

【要約】

YAP expression maintains putative cancer stemness
and
is associated with poor prognosis in intrahepatic cholangiocarcinoma

(肝内胆管癌における YAP 発現は、癌幹細胞形質を維持し、予後と関連する)

千葉大学大学院医学薬学府

先端医学薬学専攻

(主任：大塚将之教授)

杉浦 謙典

【背景】 肝内胆管癌 (ICC) は原発性肝臓癌の中で2番目に多い腫瘍である。

外科切除が治療戦略の第一選択となっているが、ICC は発見時に進行した状態であることが多く、根治切除が得られたのは 15% であると報告がある。また、ほとんどの ICC は化学療法に抵抗性を示すことから、腫瘍進展のメカニズムを解明し新たな治療のターゲットを発見する必要がある。

Hippo pathway は細胞密度の変化に応じて、器官の大きさを制御する signal pathway の1つである。Yes-associated protein (YAP) は Hippo pathway の下流にある重要な Factor であり、正常細胞においては増殖や分化、幹細胞の維持に働いているとされている。YAP は核内に移行し TEAD と結合して、細胞の増殖や分化を誘導する。また、YAP がリン酸化されると核内移行が出来ず細胞質にとどまり、14-3-3 蛋白と結合し、分解される。

近年、YAP はさまざまな腫瘍における関与が示されている。YAP の高発現は様々な癌腫において Angiogenesis, invasion, 上皮-間葉系移行 (EMT) に関連しているとされている。また、YAP は癌幹細胞様形質を維持し、化学療法抵抗性に関与していると報告もあるが、ICC における YAP の関与に対する報告は少なく、特に幹細胞様形質への関与は明らかにされていない。

【目的】 ICC の YAP 発現を調べ、特に、上皮・間葉系移行 (EMT) や Cancer stem cell-like property との関連を明らかにすることを目的とした。

【方法】 2004 年から 2016 年に当教室で初回手術を施行した ICC 52 症例について、免疫組織学的染色にて YAP 発現を評価し、臨床病理学的因子や予後との関連を検討した。次に、EMT や stemness マーカーの免疫組織学的染色を行い、YAP 発現との関連を評価した。

続いて、in vitro 実験で、YAP 特異的 siRNA や YAP inhibitor (verteporfin) を用いて、YAP 発現のある ICC 細胞株、HuCCT1 と TKKK の 2 種類を用いて YAP 発現抑制した場合での EMT や stemness マーカー発現との関連を western blot で評

価した。

さらに、癌幹細胞様機能解析として YAP 特異的 siRNA や Verteporfin を用いて、YAP 発現のある ICC 細胞株 2 種類で、YAP 発現抑制した場合の sphere formation assay、anoikis assay を行った。

今後の臨床応用を考慮し、Verteporfin の殺細胞効果や、他の signal pathway への作用、さらには Verteporfin と他薬剤との組み合わせによる上乗せ効果を評価した。

【結果】 IHC では ICC 52 例中 37 例(71.2%)に YAP 高発現を認めた。YAP 高発現群では低発現群に比べ、有意に腫瘍体積が大きく ($P=0.02$)、予後不良であった ($P=0.023$)。

さらに YAP 発現は、上皮系マーカーである E-cadherin 発現と負の相関 ($P=0.008$) を、間葉系マーカーである vimentin ($P=0.034$)、Stemness マーカーである OV-6 ($P<0.001$) 発現と正の相関を認めた。

in vitro の実験では YAP 発現を Si RNA を用いて knockdown させると、vimentin と OV-6 の発現も低下した。Verteporfin を用いて YAP 発現を抑制させた場合も同様に Vimentin と OV-6 の発現も低下した。

癌幹細胞機能解析として行った sphere formation assay、anoikis assay では Si RNA や Verteporfin によって YAP 発現を減少させると癌幹細胞様特性、および anoikis 耐性能の減弱を認めた。

また Verteporfin は、YAP/Hippo pathway は抑制するが、YAP の高発現細胞株である HuCCT-1 においては Akt/mTOR signal pathway の活性化を誘導することがわかった。さらに、YAP 発現のほとんどみられない細胞株 HuH-28 において Verteporfin 投与によって、IL-6/STAT3 signal pathway が抑制されることが明らかとなった。

Cytotoxicity assay において Verteporfin と mTOR inhibitor である rapamycin との combination では、それぞれ単独投与群より有意に細胞増殖を阻害し、上乗せ効果がみられた。

【考察】YAP は ICC 細胞株において癌幹細胞形質維持や Anoikis 抵抗性の獲得に関与していた。また、Verteporfin と Rapamycin のコンビネーション投与は ICC 細胞株に対して殺細胞効果の上乗せがみられた。

YAP の発現を Si RNA や Verteporfin を用いて Knockdown や抑制すると YAP の高発現細胞株において Akt/mTOR pathway が活性化されていることを示した。これは、細胞内の Hippo/YAP pathway が抑えられたことによって、他の signal pathway を介した補完的な feed back 機構が働いたことによるものが考えられた。さらには、YAP 発現のない細胞株においても Verteporfin の投与により IL-6/STAT3 signal pathway が抑制されたことから、Verteporfin は YAP 発現の有無にかかわらず ICC の増殖能を抑制させることが明らかとなった。

【結論】 ICC では YAP 高発現は癌幹細胞様形質を維持し、予後不良に関連していた。YAP inhibitor である Verteporfin は ICC に対し、単独投与および mTOR inhibitor との combination により高い殺細胞効果を示し、ICC 治療として有用である可能性が示唆された。