

学 位 論 文 題 名

Prognostic values of matrix metalloproteinase
(MMP)-family expression in human colorectal carcinoma

(ヒト大腸癌におけるMMP遺伝子ファミリーの
予後予測因子としての有用性)

学位論文内容の要旨

【緒言】

大腸癌は悪性新生物の中で最もよくみられる癌腫の1つである。大腸癌により死に至る要因は原発巣そのものよりも遠隔転移の影響による。遠隔転移をきたす最も重要な過程は細胞外基質や基底膜の分解であり、これにより腫瘍細胞の脈管やリンパ管への浸潤が可能となる。これまで腫瘍細胞が転移を起こす過程に関連のある因子が数多く報告されている。マトリックスメタロプロテアーゼ・ファミリーは細胞外基質分解酵素であり、25種類以上が同定されている。さまざまな細胞外基質に対する分解活性を有することから遠隔転移に関連する因子の中でもその解明に重要な鍵を握る因子として注目されてきた。そして、多くの実験系において腫瘍の浸潤・増殖、遠隔転移において重要な役割を果たしていることが実証されている。一般的にMMP遺伝子群は癌の悪性度を増す方向のみに働くと考えられていたが、近年、逆に転移を抑制しているものの存在も報告され、複雑な相互関係の下に作用していることが徐々に明らかになっている。従って、これまで行われてきたような単一因子の生物学的一側面のみを検討では全体の構造的・機能的連関や予後への影響を正しく評価することは困難であると考えられる。本研究ではヒト大腸癌及び正常大腸粘膜、肝転移巣における抑制因子(*TIMP*、*RECK*)も含めたMMP遺伝子群の発現を包括的・定量的に解析した。そして、その発現様式と大腸癌の再発や予後における関連を検討した。

【対象と方法】

北海道大学病院腫瘍外科およびその関連病院においてインフォームドコンセントの得られた大腸癌患者から手術切除された癌組織 112 例、正常粘膜組織 20 例および肝転移組織 11 例を対象とした。肝転移組織 11 例のうち 8 例は原発組織も得られている。解析の対象とした遺伝子は 22 個(MMP17 個、*TIMP*4 個、*RECK*)である。手術切除組織より全 RNA を抽出して逆転写反応を行い、cDNA を得た。cDNA を鋳型に各遺伝子に特異的なプライマーを用いて定量的リアルタイム PCR を行った。各遺伝子の発現量は、内部標準として用いた β -アクチン遺伝子の発現量で補正した相対比で表した。免疫組織学的解析は、一次抗体にマウス抗ヒト MMP-1 モノク

ローナル抗体およびウサギ抗ヒト MMP-15 ポリクローナル抗体を用いた酵素抗体法で行った。統計学的解析は StatView 5.0 を用いて二群間比較では Mann-Whitney U-test、Wilcoxon signed-rank test を行い、予後解析においては生存曲線に Kaplan-Meier 法を用い、generalized Wilcoxon test にて検定を行った。独立予後因子の解析には Cox proportional hazards model を用いた。

【結果】

(1) 各組織での MMP 遺伝子群の発現様式を比較、検討した。大腸癌組織では MMP-1、-3、-7、-9、-10、-11、-12、-14 の発現が高く ($p<0.01$)、正常粘膜組織では RECK の発現が高かった ($p<0.0001$)。手術時に肝転移を認めた大腸癌原発巣と肝転移巣の比較では MMP-1、-10、-11 の発現が原発巣で高く ($p<0.01$)、TIMP-1 の発現が肝転移巣で高かった ($p<0.01$)。さらに、大腸癌組織および肝転移組織の両方を得ることができた 8 検体について比較したところ、MMP-1、MMP-11 は肝転移巣で発現が低下していたが、TIMP-1 は肝転移巣で高くなっていた ($p<0.05$)。特に MMP-1 は 8 例中 7 例が肝転移巣で極めて低い発現を示した。

(2) 臨床病理学的因子による大腸癌原発組織での発現を検討した。肝転移を認めない大腸癌組織で MMP-12 の発現が高かった ($p<0.0001$)。

(3) 再発群と無再発群での大腸癌原発組織における各遺伝子の発現を検討した結果、MMP-15 のみに有意差がみられ、無再発群において高かった ($p<0.01$)。予後解析では、MMP-15 は発現が高いほど無再発生存率が高く ($p<0.01$)、逆に MMP-19 は発現が低いほど無再発生存率が高いという結果が得られた ($p<0.05$)。独立な予後因子に関する検討の結果、無再発生存率で MMP-15 のみに有意差がみられた (hazard ratio, 0.099; $p<0.05$)。

(4) 腫瘍組織での MMP-1、MMP-15 蛋白の局在を調べるために高い発現を示した検体に対し免疫染色を行った。MMP-15 蛋白は間質にも極わずかに認められたが、大部分は腫瘍細胞の細胞質に発現がみられた。MMP-1 蛋白の同一個体による原発巣と肝転移巣の染色では、原発巣では腫瘍細胞の細胞質が強く染まっていたが、肝転移巣での染まり方は非常に弱かった。

【考察】

本研究の結果から次の 2 つの事項が明らかになった。(1) 大腸癌組織における MMP 遺伝子群の発現様式が正常粘膜および肝転移巣と大幅に異なり、また (2) 予後との関連において MMP-15 が無再発生存に強くかわり再発予測における指標として有用であるということである。

(1) 大腸癌組織と正常粘膜組織における比較では 9 個の遺伝子において発現に差があり、手術時に肝転移を認めた大腸癌組織と肝転移巣との比較では 4 個の遺伝子で有意差を認めた。さらに、原発巣と肝転移巣の両方を得ることができた 8 検体について、同一患者間での比較では 3 遺伝子で有意差がみられた。これら 3 遺伝子のうち、特に注目したのは MMP-1 であり、8 例中 7 例が肝転移巣で極めて低い発現を示していた。免疫染色による MMP-1 蛋白の発現においても同様の傾向がみられた。この結果より腫瘍細胞が転移巣を形成する際、原発巣とは異なった MMP 遺伝子群の表現型を有している、もしくは MMP の発現が腫瘍細胞を取り巻く微小環境に影響を受けているということが示された。このように、大腸において正常粘膜で形成されている MMP 遺伝子群の遺伝子間ネットワークは癌化することにより大きく異なり、転移を起

こすことで原発巣とは発現様式が異なる腫瘍細胞に変化するということが明らかになった。

(2) 無再発生存における解析で *MMP-15* が独立な予後因子であるという結果が得られた。興味深いことは、*MMP-15* はその発現が高いほど無再発生存率が高く大腸癌の予後に好影響を与える可能性が高いということである。*MMP-15* は膜型 *MMP* に属しており、*proMMP-2* の活性化に係る因子であると考えられている。このため一般的に癌の悪性度を増す方向に関与するという考え方が大部分を占めており、これまで乳癌や子宮頸癌、卵巣癌において報告されている。また最近では anti-apoptotic factor として *MMP-15* の重要性が報告されている。しかし、膀胱癌において癌組織での *MMP-15* の発現が非癌部組織よりも低いとの報告や癌の浸潤・増殖には関連がないとする報告があり、*MMP-15* の機能の詳細は未だ判明していない。今後、更なる *MMP* 遺伝子群の解析や *MMP-15* の癌における役割を解明する研究が必要であると考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 秋 田 弘 俊
副 査 教 授 守 内 哲 也
副 査 教 授 近 藤 哲

学 位 論 文 題 名

Prognostic values of matrix metalloproteinase (MMP)-family expression in human colorectal carcinoma

(ヒト大腸癌におけるMMP遺伝子ファミリーの
予後予測因子としての有用性)

大腸癌は悪性新生物の中で最もよくみられる癌腫の1つである。大腸癌により死に至る要因は原発巣そのものよりも遠隔転移の影響による。遠隔転移をきたす最も重要な過程は細胞外基質や基底膜の分解であり、これにより腫瘍細胞の脈管やリンパ管への浸潤が可能となる。これまで腫瘍細胞が転移を起こす過程に関連のある因子が数多く報告されている。マトリックスメタロプロテアーゼ・ファミリーは細胞外基質分解酵素であり、25種類以上が同定されている。さまざまな細胞外基質に対する分解活性を有することから遠隔転移に関連する因子の中でもその解明に重要な鍵を握る因子として注目されてきた。一般的にMMP遺伝子群は癌の悪性度を増す方向のみに働くと考えられていたが、近年、逆に転移を抑制しているものの存在も報告され、複雑な相互関係の下に作用していることが徐々に明らかになっている。従って、これまで行われてきたような単一因子の生物学的一側面のみを検討では全体の機能的関連や予後への影響を正しく評価することは困難であると考えられる。本研究ではヒト大腸癌及び正常大腸粘膜、肝転移巣における抑制因子(*TIMP*、*RECK*)も含めたMMP遺伝子群の発現を包括的・定量的に解析した。そして、その発現様式と大腸癌の術後再発における関連を検討した。

北海道大学病院第二外科およびその関連施設 21 施設においてインフォームドコンセントの得られた大腸癌患者から切除された原発組織 112 検体、正常粘膜組織 20 検体および肝転移組織 11 検体を対象とした。肝転移組織 11 検体のうち 8 検体は原発組織も得られている。解析の対象とした遺伝子は 22 個 (*MMP*17 個、*TIMP*4 個、*RECK*) である。切除組織より全 RNA を抽出して逆転写反応を行い、cDNA を得た。cDNA を鋳型に各遺伝子に特異的なプライマーを用いて定量的リアルタイム PCR を行った。各遺伝子の発現量は、内部標準として用いた β -アクチン遺伝子の発現量で補正した相対比で表した。免疫組織学的解析は、一次抗体にマウス抗ヒト MMP-1 モノクローナル抗体およびウサギ抗ヒト MMP-15 ポリクローナル抗体を用いた酵素抗体法で行った。統計学的解析は StatView 5.0 を用いて二群間比較では Mann-Whitney U-test、

Wilcoxon signed-rank test を行い、予後解析においては生存曲線に Kaplan-Meier 法を用い、generalized Wilcoxon test にて検定を行った。独立予後因子の解析には Cox proportional hazards model を用いた。

各組織での MMP 遺伝子群の発現様式を比較検討した。大腸癌原発組織では MMP-1、-3、-7、-9、-10、-11、-12、-14 の発現が高く ($p < 0.01$)、正常粘膜組織では RECK の発現が高かった ($p < 0.0001$)。手術時に肝転移を認めた大腸癌原発巣と肝転移巣の比較では MMP-1、-10、-11 の発現が原発巣で高く ($p < 0.01$)、TIMP-1 の発現が肝転移巣で高かった ($p < 0.01$)。さらに、大腸癌原発組織および肝転移組織の両方を同一患者で得ることができた 8 検体について比較したところ、MMP-1、MMP-11 は肝転移巣で発現が低下していたが、TIMP-1 は肝転移巣で高くなっていた ($p < 0.05$)。臨床病理学的因子による大腸癌原発組織での発現を検討した結果、肝転移を認めない大腸癌原発組織で MMP-12 の発現が高かった ($p < 0.0001$)。再発群と無再発群での大腸癌原発組織における各遺伝子の発現を検討した結果、MMP-15 のみに有意差がみられ、無再発群において高かった ($p < 0.01$)。高発現群と低発現群に中央値で分類し生存曲線を検討した結果、MMP-15 の高発現群で有意に早期再発が少なかった ($p < 0.01$)。独立した予後因子に関する検討の結果、無再発生存率で MMP-15 のみに有意差がみられた (hazard ratio, 0.099; $p < 0.05$)。腫瘍組織での MMP-1、MMP-15 蛋白の局在を調べるために高い発現を示した検体に対し免疫染色を行った。MMP-15 蛋白は間質にもごくわずかに認められたが、大部分は腫瘍細胞の細胞質に発現がみられた。MMP-1 蛋白の同一患者の原発巣と肝転移巣の染色では、原発巣では腫瘍細胞の細胞質が強く染まっていたが、肝転移巣での染まり方は非常に弱かった。

本研究の結果から次の 2 つの事項が明らかになった。(1) 大腸癌組織における MMP 遺伝子群の発現様式が正常粘膜および肝転移巣とは異なり、また (2) 予後との関連において MMP-15 が無再発生存に強くかわり再発予測における指標として有用であるということである。

(1) 大腸癌組織と正常粘膜組織における比較では 9 個の遺伝子において発現に差があり、手術時に肝転移を認めた大腸癌組織と肝転移巣との比較では 4 個の遺伝子で有意差を認めた。さらに、同一患者で原発巣と肝転移巣の両方を得ることができた 8 検体については 3 遺伝子で有意差がみられた。これら 3 遺伝子のうち、特に注目したのは MMP-1 であり、8 例中 7 例が肝転移巣で極めて低い発現を示していた。免疫染色による MMP-1 蛋白の発現においても同様の傾向がみられた。この結果より腫瘍細胞が転移巣を形成する際、原発巣とは異なった MMP 遺伝子群の表現型を有している、もしくは MMP の発現が腫瘍細胞を取り巻く微小環境に影響を受けているということが示された。

(2) 無再発生存における解析で MMP-15 が独立した予後因子であるという結果が得られた。興味深いことは、MMP-15 はその発現が高いほど無再発生存率が高いということである。MMP-15 は膜型 MMP に属しており、proMMP-2 の活性化に係る因子であると考えられている。このため癌の悪性度を増す方向に関与するという考え方が大部分を占めており、これまで乳癌や子宮頸癌、卵巣癌において報告されている。しかし、膵癌において癌組織での MMP-15 の発現が非癌部組織よりも低いとの報告や癌の浸潤・増殖には関連がないとする報告があり、MMP-15 の機能の詳細は未だ判明していない。今後、更なる MMP 遺伝子群の解析や MMP-15 の癌における役割を解明する研究が必要であると考えられた。

口頭発表に続いて、副査守内教授より、MMP-15 と MMP-14 の相関が術後再発にもたらす影響、肝臓以外の転移巣における MMP 遺伝子群の発現様式、MMP 遺伝子群と Wnt シグナルとの

関連についての質問があった。また、副査近藤教授より、多変量解析の結果より得られた独立予後因子間の関連、*MMP-1* が遺伝子発現および免疫染色において原発巣で高く肝転移巣で低下していたことについての考察、*MMP* 遺伝子群間の発現における相関関係についての質問があった。最後に主査秋田教授より、大腸正常粘膜の採取方法、大腸腺腫および大腸上皮内癌における *MMP* 遺伝子群の発現、本研究で使用した検体での *MMP* 遺伝子群の酵素活性の確認、*MMP* 遺伝子発現の相関関係と活性化カスケードとの関連、本研究の今後の展望について質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は主旨をよく理解し自らの研究データと文献的考察を混じえて適切に回答した。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有すると判定した。