

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（ 歯学 ）	氏名	岡本 健人
学位授与の条件	学位規則第 4 条第①・2 項該当		
論文題目			
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)			
論文審査担当者			
主 査	教授	柿本 直也	印
審査委員	教授	相川 友直	
審査委員	講師	重石 英生	
〔論文審査の結果の要旨〕			
研究目的			
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．本研究の先行研究では，上皮成長因子受容体 (EGFR) が YAP 活性化に寄与するメカニズムを明らかにした．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．そこで本研究は 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た．			
研究方法・研究結果			
1. YAP 活性化を導く新規 RTK の同定			
CCLE (Cancer Cell Line Encyclopedia) と 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) を行い，YAP 標的遺伝子群の発現と最も高い濃縮（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			
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．AXL, EGFR, および pEGFR のタンパク発現を Western blot 法で確認した．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が低下した。一方、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 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。薬剤耐性に関わる遺伝子が登録されている DEPMAP (The cancer dependency map) のデータを用いた解析では、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増殖抑制が減弱し、YAP 標的遺伝子の発現量は低下するものの、control 群よりも高い発現量を維持した。

以上より、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が明らかとなった。本研究から、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た。

以上の結果から、本論文は口腔外科学をはじめ歯科医学の発展に寄与するところが大きいものと評価される。よって審査委員会委員全員は、本論文が岡本 健人に博士 (歯学) の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。