

学位論文題名

Low expression of reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs (RECK) indicates a shorter survival after resection in patients with adenocarcinoma of the lung

(肺腺癌における RECK の発現低下は切除後の予後不良因子である)

学位論文内容の要旨

【緒言】

放射線療法や化学療法の進歩にもかかわらず、非小細胞肺癌の最も有効な治療法は根治的切除である。病期IB以上の症例に対しては術前あるいは術後の補助療法を加えて予後を改善する試みがなされているが、肺癌切除術後の5年生存率は本邦の2006年の集計でも61.6%に留まっている。肺癌治療の進歩のためには肺癌の浸潤・転移の分子機構を理解することが重要である。

悪性度の高い腫瘍細胞は容易に周囲組織へと浸潤・転移を来すが、この過程で細胞外基質の分解が必要となる。細胞外基質を分解する酵素の一つにマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) があるが、これはコラーゲンなどの細胞外気質に対して広い分解活性を持っており、過去の報告でも癌の浸潤・転移に重要な役割を持っているとされている。生理的環境ではTIMPなどのMMP抑制因子がMMPの働きを調整している。Reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs (RECK)はMMP抑制因子のひとつであり、MMP-2, MMP-9, MMP-14(MT1-MMP)の活性を抑制し、腫瘍における血管新生や浸潤・転移を抑制することが知られている。各種臓器癌におけるRECKの発現が研究されており、多くは予後との相関を認めている。非小細胞肺癌においても、免疫染色によるRECKの発現と予後に関する研究はなされているが、RECKの標的であるMMP-2, MMP-9, MMP-14との関係は不明である。そこで本研究ではRECKにくわえMMP-2, MMP-9, MMP-14の発現をreal-time RT-PCRで定量的に解析し、様々な臨床病理学的因子や予後との関連を検討した。

【対象と方法】

北海道大学病院腫瘍外科およびその関連施設において2001年5月から2005年5月までに組織提供の同意が得られ治療切除された、肺腺癌46例と肺扁平上皮癌37例および正常肺組織20例を対象とした。すべての組織は癌細胞のみならず、その周囲組織における発現も含めて検討するために、マイクロダイゼクションは行わなかった。得られた切除組織から全RNAを抽出し、逆転写を行ってcDNAを得た。対象とする遺伝子はRECK, MMP-2, MMP-9, MMP-14の4遺伝子とし、これらに特異的なプライマーを設計した。この特異的プライマーを用いて定量的リアルタイムPCRを行った。得られた発現量は内因性コントロールとして用いた $\beta$ -アクチン遺伝子の発現量に対する相対比とした。統計学的解析には

StatView5.0 を用いた。各遺伝子の発現量によってそれぞれ低発現群と高発現群の二群に分けた。二群間の比較には Student's t-test, Mann-Whitney U test を用い、各臨床病理学的因子との比較には the  $\chi^2$  test, Fisher's exact test を用いた。さらに、生存曲線は Kaplan-Meier 法を用い、予後の解析には log-rank test を用いた。予後因子の解析には Cox univariate regression analysis を用いた。

### 【結果】

RECK の発現は腺癌、扁平上皮癌ともに正常組織よりも低発現であった ( $p<0.01$ )。MMP-2 での正常組織と腺癌の間を除き、MMP-2, MMP-9, MMP-14 では正常組織に比べて腺癌、扁平上皮癌での発現が高くなっていた ( $p<0.01$ )。また、腺癌と扁平上皮癌との比較では RECK では発現に差が見られなかったが、MMP-2, MMP-9, MMP-14 では扁平上皮癌で発現が高くなっていた ( $p<0.01$ )。

RECK の発現量で二群に分けて、臨床病理学的因子と比較したところ、腺癌において TNM 分類の T 因子と病期の進んだ群と RECK 低値群に有意な相関が見られた ( $p<0.01$ )。扁平上皮癌では高齢者群と RECK 低値群に有意な相関が認められた ( $p<0.01$ ) が、他の因子と RECK に相関は見られなかった。

無再発生存期間を各遺伝子の発現量を含めて臨床病理学的因子を用いて単変量解析で検討したところ、腺癌では RECK 低発現群 ( $p<0.05$ )、MMP-14 低発現群 ( $p<0.05$ )、TMN における T2 群 ( $p<0.05$ ) が予後不良因子であった。一方、扁平上皮癌ではいずれの因子も予後に差は見られなかった。また、腺癌において RECK 高発現群が低発現群に比し無再発生存率が高かった ( $p<0.05$ )。

さらに、MMP-2, MMP-9, MMP-14 とその抑制因子である RECK の発現量の比で無再発生存期間について検討した。単変量解析では各 MMP/RECK の高値群と低値群との間に差は見られず、扁平上皮癌の MMP-14/RECK を除き低値群での無再発生存率が高い傾向にあったが、有意差は見られなかった。

### 【考察】

本研究では、肺腺癌・扁平上皮癌での RECK の発現が正常組織に比べ低発現となっており、さらには肺腺癌においては進行した癌では RECK の発現が低下しており、RECK の発現が低いもので予後が不良であることを明らかにした。

各種臓器癌と RECK との報告でも正常組織に比べて癌での発現は低下しており、発現が低下した群での予後は不良となっていた。非小細胞肺癌でも同様の報告が免疫染色によりなされている。本研究では定量性に優れるリアルタイム PCR を用いて同様のことを証明した。さらに加えて、RECK の標的である MMP-2, MMP-9, MMP-14 の発現もあわせて検討し、RECK との関連も検討した。腺癌では過去の報告同様に RECK の低発現群での無再発生存率が低かったが、扁平上皮癌では有意差は見られなかった。これは、各 MMP の発現量が扁平上皮癌では正常組織・腺癌よりも非常に高くなっており、扁平上皮癌の高発現群においても MMP を阻害するのに十分な RECK の発現がなかったためではないかと考えられた。そのことを証明するために、MMP と RECK の発現量比での検討も加えた。その結果からは有意差までは見られなかったものの、各 MMP/RECK の低値の群での無再発生存率が高くなる傾向を認めた。その他の要因としては本研究では mRNA での発現を検討しており、RECK や MMP の蛋白発現および活性までは検討しておらず、mRNA の発現がこれらと相関していない可能性も考えられ、今後の検討課題である。

また、RECK と予後との関連から、RECK の発現を増加させることで予後を改善できる可能性も考えられる。erbB2 は HDAC1 及び Sp1 を介して RECK の発現を抑制するが、この HDAC1 の阻害剤である

trichostatin A を用いることで、RECK の発現を増加させることが知られている。同様に NSAIDs も RECK の発現を増加させることが知られている。これらを用いることで予後の改善につながる可能性がある。しかし、これらについてもまだ研究はなされておらず、検討が必要と思われる。

#### 【結語】

RECK の発現低下は肺腺癌切除例の予後不良因子である。

# 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 今村 雅寛  
副査 教授 近藤 哲

## 学位論文題名

### Low expression of reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs (RECK) indicates a shorter survival after resection in patients with adenocarcinoma of the lung

(肺腺癌における RECK の発現低下は切除後の予後不良因子である)

放射線療法や化学療法の進歩にもかかわらず、非小細胞肺癌の最も有効な治療法は根治的切除である。病期IB以上の症例に対しては術前あるいは術後の補助療法を加えて予後を改善する試みがなされているが、肺癌切除術後の5年生存率は本邦の2006年の集計でも61.6%に留まっている。肺癌治療の進歩のためには肺癌の浸潤・転移の分子機構を理解することが重要である。

悪性度の高い腫瘍細胞は容易に周囲組織へと浸潤し転移を来すが、この過程で細胞外基質の分解が必要となる。細胞外基質を分解する酵素の一つにマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) があるが、これはコラーゲンなどの細胞外基質に対して広い分解活性を持っており、過去の報告でも癌の浸潤・転移に重要な役割を持っているとされている。生理的環境ではTIMPなどのMMP抑制因子がMMPの働きを調整している。Reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs (RECK)はMMP抑制因子のひとつであり、MMP-2, MMP-9, MMP-14 (MT1-MMP)の活性を抑制し、腫瘍における血管新生や浸潤・転移を抑制することが知られている。各種臓器癌におけるRECKの発現が研究されており、多くは予後との相関を認めている。非小細胞肺癌においても、免疫染色によるRECKの発現と予後に関する研究はなされているが、RECKの標的であるMMP-2, MMP-9, MMP-14との関係は不明である。そこで本研究ではRECKにくわえMMP-2, MMP-9, MMP-14の発現をreal-time RT-PCRで定量的に解析し、様々な臨床病理学的因子や予後との関連を検討した。

北海道大学病院腫瘍外科およびその関連施設において2001年5月から2005年5月までに組織提供の同意が得られ治癒切除された、肺腺癌46例と肺扁平上皮癌37例および正常肺組織20例を対象とした。すべての組織は癌細胞のみならず、その周囲組織における発現も含めて検討するために、マイクロダイゼクションは行わなかった。得られた切除組織から全RNAを抽出し、逆転写を行ってcDNAを得た。対象とする遺伝子はRECK, MMP-2, MMP-9, MMP-14の4遺伝子とし、これらに特異的なプライマーを設計した。この特異的プライマーを用いて定量的リアルタイムPCRを行った。得られた発現量は内因性コントロールとして用いた $\beta$ -アクチン遺伝子の発現量に対する相対比とした。統計学的解析にはStatView5.0を用いた。各遺伝子の発現量によってそれぞれ低発現群と高発現群の二群に分けた。二群間の比較にはStudent's t-test, Mann-Whitney U testを用い、各臨床病理学的因子との比較にはchi square test, Fisher's exact testを用いた。さ

らに、生存曲線は Kaplan-Meier 法を用い、その比較には log-rank test を用いた。予後因子の解析には Cox univariate regression analysis を用いた。

RECK の発現は腺癌、扁平上皮癌ともに正常組織よりも低発現であった ( $p < 0.01$ )。MMP-2 での正常組織と腺癌の間を除き、MMP-2, MMP-9, MMP-14 では正常組織に比べて腺癌、扁平上皮癌での発現が高くなっていた ( $p < 0.01$ )。また、腺癌と扁平上皮癌との比較では RECK では発現に差が見られなかったが、MMP-2, MMP-9, MMP-14 では扁平上皮癌で発現が高くなっていた ( $p < 0.01$ )。

RECK の発現量で二群に分けて、臨床病理学的因子と比較したところ、腺癌において TNM 分類の T 因子で病期の進んだ群と RECK 低発現群に有意な相関が見られた ( $p < 0.01$ )。扁平上皮癌では高齢者群と RECK 低発現群に有意な相関が認められた ( $p < 0.01$ ) が、他の因子と RECK 発現量に相関は見られなかった。

無再発生存期間を各遺伝子の発現量を含めた臨床病理学的因子を用いて単変量解析で検討したところ、腺癌では RECK 低発現群 ( $p < 0.05$ )、MMP-14 低発現群 ( $p < 0.05$ )、TNM における T2 群 ( $p < 0.05$ ) が予後不良因子であった。一方、扁平上皮癌ではいずれの因子も予後に差を認めなかった。また、腺癌において RECK 高発現群が低発現群に比し無再発生存率が高かった ( $p < 0.05$ )。

さらに、MMP-2, MMP-9, MMP-14 とその抑制因子である RECK の発現量の比で無再発生存期間について検討した。単変量解析では各 MMP/RECK の高発現群と低発現群との間に差は見られず、扁平上皮癌の MMP-14/RECK を除き低発現群での無再発生存率が高い傾向にあったが、有意差は見られなかった。

本研究では、肺腺癌・扁平上皮癌での RECK の発現が正常組織に比べ低発現となっており、さらには肺腺癌においては進行した癌では RECK の発現が低下しており、RECK の発現が低いもので予後が不良であることを明らかにした。

各種臓器癌と RECK との報告でも正常組織に比べて癌での発現は低下しており、発現が低下した群での予後は不良となっていた。非小細胞肺癌でも同様の報告が免疫染色によりなされている。本研究では定量性に優れるリアルタイム PCR を用いて同様のことを証明した。さらに加えて、RECK の標的である MMP-2, MMP-9, MMP-14 の発現もあわせて検討し、RECK との関連も検討した。腺癌では過去の報告同様に RECK の低発現群での無再発生存率が低かったが、扁平上皮癌では有意差は見られなかった。これは、各 MMP の発現量が扁平上皮癌では正常組織・腺癌よりも非常に高くなっており、扁平上皮癌の高発現群においても MMP を阻害するのに十分な RECK の発現がなかったためではないかと考えられた。そのことを証明するために、MMP と RECK の発現量比での検討も加えた。その結果からは有意差までは見られなかったものの、各 MMP/RECK の低発現群での無再発生存率が高くなる傾向を認めた。その他の要因としては本研究では mRNA での発現を検討しており、RECK や MMP の蛋白発現および活性までは検討しておらず、mRNA の発現がこれらと相関していない可能性も考えられ、今後の検討課題である。

また、RECK 発現量と予後との関連から、RECK の発現を増加させることで予後を改善できる可能性も考えられる。crtB2 は HDAC1 及び Sp1 を介して RECK の発現を抑制するが、この HDAC1 の阻害剤である trichostatin A を用いることで、RECK の発現を増加させることが知られている。同様に NSAIDs も RECK の発現を増加させることが知られている。これらを用いることで予後の改善につながる可能性がある。しかし、これらについてもまだ研究はなされておらず、さらなる検討が必要と思われる。

口頭発表に続いて、副査今村教授より、MMP-14 における過去の報告との差異、扁平上皮癌と腺癌での結果の解離、さらに細かい病期分類での RECK の発現量との相関について質問があった。副査近藤教授より、扁平上皮癌での MMP の発現亢進、MMP・RECK の生体内での活性について質問があった。また、副査守内教授より RECK のヒトとマウスのアミノ酸配列の相同性、他の報告での解析方法、今回検討の因子以外の予後関連因子、RECK の発現を亢進させる方法について質問があった。最後に主査秋田教授より、RECK の正常肺および癌における由来細胞、RECK の癌における発現低下機序、MMP・RECK の発現量のスコア化と予後の関係についての質問があった。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。