学位論文題名

舌扁平上皮がんにおける E1AF による
MT1-MMP の発現亢進と悪性形質との関連

学位論文内容の要旨

【緒言】 がんの浸潤転移は細胞接着の減少、運動能の亢進など様々なステップを経て生じる。その中でもマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) のようなプロテアーゼによる細胞外基質 (ECM) の分解が重要な役割を担っている。

E1AFは、N末端側に転写活性化に関わっているacidic domain、glutamine rich domain、C末端側にDNA結合配列であるets domainを機能構造としてもつetsがん遺伝子群転写因子である。これまでに、E1AFはMMP-1、-3、-9の転写を亢進し、口腔扁平上皮がん由来細胞株や実際の患者でE1AFの発現亢進がMMPの活性化を導き、腫瘍細胞の浸潤性増殖に関連していることが報告されている。MMP-2はMMP-9と同様のtype IVコラゲナーゼ/ゼラチナーゼで、その転写調節領域にはets結合配列が存在することが示されているが、MMP-2のreporter assayを行ったところ、E1AFによる転写亢進はみられなかった。頭頸部がんではリンパ節転移とMMP-2の発現が相関していることが報告されており、MMP-2の転写活性化機構にE1AFがどのように関わっているのかについて検索することは意味のあることと思われる。MMP-2は潜在型MMP-2として主に周囲間質細胞から分泌され、その活性化には膜型マトリックスメタロプロテアーゼ1(MT1-MMP)が関与していることが示されている。MT1-MMPのプロモーター領域の塩基配列を検索するとSP1やCCAAT-boxなどの転写因子結合モチーフに加えて、Ets結合モチーフが存在した。

今回、MMP-2の活性化に深く関わりとされるMT1-MMPの活性化にE1AFが関与しているかどうか、さらに舌扁平上皮がんの浸潤・転移活性にE1AFとMT1-MMPの発現が関係しているかについて検討を行った。

【材料と方法・結果】 MT1-MMPのプロモーター領域(-998~+192)を組み込んだCAT reporter plasmid 5 μ g と E1AF 発現ベクターpCMVE1AF 0.5, 2, 5, 10 μ g をヒト骨肉腫細胞株 MG63 に遺伝子導入し、E1AFによるMT1-MMPの活性化について検索した。E1AFの遺伝子導入により、濃度依

存性に MT1-MMP の転写亢進が認められ、E1AF 発現ベクターを 10 μ g 導入したものでは E1AF を導入しないものに比べて、40 倍以上の転写活性化が認められた。

北海道大学歯学部付属病院口腔外科で治療を行った舌扁平上皮がん 25 例の新鮮材料から抽出した RNA を用い、定量 RT-PCR により E1AF と MT1-MMP の発現について検索した。その結果、25 症例中 13 例に E1AF の高発現が認められ、この 13 例中 11 例 (85%) は MT1-MMP を高発現していた。これに対して、E1AF が低発現であった 12 症例のうち MT1-MMP を高発現している症例は 4 症例 (33%) のみで、E1AF と MT1-MMP の発現は有意に相関していた ($p < 0.05$)。

凍結新鮮標本の得られた 18 症例について *in situ* zymography を行い、ゼラチナーゼの活性の有無を調べた。ゼラチナーゼ活性は 8 例に認められ、これらは MMP インヒビター (1-10-phenanthroline) 処理によりその活性が抑制されたことから、type IV コラゲナーゼ/ゼラチナーゼを発現していることが明らかになった。定量 PCR で MT1-MMP を高発現している 11 症例中 7 症例でゼラチナーゼ活性が認められ、両者は有意の相関を示していた ($p < 0.05$)。

定量 PCR および *in situ* zymography の結果と臨床病理学的パラメーターとの比較検討を行ったところ、MT1-MMP を高発現していた 15 例中 10 例はリンパ節転移をきたしており、低発現症例では 10 例中 4 例にのみ転移が認められた。

【考察】 今回著者は、E1AF が MT1-MMP を転写亢進することを見いだした。CAT reporter assay で、E1AF は MT1-MMP の転写を濃度依存性に亢進し、E1AF が MT1-MMP promoter を活性化することが証明された。実際の口腔扁平上皮がん症例においても、E1AF と MT1-MMP の相関した発現亢進がみられ、MT1-MMP の発現と *in situ* zymography によるゼラチナーゼ活性の発現には相関性が認められた。このことは、E1AF は直接 MMP-2 の転写活性化を起こさないが、MT1-MMP の発現亢進を介して MMP-2 を活性化し、舌扁平上皮がん細胞の浸潤・転移に関与していることを示唆している。臨床病理学的なパラメーターと比較検討したところ、T 分類、WHO 分類、腫瘍の浸潤様式と E1AF、MT1-MMP の発現との間には有意な関連は認められなかった。しかし MT1-MMP を高発現している症例では、リンパ節転移の多い傾向が認められ、MT1-MMP が舌扁平上皮がんにおいてリンパ節転移の臨床的なパラメーターになりうる可能性を示唆していた。

これまで病理組織学的に浸潤型の増殖を示す口腔扁平上皮がんは悪性度が高く、リンパ節転移等を引き起こし予後不良であり、一方膨張型の増殖を示すものは悪性度が低いと考えられてきた。実際、今回検索した 25 例のなかで膨張型の増殖を示した 10 例中転移の認められたものは 4 例にすぎず、一方浸潤型 15 例中 11 例に転移がみられ、腫瘍の浸潤様式が転移を含めた予後に深く関わっていることは実際に明らかである。その一方で、術前の臨床病理学的な予測と

は異なる進展を示す腫瘍も存在し、口腔がんの治療成績の向上を図るためには浸潤・転移機構の解明を通してさらに新しい分子標的の検索による悪性度の評価が必要とされている。今回の検索で、膨張型増殖を示しながら MT1-MMP を高発現していた 6 症例中 3 症例では転移が認められ、膨張型を示す舌扁平上皮がんでも MT1-MMP の発現の高いものは転移が多い傾向を示した。

以上の結果は、E1AF が MT1-MMP の転写亢進を介して MMP-2 を活性化することで口腔扁平上皮がんのリンパ節転移を含む悪性形質の発現と深く関係し、E1AF および MT1-MMP の発現検索が口腔扁平上皮がんの術前予測判定因子の一つとなる可能性を示唆するものであった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 戸 塚 靖 則
副 査 教 授 向 後 隆 男
副 査 教 授 鈴 木 邦 明
副 査 助 教 授 進 藤 正 信

学 位 論 文 題 名

舌扁平上皮がんにおける E1AF による MT1-MMP の発現亢進と悪性形質との関連

審査は、審査員全員出席の下に、申請者に対して提出論文とそれに関連した学科目について口頭試問により行われた。審査論文の概要は、以下の通りである。

E1AF は *ets* がん遺伝子群転写因子の 1 つで、MMP-1、-3、-9 の転写亢進を介して、がん細胞の浸潤・転移に関与することが知られている。MMP-2 は MMP-9 と同様に type IV コラゲナーゼ/ゼラチナーゼで、その転写調節領域に *ets* 結合配列が存在することが知られているが、E1AF による転写亢進はみられない。本研究は、MMP-2 の活性化に深く関わりとされる MT1-MMP の活性化への E1AF の関与、ならびに舌扁平上皮がんの浸潤・転移における E1AF と MT1-MMP の係わりについて検討したものである。

最初に、MT1-MMP のプロモーター領域を組み込んだ CAT reporter plasmid 5 μ g と E1AF 発現ベクター pCMVE1AF 0.5、2、5、10 μ g をヒト骨肉腫細胞株 MG63 に遺伝子導入し、E1AF による MT1-MMP の活性化について検索した。その結果、E1AF の濃度依存性に MT1-MMP の転写亢進が認められた。次いで、北海道大学歯学部付属病院口腔外科で治療を行った舌扁平上皮がん 25 例の新鮮材料から抽出した RNA を用い、定量 RT-PCR により E1AF と MT1-MMP の発現について検索した。その結果、25 症例中 13 例に E1AF の高発現が認められ、この 13 例中 11 例(85%)は MT1-MMP を高発現していた。これに対して、E1AF が低発現であった 12 症例のうち MT1-MMP を高発現している症例は 4 症例 (33%) のみで、E1AF と MT1-MMP の発現の間に有意の相関が認められた($p < 0.05$)。さらに、凍結新鮮標本の得られた 18 症例について *in situ* zymography を行い、ゼラチナーゼの活性の有無を調べた。ゼラチナーゼ活性は 8 例に認められ、これらは MMP インヒビター (1-10-phenanthroline) 処理によりその活性が抑制されたことから、type IV コラゲナーゼ/ゼラチナーゼを発現していることが

明らかになった。定量 PCR で MT1-MMP を高発現している 11 症例中 7 症例でゼラチナーゼ活性が認められ、一方 MT1-MMP 低発現の 7 症例中ゼラチナーゼ活性が認められのは 1 症例なので、MT1-MMP の発現とゼラチナーゼ活性は有意に相関していた ($p < 0.05$)。これらの結果は、E1AF は、直接 MMP-2 の転写活性化を起こすことはないが、MT1-MMP の発現亢進を介して MMP-2 を活性化し、舌扁平上皮がんのリンパ節転移を含む悪性形質の発現に深く関係していることを示している。

一方、定量 PCR および *in situ* zymography の結果と臨床病理学的パラメーターとの比較では、T 分類、WHO 分類、腫瘍の浸潤様式と E1AF、MT1-MMP の発現との間に有意な関連は認められなかった。しかし、MT1-MMP を高発現していた 15 例中 10 例にリンパ節転移がみられたのに対して、低発現症例では転移は 10 例中 4 例のみで、MT1-MMP が舌扁平上皮がんのリンパ節転移に関して臨床的なパラメーターになる可能性のあることが示唆された。

論文の審査にあたって、論文申請者による研究の要旨の説明後、本研究ならびに関連する研究について質問が行われた。主な質問事項は、E1AF が直接 MMP-2 の転写を亢進しないのはなぜか、MT1-MMP だけではゼラチナーゼ活性を示さないのか、臨床的に見て MMP-2 と MMP-9 とではどちらが浸潤・転移に深く関わっていると考えられるか、口腔癌患者の予後を推定するためには今後どのような研究を行うべきか、等であった。いずれの質問についても、論文申請者から明快な回答が得られ、また将来の研究の方向性についても具体的に示された。本研究は、E1AF は MT1-MMP の発現亢進を介して MMP-2 を活性化させ、舌扁平上皮がんの浸潤や転移に深く係わっていることを明らかにした点が高く評価された。本研究の業績は、口腔外科の分野はもとより、関連領域にも寄与するところ大であり、博士（歯学）の学位授与に値するものと認められた。