

論文内容の要旨

Antiaging gene Klotho regulates epithelial-mesenchymal transition
and increases sensitivity to pemetrexed by inducing lipocalin-2 expression

アンチエイジング遺伝子 Klotho は上皮間葉転換を制御し、
lipocalin-2 の発現を誘導することでペメトレキセドに対する感受性を高める

日本医科大学大学院医学研究科 呼吸器外科学分野

大学院生 竹ヶ原京志郎

Oncology letters 2020 年掲載予定

【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、個々の症例に応じた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 遺伝子に遺伝子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、認知症等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重要な予後因子であることも示した。加えて、肺扁平上皮癌では 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。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。

【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、アフアチニブ、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。

【結果】

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 $0.1 \mu\text{M}$ 、A549 細胞では $0.7 \mu\text{M}$ 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。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。

【考察】

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するものである。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。

【結論】

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。