

ヒト卵巣腫瘍嚢胞液中に分泌される細胞外基質分解酵素 と内因性特異的インヒビターの解析

学位論文内容の要旨

I. 目的

癌の組織浸潤, 転移では細胞外基質の分解が起こる. 浸潤の第一歩として蛋白分解酵素による基底膜破壊は重要で, 癌では腫瘍-間質の蛋白分解酵素とそのインヒビターの活性量に関するホメオスタシーが破綻し, 基底膜破壊と細胞外基質分解が進む. 基底膜を構成するtype IV コラーゲンの分解酵素であるmatrix metalloproteinase-2 (MMP-2), MMP-9をはじめ各種MMPsの解析がこれまでなされてきた. しかし, 腫瘍に誘導される血管内皮細胞, 線維芽細胞もMMPや, 内因性特異的インヒビターである tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) を分泌することから, 塊状の腫瘍検体を用いた解析は必ずしも腫瘍細胞由来の蛋白分解酵素活性を反映しない. このため生体内での癌細胞由来MMPsやTIMPsの発現・活性調節機構はまだ不明な点が多い. 卵巣の上皮性腫瘍の多くは嚢胞を形成しながら発育し, 腫瘍細胞が嚢胞中に分泌する基底膜分解酵素は各腫瘍型に特異的な性質を反映すると考えられる. 本研究では, 卵巣腫瘍嚢胞液中に分泌される種々の基質分解酵素を解析し, 腫瘍の生物学的悪性度との関連を検討した.

II. 材料および方法

1. 嚢胞液の採取と調整

卵巣腫瘍嚢胞液62検体を採取し4°Cで1500g10分間遠心後, 上清を-80°Cで保存した. 冷凍嚢胞液は4°Cで解凍し蛋白濃度を測定した. 希釈倍率は蛋白濃度, 粘稠度により調整した.

2. ゼラチンザイモグラフィによるMMP-2, MMP-9の検出

調整された嚢胞液とsample bufferを混合し, 0.1%ゼラチン含有10%ポリアクリルアミドゲル上に電気泳動し展開した. 泳動後, ゲルを2.5%Triton-Xで洗浄し sodium dodecyl sulfateを除去し, 10mM Tris pH8.0, 0.5mM CaCl₂, 10⁻⁶M ZnCl₂を含む溶液にて37°C16時間インキュベートした. その後ゲルをCoomassie brilliant blueで染色し, 脱色処理した. 検出されたMMP-9とMMP-2の潜在型と活性型のバンドは電気泳動解析ソフトで数値化, 測定した. MMP活性化率は, 活性型/(潜在型+活性型)で算出した.

3. カゼインザイモグラフィによるMMP-3, MMP-7, トリプシンの検出

調整された嚢胞液を0.1%カゼイン含有12%ポリアクリルアミドゲル上で電気泳動し展開した. 泳動後の処理, 解析方法はゼラチンザイモグラフィによる方法に準じた.

4. Western blottingによるMMPs, トリプシンの同定

嚢胞液の蛋白濃度を10 μ g/20 μ lに調整し, 10%ポリアクリルアミドゲル上で4°Cで電気泳動し展開した. ニトロセルロース膜に蛋白を転写し, 一次, 二次抗体に反応させ露光した.

5. ELISAによるMMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2濃度の測定

96穴プレートに希釈検体を加え反応・洗浄後、ペルオキシダーゼ標識抗体を加えて各々指定時間反応させた。3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine添加30分後に1N硫酸で反応を終了させ吸光度計にて測定した。

6. 免疫染色

摘出卵巣腫瘍の一部を採取し、periodate-lysine paraformaldehyde液に4°Cで24時間固定後、パラフィン包埋し厚さ4 μ mの切片を作製した。LSAB法により免疫染色を行った。

III. 結果

1. 粘液性腫瘍における悪性度別のMMPs, TIMPs濃度

MMP-9は腺癌, LMP, 腺腫の順に高値であった。TIMP-1はLMP, 腺癌, 腺腫の順に高値であった。MMP-2は腺癌が最高値を示したが、各群間に明らかな差を認めなかった。TIMP-2は腺腫, 腺癌, LMPの順に高値であった。TIMP-1/MMP-9モル比は腺腫, LMP, 腺癌の順に高値であった。TIMP-2/MMP-2モル比は腺腫, 腺癌, LMPの順に高値であった。

2. ザイモグラフィを用いた粘液性腫瘍におけるMMPsの発現と活性化の検討

MMP-9, MMP-2は腺癌およびLMPでは40倍、腺腫は20倍～40倍希釈で同定された。MMP-9は腺癌およびLMPには100%に、腺腫には80%に認められた。MMP-2は粘液性腫瘍全例に認められた。これらの発現はWestern blottingでも確認された。MMP-9/MMP-2比は腺癌, LMP, 腺腫の順に高値であった。MMP-9活性化率は腺癌, LMP, 腺腫の順に高値であった。MMP-2活性化率は腺癌, LMP, 腺腫の順に高値であったが、各群間で有意差は認められなかった。MMP-7活性化率は腺癌では他群より高値であったが、各群間に有意差は認められなかった。MMP-3, MMP-7, トリプシンは腺癌とLMPでは5倍～10倍、腺腫では2倍～10倍希釈で同定され、Western blottingにより確認した。これらの酵素は腺癌およびLMPでは腺腫より高頻度に発現し、MMP-3やトリプシン陽性群のMMP-9とMMP-7の活性化は陰性群より亢進していた。

3. 粘液腺腫瘍における免疫染色によるMMPsの発現の局在の検討

悪性、良性腫瘍ともにMMPsの局在は上皮細胞が主体で、囊胞液中の諸酵素が上皮由来と考える本研究の前提が確認された。MMP-2, MMP-9は上皮細胞周囲の線維芽細胞にも弱い陽性所見が得られ、MMP-7は上皮細胞と一部の毛細血管内皮細胞に発現が認められた。

4. その他の組織型の卵巣腫瘍におけるMMPs, TIMPsの検討

漿液性腺癌, 同LMP, 明細胞腺癌, 類内膜腺癌, 転移性卵巣癌では全例にMMP-9陽性所見が認められ、良性漿液性腫瘍ではMMP-9陰性例が46.1%存在した。MMP-9活性化率は転移性卵巣癌>明細胞腺癌>漿液性囊胞腺癌の順であった。MMP-2は全例に潜在型と活性型が認められた。MMP-9/MMP-2比は悪性>良性の傾向がみられた。また、その他の悪性腫瘍で52.4%に、良性漿液性で30.8%にMMP-3陽性であった。MMP-7は、その他の悪性腫瘍で76.2%に、良性漿液性で30.8%に陽性であった。MMP-7活性型は明細胞腺癌1例にのみに認められた。TIMP-1/MMP-9, TIMP-2/MMP-2比は漿液性でも良性>悪性であった。

IV. 考察

MMPsは潜在型として組織内に存在し、TIMPsによって活性調節を受け、MMP-9はTIMP-1と、MMP-2はTIMP-2と1:1の複合体を形成するが、過剰のMMPs産生やTIMPsの相対的低下により基底膜破壊や浸潤が進行すると予想される。今回の解析で、TIMPs/MMPs比は悪性<良性で、MMP-9, MMP-2活性化率は悪性度と相関して増大した。粘液性卵巣腫瘍では悪性度に相関してTIMPs/MMPs比の均衡崩壊が進み、MMP活性化が亢進し、囊胞液はこの傾向を特異的に反映す

と考えられた。MMP-7は上皮性癌細胞に発現すると報告されているが、段階的悪性度との関連は不明であった。今回の結果から、MMP-7は悪性度の増加に応じて量的、質的亢進が起これると思われ、トリプシンはセリンプロテアーゼの一種で、悪性腫瘍にも存在する。今回トリプシンは粘液性腫瘍6例にのみ認められ、他の組織型にはみられず、組織型により異なる発現をする酵素である可能性が示唆された。トリプシン、MMP-3は他のMMP活性化を促進するといわれ、これらの陽性例は陰性例に比べMMP-7、-9活性化の亢進がみられた。

V. 結論

これらの結果は、囊胞液中に分泌される基質分解酵素が、腫瘍内で進行している一連の基質分解酵素の相互作用を反映し、また腫瘍の悪性度とも相関することを示すと思われた。今後、囊胞液の解析が悪性卵巣腫瘍の予後因子となるか、また悪性度を判別するうえで補助的診断価値を有するかなど、臨床応用の可能性について詳細な検討が必要である。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 吉 木 敬

副 査 教 授 細 川 真澄男

副 査 教 授 藤 本 征一郎

学 位 論 文 題 名

ヒト卵巣腫瘍嚢胞液中に分泌される細胞外基質分解酵素 と内因性特異的インヒビターの解析

癌の浸潤の第一歩として蛋白分解酵素による基底膜破壊は重要で、癌では腫瘍一間質の蛋白分解酵素とそのインヒビターの活性量に関するホメオスタシスが破綻し、基底膜破壊と細胞外基質分解が進む。基底膜構成 IV 型コラーゲンの分解酵素である matrix metalloproteinases (MMPs) の解析がこれまでなされてきた。しかし、血管内皮細胞、線維芽細胞等も MMPs や、内因性特異的インヒビターである tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs) を分泌することから、塊状の腫瘍検体を用いた解析は必ずしも腫瘍細胞由来の蛋白分解酵素活性を反映しない。このため生体内での癌細胞由来 MMPs や TIMPs の発現・活性調節機構は未だ不明な点が多い。上皮性卵巣腫瘍の多くは嚢胞を形成しながら発育し、腫瘍細胞が嚢胞中に分泌する基底膜分解酵素は各腫瘍型に特異的な性質を反映すると考えられる。本研究では、卵巣腫瘍嚢胞液中に分泌される種々の基質分解酵素を解析し、腫瘍の生物学的悪性度との関連を検討した。

定性・半定量解析にはザイモグラフィを施行した。卵巣腫瘍嚢胞液 62 検体を採取し 4℃ で遠心後、蛋白濃度を測定した。蛋白濃度、粘稠度により希釈調整された嚢胞液をゼラチン含有ポリアクリルアミドゲル上に電気泳動し展開した。検出された MMP-9、-2 の潜在型と活性型のバンドは泳動解析ソフトで数値化、測定した。活性化率は、活性型 / (潜在型 + 活性型) で算出した。また、カゼイン含有ポリアクリルアミドゲル上でも同様に電気泳動し展開した。ザイモグラフィで得られたバンドが目的の MMPs であることを確認する目的で Western blotting を施行した。定量的解析には ELISA を施行した。96 穴プレートに希釈検体を加え反応・洗浄後、ペルオキシダーゼ標識抗体を加えて各々指定時間反応させた。反応終了後、吸光度計にて測定した。嚢胞液に分泌される酵素が腫瘍細胞由来であることを確認する目的で、periodate-lysine paraformaldehyde 液固定パラフィン包埋切片を用いて、LSAB 法にて免疫染色を行った。

ELISA の結果、MMP-9、TIMP-1 は粘液性悪性腫瘍では良性腺腫より高値を示した。MMP-2 は悪性度に関連しなかった。TIMP-2 は悪性が良性より低値であった。TIMP-1/MMP-9、TIMP-2/MMP-2 モル比は悪性度と負の相関を示した。

ザイモグラフィの結果、MMP-9、-2 は粘液性腺癌では 40 倍、良性腺腫では 20～40 倍希

釈で同定された。MMP-9 の発現率は悪性>良性であった。MMP-2 は粘液性腫瘍全例に認められた。MMP-9/-2 比, MMP-9, -2 活性化率は悪性度と相関した。MMP-3, -7, トリプシンは悪性では 5~10 倍, 良性では 2~10 倍希釈で同定された。これらの酵素は悪性では良性より高頻度に発現し, トリプシン陽性群の MMP-9, -7 の活性化は陰性群より亢進していた。

免疫染色においては, 悪性, 良性腫瘍ともに MMPs の局在は上皮細胞が主体で, 囊胞液中の諸酵素が上皮由来と考える前提が確認された。MMP-2, -9 は上皮細胞周囲の線維芽細胞にも弱い陽性所見が得られ, MMP-7 は上皮細胞と一部の毛細血管内皮細胞に発現が認められた。

粘液性腺癌以外の上皮性悪性腫瘍でも全例に MMP-9 陽性所見が認められ, 一方漿液性腺腫では MMP-9 陰性例が 46.1%存在した。MMP-2 は全例に認められた。MMP-9/MMP-2 比は悪性>良性の傾向がみられた。MMP-3 陽性率は悪性> 良性漿液性であった。MMP-7 陽性率は, 悪性>良性漿液性であった。TIMP-1/MMP-9, TIMP-2/MMP-2 比は漿液性でも悪性度と負の相関を示した。

本研究では, TIMPs/MMPs 比は悪性<良性で, MMPs 活性化率は悪性度と相関した。卵巣腫瘍では悪性度に相関して TIMPs/MMPs 比の均衡崩壊が進み, MMPs 活性化が亢進し, 囊胞液はこの傾向をよく反映することが示された。MMP-7 は上皮性癌細胞に発現すると報告されているが, 悪性度との関連は不明であった。本研究から, MMP-7 は悪性度に相関して量的, 質的に亢進することが示された。トリプシンは MMPs を活性化し, 悪性腫瘍にも存在するが, トリプシンは粘液性腫瘍にのみ発現し, 組織型により規定される可能性が示された。また陽性例では MMP-7, -9 活性化の亢進がみられた。

口頭発表に際し, 副査の細川真澄男教授から本研究結果が過去の MMPs, TIMPs に関連する報告に矛盾しないものであるかどうか, TIMP-1/MMP-9 比が TIMP-2/MMP-2 比よりも大幅に高いことの理由に関する質問があった。また, MMPs 活性化因子と MMPs 活性化との関連についての考察を求められた。副査の藤本征一郎教授から ELISA における MMPs, TIMPs の測定感度, 特に活性型 MMPs の定量性に関する質問があった。また, 今後本研究の臨床への応用に対する考察を求められた。主査の吉木 敬教授からは MMPs と TIMPs の産生部位について, 生体内における両者の局在や両者の比率を, 二重染色などを用いてもっと詳細に検討する必要があるとの助言を受けた。さらに, 分子細胞病理学講座の長嶋和郎教授から mRNA レベルでの発現の違いについての文献的考察と, 卵胞に対する MMPs, TIMPs の関与についての質問があった。申請者は実験結果と既報の成績に基づいて, 臨床的な考察をも交えて概ね妥当な回答をなした。

本研究は, 囊胞形成性卵巣腫瘍の囊胞液中の TIMPs/MMPs 比の減少, および MMP-3, MMP-7, トリプシン陽性率の増加が, 腫瘍の悪性度を判定する上での新たな基準となりうることを示唆している。これらの知見には, 卵巣腫瘍の予後因子としての, また悪性度の補助的診断マーカーとしての価値を有するかなど, 今後臨床応用の可能性が期待される。

審査員一同は, これらの研究成果を評価し, 大学院課程における研鑽も併せ申請者が博士(医学)の学位を受ける資格を有するものと判定した。