

令和 4 年 4 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22846

研究課題名（和文）Notchシグナルと食道癌転移のメカニズムの解明と臨床応用にむけて

研究課題名（英文）The mechanism of metastasis of esophageal cancer via Notch signaling

研究代表者

杉本 智樹 (Sugimoto, Tomoki)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：20882244

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：食道癌の治療で必ず使用する5-FUを食道癌細胞株に投与した際、細胞にはEMT（Epithelial Mesenchymal Transition：上皮間葉転換）が誘導され、細胞形態が間葉系細胞の特徴である紡錘形へと変化し、間葉系マーカーのVimentinが経時的に変化することを突き止めた。そしてこの時、Notch3がVimentinと逆相関することも確認することができた。加えて動物実験において、皮下腫瘍を移植したマウスに5-FUを投与し癌細胞を耐性化し、その皮下腫瘍はVimentinの増加とKRT14の減少が起こっており、EMTの遷移のメカニズムの一端を発見することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在日本の最新の切除可能な食道癌の治療、切除不能進行食道癌の治療、いずれにおいても抗癌剤を用いることがガイドラインで定められており、特に5-FUは必ず用いることとなる。抗癌剤による効果は十分見込めるが、治療を続けている中で問題になるのが、癌細胞の獲得する抗癌剤耐性であり、今回の研究ではこの抗癌剤耐性のメカニズムのひとつであるEMTに着目した。今回の研究でEMTのメカニズムの一端を解明することができたことに加え、EMTは癌の転移を誘導することが知られており、今回見つけたメカニズムは癌細胞の転移とも関連づけられるかもしれない。

研究成果の概要（英文）：We found that EMT (Epithelial Mesenchymal Transition) was induced in the cells by 5-FU which is usually used in esophageal cancer treatment. At that time, cell morphology changed to a spindle shape, characteristic of mesenchymal cells, and the mesenchymal marker Vimentin was modulated. We also confirmed that Notch3 was inversely correlated with Vimentin. In addition, in animal experiments, we treated the mice implanted with subcutaneous tumors by 5-FU to make the cancer cells 5-FU resistant. The subcutaneous tumors showed an increase in Vimentin and a decrease in KRT14. From these results, we can see one of the mechanisms for the EMT transition.

研究分野：消化器外科

キーワード：食道癌 EMT

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

食道扁平上皮癌は固形癌の中でも悪性度の高い癌の一つである。化学療法、手術、放射線療法を用いた集学的治療が進歩しつつあるが、依然として予後は不良である。その要因として高い転移再発率が挙げられ、その抑制が可能な新規治療薬の開発は必要不可欠である。

この転移再発に關与する原因のひとつとして、上皮細胞から発生する癌細胞が間葉系の性質を獲得することが考えられており、この現象は上皮間葉転換 (Epithelial Mesenchymal Transition: EMT) として知られている。そして最近では、既存の EMT の概念である上皮系か間葉系かという 2 面的なものではない、Vimentin や KRT14 などのマーカーの変化によって示される連続的なものだという報告もあるが、食道癌においてこれらの変化をみた報告はない。また食道癌における EMT のメカニズムは明らかになっていないことも多いのが現状である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、「食道癌細胞において EMT による転移のメカニズムを Notch シグナルと関連付け、治療応用につなげること」である。上述にもあるように、これまでの 2 面的な EMT ではなく、Vimentin や KRT14 などのマーカーの変化によって EMT を見ること、それに加えて、Notch シグナル、そのなかでも Notch3 がそのメカニズムの制御を担っている可能性を検討し、治療応用へと繋げることをその目的とした。

3. 研究の方法

1) EMT を誘導する可能性のある抗癌剤による食道癌細胞株を用いた検討

食道癌細胞株を用いて、食道癌に対して必ず使用する抗癌剤 5-FU が EMT を誘導するかどうか、またこの時 Vimentin や Notch シグナルはどう変化するか、など PCR や Western blotting により検討した。

2) 食道癌の EMT・分化の検討

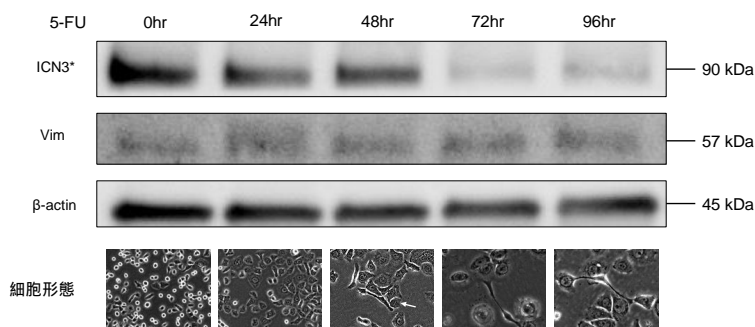
Notch シグナルの抑制や活性化が Vimentin や KRT14 にどのような変化を誘導するのか、EMT のみならず分化の視点からも検討を行った。

3) 動物モデルにおける EMT と Notch シグナルの検討

皮下腫瘍モデルマウスを用いて、EMT の誘導の検討や Notch3 を活性化することで EMT の変化がどうなるかを検討した。

4. 研究成果

1) 食道癌細胞株 (TE6 と TE11) を用いて 5-FU を投与したところ細胞の形態は徐々に上皮系から間葉系の細胞の特徴である紡錘形に変化していく様子が見られた。これは転移の過程に重要な EMT の特徴の一つと考えられる。また細胞の変化とともに今回着目した EMT マーカーである Vimentin も漸増していた。EMT が徐々に進むその経過を見ている可能性も示唆されると考えている。さらにこのとき Notch シグナルを担うタンパクの一つである Notch3 は漸減していることをタンパクレベルで確認できたことに加えて PCR でも確認することができた。



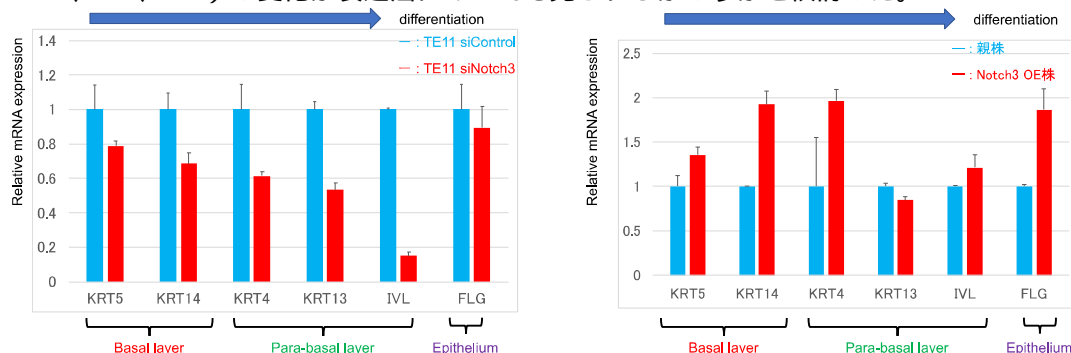
ICN3*: intra-cellular Notch3

2) 食道癌細胞株 TE11 を用いて Notch3 の抑制と Notch3 の活性化を行なったところ、Notch3 の抑制により KRT14 が減少し、Vimentin は増加する一方で、Notch3 の活性化により KRT14 が増加し Vimentin は減少した。この結果から Notch3 の変化と Vimentin・KRT14 との関連が示唆されるとともに、Vimentin と KRT14 の関係が逆相関していることも分かった。

この結果を追求するためにパブリックデータベースを用いた検討を行なったところ、Notch3 は転写因子として直接 Vimentin や KRT14 に結合するわけではなかったが、Notch3 と複合体を形成し DNA に直接結合するのに必要な因子である RBPJ が Vimentin の DNA に結合することが分かった。以上のことから Notch3 が RBPJ を介して Vimentin を制御している可能性が示唆されたが、KRT14 を制御するメカニズムについては今回の検討では不十分でありさらなる検討が必要と考えている。

さらに Notch シグナルは正常細胞において分化を司るシグナルであることから分化マーカーも検討したところ、食道癌細胞においても分化マーカーが Notch3 によって制御されている可能性

が示唆された。具体的には、正常食道における食道上皮の分化マーカー（KRT5、KRT14、KRT4、KRT13、IVL、FLG）の変化が食道癌においても見られるかどうかを検討した。



Notch3 の変化は各分化マーカーと一致して変化しており、この結果から食道癌においても Notch3 と分化マーカーとの関連があることが示唆された。

3) 動物モデルを用いた実験を行なった。TE11 と TE11 Notch3 OE 株をマウスの皮下腫瘍として植え、EMT を誘導する 5-FU を投与して皮下腫瘍の性状を検討した。5-FU により、EMT が誘導されていること、この時 Notch3 が関与していることを TE11 により検討するとともに、Notch3 OE 株により Notch3 が変化しないようにした状態で 5-FU による EMT が誘導されないかどうかを検討した。5-FU はもともと細胞毒性があることから腫瘍を死滅させない至適濃度を条件設定により設定したうえで、皮下腫瘍のできたヌードマウスに 5-FU を投与した。

できた皮下腫瘍を細胞免疫染色で評価したところ、5-FU により EMT が誘導された皮下腫瘍では Vimentin の発現が増え、KRT14 の発現が減少していた。またこの時 Notch3 の発現は低下していた。Notch3 OE 株では 5-FU によって Vimentin の増加や KRT14 の減少は起こらず、Vimentin は増えることなく KRT14 のみが増えるという結果であった。タンパクについても一貫する結果であった。これらの結果は細胞実験での結果を裏付けるとともに、Notch3 の制御が EMT を阻害するということが示唆されている。



	TE11		TE11 Notch3 OE株	
PBS	(+)	(-)	(+)	(-)
5-FU	(-)	(+)	(-)	(+)
NOTCH3				
VIM				
KRT14				

以上より、転移の一つのメカニズムである EMT の誘導と Vimentin の変化とが関連していること、Vimentin は KRT14 と逆相関し Notch3 によって制御を受けている可能性がありうること、そして Notch3 の制御により EMT が阻害されることが研究成果としてあげられる。また食道癌において Notch3 が食道の分化マーカーに関連していることも示唆され、今後は今回の検討で着目した Vimentin や KRT14 だけでなく分化マーカーにも着目することで新しい知見を得られるかもしれないと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
---------	---------