

学 位 論 文 題 名

悪性黒色腫における E1AF,
MT1-MMP 発現の浸潤能への関与

(Upregulation of Membrane-type1 Matrix Metalloproteinase correlate
with the expression of E1AF in Malignant Melanoma)

学位論文内容の要旨

悪性黒色腫はメラノサイトに由来する悪性腫瘍であり、リンパ行性または血行性に広範な早期転移をきたし、極めて悪性度が高いことが知られている。しかし、悪性黒色腫の高い浸潤・転移能がどのような機構によって制御されているかについての詳細は明かではない。

がん細胞の浸潤において細胞外基質 (extracellular matrix; ECM) の分解は重要なステップであり、この過程にはマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) を含む種々のプロテアーゼが関与していることが報告されている。MMP は現在までに 20 種類以上発見されており、異なった基質特異性を示すことが報告されている。MMP の中でもゼラチナーゼ群に属する MMP-2 (ゼラチナーゼ A) と MMP-9 (ゼラチナーゼ B) は基底膜の主成分である IV 型コラーゲンを分解するため、がんの浸潤・転移に深く関わっている。一般に MMP は潜在型 (proMMP) として細胞外へ分泌され、セリンプロテアーゼ等の酵素によって N 末端が切断され活性化型へと移行し、初めて酵素活性を発揮する。MMP-2 の活性化機序は長い間不明であったが、1994 年 Sato らによって proMMP-2 の活性化因子として MT1-MMP (MMP-14) がクローニングされた。

MT1-MMP は腫瘍細胞が発現する膜型 (membrane type; MT) MMP で、Tissue Inhibitor of

Metalloproteases-2 (TIMP-2) を介して proMMP-2 と結合し膜結合型の三分子複合体を形成する。ただし、この複合体に酵素活性はなく、proMMP-2 を活性化しないが、この複合体に近接する free の MT1-MMP が MT1-MMP/TIMP-2 に結合する proMMP-2 を活性化することが報告されている。また MT1-MMP 自体にも I、II、III 型コラーゲン、ファイブロネクチンを分解する機能をもつことから、最近では種々の腫瘍において MT1-MMP の発現が腫瘍細胞の浸潤・転移能に深く関わっていると考えられているが、その発現の転写調節機構については未だ不明な点が多い。

ets がん遺伝子群の一つである E1AF は 1993 年に Higashino らによってアデノウイルスの初期転写因子である E1A のエンハンサー領域に結合するヒト細胞の転写因子としてクローニングされた。これまでに 30 種類以上 *ets* がん遺伝子群が知られているが、E1AF は *ets1*, *ets2* などの他の *ets* がん遺伝子とほとんど相同性が認められない。しかし、先にマウスで発見された PEA3 (Polyoma Enhancer Activator 3) とは 90% 以上の相同性を有しており E1AF は mouse PEA3 のヒト相同遺伝子であることが明らかになった。

Higashino は E1AF が MMP-1, -3, -9, の 3 つの異なる MMP の転写を亢進することを CAT assay により示した。実際、E1AF は高い浸潤能を有する口腔扁平上皮がん HSC3 において、MMP-1, -9 の転写を亢進し、浸潤能に関連している可能性が示唆され、さらに浸潤活性の低い乳がん細胞株 MCF-7 へ E1AF のプラスミドを遺伝導入すると MMP-9 を発現し浸潤能と運動能が亢進した。逆に、HSC3 に anti-sense E1AF プラスミドを遺伝し導入すると、MMP の発現低下を伴うがん細胞の浸潤抑制がみられ、E1AF による MMP の活性化が上皮系腫瘍の浸潤増殖に深く関わっていることが明らかになった。悪性黒色腫ではその発がん機構に *ras* がん遺伝子の関与などが報告されているが、浸潤形質の発現に関して遺伝レベルの報告は少なく、*ets* がん遺伝子の発現、および浸潤能への関与についての検索はほとんどなされていない。

MT1-MMP の転写調節領域の塩基配列の検索によって MT1-MMP 遺伝子のプロモーター領

域にも E1AF の結合モチーフが認められた。Taguchi らは N-myc が発現している神経線維腫細胞株 5 株を用いて検索を行い、中でも N-myc が強発現している 3 株についてはノーザンブロッティングにおいて E1AF、MT1-MMP の発現量が亢進しており、さらに invasion assay の結果とも相関が認められたと報告している。また Habelhah らはマウス線維肉腫細胞株 (QR-32) に E1AF cDNA を遺伝子導入し、ノーザンブロッティングによって E1AF と MT1-MMP の発現量について検索を行ったところ、両者に有意な相関が認められ、さらに親株と比較して E1AF を遺伝子導入した QR-32 は強い浸潤活性と転移能を認めたと報告している。このような結果は E1AF が MT1-MMP の転写を亢進することによって腫瘍細胞の浸潤性を増強することを強く示唆している。

そこで、転移形質が強く悪性度の高い腫瘍として知られている悪性黒色腫細胞 4 株 (TXM18、UT、MEW0、96E) より抽出した RNA を用いてノーザンブロッティングならびに定量 RT-PCR により E1AF と、がん細胞が発現し浸潤活性と密接な関係が示されている MT1-MMP の発現について検索を行った。定量 RT-PCR は、ライトサイクラー (Roche) を用いて Hybridization probe 法により計測を行った。内部標準コントロールとしては GAPDH を、E1AF と MT1-MMP の陽性コントロールとして線維肉腫細胞株 HT1080、陰性コントロールとして乳がん細胞株 MCF7 を用いた。悪性黒色腫の全ての細胞株において mRNA レベルで E1AF と MT1-MMP の高い発現が認められた。さらに、それらの浸潤活性について IV 型コラーゲンを主成分とするマトリゲルを用いた *in vitro* invasion assay で検索を行った。Spearman の回帰分析を用いて統計学的にこれらのデータの比較検討を行ったところ E1AF と MT1-MMP の発現量に著明な相関が認められ ($P=0.0001$)、E1AF および MT1-MMP の発現量と浸潤能は明らかに相関していた。 ($P=0.0006$ 、 $P=0.0014$) またゼラチンザイモグラフィを用いた検索では、全ての悪性黒色腫の無血清培養上清において MMP-2 の発現が認められた。以上の結果から、悪性黒色腫細胞株において、E1AF の発現が MT1-MMP の転写を亢進し、浸潤性を増強することが示唆された。

このような *in vitro* での結果が実際の悪性黒色腫症例でも生じているかどうかを明らかにするために、無色素性悪性黒色腫患者から採取した臨床サンプルを用いて検索を行った。その結果、E1AF の強い発現とこれに 관련된 MT1-MMP の発現が認められた。このような所見は、培養細胞系だけではなく、実際の悪性黒色腫の浸潤・転移形質の発現にも E1AF による MT1-MMP の転写亢進が関与していることを示す新しい知見であった。

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 戸 塚 靖 則
副 査 助 教 授 進 藤 正 信

学 位 論 文 題 名

悪性黒色腫における E1AF, MT1-MMP 発現の浸潤能への関与

(Upregulation of Membrane-type1 Matrix Metalloproteinase correlate
with the expression of E1AF in Malignant Melanoma)

審査は向後、戸塚、進藤、および福田審査員全員が出席のもとに、口頭で行われた。
まず申請者から提出論文の内容の説明を受けた。概要は以下の通りである。

論文の概要

悪性黒色腫は神経堤由来のメラノサイトもしくは母斑細胞が悪性化したもので、リンパ行性あるいは血行性に広範な早期転移をきたし、極めて悪性度が高いことが知られている。

がん細胞の浸潤において細胞外基質(extracellular matrix;ECM)の分解は重要なステップで、この過程にはマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)を含む種々のプロテアーゼが関与していることが報告されている。現在 20 種類以上の MMP が発見され、異なった基質特異性を示すことが報告されている。MMP-2 はⅣ型コラーゲンの分解活性を持つことから腫瘍細胞の基底膜を破壊するメカニズムと深く関わっており、MMP-2 の発現とがん細胞の浸潤・転移との関連が注目されている。MT1-MMP は腫瘍細胞が発現する膜型 MMP で、潜在型 MMP-2 の腫瘍細胞膜上での活性化因子であるとともにⅠ、Ⅱ、Ⅲ型コラーゲン、ファイブロネクチンを分解する機能をもつことから、がん細胞での MT1-MMP の発現が浸潤・転移能と深く関わっていることが示唆されているが、MT1-MMP の転写調節機構については未だ不明な点が多い。

E1AF は *ets* がん遺伝子群転写因子で、我々はこれまでに E1AF が複数の MMP の転写を活性化し、口腔扁平上皮がん細胞の浸潤に関わっていることを報告してきた。MT1-MMP の

転写調節領域の塩基配列の検索によって MT1-MMP 遺伝子のプロモーター領域にも E1AF の結合モチーフが認められ、E1AF が MT1-MMP の転写を亢進することによって腫瘍細胞の浸潤性を増強することが示唆された。

そこで、転移形質が強く悪性度の高い腫瘍として知られている悪性黒色腫細胞 4 株および 1 例の口腔悪性黒色腫患者からの新鮮材料より抽出した RNA を用いて Northern blotting ならびに定量 RT-PCR により E1AF と、がん細胞が発現し浸潤活性と密接な関係が示されている MT1-MMP の発現について検索を行った。

悪性黒色腫の全ての細胞株において mRNA レベルで E1AF と MT1-MMP の相関する発現が認められた。さらに、ゼラチンザイモグラフィを用いた検索では、全ての悪性黒色腫の無血清培養上清において MMP-2 の発現が十分に認められた。以上の結果から、*in vitro* では悪性黒色腫細胞において、E1AF の発現が MT1-MMP の転写を亢進し、浸潤性を増強することが示唆された。それらの発現量は *in vitro* invasion assay による浸潤活性の検索結果とも一致していた。悪性黒色腫の臨床サンプルを用いた検索においても E1AF の強い発現とこれに相關した MT1-MMP の発現が認められた。

このような所見は、悪性黒色腫においても E1AF による MT1-MMP の転写亢進が生じ、悪性黒色腫の悪性形質の一つである高い浸潤活性の発現に E1AF を介した MT1-MMP の転写亢進が深く関わっていることを示唆するものであった。

ついで各審査委員から申請者に対し、本論文の内容とそれに関連する項目について質問が行われた。主な質問は以下の通りである。

- 1) 悪性黒色腫細胞株における MT1-MMP の発現量はノーザンブロットイングおよび定量 PCR においてほぼ一致した結果といえるが、E1AF ではずれが生じている。これは何故生じたと考えられるか。
- 2) 悪性黒色腫は扁平上皮癌に比しても明らかに生物学的悪性度が高いと考えられるが、それにも関わらず、悪性黒色腫臨床サンプルの E1AF, MT1-MMP の発現量は、浸潤性増殖をしめす扁平上皮癌よりも低い値となっているがそれについては、どのように考えるか。
- 3) 悪性黒色腫の生物学的悪性度が他のがんと比べても非常に高い原因としてどのようなことが考えられるか。

これらの質問に対して申請者は明快に回答した。

さらに、本実験に対する今後の展望について、今回用いた悪性黒色腫の臨床サンプルは 1 例のみであるが今後、さらにサンプル数を増やし、より厳密な結果を得たいと考えている。また今後は、MT1-MMP のプロモーター領域の deletion mutant を用いて MT1-MMP に実際に E1AF が結合し、転写活性を亢進するか CAT assay で検索を進めていく予定である。

同時に、悪性黒色腫細胞株に RNAi を遺伝子導入し、E1AF を不活化した場合に MT1-MMP の発現量が減少するかについても現在追加実験中である旨の説明があった。

本研究は、悪性黒色腫の浸潤・転移機構の解明に大きく寄与するものである。また、今後の研究結果が、悪性度のスクリーニング、あるいは遺伝子治療による浸潤・転移抑制などに役立つ可能性があり、医歯学の発展に貢献する研究であると評価された。

また申請者は本研究を中心に関連領域に関して博い知識を有し、博士（歯学）の授与に値すると判定された。