

学位論文題名

犬の腫瘍の悪性度における膜結合型
マトリクスメタロプロテイナーゼ阻害因子 RECK
(Reversion inducing cysteine rich protein with Kazal motifs)
発現の意義に関する研究

学位論文内容の要旨

MMP (マトリクスメタロプロテイナーゼ) は細胞外基質蛋白分解酵素の総称であり、腫瘍細胞の浸潤および転移に重要な役割を果たす。特にゼラチナーゼ (IV型コラゲナーゼ) である MMP-2 および MMP-9 の活性が高い腫瘍は悪性傾向が強いと考えられている。

近年、この2つの酵素の分泌および活性化を阻害する RECK (Reversion inducing cysteine rich protein with kazal motifs) が発見され、癌細胞の浸潤能を低下させることが明らかとなった。MMP は血管新生にも重要な役割をはたしており、この血管新生を RECK が抑制することで癌の成長を抑えることが明らかとなっている。この蛋白は細胞膜に結合した形で存在し、ヒトでは臨床例を用いていくつかの腫瘍で予後指標としての有用性が見出されている。さらに、RECK を強制発現させた腫瘍細胞をマウスに移植した実験では、生存期間の有意な延長が認められている。

一方、犬や猫の自然発生腫瘍はヒト腫瘍の動物モデルとして最近注目を集めているが、犬の RECK と自然発生腫瘍症例の予後との関連については未だ明らかにされていない。

そこで、本研究の第1章では、犬の RECK mRNA の発現とその機能を明らかにすることを目的とした。犬の RECK 遺伝子を解析した結果、犬の RECK cDNA の翻訳領域の長さはヒトおよびマウスと同様に 2,913 bp で、その相同性はそれぞれ 92.5 % と 87.1 % であり、翻訳されたアミノ酸配列はそれぞれ 95.5 % と 91.9 % と非常に高い相同性を示し、その特徴的配列がよく保存されていることが分かった。また、正常犬各臓器での RECK mRNA の発現量をリアルタイム PCR 法で定量したところ、ほぼ全組織に発現が認められ、特に肺と精巣で RECK mRNA の発現量が多かった。これらの結果はヒトの報告とほぼ一致し、犬の RECK も非常に似た性質を有するものと推察された。さらに、犬腫瘍細胞株に犬の RECK を強制発現させることにより腫瘍の浸潤能が抑制されることが確認され、他の動物種同様に腫瘍の浸潤および転移に関連が深い蛋白であると考えられた。以上のことから、犬とヒトでの RECK の病態生理学的意義は非常に似ているものと推察された。

次いで第2章では、腫瘍での RECK mRNA 発現について臨床検体および培養細胞を用いてその腫瘍病態との関連を明らかにする目的で実験を行った。すなわち、自然発生腫瘍症例を

用いて *RECK* mRNA 発現量を測定し、その臨床的諸指標と比較した。また、犬の腫瘍細胞株を用いて *RECK* mRNA の発現と MMP-2 および MMP-9 の活性を比較した。36 症例の腫瘍組織と正常組織での *RECK* mRNA 発現量を比較したところ、腫瘍組織では正常組織よりも発現量が少なかった。臨床例の *RECK* mRNA 発現量と年齢、性別、リンパ節および肺転移の有無などとの有意差は認められなかった。Log-rank 検定による生存期間の評価では、*RECK* が高値を示した群では有意に生存期間が延長していた。また、株化腫瘍細胞では骨肉腫以外はほとんど *RECK* mRNA の発現が認められなかった。MMP 活性は株化腫瘍細胞の種類によって異なるが、骨肉腫の肺高転移細胞は元の骨肉腫細胞と比較して *RECK* mRNA 発現量は少なく、MMP 活性は高くなっていた。

第3章では培養腫瘍細胞を用いて、*RECK* mRNA 発現量を低下させる要因を解明する目的で実験を行った。そのため、*RECK* mRNA が高発現している培養細胞として株化骨肉腫細胞に着目し、他の動物種でも犬と同様か否かを調べた。その結果、様々なマウスの腫瘍細胞株と比較して、Dunn 骨肉腫細胞の *RECK* mRNA 発現量は有意に多かった。犬とマウスで株化骨肉腫細胞の *RECK* mRNA 発現量が他の腫瘍細胞よりも多かったことから、*RECK* mRNA 発現量は腫瘍の種類によって異なると思われる。しかしながら一般的に骨肉腫は高率に肺転移を生じる極めて悪性度の高い腫瘍であり、臨床例でほとんど発現がない症例も存在したことから、生体内では *RECK* 発現が低くなっている可能性が示唆された。そのため、マウス移植モデルを用いて免疫染色を行った結果、*in vitro* では *RECK* 陽性であったが、*in vivo* では陰性であった。

このことから何らかの刺激により *RECK* 発現が低下して細胞外基質を分解している可能性が考えられた。このため、*RECK* mRNA 発現量を低下させる因子について明らかにする目的で、Dunn 骨肉腫細胞と基底膜構成成分であるマトリゲルとの接着刺激試験を行った。また、同時に培養上清のゼラチナーゼ活性も測定した。その結果、マトリゲルとの接触刺激により *RECK* mRNA 発現量低下と pro-MMP-9 分泌の増加を認めた。さらにマトリゲル構成成分に対する反応について調べたところ、主にラミニンがその働きをしていると思われる。*RECK* mRNA 発現量を低下させる要因については明らかにされておらず、本実験の成果は骨肉腫の腫瘍病態を明らかにする上で有用な成績であると思われる。

以上の結果をまとめると、犬の *RECK* は過去に報告されているヒトとマウスの *RECK* と非常によく似たアミノ酸構造を有し、腫瘍の浸潤能を抑制することが確認された。また、ほとんどの腫瘍臨床例および培養細胞で正常組織と比較して *RECK* の発現が著しく低いか、認められなかった。*RECK* mRNA 発現量が多い症例では生存期間の延長が認められ、予後因子として検討する価値があるものと推測された。また、骨肉腫細胞株は他と比較して発現が多く、細胞外基質、特にラミニンとの接触によって発現の調整を受けている可能性が示唆された。犬の腫瘍症例で生検材料が少量しか得られず、病理組織学的所見のみでは予後判定が困難な症例に遭遇した際に補助的指標として *RECK* mRNA 発現の評価は有用であると思われる。

学位論文審査の要旨

主査 教授 藤 永 徹
副査 教授 斉 藤 昌 之
副査 助教授 落 合 謙 爾
副査 助教授 奥 村 正 裕

学位論文題名

犬の腫瘍の悪性度における膜結合型

マトリクスメタロプロテイナーゼ阻害因子 RECK

(Reversion inducing cysteine rich protein with Kazal motifs)

発現の意義に関する研究

マトリクスメタロプロテイナーゼ (MMP) は細胞外基質蛋白分解酵素の総称で、特にMMP-2 および MMP-9 の活性が高い腫瘍は悪性傾向が強いと考えられている。近年、この二つの酵素の分泌および活性化を阻害して腫瘍細胞の浸潤能を低下させる RECK が発見された。この蛋白は細胞膜に結合しており、ヒトでは腫瘍症例において予後指標としての有用性が見出されている。一方、犬の RECK と腫瘍症例の予後との関連については未だに明らかにされていない。申請者は、犬の腫瘍の悪性度に関する RECKの発現調節と臨床病理学的意義に関して検討し、以下の成績を得た。

まず、正常犬の RECK 遺伝子の cDNA クローニングを実施し、その特徴的配列が動物種間でよく保存されていることを明らかにした。また、リアルタイム PCR 法による RECK mRNA の定量法を確立し、正常組織での発現を確認した。

次いで、犬の自然発生症例の腫瘍組織の RECK mRNA 発現量を測定し、その臨床的諸指標と比較した。その結果、腫瘍組織では正常組織よりも RECK mRNA 発現量が少なく、RECK が高値を示した群では有意に生存期間が延長していた。また、株化腫瘍細胞では骨肉腫のみが高い発現量を示すことを確認した。

最後に、培養骨肉腫細胞株を用いて、RECK mRNA 発現量を減少させる要因を解明する目的で実験を行った。その結果、基底膜構成成分との接触刺激により RECK mRNA 発現量減少と前駆型 MMP-9 の分泌増加が生じることを確認し、主にラミニンがその

働きをしていることを明らかにした。

以上のように申請者は、犬の自然発生腫瘍の悪性度における RECK の分子生物学的意義の解明に貢献し、犬の腫瘍症例の悪性度判定における補助的指標としての臨床病理学的診断への応用に有用な基礎的知見を提供した。よって審査員一同は、上記博士論文提出者高木哲氏の博士論文は、北海道大学大学院獣医学研究科規程第 6 条の規定による本研究科の行う博士論文の審査に合格と認めた。