



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	<a href="http://hdl.handle.net/2115/90076">http://hdl.handle.net/2115/90076</a>
Type	theses (doctoral)
Note	配架番号 : 1705
File Information	OHHARA_Yoshihito.pdf



[Instructions for use](#)

# 学位論文

胃癌における Karyopherin  $\alpha$  2 および karyopherin  $\beta$  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  $\alpha$  2 および karyopherin  $\beta$  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

# 目 次

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	6 頁
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, Hirotohi 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。

1. 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

## 要旨

【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  $\alpha$  2（KPNA2）や Karyopherin  $\beta$  1（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、転移に関与す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

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 (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
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)。

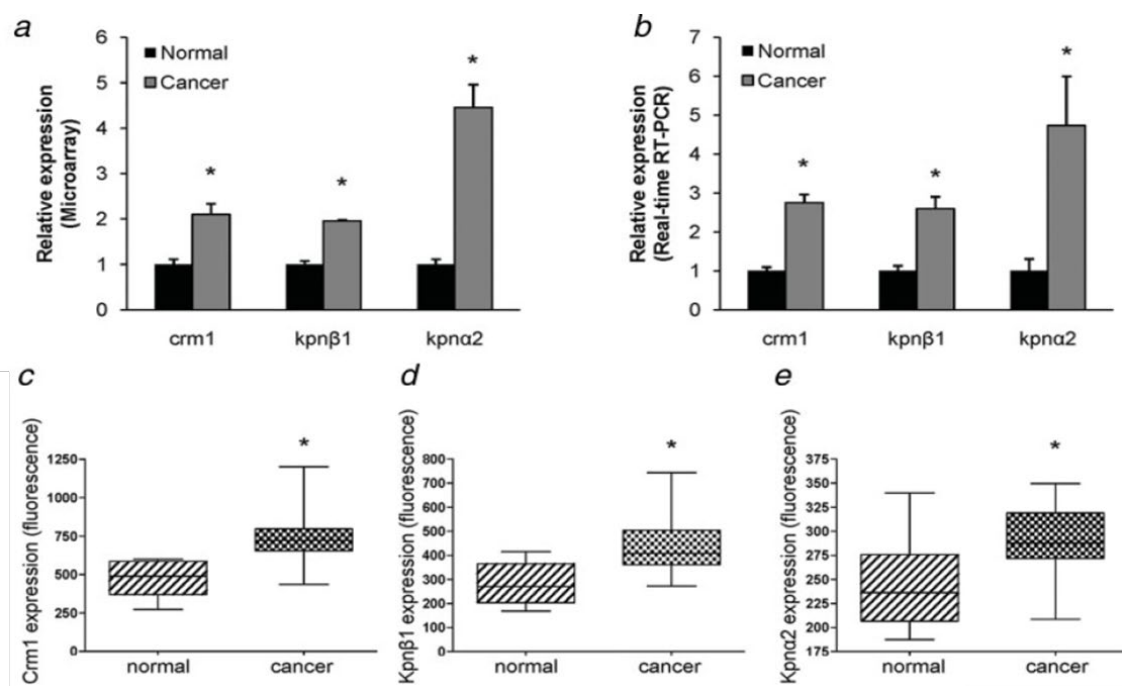
予後不良とされる胃癌の中で、HER2 は効果予測のバイオマーカーとして唯一確立されている。HER2 陽性胃癌においては、抗 HER2 抗体薬を使用することで、予後の改善を認めている。従来の標準治療に抗 HER2 抗体薬であるトラスツズマブを上乗せした TOGA 試験では、トラスツズマブ併用群が非併用群よりも有意に予後を改善した(Bang et al., 2010)。また、前治療歴のある HER2 陽性胃癌については、抗体薬物複合体であるトラスツズマブデルクステカン (T-DXd) が予後を大幅に改善することが報告されている (OS : T-DXd 12.5 か月 vs 医師選択治療 8.4 か月) (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。

### 核内輸送タンパク質カリオフィェリンについて

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 pore 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  $\alpha$  2 (KPNA2)、karyopherin  $\beta$  1 (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 (インポート)。一方、Crm1 は核内から細胞質にタンパク質を輸送する役割 (エクスポート) 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、子宮頸癌においては、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; Mortezaei 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% CO<sub>2</sub> 下の 37°C 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 T antigen 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% CO<sub>2</sub> 下の 37°C 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% CO<sub>2</sub> 下の 37°C 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% CO<sub>2</sub>、37°C 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、 $\beta$ -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へ 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°C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)

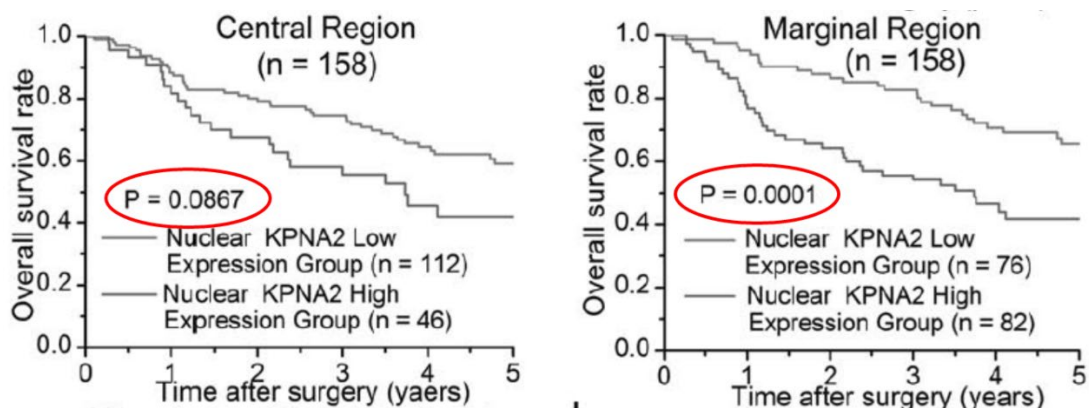
・抗 KPNB1 抗体 (1000 倍、30 分、rabbit polyclonal 抗体、H-300、sc-11367、Santa Cruz Biotechnology)

・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-rabbit 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

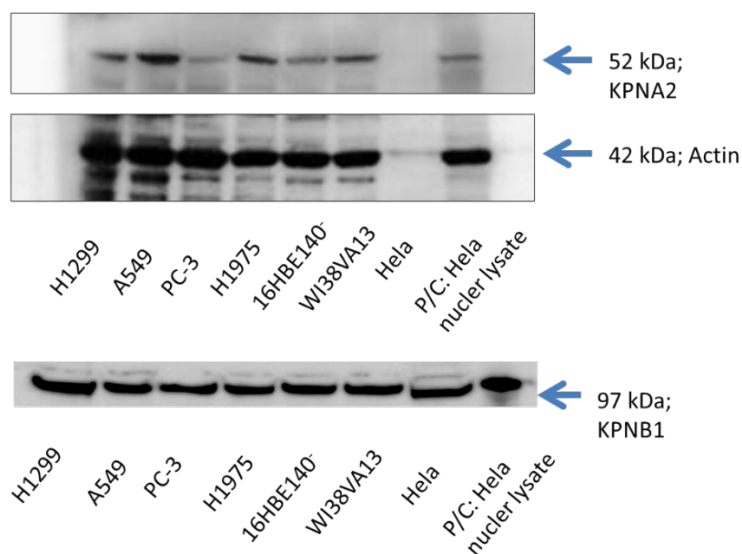
KPNA2 発現、KPNB1 発現と臨床病理学的因子の関連については、 $\chi^2$  乗検定しくはフィッシャーの正確確率検定で行った。全生存期間 (OS) については、手術を施行した日から死亡または最終フォローアップ日までと定義した。生存曲線はカプランマイヤー法で推定・作成し、ログランク法を用いて比較検討した。各種因子と生存期間についての単変量解析、多変量解析は Cox 比例ハザード回帰分析を用いて行い、 $P < 0.05$  を統計学的有意と判断した。全ての統計解析は SPSS version18 を使用して行った。

## 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。

a.



b.

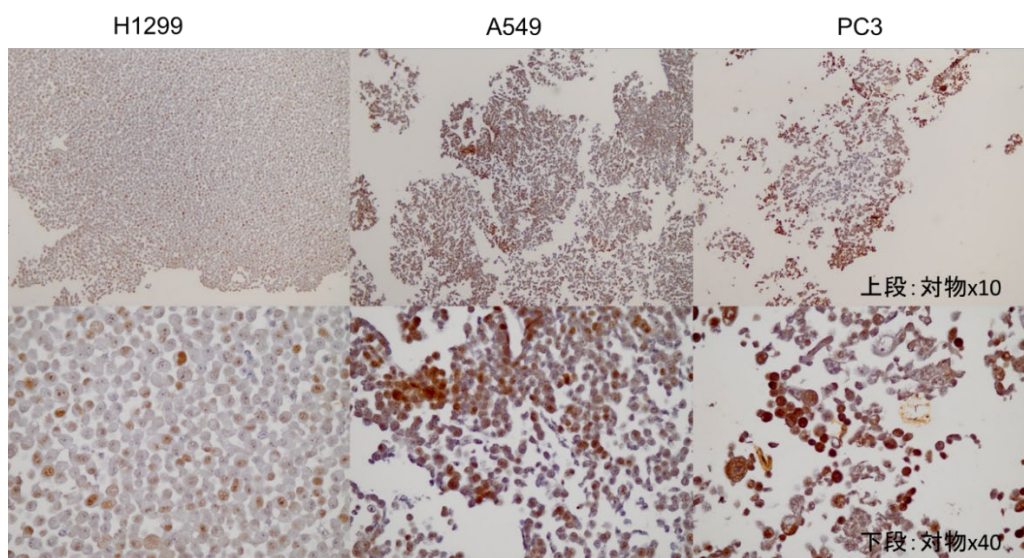


図 4. 肺癌細胞株による KPNA2 および KPNB1 のウェスタンブロット解析 (a) と KPNA2 の免疫染色 (b)

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。

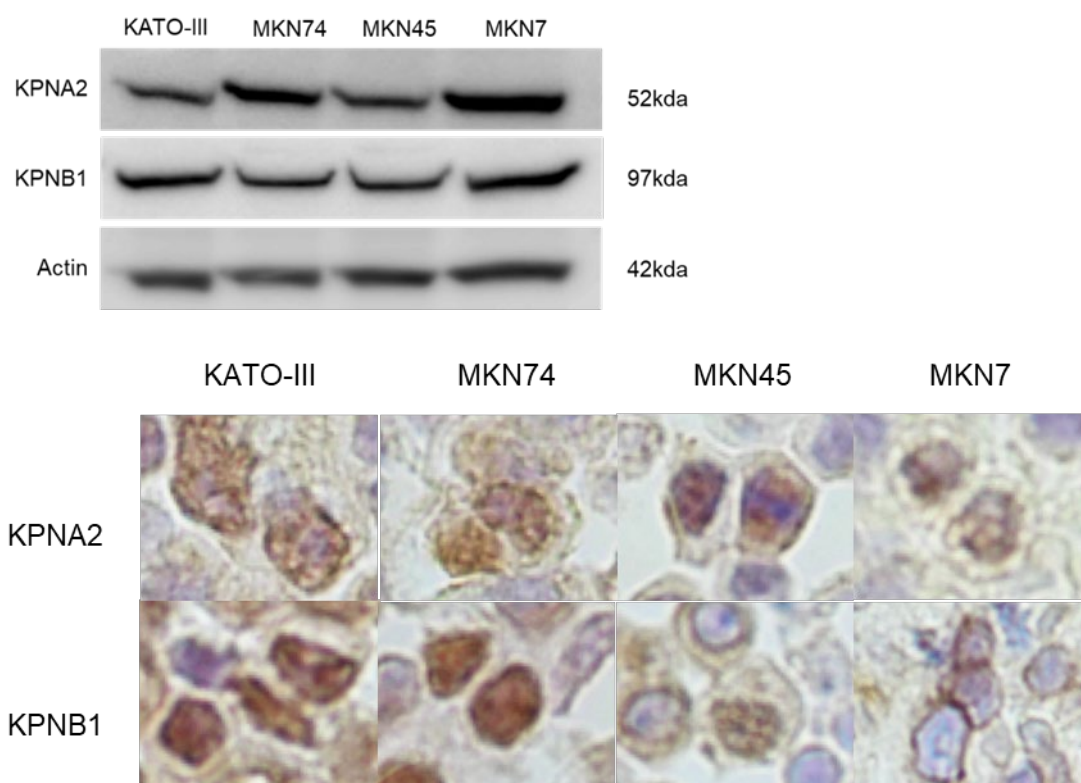


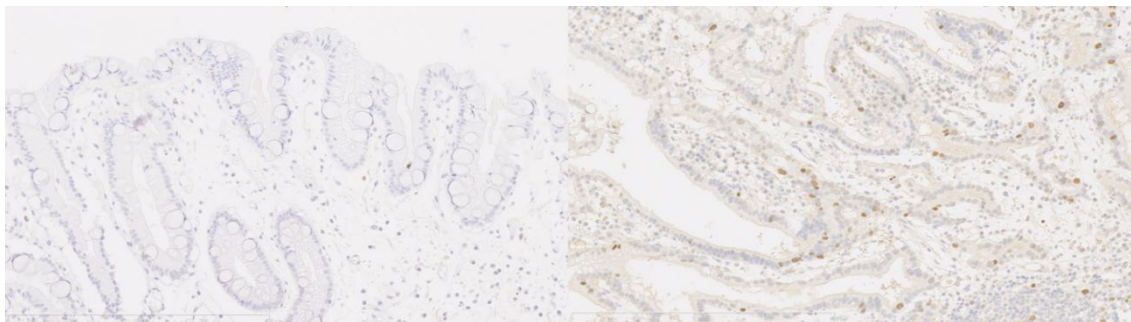
図5. 胃癌細胞株 (KATO-III, MKN74, MKN45, and MKN7)における KPNA2、KPNB1 ウェスタンブロット解析（上段）と免疫染色（下段）



### 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.



b.

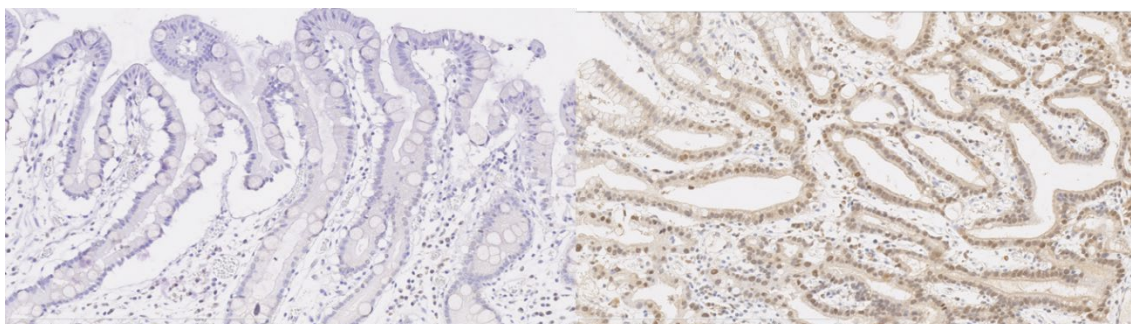


図 6. 正常胃組織 (左) と胃癌組織 (右) における KPNA2 染色 (a) および KPNB1 染色 (b)。胃癌症例 (tub1>tub2>muc, pT3(SS), N0, M0; StageIIB) で正常胃粘膜部位と腫瘍部位を比較

### 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。



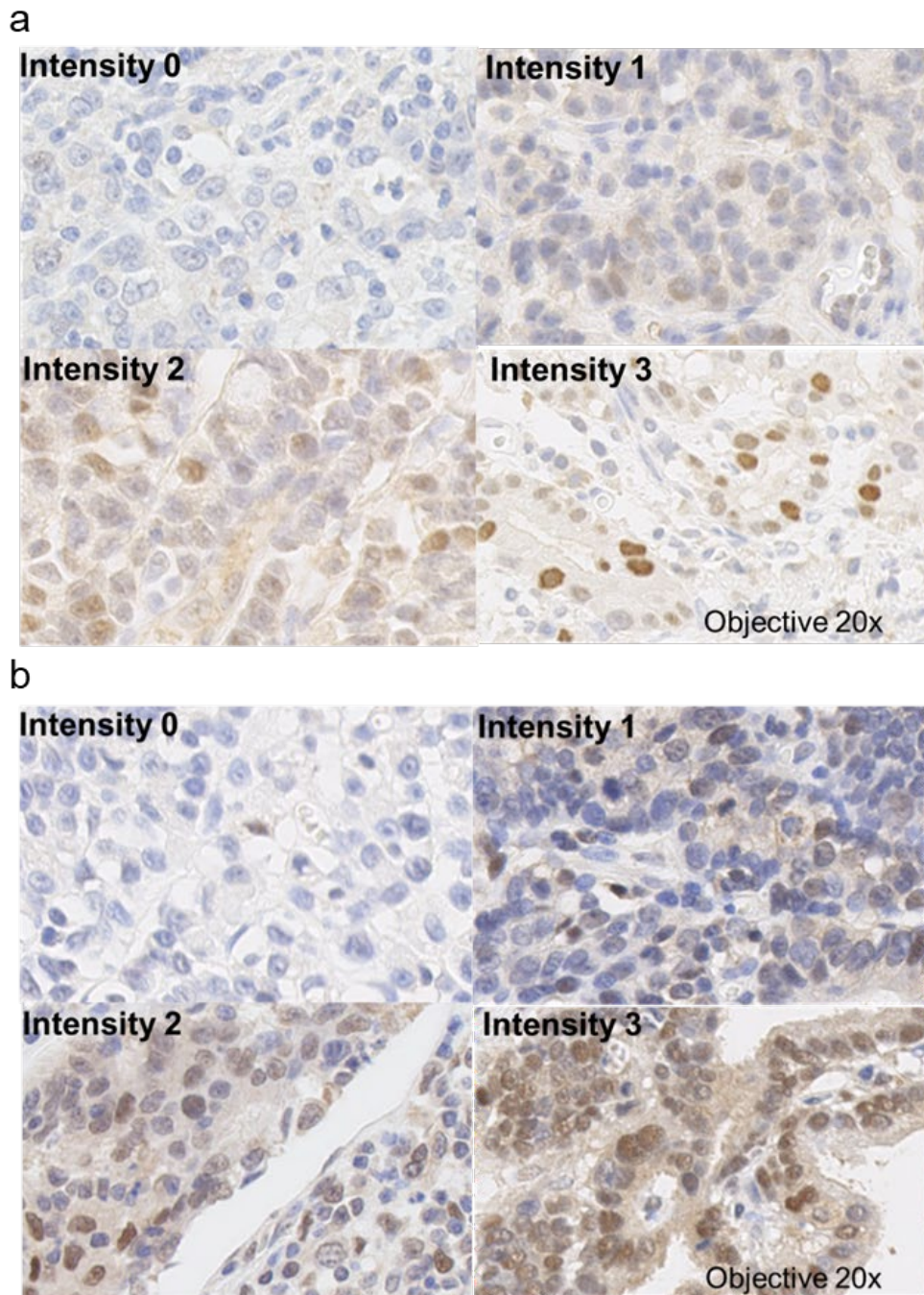


図 7. 胃癌組織における KPNA2 (a) と KPNB1 (b) の発現強度

Intensity 0 (0) = no staining

Intensity 1 (1+) = weak staining

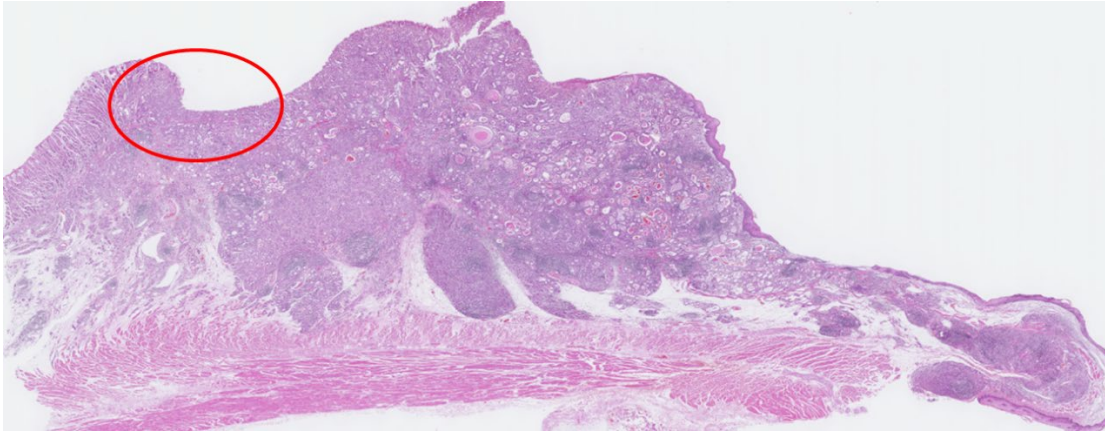
Intensity 2 (2+) = moderate staining

Intensity 3 (3+) = strong staining

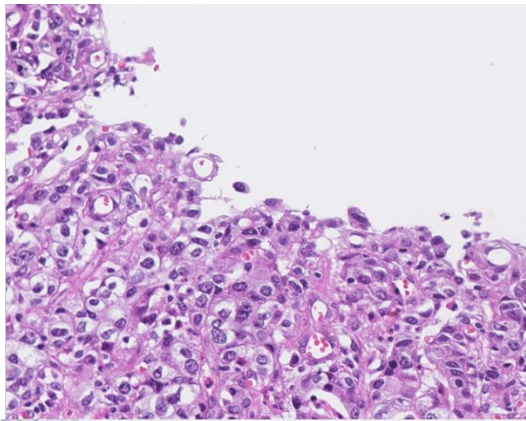
### 胃癌表層部と浸潤部での KPNA2、KPNB1 発現の違い

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。

a.



b.



HE	(対物x20)
KPNA2	KPNB1

	強度	割合	判定
KPNA2	1+	1+	陰性
KPNB1	1+	1+	陰性

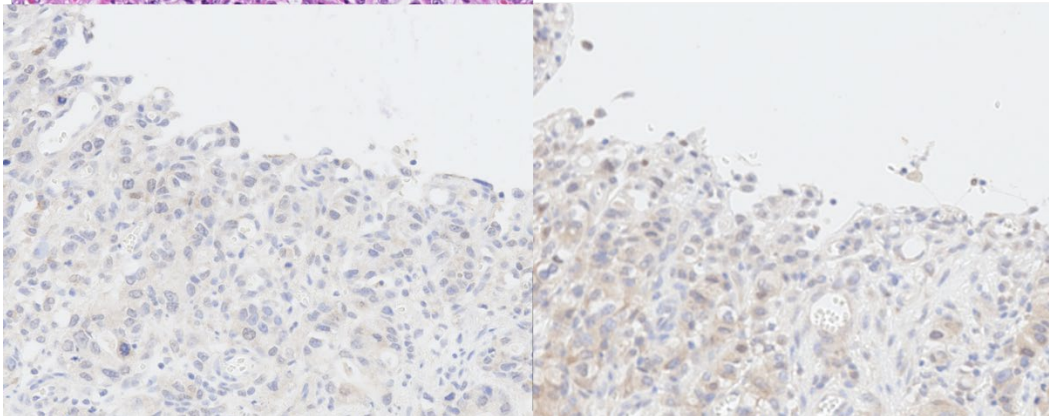
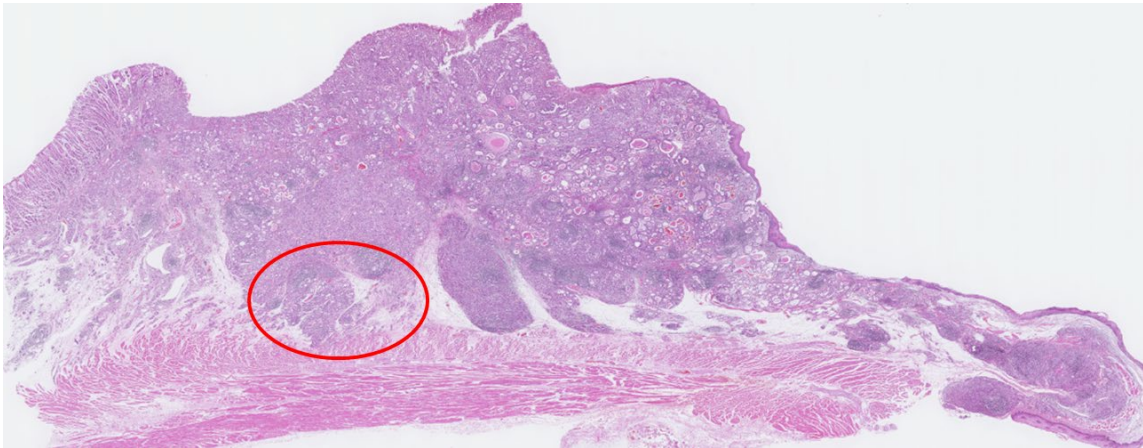


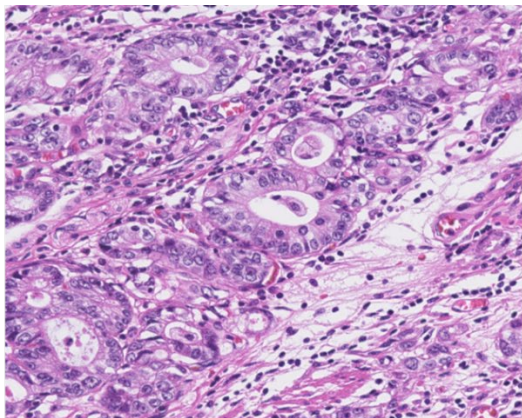
図 8. 胃癌症例 (tub2>por1=por2, pT2(MP), N2, M0; StagIIIA) a.弱拡大 (腫瘍表層部を赤丸で囲む)。b.強拡大による HE 染色、KPNA2 染色、KPNB1 染色



a



b



HE	(対物x20)
KPNA2	KPNB1

	強度	割合	判定
KPNA2	1+	1+	陰性
KPNB1	2+	2+	陽性

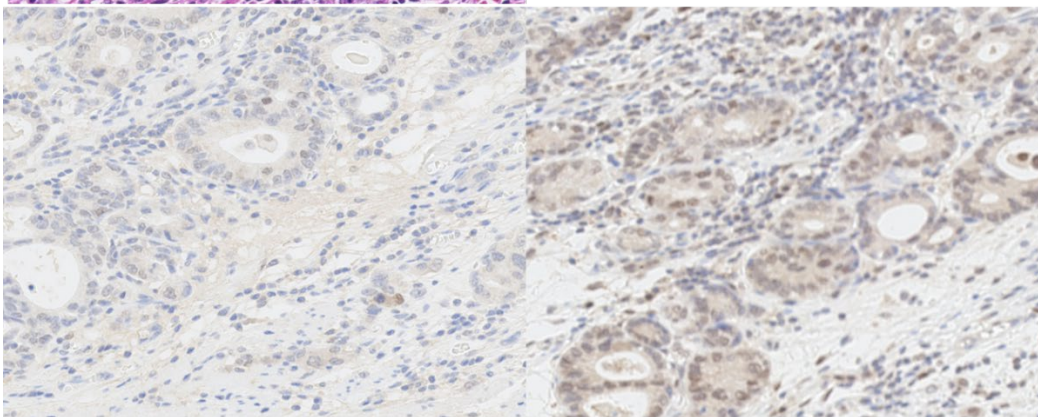


図 9. 胃癌症例 (tub2>por1=por2, pT2(MP), N2, M0; StagIIIA) a.弱拡大 (腫瘍浸潤部を赤丸で囲む)。b.強拡大による HE 染色、KPNA2 染色、KPNB1 染色

## 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、StageII 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。

表 1. 本研究の患者背景を示す

	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;		
I	74	57%
II	14	11%
III	26	20%
IV	16	12%

### 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。

表 2. 胃癌における KPNA2 発現割合と臨床病理学的特徴

	KPNA2 expression				P-value
	Low N = 98		High 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%)	
Histology					0.546
Intestinal	43	(73%)	16	(27%)	
Diffuse	55	(77%)	16	(23%)	
Tumor depth					0.006
T1 (M, SM)	52	(87%)	8	(13%)	
T2–4 (MP, SS, SE)	46	(66%)	24	(34%)	
Lymph node metastasis					0.008
Absent	60	(85%)	11	(15%)	
Present	38	(64%)	21	(36%)	
Lymphatic invasion					0.024
Absent	50	(85%)	9	(15%)	
Present	48	(68%)	23	(32%)	
Venous invasion					0.016
Absent	74	(81%)	17	(19%)	
Present	24	(62%)	15	(38%)	
KPNB1 expression					< 0.001
Low	71	(86%)	12	(14%)	
High	27	(57%)	20	(43%)	

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

表 3. 胃癌における KPNB1 発現割合と臨床病理学的特徴

	KPNB1 expression				P-value
	Low N = 83		High 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%)	

		割合(Proportion)				total
		<1%	1-10%	11-50%	51%≤	
強度 (Intensity)	0	13	0	0	0	13
	1+	0	18	26	3	47
	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)。

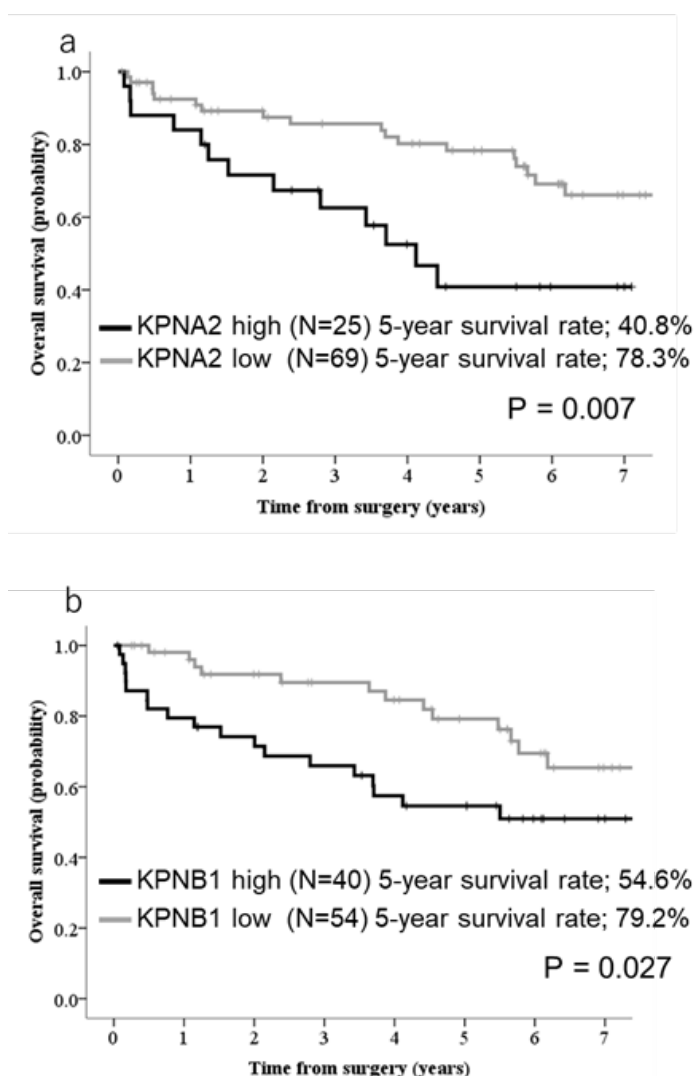


図 10. 胃癌 94 症例における KPNA2 高発現群と低発現群の生存曲線 (a) および KPNB1 高発現群と低発現群の生存曲線 (b)

### 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)。

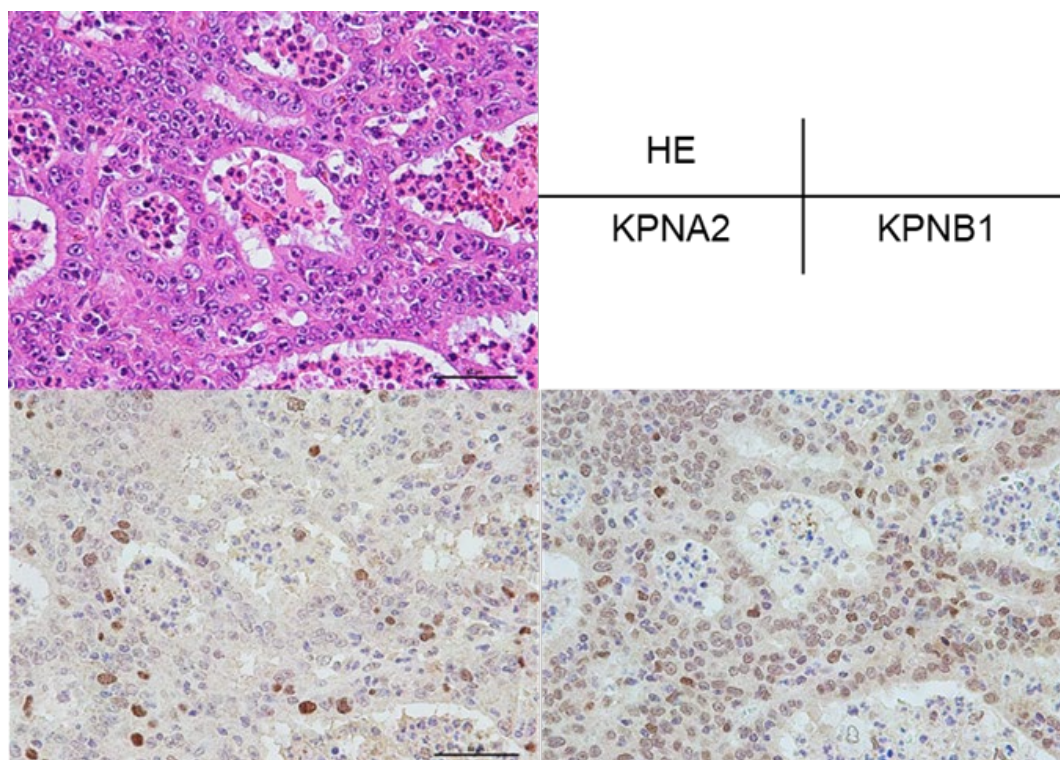


図 11. KPNA2 高発現かつ KPNB1 高発現の胃癌症例。scale bar=50  $\mu$ m

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)。

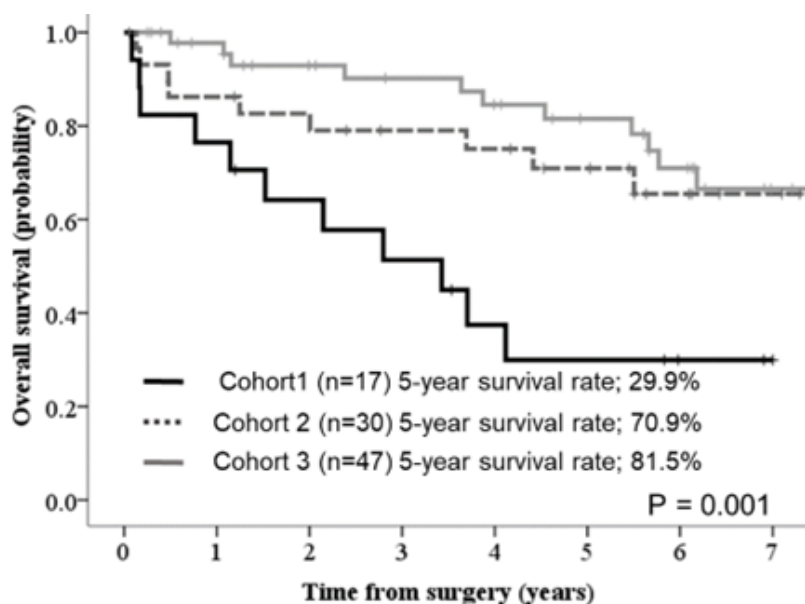


図 12. KPNA2、KPNB1 の発現別に層別化したコホート 1 (KPNA2 高発現かつ KPNB1 高発現)、コホート 2 (KPNA2 または KPNB1 のいずれか一方が高発現)、コホート 3 (KPNA2 低発現かつ KPNB1 低発現) における生存曲線。P 値はコホート 1 vs コホート 2・3 の結果を示す。

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。

	Cohort 1 N=17	Cohort 2 N=30	Cohort 3 N=47	P-value*
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%)	

### 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 ratio	95% CI	P-value	Hazard ratio	95% CI	P-value
Age; < 65 vs ≥ 65 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  $\geq 20\%$ ) 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)。

表 6. 胃癌における KPNA2、KPNB1 発現と Ki-67 の関係

		Ki-67				<i>P</i> -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%)	

## 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、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られる(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を示し、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- $\alpha$ 2 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 gastro-oesophageal 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  $\beta$ 1 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 Kpn $\beta$ 1

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- $\beta$ s: recognition and inhibition. *Biochimica et biophysica acta* *1813*, 1593-1606.

Dahl, E., Kristiansen, G., Gottlob, K., Klamann, I., Ebner, E., Hinzmann, B., Hermann, K., Pilarsky, C., Dürst, M., Klinkhammer-Schalke, M., *et al.* (2006). Molecular profiling of laser-microdissected 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, Double-

Blind, 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., Skoczymas, 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 gastro-oesophageal 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 Kpn $\beta$ 1 as an Anticancer Therapeutic. *Molecular cancer therapeutics* *15*, 560-573.

van der Watt, P.J., Ngarande, E., and Leaner, V.D. (2011). Overexpression of Kpn $\beta$ 1 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-KPN $\beta$ 1 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 KPN $\beta$ 1 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.