

Title	Determination of Imbalance between MMP-2 and TIMP-2 in Human Neuroblastoma by Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction and its Correlation with Tumor Progression
Author(s)	Tasnim, Ara
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41796
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	タスニム Tasnim	アラ Ara
博士の専攻分野の名称	博士(医学)	
学位記番号	第 15314 号	
学位授与年月日	平成12年3月24日	
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科外科系専攻	
学位論文名	Determination of Imbalance between MMP-2 and TIMP-2 in Human Neuroblastoma by Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction and its Correlation with Tumor Progression (神経芽腫における、RT-PCR法にて解析したMMP-2、TIMP-2の発現バランスと腫瘍進展との関連)	
論文審査委員	(主査) 教授 岡田 正	
	(副査) 教授 岡田伸太郎 教授 青笹 克之	

論文内容の要旨

【目的】

matrix metalloproteinase (MMP) は、細胞外基質 (ECM : extracellular matrix) を分解する作用を有し、癌細胞の浸潤・転移に際しても重要な働きをするとされている。一方 MMP の内因性特異的インヒビターである tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) は、MMP による ECM の分解を阻害し腫瘍増殖を抑制する方向に働く事が報告されている。よって腫瘍浸潤・転移の際の ECM 分解には両者が関わり合い、局所での両者のバランスが重要であると考えられる。一方神経芽腫は小児固形悪性腫瘍の中でも最も頻度の高い腫瘍である。最近における診断・治療の進歩に伴い全体の治療成績は徐々に改善しつつあるものの、未だ局所進展例や遠隔転移例ではその成績は不良である。

そこで神経芽腫の病態理解の一助として、臨床例を用い各進行度の本症において MMP-2、MMP-9、TIMP-2 の発現を、免疫組織学的に蛋白レベルで、あるいは RT-PCR を用いて mRNA レベルで検討した。定量的解析の可能な mRNA レベルでの検討では MMP-2/TIMP-2 の発現量比についても検討した。

【方法および結果】

免疫組織学検討は、31例の神経芽腫(早期例 stage I、II、IVs、進行例 stage III、IV)について行った。手術時に摘出した凍結腫瘍標本より 3 μm の切片を用意し、各々のモノクローナル抗体 (anti-MMP-2、MMP-9、TIMP-2) を一次抗体として用い、ABC法を用いて発色させ、各々の蛋白の発現部位、量を検討した。発現量は染色程度に応じて3段階(-、+、++)に評価し、+、++を陽性、-を陰性とした。mRNA の発現に関しては上述の31例中 RNA 抽出の可能であった25例について行った。total RNA を抽出後 cDNA を合成、これを鋳型として、各々を特異的に増幅する primer を用いて PCR を行った。あらかじめ指数関数的に増幅される PCR サイクル数を決定しておき、このサイクル数では増幅量から定量的に鋳型の量を解析できることを確認した。また各々のターゲットの量は、house keeping gene として β2-microglobulin にて補正するようにした。こうして得られた数値を各ターゲットの定量的発現量として用いた。また、MMP-2、TIMP-2 については、これらの発現量の比 (R value) を測定した。評価された結果について、進行度、予後との関連を統計的に検討した。

免疫組織学的には MMP-2、MMP-9 の発現は腫瘍内の間質組織内に限局して観察され、MMP-2 では 80.6%、MMP-9 では 71.0% に陽性と評価された。

TIMP-2の発現は腫瘍細胞質、間質組織双方に観察され、58.0%に発現陽性と評価された。MMP-2の発現陽性、TIMP-2の発現陰性は、それぞれ進行例ならびに予後不良例と有意の関連を認めた ($p < 0.05$)。MMP-9の発現については、これらの臨床的事項と関連を認めなかった。

同様に、mRNAレベルでの発現においても、MMP-2の高発現は、進行例 ($p = 0.02$)、予後不良例 ($p = 0.0001$)と有意の関連を示した。一方、MMP-9、TIMP-2に関しては、それらのmRNAレベルでの発現と臨床的因子との間には有意の関連は認めなかった。

mRNAレベルのR valueでの検討では、TIMP-2に対するMMP-2の相対的高値は、有意に進行例 ($p = 0.02$)、および予後不良例 ($p = 0.0006$)と関連していることが示された。

【総括】

神経芽腫臨床例を用いて、MMP-2、MMP-9、TIMP-2に関する、免疫組織学的、ならびにRT-PCRを用いた発現の検討を行い、以下の結果を得た。

1. MMP-2とMMP-9の発現は間質組織に局限して認められ、一方TIMP-2の発現は腫瘍細胞、間質組織双方に認められた。
2. MMP-2の高発現は、蛋白、mRNA両レベルにおいて、進行例、予後不良例と有意に関連し、MMP-2高発現が神経芽腫の進展に関係することが示唆された。
3. TIMP-2については、蛋白レベルでの検討で発現陰性が進行例、予後不良例と有意に関連したが、mRNAレベルでは関連は見られなかった。MMP-9についてはいずれの検討においても有意の関連を示すものはなく、MMP-9の神経芽腫進展への関係は少ないものと思われた。
4. TIMP-2に対するMMP-2の相対的高値は、有意に進行例、および予後不良例に関連していることが示され、神経芽腫の進展度を示す指標になることが考えられた。

論文審査の結果の要旨

本研究の目的は、細胞外基質を分解する作用を有し癌細胞の浸潤・転移に際して重要な働きをするMMP-2、MMP-9、ならびにMMPの特異的インヒビターであるtissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) - 2の発現を、神経芽腫手術摘出標本において蛋白及びmRNAレベル検討し、神経芽腫の病態にいかなる関りがあるかを明らかにすることである。その結果、蛋白、mRNA両レベルにおけるMMP-2の高発現が、進行例、予後不良例と有意に関連しており、神経芽腫の進展に関係することが示された。また、mRNAレベルでのTIMP-2に対するMMP-2の相対的高値も、有意に進行例、および予後不良例に関連しており、神経芽腫の進展度を示す指標になることが示唆された。一方MMP-9についてはその発現程度と病態に有意の関連を示すものはなく、神経芽腫進展への関係は少ないことが示された。本研究はMMP-2、TIMP-2が神経芽腫の病態に関することを明らかとし、MMP-2の阻害剤を当該疾患に応用する妥当性をも示す重要な研究であり、学位の授与に値すると考えられる。