

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07572

研究課題名（和文）胸腺におけるHippo経路の機能

研究課題名（英文）Functional analysis of Hippo pathway in thymus

研究代表者

西尾 美希（Nishio, Miki）

神戸大学・医学研究科・講師

研究者番号：10467897

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：胸腺は、T細胞とそれを取り巻くストローマ細胞により構成され、これまで胸腺T細胞研究はかなり進んだが、胸腺上皮細胞の増殖・分化・機能制御は、まだ不明な部分が多かった。また、胸腺関連の腫瘍免疫担当細胞の一つであるNKT細胞の分化・機能に重要なシグナル経路も十分解明されていなかった。Hippo経路は重要な腫瘍制御経路として近年注目されている。そこで遺伝子改変マウスを用いて、胸腺上皮細胞やNKT細胞におけるHippo経路の機能解析を行い、Hippo経路分子の一つであるLATSが胸腺癌の発症に関与することを見出した。また、NKT細胞の分化・成熟にはHippo経路分子のMSTが重要であることも見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胸腺上皮細胞やNKT細胞におけるHippo経路の生理的役割や破綻病態を、特に腫瘍発症の有無や腫瘍免疫監視の観点を重視して解析するは、MSTが変異したヒトにみられる病態や危険性を明示するとともに、これらの研究成果を基にした、Hippo経路を標的とする抗腫瘍薬や免疫調節薬等の創薬研究開発への貢献も期待できる。

研究成果の概要（英文）：The thymus is composed of T cells and surrounding stromal cells. Although thymic T cell research has made considerable progress, the regulation of thymic epithelial cell proliferation, differentiation, and function remains largely unknown. The Hippo pathway has recently attracted attention as an important tumor regulatory pathway. We analyzed the function of the Hippo pathway in thymic epithelial cells and NKT cells using genetically engineered mice and found that LATS, one of the Hippo pathway molecules, is involved in the pathogenesis of thymic carcinoma. We also found that MST, a Hippo pathway molecule, is important for the differentiation and maturation of NKT cells.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：Hippo経路

1. 研究開始当初の背景

胸腺は、T細胞の分化・成熟に必須の器官であり、T系列細胞とそれを取り巻くストローマ細胞により構成される。胸腺上皮細胞 (thymic epithelial cell; TEC) は、ストローマ細胞の中でもT細胞の分化・成熟において中心的な役割を担い、抗原提示や細胞接触によりT細胞の分化・成熟に寄与する。これまでTリンパ球の分化成熟の分子機構の解明は進んでいたが、胸腺上皮細胞の増殖・分化・機能制御に関しては、まだ不明なことが多かった(文献1)。また胸腺癌は希少癌で、発見時その多くが進行癌で発見されることから、予後不良の腫瘍で有効な治療法も確立されていなかった。

一方で腫瘍免疫担当細胞のうち胸腺と関連するものは主に、CD8+T細胞、Treg細胞、NKT細胞である。NKT細胞(iNKT細胞)はV α 14J α 18/V β 8 or 7 or 2のT細胞受容体を発現する $\alpha\beta$ 型T細胞の一亜群で、一般的なT細胞は、胸腺上皮細胞の主要組織適合抗原複合体拘束性にペプチド抗原を認識して獲得免疫に関与するが、NKT細胞は胸腺T細胞上のCD1d拘束性に脂質抗原を認識し、自然免疫系エフェクター様に迅速な反応で、大量・多彩な液性因子を産生して自然-獲得免疫間のギャップを橋渡しする特殊な細胞集団である。腫瘍拒絶におけるNKT細胞の重要性が明らかにされて以降(文献2)、腫瘍免疫領域におけるNKT細胞の重要性が報告されてきたが、数が少ない集団のため、解析が困難で、その分化・機能に重要なシグナル経路は未だ十分解明されていなかった。

Hippo経路は、組織レベルでは器官サイズやがん発症・進展を制御する重要なシグナル経路として急激に注目されつつある(文献3)。またMST1が全身でホモ変異したヒト個体は免疫不全症を発症すること(文献4)からもHippo経路の腫瘍免疫担当細胞における機能解析が行われてきていた。これまで胸腺に関与するHippo経路の機能解析研究としては、一般的なT細胞やTreg細胞における役割はかなり明らかになってきたが、NKT細胞や胸腺上皮細胞におけるHippo経路の役割は不明なことが多かった。

2. 研究の目的

胸腺上皮細胞やNKT細胞におけるHippo経路の役割を解析し、この経路の生理的役割や破綻病態を、特に腫瘍発症の有無や腫瘍免疫監視の観点を重視して解析し、MSTが変異したヒトにみられる病態や危険性を明示するとともに、これらの研究成果を基にした、Hippo経路を標的とする抗腫瘍薬や免疫調節薬等の創薬研究への礎をつくることを目的とした。

3. 研究の方法

胸腺上皮細胞におけるHippo経路の役割:

FoxN1-Cre Tg マウスとHippo経路コアコンポーネント分子のfloxマウスとの交配により、胸腺上皮特異的なHippo経路コアコンポーネント分子変異マウスを作製し、胸腺癌の発症の有無、胸腺上皮細胞の増殖分化及びT細胞分化制御における影響を解析する。

胸腺NKT細胞におけるHippo経路の役割:

LCK-Cre TマウスとMST floxマウスとの交配により、T細胞特異的な欠損MST欠損マウスを作製し、T細胞特異的な欠損によるNKT細胞変化と腫瘍進展性変化を解析する。

4. 研究成果

胸腺上皮細胞におけるHippo経路の役割:

FoxN1-Cre Tg マウスとLATS1/2 floxマウスを交配し、胎生期から胸腺上皮特異的にLATSを欠損させたところ、早期から全例胸腺癌を発症し、離乳期前まで生存することができなかった(図1)。また、その他のHippo経路分子を胸腺上皮特異的に変異させたところ、MOB1やYAPの欠損が胸腺のサイズに影響することを見出した。

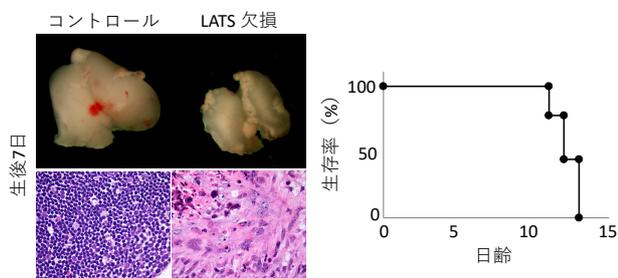


図1 LATS欠損による胸腺癌の早期発症

胸腺NKT細胞におけるHippo経路の役割:

LCK-Cre TマウスとMST1/2 floxマウスを交配し、T・NKT細胞特異的にMSTを欠損させたところ、他のV α のレパートリー数の変化は見ないものの、CD1d-GalCer陽性のiNKT細胞の数が著しく減少していた(図2)。そこでiNKT細胞の分化成熟ステージをみたところ、NK1.1およびCD44陽性であるステージ3において顕著に細胞数が減少していた(図3A)。NKT1, 2, 17などのサブセ

ットでは、CD27 および CD122 陽性である NKT1 のサブセットの細胞数が減少していたが、NKT2, 17 のサブセットに細胞数の減少はみられなかった(図 3B)。また、T・NKT 細胞特異的 MST 欠損マウスでは NKT 細胞の減少によりの血中のサイトカイン産生能も低下していた(図 4)。

次に抗原提示細胞 (DP T 細胞) の表面分子や抗原提示能を検討したところ、MST 欠損による DP T 細胞数に差はなく(図 5A)、DP T 細胞上にあり NKT 細胞分化成熟に重要な表面分子 CD1d, SLAM, Ly108 の発現量も MST 欠損による変化は見られなかった。抗原提示能 (α GalCer の存在下 MST 欠損 DP T 細胞の野生型 NKT 細胞への刺激能)は IL2 産生を指標として比較したところ、IL2 産生量にコントロール細胞と差は見られなかったことから、MST 欠損 DP 細胞の抗原提示能は維持されていた(図 5B)。

MST 欠損による iNKT 細胞数の減少が細胞増殖能の低下によるかどうかを BrdU の取り込みで、細胞死の亢進によるかどうかを AnnexinV 染色で検討した。MST 欠損 NKT 細胞の BrdU 取り込みに変化は見られず(図 6A)、AnnexinV 陽性の細胞が増加していた(図 6B)ことから、iNKT 細胞の減少は細胞死亢進によることがわかった。特に iNKT 細胞の分化成熟ステージのステージ 3 で MST 欠損 NKT 細胞の細胞死が亢進していることを見出した。

MST 欠損 iNKT (CD1d- α GalCer 陽性)細胞にみられる V α 14/J α 18 mRNA の発現量の変化や DNA 再構成障害が起きているかどうかを検討すると、MST 欠損 iNKT 細胞細胞では V α 14/J α 18 の DNA 再構成は起きているものの(図 7 上)、V α 14/J α 18 の mRNA は著しく減少しており(図 7 下)、転写抑制によることが示唆された。

これらの結果は、CD4-Cre Tg マウスを用いた MST 欠損 NKT 細胞の機能解析の報告(文献 5)と類似した結果であったことから、Hippo 経路コアコンポーネントのひとつである MST は iNKT の成熟分化に重要な分子として機能することを再確認する結果となった。

引用文献

- 1) Nat Rev Immunol. 17, p295, 2017
- 2) J Exp Med. 195, p625, 2002
- 3) Nat Rev Cancer 7, p182, 2007
- 4) Blood 119, p3450, 2012
- 5) J Exp Med. 217, e20191157, 2020

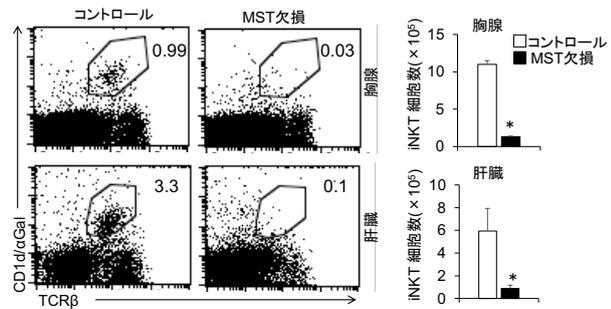


図2 MST欠損による iNKT 細胞の減少

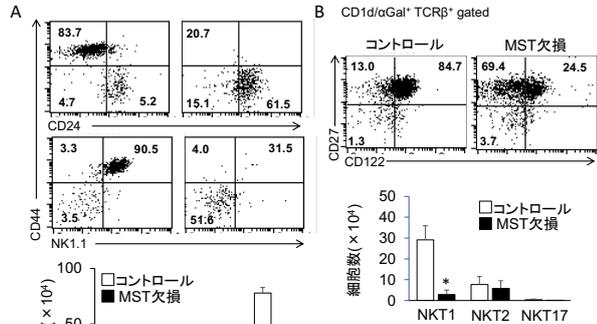


図3 NKT 細胞成熟ステージとサブセットの変化

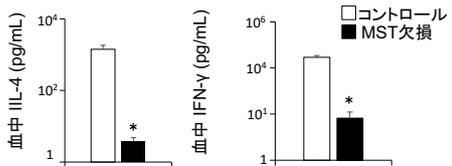


図4 MST欠損マウスのサイトカイン産生能の低下

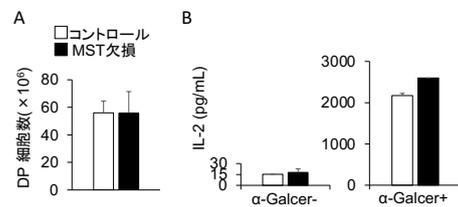


図5 抗原提示細胞 (DP T細胞) の抗原提示能に変化なし

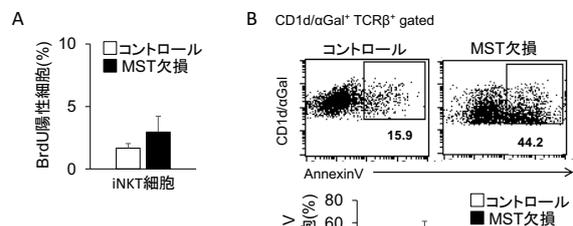


図6 MST欠損による

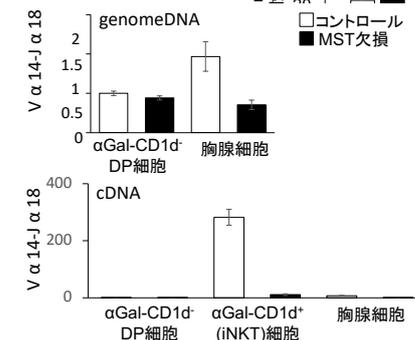


図7 MST欠損による V α 14/J α 18 mRNA の発現低下

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Keisuke Nakatani , Tomohiko Maehama , Miki Nishio , Junji Otani , Keiko Yamaguchi , Miki Fukumoto , Hiroki Hikasa , Shinji Hagiwara , Hiroshi Nishina , Tak Wah Mak , Teruki Honma , Yasumitsu Kondoh , Hiroyuki Osada , Minoru Yoshida , Akira Suzuki	4. 巻 112
2. 論文標題 Alantolactone is a natural product that potently inhibits YAP1/TAZ through promotion of reactive oxygen species accumulation.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer science	6. 最初と最後の頁 4303-4316
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15079	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yosuke Miyachi, Miki Nishio, Junji Otani, Shinji Matsumoto, Akira Kikuchi, Tak Wah Mak, Tomohiko Maehama, Akira Suzuki	4. 巻 25
2. 論文標題 TAZ inhibits acinar cell differentiation but promotes immature ductal cell proliferation in adult mouse salivary glands.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes to cells	6. 最初と最後の頁 714-726
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12879	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tomohiko Maehama , Miki Nishio , Junji Otani , Tak Wah Mak , Akira Suzuki	4. 巻 112
2. 論文標題 The role of Hippo-YAP signaling in squamous cell carcinomas.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer science	6. 最初と最後の頁 51-60
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14725	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Miki Nishio , Yoko To , Tomohiko Maehama , Yukari Aono , Junji Otani , Hiroki Hikasa , Akihiro Kitagawa , Koshi Mimori , Takehiko Sasaki , Hiroshi Nishina , Shinya Toyokuni , John P Lydon , Kazuwa Nakao , Tak Wah Mak , Tohru Kiyono , Hidetaka Katabuchi , Hironori Tashiro , Akira Suzuki	4. 巻 111
2. 論文標題 Endogenous YAP1 activation drives immediate onset of cervical carcinoma in situ in mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer science	6. 最初と最後の頁 3576-3578
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14581	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 前濱 朝彦, 西尾 美希, 鈴木 聡	4. 巻 274
2. 論文標題 細胞競合とがん 哺乳類Hippo経路による細胞接着の制御と細胞競合	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 457-462
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 西尾 美希, 前濱 朝彦, 大谷 淳二, 曾山 弘敏, 鈴木 聡
2. 発表標題 動物モデルによる先端がん研究 Hippoシグナルによるがんの発症進展制御
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 曾山 弘敏, 西尾 美希, 増田 隆明, 三森 功士, 原 重雄, 前濱 朝彦, 福本 巧, 鈴木 聡
2. 発表標題 Basal like乳癌におけるHippo経路の役割
3. 学会等名 第80回日本癌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 白石 祐介, 前濱 朝彦, 西尾 美希, 藤澤 正人, 鈴木 聡
2. 発表標題 Hippo経路を標的として膀胱がん細胞の増殖を抑制する新規化合物の同定
3. 学会等名 第80回日本癌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Junji Otani, Keisuke Nakatani, Tomohiko Maehama, Miki Nishio, Akira Suzuki
2. 発表標題 A natural product Alantolactone is a potent YAP1/TAZ inhibitor via ROS production
3. 学会等名 The 14th International Conference on Protein Phosphatase
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tomohiko Maehama, Miki Nishio, Hirofumi Omori, Akira Suzuki
2. 発表標題 Squamous cell carcinoma onset and progression driven by multistep YAP activation
3. 学会等名 The 14th International Conference on Protein Phosphatase
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鈴木 聡、西尾美希、藤 庸子、大森博文、田代浩徳、前濱朝彦
2. 発表標題 がん抑制遺伝子の機能解析
3. 学会等名 第19回日本産婦人科がん分子標的研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西尾美希、中谷圭佑、大谷淳二、日笠弘基、前濱朝彦、鈴木聡
2. 発表標題 YAP1/TAZ阻害による抗腫瘍作用を示す天然物の同定
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 前濱朝彦、西尾美希、大森裕文、鈴木聡
2. 発表標題 YAPの多段階活性化による扁平上皮癌の発症・進展の制御
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 前濱朝彦、西尾美希、大森裕文、鈴木聡
2. 発表標題 YAPの多段階活性化による扁平上皮癌の発症・進展の制御
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 前濱朝彦、西尾美希、大森裕文、田代浩徳、中尾一和、鈴木聡
2. 発表標題 Hippo経路による扁平上皮癌の制御
3. 学会等名 第57回日本臨床分子医学会学術集会
4. 発表年 2020年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------