

令和 3 年 5 月 12 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18086

研究課題名(和文) Notchシグナルと食道癌抗癌剤耐性のメカニズムの解明と臨床応用に向けて

研究課題名(英文) Correlation between Notch signaling and chemo-resistance in Esophageal cancer

研究代表者

松浦 記大(Norihiro, Matsuura)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：90804477

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)：食道癌細胞株、マウスの食道癌皮下腫瘍モデルにおいて、Notch3は5-FUの暴露により発現、活性ともに低下した。そして5-FU耐性株においても同様の結果で、いずれにおいてもEMTが誘導されていた。化学療法後の臨床サンプルでもNotch3の活性低下は抗癌剤の効果が不良であることと相関し、EMTマーカーが発現していたことに加えて、Notch1の活性上昇とNotch3の活性低下を組み合わせても同様の結果であった。逆にNotch3の活性を上げると、5-FUの効果が上がりEMTの誘導を抑制した。そしてNotch3が直接Vimentinを制御していることも発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

集学的治療の進歩に伴い食道癌治療の成績は向上しつつあるが、十分ではない。その一つの要因として抗癌剤による治療抵抗性が挙げられる。今回、抗癌剤耐性と関連のあると言われているEMTを制御するNotchシグナルに着目し、メカニズムを追求し治療へと活かすことのできる可能性を見出した。この結果は、食道癌の予後改善につながる糸口になりうるかもしれない。

研究成果の概要(英文)：In human esophageal cancer cell lines and mouse esophageal cancer subcutaneous tumor models, Notch3 expression and activity were both decreased by the anticancer drug 5-FU. The same result was observed in the 5-FU resistant cell line. Their expressions of EMT markers were up-regulated. In clinical samples after chemotherapy, Notch3 activity decreased and correlated with poor response to anticancer drugs, as did expression of EMT markers, and the same was true when Notch1 activity was increased in combination with decreased Notch3 activity. When Notch3 activity was increased, the effect of 5-FU was enhanced and the induction of EMT was inhibited in the cell line and mouse model. I also found that Notch3 directly regulates Vimentin.

研究分野：消化器外科

キーワード：Notchシグナル 上皮間葉転換 抗癌剤耐性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

集学的治療の進歩に伴い食道癌治療の成績は向上しつつあるが、未だ満足できる成績ではない。その一つの要因として治療抵抗性が挙げられる。食道癌微小環境において、Notch3 活性低下と Notch1 活性上昇が上皮間葉転換につながると報告されており、抗癌剤耐性と関連のある可能性がある。そこで我々は Notch シグナルを制御することで、EMT の抑制および、MET の誘導が可能となれば、治療抵抗性を克服できる可能性があると考えた。この研究では、食道癌抗癌剤耐性のメカニズムの検討と Notch シグナルを利用した治療開発を行い、食道癌の予後改善につながる糸口を探索する。

2. 研究の目的

目的は、食道癌細胞の抗癌剤耐性のメカニズムを解明し、抗癌剤感受性を高めることである。食道癌において Notch シグナルと EMT の関係についての報告はあるが、Notch シグナルを介した EMT と抗癌剤耐性との関連やさらにその抗癌剤耐性を克服したという報告はない。Notch シグナルを利用し抗癌剤により誘導されるであろう EMT の抑制を検討する。

3. 研究の方法

1) 食道癌細胞株を用いた Notch シグナルに関連する分子の定量

食道癌細胞株を用いて、抗癌剤 5-FU に暴露した時の Notch シグナルに関連する分子、EMT マーカーを、リアルタイム PCR、Western Blotting で定量した。また 5-FU の抗癌剤耐性株を作成し、同様に Notch シグナルに関連する分子を定量し、通常の細胞株との違いを検討した。

2) Notch3 の選択的阻害や活性化の際の抗癌剤感受性の評価

食道癌細胞株において、Notch3 を選択的に阻害、活性化することで、抗癌剤感受性の変化や EMT の誘導があるか、リアルタイム PCR、Western Blotting、アポトーシスアッセイなどで検討した。

3) マウスを用いた、Notch3 選択的活性の際の抗癌剤感受性の評価

Notch3 が活性化する細胞株を用いて皮下腫瘍モデルマウスを作成し、EMT マーカーの変化などを組織免疫染色や Western blot などで検討した。

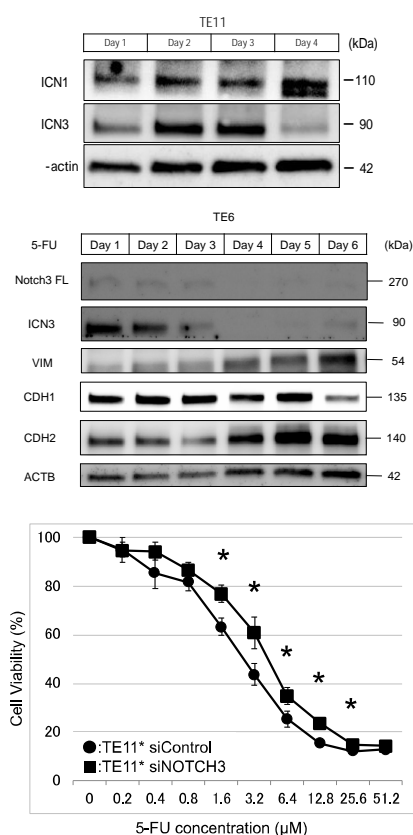
4) 臨床検体を用いた検討

術前補助化学療法を行なった食道癌切除サンプルを、抗 Notch3、Vimentin、N-cadherin 抗体で組織免疫染色し、臨床背景・抗癌剤感受性・予後と Notch3 の活性との関連を検討した。

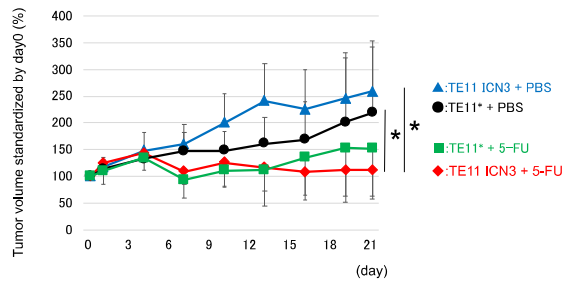
4. 研究成果

1) ヒト食道癌細胞株 (TE11) に 5-FU を暴露し、4 日目に Notch1 の活性上昇と Notch3 の活性低下を認めることがわかった。また細胞株 TE6 と TE11 を用いてさらに検討を行い、Notch3 FL (Notch3 full length) と Notch3 の活性化の指標となる ICN3 (Intracellular domain of Notch3) は減少し、EMT 関連因子のうち上皮系マーカーの E-cadherin は減少し間葉系マーカーの Vimentin と N-cadherin は増加した。続いて TE11 の 5-FU 耐性株と親株の TE11 を比較したところ、耐性株において Notch3 FL と ICN3 は減少し、E-cadherin は減少し、Vimentin と N-cadherin は増加した。また遊走能は亢進した。

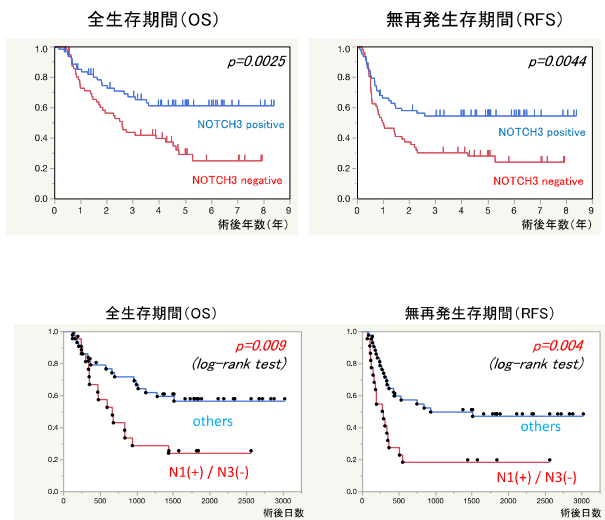
2) Notch3 の発現を RNA 干渉で抑制したところ、E-cadherin は減少、Vimentin と N-cadherin は増加し、遊走能は亢進した。5-FU への感受性は Notch3 の抑制により低下し、5-FU 暴露によるアポトーシス細胞の割合は減少した。一方で ICN3 を強制発現させると、Vimentin と N-cadherin の減少を認め、遊走能は低下した。また 5-FU 暴露によるアポトーシス細胞の割合は増加し、5-FU の治療感受性は上昇した。さらに ICN3 を強制発現して 5-FU に暴露すると、Vimentin の増加が抑制されていることが分かった。そこで、Notch3 が Vimentin を制御している可能性を検討するため、ChIP-Atlas を用いて Vimentin の 2nd intron に Notch3 が直接結合することを予測し、クロマチン免疫沈降で Notch3 が同部位に結合することを確認した。



3) ノードマウスを用いて皮下腫瘍を作成し、ICN3 を強制発現させることで 5-FU の感受性が改善するかどうかを検証した。コントロール株と ICN3 の強制発現株に対する 5-FU 投与の有無で、合計 4 群比較とした。5-FU を 3 日毎に投与し 21 日間観察したところ、コントロール株では有意な腫瘍の縮小は認めなかったが、ICN3 の強制発現株では 5-FU を投与することで有意に腫瘍の縮小を認めた。また、ICN3 の強制発現株に 5-FU を投与したマウスの皮下腫瘍は TUNEL assay においてアポトーシスに陥っている細胞がコントロール株と比べて多かった。さらに皮下腫瘍を Notch3、Vimentin、E-cadherin、N-cadherin で免疫組織染色したところ、コントロール株に 5-FU を投与したマウスの皮下腫瘍では Vimentin と N-cadherin の発現上昇を認めただ一方で、ICN3 の強制発現株に 5-FU を投与したマウスの皮下腫瘍は Vimentin や N-cadherin の発現をほとんど認めなかった。つまり、コントロール株では EMT が誘導されていたが、ICN3 の強制発現株では EMT の誘導が減弱し 5-FU の治療によりアポトーシスが誘導されていた。



4) 術前補助化学療法後に手術を行った ESCC 120 症例の切除サンプルを用いて、Notch3、Vimentin、N-cadherin の発現状況および臨床病理学的因子との関連性を免疫染色で検討した。Notch3 の活性が低い場合、Vimentin と N-cadherin の発現は有意に多かった。また抗癌剤の組織学的効果判定との比較で、Notch3 の活性が低い場合（右図赤線）、Vimentin の発現が多い場合、N-cadherin の発現が多い場合は、いずれも抗癌剤の効果が乏しかった。最後に予後との関連を検討したところ、Notch3 の活性が低いと全生存率、無再発生存率ともに有意に不良であった。また Notch1 と Notch3 を組み合わせて予後を検討をしたところ、Notch1 の活性が高く Notch3 の活性が低い場合（右図赤線）、そのほか（右図青線）と比べて優位に予後が悪かった。



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 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Norihiro Matsuura, Koji Tanaka, Makoto Yamasaki, Kotaro Yamashita, Takuro Saito, Tomoki Makino, Kazuyoshi Yamamoto, Tsuyoshi Takahashi, Yukinori Kurokawa, Kiyokazu Nakajima, Hidetoshi Eguchi, Hiroshi Nakagawa, Yuichiro Doki	4. 巻 -
2. 論文標題 NOTCH3 limits the epithelial-mesenchymal transition and predicts a favorable clinical outcome in esophageal cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Medicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松浦 記大
2. 発表標題 Notch signaling behavior during neoadjuvant chemotherapy in esophageal squamous cell carcinoma.
3. 学会等名 日本癌学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松浦 記大
2. 発表標題 食道癌化学療法とNotchシグナルの関連について
3. 学会等名 日本外科学会
4. 発表年 2020年

〔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
---------	---------