

氏名	たつかわ りょうこ 立川 量子		
学位の種類	博士（医学）		
報告番号	甲第 1625 号		
学位授与の日付	平成 28 年 9 月 13 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当（課程博士）		
学位論文題目	Immunohistochemical demonstration of EphA2 processing by MT1-MMP in invasive cutaneous squamous cell carcinoma (皮膚浸潤性有棘細胞癌における MT1-MMP による EphA2 プロセシングの免疫組織化学的検討)		
論文審査委員	(主査) 福岡大学	教授	中山 樹一郎
	(副査) 福岡大学	教授	高松 泰
	福岡大学	教授	竹下 盛重
	福岡大学	講師	田中 俊裕

内容の要旨

【目的】

有棘細胞癌(SCC; squamous cell carcinoma)は皮膚上皮性悪性腫瘍の中でも頻度が高く、高齢者の露光部に好発し、今後も高齢化に伴って患者数は増加すると考えられる。SCCは日光角化症やBowen病(Bowen disease; BD)など非浸潤性の表皮内癌が真皮への浸潤性を獲得した結果生じると考えられているが、その機構は完全には明らかになっていない。

EphA2は膜貫通型の受容体型チロシンキナーゼの1種で、Ephrinと結合してシグナル伝達を行う。正常上皮細胞では、EphA2/EphrinA1はRasを介するEGF-EGFR細胞増殖経路を抑制する。つまりリガンド依存性に働くときは腫瘍抑制的に働いている。一方がん細胞では、膜型マトリックスプロテアーゼ(MT1-MMP)の働きでリガンド非依存性になっていると最近報告された。EphA2のN末端部分がMT1-MMPによって切断され、リガンドによる抑制から解放されるというものである。これによってEGF-EGFR系シグナルが活性化され、がん細胞の浸潤性が亢進する。

本研究では、皮膚SCCとBDを対象として、このMT1-MMPによるEphA2プロセシングがヒト組織で実際に生じているかを、免疫組織化学的手法、Westernblot法、in situPLA法(Proximity Ligation Assay)を用いて検討した。

【対象と方法】

1995年から2013年の間に福岡大学病院で手術された70例のSCC及び20例のBDを対象とし、そのホルマリン固定・パラフィン包埋標本(FFPE)を用いた。免疫組織化学的に、EphA2のC末側の反応性は存在するが、N末側の反応性が失われることをもって、プロセシングあ

りと判断した。染色強度はデジタル病理イメージング解析システム (Tissue Studio) を用いて数値化し、より客観的に浸潤癌SCCと非浸潤癌BDでの比較検討を行った。

またSCC及びBDの凍結組織より蛋白抽出を行い、Western blot法にてEphA2全長型 (130kDa) およびEphA2プロセシング断片 (50-65kDa) 、MT1-MMP (65kDa) の発現を検討した。さらにin situPLA法を用いて、EphA2とMT1-MMPがプロセシング可能なほど近接しているかを検討した。この方法の妥当性は培養細胞 (MT1-MMP強制発現及びノックダウンHT-1080細胞) を用いて確認した。

【結果】

免疫組織化学的検討の結果、浸潤癌SCCでは多くの症例でEphA2-N末は発現低下 ($p < 0.001$) していたが、非浸潤癌BDではEphA2-C末、N末ともに同程度の発現 ($p=0.2244$) であった。MT1-MMPはSCC、BDともに発現がみられた。

また、Western blot法では浸潤癌SCCにおいてEphA2プロセシング断片を確認した。MT1-MMP強制発現HT-1080細胞株では、in situPLA法にてMT1-MMPとEphA2の近接を認め、同時にWestern blot法にてEphA2のプロセシング断片が確認できた。一方MT1-MMPノックダウンHT-1080細胞では両者の近接がみられず、プロセシング断片も減少していた。実際の手術標本におけるin situPLA法の結果では、SCC、BDともにMT1-MMPとEphA2の近接が認められた。

【結論】

本研究は、皮膚 SCC 組織における EphA2 のプロセシングを示した初めての報告である。BD では EphA2 のプロセシングはみられない一方 SCC では EphA2 のプロセシングが生じており、どの浸潤形態をとる SCC でも EphA2 はプロセシングされていた。また、その EphA2 プロセシングにおける MT1-MMP の関与が示唆されたが、浸潤癌においては MT1-MMP と EphA2 の近接以外にまだ確認されていないメカニズムが必要であると推定された。

審査の結果の要旨

多くの固形癌でその浸潤・転移機構に erythropoietin producing hepatocellular receptor (EphA2)が関与していると報告があり、本論文は初めて皮膚の扁平上皮癌でもその浸潤に上記受容体が membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP)によりプロセシングを受けていることが関与している、というエビデンスを免疫組織化学的染色法、visual and computer-supported evaluation 法、western blot 法、in situ proximity ligation assay を用いて示唆したものである。今後の皮膚癌進展機構の解明やそれをふまえた分子標的治療薬の開発などに寄与する論文になり得るものと期待される。

1. 斬新さ

MT1-MMP による EphA2 のプロセッシングについては、*in vitro* とアニマルモデルを用いた検討での報告しかない。本論文は SCC の腫瘍組織を用いた *in vivo* における検討を行った。また、浸潤癌である SCC (70 例) と非浸潤癌である Bowen 病 (BD, 20 例) を比較検討した初めての報告である。

2. 重要性

BD を含む非浸潤癌 (表皮内 SCC) が、真皮への浸潤性を獲得して SCC へ進展するメカニズムはまだ不明である。本論文は、SCC の浸潤機構に関わる可能性のある新しい因子を示した意味で評価できる。

3. 実験方法の正確性

MT1-MMP、EphA2 の発現は、免疫染色、Western Blotting を用い、プロトコール通り行った。蛋白間相互作用の検討については *in situ* PLA 法を用い、この方法の妥当性は培養細胞を用いて確認した。いずれも確立された方法で複数の検体を解析しており、十分な正確性があると考えられる。また、染色強度はデジタル病理イメージング解析システムを用いて数値化し、より客観的に検討した。

4. 表現の明瞭性

本論文は英語論文であり、すでに *Virchows Arch* (2016 Jul;469(1):25-34) に掲載されており、研究背景、目的、方法、実験結果、考察を簡潔・明瞭に記載していると考えられる。

5. 主な質疑応答

Q: もし癌の悪性度にプロセッシングが関与しているのであれば、*tumor thickness* やリンパ節転移で差が出るのが予想されるが、有意差がでない理由は何か。
Clinical parameter と EphA2 プロセッシングの有無に相関がでなかったのは何故か。

A: 今回の検討では、EphA2 プロセッシングが浸潤に関与する可能性は示せたが、*clinical parameter* に関わらず EphA2 プロセッシングが生じていたことから、皮膚 SCC の予後因子となることは示せなかった。皮膚 SCC は切除治療で終了できる症例が多く、他臓器に生じる SCC より比較的予後の良い腫瘍である。そのため、*tumor thickness* やリンパ節転移などの *clinical parameter* との相関がでない可能性があると考えられる。

Q: EphA2 が切断されるのなら、血中にその分解産物が検出されるのか。

A:データとして提示はできないが、共同研究者の越川らは、**EphA2 fragments** が実際に癌患者の血液で増加していることを確認しており、血中で代謝されている可能性がある。

Q:他の MMP では inhibitor が近くに存在している。今回の結果についてプロセシングが生じておもう抑制がかかってしまうような inhibitor の関与はないのか。BD において EphA2 と MT1-MMP が近接しているにもかかわらずプロセシングが生じていないのは、inhibitor の存在により抑制されているからではないのか。

A:MT1-MMP のインヒビターとして TIMP-2 がある。今回は TIMP-2 に関しては検討していないが、関与している可能性はあると考える。

Q:MT1-MMP の発現について、免疫染色では SCC に比べ BD で高く出ており、Western blot では逆に低くなっていた。その理由は。

A:今回の免染は、腫瘍全体の染色強度を測定し、平方マイクロメートル当たりの平均値で検討している。BD の方が高い染色強度である理由として、SCC では壊死や角化のため染色強度に幅があり、そのため腫瘍全体で評価すると、一様に染まる BD よりも平均値は下がったのではないかと考える。実際の腫瘍組織における蛋白量をみる Western blot では SCC の方が EphA2、MT1-MMP 発現量が多い結果であった。

Q:PLA の予備実験において、fibrosarcoma の細胞株を使用したのはなぜか。

A:PLA の予備実験の意義は、PLA 法の手技の妥当性を確認するために行った。その際に、MT1-MMP を抑制している細胞株が必要であり、我々が所有している唯一の MT1-MMP 抑制細胞が HT-1080 であった。

Q:EphA2 が MT1-MMP と co-localization するだけでプロセシングが起きるのではなく、何らかのトリガーが予想される。これまでに可能性のある因子は何か報告されているのか、または予想されるメカニズムがあるか。

A:現時点では、EphA2 をプロセシングする分子は MT1-MMP の報告しかない。ただし他の Eph/Ephrin のプロテアーゼとして ADAM、 γ -secretase、MMPs などが報告されており、これらの分子が関わっている可能性がある。

Q:免疫染色で EphA2 の発現を確認している過去の報告では、予後不良であると報告されているものが多いが、これらの報告では EphA2 の N 末、C 末のどちらの抗体を用いているのか。

A:多くの報告では C 末の抗体を使用していた。C 末を認識する抗体では、プロセシングが生じている EphA2 も whole の状態の EphA2 もどちらも検出する。この

ことから、癌組織の進展における EphA2 の役割をみるためには、EphA2 発現の多寡をみるだけでなく、本研究のように EphA2-C と N 末端の発現を調べることが重要と考える。

Q:SCC で浸潤部と非浸潤部が同一標本内に見られる場合、EphA2-N 末の発現に差はあるか。

A:データには示していないが、SCC の表層部と浸潤部において EphA2 発現を比較してみたところ、EphA2-N 末発現に有意差はなく、どちらでも発現低下していた。SCC 内における非浸潤部と浸潤部の検討はしていない。

Q:BD の中でも、SCC のように、EphA2-N 末発現が低下している部分はみられたか。

A:BD における免染の染色強度は一様であった。

Q:BD ではプロセシングが生じない理由として、EphA2 や MT1-MMP の 3 次元的な conformation が異なっている可能性があるのではないか。

A:可能性はある。BD では MT1-MMP と EphA2 が近接しているものの EphA2 プロセシングはされていないという事実は今回初めて明らかになった結果であり、今後の研究課題と考える。

その他、いくつかコメントがあったか、発表者はいずれについても的確に応答した。

以上の審査結果により、本論文は斬新さ重要性和的確な質疑応答により学位論文に値すると評価された。