

## 第二次審査（論文公開審査）結果の要旨

### 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* 2021 年掲載予定

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。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、多くの種類の癌の増殖や浸潤にも関連している。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。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、Klotho 遺伝子の機能解析や EMT 制御との関連性を明らかにすることを目的とした。

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を評価した。A549 細胞および A549/KL-1 細胞を用いて、種々の抗がん剤に対する感受性試験を行った。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。

ウェスタンブロッティングにより、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。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、IC<sub>50</sub> 値は A549/KL-1 細胞では 0.1 $\mu$ M、A549 細胞では 0.7 $\mu$ M であった。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について検討した。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。この結果は、A549/KL-1 細胞のペメトレキセドに対する感受性のメカニズムに関わっていると考えられた。

次に、A549 細胞と A549/KL-1 細胞について DNA マイクロアレイ解析を施行した。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。

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。

第二次審査では、①Klotho 発現の有無による個別化医療の可能性について、②Klotho 発現とペメトレキセド感受性について、③Klotho 過剰発現細胞における細胞形態の変化、④ Klotho 発現と EMT 抑制のメカニズムについて質疑応答がなされ、それぞれの確な回答を得た。

本論文は、Klotho 発現が EMT について抑制的働きを示し、肺癌細胞の転移・浸潤能に関与していることを明らかにし、臨床的意義は非常に高いと考えられた。以上より、本論文は学位論文として価値あるものと認定した。

## 最終試験結果の要旨

提出論文が二次審査に合格するおともに、呼吸器外科、腫瘍外科学全般に関する試問に対しても的確な回答を得た。申請者は、本研究をもとにさらなる研究の展開を目指しており、それらに必要な研究能力及び十分な学識を有している。また、研究過程における倫理性も十分有しており、後進の指導力も兼ね備えている。以上より、合格と判定した。