

博士の学位論文審査結果の要旨

申請者氏名 吉田 達也

横浜市立大学大学院医学研究科 外科治療学

審査員

主査	横浜市立大学大学院医学研究科 耳鼻咽喉科学・頭頸部外科学	教授	折館 伸彦
副査	横浜市立大学大学院医学研究科 分子生物学	教授	高橋 秀尚
副査	横浜市立大学附属市民総合医療センター 乳腺・甲状腺外科	講師	成井 一隆

Membrane type 1 matrix metalloproteinase regulates anaplastic thyroid carcinoma cell growth and invasion into the collagen matrix

甲状腺未分化癌における MT1-MMP 発現とコラーゲンマトリックス内での増殖浸潤能の制御に関する検討

甲状腺未分化癌は著しい増殖と浸潤傾向を特徴とし、全悪性腫瘍の中でも予後不良な癌腫である。Membrane Type 1- Matrix MetalloProteinase (MT1-MMP) は生体の細胞外マトリックスの主成分である I 型コラーゲンの主要な分解酵素であり、腫瘍細胞の浸潤に関与しているが、甲状腺未分化癌での MT1-MMP 蛋白発現や、浸潤・増殖の機序に関する機能解析は検討されていない。本論文では切除検体での MT1-MMP 蛋白発現と、甲状腺未分化癌細胞株での MT1-MMP の浸潤増殖能に関する検討を行った。結果、甲状腺未分化癌の 85.3% で MT1-MMP 蛋白発現を認めた。また、MT1-MMP ノックダウン株で浸潤能が低下、また生体を模した I 型コラーゲングル内での 3D 培養下で増殖能低下への関与が示唆された。

上記論文の研究内容説明に続き、以下のような質疑応答がなされた。

まず、副査の高橋秀尚教授から以下の質問があり、下記の回答がなされた。

1. MT1-MMP は周囲間質構造を破壊することで腫瘍の浸潤に関与しているという今回の内容であったが、腺癌細胞の浸潤に重要な上皮間葉転換への関連について

今回 MT1-MMP と上皮間葉転換との関連についての考察はなされていない。しかし MT1-MMP ノックダウン細胞株が 3D 培養で間葉系細胞の形態変化をきたさないことが観察されており、今回はその現象について周囲間質を分解できず浸潤突起を形成する間隙形成をとれないためと考察したが、腺癌細胞の上皮間葉転換への関与の可能性もあると考えらる。今後の研究課題とする予定である。

2. MT1-MMP が膜型の蛋白質であり western blot 法での難渋することがあるが、今回の検討ではどうであったか

研究の立案企画実施は申請者が中心となって行われたが、手技については一部分共同研究者に依頼した部分があり、今回の甲状腺未分化癌細胞株の RNA 干渉による MT1-MMP ノックダウンから western blot 法による蛋白発現抑制の確認については共同研究者に依頼させていただいた。今回の報告書作成に際しその実際について確認したが、特に難渋した点はなかった。

次に、副査の成井一隆講師から以下の質問があり、下記の回答がなされた。

1. 「神奈川県立がんセンター疫学研究「甲状腺未分化癌における遺伝子パネルを用いた変異プロファイリングと、RNAseq による遺伝子発現解析（研究管理番号;2019 疫-34）」の一部として実施」とあるが、研究実施の環境について、また研究統括者は誰か

本研究は上記疫学研究の一環として実施されたが、実際には遺伝子パネルを用いたものではなく、その前段階の研究として組織マイクロアレイに対して免疫組織化学染色を行った研究である。今回の報告では MT1-MMP のみの検討であるが、今回同時に p53 と CD68 の免疫組織化学染色も行っており、これらとの関連も検討することを考えている。

本研究の統括責任者は神奈川県立がんセンター乳腺内分泌外科 岩崎博幸部長である。

2. 細胞株を用いた研究のこれまでの経験について

学生時代に所属していた自治医科大学造血発生講座で DNA プラスミド作成の研究をさせていただいていた。また細胞株を直接用いたものではないが、神奈川県立がんセンター消化器外科所属時に、進行再発胃癌患者の血清を初代培養し、培養後 cytokeratin19 の DNA copy 数と臨床病理学的項目との関連を検討する研究の経験がある。

3. これまでも MT1-MMP 研究がなされてきたが、治療への応用は進んでいない。治療の応用についての将来展望について

MT1-MMP を含むいくつかの MMP が癌の増殖・浸潤、血管新生に重要な役割を果たすことから、癌分子標的治療薬としての MMP 阻害剤の臨床試験が実施された。しかしいづれにおいても抗がん作用は得られず、その一方で関節炎、筋肉痛、腱炎などの様々な有害事象により臨床試験が中止された経緯がある。その理由として、そこで使用された MMP 阻害剤の選択性が低いことが挙げられる。すべての MMP が癌の浸潤転移に関与するのではなく、がん抑制作用を持つものもあることから複数の MMP により抗癌作用が不明瞭になったこと、また MMP 自体は正常細胞にも発現しており、それらが阻害されることで有害事象が発現したと考えられた。近年、選択的 MT1-MMP 阻害剤など、選択的 MMP 阻害剤の研究が進んでいる。現在は基礎実験段階であるが、将来的な臨床応用に期待したい。

また MT1-MMP に特異的に結合する bicyclic peptides と微小管合成阻害剤である cytotoxin DM1 を解離可能リンカーでつないだ抗体薬物複合体の、進行性の固形癌を対象とした Phase I/IIa 試験がすでに進行している。

最後に主査の折館伸彦教授から以下の質問があり、下記の回答がなされた。

1. 今回対象とした甲状腺未分化癌 34 例のうち、先行する分化癌が確認できたものの内訳について

切除検体の病理学的検索から、ものは 11 例で乳頭癌の、8 例で濾胞癌の併存が確認できた。分化癌が確認できない、いわゆる de novo の未分化癌は残りの 15 例、44%であった。

2. 今回の検討では正常甲状腺と間質組織との MT1-MMP 蛋白発現の比較がなされているが、先行する高分化癌との比較はどうであったか

今回作成した組織マイクロアレイでは腫瘍組織は未分化癌部分を選択したため、先行高分化癌との比較は行っていない。しかし、1 例で先行する乳頭癌と一緒に採取されたものがあり、その標本では乳頭癌部分では MT1-MMP 蛋白発現は全くないが、連続する未分化癌部分で高発現していた。1 例のみの観察であるが、未分化転化に関与する可能性について興味ある所見であり、今後検討を進めたい。

3. MT1-MMP ノックダウン甲状腺未分化癌細胞株の 3D 培地での増殖能の低下について「周囲間質の分解の低下のため増殖のための間隙を作製することができないため」と考察しているが、それを証明するための今後の研究について

今回は腫瘍細胞自体の MT1-MMP の機能解析を検討した。腫瘍の伸展には腫瘍細胞のみでなく癌微小環境としての線維芽細胞も重要な役割を果たしており、過去の報告では線維芽細胞由来の MT1-MMP も間質分解に関与しているとも言われている。ご指摘いただいた点を証明するためには、MT1-MMP ノックダウン甲状腺未分化癌細胞株と MT1-MMP 蛋白発現しているなど I 型コラーゲン分解能を有していることが確認できている線維芽細胞株とを共培養し、この系で MT1-MMP ノックダウン甲状腺未分化癌細胞株の増殖が観察できれば今回の考察が証明できると考える。

申請者は質疑応答に対して的確に回答し、この領域において深く正確に理解していることが伺えた。本論文は当該分野において新たな学術的知見を得たことを証明し、今後の研究に寄与するものと期待される。以上より、本研究は横浜市立大学の学位(博士)の学位を授与するに値するものと総合的に判断された。