

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07220

研究課題名(和文) Hippo経路分子MOB1に着目したEGFR変異陽性肺癌の新規標的治療法開発

研究課題名(英文) Development of a novel targeted therapy for EGFR mutation-positive lung cancer focusing on the Hippo pathway molecule MOB1

研究代表者

田中 謙太郎 (Tanaka, Kentaro)

九州大学・医学研究院・准教授

研究者番号：00536849

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)：肺癌におけるEGFR遺伝子変異と、細胞の増殖と生存を制御するMOB1下流の転写共役因子であるYAPとの機能的関連を調べた。血清欠乏の条件下で、EGF刺激はEGFR遺伝子変異陽性非小細胞肺癌細胞株でYAPの活性化を誘導したが、EGFR野生型の細胞株では誘導しなかった。EGFRを強制発現させた細胞株を用いても、EGF刺激によるYAP活性化は変異型EGFR細胞のみで認められた。さらに、血清欠乏下のEGF刺激によって、野生型ではアポトーシスが有意に誘導されたが、変異型発現細胞はアポトーシス耐性を示した。YAPをノックダウンすると、変異型発現細胞においてもアポトーシスが観察されるようになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

EGFR遺伝子変異陽性非小細胞肺癌においては、Hippo-MOB1下流の転写共役因子であるYAPがEGF刺激により活性化され、EGF誘導性アポトーシスに対する抵抗性を有することで細胞の生存に特異的に寄与することが明らかとなった。普遍的な増殖因子の一つであるEGFに対して、EGFR野生型細胞ではアポトーシスを介した増殖の制御が有効に機能する一方、EGFR変異陽性細胞においてはそのような制御が機能せず寧ろ異常な増殖を来し、発癌や癌の増大の一因となりうると思われる。今後同経路及びクロストークすると考えられるRAS-MAPKキナーゼ経路の解析を継続し、Hippo経路を標的とした治療薬開発を進める。

研究成果の概要(英文)：The functional association between EGFR mutations in lung cancer and YAP, a transcriptional coactivator, which is a downstream of MOB1 that regulates cell growth and survival, was investigated. Under conditions of serum deprivation, EGF stimulation induced YAP activation in EGFR mutation-positive non-small cell lung cancer cell lines, but not in EGFR wild-type cell lines; even when EGFR was forced to express the mutant EGFR cell lines, EGF stimulation induced YAP activation only in mutant EGFR cells.

Furthermore, EGF stimulation under serum deprivation significantly induced apoptosis in wild-type cells, whereas Mutant-expressing cells were resistant to apoptosis; knockdown of YAP resulted in the observation of apoptosis in mutant-expressing cells as well.

研究分野：癌生物学

キーワード：YAP Hippo pathway EGFR Apoptosis NSCLC MOB1

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Hippo 経路は、細胞の増殖や組織のサイズなど生命の恒常性維持に必須の経路であり、ショウジョウバエから哺乳類に至るまで保存されている(Cancer Cell;2016, 29, 783-803)。哺乳類の Hippo 経路は、MST キナーゼ/LATS キナーゼとそのアダプター分子である SAV1/MOB1 の 4 つを core component とする。Hippo 経路が活性化されると、下流の転写共役因子 YAP/TAZ がリン酸化される。リン酸化 YAP/TAZ は細胞核外に排除され、タンパク質崩壊を受けることでその標的遺伝子の転写が抑制される。YAP/TAZ は CTGF や Survivin (BIRC5)、Amphiregulin (AREG)、CYR61 など、主に細胞増殖促進および抗アポトーシスに関連する遺伝子を転写標的としているため(Cancer Science, 2013;104:1271-77)、Hippo 経路はがん抑制性のシグナル伝達経路として働くものと考えられている。

申請者は、ノックアウトマウスを用いて、肺の形態形成および気管支肺胞幹細胞 (BASC) の維持 MOB1 が重要な役割を担っていることを世界で初めて報告した九州大学の知見 (Oncogene;36(29):2017, 4201-4211) を基に、肺腺癌における MOB1 発現と予後との相関を解析し報告を行った (Thoracic Cancer ;2020, (10):2830-2839)。癌の発生もしくは増殖進展を抑制しているという MOB1 の他癌腫における報告とは異なり、手術検体を用いた我々の研究においては、MOB1 の高発現は無病生存期間 (DFS) を短縮させる予後不良因子であった。更に交絡する因子別解析を実施したところ、EGFR 遺伝子変異陽性の集団のみにおいて、MOB1 高発現と DFS 短縮の強い相関が認められた。以上の自らの知見に基づき、申請者は、MOB1 タンパクの発現及びその下流において転写を制御する転写共役因子である YAP/TAZ は、EGFR 遺伝子変異陽性肺癌の増殖・生存に特異的な機能を有しているという仮説を基に本研究を計画した。

2. 研究の目的

非小細胞肺癌の細胞株及び臨床検体を用いて、EGFR 遺伝子変異陽性肺癌における MOB1 および MOB1 下流の YAP の発現解析、及び遺伝子転写制御の解析を行う。本研究は、EGFR 遺伝子変異陽性肺癌 (NSCLC) における Hippo 経路の特異的な機能を解明し、本経路を利用した新たな標的治療法開発の基盤的知見を得ることを目的とする。

(本文)

3. 研究の方法

EGFR 遺伝子変異陽性 NSCLC 細胞株における EGF による YAP 活性化

我々はまず、非腫瘍ヒト気道上皮細胞株である BEAS-2B および、EGFR 遺伝子野生型または EGFR 遺伝子変異陽性ヒト NSCLC 細胞株における YAP の蛋白発現を評価した。イムノブロット解析の結果、YAP の蛋白発現は EGFR 野生型の細胞株よりも EGFR 遺伝子変異陽性の細胞株で高い傾向があることが明らかになった。この結果から、EGF-EGFR シグナルは EGFR 遺伝子変異陽性の細胞においてより強く YAP 機能に影響を及ぼす可能性が示唆された。そこで我々は、血清欠乏条件下に EGFR 野生型の NSCLC 細胞株 (H1299 と A549) と EGFR 遺伝子変異陽性 NSCLC 細胞

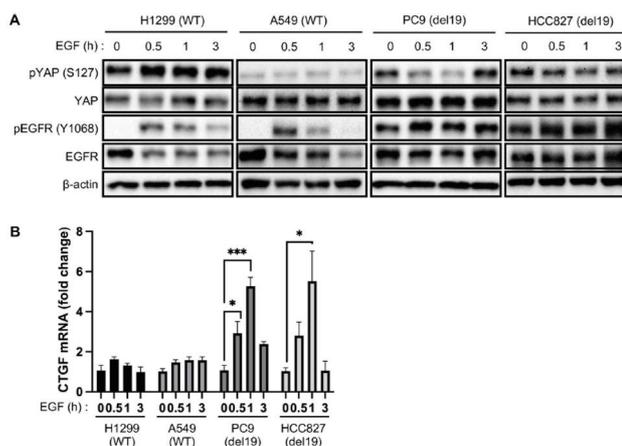


図1A EGFR 野生型 (WT)2種及びEGFR 変異型 (del19)2種による EGF 刺激後の YAP 及び EGFR リン酸化

図1B EGF 刺激後の CTGF の mRNA 転写発現量

株 (PC9 と HCC827) を用いて、YAP 活性に対する EGF の影響を解析した。イムノブロット解析の結果、EGF は PC9 と HCC827 細胞では YAP の Ser127 における阻害的リン酸化を低下させ、YAP の活性化を示す所見を認めた一方で、H1299 と A549 細胞では EGF による YAP の阻害的リン酸化の変化は認めなかった (図 1A)。この結果と一致するように、RT-qPCR 解析では、EGFR 遺伝子変異陽性の細胞株において、YAP の代表的な標的遺伝子である結合組織増殖因子 (connective tissue growth factor ; CTGF) の mRNA 発現が、EGF によって強力に増加することが明らかになった (図 1B)。これらの所見から、EGF は EGFR 遺伝子変異陽性 NSCLC でより強力に YAP シグナルを活性化することが示された。

EGFR 野生型細胞における変異型 EGFR の強制発現は、EGF による YAP 活性化を誘導する

del19 と野生型の細胞間に観察された EGF 刺激に対する YAP 活性化の違いが変異型 EGFR に依存するものかどうかを調べるため、レトロウイルス感染により野生型 EGFR および変異型 EGFR を発現する A549 細胞株 (EGFR 野生型の NSCLC 細胞株) を樹立した。血清欠乏の条件下で、del19 変異型の EGFR を発現している A549 細胞では、EGF 刺激による YAP の阻害的リン酸化の低下がみられ、YAP 活性化が誘導されたが、EGFR 野生型を過剰発現している細胞株では誘導されなかった (図 2)。これらの結果は、del19 のような EGFR 活性化変異が、NSCLC における EGF 刺激による YAP の活性化を誘導することを示している。

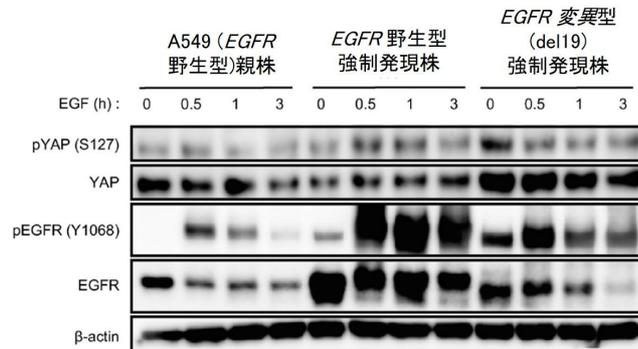


図2 EGFR変異型を発現する細胞は、EGF刺激により YAPが脱リン酸化 (=活性化)される。

③ YAP は変異型 EGFR を発現する細胞を EGF 誘導性アポトーシスから保護する

上記結果を進展させるべく、EGFR 遺伝子変異陽性 NSCLC における EGF 誘導性 YAP 活性化の機能的意義を検討した。EGF 刺激が特定の条件下でアポトーシスを誘導することが既に報告されていることから、EGFR の野生型及び del19 変異型を強制発現させた A549 細胞株の生存能に対する EGF の影響を調べた。血清欠乏条件下で EGF 刺激を行うと、野生型 EGFR を発現している細胞の生存率は低下したが、変異型 EGFR を発現している細胞の生存率は低下しなかった (図 3A)。次に、この効果がアポトーシスの誘導によるものかどうかをフローサイトメトリーで解析した。フローサイトメトリーでは、EGF 刺激は野生型 EGFR 発現細胞ではアネキシン V 陽性 (アポトーシス) 細胞数を有意に増加させたが、del19 変異型 EGFR 発現細胞では増加させなかった (図 3B)。さらに、YAP 発現と細胞生存との関連を解析した。siRNA を用いて YAP をノックダウンすると、野生型または変異型 EGFR のいずれの細胞でもアポトーシス細胞の増加がみられた。また、YAP のノックダウンにより、野生型 EGFR 発現細胞のみならず、del19 発現細胞でも EGF 誘導性のアポトーシスを認めるようになった (図 3C)。二元配置分散分析 (Two-way ANOVA) により、変異型 EGFR を発現している細胞についてのみ、EGF 刺激と YAP ノックダウンとの間に有意な相互作用が認められた。これは、野生型 EGFR を発現している細胞では EGF 刺激と YAP ノックダウンによるアポトーシス誘導は相加的な効果である一方で、変異型 EGFR を発現している細胞では相乗的な効果をもつことを示唆している (図 3D)。これらの結果から、EGFR 遺伝子変異陽性 NSCLC の EGF 誘導アポトーシスに対する抵抗性に YAP が関与していることが示唆された。

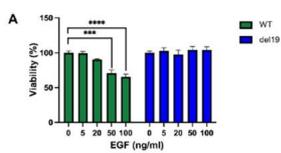


図3A 血清欠乏下のEGF刺激による EGFR野生型 (WT)とEGFR変異型 (del19) 過剰発現細胞株 間の細胞生存率

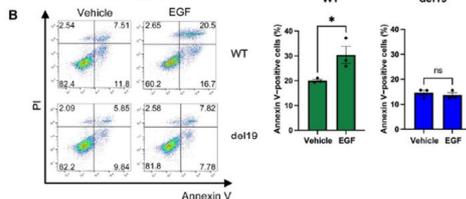


図3B血清欠乏下のEGF刺激によるアポトーシス細胞割合

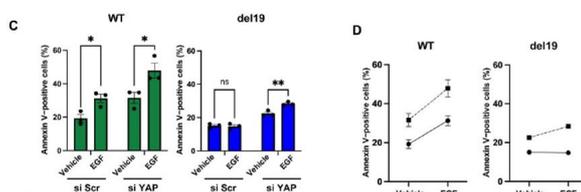


図3C/D YAPの発現抑制によるEGF刺激によるアポトーシス細胞割合の変化

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$,
 *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$
 (Student's t -test (B and C) or one-way ANOVA (A))

4 研究成果

EGFR 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌においては、*MOB1* 下流の転写共役因子である *YAP* が *EGF* 刺激により活性化され、*EGF* 誘導性アポトーシスに対する抵抗性を有することで細胞の生存に特異的に寄与することが明らかとなった。最も普遍的な細胞外増殖因子の一つである *EGF* に対して、*EGFR* 野生型細胞ではアポトーシスを介した増殖の制御が有効に機能する一方、*EGFR* 変異陽性細胞においてはそのような制御機構が働かずに寧ろ異常な増殖を来し、発癌や癌の増大の一因となりうると考えられる。本制御機構の機能においては、*EGFR* 変異陽性時に恒常的に活性化する *RAS*-*MAPK* 経路とのクロストークが重要であると考えられることから、今後同経路の詳細な解析を通して最終的な目標である *Hippo*-*MOB1*-*YAP* 経路を標的とした治療薬開発を進めていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakajima Maako, Tanaka Kentaro, Yoneshima Yasuto, Yamashita Sho, Shibahara Daisuke, Iwama Eiji, Okamoto Isamu	4. 巻 681
2. 論文標題 YAP mediates resistance to EGF-induced apoptosis in EGFR-mutated non-small cell lung cancer cells.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 120, 126
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2023.09.067	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Maako Nakajima, Kentaro Tanaka, Yasuto Yoneshima, Koji Okamura, Eiji Iwama, Isamu Okamoto
2. 発表標題 YAP activation contributes to resistance against apoptosis in EGFR-mutant NSCLC.
3. 学会等名 第82回日本癌学会学術集会
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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------