

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：84404

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16611

研究課題名(和文) 悪性腫瘍の浸潤転移を抑制するタンパク質CLIC2をもとにした膠芽腫治療薬の開発

研究課題名(英文) Development of a glioblastoma treatment based on CLIC2, a protein that inhibits invasion and metastasis of malignant tumors

研究代表者

尾崎 沙耶(Ozaki, Saya)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・病院・専門修練医

研究者番号：50898799

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：CLIC2は塩化物イオンチャネルタンパク質ファミリーの一種で、生物学的意義は不明であった。本研究では、ラットを用いたin vivo実験でCLIC2の強制発現が予後を改善させることを示した。また、CLIC2はC6細胞内ではゴルジ体または分泌顆粒に局在して細胞外に分泌され、MMP14に結合しその活性を抑制することでがん細胞の転移浸潤を抑制することを明らかにした。一方で、正常脳組織においては主にマイクログリアに発現し、貪食能を亢進させることを見出した。CLIC2の発現誘導により悪性腫瘍の転移浸潤を抑制することに加え、脳腫瘍におけるマイクログリアでのCLIC2の機能解明を目指して研究を継続している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん・悪性腫瘍研究の中でCLIC2の機能を扱った原著論文は少ない。その中で、ラットモデルを用いてCLIC2が悪性腫瘍の転移・浸潤を抑えることを見出し、そのメカニズムがMMP14の活性阻害であることを初めて示した。また、同時に腫瘍細胞内のCLIC2と、正常組織内のCLIC2の働きが異なる可能性についても示した。CLIC2由来ペプチドは、MMP14に局限して作用する画期的な新薬候補となるものと期待している。

研究成果の概要(英文)：CLIC2 was found as a member of a family of chloride ion channel proteins, and its biological significance was unknown. In this study, we show that forced expression of CLIC2 improves prognosis in in vivo experiments using rats. We also showed that CLIC2 localizes to the Golgi apparatus or secretory granules in C6 cells and is secreted extracellularly, and that CLIC2 binds to MMP14 and suppresses its activity, thereby inhibiting metastatic invasion of cancer cells. On the other hand, we found that CLIC2 is mainly expressed in microglia in normal brain tissue and enhances phagocytosis. In addition to suppressing further metastatic invasion of malignant tumors by inducing CLIC2 expression, we are continuing our research to elucidate the function of CLIC2 in microglia in brain tumors.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：CLIC2 invasion metastasis MMP brain tumor

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) Chloride intracellular channel protein 2 (CLIC2)は後生動物で広く保存されている CLIC ファミリータンパク質の一つで、in vitro 実験系では塩化物イオンチャンネルを形成するとされてきたが、実際に何をしているかはよくわかっていない。CLIC2 はこれまでにほとんど研究されておらず、特に腫瘍との関連では報告があまりない。

(2) 愛媛大学医学系研究科分子細胞生理学講座では、Wistar ラットと C6 グリオーマ細胞株を使用した浸潤性の高い膠芽腫モデル (Kobayashi et al., Neoplasia 2016)および、肺転移モデル (Kuwabara et al., BBRC, 2018)を開発している。これらの原発巣、転移巣における RNA 発現の比較から CLIC2 が転移浸潤の抑制に関わり、さらには正常組織や良性腫瘍が転移・浸潤を起こさない理由となっていると予想された。

(3) また、CLIC2 は正常組織血管内皮細胞に特異的に発現しており、タイトジャンクションの維持に重要な働きをしていることを報告した(Ueno, Ozaki et al, Tissue Barriers, 2019)。実際に、脳腫瘍においても、髄膜腫 Grade I の CLIC2 発現は特に高く、膠芽腫や Grade II 髄膜腫では低いことが判明し、CLIC2 発現の高さは PFS の長さとの正の相関をしていた。CLIC2 のメカニズムの追究を行なった結果、MMP14 の内因性阻害剤として機能する可溶性タンパク質であることが明らかになった。

(4) MMP14 も転移浸潤を抑制する上で、極めて優れた標的であることは理解されているが、その阻害剤は臨床応用には至っていない。CLIC2 由来ペプチドは、MMP14 に限局して作用するため、画期的な新薬候補となるものと期待された。

(5) 従来、良性腫瘍がなぜ転移浸潤しないのか、さらに言えば、正常臓器・組織の細胞がなぜ、他処に転移していかないのか、よくわかっていなかった。CLIC ファミリーは、後生動物に広く保存されているため、生命現象の根幹に関わるものと想定されてきたが、その本質的な役割は不明のままであった。組織や器官の分化が生じて以降は、正常細胞はその場所にとどまる必要があり、その根本的メカニズムの解明にも寄与できる可能性があるかと期待された。

### 2. 研究の目的

(1) 本研究では、当初 CLIC2 の MMP14 活性抑制ドメインを同定し、安全で新規な MMP14 阻害剤開発に向けたプロトタイプとなることを示し、膠芽腫の浸潤抑制剤として使用することを目指した。

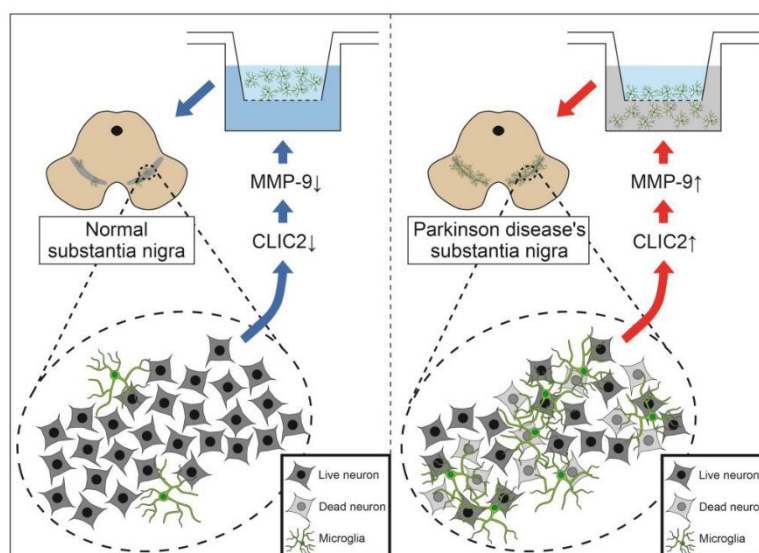
(2) しかし、特にグリオブラストーマの手術に臨床応用する場合、脳内の CLIC2 の生理的な分布や機能についてあらかじめ理解する必要があると考え、まず正常 Wistar ラット及びヒト脳組織における CLIC2 の局在を調べた。その結果、CLIC2 が主に発現していたマイクログリアに焦点を当て、正常細胞における CLIC2 の機能を解明することも目的に追加した。

### 3. 研究の方法

- (1) CLIC2 を強制発現、あるいはノックダウンしたラット C6 細胞およびマイクログリアの作製
- (2) ラット脳を用いた免疫染色による CLIC2 発現部位の同定
- (3) ゼイモグラフィやウエスタンブロッティングによる MMP 2 および MMP 9 の活性・発現測定
- (4) 遺伝子組み換え CLIC2 タンパク質合成
- (5) CLIC2 発現を変動させた細胞による invasion assay
- (6) ミトコンドリア機能測定

#### 4. 研究成果

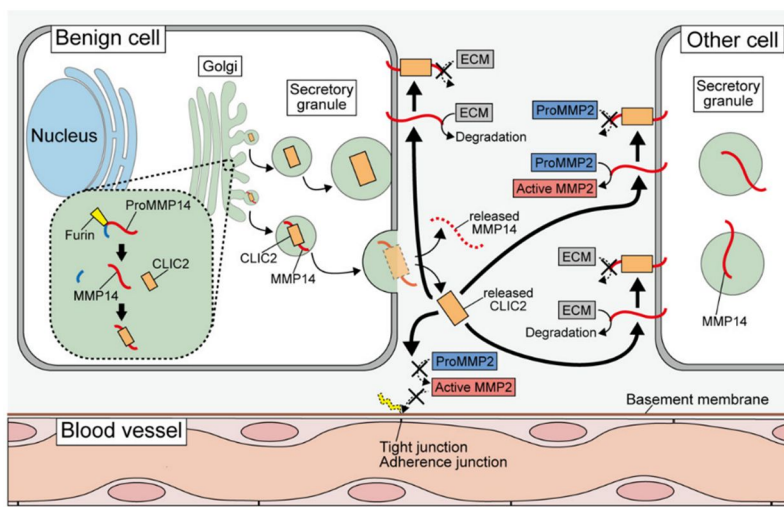
(1) CLIC2 が主に発現していたマイクログリアに対して LPS を投与すると、CLIC2 と CD68、Cathepsin S、F4/80 など貪食関連遺伝子発現は低下し、逆に起炎症性サイトカインの発現は上昇した。また、貪食実験や浸潤実験においては、CLIC2 タンパクの添加で貪食能および浸潤能の亢進、CLIC2 ノックダウンによってそれらの抑制が確認された。また、CLIC2 添加により MMP14 および MMP9 の活性化が確認され、ノックダウンによって消失した。これらの結果から、正常脳内における主たる CLIC2 発現細胞であるマイクログリアでは、CLIC2 は MMP 活性を上昇させることが示され、同時に浸潤能・貪食能亢進にも寄与すると考えられた(Choudhury, Ozaki, et al. Brain Sci 2022.)。



CC BY DOI: 10.3390/brainsci13010055

(2) また、CLIC2 にはヒト、ラットともにエクソン 1 からの転写の有無により生じるスプライシングバリエーションが存在すると予想されたことから、2 種類のバリエーション(予測分子量の大小により CLIC2-L 及び CLIC2-S と呼称)をコードする cDNA に対するプライマーを調製して、RT-PCR を行なった。その結果、実際に 2 種類の CLIC2 の存在が明らかになり、CLIC2-L は主に、血管内皮細胞に発現することを見出した(未発表)。

(3) 従来の常識と反して、CLIC2 は分泌タンパク質であって腫瘍細胞の MMP14 活性を抑制して、その浸潤能を低下させることを示した(Ozaki et al. Neoplasia 2021)。一方、CLIC ファミリーの中で最も研究が進んでいる CLIC4 は悪性脳腫瘍で高発現しているが、MMP14 活性がなく、逆に活性を亢進させた。ただし、正常脳内における主たる CLIC2 発現細胞であるマイクログリアでは、CLIC2 は MMP 活性を上昇させることが示され、同時に浸潤能も上昇、貪食能も亢進させた。今回の結果を踏まえると、グリオブラストーム手術において腫瘍摘出時に生じた空間周囲に CLIC2 を散布するとした場合、腫瘍細胞の浸潤は抑制されるはずであるが、同時にマイクログリアの貪食能や運動能が亢進することになる。脳腫瘍時のマイクログリアの役割についてはよくわかっておらず、マイクログリアのこのような機能変化が脳腫瘍の進展にどのような影響を与えるのか、また、CLIC2 の新たなバリエーションである CLIC2-L の血管内皮細胞における役割について一層の解明が必要となった。悪性腫瘍細胞で高発現している CLIC4 の発現抑制と同時に CLIC2 の発現を誘導することで悪性腫瘍のさらなる転移浸潤を抑制することに加え、脳腫瘍におけるマイクログリアでの CLIC2 の機能解明を目指して研究を継続している。(Ozaki et al. Cancers 2022)。



CC BY DOI: 10.3390/cancers14194890

< 引用文献 >

1) A Truncated form of CD200 (CD200S) Expressed on Glioma Cells Prolonged Survival in a Rat Glioma Model by Induction of a Dendritic Cell-Like Phenotype in Tumor-Associated Macrophages

Kobayashi K, Yano H, Umakoshi A, Matsumoto S, Mise A, Funahashi Y, Ueno Y, Kamei Y, Takada Y, Kumon Y, Ohnishi T, Tanaka J.

Neoplasia. 2016 Apr;18(4):229-41. doi: 10.1016/j.neo.2016.02.006.

2) Truncated CD200 stimulates tumor immunity leading to fewer lung metastases in a novel Wistar rat metastasis model

Kuwabara J, Umakoshi A, Abe N, Sumida Y, Ohsumi S, Usa E, Taguchi K, Choudhury ME, Yano H, Matsumoto S, Kunieda T, Takahashi H, Yorozuya Y, Tanaka J.

Biochem Biophys Res Commun. 2018 Feb 5;496(2):542-548. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.01.065. Epub 2018 Jan 12.

3) Chloride intracellular channel protein 2 in cancer and non-cancer human tissues: relationship with tight junctions.

Ueno Y, Ozaki S, Umakoshi A, Yano H, Choudhury ME, Abe N, Sumida Y, Kuwabara J, Uchida R, Islam A, Ogawa K, Ishimaru K, Yorozuya T, Kunieda T, Watanabe Y, Takada Y, Tanaka J.

Tissue Barriers. 2019;7(1):1593775. doi: 10.1080/21688370.2019.1593775. Epub 2019 Mar 31.

4) Chloride intracellular channel protein 2 is secreted and inhibits MMP14 activity, while preventing tumor cell invasion and metastasis

Ozaki S, Umakoshi A, Yano H, Ohsumi S, Sumida Y, Hayase E, Usa E, Islam A, Choudhury ME, Nishi Y, Yamashita D, Ohtsuka Y, Nishikawa M, Inoue A, Suehiro S, Kuwabara J, Watanabe H, Takada Y, Watanabe Y, Nakano I, Kunieda T, Tanaka J.

Neoplasia. 2021 Aug;23(8):754-765. doi: 10.1016/j.neo.2021.06.001. Epub 2021 Jul 3.

5) Chloride Intracellular Channel Protein 2 Promotes Microglial Invasion: A Link to Microgliosis in the Parkinson's Disease Brain

Choudhury ME, Ozaki S, Miyae N, Matsuura T, Mikami K, Islam A, Kubo M, Ando R, Yano H, Kunieda T, Nagai M, Tanaka J.

Brain Sci. 2022 Dec 28;13(1):55. doi: 10.3390/brainsci13010055.

6) Chloride Intracellular Channel Proteins (CLICs) and Malignant Tumor Progression: A Focus on the Preventive Role of CLIC2 in Invasion and Metastasis

Ozaki S, Mikami K, Kunieda T, Tanaka J.

Cancers (Basel). 2022 Oct 6;14(19):4890. doi: 10.3390/cancers14194890.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Saya Ozaki, Akihiro Umakoshi, Hajime Yano, Shota Ohsumi, Afsana Islam, Mohammed E Choudhury, Yusuke Nishi, Daisuke Yamashita, Yoshihiro Ohtsuka, Masahiro Nishikawa, Akihiro Inoue, Satoshi Suehiro, Jun Kuwabara, Hideaki Watanabe, Yasutsugu Takada, Yuji Watanabe, Ichiro Nakano, Takeharu Kunieda, Junya Tanaka	4. 巻 23
2. 論文標題 Chloride intracellular channel protein 2 is secreted and inhibits MMP14 activity, while preventing tumor cell invasion and metastasis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neoplasia	6. 最初と最後の頁 754-765
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neo.2021.06.001.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ozaki Saya, Mikami Kanta, Kunieda Takeharu, Tanaka Junya	4. 巻 14
2. 論文標題 Chloride Intracellular Channel Proteins (CLICs) and Malignant Tumor Progression: A Focus on the Preventive Role of CLIC2 in Invasion and Metastasis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 4890 ~ 4890
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers14194890	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Choudhury Mohammed E., Ozaki Saya, Miyae Noriyuki, Matsuura Taisei, Mikami Kanta, Islam Afsana, Kubo Madoka, Ando Rina, Yano Hajime, Kunieda Takeharu, Nagai Masahiro, Tanaka Junya	4. 巻 13
2. 論文標題 Chloride Intracellular Channel Protein 2 Promotes Microglial Invasion: A Link to Microgliosis in the Parkinson's Disease Brain	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Brain Sciences	6. 最初と最後の頁 55 ~ 55
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/brainsci13010055	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 尾崎沙耶、田中潤也、山下大介、井上明宏、末廣諭、西川真弘、大塚祥浩、渡邊英昭、國枝武治
2. 発表標題 CLIC2によるMMP14活性抑制を介した浸潤転移の抑制効果
3. 学会等名 日本脳神経外科学会 第80回学術総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------