

令和 5 年 5 月 1 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08567

研究課題名（和文）PLC を標的とした呼吸器疾患の新たな治療法の構築

研究課題名（英文）Development of a new therapeutic method for respiratory diseases targeting PLCepsilon

研究代表者

永野 達也（Nagano, Tatsuya）

神戸大学・医学研究科・講師

研究者番号：80624684

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）： rasがん遺伝子産物Rasの標的蛋白質の一つであるホスホリパーゼC（PLC）は当研究科が発見し、セカンドメッセンジャーの産生を通じてシグナル伝達に関与し、またNF- κ Bを介する炎症や発がんに関与することを報告してきた。PLC は炎症性疾患や炎症を介するがんの有望な分子標的として注目されてきている。

本研究では、PLC 遺伝子改変K-ras（LSL-K-rasG12V/PLC x/x）マウスモデルを作成した。また、ルイス肺がん由来細胞株（LLC）による皮下移植マウスモデルを作成し、PLC のKOにより腫瘍増殖が抑制され、生存率が良い傾向があることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

rasがん遺伝子産物Rasの標的蛋白質の一つであるPLC は炎症や発がんに関与することを報告してきた。本研究は、PLC を介した呼吸器疾患の新たな発病機序を、K-ras遺伝子変異陽性非小細胞肺癌（NSCLC）の疾患モデルを用いて明らかにし、呼吸器疾患の新たな治療戦略を構築することを目的としている。ras誘導性のがんはヒトの悪性腫瘍の約20%と極めて高頻度に認められている。本研究成果はNSCLCの新規治療法の開発に寄与するだけでなく、K-ras遺伝子変異が関与する複数のがん種に応用展開され、生命予後を改善するものとして期待される。

研究成果の概要（英文）：We have reported that phospholipase C（PLC），one of the target proteins of the ras oncogene has a crucial role in signal transduction through the production of second messengers and that PLC has a role in inflammation and carcinogenesis through NF- κ B. Then, PLC is thought to be promising molecular target for inflammatory diseases and inflammation-mediated cancer.

In this study, we generated a PLC gene-modified K-ras（LSL-K-rasG12V/PLC x/x）mouse model. We also created a mouse model subcutaneously transplanted with a Lewis lung cancer-derived cell line（LLC），and showed that knock out of PLC suppressed tumor growth and tended to improve the survival rate.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：肺がん PLC ras

1. 研究開始当初の背景

1. PLC の生化学的特徴と発現部位

PLC は低分子量 GTP 蛋白質 Ras/Rap の標的タンパク質 (エフェクター) の一つとして、当研究科において同定され、さらに炎症・発がんへの関与が明らかにされた分子である。PLC は G 蛋白質共役受容体やチロシンキナーゼ型受容体等の細胞膜受容体の下流で活性化する。活性化した PLC はその基質であるホスファチジルイノシトール 2 リン酸を加水分解して、セカンドメッセンジャーのジアシルグリセロール (DAG) とイノシトール 3 リン酸 (IP3) を産生し、それぞれプロテインキナーゼ C (PKC) などの活性化と細胞内の貯蔵カルシウム動員に機能している (Edamatsu H. *et al*, *Methods Enzymol*, 2006)。PLC は肺を含めて複数の臓器に発現が認められる。細胞レベルでは上皮間葉系の細胞には発現が認められるが、免疫系の細胞には発現が認められない。

2. PLC の炎症における役割とがんへの関与

近年、申請者らは、PLC が上皮細胞 (がん細胞を含む) において、NF- κ B 経路の活性化を介して、炎症性サイトカインの発現を誘導することを明らかにした (図 1, Nagano T. *et al*, *PLoS One*, 2014, Wakita M. *et al*, *J Biol Chem*, 2016)。また、PLC のリパーゼ活性を欠損させたノックアウト (KO) マウスを用いた発がんモデル (Bai Y. *et al*, *Cancer Res*, 2004, Li M. *et al*, *Carcinogenesis*, 2009) により PLC ががんに関与していることを報告してきた。

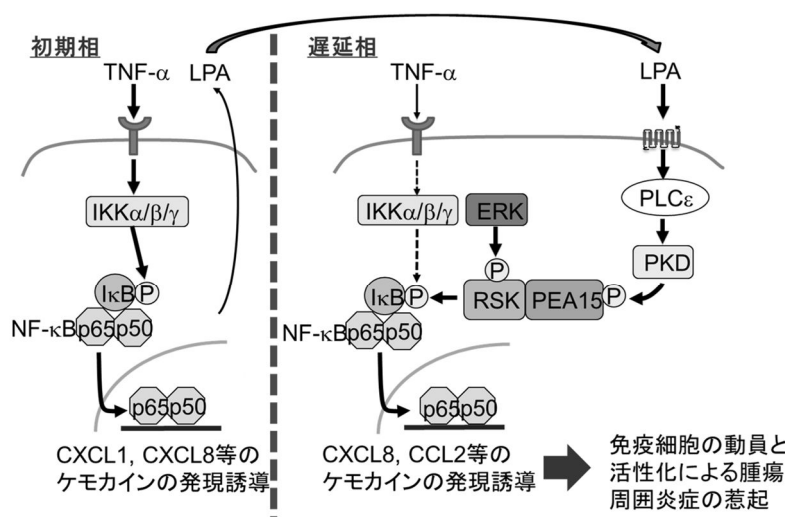


図1. 炎症におけるPLCεの役割

3. 呼吸器疾患の Unmet Clinical Needs と PLC 阻害剤の可能性

ras 誘導性のがんもヒトの悪性腫瘍の約 20% と極めて高頻度に認められているが、いまだ有効な治療法がない。そこで、申請者のこれまでの研究実績を踏まえ、PLC 選択的阻害剤の治療標的の候補となりうる「K-ras 遺伝子変異

陽性 NSCLC の発症機序において PLC がどのように関与しているのか」を明らかにすることを研究の主眼として本研究を立案した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、K-ras 遺伝子変異陽性の NSCLC における PLC の役割を明らかにし、PLC がこの治療標的になりうるかを明らかにすることである。

3. 研究の方法

実験 1. PLC 遺伝子改変 K-ras 発がんモデルの作成

申請者の施設で飼育している PLC の KO マウスと、三重大学の鈴木昇准教授より提供を受け飼育を開始している LSL-K-ras (LoxP-STOP-LoxP-K-Ras^{G12V}) マウスを交配させ、PLC 遺伝子改変 K-ras (LSL-K-ras^{G12V}/PLC^{x/x}) マウスモデルを作成した後、Cre 発現アデノウイルスを経気道的に感染させ、PLC 遺伝子改変 K-ras (K-ras^{G12V}/PLC^{x/x}) 発がんマウスモデルを作成する。遺伝子型はジェノタイピングにより確認する。

実験 2. PLC のがん細胞非自律的な機能の解析

ルイス肺がん由来細胞株の皮下移植による担がんマウスモデルも作成して腫瘍増殖抑制試験と生存率のカプランマイヤー曲線による解析を行う。

実験 3. PLC のがん細胞自律的な機能の解析

3 種類の Kras 遺伝子変異陽性 NSCLC 細胞株 (A-549, Calu-1, SW900) に、PLC に対する 2 種類の siRNA をトランスフェクションさせ (Cui XB. *et al*, *Oncotarget*, 2016) PLC をノックダウン (KD) して以下の解析を行う。

増殖能の解析：親株と PLC の KD 株をプレートに撒き、24、48、72、96 と 120 時間後 MTT 色素で染色して 490 nm の吸光度を測定し、両者を比較する (MTT アッセイ)。

細胞浸潤能・転移能の解析：親株と siRNA 導入 48 時間後の細胞株を 5×10^4 個ずつバイオコートマトリゲル細胞浸潤チャンバー (細胞浸潤アッセイ) 或いは、マトリゲルコートされていないチャンバー (細胞遊走アッセイ) に撒き、4 時間後にマトリゲル基底膜マトリックスを通過してコンパニオンプレートに接着した細胞のコロニーの個数を計測する。

アポトーシスの解析：親株と siRNA 導入 48 時間後の細胞株を用いて、ウェスタン・ブロットでアポトーシス関連タンパクの発現を親株と PLC の KD 株とで比較を行う。発現に差が見られない場合にはネクロスタチンを用いてネクロトーシスの関与を解析する。

4. 研究成果

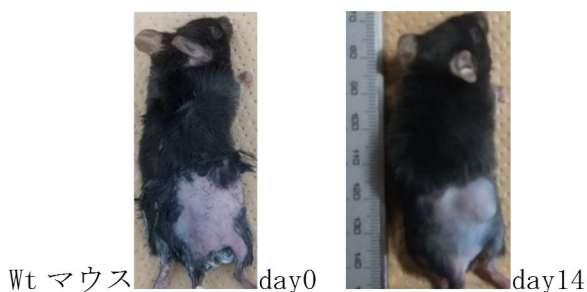
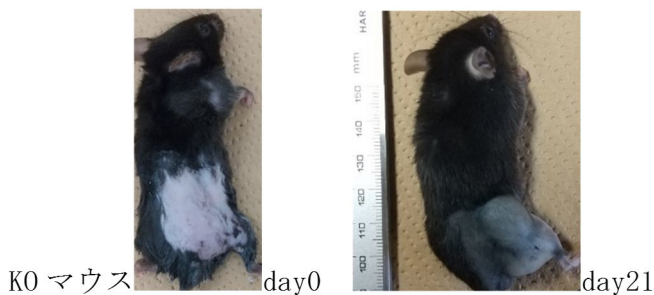
実験 1. PLC 遺伝子改変 K-ras 発がんモデルの作成

申請者の施設で飼育している PLC の KO マウスと、三重大学の鈴木昇准教授より提供を受け飼育を開始している LSL-K-ras (*LoxP-STOP-LoxP-K-Ras^{G12V}*) マウスを交配させ、LSL-Kras^{G12V}/-/PLC^{x/WT} mice を作成した。上記マウス同士の交配を行い PLC 遺伝子改変 K-ras (LSL-K-ras^{G12V}/PLC^{x/x}) マウスモデルを作成した。

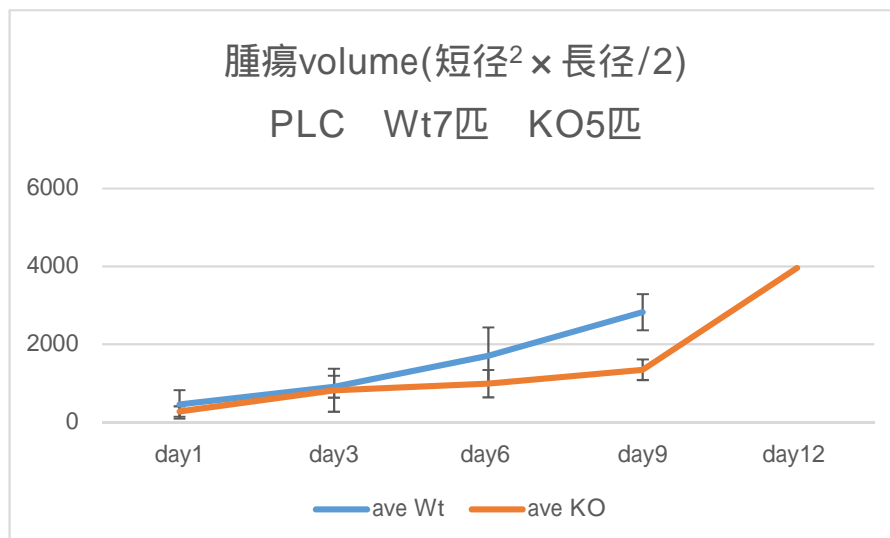
実験 2. PLC のがん細胞非自律的な機能の解析

ルイス肺がん由来細胞株 (LLC) による皮下移植がんマウスモデルの作成

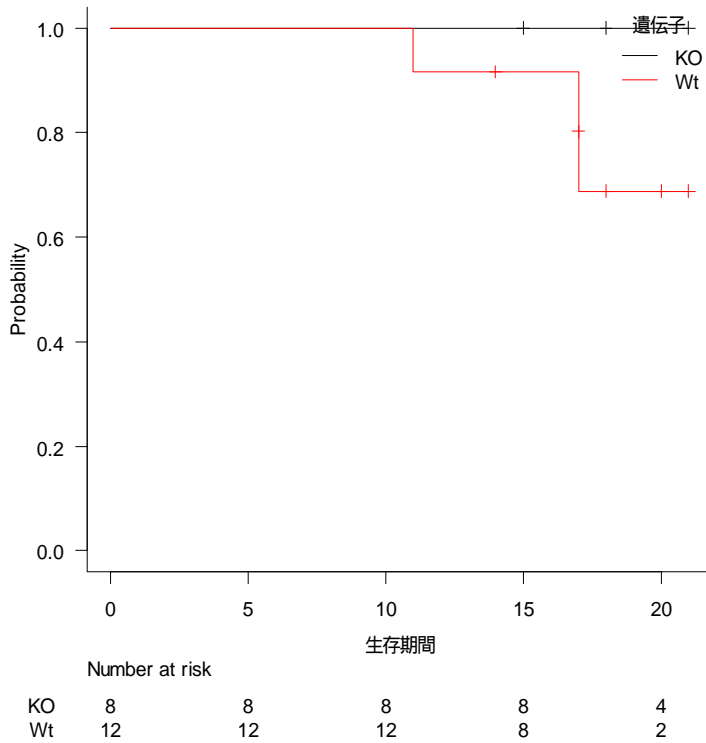
LLC 5.0×10^5 個を PBC100 μ L に溶かして PLC 野生型 Wt マウスとノックアウト KO マウスの臀部に皮下注射腫瘍の定着を確認、腫瘍径を測定した。長径 ≥ 20 mm で安楽死させて腫瘍を摘出した。



- ・腫瘍 volume 推移
(腫瘍 volume ≥ 100 を確認した日を day1)



・生着したマウスの生存期間（安楽死は死亡に含めず）(PLC Wt12 匹 KO8 匹) p=0.112

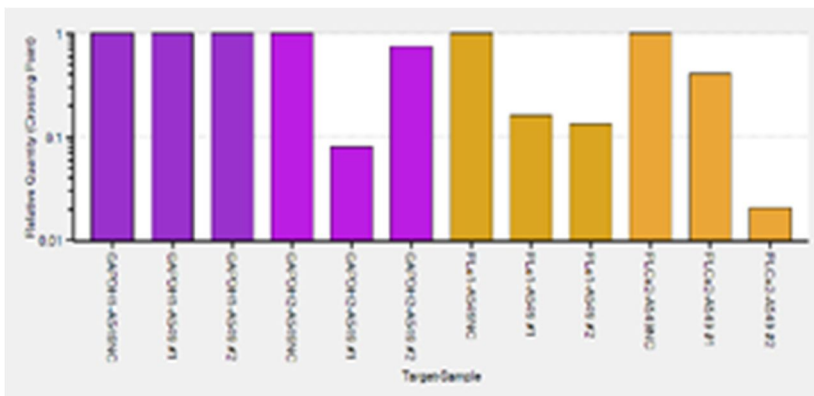


実験 4 . PLC のがん細胞自律的機能の解析

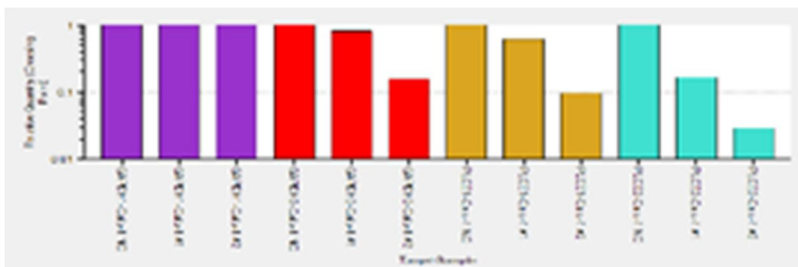
3 種類の Kras 遺伝子変異陽性 NSCLC 細胞株 (A-549、Calu-1、SW900) に、PLCε に対する 2 種類の siRNA をトランスフェクションさせ (Cui XB. *et al*, Oncotarget, 2016)、PLCε をノックダウン (KD) した。

SiRNA でトランスフェクション後 real time PCR

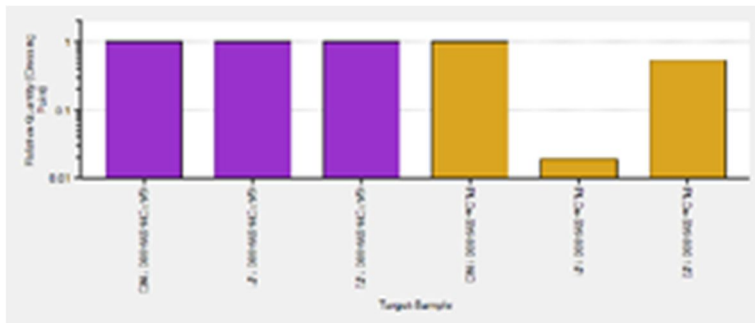
A549



Calu-1



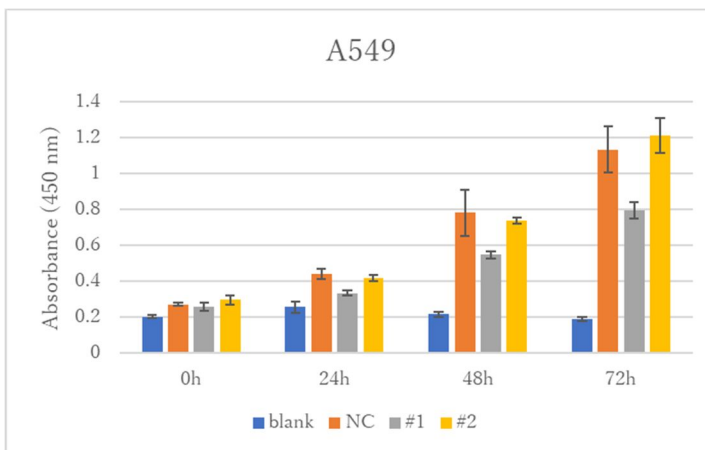
SW-900



各細胞が PLC がノックダウンされていることを確認した。

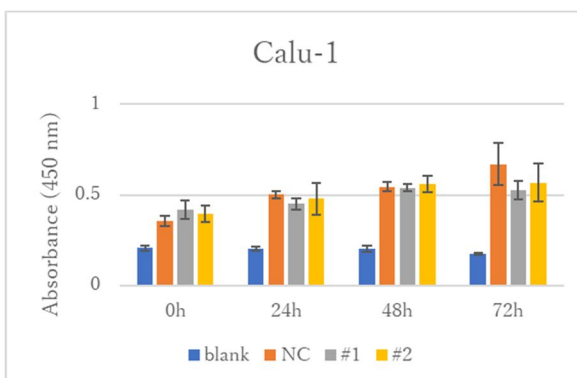
増殖能の解析：親株と PLC ϵ の KD 株をプレートに撒き、24、48、72、96 と 120 時間後 MTT 色素で染色して 490 nm の吸光度を測定し、両者を比較する (MTT アッセイ)。

A549

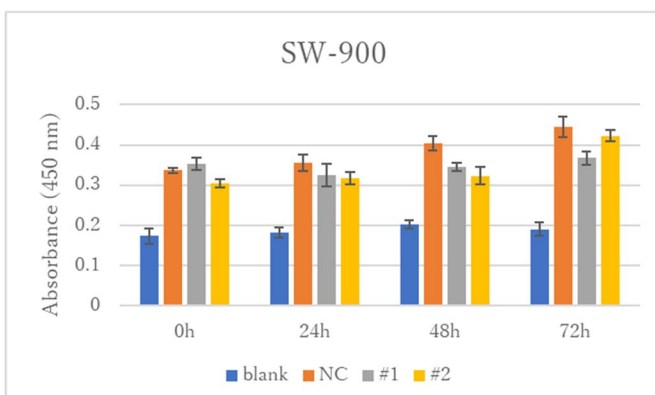


再現性をもって # 1 は増殖能が低下していた

Calu-1



SW-900



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Bao Minwei, Huang Yuxia, Lang Zhongping, Zhao Hui, Saito Yuichi, Nagano Tatsuya, Kawagoe Izumi, Divisi Duilio, Hu Xiaoyi, Jiang Gening	4. 巻 11
2. 論文標題 Proteomic analysis of plasma exosomes in patients with non-small cell lung cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Translational Lung Cancer Research	6. 最初と最後の頁 1434 ~ 1452
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21037/tlcr-22-467	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 -

1. 著者名 Suraya Ratoe, Tachihara Motoko, Nagano Tatsuya, Nishimura Yoshihiro, Kobayashi Kazuyuki	4. 巻 Volume 14
2. 論文標題 Immunotherapy in Advanced Non-Small Cell Lung Cancers: Current Status and Updates	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Management and Research	6. 最初と最後の頁 2079 ~ 2090
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2147/CMAR.S366738	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 -

1. 著者名 Zhao Yizhuo, Wang Qiming, Zhang Li, Shi Jianhua, Wang Zehai, Cheng Ying, He Jianxing, Shi Yuankai, Chen Weiqiang, Luo Yi, Wu Lin, Wang Xiwen, Nan Kejun, Jin Faguang, Dong Jian, Li Baolan, Yamaguchi Fumihito, Breadner Daniel, Nagano Tatsuya, Tanaka Fumihito, Husain Hatim, Li Kai, Han Baohui	4. 巻 11
2. 論文標題 The efficacy of anlotinib as third-line treatment for non-small cell lung cancer by EGFR mutation status: a subgroup analysis of the ALTER0303 randomized phase 3 study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Translational Lung Cancer Research	6. 最初と最後の頁 776 ~ 785
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21037/tlcr-22-320	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 -

1. 著者名 Suprpto Ratih Paramita, Suzuki Yoko, Nagano Tatsuya, Hirata Ken-ichi, Emoto Noriaki	4. 巻 100
2. 論文標題 The loss of endothelin-2 exhibits an anticancer effect in A549 human lung adenocarcinoma cell line	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Canadian Journal of Physiology and Pharmacology	6. 最初と最後の頁 818 ~ 827
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1139/cjpp-2022-0006	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 -

1. 著者名 Nagano Tatsuya, Tachihara Motoko, Tanaka Yugo	4. 巻 14
2. 論文標題 Future prospects of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors (EGFR-TKIs) and surgery for non-small cell lung cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Thoracic Disease	6. 最初と最後の頁 809 ~ 811
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21037/jtd-22-57	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 -

1. 著者名 Fukui Takafumi, Tachihara Motoko, Nagano Tatsuya, Kobayashi Kazuyuki	4. 巻 14
2. 論文標題 Review of Therapeutic Strategies for Anaplastic Lymphoma Kinase-Rearranged Non-Small Cell Lung Cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 1184 ~ 1184
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers14051184	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 -

1. 著者名 OTOSHI TAKEHIRO, NAGANO TATSUYA, PARK JONGUK, HOSOMI KOJI, YAMASHITA TOMOYA, TACHIHARA MOTOKO, TABATA TOKIKO, SEKIYA REINA, TANAKA YUGO, KOBAYASHI KAZUYUKI, MIZUGUCHI KENJI, ITOH TOMOO, MANIWA YOSHIMASA, KUNISAWA JUN, NISHIMURA YOSHIHIRO	4. 巻 42
2. 論文標題 The Gut Microbiome as a Biomarker of Cancer Progression Among Female Never-smokers With Lung Adenocarcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 1589 ~ 1598
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.15633	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 -

1. 著者名 YUMURA MASAKO, NAGANO TATSUYA, JIMBO NAOE, DOKUNI RYOTA, KIRIU TATSUNORI, TANAKA YUGO, TACHIHARA MOTOKO, ITOH TOMOO, MANIWA YOSHIMASA, NISHIMURA YOSHIHIRO, KOBAYASHI KAZUYUKI	4. 巻 42
2. 論文標題 Annexin A10 Expression as a Novel Prognostic Marker in Lung Adenocarcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 1289 ~ 1294
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.15595	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0件

〔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
研究分担者	西村 善博 (Nishimura Yoshihiro) (20291453)	神戸大学・医学部附属病院・名誉教授 (14501)	
研究分担者	小林 和幸 (Kobayashi Kazuyuki) (50403275)	神戸大学・医学部附属病院・特命教授 (14501)	

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
---------	---------