

氏名	ごりん りばす まぬえる ほせ Gorrin Rivas Manuel Jose
学位(専攻分野)	博士(医学)
学位記番号	医博第2306号
学位授与の日付	平成13年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	医学研究科分子医学系専攻
学位論文題目	Macrophage Metalloelastase (MMP-12) and its Antiangiogenic Function: A Novel and Promising Strategy to Induce Tumor Dormancy (Macrophage Metalloelastase (MMP-12) とその血管新生抑制機能: Tumor Dormancy を誘導する新戦略)
論文調査委員	(主査) 教授 山岡義生 教授 西川伸一 教授 今村正之

## 論文審査の結果の要旨

本研究では、肝細胞癌(HCC)における human matrix metalloproteinase family に属しており Matrix Metalloproteinase-12 (MMP-12) と呼ばれる Human Macrophage Metalloelastase (HME) messenger RNA (mRNA) の発現と angiostatin 産生について検討した。HME mRNA の発現を40例の HCC サンプルのうち25例(62.5%)に認めた。In situ hybridization 法では主に HCC 細胞にシグナルを認めた。Angiostatin の産生を Western blot 法にて検討したところ主に腫瘍細胞が産生しており、その発現は HME mRNA と強く相関していた ( $P=0.0008$ )。HME mRNA を発現しない腫瘍は angiostatin も産生しておらず、HME mRNA 発現が強い腫瘍と比べ予後不良であった ( $P=0.002$ )。生存率を単変量解析と多変量解析にて検討したところ、HME mRNA 発現が有意な独立した予後因子であった。(各々  $P=0.001$  と  $P=0.03$ ) 以上の結果は、HCC において HME 遺伝子発現が angiostatin 産生に関連しており、肝切除後の HCC 患者の予後予測因子として新しい分子マーカーとなり得ることを示している。さらに、B16-BL6 メラノーマ細胞に Mouse Macrophage Metalloelastase 遺伝子を導入したところ、in vivo で血管新生が抑制され、腫瘍増殖が抑制された(73%の縮小、 $P=0.00002$ )。

以上の研究は HCC における MMP-12 発現及び angiostatin 産生の意義の解明に貢献し HCC に対する新たな遺伝子治療法の開発に寄与するところが多い。従って、本論文は博士(医学)の学位論文として価値あるものと認める。なお、本学位授与申請者は、平成12年12月7日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

Human Macrophage Metalloelastase (HME) は human matrix metalloproteinase family に属している (MMP-12)。その機能は主として elastin や、ほかに type IV collagen, gelatin, fibronectin, laminin, entactin, vitronectin, proteoglycan, myelin basic protein,  $\alpha 1$ -antitrypsin などを含む広い範囲の matix, nonmatrix substrate の分解作用であるが、最近、実験的動物モデルにおいて plasminogen の internal fragment であり血管新生抑制作用を有す angiostatin の産生に関与していることが明らかにされた。しかし、HME 遺伝子の発見と angiostatin 産生の相互関係について臨床的報告はみられない

本研究ではまず、肝細胞癌(HCC)における HME messenger RNA (mRNA) の発現と angiostatin 産生について検討をした。HME mRNA の発見は、Northern blot 法にて40例の HCC サンプルのうち25例(62.5%)に認め、これらの全てにおいて非腫瘍組織より腫瘍組織に強い発現を認めた。In situ hybridization 法では主に HCC 細胞にシグナルを認めた。Angiostatin の産生でウェスタンブロット法にて検討したところ主に腫瘍細胞が産生しており、その発現は HME mRNA と強く相関していた ( $P=0.0008$ )。HME mRNA を発現しない腫瘍は angiostatin も産生しておらず、HME mRNA 発現が強い腫瘍と比べ予後不良であった ( $P=0.002$ )。生存率に対しては単変量解析と多変量解析をしたところ、HME mRNA 発現が有意な独立した予後因子であった。(各々  $P=0.001$  と  $P=0.03$ )。以上の結果は、HCC において HME 遺伝子発現が angiostatin 産生に関連しており、肝切除後の HCC 患者の予後予測因子として新しい分子マーカーとなり得ることを示して

いる。

つぎに、Mouse Macrophage Metalloelastase (MME) を持続して産生する腫瘍細胞が血管新生を抑制し、*in vivo* で腫瘍の発育を遅延させるかどうかを検討するために、MME をコードする cDNA を、MME を発現していないマウス B-16-BL6 メラノーマ細胞に導入した。MME を導入されたクローンは、*in vitro* において plasminogen から angiostatin が生成されることを免疫沈降により確認した。Stable clone を C57BL/6 マウスの皮下に生着させたところ腫瘍の発育は抑制され (73% の縮小,  $P=0.00002$ )、これは抗 von Willebrand factor 抗体による免疫組織染色により測定された腫瘍血管密度と相関していた (76% の抑制)。microangiography においてもコントロールの腫瘍では著明な血管新生が認められたが、MME を transfect した腫瘍では血管のネットワークの減少と分断が認められた。マウス angiostatin に対する特異的な抗体を用いた Western blot analysis では MME を transfect した腫瘍やマウスの血清において 38kDa の強いバンドが認められた。これらの結果は、B16-BL6 メラノーマ細胞に導入された MME 遺伝子が血管新生を抑制し、腫瘍増殖をも抑制することを示している。

以上のように本研究は MMP-12 が血管新生を抑制することにより腫瘍増殖を阻害することをはじめて示し、MMP-12 による tumor dormancy 療法の可能性を示唆するものであり、学位授与に値するものと考えられる。