



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
報告番号	甲第1636号
学位記番号	第1171号
氏名	大久保 友貴
授与年月日	平成 30年 3月 26日
学位論文の題名	NOTCH1 activates the Wnt/ β -catenin signaling pathway in colon cancer. (大腸癌において NOTCH1 は Wnt/ β -catenin 経路を活性化する) Oncotarget 2017; 8(36): 60378-60389
論文審査担当者	主査: 城 卓志 副査: 高橋 智, 瀧口 修司

論文内容の要旨

【背景と目的】

大腸癌では Wnt シグナルの異常が認められ、 β -catenin が細胞質や核内に異常集積している。 β -catenin は核内へと移行後、転写因子 TCF と結合し、CyclinD1 などの下流遺伝子の発現が上昇する。一方、NOTCH1 シグナル経路は消化管粘膜の増殖刺激作用をもち、発癌作用についての報告もみられる。NOTCH1 は細胞膜に存在し、 γ セクレターゼによって切断され、NICD1(NOTCH1 Intracellular domain)が活性化される。さらに NICD1 が核へ移行し、下流遺伝子の発現が促進される。しかしながら、NOTCH1 が癌化にどのように関与するのか、その詳細なメカニズムに関しては不明なことが多い。今回我々は、NOTCH1 が Wnt/ β -catenin シグナル伝達経路へ関与するメカニズムについて検討した。

【方法】

- ① 大腸癌組織検体の免疫染色で NICD1 と β -catenin の局在を調べ、臨床データと比較検討した。
- ② 大腸癌細胞株の NICD1 の発現量をウエスタンブロッティングにて検討した。
- ③ NICD1 を発現するベクターを作成し、HCT116 に導入した。蛍光免疫染色を施行し、細胞内での NICD1 や β -catenin の局在や発現量を比較した。核内の β -catenin 蛋白や β -catenin 経路においてその下流に存在する cyclinD1 の発現量をウエスタンブロッティングで測定し、比較検討した。colony formation assay を施行し、増殖能の変化を調べた。TCF 活性への影響についても、Luciferase assay を施行し、比較検討した。
- ④ NOTCH1 の活性を抑えるために SW480 を siNICD1 もしくは γ セクレターゼ阻害薬(DAPT) で刺激した。③と同様に NOTCH1 の Wnt シグナルへの影響について検討した。

【結果】

- ① <臨床検体における NICD1 と β -catenin の発現>組織標本における免疫染色では NICD1 と β -catenin の局在が一致した。核内の NICD1 高発現群では、腫瘍の深達度が進行していた。多変量解析では、核での NICD1 の強発現は、独立した予後不良因子であった。
- ② <大腸癌細胞株の NICD1 の発現>NICD1 の発現は HCT116 では低発現で SW480 では高発現であった。
- ③ <NICD1 強発現による Wnt シグナルへの影響>蛍光免疫染色では NICD1 を過剰発現させた HCT116 において、核内の NICD1 発現を認め、同時に β -catenin の核での発現を認めた。ウエスタンブロッティングでは NICD1 の強発現により、核内の β -catenin 発現は上昇し、下流遺伝子の CyclinD1 の発現の上昇を認めた。colony formation assay では細胞の増殖能は上昇し、Luciferase assay でも TCF 活性は上昇していた。
- ④ <NICD1 発現抑制による Wnt シグナルへの影響>NICD1 を抑制した SW480 では免疫染色で核内の NICD1 の発現は減少し、さらに核内 β -catenin も減少していた。ウエスタンブロッティングでは核内の β -catenin の発現の低下と CyclinD1 の低下を認めた。細胞の増殖能は低下し、さらには TCF 活性の低下も認めた。

【考察】臨床検体の免疫染色の解析では NICD1 の核での発現は癌の浸潤に関与していることが示唆された。従来 β -catenin が核へ移行するメカニズムが不明であったが、NICD1 が β -catenin とともに核内へと移行し、Wnt/ β -catenin 経路を活性化することで、細胞を増殖へ導いていくという機序が解明された。

【結論】NOTCH1 は Wnt/ β -catenin シグナルを活性化し、癌細胞の増殖に寄与していた。

論文審査の結果の要旨

【背景と目的】大腸癌では Wnt シグナルの異常が認められ、 β -catenin が細胞質や核内に異常集積している。 β -catenin は核へと移行後、転写因子 TCF と結合し、CyclinD1 などの下流遺伝子の発現が上昇する。一方、NOTCH1 シグナル経路に関しても、発癌作用に関連しているとの報告もみられる。NOTCH1 は細胞膜に存在し、 γ -secretase によって切断され、NICD1 (NOTCH1 Intracellular domain) が活性化される。さらに NICD1 が核へ移行し、下流遺伝子の発現が促進される。しかしながら、NOTCH1 が癌化にどのように関与するのか、その詳細なメカニズムに関しては不明なことが多い。今回、NOTCH1 が Wnt/ β -catenin シグナル伝達経路へ関与するメカニズムについて検討した。

【方法】①大腸癌組織検体の免疫染色で NICD1 と β -catenin の局在を調べ臨床データと比較検討した。②大腸癌細胞株の NICD1 の発現量を Western blotting にて検討した。③NICD1 を発現するベクターを作成し、HCT116 に導入した。蛍光免疫染色を施行し、細胞内での NICD1 や β -catenin の局在や発現量を比較した。核内の β -catenin 蛋白や β -catenin 経路の下流に存在する cyclinD1 の発現量を Western blotting で測定し、比較検討した。colony formation assay を施行し、増殖能の変化を調べた。TCF 活性への影響についても、Luciferase assay を施行し、比較検討した。④NOTCH1 の活性を抑えるために SW480 を siNICD1 もしくは γ -secretase 阻害薬(DAPT)で刺激した。③と同様に NOTCH1 の Wnt シグナルへの影響について検討した。

【結果】①<臨床検体における NICD1 と β -catenin の発現>組織標本における免疫染色では NICD1 と β -catenin の局在が一致した。核内の NICD1 高発現群では、腫瘍の深達度が進行していた。多変量解析では、核での NICD1 の強発現は、独立した予後不良因子であった。②<大腸癌細胞株の NICD1 の発現>NICD1 の発現は HCT116 では低発現で SW480 では高発現であった。③<NICD1 強発現による Wnt シグナルへの影響>蛍光免疫染色では NICD1 を過剰発現させた HCT116 において、核内の NICD1 発現を認め、同時に β -catenin の核での発現を認めた。Western blotting では NICD1 の強発現により核内の β catenin 発現は上昇し、下流遺伝子の CyclinD1 の発現の上昇を認めた。colony formation assay では細胞の増殖能は上昇し、Luciferase assay でも TCF 活性は上昇していた。④<NICD1 発現抑制による Wnt シグナルへの影響>NICD1 を抑制した SW480 では免疫染色で核内の NICD1 の発現は減少し、さらに核内 β -catenin も減少していた。Western blotting では核内の β -catenin の発現の低下と CyclinD1 の低下を認めた。細胞の増殖能は低下し、さらには TCF 活性の低下も認めた。

【考察】従来 β -catenin が核へ移行する機序が不明であったが、NICD1 が β -catenin とともに核内へと移行し、Wnt/ β -catenin 経路を活性化することで、細胞を増殖へ導いていくという機序が解明された。

【審査内容】申請者から 15 分ほど論文内容が説明された後、質疑がなされた。まず、主査である私(城)より、(1)NOTCH1 の核内タンパクがこのような機能を持つ生理的な意味は？ (2) γ -secretase の活性はどのように制御されているか。(3)NICD1 のみをどうやって過剰発現させたのか？など 14 項目の質問を行った。第 1 副査の高橋教授より(1)NICD1 の核内移行はどのようなメカニズムで起こるのか。(2)NICD1 の強制発現系はすべて transient のものか？それとも stable のものか？(3)TOP flash や FOP flash とは何か？など 11 項目の質問がされた。第 2 副査の瀧口教授より(1)多変量解析には交絡因子の検討はしたかどうか。(2)癌の遊走能や浸潤能に関する検討は行ったかどうか。(3)本研究でもう少しやっておきたかったことは？の 3 項目の質問があった。一部、返答に窮することもあったが、概ね適切な回答であった。本研究は、大腸癌において NOTCH1 が Wnt/ β catenin 経路を活性化することを明らかにした。よって、これらの新しい知見を報告している本論文の筆頭著者は博士(医学)の学位を授与するに相応しいと判断した。

論文審査担当者 主査 城 卓志 副査 高橋 智 瀧口 修司