

論文の全文要約

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)

岡本 健人

(医系科学研究科 医歯薬学専攻)

共著者

安藤俊範 (広島大学), 泉大樹 (国立がん研究センター)

小林進 (国立がん研究センター), 新谷智章 (広島大学)

J. Silvio Gudkind (カリフォルニア大学), 柳本惣市 (広島大学)

宮内睦美 (広島大学), 加治屋幹人 (広島大学)

【緒言・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。

【材料・方法】

抗体と試薬

抗 pEGFR (Y1068) (#2234, 1:5000)、EGFR (#4267, 1:5000)、pAXL (#5724, 1:500)、AXL (#8661, 1:5000)、pYAP (#13008, 1:2000)、YAP (#14074, 1:1000)、HA-tag (#3724, 1:1000)、および IgG コントロールは、Cell Signaling Technology 社 (Danvers, MA, USA) から購入した。β-アクチン (#A2228) と EGF (#E9644) は Sigma-Aldrich Inc (米国マサチューセッツ州バーリントン) から購入した。エルロチニブ (#HY-50896) および LATS1/2 阻害剤 (#HY-138489) は、MedChemExpress から購入した。セツキシマブは Merck 社 (ドイツ、ダルムシュタット) から購入した。Bemcentinib (S2841) は Selleck 社 (米国テキサス州ヒューストン) から購入した。

細胞培養とトランスフェクション

CAL27、CAL33、WSU-HN6、UM-SCC47 および HEK293A 細胞は、J Silvio Gutkind 教授のご好意によりご提供いただいた。HCC827、PC-9、II-18 および H1975 細胞は小林進教授のご厚意によりご提供いただいた。これらの細胞は STR プロファイリングにより同一性が確認された。これらの細胞はマイコプラズマ感染の有無を確認した。CAL27、CAL33、WSU-HN6、UM-SCC47 および HEK293A 細胞は DMEM (D-6429, Sigma-Aldrich Inc.) で、HCC827、PC-9、II-18 および H1975 細胞は 10%FBS 添加 RPMI1640 (30264-56, nacalai Tesque、京都、日本) で培養した。各培地は 10%FBS (Sigma-Aldrich Inc.) と 1% ペニシリン/ストレプトマイシンを添加した。

ウェスタンブロットティングおよび免疫沈降

ウェスタンブロットティングのために、細胞を冷 PBS で 2 回洗浄した後に回収し、 Halt™ Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail (#78440, ThermoFisher Scientific) を添加した RIPA 緩衝液 (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40) で溶解

した.溶解液を 5 秒間 3 回超音波処理し、氷上で 15 分間インキュベートした後、15 分間遠心した後、上清の濃度を測定した.等量のタンパク質を SDS-PAGE にロードし、膜に転写した.膜は TBS-T バッファー中 3%BSA で 20 分間ブロックした.その後、膜を TBS-T バッファー中 3%BSA または 5%脱脂乳で希釈した一次抗体と室温で 2 時間インキュベートした.TBS-T バッファーで 3 回洗浄後、膜を 2 次抗体 (HRP 標識ヤギ抗マウスまたは抗ウサギ IgG、1:3000、Cell Signaling Technology) とインキュベートし、TBS-T バッファー中 5%脱脂乳で希釈し、室温で 1 時間インキュベートした.検出には Immobilon Western Chemiluminescent HRP substrate (Millipore, MA, USA)を用いた.免疫沈降には、プロテアーゼおよびホスファターゼ阻害剤 (#78444 Thermo Fisher Scientific, CO) および 1 mM DTT を含む CHAPS 緩衝液 (1% CHAPS、30 mM Tris-HCl、150 mM NaCl) で細胞を溶解し、氷上で 15 分間インキュベートした後、16,000 g、4°Cで 15 分間遠心した.上清を一次抗体とともに 4°Cで 24 時間インキュベートした後、プロテイン A アガロースビーズとともに 4°Cで 1 時間インキュベートした.ビーズを遠心分離し、CHAPS 緩衝液で 5 回洗浄した後、サンプル緩衝液で煮沸した.ビーズを遠心分離し、上清をウェスタンブロッティングに用いた.デンシトメトリーは ImageJ ソフトウェアで解析した.

GSEA (遺伝子セット濃縮解析)

CCLC と TCGA のデータセットを GSEA(Broad Institute, <http://software.broadinstitute.org/gsea/index.jsp>)で 1000 回の順列、遺伝子あたりの RNA-seq リードカウントの "Pearson "指標、15-500 の遺伝子セットサイズフィルターを用いて解析した.MSigDB の "C6 "遺伝子セットデータベースに "DUPONT: YAP"をスパイクした.

RNA 単離と real-time PCR

RNA は RNeasy Mini Kit を用い、製造者の指示に従い抽出した (#74104, Qiagen, Hilden, Germany) .Super Script™ IV VILO™ Master Mix cDNA 合成キットを用いて、1 μg の全 RNA を cDNA 合成に用いた.Real-time PCR は Fast SYBR™ Green Master Mix(#4385612, Applied Biosystems)を用いて行った.実験は N = 3 で行った.

以下のプライマーを用いた.gapdh f: 5'-gagtcacacggatttggtcgt-3', r: ttgattttggggatctcg-3'; ctgf f: 5'-gtttgccagaccaacta-3', r: ggctctgcttctagcctg-3'; cyr61 f: 5'-caggactgtgaagatgcggt-3', r: gcctgtagaagaaacgct-3'.

細胞生存率アッセイ

細胞を 96 ウェルプレートに 1 ウェル当たり 2000 個播種し、試薬で 3 日間処理した.Cell titer blue reagent™ (#G8081, Promega) を培地に塗布し、2 時間インキュベートした後、マイクロプレートリーダーを用いて吸光度を測定した.Bliss 独立性モデルを用いて、組み合わせ指数 (CI) を $\log_2[E_{a,b}/(E_a \times E_b)]$ として算出した. E_a と E_b はそれぞれ、ある濃度における薬物 A と B の作用である. $E_{a,b}$ は、同じ濃度における薬物 A と B の複合効果である.CI が < 0 は相乗効果を示し、> 0 は拮抗効果を示す.実験は N = 5 で行った.

免疫蛍光染色

細胞をカバースリップ上に播種し、約 80%コンフルエントになるまで増殖させた。細胞を 4%パラホルムアルデヒドで 37°C、20 分間固定し、氷冷 PBS で 2 回リンスした後、PBS 中 200mM グリシン含有 0.5% Triton X-100 で 37°C、15 分間透過処理した。PBS で 3 回すすいだ後、カバースリップを PBS 中 3% BSA で 1 時間インキュベートした。YAP に対する一次抗体とウサギ IgG に対する Alexa Fluor 594 二次抗体 (Molecular Probes, Eugene, OR) を用いた。核染色には DAPI (Molecular Probes, Eugene, OR) を用いた。細胞標本の免疫染色は、CCD カメラを取り付けた IX73 顕微鏡 (オリンパス株式会社、東京、日本) を用いて記録した。各フィールドには 50-100 個の細胞が含まれていた。各条件で 5 フィールドを測定した。

統計解析

すべてのデータは GraphPad Prism version 9 (GraphPad Software, CA, USA) を用いて解析した。データは、Student's t-test (両側) および Tukey-Kramer post hoc test を用いた分散分析 (ANOVA) を用いて、あるいは図の凡例に示したように分析した。すべての実験は独立して 3 回繰り返され、同様の結果が得られた。

【結果・考察】

YAP 活性化を導く新規 RTK の同定

CCLLE (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。

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。

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。

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。

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。

YAP/TEAD 駆動型転写は、アクチベーター・プロテイン-1 (AP-1)、プロモドメイン含有タンパク質 4 (BRD4)、AT-rich interaction domain 1 A (ARID1A)、リジン特異的脱メチル化酵素 1 (LSD1) などの他の因子によっても増強されることが示唆されている。EGFR 阻害剤と AXL 阻害剤は下流シグナル伝達経路に影響を与えるため、YAP 活性化機構が影響を受け、LATS1/2 KO 細胞においても AXL 阻害と EGFR 阻害後の CTGF/CYR61 発現の減少に寄与した可能性がある。LATS1/2 阻害剤で処理した PC-9 細胞では CTGF/CYR61 の発現は減少しなかったことから、CTGF/CYR61 への影響は細胞依存的であることが示唆される。

がん細胞における AXL の発現制御に関しては、骨髄性ジンクフィンガー1 (MZF1)、低酸素誘導因子 1 (HIF1)、AP-1、特異性タンパク質-1 (Sp1) が転写因子として報告されている一方、AXL も YAP 標的遺伝子としてよく知られている。従って、過剰発現した AXL と EGFR が YAP を活性化し、活性化した YAP が AXL の転写を促進するという正のフィードバックループが存在する可能性がある。しかしながら我々の結果は、WSU-HN6 細胞株では YAP 活性化が AXL の転写を増加させなかったことを示している。このことは、EGFR 阻害剤に耐性を示す細胞や組織における AXL の過剰発現が、YAP を介した AXL 活性化の結果ではなく他の機序によって誘導されることを示唆している。がん細胞が AXL を過剰発現して EGFR 阻害剤に対する耐性を獲得する未知のメカニズムを明らかにするためには、さらなる研究が必要である。

AXL と EGFR の相互作用はよく知られているが、その結合部位やリン酸化部位は完全には解明されていない。AXL の Y702 におけるリン酸化は Erlotinib 治療によって抑制された。我々の結果と一致して、EGFR バリエント III (EGFRvIII) を保有する神経膠芽腫細胞の大規模なリン酸化チロシン解析により、Y702 が EGFR によってリン酸化される部位であることが同定された。また、Bemcentinib が EGFR の Y1068 リン酸化を減少させたことから、AXL が EGFR の自己リン酸化を促進することが示唆された。以上より、AXL と EGFR

は互いに刺激し合って活性化し、それによって EGFR-LATS1/2-YAP 経路を相乗的に促進することが示唆された。

選択的 AXL 阻害剤は前臨床試験および臨床試験で試験されている。Bemcentinib (R-428 または BGB324) は、神経膠芽腫、トリプルネガティブ乳癌、黒色腫、膵臓癌、急性骨髄性白血病、骨髄異形成症候群、非小細胞肺癌、中皮腫を含む様々な癌の患者を対象に第 I 相または第 II 相試験が行われている。(NCT03824080, NCT03184571, NCT03649321, NCT02488408, NCT03965494, NCT02922777, NCT03184558, NCT02872259, NCT02424617, NCT03654833) 。DS-1205b と ONO-7475 は、EGFR 変異非小細胞肺癌における EGFR TKI 耐性を克服する他の選択的 AXL 阻害剤である。最近では、肺癌やトリプルネガティブ乳がんにおける抗生物質耐性を克服するために、最新の高活性かつ選択的な AXL 阻害剤である ER-851 が開発された。我々は、AXL 阻害剤と EGFR 阻害剤を併用すると、HNSCC および LUAC 細胞株において、YAP の不活性化と CTGF/CYR61 発現の低下を通じて細胞生存率が有意に低下することを示し、AXL が EGFR 阻害剤に対する耐性を誘導することを示唆した。しかしながら、DS-1205b、ONO-7475、ER-851 の単剤療法は、*in vivo* 異種移植モデルにおいて腫瘍増殖を縮小させることができず、EGFR 標的療法との併用でのみ有効であった。しかし、*in vitro* 試験において、AXL の下流シグナルはこれらの薬剤によって抑制された。我々のデータは、AXL 阻害剤と EGFR 阻害剤の相乗効果が、LATS1/2 KO が介在する YAP の過剰活性化によって減弱されることを示し、YAP 阻害が AXL/EGFR 共阻害の必要な下流標的であることを示す証拠となった。

【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。