

平成 30 年 6 月 16 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26460406

研究課題名(和文) NOTCH1の扁平上皮がんにおける二面性の分子基盤

研究課題名(英文) Molecular basis for the dual face of NOTCH1 in the development of squamous cell carcinoma

研究代表者

温川 恭至 (YUGAWA, Takashi)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・主任研究員

研究者番号：80311372

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)：腫瘍細胞が体を蝕み、死に至らしめる最大の要因は、転移能を獲得し悪性化することにあります。その悪性化の分子機構を突き止めることは、がんの本態を解明する上で極めて重要です。私の研究は、扁平上皮がんを対象に、子宮頸部や皮膚等の重層扁平上皮組織の分化に関わるNOTCH1という因子が、正常組織では細胞分化を誘導し、がん抑制に働く一方、悪性化した腫瘍細胞においては運動や浸潤能を促進するドライバーとして働きを変える仕組みを明らかにしました。このことは、がんの分子標的薬としてNOTCH1を標的とする場合、その対象を見極めるための科学的根拠を提示するものです。

研究成果の概要(英文)：The most powerful force of tumor cells to erode bodies and eventually kill patients is the acquisition of the metastatic ability and malignant phenotypes. To elucidate the molecular mechanisms of malignant conversion is critical for better understanding the nature of cancer.

In this study, I revealed the molecular mechanism explaining the dual nature of NOTCH1 in the development of squamous cell carcinoma. In normal tissue, NOTCH1 has a role in cellular differentiation of stratified epithelia, such as uterine cervix and skin, and functions as a tumor suppressor. In contrast, NOTCH1 convert its role into a driver for increased motility and invasion in malignant tumor cells. This finding provide a scientific evidence to determine the applicable tumors with a molecular targeted therapy against NOTCH1.

研究分野：医歯薬学

キーワード：分子腫瘍学 癌 悪性化 発現制御 Notch1 p63 Myc

1. 研究開始当初の背景

研究代表者らは、ヒト子宮頸部正常上皮細胞に、16型ヒトパピローマウイルス E6, E7 遺伝子、活性型 HRAS に加え MYC を導入すると、三次元培養系において浸潤能を示すこと、免疫不全マウス皮下において強い造腫瘍性を示すことを明らかにした (Narisawa-Saito, Yugawa et al. Cancer Res 2008)。この時 MYC の高発現が内在性 p63 の発現レベルを顕著に低下させることを見出しており、テトラサイクリン発現誘導系を用いた結果から MYC 発現誘導 2 日後には MYC の発現量依存的に p63 レベルが減少することを確認している。一方、p63 が MYC の発現をポジティブに制御すること、MYC の過剰発現が p63 ノックダウンによる細胞増殖停止を完全にレスキューするという結果を得ていた (未発表)。また、活性型 NOTCH1 がその転写活性化能を介さず、caspase 依存的な ROCK1 の活性化を速やかに引き起こすことを発見した (Yugawa et al. Mol Cell Biol 2013)。予備的結果から、この新規 “NOTCH1-ROCK1 経路” は p63 ノックダウンによっても活性化することを見出しており、p63 の発現が消失した進行がんでは NOTCH1-ROCK1 経路が活性化し、細胞運動能の亢進に関わっている可能性を得た。これらの結果より、扁平上皮がんにおける NOTCH1 の二面性について、「正常角化細胞または上皮内がん・高分化扁平上皮がんにおいて p63 は NOTCH1 の発現抑制と MYC の発現誘導を介して増殖能の維持に働く。発がん過程において、一旦 MYC が高発現すれば、p63 発現消失による増殖能低下は回避され、NOTCH1-ROCK1 経路の活性化を介して浸潤・転移能を獲得した低分化・未分化がんに進展する」との仮説を立てた。

2. 研究の目的

NOTCH1 は多くのがんにおいてがん遺伝子として機能するが、重層扁平上皮組織においては角化細胞の分化決定因子であり、がん抑制遺伝子として機能する。しかしながら、扁平上皮がんの後期にはがん遺伝子として機能する可能性が示唆されており、NOTCH1 のが

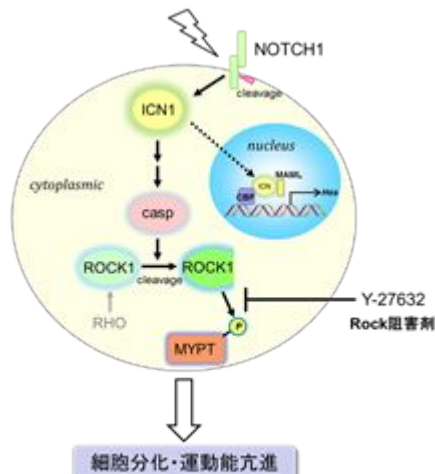


図1 新規NOTCH1-ROCK1経路とその役割

んにおける二面性は大きな謎である。この NOTCH1 の二面性の傍らで、その発現制御を担う p63 に関しても扁平上皮がんにおけるパラドックスが示唆されている。本研究では、研究代表者らが新規に同定した “NOTCH1-ROCK1 経路” (図1) が p63 の下流において NOTCH1 の二面性を説明する分子基盤となる可能性を検討し、扁平上皮がんの浸潤・転移などの悪性転換に関わるスイッチ機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

MYC 高発現下における p63 の発現消失と NOTCH1-ROCK1 経路の活性化が悪性形質を付与するか明らかにし、扁平上皮がんの臨床検体と臨床情報を用いて悪性度・予後との相関を調べる。

(1) 細胞分化能の有無における NOTCH1-ROCK1 経路の生物学的効果の違い:

分化能を有する正常角化細胞において HPV16 E6, E7 に加え、MYC と活性型 RAS を過剰発現した場合、p63 並びに分化マーカーの発現低下が起きる結果を得ている。また、正常角化細胞において p63 をノックダウンした場合、増殖能の喪失が引き起こされる。先ず正常角化細胞において p63 をノックダウンした時、NOTCH1-ROCK1 経路が活性化するか、活性型 NOTCH1 および活性型 ROCK1 の発現と ROCK1 下流因子 MYPT1 のリン酸化を指標にウエスタンブロットティングにより確認した。

上記の系において、コントロール細胞では細胞分化/増殖抑制が起きるのに対し、MYC, HRAS 導入細胞においては増殖が維持されたまま浸潤能が獲得されることを三次元培養系における浸潤像を指標に検討した。また、これらの悪性形質の獲得が NOTCH1-ROCK1 経路に依存しているか明らかにするため、NOTCH1, ROCK1 阻害剤の効果をもとに検討を行った。

(2) MYC 高発現下における p63-NOTCH1-ROCK1 経路の制御破綻と悪性転換との機能的関連:

正常角化細胞を起点とした多段階発がんモデルの場合とは逆に、高転移能を有するがん細胞株に p63 を過剰発現した場合、NOTCH1-ROCK1 経路の不活化を介して運動能・転移能の抑制が起こるか、移動アッセイを指標に確認した。

上記の系において、p63 を過剰発現することで、NOTCH1-ROCK1 経路が抑制されることを活性型 NOTCH1 および活性型 ROCK1 の発現と ROCK1 下流因子 MYPT1 のリン酸化を指標にウエスタンブロットティングにより確認した。

(3) 扁平上皮がん臨床検体と臨床情報における p53, p63, NOTCH1, MYC のステータスと悪性度・予後との相関解析:

様々なグレードの口腔がん臨床検体を用いて p63, MYC, NOTCH1 の発現レベルを免疫組織化学的に解析し、がん化進行過程あるいは浸潤部位における p63 の発現パターン変

化と MYC, NOTCH1 レベルとの相関関係、並びに悪性度との関連を調べた。口腔がん臨床検体に関しては、当センターの頭頸部がんの組織スライドを利用した。

種々の扁平上皮がんの TCGA (RNA-seq) データ {(頭頸部扁平上皮がん TCGA, Provisional, 530 症例)、(膀胱がん TCGA, Nature 2014, 131 症例)、(子宮頸部扁平上皮がん TCGA, Provisional, 309 症例)、(非小細胞肺扁平上皮がん TCGA, Provisional, 504 症例)} を解析し、p63, NOTCH1, MYC それぞれの発現レベルの相互関係を解析した。また変異ステータスも合わせて解析対象とした。

4. 研究成果

(1) 研究代表者らは p63 が NOTCH1 の転写抑制因子として機能することを見出し {Cancer Res. 2010 May 15;70(10):4034-44}、また NOTCH1 の新規下流因子として ROCK1 を同定している {Mol Cell Biol. 2013 Nov;33(22):4434-47}。正常角化細胞において NOTCH1-ROCK1 が活性化すると細胞運動能の亢進を伴いながら細胞分化が誘導されることを見出している。また p63 ノックダウンによって NOTCH1 の活性化と細胞分化の誘導が引き起こされ、増殖能の喪失に至ることが判明している。p63 ノックダウンにより、NOTCH1 の下流で ROCK1 が活性化しているか検討を行い、活性化することを確認した(図 2)。

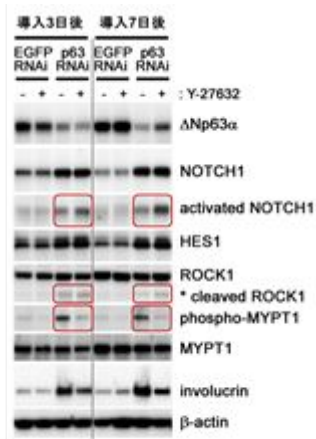


図2 p63発現低下によるNOTCH1-ROCK1経路の活性化

次に、研究代表者らが既に樹立している子宮頸がん多段階発がんモデル細胞の三次元

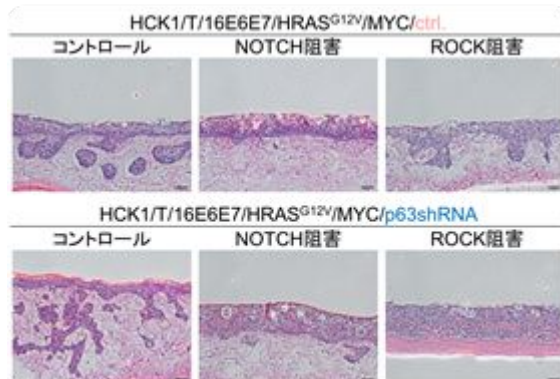


図3 NOTCH-ROCK経路の活性化と浸潤形質

培養系を用いて、NOTCH-ROCK 経路が悪性化のドライバーとなっている可能性を検討した。その結果、p63 をノックダウンにより細胞増殖能を維持したまま、浸潤能の亢進が認められた。p63 ノックダウン細胞において NOTCH あるいは ROCK を阻害すると浸潤能が阻害されたことから、NOTCH-ROCK 経路が悪性化のドライバーとして機能する責任経路であることが示唆された(図 3)。

(2) 正常角化細胞を起点とした多段階発がんモデルの場合とは逆に、p63 の発現低下が認められる転移性子宮頸がん細胞株 CaSki に p63 を過剰発現した場合の生物学的効果を wound-healing アッセイを指標に検討した。その結果、p63 を過剰発現は細胞運動能の抑制に働くことが示された(図 4)。

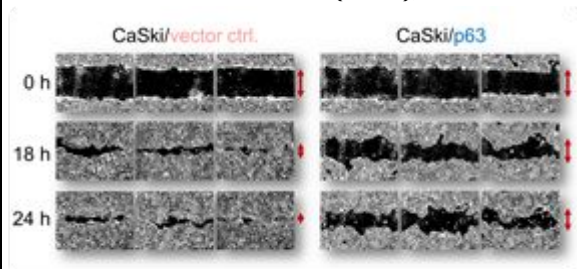


図4 転移性子宮頸がん細胞株におけるp63過剰発現と運動能の抑制

このとき NOTCH-ROCK 経路が抑制されることを確認した(図 5)。

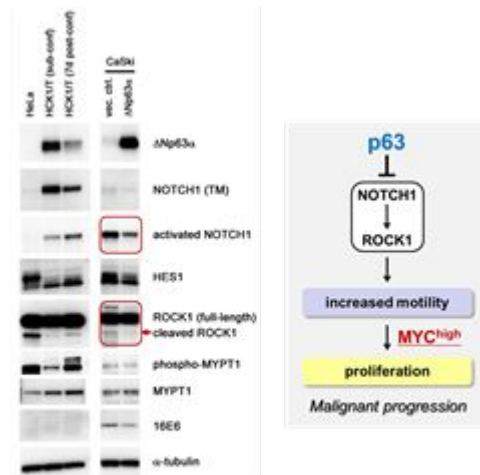


図5 転移性子宮頸がん細胞株におけるp63過剰発現と NOTCH-ROCK経路の抑制

(3) 様々なグレードの口腔がん臨床検体を用いて p63, MYC, NOTCH1 の発現レベルを免疫組織化学的に解析したところ、浸潤部位において p63 の発現低下と MYC 及び NOTCH1 発現レベルの上昇傾向が認められた。また、複数の扁平上皮がんの TCGA データを解析したところ、p63 と MYC の発現は排他的な関係にあり、MYC の発現が高い場合、p63 の発現はネガティブか低い傾向が認められ、研究代表者らの結果を支持するものだった。

NOTCH1 は多くのがんにおいてがん遺伝子として機能するが、重層扁平上皮組織においては角化細胞の分化決定因子であり、がん抑

制遺伝子として機能する。しかしながら、扁平上皮がんの悪性形質に関わるがん遺伝子として機能する可能性が示唆されており、NOTCH1 のがんにおける二面性は未解明である。また、NOTCH1 の転写抑制因子である p63 に関して、がん遺伝子としての機能が示唆される一方で、その発現低下・機能消失とがん進展・予後不良との相関が報告されており、その背景となる分子機構と意義は未解明である。

研究代表者らは p63 の下流抑制経路として新規に NOTCH1-ROCK1 経路を同定し、これがヒト正常角化細胞の分化誘導と運動能亢進に働く主要経路であることを報告している。本研究では、正常角化細胞や p63 依存性の子宮頸がん細胞株を用いて、p63 ノックダウンによる細胞増殖能の喪失は MYC の過剰発現により完全にレスキューされること、樹立済みの子宮頸がん in vitro 発がんモデルを用いて、MYC 過剰発現下における p63 ノックダウンは浸潤能を促進すること、その責任経路として NOTCH1-ROCK1 経路が機能することを見出した。また p63 が発現消失している転移性の子宮頸がん細胞株において p63 を過剰発現すると、NOTCH1-ROCK1 経路の阻害を介して運動能の低下が認められた。更に、子宮頸がん・頭頸部がんを含む複数の扁平上皮がんのデータセットを用いた TCGA 解析により p63 と MYC の発現は相互排他的な傾向にあることを確認した。

以上の結果から、MYC 高発現下では p63 消失による細胞増殖能の喪失が回避されると同時に、NOTCH1-ROCK1 経路の活性化を介して浸潤能が獲得されることを明らかにした。また、ドキシサイクリン濃度依存的に MYC の発現誘導が可能な細胞系を用いて、MYC による p63 の負の発現制御ループが存在する可能性を得ている。従って、MYC 過剰発現が p63 の発現低下をもたらす、その下流で活性化した NOTCH1-ROCK1 経路が細胞運動能の亢進を介して悪性化のドライバーとして役割転換する可能性が得られた(図6)。



図6 NOTCH1-ROCK1経路の役割転換と扁平上皮がん悪性化モデル

本研究結果、並びにこれまでの研究代表者の知見を総合すると、MYC の過剰発現が p63

の機能喪失の分子背景であり、扁平上皮がんの発生と進展における p63 と NOTCH1 の二面性を説明する鍵であると推察される。即ち、がん化の初期段階では細胞増殖は p63 に依存しており、p63 は NOTCH1-ROCK1 がん抑制経路をブロックすることでがん遺伝子として機能する。しかしながら、遺伝子増幅や MAPK 経路等の活性化により一旦 MYC の過剰発現が起こると、p63 の発現低下をもたらす、その下流で活性化した NOTCH-ROCK 経路が悪性化のドライバーとして機能転換する可能性がある(図7)。

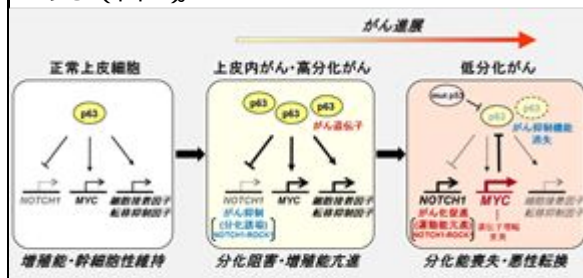


図7 p63、NOTCH1のステータス変化と、扁平上皮がん進展モデル

p63 と NOTCH1 の二面性は、がんの本態、特に浸潤・転移能に深く関わっており、高分化がんと低分化がんの違いを生む分子背景を形成するものと考えられる。現在、NOTCH 阻害薬(-セクレターゼ阻害剤)の臨床応用に向けた検討が行われている。また、ROCK 阻害剤は脳血管攣縮抑制剤として既に承認されている。NOTCH1 のがんにおける二面性を理解することは対象を見誤ることなく NOTCH1 あるいは ROCK1 を適切に標的化するがん治療、特に浸潤・転移性の低分化型扁平上皮がん細胞をコントロールする上で極めて重要であり、本研究から得られる知見は、これに分子生物学的根拠を与えるものとなり得る。

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 6件)

Dendo K, Yugawa T, Nakahara T, Ohno S, Goshima N, Arakawa H, Kiyono T.

Induction of non-apoptotic programmed cell death by oncogenic RAS in human epithelial cells and its suppression by MYC overexpression. Carcinogenesis 39(2):202-213, 2018

DOI: 10.1093/carcin/bgx124.

(査読あり)

Yoshimatsu Y, Nakahara T, Tanaka K, Inagawa Y, Narisawa-Saito M, Yugawa T, Ohno SI, Fujita M, Nakagama H, Kiyono T. Roles of the PDZ-binding motif of HPV 16 E6 protein in oncogenic transformation of human cervical keratinocytes. Cancer Science 108(7):1303-1309, 2017

DOI: 10.1111/cas.13264.

(査読あり)

Mori S, Takeuchi T, Ishii Y, Yugawa T, Kiyono T, Nishina H, Kukimoto I. Human papillomavirus 16 E6 upregulates APOBEC3B via the TEAD transcription factor. Journal of Virology 91(6): pii: e02413-16, 2017 DOI: 10.1128/JVI.02413-16. (査読あり)

Sugimoto N, Maehara K, Yoshida K, Yasukouchi S, Osano S, Watanabe S, Aizawa M, Yugawa T, Kiyono T, Kurumizaka H, Ohkawa Y, Fujita M. Cdt1-binding protein GRWD1 is a novel histone-binding protein that facilitates MCM loading through its influence on chromatin architecture. Nucleic Acids Research 43(12):5898-911, 2015 DOI: 10.1093/nar/gkv509. (査読あり)

Nakahara T, Tanaka K, Ohno S, Egawa N, Yugawa T, Kiyono T. Activation of NF- B by human papillomavirus 16 E1 limits E1-dependent viral replication through degradation of E1. Journal of Virology 89(9):5040-59, 2015 DOI: 10.1128/JVI.00389-15. (査読あり)

Inagawa Y, Yamada K, Yugawa T, Ohno S, Hiraoka N, Esaki M, Shibata T, Aoki K, Saya H, Kiyono T. A human cancer xenograft model utilizing normal pancreatic duct epithelial cells conditionally transformed with defined oncogenes. Carcinogenesis 35(8):1840-6, 2014 DOI: 10.1093/carcin/bgu112. (査読あり)

[学会発表](計 6件)

温川恭至, 中原知美, 藤田雅俊, 清野透

Non-canonical NOTCH signaling drives malignant progression of squamous cell carcinoma.

(非古典的 NOTCH シグナルは扁平上皮がんの進展を引き起こす)

第 40 回 日本分子生物学会・生命科学系学会合同年次大会

口演及び示説発表 2017 年 12 月 8,9 日 神戸

温川恭至, 中原知美, 藤田雅俊, 清野透

Dual roles of p63 and NOTCH1 in the development and progression of squamous cell carcinoma.

(扁平上皮がんの発生と進展における p63 と NOTCH1 の二面性)

第 76 回 日本癌学会学術総会

口演 2017 年 9 月 30 日 横浜

温川恭至, 中原知美, 藤田雅俊, 清野透

The dual role of p63 in the development of squamous cell carcinoma.

(扁平上皮がん発生における p63 の二面性)

第 75 回 日本癌学会学術総会

口演 2016 年 10 月 6 日 横浜

温川恭至, 中原知美, 藤田雅俊, 清野透

Loss of p63 in MYC-overexpressing cells can trigger malignant conversion through the NOTCH-ROCK pathway.

(p63 欠損は NOTCH-ROCK 経路の活性化を介して MYC 過剰発現細胞の悪性転換を引き起こす)

第 74 回 日本癌学会学術総会

口演 2015 年 10 月 8 日 名古屋

温川恭至, 西野光一郎, 大野真一, 中原知美, 藤田雅俊, 五島直樹, 梅澤明弘, 清野透

Non-canonical NOTCH signaling activates ROCK to control cellular differentiation.

(非古典的 NOTCH シグナルによる ROCK の活性化と細胞分化)

第 37 回 日本分子生物学会年会

指定講演 2014 年 11 月 27 日 横浜

温川恭至, 西野光一郎, 大野真一, 中原知美, 藤田雅俊, 五島直樹, 梅澤明弘, 清野透

The novel NOTCH-ROCK pathway limits self-renewal of human epithelial and iPS cells.

(新規 NOTCH-ROCK 経路はヒト上皮細胞と iPS 細胞の自己複製能を制限する)

第 73 回 日本癌学会学術総会

口演 2014 年 9 月 26 日 横浜

[その他]

ホームページ等

https://www.ncc.go.jp/jp/ri/division/carcinogenesis_and_prevention/viral_carcinogenesis/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

温川 恭至 (YUGAWA, Takashi)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・主任研究員

研究者番号: 80311372

(2) 研究分担者

該当なし ()

研究者番号:

(3) 連携研究者

該当なし ()

研究者番号: