

愛媛大学長 殿

プロジェクト代表者氏名	医学部・研究科		医学科・課程
	大角 翔太		
指導教員氏名	所属 分子細胞生理学		
	田中 潤也		

プロジェクト名：がん遠隔転移モデルの作成とCLIC2の転移抑制効果の解明

調査・研究の概要：

1. 問題意識

現在多くのがんにおいて、他臓器への遠隔転移があると予後が急激に悪化することが知られている。すなわち、がんの転移を抑制することは、がん治療におけるひとつの到達地点であると考えられる。

2. 目的

我々はラットC6グリオーマ（脳腫瘍）細胞を用いた、簡易的な肺転移モデルによる研究から、がんの転移にはがん細胞自身の悪性度が関わっており、遠隔転移を起こして転移巣を形成するがん細胞は、原発巣に留まるがん細胞と比較して、高い悪性度を持つことを明らかにした。また、転移巣のがん細胞では原発巣のがん細胞と比較してChloride intracellular channel protein 2 (CLIC2) という分子の発現が低下していた。CLIC2はがんとの関連を示す報告がほとんど存在せず、機能も解明されていない部分が多かったため、CLIC2とがん転移抑制の関連を検討した。

3. 方法

CLIC2を強制発現させたC6細胞（CC細胞）を作成し、肺転移モデルや脳腫瘍モデルを用いて生存期間をコントロールのC6細胞と比較した。また、ヒト髄膜腫の悪性度とCLIC2の発現の関連を定量的RT-PCR（qPCR）やWestern Blottingにより調べた。次いでC6細胞、CC細胞による腫瘍の血管透過性の違いを検討するため、Evans Blueによる血管透過性アッセイを行った。さらに、血管透過性に関わる細胞間接着分子の発現量の差を比較するためWestern Blotting, qPCR, 免疫組織化学染色法を用いた。その後、CLIC2と細胞間接着との関係を明らかにするため、細胞間接着に関与する分子の発現をWestern BlottingやqPCRを用いて比較した。

さらに、細胞外基質を分解し、腫瘍の浸潤や転移に寄与するMatrix metalloproteinase 2 (MMP2) の発現や活性をWestern BlottingやZymography, Invasion assayを用いて検討した。

研究成果：（800字～900字程度）

CC細胞を移植し、30日後の原発巣と肺を摘出するとCC細胞を移植した群では肺転移がほとんど確認されなかった。また、移植後60日間の生存率を比較するとCC細胞移植群では有意に生存期間が長期化した。これはCC細胞を用いた脳腫瘍モデルでも同様であり、ヒト髄膜腫では低悪性度のものほどCLIC2発現が増加していた。

次いでCLIC2の血管透過性への影響を検討するため、Evans Blueによる血管透過性アッセイを行った。C6細胞移植群ではEvans Blueの静注により、腫瘍組織全体が青く濃染された一方で、CC細胞移植群ではほとんどEvans Blueの漏出は見られなかった。また、摘出した腫瘍を使ってフローサイトメトリーを行ったところ、TAM (Tumor-Associated Macrophage) の減少が確認された。さらに、摘出した腫瘍のmRNA発現をqRT-PCRにより解析したところ、CC腫瘍ではマクロファージを遊走させるCCL2や血管透過性を亢進させるVEGFの発現が有意に低下していた。以上の結果から、CC腫瘍ではTAMの浸潤が減少し、TAMが産生するVEGFも減少することで血管透過性が減弱するということが示唆された。

また、CC腫瘍ではC6腫瘍に比して細胞間接着に関与する分子の発現量が増加しており、免疫組織化学染色も行ったところ、E-Cadherinと血管内皮に発現するLamininが共局在を示した。さらに、ヒト髄膜腫ではCLIC2の発現に、CTNND1というAdherence junctionを安定させる分子の発現が比例していた。よってCLIC2高発現腫瘍では、何らかの経路で血管内皮細胞の細胞間接着が増強し、血管透過性を減弱させ、転移抑制に関与することが示唆された。

CLIC2と細胞間接着分子の関係を明らかにするため、MMP2に着目したところ、各種C6細胞株MMP2の蛋白質発現に差は見られなかったが、培養上清の比較ではCC培養上清中のMMP2量及び活性が低下していることがWestern Blot, Zymographyより明らかになった。一方で、ヒト髄膜腫からCLIC2をノックダウンすると、CC細胞とは逆にMMP2の発現量、分泌量が増加した。また、CC細胞では浸潤能の減弱、CLIC2ノックダウン髄膜腫細胞では浸潤能の増強がInvasion Assayにより示され、CLIC2は何らかの経路でMMP2の分泌を抑制し、抗転移効果を持つことが示唆された。

今後の課題：（400字程度）

本研究では、細胞内MMP2のmRNA、蛋白質量に変化はないことから、転写や翻訳レベルでの調節ではな

いことが示唆されるが、細胞内におけるCLIC2の直接的なMMP2の分泌調節機構は完全には明らかになっていない。まずは、CLIC2は細胞内のどの部分に局在するのか証明する。そのために、免疫細胞化学染色を行い、CLIC2と共局在するものを見つけ出す。次いで、共局在する細胞内小器官や分子の阻害剤を用いた実験を行い、その阻害剤とCLIC2が同等の効果を示すことを証明する。また、C6細胞でCLIC2をノックアウトし、そこにCLIC2のアミノ酸配列を変化させた様々な変異体を導入した細胞を作成することで、CLIC2の細胞内での挙動や局在、部位毎の活性などを詳細に調べる。現在我々はCLIC2の細胞内局在として、蛋白質の輸送や修飾、分泌に関与するゴルジ体が有力な候補となっており、引き続き検討を行っていく予定である。

指導教員からのコメント

CLIC2は世界でも研究例が少なく、特に腫瘍との関連についてはほとんど知見がない中で、懸命に努力し、世界に通用する新たな発見を成し遂げている。本研究からCLIC2が腫瘍細胞の遠隔転移を抑制していることが明らかになり、がん/悪性腫瘍の転移浸潤の抑制方法の開発につながる可能性があり、今後の発展に大いに期待している。

1. 緒言

CLIC2 (Chloride intracellular channel protein 2) は, CLIC family に属する 28 kDa 程度の細胞内チャネルタンパク質である。現在, CLIC1-6 をコードするヒト遺伝子が報告されている (Argenzio E 2016)。CLIC は脊椎動物間で高度に保存されており, 生命の維持に重要な役割があると考えられている (Zeng J 2018)。CLIC1 や 4 は, 細胞周期やアポトーシスなどの調節に関与していると言われており, がん治療においても注目されて一方で, CLIC2 は CLIC family の中でも研究が進んでおらず, その機能はあまり解明されていないのが現状である。この一つの理由としては, CLIC2 がラットでは発現がみられるものの, マウスでは発現しておらず, ノックアウトマウスを用いた CLIC2 の研究が行えないということが考えられている。

CLIC2 はヒトにおいて, 肺と脾臓で遺伝子発現が確認されている (Mi W 2008)。ヒト CLIC2 遺伝子は X 染色体 q28 上に存在し, その変異は精神遅滞や発達障害を引き起こすことが報告されている (El-Hattab AW 2015)。また, CLIC2 はリアノジン受容体の細胞内 Ca^{2+} チャネルの調節に関与し, 変異によって心房細動や心肥大, うっ血性心不全などの心疾患を引き起こすという報告もある (Takano K 2012)。しかしながら, 他の CLIC family と異なり, CLIC2 とがんの関連を示す報告は少ない。

そこで我々は以前の研究で, まずヒト腫瘍における CLIC2 の発現を明らかにした。ヒト肝細胞癌 (Hepatocellular carcinoma; HCC) の非がん部とがん部を比較した際, CLIC2 は非がん部でがん部に比して高発現することが分かった。また, 進行した HCC, 非がん部の中でも肝機能低下や線維化の進んだ症例では CLIC2 の発現が低下することが明らかとなった (Ueno Y 2019)。この結果から CLIC2 の発現低下ががんの進展や浸潤, 転移などに寄与し, がんの悪性度と関連する可能性が考えられた。

がんは現在, 日本人の死亡原因第 1 位である。がんの悪性度を決定するのは主として遠隔転移の有無である。がんの遠隔転移は著しく患者の予後を悪化させるため, 遠隔転移の抑制ががん治療成功の鍵を握ると言っても過言ではない。よって, CLIC2 の発現がみられるラットでがん遠隔転移モデルを作成し, CLIC2 とがんの悪性度の関連について調べることにした。

我々は以前に, ラット C6 グリオーマ細胞をウィスターラットの背部皮下に移植すると高率に肺へ転移するというラットがん遠隔転移モデルを作成している。一般的なモデルでは免疫不全マウスや, 血管内にがん細胞を注入するといったような手法がとられることが多い。しかし, これらは腫瘍免疫や原発巣からの遊離, 血管浸潤について調べることができない。我々の作成したモデルはこれらを克服しており, 研究手法として採用することにした。このモデルの転移率は 90%以上であり, 遠隔転移のモデルとして適することが確認できている (Kuwabara J 2018)。

2. 材料と方法

細胞培養

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Wako, 大阪, 日本) 500 mL に細胞増殖の栄養源として fetal bovine serum (FBS; Wako) 50 mL 及び 45% グルコース 4.3 mL, 抗生物質のペニシリン・スプレプトマイシン・アムホテリシン B (Wako) 5 mL を入れた培地を使用した。

ラット遠隔転移モデル作成

生後 24 時間以内のラット新生仔背部皮下に phosphate-buffered saline (PBS; Wako) 中へ 2.5×10^4 cells/ μ L に調製した C6 細胞を 29 G 針付シリンジ (Terumo, 東京, 日本) を用いて, 40 μ L 移植した。移植 30 日後にラットを屠殺してラットの体重, 原発巣重量, 肺重量, 目視で確認可能な肺転移数を確認した (Kuwabara J 2018)。

ラット脳腫瘍モデル作成

生後 24 時間以内のラット新生仔の脳に phosphate-buffered saline (PBS; Wako) 中へ 2.5×10^4 cells/ μ L に調製した C6 細胞を 29 G 針付シリンジ (Terumo, 東京, 日本) を用いて, 20 μ L 移植した (Kobayashi K 2016)。

次世代シーケンサー (NGS; next-generation sequencing)

腫瘍組織や細胞から RNeasy Micro Kit (QIAGEN, ドイツ) を用いて gDNA やタンパク質等の不純物を排除した極めて高純度の total RNA を抽出した。この RNA を用い NGS で網羅的解析を行った。

Quantitative RT-PCR (qPCR)

腫瘍組織や細胞から ISOGEN (Nippon gene, 東京, 日本) を用いて total RNA を抽出した。その後, gDNA Remover 及び ReverTra Ace qPCR RT Master MixDNA (TOYOBO, 大阪, 日本) を用いて cDNA を調製した (Erler JT 2009)。qPCR は Fast Start Universal SYBR Green Master (Roche Diagnostic, 東京, 日本) を用いて行い, 全細胞に恒常的に発現している house-keeping gene である glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) に対する相対量で mRNA の発現量を算出した。

生存率の比較

移植後 60 日間, 毎日ラットの状態を観察し, 生存率を Kaplan-Meier 法によりプロットした。log-rank 検定により統計学的に解析した。

CLIC2 遺伝子導入 C6 細胞の作製

CLIC2 を発現させるための DNA 1.8 μ g 及び packaging vector である pGP 1 μ g, pE-anpho 1 μ g, DMEM 125 μ L, P3000 Reagent (2 μ L/ μ g DNA) 5 μ L を混合したものと, 125 μ L の DMEM と Lipofectamine 3000 Reagent (Thermo Fisher scientific, 神奈川, 日本) を 3.75 μ L を混合したものを合わせ, 室温で 5 分間放置した。その後, 6 cm Dish 上に播種した 293T 細胞に添加し, 37°C で 48 時間インキュベートした。完成した virus 液を回収, 濾過滅菌したのちに C6 細胞へ感染させた。2 週間後に puromycin による薬剤選択を行い, CLIC2 強制発現 C6 細胞 (CC 細胞) を作成した。

免疫組織化学染色

抽出した腫瘍を 4% Paraformaldehyde を含む PBS 中で 2 時間浸漬固定し, 15% Sucrose を含む Tris-buffered saline (TBS) 中で 24 時間インキュベートした。固定した腫瘍組織は Tissue-Tek OCT compound (Sakura Finetek, 東京, 日本) を用いて凍結し, 10 μ m の凍結切片を作成した。0.1% Tween-20, 1 mg/ml bovine serum albumin を含む TBS でブロッキングし, 抗体反応を行った。切片は Nikon A1 共焦点レーザー顕微鏡で観察した (Ueno Y 2019)。

Western Blotting

培養細胞を PBS にて洗浄後, 1 \times RIPA buffer にて溶解し, 蛋白質を抽出した。BCA 法にて定量を行い, 2% sodium dodecyl sulfate を含む電気泳動サンプルを調製した。腫瘍組織は 2% sodium dodecyl sulfate を含む Laemmli buffer でホモジェナイズし, 電気泳動サンプルを調製した。バンドの解析は ImageJ 1.43u (Wayne Rasband) を使用し, β -Actin の反応量で補正した。

血管透過性アッセイ

移植 30 日後に PBS を用いて 0.5% Evans Blue 溶液を調製し, 尾静脈より注射した。1 時間後にラットを屠殺し, 原発巣を摘出, 核染色蛍光色素 Hoechst 及び血管内皮細胞を染色する抗 CD105 抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。

Flow cytometry

ラット遠隔転移モデルより取り出した原発巣及び肺転移巣の組織を 5 mm 片に切断したのち, 2.5 ml の enzyme mix (Miltenyi Biotec, Cambridge, USA) 中で裁断し, gentleMACS™ Dissociator (Miltenyi Biotec) で細胞を解離させた。さらに Debris Removal Solution, Red Blood Cell Lysis Solution (Miltenyi Biotec) で処理し, Rat BD Fc Block (BD Biosciences) で 15 分間ブロッキングした後, 蛍光標識した抗体を加え, 37°C で 45 分間インキュベートした。Gallios flow cytometer (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) により解析した。

Gelatin Zymography

Gelatin-zymography kit (Cosmo-Bio, 東京, 日本) を用いて行った。スキャナーでゲルをスキャンし, MMP2 の活性を確認した。

Matrigel invasion assay

Biocoat Matrigel chambers (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) を用いて行った。upper chamber へ無血清培地を入れ, 細胞を 3×10^4 cells 播種し, lower chamber へ 10% FBS 培地を入れる。24 時間インキュベーションの後, crystal violet (Wako) により染色した。

3. 結果

原発巣由来の C6 細胞は転移巣由来の C6 細胞よりも予後が良好

まず, ラットがん遠隔転移モデルの原発巣と転移巣の性質を比較検討することにした。C6 細胞に GFP を強制発現させて蛍光標識し, 生後 24 時間以内のラット新生仔背部皮下へ移植した。移植後に形成された原発巣と転移巣をそれぞれ摘出し, 酵素処理により各腫瘍塊を細胞レベルに分解してセルソーティングにより C6 細胞を単離した。これらを再び背部皮下に移植して, 生存率の比較を行ったところ, 原発巣由来の C6 細胞を移植したラットの方が転移巣由来の C6 細胞を移植したラットよりも有意に生存率が高いということが判明した (Figure 1)。

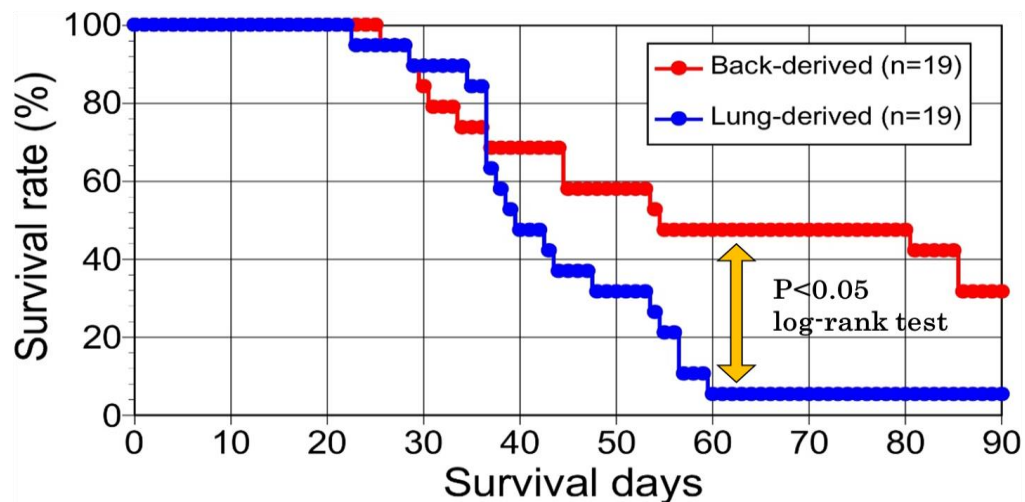


Figure 1 原発巣由来, 転移巣由来 C6 細胞移植による生存率。原発巣由来の C6 細胞移植群では生存期間が有意に長期化していた。

原発巣由来の C6 細胞で CLIC2 遺伝子が高発現

さらに原発巣、転移巣由来の C6 細胞から RNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いて網羅的に遺伝子発現を解析した。613 個もの遺伝子において発現の差が見られたが、この中でも特に CLIC2 は転移巣由来の C6 細胞と比較して、原発巣由来の C6 細胞で有意に高発現していた (Figure 2)。

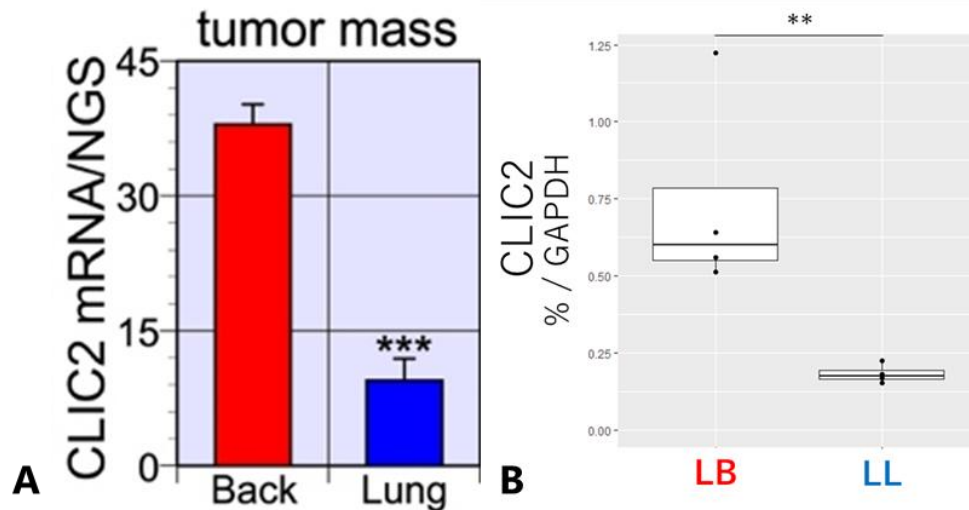


Figure 2 (A) 次世代シーケンサー, (B) qRT-PCR による CLIC2 遺伝子発現の比較。どちらにおいても原発巣由来の細胞で CLIC2 遺伝子が有意に高発現していた。Back, LB; 背部原発巣由来 C6 細胞。Lung, LL; 肺転移巣由来 C6 細胞。** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

CLIC2 遺伝子導入による増殖能, 運動能への影響はない

予後が良好な原発巣由来の C6 細胞で CLIC2 遺伝子が高発現していたことから、我々は CLIC2 に注目して研究を進めていくことにし、C6 細胞にレトロウイルスベクターを用いて CLIC2 を遺伝子導入した C6-CLIC2 細胞 (CC 細胞) を作成した (Figure 3A, B)。作成した細胞を用いて増殖率の計測及び Wound-healing assay を行った。CLIC2 遺伝子導入による細胞の増殖率, 運動能に差は見られなかった (Figure 3C, D)。

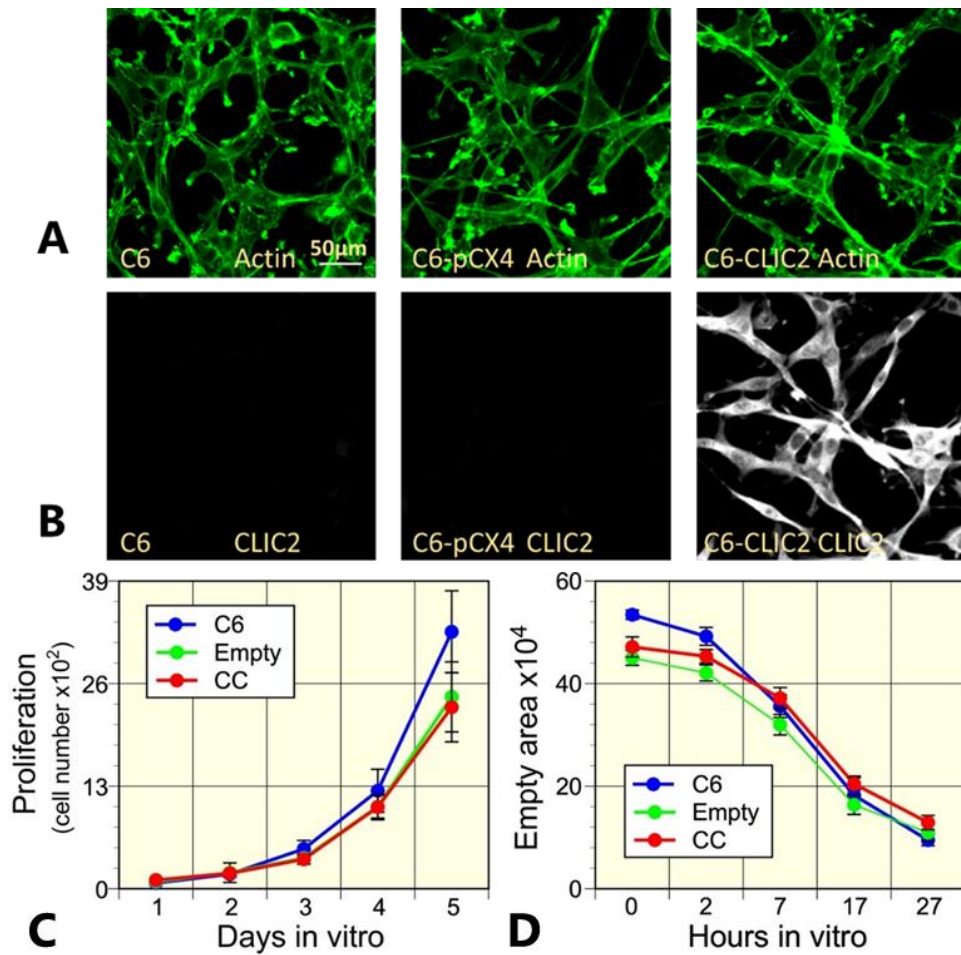


Figure 3 C6, C6-empty (強制発現コントロール株), CC 細胞の比較。(A, B) 各細胞株の actin 及び CLIC2 の免疫組織化学染色。(C) 各細胞株の増殖率, (D) Wound-healing assay。共に各細胞株間に有意な差はなく, CLIC2 遺伝子に導入による細胞の増殖能, 運動能への影響はみられなかった。

CC 細胞移植群における生存期間の長期化

各種細胞株生体内における差異を確認するため, それぞれをウイスターラット新生仔背部皮下に移植した。Figure 4 に移植 30 日後のラット, 背部原発巣, 肺を示す。C6 細胞を移植したラットでは多くの個体で肺に多数の転移巣が見られたが, CC 細胞を移植したラットでは肉眼的に肺転移が確認された個体は少なかった。

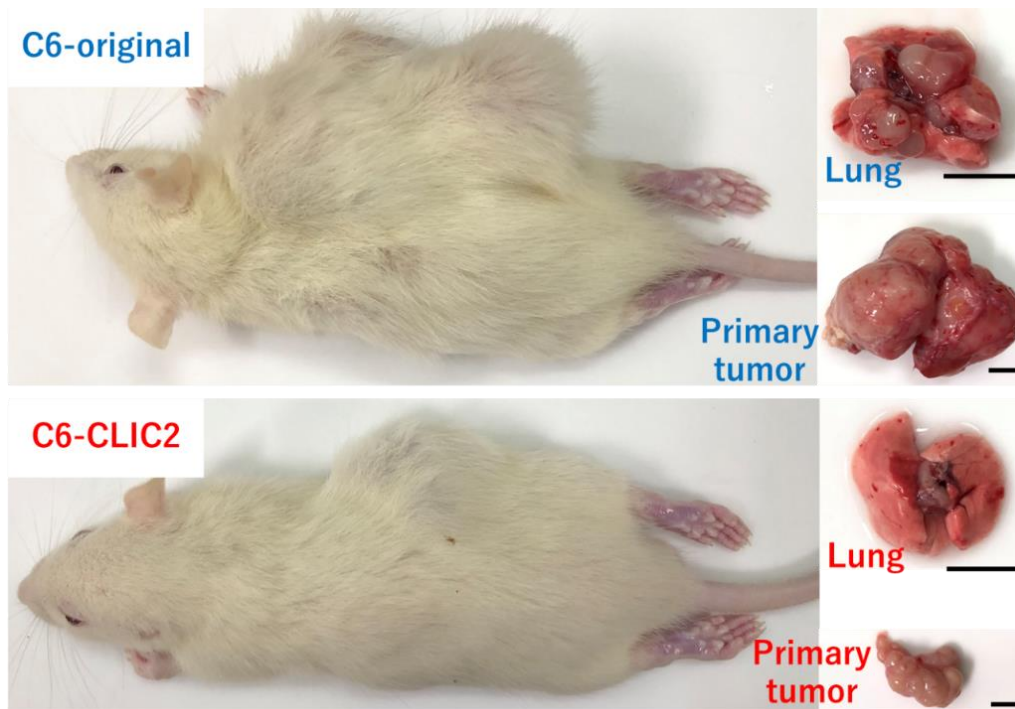


Figure 4 移植 30 日後のラット，背部原発巣，肺。CC 細胞移植群ではほとんどの個体で肺に転移がみられなかった。

各種細胞株を移植後 60 日間，生存率を観察したところ，CC 細胞移植群では C6, C6-empty 細胞移植群に比して有意に生存期間が長期化した (Figure 5A)。また，C6 細胞移植群では移植後 30 日時点で転移率が約 70%と高率であったのに対し，CC 細胞移植群では約 20%と有意に低下していた (Figure 5B)。

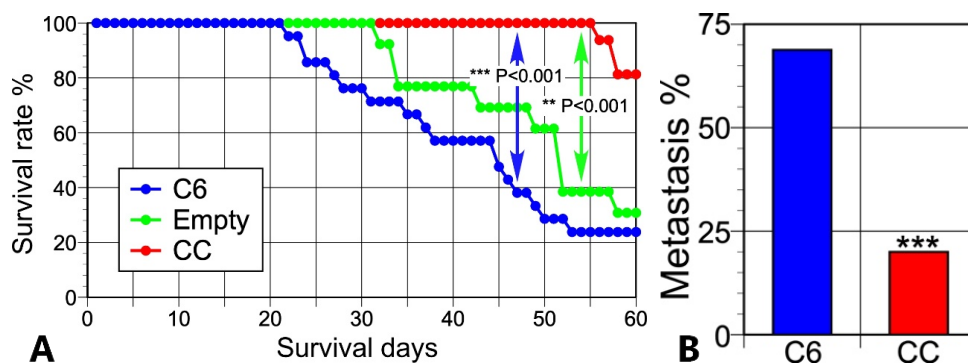


Figure 5 (A) 移植後 60 日間の生存率。CC 細胞移植群では生存期間が有意に長期化した。(B) 移植後 30 日時点での肺転移率。CC 細胞移植群では肺転移率が約 20%と有意に低下した。***P<0.001。

さらに，各種細胞株をウイスターラット新生仔の脳へ移植し，脳腫瘍モデルを作成した。移植後 6 週間，生存率を観察した。遠隔転移モデルと同様に CC 細胞移植群では，C6, C6-empty 細胞移植群に比して，生存期間の有意な長期化がみられた (Figure 6)。

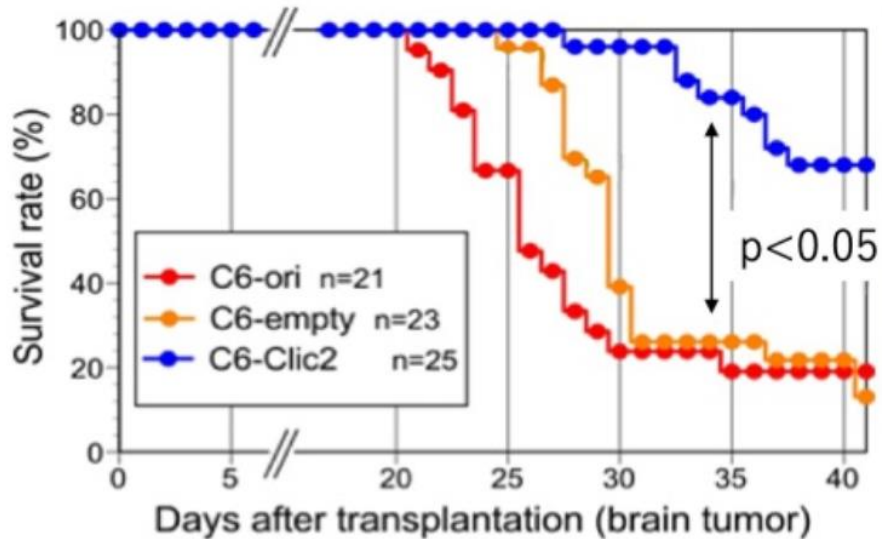


Figure 6 脳腫瘍移植後, 6 週間の C6, C6-empty, CC 細胞移植群の生存率。CC 細胞移植群は有意に生存期間が長期化していた。

ヒト脳腫瘍においても悪性度が低いものは CLIC2 が高発現

ヒトの脳腫瘍でも CLIC2 が悪性度に影響しているのか確認するため, ヒト髄膜腫組織の mRNA 発現を qPCR により解析した。髄膜腫は原発性脳腫瘍の中で発生頻度が高く, 再発率や脳実質への浸潤, 破壊性の強さ, 増殖能力などの観点から, Grade 分類が行われ, Grade I が良性, Grade II が中間悪性, Grade III が悪性とされている。Grade の低い良性の髄膜腫では CLIC2 の mRNA が有意に高発現していた (Figure 7A)。さらに, 髄膜腫組織の蛋白質発現を Western Blotting により比較した。mRNA と同様に, 良性の髄膜腫で CLIC2 の有意な高発現が確認された (Figure 7B)。また, 髄膜腫の凍結切片を作成し, CLIC2 の発現を免疫組織化学染色で確認したところ, Grade の低い髄膜腫ほど CLIC2 の反応が強くみられた (Figure 7C)。

以上のことから, ヒトの脳腫瘍においてもラットの腫瘍と同様に, 悪性度と CLIC2 の関連が示唆された。

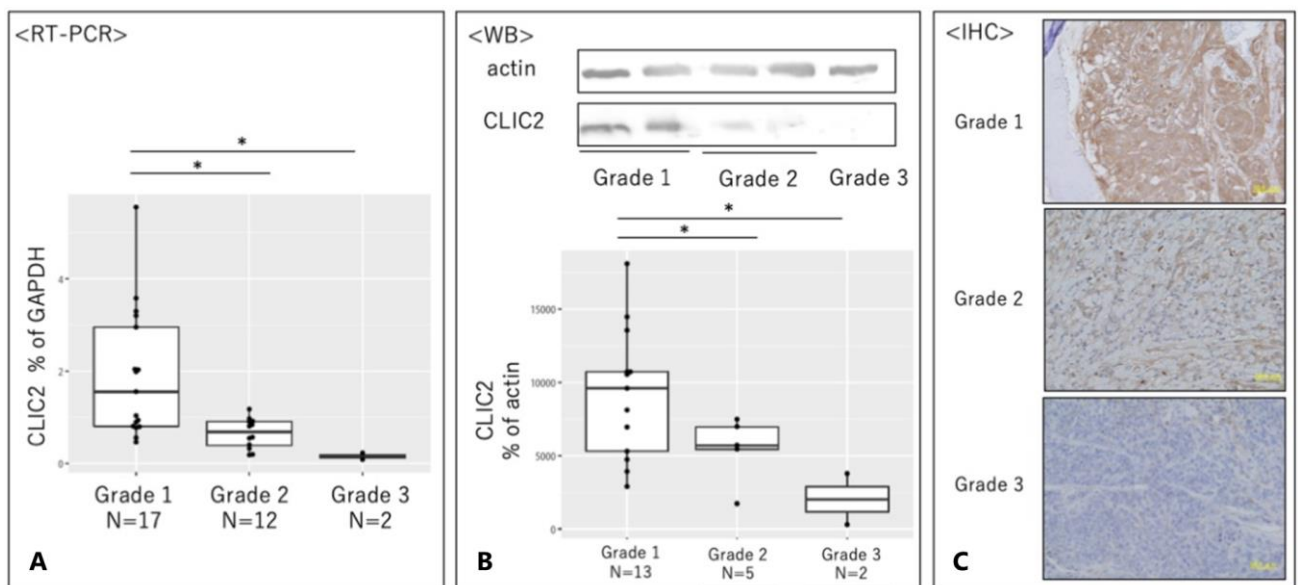


Figure 7 (A) qPCR により, 各 Grade の CLIC2 mRNA 発現量を比較した。低 Grade の良性髄膜腫では悪性のものと比して, CLIC2 が高発現していた。(B) Western Blotting により, 各 Grade の β -Actin 及び CLIC2 の蛋白質発現を定量した。良性髄膜腫での有意な CLIC2 高発現が確認された。(C) 各 Grade の髄膜腫の免疫組織化学染色による CLIC2 の反応。Grade が低いものほど CLIC2 が強く反応していた。
* $P < 0.05$ 。

CC 腫瘍における血管透過性の減弱

CLIC2 の転移抑制メカニズムを解明するため、まず C6 細胞及び CC 細胞移植 30 日後に Evans Blue を用いた血管透過性アッセイを行った。通常, Evans Blue はアルブミンと結合し血管内に留まるが, 血管透過性が亢進している部位では間質中へ滲出し, 組織を青く濃染する。

C6 細胞移植群では Evans Blue の静注により, 腫瘍組織全体が青く濃染された一方で, CC 細胞移植群ではほとんど Evans Blue の滲出は見られなかった (Figure 8A)。さらに両原発巣の凍結切片を作成し, Evans Blue の赤色蛍光を計測した。その結果, 組織学的にも CC 腫瘍では Evans Blue の滲出が C6 腫瘍に比して有意に減少していることが示され, 血管透過性の減弱が示唆された (Figure 8B, C)。

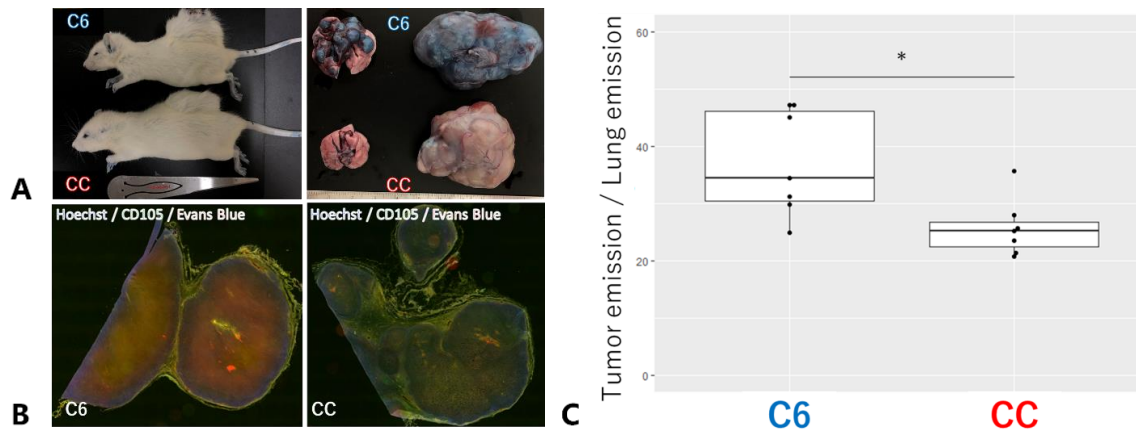


Figure 8 (A) Evans-Blue 静注 1 時間後のラット, 原発巣, 肺。C6 腫瘍では Evans Blue の滲出により, 腫瘍全体が青く濃染されたのに対し, CC 腫瘍ではほとんど濃染されなかった。(B) 免疫組織化学染色。CD105 は血管内皮に発現し, CC 腫瘍では Evans Blue が血管内腔に留まっていた。(C) Evans Blue の肺実質への滲出に対する腫瘍組織への滲出率。CC 腫瘍では Evans Blue の滲出が有意に減少していた。* $P < 0.05$ 。

CC 腫瘍における Tumor-Associated Macrophage (TAM) の減少

C6 細胞及び CC 細胞移植 30 日後に両原発巣を摘出し, 凍結切片を作成した。免疫組織化学染色を行ったところ, CC 腫瘍では C6 腫瘍に比して CD11b 陽性細胞が減少していた (Figure 9A)。続いて摘出した腫瘍を用いたフローサイトメトリーを行った。その結果, CC 腫瘍では生細胞中の CD45 陽性, CD11b 陽性細胞数が有意に減少していた (Figure 9B, C)。以上より, CC 細胞移植群では腫瘍組織へ浸潤したマクロファージ数の減少が示唆された。

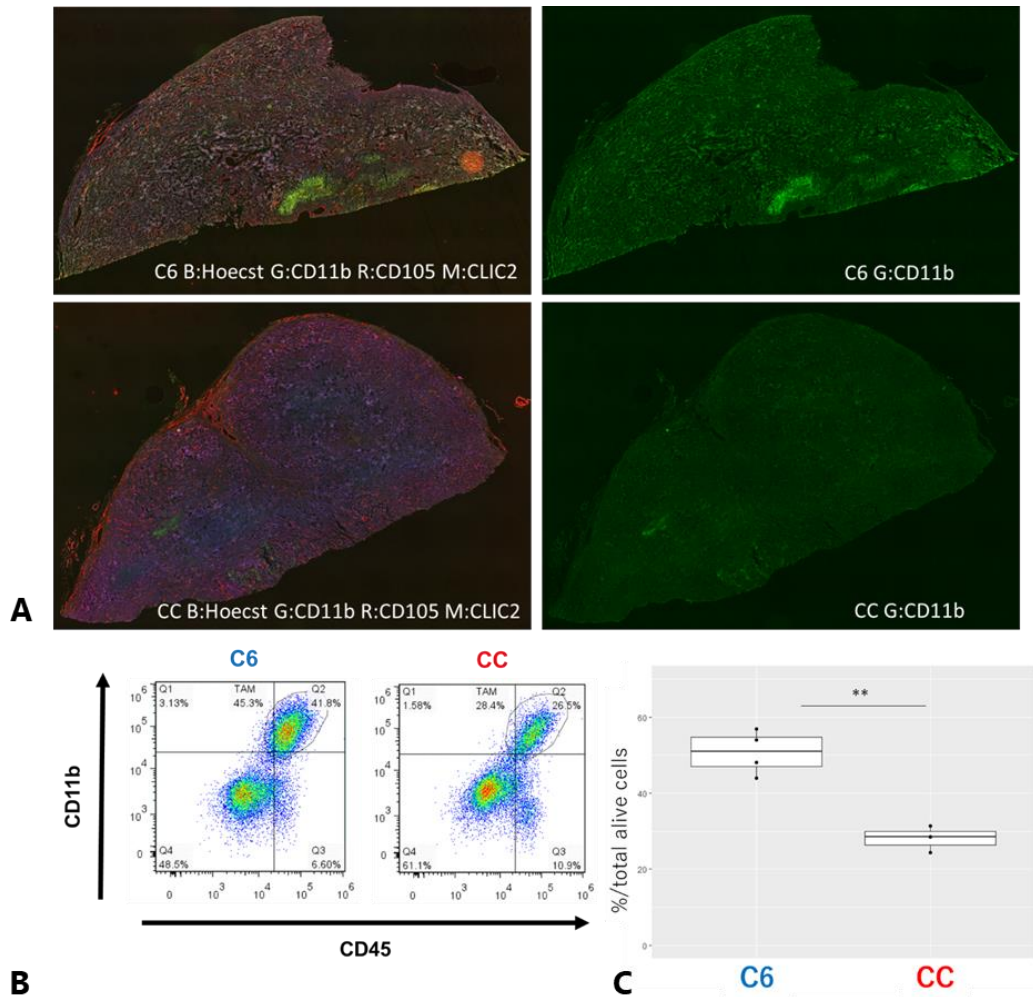


Figure 9 (A) C6/CC 腫瘍原発巣の免疫組織化学染色。CC 腫瘍内では CD11b 陽性細胞が減少していた。(B, C) C6/CC 腫瘍原発巣を用いたフローサイトメトリー。CC 腫瘍で生細胞に対するマクロファージが減少していた。** $P < 0.01$ 。

さらに、摘出した腫瘍の mRNA 発現を qPCR により解析した。その結果を Figure 10 に示す。CC 腫瘍ではマクロファージを遊走させる The chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2) や血管新生、血管透過性を亢進させる vascular endothelial growth factor (VEGF) の発現が有意に低下していた。加えて、Arginase 1 の発現も低下しており、これは抗炎症作用や種々の血管新生因子の産生等によって腫瘍の増殖を促進する (Sica A 2012) 作用を持つマクロファージ (= TAM) の減少を示唆している。

以上より、CC 腫瘍では TAM の浸潤が減少し、TAM が産生する VEGF も減少することで血管透過性が減弱するという仮説が立てられた。

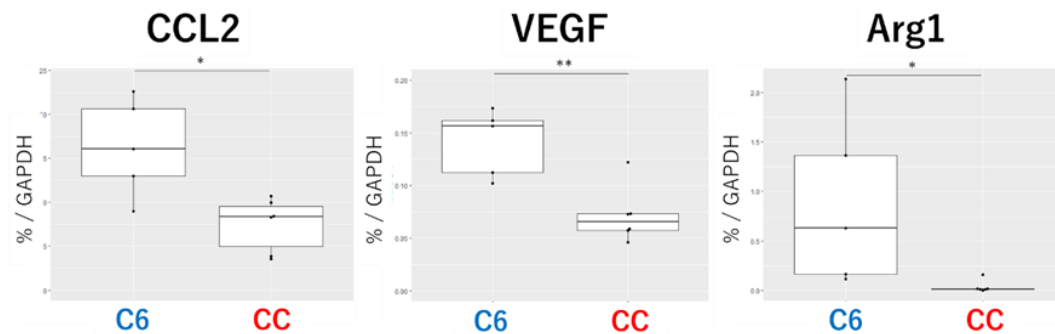


Figure 10 C6/CC 腫瘍塊中の qPCR による mRNA 発現量の比較。CC 腫瘍で TAM 関連因子の mRNA 発現が低下していた。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

CC 腫瘍における細胞間接着分子の増加

TAM の浸潤が減少する原因を解明するため、腫瘍組織の接着分子に着目した。C6 細胞及び CC 細胞移植 30 日後に両原発巣を摘出して蛋白質を抽出し、Western Blot を行った。その結果、CC 腫瘍では C6 腫瘍に比して Tight junction に関与している Claudin-1 や Adherence junction に関与している E-Cadherin の発現量が増加していた (Figure 11)。

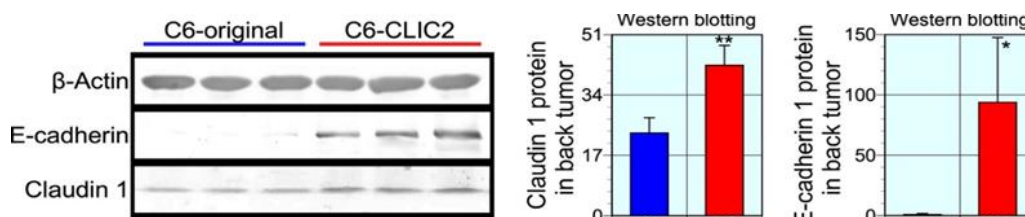


Figure 11 C6/CC 腫瘍塊中の細胞間接着分子の発現量。CC 腫瘍で E-Cadherin をはじめ、接着分子の発現量が有意に増加していた。*P<0.05, **P<0.01。

さらに、細胞間接着分子の局在を明らかにするため、免疫組織化学染色を行った。Figure 12 に E-Cadherin, 血管内皮に発現する Laminin の腫瘍内局在を示す。CC 腫瘍では C6 腫瘍に比して血管内皮で細胞間接着分子が強く発現しており、CLIC2 陽性細胞が何らかの形で血管内皮細胞の細胞間接着に作用して血管透過性を減弱させ、転移抑制に関わることが示唆された。

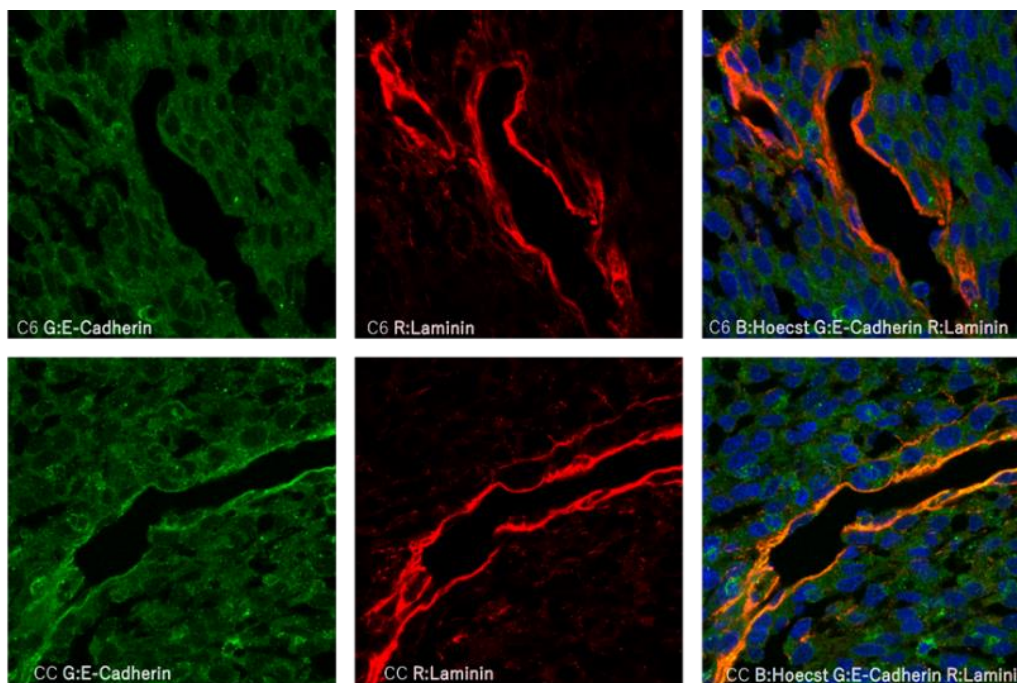


Figure 12 C6/CC 腫瘍内細胞間接着分子の局在。CC 腫瘍では血管内皮細胞で細胞間接着分子が高発現していた。

ヒト髄膜腫組織において Catenin Delta 1 (CTNND1) の発現が CLIC2 と比例

CC 腫瘍において Adherence junction に関与している E-Cadherin が高発現していたことから、ヒト髄膜腫においても CLIC2 と接着分子の関連を調べた。髄膜腫から蛋白質を抽出し、Western Blotting により解析を行ったところ、CLIC2 の発現低下に応じて CTNND1 の発現が低下していた (Figure 13)。CTNND1 は p120-catenin とも呼ばれ、E-Cadherin による Adherence junction の安定化に関与する。組織特異的ノックアウトマウスを用いた実験では Adherence junction の不活化を介して腫瘍形成に関連するとされ、CTNND1 は腫瘍抑制因子としての機能があると考えられている (Schackmann RC 2013)。

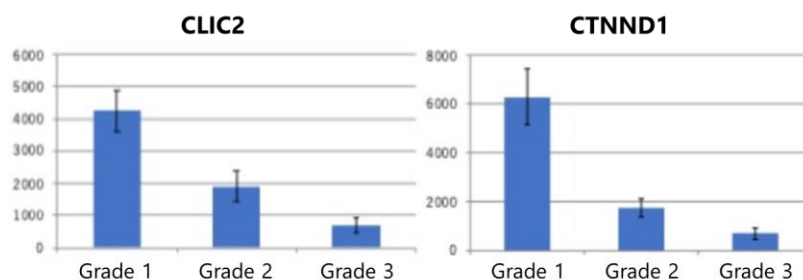


Figure 13 ヒト髄膜腫組織における CLIC2 及び CTNND1 の Grade 毎の Western Blotting による蛋白質発現。Grade が上がり、悪性度が増していくにつれて CLIC2 発現が減少しており、並行して CTNND1 の発現も減少していた。

CC 細胞培養上清中で Matrix metalloproteinase 2 (MMP2) の量・活性が低下

CLIC2 と細胞間接着分子の関係を明らかにするため、細胞外基質を酵素反応によって分解する MMP2 及びその活性化に関わるとされる MMP14 に着目した。各種培養細胞株より抽出した蛋白質を用いた Western Blot では MMP2/14 の発現に差は見られなかった (Figure 14)。

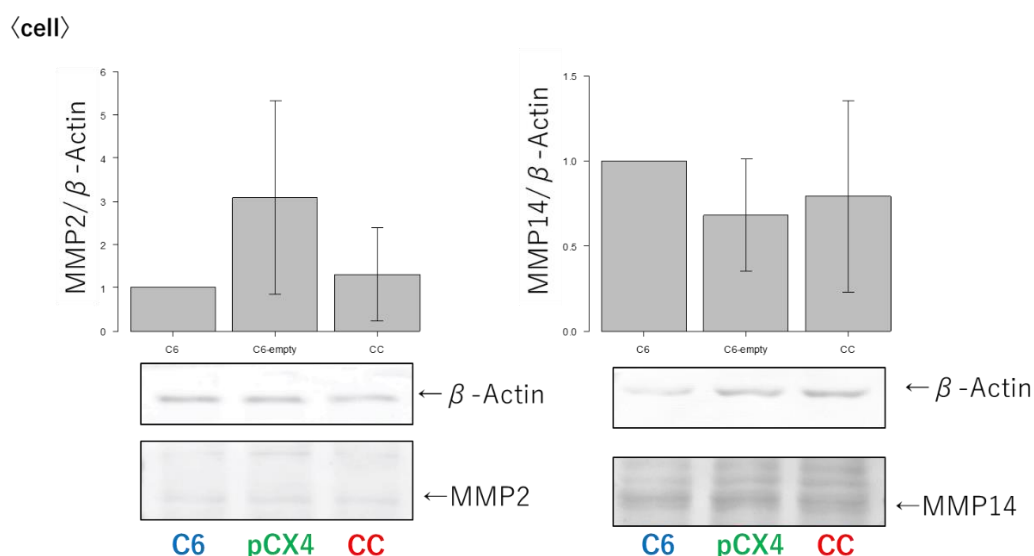


Figure 14 各種培養細胞株の MMP2/14 発現量の比較。細胞中の MMP2/14 発現量に有意な差はみられなかった。

一方、各細胞株の培養上清中の発現量を比較すると CC 細胞培養上清中では C6 細胞、C6-empty 細胞培養上清に比して MMP2 の量が有意に減少していた (Figure 15A)。さらに、各培養上清による Gelatin Zymography では CC 細胞培養上清中の MMP2 活性が低下していることが示された (Figure 15B)。

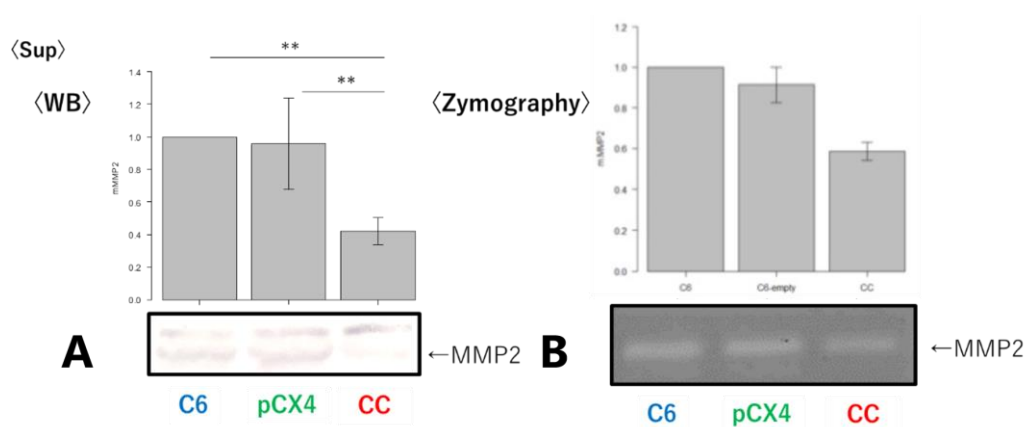


Figure 15 (A) Western Blotting による培養上清中の MMP2 量の比較。C6 細胞, C6-empty 細胞培養上清に比して, CC 細胞培養上清中の MMP2 量は有意に減少していた。(B) Zymography による MMP2 活性の比較。**P<0.01。

さらに MMP2 が関与する周囲組織への浸潤能を評価するため Invasion Assay を行ったところ, CC 細胞は C6, C6-empty 細胞に比して浸潤細胞数が有意に減少していた (Figure 16)。以上の結果より, CLIC2 は MMP2 の細胞外分泌を抑制することで転移抑制に関与する可能性が示唆された。

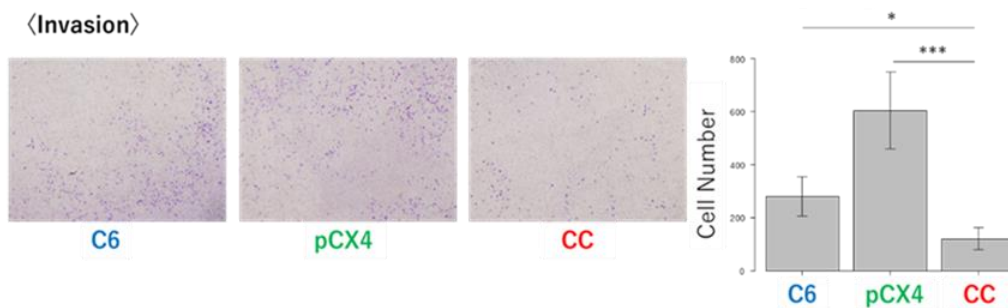


Figure 16 各種細胞株浸潤能の比較。Matrigel を越えて浸潤した Upper chamber 裏面の細胞数を計測すると, CC 細胞はコントロールの C6/C6-empty 細胞より浸潤細胞数が有意に減少していた。*P<0.05, ***P<0.001。

CLIC2 のノックダウンにより浸潤能が増強

また, C6 細胞よりも元々の CLIC2 発現量が高い髄膜腫細胞で CLIC2 をノックダウンすることによる浸潤能への影響を調べた。その結果, CLIC2 をノックダウンした髄膜腫細胞では浸潤細胞数が有意に増加しており (Figure 17), C6 細胞の結果と矛盾しなかった。

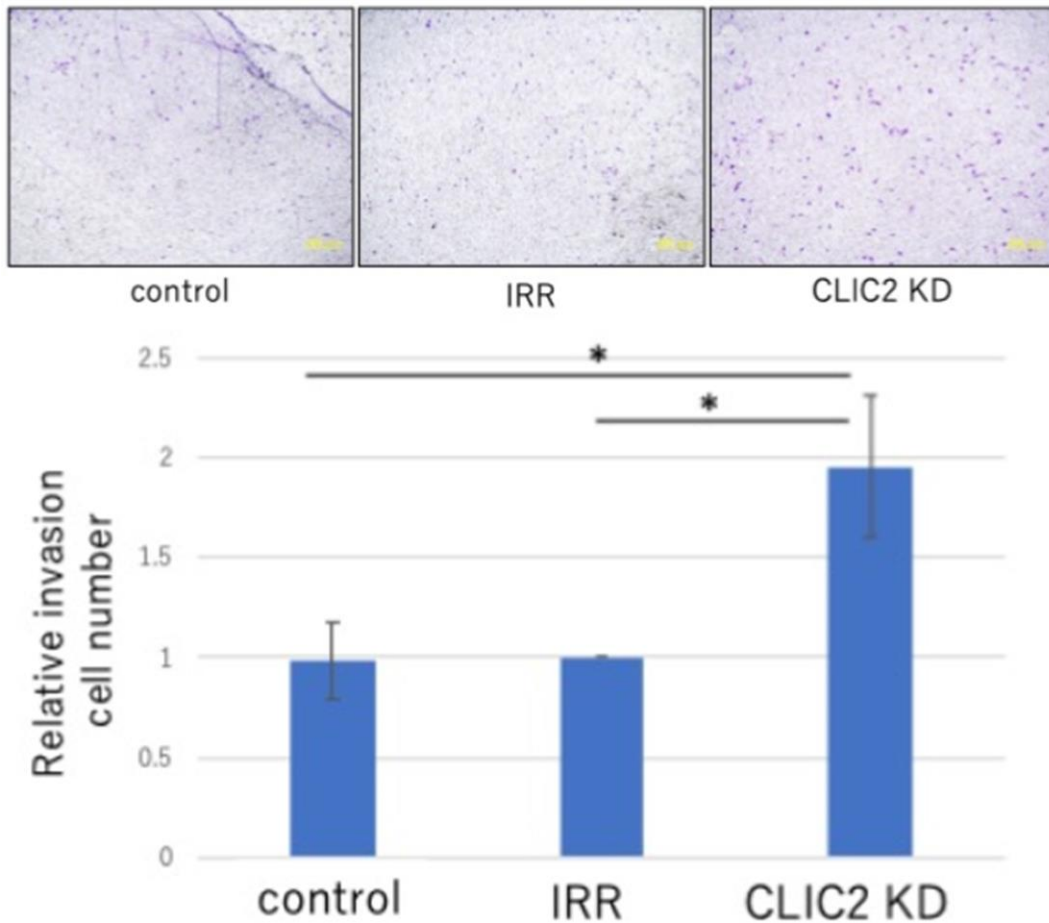


Figure 17 髄膜腫細胞を用いた Invasion Assay。IRR に対する相対量で評価した。CLIC2 ノックダウンにより、髄膜腫細胞の浸潤能が有意に増強された。IRR; ノックダウン操作のコントロール, CLIC2 KD; CLIC2 ノックダウン。*P<0.05。

CLIC2 ノックダウンにより MMP2 発現, 分泌量が増加

さらに、髄膜腫細胞から蛋白質を抽出し、Western Blotting によって MMP2 発現量を比較したところ、CLIC2 ノックダウンにより、MMP2 の発現量がコントロールに比して有意に増加していた (Figure 18A)。また、培養上清を用いた、Zymography では CLIC2 ノックダウン髄膜腫培養上清において、MMP2 の潜在型である pro-MMP2 の量が有意に増加していた。CLIC2 が MMP2 の発現, 分泌に影響する可能性が示唆された (Figure 18B)。

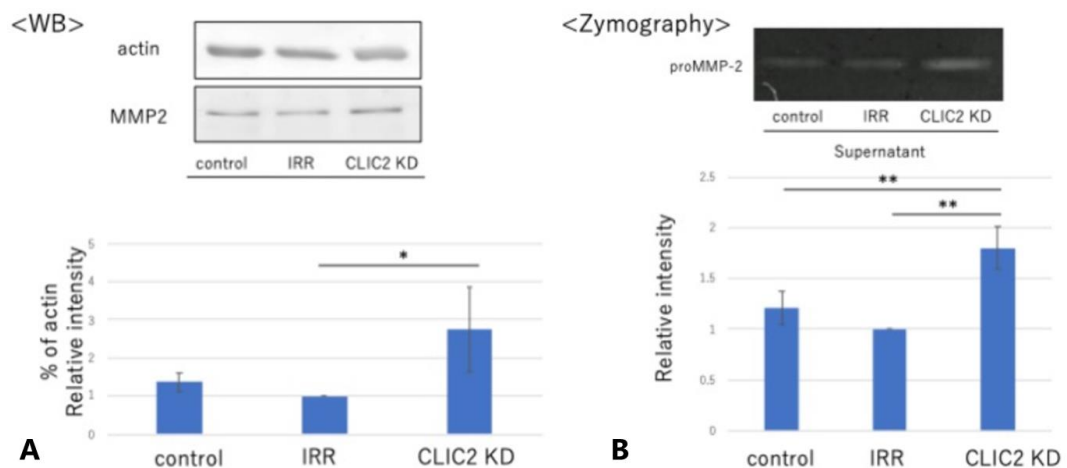


Figure 18 (A) 各髄膜腫細胞の Western Blotting。コントロール細胞, IRR 細胞, CLIC2 ノックダウン細胞から蛋白質を抽出し、 β -actin, MMP2 の発現量を定量した。IRR に対する相対量で評価した。CLIC2 ノッ

クダウン細胞では MMP2 の発現量が有意に増加していた。(B) 各髄膜腫細胞培養上清の Zymography。IRR に対する相対量で評価した。CLIC2 ノックダウンにより、培養上清中の pro-MMP2 量が有意に増加していた。*P<0.05, **P<0.01。

4. 考察

本研究において、我々はまずラット遠隔転移モデルの原発巣と転移巣の比較から、それぞれの腫瘍細胞の悪性度の違いを発見した。それぞれの遺伝子発現の違いに着目し、悪性度の低い原発巣由来腫瘍細胞に高発現する CLIC2 の腫瘍に対する影響を検討した。

ラット肺転移モデル、脳腫瘍モデルにおいて CLIC2 の抗腫瘍効果が示され、さらに、ヒト髄膜腫において Grade が低いほど、CLIC2 が高発現していることが確認できた。また C6 細胞移植群と比較し、CC 細胞移植群では血管透過性の減弱、またそれに伴う TAM の浸潤抑制が観察された。更に C6 腫瘍内では発現の認められない細胞間接着因子が、CC 腫瘍内で発現が認められ、特に血管内皮細胞で発現の上昇が観察された。加えて、ヒト髄膜腫では CLIC2 の発現に Adherence junction の安定に関与する CTNND1 の発現が比例していた。これらのことは、CLIC2 陽性細胞が何らかの形で血管内皮細胞の細胞間接着に作用し、血管透過性を下げることで腫瘍の進展を抑制していることを示唆している。

また各細胞培養上清間の比較において、C6 細胞、C6-empty 細胞に比して CC 細胞では、細胞外基質を酵素反応で分解させる MMP2 の分泌量が減少し、浸潤能も低下していた。一方で、CLIC2 をノックダウンした髄膜腫細胞では、MMP2 の発現及び分泌量が増加し、浸潤能も上昇していた。そのため、CLIC2 の抗腫瘍効果のメカニズムの一つが、この CLIC2 の MMP2 分泌抑制ではないかと示唆された。

これらのことはまず CLIC2 という未知の蛋白質の機能解明に一步前進したこと、さらにこの未知の蛋白質 CLIC2 が、がん治療において非常に難題ともいえる転移に対する治療法としての可能性を持っていることが分かったといえる。

しかし、細胞内における CLIC2 の直接的な MMP2 の調節機構は未だ分かっていない。細胞内 MMP2 の mRNA、蛋白質量に変化はなく、転写や翻訳レベルでの調節ではないことが示唆されるが、一方で細胞外へ分泌する小胞の一種であるエクソソームのマーカーである CD9 の発現が、CC 細胞培養上清中で減少していることが分かってきている。このエクソソーム内に MMP2 が内包されているという報告もある (Tang H 2019)。また、現在我々は CLIC2 の細胞内局在として、蛋白質の輸送や修飾、分泌に関与するゴルジ体であることを明らかにしつつある。以上のことから我々は MMP2 の分泌減少は単なる CLIC2 の機能の一角で、実際は分泌機構に何らかの抑制的な働きをしているのではないかと予測している。もし CLIC2 が MMP2 などの分泌、活性化に抑制的な働きを実際に持っているのであれば、この CLIC2 は将来的にがん治療において大きな役割を持つ分子となりえるのではないかと期待している。

5. 参考文献

- (1) Argenzio E, Moolenaar WH. Emerging biological roles of Cl- intracellular channel proteins. *J Cell Sci.* 2016;129(22):4165–4174. doi:10.1242/jcs.189795.
- (2) El-Hattab AW, Schaaf CP, Fang P, Roeder E, Kimonis VE, Church JA, Patel A, Cheung SW. Clinical characterization of int22h1/int22h2-mediated Xq28 duplication/deletion: new cases and literature review. *BMC Med Genet.* 2015; 16:12. doi:10.1186/s12881-015-0157-2.
- (3) Erler JT, Bennewith KL, Cox TR, Lang G, Bird D, Koong A, Le QT, Giaccia AJ. Hypoxia-induced lysyl oxidase is a critical mediator of bone marrow cell recruitment to form the premetastatic niche. *Cancer Cell.* 2009 Jan 6;15 (1) :35-44. doi: 10.1016/j.ccr.2008.11.012.
- (4) Kobayashi K, Yano H, Umakoshi A, Matsumoto S, Mise A, Funahashi Y, Ueno Y, Kamei Y, Takada Y, Kumon Y, Ohnishi T, Tanaka J. A Truncated form of CD200 (CD200S) Expressed on Glioma Cells Prolonged Survival in a Rat Glioma Model by Induction of a Dendritic Cell-Like Phenotype in Tumor-Associated Macrophages. *Neoplasia.* 2016 Apr;18(4):229-41. doi: 10.1016/j.neo.2016.02.006.
- (5) Kuwabara J, Umakoshi A, Abe N, Sumida Y, Ohsumi S, Usa E, Taguchi K, Choudhury ME, Yano H,

- Matsumoto S, Kunieda T, Takahashi H, Yorozuya T, Watanabe Y, Tanaka J. Truncated CD200 stimulates tumor immunity leading to fewer lung metastases in a novel Wistar rat metastasis model. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018 Feb 5;496(2):542-548. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.01.065. Epub 2018 Jan 12.
- (6) Mi W, Liang YH, Li L, Su XD. The crystal structure of human chloride intracellular channel protein 2: a disulfide bond with functional implications. *Proteins*. 2008 Apr;71(1):509-13.
- (7) Schackmann RC, Tenhagen M, van de Ven RA, Derksen PW. p120-catenin in cancer - mechanisms, models and opportunities for intervention. *J Cell Sci*. 2013 Aug 15;126(Pt 16):3515-25. doi: 10.1242/jcs.134411.
- (8) Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest*. 2012 Mar;122(3):787-95. doi: 10.1172/JCI59643. Epub 2012 Mar 1.
- (9) Takano K, Liu D, Tarpey P, Gallant E, Lam A, Witham S, Alexov E, Chaubey A, Stevenson RE, Schwartz CE, et al. An X-linked channelopathy with cardiomegaly due to a CLIC2 mutation enhancing ryanodine receptor channel activity. *Hum Mol Genet*. 2012;21(20):4497-4507. doi:10.1093/hmg/dds292.
- (10) Tang H, He Y, Li L, Mao W, Chen X, Ni H, Dong Y, Lyu F. Exosomal MMP2 derived from mature osteoblasts promotes angiogenesis of endothelial cells via VEGF/Erk1/2 signaling pathway. *Exp Cell Res*. 2019 Oct 15;383(2):111541. doi: 10.1016/j.yexcr.2019.111541. Epub 2019 Jul 29.
- (11) Ueno Y, Ozaki S, Umakoshi A, Yano H, Choudhury ME, 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 protein 2 in cancer and non-cancer human tissues: relationship with tight junctions. *Tissue Barriers*. 2019;7(1):1593775. doi: 10.1080/21688370.2019.1593775. Epub 2019 Mar 31.
- (12) Zeng J, Li Z, Lui EY, Lam SH, Swaminathan K. Tilapia and human CLIC2 structures are highly conserved. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018; 495:1752-1757. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.11.189.