

学位論文題名

High MMP-1 mRNA Expression is a Risk Factor for  
Disease-Free and Overall Survivals in Patients  
with Invasive Breast Carcinoma

(浸潤性乳癌における MMP-1 の発現亢進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】

乳癌は女性において悪性新生物の中で最もよくみられる癌種の1つである。乳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。腫瘍細胞が周囲組織へと浸潤・転移を来す過程では細胞外基質の分解が必要となることが知られている。

癌の浸潤・転移に重要な役割を持っているとされている細胞外基質を分解する酵素の一つに Matrix metalloproteinase (MMP) がある。MMP・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て、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つことが明らかになっていることから、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。そのうち、Matrix metalloproteinase-1 (MMP-1, interstitial collagenase) は1、2および3型コラーゲンを分解する酵素で、ヒト大腸がん、食道癌、膵癌、卵巣がんなど多くの癌において浸潤、転移に関わっていると報告されている。ヒト乳癌においては、MMP-1 蛋白がリンパ管浸潤に関与していると報告されたが、MMP-1 遺伝子発現レベルが乳がんの予後と関連しているかは未知である。以上をふまえて、本研究ではMMP-1 遺伝子発現を 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】

北海道大学病院第2外科およびその関連施設において2001年から2002年までに組織提供の同意が得られ標準手術が施行された、浸潤性乳癌85例を対象とした(平均年齢60.4歳)。症例の病期分類にはTNM分類を用いた。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MMP-1遺伝子に特異的なプライマーを用いて定量的 real-time RT-PCRを行った。遺伝子の発現量は、内部標準として用いた $\beta$ -アクチン遺伝子の発現量で補正した相対比で表した。15例では非癌部正常乳腺組織も比較検討した。7例の癌組織から蛋白を抽出し、MMP-1蛋白の発現をWestern blottingにて検証し、mRNAの発現量と比較した。統計学的解析はソフトウェア StatView5.0を用いて行った。二群間比較ではMann-Whitney U-test、Wilcoxon signed-rank testを、生存分析はKaplan-Meier法を用いて生存曲線を作成し、log-rank testにて検定を行った。独立予後因子の解析にはCox比例ハザードモデルを用いた。

### 【結果】

(1) 同一患者での対応する癌と正常組織での MMP-1 遺伝子の発現様式を比較検討した。正常組織に比べて癌での発現量の上昇を認めた ( $P < 0.023$ )。

(2) 癌組織での MMP-1 発現と臨床病理学的因子の相関を検討した。エストロゲン受容体 (ER) 陰性の癌組織で MMP-1 の発現量上昇を認めた ( $P < 0.0043$ )。ER progesterone 受容体 (PR) かつとも陰性の群での発現量はともに陽性の群より有意に高値であった。他の因子と MMP-1 の発現に相関は見られなかった。

(3) MMP-1 遺伝子発現レベルを中央値によって低発現群と高発現群の二群に分類しておこなった生存分析では、MMP-1 は発現が高い群において無再発生存率および術後生存期間が有意に不良であった ( $p < 0.05$ )。Cox 比例ハザードモデルで単変量および多変量解析を行ったところ、MMP-1 発現レベルと M 因子の有無が独立予後因子であった。

(4) MMP-1 蛋白発現レベルを Western blotting にて検証したところ、タンパク量が mRNA 量と相関していることが示された。

### 【考察】

本研究結果では、浸潤性乳管癌での MMP-1 発現が正常組織に比べ高発現であり、ER 陰性の症例では陽性症例と比較して MMP-1 の発現が亢進し、MMP-1 遺伝子の発現が高い群で予後不良であることが明らかになった。

(1) 同一患者における乳癌組織と正常組織を比較し、癌組織での MMP-1 高発現が確認されたことから、MMP-1 遺伝子の発現亢進は発癌に関与している可能性が示唆された。これは MMP-1 が乳癌の発癌に関わっているとする従来の報告と矛盾しない。

(2) ER 陰性の乳癌患者は陽性症例と比べて予後不良であることが報告されており、その原因はまだ解明されていない。今回の研究結果では、MMP-1 遺伝子は ER 陰性かつ PR 陰性の乳癌で高発現しており、MMP-1 発現亢進が ER 陰性患者の予後不良の原因のひとつであることが示唆された。また、未知の遺伝子間ネットワークが介在している可能性も考えられた。

(3) 生存分析では MMP-1 発現が独立した予後因子であるという結果が得られた。MMP-1 の発現が高いほど無再発生存率および全生存率が不良であったことから、MMP-1 発現量が術後治療法選択のための有用な指標となる可能性が考えられた。In vivo の研究では、特異的 MMP-1 siRNA を用いて発現を抑制することで、乳癌の腫瘍増大が抑えられたとする報告もあるが、特異性の高い MMP-1 阻害剤の開発が必要であると考えられた。

### 【結語】

MMP-1 の発現亢進は浸潤性乳管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

## High MMP-1 mRNA Expression is a Risk Factor for Disease-Free and Overall Survivals in Patients with Invasive Breast Carcinoma

(浸潤性乳癌における MMP-1 の発現亢進は切除後の予後不良因子である)

乳癌は女性において悪性新生物の中で最もよくみられる癌種の1つである。乳癌により死に至る要因は原発巣のものよりも遠隔転移の影響による。腫瘍細胞が周囲組織へと浸潤・転移を来す過程では細胞外基質の分解が必要となることが知られている。

癌の浸潤・転移に重要な役割を持っているとされている細胞外基質を分解する酵素の一つに Matrix metalloproteinase (MMP) がある。MMP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て、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つことが明らかになっていることから、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。そのうち、Matrix metalloproteinase-1 (MMP-1, interstitial collagenase) は1、2および3型コラーゲンを分解する酵素で、ヒト大腸癌、食道癌、膵癌、卵巣癌など多くの癌において浸潤、転移に関わっていると報告されている。ヒト乳癌においては、MMP-1蛋白がリンパ管浸潤に関与していると報告されたが、MMP-1遺伝子発現レベルが乳癌の予後と関連しているかは未知である。以上をふまえて、本研究ではMMP-1遺伝子発現を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。

北海道大学病院第2外科およびその関連施設において2001年から2002年までに組織提供の同意が得られ標準手術が施行された、浸潤性乳癌85例を対象とした(平均年齢60.4歳)。症例の病期分類にはUICCのTNM分類を用いた。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MMP-1遺伝子に特異的なプライマーを用いて定量的real-time RT-PCRを行った。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。15例では非癌部正常乳腺組織も比較検討した。7例の癌組織から蛋白を抽出し、MMP-1蛋白の発現をWestern blottingにて検証し、mRNAの発現量と比較した。統計学的解析はソフトウェアStatView5.0を用いて行った。二群間比較ではMann-Whitney U-test, Wilcoxon signed-rank testを、生存分析はKaplan-Meier法を用いて生存曲線を作成し、log-rank testにて検定を行った。独立予後因子の解析にはCox比例ハザードモデルを用いた。

同一患者での対応する癌と正常組織でのMMP-1遺伝子の発現様式を比較検討した。正常組織に比べて癌での発現量の上昇を認めた( $P < 0.023$ )。

癌組織での MMP-1 発現と臨床病理学的因子との相関を検討した。エストロゲン受容体 (ER) 陰性の癌組織で MMP-1 の発現量上昇を認めた ( $P < 0.0043$ )。ER、プロゲステロン受容体 (PR) がともに陰性の群での発現量はともに陽性の群より有意に高値であった。他の因子と MMP-1 の発現に相関は見られなかった。

MMP-1 遺伝子発現レベルを中央値によって低発現群と高発現群の二群に分類しておこなった生存分析では、MMP-1 は発現が高い群において無再発生存率および術後生存率が有意に不良であった ( $p < 0.05$ )。Cox 比例ハザードモデルで単変量および多変量解析を行ったところ、MMP-1 発現レベルと M 因子の有無が独立予後因子であった。

MMP-1 蛋白発現レベルを Western blotting にて検証したところ、タンパク量が mRNA 量と相関していることが示された。

本研究結果では、浸潤性乳管癌での MMP-1 発現が正常組織に比べ高発現であり、ER 陰性の症例では陽性症例と比較して MMP-1 の発現が亢進し、MMP-1 遺伝子の発現が高い群で予後が不良であることが明らかになった。

同一患者における乳癌組織と正常組織を比較し、癌組織での MMP-1 高発現が確認されたことから、MMP-1 遺伝子の発現亢進は発癌に関与している可能性が示唆された。これは MMP-1 が乳癌の発癌に関与しているとする従来の報告と矛盾しない。

ER 陰性の乳癌患者は陽性症例と比べて予後不良であることが報告されており、その原因はまだ解明されていない。今回の研究結果では、MMP-1 遺伝子は ER 陰性かつ PR 陰性の乳癌で高発現しており、MMP-1 発現亢進が ER 陰性患者予後不良の原因のひとつであることが示唆された。また、未知の遺伝子間ネットワークが介在している可能性も考えられた。

生存分析では MMP-1 発現が独立した予後因子であるという結果が得られた。MMP-1 の発現が高いほど無再発生存率および全生存率が不良であったことから、MMP-1 発現量が術後治療法選択のための有用な指標となる可能性が考えられた。*in vivo* の研究では、特異的 MMP-1 siRNA を用いて発現を抑制することで、乳癌の腫瘍増大が抑えられたとする報告もあるが、特異性の高い MMP-1 阻害剤の開発が必要であると考えられた。

口頭発表に続いて、副査今村教授より、MMP-1 と ER の逆相関しているその分子機構について、また他の MMP 因子の解析状況、そして癌によって発現する MMP が異なることの生物学的意義について質問があった。副査守内教授より ER の測定方法と免疫染色で使用した ER の抗体について、ER 発現低下のメカニズム、MMP-9 と乳癌予後との相関は無かったかについて質問があった。副査近藤教授より、ER(-)PgR (-) 症例では予後の差は無かったのか、MMP-1 の免疫染色結果、MMP-1 亢進の症例に対する治療法について質問があった。また、最後に主査秋田教授より、前癌病変の癌化と MMP-1 の関連、MMP-1 活性化因子の発現状況、HER-2 発現との関連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ぜて適切に回答した。

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。