

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16221

研究課題名(和文) 胸腺がんの発症・進展機構の解明

研究課題名(英文) Mechanisms of initiation and progression of thymic epithelial tumor

研究代表者

上田 史仁 (Ueda, Fumihito)

慶應義塾大学・薬学部(芝共立)・助教

研究者番号：20806129

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)：胸腺上皮性腫瘍は重症筋無力症などの自己免疫疾患を高頻度に併発することから、その発症・進展機構の理解は免疫学的にも重要であるが、非常に稀な腫瘍であるため解析がほとんど進んでいない。申請者らは胸腺上皮特異的Hippo経路構成遺伝子欠損マウスを用いて胸腺上皮性腫瘍の発症・進展機構の解明とHippo経路を標的とした治療の可能性を検証した。

種々の遺伝子改変マウスを用いた解析の結果、Hippo経路の破綻によって下流のエフェクター分子であるYAPが活性化し胸腺がん発症に繋がること、YAPを標的とすることで胸腺がんを治療できる可能性があることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、胸腺上皮性腫瘍の中でも特に稀な症例である胸腺がんに関して新たな知見を与えた。単一の遺伝子欠損で非常に早期に胸腺がんを発症する本モデルマウスは今後の胸腺がん研究において有用であるだけでなく、胸腺がんに対する治療薬としてYAPを標的とした薬剤が有用である可能性を提示できたことから、社会的にも本研究成果が与える影響は大きい。

研究成果の概要(英文)：Since thymic epithelial tumors frequently accompany autoimmune diseases such as myasthenia gravis, understanding the mechanism of their onset and progression is important either oncologically and immunologically, but they are too rare to be analyzed enough. Using mice lacking the Hippo pathway-constituting gene specific to the thymic epithelium, we elucidate the onset and progression mechanism of thymic epithelial tumors and verify the possibility of treatment targeting the Hippo pathway.

As a result of analysis using various genetically modified mice, it was shown that disruption of the Hippo pathway activates YAP, which is a downstream effector molecule of Hippo pathway, leading to the development of thymic cancer, and the possibility of effectiveness against thymic cancer by targeting YAP.

研究分野：腫瘍学

キーワード：Hippo経路 胸腺上皮細胞 胸腺がん

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

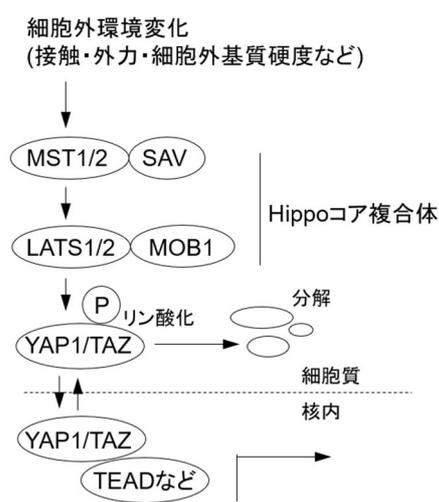
### 1. 研究開始当初の背景

近年分子標的薬が登場し、いくつかのがんにおいてはその予後を顕著に改善することが可能になってきた。一方、胸腺上皮性腫瘍は全腫瘍の 0.2-1.5%程度と極わずかであり、希少性が非常に高いことから解析がほとんど進んでおらず、現在まで有効な分子標的薬は報告されていない。胸腺上皮性腫瘍は、組織学的分類から胸腺腫 (A, AB, B1, B2, B3) と胸腺がん到大別される。胸腺腫の予後は比較的良好なものの、重症筋無力症などの自己免疫疾患を高頻度に併発すること、胸腺がんはより悪性度が高く、浸潤・転移性を示すことから、これらに対する新たな治療薬の開発が必要である。

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 1, 2)。

申請者の所属研究室では、MOB1 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 3)、肝がんや胆管がんの発症に重要であること(参考文献 4)などを明らかにしてきた。

図1. Hippo経路の活性様式



### 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、マウス胸腺上皮で特異的に Hippo 経路の構成分子 (MST1/2, MOB1, LATS1/2, YAP1, TAZ) を欠損させたマウスを作製・解析し、胸腺上皮性腫瘍の発症・進展機構を解明することをめざした。また、胸腺上皮性腫瘍に対する Hippo 経路を標的とした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

各 Hippo 経路の構成分子 (MST1/2, MOB1, LATS1/2, YAP1, TAZ) の flox マウスと Foxn1-Cre ノックインマウス、あるいは CMV-CreERT2 トランスジェニックマウスを交配し、胸腺上皮特異的 Hippo 経路分子欠損マウスあるいはタモキシフェン誘導性に Hippo 経路分子を欠損するマウスを作製した。これらのマウスを用いて以下の検討を行った。

- (1)胸腺上皮細胞 (cTEC/mTEC) の総数、分化・成熟度、増殖能、細胞死などの経時的な検討
- (2) $\alpha\beta$ T、Treg、iNKT、 $\gamma\delta$ T 細胞の総数、増殖・分化能などの検討
- (3)胸腺上皮性腫瘍の組織学的分類、発症頻度と経時的な進展状況の解析
- (4)胸腺上皮性腫瘍の発症へと至る細胞生物学的変化や生化学的変化
- (5)エフェクター分子 YAP1/TAZ を標的とした治療可能性の検証
- (6)ヒト胸腺上皮性腫瘍における Hippo 経路異常の頻度と予後相関

#### 4. 研究成果

##### (1) 胸腺上皮細胞 (cTEC/mTEC) の総数、分化・成熟度、増殖能、細胞死などの経時的な検討

胸腺上皮特異的に YAP1 を欠損させると胸腺上皮細胞(cTEC/mTEC)の総数が胎生期より減少した。一方で、cTEC や mTEC の分化・成熟度 (CD80<sup>+</sup>/MHC<sup>hi</sup>)、増殖能 (Ki-67)、細胞死 (TUNEL) には影響がなかった。in vitroで胸腺上皮細胞株に siRNA を用いて YAP1 をロックダウンすると増殖能の抑制が観察されたことから、YAP1 は胸腺上皮幹細胞の増殖に重要と考えられた。

胸腺上皮特異的に LATS1/2 を欠損させると胸腺上皮細胞 (CD45<sup>-</sup>/EpCAM<sup>+</sup>) の総数が胎生期より顕著に増加した。また、胎生期より現れる cTEC や mTEC の共通前駆細胞 (CD205<sup>+</sup>) が全く産生されず、幹細胞性 (Krt8<sup>+</sup>/Krt14<sup>+</sup>, MHC<sup>-</sup>/Sca-1<sup>+</sup>) を示す細胞の割合が増加した。一方、タモキシフェン誘導性に LATS1/2 を欠損するマウス胎仔より胸腺を採取し、2-DG 存在下で FTOC (Fetal Thymic Organ Culture) 後、タモキシフェン投与により LATS1/2 を欠損させた場合にはこのような影響は認められなかった。

TAZ や MST1/2、MOB1 を欠損させた場合には胸腺上皮細胞数の総数、分化・成熟度、増殖能、細胞死などに影響は認められなかった。

##### (2) αβT、Treg、iNKT、γδT 細胞の総数、増殖・分化能などの検討

胸腺上皮特異的に YAP1 を欠損させると T 細胞の増殖や分化、細胞死には影響が認められなかった一方で、総数の減少が認められた。TCR シグナルの強度 (CD5) にも影響は認められなかった。T 細胞の総数減少は、T 細胞を支持する胸腺上皮細胞数が減少したためと考えられた。

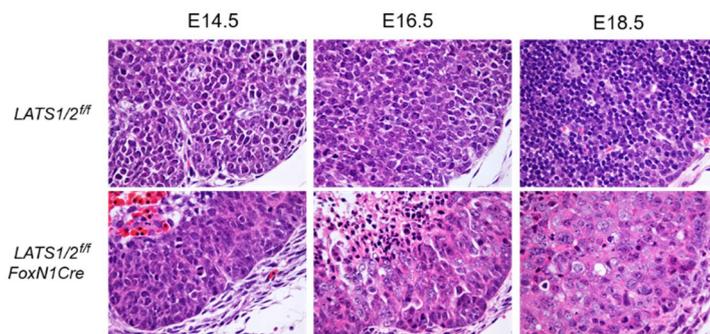
胸腺上皮特異的に LATS1/2 を欠損させると T 細胞の分化が最初期 (CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>-</sup>/CD25<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup>) で停止した。また、細胞増殖も認められなかった。胸腺上皮細胞の分化障害により Dll4-Notch シグナルや TCR シグナルが抑制されたことによると考えられた。

TAZ や MST1/2、MOB1 を欠損させた場合には影響は認められなかった。

##### (3) 胸腺上皮性腫瘍の組織学的分類、発症頻度と経時的な進展状況の解析

胸腺上皮特異的に LATS1/2 を欠損させると胎生 14.5 日で異形成を、胎生 16.5 日以降で扁平上皮がんを認めた (図 2)。一方、FTOC 後に腎被膜移植することで、成体期にタモキシフェン誘導性に LATS1/2 を欠損するモデルを作製したが、このときには胸腺上皮性腫瘍は認められなかった (次頁図 3)。

図 2. LATS1/2欠損による早期腫瘍形成



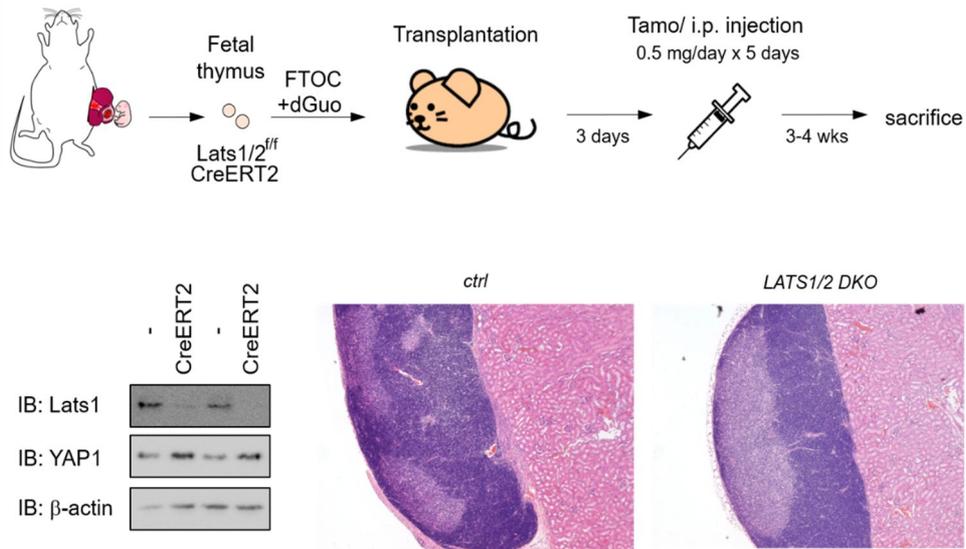
##### (4) 胸腺上皮性腫瘍の発症へと至る細胞生物学的変化や生化学的变化

LATS1/2 の欠損により胸腺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、LATS1/2 欠損によって YAP1 のリン酸化抑制、核で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、YAP1-YEAD の標的遺伝子 Ankrd1、Cyr61、Il-6 の発現上昇も認められた。したがって、LATS1/2 欠損によって YAP1 が異常に活性化し、発がんに至ると考えられた。

### 図3. 腎被膜移植を利用した成体期LATS1/2欠損モデル

inducible LATS1/2 DKO



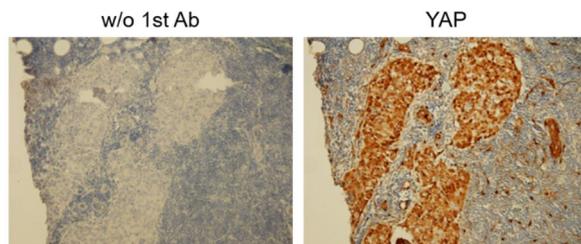
#### (5) エフェクター分子 YAP1/TAZ を標的とした治療可能性の検証

Hippo 経路異常による胸腺上皮性腫瘍発症における YAP1、TAZ 依存性を検討するため、LATS1/2 に加えて YAP1 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。YAP1 や TAZ の同時欠損によって LATS1/2 欠損による胸腺上皮性腫瘍の発症は抑制された。このことから、YAP1 や TAZ が胸腺上皮性腫瘍発症に重要であることが考えられた。

#### (6) ヒト胸腺上皮性腫瘍における Hippo 経路異常の頻度と予後相関

種々の組織型・ステージにある胸腺上皮性腫瘍の症例において、YAP1 を免疫組織染色し、YAP1 活性化の頻度と、予後相関を検討した。その結果、一部のヒト胸腺上皮性腫瘍（特に胸腺がん）では YAP1 の高い活性化が認められることが分かった（図4）。十分な症例数を検討することができなかったが、胸腺腫よりも胸腺がん、特に浸潤性扁平上皮がんなどの悪性度が高いものほど YAP1 の活性も高くなる傾向が認められた。したがって、YAP の活性化が口腔がんの予後と相関する可能性が示唆された。

図4. ヒト胸腺上皮性腫瘍におけるYAP1の活性化



このように、胸腺がん発症に Hippo 経路が関与する可能性やその治療標的として YAP1 阻害剤が有用である可能性を示すことができた一方で、胸腺上皮性腫瘍の発症機構に関してはまだ不明な点も残されている。これまでに、β-catenin 活性化型変異体トランスジェニックマウスでは LATS1/2 欠損と同様に胸腺上皮性腫瘍を発症し、逆にβ-catenin 欠損マウスでは YAP1 欠損マウスと同様に胸腺上皮細胞数が減少することが報告されている（参考文献5）。今後、Hippo 経路と Wnt-β-catenin 経路のクロストークを検討することで Hippo 経路異常による胸腺がん発症機構がより詳細に解明されるかもしれない。

**【参考文献】**

- 1: Harvey, et al. Nat Rev Cancer 2007;7:182-91
- 2: Huang, et al. Cell 2005;122:421-34
- 3: Nishio, et al. J Clin Invest 2012;122:4505-18
- 4: Nishio, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016;113:E71-80
- 5: Fujimori, et al. Elife. 2022 Jan 19;11:e69088

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 -
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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 上田 史仁、岩本 凌明、鶴島 瑠乃、多胡 めぐみ
2. 発表標題 ALCLにおけるDNAメチル化状態の差異を生じる分子機構の解析 タイトル英語
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2021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
---------	---------