

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 19 日現在

機関番号：32645

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861129

研究課題名(和文) アンチエイジング遺伝子Klothoに着目した新しい癌治療法の開発

研究課題名(英文) Innovation of cancer therapies based on anti-aging klotho gene

研究代表者

工藤 勇人(KUDO, YUJIN)

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号：80623800

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)：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影響を及ぼし、さらに肺癌細胞株に対してタキサン系抗癌剤への感受性を高める可能性をこれまで報告してきた。

タキサン系抗癌剤への感受性に関して、klothoの発現はclass III  $\beta$ -tubulin、P糖タンパクとの関与はみとめていなかった。一方、切除検体における検討では、pN2肺癌においてklothoの発現が予後に関与を認めており、非発現例で予後は不良であった。さらに、肺癌手術例および肺癌術後再発例において生物学的悪性度を規定しうる因子の探索を行った。klothoとの関係を検討中である。

研究成果の概要(英文)：We reported that the klotho gene, which was an anti-aging gene, affected the prognosis of lung cancer patients. We also found that a high expression of the klotho protein could markedly increase the apoptotic response of cancer cells to taxanes, anti-cancer agents. The expression of klotho protein was not associated with those of class III  $\beta$ -tubulin and P glycoprotein. Klotho expression was a significant prognostic factor in patients with pN2 lung cancer, and those without klotho expression had worse survival than those with klotho expression. The potential for high-grade malignancy was also investigated in patients who underwent surgical resection for lung cancer or those with postoperative recurrence.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：klotho アンチエイジング 肺癌 予後

## 1. 研究開始当初の背景

CTの普及により小型肺癌が多くみつかるようになり、早期肺癌が増えている。しかし、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。病理病期1期の非小細胞癌における5年生存率は約70%であり、大腸癌や乳癌の病理病期1期の5年生存率が90%以上である状況と比べると、肺癌の予後は十分なものとは言えない。予後不良である原因には、治療抵抗性の関与があり、外科的治療や薬物治療に対する抵抗性を解決することが重要である。

近年、新規抗癌剤だけでなく、分子標的治療薬の登場による薬物療法の進歩により、進行癌においても格段に予後の改善がみられているものの、根治に至る症例はほとんどない。組織型により有効な化学療法を選択したり、遺伝子検査に基づいた分子標的治療薬の選択する、といった個別化治療が行われているが、獲得耐性はほぼ必発である。十分なエビデンスのある化学療法が示されているものの、しかしその恩恵を得られる症例の予測は困難であり、不必要な化学療法の投与が施行され、患者への肉体的負担、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、効果予測因子や surrogate marker を明らかにし、有効な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、タキサン系抗癌剤において、klotho の過剰発現している細胞株で有意にアポトーシスを誘導するという結果を報告してきた。タキサン系抗癌剤は、多くの悪性腫瘍における key drug の一つであり、このメカニズムの解明が肺癌だけでなく、多くの悪性腫瘍に対する surrogate marker になる可能性を秘めていると考える。

## 2. 研究の目的

肺癌が予後不良である原因の一つは外科的治療や薬物治療に対する治療抵抗性である。根治切除術後の高い再発率、進行癌や再発例に対しての薬物治療への抵抗性や耐性化、を解決することが重要な課題として挙げられる。

外科的切除例は、同じ病期であっても再発する症例と再発しない症例が存在し、それらの生物学的悪性度の探索は重要である。生物学的悪性度は、腫瘍の浸潤能・転移能が強く関係しており、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、その他様々な因子が深く関与している可能性もある。これらの生物学的悪性度を規定する因子を見いだし、それらの因子を有する症例がどのような特徴をもつのかを探索することで、治療対象を選択していく点で重要である。一方、外科的切除

不能な進行癌や再発例の予後を改善するための因子の一つは、薬物療法の感受性が高く、癌を制御することが必要と考えられる。

本研究では、肺癌細胞においてアンチエイジング遺伝子 klotho の発現と発癌過程や浸潤・転移能との関係、また klotho 発現と生物学的悪性度を規定する因子との相関についての解析することを目的とした。さらにアンチエイジング遺伝子 klotho 発現が肺癌細胞においてタキサン系抗癌剤への感受性をあげる分子生物学的メカニズムを解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

- (1) 培養細胞株 MCF-7c3 を用いて、klotho プラスミドを遺伝子導入し、klotho の過剰発現を 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。klotho の発現を有する細胞株と発現のない細胞株を用いて、class III  $\beta$ -tubulin および P 糖蛋白の発現を Western blot 法で確認した。さらに、肺癌細胞株 PC-9、PC-14、A549、SBC-3 を用いて、klotho プラスミドを遺伝子導入した後、限界希釈法により安定細胞株の作成を試みた。
- (2) 肺癌切除検体を用いて、KM2076 により免疫染色を行い、klotho の発現と各臨床病理学的因子との比較、予後の検討を行った。肺癌において強力な予後不良因子の一つであるリンパ節転移と klotho の発現の関係に注目して klotho 遺伝子の発現は予後にどのように影響するのかを検討した。
- (3) 肺癌切除例において、生物学的悪性度を規定する因子を探索した。すりガラス・充実成分の混在する肺腺癌において、脈管侵襲やリンパ節転移の関係、また WHO 分類との関係、扁平上皮癌におけるリンパ節転移の予後への影響、補助化学療法が有効である因子の探索、空洞を有する病変における予後因子の探索を行った。さらに、肺癌切除例の再発例において、EGFR 遺伝子変異以外に、予後に影響を及ぼす因子を探索した。

## 4. 研究成果

- (1) In vitro において、MCF7c3 細胞株を用いて klotho 遺伝子を導入した後、klotho の発現とタキサン系抗癌剤の感受性に関与する class III  $\beta$ -tubulin および P 糖蛋白の発現の有無を Western blot 法により検討した。klotho の発現に関係なく class III  $\beta$ -tubulin は発現を認め、一方 P 糖蛋白は発現を認めなかった。klotho の発現のある安定細胞株を作成中である。

- (2) 病理病期 IA 期原発性肺癌外科的切除例において klotho 発現は予後との相関はみとめなかった。一方、N2 症例 51 例において、5 年生存が得られた 22 例のうち 81%で klotho 発現をみとめていた。しかし 5 年生存が得られなかった 29 例においては klotho 発現を認めていたのは 39%であった。N2 症例において klotho 発現は予後因子になりうると考えられた。
- (3) 肺癌切除標本を用いて、肺癌の生物学的悪性を規定する因子を検討し症例の選定を行った。術前の薄切 CT 所見に基づき、すりガラスおよび充実成分が混在した病変を有する小型肺腺癌手術症例において、充実成分の径や割合が WHO 腺癌分類や脈管侵襲やリンパ節転移と相関を示していた。一方、充実成分のみの病変では、非浸潤癌および微小浸潤癌は認めず、脈管侵襲やリンパ節転移の割合は 76%、25%と高かった。肺扁平上皮癌において、リンパ節転移の進展の程度により予後との関係を検討した。N2 症例の予後は、N0、N1 症例と比べ有意に予後不良である一方、N1 症例は N0 症例と同等の予後であった。病理病期 IB 期非小細胞癌における術後補助化学療法の有効性の検討を行い、血管浸潤を有する症例において術後補助化学療法施行例では 5 年生存率が 67.0%であるのに対し、未施行例では 43.3%であった。血管浸潤陽性例に対して術後補助化学療法を考慮すべきであると考えられた。
- (4) 肺癌術後再発は、一般に遠隔転移再発が多く薬物療法の中心になることが多い。再発後の予後は、EGFR 遺伝子変異をはじめとした driver 遺伝子変異の有無により異なると考えられている。しかし、EGFR 遺伝子変異例においても、予後不良例を認め、本研究では、手術時の病理病期が進行した症例では EGFR 遺伝子変異例であっても再発後 3 年生存率は 48.0%と、早期の症例の 81.4%と比べ予後不良であった。一方、EGFR 遺伝子野生型においては、病理病期は予後に影響を与えないという結果を得た。術後再発例において、病理病期は予後に影響を与えうる重要な因子であると考えられた。

## 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 2 件)

1. Yujin Kudo, Yoshihisa Shimada, Hisashi Saji, Yasufumi Kato, Koichi Yoshida, Jun Matsubayashi, Seisuke Nagase, Masatoshi

Kakahana, Naohiro Kajiwara, Tatsuo Ohira, Toshitaka Nagao, Norihiko Ikeda.

Prognostic factors for survival after recurrence in patients with completely resected lung adenocarcinoma: important roles of epidermal growth factor receptor mutation status and current staging system *Clinical Lung Cancer*. 2015; 16: e213-221. 査読有

2. Yujin Kudo, Jun Matsubayashi, Hisashi Saji, Soichi Akata, Yoshihisa Shimada, Yasufumi Kato, Masatoshi Kakihana, Naohiro Kajiwara, Tatsuo Ohira, Toshitaka Nagao, Norihiko Ikeda

Association between high-resolution computed tomography findings and the IASLC/ATS/ERS classification of small lung adenocarcinomas in Japanese patients. *Lung Cancer*. 2015; 90: 47-54. 査読有

(学会発表) (計 10 件)

1. 工藤 勇人, 松林純, 赤田 壮一, 嶋田善久, 雨宮亮介, 加藤靖文, 垣花昌俊, 梶原直央, 大平達夫, 池田徳彦. 小型肺腺癌における HRCT 所見と IASLC/ATS/ERS 分類を用いた臨床病理学的因子の関係. 第 56 回日本肺癌学会学術集. 会 2015 年 11 月 26 日, 横浜.
2. Yujin Kudo, Jitsuo Usuda, Junichiro Osawa, Shotaro Ono, Sachio Maehara, Keishi Ohtani, Yasufumi Kato, Masatoshi Kakihana, Naohiro Kajiwara, Tatsuo Ohira, Norihiko Ikeda. Klotho expression induces apoptosis of cancer cells against anti-cancer agents. 3rd International Conference of Federation of Asian Clinical Oncology. October 29, 2015. Kyoto, Japan.
3. 工藤 勇人, 嶋田善久, 雨宮亮介, 前田純一, 吉田浩一, 加藤靖文, 萩原優, 垣花昌俊, 梶原直央, 大平達夫, 池田徳彦. 肺扁平上皮癌においてリンパ節転移が予後に与える影響. 第 68 回日本胸部外科学会定期学術集会. 2015 年 10 月 19 日. 神戸
4. Yujin Kudo, Yoshihisa Shimada, Ryosuke Amemiya, Yasufumi Kato, Masatoshi Kakihana, Naohiro Kajiwara, Tatsuo Ohira, Norihiko Ikeda. Adjuvant chemotherapy for stage IB non-small cell lung cancer based on blood vessel invasion. 29th European Association for Cardio-Thoracic Surgery Annual Meeting. October 6, 2015. Amsterdam, Netherland.

5. Yujin Kudo, Yoshihisa Shimada, Ryosuke Amemiya, Junichi Maeda, Koichi Yoshida, Yasufumi Kato, Masaru Hagiwara, Jun Matsubayashi, Masatoshi Kakihana, Naohiro Kajiwara, Tatsuo Ohira, Norihiko Ikeda. Impact of lymph node involvement on survival in patients with completely resected pulmonary squamous cell carcinoma. 16th IASLC World Conference on Lung Cancer. September 8, 2015. Denver, USA.
6. Yujin Kudo, Jun Matsubayashi, Yoshihisa Shimada, Soichi Akata, Yasufumi Kato, Masatoshi Kakihana, Naohiro Kajiwara, Tatsuo Ohira, Toshitaka Nagao, Norihiko Ikeda. Correlation between high-resolution computed tomography findings and IASLC/ATS/ERS classification of small lung adenocarcinomas in Japanese patients. 2015 ASCO Annual Meeting. June 1, 2015, Chicago, USA
7. 工藤勇人, 嶋田善久, 雨宮亮介, 加藤靖文, 垣花昌俊, 梶原直央, 大平達夫, 池田徳彦. 30mm以下の肺腺癌における術前HRCT所見とIASLC/ATS/ERS分類を用いた臨床病理学的因子の関係. 第32回日本呼吸器外科学会総会. 2015年5月15日.高松.
8. 工藤勇人, 嶋田善久, 河口洋平, 大谷圭志, 垣花昌俊, 加藤靖文, 梶原直央, 大平達夫, 池田徳彦. 若年者肺癌切除例の臨床病理学的特徴と予後. 第55回日本肺癌学会学術集会. 2014年11月14日.京都.
9. Kudo Y, Shimada Y, Kato Y, Yoshida K, Osawa J, Maehara S, Maeda J, Matsybayashi J, Kakihana M, Kajiwara N, Ohira T, Ikeda N. Impact of EGFR mutation status on survival after recurrence in patients with completely resected lung adenocarcinoma. 2014 IASLC Asia Pacific Lung Cancer Conference. November 6, 2014. Kuala Lumpur, Malaysia
10. 工藤勇人, 嶋田善久, 垣花昌俊, 大谷圭志, 加藤靖文, 佐治久, 梶原直央, 大平達夫, 池田徳彦. 肺腺癌切除後再発とEGFR遺伝子変異の関係. 第67回日本胸部外科学会定期学術集会. 2014年10月3日. 福岡.

(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・助教  
研究者番号:80623800