

氏名	たかはし ようこ 高橋 庸子		
学位の種類	博士（医学）		
報告番号	甲第 1760 号		
学位授与の日付	平成 31 年 3 月 14 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	Activated EphA2 Processing by MT1-MMP Is Involved in Malignant Transformation of Ovarian Tumours In Vivo (卵巣腫瘍の悪性転化における MT1-MMP による EphA2 プロセッシングの関与)		
論文審査委員	(主 査) 福岡大学	教授	鍋島 一樹
	(副 査) 福岡大学	教授	竹下 盛重
	福岡大学	教授	田村 和夫
	福岡大学	講師	四元 房典

内 容 の 要 旨

【目的】細胞膜に存在する増殖因子の受容体である EphA2 は膜貫通型の受容体チロシンキナーゼの一種でリガンド Ephrin と結合しシグナル伝達を行う。正常細胞では、EphA2 はリガンド依存性に Ras を介する EGF-EGFR 細胞増殖経路を抑制し、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である MT1-MMP の働きでリガンド非依存性になっていると近年報告された。つまり EphA2 N 末端を MT1-MMP によって切断されることでリガンドによる抑制が解除され、EGF-EGFR 細胞増殖経路が活性化し、癌細胞の浸潤、転移が促進される。

本研究ではヒト上皮性卵巣腫瘍組織で、MT1-MMP による EphA2 のプロセッシングが、悪性形質の獲得に関与しているかを免疫組織化学的手法、Western blot 法、*in situ* PLA 法 (Proximity Ligation Assay) を用いて検討した。

【対象と方法】2000 年から 2011 年に切除術が施行された上皮性卵巣癌 107 例(漿液性 47 例、類内膜 24 例、粘液性 16 例、明細胞 20 例)、境界悪性腫瘍(漿液性 10 例、粘液性 38 例)、良性腫瘍(漿液性 15 例、粘液性 18 例、内膜症性嚢胞 13 例)を対象としそのホルマリン固定・パラフィン包埋標本を用いた。免疫組織化学的には、MT1-MMP 及びプロセッシングされた際に残る EphA2-C 末端、遊離する N 末端に対する抗体を用いて、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ッシング(切断)ありと判断した。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 プロセッシング断片 (50-65kDa)、MT1-MMP (65kDa) の発現を検討

した。また、2分子間の近接を証明する *in situ* PLA (Proximity Ligation Assay) 法を用いて EphA2-N 末端のプロセシングについて検討した。客観性のある評価を行うためデジタル病理イメージング解析システムで評価した。統計学的検討は、Student's *t* 検定を用いた。

【結果】免疫組織化学的検討の結果、悪性腫瘍ではいずれの組織型でも、EphA2-N 末端の発現が C 末端の発現より低くなっており EphA2 のプロセシングの存在が推定された ($p < 0.001$)。このプロセシングはすべての stage、grade で認められた。境界悪性腫瘍でも同様の結果となったが、良性腫瘍では内膜症性嚢胞を除き、EphA2-C 末端と N 末端の間で有意差は認めなかった。

また、Western blot 法にて、悪性腫瘍、境界悪性腫瘍で EphA2 のプロセシングの断片が確認できた。*in situ* PLA 法では、悪性腫瘍において MT1-MMP と EphA2-C 末が有意に近接していることが確認できたが、境界悪性腫瘍では傾向はみられるものの有意差は認めず、良性腫瘍では近接は認められなかった。

【結論】本研究は、多類例のヒト上皮性卵巣腫瘍組織において EphA2 の MT1-MMP によるプロセシングが悪性転化に関与していることを示した初めての報告である。悪性腫瘍、境界悪性腫瘍では、組織型等に関わらず EphA2 のプロセシングが生じており、良性腫瘍では生じていなかった。EphA2 は MT1-MMP と co-localization し、プロセシングされることにより活性化され浸潤等の悪性形質獲得に関与することが示唆された。

審査の結果の要旨

本論文は、卵巣腫瘍の悪性形質獲得において、erythropoietin producing hepatocellular receptor (EphA2) の membrane type 1-matrix membrane protease (MT1-MMP) によるプロセシングが関連していることを、免疫組織化学的染色法、western blot 法、*in situ* proximity ligation assay (*in situ* PLA) 法を用いて初めて示したものである。今後の卵巣癌の分子標的治療薬の開発や癌の早期発見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 のプロセシングと腫瘍増殖・浸潤におけるその重要性については、*in vitro* 系と動物モデルを用いた研究しかなかった。本論文は卵巣腫瘍の腫瘍組織を用いて *in vivo* でも実際に EphA2 のプロセシングが生じていることを示した初めての研究である。また、プロセシングに関して、卵巣腫瘍を癌、境界悪性腫瘍、良性腫

瘍に分けて比較検討したのも初めてである。

2. 重要性

卵巣癌は、骨盤内臓器であり自覚症状が出現した時点ですでに進行している症例も多く、罹患数、死亡数も増加している疾患である。そのため癌化機構に関わる新しい因子を示せたことは今後の早期発見・新規治療の開発に寄与するのではないかと期待できる。

3. 実験方法の正確性

MT1-MMP、EphA2 の発現および EphA2 のプロセッシングは、免疫染色、Western Blotting にて、MT1-MMP と EphA2 の近接した局在は *in situ* PLA 法にて解析した。いずれも確立された方法で適切なコントロールと共に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 *Anticancer Res.* (2018 Jul;38(7):4257-4266) に掲載されており、研究背景、目的、方法、実験結果、考察について簡潔・明瞭に記載されている。

5. 主な質疑応答

Q:症例が 2000 年から近年までで長期間であるが EphA2 の免疫染色に用いた抗体の信頼性はどうか。

A:免疫染色でのばらつきを防ぐためにすべての標本にコントロールを置き染色を行った。

Q:ビジュアルイメージングシステムを用いた検討を行っているが目視で行ったものとの結果に違いはあるか。

A:あまり違いはなかった。しかし、より客観性をもったものとなっている。

Q:EphA2 と MT1-MMP が co-localize されていることは証明されているが、MT1-MMP は EphA2 切断のみならず他の分子などと interaction している可能性はあるか。

A:良性腫瘍でも MT1-MMP が発現していることを考えると、恐らく何か他の因子が加わって MT1-MMP によるプロセッシングが生じている可能性がある。

Q:プロセッシングは癌においてステージ、grade、リンパ節転移に関連なくおきている結果であったが、転移のある症例では多くおきている印象を抱いてしまうがどうか。

A:実験前は、その仮説を立てていたが、実際の実験、統計結果では stage、grade、転移等ではすべての段階でプロセッシングがおこっており、また、境界悪性でもプロセッシングが生じていたため癌化機構の早期の段階で生じていると結論した。

Q: 予後との関連はないか。

A: このプロセッシングに関連しての予後との関連の文献はないが、EphA2 発現のみをみた論文では、予後との関連があるという文献も予後とは関連ないとの文献も両者がある。

Q: 癌の標本では一緒に含まれている背景の良性腫瘍病変はどのように染色されているのか。

A: ブロック自体ほぼ全体的に癌の部分のみをはじめから選択していたので今回検討した標本には良性部分は含まれていなかった。

Q: Endometriotic cyst で EphA2 のプロセッシングがおきている機序は。

A: 子宮内膜症では月経周期で組織の再構築において MMP2、MT1-MMP 発現が高く認められているので、プロセッシングがおこっているのだろうと考えた。詳しい機序は不明である。

Q: 内膜症性嚢胞が良性にもかかわらずプロセッシングがおきているのは、内膜症性嚢胞が悪性により近い良性(境界悪性)のような性質をもっているからという可能性は。

A: 内膜症は元々良性腫瘍なので考えにくいかもしれないが、今回の考察する上で検討項目には上がった。近年、異型のある内膜症で癌化したという症例報告などが散見されるようになったこと、また今回の結果で、内膜症でのみプロセッシングの現象が起こっていたことを踏まえると境界悪性のような性質をもっている可能性は否定できない。内膜症性嚢胞で異型の有無等で EphA2、MT1-MMP で免疫染色を行い検討することも今後研究課題になりうる。

Q: Western blot の結果で full length と fragment の間にバンドがあるが解釈は。

A: 変性あるいは部分分解された EphA2 のバンドと考えていて、リガンドが結合していない EphA2 なので fragment の EphA2 と同じ活性があると判断している。

Q: EphA2 がバイオマーカーになるという考察があったが、具体的な研究はすすんでいるのか。

A: 共同研究者の越川らが、血中での EphA2 N 末端を測定し癌の早期診断を目指す臨床試験を進めているところである。

Q: ダサチニブ療法での効果があまりよくないことについての考察は。

A: リガンド依存、非リガンド依存双方に作用するため、また、ダサチニブがチロシンキナーゼファミリーを標的とする multi-target のためではないかと考えている。

Q: clear cell での検討はどうであったか。

A: clear cell は良性、境界悪性がほぼないので癌のみでの検討であった。

Q: 内膜症性嚢胞における染色は個々の症例で差はあったか。

A: データとしては出してないが、印象としては症例毎での差はあまり認めなかった。

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と的確な質疑応答により学位論文に値すると評価された。