

令和 2 年 5 月 11 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15240

研究課題名(和文) Hippo経路破綻による舌がん発症マウスモデルの樹立

研究課題名(英文) Establishment of Hippo pathway defective oral cancer model mouse

研究代表者

上田 史仁 (Ueda, Fumihito)

神戸大学・医学研究科・学術研究員

研究者番号：20806129

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：頭頸部扁平上皮癌(HNSCC)においていくつかの遺伝子異常が報告されているが、これら遺伝子は単一変異ではHNSCCを早期から再現できないことから、他の遺伝子変異の蓄積も必要と考えられた。本研究ではHippo経路破綻による舌がん発症マウスモデルを樹立し、非常に早期からHNSCCを再現できることを示した。さらに遺伝子異常の蓄積によりHippo経路のエフェクター分子YAP1が活性化されること、YAP1をsiRNAあるいは薬剤によって抑制するとHNSCCの発症を抑えられることを認め、YAP1がHNSCCの強力なドライバーである可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトの全悪性腫瘍の半数以上でHippo経路異常をみること、種々の組織におけるHippo経路の単独異常で非常に早期にまた高効率に腫瘍形成をみることから、Hippo経路の機能・制御解析は、世界的に注目されつつあるテーマである。

口腔におけるHippo経路の生理的意義や破綻病態を明らかにする本研究は、生理学、生化学、腫瘍学等の研究分野へ新しい知見を与える。またこれまで原因が多岐にわたり治療が困難であった頭頸部扁平上皮がん(HNSCC)の共通発症・進展機構が解明されることのみならず、HNSCCの新治療法やその効果も提示し、臨床医学や国民福祉に大きく貢献する。

研究成果の概要(英文)：Although some genetic abnormalities are reported in patients with Head-and-neck squamous cell carcinoma (HNSCC), other genetic mutations may also be important for onset and progression of HNSCC because these reported mutations cannot reproduce tumorigenesis for short span. Here, we established HNSCC model mouse by tongue-specific deletion of Hippo pathway gene, underwent surprisingly rapid and highly reproducible tumorigenesis. Combinations of molecules mutated in HNSCC may increase and sustain YAP1, effector of Hippo pathway activation to the point of oncogenicity. Strikingly, siRNA or pharmacological inhibition of YAP1 blocks murine HNSCC onset in vitro and in vivo. Our present data indicating that YAP1 may be a strong driver of the onset and progression of HNSCC.

研究分野：腫瘍学

キーワード：Hippo経路 HNSCC マウスモデル

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

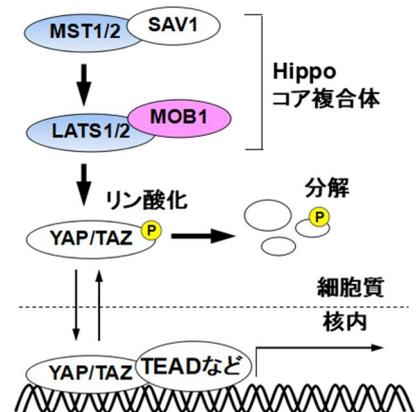
### 1. 研究開始当初の背景

(1) 頭頸部扁平上皮がん(HNSCC)は世界第6位の悪性腫瘍(参考文献1)であり、毎年65万人が新たに発症する。HNSCCの9割以上は粘膜上皮から発症し、うち口腔扁平上皮がん(OSCC)、中でも舌がんが最多である。生化学的には、ヒトHNSCCではこれまでEGFR(参考文献2)やc-mycの過剰発現(参考文献3)、Notchの活性化(参考文献4)、Rasの活性変異(参考文献5)、およびp16(参考文献6)やp53の不活化(参考文献7)などの異常がそれぞれ一部に報告されているものの、広く共通した分子異常の解明は進んでいない。K-Rasを過剰発現させたマウスでは過剰発現1か月後に良性の乳頭腫を生じるものの、OSCCまで示すものは稀であり(参考文献8,9)、活性化Aktを発現したマウスでも腫瘍形成に20-50週かかる(参考文献10)ことから、発がんには他の遺伝子変異の蓄積が必要と思われる。

(2) Hippo経路は進化的に保存されたシグナル伝達経路であり、上流のHippoコア複合体は転写共役因子でありがん遺伝子でもあるYAP1/TAZを負に制御する(図1)。またヒト全悪性腫瘍患者の半数近くでHippo経路異常を認めること、これまで作製されたHippoコア複合体分子の遺伝子欠損マウスではがんの発症を高率に認めることから、Hippo経路はがんの発症に重要なドライバーシグナルとして注目されつつある(参考文献11,12)。

また我々はこれまでに、MOB1(図1参照)がHippoコア複合体の最も重要なハブとして機能すること、初期発生に必須な分子であること、がん抑制遺伝子であること(参考文献13)、肝がんや胆管がんの発症に重要であること(参考文献14)などを明かにしてきた。

図1. Hippo経路の構成分子



### 2. 研究の目的

我々は、細胞接触などに応答してがん抑制に働くことが知られるHippo経路に着目し、マウス口腔でHippo経路を破綻させると極めて速やか(1週間後)に扁平上皮がんを発症し、3週間後には全例浸潤がんに至ることを見出した。そこで本研究では、Hippo経路異常による頭頸部扁平上皮がん(HNSCC)の発症・進展機構の解明、新規治療法の提示とその効果の検証を目的とした。

### 3. 研究の方法

CMV-CreER トランスジェニックマウスとMOB1-flox マウスを交配し、タモキシフェン塗布誘導性に口腔特異的MOB1欠損マウスを作製した。このマウスを用いて以下の項目の検討を行った。

- (1) MOB1欠損によるHNSCCの発症頻度と経時的な進展状況の病理学的解析
- (2) がん発症に至る細胞生物学的変化や生化学的変化の解析
- (3) エフェクター分子YAP, TAZを標的とした治療可能性の検証
- (4) HNSCCで高頻度に見られる遺伝子異常によるYAP, TAZ活性化機構の解析
- (5) ヒト口腔がんにおけるHippo経路異常の頻度と予後相関

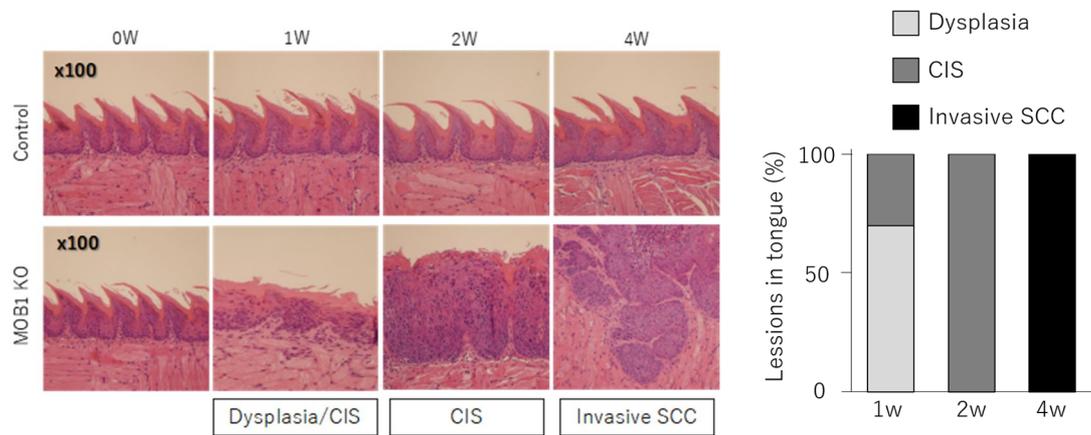
### 4. 研究成果

- (1) MOB1欠損によるHNSCCの発症頻度と経時的な進展状況の病理学的解析

マウス口腔でタモキシフェン誘導性にMOB1を欠損させると、タモキシフェン投与1週後で上

皮内がん、投与4週以内に全例浸潤がんが認められた(図2)。

図2. MOB1の欠損による早期SCCの発生



### (2) がん発症に至る細胞生物学的変化や生化学的变化の解析

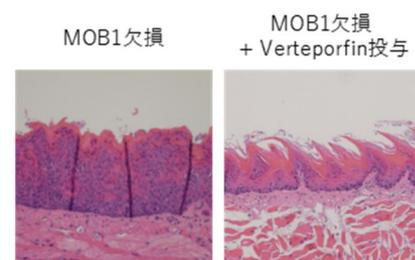
MOB1の欠損により舌上皮細胞でマイクロヌクレイや多極紡錘体、aneuploidが高頻度に観察され、ゲノム不安定化が亢進していることが示唆された。また細胞増殖能や自己複製能の亢進が認められ、これら細胞生物学的変化によってがん化に至ることが示唆された。

また、MOB1欠損によってLATS1タンパク質の安定性が抑制されYAPの発現上昇が認められた。一方YAPのホモログであるTAZに関しては影響を及ぼさなかった。さらに、YAP-YEADの標的遺伝子CTGF、BIRC5、TOP2Aの発現上昇も認められた。したがって、MOB1欠損によってYAPが異常に活性化し、発がんに至ると考えられた。

### (3) エフェクター分子YAP, TAZを標的とした治療可能性の検証

まず、Hippo経路異常によるHNSCC発症におけるYAP, TAZ依存性を検討するため、MOB1に加えてYAPあるいはTAZを同時に欠損するノックアウトマウスを作製し、経時的な観察を行った。YAPの同時欠損によってMOB1欠損によるHNSCCの発症は抑制されたものの、TAZの同時欠損ではほとんど影響は認められなかった。このことから、YAPがHNSCC発症に重要であることが考えられた。

図3. VerteporfinによるHNSCC予防効果



そこでYAP-TEAD結合阻害剤Verteporfinを用いてMOB1欠損によるHNSCC発症を予防できるのか、あるいは一旦発症した後に腫瘍の進展を抑制できるのかを検討した。その結果、VerteporfinはHNSCC発症を予防できるだけでなく、腫瘍の進展も抑制できることが明らかとなった(図3)。以上より、HNSCCの治療標的としてHippo経路が有用であると考えられた。

### (4) HNSCCで高頻度に見られるHippo経路異常によるYAP, TAZ活性化機構の解析

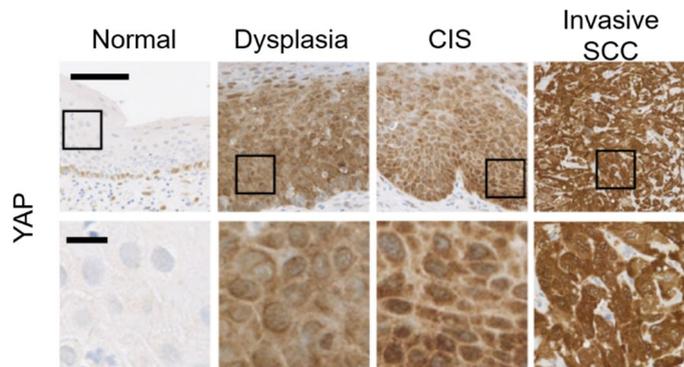
マウスにおいてHippo-YAP経路異常によりHNSCCを早期から再現できることが明らかになった。そこでヒトHNSCCで高頻度に認められる遺伝子異常(EGFR, p53, PTEN, FAT1など)がHippo-YAP経路に影響を及ぼす可能性が考えられた。HPV陰性のHNSCC患者由来細胞株WSU-HN30にEGF刺激、あるいはsiRNAを用いて種々の遺伝子をノックダウンしたときのYAP活性変化を解析したところ、EGF刺激やp53, PTEN, FAT1のノックダウンによってそれぞれYAP活性が上昇することが認められた。さらに、これらのがん抑制遺伝子を複数ノックダウンすると、より強力にYAP1が活性化されることを見出した。以上の結果から、HNSCCで高頻度に認められるEGFR, p53, PTEN, FAT1といった

遺伝子異常の蓄積によってYAPの活性化が誘導され、がんの発症・進展に寄与することが示唆された。

(5) ヒト口腔がんにおけるHippo経路異常の頻度と予後相関

種々のステージにあるHNSCCおよびDysplasiaの症例において、YAPを免疫組織染色し、YAP活性化の頻度と、予後相関を検討した。その結果、ヒト口腔がんでは発がん前の異形成の頃より9割以上の症例でYAPの高い活性化が認められることが分かった。さらに、異形成、上皮内がん、浸潤性扁平上皮がんと悪性度が高くなるにつれYAPの活性も高くなることが明らかになった(図4)。したがって、YAPの活性化が口腔がんの予後と相関することが示唆された。

図4. ヒト口腔がんにおけるYAPの活性化



【参考文献】

- (1)Histol Histopathol 2002;17:909–1014, (2)J Clin Oncol 2006;24:2666–72, (3)Cancer Detect Prev 2004;28(3):178-86, (4)Cancer Res 2014;74(4):1091-104, (5)Cancer 1998;83(2):204-12, (6)Arch Otolaryngol Head Neck Surg 2006;132(4):409-15, (7)N Engl J Med 2001;345:1890–900, (8)Cancer Res 2004;64:5054–8, (9)Cancer Res 2004;64:8804-8807, (10)Cancer Res 2009;69:4159-66, (11)Nat Rev Cancer 2007;7(3):182-91, (12)Cell 2005;122(3):421-34, (13)J Clin Invest 2012;122(12):4505-18, (14)Proc Natl Acad Sci U S A. 2016;113(1):E71-80

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Omori Hirofumi, Nishio Miki, Masuda Muneyuki, Miyachi Yosuke, Ueda Fumihito, Nakano Takafumi, Sato Kuniaki, Mimori Koshi, Taguchi Kenichi, Hikasa Hiroki, Nishina Hiroshi, Tashiro Hironori, Kiyono Tohru, Mak Tak Wah, Nakao Kazuwa, Nakagawa Takashi, Maehama Tomohiko, Suzuki Akira	4. 巻 6
2. 論文標題 YAP1 is a potent driver of the onset and progression of oral squamous cell carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eaay3324
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.aay3324	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----