

論文要旨

大腸がんバイオマーカーとしての CLIC4 に関する研究

令和 5 年度

北海道医療大学大学院薬学研究科

横山 怜央

【序論】 大腸がんは日本で最も発症率の高いがんであり、2020 年における死亡数は男性で第 3 位、女性で第 1 位である。大腸がんは原発臓器に限局する場合 5 年生存率が 97.3%と高く、リンパ節転移や近接臓器への浸潤がある場合 75.3%、遠隔転移を認める場合は 17.3%¹⁾と低くなる。従って、大腸がんの早期発見は患者の生命予後に大きな影響を与える。大腸がんの診断方法には大腸内視鏡検査などの画像診断と生検、スクリーニング検査では便潜血検査、腫瘍の分類や予後予測のためにバイオマーカーが用いられる²⁾。現在利用されているバイオマーカーは腫瘍中のマイクロサテライト不安定性(MSI)や RAS 変異等を検出し、分子標的薬による治療最適化に資する。一方で、早期発見に寄与するバイオマーカーは少ないのが現状である。日本では 40 歳以上を対象として年 1 回の大腸がん検診が定められており、侵襲性が低く死亡率低下³⁾⁴⁾が報告された便潜血検査が行われているが、特異度が低く要精密検査数の増加に繋がるため、身体的および精神的な苦痛を被る可能性がある。

Chloride Intracellular Channel (CLIC) 4 は、接着分子や膜輸送に関わるシグナル伝達に関与し、扁平上皮癌で高発現することが報告されている⁵⁾。また、CLIC4 は TGF- β シグナルの伝達に重要なタンパクであり、TGF- β と CLIC4 は相互にアップレギュレートすることが報告され⁵⁾、CLIC4-TGF- β シグナル伝達は活性酸素種によって惹起され、分化を誘導することが示唆されている⁶⁾。CLIC4 はがん組織においても TGF- β と共発現してがん関連線維芽細胞への分化を促し、がんの進展に寄与する可能性が報告されており⁷⁾、CLIC4 の発現はがんの進行度に影響を及ぼす可能性がある。しかしながら、CLIC4 はがん組織において、がんの進展や転移に関与するものの、大腸がんの各ステージにおける発現変動は知見が少ない。そこで我々は、大腸がんの各ステージにおける CLIC4 の発現量を比較することで、バイオマーカーとしての有用性を検討した。さらに、CLIC4 が及ぼす TGF- β シグナルへの影響について、ヒト大腸がん細胞株を用いた検討を試みた。

【方法】 US Biomax よりヒト大腸正常組織、大腸がん近傍組織、がん組織が含まれた切片 (CO242b, CO243a, CO243b, CO483b) を Santa Cruz Biotechnology より、抗 CLIC4 マウスモノクローナル抗体 Alexa 488 を購入した。組織のパラフィンを除去したのち、抗 CLIC4 抗体と反応させ、核を DAPI 染色し、共焦点顕微鏡により細胞の蛍光を解析した。ヒト大腸がん (腺がん)

由来 DLD-1 細胞の CLIC4 をノックダウンし、TGF- β の発現状況を RT-PCR 法によって定量解析した。

【結果】ヒト大腸組織において、正常組織、大腸がん近傍組織、大腸がん組織を蛍光解析したところ、いずれの組織においても CLIC4 の発現が確認された。各組織において上皮組織より間質で CLIC4 が有意に高発現していた (p-value : 上皮組織 vs 間質; 正常組織 : $1.58 * 10^{-12}$; 大腸がん近傍組織 : $2.02 * 10^{-14}$; がん組織 : 0.00)。また、進行度分類ごとでは、Grade1, T2 (TNM 分類), StageI が各分類において有意に CLIC4 の高発現を認めた (p-value; Grade1 vs 大腸がん近傍組織 : 0.03; T2 vs 大腸がん近傍組織 : 0.01; StageI vs 大腸がん近傍組織 : 0.003)。DLD-1 細胞の CLIC4 をノックダウンした結果、control と比較して TGF- β も有意に抑制された (control 比 siRNA 48h : 0.63 ± 0.02 , 72h : 0.62 ± 0.14 , いずれも $p < 0.05$)。また、CLIC4 のノックダウンにより細胞生存率が減少傾向を示した (control 比 siRNA 48h : $79.65 \pm 27.11\%$, siRNA 72h : $71.04 \pm 32.49\%$)。

【考察】CLIC4 はヒト大腸の正常組織、大腸がん近傍組織、大腸がん組織のいずれにおいても発現が認められ、特に間質において高発現していることが確認された。その発現は各分類における初期 (Grade1, T2, StageI) において有意であることから、初期スクリーニング検査に有用である可能性がある。また、CLIC4 は腫瘍微小環境の形成に関与することが報告されており、本研究においても初期の大腸がんおよび間質で高発現していたことから、予後を推定する指標として有用と考えられた⁸⁾。近年の研究で、線維芽細胞の分化における CLIC4-TGF- β シグナル伝達の役割が明らかになり、CLIC4 の重要性が示唆されている⁹⁾。今回行った DLD-1 細胞を用いた CLIC4 ノックダウン試験の結果、CLIC4 減少に伴った TGF- β の発現減少も確認され、CLIC4 が TGF- β 発現制御に関与していることが推察された。このことから、CLIC4 のノックダウンによる細胞生存率の低下傾向は、TGF- β の有意な減少による影響と考えられ、CLIC4 は TGF- β シグナルを介して、大腸がんの進展や悪性化に関与していることが予想された。以上の結果より、CLIC4 は大腸がんの初期スクリーニングにバイオマーカーとして有用である可能性に加えて、大腸がんの化学療法における新規標的分子としての有用性も考えられた。

【文献】

- 1) 国立がん研究センター がん統計.
- 2) 大腸がん検診マニュアル 2021 年度改訂版.
- 3) Saito, H. *et al.* (2000) *Oncol. Rep.*, **7**, 815-9.
- 4) Lee, K. J. *et al.* (2007) *Cancer. Detect. Prev.*, **31**, 3-11.
- 5) Suh, K. S. *et al.* (2012) *Carcinogenesis*, **33**, 986-95.
- 6) Yao, Q. *et al.* (2009) *Oncol. Rep.*, **22**, 541-8.
- 7) Shukla, A. *et al.* (2009) *Nat. Cell. Biol.*, **11**, 777-84.
- 8) Yokoyama, R. *et al.* (2021) *In Vivo*, **35**(6), 3165-73.

9) Wasson, C. W. *et al.* (2022) *Cells*, 11(3), 530.