

# 論文内容要旨

Clinicopathological significance of claspin  
overexpression and its association with spheroid  
formation in gastric cancer

(胃癌における claspin 過剰発現の臨床病理学的意義  
とスフェロイド形成への関与)

Human Pathology, 84:8-17,2019.

主指導教員：安井 弥教授  
(医系科学研究科 分子病理学)  
副指導教員：武島 幸男教授  
(医系科学研究科 病理学)  
副指導教員：仙谷 和弘講師  
(医系科学研究科 分子病理学)

小林 剛

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

胃癌は代表的な癌の一つであり、早期癌の治療成績は飛躍的に向上しているが、依然として世界の癌死亡の主要な位置を占めている。近年、癌の再発、転移や薬剤耐性と癌幹細胞との関連が注目されている。癌幹細胞を効率よく同定する方法のひとつにスフェロイドコロニー形成法がある。当研究室ではこれまでに、スフェロイド形成した状態の胃癌細胞と通常の接着した状態の胃癌細胞におけるマイクロアレイ解析から遺伝子発現を比較検討し、KIFC1, KIF11, IQGAP3などがスフェロイド形成細胞で高発現することを報告した。本研究では、以前に行なわれたマイクロアレイ解析にて、スフェロイド形成した胃癌細胞株 MKN45 及び MKN74 の両者において高発現している *CLSPN* に着目した。*CLSPN*は *claspin* 蛋白質をコードしている遺伝子であり、細胞周期 S 期における DNA 障害チェックポイントに関与している分子である。これまでに、*claspin* を抑制することによって細胞周期チェックポイントや修復システムに変異が生じ、結果として癌が誘発されたと報告されている一方で、肺癌、乳癌、大腸癌、子宮頸癌などでは *claspin* の過剰発現が癌の増殖に関与しているとの報告もある。しかしながら胃癌における *claspin* の発現異常、意義は全く検討されていない。そこで本研究では胃癌における *claspin* の臨床病理学的意義ならびに生物学的機能を明らかにすることを目的とした。さらに *claspin* と癌幹細胞マーカーおよび代表的な癌関連分子との関連性についても検討した。

胃癌細胞株 MKN45 と MKN74 を用い、スフェロイドを形成した細胞群とディッシュに接着した状態の通常の細胞群について、定量的 RT-PCR により *claspin* の発現レベルを比較したところ、マイクロアレイ解析の結果と合致してスフェロイドを形成した細胞群において高い発現が認められた。また正常 14 組織と 5 つの胃癌細胞株を材料に *claspin* の発現を解析したところ、正常 14 組織と比較して胃癌細胞株において *claspin* の高発現を認め、特に MKN-45 で最も高発現を示した。胃癌症例 14 例を用いて T/N 比（腫瘍部と非腫瘍部組織における発現量の比）を算出したところ、5 例（36%）の腫瘍部において *claspin* が 2 倍以上の高発現を示していた。

次に外科的に切除された胃癌組織を材料に免疫組織化学的検討を行ったところ、腫瘍の分化度に関係なく *claspin* は腫瘍細胞の核に陽性像が認められた。非腫瘍部胃粘膜では *claspin* の発現

はほとんど認められなかった。腫瘍細胞の 5%以上が染色された症例を claspin 陽性とする、203 例中 94 例(47%)が claspin 陽性であった。Claspin の発現と臨床病理学的因子との相関を解析した結果、claspin の発現は T grade ( $p=0.0028$ ), N grade ( $p=0.0045$ ), tumor stage ( $p=0.0003$ ), lymphatic invasion ( $p=0.0025$ )と有意に相関していた。Kaplan-Meier 法で予後との関連を検討したところ、claspin 陽性例は陰性例に比べ有意に予後不良であった( $p=0.0468$ )。単変量多変量解析を用いた検討では、claspin の発現は独立した予後不良因子ではなかった。

次に、123 症例の胃癌切除例について claspin と癌幹細胞マーカーおよび癌関連分子 (CD44, ALDH1, CD133, MMP7, beta-catenin, p53, HER2, EGFR) との関連についての免疫組織化学的に解析を行った。Claspin の発現は、CD44、p53 および HER2 と有意に相関することを見出した。

claspin の胃癌細胞における機能を明らかにする目的で、胃癌細胞株 MKN-45 において siRNA を用いて claspin をノックダウンし、MTT assay にて増殖能を、Modified Boyden chamber assay にて浸潤能を評価した。claspin をノックダウンした胃癌細胞は negative control siRNA で処理した胃癌細胞と比較して増殖能(MKN-45:  $p < 0.05$ )、浸潤能(MKN45:  $p < 0.05$ ) が有意に抑制された。以上のことから claspin は胃癌の増殖能、浸潤能を制御することが明らかとなった。

以上の結果より、claspin は胃癌の進行において重要な役割を担っており、癌幹細胞性への関与も示唆された。胃癌における新しい治療標的として応用され得る可能性も示された。