

# 論文内容要旨

AXL activates YAP through the EGFR-LATS1/2 axis and confers resistance to EGFR-targeted drugs in head and neck squamous cell carcinoma (AXL は EGFR-LATS1/2 軸を介して YAP を活性化し、頭頸部扁平上皮癌における EGFR 標的薬への耐性を付与する)

*Oncogene*, 42(39), 2869-2877, 2023.

主指導教員：柳本 惣市教授

(医系科学研究科 口腔腫瘍制御学)

副指導教員：宮内 睦美教授

(医系科学研究科 口腔顎顔面病理病態学)

副指導教員：太田 耕司教授

(医系科学研究科 公衆口腔保健学)

岡本 健人

(医系科学研究科 医歯薬学専攻)

Hippo 経路とその下流の転写共役因子である Yes-associated protein (YAP) は、細胞の増殖、臓器形成において中心的な役割を担っている。YAP は Hippo 経路の活性化時には Large-tumor suppressor kinases 1 and 2 (LATS1/2) にリン酸化されて細胞質内に局在あるいは分解（不活性化）しているが、頭頸部扁平上皮癌（HNSCC）では Hippo 経路が不活性化し、YAP が脱リン酸化されて核内移行（活性化）している。先行研究で我々は上皮成長因子受容体（EGFR）が YAP 活性化に寄与することを明らかにした。しかし、EGFR 阻害薬単剤の効果は低く、耐性の原因として他の受容体型チロシンキナーゼ（RTK）が YAP の活性化に関与するとの報告があったが、詳細なメカニズムは不明であった。そこで私は YAP を活性化する新規の RTK を同定し、EGFR 阻害薬耐性に関わるメカニズムを解明することを目的として研究を行った。

#### 【材料と方法】

- 網羅的遺伝子発現解析：がん細胞株の CCLE (Cancer Cell Line Encyclopedia) と、がん組織の TCGA (The Cancer Genome Atlas) の RNA-seq データを用いて、58 種類の RTK に対してエンリッチメント解析（GSEA: Gene Set Enrichment Analysis）を行った。
- 細胞株：EGFR の遺伝子増幅を有する HNSCC 細胞株と EGFR に活性化変異を有する肺腺癌（LUAC）細胞株を使用した。CRISPR/Cas9 で LATS1/2 をノックアウト（KO）し、YAP の恒常的活性化を誘導した。
- 阻害薬：AXL 阻害薬は Bemcentinib, EGFR 阻害薬は Erlotinib を用いた。
- タンパク質発現と分子間相互作用解析：western blot 法と共免疫沈降法を行った。
- 遺伝子発現解析：qPCR 法で解析した。
- 細胞増殖能解析：cell viability assay を用い、相乗効果を bliss model で解析した。
- 薬剤感受性と遺伝子発現の相関解析：DEPMAP (The Cancer Dependency Map) を使用した。
- YAP の核・細胞質移行の解析：蛍光免疫染色法で観察した。

#### 【結果】

1. YAP 活性化を導く新規 RTK の同定  
CCLE と TCGA の RNA-seq データでエンリッチメント解析を行い、YAP 標的遺伝子群の発現の最も高い濃縮（最も低い p 値と False Discovery Rate）を示した RTK として AXL を同定した。
2. HNSCC と LUAC における AXL と EGFR のタンパク発現解析  
AXL, EGFR, および pEGFR のタンパク発現を確認したところ、AXL と EGFR を最も高発現していたのは HNSCC 株では HN6, LUAC 株では PC-9 細胞であった。
3. AXL 阻害薬が YAP へ与える影響の評価  
HN6 と PC-9 細胞に Bemcentinib を作用させると、YAP のリン酸化（不活性化）が濃度依存的に亢進した。Bemcentinib の前投与は、FBS 刺激が誘導する YAP 標的遺伝子の発

現を抑制した。また、Bemcentinib 投与により細胞生存率は低下した。一方、LATS1/2 KO 株では YAP 不活性化は抑制され、細胞生存率も改善した。PC-9 細胞でも同様の結果となった。DEPMAP の解析では、YAP 関連遺伝子の発現が Bemcentinib 耐性と正の相関を示した。

#### 4. AXL-EGFR ヘテロダイマーによる YAP 活性化の評価

HN6 と PC-9 細胞において、EGF 投与時に AXL と EGFR がヘテロダイマーを形成した。AXL を knockdown すると、control 群と比較して EGF 投与時の EGFR のリン酸化（活性化）が低下し、YAP 標的遺伝子の発現を抑制した。Erlotinib と Bemcentinib をそれぞれ作用させると YAP のリン酸化が生じ、両者併用時に YAP は相乗的にリン酸化された。2 剤併用時には相乗的な YAP 不活性化、YAP 標的遺伝子の発現低下、および核内 YAP の低下（細胞質への移行）が確認された。

#### 5. EGFR 阻害薬と AXL 阻害薬の併用効果の検証

HN6 と PC-9 細胞に Erlotinib と Bemcentinib を併用すると濃度依存的に細胞死が生じ、Bliss model で相乗効果が確認された。一方 LATS1/2 KO 細胞では相乗効果による細胞死が減弱し、YAP 標的遺伝子の発現量も低下したがコントロールよりも高い発現量を維持した。

#### **【結論】**

AXL が EGFR とヘテロダイマーを形成し、YAP 活性化を介して EGFR 阻害薬耐性を示す機構を明らかにした。HNSCC および LUAC にて、EGFR/AXL 阻害薬併用療法の有効性と予後の改善が期待される。

(1973 字)