

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462848

研究課題名(和文) Notch1による扁平上皮分化調節機構とその破綻による口腔癌発生機序の解明

研究課題名(英文) Oral carcinogenesis by disturbance of squamous differentiation regulated by Notch1

研究代表者

坂本 啓 (Sakamoto, Kei)

東京医科歯科大学・医歯(薬)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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：マウスへの発癌物質の飲水投与による化学発癌実験を行ったところ、ヒトにおける病変と同様の前癌病変および扁平上皮癌が口腔と食道粘膜に誘発された。次に、上皮細胞のみでNotch1遺伝子を欠損したノックアウトマウスを作成した。このマウスは体毛の斑状の欠損と、毛の形成の不全および毛嚢の過形成を示した。さらにこのマウスを用いて化学発癌実験を行うと、野生型マウスと比較して食道癌の易誘発性を呈した。以上より、Notch1が腫瘍抑制遺伝子として口腔と食道癌発生に重要な役割を果たす可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：We conducted chemical carcinogenesis experiments on mice by administering a carcinogenic agent by drinking water. Cancers and precancerous lesions like those of human developed in the oral cavity and esophagus. We created epithelial-specific conditional Notch1-knockout mice. These mice exhibited patchy hair loss with hyperplasia of hair follicles. Chemical carcinogenesis experiments revealed increased incidence of esophageal cancer in these mice compared with the wild type littermates. These results indicated that Notch1 plays an important role in development of oesophageal cancer as a tumor-suppressor gene.

研究分野：口腔病理学

キーワード：口腔癌 Notch1

1. 研究開始当初の背景

扁平上皮は基底層から有棘層、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、そのごく初期の段階から層化や細胞配列の異常などが、組織学的な形態異常、いわゆる構造異型として認識されるようになる。我々は扁平上皮の分化調節には隣接する細胞間のシグナル因子が特に重要であると考え、そのうち腫瘍で発現が減弱しているものが、上皮の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 が扁平上皮の分化調節に重要であり、その発現の減弱が前癌病変の原因である可能性が示唆された。

2. 研究の目的

扁平上皮の正常な分化には Notch1 による制御が重要であり、その破綻が癌や前癌病変の原因であるという作業仮説の検証を推進することを目的とした。

3. 研究の方法

Notch1 の発現を上皮特異的に導入あるいは抑制した遺伝子改変マウスを作成し、上皮に現れる形質を野生型マウスと比較解析する。さらに4-ニトロキノリン1-オキシド(4NQO)の飲水投与により舌や食道に腫瘍を誘発し、組織学的変化やタンパク発現の変化を野生型マウスやコントロール群との間で比較解析する。

4. 研究成果

まずマウスへの4NQOの飲水投与による化学発癌実験を行ったところ、口腔と食道粘膜に前癌病変および扁平上皮癌が誘発された。この病変を免疫組織学的に解析すると、ヒトにおける病変と同様に、Notch1 の発現の減弱と、ケラチン13の発現の減弱、ケラチン15の発現の減弱あるいは発現領域の拡大を示した(図1)

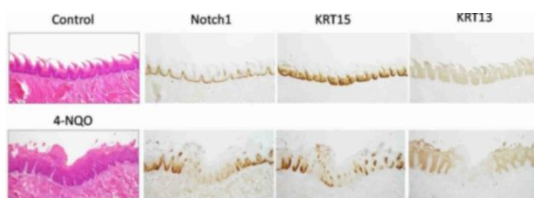


図1: 4NQOの投与によってマウスの舌に誘発された前癌病変におけるNotch1とケラチン13(Krt13)とケラチン15(Krt15)の発現の低下。上段は正常の舌組織である。左端はヘマトキシリン・エオジン染色による組織像。2列めからそれぞれNotch1、Krt13、Krt15の免疫染色像である。下段は4NQOを16週間飲水投与し、その4週間後に採取した舌であり、

舌正中部に1から4個(平均2個、n=9)の前癌病変が発生したうちの1病変を示す。

次に、Notch1発現をケラチン14プロモーターを用いて上皮特異的に導入したトランスジェニックマウスを作成し、その表現型を調べた。上皮の形質に大きな異常を認めなかったため、現在、4NQOの飲水投与による化学発癌実験を行い、野生型マウスとの比較解析を継続中である。

次にCRISPR-Cas9技術を用い、Notch1を標的としたsgRNAと、ケラチン14のプロモーターによるCas9の発現を誘導するトランスジェニックマウス(扁平上皮特異的Notch1ノックアウトマウス)を作成した(図2)

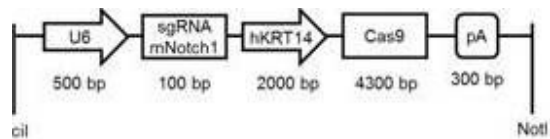


図2: 扁平上皮特異的Notch1ノックアウトマウス作成に使用したトランスジーンの概略図。

このマウスはキメラ状のノックアウトパターンを示し、皮膚や粘膜にNotch1遺伝子の変異を持ち、Notch1タンパクの発現の見られない領域が現れた(図3)



図3: 扁平上皮特異的Notch1ノックアウトマウスの舌上皮に現れたNotch1陰性領域。抗Notch1抗体を用いた免疫組織染色。

このマウスは体毛の斑状の欠損と(図4)毛の形成の不全(図5)および毛嚢の過形成を示した(図6)。

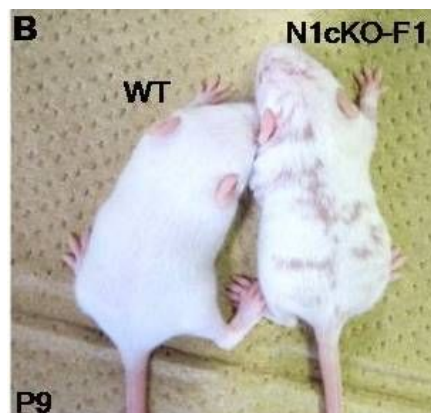


図 4: 扁平上皮特異的 Notch1 ノックアウトマウス (N1cKO) の体毛の斑状の欠損。N1cKO はトランスジーンをヘテロに持つ個体であり、同腹の野生型 (WT) 個体との比較。

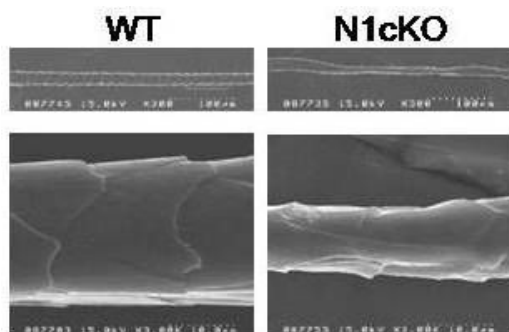


図 5: 野生型 (WT) マウスと、扁平上皮特異的 Notch1 ノックアウトマウス (N1cKO) の斑状の体毛欠損領域から採取した体毛の電子顕微鏡像。N1cKO では体毛の太さが不規則で、毛小皮の剥離が顕著である。

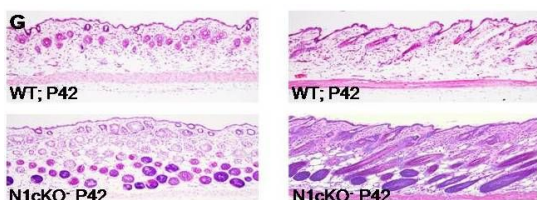


図 6: 野生型 (WT) マウスと、扁平上皮特異的 Notch1 ノックアウトマウス (N1cKO) の背部皮膚の組織像。N1cKO の体毛欠損領域と同等の部位から野生型マウスの試料を採取した。N1cKO は肉眼的には体毛の欠損を示すが、毛嚢の形成に異常はみられず、毛嚢はむしろ過形成性の組織像を示す。ヘマトキシリン・エオジン染色。

この表現型は Cre/loxP システムを用いて作成された扁平上皮特異的なコンディショナルノックアウトマウスと同様の変化であり、われわれの方法によるノックアウト戦略が機能していることの傍証となった。扁平上皮特異的 Notch1 ノックアウトマウスには皮膚腫瘍の発生傾向を認めた (図 7)。

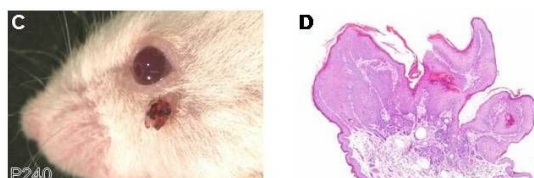


図 7: (左) 扁平上皮特異的 Notch1 ノックアウトマウスに自然発生した皮膚腫瘍。(右) 腫瘍の組織像。扁平上皮癌である。ヘマトキシリン・エオジン染色。

さらにこのマウスを用いて 4NQO による化学

発癌実験を行うと、野生型マウスに比較して食道癌の易誘発性を呈した (図 8)。

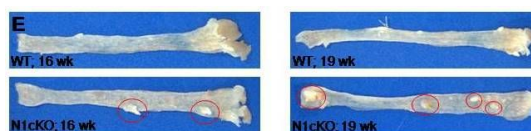


図 8: 4NQO を投与された野生型 (WT) マウスと、扁平上皮特異的 Notch1 ノックアウトマウス (N1cKO) の食道の肉眼像。ヨード染色を施し、不染域で明示される腫瘍を示している (赤丸)。

以上より、Notch1 が腫瘍抑制遺伝子として食道癌発生に重要な役割を果たす可能性が示された。

近年、Notch1 は口腔癌と食道癌を含む扁平上皮癌で高頻度に変異が認められる遺伝子として注目されている。また、その変異は扁平上皮癌以外の固形腫瘍では比較的まれであり、扁平上皮癌のドライバー遺伝子として重要である。ほとんどが機能欠失変異であると推測され、扁平上皮癌における Notch1 の腫瘍抑制遺伝子としての重要性が、ヒト腫瘍の大規模な遺伝子変異解析から明らかになっている。本研究は Notch1 の腫瘍抑制遺伝子としての作用を別の角度から示唆する研究結果であり、扁平上皮癌の新たな治療法の開発などに向けての重要な知見となる。

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 1 件)

Mandasari M, Sawangarun W, Katsube K, Kayamori K, Yamaguchi A, Sakamoto K. A facile one-step strategy for the generation of conditional knockout mice to explore the role of Notch1 in oroesophageal tumorigenesis, *Biochem Biophys Res Commun*, 469 (3)

〔学会発表〕(計 2 件)

Mandasari M, Sawangarun W, Yamaguchi A, Sakamoto K, Conditional Notch1-knockout transgenic mouse generation by CRIPSR/Cas9 genome engineering system, IADR South East Asia Division Annual Scientific Meeting, 2015年8月14日, Bali, Indonesia

坂本 啓: NOTCH1 の司る扁平上皮分化とその破綻による腫瘍発生機序、2015年11月6日、第 61 回日本病理学会秋期特別総会、東京都文京区

〔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）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂本 啓 (Kei Sakamoto)
東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・講師
研究者番号：00302886

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：