

平成 30 年 5 月 17 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11302

研究課題名(和文) NOTCH1およびHRASの機能的変異による口腔扁平上皮癌モデルの作製

研究課題名(英文) Oral cancer model of functional mutations in NOTCH1 and HRAS

研究代表者

太田 嘉英 (OTA, Yoshihide)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：60233152

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)： Flow cytometryにおいて、変異NOTCH1の細胞膜局在は不安定になっていた。免疫蛍光法でWT細胞の活性化NOTCH1は核内に認められたが、変異NOTCH1においては細胞質に認められた。qPCRにおいてWTではHES1、HEY1のmRNA発現量が有意に上昇していたが、変異NOTCH1では有意に減少していた(37%、 $P < 0.01$)。細胞増殖能力はWT細胞は有意に細胞が上昇していたが、変異NOTCH1細胞においては有意に($p < 0.01$)低下していた。マウスへの生着率はWT細胞は80%であったが、変異NOTCH1細胞では0%であった。
結論：口腔癌にNOTCH1変異は影響を与えていた。

研究成果の概要(英文)： HEK293 cell lines expressing NOTCH1 wild type (WT cells) or p.A465T (A465T cells) were established. Flow cytometry indicated that NOTCH1 expression on the cell membrane was lower in A465T cells than that in WT cells. NOTCH1 and NICD were both detected by western blot in WT and A465T cells. The immunofluorescence signal for NICD was detected in the nucleus of WT cells, while it was localized mainly in the cytoplasm of A465T cells. HES1 and HEY1 mRNA expression levels were lower in A465T than in WT cells. The cell growth of WT cells was significantly higher than that of HEK293 cells ($P < 0.01$), while that of A465T cells was significantly lower than that of HEK293 cells (37%, $P < 0.01$). In a xenograft model, the tumor cell implantation rate of WT cells was 80%, while that of A465T cells was 0%. This study indicates that NOTCH1 acts as an oncogene and that the NOTCH1 mutation (p.A465T) in the ligand-binding region causes the loss of tumorigenicity by downregulating the NOTCH1 pathway.

研究分野：Oral oncology

キーワード：NOTCH1 Oral cancer Mutation analysis

1. 研究開始当初の背景

近年、諸外国において頭頸部扁平上皮癌 (HNSCC) や食道扁平上皮癌に対して大規模な遺伝子変異を解析した報告がされ、それらは既知の TP53 など一般的に高頻度に変異が認められる癌関連遺伝子とともに、NOTCH1 と HRAS 遺伝子に有意に変異が認められることが示され、扁平上皮癌におけるこれらの重要性が注目されている (例: Science 2011)。これに対し、本邦では臨床標本に対するゲノムレベルでの解析は少なく、とくに口腔扁平上皮癌 (OSCC) に対する解析はほとんどない。そこで申請者は、NOTCH1 と HRAS に注目して研究を計画し、その足がかりとして、84 例の OSCC 臨床標本に対して NOTCH1 遺伝子の変異解析を行い、細胞外領域のリガンド結合領域においてアミノ酸変異を伴う新規の変異を 8 症例・9.5% と高頻度に発見した。それら NOTCH1 変異のある OSCC 患者は野生型に対して有意に無病生存期間が長いことを認めるとともに、発見した変異型 NOTCH1 に対して、報告されている X 線回折結果を基に立体構造のシミュレーションを行ったところ、リガンド結合領域の構造変化が起こる可能性があることが示された (BBRC2014, doi: 10.1016)。

細胞膜受容体の NOTCH (1-4) のサブタイプである NOTCH1 は、悪性リンパ腫患者の半数において細胞内領域の活性化変異が認められるが、HNSCC においては細胞外領域に変異が集中すると報告され、その変異の傾向は異なっている。その機能は固形癌においては明らかではなく、NOTCH1 の変異は腫瘍化と腫瘍抑制機能の両面に影響を生じるとの報告があり、真意の解明が待たれる。これに対し、癌遺伝子である RAS ファミリーは特定の点変異により腫瘍化に機能することで知られている。NOTCH 経路が下流の PTEN を制御することより RAS 経路が調節されることから、NOTCH 経路と RAS-PI3K 経路は重要な関係にあるとされる。RAS ファミリーのなかでも、HNSCC においては、HRAS にのみ有意な変異が報告されている。共同研究者である本学医学部分子生命科学・木村穰教授らは、ヒト HRAS トランスジェニック (Tg) マウスを作製し、癌誘発物質による発癌実験を行い、前胃に乳頭腫が高頻度に発生することを報告した。それらマウスの腫瘍の 98% においてヒト HRAS の 12 番目あるいは 61 番目のコドンに点変異が集中しており (Mol Biol Med. 1989, Cancer Res. 1992) このコドン 12 の変異はギリシャ人の OSCC 標本においても報告されている (Oncol Rep. 2012)。

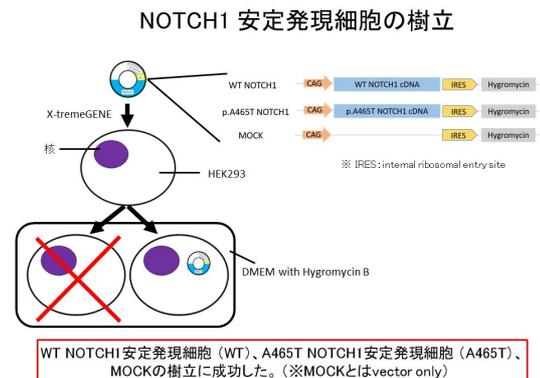
2. 研究の目的

NOTCH1 や HRAS に対する解析結果より、邦人の OSCC に対して、これらの遺伝子を中心に癌関連遺伝子の配列やその発現を解析

することで、OSCC の病態解明に有用な因子を抽出できると考えられる。さらに、NOTCH1 や HRAS の発現細胞やマウスを作製することで、OSCC モデルを構築し、その病態を解明することを目標とした。

3. 研究の方法

(1) NOTCH 経路の遺伝子、HRAS 遺伝子を含む頭頸部扁平上皮癌で高頻度に変異が報告されている遺伝子 (Stransky ら 2011, India project 2014 など) に加え、固形癌でドライバー変異がみられるとされる遺伝子を含めたパネルを作成して次世代シーケンサーを用いて行った。



(2) WT、臨床検体で見いだされた変異 NOTCH1 (A465T)、MOCK の三種類の cDNA を用いて HEK293 細胞にそれぞれ導入し、安定発現細胞 (WT 細胞、A465T 細胞、MOCK 細胞) を樹立した。これらの細胞株を用いて NOTCH1 の局在を Flow cytometry (FC) で、NOTCH1 の活性を western blot (WB)、NICD の局在を免疫蛍光法で評価し、NOTCH1 の下流の因子である HES1、HEY1 の mRNA 発現量を qPCR で評価した。腫瘍原性の解析として細胞増殖能力とヌードマウスへの異種移植を行った。

(3) HRAS 変異 flox マウスを樹立し、Cre 発現ベクターをパーティクルガンによりマウス脇腹に導入した。

4. 研究成果

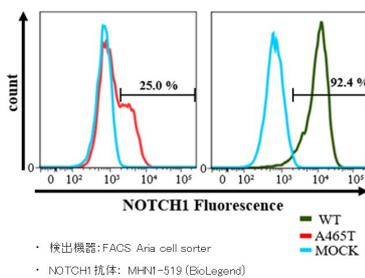
(1) P53、PIK3CA など既知のがん関連遺伝子については他の固形癌と類似したスペクトラムで変異がみられた。NOTCH 経路の遺伝子群に 28%と高頻度に変異がみられた。とくに、NOTCH1 変異についてはリガンド結合領域に集中していた。HRAS 変異については 1.8%と低頻度の変異が認められた (口腔外科学会 2017 年、京都、発表)。

	変異率 (%)	
	日本人OSCC	諸外国HNSCC
TP53	33.8	47~63
CDKN2A	19.5	15~25
NOTCH1	15.6	8~16
FAT1	10.4	8~44
CASP8	6.5	8~36
PTEN	5.2	0~7
PIK3CA	2.6	6~8
HRAS	1.3	4~12
NOTCH経路の遺伝子群	31.1	未発表

申請者らの解析

(2) Flow cytometry において、変異 NOTCH1 の細胞膜局在は不安定になっていた。免疫蛍光法で WT 細胞の活性化 NOTCH1 は核内に認められたが、変異 NOTCH1 においては細胞質に認められた。qPCR において MOCK と比較し、WT では HES1、HEY1 の mRNA 発現量が有意に上昇していたが (3 倍、 $P < 0.01$)、変異 NOTCH1 では有意に減少していた (37%、 $P < 0.01$)。細胞増殖能力は MOCK 細胞と比較して WT 細胞は有意に ($p < 0.01$) 細胞が上昇していたが、変異 NOTCH1 細胞においては有意

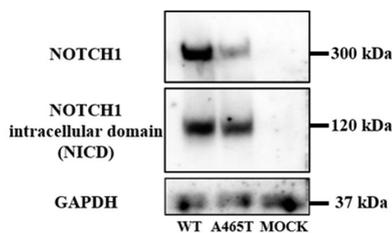
Flow cytometry



検出機器: FACS Aria cell sorter
NOTCH1 抗体: MHN1-519 (BioLegend)

WTはほぼ全てNOTCH1陽性であったが、A465Tは発現が弱かった。

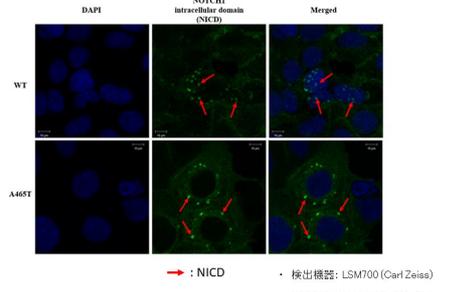
Western Blot



NOTCH1 抗体: #3608 (C末端を認識) (Cell Signaling Technology)
コントロールとしてGAPDHを使用

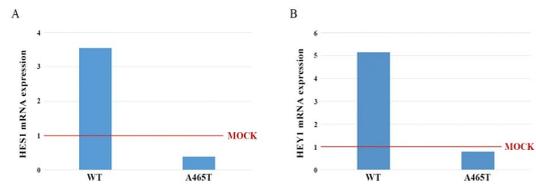
WTもA465Tも全長NOTCH1、NICDともに検出された。

Immunofluorescence imaging



WTは核内にNICDが認められたが、A465Tは細胞質に認められた。

Quantitative real-time PCR

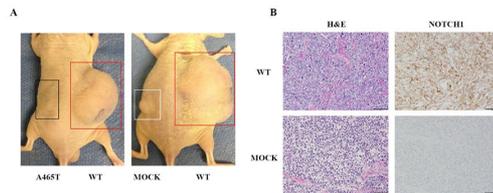


プライマー:

HES1, forward 5'-gaagcaacctccggaacct-3', reverse 5'-gtcaacctctcatgcacct-3'
HEY1, forward 5'-catagcgcaggaggaaag-3', reverse 5'-gcattatgctctcaatgatgct-3'

HES1、HEY1ともにWTはmRNAの発現量が上昇したが、A465Tは減少した。

Xenograft model



- 5週齢のスードマウス (n=5) の脇腹にWT、A465T、MOCK それぞれ 1×10^6 細胞/mlずつ皮下注射
- 8週後に生着率の計測
- NOTCH1抗体: #3608 (Cell Signaling Technology)

WTは80%が生着したが、A465Tは0%であった。
WTはほぼ全ての細胞がNOTCH1陽性であった。

NOTCH1 発現ベクター	野生型NOTCH1	変異型NOTCH1
NOTCH1の細胞膜への局在 (Flow cytometry)	+	+/-
NOTCH1 タンパク質発現 (Western blot)	全長NOTCH1	+
	NICD	+
NICDの核への局在 (Immunofluorescence imaging)	+	-
下流因子 (HES1、HEY1) のmRNA発現	↑	↓
Cell growth (MOCKと比較)	↑	↓
生着 (Xenograft assay)	+	-

に ($p < 0.01$) 低下していた。スードマウスへの生着率は WT 細胞は 80%であったが、変異 NOTCH1 細胞では 0%であった (図は全て申請者の報告した Oncology Reports 2017, Uchibori, Ota, et al を改変)。

(3) マウス脇腹における conditional 変異 HRAS 発現マウスを得るプレ実験データが得られた。現在のところ腫瘍化は認められなかった。現在も解析を継続している。
【結論】口腔扁平上皮癌において、NOTCH 経路が重要な役割を果たしている可能性が示

唆された。HRAS については、ほとんど変異が認められず、機能解析の必要性に疑問があった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6 件)

●2017 年度

Relationship of sex, age, and preference level of sour food with sweetness sensitivity in young Japanese adults.

Ken-ichi Aoyama, Y. Okino, H. Yamazaki, R. Kojima M. Uchibori, Y. Nakanishi, **Yoshihide Ota**, A. Kaneko. Journal of Nutritional Health & Food Science, Nov. 2017, IF=1.49, 査読有

A mutation in NOTCH1 ligand binding region detected in patients with oral squamous cell carcinoma reduces NOTCH1 oncogenic effect. M. Uchibori, **Ken-ichi Aoyama**, **Yoshihide Ota**, K. Kajiwara, M. Tanaka, **M. Kimura**, Oncology Reports. 10.3892/or.2017.5870. IF=2.66, 査読有

Lateral retropharyngeal lymph node metastasis from squamous cell carcinoma of the upper gingiva: A case report. Yamazaki H, Sasaki M, **Ken-ichi Aoyam**, Suzuki T, Denda Y, Uchibori M, Nakanishi Y, Kojima R, **Yoshihide Ota**. Mol Clin Oncol. 2018 Jan;8(1):68-72. doi: 10.3892/mco.2017.1496. Epub 2017 Nov 13. , 査読有

●2016 年度

Saliva pH affects the sweetness sense.

Ken-ichi Aoyama, Yuichiro Okino, Hiroshi Yamazaki, Rena Kojima, Masahiro Uchibori, Yasuhiro Nakanishi, **Yoshihide Ota**. Nutrition.

10.1016/j.nut.2016.10.018, March 2017 Volume 35, Pages 51–55 (IF=3.42) , 査読有

Case of Solitary Fibrous Tumor of the Cheek. M. Otsuru, T. Aoki, **Yoshihide Ota**, A. M. Takahashi, M. Uchibori, **Ken-ichi Aoyama**, Y. Kondo, The Tokai Journal of Experimental and Clinical Medicine.

2016 Sep 20;41(3):139-42, 査読有

●2015 年度

Kikuchi-Fujimoto Disease with 18F-Fludeoxyglucose Uptake in Cervical Lymph Nodes on Dual Time-point Imaging Positron Emission Tomography/Computed Tomography Mimicking Malignant Disease. **Ken-ichi Aoyama**, Mitsunobu Otsuru, Masahiro Uchibori, **Yoshihide Ota**, World J Nucl Med. Jan-Mar;16(1):68-70, 査読有

[学会発表](計 2 件)

Mutational landscape of Japanese oral squamous cell carcinoma、日本口腔外科学会総会・学術大会、2017 年、青山謙一、太田嘉英、内堀雅博、梶原景正、木村穰

NOTCH1 mutation found in Japanese oral carcinoma、European Society for Medical Oncology Congress, **Ken-ichi Aoyama**, **Yoshihide Ota**, T. Aoki, K. Kajiwara, **M. Kimura**, 2015

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)
該当なし

[その他]
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

太田 嘉英 (OTA, Yoshihide)
東海大学・医学部・教授
研究者番号：60233152

(2) 研究分担者

木村 穰 (KIMURA, Minoru)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：10146706

青山 謙一 (AOYAMA, Ken-ichi)

東海大学・医学部・助教

研究者番号：10647530

(3)連携研究者

該当なし

(4)研究協力者

該当なし