

研究報告書
令和4年度：A課題

2024年4月30日

公益財団法人 がん研究振興財団

理事長 堀田知光 殿

研究施設 広島大学病院 口腔検査センター

住所 広島県広島市南区霞 1-2-3

研究者氏名 安藤 俊範

(研究課題)

AXLを標的とするペプチドを用いた新たながん治療法の開発

令和5年4月1日付助成金交付のあった標記A課題について研究が終了致しましたのでご報告いたします。

1. 研究の背景

頭頸部扁平上皮癌や肺腺癌において、受容体型チロシンキナーゼ (RTK) の EGFR は遺伝子増幅や変異により活性化している。代表者は、EGFR が癌遺伝子の YAP を活性化させ、増殖を促す機構を解明した (Ando T et al, Commun Biol, 2021)。さらに、同じく RTK の AXL は、EGFR とヘテロ二量体を形成し、EGFR の活性化を介して YAP を活性化させ、EGFR 阻害薬に対する耐性を付与する分子機構を解明した。よって EGFR 阻害薬に対する耐性獲得を防ぐには、AXL 阻害薬を併用する治療が有効であることを示した (Okamoto K et al, Oncogene, 2023)。しかしながら、AXL 阻害薬はまだ実臨床の場に登場していない。そこで代表者は、EGFR と AXL のヘテロ二量体形成をペプチドで阻害することで、EGFR 阻害薬への耐性獲得を防ぐことが可能ではないかとの着想に至った (図 1)。

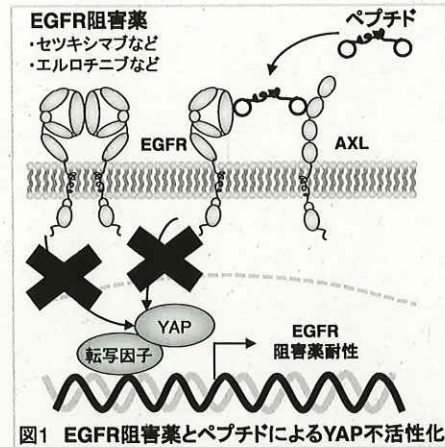


図1 EGFR阻害薬とペプチドによるYAP不活性化

2. 研究の目的

本研究の目的は、EGFR と AXL の結合を防ぐペプチドを開発し、EGFR 阻害薬と併用して YAP を不活性化することで耐性獲得を防ぐ新たな治療法へ展開することである。

3. 研究の結果

1. EGFR と AXL の結合部位の同定

EGFR と AXL の高発現を示す口腔扁平上皮癌 (OSCC) 株の WSU-HN6 細胞を用いて、活性化した EGFR が AXL と結合していることを既に確認している (図 2)。そこでこの共免疫沈降法を用いて、EGFR と AXL の主な結合部位を同定しようと試みた。

- まず AXL のプラスミドを用いて、細胞外ドメインの欠失変異体を作成した。変異体 1 は 1 個のドメインを、変異体 2 は 3 つのドメインを欠損している (図 3)。
- AXL のコントロール、欠失変異体 1、および欠失変異体 3 を EGFR が過剰発現した HEK293 (EGFR-HEK293A) にて過剰発現させた。さらに EGF 20ng/mL を 1 時間作用させて、抗 AXL 抗体を用いて共免疫沈降を行なった。AXL のコントロールに対して、AXL の変異体 1 ではリン酸化 EGFR が減少し、AXL 変異体 2 ではさらにリン酸化 EGFR が減少した。変異体 1 だけで十分なリン酸化 EGFR の低下が見られたことから、結合に重要な部位として 1 つのドメインに絞り込んだ (図 4)。

2. recombinant AXL の作成と作用

AXL の細胞外ドメインの一つで、C 末端側に His タグをつ

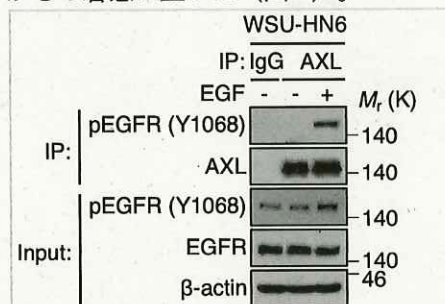


図2 共免疫沈降によるAXLとEGFRの結合

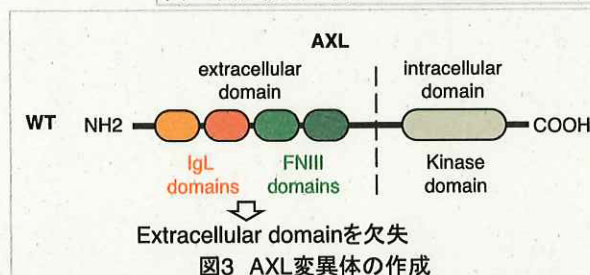


図3 AXL変異体の作成

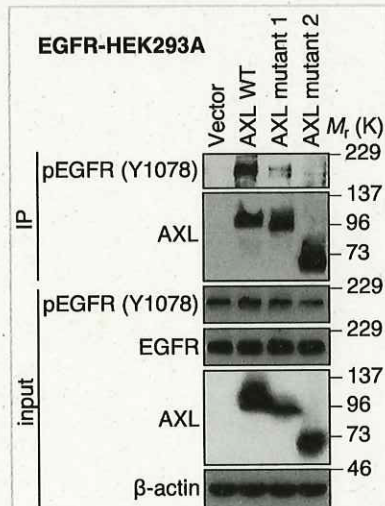


図4 AXL変異体とEGFRの結合

けた recombinant AXL を作成した。

- recombinant AXL の濃度を上げていくと、EGFR のリン酸化が減弱することを認めた (図 5)。
- recombinant AXL は EGF 刺激誘導性の YAP/TAZ 活性化による CTGF の増加を抑制した (図 6 左)。
- recombinant AXL を投与し共免疫沈降を行なった。抗 His-tag 抗体で免疫沈降すると、AXL との結合を確認した (図 6 中央)。抗 EGFR 抗体で免疫沈降すると、recombinant AXL の結合を確認した。また EGF で刺激した際にも結合していることを確認した (図 6 右)。

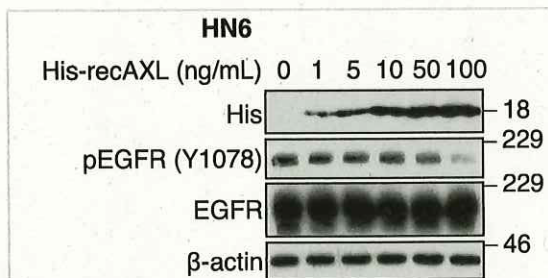


図5 recombinant AXLのEGFR抑制作用

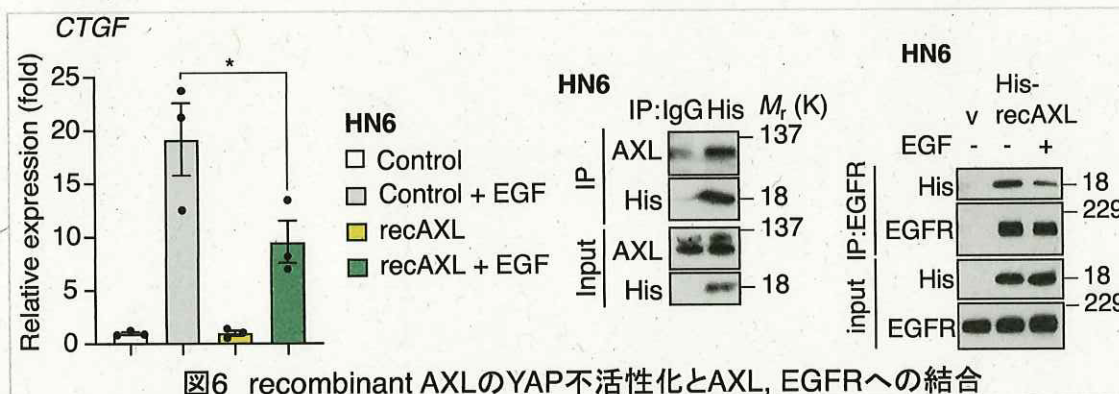


図6 recombinant AXLのYAP不活性化とAXL, EGFRへの結合

4. 考察と今後の展望

本研究より、EGFR と AXL のヘテロ二量体形成における結合部位を同定した。AXL の細胞外ドメインの一部を利用したリコンビナントタンパクが EGFR と AXL の両者に結合し、EGFR の活性化を防ぎ、結果的に YAP/TAZ の活性化も抑制できることを見出した。今後、リコンビナントタンパクから機能性を保持したさらに短いペプチド配列に絞り込むことで、EGFR-AXL 二量体形成を阻害できる新たなペプチド創薬へと発展させていく予定である。

5. 謝辞

公益財団法人がん研究振興財団からのご支援を賜り、本研究を遂行することができました。この場をお借りして深謝いたします。