

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670877

研究課題名(和文) 口腔がんにおけるドライバーがん遺伝子の検索と新規分子標的治療法の開発

研究課題名(英文) Exploration of a driver oncogene in oral cancer cells

## 研究代表者

藤井 万紀子 (Fujii, Makiko)

広島大学・医歯薬保健学研究院(歯)・教授

研究者番号：70406031

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：以前研究を行った悪性中皮腫で、増殖に強い影響を与えていたCTGFを口腔扁平上皮癌細胞株でノックダウンしても強い増殖抑制は起こらなかった。従って、口腔扁平上皮癌ではこの経路はそれほど重要ではなく、癌化の原因遺伝子にはなりにくいと推察された。癌細胞は由来組織により、がんを引き起こす遺伝子変異が様々なので、Hippo-YAPを中心とするシグナル伝達経路は悪性中皮腫の増殖で非常に重要な働きをするが口腔扁平上皮癌のような上皮由来がんより、肉腫由来癌において重要な経路であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Based on our previous findings in malignant mesothelioma cells, we have examined the role of CTGF in other cancer cell lines including squamous cell carcinoma and osteosarcoma. Expression of CTGF was detected mainly in osteosarcoma cells, but not in squamous cell carcinomas. Knockdown of CTGF suppressed the growth of only in osteosarcoma cells, suggesting that CTGF plays a critical role in the growth of osteosarcoma cells, but not in squamous cell carcinomas. These data suggested that Hippo-YAP-CTGF pathway plays an important role in the growth of malignant tumor originated from non-epithelial cells.

研究分野：口腔がん

キーワード：口腔扁平上皮癌 Hippoシグナル YAP

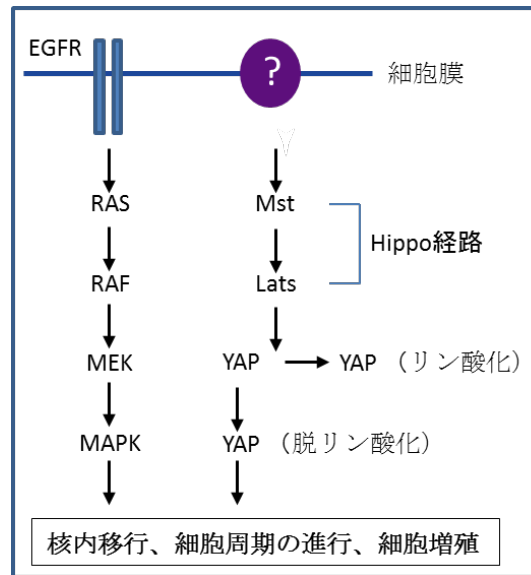
### 1. 研究開始当初の背景

ドライバーがん遺伝子とは、がんにおけるゲノム変異のうち、直接がんの進展を導くものである。がんは診断時には既に数十以上の遺伝子変異を持つことが多いが、一部のドライバーがん遺伝子を除いて、そのほとんどは直接増殖上の優位性には関与していないパッセンジャー遺伝子である。つまり、ゲノムの不安定性というがん細胞の重要な特徴の一つから引き起こされるものであり、ドライバーがん遺伝子変異に伴い細胞内で偶然生じたもので直接がんの発生、増殖や進展には寄与しない。従って、どの変異がドライバーがん遺伝子変異であるかを判定することは極めて重要であり、ゲノム解析と遺伝子異常の機能解析を平行で行うことが分子口腔がんの治療は、主に手術療法、放射線療法、化学療法の三者併用によって行われているが、いずれの療法も生体機能に対する侵襲が甚大で治療の副作用も強い。術後の機能的または審美的変化を鑑みると、口腔がんは分子標的治療法の開発が急務と位置づけられるがんの一つである。標的治療薬の早期の開発には必須である。また Hippo シグナル経路に制御されている Yes-associated protein (YAP) に関して、恒常活性化型を皮膚上皮で発現させるとマウスで、扁平上皮癌が形成されることが報告されており(Schlegelmilche K. et al. Cell 2011)、YAP が口腔扁平上皮癌でドライバーがん遺伝子として働く可能性が示唆されている。

### 2. 研究の目的

近年の急速に進歩しているがんゲノム解析により、遺伝子変異の中でも増殖進展を推進するドライバーがん遺伝子が注目されている。がん発生に重要な遺伝子変異やシグナル伝達の異常は臓器や組織、細胞により異なっており、それぞれの癌腫のドライバー遺伝子をターゲットとした創薬を開発することが分子標的治療薬の奏効率に大きく影響を与えると考えられる。本研究では、口腔扁平上皮癌細胞に固

有のドライバーがん遺伝子を検索し、機能解析をすることで分子標的治療のターゲットを絞



っていく、これらの結果から口腔扁平上皮癌に対する新たな治療剤の開発に繋げ、分子標的治療薬を基盤とした新たな新規治療法の開発を目的とする。

がんは、発生臓器や組織、細胞種によってそれぞれ異なるがん化の経緯を辿ることが明らかになってきた。口腔扁平上皮癌では EGFR の変異の他、P16 遺伝子の不活性化、p53 遺伝子の変異などが高頻度に認められる遺伝子変異として報告されている。

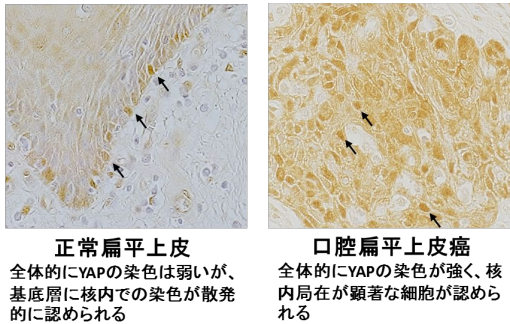
がんの発生については従来多段階発がん説が有力であったが、最近では遺伝子変異単独で発がんを直接強力に推し進めるドライバーがん遺伝子の存在が明らかとなってきた。EGFR 変異は、肺腺癌ではドライバーがん遺伝子の一つに数えられ、シグナル下流の KRAS、MEK と共に強力ながん促進作用を持つ。分子標的治療の開発を成功させるためには、このドライバーがん遺伝子の働きを阻害する薬を開発することが重要である。

### 3. 研究の方法

口腔扁平上皮癌の遺伝子異常の検索を comparative genomic hybridization (CGH) アレイや発現アレイを用いて検索すると同時に、口腔扁平上皮癌においてドライバーが

ん遺伝子変異を持つ可能性のある Hippo シグナル系の遺伝子である YAP (Yes-Associated Protein) を中心とした遺伝子変異解析や機能解析を行う。また、口腔扁平上皮癌における YAP の発現や活性化をたんぱく質レベルで解析するため、患

図3・ 口腔扁平上皮癌組織でのYAPの発現と局在



者由来の組織切片を染色し、YAP たんぱく質の局在、発現の強度、YAP のターゲットである CTGF(Connctive Tissue Growth Factor)の発現も併せて検討を行った。

#### 4 . 研究成果

口腔扁平上皮癌での YAP の遺伝子変異は 10細胞株で見つからなかった。YAPの活性化を上流で制御している NF2 (Neurofibromatosis 2)の遺伝子変異も見つからなかった。また、以前研究を行った悪性中皮腫で、増殖に強い影響を与えていた CTGF をノックダウンしてもさほどおおきな増殖抑制は起こらなかった。従って、口腔扁平上皮癌ではこの経路はさほど重要ではなく、癌化の原因遺伝子にはなりにくいと推察された。しかしながら、Hippo シグナル経路に制御されている Yes-associated protein (YAP) に関して、恒常活性化型を皮膚上皮で発現させるとマウスで、扁平上皮癌が形成されることが報告されており(Schlegelmilche K. et al. Cell 2011)、YAP に特定の遺伝子変異が入ったときには、癌化につながる可能性があると考えられた。YAP は活性化されると、核内に発現が認められるが、組織染色において約10%程度に核内染色が認められた。必ずしも口腔扁平上皮癌に必須の現象とは言えないとの結論を得た。

一方、骨肉腫細胞などでは、YAP の発現レベルが高いものが多く、また CTGF のノックダウンにより、細胞増殖は著しく低下する。癌細胞は由来組織により、がんを引き起こす遺伝子変異が様々なので、この経路は悪性中皮腫の増殖で非常に重要な働きをするが口腔扁平上皮癌のような上皮由来がんより、肉腫由来癌において重要な経路であることが示唆された。

YAP と TGF- 双方によって転写制御される遺伝子が CTGF (Connective Tissue Growth Factor)であるが、この CTGF のプロモーター領域を調べた結果、TGF- のシグナル伝達因子 Smad2/3 の DNA 結合サイトと TEAD 結合サイトが隣合わせに存在し、CTGF の発現を TGF- 刺激と YAP が協調的に促進することがわかった。更に悪性中皮腫の増殖では、CTGF が重要な役割を果たすことを見出した。

この CTGF タンパク質の発現は多種多様ながん細胞に認められる。悪性中皮腫では、悪性度と細胞内の CTGF の発現量に相関が認められた。またこの CTGF の発現を ShRNA でノックダウンすると、in vitro, in vivo 双方において、悪性中皮腫細胞の増殖が抑制されるが骨肉腫細胞においても siRNA で CTGF の発現を抑制すると、細胞増殖は抑制された。CTGF の発現が細胞増殖に重要な役割を担っていると推察された。

CTGF 自体は、細胞外に放出されることはよく知られており、実際に口腔癌に過剰発現させると、Eliza によって CTGF は検出される。ところが、N末端側にあるシグナルペプチドを削ると、Eliza による検出は不可能になり、おそらくこのペプチドがCTGFの細胞外放出に必要であると考えられる。オートクライン機能を調べる為に、シグナルペプチドを削ったCTGFと、削っていないものをそれぞれ過剰発現させ、細胞中の遺伝子変化に影響があるかどうかを検

討した。その結果、シグナルペプチドを削った CTGF と、削っていないもので共通の遺伝子発現の増強が認められた。現在それらの遺伝子の中でいくつか癌の増殖に関わる遺伝子の変化を確認している。

1990 年に発見され、骨代謝やがん増殖における役割が CTGF の受容体がまだ発見されておらず、その細胞外での昨日や動態が不明であるということ、口腔癌の中でも特に予後の悪い肉腫において、細胞内に強い染色が認められることから、細胞内で何らかの形で増殖シグナル系に関わっているのではないかと考えて研究を行っている。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

1. Tanaka I, Osada H, Fujii M, Fukatsu A, Hida T, Horio Y, Kondo Y, Sato A, Hasegawa Y, Tsujimura T, Sekido Y. A LIM-domain protein AJUBA suppresses malignant mesothelioma cell proliferation via Hippo signaling cascade. *Oncogene*. 34:73-83 (2015) 査読有

[学会発表](計 1 件)

1. Fujii M, Osada T, Sekido Y CTGF plays an important role in the growth of malignant tumor originated from non-epithelial cells. The 74th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. October 9, 2015, Nagoya

[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]

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

藤井 万紀子(MAKIKO FUJII)

研究者番号: 70406031

広島大学・医歯薬保健学研究院(歯)・教授

(2)研究分担者

( )

研究者番号:

(3)連携研究者

( )

研究者番号: