

## The 23rd Lung Cancer Workshop

### がん抑制遺伝子 CADM1/TSLC1 による肺がん抑制機構の解析

村上善則<sup>1</sup>

#### Involvement of a Tumor Suppressor Protein CADM1/TSLC1 in Human Non-small Cell Lung Cancer

Yoshinori Murakami<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Division of Molecular Pathology, Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Japan.*

**ABSTRACT** — **Purpose.** Aberration of a novel tumor suppressor gene, *CADM1* (*cell adhesion molecule 1*)/*TSLC1* (*tumor suppressor in lung cancer 1*), and its pathological significance in multistage carcinogenesis of non-small cell lung cancer (NSCLC) were investigated. **Methods.** Methylation of the gene promoter was analyzed by bi-sulfite sequencing or bi-sulfite single-strand conformation polymorphism (SSCP) methods. Functions of *CADM1* protein were examined by immunohistochemistry, immunoblotting and immunoprecipitation assays using specific antibodies against *CADM1*. Specific proteins that interact with *CADM1* were identified by yeast 2-hybrid screening. Expression of *CADM1* protein was induced in cells by introducing a plasmid containing a full-length *CADM1*, while *CADM1* expression was suppressed by siRNA specific to *CADM1* mRNA. **Results.** We show that *CADM1* acts as an epithelial cell adhesion molecule, associates with 4.1B/DAL-1 as well as MPP3 proteins, and participates in formation of an epithelia-like cell structure. In human NSCLC, promoter methylations of the *CADM1* and the *4.1B* genes are observed in 45 (44%) and 59 (57%) out of 103 tumors, respectively. These methylations are preferentially detected in advanced NSCLC and correlate with poor prognosis. **Conclusion.** A novel molecular cascade that contains a cell adhesion molecule, *CADM1*, and an actin-binding protein, 4.1B, as its main components, is critically involved in tumor suppression in human non-small cell lung cancer.

(JLCC. 2009;49:910-916)

**KEY WORDS** — Non-small cell lung cancer, Tumor suppressor gene, *CADM1*/*TSLC1*, 4.1B/DAL-1, Promoter methylation

Reprints: Yoshinori Murakami, Division of Molecular Pathology, Institute of Medical Science, The University of Tokyo, 4-6-1 Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo 108-8639, Japan (e-mail: ymurakam@ims.u-tokyo.ac.jp).

**要旨** — **目的.** 非小細胞肺がん (NSCLC) の新規がん抑制遺伝子 *CADM1*/*TSLC1* の非小細胞肺がんにおける異常の実態とその意義を明らかにする. **方法.** *CADM1* 遺伝子プロモーター領域のメチル化は重亜硫酸処理・塩基配列決定法, 重亜硫酸処理・SSCP 法にて解析した. *CADM1* タンパク質は, 特異抗体を用いた免疫組織染色, 免疫ブロット, 免疫沈降法などにより解析した. 結合タンパク質は酵母 2 ハイブリッド法などにより同定した. *CADM1* の発現とその抑制は, 全長 cDNA, あるいは特異的 siRNA の導入により行った. **結果.** *CADM1* が細胞接着分子として機能し, 細胞内では 4.1B/DAL-1 や

MPP3 と結合すること, 上皮様細胞形態の形成に必須であることを見出した. NSCLC 103 例の解析から, *CADM1*, *4.1B* 遺伝子のメチル化による不活化が 45 例 (44%), 59 例 (57%) にそれぞれ認められ, がんの進展に伴って不活化すること, 肺腺がんでは患者の予後不良と相関することを見出した. **結論.** 細胞接着分子 *CADM1*, アクチン結合タンパク質 4.1B を含む分子経路が, 非小細胞肺がんの重要な腫瘍抑制経路であることを明らかにした.

**索引用語** — 非小細胞肺がん, がん抑制遺伝子, *CADM1*/*TSLC1*, 4.1B/DAL-1, メチル化

<sup>1</sup>東京大学医科学研究所人癌病因遺伝子分野.  
別刷請求先: 村上善則, 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 (e-mail: ymurakam@ims.u-tokyo.ac.jp).

## 目的と背景

非小細胞肺癌 (Non-small cell lung cancer : NSCLC) は、多数の遺伝子、DNA の異常により多段階を経て発生、進展する。その鍵となる分子経路の解明が、がんの新しい分子標的治療へと発展することは、EGFR のキナーゼ阻害剤が、肺癌の分子標的薬として確立された事実からも明らかである。しかし、細菌と抗生物質の長年の戦いの如く、分子標的治療薬に対しても、耐性がん細胞の出現が不可避であることも同時に明らかになってきた。これを克服するためには、さらに多数の分子標的の確立が望まれ、従来のがんの基礎研究によって見出されてきた分子群に加え、がんの網羅的な遺伝子構造解析、発現解析によって新たな分子標的を見出す努力が続けられている。我々が同定した NSCLC のがん抑制遺伝子 Cell adhesion molecule 1 (CADM1)/Tumor suppressor in lung cancer 1 (TSLC1) は細胞接着分子をコードし、上皮様形態形成に関わり、肺癌の進展に伴って不活化する重要な分子経路を担っている。ここでは、その実態と肺癌進展における意義について、最近の知見を紹介したい。

## 方法と結果

### 1. 新規がん抑制遺伝子 TSLC1 の同定

非小細胞肺癌 (NSCLC) では、*KRAS2*, *NRAS* 遺伝子の変異、*EGFR* 遺伝子の増幅と変異、*TP53*, *RB1*, *CDKN1A/p16* 遺伝子の不活化など様々な遺伝子異常が認められる。また、第3染色体短腕(3p), 9p, 11q, 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、3p では *RASSF1*, 9p では *CDKN1A/p16*, 13q では *RB1*, 17p では *TP53* 遺伝子の不活化に各々対応すると考えられる。<sup>12</sup> 我々は 11q の LOH が NSCLC の進展に伴って認められることに注目し、NSCLC 由来 DNA で共通欠失を示す 11q23 領域の DNA 断片を肺腺がん細胞 A549 に導入し、そのヌードマウス皮下における腫瘍原性の抑制を指標として、新規がん抑制遺伝子 TSLC1 を同定した。<sup>34</sup>

CADM1 mRNA はリンパ球を除くすべての組織で発現し、免疫プロット解析では、精巣、脳、肺、腎などに強く発現するが、A549 を含む NSCLC 細胞 12 例中 6 例では発現の欠如、あるいは著明低下を示した。そして、遺伝子発現欠如を示す細胞や原発性 NSCLC の一部で CADM1 遺伝子プロモーター領域のメチル化が認められた。さらに、CADM1 を A549 細胞に導入すると、正常肺と同レベルまでその発現を回復した複数の細胞クローンで、ヌードマウス皮下での腫瘍原性が著しく抑制された。以上の結果から、CADM1 は NSCLC の新規がん抑制遺

伝子であると結論づけた。<sup>4</sup> その後、TSLC1 はがんのみならず、精子形成、<sup>5</sup> シナプス接着、<sup>6</sup> マスト細胞接着、<sup>7</sup> 上皮接着、<sup>8</sup> 成人 T 細胞性白血病 (ATL)、<sup>9</sup> 腫瘍免疫<sup>10-12</sup> などにおいても重要な機能を果たすことが明らかになったことから、国際会議を開き、我々の提案により、遺伝子名を Cell adhesion molecule 1 (CADM1) と統一した。

### 2. CADM1 蛋白質の機能と分子経路

CADM1 は分子量約 100 kD の免疫グロブリン様ループを 3 個もつ 1 回膜貫通性蛋白質で、N-CAM, Nectin などと相同性を示し、Nectin-like molecule-2 (Nectin-2) とも呼ばれる。<sup>8</sup> CADM1 は細胞の接着面に沿って発現し、極性細胞では壁側細胞膜に分布する。我々は CADM1 が N-型、O-型糖鎖付加を受け、シス、トランス-ホモ 2 量体を形成し、細胞凝集活性を示し、免疫グロブリン・スーパーファミリー細胞接着分子 (Immunoglobulin superfamily cell adhesion molecule : IgCAM) として働くことを示した。<sup>13</sup> 従って、CADM1 の機能破綻は、がん細胞の浸潤・転移を引き起こすものと予想される。

次に我々は、CADM1 が、その細胞内領域に存在する 4.1 結合モチーフを介して細胞裏打ち蛋白質 4.1B/DAL-1 (Differentially expressed in Adenocarcinoma of the Lung) と結合し、アクチン細胞骨格に作用することを報告した。<sup>14</sup> 4.1B は肺腺がんが発現が低下することから、肺癌の抑制遺伝子候補として単離されていた分子であり、家族性腫瘍の一つである神経線維腫症 2 型の原因である NF2 遺伝子産物とも相同性を有する。<sup>15</sup> さらに我々は、CADM1 が細胞内領域 C 端に存在する PDZ 結合ドメインを介して、ショウジョウバエのがん抑制蛋白質 Dlg のヒトホモログの一つである MPP3 と複合体を形成することを見出した。<sup>16</sup> CADM1 は 4.1B の相合体 4.1N や、MPP3 の類似体 MPPI, MPP2, CASK, Pals2 などともそれぞれ結合する。<sup>17,18</sup> このように、CADM1 は細胞接着のシグナルを細胞内に伝達し、細胞骨格や極性形成の制御を通じて上皮細胞の腫瘍形成を抑制する重要な分子経路の出発点となっており、その下流分子もそれぞれ、がん抑制遺伝子として機能する可能性が考えられた (Figure 1)。

### 3. ヒトがんにおける CADM1 遺伝子のメチル化

上述のように、CADM1 遺伝子は原発性 NSCLC の多くで 2 ヒットによる不活化を示す。これまでの解析から、その分子機構として、対立遺伝子座 (アレル) 欠失+塩基配列異常によるものはごく一部であり、大部分はアレル欠失+プロモーターメチル化、あるいは両アレルのメチル化によることが明らかになった。そこで、CADM1 遺伝子のメチル化の実態とその意義について、多数の手術例を用いて検討した。CADM1 のプロモーター領域には CpG アイランドに相当する塩基配列が存在する。重垂

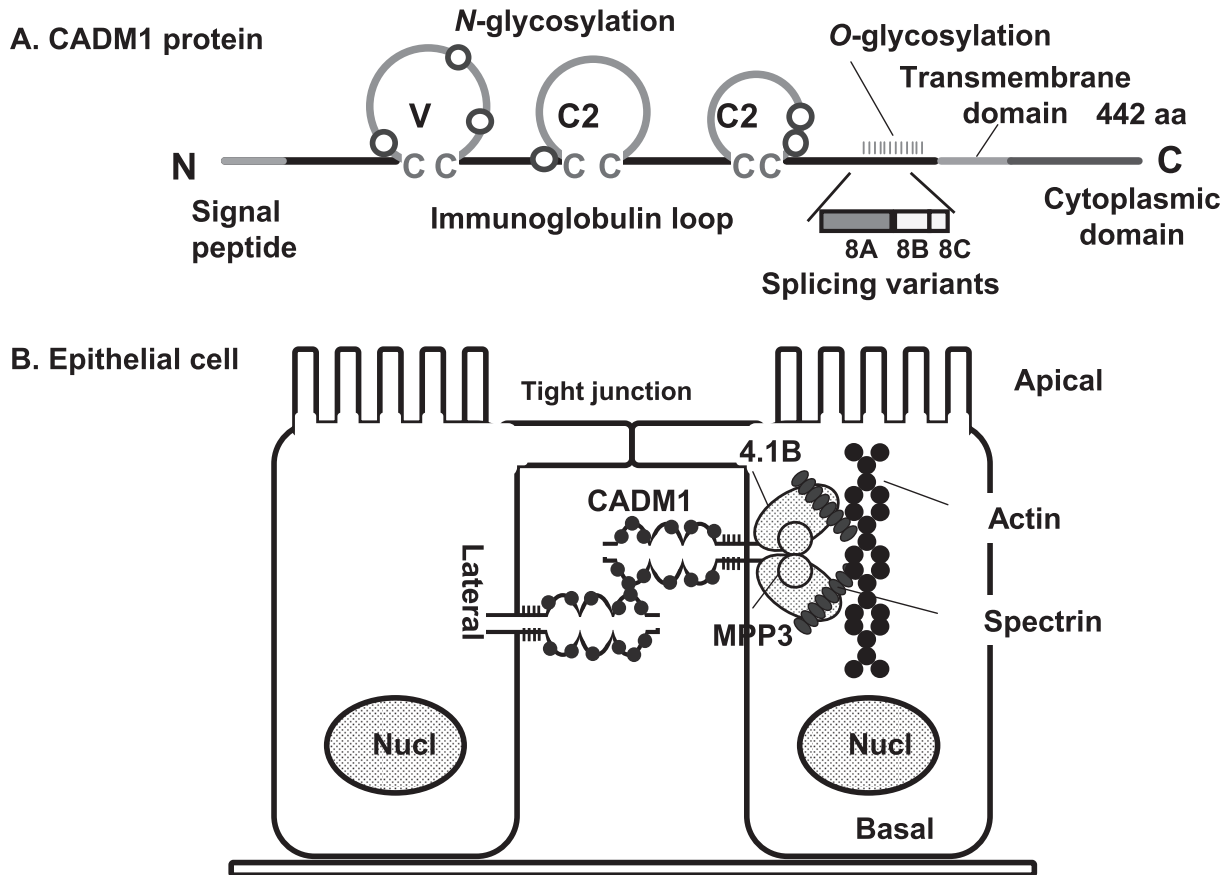


Figure 1. Schematic representation of the CADM1 protein (A) and its cascade in epithelial tissues (B) (Ref. 18).

硫酸・塩基配列決定法によってこの領域の CpG 配列を解析すると、転写開始点直上の6個の CpG 部位のメチル化が発現欠如と強く相関することが NSCLC 細胞で明らかになった。<sup>4</sup> そこで原発性 NSCLC についても、この部位のメチル化を重亜硫酸・塩基配列決定法、あるいは重亜硫酸・SSCP (Bi-sulfite (BS)-SSCP) 法を用いて検討した。Figure 2 に示すように、BS-SSCP 法は、メチル化の全貌を定量的に、かつ簡便に解析できる有用な方法である。<sup>19</sup> この結果、NSCLC 103 例中 45 例(44%)で CADM1 遺伝子のメチル化を見出した (Table 1)。メチル化は NSCLC のすべての組織型で認められたが、特に喫煙歴の濃い男性患者の腫瘍で有意に高頻度に認められ、CDKN1A/p16, RASSF1 遺伝子での報告と同様、発がんの背景としての遺伝子メチル化の役割が示唆された。<sup>20</sup>

また、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、他の様々な腫瘍についても 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、乳がんの約 30%、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 (Table

1)。<sup>18</sup> 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示された。<sup>21</sup> このように、CADM1 は今では第 11 染色体長腕の代表的ながん抑制遺伝子と考えられ、NSCLC 以外の様々な腫瘍の進展にも関わることを示されている。

#### 4. CADM1, 4.1B 遺伝子のメチル化と予後

CADM1 ががん抑制遺伝子であれば、その結合タンパク質である 4.1B や MPP 分子群も、同じくがん抑制遺伝子として機能する可能性が示唆される。そこで我々は、上述の 103 例の NSCLC 腫瘍について、まず 4.1B の不活化の有無を検討し、4.1B 遺伝子のプロモーター領域のメチル化が 103 例 59 例 (57%) に認められ、扁平上皮がんでは早期から、また腺がんでは臨床病期の進行に伴って不活化することを見出した (Table 2, 3, Figure 3)。<sup>22</sup> 4.1B を肺腺がん細胞に導入すると、その増殖が抑えられることも示されているので、4.1B も NSCLC の重要ながん抑制遺伝子として機能することと考えられる。<sup>15</sup> さらに我々は、4.1B のメチル化が腎明細胞がん 55 例中 25 例 (45%) にも認められることを示し、4.1B が NSCLC のみならず、他の様々な腫瘍においても不活化の標的と

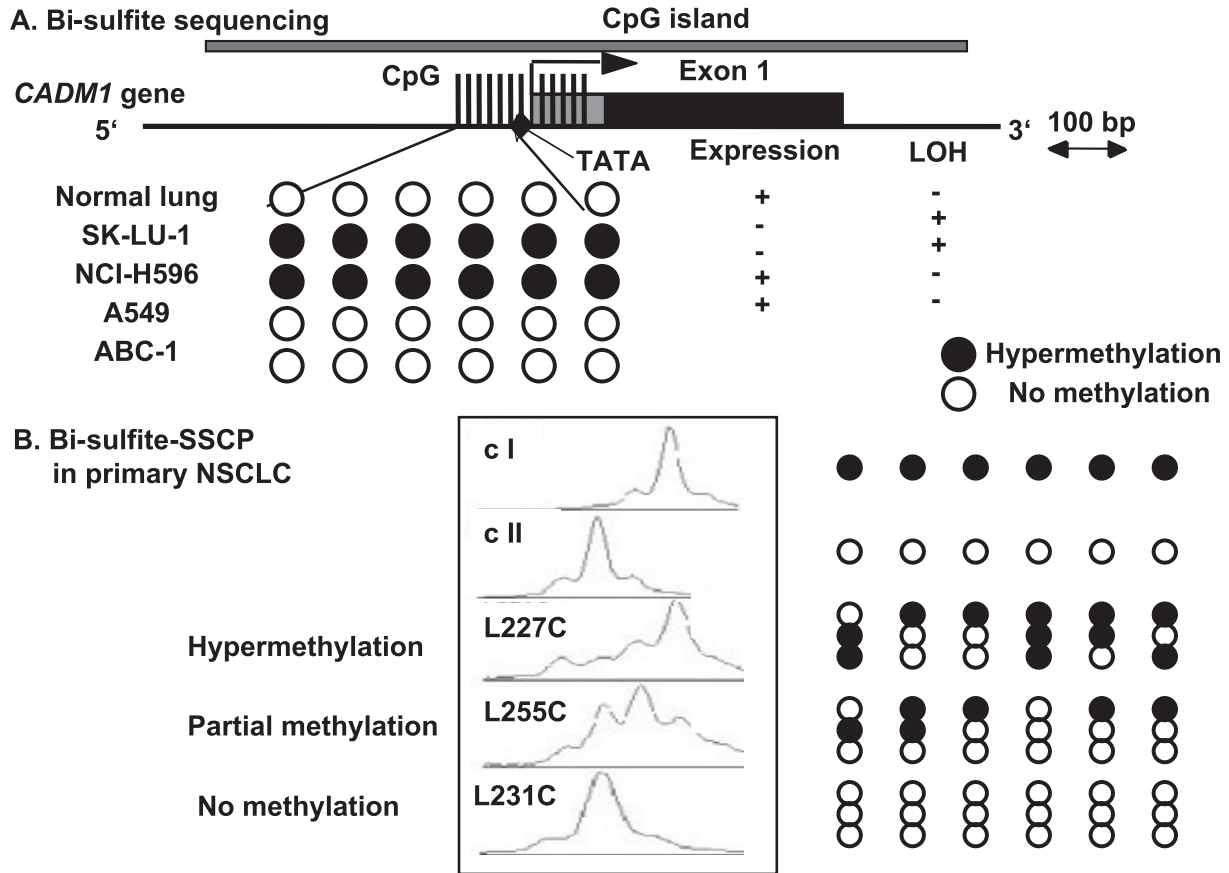


Figure 2. Analysis of promoter methylation of the CADM1 gene in NSCLC (Ref. 19, 20).

Table 1. Inactivation of the CADM1 and 4.1B Gene in Human Cancers (Ref. 18-24)

Tumor	Promoter methylation (primary tumors) (%)	Loss of expression (cell lines) (%)	Suppression of tumorigenicity (cell lines)
<b>1. CADM1 gene</b>			
Non-small cell lung ca.	45/103 (44)	6/12 (50)	A549
Small cell lung ca.	NR	2/10 (20)	
Nasopharyngeal ca.	13/38 (34)	2/5 (40)	
Esophageal ca. *	28/56 (50) *	3/3 (100)	KYSE520
Gastric ca.	15/97 (15)	8/9 (89)	
Hepatocellular ca.	4/14 (29)	3/8 (38)	
Pancreatic ca.	25/91 (27)	8/11 (73)	
Breast ca.	10/30 (33)	1/3 (33)	
Cervical ca.	30/52 (58)	9/10 (90)	SiHa
Prostate ca.	7/22 (32)	2/5 (40)	PPC-1
Meningioma *	26/41 (63) *	3/10 (30)	
Anal squamous cell ca.	9/12 (75)	NR	
Medulloblastoma	0/30 (0)	NR	
<b>2. 4.1B gene</b>			
Non-small cell lung ca.	59/103 (57)	8/11 (73)	
Renal clear cell ca.	25/45 (56)	12/19 (63)	
Medulloblastoma	NR	16/26 (62)	

\* Loss of expression. NR, not reported.

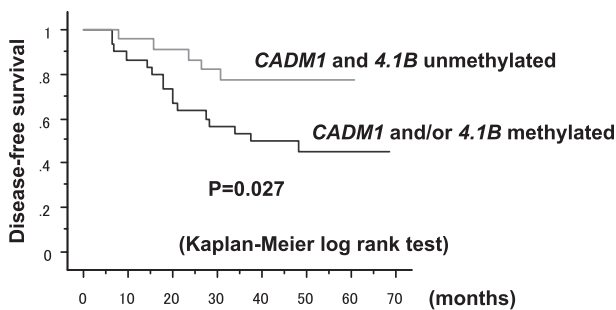
**Table 2.** Promoter Methylation of the *CADM1* and *4.1B* Genes and Clinicopathologic Characteristics in Primary NSCLC (Ref. 20, 22)

Parameters	No. of tumors analyzed	Methylation of the <i>CADM1</i>	<i>p</i>	Methylation of the <i>4.1B</i>	<i>p</i>
Total	103	45 (44%)		59 (57%)	
Gender					
Male	74	36 (49%)	0.027	41 (55%)	NS
Female	29	9 (31%)		18 (62%)	
Histology					
Adenoca.	68	29 (43%)	NS	34 (50%)	NS
Sq. cell ca.	26	14 (54%)		19 (73%)	
Ad sq cell ca.	2	1 (50%)		2 (100%)	
Large cell ca.	7	1 (14%)		4 (57%)	
Stage					
I	51	21 (41%)	NS	25 (49%)	0.010
II	27	12 (44%)		14 (52%)	
III	22	11 (50%)		17 (77%)	
IV	3	1 (33%)		3 (100%)	
Smoking index					
<799	46	13 (28%)	0.0054	22 (48%)	NS
800-	57	32 (56%)		37 (65%)	

**Table 3.** Promoter Methylation of the *CADM1* and *4.1B* Genes in Primary NSCLC (Ref. 22)

		<i>4.1B</i> gene		total
		methylation	no methylation	
<i>CADM1</i>	methylation	33 (32%)	12 (12%)	45 (44%)
	no methylation	26 (25%)	32 (31%)	58 (56%)
	total	59 (57%)	44 (43%)	103 (100%)

71 (69%), P=0.0049



**Figure 3.** Disease-free survival of a patient with lung adenocarcinoma (Ref. 22).

なる可能性を示している。<sup>23</sup>

*CADM1*, *4.1B* 遺伝子のメチル化の有無と患者の予後との相関を 68 例の肺腺がんについて Kaplan-Meier 法により検討した。この結果、*CADM1*, *4.1B* いずれにおいても、遺伝子メチル化を示した症例は、メチル化を示さ

なかった症例と比較して、有意に予後が不良であった。さらに、両遺伝子のメチル化について検討すると、103 例中 71 例 (69%) の NSCLC で、*CADM1*, *4.1B* 遺伝子のいずれか一方がメチル化により不活化しており、この経路の異常が NSCLC の進展に深く関与することが示された。そして、*CADM1*, *4.1B* 遺伝子のいずれか一方にメチル化を示した腺がん症例は、ともに非メチル化であった症例と比較して、有意に予後が不良であった。<sup>20</sup> 以上の事実、NSCLC の進展に、*CADM1*, *4.1B* の経路が極めて重要であることを示唆している。もっとも、遺伝子メチル化と予後との相関は、他の多くの遺伝子についても示されていることから、上記の結果は、がん細胞のメチル化表現型 (Methylator phenotype) の有無を現しているという解釈も成り立つことも事実であり、さらに多数の遺伝子の検索が必要である。また、スイスの Heller らも NSCLC 腫瘍 268 例中 100 例 (37%) に *CADM1* のメチル化を、また 147 例 (55%) に *4.1B* のメチル化を見出

し、さらに、4.1B のメチル化が臨床病期の進展に伴って増加することを報告している。<sup>24</sup> これらの報告から、CADM1, 4.1B 両遺伝子のメチル化が NSCLC における重要な変化であることが確立された。

これに対し、Ito ら、Uchino らは CADM1 に対する特異抗体を用いた免疫組織染色により、CADM1 の発現欠如が肺腺がんの浸潤性腫瘍において、より選択的に認められること、また、発現欠如が臨床病期、リンパ節転移、リンパ管侵襲、血管浸潤と相関し、予後不良とも相関することを報告している。<sup>25,26</sup> 一方、Goto らも 30 例の肺腺がんの同一腫瘍における浸潤部、非浸潤部の CADM1 の発現を免疫組織染色によって解析し、CADM1 の発現が Bronchioloalveolar carcinoma 様の部分では認められるが、浸潤部では選択的に欠如することを見出し、CADM1 の発現欠如が浸潤と相関することを報告している。<sup>27</sup>

### 5. CADM1 による腫瘍形成の抑制と転移の抑制

CADM1 はその同定の経過から明らかのように、NSCLC 細胞 A549 に対する強い腫瘍原性抑制活性を示す。また CADM1 による腫瘍原性抑制は、発現欠如を示す前立腺がん、食道がん、子宮がん、鼻咽頭がん細胞などでも同様に認められる。<sup>18</sup> さらに我々は、A549 細胞に CADM1、並びにコントロールベクターを導入した細胞クローンをヌードマウスの脾臓に注入し、6 週間後の肝臓への転移形成を検討して、CADM1 導入細胞では脾臓から肝臓への転移が完全に抑えられることを報告した。<sup>14</sup> Mao らは、マウス皮下に移植した A549 細胞由来の腫瘍に CADM1 をレトロウイルスベクターにより導入することにより、腫瘍の増殖が著明に抑制され、この際、アポトーシスが強く誘導されることを示している。<sup>28</sup> これらの結果は、CADM1 ががん治療の標的分子としても機能する可能性を示唆するものである。

また我々は、CADM1 の発現を誘導すると、肝細胞増殖因子 Hepatocyte growth factor (HGF) による培養イヌ腎細胞 Madin-Darby canine kidney (MDCK) Cell の 2 次元培養での分散、3 次元培養での管腔形成が著明に抑制されることを示し、CADM1 が上皮・間葉転換を実験的に抑制する可能性を示した。<sup>29</sup> さらに CADM1 の発現を siRNA により抑制すると、培養上皮細胞の細胞接着が破綻して上皮様細胞形態が失われ、トランスフォーム細胞様の形態に変化することを見出している。これらの結果は、CADM1 が細胞接着、細胞骨格の制御を通して上皮としての形質の維持に働く可能性を支持するものである。

さらに CADM1 の遺伝子欠損マウスを作成したところ、オスのホモ欠損マウスが雌性不妊、精子形成障害を示し、CADM1 が生理的には精子形成に必須であることが明らかになった。<sup>30</sup> 他の重要臓器の発生には異常は認

められなかったが、最近、長期飼育により、ホモ欠損マウスに肺腺腫、肺腺がんが一定の頻度で発生することを観察している。遺伝的背景として用いた C57BL6 は、肺がんの自然発生や 4-(N-methyl-N-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) による肺発がん実験ではむしろ腫瘍抵抗性を示すことから、非常に興味深い事実と考え、肺がんの分子機構の解明や予防研究のための新しいモデルになる可能性を含めて解析を進めている。

### 結 論

細胞接着分子 CADM1、アクチン結合タンパク質 4.1B を含む分子経路が、非小細胞肺がんやその他の腫瘍の進展に関わる重要な腫瘍抑制経路であること、予後不良の指標となること、腫瘍抑制、転移抑制の標的分子となる可能性について示した。これらの結果は、CADM1 の分子経路が細胞接着シグナルを細胞骨格や形態形成の制御につなげ、上皮様形質を保持する機能をもつことに起因すると考えられる。肺がんの発生、進展には、EGFR, K-ras などのシグナル伝達経路の亢進、p53 などの細胞周期や細胞死を司る核内タンパク質とともに、細胞間相互作用に基づく形態と増殖を制御する接着分子群の異常が重要である。今後、遺伝子欠損マウスでの発がん機構の解析を含め、細胞接着とがん進展の研究を進展させることが必要である。

### REFERENCES

1. Yokota J, Kohno T. Molecular footprints of human lung cancer progression. *Cancer Sci.* 2004;95:197-204.
2. Tomida S, Yatabe Y, Yanagisawa K, Mitsudomi T, Takahashi T. Throwing new light on lung cancer pathogenesis: updates on three recent topics. *Cancer Sci.* 2005; 96:63-68.
3. Murakami Y, Nobukuni T, Tamura K, Maruyama T, Sekiya T, Arai Y, et al. Localization of tumor suppressor activity important in nonsmall cell lung carcinoma on chromosome 11q. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:8153-8158.
4. Kuramochi M, Fukuhara H, Nobukuni T, Kanbe T, Maruyama T, Ghosh HP, et al. TSLC1 is a tumor-suppressor gene in human non-small-cell lung cancer. *Nat Genet.* 2001;27:427-430.
5. Wakayama T, Ohashi K, Mizuno K, Iseki S. Cloning and characterization of a novel mouse immunoglobulin superfamily gene expressed in early spermatogenic cells. *Mol Reprod Dev.* 2001;60:158-164.
6. Biederer T, Sara Y, Mozhayeva M, Atasoy D, Liu X, Kavalali ET, et al. SynCAM, a synaptic adhesion molecule that drives synapse assembly. *Science.* 2002;297:1525-1531.
7. Ito A, Jippo T, Wakayama T, Morii E, Koma Y, Onda H, et al. SgIGSF: a new mast-cell adhesion molecule used for attachment to fibroblasts and transcriptionally regu-

- lated by MITF. *Blood*. 2003;101:2601-2608.
8. Takai Y, Irie K, Shimizu K, Sakisaka T, Ikeda W. Nectins and nectin-like molecules: roles in cell adhesion, migration, and polarization. *Cancer Sci*. 2003;94:655-667.
  9. Sasaki H, Nishikata I, Shiraga T, Akamatsu E, Fukami T, Hidaka T, et al. Overexpression of a cell adhesion molecule, TSLC1, as a possible molecular marker for acute-type adult T-cell leukemia. *Blood*. 2005;105:1204-1213.
  10. Galibert L, Diemer GS, Liu Z, Johnson RS, Smith JL, Walzer T, et al. Nectin-like protein 2 defines a subset of T-cell zone dendritic cells and is a ligand for class-I-restricted T-cell-associated molecule. *J Biol Chem*. 2005;280:21955-21964.
  11. Boles KS, Barchet W, Diacovo T, Cella M, Colonna M. The tumor suppressor TSLC1/NECL-2 triggers NK-cell and CD8+ T-cell responses through the cell-surface receptor CRTAM. *Blood*. 2005;106:779-786.
  12. Arase N, Takeuchi A, Unno M, Hirano S, Yokosuka T, Arase H, et al. Heterotypic interaction of CRTAM with Necl2 induces cell adhesion on activated NK cells and CD8+ T cells. *Int Immunol*. 2005;17:1227-1237.
  13. Masuda M, Yageta M, Fukuhara H, Kuramochi M, Maruyama T, Nomoto A, et al. The tumor suppressor protein TSLC1 is involved in cell-cell adhesion. *J Biol Chem*. 2002;277:31014-31019.
  14. Yageta M, Kuramochi M, Masuda M, Fukami T, Fukuhara H, Maruyama T, et al. Direct association of TSLC1 and DAL-1, two distinct tumor suppressor proteins in lung cancer. *Cancer Res*. 2002;62:5129-5133.
  15. Tran YK, Böglér O, Gorse KM, Wieland I, Green MR, Newsham IF. A novel member of the NF2/ERM/4.1 superfamily with growth suppressing properties in lung cancer. *Cancer Res*. 1999;59:35-43.
  16. Fukuhara H, Masuda M, Yageta M, Fukami T, Kuramochi M, Maruyama T, et al. Association of a lung tumor suppressor TSLC1 with MPP3, a human homologue of *Drosophila* tumor suppressor Dlg. *Oncogene*. 2003;22:6160-6165.
  17. Shingai T, Ikeda W, Kakunaga S, Morimoto K, Takekuni K, Itoh S, et al. Implications of nectin-like molecule-2/IGSF4/RA175/SgIGSF/TSLC1/SynCAM1 in cell-cell adhesion and transmembrane protein localization in epithelial cells. *J Biol Chem*. 2003;278:35421-35427.
  18. Murakami Y. Involvement of a cell adhesion molecule, TSLC1/IGSF4, in human oncogenesis. *Cancer Sci*. 2005;96:543-552.
  19. Fukami F, Fukuhara H, Kuramochi M, Maruyama T, Isogai K, Sakamoto M, et al. Promoter methylation of the TSLC1 gene in advanced lung tumors and various cancer cell lines. *Int J Cancer*. 2003;107:53-59.
  20. Kikuchi S, Yamada D, Fukami T, Maruyama T, Ito A, Asamura H, et al. Hypermethylation of the TSLC1/IGSF4 promoter is associated with tobacco smoking and a poor prognosis in primary nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer*. 2006;106:1751-1758.
  21. Ito T, Shimada Y, Hashimoto Y, Kaganoi J, Kan T, Watanabe G, et al. Involvement of TSLC1 in progression of esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res*. 2003;63:6320-6326.
  22. Kikuchi S, Yamada D, Fukami T, Masuda M, Sakurai-Yageta M, Williams YN, et al. Promoter methylation of DAL-1/4.1B predicts poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2005;11:2954-2961.
  23. Yamada D, Kikuchi S, Williams YN, Sakurai-Yageta M, Masuda M, Maruyama T, et al. Promoter hypermethylation of the potential tumor suppressor DAL-1/4.1B gene in renal clear cell carcinoma. *Int J Cancer*. 2006;118:916-923.
  24. Heller G, Fong KM, Girard L, Seidl S, End-Pfützenreuter A, Lang G, et al. Expression and methylation pattern of TSLC1 cascade genes in lung carcinomas. *Oncogene*. 2006;25:959-968.
  25. Uchino K, Ito A, Wakayama T, Koma Y, Okada T, Ohbayashi C, et al. Clinical implication and prognostic significance of the tumor suppressor TSLC1 gene detected in adenocarcinoma of the lung. *Cancer*. 2003;98:1002-1007.
  26. Ito A, Okada M, Uchino K, Wakayama T, Koma Y, Iseki S, et al. Expression of the TSLC1 adhesion molecule in pulmonary epithelium and its down-regulation in pulmonary adenocarcinoma other than bronchioloalveolar carcinoma. *Lab Invest*. 2003;83:1175-1183.
  27. Goto A, Niki T, Chi-Pin L, Matsubara D, Murakami Y, Funata N, et al. Loss of TSLC1 expression in lung adenocarcinoma: relationships with histological subtypes, sex, and prognostic significance. *Cancer Sci*. 2005;96:480-486.
  28. Mao X, Seidlitz E, Truant R, Hitt M, Ghosh HP. Re-expression of TSLC1 in a non-small-cell lung cancer cell line induces apoptosis and inhibits tumor growth. *Oncogene*. 2004;23:5632-5642.
  29. Masuda M, Kikuchi S, Maruyama T, Sakurai-Yageta M, Williams YN, Ghosh HP, et al. Tumor suppressor in lung cancer (TSLC)1 suppresses epithelial cell scattering and tubulogenesis. *J Biol Chem*. 2005;280:42164-42171.
  30. Yamada D, Yoshida M, Williams YN, Fukami T, Kikuchi S, Masuda M, et al. Disruption of spermatogenic cell adhesion and male infertility in mice lacking TSLC1/IGSF4, an immunoglobulin superfamily cell adhesion molecule. *Mol Cell Biol*. 2006;26:3610-3624.