

令和 5 年 5 月 21 日現在

機関番号：15401
研究種目：若手研究
研究期間：2020～2022
課題番号：20K18477
研究課題名（和文）Hippo経路を制御する受容体型チロシンキナーゼの探索および頭頸部癌治療への応用
研究課題名（英文）Exploring receptor type tyrosine kinases regulating Hippo pathway for the treatment of patients with head and neck cancer
研究代表者
安藤 俊範（Ando, Toshinori）
広島大学・病院（歯）・助教
研究者番号：40754552
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、頭頸部扁平上皮癌においてYAP活性化を導く新たな受容体型チロシンキナーゼ（RTK）の同定と機能を解明するとともに、EGFR阻害薬耐性獲得を防ぐ治療への応用の可能性を示すことを目的とした。TCGAおよびCCLEのデータを用いてエンリッチメント解析を行いAXLを同定した。AXL高発現細胞株でAXL阻害薬を作用させると、YAPのリン酸化および増殖関連遺伝子の発現低下が見られた。EGFRとAXLはヘテロ二量体を形成しており、AXLの発現抑制はEGFR不活性化させた。AXL阻害薬とEGFR阻害薬は相乗的に増殖を抑制した。将来的なEGFR阻害薬とAXL阻害薬の併用治療が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

頭頸部扁平上皮癌（HNSCC）で遺伝子増幅・過剰発現、あるいは肺腺癌（LUAC）で活性化変異しているEGFRが、がん遺伝子のYAPを活性化して増殖を促進することを以前見出していた。しかしEGFR阻害薬単剤では再発や耐性が問題となっており、別の遺伝子によるYAP再活性化が関与する可能性が示唆されていた。本研究の成果は、AXLによるYAP活性化およびEGFR阻害薬耐性を付与する機構を解明することで、EGFR阻害薬の耐性を解除するためにAXL阻害薬を併用する新たな治療法の可能性を見出した。将来的にHNSCCおよびLUACを示す患者の治療効果を改善し、生命予後の延長をもたらす点で臨床的にも重要である。

研究成果の概要（英文）：The objective of this study is to clarify the mechanism by which AXL regulates the Hippo pathway and confers resistance to EGFR inhibitors. Database analysis revealed that AXL is the RTK most relevant to the Hippo pathway. AXL inhibitor treatment increased YAP phosphorylation and reduced CTGF/CYR61 expression in HNSCC and LUAC cells highly expressing AXL. Co-immunoprecipitation assay demonstrated that EGFR and AXL form a heterodimer, and siRNA knockdown of AXL induced EGFR inactivation and reduced CTGF/CYR61 expression. LATS1/2 knockout by CRISPR/Cas9 system rescued the phenotype mentioned above. AXL heterodimerizes with EGFR and activates YAP through EGFR-MOB1 axis, thereby conferring resistance to EGFR inhibitors. This suggests that combination therapy with AXL inhibitors and EGFR inhibitors may be a novel cancer therapeutic approach targeting YAP.

研究分野：口腔病理学

キーワード：YAP Hippo経路 AXL EGFR 口腔扁平上皮癌 頭頸部扁平上皮癌 肺腺癌 EGFR阻害薬耐性

1. 研究開始当初の背景

Hippo 経路とその下流である Yes-associated protein (YAP) は、細胞の増殖、組織・臓器形成において中心的な役割を担っている。Hippo 経路は MST1/2, LATS1/2 キナーゼおよびアダプタータンパクである SAV1, MOB1 で構成されており、活性化した LATS1/2 は YAP をリン酸化することで細胞質局在・分解を促す。一方、LATS1/2 の不活性化時には、脱リン酸化した YAP が核内で増殖関連遺伝子 (*CTGF, CYR61*) の転写を亢進させる。癌では YAP が異常に活性化し、細胞増殖に寄与している。

頭頸部扁平上皮癌 (HNSCC) は、5 年生存率 60% と予後不良であり、世界で 6 番目に多い癌である。先行研究において、HNSCC で過剰発現・遺伝子増幅、あるいは肺腺癌 (LUAC) でも活性化変異している EGFR が MOB1 のチロシンリン酸化を導き、LATS1/2 の不活性化を促すことで、YAP を恒常的に活性化させていることが報告されている (文献①)。現在、HNSCC の治療において分子標的薬である抗 EGFR 抗体 (Cetuximab) が用いられているが、単剤での奏効率は 10~30% と低い。耐性を示す症例では、YAP の再活性化や、別の受容体チロシンキナーゼ (RTK) の発現亢進が関与しているとの報告があるが、その詳細な機構は明らかになっていない。先行研究の結果と合わせて考えると、EGFR 阻害薬は一過性に YAP を抑制しうるが、RTK などの上流因子が YAP を再活性化することで耐性を獲得させる機構の存在が示唆される。したがって HNSCC 患者の予後改善には、EGFR 阻害薬耐性獲得に関わる YAP 制御機構の解明が鍵になると期待される。

2. 研究の目的

本研究では、HNSCC において YAP 活性化を導く新たな RTK の同定と機能を解明するとともに、EGFR 阻害薬耐性獲得を防ぐ治療への応用の可能性を示すことを目的とする。

3. 研究の方法

- ・実験 (1) : データベースによる新規 YAP 制御因子の候補を同定。

The Cancer Genome Atlas Network (TCGA), PanCancer atlas (HNSCC 523 samples) の組織および Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE 1020 samples) の癌細胞株の RNA-seq データを用いて、58 種類の RTK のエンリッチメント解析 (GSEA) を行い、YAP 転写標的遺伝子群の発現を最もエンリッチさせる RTK を同定する。

- ・実験 (2) : 新規 RTK の阻害薬の効果を解析。

新規 RTK を過剰発現する HNSCC および LUAC の細胞株を用いて、新規 RTK の阻害薬投与、siRNA によるノックダウンを行い、EGFR の活性化への影響や、YAP の活性化、YAP 転写標的遺伝子の発現変化を Western Blot 法や、qPCR 法を用いて解析する。CRISPR/Cas9 により作製した LATS1/2 ノックアウト (YAP が恒常的に活性化) 細胞を用いて、阻害剤による増殖抑制効果や上記の効果が rescue されるか確認する。

- ・実験 (3) : 新規 RTK と EGFR-LATS1/2-YAP 経路との関連を解析。

EGFR が新規 RTK と結合して二量体を形成し、互いにリン酸化することで活性化を生じるかを共免疫沈降法で解析する。EGFR/AXL ヘテロ二量体が EGFR-LATS1/2-YAP 経路の活性化を導くことを、ウェスタンブロット法や qPCR で検討する。

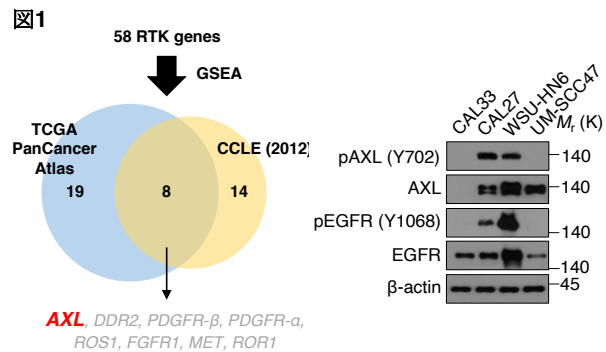
・実験 (4) : 新規 RTK の阻害薬と EGFR 阻害薬の併用効果を解析。

新規 RTK の阻害薬が EGFR 阻害薬と相乗効果的に増殖抑制するかを、in vitro の生存解析を行い検証する。

4. 研究成果

実験 (1) : データベースによる新規 YAP 制御因子の候補を同定。

58 種類の RTK で GSEA を行った結果、TCGA では 27 種類、CCLE では 22 種類が YAP 転写遺伝子群と正の相関を示した。TCGA と CCLE の両者に重複していた RTK は 8 種類であり、そのうち最も強い相関を示す RTK として AXL を同定した。また 4 種類の HNSCC 細胞株で AXL の発現を検討したところ、WSU-HN6 細胞が最も AXL および EGFR の発現が高かった

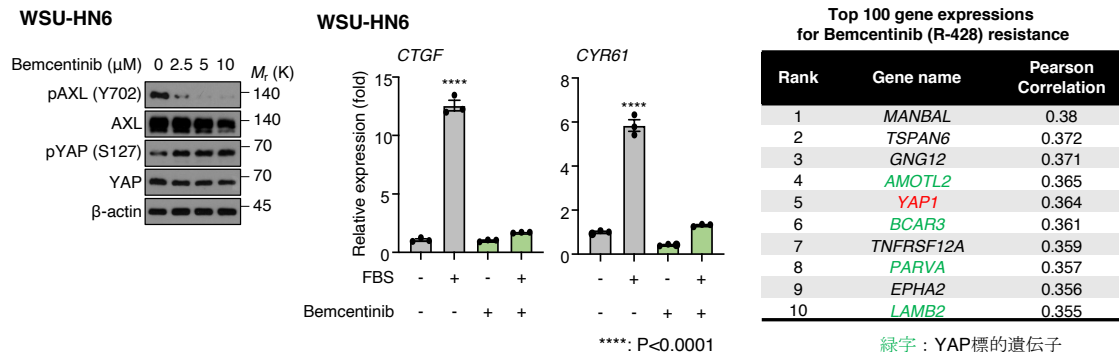


(図 1)。さらに 4 種類の EGFR 活性化変異を示す LUAC 細胞株で AXL の発現を検討したところ、PC-9 細胞が AXL の高発現を示した。

実験 (2) : 新規 RTK の阻害薬の効果を解析。

WSU-HN6 細胞および PC-9 細胞において、AXL の阻害薬である Bemcentinib の効果を検討した。Bemcentinib は YAP のリン酸化を亢進させ、CTGF/CYR61 の転写を抑制した。また Bemcentinib は増殖を抑制し、LATS1/2 KO (YAP 活性化) により rescue された。The Cancer Dependency Map (DEPMAP) にて Bemcentinib の耐性に関わる遺伝子を検索したところ、上位 TOP10 に YAP および YAP 標的遺伝子が含まれており、AXL の下流に YAP が位置していることが示された (図 2)。

図2

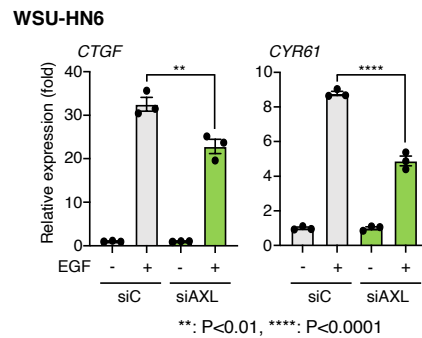
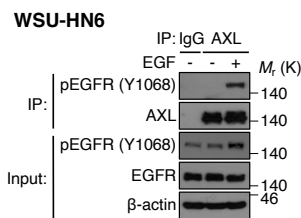


実験 (3) : 新規 RTK と EGFR-LATS1/2-YAP 経路との関連を解析。

AXL と EGFR の結合を解析するために抗 AXL 抗体で共免疫沈降を行ったところ、EGF 投与による EGFR 活性化時に、AXL と EGFR の結合を確認した。AXL を siRNA でノックダウンすると、EGF 投与時の EGFR のリン酸化が抑制されており、同時に CTGF/CYR61 の転写も抑制された (図 3)。

よって AXL は EGFR とヘテロ二量体を形成して EGFR の活性化を促し、EGFR-LATS1/2-YAP 経路を活性化させていると考えた。そこで、EGFR と AXL の両者を同時に阻害することで、より YAP を強く

図3



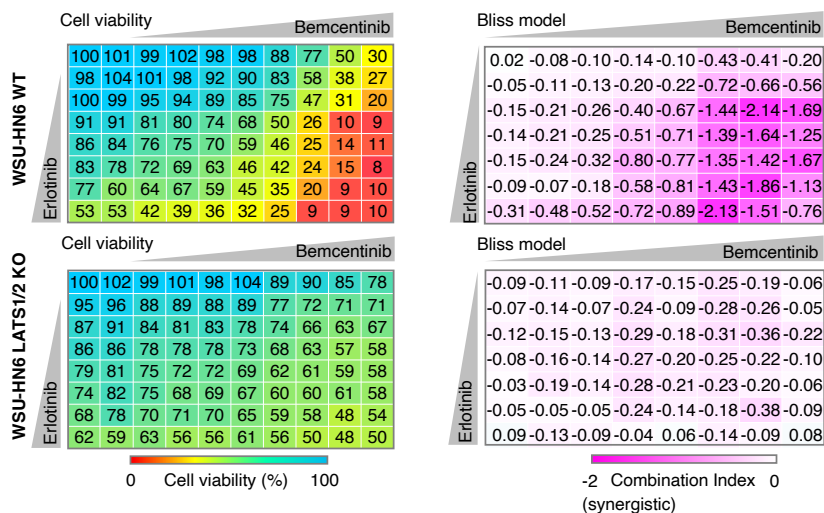
不活性化できると推測した。実際に EGFR 阻害薬である Erlotinib と Bemcentinib を併用すると、単剤で使用する時よりも強く YAP のリン酸化を亢進させ、CYR61 の発現も相乗的に抑制した。

実験 (4) : 新規 RTK の阻害薬と EGFR 阻害薬の併用効果を解析。

最後に、Erlotinib

図4

と Bemcentinib を投与すると Bliss model (相乗効果を解析する方法) によって両者が相乗的に増殖を抑制することを確認した。さらにこの相乗的な増殖抑制効果は、LATS1/2 KO によって消失した (図 4)。また Erlotinib と Bemcentinib は相乗的に



に CTGF/CYR61 の転写を抑制したが、LATS1/2 KO では CTGF/CYR61 のベースの発現量が高くなり、相乗的な抑制があっても CTGF/CYR61 の発現量が WT よりも高い状態を維持した。

以上より、AXL は EGFR とヘテロ二量体を形成し、EGFR-LATS1/2-YAP 経路を活性化させて EGFR 阻害薬への耐性を付与することを明らかにした。今後 EGFR 阻害薬と AXL 阻害薬の併用による新たな治療法の確立が期待される。

<引用文献>

① Ando T et al, EGFR Regulates the Hippo pathway by promoting the tyrosine phosphorylation of MOB1, Communications Biology, 2021, 4:1237.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ando Toshinori, Okamoto Kento, Shintani Tomoaki, Yanamoto Souichi, Miyauchi Mutsumi, Gutkind J. Silvio, Kajiya Mikihiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Integrating Genetic Alterations and the Hippo Pathway in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma for Future Precision Medicine	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Personalized Medicine	6. 最初と最後の頁 1544 ~ 1544
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/jpm12101544	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ando Toshinori, Arang Nadia, Wang Zhiyong, Costea Daniela Elena, Feng Xiaodong, Goto Yusuke, Izumi Hiroki, Gilardi Mara, Ando Kazuyo, Gutkind J. Silvio	4. 巻 4
2. 論文標題 EGFR Regulates the Hippo pathway by promoting the tyrosine phosphorylation of MOB1	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 1237
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-021-02744-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 安藤 俊範, 岡本 健人, 柳本 惣市, 宮内 睦美
2. 発表標題 AXLによる新たなHippo経路制御機構の解明
3. 学会等名 3学会合同学術大会（第32回日本口腔内科学会・第33回 日本臨床口腔病理学会・第35回日本口腔診断学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡本健人, 安藤俊範, 虎谷茂昭, 柳本惣市, 宮内睦美
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌におけるAXLのYAP活性化およびEGFR阻害薬耐性機構の解明
3. 学会等名 第76回NPO法人 日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2022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 協力 者	岡本 健人 (Okamoto Kento)	広島大学・口腔腫瘍制御学・大学院生 (15401)	

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		
米国	University of California, San Diego		