



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 [全文の要約]
Author(s)	稲村, 直哉
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号 : 2074 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
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/2115/55697
Type	doctoral thesis
File Information	Naoya_Inamura_summary.pdf



学 位 論 文 (要約)

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)

2014 年 3 月

北 海 道 大 学

稲 村 直 哉

【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、甲状腺などを含み、最も多い組織型は扁平上皮癌 (HNSCC) である。治療においては外科的切除、化学療法、放射線療法などを併用し集学的に行われているが、多くは局所再発、リンパ節転移、遠隔転移を来し、進行期の予後は5年生存率約50%程度と不良である。また、頭頸部は呼吸、咀嚼、嚥下など人間が生きるのに必要な機能の他、発声、嗅覚、味覚、聴覚など社会生活に必要な機能が集中しており、治療においては機能温存が重要である。しかし、進行期における広範囲切除などにより、機能障害や整容面に影響を来すことも多く、化学療法などによる根治を希望される症例も少なくはない。現在、HNSCC においてはシスプラチンを中心とした化学療法が広く行われているが、その効果は限定的である。そのため、HNSCC の発癌に関する分子機構を解明および、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、哺乳類では Notch1 - 4 の4種類のコホモログが確認されている。Notch は隣接する細胞のリガンドに結合すると、腫瘍壊死因子- α 変換酵素 (TACE) により細胞外領域 (NECD) が S2 切断され、S2 切断に応答して細胞内領域 (NICD) が γ セクレターゼにより S3 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、幹細胞の自己複製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で HNSCC における Notch1 の臨床的意義を明確にすることとした。

【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 例の病理標本を用いた。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、Notch1 シグナルがこれらの悪性形質を正に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 Notch1 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正に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 分類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 との有意な正の相関が見られた。リンパ節転移と Notch1 の染色性の関連については、初診時に認められたリンパ節転移 (clinical N) だけでなく、初診時には指摘できなかった潜在的リンパ節転移 (subclinical N) について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、**Notch1** 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性を評価するために **T** 分類を用いたが、**Notch1** と **T** 分類の間には有意な関連性を認めなかった。**T** 分類は、大きさだけでなく浸潤部位によっても規定される。とくに頭頸部領域は隣接する臓器との間隔が狭いため、増殖のスピードが遅い腫瘍において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** と正の相関を示した。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 (**clinical N**) と **Notch1** の染色性に正の相関を認めたが、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 (**subclinical N**) についても **Notch1** の染色性との相関が示された。臨床病理学的検討において **Notch1** の染色性が増殖能および浸潤能と正の相関を示したことから、治療前に生検検体の **Notch1** 染色をすることにより腫瘍の悪性度を評価が可能と考えられた。その結果に応じて治療方針決定することで、**Notch1** は予後改善や機能温存に寄与する重要な診断マーカーとなりうることを示唆される。

【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 **Notch1** 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) **Notch1** 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** の染色性との正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、治療標的・診断マーカーとしての**Notch1**の重要性を確立し、**HNSCC**に罹患する患者の予後改善に寄与することが望まれる。