

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：32645

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791474

研究課題名(和文) アンチエイジング機能を利用した新たな癌治療法の開発

研究課題名(英文) Development for a cancer therapy using anti-aging gene

研究代表者

工藤 勇人 (Kudo, Yujin)

東京医科大学・医学部・臨床助教

研究者番号：80623800

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：我々はアンチエイジング遺伝子klothoの発現が肺癌の予後に関与することを報告してきた(Usuda J et al. Lung Cancer. 2011)。本研究では、その予後に関与するメカニズムとして、抗癌剤感受性に注目をした。In vitroで、klothoを過剰発現させた細胞株に各種抗癌剤感受性試験を行い、docetaxel, paclitaxelでは有意にアポトーシスを誘導するという結果を得た。すなわちklotho遺伝子発現は、タキサン系抗癌剤に対する感受性因子と関連を有し、がん治療における個別化治療に有用と期待される。

研究成果の概要(英文)：We have reported that the klotho gene, which is an anti-aging gene known to be a tumor suppressor, is a prognostic factor for lung cancer patients (Usuda J et al. Lung Cancer. 2011). In this study, we determined whether klotho expression may have a predictive value of the efficacy of anti-cancer agents for cancer treatment. We performed transfection of klotho-plasmid into MCF-7c3 cells, which stably express procaspase-3, and treated the cells with various kinds of anti-cancer agents. A high expression of the klotho protein can markedly increase the apoptotic response of MCF-7c3 cells to docetaxel and paclitaxel. These results suggest that klotho expression may indicate the predictive value of chemotherapy and play an important role in cancer treatment.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：アンチエイジング 肺癌 klotho 抗癌剤 遺伝子

1. 研究開始当初の背景

わが国では、肺癌死亡者数は増加の一途をたどり、年間 10 万人を超えると予測されている。早期発見により根治術が施行されても、再発し予後不良な経過を辿る症例も少なくない。特に神経内分泌腫瘍といわれている large cell neuroendocrine tumor の中の LCNEC(大細胞神経内分泌癌)は、予後不良肺癌の 1 つである。肺癌術後補助化学療法の必要性は十分なエビデンスが示されているが、化学療法による恩恵を得られる症例の割合は少ない。すなわち、不必要な化学療法の投与が施行され、医療費増加の一つの要因になっていることも事実である。そこで、難治性固形癌である肺癌治療には、術後補助療法を施行する上で、効果予測因子や surrogate marker を明らかにし、個別化医療を実践していく必要がある。

klotho 遺伝子はアンチエイジング遺伝子、がん抑制遺伝子などの機能を有すると報告されている。我々は、「癌化」と「癌の浸潤」においてアンチエイジング遺伝子 Klotho との関係に注目してきた。そして、大細胞神経内分泌癌や小細胞癌において、klotho 発現が予後因子であることを報告してきた。そこで、我々はがん治療において klotho 発現が予後を改善する理由の一つに抗癌剤感受性との関連があるのではないかという仮説を検証することを目的として、本研究を計画した。

2. 研究の目的

肺癌治療において予後を改善する因子の一つは、化学療法の感受性が高く、癌を制御することである。アンチエイジング遺伝子 klotho が肺癌細胞において、どのようなメカニズムで予後因子として機能しているのかを解明することを目的とした。特に、化学療法に対する感受性が klotho の発現によってどのように変わるかを検証した。

また、悪性度の高い肺癌は、腫瘍の浸潤能・転移能が強く関係している。すなわち、腫瘍径、胸膜浸潤、リンパ節転移や遠隔転移といった TNM 分類に関係する因子だけでなく、血管浸潤、リンパ管侵襲、組織分化度なども悪性度に深く関与する。これらの臨床病理学的因子と肺癌の予後の関係について検証することを目的とした。

3. 研究の方法

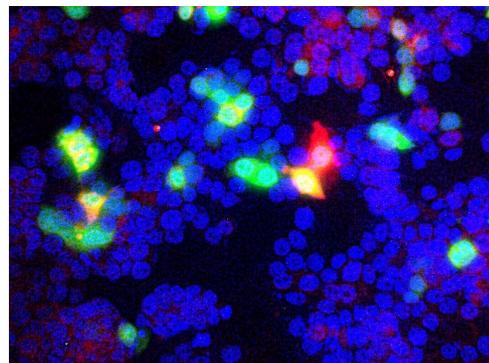
- (1) 培養細胞株 A549、MCF-7c3、PC-9 に klotho 遺伝子の発現があるかを Western blot 法により検証した。その後、klotho プラスミドを遺伝子導入して、klotho の過剰

発現がみられるかを Western blot 法で確認した。抗ヒト klotho モノクローナル抗体 (Clone No. KM2076, トランスジェニック) を使用した。

- (2) 培養細胞株を用いて、klotho プラスミドと GFP プラスミドを同時に遺伝子導入して、蛍光免疫染色法により、GFP の発現を green で、klotho の発現を red で標識し、これを merge させることで確認した。
- (3) 遺伝子導入前の細胞株 MCF-7c3 を用いて抗癌剤 cisplatin, carboplatin, vinorelbine, docetaxel, paclitaxel, etoposide, pemetrexed, gemcitabine, gefitinib を用いて、IC50 を測定した。その結果を用いて、klotho を過剰発現させた細胞株と、klotho の発現のない親株で抗癌剤感受性試験を行った。感受性の評価には、蛍光顕微鏡により形態学的アポトーシスを観察し測定した。
- (4) 肺癌切除検体を用いて、癌の浸潤に関する一つの因子である血管浸潤が予後にどのように影響するのかを検討した。さらに血管浸潤が、現行の TNM 分類にどのように影響するかを検証した。

4. 研究成果

- (1) Western blot 法により、A549、MCF-7c3、PC-9 において klotho 蛋白の発現はみられなかった。一方、klotho プラスミドを遺伝子導入した細胞株においては、klotho 蛋白の発現を認めた。
- (2) Klotho プラスミドと GFP プラスミドを遺伝子導入した培養癌細胞株における蛍光免疫染色法で確認することにより、klotho と GFP の発現を確認した (図 1)。



(図 1)

(3) Klotho を過剰発現させた癌細胞株 MCF-7c3 は、各種抗癌剤感受性試験の結果、docetaxel (DOC), paclitaxel (PTX) で有意にアポトーシスを誘導した(図2)。一方で、その他の抗癌剤 cisplatin, carboplatin, vinorelbine, etoposide, pemetrexed, gemcitabine, gefitinib においては、アポトーシス率に差はみられなかった。

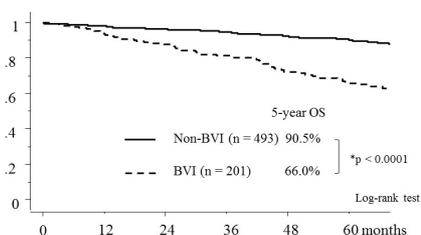
図2. klotho発現の有無によるタキサン系抗癌剤の感受性の違い

	アポトーシス率	
	DOC	PTX
Klotho(-)/GFP(-)	14.8%	19.3%
Klotho(-)/GFP(+)	18.3%	14.9%
Klotho(+)/GFP(+)	41.2%	35.9%

* NS (p≥0.05)

(4) 病理病期 I 期の非小細胞肺癌において、血管浸潤を有する症例(BVI)は、血管浸潤のない症例(non-BVI)に比べ、予後不良であった(図3)。現行の TNM 分類に血管浸潤の有無を組み込むことで予後不良群を抽出することができ、術後補助化学療法を考慮する上で重要な因子であると考えられた(Kudo Y. et al, Lung cancer 2013)。その結果を参考にし、血管浸潤と klotho の関係を検討し、補助化学療法の有用性を含めた検討を考えている。

図3. Outcome in relation to blood vessel invasion status



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

- Yujin Kudo, Hisashi Saji, Yoshihisa Shimada, Jun Matsubayashi, Toshitaka, Nagao, Masatoshi Kakihana, Jitsuo

Usuda, Naohiro Kajiwara, Tatsuo Ohira, Norihiko Ikeda. Proposal on incorporating blood vessel invasion into the T classification parts as a practical staging system for stage I non-small cell lung cancer. Lung Cancer 2013; 81: 187-193.(査読有)
DOI: 10.1016/j.lungcan.2013.04.016.

[学会発表](計4件)

- Yujin Kudo, Hisashi Saji, Yoshihisa Shimada, Jun Matsubayashi, Masatoshi Kakihana, Naohiro Kajiwara, Tatsuo Ohira, Norihiko Ikeda. Proposal on incorporating Blood Vessel Invasion into the T classification parts as a practical staging system for stage I Non-small cell Lung Cancer. 15th World Conference on Lung Cancer. October 30th, 2013. Sydney, Australia.
- 工藤勇人, 臼田実男, 古本秀行, 今井健太郎, 井上達哉, 大谷圭志, 石角太郎, 一ノ瀬修二, 垣花昌俊, 梶原直央, 大平達夫, 池田徳彦. アンチエイジング遺伝子 Klotho 発現と抗癌剤感受性との関係. 第72回日本癌学会学術総会. 2013年10月4日, 横浜.
- Yujin Kudo, Hideyuki Furumoto, Sachio Maehara, Keishi Ohtani, Yoshihisa Shimada, Jun Matsubayashi, Masatoshi Kakihana, Naohiro Kajiwara, Tatsuo Ohira, Norihiko Ikeda. Clinical impact of blood vessel invasion in completely resected stage I non-small cell lung cancer. 1st International Conference of Federation of Asian Clinical Oncology. September 26th, 2013. Xiamen, China.
- 工藤勇人, 臼田実男, 古本秀行, 石角太郎, 井上達哉, 池田徳彦. アンチエイジング遺伝子 Klotho 発現にもとづいた術後補助療法の確立をめざして. 第23回日本サイトメトリー学会学術集会. 2013年6月22日, 東京.

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)
取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等：
<http://team.tokyo-med.ac.jp/kokyukigeka/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

工藤 勇人 (KUDO, Yujin)

東京医科大学・医学部・臨床助教

研究者番号：80623800