

学位論文の要約 (研究成果のまとめ)

氏名 上野 義智

学位論文名 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

学位論文の要約

Chloride intracellular channel protein2(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 CLIC 1 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。CLIC2 は性染色体長腕末端(Xq28)のテロメア領域に存在し、その重複や欠損が発達遅滞やてんかんに関連があるとの報告がある。また、CLIC2 遺伝子の変異がリアノジン受容体を刺激し、心肥大を引き起こすとの報告もある。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した。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。

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では、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。

免疫化学染色では、肝臓の腫瘍周囲組織において、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。免疫蛍光多重染色で大腸癌周囲組織を染色したところ、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。その他のタイトジャンクション構成タンパク質である claudin5、occludin、Zo-1 も正常大腸の内皮細胞に発現していたが、リンパ管内や腫瘍組織の血管内では発現が弱かった。

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である claudin1、occludin、ZO-1 の mRNA を強く発現していた。腫瘍組織内内皮細胞ではいずれも低い発現であった。

HUVEC を用いて Transmigration assay を行った。正常 HUVEC と CLIC2 をノックダウンした HUVEC で monolayer を形成させ、ヒト舌癌細胞 (SAS) を用いて通過性を比較すると、CLIC2 をノックダウンした monolayer を通過した SAS が有意に多かった。

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限局して発現しており、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。

この学位論文の内容は、以下の原著論文に既に公表済みである。

主論文 : Ueno Y, Ozaki S, Umakoshi A, Yano H, Choudhury M.E, Abe N, Sumida Y, Kuwabara J, Uchida R, Islam A, Ogawa K, Ishimaru K, Yorozuya T, Kunieda T, Watanabe Y, Takada Y & Tanaka J: Chloride intracellular channel protein2 in cancer and non-cancer human tissues : relationship with tight junctions. *Tissue Barriers*. 2019;7(1):1593-775. DOI:10.1080/21688370.2019.1593775.