

口腔扁平上皮癌の発生と進展における

YAPと△Np63の役割

小野 早和子

(平成29年12月14日受付)

Role of YAP and \triangle Np63 in carcinogenesis and progression
of oral squamous cell carcinoma

Sawako Ono

岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科

社会環境生命科学専攻 総合社会医科学講座

総合歯科学分野

(指導:鳥井 康弘 教授)

緒 言

近年, Hippo 経路は臓器の発生や細胞数および大きさの制御, がんの生物学に重要な役割を担うシグナル伝達系として注目を集めており¹⁾, その中心的役割を担うのが転写共役因子の YAP (Yes-Associated Protein) である。

肝癌, 食道癌, 卵巣癌, 胃癌など多くのヒト悪性腫瘍で Hippo 経路の機能不全による YAP の過剰発現が報告され, YAP は oncogene として機能すると考えられている²⁾⁻⁶⁾。また口腔癌の約 90% を占める口腔扁平上皮癌(Oral Squamous Cell Carcinoma: OSCC)においても, YAP と発癌との関連が示唆されている^{7), 8)}。一方, OSCC では癌抑制遺伝子である p53 遺伝子の突然変異が癌の進展に密接に関連しており⁹⁾, p53 ファミリーである p63 は頭頸部扁平上皮癌で YAP の発現を誘導すると報告されている¹⁰⁾。p63 の主要なアイソフォームである \triangle Np63 は食道, 喉頭の扁平上皮癌で過剰発現が報告され, 癌への関与が示唆されている¹¹⁾⁻¹³⁾。近年, \triangle Np63 は扁平上皮癌では YAP の発現に関与し, YAP が oncogene として機能するために必要な因子であると報告されている¹⁴⁾。しかし, OSCC におけるヒト生体内での YAP と \triangle Np63 両者に着目した研究はほとんどみられない。

口腔扁平上皮は遺伝子変異の蓄積による多段階発癌を示し, 正常口腔扁平上皮, 口腔上皮性異形成, 上皮内癌(carcinoma in situ: CIS)という過程を経て

癌へ移行すると考えられている¹⁵⁾。よって本研究では、YAP、△Np63 の口腔扁平上皮の癌化過程と OSCC での役割を解明することを目的に、正常口腔粘膜、口腔上皮性異形成、CIS、OSCC を用いて、OSCC の癌化過程における YAP と△Np63 の発現を検討した。

材料と方法

1. 材料

組織材料

本研究では岡山大学病院病理部口腔病理部門で取り扱った、WHO頭頸部腫瘍分類に準じた組織像を呈するOSCC 80例（高分化型 30例、中分化型 30例、低分化型 20例）、上皮内癌 50例、口腔上皮性異形成 100例（低異型度上皮性異形成 50例、高異型度上皮性異形成 50例）、上皮過形成 20例、正常口腔粘膜上皮 20例を用いた。岡山大学病院の病院指針に基づき、充分なインフォームドコンセントを得た後に診断および治療のために切除された検体の一部を使用した。なお、本研究は岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 倫理委員会の承認を受けた（承認番号 研1608-018）。

2. 組織学的検討

切除後の検体は10%中性緩衝ホルマリンにて固定した。常法に従って Histoprep (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, JAPAN) でパラフィン包埋し、ミノ一型ミクロトーム (HM-325, YAMATO KOHKI INDUSTRIAL Co., Ltd., Saitama, Japan) を用いて厚さ約4μmの連続切片を作製、シランコーティング加工されたスライドグラス (MICRO SLIDE GLASS SUPERFROST S9443, Matsunami Glass Ind., OSAKA, Japan) 上にマウントした。作製した切片に対してヘマトキシリン・エオジン染色、免疫組織化学的染色を行い、組織学的検討を行った。

(1) ヘマトキシリン・エオジン染色

作製したパラフィン切片をキシレンで脱パラフィンし、下降アルコールで水和後、常法に従いヘマトキシリン・エオジン染色を行った。上昇アルコールおよびキシレンにて脱水、透徹を行った後、Entellan® new (Merck Darmstadt, Germany) にて封入し、組織学的検討を行った。

(2) 免疫組織化学的染色

作製したパラフィン切片に対し、間接酵素抗体法を用いて免疫染色を行った。一次抗体には抗ヒトYAP抗体 (#867711, R&D systems, Minneapolis, USA), 抗ヒトNp63抗体 (ZR8, BIOLOGO, Kronshagen, Germany) を使用した。使用した一

次抗体の詳細を表1に示す。切片は脱パラフィン後に0.3%過酸化水素メタノールを室温で30分間反応させ内因性ペルオキシダーゼを失活させ、続いて加圧熱処理による抗原の賦活化処理を行った。組織切片におけるYAPの賦活化には、0.01 Mクエン酸緩衝液 (pH6.0) を用い、 \triangle Np63の賦活化には0.01 Mクエン酸緩衝液 (pH9.0) を用い、ともに15分間圧力釜による加圧熱処理を行った。抗原賦活化処理の後、一次抗体を4°C、16時間反応させた。抗ヒトYAP抗体の検出にはVectastain Elite ABC kit (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA), 抗ヒト \triangle Np63抗体はHistofine, Simple Stain MAX-PO(MULTI) (NICHIREI BIOSCIENCE INC., Tokyo, Japan)によって一次抗体の検出操作を行った。発色は0.01% 3, 3' -ジアミノベンチジン含有0.05M Tris-HCl buffer, pH7.6で行った。対比染色はマイヤーへマトキシリン染色液 (Merck Darmstadt, Germany) で行った。陰性対照は一次抗体を用いずに二次抗体のみ反応させ、全て陰性を確認した。

(3) YAP発現の免疫組織化学的評価

各症例におけるYAPの発現について、YAPの免疫組織化学的染色の染色状態により評価した。YAPの評価は、免疫組織化学的染色後の切片を光学顕微鏡(OLYMPUS DP27, Tokyo, Japan)で検鏡し、Hong Xiaoらの評価方法¹⁶⁾に準じ

て行った（図1）。すなわち、口腔扁平上皮の基底細胞または傍基底細胞に限局した染色をScore 0、口腔扁平上皮細胞での弱い細胞質内染色をScore 1、口腔扁平上皮細胞の50%以下の領域での強い細胞質内染色または10%以下の領域での強い核内染色をScore 2、口腔扁平上皮細胞の50%以上の領域での強い細胞質内染色または10%以上の領域での強い核内染色をScore 3として数値化した。また、Score 3の症例について、口腔扁平上皮細胞の細胞質主体に陽性像を認めるものを細胞質染色型（C型）、核主体に陽性像を認めるものを核染色型（N型）と分類した。各症例のYAPのScore値については、病理組織学的所見との関連を統計学的に検討した。また、YAP Score値が0～2の患者群（低発現群）とScore 3の患者群（高発現群）の二群に分けOSCC患者の予後との関連について、統計学的に検討した。

△Np63の陽性細胞数の評価は、免疫組織化学的染色後の標本を光学顕微鏡下400倍で観察し、1視野につき上皮細胞100個とし、任意の5視野で上皮細胞500個をカウントした。その内の陽性細胞の出現率を陽性率として算出し、病理組織学的所見との関連を統計学的に検討した。また、△Np63陽性率はOSCCの全症例の平均値をカットオフとし、平均値以上の高発現群と平均値以下の低発現群にわけて、OSCC患者の予後との関連について検討した。

(4) 統計学的処理

統計処理にはBonferroni test, Student's T-Testを用いた。生存分析は Kaplan-Meier法により解析を行い、log-rank testにより検定を行った。統計処理はIBM SPSS Statistics 24 (IBM, Chicago, USA) で行い、 $p < 0.05$ の場合を統計学的有意差ありとした。

結 果

1. 口腔扁平上皮の癌化過程におけるYAPと $\triangle Np63$ の発現

正常口腔粘膜上皮、上皮過形成、口腔上皮性異形成、上皮内癌では、すべての標本でYAPと $\triangle Np63$ の発現が認められた。正常口腔粘膜上皮では、YAPは上皮基底層の核と細胞質に発現し、 $\triangle Np63$ は上皮基底層及び傍基底層の核に発現していた（図2-1A, B, C）。上皮過形成におけるYAPと $\triangle Np63$ の発現は、正常口腔粘膜上皮とほぼ同様であった（図2-1D, E, F）。一方、低異型度上皮性異形成では、YAPは基底層から棘細胞層基底側約1/3の領域の細胞質に弱い発現がみられ、 $\triangle Np63$ は基底側から棘細胞層基底側約1/2の領域の核に発現していた（図2-2A, B, C）。高異型度上皮性異形成では、YAPはほぼ上皮の全層に発現がみられたが、細胞質主体に陽性像を認める場合と核内主体に陽性像を認める場合の二つのパターンを示した（図2-2D～I）。そこでYAPの局在の違いにより、細胞質

内染色型（C型）と核内染色型（N型）に分類した。組織学的に、C型は扁平上皮への分化が明瞭な高異型度上皮性異形成（図2-2G）に認め、N型は扁平上皮への分化が明瞭ではなく基底細胞様細胞が増殖する高異型度上皮性異形成（図2-2J）で認めた。 \angle Np63の発現はYAPと類似した領域に認めた。上皮内癌ではYAPはほぼ上皮全層性に発現がみられたが、局在は高異型度口腔上皮性異形成と同様にC型とN型の二つのパターンを示した。組織学的にC型は表層分化型上皮内癌、N型は全層置換型上皮内癌で認めた。上皮内癌は表層分化型、全層置換型という分化傾向の異なる二つのパターンがあり（図2-2J, M）、YAPの発現は表層分化型上皮内癌ではC型、全層置換型上皮内癌ではN型であった（図2-2J～O）。 \angle Np63の発現は、YAPの発現と類似した領域に認めた。

YAP、 \angle Np63の発現を定量化するため、正常口腔粘膜上皮、上皮過形成、口腔上皮性異形成、上皮内癌において各群のYAP Score値と \angle Np63陽性率を算出し、病理学的所見との関連について検討した（図3）。その結果、細胞学的異型度の上昇に伴いYAP Score値と \angle Np63陽性率は増加し、口腔上皮性異形成、上皮内癌は正常口腔粘膜上皮、上皮過形成と比較し有意に高かった。YAP Score値と \angle Np63陽性率は、ともに高異型度上皮性異形成と上皮内癌で著しく增加了。

正常口腔粘膜上皮、上皮過形成、口腔上皮性異形成、上皮内癌において各群

のYAP Score 0～3それぞれの占める割合と病理学的所見との関連について検討した（図4）。その結果、正常口腔扁平上皮ではScore 0の症例の割合は80.0%，Score 1は20.0%，Score 2とScore 3は認めなかつた。上皮過形成ではScore 0の症例の割合は90.0%，Score 1は10.0%，Score 2とScore 3は認めなかつた。低異型度上皮性異形成ではScore 0の症例の割合は27.9%，Score 1は62.7%，Score 2は6.9%，Score 3は2.3%であり、Score 3はすべてC型であった。高異型度上皮性異形成ではScore 0はみられず、Score 1は31.4%，Score 2は14.8%，Score 3は53.7%であり、Score 3のうち80.0%はC型、20.0%はN型であった。上皮内癌ではScore 0は認めず、Score 1は17.3%，Score 2は15.3%，Score 3は67.3%であり、Score 3のうち70.0%はC型、30.0%はN型であった。

2. 口腔扁平上皮癌におけるYAPと \triangle Np63の発現

OSCCでは分化度の違いにより、YAPと \triangle Np63は異なる発現を示す傾向があつた。高分化型OSCCでは、YAPと \triangle Np63の発現は腫瘍胞巣の最外層から2，3層までにみられ、その内部では減弱し、角化部では消失する傾向を示した（図5A, B, C）。YAPは最外層から2，3層では核内に発現し、胞巣内部では細胞質に発現を示し、角化部では消失した。一方、中分化型OSCCでは、棘細胞への分化を

示す症例と棘細胞への分化傾向の乏しい症例で、YAPは異なる発現を示した（図5D, E, G, H）。棘細胞への分化を示す症例ではYAPは腫瘍胞巣の最外層から2, 3層までに発現を示し、その内部では減弱する傾向を示した（図5E）。YAPは最外層から2, 3層では核および細胞質に発現し、胞巣内部では細胞質に発現を示し、角化部では消失した。 \angle Np63は角化部以外の腫瘍胞巣で発現がみられた（図5F）。棘細胞への分化傾向の乏しい症例では、YAPと \angle Np63は角化部以外の腫瘍胞巣で発現がみられ、YAPは腫瘍細胞の細胞質に発現を認めた（図5G, H, I）。低分化型OSCCでは、組織像が類似した症例でもYAPは細胞質主体および核内主体と異なる局在を示した（図5J, K, M, N）。腫瘍胞巣において、ほぼすべての腫瘍細胞にYAPと \angle Np63の発現がみられた（図5J～O）。

また、高分化型、中分化型、低分化型OSCCのYAP Score値と \angle Np63陽性率を算出し、OSCCの分化度との関連について検討した（図6）。分化度の違いによるYAP Score値の有意な差はみられなかったが、 \angle Np63陽性率では高分化型OSCCと比較し、中分化型OSCCと低分化型OSCCが有意に高値を示した。

次に、OSCCの分化度の違いによるYAP Score 0～3それぞれの占める割合と病理学的所見との関連について検討した（図7）。その結果、高分化型OSCCではScore 0は認めず、Score 1は23.3%，Score 2は60.0%，Score 3は16.6%であり、Score 3のうち76.5%はC型、23.5%はN型であった。中分化型OSCCでは

Score 0は認めず、Score 1は33.3%，Score 2は20.0%，Score 3は46.6%であり、Score 3のうち80.0%はC型、20.0%はN型であった。低分化型OSCCではScore 0はみられず、Score 1は45.0%，Score 2は15.0%，Score 3は40.0%であり、Score 3のうち77.7%はC型、22.2%はN型であった。OSCCではYAP Score 2は高分化型OSCCで優位で、Score 3は中分化型、低分化型OSCCで優位であり、Score 3ではC型がN型より優位であった。

3. 口腔扁平上皮癌におけるYAPと \angle Np63の発現と予後との関連

OSCC組織材料におけるYAPと \angle Np63の発現と予後との関連を調べた。検討したOSCC症例の内訳を表2に示す。

YAPについてScore値が0～2の患者群（YAP低発現群）とScore 3の患者群（YAP高発現群）の二群に分けて、予後との関係を検討した。Kaplan-Meier法を用いて生存分析を行ったところ、無病期間と生存期間では、YAP高発現群とYAP低発現群の全生存率に有意な差は認められなかった（図8）。しかし、YAP低発現群と比較し、YAP高発現群は無病期間と生存期間はいずれも短い傾向があった。

OSCCの全症例における、 \angle Np63陽性率の平均値は72.9%であった。平均値をカットオフとし、平均値以上の \angle Np63高発現群と平均値以下の \angle Np63低発現群

にわけて検討した。しかし、 \angle Np63高発現群と \angle Np63低発現群の全生存率に有意な差はみられなかった（図9）。

考 察

Hippo 経路は細胞数を調節する経路であり、YAP はその重要な転写共役因子である。複数の癌において YAP の過剰発現や調節不全、oncogene としての機能が報告されている²⁾⁻⁶⁾。また、 \angle Np63 は癌において細胞の過剰増殖を促す oncogene として機能することが知られているが¹¹⁾⁻¹³⁾ 近年 YAP の発現に関与し、YAP の oncogene としての機能を促進するとの報告がある¹⁴⁾。本研究では YAP と \angle Np63 の口腔扁平上皮癌の癌化過程における役割を検討した。

1. 口腔扁平上皮の癌化過程におけるYAPと \angle Np63の発現について

正常口腔粘膜上皮では、YAPは上皮基底層の核と細胞質に発現していた。YAP は胚性幹細胞など幹細胞の維持に関与し、幹細胞での発現が報告されている¹⁷⁾。口腔扁平上皮の基底層にも幹細胞が存在しており、基底層におけるYAPの発現は上皮の幹細胞性の維持に関与していると考えられた。 \angle Np63は、上皮基底層と傍基底層の核に発現していた。皮膚の粘膜上皮では \angle Np63は表皮基底層および傍基底層に発現し、上皮幹細胞の維持、増殖に関与するとされており¹⁸⁾、

口腔粘膜上皮でも、上皮幹細胞の維持、増殖に関与することが考えられた。

低異型度口腔上皮性異形成では、上皮の構造異型として基底細胞の重層化がみられ、扁平上皮への分化抑制が生じていると考えられる。YAPと $\triangle Np63$ の発現は構造異型を示す部位にみられ、棘細胞では消失することから基底細胞の分化抑制に関与していると思われる。低異型度口腔上皮性異形成と比べ異型度が増加した高異型度口腔上皮性異形成と上皮内癌では、YAPは異型を示す領域に一致して発現し、YAP Score値も著明な増加がみられた。子宮頸部では扁平上皮の癌化に伴うYAPの発現増加や癌化に促進的な機能が示唆されており¹⁶⁾、本研究での口腔上皮性異形成、上皮内癌のYAPの発現増加も、癌化に促進的に機能していると考えられた。 $\triangle Np63$ の発現および陽性率も、低異型度上皮性異形成と比べ、高異型度上皮性異形成と上皮内癌で著明な増加がみられた。口腔上皮性異形成の異型度の上昇に伴う $\triangle Np63$ 陽性率の増加が報告されており¹⁹⁾、また $\triangle Np63$ を高発現している上皮性異形成は癌化する傾向が高いとされている²⁰⁾。我々の結果も、 $\triangle Np63$ の発現と癌化との関連が認められた。

組織学的にYAPと $\triangle Np63$ の発現は、高異型度上皮性異形成と上皮内癌ではほぼ一致しており、また異型度の上昇に伴いその染色強度も増していた。統計学的にも、低異型度口腔上皮性異形成と高異型度口腔上皮性異形成の間を境に、YAP Score値と $\triangle Np63$ 陽性率は著明に増加していた。近年、皮膚の扁平上皮癌

では△Np63はYAPの発現を誘導し、YAPの細胞増殖活性を促進すると報告されている¹⁴⁾。したがって、口腔扁平上皮の癌化過程における両者の協調した癌化への関与が考えられた。

高異型度上皮性異形成と上皮内癌ではYAPの局在については、C型は組織学的に表層分化を示す症例に、N型は表層分化が乏しく基底細胞様細胞が増殖する症例で認めた。YAPは胚性幹細胞など未分化性の高い細胞で核内に高発現するという報告がある¹⁷⁾。また、YAPが核内発現すると細胞増殖、分化抑制が生じるが、細胞質に移行すると分化促進が生じるとされている⁷⁾。よってC型は分化した状態、N型は未分化な状態であり、局在の違いにより、口腔扁平上皮の分化に関するYAPの機能が異なることが考えられた。本研究では、口腔上皮性異形成、上皮内癌において、N型と比較しC型の症例数が多い傾向があった。一方、子宮頸部の扁平上皮では癌化に伴い核内発現が増加すると報告されており¹⁶⁾、本研究の結果とは異なる結果である。この違いについて、子宮頸部の癌化はHPV感染が主要因とされ、HPV感染はYAPを核内へ局在させ細胞増殖を引き起すが、口腔ではHPVによる癌化はまれである。また癌化過程の組織像についても、子宮頸部では分化傾向の乏しい異型細胞が全層性に上皮を置換するが、口腔では上皮の成熟分化傾向を保持するという違いがある。よって同じ重層扁平上皮でも、異なる癌化のメカニズムや分化傾向がYAPの局在の違いとして生じ

たと考えられた。

今回我々は、各組織におけるYAPをHong Xiaoらの提唱した方法¹⁶⁾に準じてYAPの評価を行っている。頭頸部腫瘍のWHO 2017、第4版で上皮性異形成の分類は新たに低異型度と高異型度という二分類法が提案されており、高異型度口腔上皮性異形成は浸潤癌へ移行するリスクが高いとされている。本研究では、低異型度口腔上皮性異形成と比較し高異型度上皮性異形成、上皮内癌では、Score 3の占める割合が明らかに高く、OSCCの前癌病変の評価にScore 3は有用と考えられた。 \angle Np63陽性率とあわせて評価することで、より高い精度で口腔上皮性異形成の低異型度と高異型度を区別し、癌化や予後予測に役立つ可能性が示唆された。

2. 口腔扁平上皮癌におけるYAPと \angle Np63の発現

高分化型OSCCと、中分化型OSCCで腫瘍胞巣が扁平上皮への分化を示す症例では、YAPと \angle Np63は腫瘍胞巣の最外層から2、3層の基底細胞様細胞で発現している。肝細胞癌では、YAPは腫瘍胞巣の形成や遊走能に関与すると報告されている²¹⁾。また \angle Np63も、頭頸部扁平上皮癌で細胞増殖や遊走への関与が示されている²²⁾。よって、OSCCでの基底細胞様細胞におけるYAPと \angle Np63の発現は、細胞増殖や細胞遊走など癌の進展に関与していると考えられた。

OSCCにおける腫瘍細胞の分化との関連について、YAPは高分化型、中分化型OSCCでは基底細胞様細胞で発現し、棘細胞への分化に伴い減弱、消失する傾向を示した。これらの所見は、正常粘膜上皮や低異型度上皮性異形成の発現と共通するものであり、高分化型と中分化型OSCCでも、YAPによる口腔扁平上皮の幹細胞性の維持や分化抑制が生じている可能性が示唆された。一方で、低分化型OSCCではYAPの発現は多様で、組織像との関連や機能の推察は困難であった。 \triangle Np63は、高分化型OSCCでは腫瘍胞巣の基底細胞様細胞で、中分化型OSCCでは角化部以外の腫瘍細胞で、低分化型OSCCではほぼすべての腫瘍細胞で発現を認めた。頭頸部扁平上皮癌では、低分化型OSCCでは高分化型OSCCに比べ \triangle Np63の陽性率が高いとの報告や²²⁾、 \triangle Np63は上皮細胞の分化抑制、YAPの発現誘導と活性化に関与すると報告がある^{14), 18)}。よってOSCCでも、 \triangle Np63の発現は腫瘍細胞の分化抑制、YAPの発現誘導および活性化に関与すると考えられた。

OSCCにおけるYAPの局在について、いずれの分化度でもN型と比べてC型の症例数が多い傾向があり、高異型度口腔上皮性異形成、上皮内癌と同様であった。多くの癌ではYAPの異常な核内局在が、腫瘍の進行を促進すると報告され²⁾⁻⁶⁾、C型が多い傾向を示すのは、OSCCに特異的であるかは未だ不明である。C型についてYAPの遺伝子増幅、過剰発現による細胞質内への蓄積の可能性^{23), 24)}、YAPの分解異常やYAPの核内移行を制御するリン酸化の異常が考えられるが、こ

これらの詳細なメカニズムについては、今後の検討課題と考える。

YAP Score値に関して、Score 3を示す症例は中分化型、低分化型OSCCで優位であった。YAPが核内発現する癌では、細胞質内発現する症例より予後が不良との報告もある²⁵⁾。OSCCにおいても、C型とN型で癌の生物学的悪性度が異なる可能性が示唆される。したがって、YAPの局在が明確になるYAP Score 3の評価が重要であると考えられた。

3. 口腔扁平上皮癌におけるYAPと△Np63の発現と予後

YAPの高発現により細胞増殖、生存、上皮間葉移行、運動性の亢進、高転移能など多彩な悪性形質の獲得が報告されている¹⁾⁻²⁾。さらに、近年ではYAPと治療抵抗性や患者の予後不良の関連が示唆されている²⁵⁾⁻²⁸⁾。本研究においても、YAPと予後との関連が考えられた。一方、△Np63は他部位では独立した予後不良因子と報告があるが²⁹⁾、本研究では△Np63の発現と予後との関連はみられなかつた。したがって、OSCCでは△Np63よりYAPが予後の予測因子となりうること、さらにYAPの評価は患者の治療方針や予後予測に役立つ可能性が示唆された。

結 論

口腔扁平上皮の癌化過程で、YAP と Δ Np63 の発現は類似した領域と傾向を示し、ともに癌化に関与すると考えられた。両者の発現により、上皮性異形成の低異型度と高異型度を区別できることから、患者に対する治療や予後予測に寄与できる可能性が示唆された。OSCCにおいても、YAP Score 値により予後予測に役立つと考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、懇篤なる御指導、御校閲を賜りました岡山大学大学院医
歯薬学総合研究科 口腔病理学分野 長塚 仁 教授、総合歯科学分野 鳥井 康弘
教授に謹んで感謝の意を表します。さらに、懇切なる御指導を賜りました口腔病
理学分野 中野 敬介 准教授、高畠 清文 助教に心より感謝いたします。

文 献

- 1) Moroishi T, Hansen CG, Guan KL. : The emerging roles of YAP and TAZ in cancer. *Nat Rev Cancer.*, 15, 73–79, 2015.
- 2) Harvey KF1, Zhang X, Thomas DM. : The Hippo pathway and human cancer. *Nat Rev Cancer.*, 13, 246–257, 2013.
- 3) Zhao B, Wei X, Li W, Udan RS, Yang Q, Kim J, Xie J, Ikenoue T, Yu J, Li L, Zheng P, Ye K, Chinnaiyan A, Halder G, Lai ZC, Guan KL. : Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes & Development.*, 21, 2747-2761, 2007.
- 4) Overholtzer M, Zhang J, Smolen GA, Muir B, Li W, Sgroi DC, Deng CX, Brugge JS, Haber DA. : Transforming properties of YAP, a candidate oncogene on the chromosome 11q22 amplicon. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*, 103, 12405-12410, 2006.

- 5) Steinhardt AA, Gayyed MF, Klein AP, Dong JX, Maitra A, Pan D, Montgomery EA, Anders RA. : Expression of Yes-associated protein in common solid tumors. *Human Pathology.*, 39, 1582-1589, 2008.
- 6) Zender L, Spector MS, Xue W, Flemming P, Cordon-Cardo C. : Identification and validation of oncogenes in liver cancer using an integrative oncogenomic approach. *Cell.*, 125, 1253-1267, 2006.
- 7) Snijders AM, Schmidt BL, Fridlyand J, Dekker N, Pinkel D, Jordan RC, Albertson DG. : Rare amplicons implicate frequent deregulation of cell fate specification pathways in oral squamous cell carcinoma. *Oncogene.*, 11, 4232-4242, 2005.
- 8) Baldwin C, Garnis C, Zhang L, Rosin MP, Lam WL. : Multiple microalterations detected at high frequency in oral cancer. *Cancer Res.*, 65, 7561-7567, 2005.
- 9) Agrawal, N, Frederick, M.J, Pickering, C.R, Bettegowda, C, Chang, K, Li, R.J, Fakhry, C, Xie, T.X, Zhang, J, Wang, J. : Exome sequencing of head and neck squamous cell carcinoma reveals inactivating mutations in NOTCH1. *Science.*, 333, 1154-1157, 2011.

- 10) Saladi SV, Ross K, Karaayvaz M, Tata PR, Mou H, Rajagopal J, Ramaswamy S, Ellisen LW.: ACTL6A Is Co-Amplified with p63 in Squamous Cell Carcinoma to Drive YAP Activation, Regenerative Proliferation, and Poor Prognosis. *Cancer Cell.*, 31, 35-49, 2017.
- 11) Mills AA.: P63: oncogene or tumor suppressor? *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 16, 38-44, 2006.
- 12) Pruneri G, Pignataro L, Manzotti M, Carboni N, Ronchetti D, Neri A, Cesana BM, Viale G.: p63 in laryngeal squamous cell carcinoma: evidence for a role of TA-p63 down-regulation in tumorigenesis and lack of prognostic implications of p63 immunoreactivity. *Lab Invest.*, 82, 1327-34, 2002.
- 13) Glickman JN, Yang A, Shahsafaei A, McKeon F, Odze RD.: Expression of p53-related protein p63 in the gastrointestinal tract and in esophageal metaplastic and neoplastic disorders. *Hum Pathol.*, 32, 1157-65, 2001.

- 14) Li Y, Kong F, Shao Q, Wang R, Hu E, Liu J, Jin C, He D, Xiao X.: YAP Expression and Activity Are Suppressed by S100A7 via p65/NF κ B-mediated Repression of Δ Np63. *Mol Cancer Res.*, 10, 1158/1541–7786, 2017.
- 15) Akhilesh K, Shraddha S, Vijay K.: Molecular concept in human oral cancer. *National Journal of Maxillofacial Surgery.*, 6, 9–15, 2015.
- 16) Xiao H, Wu L, Zheng H, Li N, Wan H, Liang G, Zhao Y, Liang J: Expression of Yes-associated protein in cervical squamous epithelium lesions. *Int J Gynecol Cancer.*, 24, 1575–1582, 2014.
- 17) Tomlins SA, Chinnaiyan AM.: Of mice and men: cancer gene discovery using comparative oncogenomics. *Cancer Cell.*, 10, 2–4, 2006.
- 18) Koster MI, Roop DR.: The role of p63 in development and differentiation of the epidermis. *J. Dermatol. Sci.*, 24, 3–9, 2004.
- 19) Matsubara R, Kawano S, Kiyosue T, Goto Y, Hirano M, Jinno T, Toyoshima T, Kitamura R, Oobu K, Nakamura S. : Increased Δ Np63 expression is predictive of malignant transformation in oral

- epithelial dysplasia and poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol.*, 39, 1391–1399, 2011.
- 20) Chen YK, Hsue SS, Lin LM. : Expression of p63 protein and mRNA in oral epithelial dysplasia. *J Oral Pathol Med.*, 34, 232–239, 2005.
- 21) Chen Shi, Yong Cai, Yongheng Li, Ye Li, Nan Hu, Sai Ma, Shunying Hu, Pingjun Zhu, Weihu Wang, a, Hao Zhouc. : Yap promotes hepatocellular carcinoma metastasis and mobilization via governing cofilin/F-actin/lamellipodium axis by regulation of JNK/Bnip3/SERCA/CaMKII pathways. *Redox Biol.*, 14, 59-71, 2018.
- 22) Ehsanian R, Brown M, Lu H, Yang XP, Pattatheyil A, Yan B, Duggal P, Chuang R, Doondea J, Feller S, Sudol M, Chen Z, Van Waes C. : YAP dysregulation by phosphorylation or Δ Np63-mediated gene repression promotes proliferation, survival and migration in head and neck cancer subsets. *Oncogene.*, 29, 6160–6171, 2010.
- 23) Zhao B, Lei QY, Guan KL. : The Hippo-YAP pathway: new connections between regulation of organ size and cancer. *Curr Opin Cell Biol.*, 20, 638–646, 2008.

- 24) Hiemer SE, Zhang L, Kartha VK, Packer TS, Almershed M, Noonan V, Kukuruzinska M, Bais MV, Monti S, Varelas X. : A YAP/TAZ-Regulated Molecular Signature Is Associated with Oral Squamous Cell Carcinoma. *Mol Cancer Res.*, 13, 957–968, 2015.
- 25) Song M, Cheong JH, Kim H, Noh SH, Kim H. : Nuclear expression of Yes-associated protein 1 correlates with poor prognosis in intestinal type gastric cancer. *Anticancer Res.*, 32, 3827–3834, 2012.
- 26) Muramatsu T, Imoto I, Matsui T, Kozaki K, Haruki S, Sudol M, Shimada Y, Tsuda H, Kawano T, Inazawa J, : YAP is a candidate oncogene for esophageal squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis.*, 32, 89–98, 2011.
- 27) Xu MZ, Yao TJ, Lee NP, Ng IO, Chan YT, Zender L, Lowe SW, Poon RT, Luk JM. : Yes-Associated Protein Is an Independent Prognostic Marker in Hepatocellular Carcinoma. *Cancer.*, 115, 4576–4585 2009.
- 28) Marti P, Stein C, Blumer T, Abraham Y, Dill MT, Pikiolek M, Orsini V, Jurisic G, Megel P, Makowska Z, Agarinis C, Tornillo L, Bouwmeester

T, Ruffner H, Bauer A, Parker CN, Schmelzle T, Terracciano LM, Heim MH, Tchorz JS. : YAP promotes proliferation, chemoresistance, and angiogenesis in human cholangiocarcinoma through TEAD transcription factors. *Hepatology.*, 62, 1497–1510 2015.

29) Kumakura Y, Rokudai S, Iijima M, Altan B, Yoshida T, Bao H, Yokobori T, Sakai M, Sohda M, Miyazaki T, Nishiyama M, Kuwano H . : Elevated expression of ΔNp63 in advanced esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Sci.*, 108, 2149–2155, 2017.

図表の説明

図1 免疫組織化学的検討におけるYAPの評価基準

口腔扁平上皮の基底細胞または傍基底細胞に限局した染色をScore 0, 口腔扁平上皮細胞での弱い細胞質内染色をScore 1, 口腔扁平上皮細胞の50%以下の領域での強い細胞質内染色または10%以下の領域での強い核内染色をScore 2, 口腔扁平上皮細胞の50%以上の領域での強い細胞質内染色または10%以上の領域での強い核内染色をScore 3として評価した。Score 3では細胞質内染色をC型, 核内染色をN型と評価した。

図2-1 正常口腔粘膜上皮, 上皮過形成におけるYAPと \triangle Np63の発現

正常粘膜上皮と上皮過形成では, YAPは上皮基底層の核と細胞質に限局して発現していた。 \triangle Np63は上皮基底層及び傍基底層の核に限局して発現していた。(A-C: 正常粘膜上皮 (normal), D-F: 上皮過形成 (hyperplasia), scale bar: 20 μ m)

図2-2 口腔上皮性異形成, 上皮内癌におけるYAPと \triangle Np63の発現

低異型度上皮性異形成では, YAPは基底層から棘細胞層基底側約1/3の領域の細胞質に発現がみられ, \triangle Np63は基底側から棘細胞層の基底側約1/2の領域の

核に発現を示した。高異型度上皮性異形成、上皮内癌ではYAPと \triangle Np63はほぼ全層に発現がみられ、YAPは細胞質内染色(C型)と核内染色(N型)の二つのパターンを示した。(A-C:低異型度上皮性異形成(dys(low)), D-F:高異型度上皮性異形成(dys(high)) C型, G-I:高異型度上皮性異形成(dys(high)) N型, J-L:上皮内癌(CIS) C型, M-O:上皮内癌(CIS) N型, scale bar: 20 μ m)

図3 正常口腔粘膜上皮、上皮過形成、口腔上皮性異形成、上皮内癌におけるYAP Score値と \triangle Np63陽性率

細胞学的異型度の上昇に伴い、YAP Score値と \triangle Np63陽性率は増加し、上皮性異形成、上皮内癌は正常口腔粘膜上皮、上皮過形成と比較し有意に高かつた。YAP Score値と \triangle Np63陽性率はともに高異型度上皮性異形成と上皮内癌で著明に增加了。

(normal:正常粘膜上皮, hyperplasia:上皮過形成, dys(low):低異型度上皮性異形成, dys(high):高異型度上皮性異形成, CIS:上皮内癌, n.s:有意差無し, *:p<0.05, **:p<0.01)

図4 正常口腔粘膜上皮、上皮過形成、口腔上皮性異形成、上皮内癌におけるYAP Score値

正常口腔粘膜上皮、上皮過形成ではScore 0が、低異型度上皮性異形成ではScore 1が優位であった。高異型度上皮性異形成と上皮内癌ではScore 3が優位であり、いずれもC型がN型と比較し優位であった。

(normal : 正常粘膜上皮, hyperplasia : 上皮過形成, dys(low) : 低異型度上皮性異形成, dys(high) : 高異型度上皮性異形成, CIS : 上皮内癌)

図5 口腔扁平上皮癌におけるYAP, \angle Np63の発現

高分化型OSCCでは、YAPと \angle Np63の発現は腫瘍胞巣の最外層から2, 3層までに限局し、その内部では消失する傾向を示した。中分化型OSCCでは、棘細胞への分化を示す症例と棘細胞への分化傾向の乏しい症例ではYAPは異なる発現を示し、いずれも \angle Np63は角化部以外の腫瘍胞巣で発現がみられた。低分化型OSCCでは、組織像が類似した症例でもYAPは細胞質主体と核内主体という異なる局在を示した。腫瘍胞巣ではほぼすべての腫瘍細胞にYAPと \angle Np63の発現がみられた。

(A-C : 高分化型OSCC(well), D-I : 中分化型OSCC(moderate), J-O : 低分化型OSCC(poor), scale bar : 20 μ m)

図6 OSCCにおけるYAP Score値と \angle Np63陽性率

YAP Score値は、分化度の違いによる有意な差はみられなかった。 \triangle Np63陽性率は、高分化型OSCCと比較し中分化型OSCCと低分化型OSCCが有意に高値を示した。

(OSCC(well)：高分化型口腔扁平上皮癌，OSCC(moderate)：中分化型口腔扁平上皮癌，OSCC(poor)：低分化型口腔扁平上皮癌，n.s：有意差無し，＊：p<0.05，＊＊：p<0.01)

図7 OSCCにおけるYAP Score値

高分化型OSCCではScore 2が優位であった。中分化型OSCCと低分化型OSCCでは高分化型OSCCと比較し、Score 3が優位でありいずれもC型が優位であった。

(OSCC(well)：高分化型口腔扁平上皮癌，OSCC(moderate)：中分化型口腔扁平上皮癌，OSCC(poor)：低分化型口腔扁平上皮癌)

図8 OSCCにおけるYAPの発現と全生存率との関連

無病期間と生存期間では、YAP高発現群とYAP低発現群の全生存率に有意な差は認められなかった。YAP低発現群と比較し、YAP高発現群は無病期間と生存期間はいずれも短い傾向があった。

(YAP低発現群：YAP Score 0-2, YAP高発現群:YAP Score 3)

図9. OSCCにおける△Np63の発現と全生存率との関連

△Np63高発現群と△Np63低発現群の全生存率に有意な差は認められなかつ
た。

(△Np63低発現群 : △Np63陽性率 < 72. 9%, △Np63高発現群 : △Np63陽性率 ≥
72. 9%)

表1 本研究で使用した抗体

一次抗体は抗ヒト YAP 抗体 (R&D systems, Minneapolis, USA) , 抗ヒト△
Np63 抗体 (BIOLOGO, Kronshagen, Germany) を使用した。

表 2 OSCC 症例の内訳

男女の比率は 44:36, 年齢の平均値は 70. 5 歳, 65 歳以下と 65 歳以上の比率は
27:53, 病期は I - II と III-IV の比率は 49 : 31, 腫瘍の大きさは T1-2 と T3-4
の比率は 63 : 17, リンパ節転移は有りと無しの比率は 41 : 39, 分化度の比率
は高分化型, 中分化型, 低分化型は 30 : 30 : 20, DFS の平均値は 28. 5 ヶ月,
OS の平均値は 34. 8 ヶ月であった。 (T: tumor, N: nodes, M: metastasis,
DFS: disease-free survival , OS: overall survival)