

# 論 文 内 容 要 旨

Clinicopathological significance of RCAN2

production in gastric carcinoma

(胃癌における RCAN2 産生の臨床病理学的意義)

Histopathology, 74: 430–442, 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：大上 直秀 准教授

(医系科学研究科 分子病理学)

服部 結

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

胃癌は国内外を問わず死亡率の高い癌腫であり、新規診断あるいは治療薬の開発が重要な課題である。以前他研究室との共同研究において、KRAS 変異型大腸癌では RCAN2 の発現抑制を介し Calcineurin-NFATc (cytosolic nuclear factor of activated T cells) 経路の脱抑制で細胞増殖が亢進すること、VEGF を介して血管新生を抑制することを明らかにし報告した。RCAN2 はリンパ球の活性化や血管新生に関与している calcineurin-NFATc signaling pathway において calcineurin regulator として働いている。しかしながら、RCAN2 の胃癌における役割は全く解析されていない。本研究は、KRAS 変異型大腸癌において腫瘍抑制的な働きをしている RCAN2 蛋白が同じ消化管癌である胃癌においてはどのような働きをしているのかを明らかにすることを目的として、胃癌における RCAN2 の発現及び生物学的機能解析を行った。

得られた結果は以下のように要約される。

胃癌の外科的切除組織 207 例に対し免疫染色で RCAN2 蛋白の発現を検討したところ、110 例 (53%) が陽性を示した。RCAN2 蛋白の発現と臨床病理学的因子との関係を解析したところ、stage の進行 ( $p < 0.0001$ )、ヘリコバクターピロリ感染 ( $p = 0.0023$ ) との間に有意な相関を認めた。Kaplan-Meier 法を用いた予後との関連検討では、RCAN2 陽性例は陰性例に比べ有意に予後不良であった ( $p < 0.0001$ )。単変量、多変量解析を用いた検討において、RCAN2 は独立した予後不良因子であることが示された。癌腫の浸潤・増殖への関与が知られている種々の分子との関係を免疫染色を用いて検討を行ったところ、RCAN2 陽性例は EGFR ( $p < 0.0001$ )、 $\beta$ -catenin ( $p < 0.0014$ )、MMP-7 ( $p < 0.0001$ )、Laminin2 ( $p < 0.0001$ )、VEGF ( $p < 0.0001$ ) 陽性例と有意な相関が認められた。さらに、RCAN2 とこれらの分子の腫瘍内における共局在が免疫染色で確認できた。RCAN2 の下流である NFAT の中でも胃癌との関連が報告されている NFATc3 も、免疫染色を用いた発現検討により RCAN2 との間に相関関係が認められた ( $p < 0.0001$ )。

RCAN2 の胃癌細胞における生物学的機能を明らかにする目的で、RCAN2 の高発現がみられた MKN1 を用いて si-RNA による RCAN2 のノックダウンを行い、MTT-assay にて増殖能を、invasion assay にて浸潤能を評価した。RCAN2 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 ( $p < 0.01$ )、浸潤能 ( $p < 0.01$ ) が有意に抑制された。したがって RCAN2 は胃癌の増殖能、浸潤能を促進するものと見なされた。RCAN2 が胃癌の増殖に関与する分子機構を確認するため、EGFR の下流経路である ERK-MAPK 経路、PI3K-AKT 経路への影響を Western blot 法にて検討した。RCAN2 をノックダウンした胃癌細胞では negative control siRNA で処理した胃癌細胞と比較し ERK 及び AKT のリン酸化が抑制された。以上から RCAN2 はこれらのシグナル経路を介して癌の増殖に関与していると考えられた。また、RCAN2 のノックダウンにともなって NFATc3 のリン酸化が抑制された。次に RCAN2 の発現が低い胃癌細胞株 MKN45 を用いて RCAN2 の強制発現を行った。RCAN2 の強制発現により、empty と比較して胃癌細胞株の増殖能 ( $p < 0.01$ )、浸潤能 ( $p < 0.01$ ) が有意に上昇した。

以上の結果から、RCAN2 は胃癌において高発現し、RCAN2 の高発現は独立した予後不良因子であることが明らかとなった。また RCAN2 の発現は腫瘍の進展に関与する EGFR、 $\beta$ -catenin、MMP-7、Laminin2、VEGF の発現と相関し、ERK-MAPK 経路、PI3K-AKT 経路を活性化して増殖、浸潤を促進する可能性が示された。RCAN2 は胃癌の新規診断及び治療標的分子として期待される。