

氏 名（本籍）	南 ^{みなみ} 里 ^り 恵 ^え （富 山 県）		
学 位 の 種 類	博 士（医 学）		
学 位 記 番 号	博 甲 第 3435 号		
学位授与年月日	平成 16 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審 査 研 究 科	医学研究科		
学 位 論 文 題 目	子宮頸癌および卵巣癌における細胞外基質溶解酵素 Matrix metalloproteinases の発現と生物学的意義		
主 査	筑波大学教授	医学博士	三 輪 正 直
副 査	筑波大学助教授	医学博士	小 島 寛
副 査	筑波大学講師	博士（医学）	一 條 裕 之
副 査	筑波大学講師	医学博士	山 本 達 生

論 文 の 内 容 の 要 旨

（目的）

細胞外基質溶解酵素である Matrix metalloproteinases (MMP) は癌の重要な浸潤・転移因子として報告されている。婦人科悪性腫瘍の子宮頸部癌および卵巣癌に関して、基底膜コラーゲンを特異的に溶解する MMP-2 及び MMP-9（ゼラチナーゼ）や活性因子である MT1-MMP の発現活性を Film *in situ* zymography 法および免疫組織化学法にて解析し、予後を予測するための補助診断として可能性を検討することを目的とした。

1. Film *in situ* zymography (FIZ) 法による子宮頸部捺印細胞診の応用への検討

（対象と方法）

従来の In situ zymography 法を微量細胞検体用に改良した Film *in situ* zymography (FIZ) 法を応用し、2000 年 7 月から 2001 年 8 月までに子宮頸部円錐切除術にて切除された子宮頸部 50 検体を用いて病変断面でのゼラチナーゼの活性発現を検討した。FIZ フィルム（特殊加工したゼラチンコートフィルム）に検体を捺印し反応後、ゼラチンコートの溶解程度で、発現部位や発現量を評価した。

（結果）

まず MMP 阻害剤塗布フィルムを用いて本法の MMP 特異性を証明し、また免疫染色および従来のゼラチンザイモグラフィー法にて感度を確認した。

次に FIZ フィルムの染色パターンにより付着細胞周囲のゼラチンが全層透明に溶解され MMP 活性が強い homogenous pattern と、不均一で斑に溶解され MMP 活性が弱い heterogenous pattern とに亜分類した。進行癌 8 例中 8 例全例（100%）、上皮内癌 14 例中 14 例全例（100%）、異形成症例で 15 例中 5 例、非病変での 13 例中 3 例が陽性となった。陽性率は統計学的にも癌部と非癌部で差を認めた。染色様式は進行癌症例では 8 例全例が MMP 活性の強い homogenous pattern であるのに対して、上皮内癌症例では 14

例中 6 例が homogenous pattern を示し、症例により進行癌と同様の像を呈した。また非悪性病変に置いても heterogenous pattern 陽性例が 3 例存在したが、該当病変部には激しい炎症性変化が認められた。同一検体での免疫組織化学的解析では MMP-2 陽性例は進行癌で 8 例中 4 例に認められ、FIZ 法ではすべて homogenous pattern であった。増殖能力を示す MIB-1 index は CIN-1/-2 = 7.0, 高度異形成および上皮内癌 (CIN-3) = 17.6, 進行癌症例 = 33.8 と、悪性度が増すにつれて高くなる傾向が認められた。

(考察)

FIZ 法で検討した結果、ゼラチナーゼ活性は悪性度が増すに従って増加した。また基底膜浸潤のない上皮内癌のレベルでも 14 例中 6 例が homogenous pattern を示し、8 例の進行癌症例と同様に基底膜溶解能を保持していた。病理組織学的にも形態学的な違いは判定出来ないため、上皮内癌のうち潜在的に浸潤能を持つ上皮内癌を鑑別するのに FIZ 法は有用と考えられた。

2. 免疫組織化学的に検討した卵巢癌での MMP-2 及び MT1-MMP の発現差のその予後

(材料と方法)

1987 年から 1997 年までに筑波大学付属病院で手術を施行した FIGO 進行期Ⅲ期症例 40 例、およびⅠ期症例 50 例計 90 例を対象とし MMP-2 及び MT1-MMP の発現分布や程度を免疫組織学的に検討した。

(結果)

MMP-2 陽性症例は漿液性腺癌でⅠ期 6/15 例、Ⅲ期 4/20 例、粘液性腺癌Ⅰ期 9/15 例、Ⅲ期 0/5 例、類内膜型腺癌Ⅰ期 3/10 例、進行癌Ⅲ期 2/10 例、および明細胞腺癌Ⅰ期およびⅢ期で全例陰性であった。また MT1-MMP 陽性症例は漿液性腺癌Ⅰ期で 2/15 例、類内膜腺癌Ⅰ期 2/10 例、粘液性腺癌Ⅰ期 0/15 例、明細胞腺癌Ⅰ期 0 例であり、Ⅲ期進行癌ではいずれも陰性であった。また MT1-MMP 陽性例はすべて MMP-2 陽性例であった。

5 年生存率ではⅠ期は 5 年生存率が 100%であったが、Ⅲ期 40 例で明細胞腺癌とその他組織型の間で有意差が認められた ($p = 0.004$)。Ⅲ期 40 例全体では MMP-2 陽性例と陰性例の 5 年生存率に有意差を認め ($p = 0.039$)、組織別でも漿液性腺癌および類内膜腺癌で MMP-2 陽性例は陰性例に比べて予後が悪かった ($p = 0.012$)。

染色性を検討すると、漿液性腺癌ではⅠ期の MMP-2 陽性例は主に腫瘍細胞の細胞質および一部間質に染色され、細胞辺縁に沿って染色される傾向にあったが、Ⅲ期進行例では腫瘍細胞では染色されず主に間質組織で強陽性であった MT1-MMP 陽性例はⅠ期例のみで癌細胞質に染色された。類内膜腺癌ではⅠ期およびⅢ期陽性例とも主に腫瘍細胞が陽性であり、MT1-MMP も陽性例のⅠ期例で同様の染色性を示した。粘液性腺癌症例では、MT1-MMP は全例陰性だが、Ⅰ期の症例で MMP-2 陽性 9/15 例と陽性率が高く、腫瘍細胞の粘液内に強く染色された。周囲の間質では MMP-2 の発現は認められなかった。明細胞腺癌ではⅠ期・Ⅲ期問わず MMP-2、MT1-MMP とも陽性例はなかった。

MMP-2 の発現は初期Ⅰ期の陽性率が 36% (粘液性腺癌が 18%/漿液性腺癌 12%/類内膜腺癌 6%) であり、進行癌 15%と比較すると、初期浸潤の段階で発現が活発になっていた。またⅠ期の漿液性腺癌や類内膜腺癌陽性例では癌細胞周囲の間質組織でも MMP-2 が陽性で、乳頭状病巣の線維芽細胞や癌巣との隣接部位に強く発現していた。しかし進行癌Ⅲ期症例ではどの組織型も陽性率は減少し、漿液性腺癌では癌細胞よりは、近傍周囲の間質が主に発現しており、類内膜腺癌では主に癌細胞に発現が認められた。

(考察)

Ⅲ期卵巣癌では5年生存率を検討すると MMP-2 陽性は予後因子であり、また組織型別でも漿液性腺癌で有意差を認めた。また漿液性腺癌や類内膜腺癌ではⅠ期初期浸潤での MMP-2, MT1-MMP の発現が多く、進行癌に進展すると減弱する傾向が認められることから進行するに従って MMP の発現が失活したり、不要になる可能性が考えられた。比較して、明細胞腺癌では MMP-2, MT1-MMP とも発現が認められず MMPs とは違う浸潤因子が誘導する経路が存在する可能性が示唆された。

(総括)

子宮頸癌および卵巣癌において MMPs の発現様式の違いを明らかにすることで予後診断に役に立つことが示唆された。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は癌浸潤に重要な分子として知られる MMP の診断において、Film *in situ* zymography 法という新しい検査方法を開発した。従来の煩雑な検査方法と比較して簡便で短時間で検索可能な点は、将来的に病理形態診断と同時に施行し比較検討が可能で、かつ発現量の有無を見ることで再発のリスクが高い症例の抽出に役立つと考えられた。現段階では検討症例数が少なく更に多数の症例で検討を要するが、病理形態学的な悪性度や浸潤度の結果と FIZ 法の結果が合致する事が証明されたことから、予後を予測するための補助診断として詳細なクライテリアを作成されることを期待したい。

また卵巣癌の初期および進行癌で免疫組織学的に MMP の発現を検討し、進行度や組織型によって MMP の発現に差があることが証明された。病理形態学的な診断とともに予後予測因子としての補助診断としての可能性が期待される。

婦人科癌の日常診療において将来的に予後因子を予測する有用な知見と考えられる。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。