

乳癌原発巣における Klotho 発現と予後に関する検討
(要約)

日本大学大学院医学研究科博士過程

生理系機能生理学専攻

鈴木 周平

修了年 2017 年

指導教員 越永 従道

背景：Klotho 遺伝子は早期老化現象を呈する遺伝子変異マウスから発見され、これを欠損したマウスは動脈硬化や異所性石灰化、皮膚の萎縮等の多様な早期老化現象を呈する¹⁾。その為 Klotho 遺伝子は抗老化遺伝子として働いていると考えられ、現在様々な研究がおこなわれている。Klotho 遺伝子が細胞に対し抗老化作用を及ぼす機序は不明な点が多いが、Klotho 遺伝子の活性化によるカルシウム及びリンの恒常性維持が抗老化作用に影響していることがわかってきている²⁾。Klotho 遺伝子は1回膜貫通型の、 β -グルクロニダーゼ活性を有するタンパク質をコードしており、生体内では腎臓で最も強く発現している³⁾。Klotho 蛋白質は膜中の α/β -secretase により切断されると分泌型 Klotho 蛋白質となる。Klotho 蛋白質は FGF 受容体と協働して FGF23 のシグナルを細胞内に伝え、腎尿細管でのリンの再吸収を抑制する。また、FGF23 - Klotho シグナルは近位尿細管での 1α -hydroxylase の活性を抑制し、ビタミン D の活性化を抑制する。これにより Klotho 蛋白質は血中のカルシウム、リン、活性型ビタミン D を増加させると考えられている。実際に慢性腎不全患者の腎臓では Klotho 蛋白質の発現が低下していることがわかっており、血清中のカルシウム、リン、活性型ビタミン D が高値を示す⁴⁾。血中のカルシウムの増加は骨密度の低下、軟部組織の石灰化や血管壁の硬化を促進し、これが全身性に生じることで老化現象に発展するのではないかと考えられている。また、リンの増加も老化に関与している可能性が考えられるが、その機序は現在解明されていない。しかしながら、リンが増加することで血中のリン酸カルシウムの結晶体である Calciprotein particle (CPP) が増加し、CPP が全身性に臓器を障害することで老化現象を呈する可能性が提唱されている⁵⁾。

また、Klotho 遺伝子は insulin を介した糖代謝にも関与しており、Klotho 蛋白質は FGF19、23 の受容体として作用する。FGF は、摂食時に小腸から分泌され、脂肪細胞に作用し GLUT1 の発現を亢進させ脂肪細胞へのグルコースの取り込みを増加させる。よって Klotho 蛋白質は FGF を介し血糖値を低下させることで insulin の分泌抑制を起こす。また、Klotho 蛋白質そのものが insulin-like-growth factor-1 のシグナル伝達系を抑制する酵素としての役割もあり、成長因子である insulin 及び insulin-like-growth factor (IGF) に対し

てKlotho蛋白質は抑制的に作用することがわかっている⁶⁾。Insulin及びIGF groupは癌細胞の増殖を促進する為、これらの機序は正常細胞だけでなく、癌細胞においても重要である。特に乳癌においてはinsulin抵抗性が独立した予後因子であることが報告されている⁷⁾。

悪性疾患とKlotho遺伝子の関連については不明な点が多くその関連性について検討した研究も少ないが、肺癌患者においてKlotho蛋白質の発現を認めた症例で予後が良好であったことがUsudaらにより報告されている⁸⁾。また、肺癌細胞にKlotho蛋白質を発現させるとアポトーシスが誘導され、腫瘍発育が抑制されることがChenらにより報告されている⁹⁾。

乳癌においては乳癌患者におけるKlotho蛋白質の陽性率を測定することで予後因子として利用できるか検討した研究結果が報告されている¹⁰⁾。この報告では乳癌患者のうちKlotho蛋白質が高値に発現している群では低発現の群に比較して有意にKi-67-PIが低値であり、腫瘍サイズは小さいという結果が報告されている¹⁰⁾。WolfらはこれによりKlotho遺伝子が乳癌においてIGF-1及びFGF pathwayを調節し、腫瘍の進展に関与しているのではないかという仮説を立てている¹⁰⁾。

目的： Klotho 蛋白の発現が乳癌患者における予後因子であることを証明できれば治療方針決定の指標となりうる。我々は乳癌患者における Klotho 蛋白質の発現と各種臨床病理学的因子との関連を検討し、Klotho が乳癌における予後予測因子として有用であることを証明することを研究の目的とした。

対象と方法：2004年から2009年までに、日本大学医学部附属板橋病院において乳癌と診断され手術を施行した術前未治療で予後の明らかな乳癌病巣 142 症例を対象とした。対象の病巣部のパラフィン包埋連続切片を用いて以下の手順でKlotho 蛋白の免疫組織学的染色を行った。

1) 使用抗体

一次抗体 抗 Klotho ラビットモノクローナル抗体(abcam/Catalogue No. ab181373)

二次抗体 One-Step Polymer-HRP (BioGenex/Catalogue No. HK595-50K)

抗原賦活液 インスタントクエン酸緩衝液(20倍希釈)PH6.0 (LSI メディエンス/Catalogue No. RM-102C)

1mM EDTA pH8.0 (関東化学社/Catalogue No.14097-00)

蛋白分解酵素 Proteinase K Ready to use (DAKO/Catalogue No. S3020)

発色試薬 Super Sensitive DAB (Biogenex/Catalogue No. HK542-XAK)

対比染色試薬 マイヤーヘマトキシリン (武藤化学株式会社/Catalogue No. 3000-2)

2) 染色プロトコール

1. ホルマリン固定パラフィン包埋検体を薄切し 4 μ m 切片のスライドガラスを作成した。
2. キシレンにスライドガラスを浸し脱パラフィン処理を行った。
3. 1mM EDTA pH8.0 を 98°C40 分間で加熱処理し抗原賦活化処理を行った。
4. 室温にて 20 分置き放冷した。
5. 流水にて洗浄した。
6. 3%過酸化水素水に 5 分間浸し処理を行った。
7. PBS (0.01M、PH7.4) で 5 分間の洗浄を 3 回行った。
8. 一次抗体として抗Klotho ラビットモノクローナル抗体を室温で 50 分間反応させた。
9. PBS (0.01M、PH7.4) で 5 分間洗浄を 3 回行った。
10. 二次抗体として One-Step Polymer-HRP を室温で 15 分間反応させた。
11. PBS (0.01M、PH7.4) で 5 分間洗浄を 3 回行った。
12. Super Sensitive DAB で 5 分間発色させた。
13. 流水にて洗浄した。
14. マイヤーヘマトキシリンで 1 分間の核染色を行った。
15. スライドガラスを水洗し、その後色出しした。
16. 脱水後、透徹し封入を行った。

尚、抗原賦活化処理は先立って行った検討試験にて 1mM EDTA pH8.0 を用いて 98°C、40 分間で行った場合最も良好な染色結果を得た為同条件を採用した。

3) 判定方法

OLYMPUS 社製 typeBX51 を用いて光顕的に判定を行った。判定は二名の医師によりダブルブラインドで行い、癌組織最深部の先端部 5 視野において、陽性細胞数が 10% 以下を陰性、11%以上を Klotho 陽性とした。

同時に Ki-67 陽性細胞率(Ki-67-PI)を検索し、得られた結果と予後を含めた臨床病理学的因子を比較した。統計学的検定には 2 群間の検定及び多群間の検定には多変量分散分析法を用いて、 $p < 0.05$ を有意差ありと判定した。無再発生存率および累積生存率の算出には Kaplan-Meier 法を用いた。

結果：Klotho 蛋白は正常乳腺部の 142 症例(100%)に陽性であり、恒常的に発現していた。癌部では 88 症例(62.0%)に陽性であった。臨床病理学的因子との比較では、年齢、閉経の有無、左右、組織型、ホルモン受容体、HER-2 発現、遠隔転移の有無について Klotho 蛋白発現程度に差を認めなかった。Klotho 陽性群において非浸潤癌の割合が高かった ($p < 0.05$)。Klotho 陽性群においては陰性群に比べ腫瘍径が小さく、リンパ節転移個数は少なかった ($p < 0.05$)。Klotho 陽性群は陰性群に比べて Ki-67-PI の中央値は低値であった ($p < 0.05$)。Klotho 蛋白発現程度による 5 年無再発生存率は陽性群 77.6%、陰性群 36.9%であり Klotho 蛋白陽性群は陰性群に比較し良好であった ($p < 0.05$)。しかしながら 5 年累積生存率は陽性群で 88.3%、陰性群で 70.0%と有意差を認めなかった。Klotho 陽性群において術後無再発生存率は良好であり、他臨床病理学的因子を含め単変量及び多変量解析を行った。多変量解析では腫瘍径、Ki-67-PI が独立した乳癌の予後因子として抽出されたが、Klotho 蛋白の発現は予後因子とはならなかった。

考察：Klotho 蛋白陽性群は浸潤癌の割合、リンパ節転移の個数、腫瘍径、Ki-67-PI、病期において陰性群と比較し良好であり、いわゆる早期癌の特徴を有することがわかった。また、癌部では正常乳腺部と比較し Klotho 蛋白質の発現は低下しており、Klotho 蛋白質発現の障害が癌の進展に関与する可能性が示唆された。術後累積生存率に差は認めなかったものの術後無再発生存率では Klotho 陽性群で有意に良好な結果を認めており、Klotho 蛋白質の発現が乳癌において新たな予後予測因子に成りうることを示唆した。しかしながら Klotho 蛋白が癌細胞の進展においてどのような活性を有するかは不明な点が多く、症例数を増やし今後更なる検討を行う余地があると考えられた。

まとめ：乳癌の生存率と Klotho 蛋白の発現における因果関係は本研究では明らかにならなかった。しかしながら癌細胞が増殖する過程で Klotho 遺伝子の発現が関与する可能性があり、乳癌原発巣における Klotho 蛋白の発現程度を検索することは、予後予測に有用である可能性が示唆された。

参考文献

- 1) Kuro-o M. , Matsumura Y. , Aizawa H. , et al. : Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature*, 390, 45-51, 1997
- 2) 鍋島陽一, 前田良太, 伊村明浩 : α -Klotho の分子機能. *実験医学* 31:60-64, 2013
- 3) 山下照仁, 黒尾誠, 鍋島陽一 : 早期老化(Klotho 変異)マウスにおける骨の形態形成異常. *実験医学* 16:131-135, 1998
- 4) Koyama D. , Sato Y. , Aizawa M. , et al. : Soluble α Klotho as a Candidate for the biomarker of Aging. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 467:1019-1025, 2015
- 5) Kuro-o M. : Calciprotein(CPP) a true culprit of phosphorus woes?. *Nefrologia.*, 34(1), 1-4, 2014
- 6) Biao Xie, Jinhui Chen, Bin Liu, et al. : Klotho Acts as a Tumor Suppressor in Cancers. *Pathol. Oncol. Res*, 19:611-677, 2013
- 7) Provinciali N. et al. : High insulin levels linked to worse prognosis in advanced breast cancer. *Advanced Breast Cancer Third International Consensus Conference*, 2015
- 8) Usuda J. , Ichinose S. , Ishizumi T. , et al. : Klotho is a novel biomarker for good survival in resected large cell neuroendocrine carcinoma of the lung. *Lung Cancer.*, 72(3), 355-359, 2011
- 9) Chen B. , Ma X. , Liu S. , et al. : Inhibition of lung cancer cells growth, motility and induction of a apoptosis by klotho, a novel secreted Wnt antagonist, in a dose dependent manner. *Cancer. Biol. Ther.* 13:1221-1228, 2012
- 10) Wolf I. , Levanon-Cohen S. , Bose S. , et al. : Klotho: a tumor suppressor and a modulator of the IGF-1 and FGF pathway in human breast cancer. *Oncogene*, 27, 7094-7105, 2008