

# 卵巣明細胞癌におけるHippo経路を介したHDAC6阻害剤の有効性

Efficacy of HDAC6 inhibitors via Hippo pathway in ovarian clear cell carcinoma

大分大学医学部 産科婦人科学講座 助教 矢野 光剛

## 要 約

卵巣明細胞癌では、他の上皮性卵巣癌と比較して、化学療法抵抗性であるにもかかわらず有望な治療標的が確立されていない。過去の報告では、Histone deacetylase 6 (HDAC6) がHippo pathway を介してYes associated protein (YAP) を制御していることが示されている。これまで卵巣明細胞癌と組織学的に類似した腎明細胞癌においてHippo pathway の抑制が腫瘍悪性化に関与していることを報告した。しかし卵巣明細胞癌におけるHippo pathway の役割とHDAC6との関係は未だ不明である。本研究では、卵巣明細胞癌におけるこれらの分子の役割を明らかにすることを目的とした。171症例の卵巣明細胞癌について、YAP、HDAC6、Connective tissue growth factor (CTGF) の免疫組織化学的解析を行い、各分子の発現パターンの相関関係や、予後相関を検討した。免疫組織化学的にYAP、HDAC6、CTGFは核または細胞質で陽性となる症例が多く認められた。YAPの細胞質での発現とHDAC6の発現には有意な正の相関がみられた。予後との相関は検討中である。AT-rich interactive domain-containing protein 1A (ARID1A) 変異株2種類とARID1A野生型1種類の卵巣明細胞癌株において、YAPの遺伝子導入とノックダウンを行い、細胞増殖や遺伝子発現を解析した。YAPの遺伝子導入により増殖能が有意に増加し、YAPのターゲット分子の発現が増加したが、YAPをノックダウンすると増殖が有意に低下し、増殖能が減少した。ただし、細胞株によって違いが見られた。これらのことから、YAPは、一部の卵巣明細胞癌において治療標的となる可能性が示唆された。

## 緒 言

卵巣癌は組織型によって臨床病理学的特徴が大きく異なるが、組織型に応じた治療法の確立には至っていない。特に卵巣明細胞癌について化学療法抵抗性と予後不良に寄与する分子、治療標的については、まだ不明な点が多い。Histone deacetylase 6 (以下HDAC6と略す) について2017年にAT-rich interactive domain-containing protein 1A (以下ARID1Aと略す) のlossによってHDAC6が亢進することが報告された (Bitler BG, Nat Cell Biol, 2017)。同研究チームからはHDAC6阻害剤とPD-L1抗体の相乗効果も報告された (Fukumoto T, Cancer Res, 2019)。我々はHDAC6が卵巣明細胞癌で高発現し、卵巣明細胞癌のドライバー遺伝子であるARID1Aのloss群において予後不良であることを報告した<sup>1,3</sup>。

共同研究者の松浦らは卵巣明細胞癌と形態学的に類似性のある腎淡明細胞癌において、Hippo pathway の抑制が腫瘍増悪を促すことを見出した<sup>4</sup>。

Hippo pathway は、発見から20年しか経過していない比較的新しい細胞内情報伝達経路であり、図1に示すように、ONの状態ではターゲット分子であるYAP/TAZの核移行を阻害しているが、がん等ではOFFとなり、YAP/TAZが核に移行して転写促進因子として働き、細胞増殖の促進やアポトーシスの抑制に働くことが知られている。しかし卵巣明細胞癌研究はごく限られている。2011年にZhang Xらは、卵巣癌についてHippo pathway の中心分子であるYAPの発現が特に卵巣明細胞癌において予後不良と相関し、化学療法抵抗性と関わる可能性を報告した (Zhang X, Oncogene, 2011)。しかし、卵巣癌268例に対して明細胞癌は25例しか含まれていない。本邦では名古屋大学の研究チームからchrXq27.3領域にあるmicroRNAがYAPを介して卵巣明細胞癌のシスプラチン抵抗性に関与すると報告している (Yoshida K, Oncogene, 2021)。

またARID1AがHippo pathway のターゲット分子

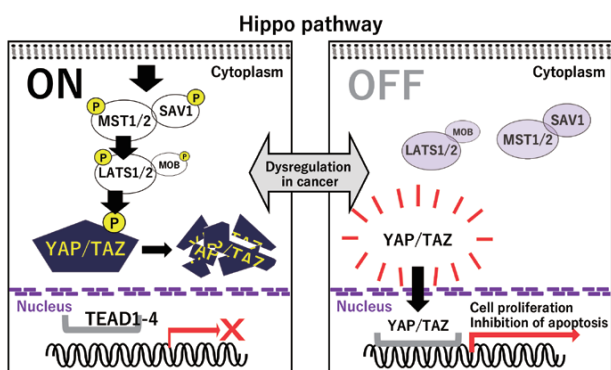


図1. Hippo pathwayによるYAP調節メカニズム  
リン酸化されたHippo pathway構成分子 (MST1/2, SAV1, LATS1/2, MOB) は、YAP/TAZをリン酸化し、細胞質でこれを壊しYAP/TAZの核移行を阻害する。(Hippo pathway "ON")  
一方、Hippo pathway構成分子がリン酸化されていない状況下では、YAP/TAZはリン酸化されることなく核移行し、細胞増殖やアポトーシス抑制などに関与する。(Hippo pathway "OFF")  
正常な細胞では、Hippo pathwayが適切に機能しているが、一部の異常な細胞ではHippo pathwayの活性が異常になり、腫瘍細胞の生存に寄与することがある。

Yes-associated protein (以下 YAP と略す) / Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif (以下 TAZ と略す) (YAP/TAZ) と複合体を形成してその機能を阻害し、ARID1A loss は YAP/TAZ 活性亢進や Hippo pathway を抑制することが報告された<sup>5</sup>。ARID1A loss はまた HDAC6 の発現を促進し (Bitler BG, Nat Cell Biol, 2017)、HDAC6 は Hippo pathway 抑制と腫瘍増殖を促す。これらの知見から ARID1A をバイオマーカーとして、卵巣明細胞癌に対して HDAC6 阻害剤が Hippo pathway を介した有望な治療標的となりうると考えた。そこで、本研究では YAP およびそのターゲット分子の発現と卵巣明細胞癌の予後を含む臨床病理学的所見との相関、さらに HDAC6 との関係性を明らかにし、YAP が卵巣明細胞癌の増悪に関係しているか、HDAC6 阻害剤は Hippo pathway を介して卵巣明細胞癌の治療に効果があるかを検討することを目的とした。

## 方法

### 1. 卵巣明細胞癌の臨床検体を使用した免疫染色

共同研究者の所属期間である埼玉医科大学国際医療センターにて卵巣明細胞癌と診断された患者の手術摘出標本 (ホルマリン固定パラフィンブロック) を用いた。同施設の IRB 承認 (承認番号 16-257) を得て研究を行った。

卵巣明細胞癌と診断された 170 例について tissue microarray による組織が集約されている。それに対して HDAC6 や YAP の関連分子 (YAP、HDAC6、

Connective tissue growth factor (以下 CTGF と略す)) の免疫染色を行い、その結果を 0、1、2、3 にスコアリングした。スコアリング結果をもとに発現の相関、臨床病理学的所見、予後との相関を解析した。特に核内発現と細胞質内発現の差異に着目して解析を行った。

### 2. 卵巣明細胞癌細胞株における Hippo pathway 関連分子の発現と細胞増殖能

- 卵巣明細胞癌の細胞株である OVISe、OVTOKO、HAC2 を培養した。前者 2 種類は ARID1A 変異型、後者 1 種類は ARID1A 野生型である。
- それぞれの細胞株に YAP cDNA 発現ベクターを電気穿孔法 (Electroporation) を用いて遺伝子導入した。また、YAP siRNA を Lipofectamine<sup>TM</sup> RNAiMAX (Invitrogen) を用いて導入し、YAP をノックダウンした。
- 遺伝子導入や siRNA 処理を行った細胞を回収し、RNA やタンパク質を抽出した。その後 qRT-PCR 法により、YAP、CTGF の mRNA の発現量を LightCycler<sup>®</sup> 480 System (Roche) で測定した。また、比色分析である CellTiter 96<sup>®</sup> Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay を用いて吸光度を測定し、細胞の増殖の変化を解析した

## 結果

### 1. 免疫染色

Hippo pathway のターゲット分子である YAP の免疫染色を行い、YAP が核あるいは細胞質に強陽性を示す発現パターンがあることを見出した (図 2)。核で強陽性 (スコアが 2 あるいは 3) を示した症例は約半数近くを占めた。細胞質ではおよそ 40% が強陽性であった。

HDAC6 の免疫組織化学では核、細胞質にそれぞれおよそ 20% の症例で強陽性を示した。CTGF の免疫組織化学では、約半数以上で強陽性を示した。YAP、HDAC6、CTGF の免疫組織化学の結果をスコアリングし、YAP 核陽性、YAP 細胞質陽性、HDAC6 陽性、CTGF 陽性それぞれに相関があるか、また

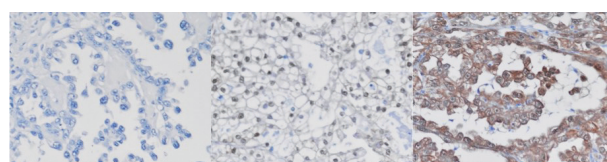


図2. YAPの免疫染色  
左、陰性；中、核中心に陽性；細胞質中心に陽性

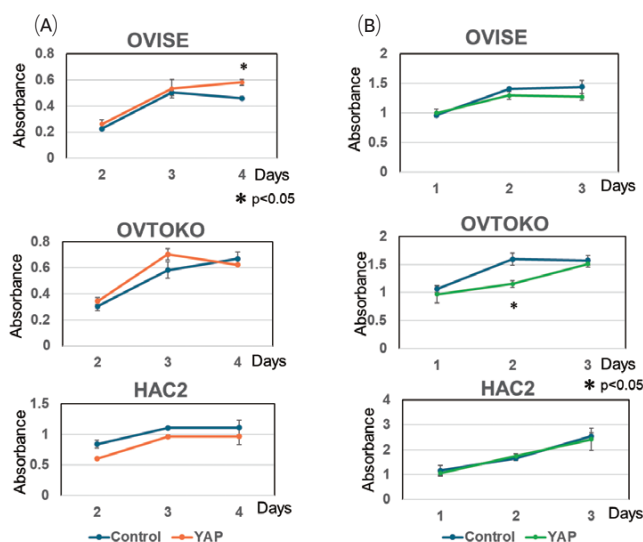


図3. 細胞増殖実験

細胞増殖への影響を3種類の細胞で調べた。それぞれコントロールと比較した。OVISE, OVTOKOで細胞増殖がコントロールと比較して有意差が得られた。

(A) YAP overexpression, (B) YAP siRNA

各々の強発現と予後について解析した。その結果、YAP核陽性例とHDAC6陽性例については相関が無かったのに対し、YAP細胞質陽性ではHDAC6陽性と有意な正の相関が見られた。また、CTGFはいずれの発現パターンとも相関は見られなかった。YAPの核での陽性、YAPの細胞質での陽性、HDAC6陽性、CTGF陽性をそれぞれ示す症例と、症例の全生存期間あるいは無増悪生存期間との相関については現在解析中である。

2. 細胞株の増殖の変化を観察したところ、YAPを導入した細胞のうちOVISEでは増殖の亢進がみられたが、HAC2はコントロールとの有意な差が無かった(図3A)。YAP siRNAによるノックダウンではOVISEにおいてやや増殖抑制がみられた。OVTOKOではコントロールと比較して有意差がみられ、YAPのノックダウンにより増殖が抑制されていると推測された(図3B)。

次に、RT-PCR法でYAPターゲット遺伝子CTGFの発現量を比較した。OVISEはYAPの遺伝子導入によりCTGFのmRNAは増加し、OVTOKO, HAC2ではYAPノックダウンで低下していた。(図4)。

## 考察

卵巣明細胞癌は予後不良で化学療法抵抗性であり、欧米に比して本邦で頻度が高いため、本邦から

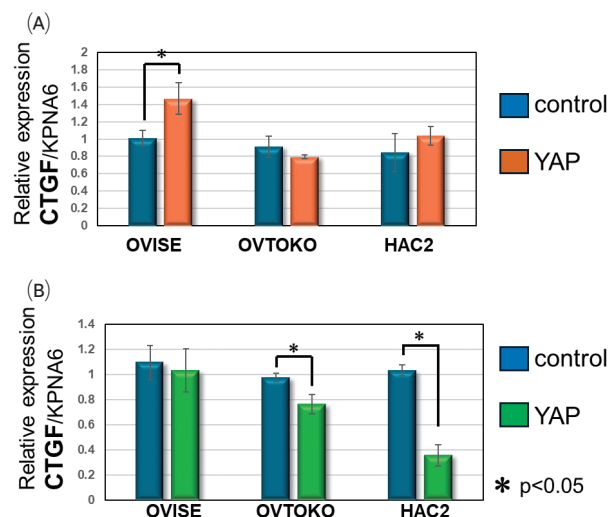


図4. RT-PCRによるCTGFのmRNA発現量の解析

YAPのターゲット分子であるCTGFのmRNA発現量をRT-PCRで解析した。3種類の細胞にYAP overexpressionあるいはsiRNAの導入により、発現量への影響を調べたところ、overexpressionではOVISEが、ノックダウンではOVTOKO, HAC2でそれぞれ発現量が有意にコントロールと比較して変化した。内因性コントロールKPNA6との相対比で示した。(A) YAP overexpression, (B) YAP siRNA

のエビデンス発信が望まれているが、Hippo pathwayの分野では国内は名古屋大学からの1編しか発信できておらず、国外からの研究も先に挙げたように5編にも満たない。HDAC6とARID1A研究も同様に国内では我々の研究チーム以外からの発信はほとんどなく、国外からも5編にも満たない。さらにHDAC6阻害剤とHippo pathway、YAPの関わりについての研究は国内外ともにいまだ報告がない。

本研究テーマについて卵巣明細胞癌170例の免疫染色を行っており、前述したZhang Xら報告の症例数が少ない(25例)という問題を解決することができた。興味深いことにYAPの発現は症例ごとに核内、細胞質内、腫瘍周囲間質と局在が異なることを見出しており、YAPのリン酸化や活性化状態に起因すると推察している。実際、我々が行った免疫組織化学では、HDAC6陽性例において、YAP核陽性とは相関が無かったのに対し、YAP細胞質陽性とは有意な相関が見られた。この結果より、HDAC6はYAPの局在およびその機能に影響を及ぼしており、HDAC6の発現調節によりYAPの発現を制御できる可能性が示唆される。既報ではHDAC6はHippo pathway構成分子を脱アセチル化することにより、Hippo pathway構成分子を不活性化させ、YAPの核への移行を促進するという報告があった(Kim YS, Pharmaceuticals, 2022)。しかし今回の我々の解析では、HDAC6の発現とYAPの核での発現に相関関係はなく、YAPの

発現調節に既報とは異なるメカニズムが関与しており、卵巣明細胞癌においては全てではないが一部の症例でHDAC6 inhibitorによってYAPの核への移行が抑制できる可能性が示唆された。さらにYAPのターゲット分子であるCTGFの強陽性症例とYAPの発現との相関関係は免疫組織学的には見出されなかったが、細胞株の実験からCTGFは卵巣明細胞癌において腫瘍生存に寄与している可能性がある。HDAC6、YAP、CTGFの発現と卵巣明細胞癌症例の予後について、予後予測因子となりうるかどうか検討中である。

細胞株の種類によるYAPの増殖への影響は異なっていたが、ターゲット遺伝子への影響は共通していた。また今回、3つの細胞はそれぞれ40歳、78歳、年齢不詳の女性から採取された別の細胞であり、Tissue microarrayにおいてもYAP免疫染色で核が染まっていない症例もあり、細胞による結果の違いに繋がっていると推測される。

現時点で行っている免疫組織化学の結果からはHDAC6 inhibitorによるYAP発現調節は、症例によってはYAP活性化を抑制できる可能性があり、一方で卵巣明細胞癌の細胞株を用いた実験結果からは、YAPを抑制することで増殖が抑えられる症例があることがわかった。また、YAPのターゲット分子

の一つであるCTGFは、免疫組織化学、細胞実験いずれの結果からYAPによって制御される症例とそうでない症例に分けられることがわかった。

上記より、本研究の結果より卵巣明細胞癌においてHDAC6 inhibitorを用いてYAP活性を抑制し、細胞増殖を抑制できる症例がある可能性が示唆された。今後、HDAC inhibitorを用いた細胞実験や予後解析をすることにより、検証を続けていきたい。

#### 参考文献

1. Yano M, Yasuda M, Sakaki M et al. Association of histone deacetylase expression with histology and prognosis of ovarian cancer. *Oncol Lett.* 2018;15(3): 3524–3531.
2. Yano M, Yasuda M, Sakaki M et al. Up-regulation of HDAC6 results in poor prognosis and chemoresistance in patients with advanced ovarian high-grade serous carcinoma. *Anticancer Res.* 2021;41(3):1647-1654.
3. Yano M, Katoh T, Miyazawa M et al. Clinicopathological correlation of ARID1A status with HDAC6 and its related factors in ovarian clear cell carcinoma. *Sci Rep.* 2019;9(1):2397.
4. Kai T, Tsukamoto Y, Hijiya N et al. Kidney-specific knockout of Sav1 in the mouse promotes hyperproliferation of renal tubular epithelium through suppression of the Hippo pathway. *J Pathol.* 2016;239(1):97-108.
5. Chang L, Azzolin L, Biagio DD et al. The SWI/SNF complex is a mechanoregulated inhibitor of YAP and TAZ. *Nature* 2018, 563, 265–269.

#### Abstract

Ovarian clear cell carcinoma (OCCC) is more resistant to chemotherapy than other epithelial ovarian cancers; however, no therapeutic targets have been identified to date. Histone deacetylase 6 (HDAC6) has been found to regulate Yes-associated protein (YAP) via the Hippo pathway. We previously reported that suppression of the Hippo pathway is involved in tumor progression in renal clear cell carcinoma, which is histologically similar to OCCC. However, the specific role of the Hippo pathway and its relationship with HDAC6 in OCCC remain unclear. Therefore, in this study, we investigated the roles of the Hippo pathway and HDAC6 in OCCC.

We performed immunohistochemical analyses for YAP, HDAC6, and connective tissue growth factor (CTGF) in 171 OCCC samples to determine the correlation between their expression patterns and disease prognosis. Immunohistochemically, YAP, HDAC6, and CTGF were detected in the nucleus or cytoplasm, with a significant positive correlation between the cytoplasmic expression levels of YAP and HDAC6. The correlation between these molecules and the disease prognosis is currently being investigated.

YAP overexpression and knockdown tests were performed using two AT-rich interaction domain 1A (ARID1A) mutant and one ARID1A wild-type OCCC cell line, and cell proliferation was evaluated. Cell proliferation was significantly increased by YAP overexpression but significantly decreased by YAP knockdown in a cell context-dependent manner.

Overall, these findings suggest YAP as a potential therapeutic target for OCCC.