

博士論文（要約）

消化管癌における分泌型プロテアーゼの発現異常と
悪性形質との関連

佐久間 信行

消化管癌は、治療法が開発されつつある現在でも、死亡原因の上位を占めている。わが国においても、胃癌は減少しつつあるものの依然として高い水準を保っており、大腸癌は男女とも増加傾向となっている。胃、十二指腸及び大腸癌において、進行癌は予後不良で、大腸癌では脈管・神経周囲浸潤・リンパ節転移が予後規定因子と考えられる。転移を起こしたものは根治が困難な場合が多く、予後に影響する。そのため、浸潤・転移といった悪性度上昇の機序の解明が求められる。

我々は、胃癌や十二指腸腫瘍の内視鏡生検検体を用いた網羅的遺伝子発現解析を行っている。その結果、正常部と比較して腫瘍部で分泌型セリンプロテアーゼ **KLK6** 及び **KLK7** の mRNA の顕著な発現上昇がみられた。

ヒトの **KLK** ファミリーは、**KLK1-KLK15** の 15 種類がある。**KLK** は一部のサブタイプにおいて、プロテアーゼ活性化受容体 (PAR) の活性化や、キナーゼや成長因子などのシグナル伝達分子の活性調節などに関与し、癌悪性度の上昇を招くことが示唆されている。また、各種癌でバイオマーカーとして報告されており、**KLK3** は前立腺癌バイオマーカーの前立腺特異抗原 (PSA : prostate specific antigen) として臨床で使用されている。

そこで本研究では **KLK6** 及び **KLK7** に着目し、消化管癌における、これら遺伝子の発現異常と悪性形質との関連を明らかにすることを目的とした。

まず **KLK6** や **KLK7** の発現上昇が癌悪性度の上昇に関与するかを、 Kaplan-Meier 法で解析した。その結果、胃癌や大腸癌では **KLK6** や **KLK7** が予後不良因子となる傾向が示唆された。

一般的に分泌型プロテアーゼは癌において、細胞外マトリックスタンパク質や細胞接着因子を分解することにより、浸潤・転移を促進すると考えられている。**KLK6**、**KLK7** も分泌型プロテアーゼであることから、癌の浸潤・転移に関与しているのではないかと考え、本研究では、早期大腸癌での浸潤程度の違いによる **KLK6** や **KLK7** の発現差を免疫組織染色にて解析した。具体的には、東京大学医学部附属病院において内視鏡的粘膜下層剥離術 (ESD) を施行され、ホルマリン固定パラフィン包埋 (formalin-fixed paraffin embedded, FFPE) されている一部に腺腫を含む粘膜内癌 (M 癌) と粘膜下層浸潤癌 (SM 癌) 症例を対象にし、それぞれ 6 症例を解析した。**KLK6** に関しては、非腫瘍部と腫瘍部での明らかな発現差は認めなかったが、**KLK7** に関しては、腫瘍部でより発現がみられた。さらに詳細に解析すると、明らかな有意差は示せないものの、SM 癌の腫瘍部での発現の方が M 癌より高い傾向がみられた。また、粘膜下層浸潤癌の腫瘍先進部で、癌細胞周囲の stroma (間質) が染色されているように観察される症例を認めた。我々だけのトライアルのため専門的に判断するのは難しい結果ではあるが、**KLK7** が浸潤に関与している可能性が考えられた。

以上の事から、**KLK6** 及び **KLK7** の発現異常が悪性形質と関連することが示唆されたため、胃癌や大腸癌由来の細胞株で **KLK6** や **KLK7** を発現させて、癌悪性度の上昇に関与するかを検証することにした。まず胃癌や大腸癌細胞株で **KLK6** や **KLK7** の発現を RT-PCR で確認し、**KLK6**、**KLK7** の発現が低値の大腸癌細胞株の LoVo、**KLK6** の発現はみられるが、

KLK7 の発現は検出限界以下の胃癌細胞株の FU97 と IM95、及び、KLK6、KLK7 とともに発現がみられた胃癌細胞株の NUGC3 を選定した。これら細胞株に、KLK6 または KLK7 遺伝子を組み込んだレトロウイルスを感染させ、選択を行い、安定発現株を作成した。KLK6 及び KLK7 のこれら細胞株での発現は、培養上清を用いた Western blotting で確認した。

作成した KLK6 及び KLK7 の安定発現株を用いて、細胞増殖能について調べた。細胞を 96 well plate に播種後、経時的な細胞数の変化を観察した。その結果、KLK6、KLK7 による増殖能の著明な変化はみられなかった。そこで次に細胞遊走能を調べるため、スクラッチアッセイを行った。細胞をコンフルエントになるように培養し、チップでディッシュの底を引っ掻いて細胞を一部除去し、その部分の閉鎖能を顕微鏡で観察した。その結果、KLK6 や KLK7 を安定発現させたものは、コントロールと同程度の閉鎖能であったことから、KLK6 や KLK7 の発現上昇は、遊走能を変化させないと考えられた。

また、癌ではアノキス(接着喪失により誘導されるアポトーシス)を回避することで足場非依存性増殖(AIG)を起こすことが知られていることから、軟寒天培地中での増殖能を調べた。6cm dish のゲル内に細胞を播種し、コロニー形成能を確認すると、KLK7 を発現させた胃癌細胞株 IM95 では、AIG の亢進がみられた。また、96 well plate のゲル内に細胞を播種して数日間培養すると、KLK7 を発現させた IM95 で細胞数増加を認めた。これらの結果から、KLK7 の発現は、足場非依存性増殖能を有意に上昇させることが示唆された。一方で、KLK6 に関しては、細胞数増加傾向ではあったが、有意差は認められなかった。

癌において周囲組織(間質)を破壊して入り込む細胞の性質を浸潤といい、それは癌の転移につながる。分泌型プロテアーゼである KLK6 や KLK7 は細胞外マトリックスタンパク質等を分解することにより、浸潤・転移を促進する可能性が考えられたため、浸潤能の変化を調べた。細胞外マトリックスにあたるマトリゲル基底膜マトリックスをコートしたメンブレン上に細胞を播種し、一定時間培養し、メンブレンを通過した細胞数を測定した。コントロールとして、コート無しのメンブレンでも同様の実験を行い、浸潤率(% invasion)を計算したところ、胃癌や大腸癌細胞株で KLK6 や KLK7 の発現上昇により浸潤率が上昇する傾向がみられた。

浸潤の過程では、細胞外マトリックスの分解だけでなく、様々な経路を介して浸潤能を亢進させており、その一つとして、上皮間葉転換(EMT : Epithelial-Mesenchymal Transition)の促進が知られている。そして EMT で活性化するシグナル伝達経路は、TGF- β 、Wnt/ β -Catenin、Wnt5a による非古典的 Wnt 等が知られている。また、EMT はカドヘリンスイッチ(E-cadherin の発現が低下し、N-cadherin が上昇する)を起こし、Vimentin などの間葉系マーカーの発現上昇を起こすことが報告されている。そこで Vimentin の発現を Western blotting と蛍光染色で調べたところ、コントロールと比較して KLK6 や KLK7 を安定発現させた大腸癌細胞株 LoVo では Vimentin の発現上昇が観察された。故に KLK6 や KLK7 の発現上昇による浸潤能の亢進には、EMT が関与していることが示唆された。

KLK6やKLK7を発現させたLoVoではコントロールと比較して、浮遊する細胞数が増え、

浮遊している細胞の生存率も高いことが見いだされた。さらに KLK6 や KLK7 を発現させた LoVo の浮遊した細胞を浮遊細胞用の無処理ディッシュで継続培養すると、細胞凝集体を形成しているものが多く観察され、一部、癌幹細胞様に観察された。そこで癌幹細胞マーカーの一つである CD44 の発現を蛍光染色で調べた。その結果、KLK6 や KLK7 の安定発現株ではコントロールの細胞株より強く染色された。このことから、KLK6 や KLK7 の発現亢進により、細胞凝集体を形成し、癌幹細胞様の性質となる可能性が示唆された。しかし癌幹細胞様と考えるためには、今後さらなる癌幹細胞マーカーの発現状況を調べ、スフェロイド形成能を評価する sphere formation assay で癌幹細胞の性質をさらに評価することを検討する必要がある。

本研究では転移の初期に重要な浸潤能の亢進と、転移に必要な足場非依存性増殖能の亢進を細胞レベルの実験で解析した。しかし転移の詳細な評価のためには、癌細胞周囲の間質細胞を含めた研究も必要であると考えられるため、転移能の促進を確かめるためにマウス実験等も含めた in vivo 実験も今後の検討課題である。

KLK は体の様々な場所で働き、様々な疾患に関与し、バイオマーカーになる可能性がある。腫瘍関連では既に KLK3(PSA)が、前立腺癌のスクリーニングや、治療効果、再発の判定に用いられている。本研究により胃癌や大腸癌で KLK6、KLK7 が浸潤に関与していることが明らかになったことから、早期診断・予後予測バイオマーカーとして活用されることが期待される。

現在、KLK に対する様々な阻害剤の開発研究が行われており、KLK6 や KLK7 も同様である。今後 KLK6 及び KLK7 の発現制御機構や、癌の浸潤・転移にかかわる詳細な経路を解明し、浸潤・転移を阻止する治療戦略につなげたい。