



Title	NOTCH3 limits the epithelial-mesenchymal transition and predicts a favorable clinical outcome in esophageal cancer
Author(s)	松浦, 記大
Citation	大阪大学, 2021, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/85308
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について <a>〉 をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論 文 内 容 の 要 旨
Synopsis of Thesis

氏 名 Name	松浦 記大
論文題名 Title	NOTCH3 limits the epithelial-mesenchymal transition and predicts a favorable clinical outcome in esophageal cancer (NOTCH3は食道癌の上皮間葉転換を制御し、臨床的なアウトカムの予測因子である)
論文内容の要旨	
〔目的(Purpose)〕	
<p>食道扁平上皮癌 (esophageal squamous cell carcinoma: ESCC) はヒトの扁平上皮癌の中でも予後不良な癌の一つであり、上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition: EMT) を介した化学療法抵抗性がある原因の一つと考えられている。一方で、ESCCにおいて遺伝子変異の頻度として、Notchシグナルの中心的な役割を担うタンパク質であるNotch1やNotch3が上位にあることから、Notchシグナルの異常が食道癌の発癌や進行、また治療抵抗性に関わっている可能性が示唆されている。さらに、近年の報告でESCCにおいてEMTが生じる際にNotch3の発現が低下することが報告されたが、化学療法抵抗性におけるNotchシグナルの役割は未だ不明である。そこで今回、Notch3と化学療法抵抗性との関連について検討を行うこととした。</p>	
〔方法ならびに成績(Methods/results)〕	
<p>ヒト食道癌細胞株 (TE6とTE11) に5-FUを暴露したところ、Notch3 FL (Notch3 full length) とNotch3の活性化の指標となるICN3 (Intracellular domain of Notch3) は減少し、EMT関連因子のうち上皮系マーカーのE-cadherinは減少し間葉系マーカーのVimentinとN-cadherinは増加した。続いてTE11の5-FU耐性株と親株のTE11を比較したところ、耐性株においてNotch3 FLとICN3は減少し、E-cadherinは減少し、VimentinとN-cadherinは増加した。また遊走能は亢進した。次に、Notch3の発現をRNA干渉で抑制したところ、E-cadherinは減少、VimentinとN-cadherinは増加し、遊走能は亢進した。5-FUへの感受性はNotch3の抑制により低下し、5-FU暴露によるアポトーシス細胞の割合は減少した。一方でICN3を強制発現させると、VimentinとN-cadherinの減少を認め、遊走能は低下した。また5-FU暴露によるアポトーシス細胞の割合は増加し、5-FUの治療感受性は上昇した。さらにICN3を強制発現して5-FUに暴露すると、Vimentinの増加が抑制されていることが分かった。そこで、Notch3がVimentinを制御している可能性を検討するため、ChIP-Atlasを用いてVimentinの2nd intronにNotch3が直接結合することを予測し、クロマチン免疫沈降でNotch3が同部位に結合することを確認した。</p> <p>続いてヌードマウスを用いて皮下腫瘍を作成し、ICN3を強制発現させることで5-FUの感受性が改善するかどうかを検証した。コントロール株とICN3の強制発現株に対する5-FU投与の有無で、合計4群比較とした。5-FUを3日毎に投与し21日間観察したところ、コントロール株では有意な腫瘍の縮小は認めなかったが、ICN3の強制発現株では5-FUを投与することで有意に腫瘍の縮小を認めた。また、ICN3の強制発現株に5-FUを投与したマウスの皮下腫瘍はTUNEL assayにおいてアポトーシスに陥っている細胞がコントロール株と比べて多かった。さらに皮下腫瘍をNotch3、Vimentin、E-cadherin、N-cadherinで免疫組織染色したところ、コントロール株に5-FUを投与したマウスの皮下腫瘍ではVimentinとN-cadherinの発現上昇を認めた一方で、ICN3の強制発現株に5-FUを投与したマウスの皮下腫瘍はVimentinやN-cadherinの発現をほとんど認めなかった。つまり、コントロール株ではEMTが誘導されていたが、ICN3の強制発現株ではEMTの誘導が減弱し5-FUの治療によりアポトーシスが誘導されていた。</p> <p>最後に、術前補助化学療法後に手術を行ったESCC 120症例の切除サンプルを用いて、Notch3、Vimentin、N-cadherinの発現状況および臨床病理学的因子との関連性を免疫染色で検討した。Notch3の活性が低い場合、VimentinとN-cadherinの発現は有意に多かった。また抗癌剤の組織学的効果判定との比較で、Notch3の活性が低い場合、Vimentinの発現が多い場合、N-cadherinの発現が多い場合は、いずれも抗癌剤の効果が乏しかった。最後に予後との関連を検討したところ、Notch3の活性が低いと全生存率、無再発生存率ともに有意に不良であった。</p>	
〔総括(Conclusion)〕	
<p>ESCCにおいてNotch3は、EMTによって化学療法抵抗性を制御し、かつ臨床的なアウトカムの予測因子となりうる可能性が示唆された。</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 松浦 記大	
論文審査担当者	(職) 氏 名
	主 査 大阪大学教授 土岐祐一郎
	副 査 大阪大学教授 竹原徹也
	副 査 大阪大学教授 小川和彦
<p>論文審査の結果の要旨</p> <p>Notchシグナルは食道癌においては上皮間葉転換に関与する可能性が報告されており、今回は特にNotch3に着目し、治療抵抗性の原因となる抗癌剤耐性と上皮間葉転換との関連について検討している。</p> <p>本研究では、食道癌細胞株に抗癌剤を暴露すると、Notch3の漸減と上皮間葉転換の誘導を認めた。抗癌剤耐性株ではNotch3の抑制と上皮間葉転換を認めた。次に、RNA干渉を用いてNotch3を抑制したところ、上皮間葉転換の誘導を認め抗癌剤感受性は悪化した。逆に抗癌剤暴露時にNotch3の抑制が起こらないようにNotch3を強制的に活性化させると、抗癌剤感受性は改善を認めた。マウスの皮下腫瘍を用いて同様の検討を行ったところ、Notch3の活性化により上皮間葉転換の誘導阻害と抗癌剤感受性の改善を認めた。抗癌剤治療後の食道癌切除サンプル120例の免疫染色を行い、Notch3陰性群では上皮間葉転換が誘導されており抗癌剤の感受性も悪かった。つまり、Notch3を介した上皮間葉転換の誘導が抗癌剤耐性に関連しNotch3の活性化は上皮間葉転換を阻害して抗癌剤感受性を改善させることが判明した。この結果は治療への応用も期待される。</p> <p>本研究はCancer Medicine誌に掲載され、学位の授与に値すると考える。</p>	