

学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
高橋優子	主査 教授 大道 正英 副査 教授 岡田 仁克 副査 教授 辻 求 副査 教授 瀧内 比呂也
主論文題名 Versican G1 and G3 domains are upregulated and latent transforming growth factor- β binding protein-4 is downregulated in breast cancer stroma (乳癌組織の間質におけるバーシカン G1、G3 ドメインの増加、および潜在型 TGF- β 結合蛋白 4 の減少)	
学位論文内容の要旨	
《研究の背景と目的》 乳癌組織をはじめ種々の癌組織における間質は正常部のそれと異なり、腫瘍細胞の増殖・浸潤に大きな役割を果たしていることが知られている。細胞外マトリックス(ECM)の一つであるバーシカン (versican)はコンドロイチン硫酸プロテオグリカンで、ヒアルロン酸(HA)と共に細胞の接着や移動の制御に関与している。肺癌、消化器癌では、間質での発現と予後との関連が示唆されている。また、versicanには V0,V1,V2,V3 の 4 つの isoform が存在し、互いに異なる作用を有することも知られている。 一方、TGF- β は ECM の遺伝子発現やマトリックス分解酵素の制御に関わり、細胞増殖と分化に携わることが知られているが、通常は潜在型 TGF- β 結合蛋白(latent transforming growth factor- β binding protein : LTBP)と結合して ECM に存在する。TGF- β の活性化には LTBP が ECM に結合することが必要であり、ECM に存在する microfibril の構成要素である fibrillin-1 と結合することが知られている。	

Versican はそのN末端(G1 domain)において HA と結合し、C 末端(G3 domain)において fibrillin-1 と結合する。さらに、fibrillin-1 は LTBP-1 および 4 と結合するため、HA、versican、fibrillin-1、および LTBP-1,4 には相互作用があり、癌周囲の間質においてはこれらの発現の不均衡があることが示唆される。しかし、これらの動態は、いまだ解明されていないのが現状であり、特に乳癌組織の臨床検体を用いた報告例も少ない。

本研究では、手術検体によって得られた乳癌組織の癌部と非癌部の間質における、Versican の G1,G3 domain およびその isoform、また fibrillin-1 や LTBP1,4 の発現の違いを、臨床病理学的因子との関係も含めて比較・検討した。

《方 法》

浸潤癌と診断され、外科的乳房切除を行った 18 症例の摘出標本より、癌部および非癌部の組織片を採取し、それぞれホルマリン固定および - 80°C にて保存した。この際、癌部と非癌部は目視において十分離れていることを確認して採取し、H&E 染色において確認した。

Versican の G1,G3 domain およびその isoform、fibrillin-1、LTBP-1,4 の発現の癌部および非癌部での違いを、real time RT-PCR、slot blotting、免疫組織化学にて比較・検討した。さらに、これらの発現と臨床病理学的因子との関連を検討した。

《結 果》

Realtime RT-PCR では、癌部において versican V1 および V0 の増加および LTBP-4 の減少が認められた。Slot blotting では、癌部において versican G1,G3 domain の増加および LTBP-4 の減少が認められた。一方、fibrillin-1 および LTBP-1 は、いずれの検討においても有意差が認められなかった。

免疫組織化学では、癌周囲の間質において HA、6084(versican の G1 domain

を認識する抗体)、2B1(同 G3 domain を認識する抗体)の陽性像が認められたが、LTBP-1,4 の発現は陰性あるいは微かであった。

臨床病理学的因子との関連においては、Versican の G3 domain と癌細胞の Ki67 index 間に相関関係が認められた。

《考 察》

Versican の isoform においては、癌部で V0,V1 の増加が認められたが、これは消化器癌、肺癌等の癌組織と同様であった。一方、V2 と、V3 は量的には少量であった。

一方、versican の G1,G3 domain 蛋白については、slot blotting および免疫組織化学においてその発現の増加が認められた。G1 domain は細胞移動や増殖に関わっていることや、G3 domain が血管新生や epidermal growth factor 様構造によって増殖や浸潤に関わっていることが指摘されていることから、乳癌組織においても、G1 および G3 domain の増加により、腫瘍の増殖浸潤に関与する可能性が示唆された。

さらに免疫組織化学では、これらの物質が癌細胞外に認められたが、versican が癌細胞から分泌されて ECM に集簇している可能性や、癌細胞が ECM の間質細胞に働きかけて paracrine mechanism により versican の発現を促している可能性が考えられる。一方、LTBP-4 が癌部において mRNA や蛋白レベルで低下していることについては、LTBP-4 が TGF- β シグナル経路を制御していることから、その破綻により癌細胞の増殖に関与している可能性が示唆された。

免疫組織化学により、HA、versican G1, G3 domain、fibrillin-1、および LTBP-1,4 は非癌部の乳腺組織においては、非癌部の乳管の周囲に局限して存在していたが、癌部の間質においては HA と versican G1,G3 が認められ、LTBP-4 は認められなかったことから、HA-versican 複合体の増加と、LTBP-4-TGF- β 複合体の破綻が起こっていることが示唆された。

臨床病理学的因子との相関については、versican と Ki67 index および腫瘍径の
間で認められ、versican が腫瘍細胞の biological phenotype に影響を与えるもの
と考えた。

《結 語》

乳癌組織の間質における、versican の G1,G3 domain および V0,V1 isoform の
増加、および LTBP-4 の減少を証明した。また、versican の G3 domain は癌細胞
の Ki67 index と相関した。

今回の研究により、乳癌細胞の増殖進展には、間質に存在する versican や
LTBP-4 が重要な働きを担っていると考えられ、今後の乳癌治療の標的として期待
される。

審査結果の要旨および担当者

報告番号	甲第号	氏名	高橋優子
論文審査担当者		主査教授 大道 正英	
		副査教授 岡田 仁克	
		副査教授 辻 求	
		副査教授 瀧内 比呂也	
主論文題名			
Versican G1 and G3 domains are upregulated and latent transforming growth factor- β binding protein-4 is downregulated in breast cancer stroma (乳癌組織の間質におけるバーシカン G1、G3 ドメインの増加、および潜在型 TGF- β 結合蛋白 4 の減少)			
論文審査結果の要旨			
<p>乳癌組織をはじめ種々の癌組織における間質は正常部と異なり、腫瘍細胞の増殖・浸潤に大きな役割を果たしていることが知られている。細胞外マトリックス (ECM) の一つであるバーシカン (versican) は、ヒアルロン酸 (HA) と共に細胞の接着や移動の制御に関与しており、肺癌、消化器癌では、間質での発現と予後との関連が示唆されている。</p> <p>一方、TGF-β は ECM の遺伝子発現やマトリックス分解酵素の制御に関わり、細胞増殖と分化に携わることが知られているが、通常は潜在型 TGF-β 結合蛋白 (LTBP) と結合して ECM に存在する。TGF-β の活性化には LTBP が ECM に結合することが必要であり、ECM に存在する microfibril の構成要素である fibrillin-1 と結合することが知られている。</p> <p>Versican はその N 末端 (G1 domain) において HA と結合し、C 末端 (G3 domain) において fibrillin-1 と結合する。さらに、fibrillin-1 は LTBP-1 および 4 と結合す</p>			

るため、HA、versican、fibrillin-1、および LTBP-1,4 には相互作用があり、癌周囲の間質においてはこれらの発現の不均衡があることが示唆される。

申請者は、手術検体によって得られた乳癌組織の癌部と非癌部の間質における versican の G1,G3 domain およびその isoform、fibrillin-1、LTBP-1,4 の発現の違いを real time RT-PCR、slot blotting、免疫組織化学にて比較・検討し、さらに、これらの発現と臨床病理学的因子との関連を検討した。

この結果、乳癌組織の間質における、versican の G1,G3 domain およびその V0,V1 isoform の増加、および LTBP-4 の減少が証明された。また、versican は癌細胞の biomarker である Ki67 index と関連した。

乳癌組織における ECM の動態は、いまだ解明されていないのが現状であり、臨床検体を用いた報告例も少ない。今回の研究により、乳癌細胞の増殖進展には、間質に存在する versican や LTBP-4 が重要な働きを担っていると考えられる。

本研究は、今後の乳癌における targeted therapeutics としての可能性が期待される。

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 条に定めるところの博士（医学）の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Breast Cancer 19: , 2012 in press