

令和元年6月14日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11438

研究課題名(和文) NOTCH1の異常による前癌病変発症機構：扁平上皮の形態ホメオスタシス制御破綻

研究課題名(英文) Pathogenesis of oral precancer by NOTCH1

研究代表者

坂本 啓 (SAKAMOTO, Kei)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師

研究者番号：00302886

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：口腔・食道腫瘍の発生におけるNotch1遺伝子欠損の寄与を生理学的実験モデルを用いて調べた。Notch1の扁平上皮特異的ノックアウトマウスを作成し、口腔・食道腫瘍の発症が野生型よりもノックアウトマウスにおいて早く起こることを見出した。腫瘍はNotch1陰性上皮の方に優先的に生じた。Notch1はTERTの発現を増加し、マウスの加齢に伴うテロメア短縮の速度はNotch1を欠損した扁平上皮基底細胞において、正常上皮基底細胞より速かった。これらの結果から、Notch1欠損がテロメア短縮の促進につながり、扁平上皮の腫瘍発生の誘因となることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NOTCH1は扁平上皮の基底細胞に発現し、扁平上皮癌で高頻度で変異が検出される遺伝子だが、その異常が発癌に及ぼす作用は不明な点が多い。本研究から、NOTCH1が扁平上皮の形成に必須ではないものの、テロメアの維持に関連し、NOTCH1の異常が前癌病変および扁平上皮癌の発生を促進する誘因であることを示した。本研究の結果は、正常上皮の腫瘍化リスク、あるいは前癌病変の癌化リスクを評価する指標のひとつとしてNOTCH1の変異の検査が有用であることを示唆する。また癌および前癌病変発生を予防する治療の開発にヒントを与えるものである。

研究成果の概要(英文)：We clarified the contribution of Notch1 deficiency to oro-esophageal tumorigenesis using a physiological experimental model. Tongue and esophageal tumors induced in mice by 4-nitroquinoline-1-oxide (4-NQO) showed pathophysiological similarities to human tumors, including decreased Notch1 expression in the basal cells. We created mutant mice (N1cK0), in which the Notch1 gene was disrupted specifically in the squamous epithelium. Although no tumors developed spontaneously in the tongue and esophagus, 4-NQO-induced tumorigenesis assays revealed that tumor onset occurred earlier in N1cK0 mice than in wild-type littermates, and the tumors arose preferentially from the Notch1-negative epithelium. Notch1 regulates the expression of TERT, and age-related telomere erosion was more rapid in Notch1-deficient basal cells. Our results indicated that Notch1 deficiency predisposed the affected epithelium to tumor development, in part through accelerated telomere erosion.

研究分野：口腔病理学

キーワード：口腔癌 前癌病変

1. 研究開始当初の背景

扁平上皮は新陳代謝回転の速い組織だが、基底層から有棘層、角化層にわたり細胞は常に整然と配列している。これは分裂と分化を厳密に調節して形態ホメオスタシスを保つ機構が存在することを示唆する。腫瘍化した上皮では、その初期の段階から層化や細胞配列の異常などが組織構造の形態異常として可視化され、病理組織学的に上皮性異形成などと呼ばれる前癌病変の状態になる。扁平上皮の層化の調節には隣接する細胞間の (juxtacrine) シグナル因子が特に重要であると我々は考えた。正常上皮で発現し、腫瘍で発現が減弱しているものが、上皮形態ホメオスタシスを維持する主要な因子であり、同時に腫瘍の発生に重要な因子であると考えて、その同定に着手した。その結果、NOTCH1 が候補遺伝子として挙がってきた。Notch は進化的によく保存された juxtacrine シグナル受容体で、幹細胞の維持や組織のパターン形成に支配的な役割を持つ。我々は4つの Notch パラログのうち、NOTCH1 が正常扁平上皮で基底細胞特異的に発現し、腫瘍では口腔、食道、子宮のいずれにおいても発現が著明に低下することを見出した。浸潤癌のみならず、前癌病変でも、その初期の段階から発現は著明に低下していた。次にマウスへのニトロキニン (4NQO) の飲水投与による化学発癌実験を行い、口腔に前癌病変を誘発したところ、ヒトの病変と同様に NOTCH1 の発現の減弱が微小な病変でも観察された。また、ヒト、マウスの病変ともに分化マーカーであるケラチンサブタイプの発現の明確な変化と、分裂細胞の位置と配列の異常を示した。以上より NOTCH1 は分裂・分化を制御し、扁平上皮の正常構造の維持に重要であることが示唆された。次世代シーケンサーを用いた大規模解析からも NOTCH1 が口腔腫瘍の発症に重要な遺伝子であることが明らかになり、NOTCH1 の変異は頭頸部癌との相関が6番目に高い遺伝子とされている。また、他の癌との相関は低く、頭頸部癌発症に特異的に重要な遺伝子と考えられる。しかし NOTCH1 遺伝子変異は10%程度の症例に検出されるのみであり、自検例でも NOTCH1 遺伝子の変異は5%以下の症例に認められるのみだった。いっぽう NOTCH1 の発現の減弱は9割以上の前癌病変・口腔癌症例に共通して認められる変化であった。したがって NOTCH1 遺伝子の機能欠失変異よりも、発現の減弱によるシグナル低下の方が、腫瘍発生への寄与が大きいと考えている。

2. 研究の目的

扁平上皮の正常な分化と組織構造の維持には NOTCH1 による制御が重要であり、その破綻が腫瘍、特に前癌病変の直接の原因であるという作業仮説の検証を推進する。

3. 研究の方法

具体的には Notch1 の機能欠失をきたすノックアウトマウス、および Notch1 の発現を上昇させたトランスジェニックマウスを作成し、前癌病変・扁平上皮癌の発症を含む、扁平上皮の表現型解析を行った。

ケラチン14プロモーターにより扁平上皮基底細胞特異的に Notch1 を発現するトランスジェニックマウスを作成した。また、ケラチン14プロモーターで Cas9 を発現し、同時に Notch1 を標的としたガイド RNA を発現するトランスジェニックマウスを持つトランスジェニックマウスを作成した。このマウスは Notch1 のコンディショナルノックアウトマウスとなる。これらのマウスの口腔・食道の扁平上皮の形質を調べるとともに、前癌病変・癌の自然発生を調べた。また、4NQO の投与による化学発癌実験も併せて進めた。Notch1 とテロメア短縮の関連を調べるため、培養上皮細胞に Notch1 遺伝子を導入し、TERT の発現などの変化を調べた。FISH を用いてテロメア長さを組織切片上で個々の細胞毎に測定した。

4. 研究成果

ノックアウトマウスではキメラ状に、扁平上皮の基底細胞の Notch1 発現消失を確認した。しかし、扁平上皮の形態異常はなく、種々の分化マーカーの発現にも異常はなかった。口腔と舌の自然発癌の上昇は認めなかったが、皮膚には扁平上皮癌の自然発生を認めた。4NQO による腫瘍誘発環境では、口腔と食道の前癌病変・扁平上皮癌の発生が、野生型に比べてノックアウトマウスで有意に増加した。ノックアウトマウスにおいては、野生型よりも早期に前癌病変が発生した。組織型の違いは見られなかった。ノックアウトマウスに発生した腫瘍の大部分は Notch1 陰性の上皮部分に発生したことがシーケンシングの結果から明らかになった。活性型 Notch1 を培養上皮細胞にトランスフェクションすると TERT の発現が上昇した。Notch1 を欠損した口腔・食道扁平上皮基底細胞で

は、テロメアが Notch1 陽性基底細胞に比べて短かった。テロメアはマウス週齢とともに短縮が認められたが、Notch1 陰性基底細胞の方が早く、テロメア短縮が進んだ。以上より、扁平上皮の正常な分化と組織構造の維持には NOTCH1 は必ずしも必要でないことが明らかになった。しかし、Notch1 欠損がテロメア短縮の促進につながり、扁平上皮の腫瘍発生の誘因となることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Sawangarun W, Mandasari M, Aida J, Morita KI, Kayamori K, Ikeda T, Sakamoto K. Loss of Notch1 predisposes oro-esophageal epithelium to tumorigenesis. *Exp Cell Res.* 15;372(2):129-140, 2018 査読あり

〔学会発表〕(計 5 件)

森田圭一、横川美咲、及川 悠、栢森 高、坂本 啓、池田 通、原田浩之：
「口腔扁平上皮癌患者における遠隔転移予測因子の検討 Predictive factor for distant metastasis in patients with oral squamous cell carcinoma」、第 62 回日本人類遺伝学会、神戸、2017 年 11 月 16-18 日
2017.11.16

〔図書〕(計 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：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。