

(第7号様式)

学位論文審査結果の要旨

氏名	尾崎沙耶
審査委員	主査 東山 繁樹 副査 薬師神 芳洋 副査 中城 公一 副査 川上 良介 副査 三宅 映己

論文名：塩化物イオンチャンネルタンパク質 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

審査結果の要旨

【目的】

申請者は、ラット C6 グリオーマ細胞のラット新生仔背部皮下移植により 3 週間程度で肺に転移を起こすことを見出した。この遠隔転移モデルを用いて、遠隔転移細胞と原発巣細胞の遺伝子発現を比較・解析した結果、原発巣細胞に高発現する遺伝子として Chloride intracellular channel protein 2 (CLIC2) を見出し、腫瘍細胞の浸潤・転移の抑制に関与することを示した。本研究では、悪性腫瘍の浸潤・転移を規定するシグナル伝達分子として、CLIC2 の作用分子機構解明を目指した。

【材料と方法】

動物実験については動物実験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。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。CLIC2 mRNA 発現レベルとヒト髄膜腫及び膠芽腫の無増悪生存率との関連を調べた。ヒト膠芽

腫細胞株の RNAseq 遺伝子発現解析に基づき、gene ontology 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、ウエスタンブロットリ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。血管透過性はエバンスブルー注入法により、各種タンパク質の発現はウエスタンブロットリング法により解析した。

【結果】

ラット肺転移モデル・脳腫瘍モデルにおいて、CLIC2 強制発現 C6 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低く、細胞間接着タンパク質 E-cadherin が高発現していたが、その mRNA 発現には変化がなかった。ヒト髄膜腫組織では、low grade において CLIC2 が高発現し、同時に活性型 MMP2 が低かった。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。リコンビナント CLIC2 タンパク質は、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・結論】

今回、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。CLIC2 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。

公開審査会は、令和 2 年 1 2 月 2 2 日に開催され、申請者は、研究内容を英語で明確に発表した後に、審査員から本研究に関する以下に示すような多数の質問がなされ、的確に回答した。

- CLIC2 の癌転移抑制効果の癌腫特異性はあるのか？
 - CLIC2 は膜タンパク質とのことであるが、細胞外への分泌はどのような分子機構によるものか？
 - CLIC2 の発現を制御する因子、またはその分子機構は何か？
 - CLIC2 による MMP14 の活性阻害様式は、MMP14 前駆体から活性化体への変換阻害によるのか、酵素活性そのものの阻害によるのか、どちらであるのか？
 - CLIC2 によるがん細胞の血管透過性抑制には、VEGF-VEGFR の関与はないのか？
- そのほか 20 問以上の質問がなされた。

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を有す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。