

氏名 田 村 彰 規

授与した学位 博士
専攻分野の名称 歯学

学位授与の番号 博 甲 第 2663 号

学位授与の日付 平成 16 年 3 月 25 日

学位授与の要件 歯学研究科歯学専攻(学位規則第4条第1項該当)

学位論文題名 腺様嚢胞癌における細胞外基質とuPAシステムに関する研究

論文審査委員 教授 菅原 利夫 教授 永井 教之 教授 佐々木 朗

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

【緒言】

腺様嚢胞癌は唾液腺悪性腫瘍のなかで最も頻度が高く、組織学的には基底膜物質を自己産生し、細胞間に蓄積することで嚢胞を形成し本腫瘍に特徴的な多数の小腔を含む篩状構造をとる。又、本腫瘍は一般に増殖は緩慢であるにもかかわらず、しばしば局所再発や遠隔転移を起こし易いという特徴を有し、予後はきわめて不良である。このことから腺様嚢胞癌の浸潤機構の解明が求められている。癌の浸潤では癌細胞が癌巣周囲の基底膜を分解して胞巣から離脱し、周囲組織へ移動することが重要となる。一般に癌の基底膜の分解には、uPA, uPAR, PAI-1 からなる uPA システムが関与している。uPA は uPAR と結合することで、plasminogen を plasmin に変換させ、plasmin が、さらに潜在型 MMP を活性型 MMP に変換し、活性型 MMP により基底膜を分解するとされている。しかし、腺様嚢胞癌では基底膜物質を含む細胞外基質を自己産生し、胞巣形成をしつつ浸潤するという特異な浸潤機構を示すことから、細胞外基質と uPA システムの相互作用が示唆されるがその詳細に関しては不明な点が多い。そこで本研究では、腺様嚢胞癌の浸潤機構の解明を目的として本腫瘍の主要な基底膜構成成分である typeIVcollagen (Coll IV), laminin (LN) とその分解系である uPA システムについて腺様嚢胞癌の臨床材料を用いて免疫組織化学的に検索するとともに、in vitro で Coll IV, LN と uPA システムとの相互作用及び、uPA システムの関連因子の発現に関与するシグナル伝達系について検討した。

【材料および方法】

1. 腺様嚢胞癌の臨床材料における uPA システム, typeIVcollagen, laminin の病理組織学的検索

腺様嚢胞癌 14 例の手術標本を使用した。一次抗体として anti-uPA, anti-uPAR, anti-PAI-1, anti-Coll IV および anti-LN γ 2 chain を用い、Envision システムにて免疫組織化学的検索を行った。

2. 腺様嚢胞癌細胞の typeIVcollagen, laminin に対する接着能・浸潤能の検索

蛋白レベルで Coll IV と LN の発現を認める腺様嚢胞癌細胞株 ACC-S, ACC-H を用いた。

1) Coll IV および laminin に対する接着能の検討

96 穴プレートに 0.1~4.0 μ g/ml の濃度で Coll IV, LN を 4°C で 24 時間コートし、ACC-S, ACC-H を培養した。30 分後プレートに無血清培養液を加え、非接着細胞を除去し接着した細胞数を測定した。

2) typeIVcollagen および laminin に対する浸潤能の検討

24 穴プレートにセル・カルチャー・インサートを装着し、フィルター上面に Coll IV および LN (各 4.0 μ g/ml) をコートし、ACC-S, ACC-H 細胞の懸濁液を加えた。チャンバー下室に 10 μ g/ml の fibronectin を含む無血清

培地を加え6日間培養し、浸潤したフィルター下面の細胞数を測定した。

3) 細胞外基質存在下での uPA, uPAR, PAI-1 の発現の検索

培養ディッシュに Coll IV および LN (各 4.0 $\mu\text{g/ml}$) をコートし、ACC-S, ACC-H を培養し、total RNA を抽出し、uPA, uPAR, PAI-1 の mRNA 発現レベルを RT-PCR 法を用いて検討した。

3. 腺様嚢胞癌において typeIV collagen が uPA システムを調節するシグナル伝達系の検索

培養ディッシュに Coll IV (4.0 $\mu\text{g/ml}$) をコートし、ACC-S, ACC-H 細胞を播種後、各種シグナル伝達系阻害剤 (ERK1/2MAPK 阻害剤, p38 MAPK 阻害剤, PI3K 阻害剤, PKA 阻害剤, PKC 阻害剤) を 20 μM 添加し培養した。24 時間後 total RNA を抽出し、uPA, uPAR, PAI-1 の mRNA 発現レベルを RT-PCR 法にて検討した。

【結果】

1. 腺様嚢胞癌の臨床材料における uPA システム, typeIV collagen, laminin の病理組織学的検索

腫瘍実質部では、細胞外基質の分解促進因子である uPA で 8/14 例 (57%), uPAR で 6/14 例 (43%), 分解阻害因子である PAI-1 で 4/14 例 (29%) の発現を認めた。細胞外基質である Coll IV で 9/14 例 (64%), LN で 6/14 例 (43%) の発現を認めた。一方、浸潤先端部では、Coll IV が発現した 9 例全例において浸潤先端部の小胞巣周囲に腫瘍実質と比べ Coll IV の強発現を認めた。また、Coll IV の強発現部位と同部位に、7/9 例 (78%) で uPA の発現も認めた。

2. 腺様嚢胞癌細胞の typeIV collagen, laminin に対する接着能・浸潤能の検索

ACC-S, ACC-H において細胞外基質への接着能は、LN と比較して Coll IV において濃度依存的に有意に亢進した。又、浸潤能においても、LN より Coll IV に対して有意に亢進した。Coll IV 上で培養した ACC-S, ACC-H では uPA, uPAR, PAI-1 の mRNA 発現レベルが有意に上昇した。LN 上で培養した ACC-S, ACC-H では uPA, uPAR, PAI-1 の mRNA 発現レベルは両細胞において差はあるもの上昇傾向が認められたが、Coll IV 上で培養した方が LN と比べて uPA, uPAR, PAI-1 の mRNA 発現レベルの上昇は顕著であった。

3. 腺様嚢胞癌において typeIV collagen が uPA システムを調節するシグナル伝達系の検索

Coll IV 上で培養した ACC-S, ACC-H において、uPA, uPAR, PAI-1 の mRNA 発現レベルの上昇は主に PKC 阻害剤で、また一部 PKA 阻害剤で阻害された。

【考察】

手術材料を用いた免疫組織化学的所見では、腺様嚢胞癌の浸潤先端部で、扁平上皮癌などの浸潤パターンとは異なり腫瘍実質と比較して Coll IV を強発現する多数の小胞巣を認め、これらに一致した部位に uPA の発現を認めるという特徴的な像を呈しており、腺様嚢胞癌の浸潤には Coll IV と uPA の相互作用が重要な役割を果たすことが示唆された。これらの細胞外基質-細胞の相互作用に関して培養細胞株 ACC-S, ACC-H を用いて検討したが LN と比較して Coll IV に対して、これらの細胞の接着性、浸潤能は強く、又 uPA システムの mRNA 発現も上昇させた。口腔扁平上皮癌などでは、一般に浸潤機構において uPA システムを介して Coll IV などの細胞外基質を著明に分解し浸潤が進行することが知られているが、腺様嚢胞癌においては、細胞外基質の分解は口腔扁平上皮癌などより著明でなくむしろ自己産生した Coll IV などの細胞外基質は小胞巣を形成しつつ、細胞外基質-細胞の相互作用すなわち uPA システムをコントロールする機構が示唆された。Coll IV と腺様嚢胞癌の接着を介した uPA システムの調節機構を網羅的にシグナル伝達系の阻害剤により解析を行ったが、uPA システムの調整は、主として PKC, また一部 PKA シグナル伝達系により行われている可能性が明らかとなった。これらのシグナル伝達系に関しては未だ不明な点も多いが、さらなる詳しい解析により、その分子標的を用いることで腺様嚢胞癌の浸潤抑制という治療の展開が期待できると考えられる。

【結論】

腺様嚢胞癌の浸潤において Coll IV は重要な働きをしており、その一つとして uPA システムの制御が示唆された。

論文審査結果の要旨

腺様嚢胞癌は悪性唾液腺腫瘍の中で最も頻度が高く、一般に増殖は緩慢であるにもかかわらず、しばしば局所再発や遠隔転移を認め、予後はきわめて不良である。一般に癌の浸潤では、まず癌細胞が基底膜を分解することが必須であり、基底膜の分解には uPA、uPAR、PAI-1 からなる uPA システムが関与している。腺様嚢胞癌では基底膜物質を含む細胞外基質を自己産生し、胞巣形成しつつ浸潤するために、細胞外基質と uPA システムの相互作用が示唆されるがその詳細に関しては不明な点が多い。

本研究は、腺様嚢胞癌における基底膜の主要な構成成分である typeIV collagen および laminin とその分解系である uPA システムとの関連について検討している。

腺様嚢胞癌の臨床材料を用いて uPA システム、typeIV collagen、laminin の病理組織学的検索を行い、in vitro での typeIV collagen、laminin に対する接着能・浸潤能の検索、typeIV collagen が uPA システムを調節するシグナル伝達系の検索を行った結果、以下の結論を得ている。

1. 腺様嚢胞癌の浸潤先端部では小胞巣周囲に typeIV collagen が強く染色されている部位と同部位に uPA の染色も認められた。
2. 腺様嚢胞癌細胞における uPA システムの制御は細胞外基質である typeIV collagen、laminin による癌細胞－細胞外基質の相互作用により調節されていることが示唆された。
3. PKC を介したシグナル伝達系が腺様嚢胞癌の浸潤機構における癌細胞－細胞外基質の相互作用には重要であることが示唆された。

これらの知見は腺様嚢胞癌の浸潤、転移の解明のための基礎的研究として価値のある研究業績である。よって、本申請論文は博士（歯学）の学位論文に値するものと認めた。