

Title	胃癌におけるKaryopherin 2およびkaryopherin 1発現と予後に関する研究
Author(s)	大原, 克仁
Citation	北海道大学. 博士(医学) 乙第7178号
Issue Date	2023-03-23
DOI	10.14943/doctoral.r7178
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/90076
Туре	theses (doctoral)
Note	配架番号:1705
File Information	OHHARA_Yoshihito.pdf



# 学位論文

胃癌における Karyopherin α 2 および karyopherin β 1 発現と予後に関する研究

(Studies on expression of karyopherin alfa 2 and karyopherin beta 1 as the prognostic factors in gastric cancer patients)

2023年3月

北海道大学

大原 克仁

# 学位論文

# 胃癌における Karyopherin α 2 および karyopherin β 1 発現と予後に関する研究 (Studies on expression of karyopherin alfa 2 and karyopherin beta 1 as the prognostic factors in gastric cancer patients)

2023年3月

北海道大学

大原 克仁

発表論文目録および学会発表目録 ・・・・・・・・・・・・・・・ 1 頁 要旨 •••• ・・・・・・・・・・・・・・・・・ 2 頁 • 略語表・・・・・ ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 5 頁 緒言 対象と方法 ・・・・・ • • • • • • • • • • • • • • • • 10 頁 • • 結果 . . . . . . . . . . . . . . . . . . 17頁 • • • • 考察 34 頁 総括および結論 37頁 謝辞 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・38 頁 • • • • • • 利益相反 39 頁 引用文献 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・40 頁

# 発表論文目録および学会発表目録

本研究は以下の雑誌に受理された。

著者名: Yoshihito Ohhara, Ichiro Kinoshita, Akira Suzuki, Makoto Imagawa, Jun Taguchi, Takuro Noguchi, Satoshi Takeuchi, Yasushi Shimizu, Hideyuki Seki, Junichi Suzuki, Hirotoshi Dosaka-Akita 題目: Expression of karyopherin alfa 2 and karyopherin beta 1 correlate with poor prognosis in gastric cancer 雑誌名: Oncology. 100: 685-695 (2022).

本研究の一部は以下の学会に発表した。

 大原 克仁、木下 一郎、清水 康、鈴木 昭、秋田 弘俊 胃癌における Karyopherin alpha2 および beta1 の発現と予後の検討 第75回 日本癌学会学術総会 2016年10月6日~8日 横浜市

【背景と目的】 胃癌は本邦において、罹患率、死亡率ともに第3位の癌である。 診断技術の進歩により早期発見・早期治療できる症例も増えている一方で、診断 時点ですでに切除不能、転移症例や再発症例も多く存在する。切除不能進行再発 胃癌に対しては、薬物療法が主に用いられる。1 次治療では、キードラッグとさ れるプラチナ系薬剤やフッ化ピリミジン系薬剤を併用し、2次治療以降ではタキ サン系薬剤、イリノテカンなどが使用される。近年、免疫チェックポイント阻害 薬であるニボルマブ(抗 PD-1 抗体薬)も使用可能となり、サルベージラインの 治療や、直近では1 次治療の化学療法にニボルマブを併用する治療も行われて いる。標準治療のプラチナ系薬剤+フッ化ピリミジン系薬剤に免疫チェックポ イント阻害薬ニボルマブを上乗せした CheckMate649 試験においてニボルマブ 併用群では非併用群と比較して、奏効率、無増悪生存期間(Progression-free survival; PFS)、全生存期間(Overall survival; OS)の延長を認めるものの、 日本人を含めたアジア人が多く参加した ATTRACTION-4 試験では OS の延長 を示すことができず、一般的に進行再発胃癌の生存期間中央値は12-16か月と 報告されている。予後不良とされる胃癌の中で、HER2 は効果予測のバイオマ ーカーとして唯一確立されている。HER2 陽性胃癌においては、抗 HER2 抗体 薬を使用することで、予後の改善を認めている。従来の標準治療に抗 HER2 抗 体薬であるトラスツズマブを上乗せした TOGA 試験では、トラスツズマブ併用 群が非併用群よりも有意に予後を改善した。また、前治療歴のある HER2 陽性 胃癌については、抗体薬物複合体であるトラスツズマブデルクステカン (T-DXd) が予後を大幅に改善することが報告されている(OS:T-DXd 12.5 か月 vs 医師 選択治療 8.4 か月)。しかしながら、胃癌における HER2 以外のバイオマーカ ーは存在せず、新規の治療標的となるバイオマーカーの確立が望まれる。

近年、細胞の増殖と分化に関わる細胞外刺激を細胞核に伝達するシグナル伝達の分子機構解析が進められ、核内輸送のメカニズムは様々な遺伝子発現、細胞 周期、細胞内シグナル伝達に関連していることが報告されている。核内輸送タン パク質として Karyopherin (KPN)が同定され、細胞質から核内へのタンパク 質の輸送に重要な役割を担っていることが分かってきた。Karyopherin α 2

(KPNA2) や Karyopherin β1 (KPNB1) は KPN ファミリーに属している。 KPNA2 と KPNB1 は細胞質にて結合し複合体となり、核局在化シグナル

(nuclear localization signal: NLS) と呼ばれるアミノ酸配列を持つカーゴタンパク質と強く結合し、細胞質から核内にカーゴタンパク質を輸送する役割を 担っている。癌細胞における KPNA2、KPNB1 は癌の増殖、浸潤、転移に関わ ることが基礎研究にて証明されてきた。KPNA2 および KPNB1 は様々な癌腫に おいて正常組織と比べて高発現し、複数の固形癌において、KPNA2発現例では 予後不良であることが報告されている。一方で、KPNB1発現と予後については、 いずれの固形癌でも十分に検討されていない。KPNA2と KPNB1 は核内タンパ ク輸送において協調して作動する必要があるが、固形癌における KPNA2 と KPNB1の関連についてはいまだ不明な部分が多い。

今回、我々は胃癌における KPNA2、KPNB1 発現と予後の関連について明ら かにすることを目的に研究を行うこととした。

【対象と方法】2004年1月から2007年12月の間にKKR 札幌医療センターに て外科的切除された胃癌症例について、KPNA2および KPNB1の免疫染色を行 い、KPNA2、KPNB1発現と臨床病理学的因子の相関について統計学的解析を 行った。生存期間は診療録をもとに、手術日から最終生存確認日までを調査し、 カプランマイヤー法にて評価した。KPNA2および KPNB1高発現例と低発現例 での予後の比較は、ログランク法を、予後因子の解析には Cox ハザード解析を 用いて検討した。

【結果】胃癌手術検体 130 例において、KPNA2 高発現は 32 例(24.6%)、KPNA2 低発現は 98 例(75.4%)、KPNB1 高発現は 47 例(36.2%)、KPNB1 低発現は 83 例(63.8%)であった。KPNA2 高発現および KPNB1 高発現はともに、腫瘍 壁深達度、リンパ節転移、リンパ管侵襲、静脈侵襲と強い相関関係を認め、また、 KPNA2 高発現は KPNB1 高発現と強く相関していた(P < 0.001)。粘膜下層

(SM) 以深の胃癌 94 例における生存解析では、KPNA2 高発現群(n=25) に おける全生存期間(Overall survival; OS) は KPNA2 低発現群(n=69)の OS よりも有意に短く、5 年生存率は KPNA2 高発現群で 40.8%、KPNA2 低発現群 で 78.3%であった(P=0.007)。また、KPNB1 高発現群(n=40)における OS は KPNB1 低発現群(n=54)の OS よりも有意に短く、5 年生存率は KPNB1 高 発現群で 54.6%、KPNB1 低発現群で 79.2%であった(P=0.027)。KPNA2、 KPNB1 発現をもとに 3 つのコホートに層別化した。コホート 1: KPNA2 高発 現かつ KPNB1 高発現(n=17)、コホート 2: KPNA2 または KPNB1 のいずれか ー方が高発現(n=30)、コホート 3: KPNA2 低発現かつ KPNB1 低発現(n=47)。 コホート 1 は、コホート 2、コホート 3 と比べて予後不良であることが示され、 5 年生存率はコホート 1 が 29.9%、コホート 2 が 70.9%、コホート 3 が 81.5% であった(P=0.001)。臨床病理学的因子の予後因子解析では、単変量解析およ

び多変量解析の結果、リンパ節転移(hazard ratio[HR] = 2.36、95% confidence interval [CI] = 1.01–5.50、P = 0.046) と KPNA2 高発現かつ KPNB1 高発現 (HR = 3.458、95% CI = 1.64–7.29、P = 0.001) が独立した予後因子として同

定された。

【考察】本研究において、我々は胃癌における KPNA2 高発現、KPNB1 高発現

例が予後不良であること、KPNA2 高発現は KPNB1 高発現と強く相関している ことを示した。さらに、胃癌における KPNA2 高発現かつ KPNB1 高発現は強 力な予後不良因子であることが分かった。これまでのいくつかの研究において、 KPNA2 高発現が固形癌における予後不良因子の可能性が示されていたが、本研 究でも既報と同様の結果を得ることとなった。一方、KPNB1 については、 KPNA2 との関連および予後については十分に検討されていない現状で、胃癌に おける KPNA2 と KPNB1 の共発現を検討した初めての研究である。KPNA2 と KPNB1 の共発現を認める場合は、KPNA2、KPNB1 のいずれかの高発現もし くはいずれも低発現の場合と比べて極めて予後が悪いことが示された。しかし、 本研究では予後の解析を SM 以深の 94 例の胃癌症例を用いて行っており、症例 数が十分とは言えず、より多数の症例による検討が望ましいと考えた。

【結論】胃癌において、KPNA2 高発現は KPNB1 高発現と強く相関し、KPNA2 および KPNB1 高発現の胃癌症例では予後不良であることが示唆された。 KPNA2 と KPNB1 の共発現は胃癌における強力な予後因子であることが同定 された。

# 略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

AP-1	Activator protein 1
BARD1	BRCA1-associated RING domain protein 1
BRCA1	Breast cancer susceptibility gene 1
BRG1	Brahma-related gene 1
CDDP	Cisplatin
Chk1	Checkpoint kinase 1
CI	Confidence interval
CR	Complete response
Creb	cAMP response element binding protein
FBS	Fetal bovine serum
FDA	Food and Drug Administration
HER2	Human epidermal growth factor receptor type2
HR	Hazard ratio
INI-43	Inhibition of nuclear import-43
KPNA2	Karyopherin alfa 2
KPNB1	Karyopherin beta 1
NBS1	Nijmegen breakage syndrome 1
NLS	Nuclear localization signal
OS	Overall survival
PFS	Progression-free survival
PIAS1	Protein inhibitor of activated STAT 1
PR	Partial response
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
S-1	Tegafur/Gimeracil/Oteracil
SD	Stable disease
$\mathbf{SM}$	Submucosa
TBST	Tris-Buffered Saline, 0.05% Tween20
T-DXd	Trastuzumab deruxtecan

# 緒言

#### 胃癌治療の現状

胃癌は本邦では罹患数、死亡数ともに第3位のがんで、全世界でもがんに起因する死亡数で常に上位に位置するがんである(Bray et al., 2018)。内視鏡診断技術の進歩とともに早期胃癌の発見ができるようになった一方で、診断時にすでに進行・転移している症例もしばしば経験する。

2000年代に入り、化学療法の進歩に伴い進行胃癌の予後は以前よりも改善し てきた。本邦では、従来の標準治療であるフッ化ピリミジン系薬剤に対するシス プラチン (CDDP)の上乗せを検証した SPIRITS 試験にて、CDDP+S-1 併用療 法が S-1 単剤療法よりも生存期間を有意に延長することが報告され(OS:13.0 か月 vs 11.0 か月)、以後の標準治療として確立している(Koizumi et al., 2008)。2 次治療以降の治療としてはパクリタキセル、パクリタキセル+ラムシ ルマブ (VEGF 阻害薬)、免疫チェックポイント阻害薬であるニボルマブ(抗 PD-1 抗体薬) などが保健適応となっているが、いずれの薬剤を使用した場合でも、 生存期間中央値は 12-16 カ月であり、予後不良と言わざるを得ない(Hironaka et al., 2013; Kang et al., 2017; Wilke et al., 2014)。最近では、標準治療のプラチ ナ系薬剤+フッ化ピリミジン系薬剤に免疫チェックポイント阻害薬ニボルマブ を上乗せした CheckMate649 試験においてニボルマブ併用群では非併用群と比 較して、奏効率、PFS、OS の延長を認めるものの、日本人を含めたアジア人が 多く参加した ATTRACTION-4 試験では OS の延長を示すことができなかった (Janjigian et al., 2021; Kang et al., 2022; Shitara et al., 2022)。

予後不良とされる胃癌の中で、HER2 は効果予測のバイオマーカーとして唯 一確立されている。HER2 陽性胃癌においては、抗 HER2 抗体薬を使用するこ とで、予後の改善を認めている。従来の標準治療に抗 HER2 抗体薬であるトラ スツズマブを上乗せした TOGA 試験では、トラスツズマブ併用群が非併用群よ りも有意に予後を改善した(Bang et al., 2010)。また、前治療歴のある HER2 陽 性胃癌については、抗体薬物複合体であるトラスツズマブデルクステカン(T-DXd) が予後を大幅に改善することが報告されている (OS:T-DXd 12.5 か月 vs 医師選択治療 8.4 か月) (Shitara et al., 2020)。しかしながら、胃癌における HER2 以外のバイオマーカーは存在せず、新規の治療標的となるバイオマーカ ーの確立が望まれる。

6

# 核内輸送タンパク質カリオフェリンについて

近年、細胞の増殖と分化に関わる細胞外刺激を細胞核に伝達するシグナル伝 達の分子機構解析が進められ、核内輸送のメカニズムは様々な遺伝子発現、細胞 周期、細胞内シグナル伝達に関連していることが報告されている(Chook and Blobel, 2001)。1995 年、Morolanu らは、核内輸送タンパク質を Karyopherin (以下、KPN) として同定し、以後、多くの KPN ファミリーが発見されてい る(Moroianu et al., 1995)。KPN は、細胞質と細胞核の間の分子の輸送に関わ る一群のタンパク質である。核と細胞質間の輸送には、核膜に存在する Nuclear core complexes(NPCs)によって制御されている。20kDa 未満の小分子タンパ ク質は拡散にて NPCs を通過するが、40kDa 以上の高分子タンパク質は核膜孔 を通過するのに KPN との結合を必要とする。Karyopherin α2 (KPNA2)、 karyopherin β1 (KPNB1)、Crm1 は KPN ファミリーに属しており、KPNA2 と KPNB1 は細胞質にて結合し複合体となり、核局在化シグナル (nuclear localization signal: NLS) と呼ばれるアミノ酸配列を持つカーゴタンパク質と 強く結合し、細胞質から核内にカーゴタンパク質を輸送する(インポーチン)。 一方、Crm1 は核内から細胞質にタンパク質を輸送する役割(エクスポーチン) を担う(Fukuda et al., 1997; Stewart, 2007)。KPNB1 は KPNA2 と結合し、カ ーゴタンパク質を核内に輸送するほか、KPNB1 単独でもカーゴタンパク質と直 接結合し、細胞質から核内に輸送することが可能である(Ström and Weis, 2001)。

# 癌細胞における KPNA2、KPNB1 発現と予後

癌における KPNA2、KPNB1 については、van der Watt PJ らが報告してお り、KPNA2、KPNB1 が子宮頸癌の癌細胞において正常細胞よりも過剰発現し ていることが示された(図1)(van der Watt et al., 2011)。KPN と腫瘍細胞の 増殖についても研究が進められ、子宮頚癌においては、KPNA2、KPNB1の発 現が細胞周期の G1/S 期の増殖シグナル(E2F)に関わること、また乳癌細胞に おいては、KPNA2 発現と Ki-67 labeling index が相関することが報告されてい る(Gluz et al., 2008; van der Watt et al., 2011)。KPN の発現が、癌細胞の腫瘍 増殖に関与している可能性が考えられる。また、これらの報告では、子宮頸癌細 胞株において、KPNA2、KPNB1 発現を阻害することでアポトーシスが引き起 こされるが、非癌細胞においては、その効果が限定的であり、KPNA2、KPNB1 が癌治療における標的分子になる可能性が示唆された。



参考文献 Pauline J. van der Watt, et al. Int J Cancer 2009 より引用

図1.子宮頸癌細胞と正常細胞における核内輸送タンパク質(KPNA2、KPNB1、 Crm1)の発現の違い。マイクロアレイ解析(a)と Real-time RT-PCR(b)に て *Crm1、KPNB1、KPNA2*の遺伝子発現が正常子宮頸部細胞よりも子宮頸癌 細胞にて高発現であることを示す。免疫蛍光分析にて Crm1(c)、KPNB1(d)、 KPNA2(e)発現が正常子宮頸部細胞よりも子宮頸癌細胞にて高発現であるこ とを示す。 2000年代には、様々ながん腫において、臨床病理学的特徴と KPNA2 高発現 群での予後に関する検討がなされた。乳癌においては、KPNA2 高発現群は、 KPNA2 低発現群に比べて病期、リンパ節転移、がんの悪性度、ホルモン受容体 陰性(エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体)、Ki-67 高値と有意に相関 していた(Dankof et al., 2007; Gluz et al., 2008)。さらに、KPNA2 高発現は KPNA2 低発現の患者よりも予後が不良で、KPNA2 高発現は乳癌における独立 した予後因子となった(Dahl et al., 2006)。食道癌、非小細胞肺癌、前立腺癌、 卵巣癌についても、KPNA2 高発現群が低発現群と比較し予後不良であることが 報告されている(Li et al., 2013b; Mortezavi et al., 2011; Zheng et al., 2010)。

胃癌については、KPNA2 高発現と予後の関連について日本と中国で検討され ている(Altan et al., 2013; Li et al., 2013a)。胃癌における KPNA2 高発現群は 低発現群に比べて予後不良であることが日本、中国いずれの研究でも示された。 しかしながら、KPNB1 発現と予後については、いずれの固形癌でも十分に検討 されていない。KPNA2 と KPNB1 は核内タンパク輸送において協調して作動す る必要があるが、固形癌における KPNA2 と KPNB1 の関連についてはいまだ 不明な部分が多い。また、KPNA2 と KPNB1 との共発現や予後については未だ 検討されていない。

以上より、我々は胃癌における KPNA2、KPNB1 発現を検討し、予後との関 連について明らかにすることを目的に研究を行うこととした。

#### 対象と方法

以下の順で、検討を行うこととした。

- ① 胃癌手術検体において、KPNA2 および KPNB1 の免疫染色を行い、その発現を確認する。
- ② 胃癌における KPNA2、KPNB1 の発現と臨床病理学的因子の関連を統計学 的手法にて調べる
- ③ 胃癌における KPNA2、KPNB1 発現と予後の関係について検討する。
- ④ 胃癌における KPNA2、KPNB1 発現を含めた予後因子の解析を行う。

# 腫瘍検体と生存データ

今回の研究は、2004 年 1 月から 2007 年 12 月までに KKR 札幌医療センター にて外科的切除された胃癌症例 130 例の検体を用いて行った。臨床病理学的因 子は診療録をもとに後ろ向きに収集した。病理学的病期分類は日本胃癌学会胃 癌取り扱い規約に則って行った(Japanese Gastric Cancer, 1998)。

生存解析は、粘膜下層以深(SM 以深)に浸潤した症例を対象とし、94 例 が該当した。

#### 倫理的事項

本研究は、北海道大学病院自主臨床研究審査委員会および KKR 札幌医療セン ターの倫理委員会の審査を受けており(北海道大学病院 臨床研究番号:自 012-0304、KKR 札幌医療センター 承認番号 24-2)、本研究に関係するすべて の研究者は「ヘルシンキ宣言」および「臨床研究に関する倫理指針」に従って本 研究を実施した。手術時点で対象患者全員から包括同意を取得しており、本研究 同意については、KKR 札幌医療センターおよび北海道大学病院のホームページ にオプトアウトにて開示し、研究を遂行した。

## 細胞株とウェスタンブロット解析

本研究では、最初に北海道大学医学研究院腫瘍内科学教室で培養していた以下の4種類の非小細胞肺癌細胞株と2種類の不死化気管支上皮細胞、線維芽細胞株を用いた。

・NCI-H1299: 非小細胞肺癌細胞株、p53、p16 が失活している。

・A549:肺腺癌細胞株。

・PC-3:肺腺癌細胞株。本研究で使用した PC-3 は前立腺癌細胞株ではなく、 exon19 が欠失した EGFR 遺伝子変異を有する非小細胞肺癌株

・NCI-H1975: 肺腺癌細胞株、exon20(T790M)+exon21(L858R)の EGFR 遺伝 子変異を有している。EGFR-TKI に抵抗性を示す。

上記の細胞株は 5% CO2 下の 37℃湿潤環境にて 10% FBS(ウシ胎児血清) と 0.03%のグルタミンを添加した RPMI で培養した。A549 は American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)、PC-3 は Japan Cancer Research Resources Bank (Tokyo, Japan) からそれぞれ購入した。

・16HBE14o-: ヒト気管支上皮細胞を SV40 large Tantigen で不死化した細胞 株。Dr.Dieter C. Gruenert (University of California, San Francisco, CA, USA) より供与を受けた。5% CO2 下の 37℃湿潤環境にて 10%の牛胎仔血清を添加し た EMEM (Invitrogen Life Technologies)を用いてコラーゲンコートディッシュ で培養した。

・WI-38 VA-13 2RA: ヒト肺線維芽細胞である WI38 を SV40 ウイルスで不死 化した細胞株。American Type Culture Collection より購入した。 5% CO2 下 の 37℃湿潤環境にて 10%の牛胎仔血清を添加した EMEM を用いて培養した。

その後、ヒト胃癌細胞株である以下の4種類を使用した。4細胞株はいずれも JRCB細胞バンクより購入した。

- ・MKN7:ヒト胃癌、管状腺がん,高分化型
- ・MKN45:ヒト胃癌、腺がん,低分化型
- ・MKN74:ヒト胃癌、管状腺がん、中分化型
- ・KATO-III: ヒト胃癌、印環細胞がん

これらの細胞株を、RPMI-1640+10%FBS+100 U/mL ペニシリン+100 U/mL ストレプトマイシンを使用し、5% CO2、37℃の浸潤環境下で培養した。

肺癌細胞株、胃癌細胞株を使用した KPNA2、KPNB1、β-actin のタンパク 発現確認のためのウェスタンブロット解析は NuPAGE プロトコールに従い施 行した。

注入タンパク量を決定し蛋白濃度より loading sample 量を計算後、メルカ プトエタノール、LDS sample buffer と混合し GEL にそれぞれ注入し、泳動 した。Running Buffer は MOPS を使用した。泳動後 Trans-buffer を用いて メンブレンヘ Transfer (60 分)を行った。TBST で 5 分×3 回の洗浄施行後、 5%スキムミルクを用いて ブロッキング を行った後、再度 TBST で 5 分×3 回洗浄し、1 次抗体を添加して 4℃下で一晩振とうした。

翌日に TBST で 5 分×6 回の洗浄施行後、2 次抗体を 60 分添加。再度 TBST で 5 分×6 回洗浄して撮影を行った。感光液は ECL TM Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) を用いた。1 次抗体に関しては 抗 KPNA2 抗体(1000 倍;C-20; Santa Cruz Biotechnology)は goat polyclonal 抗体を、抗 KPNB1 抗体(1000 倍;H-300; Santa Cruz Biotechnology)は rabbit polyclonal 抗体を、抗 Actin 抗体 (1000 倍; A-2066, Sigma-Aldrich Co.) は rabbit monoclonal 抗体をそれぞれ使用した。撮影は Image Gauge software (Fujifilm, Tokyo, Japan)を用いて行った。

## 免疫組織化学(Immunohistochemistry : IHC)

胃癌組織および肺癌細胞株・胃癌細胞株を用いた免疫染色は Leica Biosystems のプロトコールを用いて行った。

ホルマリン固定組織切片をキシレンで脱パラフィンし、段階的アルコールと 蒸留水で再水和した。 再水和後、Leica Epitope Retrieval Solution (pH 9.0、 98°C、20 分) で抗原賦活し、その後、室温(20~25°C)まで自然冷却した。 Refine Detection Kit Peroxide Bloc にて内因性ペルオキシダーゼ除去を行い、 切片を数回洗浄した。ブロッキングを行った後、以下の1次抗体を添加した。 1次抗体

・抗 KPNA2 抗体(100 倍、40 分、goat polyclonal 抗体、C-20、sc-6917、Santa Cruz Biotechnology)

・抗 KPNB1 抗体(1000 倍、30 分、rabbit polyclonal 抗体、H-300、sc-11367、 Santa Cruz Biotechnology)

・抗 Ki-67 抗体(200 倍、30 分、rabbit monoclonal 抗体、Clone SP6、Thermo Scientific)

洗浄後に2次抗体(anti-goat 抗体 30分または anti-rabit 抗体 8分・2回)を添加し、再度洗浄した。Refine Detection Kit を用いて免疫染色を行った。また、 KPNA2、KPNB1の免疫染色のほかに、胃癌の腫瘍細胞の確認のため、 hematoxylin and eosin (H&E)染色による切片も作成した。

1次抗体の濃度は、1/100、1/200、1/500、1/1000と複数パターン行い、また、 染色時間も 30 分、40 分、50 分と条件を変えながら行い、上記条件が最も妥当 な染色結果であると判断し、上記プロトコールで以後の IHC を行うこととした。 当初は胃癌の表層部と浸潤部で KPNA2、KPNB1 発現を検討していたが、過 去の研究でも胃癌の腫瘍表層部(central region)における KPNA2 発現は予後 に相関せず、腫瘍浸潤部(marginal region)での KPNA2 発現が予後に関係す ることが報告されており(図 2)(Altan et al., 2013)、本研究でも胃癌の浸潤部 にて評価を進めることとした。



参考文献 Altan B, et. al. Carcinogenesis. 2013; 34:2314-21 Fig.1 より引用 図 2. 胃癌における腫瘍表層部と腫瘍浸潤部における KPNA2 発現と予後

# 免疫染色の評価方法

免疫染色の評価については、2人の経験のある医師が担当した(大原克仁、 鈴木昭)。がん細胞の細胞核染色割合の評価は、腫瘍浸潤部において、4視野に 最低 500 個以上の癌細胞を用いて行った。KPNA2 については、細胞核の免疫 染色の評価については、既報の染色割合(Percentage)と染色強度

(Intensity)を掛け合わせて、スコア化する方法を採用した(Altan et al., 2013)。

発現割合を 0、1+、2+、3+とし、0 は 1%未満、1+は 1·10%、2+は 11-50%、3+は 51%以上、発現強度も 0、1+、2+、3+とし、0 は発現なし、1+は 弱発現、2+は中等度発現、3+は強発現とした。スコアは、発現割合と発現強度 を掛け合わせたもので、0·3 点を低発現、4 点以上を高発現と定義した(図 3)。KPNB1 については、現在までの免疫染色の発現を評価する一定の基準が ないため、KPNA2 同様に発現割合と発現強度を掛け合わせてスコア化するこ ととした。Ki-67 の陽性カットオフは既報と同様、21%以上を陽性、20%以下 を陰性とした(Altan et al., 2013)。

	発現強度 (Intensity)		発現割合 (Proportion)
0	No staining	0	<1%
1+	Weak	1+	1-10%
2+	Moderate	2+	11-50%
3+	Strong	3+	51%≦

強度と割合を掛け合わせ4点以上を陽性と判断する

図3. 免疫染色の発現強度と発現割合の評価方法

# 統計学的解析

KPNA2 発現、KPNB1 発現と臨床病理学的因子の関連については、 $\chi^2$  乗検定 しくはフィッシャーの正確確率検定で行った。全生存期間(OS)については、 手術を施行した日から死亡または最終フォローアップ日までと定義した。生存 曲線はカプランマイヤー法で推定・作成し、ログランク法を用いて比較検討した。 各種因子と生存期間についての単変量解析、多変量解析は Cox 比例ハザード回 帰分析を用いて行い、P <0.05 を統計学的有意と判断した。全ての統計解析は SPSS version18 を使用して行った。

# 結果

# 細胞株における KPNA2、KPNB1 発現

胃癌細胞株で実験を行う前に、腫瘍内科学教室の実験室にて培養していた、肺 癌の細胞株にて KPNA2、KPNB1 のウェスタンブロット解析と KPNA2 の免疫 染色を行った(図 4)。肺癌の細胞株において、Santa Cruz 社製の抗 KPNA2 抗 体、抗 KPNB1 抗体が使用できそうと判断したため、その後、胃癌細胞株による 実験に移ることとした。



b.



図 4. 肺癌細胞株による KPNA2 および KPNB1 のウェスタンブロット解析(a) と KPNA2 の免疫染色(b)

4 つのヒト胃癌細胞株(KATO-III、MKN74、MKN45、MKN7)におい て、免疫染色ならびにウェスタンブロット解析を行った(図 5)。ヒト胃癌細胞 株にて KPNA2、KPNB1の免疫染色を行ったところ、いずれの細胞株も中等 度から弱い発現を認めた。ウェスタンブロット解析では、いずれの細胞株も KPNA2(52kDa)、KPNB1(97kDa)のタンパク発現を認めた。これらの結 果から、Santa Cruz 社製の抗 KPNA2 抗体、抗 KPNB1 抗体を使用可能と判 断した。

免疫染色の発現評価においては、胃癌細胞株の KPNA2、KPNB1 免疫染色を 陽性コントロールとして用いた。



図 5. 胃癌細胞株 (KATO-III. MKN74, MKN45, and MKN7)における KPNA2、 KPNB1 ウェスタンブロット解析(上段)と免疫染色(下段)

# 胃の正常組織・腫瘍組織における KPNA2、KPNB1 発現

胃の正常組織においては、免疫染色における KPNA2 および KPNB1 の発現 は認めなかった。そのため、胃の正常組織を陰性コントロールとして用いること とした(図 6a、b)。

a.



図 6. 正常胃組織(左)と胃癌組織(右)における KPNA2 染色(a)および KPNB1 染色(b)。胃癌症例(tub1>tub2>muc, pT3(SS), N0, M0; StageIIB) で正常胃粘膜部位と腫瘍部位を比較

# 胃癌組織における KPNA2、KPNB1 の発現強度

胃癌組織において、KPNA2、KPNB1の免疫染色を行い、発現強度の違いを 確認した。KPNA2、KPNB1の発現強度の具体例を図7に示す。



図 7. 胃癌組織における KPNA2 (a) と KPNB1 (b) の発現強度 Intensity 0 (0) = no staining Intensity 1 (1+) = weak staining Intensity 2 (2+) = moderate staining Intensity 3 (3+) = strong staining

# 胃癌表層部と浸潤部での KPNA2、KPNB1 発現の違い

胃癌表層部と浸潤部それぞれで KPNA2 および KPNB1 発現を確認したところ、本研究の大部分の症例で胃癌表層部(図8)では、KPNA2、KPNB1 発現が低発現であることが判明した。胃癌浸潤部での KPNA2、KPNB1 発現の例を図9 に示す。



b.



図 8. 胃癌症例(tub2>por1=por2, pT2(MP), N2, M0; StagIIIA)a.弱拡大(腫 瘍表層部を赤丸で囲む)。b.強拡大による HE 染色、KPNA2 染色、KPNB1 染 色



b

	HE	(対物x2	20)
	KPNA2	KPNB	1
	強度	割合	判定
KPNA2	1+	1+	陰性
KPNB1	2+	2+	陽性
		認うた	
A COL			

図 9. 胃癌症例(tub2>por1=por2, pT2(MP), N2, M0; StagIIIA)a.弱拡大(腫 瘍浸潤部を赤丸で囲む)。b.強拡大による HE 染色、KPNA2 染色、KPNB1 染 色

# 患者背景

本研究で検討した 130 症例の内訳を表 1 に示す。男性 82 例(63%)、女性 48 例(37%)、年齢中央値は 68 歳(31 歳~90 歳)。病理学的分化度は Lauren の 組織学的分類に基づき、腸型とびまん型の 2 つに分けた。病理学的病期分類で は StageI が 74 例、StegeII が 14 例、StageIII が 26 例、StageIV が 16 例であ った。

生存期間フォローアップの中央値は55か月(1~113か月)であった。

	N=130	(%)
Age, median (range)	68	(31-90)
Sex; male / female	82 / 48	63%, 37%
Histological type;		
Intestinal / Diffuse	59 / 71	45%, 55%
Tumor depth;		
T1	60	46%
T2	37	28%
T3	30	23%
T4	3	2%
Lymph node metastasis	59	45%
Lymphatic invasion	71	55%
Venous invasion	39	30%
Stage;		
Ι	74	57%
II	14	11%
III	26	20%
IV	16	12%

# 表1. 本研究の患者背景を示す

#### 胃癌における KPNA2 および KPNB1 発現と臨床病理学的特徴

胃癌手術検体 130 例において、KPNA2 高発現は 32 例 (24.6%)、低発現は 98 例 (75.4%) であった。

KPNA2 高発現は、腫瘍壁深達度(tumor depth 、P=0.006)、リンパ節転移 (P=0.008)、リンパ管侵襲(P=0.024)、静脈侵襲(P=0.016)と強い相関関係を認 めた。KPNA2 高発現は KPNB1 高発現と強く相関していた (P<0.001) (表 2)。

KPNB1 発現は 47 例 (36.2%) が高発現、83 例 (63.8%) が低発現であった。 KPNB1 高発現は、腫瘍壁深達度 (tumor depth、P = 0.005)、リンパ節転移(P < 0.001)、リンパ管侵襲(P = 0.02)、静脈侵襲(P = 0.006)と強い相関関係を認め た (表 3)。

以上の結果より、胃癌における KPNA2 高発現および KPNB1 高発現はいず れも腫瘍壁深達度、リンパ節転移、リンパ管侵襲、静脈侵襲と統計学的に強い相 関関係が示された。

		KPNA2 e				
		Low		High		P-value
		N = 98		N = 32		
Age,	median (range)	68	(34–86)	70	(31–90)	0.111
Sex						0.235
	Male	59	(72%)	23	(28%)	
	Female	39	(81%)	9	(19%)	
Histol	ogy					0.546
	Intestinal	43	(73%)	16	(27%)	
	Diffuse	55	(77%)	16	(23%)	
Tumo	or depth					0.006
	T1 (M, SM)	52	(87%)	8	(13%)	
	T2–4 (MP, SS, SE)	46	(66%)	24	(34%)	
Lymp	h node metastasis					0.008
	Absent	60	(85%)	11	(15%)	
	Present	38	(64%)	21	(36%)	
Lymp	hatic invasion					0.024
	Absent	50	(85%)	9	(15%)	
	Present	48	(68%)	23	(32%)	
Veno	us invasion					0.016
	Absent	74	(81%)	17	(19%)	
	Present	24	(62%)	15	(38%)	
KPNE	31 expression					< 0.001
	Low	71	(86%)	12	(14%)	
	High	27	(57%)	20	(43%)	

# 表 2. 胃癌における KPNA2 発現割合と臨床病理学的特徴

		<1%	1-10%	11-50%	$51\% \leq$	total
	0	32	0	0	0	32
強度 (Intensity)	1+	0	29	3	1	33
	2+	0	30	10	1	41
	3+	0	9	11	4	24
	total	32	68	24	6	130

	KPNB1 e				
	Low		High		P-value
	N = 83		N = 47		
Age, median (range)	68	(34–90)	71	(31–86)	0.356
Sex					0.168
Male	56	(68%)	26	(32%)	
Female	27	(56%)	21	(44%)	
Histology					0.806
Intestinal	37	(63%)	22	(37%)	
Diffuse	46	(65%)	25	(35%)	
Tumor depth					0.005
T1 (M, SM)	46	(77%)	14	(23%)	
T2–4 (MP, SS, SE)	37	(53%)	33	(47%)	
Lymph node metastasis					< 0.001
Absent	55	(77%)	16	(23%)	
Present	28	(47%)	31	(53%)	
Lymphatic invasion					0.02
Absent	44	(75%)	15	(25%)	
Present	39	(55%)	32	(45%)	
Venous invasion					0.006
Absent	65	(71%)	26	(29%)	
Present	18	(46%)	21	(54%)	

# 表 3. 胃癌における KPNB1 発現割合と臨床病理学的特徴

			割合(Proportion)				
		<1%	1-10%	11-50%	$51\% \leq$	total	
	0	13	0	0	0	13	
強度	1+	0	18	26	3	47	
(Intensity)	2+	0	13	40	10	63	
	3+	0	0	4	3	7	
	total	13	31	70	16	130	

# 胃癌における KPNA2、KPNB1 発現と生存期間についての検討

胃癌 130 例のうち、粘膜下層(SM)以深の 94 例を対象に KPNA2 および KPNB1 発現と全生存期間(Overall survival; OS) について検討した。SM 以 深の胃癌症例 94 例のうち、KPNA2 高発現は 25 例(26.6%)、KPNB1 高発現 は 40 例(42.6%)であった。

KPNA2 高発現群 (n=25) における OS は KPNA2 低発現群 (n=69) の OS よりも有意に短く、5 年生存率は KPNA2 高発現群で 40.8%、KPNA2 低発現群 で 78.3%であった (P=0.007、図 10a)。また、KPNB1 高発現群 (n=40) にお ける OS は KPNB1 低発現群 (n=54) の OS よりも有意に短く、5 年生存率は KPNB1 高発現群で 54.6%、KPNB1 低発現群で 79.2%であった (P=0.027、図 10b)。



図 10. 胃癌 94 症例における KPNA2 高発現群と低発現群の生存曲線(a) および KPNB1 高発現群と低発現群の生存曲線(b)

# 胃癌における KPNA2 高発現かつ KPNB1 高発現症例の検討

次に我々は、KPNA2 高発現かつ KPNB1 高発現の症例と生存期間について検討した。KPNA2 高発現かつ KPNB1 高発現の症例は胃癌 94 例中 17 例(18%)であった(図 11)。



図 11. KPNA2 高発現かつ KPNB1 高発現の胃癌症例。scale bar=50 µm

KPNA2 および KPNB1 の高発現の有無をもとに、以下の3群に分けて、生存 期間を比較した。

コホート1: KPNA2 高発現かつ KPNB1 高発現 (n=17、18%)

コホート2: KPNA2 または KPNB1 のいずれか一方が高発現(n=30、32%) コホート3: KPNA2 低発現かつ KPNB1 低発現(n=47、50%)

コホート1は、コホート2、コホート3と比べて予後不良であることが示され、5年生存率はコホート1が29.9%、コホート2が70.9%、コホート3が81.5%であった(P=0.001、図12)。

臨床病理学的因子の検討では、コホート1はコホート2、コホート3と比べて 腫瘍壁深達度(tumor depth)とより強く相関していた(P = 0.04、表4)。



図 12. KPNA2、KPNB1の発現別に層別化したコホート1(KPNA2高発現かつ KPNB1高発現)、コホート2(KPNA2または KPNB1のいずれか一方が高発現)、コホート3(KPNA2低発現かつ KPNB1低発現)における生存曲線。
 P 値はコホート1 vs コホート2・3の結果を示す。

	Cohort 1		Cohort 2		Cohort 3		P-value*
	]	N=17		N=30		N=47	
Age, median (range)	73	(57-85)	70	(39-86)	70	(39-90)	0.536
Sex							0.986
Male	11	(18%)	19	(31%)	31	(51%)	
Female	6	(18%)	11	(33%)	16	(48%)	
Histology							0.421
Intestinal	7	(15%)	16	(34%)	24	(51%)	
Diffuse	10	(21%)	14	(30%)	23	(49%)	
Tumor depth							0.04
T1 (M, SM)	1	(4%)	6	(25%)	17	(71%)	
T2-4 (MP, SS, SE)	16	(23%)	24	(34%)	30	(43%)	
Lymph node metastasis							0.166
Absent	4	(11%)	5	(14%)	27	(75%)	
Present	13	(22%)	25	(43%)	20	(34%)	
Lymphatic invasion							0.15
Absent	2	(8%)	6	(25%)	16	(67%)	
Present	15	(21%)	24	(34%)	31	(44%)	
Venous invasion							0.29
Absent	8	(15%)	13	(24%)	34	(62%)	
Present	9	(23%)	17	(44%)	13	(33%)	

表 4. コホート 1、コホート 2、コホート 3 における臨床病理学的因子の相関 P 値はコホート 1 vs コホート 2、3 の結果を表す。

# 胃癌における KPNA2、KPNB1 発現と予後因子の検討

生存解析を行った胃癌 94 例に対し、KPNA2、KPNB1 発現を含めた臨床病理 学的因子の予後因子解析を行った。年齢(65歳以上)、性別、組織型(腸型、び まん型)、T 因子、リンパ節転移の有無、リンパ管侵襲の有無、静脈侵襲の有無、 Ki-67 陽性、KPNA2 および KPNB1 ともに高発現を因子として、単変量解析、 多変量解析を行った。単変量解析および多変量解析の結果、再発後の化学療法の 施行(HR=3.64、95% CI=1.69-7.83、P=0.001)と KPNA2 高発現かつ KPNB1 高発現(HR=1.83、95% CI=1.13-2.97、P=0.014)が独立した予後因子とし て同定された(表 5)。

表 5. 胃癌における KPNA2、KPNB1 発現と予後因子に対する単変量・多変量 解析

	Univariate analysis			Multivariate analysis		
	Hazard	05% CI	<i>P</i> -	Hazard	05% CI	<i>P</i> -
	ratio	9370 CI	value	ratio	9570 CI	value
Age; $< 65 \text{ vs} \ge 65 \text{ years}$	1.33	0.55-3.25	0.529			
Sex; male versus female	0.57	0.26–1.24	0.156			
Histology; Intestinal vs diffuse	1.16	0.57–2.36	0.683			
T1 vs T2-4	2.17	0.83-5.66	0.113			
Lymph node metastasis	2.44	1.05-5.67	0.038	2.36	1.01-5.50	0.046
Lymphatic invasion	2.00	0.77–5.21	0.157			
Venous invasion	1.79	0.88-3.62	0.108			
Ki-67 high	1.363	0.63-2.96	0.435			
KPNA2 high and KPNB1 high expression	3.55	1.70–7.47	0.001	3.46	1.64–7.29	0.001

# 胃癌における KPNA2、KPNB1 発現と Ki-67 との関係性

腫瘍の深達度が SM 以深の胃癌 94 症例に対し、KPNA2、KPNB1 発現と Ki-67 の関係性を調べた。Ki-67 は 65% (61/94) で陽性 (cut-off≥20%) であった。 KPNA2 高発現群は KPNA2 低発現群と比べて、Ki-67 陽性例と強い相関がみら れた (88% (22/25) vs 12% (3/25)、P=0.005)。胃癌における KPNA2 高発現例 が Ki-67 陽性と相関することは既報の結果と同様であった(Altan et al., 2013)。 また、KPNB1 においても、高発現群は低発現群と比べて、Ki-67 陽性例と強い 相関がみられた (78% (31/40) vs. 23% (9/40)、P=0.028) (表 6)。

			Ki-67			P-value
			low		high	
KPNA2	low	30	(43%)	39	(57%)	0.005
	high	3	(12%)	22	(88%)	
KPNB1	low	24	(44%)	30	(56%)	0.028
	high	9	(23%)	31	(78%)	

表 6. 胃癌における KPNA2、KPNB1 発現と Ki-67 の関係

# 考察

本研究において、我々は胃癌における KPNA2 高発現、KPNB1 高発現例が予 後不良であること、KPNA2 高発現は KPNB1 高発現と強く相関していることを 示した。さらに、胃がんにおける KPNA2 高発現かつ KPNB1 高発現は強力な 予後不良因子であることが分かった。これまでのいくつかの研究において、 KPNA2 高発現が固形癌における予後不良因子の可能性が示されていたが、 KPNB1 高発現が予後に影響するかは十分に検討されていない(Yang et al., 2015)。我々の知見では、本研究は、胃癌における KPNA2 と KPNB1 の共発現 を検討した初めての研究である。

Zhou らは、過去に報告された固形癌における KPNA2 と予後との関係を調べた 24 の研究についてメタ解析し、報告している(Zhou et al., 2017)。この検討では、胃癌を含めた 15 種類の固形がんについて、KPNA2 発現が独立した予後因子であると結論づけている。しかしながら、KPNB1 発現と予後の関連については、不明な部分が多い。胃癌については、1 つだけ KPNB1 発現と予後について検討した報告がある(Zhu et al., 2016)。Zhu らの報告では、胃癌 150 症例を用いて KPNB1 発現と臨床病理学的因子の関連を調べたところ、腫瘍異型度、リンパ管・静脈侵襲、腫瘍壁深達度、Ki-67 高値と相関しており、KPNB1 発現は単変量・多変量解析にて独立した予後因子であることが示された。我々の研究でも、胃癌における KPNB1 高発現が予後因子であることを証明しており、既報と再現性のある結果と考える。

今回、我々は胃癌における KPNA2 高発現が KPNB1 高発現と相関している ことを示し、KPNA2 と KPNB1 の共発現が KPNA2 または KPNB1 の単独発 現よりも統計学的にも有意に独立した予後因子であることを証明した。KPN フ ァミリーである KPNA2 は KPNB1 と複合体を形成し、カーゴタンパク質を結 合して、核内に輸送を行う(Ström and Weis, 2001)。腫瘍の細胞核における KPNA2 高発現かつ KPNB1 高発現であることは、核内輸送において KPNA2 と KPNB1 が複合体を形成し作動することにも関連していることが示唆される結 果であると考えられた。

胃癌における KPNA2 および KPNB1 の役割については未だ不明な部分も多 い。KPNA2 については、いくつかの腫瘍抑制因子のトランスポーターとして機 能することが示唆されている(Tseng et al., 2005)。過去の報告では、細胞周期調 節因子 Chk2 が KPNA2 の主要なカーゴタンパク質の1つであることが示され た(Zannini et al., 2003)。KPNA2 はカーゴタンパク質の核内輸送に不可欠な Chk2 の NLS と相互作用し、KPNA2 の過剰発現はカーゴタンパク質の核内輸 送の増加と相関することが報告されている。また、KPNA2 は、癌の進行に関連 する遺伝子産物である NBS1 の核への取り込みにも関与していることが示唆さ れている(Teng et al., 2006)。その研究では、KPNA2 は、細胞内局在の調節にお いて NBS1 の役割を決定すると推測されている。乳癌においては、KPNA2 発 現が、BRCA1、RAD51、BARD1、PIAS1、および Chk1 を含むいくつかの重 要な DNA 修復タンパク質の細胞質局在と関連していた(Alshareeda et al., 2015)。こうした研究結果からは、癌における KPNA2 が治療標的のバイオマー カーになる可能性があることが示唆される。当院を含む北海道がんゲノム医療 中核・拠点・連携病院にて行った包括的がんゲノムプロファイリング検査でも上 記の DNA 修復タンパク質の合成に関わる遺伝子変異症例を認めており、 KPNA2 との関連について検討する意義があると考える(Hagio et al., 2021; Kikuchi et al., 2021; Takada et al., 2022)。KPNB1 は、炎症、遊走、アポトー シスを含むいくつかの細胞機能を調節することが報告されている(Carden et al., 2018; Stelma et al., 2016; van der Watt et al., 2016)。また、KPNB1 は癌治療 における標的として研究されている。いくつかの研究では、KPNB1の阻害が、 E2F1 活性の干渉(Wang et al., 2019)、タンパク質恒常性の破綻(Zhu et al., 2018)など、様々なメカニズムを通じて抗癌作用をもたらすことが示されており、 KPNB1 もまた有望な治療標的のバイオマーカーになる可能性がある。

我々の研究では、胃癌における KPNB1 高発現例は KPNA2 高発現例よりも 比較的高い割合で、びまん型の組織型(KPNB1 vs KPNA2; 35% vs 23%)、よ り進行した腫瘍壁深達度(T2・4、47% vs 34%)、リンパ節転移(53% vs 36%)、 リンパ管侵襲(45% vs 32%)、静脈侵襲(54% vs 38%)を認めた。KPNB1 は KPNA2 を含めた KPNA サブユニットと複合体を形成し、NSL を持つカーゴタ ンパク質の核内輸送を行うだけでなく、直接、カーゴタンパク質に結合し、核内 輸送を行うことができる(Chook and Süel, 2011)。興味深いことに、KPNB1 は、 KPNA ファミリーとは無関係に、細胞の生存と増殖に関与する Creb および AP-1 転写因子の核移行を促進することが報告されている(Forwood et al., 2001)。このように KPNA2 と KPNB1 では核内に輸送されるカーゴタンパク質 に違いがあるため、KPNB1 高発現群では KPNA2 高発現群よりもより進行した 臨床病理学的因子の割合が多い傾向を示した可能性があると考えられた。

近年、INI-43 という小分子化合物が、KPNB1 結合カーゴタンパク質の核内 輸送阻害の効果示し、子宮頸癌と食道癌の xenograft マウスモデルにおいて腫 瘍の増殖を減少させた(Chi et al., 2021)。INI-43 を用いたこの研究では、子宮 頸癌に対し、INI-43 と CDDP との相乗効果の可能性が示唆された。また、 selinexor (KPT-330)は、新規経口分子標的薬で核内輸送タンパク質のエクスポ ーチン1 (XPO1/CRM1) を阻害する作用を有しており、進行固形癌に対し、抗 腫瘍効果を認めたことが報告された(Abdul Razak et al., 2016)。Selinexor を用 いた first-in-human の第 1 相試験では、固形癌 189 例が selinexor 治療を受け た。157 例にて治療効果の評価を行い、CR もしくは PR が 7 例(4%)、4 か月 以上の SD が 27 例(17%)であった。この臨床試験の結果をもとに、selinexor は多発性骨髄腫とびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫において、米国 FDA(Food and Drug Administration)に承認された(Chari et al., 2019; Kalakonda et al., 2020)。さらに、selinexor は第 2/3 相試験の SEAL 試験において、脱分化型脂 肪肉腫の患者に対する効果を示した(Gounder et al., 2022)。こうした臨床試験 の結果からも、様々ながん腫において、核内輸送タンパク質を標的とした治療法 の可能性があると思われ、KPNA2 や KPNB1 を標的とした治療開発も望まれ る。

今回の研究結果から、胃癌における KPNA2 高発現と KPNB1 高発現は、腫 瘍壁深達度、リンパ節転移、リンパ管侵襲、静脈侵襲、Ki-67 陽性と強い相関関 係を認めた。本研究の問題点は、検討症例数が 130 例と少数例であったこと、 対象症例が 2004 年から 2007 年と古い症例であったことが挙げられるため、比 較的新しい胃癌切除症例で症例数も多くして検討することが望ましいと考えた。 KPNA2 高発現は KPNB1 高発現と強く相関し、KPNA2 と KPNB1 の共発現は 胃癌において独立した予後因子であることが示された。今回の研究結果から、胃 癌における KPNA2、KPNB1 の共発現症例は、非常に予後不良であるため、 KPNA2、KPNB1 は胃癌の治療標的になる可能性があると考えられる。

## 総括および結論

- ・ 胃癌手術検体 130 例において、KPNA2 高発現は 32 例(24.6%)、KPNA2 低発現は 98 例(75.4%)、KPNB1 高発現は 47 例(36.2%)、KPNB1 低発 現は 83 例(63.8%)であった。
- ・ KPNA2 高発現および KPNB1 高発現はともに、腫瘍壁深達度、リンパ節転 移、リンパ管侵襲、静脈侵襲と強い相関関係を認めた。また、KPNA2 高発 現は KPNB1 高発現と強く相関していた。
- 粘膜下層(SM)以深の胃癌 94 例における生存解析では、KPNA2 高発現群 (n=25)における OS は KPNA2 低発現群(n=69)の OS よりも有意に短 く、5 年生存率は KPNA2 高発現群で 40.8%、KPNA2 低発現群で 78.3%で あった(P=0.007)。また、KPNB1 高発現群(n=40)における OS は KPNB1 低発現群(n=54)の OS よりも有意に短く、5 年生存率は KPNB1 高発現群 で 54.6%、KPNB1 低発現群で 79.2%であった(P=0.027)。
- KPNA2、KPNB1 発現をもとに3つのコホートに層別化した。コホート1:
   KPNA2 高発現かつ KPNB1 高発現(n=17)、コホート2: KPNA2 または
   KPNB1 のいずれか一方が高発現(n=30)、コホート3: KPNA2 低発現かつ
   KPNB1 低発現(n=47)。コホート1は、コホート2、コホート3と比べて
   予後不良であることが示され、5年生存率はコホート1が29.9%、コホート2が70.9%、コホート3が81.5%であった(P=0.001)。
- ・ 臨床病理学的因子の予後因子解析では、単変量解析および多変量解析の結果、 リンパ節転移(HR=2.36、95% CI=1.01-5.50、P=0.046)と KPNA2 高 発現かつ KPNB1 高発現(HR=3.458、95% CI=1.64-7.29、P=0.001) が独立した予後因子として同定された。

本研究において、胃癌における KPNA2 高発現と KPNB1 高発現は強く相関 し、KPNA2、KPNB1 共発現は強力な予後因子なることが示された。この結果 から、予後不良とされる胃癌において、KPNA2 および KPNB1 は有望な治療標 的になる可能性が示唆される。しかし、現時点までに KPNA2、KPNB1 を直接 標的とした分子標的薬は開発されていないが、エクスポーチン 1 などの核内輸 送タンパク質を標的とした治療が報告されている。本研究をもとに、胃癌におけ る KPNA2、KPNB1 の分子学的な意義を解明し、治療開発の基盤となる研究に 発展させていきたい。

# 謝辞

本研究の機会を与えていただき、ご指導いただいた北海道大学大学院医学 研究院内科系部門内科学分野腫瘍内科学教室 秋田弘俊前教授に深謝いたし ます。ならびに、研究の遂行にあたり、適切な助言と親身な指導を賜りまし た北海道大学病院腫瘍内科・がん遺伝子診断部 木下一郎教授、同教室・診 療科のスタッフの皆様、ならびに本研究に協力していただきました KKR 札 幌医療センター 病理診断科 鈴木昭先生・検査技師の皆様に厚く御礼申し 上げます。

# 利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

# 引用文献

Abdul Razak, A.R., Mau-Soerensen, M., Gabrail, N.Y., Gerecitano, J.F., Shields, A.F., Unger, T.J., Saint-Martin, J.R., Carlson, R., Landesman, Y., McCauley, D., *et al.* (2016). First-in-Class, First-in-Human Phase I Study of Selinexor, a Selective Inhibitor of Nuclear Export, in Patients With Advanced Solid Tumors. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology *34*, 4142-4150.

Alshareeda, A.T., Negm, O.H., Green, A.R., Nolan, C.C., Tighe, P., Albarakati, N., Sultana, R., Madhusudan, S., Ellis, I.O., and Rakha, E.A. (2015). KPNA2 is a nuclear export protein that contributes to aberrant localisation of key proteins and poor prognosis of breast cancer. British journal of cancer *112*, 1929-1937.

Altan, B., Yokobori, T., Mochiki, E., Ohno, T., Ogata, K., Ogawa, A., Yanai, M., Kobayashi, T., Luvsandagva, B., Asao, T., *et al.* (2013). Nuclear karyopherin-α2 expression in primary lesions and metastatic lymph nodes was associated with poor prognosis and progression in gastric cancer. Carcinogenesis *34*, 2314-2321.

Bang, Y.J., Van Cutsem, E., Feyereislova, A., Chung, H.C., Shen, L., Sawaki, A., Lordick, F., Ohtsu, A., Omuro, Y., Satoh, T., *et al.* (2010). Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastrooesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. Lancet (London, England) *376*, 687-697.

Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A., and Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA: a cancer journal for clinicians *68*, 394-424. Carden, S., van der Watt, P., Chi, A., Ajayi-Smith, A., Hadley, K., and Leaner, V.D. (2018). A tight balance of Karyopherin β1 expression is required in cervical cancer cells. BMC cancer *18*, 1123.

Chari, A., Vogl, D.T., Gavriatopoulou, M., Nooka, A.K., Yee, A.J., Huff, C.A., Moreau, P., Dingli, D., Cole, C., Lonial, S., *et al.* (2019). Oral Selinexor-Dexamethasone for Triple-Class Refractory Multiple Myeloma. The New England journal of medicine *381*, 727-738.

Chi, R.A., van der Watt, P., Wei, W., Birrer, M.J., and Leaner, V.D. (2021). Inhibition of Kpn81

mediated nuclear import enhances cisplatin chemosensitivity in cervical cancer. BMC cancer *21*, 106.

Chook, Y.M., and Blobel, G. (2001). Karyopherins and nuclear import. Current opinion in structural biology *11*, 703-715.

Chook, Y.M., and Süel, K.E. (2011). Nuclear import by karyopherin-6s: recognition and inhibition. Biochimica et biophysica acta *1813*, 1593-1606.

Dahl, E., Kristiansen, G., Gottlob, K., Klaman, I., Ebner, E., Hinzmann, B., Hermann, K., Pilarsky, C., Dürst, M., Klinkhammer-Schalke, M., *et al.* (2006). Molecular profiling of lasermicrodissected matched tumor and normal breast tissue identifies karyopherin alpha2 as a potential novel prognostic marker in breast cancer. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research *12*, 3950-3960.

Dankof, A., Fritzsche, F.R., Dahl, E., Pahl, S., Wild, P., Dietel, M., Hartmann, A., and Kristiansen, G. (2007). KPNA2 protein expression in invasive breast carcinoma and matched peritumoral ductal carcinoma in situ. Virchows Archiv : an international journal of pathology *451*, 877-881.

Forwood, J.K., Lam, M.H., and Jans, D.A. (2001). Nuclear import of Creb and AP-1 transcription factors requires importin-beta 1 and Ran but is independent of importin-alpha. Biochemistry *40*, 5208-5217.

Fukuda, M., Asano, S., Nakamura, T., Adachi, M., Yoshida, M., Yanagida, M., and Nishida,E. (1997). CRM1 is responsible for intracellular transport mediated by the nuclear export signal. Nature *390*, 308-311.

Gluz, O., Wild, P., Meiler, R., Diallo-Danebrock, R., Ting, E., Mohrmann, S., Schuett, G., Dahl, E., Fuchs, T., Herr, A., *et al.* (2008). Nuclear karyopherin alpha2 expression predicts poor survival in patients with advanced breast cancer irrespective of treatment intensity. International journal of cancer *123*, 1433-1438.

Gounder, M.M., Razak, A.A., Somaiah, N., Chawla, S., Martin-Broto, J., Grignani, G., Schuetze, S.M., Vincenzi, B., Wagner, A.J., Chmielowski, B., *et al.* (2022). Selinexor in Advanced, Metastatic Dedifferentiated Liposarcoma: A Multinational, Randomized, DoubleBlind, Placebo-Controlled Trial. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology *40*, 2479-2490.

Hagio, K., Amano, T., Hayashi, H., Takeshita, T., Oshino, T., Kikuchi, J., Ohhara, Y., Yabe, I., Kinoshita, I., Nishihara, H., *et al.* (2021). Impact of clinical targeted sequencing on endocrine responsiveness in estrogen receptor-positive, HER2-negative metastatic breast cancer. Scientific reports *11*, 8109.

Hironaka, S., Ueda, S., Yasui, H., Nishina, T., Tsuda, M., Tsumura, T., Sugimoto, N., Shimodaira, H., Tokunaga, S., Moriwaki, T., *et al.* (2013). Randomized, open-label, phase III study comparing irinotecan with paclitaxel in patients with advanced gastric cancer without severe peritoneal metastasis after failure of prior combination chemotherapy using fluoropyrimidine plus platinum: WJOG 4007 trial. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology *31*, 4438-4444.

Janjigian, Y.Y., Shitara, K., Moehler, M., Garrido, M., Salman, P., Shen, L., Wyrwicz, L., Yamaguchi, K., Skoczylas, T., Campos Bragagnoli, A., *et al.* (2021). First-line nivolumab plus chemotherapy versus chemotherapy alone for advanced gastric, gastro-oesophageal junction, and oesophageal adenocarcinoma (CheckMate 649): a randomised, open-label, phase 3 trial. Lancet (London, England) *398*, 27-40.

Japanese Gastric Cancer, A. (1998). Japanese Classification of Gastric Carcinoma - 2nd English Edition. Gastric cancer : official journal of the International Gastric Cancer Association and the Japanese Gastric Cancer Association 1, 10-24.

Kalakonda, N., Maerevoet, M., Cavallo, F., Follows, G., Goy, A., Vermaat, J.S.P., Casasnovas, O., Hamad, N., Zijlstra, J.M., Bakhshi, S., *et al.* (2020). Selinexor in patients with relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma (SADAL): a single-arm, multinational, multicentre, open-label, phase 2 trial. The Lancet Haematology *7*, e511-e522.

Kang, Y.K., Boku, N., Satoh, T., Ryu, M.H., Chao, Y., Kato, K., Chung, H.C., Chen, J.S., Muro, K., Kang, W.K., *et al.* (2017). Nivolumab in patients with advanced gastric or gastrooesophageal junction cancer refractory to, or intolerant of, at least two previous chemotherapy regimens (ONO-4538-12, ATTRACTION-2): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. Lancet (London, England) *390*, 2461-2471. Kang, Y.K., Chen, L.T., Ryu, M.H., Oh, D.Y., Oh, S.C., Chung, H.C., Lee, K.W., Omori, T., Shitara, K., Sakuramoto, S., *et al.* (2022). Nivolumab plus chemotherapy versus placebo plus chemotherapy in patients with HER2-negative, untreated, unresectable advanced or recurrent gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ATTRACTION-4): a randomised, multicentre, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. The Lancet Oncology *23*, 234-247.

Kikuchi, J., Ohhara, Y., Takada, K., Tanabe, H., Hatanaka, K., Amano, T., K, C.H., Hatanaka, Y., Mitamura, T., Kato, M., *et al.* (2021). Clinical significance of comprehensive genomic profiling tests covered by public insurance in patients with advanced solid cancers in Hokkaido, Japan. Japanese journal of clinical oncology *51*, 753-761.

Koizumi, W., Narahara, H., Hara, T., Takagane, A., Akiya, T., Takagi, M., Miyashita, K., Nishizaki, T., Kobayashi, O., Takiyama, W., *et al.* (2008). S-1 plus cisplatin versus S-1 alone for first-line treatment of advanced gastric cancer (SPIRITS trial): a phase III trial. The Lancet Oncology *9*, 215-221.

Li, C., Ji, L., Ding, Z.Y., Zhang, Q.D., and Huang, G.R. (2013a). Overexpression of KPNA2 correlates with poor prognosis in patients with gastric adenocarcinoma. Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine *34*, 1021-1026.

Li, X.L., Jia, L.L., Shi, M.M., Li, X., Li, Z.H., Li, H.F., Wang, E.H., and Jia, X.S. (2013b). Downregulation of KPNA2 in non-small-cell lung cancer is associated with Oct4 expression. Journal of translational medicine *11*, 232.

Moroianu, J., Blobel, G., and Radu, A. (1995). Previously identified protein of uncertain function is karyopherin alpha and together with karyopherin beta docks import substrate at nuclear pore complexes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *92*, 2008-2011.

Mortezavi, A., Hermanns, T., Seifert, H.H., Baumgartner, M.K., Provenzano, M., Sulser, T., Burger, M., Montani, M., Ikenberg, K., Hofstädter, F., *et al.* (2011). KPNA2 expression is an independent adverse predictor of biochemical recurrence after radical prostatectomy. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research *17*, 1111-1121. Shitara, K., Ajani, J.A., Moehler, M., Garrido, M., Gallardo, C., Shen, L., Yamaguchi, K., Wyrwicz, L., Skoczylas, T., Bragagnoli, A.C., *et al.* (2022). Nivolumab plus chemotherapy or ipilimumab in gastro-oesophageal cancer. Nature *603*, 942-948.

Shitara, K., Bang, Y.J., Iwasa, S., Sugimoto, N., Ryu, M.H., Sakai, D., Chung, H.C., Kawakami, H., Yabusaki, H., Lee, J., *et al.* (2020). Trastuzumab Deruxtecan in Previously Treated HER2-Positive Gastric Cancer. The New England journal of medicine *382*, 2419-2430. Stelma, T., Chi, A., van der Watt, P.J., Verrico, A., Lavia, P., and Leaner, V.D. (2016). Targeting nuclear transporters in cancer: Diagnostic, prognostic and therapeutic potential. IUBMB life *68*, 268-280.

Stewart, M. (2007). Molecular mechanism of the nuclear protein import cycle. Nature reviews Molecular cell biology *8*, 195-208.

Ström, A.C., and Weis, K. (2001). Importin-beta-like nuclear transport receptors. Genome biology *2*, Reviews3008.

Takada, K., Kubo, T., Kikuchi, J., Yoshida, M., Murota, A., Arihara, Y., Nakamura, H., Nagashima, H., Tanabe, H., Sugita, S., *et al.* (2022). Effect of comprehensive cancer genomic profiling on therapeutic strategies and clinical outcomes in patients with advanced biliary tract cancer: A prospective multicenter study. Frontiers in oncology *12*, 988527.

Teng, S.C., Wu, K.J., Tseng, S.F., Wong, C.W., and Kao, L. (2006). Importin KPNA2, NBS1, DNA repair and tumorigenesis. Journal of molecular histology *37*, 293-299.

Tseng, S.F., Chang, C.Y., Wu, K.J., and Teng, S.C. (2005). Importin KPNA2 is required for proper nuclear localization and multiple functions of NBS1. The Journal of biological chemistry *280*, 39594-39600.

van der Watt, P.J., Chi, A., Stelma, T., Stowell, C., Strydom, E., Carden, S., Angus, L., Hadley, K., Lang, D., Wei, W., *et al.* (2016). Targeting the Nuclear Import Receptor Kpn81 as an Anticancer Therapeutic. Molecular cancer therapeutics *15*, 560-573.

van der Watt, P.J., Ngarande, E., and Leaner, V.D. (2011). Overexpression of Kpnß1 and Kpna2 importin proteins in cancer derives from deregulated E2F activity. PloS one *6*, e27723. Wang, T., Huang, Z., Huang, N., Peng, Y., Gao, M., Wang, X., and Feng, W. (2019). Inhibition

of KPNB1 Inhibits Proliferation and Promotes Apoptosis of Chronic Myeloid Leukemia Cells Through Regulation of E2F1. OncoTargets and therapy *12*, 10455-10467.

Wilke, H., Muro, K., Van Cutsem, E., Oh, S.C., Bodoky, G., Shimada, Y., Hironaka, S., Sugimoto, N., Lipatov, O., Kim, T.Y., *et al.* (2014). Ramucirumab plus paclitaxel versus placebo plus paclitaxel in patients with previously treated advanced gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (RAINBOW): a double-blind, randomised phase 3 trial. The Lancet Oncology *15*, 1224-1235.

Yang, L., Hu, B., Zhang, Y., Qiang, S., Cai, J., Huang, W., Gong, C., Zhang, T., Zhang, S., Xu, P., *et al.* (2015). Suppression of the nuclear transporter-KPNB1 expression inhibits tumor proliferation in hepatocellular carcinoma. Medical oncology (Northwood, London, England) *32*, 128.

Zannini, L., Lecis, D., Lisanti, S., Benetti, R., Buscemi, G., Schneider, C., and Delia, D. (2003). Karyopherin-alpha2 protein interacts with Chk2 and contributes to its nuclear import. The Journal of biological chemistry *278*, 42346-42351.

Zheng, M., Tang, L., Huang, L., Ding, H., Liao, W.T., Zeng, M.S., and Wang, H.Y. (2010). Overexpression of karyopherin-2 in epithelial ovarian cancer and correlation with poor prognosis. Obstetrics and gynecology *116*, 884-891.

Zhou, L.N., Tan, Y., Li, P., Zeng, P., Chen, M.B., Tian, Y., and Zhu, Y.Q. (2017). Prognostic value of increased KPNA2 expression in some solid tumors: A systematic review and meta-analysis. Oncotarget *8*, 303-314.

Zhu, J., Wang, Y., Huang, H., Yang, Q., Cai, J., Wang, Q., Gu, X., Xu, P., Zhang, S., Li, M., *et al.* (2016). Upregulation of KPN81 in gastric cancer cell promotes tumor cell proliferation and predicts poor prognosis. Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine *37*, 661-672.

Zhu, Z.C., Liu, J.W., Li, K., Zheng, J., and Xiong, Z.Q. (2018). KPNB1 inhibition disrupts proteostasis and triggers unfolded protein response-mediated apoptosis in glioblastoma cells. Oncogene *37*, 2936-2952.