

学位論文題名

低酸素・低栄養下での  
matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) の産生増強

学位論文内容の要旨

【緒言】

遠隔転移は癌における主要な死亡要因であり、遠隔転移を抑制できれば予後の改善も期待できると考えられている。最近、組織中の酸素濃度の低い癌のほうが高い癌より予後不良であり、遠隔転移の多いことが報告された。細胞が低酸素に曝されると、低酸素誘導転写因子(hypoxia-inducible factor-1, HIF-1)が活性化されて、低酸素適応に必要な血管新生因子や嫌気性解糖系酵素などの発現を誘導することが知られている。著者らは、低酸素が腫瘍細胞の浸潤転移を促進する可能性もあるのではないかと考え、低酸素下で発現誘導される細胞外マトリックス蛋白分解酵素(matrix metalloproteinases, MMPs)の同定を試みた。既知のMMPsのうちmatrix metalloproteinase-9 (MMP-9)のプロモーター領域に、HIF-1の結合配列を認めたため、低酸素・低栄養によるMMP-9の発現制御について検討することとした。また、MMP-9発現亢進が浸潤能亢進につながることを検証するため、実験的血管基底膜モデルとされるMatrigelへの浸潤能についても検討した。

【材料と方法】

1. プロモーター領域にHIF-1が結合するMMPs遺伝子の解析: 当教室の王が作製したコンピュータープログラミングにより、MMP-9遺伝子のプロモーター領域にHIF-1結合配列があるか否か検索した。
2. 細胞株: 肺癌細胞株5株、卵巣癌細胞株TTOV、線維肉腫細胞株HT1080などのヒト癌細胞を用いた。低酸素下培養は1%酸素濃度で行った。低栄養培養は、グルコース無添加DMEM培養液に10%FCSを添加した低グルコース培養液で行った。
3. Dominant negative HIF-1 $\alpha$ (dnHIF-1 $\alpha$ )導入肺癌細胞株: 当教室の陳らが樹立した2クローンとベクターコントロールを用いた。
4. RT-PCR およびreal-time PCR細胞より抽出したtotal RNAよりcDNAを作製後、RT-PCRはサーマルサイクラーにて増幅した。Real-time PCRはABI PRISM7900 HTを用いて行なった。
5. Western blot 法: Lysis bufferで細胞を溶解後、遠心して上清を回収し蛋白抽出液とした。サンプルを非還元条件下で12%polyacrylamide gelを用いて電気泳動後、ニトロセルロース膜に転写した。blocking bufferにて非特異的結合をblock後、1次抗体で標識した。洗浄後2次

抗体と反応させ、ECL detection kit にて発色させた。

6. 浸潤能の検討:transwell chamber の膜に 40 倍希釈した Matrigel をコートし乾燥させた。使用前に 1 時間培養液中に浸し、上室に細胞浮遊液を下室には培養液を入れ、24 時間培養した。培養後、ギムザ液で染色し、膜上面に付着している細胞を綿棒にて除去した。その後、膜下面に付着している細胞数を倒立顕微鏡下で計測した。

#### 【結果】

1. 低酸素・低栄養下での MMP-9 mRNA 発現:各種肺癌細胞株において、低酸素下で誘導される Glut-1 mRNA が誘導され、低酸素に反応していることを確認した。同細胞株において、低酸素下で MMP-9 mRNA 発現が誘導された。次に real-time PCR によって各種癌細胞株の MMP-9 mRNA 発現を定量的に比較した。いずれも低グルコース、低酸素+低グルコース下で MMP-9 mRNA 発現が有意に増強し、また低酸素下では 2 種類の細胞株で MMP-9 mRNA 発現が有意に増強した。
2. 低酸素・低栄養下での MMP-9 蛋白発現:いずれの細胞株においても低酸素、低グルコース、低酸素+低グルコースで培養すると、MMP-9 蛋白発現が明らかに増強していた。
3. 低酸素・低栄養下での浸潤能:低グルコース、低酸素+低グルコース下での浸潤能はコントロールに比し有意に増加した。また低酸素下でも浸潤能は亢進傾向にあった。
4. dnHIF-1 $\alpha$ 導入株における MMP-9 mRNA 発現:ベクターコントロールでは、低酸素誘導遺伝子である Glut-1 や aldolase A mRNA の発現が低酸素で誘導されるが、dnHIF-1 $\alpha$ 導入株においては発現亢進が認められなかった。ついで MMP-9 mRNA 発現を real-time PCR にて検討したところ、Glut-1 等と同様にベクターコントロールでは低酸素下で誘導されるが、dnHIF-1 $\alpha$ 導入株においては発現亢進が認められなかった。

#### 【考案】

本研究で、低酸素誘導転写因子 HIF-1 の結合配列のコンピューター解析から MMP-9 を明らかにした。さらに低酸素・低栄養下で MMP-9 の発現が増強すること、それによって癌細胞株の浸潤能が亢進することを明らかにした。MMPs の転移における重要性に関しては、すでに多くの論文が発表され周知の事実となっている。本研究は、低酸素や低栄養といった常に腫瘍細胞が直面する環境そのものが、MMPs 産生を増強することをはじめ明らかにした。一般に MMPs の発現は癌細胞からの産生および活性から検索することが多い。本研究では、著者らが注目している HIF-1 の機能からアプローチして MMP-9 を同定した。MMP-9 のプロモーター領域に HIF-1 の結合モチーフが存在すること、および dn HIF-1 $\alpha$ 導入株では低酸素による MMP-9 発現亢進が消失していることは、低酸素による MMP-9 の転写誘導が HIF-1 によって調節されている可能性を強く示唆している。次に、低酸素、低栄養下におかれた癌細胞の Matrigel への浸潤能が亢進することを示した。この現象には、上述した MMP-9 の産生増強が関与することは明らかである。しかし、著者らはすでに、低酸素によって癌細胞の運動能を亢進させる autocrine motility factor (AMF) の産生亢進を見出しており、MMPs だけが癌細胞の浸潤能亢進に関与しているわけではない。低酸素や低栄養によって少なくとも運動能と MMPs の産生が亢進するという事実は、低酸素や低栄養という腫瘍環境自身が、癌細胞の転移能亢進を誘導している可能性を強く示唆する。そして、転移そのものが癌細胞の低酸素適応応答である可

能性を示唆しており,今後検証すべき課題である.

**【結語】**

低酸素・低栄養下にある癌細胞の転移能亢進に,HIF-1 を介した MMP-9 の関与が推察された.

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 浅 香 正 博

副 査 教 授 細 川 眞 澄 男

副 査 教 授 田 中 一 馬

学 位 論 文 題 名

## 低酸素・低栄養下での

## matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) の産生増強

遠隔転移は癌における主要な死亡要因であり、これを抑制できれば予後の改善も期待できる。最近、癌組織中の酸素濃度が低いほうが予後不良で、遠隔転移の多いことが報告された。細胞が低酸素に曝されると、低酸素適応に必要な因子の発現を誘導する、hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) が活性化される。本研究では、低酸素が腫瘍細胞の浸潤転移を促進する可能性を考え、低酸素下で発現誘導される細胞外マトリックス蛋白分解酵素 (MMPs) の同定を試みた。既知の MMPs のうち、matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) のプロモーター領域に HIF-1 の結合配列を認めたため、低酸素・低栄養による MMP-9 の発現制御について検討することとした。実験には、肺癌細胞株、卵巣癌細胞株、線維肉腫細胞株、dominant negative HIF-1 $\alpha$  (dnHIF-1 $\alpha$ ) 導入株を用いた。低酸素下培養は 1 % 酸素濃度下で行い、低栄養培養は、DMEM に 10 % FCS を添加した低グルコース培養液で行った。RT-PCR, real-time PCR 及び Western blot 法を用いて MMP-9 の発現を検討し、また浸潤能の検討も行った。まず、各種肺癌細胞株において低酸素下で MMP-9 mRNA 発現が誘導されることを確認した (RT-PCR 法)。次に real-time PCR 法によって mRNA 発現を定量的に比較した。低グルコース、低酸素+低グルコース下で MMP-9 mRNA 発現が有意に増強し、また低酸素下では 2 種の細胞株で MMP-9 mRNA 発現が有意に増強した。さらに、全ての細胞株で低酸素、低グルコース、低酸素+低グルコース下にて、MMP-9 蛋白発現が明らかに増強していた (Western blot 法)。また、低グルコース、低酸素+低グルコース下での浸潤能は有意に亢進し、低酸素下でも亢進傾向にあった。最後に dnHIF-1 $\alpha$  導入株における MMP-9 mRNA 発現を、real-time PCR 法にて検討した。Glut-1 mRNA 等と同様にベクターコントロールでは低酸素下で誘導されるが、dnHIF-1 $\alpha$  導入株では発現亢進が認められなかった。MMP-9 のプロモーター領域に HIF-1 の結合モチーフが存在すること、および dnHIF-1 $\alpha$  導入株では低酸

素による MMP-9 発現亢進が消失していることは、HIF-1 が低酸素による MMP-9 の転写誘導を調節している可能性を示唆している。そして、低酸素・低栄養下で MMP-9 の発現が増強することをはじめ明らかにし、さらに、癌細胞の Matrigel への浸潤能が亢進することを示した。これまでに、低酸素によって癌細胞の運動能を亢進させる AMF の産生亢進も確認されている。すなわち、運動能と MMPs の産生亢進から、低酸素や低栄養という腫瘍環境自体が、癌細胞の転移亢進を誘導している可能性を強く示唆した。転移そのものが癌細胞の低酸素適応応答である可能性を示唆しており、今後検証すべき課題である。以上、低酸素・低栄養下にある癌細胞の浸潤転移亢進に、HIF-1 を介した MMP-9 の関与が推察された。

口頭発表後、副査田中一馬教授から、正常細胞での MMP-9 の機能や HIF-1 との結合について、細胞からの MMP-9 の分泌について、運動能に関する因子と HIF-1 の関与についての質問があった。申請者はこれらに対し、HIF-1 が degradation される正常細胞では MMP-9 はほとんど機能しないと考えられること、培養上清の MMP-9 の発現は確認できなかったこと、低酸素での AMF の増強が確認されており HIF-1 の関与が考えられていること、など回答した。次いで、副査細川眞澄男教授から、低酸素・低栄養以外に MMP-9 発現亢進をもたらす条件や因子、また MMP-9 の活性についての質問があった。申請者は、NF- $\kappa$ B 等の関与が考えられること、また、浸潤能亢進から MMP-9 の活性化が考えられること等答えた。さらに、主査浅香正博教授から、細胞株ごとの MMP-9 の発現の差また転移能の差について、他の細胞株での MMP-9 の発現について、等の質問があった。これらに対しては RNA と Protein の採取の時期のずれが 1 つの原因と考えられること、HT1080 以外の細胞株では今回の実験系では浸潤能の確認ができなかったこと、RT-PCR で示したように他の多くの細胞株でも低酸素下で MMP-9 産生増強を認めること等を回答した。最後に主査浅香正博教授が、転移機構における MMP-9 や他の因子との関わりについての質問のほか、上記審査員の質問への補足質問とその回答の確認を行って、発表を終了した。

この論文は、腫瘍環境が転移関連遺伝子 MMP-9 の発現増強させる可能性を初めて明らかにしたこと、また HIF-1 との関係を示唆したことで高く評価された。今後のさらなる研究と将来の癌治療への応用が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有すると判定した。