

令和 6 年 5 月 22 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09843

研究課題名（和文）早期癌に認められる異型におけるHippo-YAPシグナルの機能解析

研究課題名（英文）Investigation of the effect of the Hippo-YAP signaling on atypia in oral squamous cell carcinoma

研究代表者

長谷川 佳那（Hasegawa, Kana）

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号：30793989

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、口腔扁平上皮癌の初期段階でみられる細胞異型へのYAPシグナルの関与と、その機序を解明することを目的とした。本研究の結果からYAPシグナルは上皮内癌の段階から活性化していたことを見出した。口腔扁平上皮癌細胞株を用いた実験から、YAPが核腫大および上皮間葉転換（EMT）に関与す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

本研究では発癌の初期段階でみられる異型が誘導されるメカニズムを解明しようと企図している。YAPシグナルが上皮内癌から活性化し、異型やEMTに関与する可能性を見出したことは、学術的な意義が高い。加えて、異型やEMTが誘導される分子病理学的な解明は新規口腔癌治療法の開発の一助となり、社会的な意義も高い。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to investigate the involvement of YAP signaling in the cellular atypia observed in the early stages of oral squamous cell carcinoma and its molecular mechanism. It was suggested that YAP signaling was activated from the carcinoma in situ lesion and YAP signaling might be involved in nuclear enlargement and EMT.

研究分野：口腔病理

キーワード：口腔癌 細胞異型 上皮間葉転換

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍では、DNA の遺伝子異常が生じ、細胞が増殖し、浸潤能を獲得していく。本邦では、特定の遺伝子異常を標的とする分子標的薬の臨床応用が開始されている。一方、口腔癌では治療標的となる遺伝子異常が少ない。そのため、異常に活性化した細胞内シグナル伝達とその異常を引き起こす責任分子を同定する必要がある。申請者らは最近、口腔扁平上皮癌 (OSCC) 特 に浸潤癌において、異常活性化した YAP シグナルが機械感受性イオンチャネルを介して腫瘍細胞の増殖を促進することを報告した。その研究過程において、異型 (核の腫大や極性の喪失) を伴う早期癌 (上皮内癌) では、YAP シグナルが異常活性化しており、異型に関与することを見出している。しかし、その詳細な分子基盤は不明である。

2. 研究の目的

本研究では、YAP シグナルの異型への関与とその機序を解明することを目的とした。

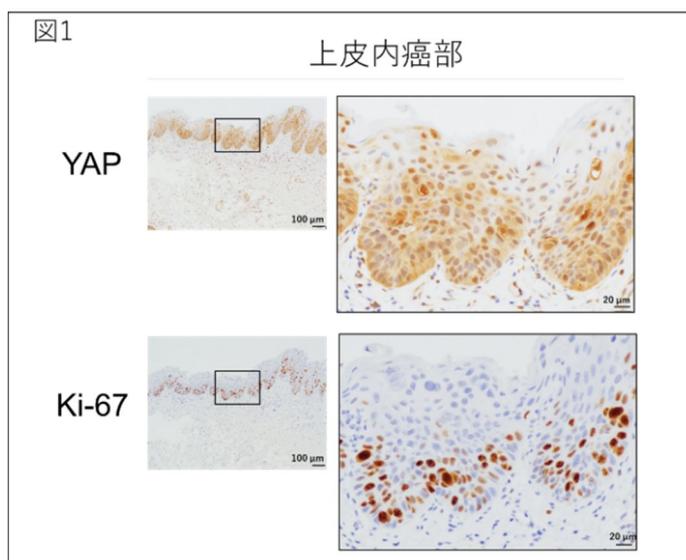
3. 研究の方法

上皮内癌と診断されたヒト病理組織標本を用いて、YAP の発現局在を検討した。OSCC 細胞株を用いて、細胞異型、特に核腫大に与える影響について蛍光免疫染色法を用いて検討した。また、siRNA を用いて、YAP の発現抑制により、上皮間葉転換 (EMT) に与える影響について、PCR 法および Western Blotting 法にて解析した。さらに遊走能についても検討した。

4. 研究成果

ヒト上皮内癌病理組織標本 50 症例を免疫組織化学染色にて検討したところ、非腫瘍部では YAP は細胞質に発現していたが、腫瘍部では YAP が高頻度に異型細胞の核に局在していた。また、腫瘍部では高頻度に Ki-67 と共局在していた (図 1)。この結果から、上皮内癌部においても、浸潤癌部と同様に (Hasegawa *et al.*, 2021. J Pathol.) YAP シグナルが活性化している可能性が示唆された。

そこで発癌過程における遺伝子変化について詳細に検討するために、OSCC 病理組織標本を用いて、DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子検索を行ったところ、非腫瘍部、上皮性異形成/上皮内癌、浸潤癌において段階的に発現が上昇する遺伝子を 73 個、非腫瘍部と比較して上皮性異形成/上皮内癌および浸潤癌において発現が上昇する遺伝子を 295 個、非腫瘍部、上皮性異形成/上皮内癌、浸潤癌において段階的に発現が減少する遺伝子を 100 個、非腫瘍部と比較して上皮性異形成/



浸潤癌において段階的に発現が減少する遺伝子を 100 個、非腫瘍部と比較して上皮性異形成/

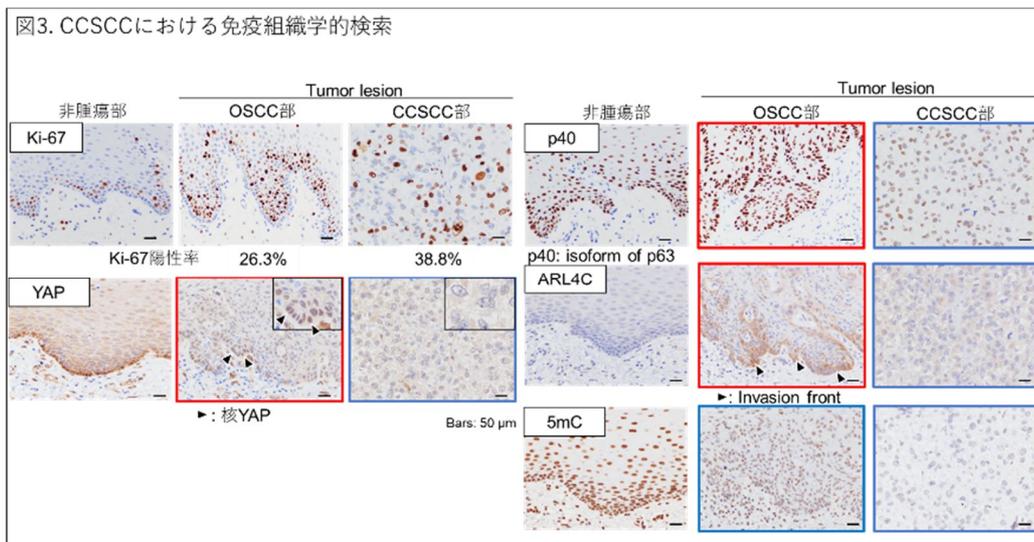
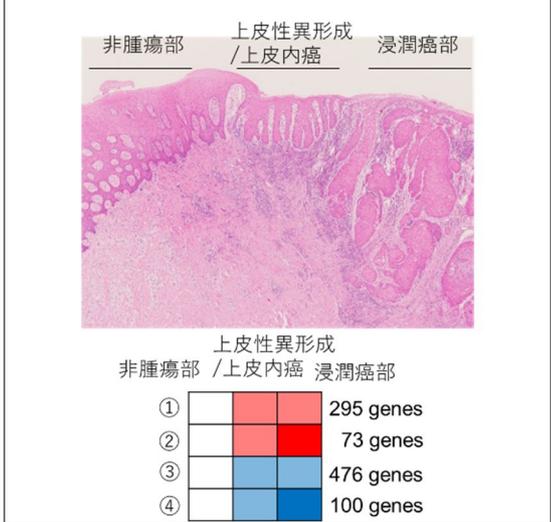
上皮内癌および浸潤癌において発現が減少する遺伝子を 476 個単離した (図 2)(Alkhatib *et al.*, 2023. *Pathol Res Pract.*)

OSCC 細胞株において siRNA を用いて、YAP をノックダウンしたところ、複数の細胞株にて核の大きさに影響した。

加えて、YAP の機能獲得実験を行うと、EMT (上皮-間葉転換) のマーカーである Vimentin の mRNA またはタンパクレベルで変動した。YAP の阻害剤でも同様の結果を得た。加えて、極性に関する因子にも影響した。

これらの結果から、YAP シグナルの異常活性化が細胞異型の誘導および EMT に関する可能性が示唆された。

図2. OSCC病理組織標本を用いた網羅的遺伝子検索



加えて、申請者が研究期間中に経験した OSCC の亜型である Clear cell squamous cell carcinoma (CCSCC) を用いて、細胞内シグナル伝達経路および DNA メチル化を含めた CCSCC のキャラクタリゼーションを行った。免疫組織化学染色にて検討したところ、Ki67 陽性率は非腫瘍部と比較し増加した OSCC 部よりさらに CCSCC 部では増加した。SCC 部で高発現した p63 のアイソフォームである p40、ARL4C および 5mC の発現が CCSCC 部では減少し、YAP の核局在も減少した (図 3)。一方 DNA メチル化状態を示す 5mC の発現は OSCC 部では非腫瘍部と比べ減少し CCSCC 部ではより減少した。さらに、OSCC 細胞株における機能抑制実験により、p63 の発現が ARL4C の発現に必要であり、核のサイズを調節する可能性が示唆された。また、p63 および YAP/TAZ は協調的に 5mC レベルを制御した。これらの結果から、CCSCC では ARL4C および YAP シグナルを含む細胞内シグナル伝達経路の活性が低下し、加えてエピジェネティックな変化も生じている、未分化な SCC の variant であることが示唆された(Hasegawa *et al.*, 2022. *Pathol Res Pract.*)

以上のように、申請者は病理組織標本および細胞株を用い、OSCC の腫瘍発生および進展機構の解明を分子病理学的に進めている。OSCC のみならず、口腔領域に発生する病変の発生機序の解明にも取り組み、その一部として、唾液腺悪性腫瘍である腺様嚢胞癌腺様嚢胞癌の後発リンパ節転移において、癌遺伝子 Wnt シグナルの不活性化が関与する機構を見出した (Hasegawa (co-first) *et al.*, 2022. *Pathol Res Pract.*)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hasegawa K, Fujii S, Kurppa KJ, Maehara T, Oobu K, Nakamura S, Kiyoshima T	4. 巻 235
2. 論文標題 Clear cell squamous cell carcinoma of the tongue exhibits characteristics as an undifferentiated squamous cell carcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pathol Res Pract.	6. 最初と最後の頁 153909
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.prp.2022.153909	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 該当する
1. 著者名 Fujii S, Fujimoto T, Hasegawa K, Nagano R, Ishibashi T, Kurppa KJ, Mikami Y, Kokura M, Tajiri Y, Kibe T, Wada H, Wada N, Kishida S, Higuchi Y, Kiyoshima T	4. 巻 236
2. 論文標題 The Semaphorin 3A-AKT axis-mediated cell proliferation in salivary gland morphogenesis and adenoid cystic carcinoma pathogenesis.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pathol Res Pract.	6. 最初と最後の頁 153991
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.prp.2022.153991. Epub 2022 Jun 21.	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 該当する
1. 著者名 Nagano R, Fujii S, Hasegawa K, Maeda H, Kiyoshima T	4. 巻 630
2. 論文標題 Wnt signaling promotes tooth germ development through YAP1-TGF- signaling.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 64-70
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2022.09.012	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 Fujii S, Hasegawa K, Maehara T, Kurppa KJ, Heikinheimo K, Kristy A. Warner, Maruyama S, Tajiri Y, Jacques E. Nör , Tanuma J, Kawano S and Kiyoshima T	4. 巻 254
2. 論文標題 Wnt/ -catenin-C-kit axis may play a role in adenoid cystic carcinoma prognostication.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Pathol Res Pract.	6. 最初と最後の頁 155148
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.prp.2024.155148	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 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 長谷川 佳那、藤井 慎介、清島 保
2. 発表標題 口腔癌においてYAPシグナルは異型性および上皮間葉転換を誘導する
3. 学会等名 日本病理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長谷川 佳那、藤井 慎介、清島 保
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌においてp63シグナルはYAPシグナルと協調的に細胞内シグナル およびDNAメチル化を制御する
3. 学会等名 歯科基礎医学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長谷川 佳那、藤井 慎介、清島 保
2. 発表標題 未分化な扁平上皮癌の特徴を有する舌に生じたclear cell squamous cell carcinoma
3. 学会等名 日本臨床口腔病理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長谷川 佳那
2. 発表標題 YAP-PIEZO1シグナルは口腔扁平上皮癌の細胞増殖を促進する
3. 学会等名 歯科基礎医学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長谷川佳那、藤井慎介、清島保
2. 発表標題 YAP signaling induces PIEZO1 to promote oral squamous cell carcinoma cell proliferation
3. 学会等名 Kyudai Oral Bioscience & OBT Research Center 5th Joint International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長谷川佳那、藤井慎介、清島保
2. 発表標題 YAP-PIEZO1シグナルは口腔扁平上皮癌の細胞増殖を促進する
3. 学会等名 歯科基礎医学会
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
研究分担者	清島 保 (Kiyoshima Tamotsu) (20264054)	九州大学・歯学研究院・教授 (17102)	
研究分担者	藤井 慎介 (Fujii Shinsuke) (60452786)	九州大学・歯学研究院・講師 (17102)	
研究分担者	和田 裕子 (Wada Hiroko) (70380706)	九州大学・歯学研究院・助教 (17102)	

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
---------	---------