

論文の内容の要旨

論文題目 「Frequent mutations in NOTCH1 ligand-binding regions in Japanese oral squamous cell carcinoma」

(日本人の口腔扁平上皮癌には、NOTCH1 リガンド結合領域に高頻度に変異が認められる)

学位申請者 青山 謙一

キーワード: Japanese oral squamous cell carcinoma、NOTCH1、Point mutation、Ligand binding region、Protein structure simulation

【背景】口腔扁平上皮癌（OSCC）は頭頸部癌の一部とされているが、その治療感受性はその他の頭頸部癌とは異なり、口腔領域単独の解析が必要とされている。また、OSCC に特異的なバイオマーカーは存在せず、病態解明が待たれている。近年、米国において頭頸部扁平上皮癌（HNSCC）に対するエキソームシーケンスによる遺伝子変異を解析した報告がされ、それらは既知の *TP53*、*CDKN2A*、*PIK3CA* や *HRAS* などの癌関連遺伝子とともに、*NOTCH1* 遺伝子において 8.1-15.6% と高頻度に変異が認められることが示された。*NOTCH1* 遺伝子は、悪性リンパ腫患者の半数において活性化変異が認められることが知られているが、近年は頭頸部癌を含めた多くの固形癌においても重要性が示されている。しかしながら、固形癌において NOTCH1 は腫瘍化機能と腫瘍抑制機能の両者をもつとの報告があり、その真実は明らかでない。特に、日本人の OSCC に対する、*NOTCH1* の変異を検討した報告はなく、その病態解明が必要とされている。

【目的】NOTCH タンパク質（NOTCH1-4）は細胞膜貫通受容体であり、細胞外ドメインに Epidermal growth factor（EGF）-like repeat が 36 個存在する。この中で、EGF-like repeat 12 がリガンド結合ドメイン、その周囲を含めてリガンド結合領域と呼ばれている。米国の HNSCC における上記報告において、悪性リンパ腫で知られる領域と異なり、NOTCH1 のリガンド結合領域に変異が集中していることが示された。そこで、日本人の OSCC に対し、NOTCH1 においてリガンド結合領域である EGF-like repeat 10-13 をコードする領域（Exon 6-9）に対する遺伝子変異の解析を行い、日本人の変異スペクトラムおよびその臨床的意義を検討するとともに、機能を解析することで、NOTCH1 が OSCC のバイオマーカーとなり得るかを解明することを目的に研究を行った。

【対象・方法】2010 年 4 月から 2012 年 12 月に東海大学医学部附属病院口腔外科を受診し、根治的に腫瘍切除手術を行った 84 症例の OSCC 新鮮患者を対象と

した。新鮮手術標本よりそれぞれ腫瘍組織と正常粘膜を凍結保存した。標本より抽出したゲノム DNA に対し、リガンド結合領域をコードする Exon6-9 に対して PCR を行い、サンガー法により遺伝子変異を解析した。なお、変異の確認された症例に対しては、正常組織に変異がないことを確認した。確認された *NOTCH1* 変異と臨床情報とを統計学的に解析した。本研究により発見された *NOTCH1* 変異の機能解析の足掛かりとして、リガンド結合ドメインに認められた日本人 OSCC および白人 HNSCC 由来の *NOTCH1* 変異 (p. A465T および p. G481S) が、タンパク質の構造に与える影響を、報告されている X 線回折結果 (PDB: 2VJ3) に基づいてシミュレーションした。*In vitro* の解析は、変異型 *NOTCH1* (p. A465T, p. G481S, p. C376Y, p. C387Y) 発現ベクターを作製し、HEK293 細胞に一過性に過剰発現させることにより行った。これらの発現細胞に対し、ウエスタンブロッティング、フローサイトメトリーを行うことで、タンパク質の発現と局在を確認した。

【結果】84 症例のうち 8 症例 (9.5%)、6 カ所において新規の点変異が発見され、これらはすべて G>A transition でアミノ酸変異を伴うものであった。これら *NOTCH1* 遺伝子に変異を有する OSCC 症例は、野生型の症例に比べ、有意に無病生存期間が長かった ($P < 0.05$)。X 線結晶解析データを基準として、タンパク質の立体構造をシミュレーションしたところ、p. A465T 変異により *NOTCH1* の EGF-like repeat 11-13 の立体構造が変化する可能性、p. G481S 変異により同領域の柔軟性が喪失する可能性があることが示された。*In vitro* における解析では、ウエスタンブロッティングにおいて変異型 *NOTCH1* の発現は確認されたが、フローサイトメトリーの結果、細胞膜に局在しにくいことが示された。

【考察】本研究において、日本人の OSCC 症例の 9.5% に *NOTCH1* 遺伝子の変異が確認され、諸外国の報告 (米国の HNSCC における 8.1-15.6%、インドの OSCC における 16.0%、中国の OSCC における 43.1%) と同様に高率であった。また、リガンド結合領域付近の EGF-like repeat 10-13 をコードする領域においては、米国の 4.1-6.3%、インドの 2.0%、中国人の 1.9% に比べ日本人では高頻度であった。臨床情報との解析においては、*NOTCH1* 遺伝子に変異のある日本人の OSCC 患者において、有意に無病生存期間が長いことが示されたが、探索的な単変量解析であるため、今後症例数を増やしてさらなる客観的な検討が必要であると思われる。また、中国の OSCC に対する報告では *NOTCH1* 遺伝子変異が予後不良因子であるとされており、異なる結果となったが、この報告では 51 症例の OSCC 患者から 42 変異が発見されているが、本研究で解析したリガンド結合領域における変異は 1 症例と、異なるスペクトラムを示し、人種差による可能性が高いと考えられる。さらに、機能解析の足掛かりとして、変異型 *NOTCH1* のタンパク質立体構造をシミュレーションしたが、この結果によると、変異型 *NOTCH1* によりタンパク質の構造が変化し、リガンド結合が不安定になる可能性

が示され、NOTCH1 経路の活性化に影響が与えられる可能性が示唆された。また、*In vitro* の解析では変異型 NOTCH1 タンパク質の細胞膜局在が不安定であることが示されたことから、日本人の OSCC より発見された *NOTCH1* 遺伝子の変異は、NOTCH1 経路の機能を低下させる可能性があることが示唆された。引き続き、OSCC と NOTCH1 の関連をさらに客観的に解析する計画であり、現在も新規の症例より標本採取を行っている。また、すべての変異型 NOTCH1 を発現するベクターを作製し、解析を進めていく準備を行っている。

【結論】本研究により、日本人 OSCC において、*NOTCH1* 遺伝子のリガンド結合部位とその周辺部位において諸外国に比較して高率に新規の変異が発見された。変異スペクトルが欧米やアジアでの報告と異なることや、NOTCH1 に変異のある症例においては、有意に無病生存期間が長かったことは興味深い。タンパク質の構造シミュレーションと *In vitro* に解析により、これらの NOTCH1 の変異は、NOTCH1 経路の活性低下を引き起こしている可能性が示唆された。