

## 学位論文審査結果の要旨

氏名	上野 義智
審査委員	主査 松田 正司 副査 佐山 浩二 副査 川上 良介 副査 池田 宜央 副査 倉田 聖

論文名 塩素イオンチャネルタンパク質 CLIC2 の、ヒト癌およびその周囲組織における発現：血管内皮細胞におけるタイトジャンクション形成との関わり

【審査結果の要旨】本研究はラット C6 グリオーマ細胞株移植後に肺転移腫瘍内では原発腫瘍内に比較し Chloride intracellular channel protein 2 (CLIC2) の発現が低いことを端緒とし、癌組織の血管では CLIC2 とともにタイトジャンクションタンパク質発現が低下することにより血行性転移が起りやすくなる可能性を示したものである。

【目的】申請者らはラット C6 グリオーマ細胞株をラット新生仔背部皮下に移植すると、4週間以内に肺に遠隔転移することを見出した。肺転移した C6 細胞と背部皮下の原発腫瘍内にとどまった C6 細胞の遺伝子発現を次世代シーケンサーにより比較すると、後者で CLIC2 が高発現していることを見出した。CLIC2 は近年になって発見された塩素イオンチャネルである CLIC ファミリーに属するタンパク質で、ヒトでは CLIC1 から 6 の 6 種類が存在する。後生動物に広く保存されており、生命維持に重要な働きをしている可能性があるが、解明は十分進んではない。中でも CLIC2 は最も研究が遅れている CLIC タンパク質であり、その役割、組織や細胞内局在など基本的な知見が大きく不足している。動物実験から遠隔転移との関わりが示されたため、本研究では手術で摘出されたヒト肝細胞癌、大腸癌肝転移、大腸癌の検体を用いて腫瘍組織とその周囲の非腫瘍組織における CLIC2 の発現や局在を検討し、その生理的意義や癌とその遠隔転移との関わりを検討することとした。

【方法】愛媛大学医学部附属病院で2015年1月から2018年3月の期間に手術を受けた51人の患者を本研究の対象とした。内訳は肝細胞癌32例、大腸癌肝転移14例、大腸癌6例で、大腸癌肝転移と大腸癌を同時切除した1例を含んでいる。本研究は愛媛大学医学部附属病院臨床研究倫理審査委員会の承認を受けている。病理学的診断はUICC TNM第8版を用いて行った。

【結果】定量的 RT-PCR (qPCR) で肝細胞癌、転移癌、大腸癌患者の腫瘍組織と腫瘍周囲組織の CLIC1, 2, 3, 4, 5 の mRNA 発現量を調べたところ、CLIC2 の mRNA 発現は腫瘍組織で低く、腫瘍周囲組織のほうが高かった。CLIC1, 4, 5 では差がなく、CLIC3 はほとんど発現していなかった。また、肝細胞癌では CLIC2 mRNA 発現量は肝障害や肝線維化によって抑制されていた。ウェスタンブロッティングによる検討により、CLIC2 タンパク質量も腫瘍組織で少なく、腫瘍周囲組織で多い事が判明した。CLIC2 が主に腫瘍周囲組織に発現し、腫瘍組織では弱い発現しか見られないことは免疫組織化学染色でも示された。肝臓の腫瘍周囲組織においては、CLIC2 はクッパー細胞と内皮細胞に強く発現し、肝細胞には発現していなかった。免疫蛍光多重染色により大腸癌周囲組織を染色したところ、内皮細胞マーカー CD31 を発現するが、リンパ管内皮特異マーカーであるポドプラニンが発現しない細胞、すなわち血管内皮細胞に CLIC2 が特に強く発現していることを見出した。しかし、癌組織内では血管内皮細胞であっても CLIC2 発現は弱い、または発現が確認できなかった。CLIC2 の中等度の発現は、間質の線維芽細胞様細胞、CD11b 陽性マクロファージ様細胞等に見られた。また、血管内皮細胞において CLIC2 は主に細胞膜直下と核内に分布しており、塩素イオンチャネルとしては機能していないと考えられた。CLIC2 は、内皮細胞間の接着部位に比較的集積していたため、タイトジャンクション構成タンパク質である claudin 1 と二重染色したところ共局在が確認できた。claudin 1 は、腫瘍内血管やリンパ管には発現が見られなかった。Claudin1 mRNA は肝細胞癌と転移癌では腫瘍周囲組織で強く発現していた。肝細胞癌の腫瘍組織と腫瘍周囲組織を単細胞に分散させて、フローサイトメリーによりソーティングし、内皮細胞 (CD31+/CD45-) と (CD31+/CD45+) 細胞、(CD31-/CD45+) の細胞に分けて、mRNA 発現を検討した。その結果、腫瘍周囲組織の内皮細胞で CLIC2 及び、タイトジャンクションタンパク質である claudin1、occludin、ZO-1 の mRNA を強く発現していた。一方、腫瘍組織内内皮細胞ではいずれも低い発現であった。

【考察】CLIC2 は、タイトジャンクションタンパク質とともに非腫瘍組織血管内皮に局限して発現しており、リンパ管内皮や癌組織血管には発現していなかった。この結果は、CLIC2 が正常血管内皮のタイトジャンクション形成またはその維持に関与しており、その結果、血行性遠隔転移の抑制と関連していると考えられた。

【結論】本研究は、癌組織の血管では CLIC2 とともにタイトジャンクションタンパク質発現が低下していることを見出し、血行性転移との関連が推測できる癌血管の異常性の一端を解明できた。

審査会は平成31年1月31日に開催された。申請者は、英語で発表後、本研究に対して質疑応答が行なわれ、1) CLIC2 の機能、2) CLIC2 とイオンチャネルとの関係、3) 各種成長因子との関係、4) CLIC2 とタイトジャンクションの関係、5) CLIC2 の肝硬変、肝細胞癌での変化、6) CLIC2 の原発巣と転移巣での違い、7) 炎症と CLIC2 の関係、等の質問に的確に回答した。審査委員は、申請者が本論文関連領域に対して学位授与に値する十分な見識と能力があることを全員一致で確認し、本論文が学位授与に値すると判定した。