

氏 名 かわい しゅんすけ
河合 俊輔

学位の種類 博士 (医学)

学位記番号 富医薬博甲第 297 号

学位授与年月日 平成 31 年 3 月 26 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教育部名 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

学位論文題目

胃癌におけるchloride intracellular channel 3 (CLIC3) の
発現減少は生命予後を悪化させる
(Decreased expression of CLIC3 aggravates survival rate of
gastric cancer patients.)

論文審査委員

(主査)	教授	芳村	直樹
(副査)	教授	笹原	正清
(副査)	教授	井村	穰二
(副査)	教授	安田	一朗
(指導教員)	教授	藤井	努

論文内容の要旨

〔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、その高発現は膀胱癌、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。

〔方法並びに成績〕

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⁻チャンネル阻害剤である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。

学位論文審査の要旨

[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、その高発現は膀胱癌、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。

そこで河合俊輔先生は、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ため、以下の研究を行った。

[方法]

(研究1) 富山大学附属病院で2001年から2008年に手術が行われた胃癌107症例の切除標本において抗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。また、胃癌切除標本の非癌部および癌部より、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。

(研究2) ヒト胃癌細胞株(MKN7、MKN74、MKN45、KATOⅢ、NUGC-4)を用いたウェスタンブロットおよびパッチクランプホールセル記録法を用いた電気生理学的解析を行い、各細胞株におけるCLIC3の局在と機能を検討した。

(研究3) 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。

[結 果]

(研究1) 単変量解析では、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。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。

(研究2) ヒト胃癌細胞株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。パッチクランプホールセル記録法を用いた電気生理学的解析では、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⁻チャンネル阻害剤である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、MKN7細胞と同様にCLIC3は原形質膜に局在し、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。

(研究3) 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。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]

今回、河合俊輔先生は、富山大学で手術が行われた胃癌症例の切除標本、ヒト胃癌細胞株を用いた検討により、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、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という新知見を見出した。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、細胞増殖能を亢進させた結果、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のではないかと考察された。本研究は胃癌の悪性度評価に新たな指標を見出す重要な知見を得たという点から、医学における学問的重要性が高く、かつ臨床的発展性も期待できる。以上より本審査委員会は本研究を博士(医学)の学位に十分値するものと結論した。