

●ファイザーフェローシップ報告

 γ -secretase inhibitor によるヒト肺癌細胞における Notch3 活性と細胞増殖の抑制

小西 純

はじめに

私は2005年4月から2008年3月まで、テネシー州ナッシュビルにありますが Vanderbilt 大学の Thao P. Dang 先生の教室に留学させていただきました。留学中、膜受容体蛋白である Notch3 の肺癌における役割について、研究いたしました。その結果につきましては、Konishi らの文献¹⁾に記載されておりますが、内容をご報告いたします。

背景と目的

Notch pathway は、神経、造血、血管といったさまざまな組織の分化にとって重要な役割を果たしている、シグナル伝達経路である²⁾。哺乳動物においては4つの細胞膜蛋白である Notch receptor と5つのリガンドの存在が知られており、4つすべての Notch receptor の異常活性が癌化と密接に関連していることが報告されている^{3)~6)}。Notch 活性化の機序としては、リガンドが Notch receptor にいったん結合すると γ -secretase と呼ばれるプロテアーゼにより Notch receptor が分解され、活性型である Notch 細胞内ドメイン (NICD) が細胞膜より核内へ移行する。その後 NICD が転写因子である CSL (CBF1, Sel, Lag-1) と結合することで、標的遺伝子 (Hes, Hey) の転写活性が行われる²⁾。 γ -secretase inhibitor は γ -secretase の活性化を抑えることで Notch pathway を抑制し、さまざまな腫瘍をアポトーシスに導くことが報告されている⁴⁾⁷⁾が、肺癌における詳細な検討は十分ではない。我々は、Notch3 が肺癌組織の約40%に過剰発現しており、さらに Notch3 を dominant negative (DN) により抑制すると、非小細胞肺癌細胞株の増殖が抑えられ腫瘍原性が失われることを報告した⁸⁾。今回我々は、 γ -secretase inhibitor を使用し Notch3 の肺癌細胞における役割について検討した。

方 法

肺癌細胞株は Notch3 が高発現である HCC2429, H460, A549 を使用した。Notch3 の発現と各種アポトーシス関連蛋白の発現は、ウエスタンブロットにより確認した。HES1 と HEY1 の発現については real time PCR を使用し確認した。 γ -secretase inhibitor の細胞傷害活性については MTT assay を用い、アポトーシス細胞は annexin V と PI を用いフローサイトメトリーにより確認した。Notch3 の抑制は以下のシーケンス (5'-CACCUAUAACUGCCAGUGC-3') を用い siRNA により施行した。xenograft model は、ヌードマウスに上記の肺癌細胞株 (1×10^7) を接種し作製した。腫瘍が触知可能になった時点で γ -secretase inhibitor (100 mg/kg) を1週あたり3日間連続経口投与、4日間休薬とし、2~3週間施行した。

結 果

γ -secretase inhibitor は、非小細胞肺癌細胞株における Notch3 の発現を濃度依存的に抑制し、Notch pathway の下流のシグナルである HES1, HEY1 の発現も抑制した。また γ -secretase inhibitor は非小細胞肺癌細胞株の増殖を抑制し、アポトーシス細胞数の増加を誘導した。さらに Bcl-2, BclxL の発現の低下と PARP, cytochrome C の発現が誘導され、 γ -secretase inhibitor によりアポトーシスシグナルの活性化が認められた。*in vivo* において γ -secretase inhibitor 投与群ではコントロール群に比べて腫瘍縮小効果を認め、腫瘍組織において Notch3 発現の低下が認められた。使用した肺癌細胞株のうち4つの Notch family の発現を調べたところ、Notch3 の発現のほかに HCC2429 でのみ Notch1 の発現を認めしたが、A549, H460 では発現を認められず、 γ -secretase inhibitor の作用は比較的 Notch3 特異的であることが示唆された。HCC2429 については、Notch3 の発現が Notch3 siRNA によって抑制されると γ -secretase inhibitor の効果が減弱したことから、HCC2429 においても γ -secretase inhibitor の効果は Notch3 特異的であると考えられた。

連絡先：榊原 純 (現姓)

〒060-8638 北海道札幌市北区北15条西7丁目

北海道大学医学部第1内科

(E-mail: konishj@med.hokudai.ac.jp)

結 論

γ -secretase inhibitor を使った Notch pathway の抑制は、肺癌における新しい標的治療となりうることが示唆された。

謝辞：今回、このような留学の機会を与えていただき誠にありがとうございました。ファイザーフェローシップ選考委員の先生方をはじめとして、ご指導いただきました数多くの先生方にこの場をお借りして深謝いたします。

引用文献

- 1) Konishi J, et al. Gamma-secretase inhibitor prevents Notch3 activation and reduces proliferation in human lung cancers. *Cancer Res* 2007; 67: 8051-7
- 2) Radtke F, et al. The Notch 'gospel'. *EMBO Rep* 2005; 6: 1120-5.
- 3) Das I, et al. Notch oncoproteins depend on gamma-secretase/presenilin activity for processing and function. *J Biol Chem* 2004; 279: 30771-80.
- 4) Curry CL, et al. Gamma secretase inhibitor blocks Notch activation and induces apoptosis in Kaposi's sarcoma tumor cells. *Oncogene* 2005; 24: 6333-44.
- 5) Duechler M, et al. Induction of apoptosis by proteasome inhibitors in B-CLL cells is associated with downregulation of CD23 and inactivation of notch2. *Leukemia* 2005; 19: 260-7.
- 6) Reedijk M, et al. High-level coexpression of JAG1 and NOTCH1 is observed in human breast cancer and is associated with poor overall survival. *Cancer Res* 2005; 65: 8530-7.
- 7) Qin JZ, et al. p53-independent NOXA induction overcomes apoptotic resistance of malignant melanomas. *Mol Cancer Ther* 2004; 3: 895-902.
- 8) Haruki N, et al. Dominant-negative Notch3 receptor inhibits mitogen-activated protein kinase pathway and the growth of human lung cancers. *Cancer Res* 2005; 65: 3555-61.