

Cancer cells overexpress mRNA of urokinase-type plasminogen activator, its receptor and inhibitors in human non-small-cell lung cancer tissue: analysis by Northern blotting and in situ hybridization

メタデータ	言語: jpn 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2017-01-18 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 森田, 純仁 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/815

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 457号	学位授与年月日	平成20年 9月19日
氏名	森田純仁		
論文題目	<p>Cancer cells overexpress mRNA of urokinase-type plasminogen activator, its receptor and inhibitors in human non-small-cell lung cancer tissue: analysis by Northern blotting and <i>in situ</i> hybridization</p> <p>(癌細胞はヒト非小細胞肺癌組織において、ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーターとその受容体、インヒビターの mRNA を過剰発現している：ノーザン・ブロッティングと <i>in situ</i> ハイブリダイゼーションによる分析)</p>		

博士(医学) 森田 純仁

論文題目

Cancer cells overexpress mRNA of urokinase-type plasminogen activator, its receptor and inhibitors in human non-small-cell lung cancer tissue: analysis by Northern blotting and *in situ* hybridization

(癌細胞はヒト非小細胞肺癌組織において、ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーターとその受容体、インヒビターの mRNA を過剰発現している：ノーザン・ブロットィングと *in situ* ハイブリダイゼーションによる分析)

論文内容の要旨

[はじめに]

癌の転移に関わるいくつかの過程の中で、癌組織周囲のマトリックスの分解は、重要なステップの1つと考えられている。ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター (uPA) はプラスミノゲンをプラスミンに活性化し、細胞外マトリックスを直接あるいはマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) を介して分解する。uPAの受容体 (uPAR) は細胞表面に発現し、uPAと結合することで蛋白分解活性を細胞表面に局在させる。uPARに結合したuPAの活性は2つのインヒビター (PAI-1とPAI-2) によって調節される。このシステムは癌の転移に深く関与すると考えられている。uPA、uPAR、PAI-1、PAI-2の転写の局在は、ヒト肺癌では決定されておらず、非小細胞肺癌におけるこれらの因子のmRNAの発現について検討した。

[材料ならびに方法]

1994年から1995年に浜松医科大学で手術を受けた25例の肺癌症例の、外科的に切除された肺癌組織と正常肺組織を使用した。術前に化学療法や放射線治療を受けた症例は含まない。得られた肺癌組織の組織型は腺癌14例、扁平上皮癌11例であった。uPAR cDNAは、報告されているcDNA配列に基づいて作成した特異的プライマーによってRT-PCR法にて調製した。uPAとPAI-1、PAI-2のcDNAはDr. Tor Ny (ウメオ大学、スウェーデン) より供与された。mRNAの発現量は³²Pで標識したcDNAプローブでノーザン・ブロットィング法にて定量した。定量はβアクチンで標準化し、オートラジオグラフィとBAS 1000システムの2つの方法で行った。ノーザン・ブロットィングは全組織に対し行った。mRNAの局在はジゴキシゲニンで標識したcRNAプローブで*in situ* ハイブリダイゼーションを行い決定した。アンチセンスcRNAプローブで染色した組織で細胞を同定し、センスcRNAプローブで染色した組織をコントロールとした。*in situ* ハイブリダイゼーションは10組織 (腺癌4、扁平上皮癌6) に対し行った。

[結果]

uPAとPAI-2のmRNAの発現量は正常肺組織に対し肺癌組織で有意に高かった。しかし、uPARとPAI-1のmRNAの発現量は差がなかった。PAI-1のmRNAの発現量は高分化癌より低及び中分化癌で高く、PAI-2のmRNAの発現量は腺癌より扁平上皮癌において高かった。各mRNAの発現量と腫瘍径、リンパ節転移の程度、血清中腫瘍マーカーの値とはいずれも相関がなかった。uPA、uPAR、PAI-1、PAI-2全てのmRNAの発現が癌細胞で認められた。各mRNAの発現は数例で腫瘍辺縁に優位に局在していた。また、uPAのmRNAは線維芽細胞様細胞で、uPARのmRNAは線維芽細胞様細胞とマクロファージで認められた。uPARのmRNAを発現しているマクロファージは癌組織と正常肺組織の両方でみられ、uPAとuPARのmRNAを発現している線維芽細胞様細胞は腺癌の線維化巣においてみられた。

[考察]

我々はuPA、uPAR、PAI-1、PAI-2のmRNAが非小細胞肺癌組織において癌細胞に強く発現していること、さらに、いくつかの癌組織ではこれらの因子が癌病巣の辺縁に強く発現している事実を見いだした。

uPARはuPA活性を癌細胞表面に局在させることで細胞外マトリックスを効率的に分解し、癌の浸潤と転移に重要な役割を担っていると考えられている。ヒト癌細胞では、既に、脳、皮膚、結腸、骨および腎でuPAR mRNAの発現が示されており、本研究ではヒト肺癌組織においてもuPAR mRNAが発現していることを示した。

uPAの蛋白の発現は主に癌細胞でみられているが、uPAのmRNAの発現については意見が分かれている。結腸癌では癌細胞にはみられず、線維芽細胞様細胞にみられている。この局在の不一致は、uPAがuPARと結合し細胞内にインターナリゼーションした結果と説明されている。他の癌においてuPA mRNAの発現は、我々の肺癌の結果と同様に癌細胞にもみられている。肺癌において癌細胞はuPAとuPARをともに発現し、いくつかの例では病巣の辺縁に強く発現することで、浸潤能力を高めていることが示唆される。

PAI-1とPAI-2のmRNAも他の癌と同様に、肺癌でも癌細胞に発現していた。PAI-1とPAI-2はuPAのインヒビターであり、*in vitro* および*in vivo*モデルで癌細胞の浸潤と転移能を阻害することが示されている。我々のいくつかの例ではPAI-1とPAI-2も病巣の辺縁に強く発現しており、uPAの活性を阻害することで浸潤能を調節していると考えられる。しかしながらいくつかの臨床研究ではPAI-1の高い発現量とPAI-2の低い発現量が予後不良因子であることが示されている。我々の結果ではPAI-1 mRNAは中・低分化癌で強く、PAI-2 mRNAは腺癌で弱く発現していた。非小細胞肺癌において、これらの型の癌はより浸潤・転移し易いと考えられている。高PAI-1発現と低PAI-2発現は、癌細胞の高い転移能と関係しているようである。これらの機序については今後検討していく必要がある。

uPARとuPAのmRNAは腺癌線維化巣中の線維芽細胞様細胞に発現がみられ、肺の線維化にも関連しているようである。また、uPARのmRNAはマクロファージに発現がみられ、単球の遊走能への関与も示唆される。正常肺組織と肺癌組織でuPAR mRNAの発現量に差がみられなかった事実は、正常肺にみられる豊富な肺胞マクロファージの存在を反映した結果と考えられる。

[結論]

非小細胞肺癌においてuPA、uPAR、PAI-1、PAI-2のmRNAが癌細胞で強く発現していることを示した。癌転移の制御という点で、これら因子のさらなる詳細な分析は、肺癌の新しい治療戦略の確立に発展する可能性がある。

論文審査の結果の要旨

生体内のplasminogen activator (PA)は分子量、抗原量、生物学的活性の異なるurokinase-type PA (uPA)とtissue-type PA (tPA)の2種類があり、それぞれの遺伝子は第8染色体と第10染色体に存在する。uPAとtPAは生理学的作用が異なり、tPAは血管内皮細胞で主に産生され、fibrin clotを溶解することが主な生理学的作用であるが、受容体は癌細胞表面には存在しない。これに対してuPAは生理的かつ病的な組織破壊に主として関与しており、多くの固形癌において浸潤、転移など癌の進展に深く関わっている。すなわちuPAの受容体であるuPARは癌細胞表面に存在し、これと結合することで癌細胞表面局所における蛋白分解活性を担っている。このようなuPAの活性を調節しているのがplasminogen activator inhibitor (PAI)であ

る。3種類のPAI-1、PAI-2、PAI-3が存在しているが、悪性腫瘍との関連が認められているのはPAI-1とPAI-2である。生理的にはPAI-1は血管内皮由来の循環血液中の主要な凝固関連因子で、生体内における血漿中の主たるPA阻害物質である。PAI-2は主としてマクロファージ、モノサイトから産生される。

申請者は1994年から1995年に浜松医科大学で手術を受けた25例の非小細胞肺癌切除検体（腺癌14例、扁平上皮癌11例）を用いて、これらの因子のmRNAの発現と局在、及び臨床病理学的因子との関連について検討した。uPAR cDNAは、cDNA配列に基づいて作成した特異的プライマーによってRT-PCR法にて調製した。mRNAの発現量は³²Pで標識したcDNAプローブでノーザン・ブロットング法にて定量した。定量はβアクチンで標準化し、オートラジオグラフィとBAS 1000システムの2つの方法で行った。ノーザン・ブロットングは全組織に対し行った。mRNAの局在はジゴキシゲニンで標識したcRNAプローブで*in situ* ハイブリダイゼーションを行い決定した。アンチセンスcRNAプローブで染色した組織で細胞を同定し、センスcRNAプローブで染色した組織をコントロールとした。*in situ* ハイブリダイゼーションは10組織（腺癌4、扁平上皮癌6）に対し行った。

その結果、①uPAmRNAとPAI-2mRNAの発現量は正常肺組織に対し肺癌組織で有意に高く、uPARmRNAとPAI-1mRNAの発現量は差がなかった。②PAI-1mRNAの発現量は高分化癌より低及び中分化癌で高く、PAI-2mRNAの発現量は腺癌より扁平上皮癌において高かった。③各mRNAの発現量と腫瘍径、リンパ節転移の程度、血清中腫瘍マーカーの値とはいずれも相関がなかった。局在に関しては④uPA、uPAR、PAI-1、PAI-2全てのmRNAの発現が癌細胞で認められ、一部の症例では各mRNAの発現は腫瘍辺縁に強い局在を認めた。⑤uPAmRNAは線維芽細胞様細胞で、uPARmRNAは線維芽細胞様細胞とマクロファージで認められた。uPARmRNAを発現しているマクロファージは癌組織と正常肺組織の両方でみられ、uPAmRNAとuPARmRNAを発現している線維芽細胞様細胞は腺癌の線維化巣においてみられた。

ヒト癌細胞では、既に、脳、皮膚、結腸、骨および腎でuPARmRNAの発現が示されているが、本研究によりヒト肺癌組織においてもuPARmRNAが発現していることが示された。肺癌細胞はuPARとuPAをともに発現し、さらに病巣の辺縁に強く発現することで、浸潤能力を高めていることが示唆される。PAI-1とPAI-2のmRNAも他の癌と同様に、肺癌組織でも癌細胞に発現していたが、特に病巣の辺縁に強く発現しており、uPAの活性を阻害することで浸潤能を調節していると考えられる。今回の結果ではPAI-1mRNAは中・低分化癌で強く、PAI-2mRNAは腺癌で弱く発現していた。非小細胞肺癌において、高PAI-1発現と低PAI-2発現は、癌細胞の高い転移能と関係している可能性がある。最近、PAI-1は腫瘍血管新生を促進することが報告されており、非小細胞肺癌において高uPAかつ高PAI-1例は、予後不良となる可能性があることが示された。

申請者らは非小細胞肺癌においてuPA、uPAR、PAI-1、PAI-2のmRNAが癌細胞で強く発現していることを示した。これらのmRNA発現が非小細胞肺癌の予測因子となる可能性があり、さらに肺癌の新しい治療戦略の確立に発展する可能性がある、との結論に至った。

審査委員会では非小細胞肺癌においてPA systemにおける各因子のmRNA発現を初めて明らかにし、特にPAI-1mRNA発現が肺癌の進展に関与している可能性を示した点を高く評価した。

審査の過程において、審査委員会は次のような質問を行った。

- 1) 癌細胞におけるインテグリンと uPA について
- 2) pro uPA について
- 3) plasmin と MMP の基底膜分解作用について
- 4) 扁平上皮癌における PAI-2mRNA 発現について

- 5) 間質細胞における PA 系の発現について
- 6) PA 系因子の蛋白発現について
- 7) 肺癌における PA 系因子の腫瘍マーカーとしての有用性について
- 8) 間質性肺炎における PA system の役割について
- 9) PA system の蛋白発現と mRNA 発現の腫瘍マーカーとしての有用性について

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者	主査	今野 弘之	
	副査	梶村 春彦	鈴木 一也