

がん遠隔転移モデルの作成とCLIC2の転移抑制効果の解明

大角翔太¹, 尾崎沙耶², 馬越陽大¹, 早瀬絵理香¹, 田中潤也¹
愛媛大学大学院医学系研究科 分子細胞生理学¹, 脳神経外科学²

Introduction

がん研究の目的

- がんは日本人の死因第1位。
- 無秩序な増殖, 周囲組織への浸潤や遠隔転移を起こす。
- 遠隔転移を起こすと手術や放射線治療が困難となり, 予後が悪化。

遠隔転移の抑制が治療の1つの鍵

CLIC2 (Chloride intracellular channel protein 2) とは?

- CLICファミリー (1-6まで存在) に属する28 kDa程度の低分子蛋白質。
- 生体内の挙動は明らかではなく塩化物イオンチャネルとしての機能も不明。

がんとCLIC2の関連

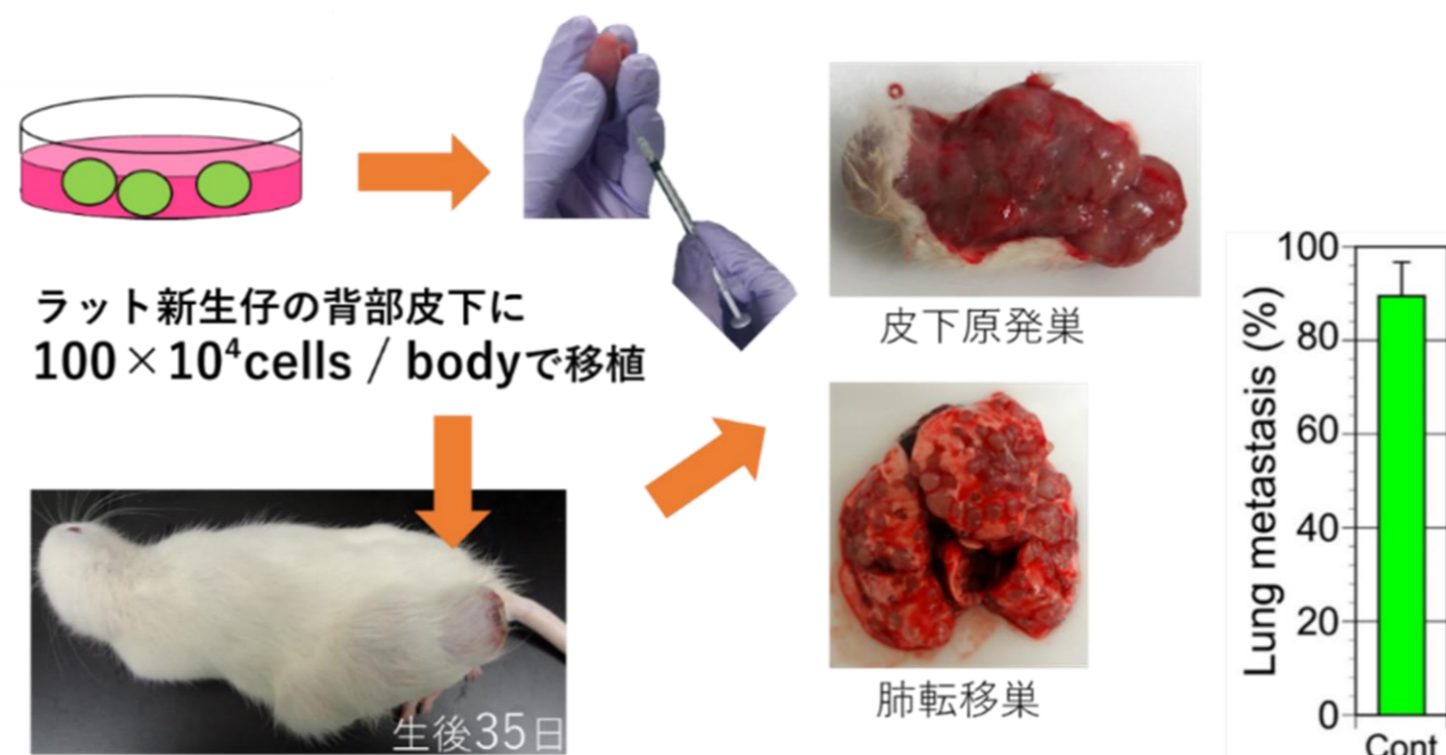
- ヒト肝細胞癌 (Hepatocellular carcinoma; HCC) では癌組織に比して周囲の非癌組織で高発現 (Ueno Y 2019)。
- 進行したHCC, 癌以外にも肝機能低下や線維化の進んだ症例 (癌の高リスク) では発現が低下。

CLIC2の発現低下はがんの進行に寄与する可能性

Method / Result

がん遠隔転移モデルの作成, 本モデルの特長

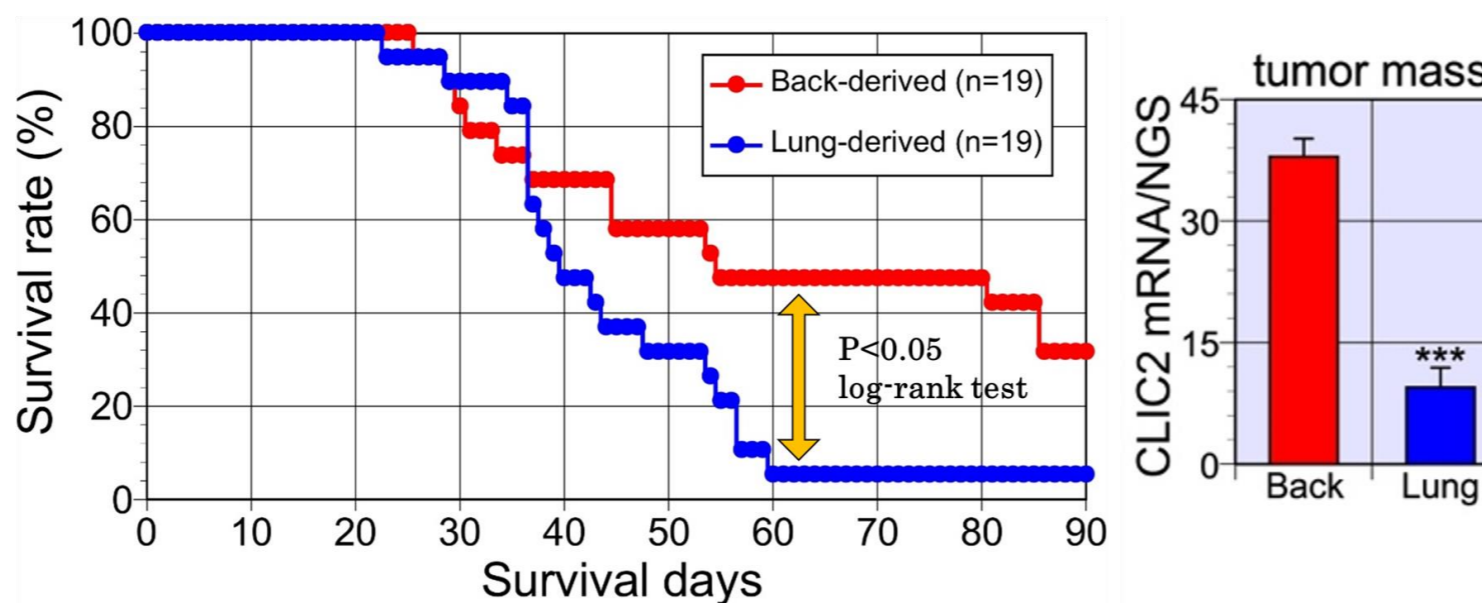
- ラットC6グリオーマ細胞を使用。
- 正常ラットを使用し, 腫瘍免疫や血管浸潤について調べられる (一般には, 免疫不全動物やがん細胞を血管内に直接注入する方法がある)。
- 背部皮下注射という簡便な手技。
- 転移率が高く, 肺に転移巣を形成。



原発巣由来の細胞は低悪性度, CLIC2が高発現

Green fluorescent protein (GFP) で標識したC6細胞を移植し, 形成された腫瘍塊からC6細胞を単離することで, 背部原発巣と肺転移巣のC6細胞の性質を比較した。それぞれの細胞を用いて, ラット新生仔背部皮下に再び移植する動物実験, 及び次世代シーケンサーによる遺伝子発現の解析を行った。

- 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。
- 原発巣由来の細胞でCLIC2遺伝子が有意に高発現。



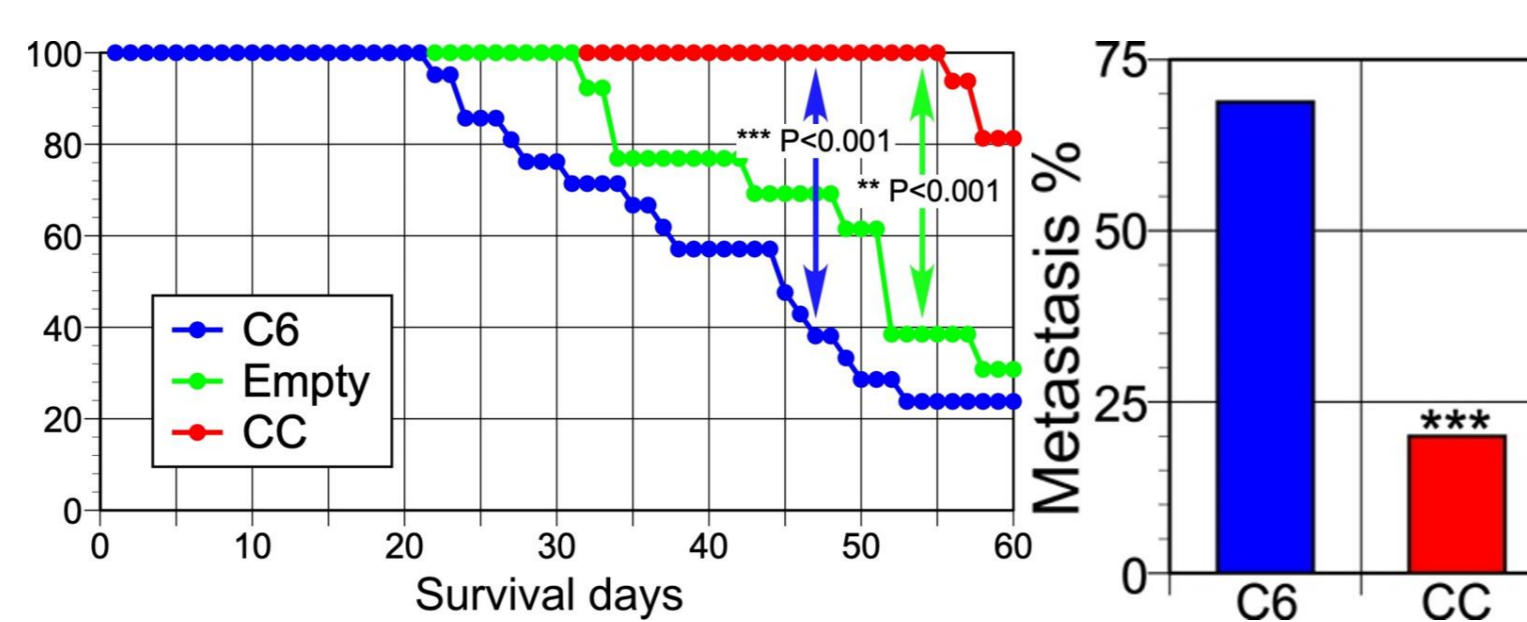
低悪性度の原発巣C6細胞でCLIC2が高発現
CLIC2はがん抑制的であることを示唆

CLIC2強制発現C6細胞移植群は生存期間が有意に長い

- CLIC2遺伝子をC6細胞に導入したC6-CLIC2細胞 (CC細胞) を作成。
- C6細胞, C6-Empty細胞 (遺伝子導入操作のコントロール) と共に移植。

- CC細胞移植群は有意に生存期間が長かった。

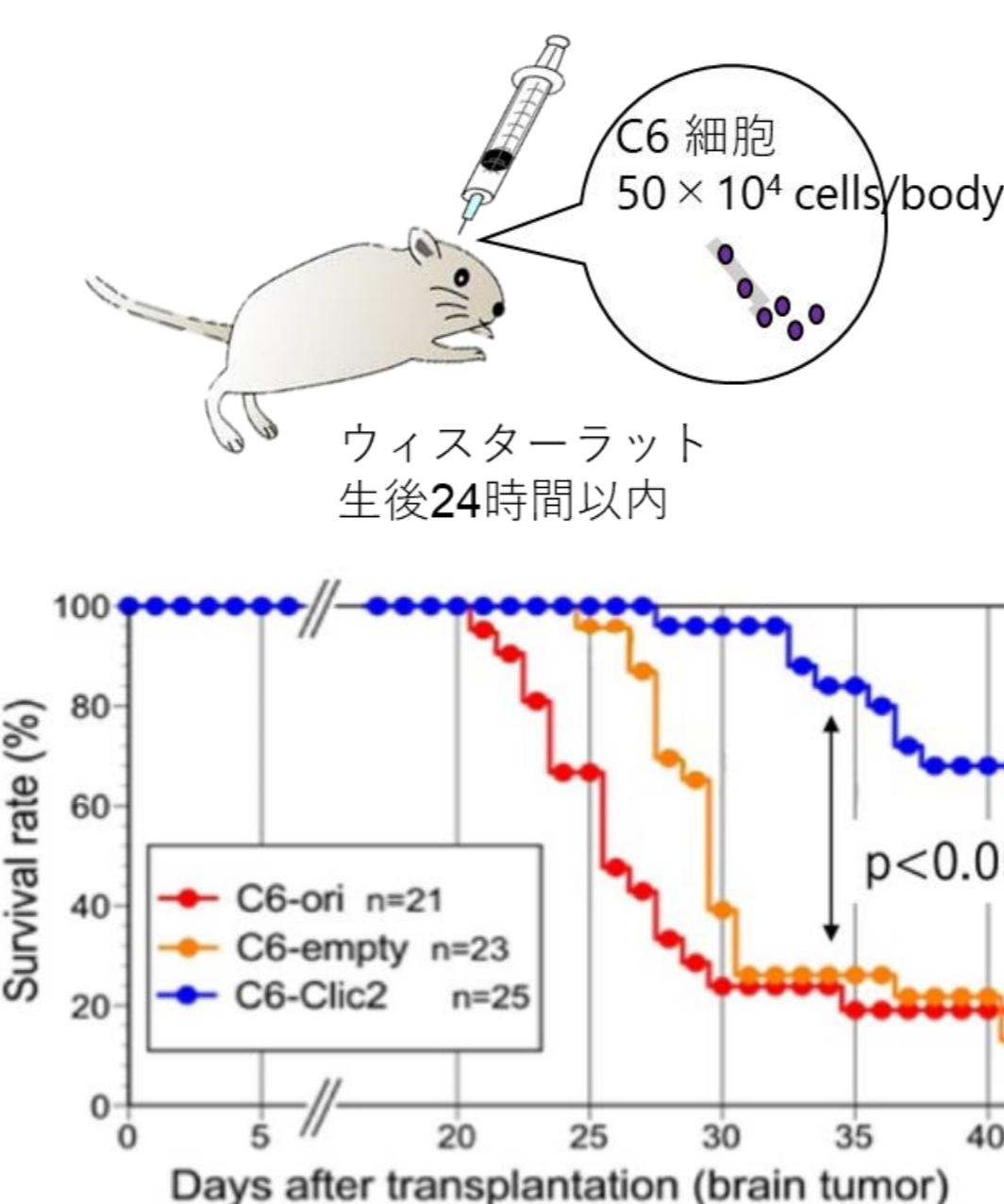
- 肺への転移率も有意に低下。



- 各種細胞株をラット新生仔の脳へ移植し, 脳腫瘍モデルを作成。

- 原発性脳腫瘍はほぼ転移しないが, 周囲組織への浸潤が特に問題となる。

- 脳腫瘍モデルにおいてもCC細胞移植群は生存期間が有意に長かった。



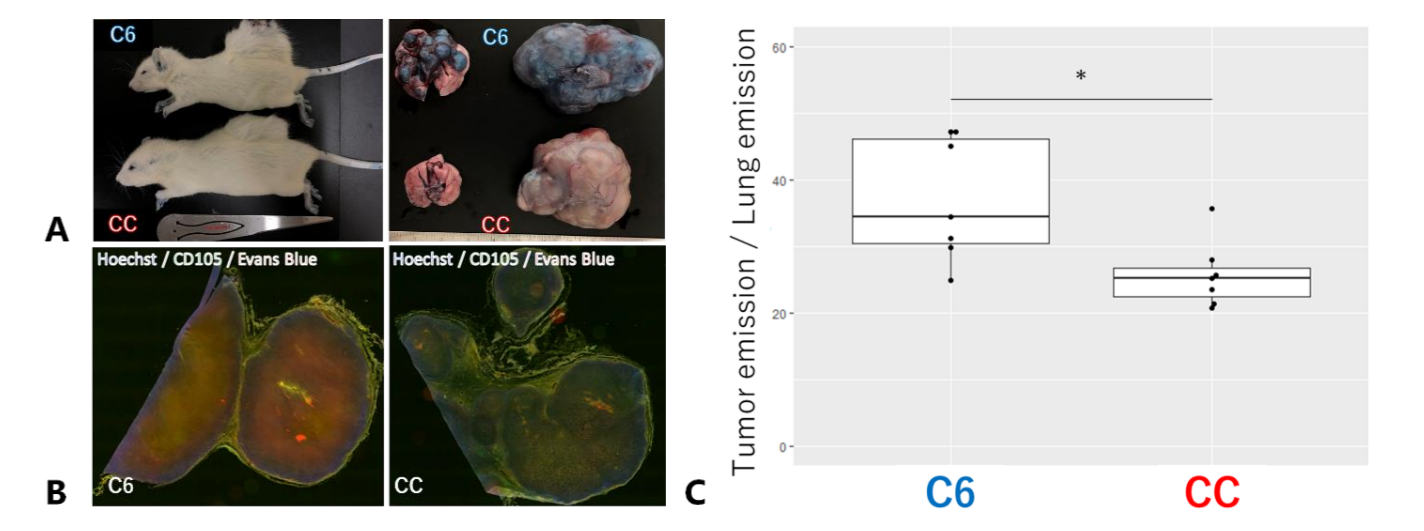
CLIC2はがんの遠隔転移, 浸潤に抑制的

CC腫瘍では血管透過性が減弱

腫瘍細胞背部皮下移植30日後, Evans Blueを尾静脈に注射。

血管透過性が亢進していれば多量に滲出し, 濃染。一般に腫瘍新生血管では亢進している。

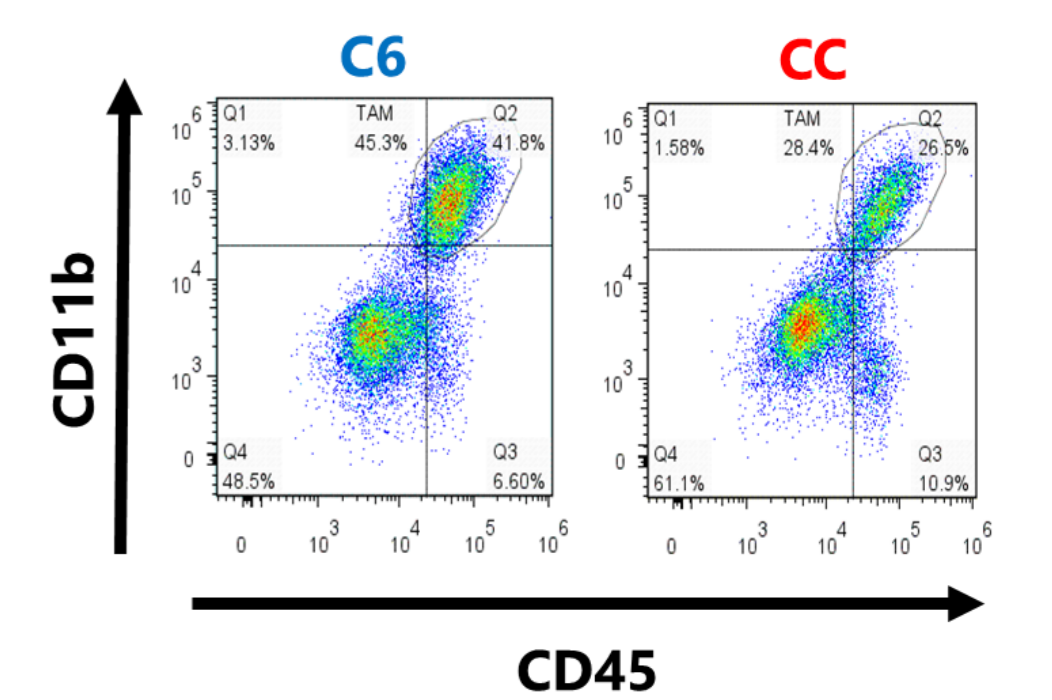
- CC腫瘍では濃染されず (A), 免疫組織化学染色でもEvans Blue (赤色) はほぼ検出されなかった (B)。
- Evans Blueの肺実質への滲出に対する腫瘍組織への滲出率はCC腫瘍で有意に低下 (C)。



CC腫瘍でTumor-Associated Macrophage (TAM) が減少

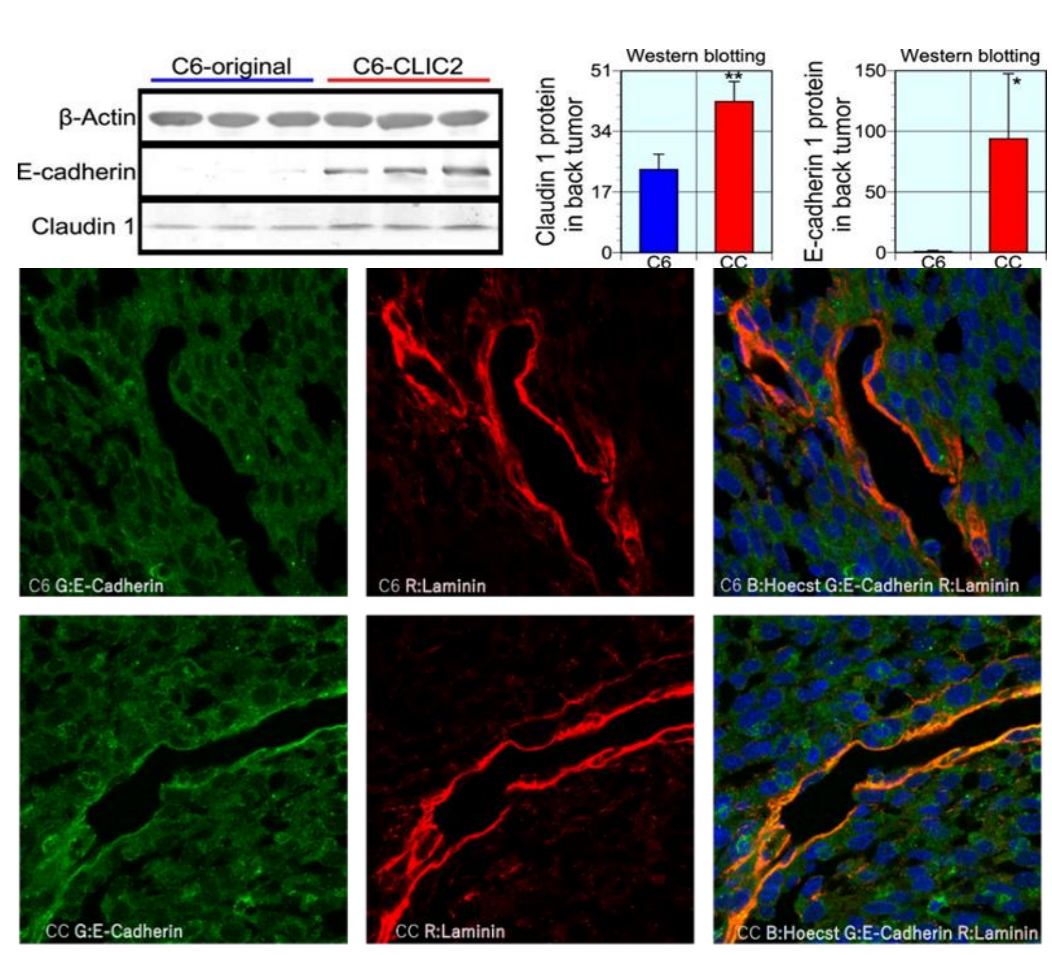
CC腫瘍ではCD45陽性かつCD11b陽性細胞 (マクロファージ) 数が有意に減少。

血管新生, 血管透過性亢進, 抗炎症効果等により腫瘍発育を促進するTAMの減少を示唆



CC腫瘍細胞間接着分子が高発現

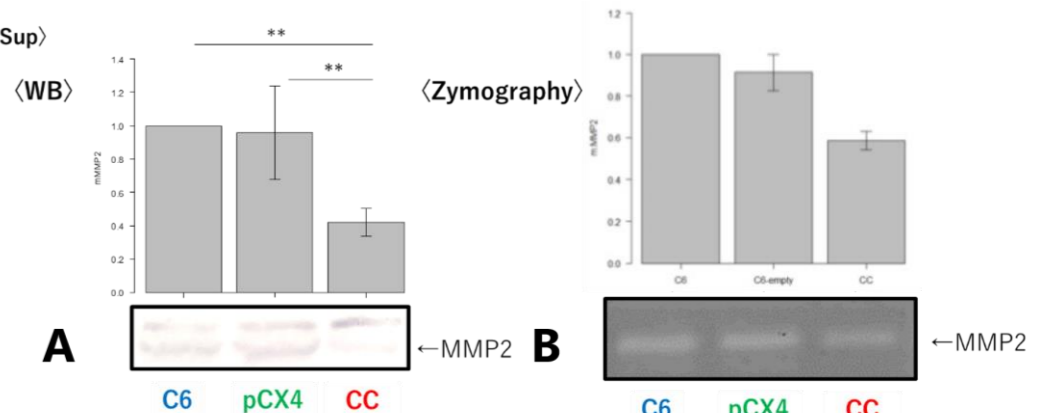
- 原発巣の蛋白質発現を比較。
- CC腫瘍で細胞間接着分子が高発現。
- 特に血管内皮で強固。



CLIC2は細胞間接着を強固にし, TAMの浸潤を抑制することで血管透過性の亢進を抑制する可能性

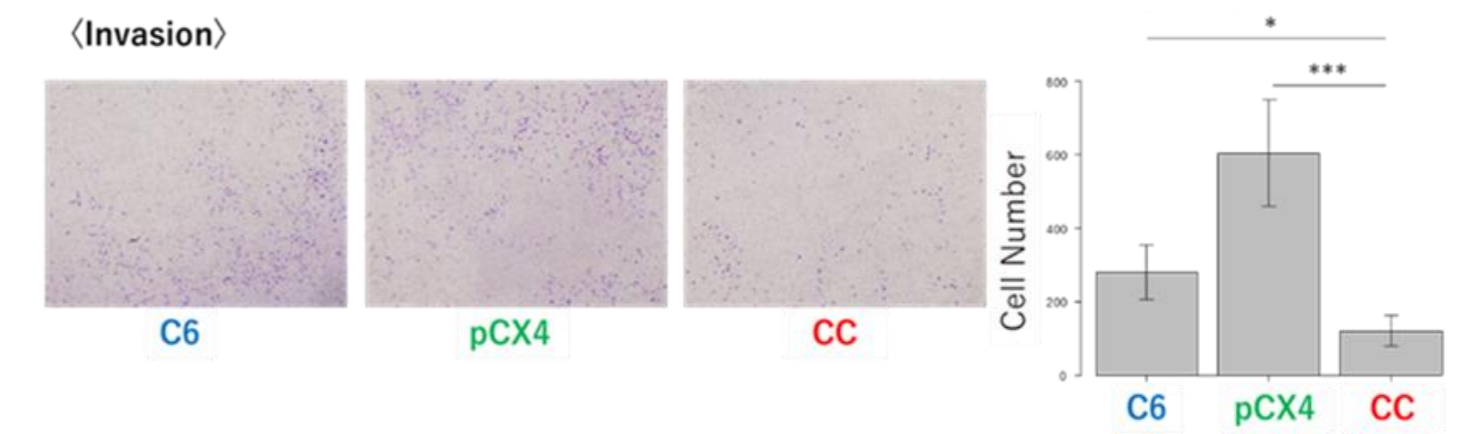
CC細胞MMP2 (Matrix metalloproteinase 2) 活性, 浸潤能低下

- CC細胞培養上清中のMMP2の分泌量 (A), 活性 (B) が有意に低下。
- MMP2は細胞外基質を酵素反応によって分解するため浸潤に重要。



Matrigel invasion assayにより浸潤能を評価。

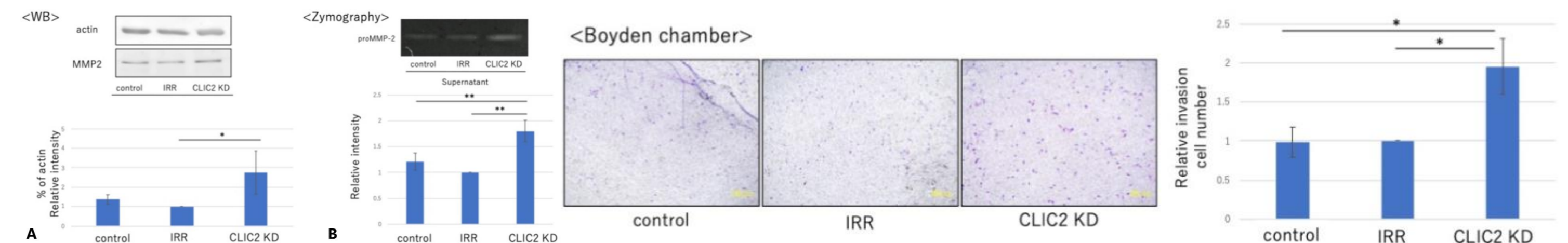
CC細胞は浸潤細胞数が有意に減少。



CLIC2 KnockdownによりMMP2活性, 浸潤能亢進

CLIC2を高発現する良性脳腫瘍のヒト髄膜腫細胞でCLIC2をKnockdownし, CLIC2低下による影響を検討。

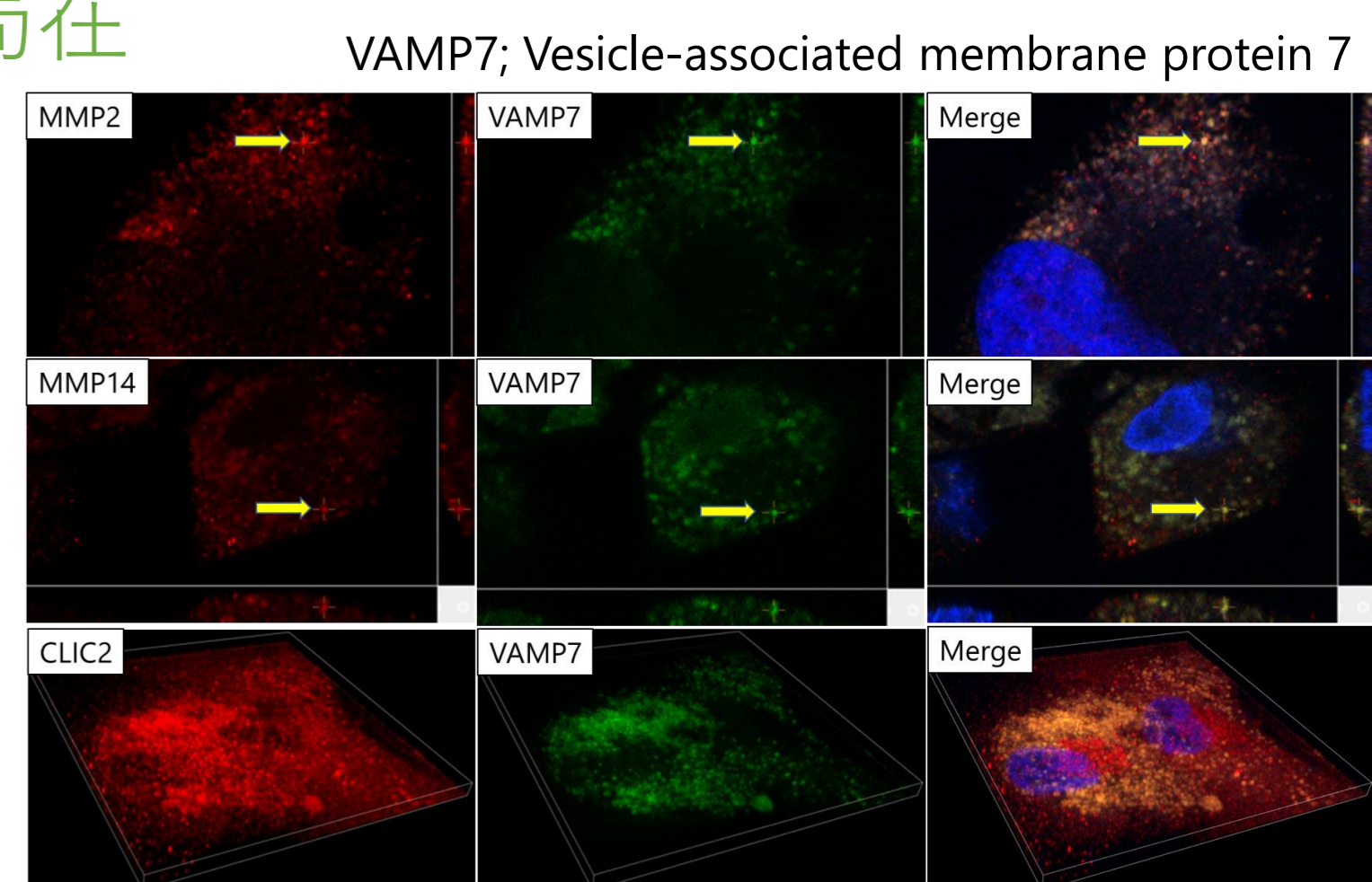
- CLIC2 Knockdownにより, MMP2の量, 活性が有意に上昇。
- Matrigel invasion assayで浸潤細胞数も有意に増加。



CLIC2はMMP2の抑制に関与
細胞間接着分子の分解や腫瘍の組織浸潤を抑制

CLIC2, MMP2, MMP14が共局在

- CLIC2, MMP2, MMP14が細胞内でVAMP7陽性分泌顆粒に存在。
- MMP14はpro-MMP2の活性化に関与するとされる。



CLIC2はMMP14に作用し, MMP2の活性化を抑制する可能性

Conclusion

CC細胞移植群は有意に生存期間が長く, 転移率も低かった。

CC細胞では, MMP2の分泌量や活性が低く, 浸潤能も低下していた。一方で, CLIC2をKnockdownした髄膜腫細胞では, MMP2の分泌量が増加し, 浸潤能も上昇していた。これがCC腫瘍における細胞間接着分子の分解を抑制し, TAMの浸潤を減少させ, その結果, 腫瘍血管の透過性が亢進しにくく, 腫瘍の進展が抑制されると考えられる。

また, MMP2の活性化を制御するMMP14とCLIC2が共局在することからCLIC2の一連の抗腫瘍効果はMMP14への作用によるものと考えられる。