

平成 2 6 年 6 月 1 7 日現在

機関番号 : 1 3 6 0 1

研究種目 : 基盤研究(C)

研究期間 : 2011 ~ 2013

課題番号 : 2 3 5 9 2 4 4 2

研究課題名 (和文) 子宮内膜癌における N o t c h シグナル関連因子の発現とその意義の研究

研究課題名 (英文) Analysis of the expression and function of Notch-related factors in endometrial carcinoma

研究代表者

高津 亜希子 (TAKATSU, Akiko)

信州大学・医学部附属病院・助教

研究者番号 : 9 0 4 4 7 7 3 0

交付決定額 (研究期間全体) : (直接経費) 4,000,000 円、(間接経費) 1,200,000 円

研究成果の概要 (和文) : 正常子宮内膜37例および子宮内膜癌76例の免疫染色から、Notch関連タンパク (Notch1、Notch3、JAG1、DLL4) の発現が、正常に比べ子宮内膜癌で有意に亢進していること、Notch1、JAG1両者高発現の場合、有意に予後が不良であることを見出した ($P=0.015$)。子宮内膜癌細胞株にNotch阻害剤 (DAPT) 添加を行ったところ、増殖能は変化しなかったが、遊走能・浸潤能の減弱が観察された ($p < 0.05$)。Notchシグナルが子宮内膜癌細胞の遊走能・浸潤能増強に関与し、Notchシグナル阻害剤は子宮内膜癌の新たな治療薬となる可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文) : The expression of Notch receptors (Notch1 and 3) and Notch ligands (JAG1 and DLL4) was examined immunohistochemically in 37 normal and 76 malignant endometrial tissue samples. For each section, immunohistochemical staining was scored using a positivity index (PI, full score; 200). The PIs for Notch1 (mean 90.4), Notch3 (mean 95.6), JAG1 (mean 95.5) and DLL4 (mean 88.2), were significantly higher in endometrial carcinoma than normal endometrium. Patients with tumours showing high expression of both Notch1 and JAG1 had a poor prognosis compared with those having double-negative carcinomas ($P = 0.015$). The addition of a Notch inhibitor, DAPT, did not inhibit proliferation, but decreased invasion and motility of endometrial carcinoma cell lines. In conclusion, the Notch1-JAG1 axis may enhance the invasive properties of endometrial carcinomas, which suggests the Notch pathway may be a promising target for the treatment of this malignancy.

研究分野 : 婦人科腫瘍学

科研費の分科・細目 : 外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード : Notch シグナル 子宮内膜癌 Notch 阻害薬 Notch1 Notch3 JAG1 DLL4

1. 研究開始当初の背景

Notch シグナル伝達経路の活性化は細胞の分化のみならず、増殖やアポトーシスに影響を与え、器官形成や特定の表現型への分化を促すことを示した(Science 1999;284)。更に近年、Notch シグナル経路が幹細胞の維持に関与することが示されたため (Androutsellis-Theotokis et al. Nature 2006; 442)、癌幹細胞の生存や維持への関与も注目されている。Notch シグナル伝達経路は Notch 受容体および Notch リガンドで構成され、現在までにヒトにおいて 4 種類の受容体 (Notch1-4) と 5 種類のリガンド (Jagged1, -2, Delta1, -3, -4) が同定されている。Notch 受容体、リガンドは共に細胞膜上に発現しており、細胞間接着による両者の結合により活性化される。リガンド結合により Notch 受容体は γ -secretase により切断され、細胞内ドメイン(NICD)が遊離し核に移行後、標的遺伝子の転写活性を制御することが明らかとなっている。Notch シグナル関連タンパクの発現異常は血液癌、乳癌、肺癌などで報告されており、Parr らは乳癌細胞株において Notch1 が腫瘍進展に関与すること、Notch2 は逆に腫瘍抑制に関与することを示した。(Parr et al. Int J Mol Med 2004;14)。Hanlon らは膵臓癌のマウスモデルにおいて Notch1 が腫瘍抑制遺伝子である可能性も報告しており (Cancer Res.2010;70) Notch シグナル経路関連タンパクの役割や発現異常は各々の悪性腫瘍によって大きく異なることが示唆される。子宮内膜癌に関して Cobellis らは Notch1 高発現および Jagged1 発現低下を報告しているが (J. Anat. 213: 464-472) Notch シグナル経路の子宮内膜癌における臨床病理学的意義や予後への影響に関しては未だ解析されていない。

2. 研究の目的

子宮内膜癌における Notch シグナル経路タンパクの発現状況と各種臨床病理学的因子との関連を解析する。またその機能をかいせきすることにより、新規分子標的となる可能性を検討する。

3. 研究の方法

(1) 組織サンプル

組織切片は、あらかじめ術前・生検前にインフォームドコンセントを得た後、摘出されたホルマリン固定パラフィン包埋組織検体を用いた。子宮内膜癌組織 76 例 (Grade1: 50 例、Grade2: 9 例、Grade3: 17 例)、正常子宮内膜組織 37 例 (増殖期 19 例、分泌期 18 例) を検討に用いた。

(2) 免疫染色

Notch シグナル経路関連タンパクのうち、Notch 受容体 (Notch1, Notch2) と Notch リガンド (JAG1 and DLL4) の発現を間接的酵素抗体法を用いて、免疫染色で検討した。

染色結果は 200 細胞中の陽性細胞率 (0-100) と染色強度 (陰性: 0、弱陽性: 1、強陽性: 2) から Positivity Index (PI) = $1 \times$ 弱陽性細胞率 + $2 \times$ 強陽性細胞率で算出し評価した (PI 最大値 200)。発現の統計学的有意差は Mann-Whitney U-test で検定した。各因子の平均 PI よりも高い症例を高発現群、低い症例を非高発現群として Kaplan-Meier 法で生存分析 (全生存期間) を行った。

(3) 子宮内膜癌細胞株における発現

子宮内膜癌細胞株 (HEC1A, HEC1B, HHUA, KLE, Ishikawa) における Notch シグナル経路関連タンパク (Notch1, Notch2, JAG1, DLL4) の発現を Western blotting で検討した。

(4) γ -secretase 阻害剤の効果の検討

上記の子宮内膜癌細胞に γ -secretase 阻害剤 DAPT を添加し、72 時間後までの増殖能を WST-1 assay で検討した。また KLE 細胞を用いて遊走能を scratch wound healing assay (48 時間後) で検討し、浸潤能を Matrigel invasion assay (22 時間後) で検討した。また細胞接着能を type IV collagen coated well に 2 時間で接着した細胞を WST-1 assay で定量した。

4. 研究成果

(1) 免疫染色結果

(ア) 正常子宮内膜

正常子宮内膜は月経周期から、増殖期と分泌期に分けて検討した。また機能層と基底層、上皮細胞と間質細胞ごとに検討した。上皮細胞と間質細胞いずれの場合も、機能層と基底層ともに増殖期と分泌期で Notch シグナル経路関連タンパク (Notch1, Notch2, JAG1, DLL4) の発現に差を認めなかった。

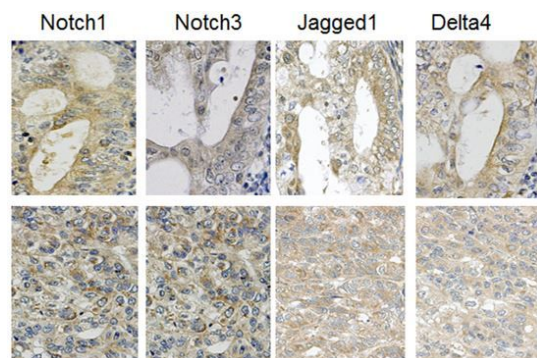


図1. 子宮内膜癌における Notch シグナル経路関連タンパクの免疫染色結果 上段: 類内膜腺癌 Grade1、下段: 類内膜腺癌 Grade3

(イ) 子宮内膜癌

正常子宮内膜に比較して子宮内膜癌で Notch1 (mean PI: 71.9 vs 90.4) Notch3 (mean PI: 76.1 vs 95.6) JAG1 (mean PI: 70.2 vs 95.5) DLL4 (mean PI: 74.0 vs

88.2) のいずれの発現も有意に増強していた ($P<0.05$) (図 1, 2) 各因子とも組織学的 Grade による発現差は認めなかったが、JAG1 のみ進行期 III, IV 期での発現が進行期 I, II 期より有意に高かった。(図 2)

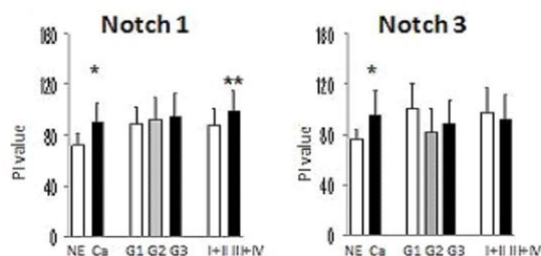


図 2 . 子宮内膜癌における Notch1, Notch3 の PI 平均値 NE: 正常子宮内膜機能層上皮、Ca : 子宮内膜癌、G1, G2, G3 : 類内膜腺癌 Grade1, 2, 3、I+II, III+IV : 進行期

(ウ) 累積生存期間

Kaplan-Meier 法での生存分析 (全生存期間) では、Notch1 高発現群 ($P=0.005$)、Notch3 高発現群 ($P=0.041$) で有意に生存期間が短縮していた。(図 3) JAG1 も高発現群で生存期間短縮の傾向を認めたが、 $P=0.078$ であり、有意差は認めなかった。さらに Notch1 と JAG1 がともに高発現群は Notch1 単独高発現症例よりも生存期間がより短縮していた ($P=0.015$)

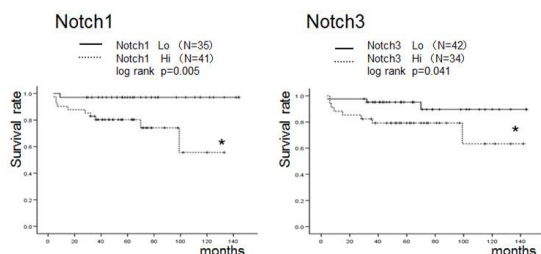


図 3 . Kaplan-Meier 累積生存曲線

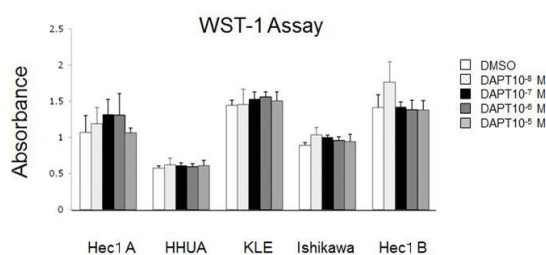


図 4 . γ -secretase 阻害薬 DAPT 添加 72 時間後の子宮内膜癌細胞の生細胞量 (WST-1 assay)

(2) 子宮内膜癌細胞

Western blot により、検討した 5 種の子宮内膜癌細胞 (HEC1A, HEC1B, HHUA, KLE, Ishikawa) の全てで Notch シグナル経路関連タンパク (Notch1, Notch2, JAG1, DLL4) の発現が確認された。これらの細胞に

γ -secretase 阻害薬 DAPT を添加し、増殖能検討のため 72 時間後の生細胞量を WST-1 assay で定量したところ、DAPT はこれらの細胞の増殖を抑制しないことが示された。(図 4) また細胞接着能に関しても、DAPT 添加は影響しなかった。

次に Matrigel invasion assay により KLE, HEC1B 細胞の浸潤能を検討したが、DAPT 添加により浸潤能の低下が観察され、特に KLE 細胞では有意差も認めた。(図 5) また scratch wound healing assay による遊走能の検討においても、KLE, HEC1B 細胞ともに DAPT 添加により遊走能の低下が観察され、特に KLE 細胞では有意差も認めた ($P<0.05$)

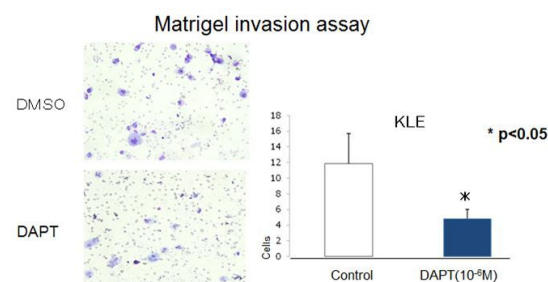


図 5 . KLE 細胞の Matrigel invasion assay の結果。DAPT 添加により、浸潤細胞の有意な減少が観察された。

以上より、Notch 経路は子宮内膜癌細胞の浸潤能・遊走能亢進を介し予後不良に関与する可能性が考えられた。Notch シグナル阻害剤は子宮内膜癌細胞の浸潤能・遊走能を阻害し、今後子宮内膜癌の新たな治療薬となる可能性が示唆された。

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 5 件)

1. Kobara H, Miyamoto T, Suzuki A, Asaka R, Yamada Y, Ishikawa K, Kikuchi N, Ohira S, Shiozawa T. Lipocalin2 enhances the matrix metalloproteinase-9 activity and invasion of extravillous trophoblasts under hypoxia. Placenta. 2013; 34: 1036-43. (査読あり)
2. Takatsu A, Miyamoto T, Fuseya C, Suzuki A, Kashima H, Horiuchi A, Ishii K, Shiozawa T. Clonality analysis suggests that STK11 gene mutations are involved in progression of lobular endocervical glandular hyperplasia (LEGH) to minimal deviation adenocarcinoma (MDA). Virchows Arch. 2013; 462: 645-51. (査読あり)
3. Miyamoto T, Suzuki A, Asaka R,

- Ishikawa K, Yamada Y, Kobara H, Nakayama J, Shiozawa T. Immunohistochemical expression of core 2 β 1,6-N-acetylglucosaminyl transferase 1 (C2GnT1) in endometrioid-type endometrial carcinoma: a novel potential prognostic factor. *Histopathology*. 2013 Jun;62(7):986-93. (査読あり)
4. Fuseya C, Horiuchi A, Hayashi A, Suzuki A, Miyamoto T, Hayashi T, Shiozawa T. Involvement of pelvic inflammation-related mismatch repair abnormalities and microsatellite instability in the malignant transformation of ovarian endometriosis. *Hum Pathol*. 2012; 43: 1964-72. (査読あり)
 5. Mitsuhashi Y, Horiuchi A, Miyamoto T, Kashima H, Suzuki A, Shiozawa T. Prognostic significance of Notch signalling molecules and their involvement in the invasiveness of endometrial carcinoma cells. *Histopathology*. 2012; 60: 826-37. (査読あり)

〔学会発表〕(計10件)

1. 石川香織、宮本 強、鈴木昭久、山田 靖、浅香亮一、塩沢丹里：子宮内膜癌におけるポリコム遺伝子群発現とその臨床病理学的意義の検討 .第65回日本産科婦人科学会学術講演会 2013年5月10日～12日 札幌
2. Yamada Y, Miyamoto T, Asaka R, Ishikawa K, Kobara H, Suzuki A, Shiozawa T : The expression of lipocalin2 in ovarian carcinoma and endometriosis . 14th International Gynecologic Cancer Society(IGCS) 2012年10月13日～16日 バンクーバー
3. Miyamoto T, Asaka R, Yamada Y, Ishikawa K, Kobara H, Suzuki A, Kashima H, Shiozawa T : Lipocalin2 enhances the proliferation of endometrial carcinoma cells in nude mice . 14th International Gynecologic Cancer Society(IGCS) 2012年10月13日～16日 バンクーバー
4. 宮本 強、浅香亮一、山田 靖、石川香織、小原久典、鈴木昭久、鹿島大靖、塩沢丹里 : Lipocalin2 はヌードマウスでの子宮内膜癌細胞の腫瘍増大を促進する . 第71回日本癌学会学術総会 2012年9月19日～21日 札幌
5. 宮本 強、浅香亮一、鈴木昭久、鹿島大靖、塩沢丹里 : Lipocalin2 は紫外線照射後およびシスプラチン処理後の子宮内膜癌細胞の生存を促進する .第64回日本産科婦人科学会学術講演会 2012年4月13日～15日 神戸
6. Asaka R, Miyamoto T, Suzuki A, Takatsu A, Kashima H, Nakayama J, Shiozawa T : Immunohistochemical expression of Core2 β 1-6 N-acetylglucosaminyl transferase 1 in the endometrial carcinoma; a novel potential prognostic factor . Asian Society of Gynecologic Oncology 2011年11月3日～5日 韓国
7. Takatsu A, Imanishi T, Tunoda H, Tanino S, Asaka R, Kashima H, Miyamoto T, Shiozawa T : Pre-operative diagnosis and the management of minimal deviation adenocarcinoma and lobular endocervical glandular hyperplasia of the uterine cervix: a multi-center, retrospective study . Asian Society of Gynecologic Oncology 2011年11月3日～5日 韓国
8. Miyamoto T, Asaka R, Imanishi T, Kashima H, Shiozawa T : Laser captured microdissection-microarray analysis of the genes involved in endometrial carcinogenesis: stepwise up-regulation of lipocalin2 expression in normal and neoplastic endometria, and its functional relevance . Asian Society of Gynecologic Oncology 2011年11月3日～5日 韓国
9. 高津亜希子、布施谷千穂、鈴木昭久、宮本 強、堀内晶子、塩沢丹里 : LEGH(lobular endocervical glandular hyperplasia)は悪性腺腫の前駆病変か? 第63回日本産科婦人科学会・総会・学術講演会 2011年8月29日～31日 大阪
10. 宮本 強、浅香亮一、鈴木昭久、高津亜希子、鹿島大靖、塩沢丹里 : 子宮内膜癌における lipocalin2 受容体 SLC22A17 発現の検討 . 第63回日本産科婦人科学会・総会・学術講演会 2011年8月29日～31日 大阪

6. 研究組織

(1)研究代表者

高津 亜希子 (TAKATSU, Akiko)
信州大学・医学部附属病院・助教
研究者番号 : 90447730

(2)研究分担者

鈴木 昭久 (SUZUKI, Akihisa)
信州大学・医学部附属病院・特任研究員
研究者番号 : 10547095

(3)研究分担者

塩沢 丹里 (SHIOZAWA, Tanri)
信州大学・医学部・教授
研究者番号 : 20235493