

## 論 文 内 容 要 旨

Overexpression of claspin promotes docetaxel resistance and is associated with prostate-specific antigen recurrence in prostate cancer

(前立腺癌における claspin 高発現はドセタキセル耐性を促進し、PSA 再発に関与する)

Cancer Medicine, 10(16):5574–5588, 2021.

主指導教員：大上 直秀教授

(医系科学研究科 分子病理学)

副指導教員：日向 信之教授

(医系科学研究科 腎泌尿器科学)

副指導教員：仙谷 和弘講師

(医系科学研究科 分子病理学)

馬場崎 隆志

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

前立腺癌は、男性において罹患数の最も多い癌であり、世界のがん死亡原因の主要な位置を占めている。アンドロゲン遮断療法は、前立腺癌の治療に効果的であるが、一度去勢抵抗性が獲得されるとアンドロゲン遮断療法の効果は低下し、去勢抵抗性前立腺癌として再発と転移が生じる。ドセタキセルは去勢抵抗性前立腺癌患者に有意な延命効果をもたらす抗癌剤であるが、いずれはドセタキセル耐性化が必然的に生じるため、依然として去勢抵抗性前立腺癌患者は予後不良である。したがって、ドセタキセル耐性メカニズムの解明により、去勢抵抗性前立腺癌患者の予後が改善する可能性があり、早期解明が求められている。一方、*CLSPN*は *claspin* 蛋白質をコードしている遺伝子であり、DNA 複製ストレスおよび DNA 損傷反応において極めて重要な役割を果たし、S 期チェックポイントの重要な調節因子である。DNA 損傷の存在下で、*claspin* は ATR-CHK1 経路の活性化を促進し、細胞周期の停止と DNA 損傷修復をもたらす。DNA 損傷修復が成功するとチェックポイントの回復が起こり、細胞周期が再開するが、DNA 損傷修復が困難であるとアポトーシスを促す。これまでに PARP、BRCA1/2、ATM などの DNA 損傷修復関連遺伝子が前立腺癌の予後に関与していると報告されている。また肺癌、子宮頸癌、胃癌、腎細胞癌などでは、*claspin* の過剰発現が癌の増殖に関与していると報告されている。しかし、前立腺癌における *claspin* の発現異常の報告はなく、臨床的意義は検討されていない。そこで本研究では、前立腺癌における *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、さらに *claspin* とドセタキセル耐性との関係を検討した。

まず前立腺癌における *claspin* の免疫組織化学染色を行い、*claspin* の発現と臨床病理学的因子との関連を解析した。対象は、限局性前立腺癌と診断され 2012 年から 2013 年の間に広島大学病院で前立腺全摘除術を施行された全 89 例であり、術前アンドロゲン遮断療法および放射線療法を施行された症例は除外した。腫瘍細胞の *claspin* 染色率が 5%以上を *claspin* 陽性、5%未満を *claspin* 陰性と定義したところ、89 例中 31 例 (35%) で *claspin* 陽性であった。*claspin* 陽性例は、Gleason score  $\geq 8$  ( $p=0.015$ )、静脈浸潤 ( $p=0.015$ )、神経周囲浸潤 ( $p=0.050$ ) と有意に相関していた。Kaplan-Meier 法で PSA 非再発生存期間との関連を検討したところ、*claspin* 陽性例は陰性例に比べ予後不良であった ( $p<0.038$ )。多変量解析を用いた検討では *claspin* 陽性は PSA 非再発生存期間の独立した予後不良因子ではなかったが、予後不良な傾向が認められた ( $p=0.052$ )。

次に Public database における *CLSPN* の発現を解析した。TCGA (The Cancer Genome Atlas) では、*CLSPN* の mRNA 発現レベルは、Gleason score と T stage と正の相関を認めた ( $p<0.01$ )。またリンパ節転移症例の方が、*CLSPN* の mRNA 発現が高かった ( $p<0.01$ )。*CLSPN* の mRNA 高発現群は低発現群に比べ、PSA 非再発生存期間において予後不良であった ( $p=0.022$ )。GEO (Gene Expression Omnibus) では、限局性前立腺癌に比べ、去勢抵抗性前立腺癌と転移性前立腺癌において *CLSPN* 高発現を認めた ( $p<0.01$ )。さらに前立腺癌と比較し神経内分泌分化を呈した前立腺癌において *CLSPN* 高発現を認めた ( $p<0.01$ )。

続いて、前立腺癌細胞株 DU145 と PC3 において siRNA を用いて *CLSPN* をノックダウンし、qRT-PCR、western blot、MTT assay の手法を用いて生物学的機能評価をした。まず、western

blot および qRT-PCR で *CLSPN* がノックダウンされることを確認した。MTT assay において *CLSPN* をノックダウンすると、細胞増殖能が有意に抑制され ( $p < 0.05$ )、細胞増殖経路である Akt、Erk1/2 のリン酸化、ATR-CHK1 経路である CHK1 リン酸化が抑制された。さらに、ドセタキセル投与下の MTT assay で *CLSPN* をノックダウンすると、ドセタキセル感受性が有意に増強し ( $p < 0.05$ )、western blot で DNA 損傷関連蛋白質  $\gamma$ -H2AX とアポトーシス関連蛋白質 cleaved-PARP の発現が増強した。さらに、ドセタキセル耐性 DU145 細胞株 (DU145-DR) を用いて western blot を行ったところ、DU145 より DU145-DR において claspin の発現が亢進していた。DU145-DR において、*CLSPN* をノックダウンすると、ドセタキセル感受性が有意に増強し ( $p < 0.05$ )、western blot で Akt、Erk1/2 および CHK1 リン酸化が抑制された。

以上の結果より、本研究において claspin の高発現が前立腺癌における PSA 再発、細胞増殖、DNA 損傷修復、ドセタキセル耐性に重要な役割を果たしている可能性が示された。前立腺癌における claspin の阻害により CHK1 リン酸化が抑制されることで、DNA 複製ストレスの増加、DNA 損傷修復のミス、ドセタキセルの細胞障害性の増強を引き起こし、最終的にアポトーシスを誘導する可能性があり、claspin は前立腺癌における新しい治療標的として、有用であると考えられた。