

氏名・(本籍) 梅田 朋子(奈良県)
 学位の種類 博士(医学)
 学位記番号 博士第260号
 学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
 学位授与年月日 平成9年9月26日
 学位論文題目 Cellular localization of urokinase-type plasminogen activator, its inhibitors and their mRNAs in breast cancer tissues
 (ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーターとそのインヒビター蛋白とmRNAの乳癌組織における発現と局在)

審査委員 主査 教授 大久保 岩 男
 副査 教授 服部 隆 則
 副査 教授 小玉 正 智

論文内容の要旨

【目的】

腫瘍の浸潤転移過程において基底膜や細胞外マトリックス構造が破壊されることが必要であり種々の蛋白分解酵素の関与が報告されている。セリンプロテアーゼの一つである urokinase-type plasminogen activator (u-PA) は細胞外基質を分解することで、腫瘍の浸潤転移機構に関与しているものと考えられている。また、PA inhibitor (PAI-1)、PAI-2 は u-PA 活性を阻害することから腫瘍の浸潤転移に抑制的に作用すると考えられる。我々は連続切片を用いて乳癌の浸潤形態における線溶系因子 u-PA、PAI-1、-2 の mRNA と蛋白の局在と発現を、乳癌細胞と間質細胞に分類し免疫組織染色法および独自に作成した RNA プロブを用いて in situ hybridization (ISH) 法にて検討した。さらに各々の蛋白の発現を臨床病理学的因子と比較し、乳癌の浸潤における意義に関して検討した。

【方法】

mRNA の局在は浸潤性乳管癌10例と良性疾患(線維腺腫、乳頭腫、乳腺症)4例の4%パラホルムアルデヒド固定標本を対象とした。

RNA probe は独自に作成したが、u-PA においては Japanese cancer research resources bank (JCRB) より供与された u-PA cDNA (1.58kb) を vector (pBluescriptII KS+) に挿入し、T7 RNA polymerase により合成した。また、PAI-1、-2 RNA probe においては JCRB より供与された HT1080 (PAI-1 産生株) より抽出した genomic RNA に対して RT-PCR 法にて genomic DNA を合成し、各々プライマー2種類を用いて 564bp、406bp の PAI-1、-2 cDNA を作成し vector (pCR^{TV} II) に挿入し、T7、SP6 RNA polymerase にて合成した。いずれの probe もジゴキシゲニンで標識した。陰性コントロールには sense probe を使用した。

蛋白の局在は乳癌73例のホルマリン固体標本を対象とし、SAB法にて検討した。抗 u-PA モノクローナル抗体は自治医科大学血液研究部門止血血栓、坂田洋一助教授より供与された u-PA α 1 抗体を、抗 PAI-1、-2 モノクローナル抗体バイオプール社の MAT-11、-21 抗体を用いた。いずれも発色には AFC を使用した。

統計学的処理は Stat View プログラムに χ^2 検定、カプランマイヤー法、log-rank test、Cox ハザードモデルを用いて行った。

【結果】

u-PA mRNA は乳管内進展部および硬性浸潤部の乳癌細胞核周囲細胞質および癌細胞近傍の線維芽細胞に陽性であった。連続切片による u-PA 蛋白の局在は mRNA のそれとほぼ一致した。良性疾患の間質線維芽細胞においても u-PA mRNA は弱陽性であった。PAI-1 mRNA は浸潤先進部乳癌細胞に強く認められ、その周囲の間質の線維芽細胞、マクロファージ、血管内皮細胞にも強

陽性であった。PAI-2 mRNAも同様に浸潤先進部の乳癌細胞、間質線維芽細胞、リンパ球に陽性であった。PAI-2 蛋白も癌細胞近傍の線維芽細胞に陽性であったが良性疾患では間質細胞に陽性所見を認めなかった。

浸潤性乳癌の同一切片上の乳癌細胞と間質線維芽細胞を正常乳管部、乳管内進展部、硬性浸潤部（浸潤先進部）に分けて各々のmRNA、蛋白の発現を比較するとu-PAの癌細胞における発現は硬性浸潤部ほど強く、PAI-1、-2ではさらにその傾向が強かった。また、間質線維芽細胞においてPAI-1、-2は浸潤部でのみ発現し正常乳管部では認められなかった。

各種臨床病理学的因子との検討ではu-PA蛋白は33例、PAI-1蛋白は31例、PAI-2蛋白は34例の乳癌細胞質に陽性であった。u-PA蛋白は硬癌（ $P=0.035$ ）、N3（ $P=0.022$ ）、M1（ $P=0.044$ ）において有意（ χ^2 検定）に陽性例が多かった。10年生存率はu-PA蛋白陰性例では93%であったのに対してu-PA蛋白陽性例では63%と有意（ $P=0.019$ 、log-rank test）に予後が悪かった。また、PAI-2蛋白陽性例では陰性例と比べて有意（ $P=0.017$ 、log-rank test）に予後が良かった。Multivariate Coxハザードステップワイズ検定では（ $P<0.10$ ）、u-PA（ $P=0.0380$ 、 $0.057-0.978$ 、 $RR=0.237$ ）とM（ $P=0.0011$ 、 $0.6057-0.780$ 、 $RR=0.211$ ）だけが有意な予後因子であった。

【考 察】

癌組織における悪性度はその癌細胞の性質や発現する因子のみならず癌細胞周囲の宿主側の因子も検討することによってさらに詳しい悪性度診断が可能であり、このことは縮小手術が施行される現在の乳癌治療において重要であると考えられる。今回の検討から、間質線維芽細胞におけるPAI-1、-2の発現は癌に特異的で、乳癌細胞がu-PAを産生し、それに伴ってPAI-1、-2 mRNAが癌細胞および周囲の間質細胞に発現して乳癌細胞のu-PA活性が制御される機構が示唆された。

【結 論】

u-PAの癌細胞における発現が最も乳癌の予後に関与するものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

Serine proteaseの一つであるurokinasa-type plasminogen activator (u-PA)は細胞外基質を分解することにより腫瘍の浸潤転移に関与し、plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)およびPAI-2はu-PA活性を阻害し、浸潤転移に抑制的に作用すると推定されている。本研究は、乳癌組織におけるu-PA、PAI-1、およびPAI-2の発現をmRNAとタンパク質レベルで解析したものである。実際には、RNA probeを用いたin situ hybridizationによってmRNA量を、モノクローナル抗体を用いた免疫組織染色法によってタンパク質量を定性的に観察している。さらに、腫瘍中心部と浸潤先進部で乳癌細胞と間質細胞におけるu-PA、PAI-1とPAI-2の発現の有無を、臨床病理学的因子と比較することで、それらの発現の意義について検討している。

得られた結果は以下の如くである。

- 1) 浸潤に伴い乳癌組織のu-PA mRNA、および癌細胞と線維芽細胞における、PAI-1、PAI-2 mRNAの発現量が増加した。
- 2) 乳癌細胞においてu-PAが発現している症例は有意に予後が悪く、PAI-2発現例で有意に予後が良好であった。
- 3) 癌細胞のu-PAは浸潤に促進的に、間質細胞のPAI-1とPAI-2発現は浸潤に抑制的に働き、癌細胞でのPAI-1とPAI-2発現は間質構築の安定化に関与している可能性があることが示唆された。

本研究は、u-PAが癌浸潤において重要な役割をしていることを明らかにし、逆にPAI-1とPAI-2がu-PAを阻害することによって、間質構築の保持がおこる可能性を示したこと、さらにu-PAとPAI-2の発現量が乳癌の予後が規定することを見いだしたことに意義があり、博士（医学）

の学位授与に値するものと認められた。