

## 審査の結果の要旨

氏名 谷脇 香

本研究は癌の浸潤・転移において重要な役割を果たしていると考えられる膜型マトリクスメタロプロテアーゼ 1(以下 MT1-MMP)が癌の増殖にも関与しているか否か、また MT1-MMP が癌の増殖に関与している場合、*in vitro* で MT1-MMP に活性化されることが示されている MMP-2 がこの増殖に関与しているか否かを検討するため、*MT1-MMP* 欠失マウス由来大腸癌細胞株を同系(C57BL/6)の野生型マウス、および *MMP-2* 欠失マウスに移植する系を用いて解析した研究であり、下記の結果を得ている。

1. *MT1-MMP* 欠失マウスより大腸上皮細胞株を樹立した。この細胞が腸上皮細胞株であることを透過型電子顕微鏡観察により同定した。この細胞株に *v-src* を導入することで癌化した。*v-src* 導入後も細胞が上皮様構造を維持し、E-cadherin が細胞・細胞間接着構造に局在していることが免疫組織化学により示された。この細胞が腫瘍形成能を有することが同系の野生型マウス皮下に移植することで示された。
2. 得られた *MT1-MMP* 欠失大腸癌細胞株に *MT1-MMP* をテトラサイクリン誘導型のベクターシステムを用いて導入し、得られたクローン細胞を *MT1-MMP* revertant 細胞(以下 MT1 rev.細胞)とした。対照としてベクターのみを導入した mock 細胞も作製した。得られたクローン細胞において *MT1-MMP* が発現し、かつテトラサイクリン誘導体であるドキシサイクリンでその発現が制御されることを、抗 *MT1-MMP* 抗体を用いたウエスタンブロッティングで示した。また、この細胞が *MMP-2* を発現していないことを RT-PCR により評価した。
3. MT1 rev.細胞に導入した *MT1-MMP* が *MMP-2* を活性化することをゼラチンゼイモグラフィーで示した。また、導入した *MT1-MMP* が膜表面に局在して酵素活性を有することをゼラチン分解アッセイと免疫組織化学にて示した。
4. MT1 rev.細胞を同系のマウス皮下に移植して、測定した腫瘍径より体積を算出することで癌細胞の増殖を検討したところ、*MT1-MMP* を発現誘導した場合に癌細胞の増殖が増大し、*MT1-MMP* の発現を抑制した場合には癌細胞の増殖は mock 細胞と同程度に抑えられることが示された。また、*MT1-MMP* の発現量が異なるクローン細胞 2 種による増殖を比較検討した結果、*MT1-MMP* 発現量依存的に腫瘍体積が増大することが示された。
5. MT1 rev.細胞を *MMP-2* 欠失マウス皮下に移植して、上記と同様にして腫瘍体積を算出したところ、*MT1-MMP* を発現させている場合においても野生型マウス皮下への移植時に比較して有意に低下した。

6. MT1 rev.細胞に *MMP-2* を導入し、MT1-MMP 発現はドキシサイクリンにより制御でき、*MMP-2* は恒常的に発現している細胞(MT1 rev./*MMP-2* 細胞)を作製した。この細胞で MT1-MMP 発現依存的に *MMP-2* の活性化がみられることをゼラチンザイモグラフィにより示した。この細胞を *MMP-2* 欠失マウス皮下に移植して腫瘍増殖を検討したところ、MT1-MMP と *MMP-2* 双方を発現させた場合の腫瘍体積は、MT1-MMP 発現を抑制した場合に比較して有意に大きいものであった。また MT1-MMP を発現させた MT1 rev.細胞を野生型マウスに移植した場合の腫瘍体積と同程度となった。したがって、MT1-MMP と *MMP-2* をともに発現することが癌細胞の増殖に重要であることが示唆された。

以上、本論文は *MT1-MMP* 欠失マウス由来大腸癌細胞株より作製した *MT1-MMP* revertant 細胞において、マウス皮下移植系を用いて MT1-MMP が癌細胞の増殖に関与していること、および癌細胞の増殖には MT1-MMP と *MMP-2* の協調が重要であることを明らかにした。これまで MT1-MMP が癌細胞の増殖に関与する可能性は報告されていたが、*MMP-2* の関与については知見が得られていなかった。本研究はこの点を明らかにすることにより癌治療法開発の一端につながるものと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。