の CpG 配列のメチル化が *CADM1* 遺伝子の発現欠如と強く相関することを12例の非小細胞肺癌培養細胞を用いた解析により明らかにした³⁵⁾。そして、非小細胞肺癌103例中45例(44%)に *CADM1* 遺伝子のメチル化を見出した(図4)³⁶⁾。一方、*CADM1* 遺伝子が位置する11q23領域の LOH は肺癌以外の腫瘍でも認められることから、様々な腫瘍における *CADM1* の異常の有無が調べられた。その結果、食道がんの50%をはじめとして、肝細胞がん、膵がん、前立腺がん、乳がん、肛門扁平上皮がんの約30-70%、また胃がん、鼻咽頭がん、子宮頸がん、髄膜腫でも進展例で高頻度に *CADM1* のメチル化や発現低下が見出された(表2)³⁷⁻⁴⁹⁾。特に食道がんでは、*CADM1* の発現欠如例の5年生存率が有意に低く、また T, N 因子について独立した予後因子となり得ることが Ito らにより示された⁴⁰⁾。このように *CADM1* は非小細胞肺癌以外の様々な腫瘍の進展にも関わり、第11染色体長腕で高頻度に認められる LOH の責任となるがん抑制遺伝子であることが広く認められている。これらの変化に共通する特徴

は、*CADM1* の不活化が進行がんで、より高頻度に認められることであり、接着分子としての *CADM1* の不活化が、がんの浸潤、転移に関わることを示唆している。

一方、上述のように *CADM1* は、4.1 群タンパク質、MAGuK 群タンパク質と三者複合体を形成して腫瘍抑制経路を形成することから、4.1, *MAGuK* もがん抑制遺伝子の候補となり得る。そこで非小細胞肺癌培養細胞12例についてその発現を検討したところ、*CADM1*, *4.1B*, *MPP3* 遺伝子のそれぞれ6例、9例、1例に発現欠如を認め、三つの遺伝子を合わせて12例中10例で、この分子経路に異常が認められることが明らかになった^{17,27,29)}。非小細胞肺癌の手術例では *4.1B* 遺伝子のメチル化が103例中63例(61%)に認められ、*CADM1*, *4.1B* 両遺伝子のいずれか、あるいは両方にメチル化を認める症例は全体の69%(103例中71例)に達することがわかった⁵⁰⁾。そして、両遺伝子のどちらかにメチル化を認める腫瘍をもつ症例は、ともに非メチル化を示した腫瘍の症例と比較して、有意に無再発生存期間が短いことが明らかになった³⁶⁾。以上の結果は、*CADM1*, *4.1B* の経路が非小細胞肺癌の進展に深く関わり、その予後因子ともなることを示唆する所見である。さらに、*4.1B* の不活化、メチル化は神経膠腫、腎明細胞がんや乳がんでも Gutmann ら、Yamada ら、Heller らによりそれぞれ見出され、これまた

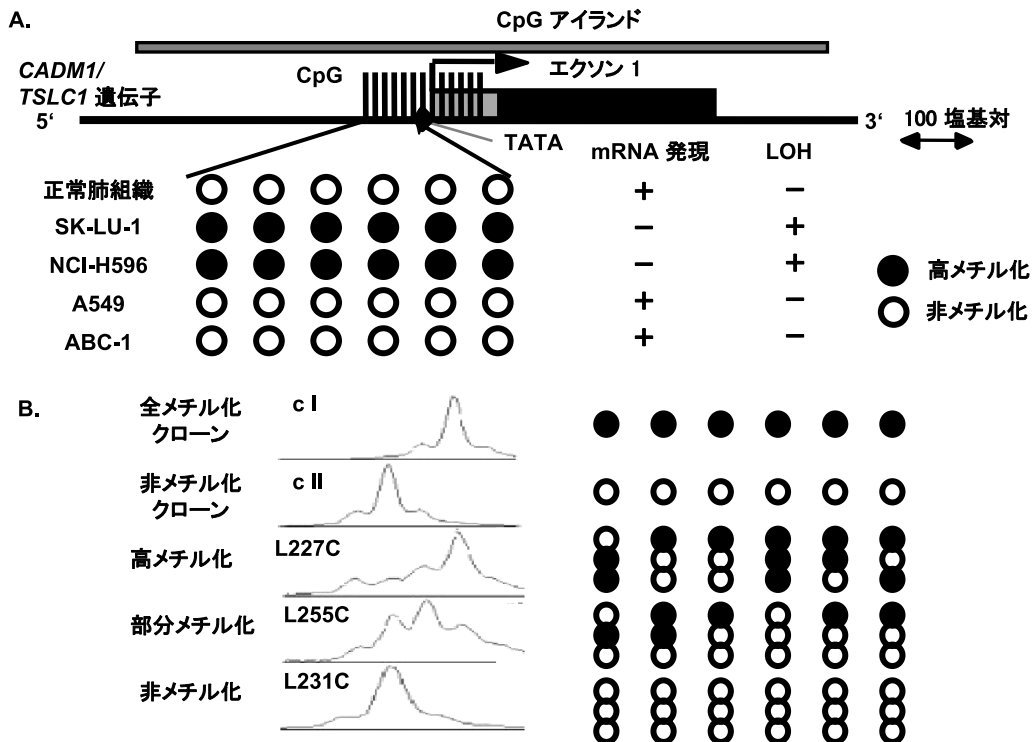


図4 非小細胞肺癌における *CADM1/TSLC1* 遺伝子プロモーターのメチル化 (文献 35, 36)

A. 重亜硫酸処理—塩基配列決定法による *CADM1* 遺伝子プロモーターの解析 B. 重亜硫酸—SSCP 法, 塩基配列決定法による非小細胞肺癌の解析

表2 腫瘍における *CADM1/TSLC1*, *4.1B/DAL-1* 遺伝子の不活化

腫瘍	プロモーターメチル化 (原発性腫瘍) (%)	発現欠如 (培養細胞) (%)	腫瘍原性抑制 (培養細胞)	文献
1. <i>CADM1/TSLC1</i> 遺伝子				
非小細胞肺癌	21/ 48 (44)	6/12 (50)	A549	17, 35-37
小細胞肺癌	未報告	2/10 (20)		35
鼻咽頭がん	13/ 38 (43)	2/ 5 (40)		38, 39
食道がん*	28/ 56 (50)*	3/ 3 (100)	KYSE520	40
胃がん	15/ 97 (16)	8/ 9 (89)		4
肝細胞がん	4/ 14 (29)	3/ 8 (38)		41
膀胱がん	25/ 91 (27)	8/11 (73)		42
乳がん	10/ 30 (33)	1/ 3 (33)		43
子宮頸がん	30/ 52 (58)	9/10 (90)	SiHa	44, 45
前立腺がん	7/ 22 (32)	2/ 5 (40)	PPC-1	46
髄膜腫*	26/ 41 (63)*	3/10 (30)		47
肛門扁平上皮がん	9/ 12 (75)	未報告		48
髄芽細胞腫	0/ 30 (0)	未報告		49
2. <i>4.1B/DAL-1</i> 遺伝子				
非小細胞肺癌	59/103 (57)	8/11 (73)		37, 50
腎明細胞癌がん	25/ 45 (55)	12/19 (63)		51
髄膜腫*	未報告	16/26 (62)		52

*発現欠如

肺癌以外の様々な腫瘍の抑制に関わることが示唆される⁵¹⁻⁵³⁾。

4. 細胞接着と共役するがん抑制活性

上皮細胞間の接着の破綻は、原発巣からがん細胞が浸潤、転移する最初の段階であることから、*CADM1/TSLC1* の発現欠如が、結果としてがん細胞の浸潤、転移と相関することは容易に推測される。実際、肺癌組織における免疫組織染色では、*CADM1* の発現が臨床病期の進行、リンパ節・リンパ管への浸潤、血管浸潤と逆相関することが Ito らにより示されている^{54,55)}。また、Goto らは、同一患者の肺腺がんの比較で、浸潤性を示さない bronchiolo-alveolar carcinoma の組織型を示す部位では *CADM1* の発現が保たれるが、同一腫瘍内の浸潤部位ではこの発現が高率に欠如することを示した⁵⁶⁾。がんの浸潤、転移に伴うこのような変化は *CADM1* の上皮細胞間の接着分子としての性質に符合するものである。

一方、接着の破綻のみならず、*CADM1* がより積極的に上皮様形態の維持と腫瘍抑制に関与することを示唆する知見も幾つか得られている。まず、*CADM1* の発現量を正常肺程度に回復した A549 細胞がマウス皮下での腫瘍形成、並びに脾臓から肝臓への実験的転移を抑制したことが報告された^{17,26)}。これらの実験系では、浸潤、転移の第一段階たる原発巣からの離脱は人工的に完了させ、非接着状態の単一細胞群を皮下、あるいは脾臓に注入して、その後の生着を評価している。従って *CADM1* が単なる接着分子であれば、その発現の回復はむしろ組織への定着に有利に働

き、腫瘍原性や転移性を亢進させるようにも思われる。しかし、事実が逆であることは、*CADM1* の発現が細胞の増殖抑制や細胞死の誘導を積極的に導く可能性を示唆している。実際、Mao らは、アデノウイルスベクターを用いて *CADM1* を A549 細胞に過剰発現させると、その増殖が抑えられるとともにアポトーシスが誘導され、この過程でカスパーゼ3が活性化されることを報告している⁵⁷⁾。これらの活性も 4.1 並びに PDZ 結合モチーフの有無に依存することから、*CADM1* とともに 4.1 群、並びに MAGuK 群タンパク質が重要であることが示唆される。もちろん、これは *CADM1* の過剰発現系での結果であり、正常上皮での *CADM1* の発現が直ちに細胞死を誘導するとは考えにくい。しかし、*CADM1* が細胞間の脱接着等、様々な刺激に応じてアポトーシスに関わる可能性は大いに考えられ、今後検討する必要がある。これに対し、Ito らは、食道がん細胞で *CADM1* の発現を回復させると、細胞周期の G₁ 期から S 期への進行が阻害されることを示し、*CADM1* の発現が細胞周期制御にも関わる可能性を示している⁴⁰⁾。

Masuda らは、がん細胞が浸潤、転移する際に、個体発生や臓器形成の過程で認められる上皮間葉転換に類似した現象が見られることに注目し、イヌ腎細胞 MDCK が HGF の刺激により二次元培養では遊走し、三次元培養では嚢胞から管腔を形成するモデル系を用いて *CADM1* の効果を検討した。MDCK 細胞に報告どおり HGF を投与すると、細胞は脱接着を起こして遊走し、この際、上皮マーカーである E-カドヘリン、β-カテニンの発現が消失し、間葉系マーカーであるビメンチン、フィブロネクチンの発現が見

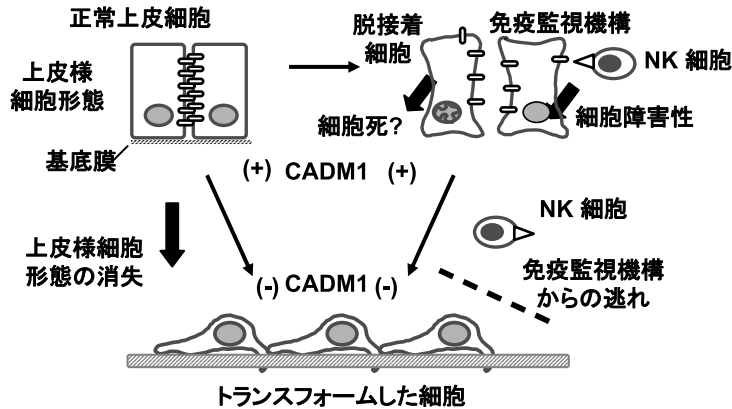


図5 CADM1/TSLC1の二つの側面からのがん抑制機構 (文献59-61, 75)
 CADM1は上皮様形態形成と免疫監視機構の両面から腫瘍形成を抑制する。細胞配列の修復と細胞死誘導の両面性は個体維持のための高次機能であり、その破綻ががんの発生の原因になると考えると、CADM1は上皮の番人 (epithelial guardian) として機能していることが示唆される。中空長丸：CADM1, 中空矢頭：CRTAM (class 1-restricted T-cell associated molecule)

られた。三次元培養では管腔を形成した。これに対し、CADM1を発現させたMDCK細胞では、HGFによる遊走能、管腔形成能が著明に抑えられ、上皮マーカーであるE-カドヘリン、 β -カテニンの発現が持続し、間葉系マーカーであるビメンチン、フィブロネクチンは全く発現しなかった。そして、HGF投与によるRacの一過性の活性化がCADM1発現細胞では阻害された。さらに、これらHGFによる一連の上皮間葉転換に対するCADM1の抑制効果が、CADM1細胞内ドメインの欠失体では認められなかったことから、CADM1は4.1群、MAGuK群タンパク質とともに、細胞接着を介して細胞骨格の制御やアポトーシス誘導、上皮間葉転換の抑制等に作用するものと考えられた⁵⁸⁾。さらにSakuraiらは培養上皮細胞でCADM1の発現をRNAiによって抑制することにより、細胞の上皮様形態が失われ、細胞接着が未熟となり、全体としてトランスフォームした細胞形態に似た像を示すこと、この時、4.1BやMAGuK等のCADM1結合タンパク質は量的には変化を示さないものの、その膜局在が失われることを複数の細胞で観察している。以上の結果から、CADM1は上皮様細胞形態の構築、維持に関わり、上皮としての性質を保持することにより、腫瘍抑制に働くものと考えられる。

5. CADM1/TSLC1の抑制による免疫監視機構からの回避

上皮細胞の接着に加えCADM1ががん細胞の免疫応答性にも関与することが、三つの免疫研究者のグループにより明らかにされた。即ちBolesら、Galibertら、Araseらは、活性化されたNK細胞や $CD8^+$ T細胞の膜上に特異的に発現するIgCAMとしてclass I-restricted T cell-associated molecule (CRTAM)を単離し、CRTAMと特異的に結合する標的上皮細胞側の分子を検索してCADM1を同定し

た⁵⁹⁻⁶¹⁾。CRTAMとCADM1とのトランス・ヘテロ結合によりNK細胞の細胞障害性が亢進し、一方 $CD8^+$ T細胞は γ インターフェロンを分泌し、CADM1発現細胞が障害されると考えられる。さらに、CADM1を発現するがん細胞はマウスの腹腔内移植実験でNK細胞に効果的に排除された。このことからCADM1がNK細胞や $CD8^+$ T細胞により特異的に認識されるがん抗原として機能すること、一方CADM1発現の欠如したがん細胞は免疫監視機構から回避できるため浸潤、転移に有利に働くことが推測される。CADM1の発現欠如ががんの浸潤、転移と相関する事実は、この仮説を支持する。AraseらはCADM1とCRTAMとのヘテロ結合の親和性がCADM1ホモ結合の親和性よりも強いことを実験的に示している⁶¹⁾。しかし、正常上皮細胞間でホモ結合を形成するCADM1分子が免疫細胞に認識、攻撃されることは考えにくいことから、がん抗原として機能するCADM1は、翻訳後修飾や細胞表面への発現様式が異なる可能性が高い。ところでCRTAMとの結合にはCADM1分子のN端のIg-V鎖のみで十分であり、一方、その細胞内領域は上述した腫瘍抑制や細胞形態の維持に必須であり、それぞれ分子内の機能局在が異なっている。このことから、CADM1は上皮の細胞接着と、免疫応答の両面で機能するユニークながん抑制遺伝子で、両方の活性が重要であることが示唆される (図5)。

6. CADM1/TSLC1の成人T細胞白血病における異所性発現

これまでがん抑制遺伝子CADM1/TSLC1について述べてきた。ところが予想外の事実であるが、CADM1がATLでは特異的に過剰発現していることが宮崎大学のSasakiらにより見出された⁶²⁾。即ちATL患者8例の腫瘍細

胞に関する約 12,000 遺伝子の発現解析により, *CADM1* が ATL 細胞で正常 $CD4^+$ 細胞と比較して 30 倍以上に発現が増加する四つの遺伝子の一つとして同定された. その後の解析で, *CADM1* は患者由来の ATL 細胞の 8 例全例, ATL 培養細胞の 7 例中 5 例で強発現が認められたが, 他の T 細胞性 ALL を含む白血病, リンパ腫 36 例, また正常 $CD4^+$ 細胞 10 例では全く発現が認められなかった. さらに HTLV-1 感染 T 細胞でも 3 例中 2 例で *CADM1* の発現が認められた. ATL はレトロウイルス HTLV-1 の感染を契機として, 35 年以上の潜伏期を経てウイルス抗体陽性者の 5% 程度に発症する. *CADM1* の発現が HTLV-1 感染細胞と ATL 細胞の両者で見られたことは, ATL の成立に早期から関与することを示唆する. 実際 *CADM1* を発現させた T-ALL 細胞では, 実験的に血管内皮細胞や線維芽細胞への接着能が亢進することから, *CADM1* の発現が臓器, 皮膚浸潤や腫瘍形成といった ATL に特異的な病態に積極的に関与することが示唆される. しかし血管内皮や線維芽細胞では *CADM1* の発現がないことから, 異分子とのヘテロ結合がこの接着に関わるものと考えられる. また, *CADM1* が上皮と異なり ATL では腫瘍促進に働くことは極めて興味深い. 上皮との機能の相違については現在解析中であるが, 下流分子の違いがその一因と思われる.

7. *Cadm1/Tslc1* 遺伝子欠損マウスにおける精子形成障害

CADM1 のマウスにおける同一分子はまた, 精巣特異的に発現する IgCAM, SgIGSF として, Wakayama らにより

精巣ライブラリーの検索によって, 全く独立にクローニングされた⁶³⁾. *CADM1/SgIGSF* は精細管上皮で, 精祖細胞, 精母細胞の段階と, 分化したステップ 7 以降の精子細胞の段階で二相性に発現するが, 支持細胞であるセルトリ細胞や間質のライディッヒ細胞では全く発現しない⁶⁴⁾. 一方 Yamada らは *CADM1* の個体レベルでの機能を明らかにする目的で *Cadm1* 遺伝子欠損マウスを作製したところ, ヘテロマウスの交配によりホモ欠損マウスがメンデル比に従って正常に誕生した. ところが, ホモ欠損マウスの交配から, 雄の *Cadm1* ホモ欠損マウスが不妊であることが明らかになった. 一方, 雌のホモ欠損マウスは妊性を示し, 雄のヘテロマウスも妊性に異常はなかった. 11 週齢のマウスの精子検査を行ったところ, ホモ欠損マウスでは, 成熟精子数が野生型のそれと比較して 10,000 分の 1 程度に減少し, また運動率も 1% 以下という無精子症の所見を示した. 11 週齢の精巣自体の比較でも, 遺伝子ホモ欠損マウスの精巣は, 野生型と比較してその重量が 88% に低下していたが, ほかの臓器, 組織には差異を認めなかった. 精巣の病理学的解析では, 遺伝子ホモ欠損マウスの精細管では上皮組織が全体に希薄で, 管腔内に円形の変性細胞が多数認められたが, 成熟精子はほとんど認められなかった (図 6). しかし, この円形変性細胞の一部は PAS 染色陽性で, 電子顕微鏡解析でも極めて密なアクロソーム様所見を示すことから, その起源が未熟な精子細胞にあり, 成熟する前にセルトリ細胞から剥がれ, 精細管内腔に滑脱したものであると考えられた. そして, 遺伝子ホモ欠損マウス

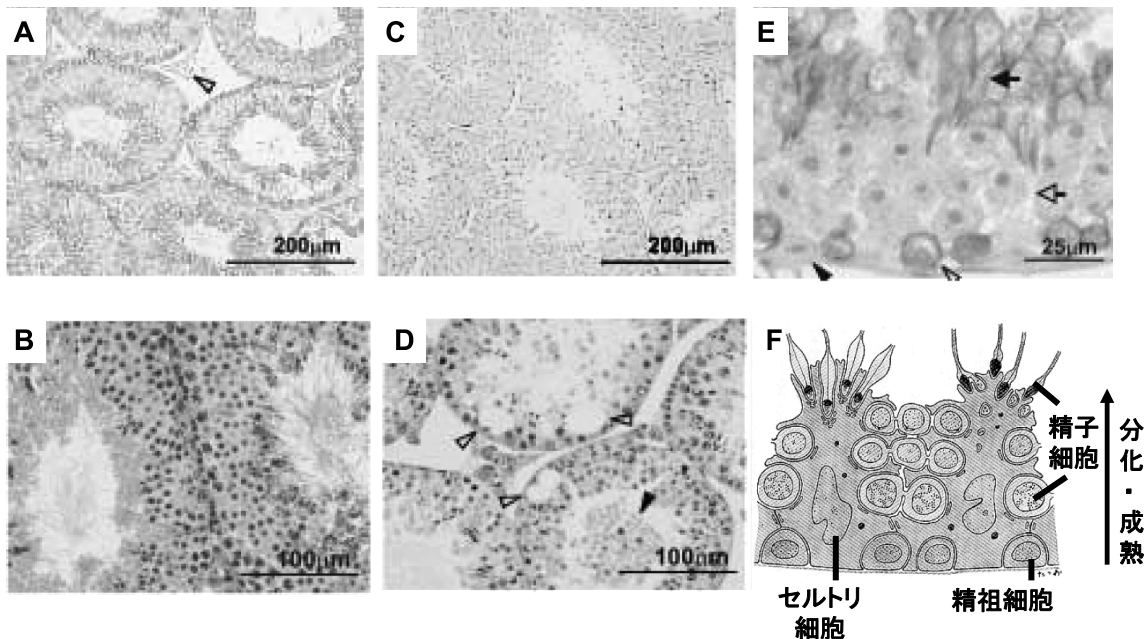


図 6 *Cadm1*^{-/-}マウスにおける精子細胞の精細管上皮からの滑脱 (文献 65)

Cadm1^{+/-}マウス精細管の CADM1 染色 (A, 拡大図 E), HE 染色 (B), *Cadm1*^{+/-}マウス精細管の CADM1 染色 (C), HE 染色 (D), 正常精細管上皮の模式図 (F; 藤田, 牛木 2004 より)

の滑脱細胞、或いはその直前の精子細胞は TUNEL アッセイで陽性に染まる割合が野生型マウスのそれと比較して顕著に増加しており、細胞接着の破綻した細胞の一部がアポトーシスを起こすことが示唆された。また、これら滑脱した細胞の成熟度を観察するとステップ7前後の細胞が多いことから、本来は CADM1 を発現するこの段階の精子細胞の、セルトリ細胞との接着が破綻したものと考えられた。しかし、セルトリ細胞自身は CADM1 を発現しないことから、セルトリ細胞側で精子細胞の CADM1 とヘテロ接合を示す分子が存在するはずであるが、未だ同定されていない。いずれにしても、CADM1 遺伝子が、精子形成に必須であることがマウスモデルで示され、ヒトにおいても男性不妊の原因となる可能性が示唆された⁶⁵⁾。同様の結果は別のグループからも報告されている^{66,67)}。

8. マスト細胞接着因子、シナプス接着分子としての機能と病態への関与

マスト細胞はヒスタミン顆粒を含み、アレルギー反応を含む様々な免疫・炎症反応に関与する。このマスト細胞は全身を巡回するが、局所で組織の細胞と接触し、一過性の免疫シナプスと呼ばれる接着を形成することにより活性化されると考えられている。Ito らは全身のマスト細胞を欠如する受容体型チロシンキナーゼ KIT の遺伝子変異マウスや、転写因子 MITF 変異マウスの解析から、KIT を介したマスト細胞と間質細胞との接着に必須の接着分子として、CADM1/SgIGSF を同定した⁶⁸⁾。CADM1 の発現を抑制すると、腹腔内のマスト細胞の腹膜への接着が低下し、結果として生存マスト細胞の数が減少する⁶⁹⁾。また、マスト細胞は様々な神経炎にも関与するが、神経細胞とマスト細胞とが CADM1 を介して接着すること、この時にヒスタミンが遊離されることが、マウスを用いた実験で Furuno らにより明らかにされている⁷⁰⁾。さらにマスト細胞は気管支喘息の発症にも関与するが、Yang らはマスト細胞の気管支平滑筋細胞との接着に CADM1 が関わり、この接着によりヒスタミンが遊離されて気管支平滑筋が攣縮を起こすことを、マウスを用いた実験で報告した⁷¹⁾。これらは、未だ動物実験の段階での知見であるが、CADM1 がマスト細胞の接着を介してヒトの腹膜炎、神経炎、気管支喘息にも関わる可能性が示唆され、今後の研究の発展が期待される。この領域の研究の詳細については紙面の都合で割愛するが、Ito, Kitamura らの優れた総説を参照されたい^{72,73)}。

さらに、CADM1 と同一分子はシナプス特異的接着分子 SynCAM1 としても、Biederer らにより同定された³¹⁾。CADM1/SynCAM1 はシナプス前膜、後膜の間でもホモフィリックに結合し、細胞接着を誘導する。注目すべきことには、 β -ニューレキシン・ニューロリジンの系と同様に、CADM1/SynCAM1 を発現させた非神経細胞は神経細

胞との間にシナプス形成を誘導することができる。さらに、グルタミン酸受容体 GluR2 を CADM1/SynCAM1 と共発現させると、本来はシナプスを形成しない腎由来の HEK293 細胞に機能的シナプス形成を誘導することも示され、シナプス接着における重要な IgCAM と考えられている。この点に関しても、詳細は総説を参照されたい⁷⁴⁾。









ま と め

以上、免疫グロブリン細胞接着分子 CADM1/TSLOC1 の多彩な機能について紹介した。上皮や神経におけるホモ結合のみならず、腫瘍免疫、精子形成、マスト細胞における異なる系統の細胞間のヘテロ結合が、その多様な生理的活性を担っていることが次第に明らかになってきた。各局面における細胞間接着因子や細胞内結合タンパク質、生理的機能と、その異常に基づく病態について表3にまとめた⁷⁵⁾。免疫グロブリンスーパーファミリー分子群は脊椎動物では100種類以上存在し、膜の増殖因子受容体として機能する分子群と細胞接着分子として機能する分子群とに大別される。いずれにしても、免疫グロブリン様ループの多様性に基づく時間的、空間的結合の特異性が、この極めて興味深い分子群の生理的特性を担っているものと考えられる。これらの現象の解明には、従来の分子細胞生物学的手法に加えて、今後、動物モデルが必須であり、さらに患者組織やヒトの疫学的解析も必要となるであろう。分子、細胞から動物、ヒトの病理、疫学までを含めた疾患科学として、細胞接着現象、並びにその異常たるがんを捉えていきたいと筆者は考えている。

謝辞

上記の研究の多くは、国立がんセンター研究所がん抑制ゲノム研究プロジェクト、並びに東京大学医科学研究所人癌病因遺伝子分野で行った仕事、並びに共同研究の成果である。遺伝子同定から機能解析に至る一連の仕事を担当してくれた倉持正己、福原浩、信國宇洋、増田(丸山)智子、深見武史、増田万里、櫻井(八下田)美佳、磯貝香奈、Williams (名手) 祐子、菊池慎二、山田大介、薄井真悟、坪井裕見、市原博美、永田政義、尾鼻孝滋、岩井美和子、岩田聖子の諸氏に感謝の意を表したい。この中の8人は現在も同じ職場で研究を続けてくれている。また、共同研究者である神戸大学の伊藤彰彦博士、宮崎大学の森下和広博士、金沢大学の若山友彦博士、筑波大学の鬼塚正孝博士、国立がんセンターの金井弥栄博士、松野吉宏博士、浅村尚生博士、垣添忠生博士、東京大学の北村唯一博士、国立医薬品食品衛生研究所の吉田緑博士、済生会中和病院の堤雅彦博士、並びに米国 Johns Hopkins 大学の Roger H. Reeves 博士に深謝申し上げる。最後に、研究全般にわたり御指導を戴いた国立がんセンターの広橋説雄博士、東京大学の洪

表3 CADM1 は特異的な結合に基づき多彩な病態に関与する (文献 75) *マウスでの結果

組織	CDM1 発現細胞	相手細胞	下流分子	共役機能	病的意義
上皮	上皮細胞 (構成的) 	上皮細胞 (構成的)	4.1B, 4.1N MPP1-3 Pals2, CASK	上皮様 細胞形態 (TSLC1/Necl-2)	腫瘍形成
がん免疫	がん細胞 (構成的) 	NK 細胞 (誘導)	4.1B, 4.1N MPP1-3 Pals2, CASK	細胞障害	免疫監視* 腫瘍拒絶
	抗原提示細胞 	CD8 ⁺ T (誘導)	?	IF- γ 産生	
シナプス	シナプス前膜 (構成的) 	シナプス後膜 (構成的)	CASK syntenin	シナプス形成 (SynCAM1)	未報告
精巣	精子細胞 (構成的) 	セルトリ細胞 (構成的?)	?	精子成熟 (SgIGSF)	雄性不妊*
ATL	ATL 細胞 (異所性) 	血管内皮 線維芽細胞	?	接着、浸潤	ATLの 浸潤
マスト細胞	マスト細胞 (構成的) 	線維芽細胞 平滑筋細胞	?	寿命延長 ヒスタミン遊離	腹膜炎* 喘息*
	マスト細胞 (構成的) 	神経細胞 (構成的)	?	ホメオスタシス ヒスタミン遊離	神経炎*

谷正史博士, 並びに恩師の関谷剛男博士に心より御礼申し上げます。

文 献

- 1) Yokota, J. & Kohno, T. (2004) *Cancer Sci.*, 95, 197-204.
- 2) Dammann, R., Li, C., Yoon, J.H., Chin, P.L., Bates, S., & Pfeifer, G.P. (2000) *Nat. Genet.*, 25, 315-319.
- 3) 村上善則 (1998) がん抑制遺伝子 I (黒木, 澁谷編), 岩波講座現代医学の基礎 10 細胞増殖とがん, pp. 139-154, 岩波書店, 東京.
- 4) Murakami, Y. (2002) *Oncogene*, 21, 6936-6948.
- 5) Murayama, F. & Okada, Y. (1965) *Exp. Cell Res.*, 40, 154-158.
- 6) Harris, H., Miller, O.J., Klein, G., Worst, P., & Tachibana, T. (1969) *Nature*, 223, 363-368.
- 7) Fournier, R.E. & Ruddle, F.H. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 74, 319-323.
- 8) Weissman, B.E., Saxon, P.J., Pasquale, S.R., Jones, G.R., Geiser, A.G., & Stanbridge, E.J. (1987) *Science*, 236, 175-180.
- 9) Koi, M., Morita, H., Yamada, H., Satoh, H., Barrett, J.C., & Oshimura, M. (1989) *Mol. Carcinog.*, 2, 12-21.
- 10) Koi, M., Johnson, L.A., Kalikin, L.M., Little, P.F., Nakamura, Y., & Feinberg, A.P. (1993) *Science*, 260, 361-364.
- 11) Murakami, Y., Brothman, A.R., Leach, R.J., & White, R.L. (1995) *Cancer Res.*, 55, 3389-3394.
- 12) Pavan, W.J., Hieter, P., & Reeves, R.H. (1990) *Mol. Cell Biol.*, 10, 4163-4169.
- 13) Satoh, H., Lamb, P.W., Dong, J.T., Everitt, J., Boreiko, C., Oshimura, M., & Barrett, J.C. (1993) *Mol. Carcinog.*, 7, 157-164.
- 14) Iizuka, M., Sugiyama, Y., Shiraishi, M., Jones, C., & Sekiya, T. (1995) *Genes Chrom. Cancer*, 13, 40-46.
- 15) Arai, Y., Hosoda, F., Nakayama, K., & Ohki, M. (1996) *Genomics*, 35, 196-206.
- 16) Murakami, Y., Nobukuni, T., Tamura, K., Maruyama, T., Sekiya, T., Arai, Y., Gomyou, H., Tanigami, A., Ohki, M., Cabin, D., Frischmyer, P., Hunt, P., & Reeves, R.H. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 8153-8158.
- 17) Kuramochi, M., Fukuhara, H., Nobukuni, T., Kanbe, T., Maruyama, T., Ghosh, H.P., Pletcher, M., Isomura, M., Onizuka, M., Kitamura, T., Sekiya, T., Reeves, R.H., & Murakami, Y. (2001) *Nat. Genet.*, 27, 427-430.
- 18) Gomyo, H., Arai, Y., Tanigami, A., Murakami, Y., Hattori, M., Hosoda, F., Arai, K., Aikawa, Y., Tsuda, H., Hirohashi, S., Asakawa, S., Shimizu, N., Soeda, E., Sakaki, Y., & Ohki, M. (1999) *Genomics*, 62, 139-146.
- 19) Masuda, M., Yageta, M., Fukuhara, H., Kuramochi, M., Maruyama, T., Nomoto, A., & Murakami, Y. (2002) *J. Biol. Chem.*, 277, 31014-31019.
- 20) Takai, Y., Irie, K., Shimizu, K., Sakisaka, T., & Ikeda, W. (2003) *Cancer Sci.*, 94, 655-667.
- 21) Fukuhara, H., Kuramochi, M., Nobukuni, T., Fukami, T., Saino, M., Maruyama, T., Nomura, N., Sekiya, T., & Murakami, Y. (2001) *Oncogene*, 20, 5401-5407.
- 22) Fukami, T., Satoh, H., Maruyama, T., Fukuhara, H., Kuramochi, M., Takamoto, S., Momoi, T., & Murakami, Y. (2002) *Gene*, 295, 7-12.

- 23) Fukami, F., Fukuhara, H., Kuramochi, M., Maruyama, T., Isogai, K., Sakamoto, M., Takamoto, S., & Murakami, Y. (2003) *Int. J. Cancer*, **107**, 53–59.
- 24) Biederer, T. (2006) *Genomics*, **87**, 139–150.
- 25) Shingai, T., Ikeda, W., Kakunaga, S., Morimoto, K., Takekuni, K., Itoh, S., Satoh, K., Takeuchi, M., Imai, T., Monden, M., & Takai, Y. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 35421–35427.
- 26) Kakunaga, S., Ikeda, W., Itoh, S., Deguchi-Tawarada, M., Oh-tsuka, T., Mizoguchi, A., & Takai, Y.J. (2005) *Cell Sci.*, **118**, 1267–1277.
- 27) Yageta, M., Kuramochi, M., Masuda, M., Fukami, T., Fukuhara, H., Maruyama, T., Shibuya, T., & Murakami, Y. (2002) *Cancer Res.*, **62**, 5129–5133.
- 28) Tran, Y.K., Bogler, O., Gorse, K.M., Wieland, I., Green, M.R., & Newsham, I.F. (1999) *Cancer Res.*, **59**, 35–43.
- 29) Sun, C.X., Robb, V.A., & Gutmann, D.H. (2002) *J. Cell Sci.*, **115**, 3991–4000.
- 30) Fukuhara, H., Masuda, M., Yageta, M., Fukami, T., Kuramochi, M., Maruyama, T., Kitamura, T., & Murakami, Y. (2003) *Oncogene*, **22**, 6160–6165.
- 31) Biederer, T., Sara, Y., Mozhayeva, M., Atasoy, D., Liu, X., Kavalali, E.T., & Sudhof, T.C. (2002) *Science*, **297**, 1525–1531.
- 32) Mao, X., Seidlitz, E., Ghosh, K., Murakami, Y., & Ghosh, H.P. (2003) *Cancer Res.*, **63**, 7979–7985.
- 33) Frommer, M., McDonald, L.E., Millar, D.S., Collis, C.M., Watt, F., Grigg, G.W., Molloy, P.L., & Paul, C.L. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 1827–1831.
- 34) Jones, P.A. & Baylin, S.B. (2002) *Nat. Rev. Genet.*, **3**, 415–428.
- 35) Fukami, F., Fukuhara, H., Kuramochi, M., Maruyama, T., Isogai, K., Sakamoto, M., Takamoto, S., Murakami, Y. (2003) *Int. J. Cancer*, **107**, 53–59.
- 36) Kikuchi, S., Yamada, D., Fukami, T., Maruyama, T., Ito, A., Asamura, H., Matsuno, Y., Onizuka, M., & Murakami, Y. (2006) *Cancer*, **106**, 1751–1758.
- 37) Heller, G., Fong, K.M., Girard, L., Seidl, S., End-Pfützenreuter, A., Lang, G., Gazdar, A.F., Minna, J.D., Zielinski, C.C., & Zöchbauer-Müller, S. (2006) *Oncogene*, **25**, 959–968.
- 38) Hui, A.B., Lo, K.W., Kwong, J., Lam, E.C., Chan, S.Y., Chow, L.S., Chan, A.S., Teo, P.M., & Huang, D.P. (2003) *Mol. Carcinog.*, **38**, 170–178.
- 39) Lung, H.-L., Cheng, Y., Kumaran, M.K., Liu, E.T.-B., Murakami, Y., Chan, C.Y., Yau, W.L., Stanbridge, E.J., & Lung, M.L. (2004) *Int. J. Cancer*, **112**, 628–635.
- 40) Ito, T., Shimada, Y., Hashimoto, Y., Kaganoi, J., Kan, T., Watanabe, G., Murakami, Y., & Imamura, M. (2003) *Cancer Res.*, **63**, 6320–6326.
- 41) Honda, T., Tamura, G., Waki, T., Jin, Z., Sato, K., Motoyama, T., Kawata, S., Kimura, W., Nishizuka, S., & Murakami, Y. (2002) *Jpn. J. Cancer Res.*, **93**, 857–860.
- 42) Jansen, M., Fukushima, N., Rosty, C., Walter, K., Altink, R., Heek, T.V., Hruban, R., Offerhaus, J.G., & Goggins, M. (2002) *Cancer Biol. Ther.*, **1**, 293–296.
- 43) Allinen, M., Peri, L., Kujala, S., Lahti-Domenici, J., Outila, K., Karpinen, S.M., Launonen, V., & Winqvist, R. (2002) *Genes Chrom. Cancer*, **34**, 384–389.
- 44) Steenbergen, R.D., Kramer, D., Braakhuis, B.J., Stern, P.L., Verheijen, R.H., Meijer, C.J., & Snijders, P.J. (2004) *J. Natl. Cancer Inst.*, **96**, 294–305.
- 45) Li, J., Zhang, Z., Bidder, M., Funk, M.C., Nguyen, L., Goodfellow, P.J., & Rader, J.S. (2005) *Gynecol. Oncol.*, **96**, 150–158.
- 46) Fukuhara, H., Kuramochi, M., Fukami, T., Kasahara, K., Furu-hata, M., Nobukuni, T., Maruyama, T., Isogai, K., Sekiya, T., Shuin, T., Kitamura, T., Reeves, R.H., & Murakami, Y. (2002) *Jpn. J. Cancer Res.*, **93**, 605–609.
- 47) Surace, E.I., Murakami, Y., Scheithauer, B.W., Perry, A., & Gutmann, D.H. (2004) *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **63**, 1015–1027.
- 48) Zhang, J., Martins, C.R., Fansler, Z.B., Roemer, K.L., Kincaid, E.A., Gustafson, K.S., Heitjan, D.F., Clark, D.P. (2005) *Clin. Cancer Res.*, **11**, 6544–6549.
- 49) Lindsey, J.C., Lusher, M.E., Anderton, J.A., Bailey, S., Gilbertson, R.J., Pearson, A.D., Ellison, D.W., & Clifford, S.C. (2004) *Carcinogenesis*, **25**, 661–668.
- 50) Kikuchi, S., Yamada, D., Fukami, T., Masuda, M., Sakurai-Yageta, M., Williams, Y.N., Maruyama, T., Asamura, H., Matsuno, Y., Onizuka, M., & Murakami, Y. (2005) *Clin. Cancer Res.*, **11**, 2954–2961.
- 51) Gutmann, D.H., Donahoe, J., Perry, A., Lemke, N., Gorse, K., Kittiniyom, K., Rempel, S.A., Gutierrez, J.A., & Newsham, I.F. (2000) *Hum. Mol. Genet.*, **9**, 1495–1500.
- 52) Yamada, D., Kikuchi, S., Williams, Y.N., Sakurai-Yageta, M., Masuda, M., Maruyama, T., Tomita, K., Gutmann, D.H., Kaki-zoe, T., Kitamura, T., & Murakami, Y. (2006) *Int. J. Cancer*, **118**, 916–923.
- 53) Heller, G., Geradts, J., Ziegler, B., Newsham, I., Filipits, M., Markis-Ritzinger, E.M., Kandioler, D., Berger, W., Stiglbauer, W., Depisch, D., Pirker, R., Zielinski, C.C., & Zöchbauer-Müller, S. (2007) *Breast Cancer Res. Treat.*, **103**, 283–291.
- 54) Uchino, K., Ito, A., Wakayama, T., Koma, Y., Okada, T., Oh-bayashi, C., Iseki, S., Kitamura, Y., Tsubota, N., Okita, Y., & Okada, M. (2003) *Cancer*, **98**, 1002–1007.
- 55) Ito, A., Okada, M., Uchino, K., Wakayama, T., Koma, Y., Iseki, S., Tsubota, N., Okita, Y., & Kitamura, Y. (2003) *Lab. Invest.*, **83**, 1175–1183.
- 56) Goto, A., Niki, T., Chi-pin, L., Matsubara, D., Murakami, Y., Funata, N., & Fukayama, M. (2005) *Cancer Sci.*, **96**, 480–486.
- 57) Mao, X., Seidlitz, E., Truant, R., Hitt, M., & Ghosh, H.P. (2004) *Oncogene*, **23**, 5632–5642.
- 58) Masuda, M., Kikuchi, S., Maruyama, T., Sakurai-Yageta, M., Williams, Y.N., Ghosh, H.P., & Murakami, Y. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 42164–42171.
- 59) Galibert, L., Diemer, G.S., Liu, Z., Johnson, R.S., Smith, J.L., Walzer, T., Comeau, M.R., Rauch, C.T., Wolfson, M.F., Sorensen, R.A., Van der Vurst de Vries, A.R., Branstetter, D. G., Koelling, R.M., Scholler, J., Fanslow, W.C., Baum, P.R., Derry, J.M., & Yan, W. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 21955–21964.
- 60) Boles, K.S., Barchet, W., Diacovo, T., Cella, M., & Colonna, M. (2005) *Blood*, **106**, 779–786.
- 61) Arase, N., Takeuchi, A., Unno, M., Hirano, S., Yokosuka, T., Arase, H., & Saito, T. (2005) *Int. Immunol.*, **17**, 1227–1237.
- 62) Sasaki, H., Nishikata, I., Shiraga, T., Akamatsu, E., Ishida, Y., Fukami, T., Hidaka, T., Kubuki, Y., Okayama, A., Hamada, K., Okabe, H., Murakami, Y., Tsubouchi, H., & Morishita, K. (2005) *Blood*, **105**, 1204–1213.
- 63) Wakayama, T., Ohashi, K., Mizuno, K., & Iseki, S. (2001) *Mol. Reprod. Dev.*, **60**, 158–164.
- 64) Wakayama, T., Koami, H., Ariga, H., Kobayashi, D., Sai, Y., Tsuji, A., Yamamoto, M., & Iseki, S. (2003) *Biol. Reprod.*, **68**, 1755–1763.
- 65) Yamada, D., Yoshida, M., Williams, Y.N., Fukami, T.,

- Kikuchi, S., Masuda, M., Maruyama, M., Ohta, T., Nakae, D., Maekawa, A., Kitamura, T., & Murakami, Y. (2006) *Mol. Cell Biol.*, **26**, 3610–3624.
- 66) Weyden, L.V.D., Arends, M.J., Chausiaux, O.E., Lange, U.C., Surani, M.A., Affara, N., Murakami, Y., Adams, D.J., & Bradley, A. (2006) *Mol. Cell Biol.*, **26**, 3595–3609.
- 67) Fujita, E., Soyama, A., & Momoi, T. (2001) *Exp. Cell Res.*, **287**, 57–66.
- 68) Ito, A., Jippo, T., Wakayama, T., Morii, E., Koma, Y., Onda, H., Nojima, H., Iseki, S., & Kitamura, Y. (2003) *Blood*, **101**, 2601–2608.
- 69) Ito, A., Koma, Y., Watabe, K., Jippo, T., Wakayama, T., Iseki, S., & Kitamura, Y. (2004) *Biophys. Biochem. Res. Commun.*, **319**, 200–206.
- 70) Furuno, T., Ito, A., Koma, Y., Watabe, K., Yokozaki, H., Bienstock, J., Nakanishi, M., & Kitamura, Y. (2005) *J. Immunol.*, **174**, 6934–6942.
- 71) Yang, W., Kaur, D., Okayama, Y., Ito, A., Wardlaw, A.J., Brightling, C.E., & Bradding, P. (2006) *J. Immunol.*, **176**, 1238–1243.
- 72) Watabe, K., Ito, A., Koma, Y.I., & Kitamura, Y. (2003) *Histol. Histopathol.*, **18**, 1321–1329.
- 73) Kitamura, Y. & Ito, A. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 11129–11130.
- 74) Yamagata, M., Sanes, J.R., & Weiner, J.A. (2003) *Curr. Opin. Cell Biol.*, **15**, 621–632.
- 75) Murakami, Y. (2005) *Cancer Sci.*, **96**, 543–552.
- 76) Wada, M., Ihara, Y., Tatsuka, M., Mitsui, H., Kohno, K., Kawanano, M., & Schlessinger, D. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **200**, 1693–1700.
- 77) Todd, M.C., Xiang, R.H., Garcia, D.K., Kerbacher, K.E., Moore, S.L., Hensel, C.H., Liu, P., Siciliano, M.J., Kok, K., van den Berg, A., Veldhuis, P., Buys, C.H., Killary, A.M., & Naylor, S.L. (1996) *Oncogene*, **13**, 2387–2396.
-