

学 位 論 文 要 旨

氏 名 尾崎 沙耶

論 文 名

塩化物イオンチャネルタンパク質 CLIC2 は、MMP14 の活性阻害によって腫瘍細胞の浸潤・転移を抑制する

学位論文要旨

【はじめに】

これまでに、悪性腫瘍の浸潤・転移について様々な分子やシグナル伝達に関する研究が盛んに行われてきた。中でも、matrix metalloprotease 2 (MMP2)やその活性化に関わる MMP14 の浸潤転移への関与が重視され、阻害剤を悪性腫瘍の治療に応用することが目指されてきたが、臨床応用には至っていない。一方、正常組織や良性腫瘍の細胞が周囲への浸潤や遠隔臓器への転移をしない理由は現在でも明らかにされていない。そのメカニズムを解明することで、新たな悪性腫瘍の浸潤転移抑制方法を見いだせる可能性がある。我々は、ラット C6 グリオーマ細胞をラット新生仔背部皮下に移植すると、3週間程度で肺に肉眼的転移を起こすことを見出している。この遠隔転移モデルを用いて、遠隔転移した細胞と原発巣にとどまった細胞の遺伝子発現を RNAseq により比較した。原発巣にとどまった細胞に高発現するタンパク質として、Chloride intracellular channel protein 2 (CLIC2)に着目し研究を進めたところ、CLIC2 は腫瘍細胞の浸潤・転移の抑制に関与していることを見出した。

【材料と方法】

動物実験については動物実験倫理委員会の承認のもと Wistar ラットを用いて行なった。研究倫理審査委員会の承認のもと愛媛大学医学部附属病院にて保存または手術時に取得されたヒト脳腫瘍組織を研究に供した。ラット C6 グリオーマ細胞、ヒト一次培養髄膜腫細胞、または株化されたヒト膠芽腫細胞を用いた。CLIC2、CLIC4 を小麦胚芽タンパク質合成システムを用いて合成した。C6 細胞は、ラット新生仔背部皮下または大脳線条体に移植し、それぞれ肺への遠隔転移モデル、脳腫瘍モデルとし、生存期間・肺転移率を測定した。肺転移モデルにおいて、背部原発巣と肺転移巣から C6 細胞を分離し、その遺伝子発現を RNAseq により解析した。ラット腫瘍組織の血管透過性をエバンスブルー注入により調べた。CLIC2 発現と E-カドヘリン発現量との関連をウエスタンブロッティングにより検討した。CLIC2mRNA 発現レベルとヒト髄膜腫及び膠芽腫の無増悪

氏名 尾崎 沙耶

生存率との関連を調べた。ヒト膠芽腫細胞株を RNAseq により遺伝子発現解析を行い、遺伝子オントロジー解析を加えた。ヒト髄膜腫細胞、C6 細胞の細胞外マトリックス分解および浸潤能を調べた。CLIC2 の細胞外分泌を、ウェスタンブロッティングおよび共焦点顕微鏡により調べた。合成 CLIC2 の MMP14 への結合を免疫沈降法で、MMP14 阻害活性を活性測定キットにより検討した。

【結果】

ラット肺転移モデル・脳腫瘍モデルにおいて、CLIC2 を強制発現させた細胞を用いると、遠隔転移や周囲組織への浸潤が抑制され、モデル動物の生存期間が延長した。ヒト髄膜腫・膠芽腫症例では、CLIC2 mRNA が高発現していると無増悪生存期間が延長していた。ヒト膠芽腫細胞株の RNAseq および gene ontology 解析から、CLIC2 高発現細胞は良性の形質を、低発現細胞は悪性の形質を有していた。ラット CLIC2 高発現腫瘍では、血管透過性が小さく細胞間接着タンパク質 E-cadherin が多く発現していたが、その mRNA 発現には変化がなかった。ヒト髄膜腫組織でも、良性の場合は CLIC2 が高発現し、同時に活性型 MMP2 が少なかった。培養実験により、CLIC2 の高発現は細胞の浸潤活性や MMP2 活性の低下と関連していた。CLIC2 は、細胞内では主に分泌顆粒に局在し、細胞外に分泌されていた。小麦胚芽合成システムを利用して作成した組み替え体 CLIC2 は、MMP2 の活性化に必要な MMP14 と結合し、その活性を阻害した。細胞外マトリックス分解を必要とする浸潤活性測定系で、C6 細胞およびヒト膠芽腫細胞株の浸潤能は CLIC2 の添加により抑制された。

【考察】

CLIC2 はマウスにそのゲノムがないこともあって、最も研究が進んでいない CLIC ファミリータンパク質であるが、最近我々の研究も含めてがんの予後改善と関係することが示唆されていた。今回、ラットを用いた実験系と臨床研究の双方で、CLIC2 高発現が腫瘍の予後を改善することを示し、そのメカニズムは MMP14 阻害にあることを見出した。イオンチャネルタンパク質とされ、膜結合型として存在するものと考えられてきた CLIC2 が細胞外に分泌されていることも明らかにした。CLIC ファミリータンパク質は後生動物に広く保存されていることから、良性腫瘍のみならず正常組織の細胞が他所へ浸潤転移することを抑制している可能性も考えられる。

【結論】

CLIC 2 の浸潤転移抑制効果の発見は、今後の浸潤転移抑制薬の開発につながるものと期待される。また、MMP 活性の内因性制御機構としても重要であると考えられる。

キーワード (3~5)	CLIC MMP invasion glioblastoma meningioma
-------------	---