

## 学位論文題名

Fascin is involved in tumor necrosis factor- $\alpha$ -dependent production of MMP9 in cholangiocarcinoma(胆管癌において fascin は TNF- $\alpha$  依存性の MMP9の産生に関与する)

## 学位論文内容の要旨

【背景と目的】胆管癌は、肝内胆管、肝門部胆管、肝外胆管の胆管から発生し、肝胆道系の悪性腫瘍で二番目に多い癌腫である。そして、周囲への進展、転移により予後不良であり、悪性度の高い腫瘍である。近年、細胞の運動性に関わるアクチン結合蛋白である fascin が各種癌細胞の浸潤や転移に関与し、肺癌、食道癌、胃癌、乳癌、大腸癌などでは、手術後の予後不良因子に関与していることが報告されている。近年、胆管癌においても、fascin が悪性度に関与するとの報告がみられるが、胆管癌における腫瘍進展についての役割は明らかになっていない。また、胆管癌において、炎症性サイトカインである tumor necrosis factor(TNF)- $\alpha$  や間質浸潤において重要な働きを示す Matrix metalloproteinase (MMP) が腫瘍進展に関与しているとの報告も散見される。今回我々は、fascin を中心とした胆管癌における fascin, MMP, TNF- $\alpha$  発現に関して、臨床病理学的、分子生物学的検討を行った。

【対象と方法】対象は外科的切除症例 87 例(肝内胆管癌 32 例、肝門部胆管癌 25 例、肝外胆管癌 30 例)。ホルマリン固定パラフィン包埋切片において fascin, MMP2, MMP9, TNF- $\alpha$  の免疫組織染色の発現を検討し、術後予後との関連性を検討した。また、培養胆管癌細胞 (CCKS-1, HuCCT1) を用い、それぞれの fascin 発現, TNF- $\alpha$  刺激下における fascin 発現, fascin の knockdown 下における fascin 発現, TNF- $\alpha$  刺激もしくは fascin の knockdown 下における MMP9 の発現の関連性を検討した。fascin, MMP9 の RNA 発現については、PT-PCR, Realtime-PCR を用いた定量的発現, fascin, MMP9 の蛋白発現については、Western blot, Gelatin-zymography を用いた定量的発現を用いて検討した。

【結果】In vivo, 免疫組織染色の検討において、Fascin は、肝内胆管癌 20 例(62%)、肝門部胆管癌 13 例(52%)、肝外胆管癌 10 例(33%)、MMP9 は、肝内胆管癌 20 例(62%)、肝門部胆管癌 14 例(56%)、肝外胆管癌 12 例(40%)、MMP2 は、発現が少なく、胆管癌全体の 9 例(8%)に発現がみられた。Fascin と MMP9 発現は有意に相関し、Fascin と MMP9 は浸潤先進部で強く発現する傾向にあった。一方 fascin と MMP2 発現に関連性はなかった。TNF- $\alpha$  は、胆管癌の浸潤先進部の腫瘍の間質や腫瘍周囲組織に発現する傾向がみられ、胆管癌全体の 63 例(72%)で発現していた。fascin や MMP9 発現と TNF- $\alpha$  発現はそれぞれ相関して、強発現する傾向にあった。Fascin 発現と術後予後の関連は、肝門部胆管癌、肝外胆管癌において差がみられなかったが、肝内胆管癌では、陽性例で有意に予後が悪かった ( $P=0.02$ )。In vitro の検討において、胆管癌培養細胞、CCKS-1 に fascin 発現はみられたが、HuCCT1 の fascin 発現が弱く、培養細胞種により発現に差がみられた。胆管癌培養細胞に TNF- $\alpha$  刺激すると、用量依存性、時間依存性に fascin 発現が増強し、TNF- $\alpha$  刺激による fascin 発現の増強が示された。この発現の増強は、元々 fascin の発現が弱かった HuCCT1 で顕著であった。次に、fascin small interfering(si)RNA にて、CCKS-1 における fascin 発現を knock-down すると、MMP9 の発現低下がみられ、fascin と MMP9 の関連性が示された。胆管癌培養細胞に TNF- $\alpha$  刺激をすると、用量依存性、時間依存性に fascin 発現が増

強し, TNF- $\alpha$  刺激による fascin 発現の増強が示された. TNF- $\alpha$ , fascin, MMP9 のシグナル伝達を確認するため, 両細胞株において, fascin を knockdown 下に MMP9 発現を検討したところ, fascin の knockdown により TNF- $\alpha$  刺激下の MMP9 産生が抑制され, fascin は TNF- $\alpha$  依存性の MMP9 産生に関与していることが示された. また, TNF- $\alpha$  依存性の MMP9 産生に関わる TNF- $\alpha$  受容体 (TNF receptor1) や細胞内シグナル伝達の cytokinase (NF- $\kappa$   $\beta$ , Erk1/2, p38MAP kinase) を抑制することにより, TNF- $\alpha$  刺激下の fascin の発現にも抑制がみられた. 以上より, fascin が TNF- $\alpha$  依存性の MMP9 の産生の signaling pathway に関与していることが示された.

【考案】 Fascin の発現は, 癌の浸潤先進部で増強し, 癌細胞の浸潤, 転移にかかわる TNF- $\alpha$  依存性の MMP9 産生との関連性が臨床病理学的, 分子生物学的に示唆された. Fascin の発現は, 癌浸潤先進部で増強し, MMP9 の発現と相関していたことや, 腫瘍の周囲において, TNF- $\alpha$  の発現が増強していたことは, 腫瘍の浸潤先進部で fascin, MMP9, TNF- $\alpha$  が相互に働いて浸潤していく可能性を示していると考えられた. また, 他の癌種と同様に, 肝内胆管癌において, fascin 陽性例の術後予後が悪かったが, 肝門部胆管癌, 肝外胆管癌においては, 術後予後との関連はみられなかった. 胆管癌の腫瘍発生において, 胆管の大きさにより発生様式が違うことが示唆されているが, この発生様式の違いが, 術後予後の差に関与している可能性があると考えられた. もっと詳細で症例数を増やした研究により fascin の陽性例における悪性度の意義が明らかになると考えられた. また, *in vitro* の研究において, fascin は, 癌細胞の運動性に関与することが知られているが, MMP9 のような細胞間質の分解に関する働きとの関連性は知られていなかった. 本検討において, fascin は胆管癌において, 細胞の運動性を増加するだけでなく, 細胞間質の分解にも重要な役割を果たしていると考えられた. このことは, *in vivo* での結果と相関し, TNF- $\alpha$  からの signal をうけた癌細胞が活性化して, fascin, MMP9 の作用により腫瘍が浸潤していくと考えられた.

【結果】 fascin や MMP9 の発現は, 胆管癌における腫瘍浸潤に重要な役割を持ち, TNF- $\alpha$  依存性の MMP9 の産生の signaling pathway に関与することが示唆された. fascin に関する MMP9 の産生や阻害の mechanism を分析することは, 胆管癌, 特に肝内胆管癌における治療的アプローチの発展に寄与する可能性があると考えられた.

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 松 野 吉 宏

副 査 教 授 浅 香 正 博

副 査 教 授 田 中 伸 哉

## 学位論文題名

### Fascin is involved in tumor necrosis factor- $\alpha$ -dependent production of MMP9 in cholangiocarcinoma

(胆管癌において fascin は TNF- $\alpha$  依存性の MMP9 の産生に関与する)

近年、細胞の運動性に関わるアクチン結合蛋白である fascin が浸潤や転移に関与し、多くの癌種において、予後不良因子に関与していることが報告されているが、胆管癌における役割は明らかになっていない。我々は、fascin を中心とした胆管癌における fascin, MMP, TNF- $\alpha$  発現に関して、臨床病理学的、分子生物学的検討を行った。対象は外科的切除症例 87 例(肝内胆管癌 32 例, 肝門部胆管癌 25 例, 肝外胆管癌 30 例)。fascin, MMP2, MMP9, TNF- $\alpha$  の免疫組織染色の発現、術後予後との関連性を検討した。2 種類の培養胆管癌細胞を用い、TNF- $\alpha$  刺激、fascin に対する siRNA、各種阻害剤導入下における fascin, MMP9 の発現を検討した。免疫組織染色の検討において、Fascin や MMP9 発現と TNF- $\alpha$  発現はそれぞれ相関して、強発現する傾向にあった。Fascin 発現と術後予後の関連は、肝内胆管癌では、陽性例で有意に予後が悪かった。胆管癌培養細胞においては、TNF- $\alpha$  刺激すると、用量依存性、時間依存性に fascin 発現が増強し、TNF- $\alpha$  刺激による fascin 発現の増強が示された。次に、fascin small interfering(si)RNA にて、fascin 発現を knock-down すると、MMP9 の発現低下がみられ、fascin と MMP9 の関連性が示された。TNF- $\alpha$ , fascin, MMP9 のシグナル伝達を確認するため、fascin を knockdown 下に MMP9 発現を検討したところ、fascin の knockdown により TNF- $\alpha$  刺激下の MMP9 産生が抑制された。MMP9 産生に関わる TNF $\alpha$  受容体(TNF receptor1)や細胞内シグナル伝達物質(NF- $\kappa$   $\beta$ , Erk1/2, p38MAP kinase)を抑制することにより、TNF $\alpha$  刺激下の fascin の発現にも抑制がみられた。以上より、fascin は、胆管癌における腫瘍浸潤に重要な役割を持ち、TNF $\alpha$  依存性の MMP9 の産生の signaling pathway に関与することが示唆された。公开发表において、副査の田中伸哉教授から、2009 年 12 月の Cell の論文では、fascin と MMP1 が肺癌などの進展に関与しているとの報告があり、本研究においての他の MMP との関連について、次に、2009 年の Journal Surgical Oncology には、fascin と HCC の関連が指摘され、発表では肝内胆管癌と肝外胆管癌での発現の違いがみられるが、肝内もしくは肝外での挙動の違いについての質問があった。申請者は、本研究においては、手術検体からの結果から、fascin と MMP9 の関連しか検討してないが、手術検体の検討のみでは、同じような検体で MMP7 での発現がみられ、他の蛋白も関連している可能性はある。肝内胆管癌に関しては、発生母地として慢性肝炎など慢性炎症が、肝細胞癌程ではないが、関連しているとの報告があり、肝外胆管癌に関しては、大型胆管から発生する癌は、胆石などの慢性炎症から乳頭状に発育してくるものもあり、発生学的に異なっている可能性が指摘されている。これらの違いから本研究における肝内胆管癌と肝外胆管癌での fascin の違いが関わってきている可能性がある」と回答

した。次いで副査の浅香正博教授から、fascin 発現の胆管癌においての特異性について、検討で使われた胆管癌培養細胞の性質について、fascin を knockout した mouse を用いた検討の有無についての質問があった。申請者は、fascin 発現は、胆管癌には特異的なものではなく、他の癌種でも多数みられる。使用した培養細胞は、肝内胆管癌の腹水から、肝内胆管癌の腫瘍から直接樹立したものであり、特殊な胆管癌細胞ではない。培養細胞を用いて、knock down を施行し、発現を検討した報告はあるが、検索範囲では、knockout mouse を用いた検討はないと回答した。最後に、主査の松野吉宏教授から、癌の上皮から間質への進展での微小環境での性質の違いについて、培養細胞での検討において、knockdown したものの、実際の細胞の動き、振る舞いの相違についての質問があった。申請者は、胆管癌において、前癌病変である BilIN といわれる上皮内腫瘍が知られており、上皮内病変においても少数の検討であるが、異型度が増すにつれて、fascin の発現がみられる傾向があり、細胞が活動的に動いている、もしくは動こうとしている病変では、fascin などの発現が強く、腫瘍の中心部などの fascin などの発現の弱い部位では、細胞の活動性が低いと考えた。腫瘍の種類だけでなく、部位によっても性質が違っていると考えられた。論文上では、fascin を knockdown したものは、細胞の運動能、浸潤能ともに低下するとの報告がみられるが、本検討では、運動能等は未検討である。しかし、検討に用いた細胞等の振る舞いは、knockdown した群にて、見た目の増殖の低下、細胞の活きの悪さがみられ、細胞の活動性も落ちている印象であったと回答した。

この論文は、胆道癌における fascin の動態を TNF- $\alpha$ 、MMP9 との関連も含めて検討した初めての検討であり、今後の胆道癌の病態の解明に期待される。

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ものと判定した。