HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	頭頸部扁平上皮癌におけるNotch1の役割に関する研究［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	稲村, 直哉
Description	配架番号：2074
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11202号
Issue Date	2014-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/55696
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Naoya_Inamura_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（医　学）　氏名　稲　村　直　哉

学 位 論 文 題 名

頭頸部扁平上皮癌における Notch1 の役割に関する研究

(Analysis of the role for Notch1 in head and neck squamous cell carcinoma)

【背景と目的】頭頸部悪性腫瘍は、口腔、咽頭、喉頭、鼻副鼻腔、唾液腺などを含み、最も多い組織型は扁平上皮癌(HNSCC)である。多くは局所再発、リンパ節転移、遠隔転移を来し、その予後は不良であるため、HNSCC の発癌に関する分子機構を解明し、新規治療標的分子の発見は急務である。一方、Notch は細胞膜貫通型の受容体分子であり、隣接する細胞のリガンドに結合すると、細胞内領域(NICD)がγセクレターゼにより切断され、核内に移行し下流遺伝子の転写を促す。Notch シグナルの作用は、分化、増殖、アポトーシス、幹細胞の自己再生を含む多くの発生過程を制御するため、その異常は悪性化に繋がると考えられている。HNSCC における Notch1 の機能に関する報告も散見されるが、いずれも症例数や検討法の点で部分的かつ詳細とは言えない報告が多く、HNSCC における Notch1 の役割は未だに十分な検討がなされているとは言えない。そのため、本研究では複数の HNSCC 細胞株を用いて HNSCC における Notch1 の悪性化への関与を詳細に調べるとともに、臨床病理学的アプローチを用いて、既存の報告よりも多くの HNSCC 手術標本において検討し、包括的な研究を行うこととした。

【材料と方法】HNSCC 細胞株として HSC2、HSC3、HSC4、Ca9-22、OSC20、SAS を使用した。Notch1 シグナルの阻害には、γセクレターゼインヒビター(DAPT)を使用した。HNSCC 細胞株の発現を半定量的 RT-PCR 法、ウエスタンブロット(WB)法にて評価した。核内における NICD と Notch1 シグナルの関連分子である c-Myc の発現を調べる際は、細胞成分分画法により核抽出成分を使用した。c-Myc の関与に関する解析は HSC3 への一過性過剰発現系を用いた。表現型の評価として、増殖能、足場非依存性増殖能、浸潤能、ヌードマウスを用いた腫瘍形成能の検討を行った。浸潤能においては、c-Myc 過剰発現細胞を用いて、上皮間葉移行（EMT）との関連をリアルタイム RT-PCR 法を用いて評価した。臨床病理学的検討は、2000 年から 2011 年に北海道大学病院にて外科的切除され、説明し同意を得た患者 101 例の標本を用いた。Notch1 と Ki-67 の染色性と、後ろ向き観察から得られた臨床情報との関連を検討した。

【結果】HNSCC 細胞株における Notch1 の発現を調べたところ、細胞密度が高い培養条件では細胞全体の Notch1 のタンパク量が増大し、核内の NICD のタンパク量も増大した。Notch1 発現量は mRNA の定量では SAS、OSC20、HSC3、HSC4 にて多く、Ca9-22 と HSC2 では少なかった。タンパク量は OSC20、HSC3、HSC4 にて多く、HSC2 で少なかった。また、Notch1 の細胞内局在は SAS、OSC20、HSC3 において核優位の染色性を示した。細胞全体の染色強度として SAS と HSC3 にて多く、HSC2 で少なかった。

DAPT 投与による細胞内の Notch1 染色性の偏在に明らかな影響は認められなかったが、全体として染色性が低下する結果となった。蛍光免疫染色では、HSC3 において DAPT 投与により核内の NICD の染色性の減弱を認めた。DAPT 投与による Notch1 の発現量の変化は、核内の NICD や Hes1、c-Myc の発現量が減少した。DAPT 投与により増殖能・足場非依存性増殖能・腫瘍形成能が抑制されることから、Notch シグナルがこれらの悪性形質を制御していることが判明した。これらの悪性形質に関与する下流シグナルの探索を行ったが、既存の報告にある MAPK/ERK や PI3K/AKT 経路の有意な変化は本実験系では観察されなかった。また DAPT 投与による Notch シグナルの遮断により浸潤能が低下

する事が判明し、文献的考察を元に解析を進めたところ、Notch1 は c-Myc の発現量調節を介して EMT を制御することで浸潤能を制御する事が明らかとなった。

臨床検体を用いた検討では、Notch1 の染色性と T stage との有意な関連性は認められなかったが、腫瘍増殖の直接的な指標である MIB-1 index との有意な相関が見られ、リンパ節転移とも有意な相関を認められた。以上の事から細胞株を用いた検討で見られた Notch シグナルの細胞増殖や造腫瘍能、浸潤への関与が実際の HNSCC においても重要なシグナル経路である事が示唆された。

【考察】DAPT を用いた解析では、Hes 等の Notch 下流遺伝子の発現で遮断効果を評価している研究が多数みられるが、この方法ではγセクレターゼで切断される全ての分子のシグナルが阻害されている可能性が考えられ、検証の正確性に問題があった。本研究では核抽出を行い、核内の NICD を直接定量することで DAPT が適切に Notch1 シグナルを遮断していることを確認した。

Notch1 シグナルと増殖能に関わる分子を検討し、c-Myc との関連が明らかになった。c-Myc は一般に細胞増殖において重要な分子として知られているが、浸潤においても乳癌では密接に関与するという報告がある。HNSCC においては、臨床的解析による c-Myc と転移の関連や、浸潤・転移と EMT の関連が部分的に報告されているが、Notch シグナルの浸潤能における c-Myc との関連について体系的な検討はされていなかった。これらの報告を元に本研究によって、HNSCC の浸潤を制御する経路の一つが Notch1 による c-Myc の発現調節を介した EMT の制御であるということが初めて証明された。これは Notch1 が HNSCC の浸潤・転移の診断マーカーになりうる可能性を示した重要な知見である。

臨床症例における増殖能との関係を評価するために T stage を用いたが、Notch1 と T stage の間には有意な関連性を認めなかった。T stage は、大きさだけでなく浸潤部位によっても規定され、頭頸部は隣接する臓器との間隔が狭いため、増殖の遅い腫瘍でも隣接した臓器に容易に達してしまう。そのため、純粋に細胞増殖のみを評価する指標として MIB-1 index との関連について検証した。その結果、Notch1 の染色性が有意に MIB-1 index と相関した。これは Notch1 シグナルが、*in vitro* における増殖能及び腫瘍形成能においての働きと同様、実際の臨床症例においても増殖に関連することを確認できた点で意義深い。初診時に認められたリンパ節転移と Notch1 の染色性に相関を認めたが、本研究では新しく得られた知見として、臨床的には初診時に指摘できない病理学的リンパ節転移や局所加療後の後発リンパ節転移といった、潜在的なリンパ節転移についても Notch1 の染色性との相関が示され、治療方針決定にも影響を与える重要な診断マーカーとなりうることが示唆される。

【結論】1）細胞成分分画法による核抽出された NICD を直接定量する手法は、適切に Notch シグナルを評価する上で非常に有効であった。2) *in vitro* / *in vivo* の研究で増殖能、足場非依存性増殖能、腫瘍形成能、浸潤能において Notch1 シグナルが影響を与えることを体系的に確認した。3) Notch シグナルは c-Myc を介して EMT を制御することにより浸潤に影響を及ぼすことが HNSCC において証明された。4）多数症例における詳細な臨床病理学的検討を施行し、増殖と Notch1 の染色性との相関が明らかになった。5）同様に初診時に指摘できない潜在的なリンパ節転移と Notch1 の染色性についても関連性を見出すことができた。

以上の知見から、HNSCC において Notch1 シグナルの働きは増殖能、浸潤能に密接に相関する癌遺伝子としての役割が明らかとなった。今後はさらに詳細な分子生物学的研究や臨床的な前向き研究を行い、診断マーカーとして確立することが望まれる。