

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：34519

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K18225

研究課題名(和文) アンチエイジング遺伝子Klotho発現に基づく新たな肺癌治療法の構築

研究課題名(英文) A new strategy of adjuvant chemotherapy for lung cancer based on the expression of anti-aging gene Klotho

研究代表者

竹ヶ原 京志郎 (Takegahara, Kyoshiro)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：90809534

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、「アンチエイジング遺伝子」Klotho発現と癌細胞の上皮間葉転換(EMT)の関連について検討した。細胞実験でKlotho過剰発現細胞に対する薬剤感受性について、Pemetrexedが親株に比して優位に感受性をみとめた。また、N-cadherinはPemetrexedにより誘導されるが、Klotho過剰発現細胞ではN-cadherinの発現が完全に抑制されており、Pemetrexed曝露によりKlotho蛋白発現が上昇するといった相乗効果もみとめた。mRNA解析ではKlotho過剰発現細胞株でlipocalin-2の発現が亢進し、肺癌におけるEMTを制御している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はKlotho遺伝子が肺腺癌におけるEMTの抑制因子であることを発見した最初の研究である。肺腺癌細胞株へのKlotho遺伝子の導入によってN-cadherinの発現が完全に抑制された。これは、Klotho遺伝子が癌細胞の浸潤・進行に重要な役割を果たしていると考えられているカドヘリンスイッチを抑制していることを示している。また、薬剤感受性試験からKlotho遺伝子がペメトレキセドの感受性因子であることも明らかになった。このことは、将来的に肺癌治療においてKlotho遺伝子の発現の有無により、選択的にペメトレキセドを使用するという個別化医療を可能にするものである。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the relationship between the "anti-aging gene" Klotho expression and epithelial-mesenchymal transition (EMT) of cancer cells. In cellular experiments, Pemetrexed was found to be predominantly sensitive to drugs against Klotho overexpressing cells compared to the parental strain. N-cadherin is induced by Pemetrexed, but N-cadherin expression is completely suppressed in Klotho-overexpressing cells. mRNA analysis showed that the expression of Klotho protein was upregulated by Pemetrexed exposure, and that the expression of lipocalin-2 expression was enhanced by Pemetrexed. Klotho overexpressing cell lines showed enhanced lipocalin-2 expression, suggesting that Klotho overexpression may regulate EMT in lung cancer.

研究分野：呼吸器外科学

キーワード：Klotho EMT lipocalin-2 肺癌

1. 研究開始当初の背景

肺癌は、世界の癌関連死因の第1位である。しかし、その治療成績は必ずしも満足のいくものではない。肺癌の治療転帰を改善するためには、個々の症例に応じて効果的な化学療法レジメンを確立し、個別化された治療の実践が必要である。上皮間葉転換(EMT)は、癌細胞の転移・浸潤能力に重要な役割を果たすと考えられている。癌の多様性、耐性獲得に関連する EMT のメカニズムを解明することは、新しい癌治療につながる可能性がある。我々が注目した Klotho 遺伝子は、もともと高血圧マウスモデルの作成中に発見された。Klotho 遺伝子に変異を持つマウスは、ヒトの老化に似た症状を示し、臓器の萎縮や血管の石灰化、骨粗鬆症、肺気腫、認知症などの複数の障害を発症する。Klotho 遺伝子はアンチエイジングだけでなく、乳癌、膵臓癌、卵巣癌、肺癌、大腸癌、メラノーマなどの多くの種類の癌の増殖や浸潤にも関連している。我々は、Klotho 遺伝子が肺癌の転移・浸潤能にも関与しているのではないかと仮説を立てた。我々はこれまでに、小細胞肺癌(SCLC)および大細胞神経内分泌癌(LCNEC)患者における Klotho 発現と全生存期間との関連を報告した。また、Klotho 発現は SCLC および LCNEC 患者において術後の予後因子であることも示した。加えて、扁平上皮癌では Klotho 発現が EMT 関連分子と関連していることも明らかにした。

2. 研究の目的

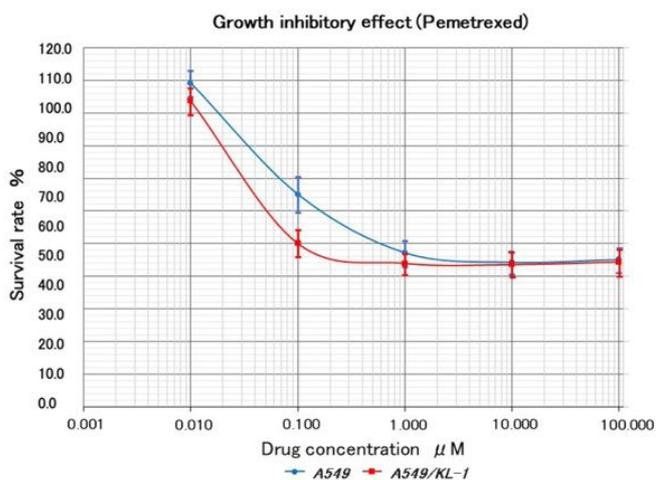
本研究では、肺腺癌における Klotho 遺伝子と癌転移との関連に着目した。特に Klotho 遺伝子の機能を解析し、転移過程の一部である EMT の制御との関連性を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

GFP-Klotho プラスミドを肺腺癌細胞(A549)にトランスフェクションし、安定に発現する細胞株(A549/KL-1)を樹立した。A549、A549/KL-1 細胞株を用いてウェスタンブロッティングにより Klotho タンパク、および上皮間葉転換関連タンパク(E-cadherin、N-cadherin、vimentin、Snail)を評価した。また A549 細胞および A549/KL-1 細胞を用いて、アフマチニブ、カルボプラチン、セリチニブ、シスプラチン、ドセタキセル、ゲフィチニブ、オシメルチニブ、パクリタキセル、およびペメトレキセドを含む種々の抗がん剤に対する感受性試験を行った。続けて A549 細胞および A549/KL-1 細胞の遺伝子発現に関して cDNA マイクロアレイを用いて解析した。

4. 研究成果

ウェスタンブロッティングでは、A549/KL-1 細胞株は Klotho タンパクの高い発現レベルを有していたが、親株である A549 細胞は Klotho タンパクを全く発現していなかった。また、間葉系マーカーである N-cadherin の発現は、A549/KL-1 細胞株では完全に抑制されており、Klotho の過剰発現は、Vimentin や上皮マーカーである E-cadherin の発現に影響を与えなかった。薬剤感受性試験では A549/KL-1 細胞は、A549 細胞と比較してペメトレキセドに対して高い感受性を示し、IC50 値は A549/KL-1 細胞では 0.1 μ M、A549 細胞では 0.7 μ M であった。ペメトレキセドに対する感受性については、A549 細胞と A549/KL-1 細胞の間で IC50 に有意な差が認められた(図1)。

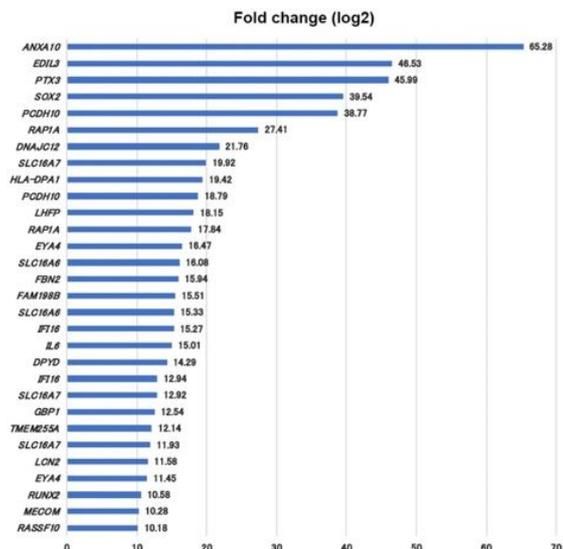


次にペメトレキセド曝露後の Klotho および EMT 関連タンパク質の発現を調べた。注目すべきは、A549 細胞と A549/KL-1 細胞にペメトレキセドを様々な用量で曝露したところ、A549/KL-1 細胞

胞ではKlotho発現が用量依存的に増加したことである。これらの知見は、Klotho 発現が癌細胞のペメトレキセドに対する感受性に関係していることを示唆している。次にマイクロアレイ解析で、A549 細胞と A549/KL-1 細胞で発現に差がある遺伝子を調べた。その結果、変化値の高い上位 30 遺伝子を評価したところ、ペメトレキセド関連遺伝子である lipocalin-2(LCN2)が Klotho 遺伝子の導入によりアップレギュレーションされていることがわかった。これらの結果から、Klotho 遺伝子の発現が LCN2 の調節に重要な役割を果たしている可能性が示唆された (図 2)。

我々の知る限りでは、本研究は Klotho 遺伝子が肺腺癌における EMT の抑制因子であることを発見した最初の研究である。肺腺癌細胞株への Klotho 遺伝子の導入によって N-cadherin の発現が完全に抑制されていることが確認できた。これは、Klotho 遺伝子が癌細胞の浸潤・進行に重要な役割を果たしていると考えられているカドヘリンスイッチを抑制していることを示している。また、薬剤感受性試験から Klotho 遺伝子がペメトレキセドの感受性因子であることも明らかになった。このことは、将来的に肺癌治療において Klotho 遺伝子の発現の有無により、選択的にペメトレキセドを使用するといった個別化医療を可能にしうるものである。そのメカニズムに関して、マイクロアレイ解析により、Klotho 遺伝子のペメトレキセドの抗腫瘍効果には、LCN2 を介した N-cadherin 発現の調節という新たな作用機序が存在すると考えられた。

肺癌における Klotho の発現の評価は、ペメトレキセドの有効性の予測因子として、そして術後の補助化学療法における個別化医療の選択の要素として大きな可能性を秘めている。ペメトレキセド、EMT、Klotho 遺伝子との関連を検討した本研究の知見は、新たな肺癌治療への足がかりとなる可能性がある。



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 Takegahara Kyoshiro, Usuda Jitsuo, Inoue Tatsuya, Sonokawa Takumi, Matsui Takuma, Matsumoto Mitsuo	4. 巻 21
2. 論文標題 Antiaging gene Klotho regulates epithelial-mesenchymal transition and increases sensitivity to pemetrexed by inducing lipocalin-2 expression	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2021.12679	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 竹ヶ原京志郎、松本充生、松井琢真、井上達哉、白田実男
2. 発表標題 アンチエイジング遺伝子 Klotho 発現を利用した分子標的治療の可能性
3. 学会等名 第 119 回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹ヶ原京志郎、松本充生、園川卓海、井上達哉、白田実男
2. 発表標題 アンチエイジング遺伝子 Klotho発現に基づく新しい肺がん個別化治療戦略
3. 学会等名 第57回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kyoshiro Takegahara, Jitsuo Usuda
2. 発表標題 Expression of Anti-Aging Gene, Klotho Is a Surrogate Marker of Pemetrexed for Lung Cancer Treatment
3. 学会等名 IASLC 2019 World Conference on Lung Cancer（国際学会）
4. 発表年 2019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
---------	---------