慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	ヒトNotch4およびヒトNotch1遺伝子の子宮内膜癌における発現異常
Sub Title	
Author	鈴木, 貴士(Suzuki, Takashi)
Publisher	慶應医学会
Publication year	2004
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.81, No.2 (2004. 6) ,p.T51- T61
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	学位論文
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20040601-0051

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

慶應医学・81(2)：T51～T61，2004

学位論文

ヒト *Notch4* およびヒト *Notch1* 遺伝子の子宮内膜癌における発現異常

慶應義塾大学医学部産婦人科学教室
（指導：野澤志朗教授）
鈴木貴士（すずき たかし）

（平成15年10月1日受付）

Key Words：*Notch4*, *Notch1*, endometrium, endometrial cancer, lateral specification

近年，ショウジョウバエにおいて遺伝学的手法を利用した解析により胚発生における多くの知見が得られている．ショウジョウバエの重要な遺伝子の機能は種を越えて保存されており，異なった種においても重要な役割を果たしていることが明らかにされている[1]．したがって，ショウジョウバエのこれらの遺伝子に対応する脊椎動物の相同遺伝子を単離し解析することは，脊椎動物におけるその機能を知るうえで有用な手法の1つとなっている．

ショウジョウバエの神経系の過形成を引き起こす原因遺伝子として単離された *Notch* 遺伝子およびそのタンパクは発生過程において様々な役割を果たしている重要な遺伝子であると考えられている．Notch タンパクは cell autonomous に作用する膜貫通型の受容体タンパクである[2]．その細胞外領域のアミノ酸配列は36個の epidermal growth factor (EGF)-like リピートと3つの Lin-12/Notch リピートをもち，細胞内領域には高度に保存された6つの cdc10/ankyrin リピートをもつ[3,4]．

様々な機能の中で最もよく研究されているのは神経系の発生における Notch の機能である[3~5]．*Notch* が欠失した変異体は神経外胚葉から表皮細胞の分化が起こりにくくなり，ほとんどすべての細胞が神経芽細胞となる[6~8]．一方，Notch を過剰発現させると神経芽細胞の分化が抑制され，表皮細胞の増加が目立つようになる[2,9]．これらの結果より *Notch* は神経外胚葉細胞の神経芽細胞への分化を抑制（lateral inhibition）し，正常な細胞系譜になるように機能している遺伝子であると考えられている．現在，*Notch* は細胞が分化する多くの局面で発現が認められる多機能な遺伝子であることが知られている．例えば，中胚葉系細胞の運命決定や，胚の軸索形成[10]，さなぎの複眼形成[11]，剛毛形成[2]にも *Notch* の発現が必要であり，また胚の上皮形成や維持[8]，卵母細胞形成[12]にも重要な役割を果たしていることが明らかとなっている．さらに，発生初期過程における *Notch* の欠損は三胚葉すべての組織や細胞に影響を与え，*Notch* シグナル系は発生後期においても中枢および末梢神経系，精子および卵形成，筋分化，心臓形成，成虫原基の発生に必要とされる[8]．

Notch は種を越えて保存され，*Notch* 相同遺伝子が線虫[13,14]，ウニ[15]，ゼブラフィッシュ[16]，アフリカツメガエル[17]，ラット[18,19]，マウス[20~27]，ヒト[28~32]などから複数単離されており，ヒトを含めたすべての動物で *Notch* の突然変異は発生異常を示すことが知られている．さらに，無脊椎，脊椎動物の研究結果より *Notch* 相同遺伝子の細胞内領域が発生分化におけるシグナル伝達に重要であることが報告されている[9,33~40]．

一方で，マウス *Notch4/int-3*, *TAN-1*（*Translocation Associated Notch* homologue-1；ヒト *Notch1*），ヒト *Notch2* といった *Notch* 相同遺伝子は発生分化にのみ関与しているのではなく，その異常は発癌にも関与していることが明らかとなっている．これらの相同遺伝子の1つであるマウス *int-3* はその全長がクローニングされ，マウス *Notch4/int-3* として知られている[26,27]．この遺伝子はマウスの初期発生において血管内皮細胞に発現しており，血管新生に関与していると考えられている反面，*int-3* 遺伝子座に mouse mammary tumor virus (MMTV) が挿入されることにより，2.3 kbp の過剰な *int-3* mRNA の増幅が認められ乳癌が発生する[41]．マウ

本論文は，Suzuki T, Aoki D, Susumu N, Udagawa Y, Nozawa S：Imbalanced expression of *TAN-1* and human *Notch4* in endometrial cancers. Int J Oncol 17：1131-1139 の一部を含む．

ス乳腺上皮細胞でのマウス *int-3* 細胞内領域の強制発現[25]や，同領域を強制発現させたトランスジェニックマウス[42]などの研究結果から，マウス *int-3*（細胞内領域）はMMTVによる乳癌の原因遺伝子の1つであることが明らかとなっている．*TAN-1*（ヒト *Notch1*）は染色体上で転座を起こすとT細胞白血病を引き起こすことが知られている．この際，*TAN-1*（ヒト *Notch1*）の細胞内領域が過剰発現していることが報告されている[28]．ヒト *Notch2* の機能は未だ明らかにされていないが，子宮頸癌に関与している可能性が報告されている[43]．

ヒトにおけるショウジョウバエNotchの相同遺伝子および相同タンパクは上記の他に2つ知られており，それぞれNotch3，Notch4と呼ばれている．Notch3は，その突然変異によりCADASIL（Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy）の原因となっていることが知られている[44,45]．ヒト *Notch4* はマウス *Notch4/int-3* の相同遺伝子としてそのゲノムおよびcDNAがクローニングされ，第6番染色体上に存在することが報告されている[31,32]．ショウジョウバエ *Notch* やマウス *Notch4/int-3* のトランスジェニックマウス，*TAN-1*（ヒト *Notch1*）のT細胞白血病に関する知見から，ヒト *Notch4* 遺伝子も細胞分化や増殖，癌化に関与している可能性が推測される．しかし，ヒト *Notch4* の機能や発現パターンについては不明な点が多い．さらに，*TAN-1*（ヒト *Notch1*）やマウス *Notch4/int-3* などのように癌化に関与するか否かも明かでない．そこで，本研究では正常子宮内膜および子宮内膜癌を対象として，ノーザンブロット，ドットブロット，*in situ* ハイブリダイゼーションを行い，機能の詳細が明かでないヒト *Notch4* 遺伝子の発現とその局在および役割を，ヒト *Notch1* 遺伝子と比較して解析することを目的とした．

ヒトの正常子宮内膜は約28日の月経周期を持っており，この間に子宮内膜は増殖期から分泌期へと変化し月経を起こす．この月経周期の中で子宮内膜の細胞（腺細胞と間質細胞）は増殖と機能変化（分化）を起こす．また，子宮内膜増殖症や子宮内膜癌は内膜腺細胞が規律性を失い異常増殖をすることにより引き起こされる．これらのダイナミックな変化は，*Notch* 相同遺伝子が正常子宮内膜の構築や子宮内膜癌の発生に関与している可能性を想定させるので，正常子宮内膜および子宮内膜癌を対象とすることは妥当であると考えられる．

なお，*TAN-1* とヒト *Notch1* は同一遺伝子であるが，現在ではヒト *Notch1* に統一されている．したがって本論文では，引用文献において *TAN-1* と表記されているものについては *TAN-1*（ヒト *Notch1*）とし，それ以外のものはヒト *Notch1* とした．

実験材料および方法

1. 正常子宮内膜および子宮内膜癌組織

各月経周期の正常子宮内膜は子宮筋腫などの婦人科良性疾患および子宮頸癌で摘出された子宮より採取した．組織の採取に際しては各々の患者からインフォームドコンセントを得た．採取後すぐに液体窒素にて凍結保存し，ポリ－(A)＋RNA抽出用とした．あるいは採取後すぐに4%－パラホルムアルデヒドにて固定し *in situ* ハイブリダイゼーション用とした．同一の婦人科病理医により正常子宮内膜を以下のように診断した：増殖期初期，中期，後期，および分泌期初期，中期，後期．12サンプルのうち，前記の6つの月経周期に対し各2つずつサンプルを用意した．子宮内膜癌サンプルは手術にて子宮全摘出術を施行した検体より採取した後，直ちに液体窒素にて凍結保存し，ポリ－(A)＋RNA抽出用とした．また，採取後すぐに4%－パラホルムアルデヒドにて固定し，*in situ* ハイブリダイゼーション用とした．正常子宮内膜，子宮内膜癌組織の詳細については第1表に示した通りである．なお，第1表中で検体番号が不連続であるのは，検体採取の際に検体番号を決定したが，その後の検体処理において，ポリ－(A)＋RNAの必要最少量が確保できず，ドットブロット解析に用いることができなかったためである．

第1表　正常子宮内膜および子宮内膜癌の病理組織所見

正常子宮内膜		子宮内膜癌		
検体番号	病理組織	検体番号	病理組織	Grade
N1	分泌期初期	C3	類内膜腺癌	2
N2	増殖期中期	C4	類内膜腺癌	1
N3	増殖期後期	C5	類内膜腺癌	1
N4	増殖期初期	C7	類内膜腺癌	1
N5	増殖期初期	C8	腺扁平上皮癌	1
N7	増殖期後期	C9	類内膜腺癌	1
N9	分泌期中期	C10	漿液性腺癌	2
N11	分泌期後期	C12	類内膜腺癌	2
N12	増殖期中期	C13	類内膜腺癌	1
N13	分泌期初期	C14	類内膜腺癌	1
N16	分泌期中期	C15	類内膜腺癌	1
N18	分泌期後期	C16	類内膜腺癌	1

（Suzuki　T et al：Int J Oncol 17：1131-1139, 2000[52]のTable Iを一部改変し，許可を得て転載）

2. 全RNAおよびポリー(A)+RNAの抽出

全RNAは，RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を使用して上記サンプルより抽出した．ポリー(A)+RNAは全RNAからQuickPrep Micro mRNA Purification Kit (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) を使用して抽出した．ポリー(A)+RNAの濃度は吸光度計を用い，QuickPrep Micro mRNA Purification Kitに付属のエルーションバッファーにて0.03 μg/μl に調整した．

3. プローブの作製

ヒト *Notch4* とヒト *Notch1* の細胞内領域および *β2-microglobulin* に相補的な特異的cDNAプローブ（以下，それぞれN4-In, N1-In, β2-MGと呼ぶ）をReverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) にて作製した．これらのcDNAプローブはノーザンブロット，ドットブロット，*in situ* ハイブリダイゼーションにて使用した．RT-PCRはTaKaRa RNA LA PCR Kit (AMV) ver.1.1 (Takara Bio Inc., Shiga) を用いて行った．逆転写反応溶液は5 mMの $MgCl_2$, 1×RNA PCR Buffer, 1 mMのdNTP混合液，1U/μlのRNase inhibitor, 0.25U/μlの逆転写酵素，2.5 μMのrandom 9 mers，0.03 μgのpoly－(A)+RNAである．逆転写反応の条件は30℃/10分，55℃/30分，99℃/5分である．PCR反応溶液は逆転写反応溶液，2.5 mMの $MgCl_2$, 1×LA PCR Buffer II (Mg^{2+} free), 2.5 U/100 μlのTaKaRa LA Taq, 0.2 μMのプライマーセットを含んでいる．PCRの反応条件は，94℃/20秒，60℃/45秒，72℃/90秒を30サイクル行い，次いで72℃/10分で伸長反応を行った．RT-PCRを行うにあたって使用したプライマーセットを第2表に示した．PCR産物は1.2%アガロースゲルにて電気泳動し，特異的バンドを含むゲルを切り出しQIAEX II Gel Extraction kit (QIAGEN) を用いて精製した後，Klenow enzyme (Takara) とT4 polynucleotide kinase (Takara) を用いてリン酸化平滑末端とし，脱リン酸化してあるpBluescript II SK+ ベクター (Stratagene, La Jolla, CA, USA) のSma Iサイトにライゲーションしてサブクローニングした．

in situ ハイブリダイゼーション用には，ヒト *Notch4* の3'UTR領域（N4-3'UTRと呼ぶ）およびヒト *Notch1* の3'末端領域(N1-3'ENDと呼ぶ）で新たにプローブを作製した．これらのプローブは上述の方法と同様に作製した．また特異的プライマーは第2表に示した通りである．

4. ノーザンブロット解析

2つの正常子宮内膜サンプル(増殖期中期；検体番号N2，分泌期中期；検体番号N9）と1つの子宮内膜癌サンプル（検体番号C3）を用いてノーザンブロット解析を行った．10 μgの全RNAを電気泳動し，Hybond N+ membrane (Amersham, Little Chalfont, UK) にブロットした．メンブレンは，5 mlの5×SSPE/0.5%－SDS/5×デンハルト液/50%-ホルムアミドを含む溶液にcDNAプローブを加え，50℃で一晩反応させた．ハイブリダイゼーション後のメンブレンは以下の条件で洗浄した．2×SSPE/0.1%-SDS溶液で室温にて10分間，ついで1×SSPE/0.1%－SDS溶液で50℃にて20分間，

第2表　プローブ作成用特異的プライマー

遺伝子	プローブ	プライマー	bp*	温度**
ヒト *Notch4*	N4-In	5'-ACTAGGCGAGGACAGCATTG-3' 5'-CGGCGTCTGCTCCCTGTTGT-3'	802	60
	N4-3'UTR	5'-TCCCGCCTCCTTGCCTTACTCC-3' 5'-CCACTCCACTCTGCCCTCCTGT-3'	378	62
ヒト *Notch1*	N1-In	5'-CCGCCTTTGTGCTTCTGTTCT-3' 5'-GTTAGCCCCGTTCTTCAGGAG-3'	935	60
	N1-3'END	5'-ATGGTCAATGCGAGTGGCTGTC-3' 5'-GCTTTGCTGCTGCTGGATGTTT-3'	308	62
β2-microglobulin	β2-MG	5'-ACCCCCACTGAAAAAGATGA-3' 5'-ATCTTCAAACCTCCATGATG-3'	120	60

*bp：RT-PCRによって増幅される塩基対長

**温度：PCRにおけるアニーリング温度（℃）

(Suzuki T et al：Int J Oncol 17：1131-1139, 2000[52]のTable IIを一部改変し，許可を得て転載)

これを2回行い，さらに0.1×SSPE/0.1%－SDS溶液で50℃にて20分間の洗浄後，メンブレンをイメージングプレート（Fuji Photo Film Co., Ltd., Tokyo）に収容し，室温にて24時間露出した．イメージングプレートはBAS 2000 Image Analyzer（Fuji Photo Film）を用いて解析した．メンブレンにハイブリダイズしたプローブは沸騰水の中に15分間浸し，プローブをメンブレンから解離させ，他のプローブを同一のメンブレンに上記の手順で再度ハイブリダイズさせた．

5. ドットブロット解析

ドットブロット解析には12個の正常子宮内膜サンプルと12個の子宮内膜癌サンプルを用いた（第1表）．前述の0.03 μgに調製したポリ－(A)＋RNAを用いてRT-PCRを施行し，ヒト*Notch4*，ヒト*Notch1*，*β2-microglobulin*の発現の有無を確認した．逆転写反応の条件はプローブ作成時と同条件である．PCRの条件はヒト*Notch4*，*β2-microglobulin*に対しては94℃/20秒，60℃/45秒，72℃/90秒を16サイクル反応させ，72℃/10分の伸長反応を行った．ヒト*Notch1*に対してはアニーリング温度を62℃とした．正確な測定をきすためにPCR産物が指数関数的に増幅している過程にあり平衡状態に到達していないことを確認した．3 μ*l*のPCR産物をHybond N＋ membraneにブロットし，α^{32}P-dCTPでラベルしたヒト*Notch4*，ヒト*Notch1*，*β2-microglobulin*に対するそれぞれの特異的プローブにてハイブリダイゼーションを行った．ハイブリダイゼーションは0.5%－SDS，5×SSPE，100 μgのサケ精子DNAおよび各々のプローブ(ヒト*Notch4*ではN4-Inプローブ，ヒト*Notch1*ではN1-Inプローブ，および*β2-microglobulin*ではβ2-MGプローブ）を含んだ混合液中で65℃，17時間行った．メンブレンの洗浄は5×SSPE，0.1%－SDSの混合液で65℃にて15分間2回行い，ついで，1×SSPE，0.1%－SDS混合液で室温にて10分間，0.1×SSPE，0.1%－SDS混合液で室温にて10分間洗浄した．洗浄したメンブレンはイメージングプレートに室温で30分間露出し，BAS 2000 Image Analyzerにて解析した．各ドットのシグナル強度はImage Analyzerにて定量化した．ヒト*Notch4*およびヒト*Notch1*のドットのシグナル強度はバックグラウンドの補正を行い，同一サンプルの陽性コントロールである*β2-microglobulin*のシグナル強度との比を算出した後，これらの比をStudent's *t*-testにて検定した．

6. *in situ* ハイブリダイゼーション

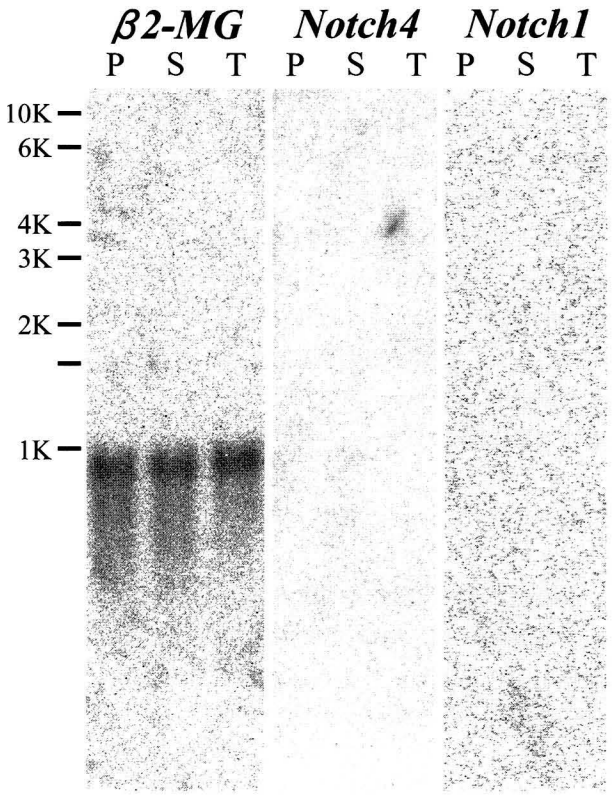
in situ ハイブリダイゼーションに使用したプローブはDIG RNA Labeling Kit（Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany）を用いてジゴキシゲニンにて標識したヒト*Notch4*（N4-3'UTR）およびヒト*Notch1*（N1-3'END）のセンスおよびアンチセンスのcRNAプローブをT3/T7 RNAポリメラーゼにて合成した．

正常子宮内膜および子宮内膜癌サンプルを採取後，4%－パラホルムアルデヒドにて6時間固定した．続いて30%－蔗糖溶液にて置換反応を行い，OCT compound（Sakura Finetek Japan Co., Ltd., Tokyo）に包埋した後，液体窒素にて凍結した．凍結された組織をクリオスタットにて18 μmに薄切し，シランコートされたスライドグラスにのせた．切片は49℃で一晩ホルムアミドを加えた反応液中でジゴキシゲニンで標識した上記の特異的プローブ（0.1 μg/m*l*）とハイブリダイズさせた．その後はAnti-digoxigenin-AP, Fab fragments（Boehringer Mannheim）と結合させ，発色基質であるBM purple AP Substrate, precipitating（Boehringer Mannheim）にて発色反応を行った．明らかな発色を得るためにプローブによって発色反応時間を変更した．

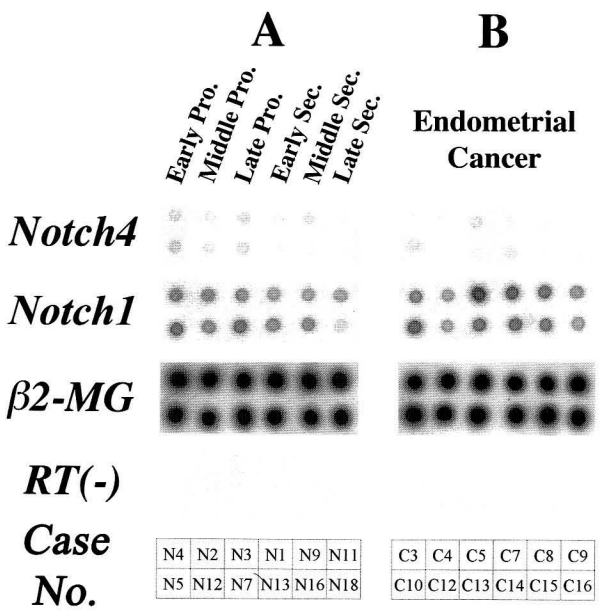
結　果

1. ヒト*Notch4*およびヒト*Notch1*の正常子宮内膜における発現

正常子宮内膜におけるヒト*Notch4*の発現の有無を確認するために正常子宮内膜から抽出した全RNAを用いてノーザンブロット解析を行った．第1図に示すように，ヒト*Notch4*およびヒト*Notch1*の全RNAは正常子宮内膜の増殖期および分泌期において明らかなシグナルを検出することはできなかった．正常子宮内膜でヒト*Notch4*が発現していないのか，あるいは発現量が微量のため検出できないのかを確認するために各月経周期の正常子宮内膜から抽出したポリ－(A)＋RNAを用いてドットブロット解析を行った．マウス*Notch4/int-3*や*TAN-1*（ヒト*Notch1*）はそれぞれマウス乳癌および急性T細胞性白血病において細胞内領域が過剰発現しているので，ヒト*Notch4*およびヒト*Notch1*の細胞内領域でプローブを作製した．第2図Aに示したように，ヒト*Notch4*とヒト*Notch1*はさまざまな月経周期の正常子宮内膜において発現していることが確認された．Image Analyzerによってドットのシグナル強度を定量化し統計学的に検討を行った結果，正常子宮内膜では，



第1図　正常子宮内膜および子宮内膜癌組織を用いたノーザンブロット解析の結果．プローブはN4-In（中央図），N1-In（右図）で，陽性コントロールとしてβ2-MG（左図）を使用している．図左側の数字はRNA断片の長さ（単位はKb）を示している．ヒト *Notch4* およびヒト *Notch1* は正常子宮内膜および子宮内膜癌において，その転写産物を検出できなかった．P：正常子宮内膜の増殖期，S：正常子宮内膜の分泌期，T：子宮内膜癌．（Suzuki T et al：Int J Oncol 17：1131-1139, 2000[53]の Fig. 1を許可を得て転載）

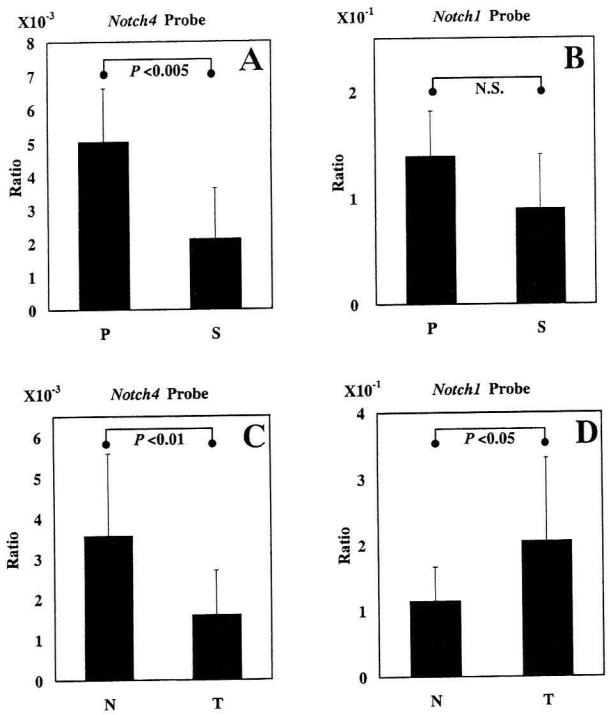


第2図　ドットブロット解析による正常子宮内膜（12例）および子宮内膜癌（12例）におけるヒト *Notch4* とヒト *Notch1* の発現．A：正常子宮内膜の増殖期におけるヒト *Notch4* の発現は分泌期より増加している．ヒト *Notch1* の発現は増殖期と分泌期では同様のレベルである．Pro：正常子宮内膜の増殖期，Sec：正常子宮内膜の分泌期，β2-MG：，*β2-microglobulin*．B：子宮内膜癌におけるヒト *Notch4* の発現は正常子宮内膜と比較して減少している．ヒト *Notch1* の発現は正常子宮内膜と子宮内膜癌において同様である．RT(−)：逆転写酵素を用いないでRT-PCRを行ったもの（陰性コントロール）．Case No. は第1表に掲載されているドットブロットの検体番号に一致．（Suzuki T et al：Int J Oncol 17：1131-1139, 2000[53]の Fig. 2を許可を得て転載）

ヒト *Notch4* の発現量は増殖期から分泌期になると有意に減少した（$P<0.005$，第3図A）．ヒト *Notch1* については増殖期と分泌期とでは有意な差を認めなかった（第2図A，第3図B）．

2.　ヒト *Notch4* およびヒト *Notch1* の子宮内膜癌における発現

子宮内膜癌におけるヒト *Notch4* の発現の有無を調べるためにノーザンブロット解析を行った．正常子宮内膜の時と同様にヒト *Notch4* は子宮内膜癌においてもノーザンブロット解析ではその発現を確認できなかった（第1図）．子宮内膜癌においてヒト *Notch4* が全く発現していないのか，あるいは発現量が微量のために検出できないのかを確認するために，12個の子宮内膜癌サンプルから抽出したポリ−(A)+RNAを用いてドットブロット解析を行った．第2図Bに示したようにヒト *Notch4*，ヒト *Notch1* ともにその発現を確認することができた．Image Analyzerを用いてドットのシグナル強度を解析し統計学的処理を行った結果，ヒト *Notch4* は正常子宮内膜より子宮内膜癌においてその発現量が有意に減少していることが確認された（$P<0.01$，第3図C）．一方，ヒト *Notch1* の発現量はヒト *Notch4* とは異なり，子宮内膜癌においてその発現量が有意に増加していた（$P<0.05$，第3図D）．



第3図　A, B：正常子宮内膜の増殖期と分泌期におけるヒト *Notch4*（A）およびヒト *Notch1*（B）の発現量の比較．増殖期におけるヒト *Notch4* の発現量は分泌期に比較して有意に増加している（$P<0.005$, n=6）．ヒト *Notch1* の発現は有意な差を認めなかった（n=6）．C, D：正常子宮内膜と子宮内膜癌におけるヒト *Notch4*（C）およびヒト *Notch1*（D）の発現量の比較．子宮内膜癌は正常子宮内膜と比較して，ヒト *Notch4* の発現量は有意に減少しており（$P<0.01$, n=12），逆にヒト *Notch1* では有意に増加している（$P>0.05$, n=12）．それぞれのバーは12検体の平均値±標準偏差を示す．P：正常子宮内膜の増殖期，S：正常子宮内膜の分泌期，N：正常子宮内膜（増殖期および分泌期），T：子宮内膜癌，N. S. ：有意差無し．（Suzuki T et al：Int J Oncol 17：1131-1139, 2000[53] の Fig. 3 を許可を得て転載）

3.　正常子宮内膜および子宮内膜癌におけるヒト *Notch4* の局在

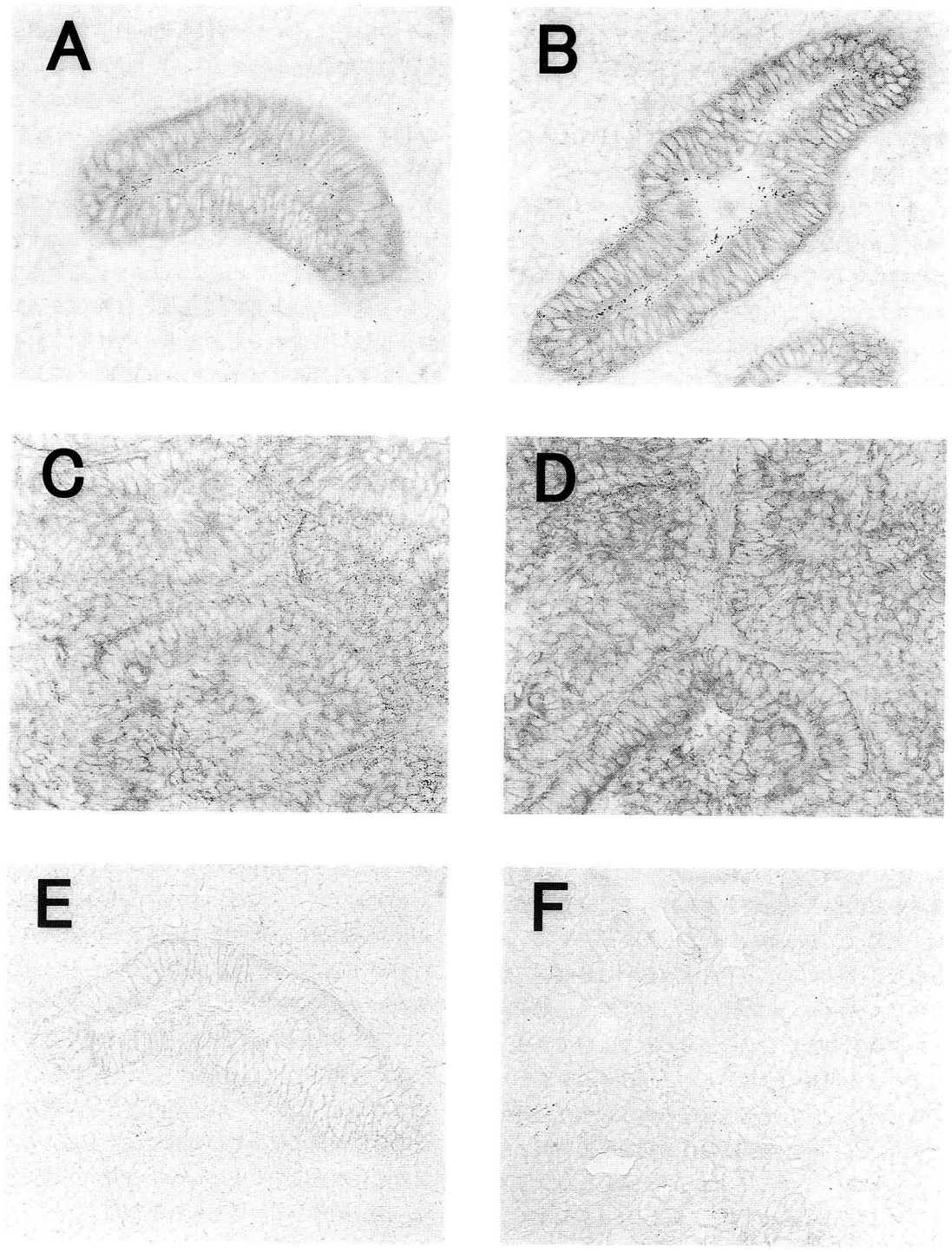
ノーザンブロットやドットブロット解析では正常子宮内膜や子宮内膜癌組織全体から全 RNA またはポリー(A)＋RNA を抽出したものを用いたが，これらの組織には腺細胞，間質細胞，癌細胞，血管内皮細胞など，様々な細胞が含まれている．したがって，内膜組織や癌組織のどの細胞にヒト *Notch4* が発現しているのかはノーザンブロットやドットブロット解析では検出することができない．しかし，ヒト *Notch4* やヒト *Notch1* タンパクの子宮内膜や子宮内膜癌における機能を推定するにあたり，どの細胞で発現しているかを知ることは非常に重要である．そこで，ヒト *Notch4* プローブ(N4-3'UTR）およびヒト *Notch1* プローブ（N1-3'END）を用いて *in situ* ハイブリダイゼーションを行った．第4図Aに示すように，正常子宮内膜ではヒト *Notch4* 遺伝子は主に腺細胞に発現していることが確認できた．また弱いながらも，間質細胞にも発現していることが確認された．ヒト *Notch1* 遺伝子も主に腺細胞で発現していることが確認された（第4図B）．子宮内膜癌組織では，ヒト *Notch4* およびヒト *Notch1* はともに癌細胞に発現を認めた．また，正常子宮内膜とは異なり，間質細胞においても癌細胞と同等のレベルで発現していることが確認できた（第4図C, D）．

考　察

本研究では，正常子宮内膜および子宮内膜癌におけるヒト *Notch4* およびヒト *Notch1* 遺伝子の時間的空間的発現を明らかにし，ヒト *Notch4* およびヒト *Notch1* 遺伝子の正常子宮内膜および子宮内膜癌における機能を推察した．

ノーザンブロット解析では正常子宮内膜および子宮内膜癌においてヒト *Notch4* 転写産物は検出できなかった．しかしながら，PCR を16サイクル行った後のドットブロット解析を行うことによって正常子宮内膜および子宮内膜癌のすべてのサンプルにおいてヒト *Notch4* とヒト *Notch1* を検出することができた．以上のことから，ノーザンブロット解析によってヒト *Notch4* とヒト *Notch1* を検出できなかった理由として，正常子宮内膜や子宮内膜癌での発現量が微量であることが考えられた．また，*in situ* ハイブリダイゼーションで発現を確認できた理由としてはノーザンブロット解析よりも感度の高いRNA プローブを使用したこと，発色を検出できるまで発色時間を長くしたことによると考えられた．

ヒト *Notch4* の発現量は月経周期にあわせて変化した．その発現は，増殖期から分泌期に移行すると有意に減少していた（$P<0.005$）．月経周期においてヒト *Notch4* の発現量が増加している時期は子宮内膜の腺細胞や間質細胞で細胞分裂が見られる時期と一致していた．増殖期にヒト *Notch4* の発現量が増加していることは，今までに知られている *Notch* ファミリーの機能の1つである「秩序だった細胞増殖の状態を保っておく」ことと一致していた[46]．すなわち，増殖期でその発現量が高い状態にあるヒト *Notch4* が子宮内膜の腺細胞に増殖期の表現型を示すように機能していると考えられた．さらに，ヒト *Notch4* の発現量は分泌期になると減少しており，ヒ



第4図　A, B：正常子宮内膜（増殖期）の切片で，N4-3'UTR アンチセンスプローブ（A）および N1-3' END アンチセンスプローブ（B）を用いてそれぞれ *in situ* ハイブリダイゼーションを行った．ヒト *Notch4*，ヒト *Notch1* ともに内膜腺細胞で発現を認めた．C, D：子宮内膜癌（類内膜腺癌，G2）の切片に対して N4-3'UTR アンチセンスプローブ（C）および N1-3'END アンチセンスプローブ（D）を用いた．子宮内膜癌では癌細胞と間質細胞の両方でヒト *Notch4* とヒト *Notch1* の発現を認めた．E, F：正常子宮内膜（増殖期）（E）および子宮内膜癌（類内膜腺癌）（F）の切片に対して N4-3'UTR センスプローブ（E）および N1-3'END センスプローブ（F）を用いた．センスプローブでは陽性反応を認めない．（Suzuki T et al：Int J Oncol 17：1131-1139, 2000[53]の Fig. 4 を許可を得て転載）

ト *Notch4* の発現量の低下が腺細胞の増殖期の表現型を分泌期の表現型に変化させる機能と関連があると考えられた．ヒト *Notch4* の発現量は有意な差をもって月経周期において変化していたが，ヒト *Notch1* の発現量については増殖期から分泌期になると減少する傾向はあるものの，統計学的には有意ではなかった(第3図B)．ドットブロット解析の結果から，ヒト *Notch4* もヒト *Notch1* も月経周期を通じて同様の傾向で変動するので，正常子宮内膜においてヒト *Notch1* はヒト *Notch4* と同様の機能を持っていると推察されるが，ヒト *Notch4* に比較してヒト *Notch1* は月経周期における子宮内膜の変化への関与は少ないことが示唆された．しかしながら，*Notch1* 変異マウスでは，胎児の発生過程で秩序を失った体節形成を示すことから，*Notch1* が体節形成の過程で協調的に機能していることが示唆されている[47]．したがって，その相同遺伝子であるヒト *Notch1* が正常子宮内膜においても正常構造を構成するのに少なからず関与していると考えられた．

また，月経周期によって変化することから，エストロゲンとの関連性の有無について考察されるべきであるが，現在までのところ *Notch* とエストロゲンのシグナル伝達の関連性を示唆する報告はなく，今後のさらなる検討を要すると思われる．

ドットブロット解析において，正常子宮内膜に比較して子宮内膜癌では，ヒト *Notch4* の発現量は有意に減少していた（$P<0.01$）．子宮内膜癌の発生母地である増殖期内膜と子宮内膜癌で比較をすればさらに有意に減少していた．ここで，*in situ* ハイブリダイゼーションの結果とあわせて考察すると，子宮内膜癌では癌細胞と間質の両方にヒト *Notch4* が発現しているため，正常子宮内膜より発現量が増加していると考えることができる．しかし，これは発現量の少ないヒト *Notch4* のシグナルを検出するために，長時間発色反応をおこなったためであり，しかも，正常子宮内膜における発色反応時間よりも長くなっている．このことより，*in situ* ハイブリダイゼーションの結果は定量性に乏しく，むしろドットブロット解析の結果が定量的であると考えられた．

この結果は今までの腫瘍との関連についての報告，つまり腫瘍性変化によって *TAN-1*（ヒト *Notch1*）やマウス *Notch4/int-3* などの *Notch* 相同遺伝子では，その細胞内領域が過剰発現している[28,42]こととは反対の結果である．この一見矛盾した結果はヒト *Notch4* 遺伝子の構造が他の *Notch* 相同遺伝子と異なることから説明しうる．ヒト *Notch4* 遺伝子は EGF-like リピート数が他の *Notch* 相同遺伝子よりも少ないため（*Notch1*, 36；*Notch2*, 36；*Notch3*, 34；*Notch4*, 29），*Notch* ファミリーの中では *Notch4* が最も相同性の低い遺伝子であると報告されている[32]．さらに，ヒト *Notch4* の cdc10 領域をヒト *Notch1*，ヒト *Notch2*，マウス *Notch3* といった他の相同タンパクの同領域と比較すると，それぞれ 63%，66%，65%の相同性しか認められない．これらのことから，ヒト *Notch4* は異なったシグナル伝達や機能を示す別のリガンドが存在する可能性もある．そのために，腫瘍性変化に伴ってヒト *Notch4* ではこれまで報告されている他の *Notch* 相同遺伝子とは異なる挙動，すなわち発現量が減少するものと考えられる．さらに，HPV 誘因の子宮頸癌においてヒト *Notch1* の発現が減少し，ヒト *Notch2* の発現が維持または増加しているという報告[48]からも，子宮内膜癌においては，ヒト *Notch4* とヒト *Notch1* の発現量の相違があると考えられた．

また胎児における *Notch* 活性に関する研究では，いくつかある *Notch* の機能の主なものとして上皮の発生またはその状態を維持する機能が報告されていることから[8]，正常子宮内膜におけるヒト *Notch4* の機能の1つとして正常内膜上皮構造の維持というものが考えられる．これらのことより子宮内膜におけるヒト *Notch4* の発現の減少によって内膜の正常な細胞増殖状態と組織構築を維持できなくなり，異常な細胞増殖，つまり，子宮内膜の癌化に関与するものと考えられる．したがって，子宮内膜癌の発生機序はマウスにおける乳癌やヒトの白血病とは異なることが推察される．

ドットブロット解析において，ヒト *Notch4* とは反対にヒト *Notch1* の発現量は正常子宮内膜より子宮内膜癌において有意に増加していたので（$P<0.05$），ヒト *Notch1* も子宮内膜癌の発生に関与していることが考えられ，ヒトにおける新生物の発生に関与しているという以前に報告されている結果とも一致する[28,43]．しかし，ヒト *Notch1* において増殖期内膜と子宮内膜癌を比較した場合には発現量の差が有意でなくなることから，発現量の変化が大きいヒト *Notch4* の方が子宮内膜癌の発生に，より関与しているものと思われた．

ヒト *Notch4* 遺伝子のプロモーター領域には2つの GATA 認識領域と推定される部位があることが報告されている[32]．GATA 転写因子は細胞系譜特異的な運命決定に関与している[49~52]ため，細胞系譜特異的な運命決定の場面では GATA 転写因子がヒト *Notch4* の発現を調節していることを示唆している．このことからヒト *Notch4* の発現の減少が GATA 転写因子を介しているとすれば，細胞系譜に非特異的な運命決定が行われ，秩序を失った細胞の増殖を引き起こし，結果として子宮内

膜癌でみられる腺細胞の乱れた配列を引き起こすことが推察される．この推察は，*in situ* ハイブリダイゼーションの結果からも裏付けられる．ヒト *Notch4*，ヒト *Notch1* ともに，正常子宮内膜では腺細胞に強く発現しているのに対して間質ではわずかな発現しか認められないが，癌組織では癌細胞と間質とに発現し，その差が明確ではなかった．つまり癌組織では腺細胞と間質細胞の間で lateral specification（側方特異化）が機能しておらず，細胞がある特定の方向へ運命決定（分化）されていないものと考えられた．これはヒト *Notch4* とヒト *Notch1* の発現が正常子宮内膜あるいは子宮内膜癌組織で同一部位に観察されたという *in situ* ハイブリダイゼーションの結果からからも支持される．さらにこの結果はこれら2つのタンパクが正常内膜構造を維持するにあたり協調的に機能していることも示していると考えられた．

今回の研究では，正常子宮内膜と比較して子宮内膜癌においてヒト *Notch4* の発現が減少しており，一方でヒト *Notch1* の発現量は増加していることを示した．このことはヒト *Notch4* とヒト *Notch1* の発現量比の変化が，正常な細胞の運命決定や秩序だった細胞増殖の破綻を通して子宮内膜癌の発生に関与していることを示唆するものであると考えられた．

総　括

正常子宮内膜および子宮内膜癌におけるヒト *Notch4* およびヒト *Notch1* 遺伝子の役割に関して検討を行い，以下の結果を得た．

1. 正常子宮内膜および子宮内膜癌組織においてヒト *Notch4* およびヒト *Notch1* が発現していることが確認された．

2. 月経周期によってヒト *Notch4* の発現量が増殖期内膜で増加し，分泌期では低下することが確認され，正常子宮内膜の増殖期から分泌期への変化に関与していることが示唆された．

3. *in situ* ハイブリダイゼーションを行った結果，ヒト *Notch4* およびヒト *Notch1* は正常子宮内膜では主に内膜腺細胞に，また子宮内膜癌では癌細胞とその間質細胞にも発現していた．

4. 子宮内膜癌におけるヒト *Notch4* の発現量は正常子宮内膜と比較して減少していた．一方，ヒト *Notch1* は正常子宮内膜より子宮内膜癌にて発現量が増加しており，両者の発現量比の変化が，正常な細胞の運命決定や細胞増殖の破綻を通して子宮内膜癌の発生に関与していることが示唆された．

稿を終えるにあたり，御指導，御校閲を賜りました慶應義塾大学医学部産婦人科学教室野澤志朗教授に深謝いたします．また，実験の技術面で援助をいただきました国立遺伝学研究所発生工学研究室の中辻憲夫教授（現，京都大学再生医科学研究所再生統御学研究部門発生分化研究分野教授），白吉安昭助手（現，鳥取大学医学部生命科学科分子細胞生物学講座細胞工学分野助教授），同田村勝博士（現，国立遺伝学研究所系統生物研究センター哺乳動物遺伝研究室助手），同湯浅喜博氏（現，国立遺伝学研究所発生遺伝研究部門研究員）に感謝いたします．また，実験を様々な面から援助して下さった慶應義塾大学医学部産婦人科学教室青木大輔講師，宇田川康博講師（現，藤田保健衛生大学産婦人科教授），産婦人科第一研究室諸兄に感謝いたします．

本研究の要旨の一部は，第28回婦人科腫瘍学会学術集会において報告した．なお，本研究の一部は平成11年度医学部研究奨励費により行われた．

文　献

1) Krumlauf R：Hox genes in vertebrate development. Cell 78：191-201, 1994
2) Heitzler P, Simpson P：The choice of cell fate in the epidermis of Drosophila. Cell 64：1083-1092, 1991
3) Artavanis-Tsakonas S, Matsuno K, Fortini ME：*Notch* signaling. Science 268：225-232, 1995
4) Simpson P：Developmental genetics. The *Notch* connection. Nature 375：736-737, 1995
5) Cabrera CV：The generation of cell diversity during early neurogenesis in Drosophila. Development 115：893-901, 1992
6) Poulson DF：The effects of certain X-chromosome deficiencies on the embryonic development of *Drosophila melanogaster*. J Exp Zool 83：271-325, 1940
7) Artavanis-Tsakonas S, Simpson P：Choosing a cell fate：a view from the *Notch* locus. Trends Genet 7：403-408, 1991
8) Hartenstein AY, Rugendorff A, Tepass U, Hartenstein V：The function of the neurogenic genes during epithelial development in the Drosophila embryo. Development 116：1203-1220, 1992
9) Lieber T, Kidd S, Alcamo E, Corbin V, Young MW：Antineurogenic phenotypes induced by truncated *Notch* proteins indicate a role in signal transduction and may point to a novel function for *Notch* in nuclei. Genes Dev 7：1949-1965, 1993
10) Giniger E, Jan LY, Jan YN：Specifying the path of

the intersegmental nerve of the Drosophila embryo : a role for Delta and *Notch*. Development 117 : 431-440, 1993

11) Fortini ME, Rebay I, Caron LA, Artavanis-Tsakonas S : An activated *Notch* receptor blocks cell-fate commitment in the developing Drosophila eye. Nature 365 : 555-557, 1993

12) Xu T, Caron LA, Fehon RG, Artavanis-Tsakonas S : The involvement of the *Notch* locus in Drosophila oogenesis. Development 115 : 913-922, 1992

13) Yochem J, Weston K, Greenwald I : The *Caenorhabditis elegans lin-12* gene encodes a transmembrane protein with overall similarity to *Drosophila Notch*. Nature 335 : 547-550, 1988

14) Yochem J, Greenwald I : glp-1 and lin-12, genes implicated in distinct cell-cell interactions in C. elegans, encode similar transmembrane proteins. Cell 58 : 553-563, 1989

15) Sherwood DR, McClay DR : Identification and localization of a sea urchin *Notch* homologue : insights into vegetal plate regionalization and *Notch* receptor regulation. Development 124 : 3363-3374, 1997

16) Bierkamp C, Campos-Ortega JA : A zebrafish homologue of the Drosophila neurogenic gene *Notch* and its pattern of transcription during early embryogenesis. Mech Dev 43 : 87-100, 1993

17) Coffman C, Harris W, Kintner C : *Xotch*, the *Xenopus* homolog of *Drosophila Notch*. Science 249 : 1438-1441, 1990

18) Weinmaster G, Roberts VJ, Lemke G : A homolog of Drosophila *Notch* expressed during mammalian development. Development 113 : 199-205, 1991

19) Weinmaster G, Roberts VJ, Lemke G : *Notch2* : a second mammalian *Notch* gene. Development 116 : 931-941, 1992

20) Del Amo FF, Smith DE, Swiatek PJ, Gendron-Maguire M, Greenspan RJ, McMahon AP, Gridley T : Expression pattern of Motch, a mouse homolog of Drosophila *Notch*, suggests an important role in early postimplantation mouse development. Development 115 : 737-744, 1992

21) Kopan R, Weintraub H : Mouse notch : expression in hair follicles correlates with cell fate determination. J Cell Biol 121 : 631-641, 1993

22) Reaume AG, Conlon RA, Zirngibl R, Yamaguchi TP, Rossant J : Expression analysis of a *Notch* homologue in the mouse embryo. Dev Biol 154 : 377-387, 1992

23) Lardelli M, Lendahl U : Motch A and motch B-two mouse *Notch* homologues coexpressed in a wide variety of tissues. Exp Cell Res 204 : 364-372, 1993

24) Lardelli M, Dahlstrand J, Lendahl U : The novel *Notch* homologue mouse *Notch 3* lacks specific epidermal growth factor-repeats and is expressed in proliferating neuroepithelium. Mech Dev 46 : 123-136, 1994

25) Robbins J, Blondel BJ, Gallahan D, Callahan R : Mouse mammary tumor gene *int-3* : a member of the notch gene family transforms mammary epithelial cells. J Virol 66 : 2594-2599, 1992

26) Uyttendaele H, Marazzi G, Wu G, Yan Q, Sassoon D, Kitajewski J : *Notch4/int-3*, a mammary proto-oncogene, is an endothelial cell-specific mammalian *Notch* gene. Development 122 : 2251-2259, 1996

27) Shirayoshi Y, Yuasa Y, Suzuki T, Sugaya K, Kawase E, Ikemura T, Nakatsuji N : Proto-oncogene of *int-3*, a mouse *Notch* homologue, is expressed in endothelial cells during early embryogenesis. Genes Cells 2 : 213-224, 1997

28) Ellisen LW, Bird J, West DC, Soreng AL, Reynolds TC, Smith SD, Sklar J : *TAN-1*, the human homolog of the Drosophila *Notch* gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. Cell 66 : 649-661, 1991

29) Stifani S, Blaumueller CM, Redhead NJ, Hill RE, Artavanis-Tsakonas S : Human homologs of a Drosophila Enhancer of split gene product define a novel family of nuclear proteins. Nat Genet 2 : 119-127, 1992

30) Larsson C, Lardelli M, White I, Lendahl U : The human *NOTCH1*, *2*, and *3* genes are located at chromosome positions 9q34, 1p13-p11, and 19p13.2-p13.1 in regions of neoplasia-associated translocation. Genomics 24 : 253-258, 1994

31) Sugaya K, Fukagawa T, Matsumoto K, Mita K, Takahashi E, Ando A, Inoko H, Ikemura T : Three genes in the human MHC class III region near the junction with the class II : gene for receptor of advanced glycosylation end products, PBX2 homeobox gene and a *Notch* homolog, human counterpart of mouse mammary tumor gene *int-3*. Genomics 23 : 408-419, 1994

32) Li L, Huang GM, Banta AB, Deng Y, Smith T, Dong P, Friedman C, Chen L, Trask BJ, Spies T, Rowen L, Hood L : Cloning, characterization, and the complete 56.8-kilobase DNA sequence of the human NOTCH4 gene. Genomics 51 : 45-58, 1998

33) Kopan R, Schroeter EH, Weintraub H, Nye JS : Signal transduction by activated m*Notch* : Importance of proteolytic processing and its regulation by the extracellular domain. Proc Natl Acad Sci U S A 93 : 1683-1688, 1996

34) Honjo T : The shortest path from the surface to the nucleus : RBP-Jk/Su(H) transcription factor. Genes Cells 1 : 1-9, 1996

35) Kato H, Taniguchi Y, Kurooka H, Minoguchi S, Sakai T, Nomura-Okazaki S, Tamura K, Honjo T : Involvement of RBP-J in biological functions of mouse *Notch1* and its derivatives. Development 124 : 4133-4141, 1997

36) De Strooper B, Annaert W, Cupers P, Saftig P, Craessaerts K, Mumm JS, Schroeter EH, Schrijvers V,

Wolfe MS, Ray WJ, Goate A, Kopan R：A presenilin-1-dependent g-secretase-like protease mediates release of *Notch* intracellular domain. Nature 398：518-522, 1999

37) Ye Y, Lukinova N, Fortini ME：Neurogenic phenotypes and altered *Notch* processing in Drosophila Presenilin mutants. Nature 398：525-529, 1999

38) Rebay I, Fehon RG, Artavanis-Tsakonas S：Specific truncations of Drosophila *Notch* define dominant activated and dominant negative forms of the receptor. Cell 74：319-329, 1993

39) Struhl G, Fitzgerald K, Greenwald I：Intrinsic activity of the Lin-12 and *Notch* intracellular domains *in vivo*. Cell 74：331-345, 1993

40) Roehl H, Kimble J：Control of cell fate in *C. elegans* by a GLP-1 peptide consisting primarily of ankyrin repeats. Nature 364：632-635, 1993

41) Varmus HE：Recent evidence for oncogenesis by insertion mutagenesis and gene activation. Cancer Surv 1：309-319, 1982

42) Jhappan C, Gallahan D, Stahle C, Chu E, Smith GH, Merlino G, Callahan R：Expression of an activated *Notch*-related *int-3* transgene interferes with cell differentiation and induces neoplastic transformation in mammary and salivary glands. Genes Dev 6：345-355, 1992

43) Zagouras P, Stifani S, Blaumueller CM, Carcangiu ML, Artavanis-Tsakonas S：Alterations in *Notch* signaling in neoplastic lesions of the human cervix. Proc Natl Acad Sci U S A 92：6414-6418, 1995

44) Joutel A, Corpechot C, Ducros A, Vahedi K, Chabriat H, Mouton P, Alamowitch S, Domenga V, Cecillion M, Marechal E, Maciazek J, Vayssiere C, Cruaud C, Cabanis EA, Ruchoux MM, Weissenbach J, Bach JF, Bousser MG, Tournier-Lasserve E：*Notch3* mutations in CADASIL, a hereditary adult-onset condition causing stroke and dementia. Nature 383：707-710, 1996

45) Joutel A, Corpechot C, Ducros A, Vahedi K, Chabriat H, Mouton P, Alamowitch S, Domenga V, Cecillion M, Marechal E, Maciazek J, Vayssiere C, Cruaud C, Cabanis EA, Ruchoux MM, Weissenbach J, Bach JF, Bousser MG, Tournier-Lasserve E：*Notch3* mutations in cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL), a mendelian condition causing stroke and vascular dementia. Ann N Y Acad Sci 826：213-217, 1997

46) Lardelli M, Williams R, Lendahl U：*Notch*-related genes in animal development. Int J Dev Biol 39：769-780, 1995

47) Conlon RA, Reaume AG, Rossant J：*Notch1* is required for the coordinate segmentation of somites. Development 121：1533-1545, 1995

48) Talora C, Sgroi DC, Crum CP, Dotto GP：Specific down-modulation of *Notch1* signaling in cervical cancer cells is required for sustained HPV-E6/E7 expression and late steps of malignant transformation. Genes Dev 16：2252-2263, 2002

49) Orkin SH：GATA-binding transcription factors in hematopoietic cells. Blood 80：575-581, 1992

50) Tsai FY, Keller G, Kuo FC, Weiss M, Chen J, Rosenblatt M, Alt FW, Orkin SH：An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. Nature 371：221-226, 1994

51) Joulin V, Bories D, Eleouet JF, Labastie MC, Chretien S, Mattei MG, Romeo PH：A T-cell specific TCR delta DNA binding protein is a member of the human GATA family. Embo J 10：1809-1816, 1991

52) Ip HS, Wilson DB, Heikinheimo M, Tang Z, Ting CN, Simon MC, Leiden JM, Parmacek MS：The GATA-4 transcription factor transactivates the cardiac muscle- specific troponin C promoter-enhancer in nonmuscle cells. Mol Cell Biol 14：7517-7526, 1994

53) Suzuki T, Aoki D, Susumu N, Udagawa Y, Nozawa S：Imbalanced expression of *TAN-1* and human *Notch4* in endometrial cancers. Int J Oncol 17：1131-1139, 2000