

別記様式第6号（第16条第3項，第25条第3項関係）

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（医学）	氏名	小林 剛
学位授与の条件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目 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)			
論文審査担当者			
主査	教授	有 廣	光 司 印
審査委員	教授	田 中	信 治
審査委員	准教授	伊 藤	公 訓
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>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。申請者の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 <i>CLSPN</i> に着目している。<i>CLSPN</i> 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。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、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ている。</p> <p>本研究では、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イス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</p>			

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($p=0.0468$)。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。

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。

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。

以上の結果より、本研究では claspin は胃癌の進行において重要な役割を担うことが示され、癌幹細胞性への関与も示唆された。本研究は、claspin の胃癌における発現と機能を明らかにし、新しい治療標的として応用され得る可能性を示した点で高く評価される。

よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士 (医学) の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。