

Decreased expression of CLIC3 aggravates survival rate of gastric cancer patients

胃癌におけるCLIC3の発現減少は生命予後を悪化させる

富山大学大学院医学薬学教育部 博士課程 生命・臨床医学専攻

河合俊輔

目次

要旨	．．．．．3
1. 序論	．．．．．5
2. 材料と方法	
2.1 試料	．．．．．6
2.2 CLIC3 の遺伝子クローニング	．．．．．6
2.3 細胞培養、トランスフェクション	．．．．．6
2.4 膜画分の調整	．．．．．6
2.5 免疫細胞染色	．．．．．6
2.6 電気生理学的解析	．．．．．6
2.7 Tissue microarray 解析	．．．．．6
2.8 ウェスタンブロット	．．．．．6
2.9 細胞増殖能解析	．．．．．6
2.10 ミトコンドリア活性解析	．．．．．6
2.11 遊走能、浸潤能解析	．．．．．6
2.12 統計解析	．．．．．6
3. 結果	
3.1 胃癌切除症例における CLIC3 の発現検討	．．．．．7
3.2 胃癌細胞株における CLIC3 の発現機能	．．．．．7
3.3 CLIC3 過剰発現 HEK293T 細胞の電気生理学的性質	．．．．．7
3.4 胃癌細胞の増殖、遊走、浸潤に対する CLIC3 過剰発現の効果	．．．．．7
4. 考察	．．．．．8
5. 総括	．．．．．9
6. 謝辞	．．．．．9

要旨

目的：

これまで胃癌細胞において、生命予後に影響を及ぼす膜タンパク質が報告されている。**chloride intracellular channel 3 (CLIC3)**は可溶性タンパク質もしくは細胞内オルガネラの膜タンパク質として機能することが報告されており、その高発現は膵癌、乳癌、卵巣癌、悪性胸膜中皮腫患者の生命予後を悪化させることが報告されている。しかし、**CLIC3**と胃癌との関連についてはこれまで報告されていない。本研究は、胃癌における**CLIC3**の発現とその病態生理機能を明らかにすることを目的とした。

方法および結果：

富山大学附属病院で2001年から2008年に切除された胃癌107症例について抗**CLIC3**抗体を用いた組織マイクロアレイ(TMA)解析を行い、**CLIC3**の発現を臨床病理学的に検討した。単変量解析では、予後に反して、**CLIC3**低発現群で腫瘍の壁深達度が有意に進展していた。他方、性別、年齢、リンパ節転移、肝転移、腹膜播種、腹腔洗浄細胞診、臨床病期、リンパ管侵襲および静脈侵襲については有意差を認めなかった。Kaplan-Meier法による予後解析では、全生存率および疾患特異的生存率ともに**CLIC3**高発現群で低発現群よりも予後良好であった。また、胃癌切除標本の非癌部および癌部よりそれぞれ膜画分を調整し、ウェスタンブロットにて**CLIC3**タンパク質の発現レベルを検討した。非癌部の多くで**CLIC3**の発現が観察された一方、癌部においてはTMA解析と同様に、非癌部と同程度の発現を示す症例と発現が著しく低下している症例が観察された。以上の結果から、これまで報告されている癌種の結果と異なり、胃癌においては**CLIC3**の発現低下が生命予後の悪化と相関する可能性が示唆された。

ヒト胃癌細胞株(MKN7、MKN74、MKN45、KATOIII、NUGC-4)の膜画分を用いたウェスタンブロットにより、MKN7細胞が**CLIC3**を発現することが示されたが、他の胃癌細胞株では明らかな発現は見られなかった。また、MKN7細胞において**CLIC3**は部分的に原形質膜に局在していた。そこでパッチクランプホールセル記録法を用いて電気生理学的解析を行った結果、MKN7細胞において外向き整流性Cl⁻電流が観測された。この電流はCl⁻チャネル阻害剤であるNPPB処理により有意に減少した。

CLIC3を過剰発現させたヒト胎児腎臓由来HEK293T細胞においては、MKN7細胞と同様に**CLIC3**は原形質膜に局在していた。パッチクランプホールセル記録法では、mock細胞に比べて有意な外向き整流性Cl⁻電流が観察され、細胞外液Cl⁻濃度を低下させることで逆転電位が脱分極方向にシフトした。また、細胞外液にNPPBを加えることによって外向き電流は有意に減少した。以上の結果から、**CLIC3**は原形質膜において外向き整流性

Cl⁻チャンネルとして機能することが示唆された。

一般的に、壁深達度は細胞増殖能に、転移能は細胞遊走能、浸潤能に相関することから、CLIC3の内因性発現が見られなかった KATOIII細胞と NUGC-4細胞に CLIC3を過剰発現させ、細胞増殖能、ミトコンドリア活性、遊走能、浸潤能を評価した。CLIC3の発現により、細胞増殖能およびミトコンドリア活性は有意に低下した。一方、遊走能と浸潤能に有意な変化は認められなかった。

総括：

これらの結果から、CLIC3は胃癌細胞の原形質膜において Cl⁻チャンネルとして機能する膜タンパク質であり、CLIC3の発現低下が胃癌細胞内の Cl⁻濃度の恒常性維持機能に影響を与えることで、細胞増殖能を低下することが示唆された。その結果、腫瘍学的因子としての壁深達度が進展することにより、生命予後の悪化を引き起こす可能性が示唆された。

1. 序論

胃癌は腹部領域において、もっとも罹患率の高い悪性腫瘍のひとつである (1, 2)。現在までに外科的手術、内視鏡治療、化学療法と様々な治療法の開発が進んでいる (3-5)。日本では人口の高齢化に伴い、罹患患者数は増加傾向を示しており (6)、胃癌の悪性形質のメカニズムを解明することは患者の生命予後改善に重要である。

これまで胃癌において、Cl⁻チャネルの異常発現が報告されており、生命予後の増悪に寄与することが示唆されている。chloride channel-3 (CLC-3)の高発現は胃癌細胞浸潤を促進することで生命予後を増悪させ (7)、Ca²⁺依存性 Cl⁻チャネルである transmembrane protein 16A (TMEM16A)の高発現も腫瘍浸潤を促進することで生命予後を増悪させる (8)。また、chloride intracellular channel 1 (CLIC1)の高発現は、リンパ節転移やリンパ管侵襲、また病理学的臨床病期と強い相関を示すことが報告されている (9)。

glutathione-S-transferase superfamily である chloride intracellular channel 3 (CLIC3)は、これまで可溶性タンパク質もしくは細胞内オルガネラにおける膜タンパク質として機能することが報告されている (10-12)。膵癌、乳癌、卵巣癌、悪性胸膜中皮腫において、CLIC3の異常発現と生命予後の増悪との相関が示唆されている (13-16)。しかし、これまでに CLIC3の発現と胃癌との関連を検討した報告はない。本研究では、胃癌における CLIC3の発現と病態生理機能を明らかにすることを目的とした。

2. 材料と方法

下記のごとく実験を行った。詳細非公表。

2.1 試料

2.2 CLIC3 の遺伝子クローニング

2.3 細胞培養、トランスフェクション

2.4 膜画分の調整

2.5 免疫細胞染色

2.6 電気生理学的解析

2.7 組織マイクロアレイ (TMA) 解析

2.8 ウェスタンブロット

2.9 細胞増殖能解析

2.10 ミトコンドリア活性解析

2.11 遊走能、浸潤能解析

2.12 統計解析

3. 結果

下記のごとく評価を行った。内容非公表。

3.1 胃癌切除症例における CLIC3 の発現検討

3.2 胃癌細胞株における CLIC3 の発現と機能

3.3 CLIC3 過剰発現 HEK293T 細胞の電気生理学的性質

3.4 胃癌細胞の増殖、遊走、浸潤に対する CLIC3 過剰発現の効果

4. 考察

非公表。

総括

本研究では、CLIC3が胃癌細胞の原形質膜においてCl⁻チャネルとして機能することを見出した。CLIC3の発現が低下による胃癌細胞内Cl⁻濃度の変動が、胃癌細胞の増殖能を亢進することで、腫瘍学的因子としての壁深達度の進展、また胃癌患者の生命予後の増悪に寄与する可能性が示唆された。今後、胃癌におけるCLIC3発現制御機構を解明することで、新たな胃癌制御法の開発につながるものと期待される。

5. 謝辞

稿を終えるにあたって、本研究の遂行に際して御指導、御高閲を賜りました、富山大学 消化器・腫瘍・総合外科 藤井努教授に感謝申し上げます。奥村知之講師をはじめ、富山大学 消化器・腫瘍・総合外科のスタッフの方々に感謝申し上げます。実験技術の御指導を賜りました、富山大学薬学部 薬物生理学研究室 酒井秀紀教授をはじめ、清水貴浩准教授、藤井拓人助教、研究室員の方々に感謝申し上げます。