

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09909

研究課題名(和文) 頭頸部扁平上皮癌特異的NOTCHパスウェイの探求とその特性の解明

研究課題名(英文) Exploration of head and neck squamous cell carcinoma-specific NOTCH pathway

研究代表者

福角 隆仁 (Fukusumi, Takahito)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：70623734

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：近年、頭頸部扁平上皮癌に対し様々な網羅的遺伝子解析が行われ、その結果NOTCHパスウェイが着目されるようになった。我々はTCGAデータのDRY解析を用い、NOTCH4-HEY1パスウェイが頭頸部癌に特異的に亢進しており、またそのパスウェイは癌の浸潤・転移に最も重要な特質も促進する事を先行研究で示した。今回、NOTCH4-HEY1パスウェイはSOX2の制御下に発現が亢進し、またNOTCH4-HEY1間でpositive feedback loopも形成することを示した。この結果はInternational Journal of Oncology誌に掲載された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NOTCHパスウェイは、正常組織の発生やホメオスタシスに不可欠の経路である。癌においても、様々な癌種でその増殖・浸潤・転移に寄与することが報告されている。しかし頭頸部癌においては、その機能やどれほど影響のあるパスウェイなのかなどは様々な争点があった。本研究成果によりNOTCH4-HEY1パスウェイが頭頸部癌に特異的に亢進しそれらはSOX2遺伝子の制御下にあること、またその結果、癌の浸潤・転移に影響することを示した。これらは頭頸部癌の特質解明に大きく寄与する研究成果であった。

研究成果の概要(英文)：Recently, various comprehensive genetic analyses of head and neck squamous cell carcinoma have been performed, and the NOTCH pathway has been focused on as a result. Using TCGA data analysis, we showed in a previous study that the NOTCH4-HEY1 pathway is specifically upregulated in head and neck cancers, and that this pathway also promotes the important characteristics for cancer invasion and metastasis. In this study, we show that the NOTCH4-HEY1 pathway is upregulated under the control of SOX2 and that a positive feedback loop is also formed between NOTCH4 and HEY1. The results were published in the International Journal of Oncology.

研究分野：医歯薬学

キーワード：NOTCH4 HEY1 EMT SOX2

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、研究者個人に帰属します。

### 1. 研究開始当初の背景

近年、次世代シーケンスが普及し、より多くの症例を対象とした包括的遺伝子プロファイル解析が可能となってきた。頭頸部扁平上皮癌においても数十症例を対象とした解析報告が出始めており、それらの報告より NOTCH1 が TP53 に次いで 2 番目に変異の多い遺伝子であることが初めて示された (Science, 2011)。TCGA (the Cancer Genome Atlas) グループは癌特異的な遺伝子変異、シグナルなどの解析を目的としたグループであり、2015 年 同グループにより約 250 例の頭頸部扁平上皮癌に対する網羅的遺伝子解析結果が報告された (Nature, 2015)。そこでも NOTCH1 変異は 19% と高い頻度で認められた。以上の背景より NOTCH パスウェイは頭頸部扁平上皮癌研究において近年非常に注目され始めている。NOTCH パスウェイは、正常組織の発生やホメオスタシスに不可欠の経路である。癌においても、様々な癌種でその増殖・浸潤・転移に寄与することが報告されている。しかし頭頸部癌においては、その機能やどれほど影響のあるパスウェイなのかなどは様々な争点があった。

そこで我々は TCGA の mRNA シーケンスデータを用い特異的パスウェイを検索した。各 NOTCH 受容体 (NOTCH1-4) の頭頸部扁平上皮癌と正常組織での発現を比べ、結果 NOTCH4 が最も腫瘍での発現が高いことを示した。次に各 NOTCH 受容体と NOTCH 下流遺伝子 (HEY1、HES1、HES5) との相関を検討した。結果、HES1/5 の発現と各 NOTCH 受容体の間には有意な相関は認めなかったが、HEY1 の発現は全ての NOTCH 受容体とに有意な相関があり、特に NOTCH4 に対して最も高い正の相関を認めた。また腫瘍組織における HEY1 の発現自体も、正常組織に比較して約 2 倍であった。上記の背景より、NOTCH4-HEY1 パスウェイは頭頸部癌 NOTCH シグナルにおいて特異的に亢進したパスウェイであると予想された。次に上記予想を検証するために、*in vitro* での実験を加えた。NOTCH4 ノックダウン頭頸部扁平上皮癌細胞株を使用し、HEY1・HES1・HES5 の発現を対照群と比較した。果たして NOTCH4 ノックダウン群にて HEY1 のみ有意に発現の低下が認められた。以上より我々は NOTCH4-HEY1 パスウェイは頭頸部癌特異的に亢進している事を示した。

また、SOX2 は CD10、CD44、ALDH1 と同様に HNSCC のがん幹細胞 (CSC) マーカーである。HNSCC における SOX2 発現は予後不良と有意に関連しており、SOX2 は HNSCC の移動、浸潤、EMT を促進することも示されている。また、HEY1 の発現は TCGA データでも *in Vitro* の実験でも SOX2 の発現と有意な相関を示した。よって、NOTCH4 や HEY1 に関連する因子として、本研究では SOX2 との関連を検討した。

### 2. 研究の目的

頭頸部扁平上皮癌における NOTCH4-HEY1 パスウェイに影響を与える因子は何か。また、同パスウェイは頭頸部扁平上皮癌のどのような特質に寄与するか。

### 3. 研究の方法

頭頸部扁平上皮癌細胞株を用い、SOX2 overexpressing 細胞を作成した。それを用いレポーターアッセイと ChIP RT-qPCR 実験施行し、SOX2 が HEY1 プロモーターに直接結合することで HEY1 の発現を制御していることを示した。また同様に HEY1 overexpressing 細胞を作成し、レポーターアッセイと ChIP RT-qPCR 実験にて HEY1 は、NOTCH4 の発現を制御し、ポジティブフィードバックループを形成することを示した。さらに HEY1 overexpressing 細胞は、マウスへの細胞移植実験でも、コントロールに比べ形成された腫瘍体積は大きく、*in Vivo* においても HEY1 の造腫瘍能を示した。また、HEY1 overexpressing 細胞はコントロールに比較して Fibronectin, Vimentin, TWIST1 の発現が多く、Migration Assay でも Invasion Assay でもコントロールに比較して遊走能や浸潤能が高かった。HEY1 overexpressing 細胞を Sphere Formation Assay にかけたところ、コントロールに比べ sphere 形成能が高く、HEY1 は細胞の幹細胞性や未分化性、造腫瘍性に関与することがわかった。さらに dry 解析として TCGA データ解析を行い、HEY1 と SOX2 の発現は、頭頸部扁平上皮癌のみならず原発性肺扁平上皮癌やその他の癌種の扁平上皮癌においても正の相関関係を認めることを示した。

#### 4 . 研究成果

今回、NOTCH4-HEY1 パスウェイは SOX2 の制御下に発現が亢進し、また NOTCH4-HEY1 間で positive feedback loop も形成することを示した。本研究の根幹である TCGA データを用いた頭頸部癌の NOTCH パスウェイの DRV 解析は、現在までに我々を含めて数篇しか報告されていない。更に、NOTCH パスウェイのリガンド、レセプター、下流遺伝子までも網羅的に解析したのは我々が初である。この結果は International Journal of Oncology 誌に掲載された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Fukusumi Takahito, Guo Theresa, Ren Shuling, Haft Sunny, Liu Chao, Sakai Akihiro, Ando Mizuo, Saito Yuki, Sadat Sayed, Califano Joseph	4. 巻 58
2. 論文標題 Reciprocal activation of HEY1 and NOTCH4 under SOX2 control promotes EMT in head and neck squamous cell carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Oncology	6. 最初と最後の頁 226 ~ 237
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ijo.2020.5156	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------