

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、細胞成分分析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のタンパク量が增大し、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性を評価するために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ける働きと同様、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事が示唆される。

【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、浸潤能に密接に関連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。