

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

SUMMARY

Colorectal cancer (CRC) is the most common cancer in Japan, and was responsible for the third highest number of deaths for men and the first for women in 2020. The 5-year survival rate is 97.3% for CRC in the primary organ, 75.3% for those with lymph node metastasis, and 17.3% for those with distant metastasis. Although early detection of CRC greatly affects the patient's life prognosis, there are few biomarkers for early detection. Chloride intracellular channel (CLIC) 4 is involved in adhesion and membrane transport, and is highly expressed in tumors. Furthermore, CLIC4 is an important protein for TGF- β signaling, and both TGF- β and CLIC4 mutually upregulate. CLIC4 expression influences cancer progression and metastasis, but little is known about its changes in expression by CRC staging. In this study, we investigated the usefulness of CLIC4 as a biomarker for CRC staging and examined the effect of CLIC4 on TGF- β signaling using human colon cancer cell lines. Immunofluorescence analysis using sections containing normal human colon, normal adjacent to tumor (NAT) and cancer tissue. In each tissue, CLIC4 was significantly more expressed in the stroma than in the epithelial tissue. Furthermore, regarding each staging classification, Grade 1, T2 (TNM classification), and stage I showed significantly higher CLIC4 expression in each

classification. DsiRNA-mediated knockdown of CLIC4 in DLD-1 human colorectal cancer cells significantly suppressed TGF- β compared to the control. In addition, the cell viability rate tended to decrease under CLIC4-knockdown conditions. CLIC4 was expressed in normal, NAT and tumor tissues from the human colon, and was particularly highly expressed in the stroma. Its expression was significantly higher in the early stages of each classification (Grade 1, T2, Stage I), suggesting that it is useful as a CRC screening test. CLIC4 is involved in the formation of the tumor microenvironment. In this study, CLIC4 was highly expressed in early CRC and the stroma, indicating that it may be useful for estimating prognosis. In recent years, the role of CLIC4-TGF- β signaling in fibroblast differentiation has been revealed. As a result of CLIC4 knockdown in DLD-1 cells, decreased expression of TGF- β was shown, suggesting that CLIC4 is involved in regulating TGF- β expression. Therefore, the tendency for cell viability to decrease with CLIC4 knockdown may be influenced by a significant decrease in TGF- β , and the progression and malignancy of CRC may be affected through CLIC4-TGF- β signaling. Taken together, CLIC4 is suggested to be useful as a biomarker for initial screening for CRC and as a new target for chemotherapy in CRC.

略語集

本文では，以下の略語を使用した．

α -SMA : α -Smooth Muscle Actin, α 平滑筋アクチン

BSA : Bovine Serum Albumin, ウシ血清アルブミン

BMP : Bone Morphogenetic Protein, 骨形成タンパク質

CA19-9 : Carbohydrate Antigen 19-9, 糖鎖抗原 19-9

CEA : Carcinoembryonic Antigen, がん胎児性抗原

CLIC4 : Chloride Intracellular Channel 4, 細胞内塩素チャネル 4

CT : Computed Tomography, コンピュータ断層撮影

DAPI : 4',6-diamidino-2- phenylindole

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO : Dimethyl Sulfoxide

dsRNA : dicer-substrate short interfering RNA, dicer 基質低分子 2 本鎖 RNA

EDTA : Ethylenediamine tetraacetic acid, エチレンジアミン四酢酸

EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor, 上皮増殖因子受容体

Erp29 : Endoplasmic Reticulum Protein 29

FBS : Fetal Bovine Serum, ウシ胎児血清

GAPDH : glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, グリセルアルデヒド 3-

リン酸デヒドロゲナーゼ

KRAS : v-Ki-ras2 Kirsten Rat Sarcoma viral oncogene, KRAS がん遺伝子

MRI : Magnetic Resonance Imaging, 核磁気共鳴画像

MSI : Microsatellite Instability, マイクロサテライト不安定性

NAT : Normal Adjacent to Tumor, がん近傍組織

NC : Negative Control

p-Smad : Phospho-Smad, リン酸化 smad

PCR : Polymerase Chain Reaction

PET : Positron Emission Tomography, 陽電子放出断層撮影

RAS : Rat Sarcoma, RAS がん遺伝子

RT-PCR : Reverse Transcription PCR

Smac/DIABLO : Second Mitochondria-derived Activator of Caspases

TBST : Tris-Buffered Saline with Tween 20

TGF- β : Transforming Growth Factor β , トランスフォーミング増殖因子

Tm : melting Temperature

TNM : T (Tumor) N(Lymph Node) M(metastasis) staging system

VEGF : vascular endothelial growth factor, 血管内皮細胞増殖因子

目次

序論	1
第 1 章 がん間質における CLIC4 の発現	6
第 1 節 緒言	6
第 1 項 CLIC4 の役割	6
第 2 項 腫瘍微小環境の機能	7
第 3 項 大腸がんにおける CLIC4	7
第 4 項 大腸がん近傍組織	8
第 2 節 実験材料および実験方法.....	9
第 1 項 ヒト大腸がん切片	9
第 2 項 蛍光免疫染色イメージング	10
第 3 節 結果	11
第 4 節 考察	15
第 5 節 小括	16
第 2 章 がん上皮の進行度による CLIC4 の発現	17
第 1 節 緒言	17
第 2 節 実験材料および実験方法.....	20
第 3 節 結果	20
第 4 節 考察	25
第 5 節 小括	26
第 3 章 がん間質の進行度による CLIC4 の発現	27
第 1 節 緒言	27

第2節 実験材料および実験方法.....	27
第3節 結果.....	28
第4節 考察.....	32
第5節 小括.....	33
第4章 CLIC4 と TGF-β の関連性.....	34
第1節 緒言.....	34
第2節 実験材料および実験方法.....	35
第1項 細胞培養.....	35
第2項 RT-PCR 及び Real time PCR 条件.....	35
第3項 ノックダウン条件.....	38
第4項 ウェスタンブロット.....	38
第5項 細胞生存率の測定.....	40
第6項 統計学的解析.....	40
第3節 結果.....	40
第4節 考察.....	43
第5節 小括.....	44
第5章 総括.....	47
謝辞.....	51
引用文献.....	52

序論

大腸がんは 2022 年現在世界で 4 番目に罹患率の高いがんであり，日本では最も罹患率の高いがんである．大腸がんの原発部位は盲腸，結腸，S 状結腸，直腸の 4 つに分かれており，結腸における罹患率が最も高く，続いて盲腸，直腸，S 状結腸移行部である．¹⁾

大腸がん発症の危険因子として主なものは年齢であり，50 歳を超えると発症リスクが著しく増大することが報告されている．²⁾ また，慢性疾患の病歴によってもリスクは増大し，潰瘍性大腸炎患者では有病率が 3.7%であり，疾患の期間が長くなるにつれて上昇する．³⁾ クローン病患者では健常者と比較して 2.5 倍発症リスクが高く，結腸が主な部位の場合は 4.5 倍，回腸の場合は 1.1 倍であり，主たる病変部位によって大腸がんの発症リスクは変化する．⁴⁾ 食習慣や運動習慣といったライフスタイルも発症に寄与しており，喫煙やアルコールの摂取，座り姿勢の多さによってリスクが高くなることが示唆されている．⁵⁻⁷⁾ 一方でライフスタイルの改善でリスクを低下させることができ，野菜の摂取や身体活動の向上が推奨される．近年，腸内細菌叢の変化も大腸がん発症リスクの一つとして注目されており，赤身肉や脂肪が多い食事を摂取し続けることで有害な細菌が増加する一方で，食物繊維が豊富な食事を摂取することで腸内細菌叢を正常化し大腸がんのリスクを低下させる可能性が示唆されている．⁸⁾

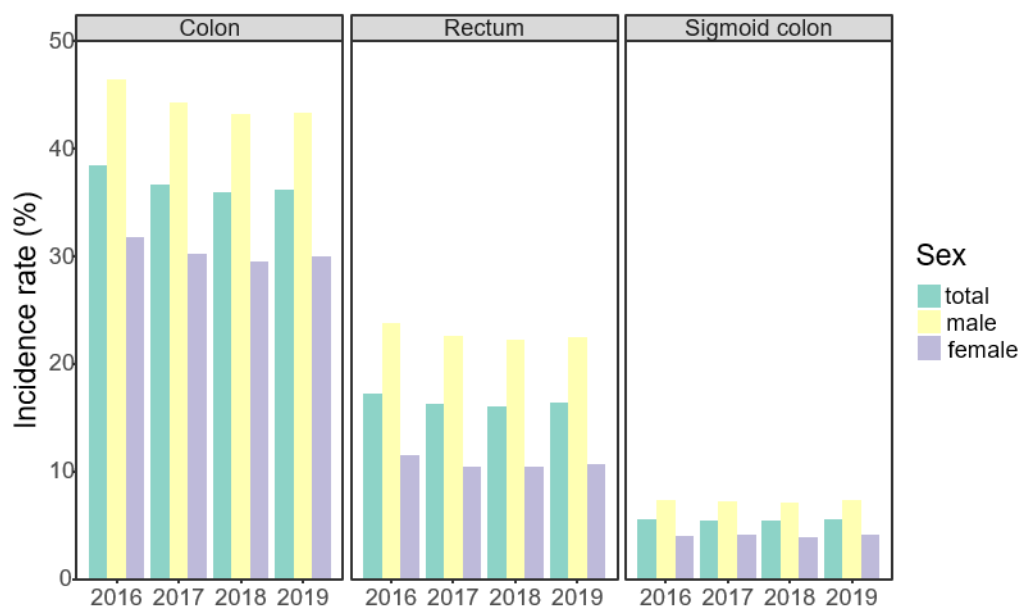


Fig. 1. Colorectal Cancer Incidence Rate

The colorectal cancer incidence rates were investigated in 2016, 2017, 2018 and 2019, in Japan. These rates were classified by primary sites including the Colon, Rectum and Sigmoid colon.

大腸がんの罹患率は部位別にみると、2019年の統計において結腸、盲腸、直腸 S 状結腸移行部で 36.2%、16.4%、5.6%であり、大腸がんの罹患率の推移は近年横ばいで減少傾向は見られない (Fig. 1)。大腸がんの死亡数は、2021 年、男性では肺がんに次ぐ第二位であり、女性では第一位である。その死亡割合は全がんのうち 13.7%と非常に高い。⁹⁾ 1960 年来の統計によると、男女ともに死亡数は増え続けており、今後も横ばいあるいは増加する可能性がある。また、死亡数は 40 歳以上から高くなりはじめて高齢になるほど高くなる。さらに、近年の統計によると、男女ともに罹患数は横ばいとなっており、年齢階級では 30 歳以上から増加し、高齢になるほど罹患率が高くなる。したがって、加齢がリスクファクターとなる大腸がんにおいて、サーベイランスを早い段階から行うことは重要である。5 年生存率は、発現部位にとどまる限局、所属リンパ節転移や隣接臓器への浸潤を認める領域浸潤、遠隔リンパ節や遠隔臓器に転移を認める遠隔転移の 3 つにおいて、そ

れぞれ 97.3%, 75.3%, 17.3%である。⁹⁾ 大腸がんは早期において 5 年生存率が高く、リンパ節転移や浸潤と進行するにつれて低下しており、進行の初期で発見することは 5 年生存率を高めるうえで重要である。

現在、日本では 40 歳以上に対して年 1 回の大腸がん検診が行われている。スクリーニング検査では免疫便潜血検査 2 日法が行われており、2 日間のうち 1 日でも陽性であれば精密検査を推奨される。便潜血検査は侵襲性が低く、血液に対する感度がよいため微小の血液を検出することが可能である。また、便潜血検査を行うことにより大腸がんによる死亡率を低下することが報告されている。^{10,11)} 精密検査による診断では大腸内視鏡検査が第一選択となっており、大腸内視鏡検査が困難な場合は、S 状結腸内視鏡検査および注腸 X 線検査が実施される。また、大腸 CT 検査も精密検査時に利用されており、がん検診実施指針に記載されていないものの、大腸がん検診精度管理委員会では精密検査法として推奨されている。¹²⁾ 大腸内視鏡検査を実施するには腸管洗浄剤が必要であり、患者が苦痛を感じることも多い。CT、注腸 X 線検査では放射線被ばくによる侵襲もある。これら身体的苦痛のほか、検査時の恥ずかしさや忌避感といった精神的苦痛を訴えることも多い。患者にとって侵襲性の低い検査法を検討することは非常に重要であり、近年ではリキッドバイオプシーやがんマーカーの研究が盛んである¹³⁾。さらに、大腸がんの診断方法では大腸カプセル内視鏡検査¹⁴⁾、MRI 検査¹⁵⁾、PET 検査¹⁶⁾が行われることもある。ただし、カプセル内視鏡検査では事前にダミーカプセルを飲んで排泄されることを確かめる必要があるほか、大量の腸管洗浄剤が必要となる。MRI 検査は CT よりも組織分解能に優れるものの、撮像時間が長く、広い範囲には不向きである。また、PET 検査は多臓器を同時にスクリーニング可能なものの、コストが高いことに加え、放射線被ばくによる侵襲性がある。ほかにも便中がん遺伝子検査やリキッドバイオプシーの検討も行われているが、いずれの検査法も有効性が示されておらず、精度が不安定であることから実現されていない。このようにいずれの診断方法も患者にとっての不利益があり、また、低侵襲で有効な検査法は

ない。¹⁷⁾

大腸がんバイオマーカーでは CA19-9 や CEA, 腫瘍中のマイクロサテライト不安定性(MSI)や KRAS 変異等が用いられている。いずれも診断法としては用いられず, CA19-9 と CEA は予後や転移, 治療効果の指標として用いられる罹患後のマーカーであり,^{18,19)} MSI や RAS 変異はそれぞれペムブロリズマブ²⁰⁾やセツキシマブ²¹⁾, パニツムマブ²²⁾といった医薬品の使用可否を調べるための個別化医療のマーカーとして利用されている。²³⁻²⁵⁾ このように, 罹患後および個別化医療のマーカーは利用されているものの, 大腸がんの早期発見で用いられているバイオマーカーは未だなく, 新規のマーカー分子を提案することが重要である。そこで, 本研究において大腸がん細胞に発現し, がんの進行に関連する細胞内塩素チャネル 4 (CLIC4, Chloride Intracellular Channel 4) に着目し, 大腸がんバイオマーカーとして利用可能かどうか検討した。

CLIC4 は細胞内塩素チャネル(Chloride Intracellular Channel)ファミリーの 1 種であり, CLIC1 から CLIC4, CLIC5A, 5B, CLIC6 のサブタイプが存在する。これらファミリーの中でも CLIC1 と CLIC4 ががんに関連することが報告されており,²⁶⁾ CLIC4 は大腸がんや胃がん, 腎がん, 乳がん等に高発現している。また, 特になんがん細胞では CLIC4 の発現に伴って, がんの進展に影響することが報告されている。²⁷⁾ これまで, CLIC4 は大腸がん細胞とその周囲を含めた大腸がん組織に高発現していることが報告されている。

²⁸⁾ しかしながら, CLIC4 の発現を上皮組織や間質など, 大腸がんの部位, 細胞に分けて調べた知見はない。したがって, 第一章では CLIC4 がヒト大腸正常組織, 大腸がん近傍組織, 大腸がん組織に発現しているかどうか, 第二章では大腸がんの各進行度分類ごとにがん組織での CLIC4 の発現状況

を，第三章ではがん間質での CLIC4 の発現状況を，第四章では CLIC4 のがん細胞に対する影響を追究した．

第1章 がん間質における CLIC4 の発現

第1節 緒言

第1項 CLIC4 の役割

CLIC4 は可溶化した状態で細胞質や核内に存在するとともに、膜貫通構造を形成することで細胞膜や細胞内小器官等の様々な場所にも存在しており、線維芽細胞や周皮細胞、免疫細胞といった様々な細胞に発現していることが知られている。²⁹⁾ また、正常の細胞だけでなくがん細胞でも発現しており、大腸がん細胞に高発現している。²⁸⁾ CLIC4 は大腸がん組織において、がん細胞だけでなく間質細胞においても多く発現しており、間質細胞の分化や酸化ストレス等に関与することが報告されている。²⁹⁾ CLIC4 はほかに液胞の酸性化や血管新生に関与することが報告されており、CLIC4 は腫瘍微小環境に影響する可能性がある。³⁰⁻³³⁾ CLIC4 は細胞内塩素チャンネルと呼ばれているがイオンチャンネルとしての役割は明らかではない。CLIC4 が関連タンパク質のシグナル伝達を制御する機序は不明であるものの、リン酸化 smad を介した TGF- β (Transforming growth factor β) シグナル伝達^{34,35)}、インテグリンを介した細胞接着の制御^{36,37)}、細胞骨格の形成に関与していることが知られている。^{38,39)} CLIC4 の発現はこれらシグナル伝達に重要であり、細胞恒常性に寄与している。⁴⁰⁾

そこで、本研究において、大腸がんを高発現しておりがんの進展や細胞恒常性に寄与することが報告されている CLIC4 のバイオマーカーとしての有用性について検討した。

第2項 腫瘍微小環境の機能

がん組織は単にがん細胞で構成されたグループではなく、ほかの多くの細胞が動員されており、浸潤細胞や常在細胞、サイトカイン、細胞外マトリックスを含む組織である。この組織に含まれているがん細胞とそれを取り巻く環境による相互作用で形成された組織を腫瘍微小環境と呼び、腫瘍微小環境の構成は腫瘍の種類によって異なる。腫瘍微小環境には線維芽細胞、周皮細胞、脂肪細胞、免疫細胞⁴¹⁾ 等の間質細胞や血管、リンパ管が含まれており、がんを支える支持組織として働くほか、栄養や酸素を供給する役割を果たし、がん組織と相互に干渉している。⁴²⁾ 大腸がんのような一部のがんでは前がん状態に炎症があり、腫瘍微小環境における炎症により腫瘍の発生が促進される。⁴³⁾ また、腫瘍微小環境はがんの転移にも重要であり、支持組織や血管移行を利用した転移の促進、それに伴うマクロファージや内皮細胞等の動員を行う。⁴⁴⁾ このようにがん細胞と腫瘍微小環境は互いにシグナル伝達を行うことでがんの進展や転移に寄与することが知られている。^{45,46)} 近年では腫瘍微小環境をターゲットとした創薬も盛んであり、代表的なものに VEGF を標的としたベバシズマブや VEGF 受容体を標的としたラムシルマブがあげられる。⁴⁷⁾

第3項 大腸がんにおける CLIC4

CLIC4 は大腸がんの上皮と間質の両方に発現しており、がん細胞のアポトーシス制御や進展、転移に寄与することが示唆されている。がん細胞と間質の共培養により多くの腫瘍上皮で核内 CLIC4 は発現が低下し、間質で高発現することが報告されており、特に大腸がんでは腫瘍細胞の総 CLIC4 は進行とともに発現が低下し、間質では徐々に発現が増加することが明ら

かとなっている。²⁸⁾ したがって、CLIC4は大腸がんのバイオマーカーとして有用な可能性がある。大腸がんにおける転移性のがん幹様細胞では、CLIC4, Erp29, Smac/DIABLOのタンパクを組み合わせたパネルテストにより、大腸がん切除患者の予後リスクを危険度別に階層化することができたものの、CLIC4が大腸がんの診断バイオマーカーとして利用可能かは知見が乏しい。⁴⁸⁾ そこで、本研究ではヒト大腸正常組織とヒト大腸がん組織を用いて、腫瘍上皮および間質のCLIC4発現様式を検証した。

第4項 大腸がん近傍組織

本研究では、大腸の正常組織、大腸がん近傍組織 (NAT, Normal adjacent to tumor)、大腸がん組織について検討した。NATは、大腸がん隣接する正常組織であり、がん研究におけるコントロールとしてよく用いられている (Fig. 2)。NATには上皮細胞のほか免疫細胞や線維芽細胞といった間質細胞も含まれている。ただし、その細胞構成は健康な組織及び腫瘍とも異なっており、NATは正常組織と分類されるが、がん組織ではないものの正常とも言えず、前がん状態の場合もある。⁴⁹⁾ この組織はがん組織と同様に炎症や線維化に関与しており、がん組織と互いにシグナル伝達を行っている。また、大腸幹細胞を刺激してがん化を促進する。大腸がんは完全に切除を行った後も再び発生することがあり、NATによるがんの再発である可能性が示唆されている。⁵⁰⁾ そこで、我々は大腸がん組織だけでなく、大腸がん近傍組織にも注目し、CLIC4の発現を調査した。

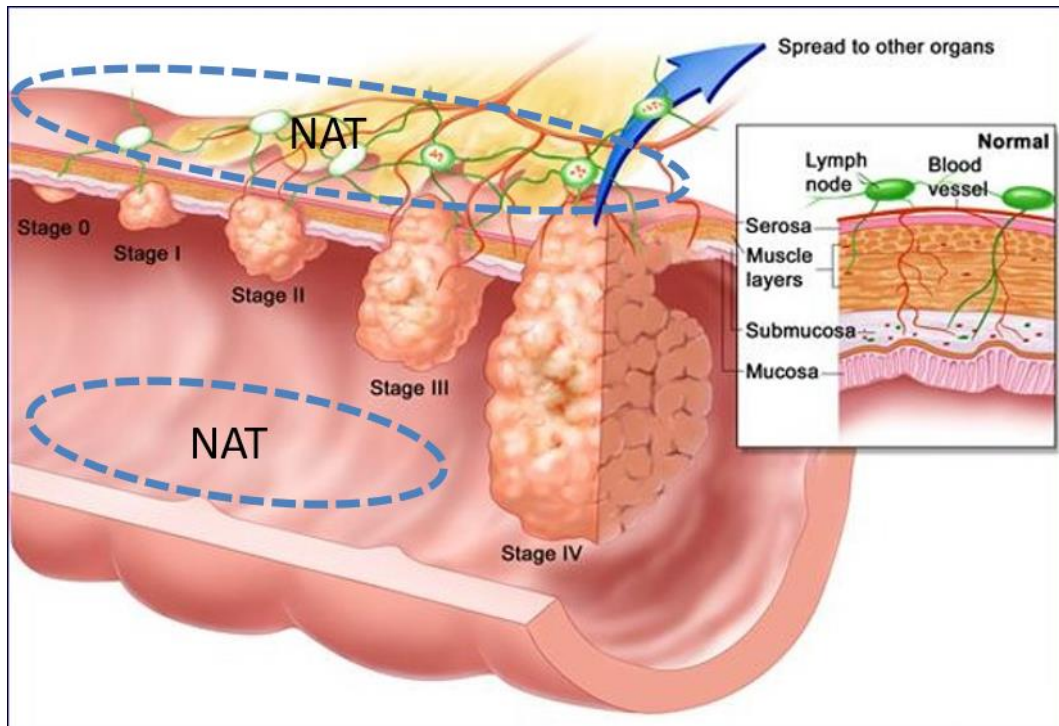


Fig. 2. Colorectal cancer tissue

Figure was cited from National Institutes of Health "Stages of colorectal cancer" ⁵¹⁾ and partially modified by the author.

第 2 節 実験材料および実験方法

第 1 項 ヒト大腸がん切片

抗 CLIC4 マウスモノクローナル抗体 Alexa Fluor 488 を Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) から購入した。牛血清アルブミン (BSA) は Nacalai Tesque (Kyoto, Japan) から購入した。ProLong Gold Antifade reagent with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) は Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) から購入した。

ヒト大腸がん組織を Biomax (Rockville, MD, USA) より購入した。購入された切片は CO242b, CO243a, CO243b, CO483b として販売されているものである。これらの切片は患者情報が完全匿名化処理されており、個人情報保

護法の対象外である。CRC 患者（またはその親族）より得たインフォームドコンセントに関する文書は (<http://www.biomax.us/tissue-arrays/Colon.>) へ問合せることによって入手可能である。切片には年齢や性別, 原発部位, 病理診断, TNM 分類, Grade 分類, Stage 分類といった情報が付加されている。切片のうち, 大腸がんは 79 例あり, 正常組織は 18 例, NAT は 15 例である。

第 2 項 蛍光免疫染色イメージング

パラフィン包埋切片をキシレンでパラフィン除去したのち, 無水エタノール, 95% エタノール, 蒸留水の順で洗浄した。さらに, 組織に 1 mM EDTA バッファ (pH 9.0) を添加し, 95 °C で 20 分インキュベートし, 蒸留水および TBS で洗浄した。5%BSA/TBST を添加し, 室温にて 1 時間インキュベート後, 4 °C で 20 分間インキュベートした。抗 CLIC4 抗体を 5%BSA/TBST で希釈して 2% とし, 組織に添加後, 4 °C で 1 日インキュベートした。さらに, TBST および PBS で洗浄し, DAPI を添加した。蛍光免疫染色画像は共焦点顕微鏡 (Nikon TE2000) で撮影した。撮影した画像を ImageJ で解析し, Student t 検定を行った。有意水準は ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ とした。

第3節 結果

CLIC4 はヒト大腸がんのいずれの Stage においても発現しており， Stage I と Stage IIIc を比較したところ，上皮組織での CLIC4 発現が減少していることが示された (Fig. 3). 一方，どちらの Stage でも間質における CLIC4 は高発現していた．大腸がん近傍組織と通常組織のいずれにおいても，上皮組織および間質組織の両方で CLIC4 が発現していた (Fig. 4). 大腸がん，近傍組織，通常組織のいずれであっても CLIC4 は発現しており，がんの発現に関わらず大腸組織に広く発現していた．

染色画像における CLIC4 の発現を 1 mm^2 あたりの細胞数で解析したところ，いずれのグループにおいても間質で有意に高発現していた (Fig. 5). 陰窩と比較すると 7.6 倍 ~ 25.3 倍に上昇していた．さらに，NAT とがん組織を比較すると，NAT の間質では有意に CLIC4 の発現が高かった．

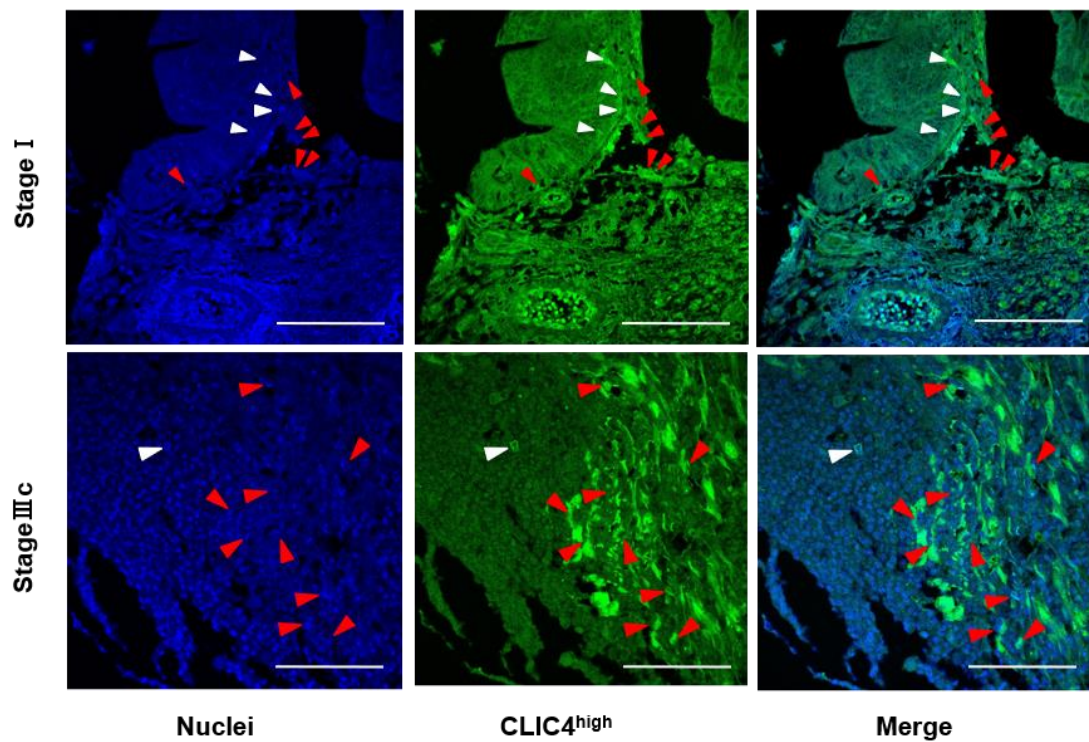


Fig. 3. Detection of CLIC4^{high} Cells in the Human Colorectal Tissue with Stage I and Stage IIIc

The nuclei (blue fluorescence) and CLIC4 (green fluorescence) were observed by confocal microscopy. White arrow heads in malignant epithelial cells, and red arrow heads in stromal cells show the cells with high expression of CLIC4 (CLIC4^{high}). White bars are 100 μm. Tissues that showed fluorescence other than the arrows were interstitial tissues such as blood vessels, lymph vessels, fibroblasts, and pericytes.

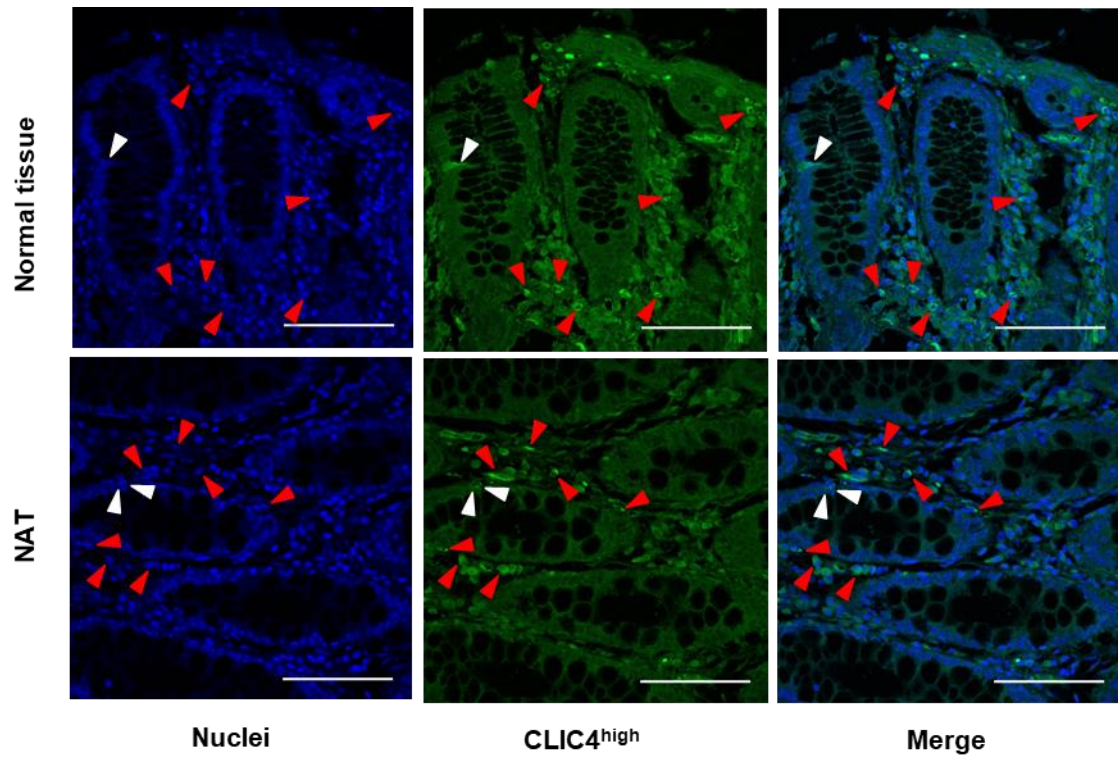


Fig. 4. Detection of CLIC4^{high} Cells in the Human Colorectal Tissue with the Normal Tissue and NAT

The nuclei (blue fluorescence) and CLIC4 (green fluorescence) were observed by confocal microscopy. White arrow heads in normal crypt cells, and red arrow heads in stromal cells show the cells with high expression of CLIC4 (CLIC4^{high}). White bars are 100 μm .

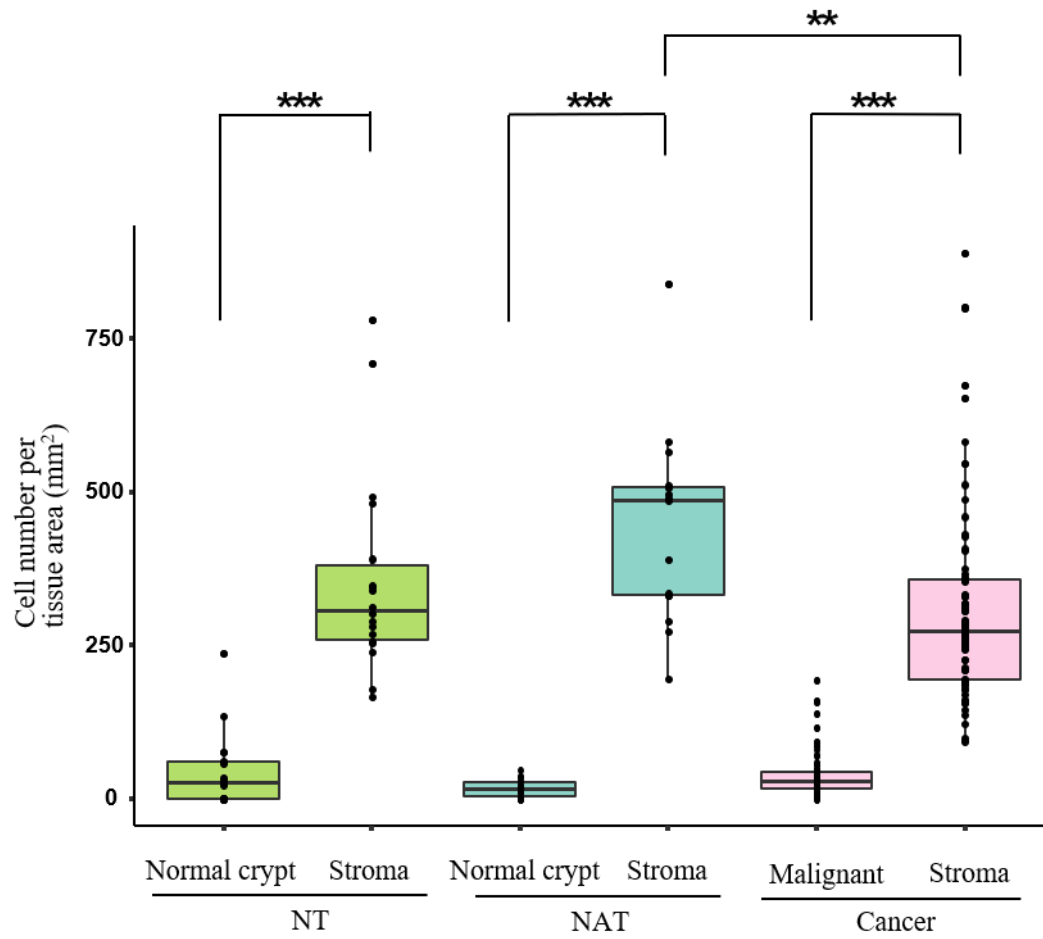


Fig. 5. The Different Number of CLIC4^{high} Cells in Normal and Malignant Tissue

The number of CLIC4^{high} cells per tissue area (mm²) were measured in normal colorectal tissue (NT), cancer adjacent normal colorectal tissue (NAT) and cancer, and shown in both epithelial area (normal crypt or malignant area) and stroma area.

Mean \pm SE (n=15-79). ** p <0.01, *** p <0.001.

第4節 考察

CLIC4 は細胞膜や細胞質，核内等に発現していることが知られており，⁴⁰⁾ ヒト大腸組織の細胞において細胞膜や核内，細胞全体に蛍光が観察された。また，ヒト大腸上皮および間質に発現し，特に間質に多く発現していた。これまで，大腸がん細胞に CLIC4 が高発現しており，間質にも高発現することが動物実験により報告されていた。²⁸⁾ しかしながら，ヒト大腸がん組織での報告はなく，本研究によりヒト大腸組織でも同様の傾向が明らかとなった。したがって，CLIC4 は間質でより腫瘍微小環境の形成やがんの発生，転移に関与している可能性がある。また，大腸がんの進行度分類で比較したところ，Stage Iでは Stage IIIc よりも上皮細胞での CLIC4 発現が多く確認され，進行度により発現が異なる可能性が考えられた。CLIC4 の発現が進行度に依存するならば進行度，予後予測のマーカーとして利用できる可能性がある。また，初期において特異的に高発現する場合，大腸がんのスクリーニングでバイオマーカーとして利用できる可能性がある。既報では大腸がんの初期で CLIC4 の発現が高く，腫瘍の進行とともに発現が低下することが明らかとなっており，²⁸⁾ ヒト大腸組織では報告がないため，本研究第2章において，進行度による上皮での CLIC4 の発現状況について調査した。さらに，大腸がん患者の組織では，がん組織中よりも近傍組織における間質での CLIC4 発現が有意に高かったことから，がん組織だけでなく，がん近傍組織へ CLIC4 が影響している可能性が考えられた。NAT はがん組織と相互に干渉しており，炎症や繊維化を誘導するとともに，がんの進展に関与している。⁵⁰⁾ CLIC4 は NAT での発現が高く，これら作用を促進する可能性がある。そこで，本研究第3章において，進行度による間質での CLIC4 の発現状況について調査した。

第5節 小括

CLIC4 はヒト大腸組織において間質に多く発現していた。大腸がん患者の組織では、がん組織中よりも近傍組織における間質での CLIC4 発現が有意に高かった。したがって、がん組織だけでなくがん近傍組織へ CLIC4 が影響している可能性が示唆された (Fig. 6)。がん組織の進行度による発現を調査し、CLIC4 ががん組織の進展に寄与する可能性について検討する必要がある。

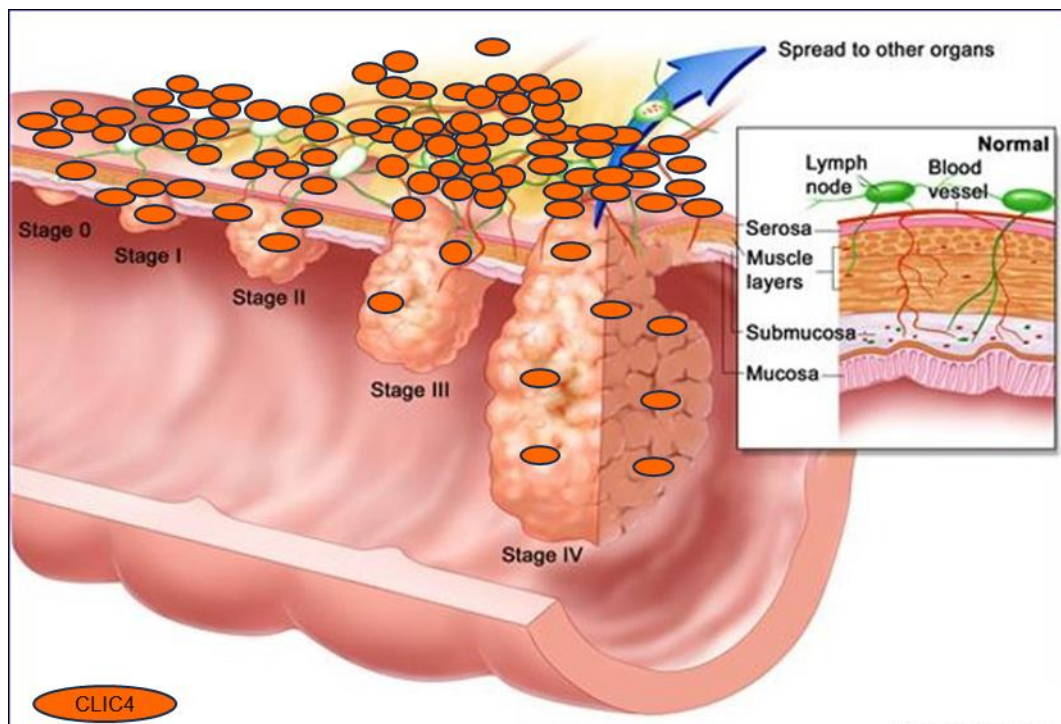


Fig. 6. CLIC4 is abundant in cancer stroma

Figure was cited from National Institutes of Health "Stages of colorectal cancer" ⁵¹⁾ and partially modified by the author.

第2章 がん上皮の進行度による CLIC4 の発現

第1節 緒言

大腸がんの分類法で広く知られているものは4種類あり、Duke's 分類、Stage 分類、TNM 分類、Grade 分類があげられる (Table 1). Duke's 分類は古くから使われてきた分類法で簡便であるが、リンパ節転移や腫瘍等の病理学的特徴が含まれていない。そのため評価者によって診断が異なる場合があり、再現性が低く現在では用いられていない。⁵²⁾ 近年では TNM 分類が国際的に使われる分類法であるためよく用いられている。ただし、非解剖学的な要素が加味されていないため、これを加味した修正分類法が期待されている。⁵³⁾ 日本では TNM 分類をもとに評価する Stage 分類が使われているが、診断における国際規約では使用されていない。Stage および TNM 分類はがんの深度(T: Tumor)、リンパ節転移(N: lymph Node)、遠隔転移(M: Metastasis)で評価し、Stage においては大腸粘膜内にとどまるものを Stage 0、固有筋層までにとどまるものを Stage I、漿膜下層を超えたもの、漿膜を超えたもの、外膜を超えたものをそれぞれ Stage IIa, IIb, IIc, としている。これらのうちリンパ節転移したものを複合的に判断して、Stage IIIa, IIIb, IIIc と評価し、遠隔転移したものを Stage IV としている。T はがんの深度を評価し、T0 はがんを認めない状態である。T1 はがんが粘膜下層に達しているが固有筋層に至っておらず、T2 は固有筋層まで浸潤、T3 は固有筋層を超えて浸潤、T4a はがんが漿膜表面に接しているかこれを破って腹腔に露出しているものであり、T4b はがんが他臓器に転移したものである。N はリンパ節転移を評価し、N0 はリンパ節転移を認めない状態である。N1 は腸管傍リンパ節と中間リンパ節の転移総数が3個以下、N2 は4個以上、N3 は主リンパ

節に転移を認めるものである。Mは遠隔転移を評価し、M0は遠隔転移を認めず、M1は遠隔転移を認める状態である。Grade分類は転移等の予後リスクを評価するために用いられ、他の分類法と併用することで効果的なリスク検討が行われる。Grade分類は浸潤性のがんの個数で評価し、0から4個であればGrade 1、5から9個であればGrade 2、10個以上あればGrade 3とする方法である。⁵⁴⁾ しかしながら、客観的に評価することは難しく、大腸がん治療の予後予測としても不十分であることが指摘されている。^{55,56)}

CLIC4は大腸がんにおいて高発現することが報告されているが、ヒト大腸組織において進行度分類ごとに発現を調べた報告はない。したがって、先述の進行度分類法に基づき、CLIC4の発現を解析した。

Table 1. Classification of TNM, Stage and Grade

TNM 分類				
深度(T)				
T0	がんと認めない。			
T1	がんが粘膜下層までにとどまり、固有筋層に及ばない。			
T2	がんが固有筋層まで浸潤している。			
T3	がんが固有筋層を超えて浸潤している。			
T4	がんが漿膜表面に接する、腹腔に露出する、または直接他臓器に浸潤している。			
リンパ節転移(N)				
N0	リンパ節転移を認めない。			
N1	腸管傍リンパ節と中間リンパ節の転移総数が 3 個以下			
N2	腸管傍リンパ節と中間リンパ節の転移総数が 4 個以上			
N3	主リンパ節に転移を認める。下部直腸がんでは主リンパ節または側方リンパ節に転移を認める。			
遠隔転移(M)				
M0	遠隔転移を認めない。			
M1	遠隔転移を認める。			
Stage 分類				
Stage I	T1/2N0M0			
Stage II a	T3N0M0			
Stage II b/c	T4N0M0			
Stage III a	T1N1/2M0	T2N2M0		
Stage III b	T1N2M0	T2N2M0	T3N1/2M0	T4N1M0

Stage IIIc	T3N2M0	T4N1/2M0
Stage IVa/b/c	T1-4N0-2/M1	

Grade 分類	がん発育先進部間質に浸潤性に存在する 1 個または 5 個未満の構成細胞からなる癌胞巣の個数
Grade1	0-4 個
Grade2	5-9 個
Grade3	10 個以上

第 2 節 実験材料および実験方法

第 1 章で撮影したヒト大腸がん切片の蛍光画像を ImageJ で解析し、大腸上皮組織の 1 mm² における CLIC4 発現細胞を定量した。Tukey-Kramer test を行い、有意水準は * p < 0.05, ** p < 0.01 とした。

第 3 節 結果

最初に、TNM 分類における CLIC4 の発現を調べたところ、深度 T で比較した場合、NAT と比べて T2 では 4.2 倍有意に上昇した。また、T4 では T2 と比較して 0.42 倍であり、有意な差が観察された (Fig. 7A)。リンパ節転移 N について比較したところ N0 で増加傾向が見られるものの、統計学的な有意差は観察されなかった (Fig. 7B)。ただし、N0 と比較して N1, N2 は低下傾向であった。

次に Stage 分類における CLIC4 の発現状況を調べたところ、Stage I は NAT と比較して有意に上昇していた。さらに、I と比較すると IIb, IIIb で有意に低下していた。IIa, IIIc はばらつきが大きく、有意差は観察されなかつ

たが低下傾向は確認された (Fig. 8).

最後に Grade 分類における CLIC4 の発現状況を調べたところ, Grade1 で NAT と 比較して有意に高発現していた. しかしながら, Stage 分類等と比較した場合, その差は小さかった (Fig. 9).

以上のことから, CLIC4 の発現が早期において上昇し, 進行するにつれて低下傾向であった. とくに, がんの深度である T および Stage 分類において顕著に観察された.

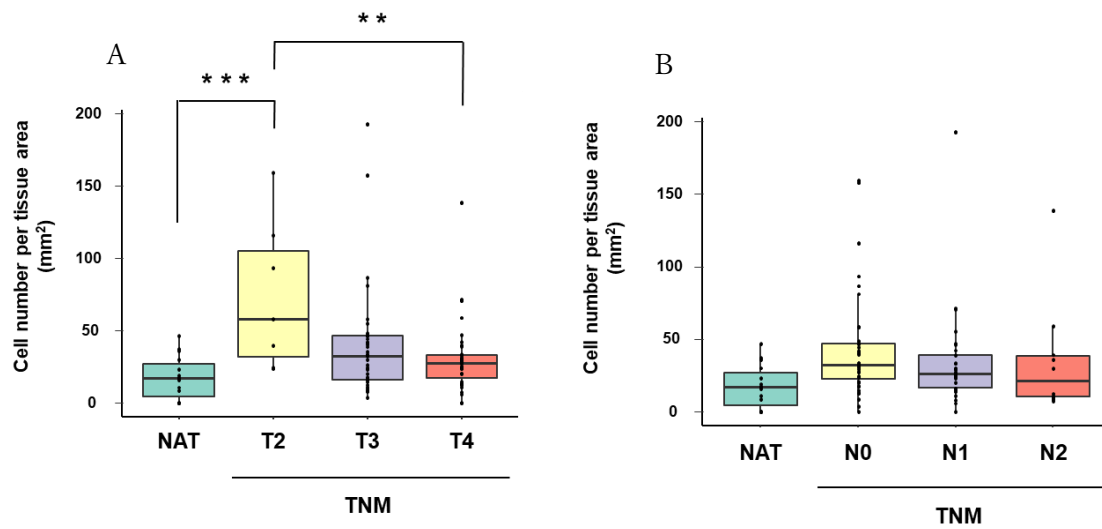


Fig. 7. The Different Number of CLIC4^{high} Cells in Epithelial Area with TNM Staging

The number of CLIC4^{high} cells per malignant epithelial tissue area (mm²) were estimated by each (A) tumor stage (T2, T3 and T4) and (B) node stage (N0, N1 and N2) using tumor, node, metastasis (TNM) classification. NAT, cancer adjacent normal colorectal tissue. Mean \pm SE. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

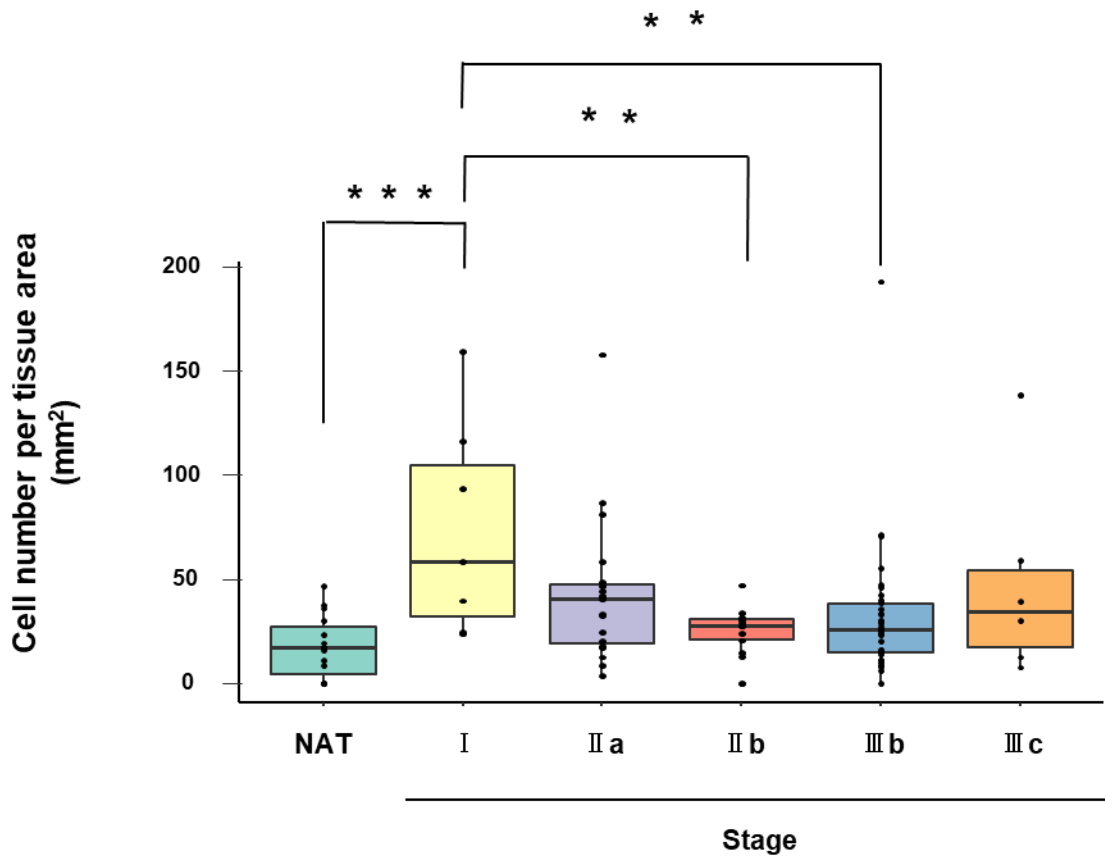


Fig. 8. The Different Number of CLIC4^{high} Cells in Epithelial Area with Stage Diagnosis

The number of CLIC4^{high} cells per malignant epithelial tissue area (mm²) were estimated by cancer stage (I, IIa, IIb, IIIb and IIIc). NAT, cancer adjacent normal colorectal tissue. Mean ± SE. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

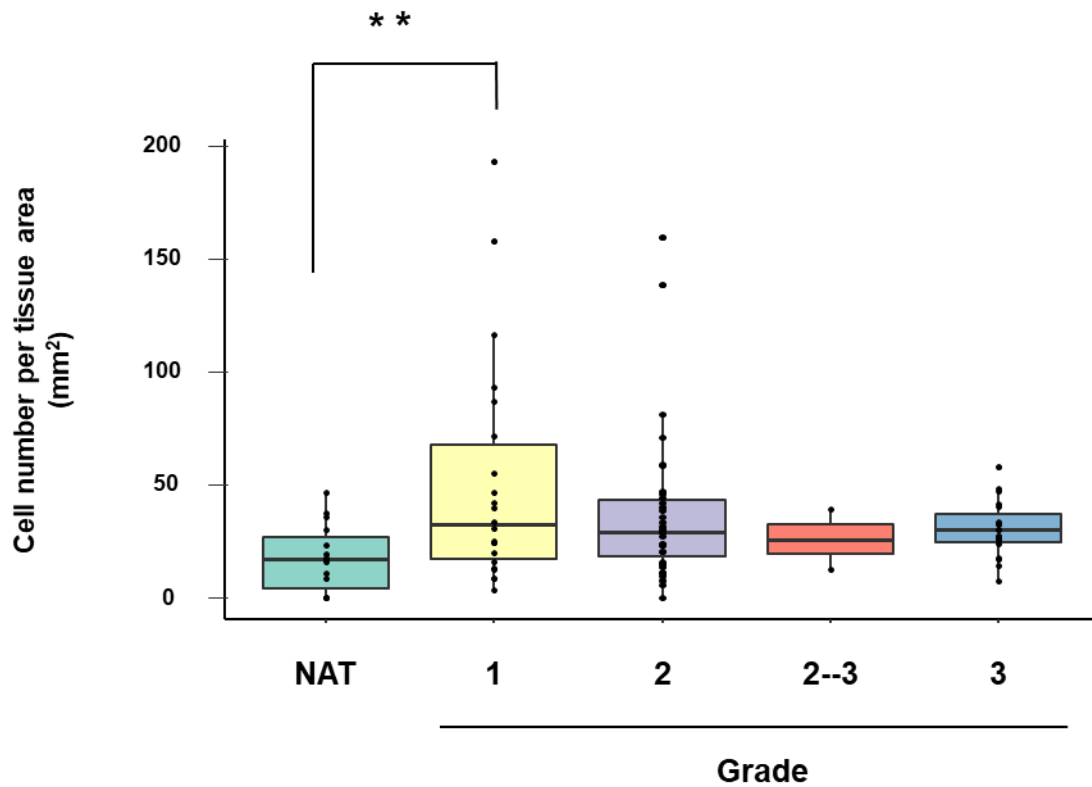


Fig. 9. The Different Number of CLIC4^{high} Cells in Epithelial Area with Grade Diagnosis

The number of CLIC4^{high} cells per malignant epithelial tissue area (mm²) were estimated by cancer grade (1, 2, 2-3 and 3). NAT, cancer adjacent normal colorectal tissue. Mean \pm SE. ** $p < 0.01$.

第4節 考察

CLIC4 はがんの進行度によって上皮における発現が異なっており，初期では高発現し，進行するにつれて発現が低下する傾向が明らかとなった．既報における大腸がん細胞と間質細胞との共培養で見られた傾向²⁸⁾がヒト大腸組織においても確認された．特に Stage 分類と T 分類の初期で顕著な上昇が観察されており，転移よりもがんの深度に寄与すると考えられる．したがって，CLIC4 は大腸がん上皮においてがん細胞の増殖，分化，がんの形成に関与する可能性が考えられ，とりわけがんの初期に重要な可能性が高い．

大腸がんの進行度分類別 5 年生存率は，I が 83.1%，II が 75.6%，III で 68.7% と高値だが，IV は 17% と低下する．Stage の初期に大腸がんを診断することが可能となれば，あるいはそれを補助するバイオマーカーが活用できれば，早期治療による平均余命の延伸につながる可能性が高いと考えられる．大腸がん検診の精密検査では身体的および精神的苦痛を伴うことが多く，低侵襲性で感度の高い早期発見方法の開発が期待されている．¹⁷⁾

CLIC4 は特に Stage I において顕著な上昇が観察されたことから，早期発見のバイオマーカーとして有用な可能性がある．現在，早期に使用できるバイオマーカーは臨床で活用されていないため，CLIC4 は血液検査やリキッドバイオプシー等による低侵襲な検査方法への利用が期待される．リキッドバイオプシーは侵襲性が低く血液サンプルがあれば検査可能であり，早期がんの検出に用いることが期待されている．^{57,58)} しかしながら臨床に応用されておらず，リキッドバイオプシーによる診断にはバイオマーカーを用いることで精度の向上が期待されている．大腸がんにおけるリキッドバイオプシーでは，循環腫瘍遺伝子の KRAS 遺伝子変異を検出することで抗 EGFR 抗体の使用可否を調べる治療マーカーが検討されている．⁵⁹⁾

本章において大腸がん上皮細胞に発現する CLIC4 がバイオマーカーとして有用な可能性が示唆された。一方で上皮よりも発現の高い間質における CLIC4 の発現状況は不明である。そこで第 3 章では大腸がんの間質における CLIC4 の発現を進行度ごとに調査した。

第 5 節 小括

CLIC4 の上皮における発現は、初期では高発現し進行するにつれて発現が低下する傾向が示された。特に Stage 分類と T 分類の初期で顕著な上昇が観察されていたことから、CLIC4 は特に Stage I において早期発見のバイオマーカーとして有用な可能性がある。

第 3 章 がん間質の進行度による CLIC4 の発現

第1節 緒言

がんの周囲には線維芽細胞や周皮細胞，免疫細胞などの様々な間質細胞や血管，リンパ管等が存在し，がんと互いにシグナル伝達を行っている。⁶⁰⁾ がんとその周囲で形成された環境を腫瘍微小環境と呼び，これらを含む腫瘍周囲の組織を間質組織と呼ぶ．間質とがんとの相互干渉により細胞接着分子や細胞骨格タンパクが動員されることで浸潤に関与する⁶¹⁾ ことや，間質細胞の分化に伴いがんおよび腫瘍微小環境が互いに進展や転移を促進することが知られている。^{62,63)} また，間質の持つ血管が腫瘍に対し栄養を運び，血管やリンパ管を伝って腫瘍細胞が近傍組織やリンパ節，遠隔臓器へと転移することも報告されている。⁶⁴⁾ このように間質組織はがんの進行に深くかかわっており，間質や腫瘍微小環境はがん治療において重要なターゲットである．

CLIC4 は間質細胞を含む様々な細胞に発現することが知られており，正常線維芽細胞からがん関連線維芽細胞へ分化する過程に寄与する可能性が報告されている。³⁴⁾ また，液胞の酸性化を介して血管新生に関与することが報告されている。^{32,33)} CLIC4 は細胞恒常性を維持する働きのほか，間質組織の形成に重要な役割を持ち，腫瘍組織の進展に関わる可能性が指摘されている．そこで，ヒト大腸がん組織の間質における CLIC4 の発現状況を進行度分類別に調査し，CLIC4 の間質における影響を検討した．

第 2 節 実験材料および実験方法

第 1 章で撮影したヒト大腸がん切片の蛍光画像を ImageJ で解析し，大腸

間質組織の 1mm^2 における CLIC4 発現細胞を定量した。Tukey-Kramer test を行い、有意水準は * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ とした。

第3節 結果

最初に、TNM 分類における CLIC4 の発現状況を調べたところ、深度 T で比較した場合、NAT と比べて T4 では有意に発現が低下していた。一方で T2, T3 ではばらつきが大きく、T2, T3, T4 間の差は観察されなかった (Fig. 10A)。リンパ節転移 N について比較したところ、NAT と比べて N1 では有意に発現が低下していたが、N0, N2 ではばらつきが大きく、N0, N1, N2 間の差は観察されなかった (Fig. 10B)。

次に Stage 分類における CLIC4 の発現状況を調べたところ、NAT と比較して StageIIIb で有意に低下していた。一方で、Stage 分類内での比較では差は観察されなかった (Fig. 11)。

最後に Grade 分類における CLIC4 の発現を調べたところ、NAT と比較して Grade1,3 において有意な差が確認された。しかし、Grade 分類内で比較した場合には差が見られなかった (Fig. 12)。

以上のことから、いずれの分類法においても間質では CLIC4 の発現が NAT で高く、がん組織では発現が低下する傾向が観察された。

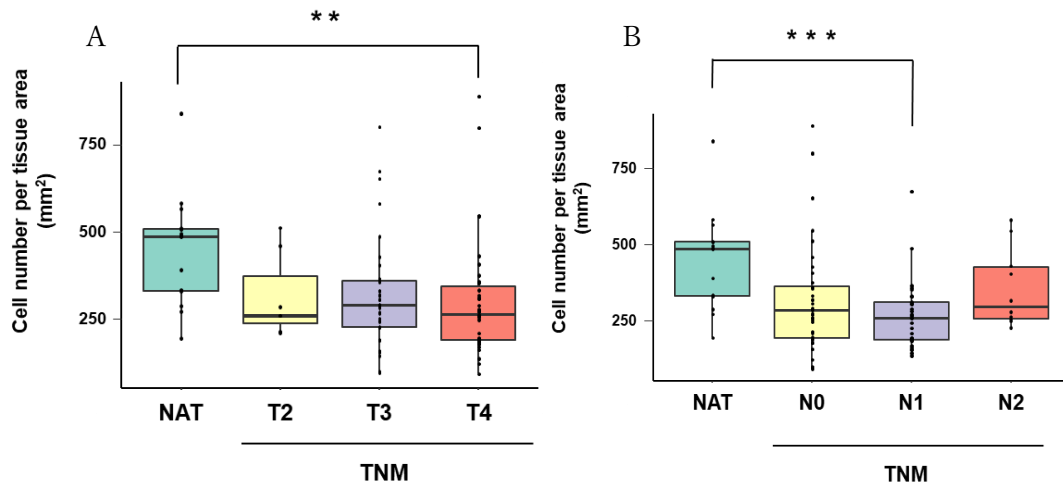


Fig. 10. The Different Number of CLIC4^{high} Cells in Stromal Area with TNM Staging

The number of CLIC4^{high} cells per stromal tissue area (mm²) were estimated by each (A) tumor stage (T2, T3 and T4) and (B) node stage (N0, N1 and N2) using tumor, node, metastasis (TNM) classification. NAT, cancer adjacent normal colorectal tissue. Mean \pm SE. ** p <0.01, *** p <0.001.

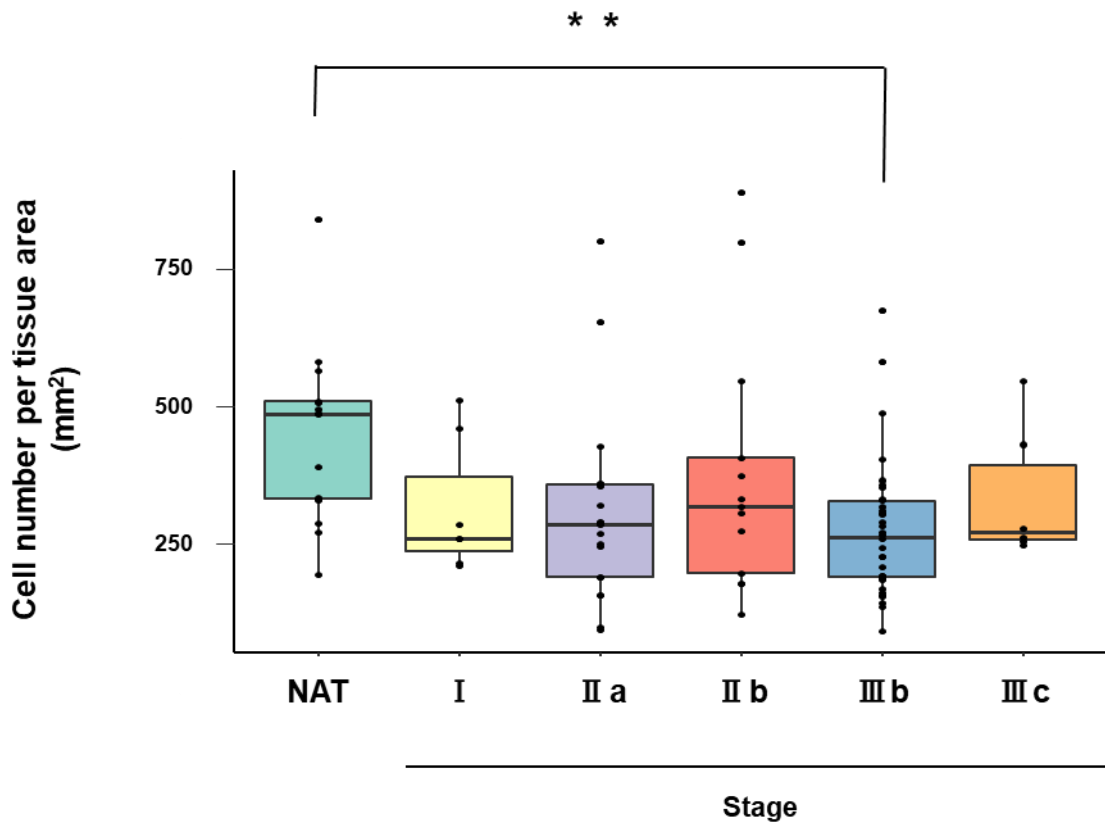


Fig. 11. The Different Number of CLIC4^{high} Cells in Stromal Area with Stage Diagnosis

The number of CLIC4^{high} cells per stromal tissue area (mm²) were estimated by cancer stage (I, IIa, IIb, IIIB and IIIc). NAT, cancer adjacent normal colorectal tissue. Mean ± SE. ***p*<0.01.

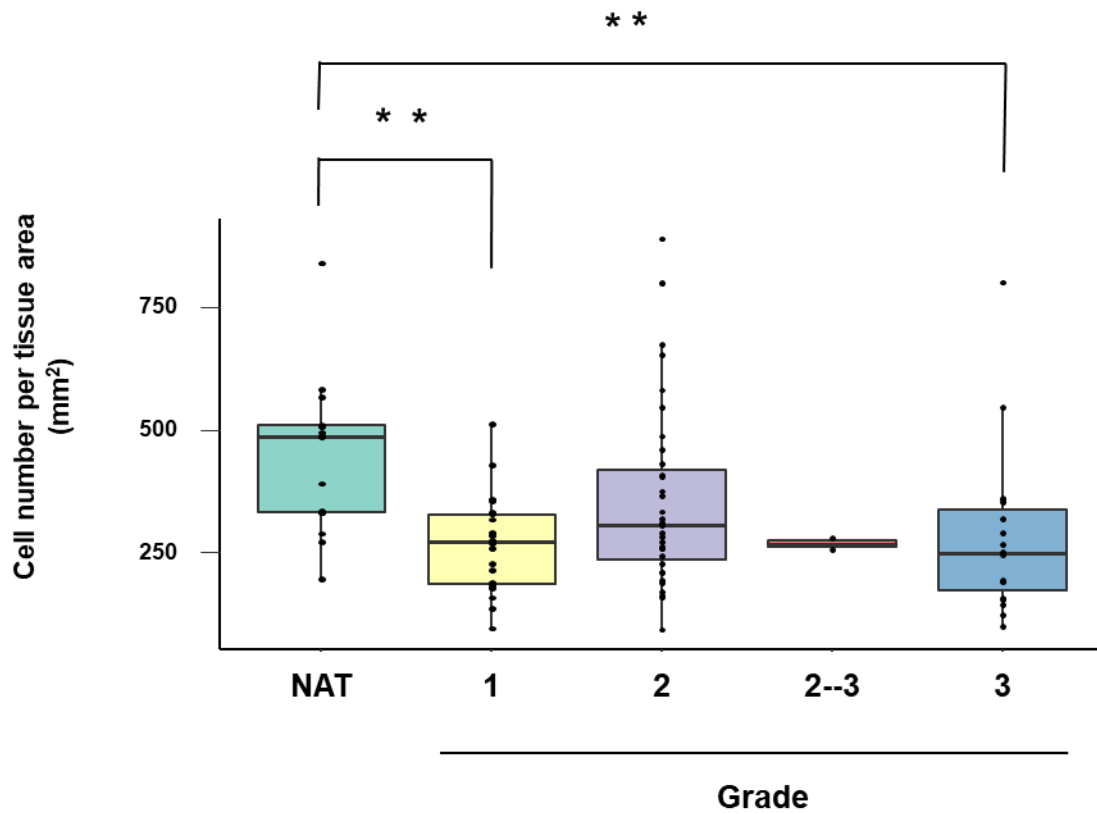


Fig. 12. The Different Number of CLIC4^{high} Cells in Stromal Area with Grade Diagnosis

The number of CLIC4^{high} cells per stromal tissue area (mm²) were estimated by cancer grade (1, 2, 2-3 and 3). NAT, cancer adjacent normal colorectal tissue. Mean \pm SE. ** $p < 0.01$.

第4節 考察

CLIC4 はがん上皮と比較して間質において高発現しており，進行度分類別に調査したところ NAT で最も高発現し，がんが進行した間質では低下する傾向を示した．ただし，各進行度同士の比較では低下傾向が見られず，発現量のばらつきが大きかった．間質は腫瘍によって特徴が異なるため，CLIC4 発現のばらつきの大きさは大腸がんの中で組織形態が異なったことによる可能性がある．そのため，より詳しい病理診断やトランスクリプトーム解析⁶⁵⁾と組み合わせることで CLIC4 発現の傾向が明確になると考えられる．

CLIC4 が NAT の間質および前がん状態でとくに高発現し，がんが形成されるとフィードバック制御等により発現量が低下する可能性が示唆された．ただし，がん上皮よりも発現は依然として高く，がん間質で CLIC4 が維持されることによって組織の恒常性が保たれていると考えられる．これまで，大腸がんでは進行に伴ってがん間質における CLIC4 の発現が高くなることが示唆されてきた²⁸⁾が，本研究において逆の傾向が示された．これは，既報がヒト大腸がん細胞と間質細胞の共培養にて調査されたものであり，実際のヒト組織とは組成が異なったためと考えられる．

大腸がんの転移はがんの進展による近接臓器への浸潤のほか，リンパ節転移や遠隔臓器への転移があり，これらは腫瘍微小環境の肥大化，炎症性シグナル，血管やリンパ管を介したがん細胞の移動等が要因である⁶⁶⁾．CLIC4 は間質細胞の分化や血管新生等の間質組織の形成に重要な役割を持つことが報告されており，CLIC4 はがんの転移に関与している可能性がある．³²⁻³⁴⁾しかしながら，転移の予後予測として用いられる Grade 分類では進行度による差は見られず，間質における CLIC4 の発現状況が転移リスクを評価す

ることは難しいと考えられる。Grade 分類はがんの深度や転移に関わらず、がん細胞の簇出の個数によって評価するため、遺伝素因や stage, TNM が異なり CLIC4 の発現にばらつきが大きくなった可能性がある。したがって、がんの深度をそろえて Grade 分類の検討を行うことにより正確に CLIC4 による転移リスクを評価できると考えられる。

以上の結果より、ごく初期のがん形成段階において CLIC4 が重要である可能性が示唆され、バイオマーカーとしての有用性は高いと考えられる。しかしながら、CLIC4 の機序について不明点が多く、CLIC4 ががん細胞に与える影響について検討する必要がある。そこで本研究第 4 章において、ヒト大腸がん由来の細胞株を用いて、CLIC4 ががん細胞の生存率に与える影響とシグナル伝達経路に与える影響を検討した。

第 5 節 小括

CLIC4 は上皮組織において、Stage の初期段階で他の Stage と比べて有意に高発現していた。初期段階で特に発現しているため、大腸がんの初期におけるバイオマーカーとして利用できる可能性がある。

第4章 CLIC4 と TGF- β の関連性

第1節 緒言

CLIC4 は大腸がん細胞に発現しており，腫瘍が形成されるときに上皮で高発現し進行とともに発現が低下することが *in vitro* で報告されてきた。²⁸⁾ また，間質においても高発現しており，線維芽細胞に発現した CLIC4 が分化に関連する可能性が明らかになってきた。³⁴⁾ 線維芽細胞からがんの悪性化に関与する筋線維芽細胞への分化は TGF- β によって媒介されており，⁶⁷⁾ その際 CLIC4 が TGF- β によってアップレギュレートされる。⁶⁸⁾ また，TGF- β は筋線維芽細胞の収縮性に関与する α -smooth muscle actin タンパクを誘導し，^{69,70)} α -SMA タンパクは CLIC4 と共発現している²⁸⁾。

TGF- β シグナルは腫瘍細胞および腫瘍微小環境において，TGF- β のオートクリン，パラクリンを行うことで腫瘍の抑制や進行，浸潤のどちらにも影響する。⁷¹⁾ TGF- β シグナルは，TGF- β がセリン・トレオニンキナーゼ活性を有する TGF- β 受容体に結合することで開始される。TGF- β 刺激により活性化された TGF- β 受容体は転写因子 smad をリン酸化し，リン酸化 smad (p-smad) は核内に移行して転写制御を行う。⁷²⁻⁷⁴⁾ Smad ファミリーのうち特に p-smad2, p-smad3 は CLIC4 に関与することが報告されている。p-smad2, p-smad3 は核に移行して転写制御を行うが，核内で脱リン酸化されることで転写活性が負に調節されている。この脱リン酸化の際に，p-smad2/3 と CLIC4 が複合体を形成することで脱リン酸化を抑制しシグナル伝達を増強する。⁷⁵⁾ また，CLIC4 による TGF- β シグナルの活性化は活性酸素によって CLIC4 が核内に移行することで促進され，腫瘍細胞の増加や酸化ストレスに関与することが示唆されている。⁷⁶⁾ このように，CLIC4 が TGF- β シグナルを活

性化する機序について不明であるものの、両者は互いに関連していることが予想される。そこで、我々は CLIC4 と TGF- β の発現がヒト大腸がん由来細胞株で関連しているかどうか調査した。

第2節 実験材料および実験方法

第1項 細胞培養

ヒト結腸腺癌由来細胞である DLD-1(JCRB 細胞バンク, Tokyo, Japan)を用いた。⁷⁷⁾ この細胞は上皮様細胞であり、接着性で倍化速度は 20 時間程度である。細胞は 10% heat-inactivated FBS, L-グルタミン 4 mM, ペニシリン 40000 U/L, ストレプトマイシン 40 mg/L を添加した DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)で培養した。

第2項 RT-PCR 及び Real time PCR 条件

Table 2 に示したとおり、TGF- β および GAPDH のプライマーを設計し、妥当性については BLAST を用いて確認した。⁷⁸⁾ TGF- β のプライマーは、プロダクトサイズが 205bp, Tm 値が 56°C程度であり、GAPDH はプロダクトサイズが 215bp, Tm 値は 60°C程度であった。次に、プライマーを用いるのに適正な温度を検討し、56 °Cから 60 °Cで PCR を行った。いずれの温度であってもプロダクトサイズにシングルバンドが確認されたため、当研究室で保有する他のプライマー温度とも鑑み、58 °Cで以後の検討を行った。また、両プライマーの増幅効率が異なり $\Delta\Delta$ Ct 法は適さないため、検量線法を用いた。なお、RT-PCR 条件は Table 2 , Real time PCR 条件は Table 3 に示した。RNA 抽出は RNeasy® Mini キット (QIAGEN, Tokyo, Japan) を用いて行い、cDNA への逆転写反応は High Capacity RNA-to-cDNA kit

(Applied Biosystems, MA, USA) を用いて行った。Real time PCR は KAPA SYBR FAST Universal kit (Roche, Basel, Switzerland) を使用した。

Table 2. TGF- β and GAPDH Primers

遺伝子名	配列
Human TGF- β forward ⁷⁸⁾	5'-GGA CAC CAA CTA TTG CTT CAG-3'
Human TGF- β reverse ⁷⁸⁾	5'-CGG GTT ATG CTG GTT GTA C-3'
Human GAPDH forward ⁷⁹⁾	5'-GGT GGT CTC CTC TGA CTT CAA C-3'
Human GAPDH reverse ⁷⁹⁾	5'-TCT CTC TTC CTC TTG TGT TCT TG-3'

Table 3. Temperature Conditions for RT-PCR

STEP	温度	時間(分)
Step 1	95.0°C	1 : 00
Step 2 ×30	74.0°C	0 : 30
	56.0-60.0°C	0 : 30
	74.0°C	0 : 30
Step 3	74.0°C	7 : 00
	4.0°C	free

Table 4. Temperature Conditions for Real Time PCR

STEP	温度	時間(分)
Step 1	95.0°C	1 : 00
Step 2 ×35	74.0°C	0 : 15
	58.0°C	0 : 15
	74.0°C	0 : 15
Step 3	74.0°C	7 : 00
	4.0°C	free

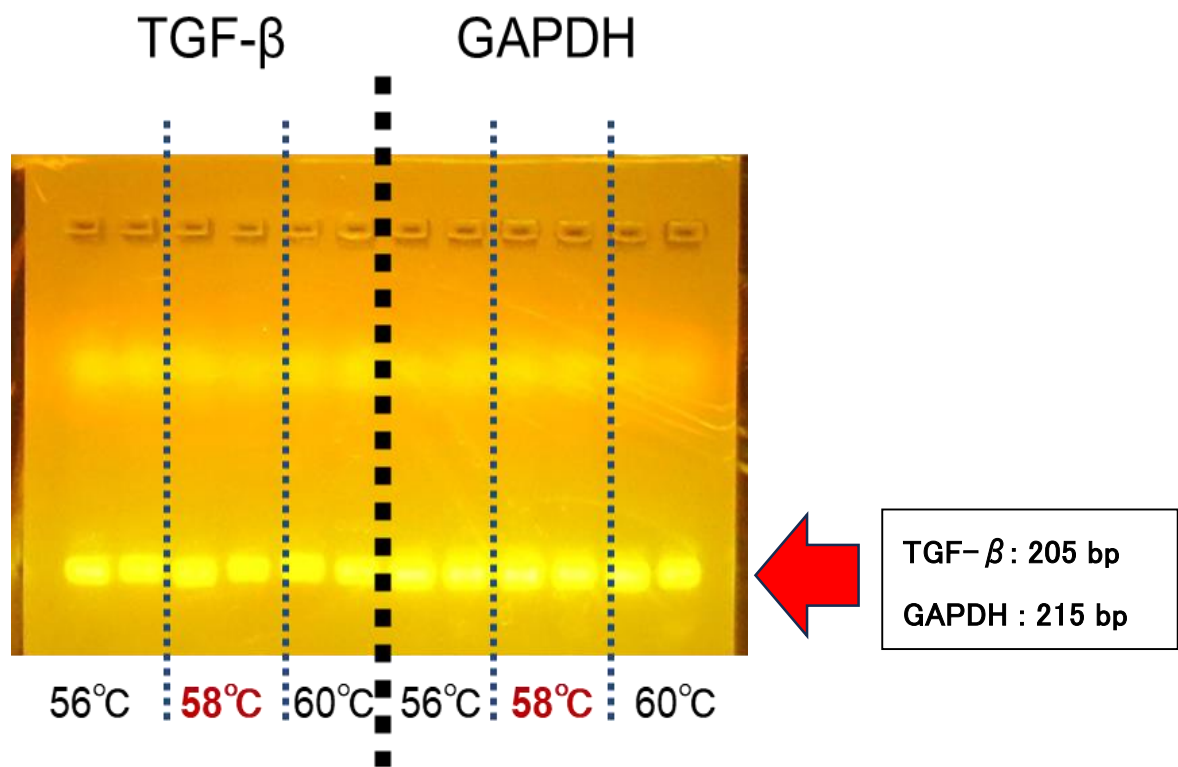


Fig. 13. Verification of PCR products

Total RNA extracted from DLD-1 cells were subjected to RT-PCR analysis (at annealing temperature 56°C, 58°C and 60°C). PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis.

第3項 ノックダウン条件

CLIC4 のノックダウンでは、 8×10^4 cells/mL になるよう細胞を播種し、Lipofectamine RNAiMAX Reagent (Invitrogen, MA, USA) を添加、dsiRNA を添加して 24 時間インキュベートした。CLIC4 dsiRNA は Table 5 に示した通りである。CLIC4 タンパクのノックダウンは、抗 CLIC4 抗体を用いた western blotting により確認した(Fig. 14).

Table 5. CLIC4 dsiRNA for Knockdown

遺伝子名	配列
CLIC4 dsiRNA	5'-GCU CUC UAU UCU AGU UGA UAA AAC T-3'
CLIC4 dsiRNA	5'-CAA AUU CUC UGC AUA UAU CAA GAA T-3'

第4項 ウェスタンブロット

DLD-1 細胞を細胞溶解バッファに溶解した。タンパク質濃度はブラッドフォード法(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)によって定量した。細胞から抽出したタンパク質 (10 μ g) を 10% ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) により分画した後、二フッ化ポリビニリデンメンブレン (Amersham Bioscience, Little Chalfont, UK)へ転写した。このメンブレンを TBST で洗浄し、さらに 1% BSA/TBST を添加して室温で 1 時間ブロッキングした。続いて、メンブレンに抗 CLIC4 一次抗体を添加し 1% BSA/TBST で 4°C、一晩インキュベートした。このメンブレンを TBST で洗浄したのち、蛍光抗ウサギ二次抗体を添加し 1% BSA/TBST 中で、室温 1 時間インキュベートした。TBST で洗浄後、タンパクのバンドは化学発光アッセイキット(Millipore, Billerica, MA, USA)によって観察した。

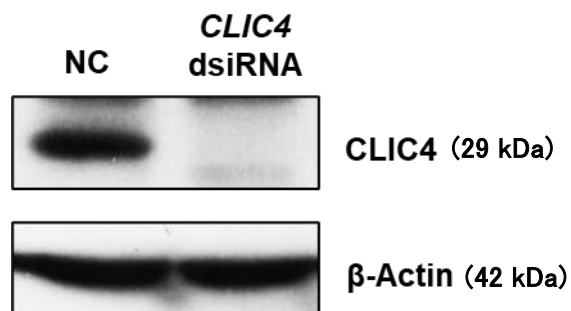


Fig. 14. dsRNA-mediated knockdown of CLIC4 in DLD-1 cells

DLD-1 cells were transfected with CLIC4 dsRNA. At 48h post-transfection, cell lysates were prepared and subjected to western blot analysis using anti-CLIC4 and anti- β -actin antibodies.

第5項 細胞生存率の測定

細胞生存率の測定のため WST-1 アッセイを行った。WST-1 アッセイは MTT アッセイと比較して感度が高く、MTT は不溶性試薬が細胞内に凝集することで細胞毒性を示すが、WST-1 ではその毒性が認められないため本研究では WST-1 アッセイを選択した。DLD-1 細胞を 10 % FBS/DMEM に 5×10^4 cells/mL になるよう播種し、3.5 時間接着後、ジメチルスルホキシド (DMSO) を含む 1 % FBS/DMEM 培地と交換して 24 時間インキュベートした。WST-1 アッセイを行い、ELISA 用プレートリーダー (TECAN Japan, 東京, 日本) を使用して 450 nm の波長で測定した。

第6項 統計学的解析

コントロール DLD-1 細胞に対する CLIC4 ノックダウン DLD-1 細胞における TGF- β 発現及び細胞生存率の統計学的解析は、Student t 検定を行った。有意水準は * $p < 0.05$ とした。

第3節 結果

CLIC4 をノックダウンした結果、24 時間および 48 時間では control の 60 % 程度まで TGF- β が有意に減少した (Fig. 15)。72 時間では有意な差が消失した。CLIC4 ノックダウンによる細胞生存率への影響では、24 時間、48 時間における差は見られなかった (Fig. 16)。また、細胞生存率の有意な減少は観察されなかった。しかし、いずれの時間においても低下傾向が見られた。

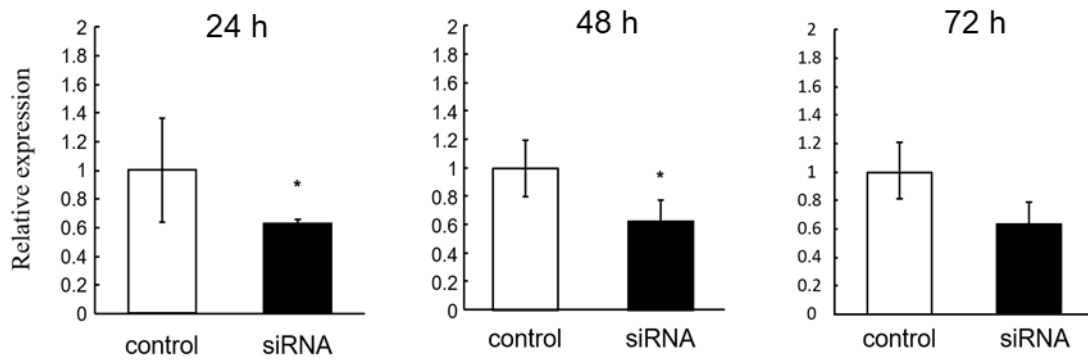


Fig. 15. TGF- β RNA in CLIC4 Knockdown Cells with RT-PCR

DLD-1 cells were transfected with CLIC4 dsRNA. At 24, 48, or 72 h post-transfection, total RNA was extracted and the expression levels of TGF- β mRNA were measured by real time RT-PCR analysis. GAPDH was used as an internal control. T-test, n = 3, mean \pm SE, *p < 0.05.

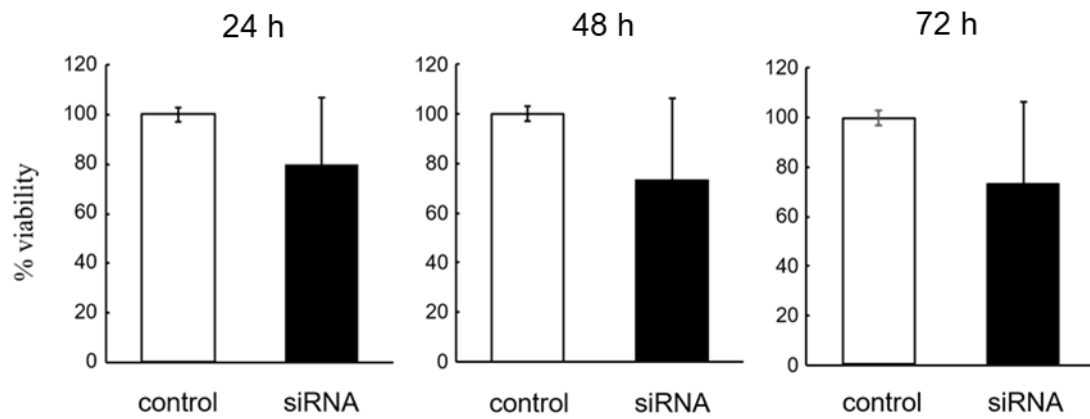


Fig. 16. Cell Viability in CLIC4 Knockdown Cells with WST-1 assay

DLD-1 cells were transfected with CLIC4 dsRNA. At 24, 48, or 72 h post-transfection, cell viability was measured by WST-1 assay. T-test, $n = 3$, mean \pm SE.

第4節 考察

CLIC4 をノックダウンした結果、24 時間および 48 時間では TGF- β mRNA 発現が有意に減少したものの、72 時間では有意差が見られず、siRNA の効果が減弱した可能性がある。TGF- β は CLIC4 をアップレギュレートする⁶⁸⁾ものの、48 時間では CLIC4 の knockdown によって TGF- β mRNA 発現量が低下しており時間経過による回復は見られなかった。一方で 72 時間では TGF- β mRNA 量に有意な低下は確認されず、CLIC4 あるいは TGF- β の発現が誘導された可能性がある。したがって、TGF- β および CLIC4 の発現が誘導されるためには、TGF- β 、CLIC4 の共存が効果を示す可能性がある。TGF- β シグナルは CLIC4 と骨形成タンパク質(BMP)シグナルの転写因子である Schnurri-2 の共存によって促進されており、どちらかが発現していない場合 TGF- β シグナルが機能しないことが報告されている。³⁵⁾ 72 時間で有意差が見られなかったことから、CLIC4 の発現が回復したことで TGF- β との共存条件が満たされたため TGF- β の発現が促進された可能性がある。TGF- β は大腸がんの進行に伴って血漿中濃度が高くなり、腫瘍の転移や再発に関与することが報告されている^{81,82)}が、CLIC4 の上皮組織での発現は進行に伴って低下するため、間質においてアップレギュレートされた TGF- β が循環血漿中に検出された可能性がある。したがって、CLIC4 は初期の大腸がんにおけるバイオマーカーとしてだけでなく、TGF- β や Schnurri-2 等の関連タンパクとのパネル検査によってより正確に大腸がんの進行を推定できる可能性が示唆された。

細胞生存率では、ノックダウン 24 時間、48 時間における差は見られず、低下傾向は示されたが有意な差も認められなかった。これは、mRNA 抽出と同一条件で培養を行った場合、細胞数が十分でなくばらつきが大きくな

ったことが一因と考えられる。したがって、適正な系を構築することで細胞生存率についてより明確な結果が得られると考えられる。また、CLIC4 ノックダウンの結果は時間依存的な傾向が認められず、細胞生存率の低下傾向は TGF- β の低下程明確な抑制ではなかったことから、CLIC4-TGF- β シグナルは大腸がんの制御における一つの機構であり、ほかにも様々な分子によって細胞恒常性が高度に維持されていると考えられる。

以上の結果より、CLIC4 と TGF- β シグナルの関連は明らかであり、CLIC4 は薬物治療の標的分子として期待される。しかしながら、その詳しい機序については未だ不明であり、現在のところは、標的分子としての効果よりも大腸がん初期のバイオマーカーとして有用性が高いと考えられる。

第5節 小括

本研究では腫瘍に発現しその形成や進行において注目されているタンパク CLIC4 が大腸がんのバイオマーカーとして利用可能であるかを目的に、大腸がんの進行に伴う CLIC4 および関連タンパクに対する影響について調査した。

第4章においてヒト大腸がん細胞の CLIC4 をノックダウンし、関連タンパク質である TGF- β の mRNA 発現量および細胞生存率を調査した。CLIC4 ノックダウン 24 時間および 48 時間で TGF- β mRNA 発現量が有意に減少したものの、72 時間では有意差が見られなかった。TGF- β と CLIC4 は互いに誘導するが、CLIC4 ノックダウンによる TGF- β mRNA 発現量は、48 時間経過による回復が確認されず、TGF- β と CLIC4 の誘導は両者の共存下において効果を示す可能性が示唆された。TGF- β は腫瘍の転移や再発に関与するだけでなく、線維芽細胞の分化に伴う腫瘍微小環境の形成にも関わってお

り、CLIC4 はこれら TGF- β のシグナル伝達に必要不可欠な可能性がある。ノックダウン 24 時間および 48 時間で細胞生存率の低下傾向は示されたものの、有意差は認められなかった。また、細胞生存率の低下傾向において時間依存的な傾向が見られず、TGF- β の低下ほど有意な抑制ではなかったことから、CLIC4 欠損に対するフィードバックが働いた可能性がある。細胞恒常性における CLIC4 のシグナルは様々な制御機構のうちの一つであり、ほかにも多様な分子によって高度に維持されていると考えられる。したがって、CLIC4 は TGF- β シグナルにおいて必要不可欠であり、腫瘍や腫瘍微小環境の形成に関わることから、単に CLIC4 だけでなく TGF- β 等の関連タンパク質と組み合わせることで大腸がんバイオマーカーとしての利用可能性が高くなると考えられる。ただし、CLIC4-TGF- β シグナルの機序は不明であり、また、CLIC4 の役割の詳細は解明されていない部分も多いため、治療標的分子としてよりもバイオマーカーとしての有用性が高いと考えられる (Fig. 17) .

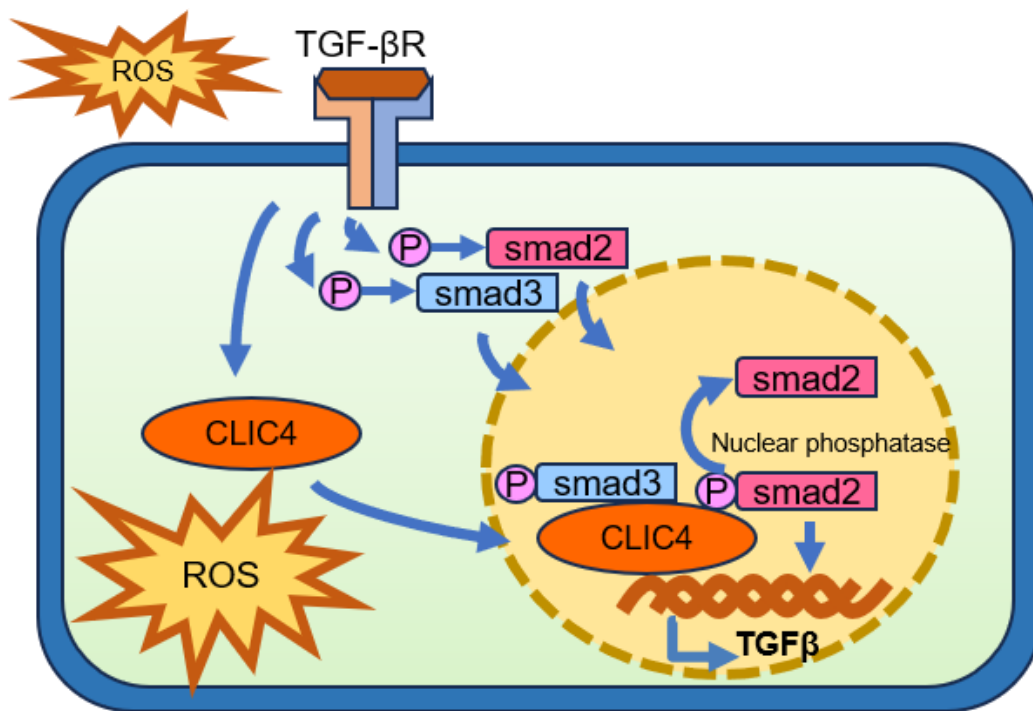


Fig. 17. CLIC4 is involved in TGF- β signaling

TGF- β signaling is regulated with smad2/3 mediated by its phosphorylation and is possible to affect by CLIC4 stimulated with ROS.

以上のことより，本研究で明らかとなった大腸がんにおける CLIC4 および TGF- β の発現状況に関する知見は，大腸がんのスクリーニングのバイオマーカーとして利用するうえで有用な情報になると考えられる．ヒト大腸組織のがん化，進行に伴う CLIC4 の特異的な発現，TGF- β の発現が，今後 CLIC4 および関連タンパクを含めた大腸がんのバイオマーカー実用化に役立てられ，平均余命の延伸に寄与することに期待する．

第5章 総括

CLIC4 は様々ながんに発現しており、大腸がんにも高発現していることが報告されていた。²⁸⁾ しかし、大腸がんの部位や細胞内での発現状況については不明な点が多かった。そこで、大腸がんでは早期に使用できるバイオマーカーがないことや、新たな治療標的分子が求められていることを踏まえ、大腸がんにおける CLIC4 の発現状況を調査したところ、ヒト大腸の正常組織、がん近傍組織、大腸がん組織のいずれにおいても発現していることが明らかとなった。また、各組織において間質に特に多く発現していることが明らかとなった。CLIC4 は線維芽細胞や周皮細胞といった間質細胞に発現しており、間質の分化、形成や液胞の酸性化を介した血管新生等に寄与していることが報告されている。³²⁻³⁴⁾ したがって、CLIC4 が上皮と比較して間質においてより重要な役割を果たす可能性がヒト大腸組織において示唆された。また、上皮における共焦点顕微鏡画像では、Stage Iと比較して Stage IIIc において発現が低下しており、進行に伴って CLIC4 の発現が低下していた。大腸がんにおける CLIC4 はがんの初期に高発現し進行するにつれて発現が低下することが報告されており²⁸⁾、本研究でも同様の傾向が示されたため、初期の大腸がんにおけるバイオマーカーとして有用な可能性が示唆された。

さらに、NAT おいてがん組織中よりも間質の CLIC4 発現が高かった。NAT は正常組織ともがん組織とも異なる構成であり、前がん状態の可能性もある。この組織はがん組織とクロストークしており、炎症や繊維化に伴うがん化や転移、腫瘍微小環境の形成といった役割を持つ。^{49,50)} したがって、CLIC4 は前がん状態から初期のがん形成に関与する可能性が示唆された。また、腫瘍微小環境は創薬ターゲットとしても注目されており、CLIC4 が

治療標的として利用できる可能性が示唆された。

これまで前がん状態からのがん化やがんの進行度における CLIC4 の発現状況を調査した報告はない。そこで、本研究で調査したところ、CLIC4 は大腸がんの Stage I と T2 で著しく高発現しており、進行に伴って低下した。がんのリンパ節浸潤を示す N 分類や転移の予後予測に利用される Grade 分類でも同様の傾向が見られたが、有意な差は確認されなかったことから、CLIC4 は転移よりもがんの深度のほうがより寄与している可能性が示唆された。このことから、大腸がん上皮の CLIC4 は初期のがん化において特異的な様態を示すことが明らかとなった。また、NAT よりも初期のがんにおいて CLIC4 が高発現しており、前がん状態からがん化する際に CLIC4 の発現が促進されている可能性が考えられる。一方で、リンパ節浸潤、リンパ節転移の指標となる分類においては CLIC4 の発現に有意な差は見られず、がん上皮細胞における CLIC4 の発現がリンパ節や隣接臓器、遠隔臓器に影響する可能性は低いか、あるいはがんの進行度に関わらず常に影響している可能性が考えられる。そこで、腫瘍の形成、進展や転移、リンパ管、血管の新生等に関与する腫瘍微小環境、間質に対する CLIC4 の影響を検討するために、間質細胞における CLIC4 の発現状況を進行度分類別に調査した。

TNM 分類、Stage 分類、Grade 分類、いずれの分類法においても、NAT の間質で最も高発現しており、大腸がんに行進した間質組織では発現が低下していた。ただし、がん間質の CLIC4 は上皮組織と比較して高発現に維持されており、発現そのものが低く誘導されているわけではない。すなわち、前がん状態において上皮組織の周囲を取り囲む間質は、がんに進展する以前から CLIC4 の影響を受けており、がん化した後も発現量は低下するものの十分ながん組織に影響している可能性が考えられる。先述した大腸が

ん上皮および間質の CLIC4 の発現状況を考慮すると、前がん状態からがん化、進展に CLIC4 が影響しながら、CLIC4 が腫瘍微小環境の形成を促し、がん周囲組織の維持に寄与することでがん組織を進行させると推察される。ただし、CLIC4 がヒト大腸がん組織にどのような機序で影響を及ぼしているかは不明な点が多い。そこで、CLIC4 と TGF- β のシグナル伝達が間質細胞の分化に寄与することが報告されている^{34,67,69,70} ことから、CLIC4 発現に伴う TGF- β の発現状況を調査した。

CLIC4 のノックダウンで TGF- β は有意に発現低下したものの、48 時間の経過では発現が回復しなかった。CLIC4 は TGF- β によって誘導される報告があるものの⁶⁸、この傾向は見られなかった。したがって、CLIC4-TGF- β シグナルは CLIC4 との共存下で機能することが重要な可能性がある。CLIC4-TGF- β シグナルは Schnurri-2 の共存によって促進され、CLIC4 または Schnurri-2 の欠損でシグナル伝達の機能が失われることが報告されている。⁵⁶ CLIC4 の発現ががんの進行につれて低下する一方で、TGF- β は血漿中濃度が高くなり腫瘍の促進効果を示すことが報告されている。^{81,82} CLIC4, TGF- β および Schnurri-2 の3者の共存下でシグナル伝達が亢進することから、TGF- β は間質で高発現している CLIC4 によって誘導された可能性がある。すなわち、CLIC4 は初期のバイオマーカーとしてだけでなく、TGF- β や Schnurri-2 等の関連タンパクと組み合わせることでより正確に大腸がんの進行を検出できる可能性がある。細胞生存率では CLIC4 のノックダウンで低下傾向を示したものの、ばらつきが大きく有意差は認められなかった。これは細胞培養の条件を精査し、適正な系を構築することで明確な結果が得られると考えられる。また、細胞生存率は TGF- β の発現低下程明らかな抑制は見られず、CLIC4-TGF- β 以外の機序によって細胞恒常性が維

持された可能性がある。したがって、大腸がんは CLIC4-TGF- β だけでなく他の制御にもよって高度に維持されていると考えられる。

以上のことから、CLIC4 は前がん状態からのがん化および腫瘍微小環境の形成や進展といった初期において発現が高く、進行するにつれて CLIC4 の発現が低下し、初期のバイオマーカーとして有用である可能性が示唆された。また、CLIC4, TGF- β ともに大腸がんの進行に関連するタンパクであり、どちらも血漿中に検出される⁸¹⁻⁸⁴⁾ ことから、パネルテストに用いることでバイオマーカーとしての特異度を高められる可能性がある。CLIC4 と TGF- β は腫瘍形成に重要なタンパクであり、これらの発現量、シグナル伝達に関連が見られたことから治療標的としての可能性もある。ただし、CLIC4 の機序については不明な点が多いため、現時点では治療標的としての実現可能性よりもバイオマーカーの方が有用であると考えられる。

謝 辞

本研究の遂行にあたり，指導教官として終始懇切なるご指導ご鞭撻を賜りました，北海道医療大学大学院薬学研究科衛生薬学分野環境衛生学 小島弘幸教授，寺崎将准教授，窪田篤人助教に心より深謝いたします。

本論文の主査としてご審査を賜り，また発表の際の座長としてご助言を賜りました，北海道医療大学大学院薬学研究科分子生命科学分野生化学 中川宏治教授に深く御礼申し上げます。

本論文の副査としてご審査を賜りました，北海道医療大学大学院薬学研究科衛生薬学分野衛生化学 小林大祐准教授，北海道医療大学大学院薬学研究科薬理学分野臨床薬理毒理学 鹿内浩樹講師に御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり，ご支援とご協力を頂きましたすべての方々に心より感謝申し上げます。

北海道医療大学大学院薬学研究科

横山 怜央

引用文献

- 1) 大腸癌研究会, 大腸癌治療ガイドライン医師用 2022 年版
- 2) Levin B., the US Multi-Society Task Force., the American College of Radiology
Colon Cancer Committee., Screening and surveillance for the early detection of
colorectal cancer and adenomatous polyps, *CA Cancer. J Clin.*, **58**, 130-160
(2008).
- 3) Eaden J.A., Abrams K.R., Mayberry J.F., The risk of colorectal cancer in
ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut.*, **48**, 526 (2001).
- 4) Canavan C., Abrams K.R., Mayberry J., Meta-analysis: colorectal and small
bowel cancer risk in patients with Crohn's disease. *Alimentary pharmacology &
therapeutics.*, **23**, 1097-1104 (2006).
- 5) Johnson C.M., Wei C., Ensor J.E., Smolenski D.J., Amos C.I., Levin B., Berry
D.A., Meta-analyses of colorectal cancer risk factors. *Cancer causes & control.*,
24, 1207-1222 (2013).
- 6) Keum N., Edward G., Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk
factors and prevention strategies. *Nature reviews Gastroenterology &
hepatology.*, **16**, 713-732 (2019).

- 7) Mármol I., Sánchez-de-Diego C., Pradilla D.A., Cerrada E., Rodríguez Yoldi M.J.,
Colorectal carcinoma: a general overview and future perspectives in colorectal
cancer. *International journal of molecular sciences.*, **18**, 197 (2017).
- 8) O’Keefe S.J., Li J.V., Lahti L., Ou J., Carbonero F., Mohammed K., Posma J.M.,
Kinross J., Wahl E., Ruder E., Vipperla K., Naidoo V., Mtshali L., Tims S.,
Puylaert P.G.B, DeLany J., Krasinkas A., Benefiel A.C., Kaseb H.O., Newton
K., Nicholson J.K., Vos W.M., Gaskins H.R., Zoetendal E.G., Fat, fibre and
cancer risk in African Americans and rural Africans. *Nature communications.*,
6, 1-14 (2015).
- 9) 国立がん研究センター, がん統計 大腸がん, (2022)
- 10) Saito H., Soma Y., Nakajima M., Koeda J., Kawaguchi H., Kakizaki R., Chiba
R., Aisawa T., Munakata A., A case-control study evaluating occult blood
screening for colorectal cancer with hemoccult test and an immunochemical
hemagglutination test. *Oncology reports.*, **7**, 815-824 (2000).

- 11) Lee K.J., Inoue M., Otani T., Iwasaki M., Sasazuki S., Tsugane S., Colorectal cancer screening using fecal occult blood test and subsequent risk of colorectal cancer: a prospective cohort study in Japan. *Cancer detection and prevention.*, **31**, 3-11 (2007).
- 12) 日本消化器がん検診学会大腸がん検診精度管理委員会., 委員会報告:精密検査の手法として大腸 CT 検査の位置づけおよび必要条件と課題. 日消がん検診誌., **54**, 425-441 (2016).
- 13) Li L., Jiang H., Zeng B., Wang X., Bao Y., Chen C., Ma L., Yuan J., Liquid biopsy in lung cancer. *Clinica Chimica Acta.*, **554**, 117757 (2024).
- 14) Tai F.W.D., McAlindon M., Sidhu R., Colon Capsule Endoscopy–Shining the Light through the Colon. *Current Gastroenterology Reports.*, **25**, 99-105 (2023).
- 15) Ghahremani G.G., Krukenberg Tumors in Young Women: Computed Tomography and Magnetic Resonance Imaging Diagnosis. *Journal of Computer Assisted Tomography.*, 10-1097 (2022).
- 16) Arçay Öztürk A., Flamen P., FAP-targeted PET imaging in gastrointestinal malignancies: a comprehensive review. *Cancer Imaging.*, **23**, 79 (2023).

- 17) 日本消化器がん検診学会大腸がん検診精度管理委員会., 大腸がん検診マニュアル—2021年度改訂版—. 日消がん検診誌., **60**, 385-536 (2022).
- 18) Locker G.Y., Hamilton S., Harris J., Jessup J.M., Kemeny N., Macdonald J.S., Somerfield M.R., Hayes D.F., Bast Jr R.C., ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer. *Journal of clinical oncology.*, **24**, 5313-5327 (2006).
- 19) Duffy M.J., van Dalen A., Haglund C., Hansson L., Holinski-Feder E., Klapdor R., Lamerz R., Peltomaki P., Sturgeon C., Topolcan O., Tumour markers in colorectal cancer: European Group on Tumour Markers (EGTM) guidelines for clinical use. *European journal of cancer.*, **43**, 1348-1360 (2007).
- 20) Elez E., Kopetz S., Tabernero J., Bekaii-Saab T., Taieb J., Yoshino T., Manji G., Fernandez K., Abbattista A., Zhang X., Morris V.K., SEAMARK: phase II study of first-line encorafenib and cetuximab plus pembrolizumab for MSI-H/dMMR BRAF V600E-mutant mCRC. *Future Oncology.*, (2023).
- 21) Adebayo A.S., Agbaje K., Adesina S.K., Olajubutu O., Colorectal Cancer: Disease Process, *Current Treatment Options, and Future Perspectives. Pharmaceutics.*, **15**, 2620 (2023).

- 22) Mastrantoni L., Beccia V., Caira G., Trovato G., Calegari M.A., Basso M., Salvatore L., Pozzo C., Tortora G., Bria E., Orlandi A., Maintenance strategies after anti-EGFR-based induction in metastatic colorectal cancer: a systematic review and Bayesian network meta-analysis. *Critical Reviews in Oncology/Hematology.*, 104106 (2023).
- 23) Amado R.G., Wolf M., Peeters M., Van Cutsem E., Siena S., Freeman D.J., Todd J., Robert S., Sid S., Robert R., Scott D.P., Chang D.D., Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *Journal of clinical oncology.*, **26**, 1626-1634 (2008).
- 24) Dahabreh I.J., Terasawa T., Castaldi P.J., Trikalinos T.A., Systematic review: Anti-epidermal growth factor receptor treatment effect modification by KRAS mutations in advanced colorectal cancer. *Annals of Internal Medicine.*, **154**, 37-49 (2011).

- 25) Kara'petis C.S., Khambata-Ford S., Jonker D.J., O'Callaghan C.J., Tu D., Tebbutt N.C., John S.R., Chalchal H., Shapiro J.D., Robitaille S., Price T.J., Shepherd L., Au H.J., Langer C., Moore M.J, Zalcberg J.R., K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *New England Journal of Medicine.*, **359**, 1757-1765 (2008).
- 26) Peretti M., Angelini M., Savalli N., Florio T., Yuspa S. H., Mazzanti M., Chloride channels in cancer: Focus on chloride intracellular channel 1 and 4 (CLIC1 AND CLIC4) proteins in tumor development and as novel therapeutic targets. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes.*, **1848**, 2523-2531 (2015).
- 27) Wang H., An J., He S., Liao C., Wang J., Tuo B., Chloride intracellular channels as novel biomarkers for digestive system tumors. *Molecular Medicine Reports.*, **24**, 1-12 (2021).
- 28) Suh K.S., Crutchley J.M., Koochek A., Ryscavage A., Bhat K., Tanaka T., Oshima A., Fitzgerald P., Yuspa S.H., Reciprocal modifications of CLIC4 in tumor epithelium and stroma mark malignant progression of multiple human cancers. *Clinical Cancer Research.*, **13**, 121-131 (2007).

- 29) Suh K.S., Mutoh M., Gerdes M., Yuspa S.H., CLIC4, an intracellular chloride channel protein, is a novel molecular target for cancer therapy. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings.*, **10**, 105-109 (2005).
- 30) Argenzio E., Moolenaar W.H., Emerging biological roles of Cl⁻ intracellular channel proteins. *Journal of cell science.*, **129**, 4165-4174 (2016).
- 31) Sanchez V.C., Yang H.H., Craig-Lucas A., Dubois W., Carofino B.L., Lack J., Dwyer J.E., Simpson M., Cataisson C., Lee M.P., Luo J., Hunter K.W., Yuspa S.H., Host CLIC4 expression in the tumor microenvironment is essential for breast cancer metastatic competence. *PLoS Genetics.*, **18**, (2022)., e1010271.
- 32) Bohman S., Matsumoto T., Suh K., Dimberg A., Jakobsson L., Yuspa S., Claesson-Welsh L., Proteomic analysis of vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell differentiation reveals a role for chloride intracellular channel 4 (CLIC4) in tubular morphogenesis. *Journal of Biological Chemistry.*, **280**, 42397-42404 (2005).

- 33) Ulmasov B., Bruno J., Gordon N., Hartnett M.E., Edwards J.C., Chloride intracellular channel protein-4 functions in angiogenesis by supporting acidification of vacuoles along the intracellular tubulogenic pathway. *The American journal of pathology.*, **174**, 1084-1096 (2009).
- 34) Shukla A., Edwards R., Yang Y., Hahn A., Folkers K., Ding J., Padmakumar V.C., Cataisson C., Suh K.S., Yuspa S.H., CLIC4 regulates TGF- β -dependent myofibroblast differentiation to produce a cancer stroma. *Oncogene.*, **33**, 842-850 (2014).
- 35) Shukla A., Malik M., Cataisson C., Ho Y., Friesen T., Suh K.S., Yuspa S.H., TGF- β signalling is regulated by Schnurri-2-dependent nuclear translocation of CLIC4 and consequent stabilization of phospho-Smad2 and 3. *Nature cell biology.*, **11**, 777-784 (2009).
- 36) Argenzio E., Margadant C., Leyton-Puig D., Janssen H., Jalink K., Sonnenberg A., Moolenaar W.H., CLIC4 regulates cell adhesion and β 1 integrin trafficking. *Journal of cell science.*, **127**, 5189-5203 (2014).

- 37) Dozynkiewicz M.A., Jamieson N.B., MacPherson I., Grindlay J., van den Berghe P.V., von Thun A., Morton J.P., Gourley C., Timpson P., Nixon C., McKay C.J., Carter R., Strachan D., Anderson K., Sansom O.J., Caswell P.T., Norman J.C., Rab25 and CLIC3 collaborate to promote integrin recycling from late endosomes/lysosomes and drive cancer progression. *Developmental cell.*, **22**, 131-145 (2012).
- 38) Singh H., Cousin M.A., Ashley R.H., Functional reconstitution of mammalian 'chloride intracellular channels' CLIC1, CLIC4 and CLIC5 reveals differential regulation by cytoskeletal actin. *The FEBS journal.*, **274**, 6306-6316 (2007).
- 39) Jiang L., Phang J.M., Yu J., Harrop S.J., Sokolova A.V., Duff A.P., Wilk K.E., Alkhamici H., Breit S.N., Valenzuela S.M., Brown.L.J., Curmi P.M., CLIC proteins, ezrin, radixin, moesin and the coupling of membranes to the actin cytoskeleton: a smoking gun?. *Biochimica et Biophysica Acta -Biomembranes.*, **1838**, 643-657 (2014).
- 40) Edwards J.C., Kahl C.R., Chloride channels of intracellular membranes. *FEBS letters.*, **584**, 2102-2111 (2010).

- 41) Porta C., Riboldi E., Totaro M.G., Strauss L., Sica A., Mantovani A.,
Macrophages in cancer and infectious diseases: the ‘good’and the ‘bad’.
Immunotherapy., **3**, 1185-1202 (2011).
- 42) Hanahan D., Coussens L.M., Accessories to the crime: functions of cells
recruited to the tumor microenvironment. *Cancer cell.*, **21**, 309-322 (2012).
- 43) Mantovani A., Allavena P., Sica A., Balkwill F., Cancer-related inflammation.
Nature., **454**, 436-444 (2008).
- 44) Joyce J.A., Pollard J.W., Microenvironmental regulation of metastasis. *Nature
reviews cancer.*, **9**, 239-252 (2009).
- 45) Balkwill F.R., Capasso M., Hagemann T., The tumor microenvironment at a
glance. *Journal of cell science.*, **125**, 5591-5596 (2012).
- 46) Anderson N.M., Simon M.C., The tumor microenvironment. *Current Biology.*,
30, R921-R925 (2020).
- 47) Carmeliet P., Jain, R.K., Molecular mechanisms and clinical applications of
angiogenesis. *Nature.*, **473**, 298-307 (2011).
- 48) Deng Y.J., Tang N., Liu C., Zhang J.Y., An S.L., Peng Y.L., Ma L.L., Li G.Q.,
Jiang Q., Hu C.T., Wang Y.N., Liang Y.Z., Bian X.W., Fang W.G., Ding Y.Q.,
CLIC4, ERp29, and Smac/DIABLO derived from metastatic cancer stem-like

- cells stratify prognostic risks of colorectal cancer. *Clinical Cancer Research.*, **20**, 3809-3817 (2014).
- 49) Aran D., Camarda R., Odegaard J., Paik H., Oskotsky B., Krings G., Goga A., Sirota M., Butte A.J., Comprehensive analysis of normal adjacent to tumor transcriptomes. *Nature communications.*, **8**, 1077 (2017).
- 50) Zhao Y., Guo M., Zhao F., Liu Q., Wang X., Colonic stem cells from normal tissues adjacent to tumor drive inflammation and fibrosis in colorectal cancer. *Cell Communication and Signaling.*, **21**, 186 (2023).
- 51) Advances in Colorectal Cancer Research, National Institutes of Health
- 52) Haslam A.C., Pearson J.M., Bisset D.L., Michie H.R., Hobbiss J.H., A Dukes/Jass combination—is it more discriminating?. *Colorectal Disease.*, **8**, 418-422 (2006).
- 53) Puppa G., Sonzogni A., Colombari R., Pelosi G., TNM staging system of colorectal carcinoma: a critical appraisal of challenging issues. *Archives of pathology & laboratory medicine.*, **134**, 837-852 (2010).
- 54) 大腸癌研究会, 大腸癌取扱い規約

- 55) Compton C.C., Fielding L.P., Burgart L.J., Conley B., Cooper H.S., Hamilton S.R., Hammond M.E.H., Henson D.E., Hutter R.V.P., Nagle R.B., Nielsen M.L., Sargent D.J., Taylor C.R., Welton M., Willett C., Prognostic factors in colorectal cancer: College of American Pathologists consensus statement 1999. *Archives of pathology & laboratory medicine.*, **124**, 979-994 (2000).
- 56) Compton C.C., Colorectal carcinoma: diagnostic, prognostic, and molecular features. *Modern Pathology.*, **16**, 376-388 (2003).
- 57) Alix-Panabières C., Pantel K., Liquid biopsy: from discovery to clinical application. *Cancer discovery.*, **11**, 858-873 (2021).
- 58) Alix-Panabieres C., Perspective: The future of liquid biopsy. *Nature.*, **579**, S9-S9 (2020).
- 59) Walther A., Johnstone E., Swanton C., Midgley R., Tomlinson I., Kerr D., Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Nature Reviews Cancer.*, **9**, 489-499 (2009).
- 60) Bhowmick N.A., Harold L.M., Tumor–stroma interactions. *Current opinion in genetics & development.*, **15**, 97-101 (2005).

- 61) Leeman M.F., Curran S., Murray G.I., New insights into the roles of matrix metalloproteinases in colorectal cancer development and progression. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland.*, **201**, 528-534 (2003).
- 62) Le N.H., Franken P., Fodde R., Tumour–stroma interactions in colorectal cancer: converging on β -catenin activation and cancer stemness. *British journal of cancer.*, **98**, 1886-1893 (2008).
- 63) Karnoub A.E., Dash A.B., Vo A.P., Sullivan A., Brooks M.W., Bell G.W., Richardson A.L., Polyak K., Tubo R., Weinberg R.A., Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature.*, **449**, 557-563 (2007).
- 64) Kitadai Y., Sasaki T., Kuwai T., Nakamura T., Bucana C.D., Fidler I.J., Targeting the expression of platelet-derived growth factor receptor by reactive stroma inhibits growth and metastasis of human colon carcinoma. *The American journal of pathology.*, **169**, 2054-2065 (2006).
- 65) Mokhtari K., Peymani M., Rashidi M., Hushmandi K., Ghaedi K., Taheriazam A., Hashemi M., Colon cancer transcriptome. *Progress in Biophysics and Molecular Biology.*, **180-181**, 49-82 (2023).

- 66) Mezzapesa M., Losurdo G., Celiberto F., Rizzi S., d'Amati A., Piscitelli D., Ierardi E., Di Leo A., Serrated colorectal lesions: an up-to-date review from histological pattern to molecular pathogenesis. *International Journal of Molecular Sciences.*, **23**, 4461 (2022).
- 67) Rønnov-Jessen, L., Petersen O.W., Induction of alpha-smooth muscle actin by transforming growth factor-beta 1 in quiescent human breast gland fibroblasts. Implications for myofibroblast generation in breast neoplasia. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology.*, **68**, 696-707 (1993).
- 68) Rønnov-Jessen L., Villadsen R., Edwards J.C., Petersen O.W., Differential expression of a chloride intracellular channel gene, CLIC4, in transforming growth factor- β 1-mediated conversion of fibroblasts to myofibroblasts. *The American journal of pathology.*, **161**, 471-480 (2002).
- 69) Desmoulière A., Geinoz A., Gabbiani F., Gabbiani G., Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *The Journal of cell biology.*, **122**, 103-111 (1993).

- 70) Sieuwerts A.M., Klijn J.G., Henzen-Logmans S.C., Bouwman I., Van Roozendaal K.E., Peters H.A., Setyono-Han B., Foekens, J.A., Urokinase-type-plasminogen-activator (UPA) production by human breast (myo) fibroblasts in vitro: Influence of transforming growth factor- β 1 (TGF β 1) compared with factor (s) released by human epithelial-carcinoma cells. *International journal of cancer.*, **76**, 829-835 (1998).
- 71) Derynck R., Akhurst R. J., Balmain A., TGF- β signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nature genetics.*, **29**, 117-129 (2001).
- 72) Whitman M., Smads and early developmental signaling by the TGF β superfamily. *Genes & development*, **12**, 2445-2462 (1998).
- 73) Massagué J., Blain S.W., Lo R.S., TGF β signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell.*, **103**, 295-309 (2000).
- 74) Hill C.S., Nucleocytoplasmic shuttling of Smad proteins. *Cell research.*, **19**, 36-46 (2009).
- 75) Shukla A., Yuspa S.H., CLIC4 and Schnurri-2: A dynamic duo in TGF β signaling with broader implications in cellular homeostasis and disease. *Nucleus.*, **1**, 144 (2010).

- 76) Yao Q., Qu X., Yang Q., Wei M., Kong B., CLIC4 mediates TGF- β 1-induced fibroblast-to-myofibroblast transdifferentiation in ovarian cancer. *Oncology reports.*, **22**, 541-548 (2009).
- 77) Dexter D.L., Spremulli E.N., Fligiel Z., Barbosa J.A., Vogel R., VanVoorhees A., Calabresi P., Heterogeneity of cancer cells from a single human colon carcinoma. *The American journal of medicine.*, **71**, 949-956 (1981).
- 78) Ye J., Coulouris G., Zaretskaya I., Cutcutache I., Rozen S., Madden T.L., Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC bioinformatics.*, **13**, 1-11 (2012).
- 79) Chen Q., Zhao T., Xie X., Yu D., Wu L., Yu W., Sun W., MicroRNA-663 regulates the proliferation of fibroblasts in hypertrophic scars via transforming growth factor- β 1. *Experimental and Therapeutic Medicine.*, **16**, 1311-1317 (2018).
- 80) Murase W., Kubota A., Ikeda-Araki A., Terasaki M., Nakagawa K., Shizu R., Yoshinari K., Kojima H., Effects of perfluorooctanoic acid (PFOA) on gene expression profiles via nuclear receptors in HepaRG cells: Comparative study with in vitro transactivation assays. *Toxicology.*, 153577 (2023).

- 81) Tsushima H., Kawata S., Tamura S., Ito N., Shirai Y., Kiso S., Imai Y., Shimomukai H., Nomura Y., Matsuda Y., Matsuzawa Y, High levels of transforming growth factor beta 1 in patients with colorectal cancer: association with disease progression. *Gastroenterology.*, **110**, 375-382 (1996).
- 82) Friedman E., Gold L.I., Klimstra D., Zeng Z.S., Winawer S., Cohen A., High levels of transforming growth factor beta 1 correlate with disease progression in human colon cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology.*, **4**, 549-554 (1995).
- 83) Sanchez V.C., Craig-Lucas A., Wei B.R., Read A., Simpson M., Luo J., Hunter K., Yuspa, S., Chloride intracellular channel protein 4 (CLIC4) is a serological cancer biomarker released from tumour epithelial cells via extracellular vesicles and required for metastasis. *Journal of Extracellular Vesicles.*, **7**, 58-58 (2018).
- 84) Sanchez V.C., Craig-Lucas A., Cataisson C., Carofino B.L., Yuspa S.H., Crosstalk between tumour and stroma modifies CLIC4 cargo in extracellular vesicles. *Journal of Extracellular Biology.*, **2**, e118 (2023).