

## 学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	加藤 育民
<h3>学位論文題目</h3> <p>「Relationship between expression of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9, and invasion ability of cervical cancer cells」 (子宮頸癌におけるマトリックスメタロプロテアーゼ-2 およびマトリックスメタロプロテアーゼ-9 の遺伝子発現量と浸潤能との関連性) に関する研究</p> <h3>共著者名</h3> <p>山下剛、石川陸男</p> <p>The Oncology Reports より掲載許可</p> <h3>研究目的</h3> <p>癌の浸潤・転移に、癌細胞周囲や血管基底膜の細胞外マトリックス (Extracellular matrix : ECM) の分解は必須である。代表的な ECM 分解酵素としてマトリックスメタロプロテアーゼ (Matrix metalloproteinase : MMP) 遺伝子ファミリーが報告されている。MMP は、細胞の浸潤、炎症に影響を及ぼす酵素で、現在 20 種類の MMP 分子が同定されている。特に、基底膜の主な構成成分であるコラーゲンIVの分解酵素能をもつ MMP-2 ならびに MMP-9 は、大腸癌、膵臓癌、膀胱癌など多くの癌細胞において浸潤・転移とよく相関することが知られている。また、MMP 活性を阻害することにより、腫瘍増殖や転移が抑制されることが報告され、最近では、いくつかの合成 MMP 阻害剤が開発中である。</p> <p>現在、MMP 遺伝子ファミリーは、様々な観点 (癌種・遺伝子レベル・酵素レベルなど) から研究されている。しかしながら、婦人科癌に対する MMP の報告は認めていない。</p> <p>今回、婦人科癌の中で、子宮頸癌に注目し、子宮頸癌細胞株 7 株を用いて MMP-2 および MMP-9 の mRNA レベル、酵素レベル、ならびに MMP 阻害剤を用いた細胞浸潤能を測定し、各々の関連性について検討した。</p>			

## 材料・方法

### [ 材料 ]

子宮頸癌細胞株 7 株 (HT-3, Siha, ME-180, Hela-S3, Caski, C-4I, C-33A; American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) を使用した。

MMP 抑制剤として、*o*-phenanthroline (Wako Pure Chemical Industries, Japan) を使用した。

### [ 方法 ]

#### (1) RTPCR 法

子宮頸癌細胞株 7 株を培養後、ISOGEN (Nippon Gene, Japan) を用いて各細胞株より Total RNA を抽出、その後 Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (GIBCOBRL, MD, USA) を用いて cDNA を作成した。MMP-2、MMP-9、 $\beta$ -actin に対する特異的プライマーを作製し PCR 法を施行、MMP-2、MMP-9 および  $\beta$ -actin の mRNA の有無を確認した。

#### (2) Real-time PCR 法

SmartCycler (Cepheid, CA, USA) を用いて、Real-time PCR 法で MMP-2、MMP-9、 $\beta$ -actin の cDNA を定量した。測定した MMP-2 および MMP-9 cDNA 発現量を各細胞株の  $\beta$ -actin の cDNA 発現量 ( $\beta$ -actin の cDNA は内部コントロール) を基準として相対的発現量を計測した。

#### (3) Gelatin zymography 法

Gelatin zymography kit (Yagai Corporation, Japan) を用いて、細胞株培養上清中の MMP-2 および MMP-9 の酵素活性を定性した。

#### (4) Invasion assay 法

マトリゲル添加または無添加 Membrane (8.0  $\mu$ m) で仕切られた 24 穴 2 層式細胞培養容器 (Becton Dickinson BioCoat, NJ, USA) を用いて各細胞株を培養した。上層培養液に MMP 抑制剤添加 (0  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 50  $\mu$ M の *o*-phenanthroline を添加) し、下層培養液は、NIH3T3 細胞 (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) の培養上清液 (Chemoattractants として使用) を含む MMP 抑制剤無添加培養液を用いて 72 時間培養したのち、Membrane 裏面に浸潤した細胞数を顕微鏡で測定した。

#### (5) 遺伝子発現量と浸潤能との関連性の解析

Real-time PCR 法での結果および Invasion assay 法の結果をもとに統計処理を施行し関連性を解析した。

## 成 績

(1) PCR 法および Real-time PCR 法の解析より子宮頸癌細胞株 7 株において、MMP-2、MMP-9 の mRNA の発現を認めた。前者では、Caski 株、Siha 株で、後者では、HT-3 株、Caski 株などが顕著であった。

(2) Gelatin Zymography 法では、mRNA 発現量の高い細胞株において、高い酵素活性を認め、発現と酵素作用の関連性が示された。一方、MMP 抑制剤である *o*-phenanthroline を 5  $\mu$ M 添

加することにより、非添加で確認された酵素（MMP-2ではCaski株、Siha株で、一方MMP-9ではHT-3株）において明らかな酵素活性抑制効果が認められた。また、*o*-phenanthrolineを50 $\mu$ M添加した時も同様の酵素活性抑制効果が得られた。

(3) Invasion assay法において、細胞培養液中に5 $\mu$ M *o*-phenanthroline添加した条件では、全ての細胞株の浸潤は非添加時よりも低下を認めた。特にCaski株、Siha株では、非添加群に比べてそれぞれ平均50.3%、55.0%と浸潤率の有意な( $p < 0.05$ )低下を示した。また、細胞培養液中に50 $\mu$ M *o*-phenanthroline添加した条件では、細胞の成長が極端に遅く、本実験条件において浸潤率の測定は不可能であった。

(4) 多くのパラメーターとの関連性を検索した結果、MMP-2 mRNA発現量と抑制剤添加(5 $\mu$ M *o*-phenanthroline)群と非添加群での浸潤能の差には関連性が認められた。( $r=0.84$ 、 $p < 0.05$ )これに対して、MMP-9高発現細胞株では関連性は認められなかった。

## 考 案

細胞外マトリックス分解酵素であるMMPは、最近では、20種類の分子が同定され機能も次第に明らかになってきている。その中で、MMP-2、MMP-9は、基底膜に特有のIV型コラーゲンを分解することが知られており、癌の浸潤・転移に関連することが報告されている。現時点において、大腸癌、膵臓癌、膀胱癌など多くの癌における浸潤にMMPが関与していることが報告されており、特に、MMP-2、MMP-9における細胞浸潤と関連性を示唆する報告を多く認める。

我々は、現時点において報告されていない子宮頸癌の浸潤におけるMMP-2、MMP-9の関連性について子宮頸癌細胞株7株を用いて検討した。研究結果より、細胞株7株すべてに、MMP-2 mRNAおよびMMP-9 mRNAの発現が確認された。また、今回の実験条件では、MMP-2 mRNAおよびMMP-9 mRNAそれぞれの発現量の高い2つの細胞株において酵素活性を認めた。対象子宮頸癌細胞株は、MMP-2およびMMP-9を産生しているものと考えられた。また、mRNA発現量とInvasion assay法からの浸潤率の測定結果よりMMP-2 mRNA発現量と浸潤率の変化には高い関連性が示唆された。しかしながら、MMP-9 mRNA発現量と浸潤率の変化には関連性が認められなかった。したがって、MMP-2 mRNA発現量の高い子宮頸癌は、MMP抑制剤の投与により浸潤率が低下するものと考えられた。最近の報告では、MMP-2は、Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2)およびMMP-14と細胞膜表面において3分子間コンプレックスを形成しており、促進・抑制のメカニズムが次第に明らかになってきている。今後の検討としては、MMP-2単独研究から、TIMP-2、MMP-14などの関連分子を総合し検討していく必要がある。また、細胞株数の増加ならびに組織検体の検討を加え、子宮頸癌におけるより繊細なMMPの研究を進めていく考えである。現在、我々は、TIMP-2、MMP-14ならびにMMP関連のUrinary plasminogen activator (uPA)について子宮頸癌細胞株の浸潤との関連性について研究段階であり、TIMP-2 mRNA量と浸潤の変化に負の高い関連性を認めている。

手術、化学療法、放射線療法が今なお癌治療の主体を占めているが、MMP抑制剤は、いくつかの癌種において浸潤能低下をもたらすことが報告され、今後の新しい抗がん剤としての検討がなさ

れている。今回の結果より MMP-2 特異性が高く副作用の少ない抑制剤の開発は、子宮頸癌治療につながるものと期待される。

## 結 論

MMP は、癌の浸潤と転移に見られる細胞の浸潤と組織の破壊に重要な役割を担っている。今回我々は、子宮頸癌細胞株 7 株を用いて、基底膜の重要構成成分である IV 型コラーゲンの分解酵素である MMP-2 および MMP-9 について、細胞の浸潤能との関連性の検討を行った。研究対象子宮頸癌細胞株においては、MMP-2 mRNA 発現量と酵素活性抑制による浸潤能の変化には高い関連性を認めた。今回の結果は、子宮頸癌の浸潤調節、子宮頸癌治療に重要な情報を与えるものと考えている。

## 重要引用文献

- 1) Davies B, Waxman J, Wasan H, Abel P, Williams G, Krausz T, Neal D, Thomas D, Hanby A, and Balkwill F: Levels of matrix metalloproteases in bladder cancer correlate with tumor grade and invasion. *Cancer Res.* 53: 5365-5369, 1993
- 2) Albin A, Iwamoto Y, Kleinman HK, Martin GR, Aaronson SA, Kozlowski JM, and McEwan RN: A rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of tumor cells. *Cancer Res.* 47: 3239-45, 1987
- 3) Forsyth PA, Wong H, Laing TD, Rewcastle NB, Morris DG, Muzik H, Leco KJ, Johnston RN, Brasher PMA, Sutherland G, and Edwards DR. Gelatinase-A (MMP-2), gelatinase-B (MMP-9) and membrane type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) are involved in different aspects of the pathophysiology of malignant gliomas. *Brit. J. Cancer* 79: 1828-1835, 1999

## 参考論文

- 1) 加藤育民、渡辺まり子、早川和彦、山崎知文、伊藤智雄：当科における CPT-11 使用症例の効果・副作用の検討。産婦人科の実際 47 (11)：1927-1932, 1998
- 2) 加藤育民、渡辺まり子、森典久、岡田力哉、山崎知文、辻由紀子：汎発性膿疱性乾癬を併発した妊産婦の 1 症例。周産期医学 27 (8)：1145-1148, 1997
- 3) 加藤育民、岡田力哉、森典久、山崎知文：乳癌術後の Tamoxifen を服用した婦人にみられた巨大子宮内膜ポリープの 2 症例。産科と婦人科 64 (5)：687-692, 1997
- 4) 加藤育民、山下幸紀、兼元敏隆：当科における高齢子宮頸癌患者の臨床的実態。産婦人科の実際 45 (3)：357-361, 1996

## 学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士 (医学)	氏 名	加藤 育民
審査委員長 伊藤 喜久 ㊦ 審査委員 石川 睦男 ㊦ 審査委員 吉田 成孝 ㊦			
学 位 論 文 題 目  「Relationship between expression of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9, and invasion ability of cervical cancer cells」 (子宮頸癌におけるマトリックスメタロプロテアーゼ-2およびマトリックスメタロプロテアーゼ-9の遺伝子発現量と浸潤能との関連性)			
マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) は、種々の細胞外マトリックス構成成分を分解するzinc endopeptidaseで、現在20種類余りが同定されている。このうちMMP-2、MMP-9はそれぞれ、progelatinase-A, progelatinase-Bとして分泌され、基底膜の構成成分であるIV型collagenを分解する機能を有する。 これまで大腸癌、膵臓癌、膀胱癌について細胞増殖、組織破壊能との関連性から検索が行われていたが、婦人科癌とMMPとの関連性についての報告は認められていない。そこで、子宮頸癌細胞株を用いて、MMP-2、MMP-9のmRNA発現量、酵素産生分泌能、活性・活性抑制効果と、細胞浸潤能との関連性について検索を行った。 子宮頸癌細胞株7株はATCC (American Type Tissue Culture Collection, USA) より購入した。MMP酵素活性抑制剤は、キレート剤であるo-phenanthroline (WAKO, Japan) を用いた。			

既に確立された方法に従いRT-PCR法、real-time PCR法によりmRNA定性、定量を行った。培養上清中のMMP-2、MMP-9の酵素活性の評価は、gelatin zymography法 (Yagai, Japan) により測定した。腫瘍細胞の浸潤能はAlbiniのinvasion assay法による。すなわちpolycarbonate membrane (8.0 mm) で仕切られたchamber下層に、NIH3T3培養上清由来の走化因子を、上層には至適濃度に調整した細胞を加え、*o*-phenanthrolineを添加、非添加の条件下で72時間培養し、membrane裏面に浸潤した細胞数を、顕微鏡下で算定した。

この結果、RT-PCR法、real-time PCR法において全ての細胞株でmRNAの発現を認め、MMP-2ではCaski株、Siha株、MMP-9ではHT-3株、Caski株で顕著であった。さらに、これら発現量の高い細胞株で、培養上清中にも高い酵素活性が存在し、*o*-phenanthrolineでほぼ完全に活性が抑制されることを、gelatin zymography法で確認した。invasion assay法では、全ての細胞株に浸潤能があり、*o*-phenanthroline添加により抑制があり、特にMMP-2高度産生株Caski株、Siha株では非添加群に比べ、添加群は50%もの高度の低下を認めた。多くの関連因子との関係を統計学的に評価検討した結果、MMP-2のmRNA発現量と浸潤抑制効果とに高い関連性が認められた。これに対して、MMP-9の高発現株との関連性は認められなかった。

以上の結果から、MMP-2産生細胞株で、mRNA発現量が高い細胞株ほど産生分泌、基質分解能が高く、これに符合して高い細胞浸潤能が認められ、酵素活性抑制剤により浸潤が抑制されたことから、検索した細胞株7株から、少なくともMMP-2については細胞浸潤への直接関与が示された。

本研究は婦人科癌細胞におけるMMP-2のmRNAの高度発現、酵素活性と細胞浸潤能の関連性を初めて明らかにし、酵素活性抑制剤による浸潤調節、遠隔転移に対する新たな薬剤治療の可能性の道を開いた臨床的価値は、評価される。今後、本研究を基礎に、局所の癌細胞の浸潤、転移を制御する機序の更なる解明を期待したい。

発表後、論文要旨の若干の字句の修正を求めた。さらに発表論文、周辺領域について質疑応答を行い、これに対して申請者から適切な回答が得られ、本学の博士を授与するにふさわしい知識、技能を有すると考え、全員一致で合格と判定した。

なお本研究はThe Oncology Reportsに掲載予定である。