



Title	口腔扁平上皮癌細胞のマトリックスメタロプロテアーゼ2(MMP-2)活性化機構における線維芽細胞の関与
Author(s)	占部, 一彦
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/41514">https://hdl.handle.net/11094/41514</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について〈/a〉をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	占部一彦
博士の専攻分野の名称	博士(歯学)
学位記番号	第14545号
学位授与年月日	平成11年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 歯学研究科歯学臨床系専攻
学位論文名	「口腔扁平上皮癌細胞のマトリックスメタロプロテアーゼ2 (MMP-2) 活性化機構における線維芽細胞の関与」
論文審査委員	(主査) 教授 松矢 篤三  (副査) 教授 浜田 茂幸 講師 岩本 資己 講師 村上 伸也

### 論文内容の要旨

悪性腫瘍の浸潤・転移において細胞外基質蛋白の分解は必須の過程であり、種々の蛋白分解酵素の関与が報告されている。マトリックスメタロプロテアーゼ2 (MMP-2) は基底膜成分であるIV型コラーゲン、ラミニンやフィブロネクチン等を分解することから浸潤、転移過程の第一段階であるがん細胞が基底膜を浸潤する際に重要な役割を担っている蛋白分解酵素と考えられている。細胞の悪性化に伴いMMP-2の産生が亢進することやがん細胞のMMP-2活性と浸潤能及び転移能が相関することが確認されている。MMP-2をはじめとする蛋白分解酵素の多くは不活性型として産生され、がん細胞が浸潤するためにはこれらの酵素の活性化されることが必要である。

またある種のがん細胞はMMP-2やMMP-9のゼラチナーゼを産生しないにもかかわらず生体では強い基底膜浸潤能を示すことが知られている。これはがん細胞が周囲の間質細胞の産生するゼラチナーゼを周囲の基質分解に利用しているためと推測される。このように生体でのがんの浸潤・転移はがん細胞固有の特性のみならず、がん細胞と宿主との相互作用によって制御されているがその詳細は明らかにされていない。

本研究では口腔扁平上皮癌の生体での浸潤における間質の役割の一端を明らかにするため、口腔扁平上皮癌細胞のMMP-2活性に与える間質の主な細胞成分である線維芽細胞の影響について解析した。

#### 【方法および結果】

##### 1. 扁平上皮癌細胞のMMP-2活性化能

実験には、口腔扁平上皮癌細胞株SCCKN, SCCTF及びKBと外科的に切除された正常歯肉または口腔扁平上皮癌組織より分離された継代4代から10代の線維芽細胞を使用した。口腔扁平上皮癌細胞と線維芽細胞の培養上清中のゼラチナーゼ活性をゼラチンを基質とするザイモグラフィーにて検討したところ、扁平上皮癌細胞の培養上清中にはゼラチナーゼ活性が認められないのに対し、線維芽細胞は多量の72kDaゼラチナーゼ(不活性型MMP-2)産生していた。不活性型MMP-2を含む線維芽細胞培養上清をSCCKN細胞に添加すると、24時間後より線維芽細胞培養上清の不活性型MMP-2が減少し、あらたに62kDaゼラチナーゼ(活性型MMP-2)がみられるようになった。この活性型MMP-2の発現はマトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤である1.10-phenanthrolineにより阻害された。

##### 2. 扁平上皮癌細胞の細胞膜画分のMMP-2の活性化及び結合能

不活性型MMP-2は線維芽細胞培養上清をゼラチン親和性クロマトグラフィー展開し吸着画分をDMSOにて溶出

し、さらにゲルクロマトグラフィーに展開・溶出させることにより精製した。また線維芽細胞培養上清のゼラチン親和性クロマトグラフィー非吸着画分をゼラチナーゼを含まない線維芽細胞培養上清として実験に用いた。SCCKN細胞を4℃、1.5% Triton-X114溶液に溶解し37℃で反応後遠心し、細胞膜蛋白を含む疎水性画分（細胞膜画分）を分離した。線維芽細胞培養上清より精製した不活性型 MMP-2 を細胞膜画分と反応後、さらに親水性画分と細胞膜蛋白を含む疎水性画分に分離しそれぞれのゼラチナーゼ活性を検索した。SCCKN細胞の細胞膜画分は親水性画分中の MMP-2 を活性化しなかったが、あらかじめゼラチナーゼを含まない線維芽細胞培養上清で処理された SCCKN細胞の細胞膜画分によって不活性型 MMP-2 が活性化された。またゼラチナーゼを含まない線維芽細胞培養上清で処理された SCCKN細胞の細胞膜画分中には MMP-2 活性が認められた。

### 3. 口腔扁平上皮癌の MT1-MMP 発現に対する線維芽細胞の影響

口腔扁平上皮癌細胞における膜型マトリックスメタロプロテアーゼ 1 (MT1-MMP) の遺伝子及び蛋白発現についてそれぞれ RT-PCR 法及びウエスタンブロッティング法により検討した。線維芽細胞培養上清処理により SCCKN細胞の MT1-MMP 遺伝子及び蛋白の発現が誘導された。また間接蛍光抗体法でも線維芽細胞培養上清で処理された SCCKN の細胞膜上に MT1-MMP 発現が認められた。

### 4. 扁平上皮癌細胞の MMP-2 結合能及び活性化能における MT1-MMP とインテグリン $\alpha V$ サブユニットの関与

あらかじめゼラチナーゼを含まない線維芽細胞培養上清で処理された SCCKN細胞をプロテイン A 及び抗 MT1-MMP モノクローナル抗体あるいは抗  $\alpha V$  モノクローナル抗体にて免疫沈降することにより、それぞれ MT1-MMP あるいはインテグリン  $\alpha V$  サブユニット分子が除去された細胞膜画分と不活性型 MMP-2 とを 37℃、24時間反応させた、MT1-MMP が除去された SCCKN細胞膜画分の MMP-2 の活性化能は減弱し、それに伴い細胞膜画分中の活性型 MMP-2 は減少したが不活性型 MMP-2 量に変化はみられなかった。一方、インテグリン  $\alpha V$  サブユニット分子が除去された細胞膜画分の MMP-2 活性化能には変化がみられなかったが細胞膜画分中の活性型 MMP-2 量は減少した。

活性型 MMP-2 存在下で培養した SCCKN細胞を抗 MMP-2 モノクローナル抗体及び抗  $\alpha V$  ポリクローナル抗体で 2重染色し位相差レーザー顕微鏡で検鏡すると MMP-2 とインテグリン  $\alpha V$  サブユニットが SCCKN の細胞膜上で co-localize していた。

### 【結語】

扁平上皮癌細胞は自らは殆ど MMP-2 産生能を持たないが線維芽細胞の産生する潜在型 MMP-2 を活性化した。線維芽細胞は扁平上皮癌細胞の MT1-MMP 発現を誘導し MMP-2 活性化能を亢進させると考えられる。扁平上皮癌細胞によって活性化された MMP-2 はインテグリン  $\alpha V$  サブユニットを介して細胞膜に結合し、癌細胞周囲の細胞外基質蛋白を分解していると推測される。

以上の結果より、線維芽細胞は MMP-2 の供給源としてだけでなく扁平上皮癌細胞膜上の MMP-2 活性を亢進させることにより口腔扁平上皮癌細胞の浸潤を促進させていると考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

本研究は口腔扁平上皮癌の基底膜浸潤機構に対する宿主の作用を明らかにする目的で、口腔扁平上皮癌細胞のマトリックスメタロプロテアーゼ 2 (MMP-2) 活性に与える線維芽細胞の影響について解析したものである。

その結果、口腔扁平上皮癌細胞は自らは殆どマトリックスメタロプロテアーゼ 2 (MMP-2) を産生しない。しかし線維芽細胞の誘導によって口腔扁平上皮癌細胞が産生する膜型マトリックスメタロプロテアーゼ MT1-MMP が、線維芽細胞が産生した潜在型 MMP-2 を細胞膜上で活性化することを明らかにした。さらに活性型 MMP-2 はインテグリン  $\alpha V$  サブユニットを介して扁平上皮癌細胞膜上に結合し癌周囲の基底膜成分を分解していることが示唆された。

本研究は口腔扁平上皮癌の基底膜浸潤における上皮-間質相互作用の一端を明らかにしたもので、価値ある知見である。

従って、本研究者は博士（歯学）の学位を得る資格があるものと認める。