

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10621

研究課題名（和文）核Notchを標的とするガンマセクレターゼ阻害による大腸癌治療

研究課題名（英文）Inhibition of gamma-secretase targeting nuclear NOTCH in colorectal cancer

研究代表者

野澤 宏彰（Nozawa, Hiroaki）

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：80529173

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：Notchの細胞膜におけるcleavageにかかわるガンマセクレターゼ阻害が腫瘍抑制の標的となりうるのではないかとこの仮説を検証するべく大腸癌細胞株CaCO2, LoVoを用いてガンマセクレターゼ阻害剤(GSI)を投与し、Notch3の局在が核から細胞質に移動することが示された。次にquantitative RT-PCR法にて、GSI投与でGSI非投与群に比べHey1, Hey2, Hes1, Ki-67の発現が低下することが示された。さらに動物実験もを行い、大腸癌細胞株をヌードマウス側腹部皮下に投与してできたxenograftが、GSI投与で腫瘍サイズの増加が抑えられる傾向を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸癌患者における予後不良因子である核Notch発現について、その細胞膜におけるcleavageにかかわるガンマセクレターゼを阻害することが新規治療となるかを検証する目的で、in vitro, in vivoでその抗腫瘍効果を検証した。大腸癌細胞やマウスでの実験レベルにとどまるが、GSI投与が実際に細胞増殖を抑制し、細胞増殖に関わる分子の発現を低下させ、さらに生体における腫瘍の発育を抑制する傾向が示された。したがってNotchを高発現しているような大腸癌患者において、GSIは新規治療の1つとなりうる可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：In in vitro experiments, inhibitor of gamma secretase (GSI), which cleaves Notch at the cell membrane, successfully inhibited the expressions of Hey1, Hey2, Hes1, and Ki-67 in colon cancer cell lines, as evaluated by quantitative RT-PCR methods. In these cells, the localization of Notch 3 was shifted from the nucleus to the cytoplasm. Furthermore, we conducted a in vivo experiment to test the effect of GSI. intraperitoneal administration of GSI appressed tumor growth in xanografts in the flank of Balb/c nude mice.

研究分野：消化器外科

キーワード：大腸癌 ガンマセクレターゼ

1. 研究開始当初の背景

大腸癌は、男性では前立腺癌、肺癌、胃癌に次いで第4位、女性では乳癌について第2位の死亡率となっている悪性疾患である。手術療法はもっとも有効な治療であるが、一方で非常に進行した stage で発見され手術のみでは治癒が望めないことも多い。切除不能の大腸癌に対する化学療法をはじめ集学的な治療の進歩は目覚ましいが、依然これらの効果には個別差があり、数多くのバイオマーカーの同定とそれぞれに対応する効果的な治療の開発が必要である。

Notch は腫瘍細胞を含む多くのヒトの細胞に発現しており、4 つの Notch1-4 と 5 つのリガンド (Jagged 1,2, Delta 1,3,4) が知られている。ともに細胞膜貫通型の蛋白であり、リガンド側からのシグナルを Notch 発現側の細胞が受け取るため、Notch はレセプターとしての役割を果たす。Notch はまず ADAM family による cleavage をうけ、ついでガンマセクレターゼによる cleavage により細胞内ドメイン (NICD) は細胞膜から離れて核に移行してその作用を発揮する。NICD は直接 Cyclin D を制御し増殖に関与するほか、NICD の下流には Notch-induced transcription factor と総称される HES-1, Hey-1, SOX9 などの標的がある。例えば HES-1 はさらに STAT3, p21, RUNX2, Snail1/2, AKT, Math, CD133, Nestinなどを標的として、化学療法耐性や遠隔転移、癌幹細胞の維持に関与するとされる。

これまでの研究では Notch 解析は主として細胞外ドメインを認識する抗体を用いて検討されてきた。我々は最近 Notch-1 と Notch-3 蛋白に着目し、特に核に移行した Notch-1, Notch-3 の NICD を認識する抗体を用いて評価すると、核での Notch-1 と Notch-3 の高発現が stage II, III の大腸癌の再発と関連することを見出し、両者ともに発現する症例の無再発生存は一方のみの発現あるいは両者の発現の弱い症例よりも有意に低いことを示した (Ozawa T et al. Ann Surg Oncol 2014)。上記の molecular mechanism から考えると、ガンマセクレターゼを阻害することにより Notch の NICD の量を制御することが治療につながるという仮説から本研究を計画した。

2. 研究の目的

大腸癌細胞株を用いて、Notch の発現がみられるか、またそれらの細胞でガンマセクレターゼ阻害剤投与により実際に Notch の ICD の核移行を抑制できるか、さらには癌細胞、生体における癌の behavior の悪性度の低下に相関するかを in vitro, in vivo で検証する。

3 . 研究の方法

in vitro では大腸癌細胞株を用いてガンマセクレターゼ阻害剤の有無による核 Notch や下流の因子である HES-1, Hey-1, SOX9 の発現量、細胞増殖能、細胞周期、幹細胞、アポトーシス、などを比較する。引き続きマウスでの大腸癌皮下移植モデルを用いてガンマセクレターゼ阻害剤の有無による抗腫瘍効果を検討する。

4 . 研究成果

ガンマセクレターゼ阻害薬として既に臨床応用され、副作用も含めて情報の豊富な塩酸ドネペジルを選択し、さらにポジティブコントロール用の Notch リガンドとして Jagged-1 を選んだ。Notch1 ~ 4、ヒト大腸癌株の Lovo 株、Caco2 株、SW480 株、HT29 株の 4 株について、抗 Notch1 ~ 4 抗体による細胞染色法を用いたスクリーニングを施行し、Notch 活性および塩酸ドネペジル反応性の特に高い受容体として Notch3 を選出し、細胞株としては Lovo 株と Caco2 株を選出した。ウエスタンブロッティング法を行ったところ、Lovo 株で塩酸ドネペジルによる活性化型 Notch3 タンパクの発現量低下を確認した。さらに細胞染色により、塩酸ドネペジル 10nM で 12 時間処理した大腸癌細胞株では Notch3 の局在が核から細胞質に移動することが示された。次いでリアルタイム PCR 法による Notch 経路の下流因子の評価を行った。Lovo 及び Caco2 株において、塩酸ドネペジル投与で非投与群に比べ Hey1, Hey2, Hes1, Ki-67 の発現量が 6-7 割程度に低下することが示された (法による)。また Jagged- 1 投与により刺激した大腸癌細胞株においても亢進した HEY 1 遺伝子の mRNA 転写活性が、塩酸ドネペジル投与により大きく抑制されることを確認した。他の Notch 経路の下流に位置する遺伝子 HEY2 や HES1、HES2 遺伝子についても同様の傾向が示された。

動物実験では、大腸癌細胞株LoVoをBalb/c nu/nu雌マウスの側腹部皮下に投与してできた

xenograftに対して、塩酸ドネペジルを腹腔内に1-5 mg/kg, 週3回を2週間投与したが、非投与群に比べて腫瘍体積の増加が抑えられる傾向があった。さらに塩酸ドネペジル投与スケジュールを調整する試みにより、そのin vivoでの抗腫瘍効果がさらに明確なものとなる可能性があると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nozawa H, Takiyama H, Hasegawa K, Kawai K, Hata K, Tanaka T, Nishikawa T, Sasaki K, Kaneko M, Murono K, Emoto S, Sonoda H, Nakajima J.	4. 巻 in press
2. 論文標題 Adjuvant chemotherapy improves prognosis of resectable stage IV colorectal cancer: A comparative study using inverse probability of treatment weighting.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Ther Adv Med Oncol	6. 最初と最後の頁 in press
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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nozawa H, Morikawa T, Kawai K, Hata K, Tanaka T, Nishikawa T, Sasaki K, Shuno Y, Kaneko M, Hiyoshi M, Murono K, Emoto S, Sonoda H, Fukayama M, Ishihara S.	4. 巻 in press
2. 論文標題 Obstruction is associated with perineural invasion in T3/T4 colon cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Colorectal Dis	6. 最初と最後の頁 in press
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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔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
研究分担者	川合 一茂 (Kawai Kazushige) (80571942)	東京大学・医学部附属病院・講師 (12601)	
研究分担者	畑 啓介 (Hata Keisuke) (60526755)	東京大学・医学部附属病院・特任講師 (12601)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	渡邊 聡明 (Watanabe Toshiaki) (80210920)	東京大学・医学部附属病院・教授 (12601)	
研究 分 担 者	石原 聡一郎 (Ishihara Soichiro) (00376443)	東京大学・医学部附属病院・教授 (12601)	