

学 位 論 文 題 名

9, 10-dimethyl-1, 2-benzanthracene (DMBA)

誘発ハムスター頬嚢粘膜癌の発癌過程における
マトリックスメタロプロテアーゼ発現に関する研究

学位論文内容の要旨

【緒言】

マトリックスメタロプロテアーゼ（matrix metalloproteinase : MMP）は細胞外基質の分解にかかわる主要なプロテアーゼである。癌研究においては、これまでに癌細胞およびそれらを取りまく細胞が産生するMMPが癌の浸潤・転移に深く関与することが明らかにされてきた。ところが近年、MMPによる細胞外基質分解が癌化の初期過程においても重要な役割を担っていることが明らかとなり、さらにMMPの過剰発現によって癌化が起こりやすくなるという事実も報告されている。MMPの発現量が癌化と相関するのであれば、その発現量は口腔白板症などの前癌病変のmalignant potentialを知るうえでの重要な指標となり得る可能性がある。しかし、実際の発癌過程においてMMPがどの程度発現し、推移していくかについてはこれまでまったく解明されていない。そこで、本研究では口腔粘膜の発癌過程における組織中のMMP発現量の推移を明らかにする事を目的として、口腔扁平上皮癌での発現が確認されているゼラチナーゼ群（MMP-2およびMMP-9）について、DMBA誘発ハムスター頬嚢粘膜癌を用いて検討した。さらに、臨床検体を用いて口腔白板症および扁平上皮癌でのゼラチナーゼ群の発現を検索し、実験的発癌での結果と合わせてmalignant potentialの指標になり得るかどうかを検討した。

【材料と方法】

発癌実験は生後6週齢のゴールデンハムスター60匹（DMBA群48匹，対照

群12匹)を用い、DMBA群は0.5% DMBA含有ミネラルオイル溶液を週3回隔日に、左右頬嚢粘膜全体に均等に塗布した。DMBA塗布開始後4, 8, 12, 16週の時点で各群ごとに屠殺し、病理組織、RNAおよび蛋白検索用試料を採取した。対照群はそれぞれの期間ミネラルオイルのみを塗布し、実験群と同様に試料を採取した。ゼラチナーゼの検出はゼラチンを基質としたザイモグラフィにて行った。すなわち、検索試料の蛋白濃度を測定後、0.1%ゼラチン含有10%ポリアクリルアミドゲル上で、10 μ g蛋白を含む検体を4℃、非還元状態で電気泳動した。ゲルを洗浄後、活性化緩衝液にて37℃、20時間インキュベートした。その後、ゲルを0.25%クマジーブリリアントブルーR250で染色し、10%酢酸添加20%メタノール溶液で脱色した。

検出されたゼラチナーゼがメタロプロテアーゼであることを確認するため、各種プロテアーゼインヒビター存在下にザイモグラフィを試行した。さらに、MMPとしての諸性質が本研究で検出されたゼラチナーゼでもみられるかどうかを検討するとともに、ヒトMMP-9 cDNA断片をプローブとしてノーザンブロット分析を行い、検出ゼラチナーゼの同定を試みた。また、microdissectionを行い試料を上皮と間質とに分けて回収することにより、ゼラチナーゼの局在を検討した。

ヒト口腔白板症4例および扁平上皮癌2例の生検または手術材料を用いて、ザイモグラフィならびに抗ヒトMMP-9モノクローナル抗体による免疫組織化学染色を行い、臨床検体におけるゼラチナーゼ発現を検索した。

【結果】

1. 肉眼的および病理組織学的変化

対照群では全経過を通して肉眼的および病理組織学的に変化はみられなかったが、DMBA群では16週では全例に腫瘤形成がみられ、組織学的には経時的に上皮過形成から異形成、初期癌を経て浸潤癌にいたる一連の組織像が観察された。

2. 発癌過程におけるゼラチナーゼの検出

DMBA誘発ハムスター頬嚢粘膜癌の発癌過程において、2種類のゼラチナーゼ活性が検出された。67kDaの活性は対照群にもみられたが、105kDaの活性はDMBA群にのみ認められ、さらに癌化に伴って発現量は有意に増加し

ており、癌化と105kDaのゼラチナーゼ発現量との正の相関が認められた。

3. 検出ゼラチナーゼの同定と発現部位

1mM EDTAによりゼラチナーゼ活性の阻害がみられ、また試料に1mM APMAを加え37℃でインキュベーションした後ザイモグラフィーを行ったところ、105kDaのバンドは96kDaを経て86kDaに移行し、同様に67kDaのバンドは47kDaを経て39kDaへ移行していた。さらに、ヒトMMP-9 cDNA断片を用いたノーザンブロット分析では4週および8週群ではMMP-9 mRNAの発現はみられなかったが、12週群では弱く、16W群では比較的強く発現し、経時的に増加していた。また、microdissectionによるサンプルのザイモグラフィーでは2種類のゼラチナーゼは上皮、間質ともに存在していた。

4. 口腔白板症および扁平上皮癌におけるゼラチナーゼの発現

白板症および口腔癌の臨床検体を用いたザイモグラフィーではMMP-2については白板症および扁平上皮癌の間で大きな発現量の違いはみられなかった。しかし、MMP-9の発現は白板症では弱く、扁平上皮癌では比較的強く認められ、抗ヒトMMP-9抗体による免疫組織化学染色の結果でも同様な結果であった。

【考察】

口腔粘膜の実験的発癌過程における組織中のゼラチナーゼ群の発現量の推移をザイモグラフィーを用いて検討したところ、2種類のゼラチナーゼ活性が検出され、特に105kDaの活性はDMBA群にのみ認められ、さらに癌化に伴って発現量は有意に増加しており、癌化と105kDaのゼラチナーゼ発現量との間に正の相関が認められた。しかし、検出されたゼラチナーゼの分子量はヒトのゼラチナーゼ群の分子量とは異なり、またこれまでハムスターにおけるゼラチナーゼの研究が全くないため、検出されたゼラチナーゼの同定を試みた。その結果、各種プロテアーゼインヒビターによる阻害の有無およびAPMAによる分子量の変化などより、これらゼラチナーゼはMMPであり、いずれも前駆体として組織中に分泌されていることが示唆された。さらに、105kDaのゼラチナーゼはヒトMMP-9 cDNA断片を用いたノーザンブロット分析の結果等よりMMP-9であると考えられた。また、癌組織では癌細胞自身が産生するMMPに加え、癌細胞が何らかの因子を介して宿主細胞におけるMMPの産生、

分泌を刺激すると考えられており、本研究でも2種類のゼラチナーゼは上皮、間質ともに存在していることが確認された。

ヒト口腔白板症および扁平上皮癌におけるゼラチナーゼ発現は動物実験の結果と一致しており、ヒトにおいても白板症から扁平上皮癌への癌化とともにMMP-9の発現量は増加することが示唆され、癌化とMMP-9の発現量は関連することが推測された。

【結語】

以上の動物および臨床検体を用いた実験結果より、口腔粘膜の癌化とMMP-9の発現量との相関が認められ、MMP-9の発現量は口腔前癌病変のmalignant potentialの指標となり得る可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 福 田 博
副 査 教 授 向 後 隆 男
副 査 教 授 松 本 章

学 位 論 文 題 名

9, 10-dimethyl-1, 2-benzanthracene (DMBA)

誘発ハムスター頬嚢粘膜癌の発癌過程における

マトリックスメタロプロテアーゼ発現に関する研究

審査は、審査担当者全員が一堂に会し、口頭にて行った。まず、論文提出者に研究の概要の説明を求めた。論文提出者は、論文別刷りに基づき、研究内容を明快に説明した。

論文の概要は以下の通りである。

マトリックスメタロプロテアーゼ (matrix metalloproteinase : MMP) は細胞外基質の分解にかかわる主要なプロテアーゼである。近年、MMPによる細胞外基質分解が癌化の初期過程において重要な役割を担っていることが明らかとなり、さらにMMPの過剰発現によって癌化が起りやすくなるという事実も報告されている。しかし、実際の発癌過程においてMMPがどの程度発現し、推移していくかについてはこれまでまったく解明されていない。そこで、本研究では口腔粘膜の発癌過程における組織中のMMP発現量の推移を明らかにすることを目的として、口腔扁平上皮癌での発現が確認されているゼラチナーゼ群 (MMP-2およびMMP-9) について、DMBA誘発ハムスター頬嚢粘膜癌を用いて検討した。さらに、ヒト口腔白板症および扁平上皮癌でのMMPの発現を検索し、実験的発癌での結果と合わせてMMP発現量が口腔前癌病変のmalignant potentialの指標になり得るかどうかを検討した。

材料と方法

発癌実験は生後6週齢のゴールデンハムスターを用い、0.5% DMBA含有ミネラルオイル溶液を週3回隔日に頬嚢粘膜に塗布した。DMBA塗布開始後4, 8, 12, 16週の時点で屠殺し、病理組織、RNAおよび蛋白検索用試料を採取した。対照群はそれぞれの期間ミネラルオイルのみを塗布し、同様に試料を採取した。ゼラチナーゼの検出はゼラチンを基質としたザイモグラフィーにて行い、生化学的および分子生物学的方法によりその同定を試みた。また、microdissectionを行うことにより、ゼラチナーゼの局在を検討した。さらに、ヒト口腔白板症および扁平上皮癌を用いて、ザイモグラフィーならびに免疫組織化学染色を行い、臨床検体におけるMMP発現を検索した。

実験結果および結論

1. 発癌過程におけるゼラチナーゼの検出

DMBA誘発ハムスター頬嚢粘膜癌の発癌過程において、2種類のゼラチナーゼ活性が検出された。67kDaの活性は対照群にもみられたが、105kDaの活性はDMBA群にのみ認められ、さらに癌化に伴って発現量は有意に増加しており、癌化と105kDaのゼラチナーゼ発現量との正の相関が認められた。

2. 検出ゼラチナーゼの同定と発現部位

各種プロテアーゼインヒビターを用いた実験では1mM EDTAにより活性阻害がみられた。また、試料に1mM APMAを加えザイモグラフィーを行ったところ、105kDaのバンドは96kDaを経て86kDaに移行し、同様に67kDaのバンドは47kDaを経て39kDaへ移行していた。さらに、ノーザンブロット分析ではMMP-9 mRNAの発現は4週および8週群ではみられなかったが、12週群では弱く、16W群では比較的強く発現し、経時的に増加していた。また、これらゼラチナーゼは上皮、間質ともに存在していた。

3. ヒト口腔白板症および扁平上皮癌におけるゼラチナーゼの発現

白板症および口腔癌を用いたザイモグラフィーではMMP-2については発現量に大きな違いはみられなかったが、MMP-9の発現は白板症では弱く、扁平上皮癌では比較的強く認められ、抗ヒトMMP-9抗体による免疫組織化学染色の結果も同様であった。

以上の動物および臨床検体を用いた実験結果より、口腔粘膜の癌化とMMP-9の発現量との相関が認められ、MMP-9の発現量は口腔前癌病変のmalignant potentialの指標となり得る可能性が示唆された。

続いて、審査担当者から本研究およびその関連事項について種々の質問がされた。

1) 実験法の細部に関して。

2) ハムスターのMMPとヒトのMMPとの類似性についてなど、動物実験と臨床検体との関連に関して。

3) 癌細胞の異型性の程度とMMP発現との関連、癌病巣におけるMMPの発現部位すなわち局在について、また、白板症症例の中にもやや強い発現が認められたものがあつたことについてどう考えるかなど、MMP発現と臨床所見あるいは病理組織所見との関連について。

4) 引用論文の内容に関して。

5) 本研究の独創性、本研究の今後の発展性および臨床応用について。

これらの質問に対して、論文提出者はそれぞれ明快に回答した。

以上より、本論文内容が高く評価されるとともに、本論文提出者は、本研究を中心に広い知識を有し、博士（歯学）を授与するに値するものと判定された。