

令和元年5月23日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10589

研究課題名(和文)胆管癌癌源細胞誘導におけるYAP/TAZの役割と新規分子標的治療法の開発

研究課題名(英文) Role of YAP/TAZ in induction of cancer-initiating cells in cholangiocarcinoma and development of new targeting therapy

研究代表者

大塚 将之(OHTSUKA, Masayuki)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：90334185

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：肝内胆管癌症例の71%にYAP発現が認められ、それはEMTマーカーや肝前駆細胞マーカーと関連があり、その予後は不良であった。肝内胆管癌細胞株を用いた検討では、YAP発現をsiRNAで抑制することでEMTマーカーの発現低下、stemnessの低下が見出された。同様な所見はYAP機能発現抑制剤であるverteporfin投与でも観察された。マウス肝内胆管癌皮下モデルにおいてもverteporfinによる腫瘍増大抑制効果が認められた。YAP/Hippo経路は肝内胆管癌における癌源細胞の誘導あるいは維持に働き、その抑制は新たな治療法になりうる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝内胆管癌は、現状で外科切除以外有効な治療法がなく、外科切除しえたとしても高率に再発し、その予後は不良である。本研究ではそのような疾患に対し、その予後を悪くしている一因と考えられる癌源細胞に注目し、その誘導あるいは維持のためにはYAP/Hippo経路が重要であることを明らかにするとともに、その機能発現抑制剤であるverteporfinがin vitro, in vivoで本疾患に対して有効であることを示し、新たな治療法になりうる可能性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：YAP was expressed in 71% of cases with intrahepatic cholangiocarcinoma. YAP expression was significantly associated with the expression of EMT-related markers and a hepatic progenitor cell marker. Survival of patients with positive YAP expression was significantly worse than that of patients with negative YAP expression. In in vitro cell line studies, EMT-related markers and stemness properties were significantly downregulated when YAP expression was knocked out by siRNA. Similar findings were observed after treatment with verteporfin, an inhibitor of YAP function. Furthermore, inhibition of tumor growth in mouse models was found by administration of verteporfin. These results suggest that the YAP/Hippo pathway plays a role in the induction or maintenance of cancer-initiating cells, and that inhibition of this pathway may be a new therapeutic option.

研究分野：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：肝内胆管癌 癌源細胞 上皮間葉転換 stemness yes-associated protein

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 癌において、癌源細胞 (tumor-initiating cells) を頂点とした階層性が存在し、それが悪性度などの heterogeneity を形成するという概念 (cancer stem cell theory) が、近年広く受け入れられているが、癌源細胞の由来についてはいまだ十分に解明されていない。癌源細胞は、自己複製能をもち、かつ腫瘍形成能をもつといった既存の組織幹細胞と類似の性質を有するため、既存の組織幹細胞の遺伝子異常、形質転換によって自己複製制御機構が破綻することから発生すると一般的に仮説づけられてきた。特に、消化管や皮膚においては上皮のターンオーバーが早く、組織幹細胞を頂点とした階層性に基づいた恒常的な組織形成・修復過程が明確に示されており、組織幹細胞の癌化が癌における癌源細胞の供給源として重要な位置におかれている。肝臓においても組織幹細胞というべき細胞の存在は認知され、canals of Hering や大型胆管における peribiliary glands に存在し、肝障害時、とくに成熟肝細胞や胆管細胞の複製が制限された状態で、活性化するとされるが、消化管や皮膚とは異なり、肝臓においては成熟肝細胞自体が組織障害の修復・再生に積極的に関与し、肝切除後などはそれが顕著に観察され、組織幹細胞の関与は限られたものと認識されている。成熟胆管上皮細胞においても、例えば、閉塞性黄疸時には、成熟胆管上皮細胞の増殖が病理学的にも認められ、それ自体が組織障害の修復・再生に関与していることが示唆される。すなわち、肝胆道においては組織幹細胞を頂点とした階層性が確立しておらず、肝胆道癌における癌源細胞も組織幹細胞とは異なった由来で誘導されている可能性がある。

(2) 近年、終末分化を遂げた細胞からのリプログラミングによって幹細胞あるいは幹細胞様の特徴を有する細胞が誘導されるという報告が多くみられ、肝臓における組織幹細胞の活性化を示す、とされてきた病理学的な ductular reaction も既存の組織幹細胞の活性化というよりもむしろ成熟肝細胞由来である可能性が指摘されている。また、肝細胞癌の癌源細胞が成熟肝細胞由来であることも報告され、われわれも肝内胆管癌において gankyrin と肝前駆細胞マーカーとの関連を明らかにし、癌源細胞様の特徴を持った細胞が分化した細胞の脱分化により誘導できることを明らかにしている。これらの事実は、肝胆道癌においては癌細胞が腫瘍内でダイナミックに分化・脱分化を繰り返し、その中で分化した癌細胞の脱分化から癌源細胞の特徴を有する細胞が供給されている可能性を示すものと考えられる。しかしながら、癌源細胞が誘導されるメカニズムについてはいまだ不明な点が多い。

(3) 胆管癌の前癌病変の発生・進展、癌源細胞の意義についての解明はほとんどすすんでいない。胆管上皮細胞は、肝内外とも胆汁酸、リン脂質あるいは細菌・薬剤など細胞傷害性を有する物質に常にさらされており、それらが前癌病変形成の最初のトリガーになることが想定される。コランギオパチーという概念によると、重炭酸アンブレラなどの細胞傷害性物質に対する胆管上皮細胞の防御機構が破綻した場合に胆管上皮細胞傷害が起こるとともに、障害胆管上皮細胞自体がサイトカインやケモカインを産生、Hedgehog や Notch シグナルを活性化、自然免疫反応の惹起など積極的に病態形成に関与する、とされる。コランギオパチーの概念には胆管癌も含まれるが、それらにおいて発現が上昇している分子に yes-associated protein (YAP) とそのパラログである transcriptional coactivator with PDZ-binding motif (TAZ) という転写共役因子が知られている。YAP/TAZ は Hippo 経路の重要な制御因子であり、核内で TEADs などの転写因子とともに遺伝子発現を誘導し、細胞増殖を促進、細胞死を抑制するが、種々の癌においてもその高発現が知られている。さらに、YAP は AKT 経路の活性化とともに肝内胆管癌の発生にも関するとともに、肝内胆管癌細胞の増殖と抗癌剤抵抗性を誘導する、との報告もある。また、乳癌においては、YAP/TAZ が epithelial-mesenchymal transition (EMT) を誘導し、

特に TAZ が自己複製能と腫瘍形成能をもたらす、癌源細胞様の性質獲得に貢献していることが示されている。これらは、YAP/TAZ が癌を発生させ、分化した癌細胞を脱分化することによって癌源細胞を誘導するのに大きな役割を果たしている可能性を強く示唆するものと考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は

(1) 実際の胆管癌(肝内外)およびその前癌病変の臨床検体(外科切除材料)を用いて、YAP/TAZ の発現、EMT との関係、癌源細胞の出現動態を mRNA 及びタンパクレベルで検討し、それらと臨床病理学的因子を比較する、

(2) 肝内胆管癌細胞株を用いて YAP と EMT、癌源細胞との関連を検討する、

(3) YAP を標的とし、癌源細胞の供給の抑制を狙った新たな、かつ従来よりも有効な治療法を開発するための基盤を確立することにある。

3. 研究の方法

(1) 肝内胆管癌における YAP/TAZ の発現解析

肝内胆管癌外科切除材料を用いて YAP/TAZ につき市販の抗体を用いて免疫組織染色を行い、その結果と臨床病理学的因子、予後との関連について比較検討する。さらに EMT マーカーである E-cadherin や vimentin との関係を検討するとともに、特に YAP においては stemness マーカーである CD133, OV-6 との関連も検討する。

(2) 肝内胆管癌細胞株を用いた YAP ノックダウン解析

YAP 発現の認められた肝内胆管癌細胞株において siRNA を用いて YAP をノックダウンさせたときの EMT マーカーの発現変化と stemness マーカーの発現変化を検討するとともに sphere formation assay による自己複製能の評価、anoikis assay による anoikis 耐性を評価することで癌源細胞の動態解析を行う。さらに加齢黄斑変性症治療薬として市販されている、YAP 機能発現抑制剤である verteporfin を用いて同様の評価を行う。

(3) 肝内胆管癌動物モデルを用いた YAP 機能発現抑制剤による治療効果の解析

ヌードマウスを用いて肝内胆管癌の皮下モデルを作製し、verteporfin を腹腔内投与することで腫瘍増殖が抑制できるか、を検討することで臨床応用に向けた基盤を確立する。

4. 研究成果

(1) 肝内胆管癌における YAP/TAZ の発現解析

52 例の肝内胆管癌外科切除材料において YAP の発現を検討したところ、37 例(71%)において核内に発現が認められた。一方、TAZ は 35 例(67%)において発現がみられた。YAP 発現と臨床病理学的因子との関連をみると YAP 発現例では腫瘍体積が有意に大きいことが明らかにされたが、患者年齢、性別、腫瘍マーカー、腫瘍径、腫瘍個数、脈管侵襲、腫瘍分化度、TNM ステージには関連が認められなかった。その一方、YAP 発現例は有意に切除後の予後が不良なことがわかり、YAP が何らかの機序により臨床的な heterogeneity に貢献していることが明らかになった。TAZ 発現例も同様に切除後の予後が不良であった。

YAP 発現と EMT マーカーの関連を検討するために E-cadherin と vimentin の免疫組織染色を行ったところ、YAP と E-cadherin は負の相関、vimentin とは正の相関がみられ、YAP が EMT を促進させることに関与している可能性を示唆するものと考えられた。一方、癌幹細胞マーカーと報告されている CD133 の免疫組織染色では YAP との相関は認められなかったものの、肝前駆細胞マーカーとしてしられる OV-6 の免疫染色では YAP と強い相関が見出された。この結果は

YAP が癌源細胞の供給に関与し, cancer stemness に関連している可能性を示唆する。

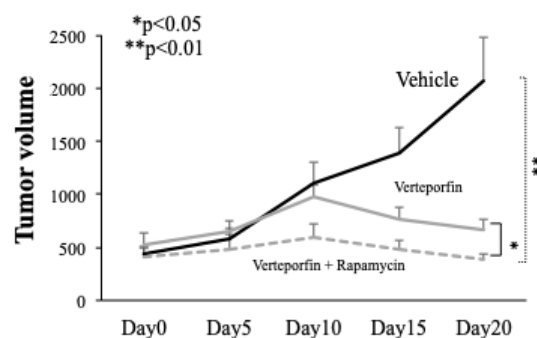
(2) 肝内胆管癌細胞株を用いた YAP ノックダウン解析

肝内胆管癌細胞株 3 種類, HuCCT1, TKKK, HuH-28, を用いて YAP 発現を Western blot で確認したところ HuCCT1 で強発現, TKKK で中等度発現, HuH-28 は発現なし, であった。そこで HuCCT1 において siRNA を用いて YAP をノックダウンさせたときの EMT マーカー (E-cadherin, N-cadherin, vimentin) と stemness マーカー (OCT4) の発現変化を western blot で検討したところ, N-cadherin, vimentin, OCT4 の発現低下が観察された。さらに sphere formation assay を行ったところ YAP ノックダウンによって有意に sphere forming rate が低下, すなわち自己複製能が低下することが明らかになり, anoikis assay においては anoikis 耐性能が有意に低下することが判明した。この結果は YAP/Hippo 経路が肝内胆管癌において癌源細胞の誘導あるいは維持に重要な役割を果たしていることを示唆するものと考えられる。

さらに YAP の核内移行を妨げ, また TEADs との結合を抑制し転写因子としての活性を抑制する verteporfin を用いてリン酸化 YAP, EMT マーカー, stemness マーカーの動態を western blot で評価したところ, リン酸化 YAP は verteporfin 濃度依存性に発現増強し, YAP/Hippo 経路が阻害されていることを示すとともに siRNA のときと同様, N-cadherin, vimentin, OCT4 の発現低下が観察された。また, sphere forming rate の低下, anoikis 耐性能の低下も明らかにされた。このことは既存の薬剤である verteporfin が新たな肝内胆管癌治療の手段となる可能性を示すものと考えられた。

(3) 肝内胆管癌動物モデルを用いた YAP 機能発現抑制剤による治療効果の解析

そこで, in vivo マウスモデルを用いて verteporfin の肝内胆管癌に対する効果を検討した。BALB/cAyc1-nu/nu マウスにおいて HuCCT1 細胞を皮下に投与して腫瘍形成をまち (5 週), その後 verteporfin を投与して, 腫瘍体積の変化を検討した。なお, 基礎実験として verteporfin は YAP 発現のみられる細胞に対しては, YAP/Hippo 経路を抑制するが, Akt/mTOR 経路が亢進することが明らかにされたので, verteporfin に加え, mTOR 阻害剤である rapamycin の上乗せ効果も合わせて検討した。その結果, verteporfin 投与によって腫瘍体積はコントロールに比べ, 有意に小さく, そこに rapamycin を加えることによって腫瘍の増大はほぼ抑制されることが示された (図)。今回はその後の長期経過については追えていないため, 腫瘍の縮小までは検討できていないが, YAP/Hippo 経路の抑制は, 少なくとも YAP 発現肝内胆管癌に対しては腫瘍増大抑制効果が示され, そこに Akt/mTOR 経路をさらに抑制することでほぼ腫瘍増大の抑制が得られることが明らかになった。なお, YAP 発現のみられない症例に対しては, in vitro の基礎実験においては, verteporfin が IL-6/STAT3 経路を抑制することで腫瘍増殖抑制作用を有していることを明らかにしている。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 11 件)

Roles of Pin1 as a key molecule for EMT induction by activation of STAT3 and NF- κ B in human gallbladder cancer. Nakada S, Kuboki S, Nojima H, Yoshitomi H, Furukawa K,

Takayashiki T, Takano S, Miyazaki M, Ohtsuka M. Ann Surg Oncol 26:907-917,2019 (査読 有)
DOI: 10.1245/s10434-018-07132-7.

Expression of annexin II and stromal tenascin C promotes epithelial to mesenchymal transition and correlates with distant metastasis in pancreatic cancer. Yoneura N, Takano S, Yoshitomi H, Nakata Y, Shimazaki R, Kagawa S, Furukawa K, Takayashiki T, Kuboki S, Miyazaki M, Ohtsuka M. Int J Mol Med 42:821-830,2018 (査読 有) DOI:
10.3892/ijmm.2018.3652.

Sex determining region Y box 9 induces chemoresistance in pancreatic cancer cells by induction of putative cancer stem cell characteristics and its high expression predicts poor prognosis. Higashihara T, Yoshitomi H, Nakata Y, Kagawa S, Takano S, Shimizu H, Kato A, Furukawa K, Ohtsuka M, Miyazaki M. Pancreas 46:1296-1304,2017 (査読 有) DOI:
10.1097/MPA.0000000000000945.

Grainyhead-like 2 (GRHL2) regulates epithelial plasticity in pancreatic cancer progression. Nishino H, Takano S, Yoshitomi H, Suzuki K, Kagawa S, Shimazaki R, Shimizu H, Furukawa K, Miyazaki M, Ohtsuka M. Cancer Med 6:2686-2696,2017 (査読 有) DOI:
10.1002/cam4.1212.

Metadherin promotes metastasis by supporting putative cancer stem cell properties and epithelial plasticity in pancreatic cancer. Suzuki K, Takano S, Yoshitomi H, Nishino H, Kagawa S, Shimizu H, Furukawa K, Miyazaki M, Ohtsuka M. Oncotarget 8:66098-66111,2017 (査読 有) DOI: 10.18632/oncotarget.19802.

Intraductal neoplasms of the bile duct - A new challenge to biliary tract tumor pathology. Nakanuma Y, Uesaka K, Miyayama S, Yamaguchi H, Ohtsuka M. Histol Histopathol 32:1001-1015,2017 (査読 有) DOI: 10.14670/HH-11-892.

〔学会発表〕(計 9 件)

肝内胆管癌におけるYAP/TAZ発現の意義 杉浦謙典、三島 敬、高野 重紹、酒井 望、鈴木 大亮、久保木 知、高屋敷 吏、古川 勝規、吉富 秀幸、大塚 将之 第73回日本消化器外科学会総会 2018年

進行肝内胆管癌に対する術前化学療法の施行およびR0切除を目指した積極的外科治療の意義を再考する 久保木 知、宮崎 勝、大塚 将之 JDDW2018 2018年

Outcome of patients with initially unresectable locally advanced intrahepatic cholangiocarcinoma treated by downsizing chemotherapy and subsequent surgical resection. Ohtsuka M, Yoshitomi H, Furukawa K, Takayashiki T, Kuboki S, Takano S, Suzuki D, Sakai N, Kagawa S, Nojima H, Mishima T, Kato A, Miyazaki M. 13th IHPBA World Congress 2018 年

Clinicopathological Features and Surgical Outcome of Intraductal Papillary Neoplasm of the Bile Duct (IPNB) 大塚 将之、清水 宏明、吉富 秀幸、古川 勝規、高屋敷 吏、久保木 知、高野 重紹、鈴木 大亮、酒井 望、賀川 真吾、野島 広之 第72回日本消化器外科学会総会 2017 年

進行肝内胆管癌に対する血管合併切除を伴う外科治療の意義 大塚 将之、清水 宏明、加藤 厚、吉富 秀幸、古川 勝規、高屋敷 吏、久保木 知、高野 重紹、鈴木 大亮、酒井 望、賀川 真吾、野島 広之、宮崎 勝 第116回日本外科学会定期学術集会 2016年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：高野 重紹

ローマ字氏名：(TAKANO, shigetsugu)

所属研究機関名：千葉大学

部局名：大学院医学研究院

職名：助教

研究者番号(8桁)：20436380

研究分担者氏名：高屋敷 吏

ローマ字氏名：(TAKAYASHIKI, tsukasa)

所属研究機関名：千葉大学

部局名：大学院医学研究院

職名：講師

研究者番号(8桁)：30456024

研究分担者氏名：久保木 知

ローマ字氏名：(KUBOKI, satoshi)

所属研究機関名：千葉大学

部局名：医学部附属病院

職名：講師

研究者番号(8桁)：50571410

研究分担者氏名：清水 宏明

ローマ字氏名：(SHIMIZU, hiroaki)

所属研究機関名：帝京大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号(8桁)：80272318

(2)研究協力者

研究協力者氏名：杉浦 謙典

ローマ字氏名：(SUGIURA, kaneyasu)

研究協力者氏名：三島 敬

ローマ字氏名：(MISHIMA, takashi)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。