

Deregulated matriptase activity in oral squamous cell carcinoma promotes the infiltration of cancer-associated fibroblasts by paracrine activation of protease-activated receptor 2

学位名	博士(医学)
学位授与機関	宮崎大学
学位授与番号	17601甲第50号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10458/6185">http://hdl.handle.net/10458/6185</a>

## 学 位 論 文 要 旨

博士課程 ①・乙	第50号	氏名	金丸 愛
[論文題名]			
<p>口腔扁平上皮癌における matriptase 活性制御の破綻は、線維芽細胞 protease-activated receptor 2 のパラクリン活性化を介し、癌随伴線維芽細胞を増加させる。</p> <p>Deregulated matriptase activity in oral squamous cell carcinoma promotes the infiltration of cancer-associated fibroblasts by paracrine activation of protease-activated receptor 2</p> <p><i>International Journal of Cancer</i>, 140: 130-141 (2017) DOI: 10.1002/ijc.30426</p>			
[要 旨]			
<p>癌組織にみられる癌随伴線維芽細胞 (CAF) は癌の悪性形質に関与することが知られている。我々は強い間質浸潤を示す口腔扁平上皮癌 (OSCC) 組織の浸潤先端部において、癌細胞膜上の hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 (HAI-1) の発現低下が見られ、そのような部位では CAF が増加することを報告してきた。HAI-1 は上皮細胞や癌細胞に発現する膜結合型セリンプロテアーゼインヒビターであり、hepatocyte growth factor (HGF) activator、kallikrein 1-related peptidase などの分泌型セリンプロテアーゼのみならず、matriptase、prostasin、hepsin、TMPRSS13 などの細胞膜結合型トリプシン様プロテアーゼの活性も制御している。これらのうち matriptase は protease-activated receptor 2 (PAR2)、pro-urokinase、pro-HGF などを活性化することが知られており、癌進展における意義が強調されてきた。PAR2 は、上皮細胞、内皮細胞、平滑筋細胞に広範に発現している細胞膜 7 回貫通 G 蛋白共役受容体であり、トリプシン様プロテアーゼによって細胞外ドメインが切断されることにより細胞内にシグナルが伝達され、細胞遊走をはじめとする様々な影響を与える。線維芽細胞では PAR2 はほとんど発現していないが、platelet-derived growth factor、transforming growth factor-<math>\beta</math> などの刺激により発現が誘導されることが知られており、これらの誘導因子は癌組織においてしばしば発現が亢進している分子でもある。</p> <p>本研究では、OSCC において HAI-1 機能低下によって生じる matriptase 活性異常が CAF の増加に関わる可能性と、その分子機序を、線維芽細胞 PAR2 に着目して検証した。また、CAF における PAR2 発現と臨床病理学的因子、予後との相関について、切除 OSCC 標本を用いて検証した。</p> <p>ヒト OSCC 細胞株 SAS および 3 種類のヒト線維芽細胞株 (NB1RGB、MRC5、KD) を用いて検討した。SAS 細胞の無血清培養上清 (SFCM) にはいずれの線維芽細胞をも遊走させ</p>			

る因子が含まれていることが示された。加えて、SAS 細胞における HAI-1 発現をノックダウンすることによって SFCM の線維芽細胞遊走刺激作用が更に亢進することが、NBIRGB 細胞と MRC5 細胞において観察された。一方で、KD 細胞においてはこのような追加刺激効果は認めなかった。すなわち、SAS 細胞 SFCM 中には HAI-1 機能非依存性の線維芽細胞遊走刺激活性と HAI-1 機能不全によって更に生じる遊走刺激活性が存在しており、後者の影響は NBIRGB と MRC5 においてのみ認められることを示している。また、SAS 細胞 SFCM 中のトリプシン様プロテアーゼ活性は HAI-1 ノックダウンに伴い顕著に亢進し、これは matriptase のノックダウンにより強く抑制された。

次に、これらの線維芽細胞における PAR2 発現を検討したところ、いずれにおいてもほとんど発現が認められなかった。しかし、NBIRGB と MRC5 においては、SAS 細胞 SFCM の添加によって PAR2 発現の亢進が観察された。一方、KD にはこのような現象はみられなかった。これらのことより、SAS 細胞の HAI-1 ノックダウンに伴う SFCM の線維芽細胞遊走刺激効果は、SAS 細胞 SFCM 中の過剰 matriptase 活性により線維芽細胞の PAR2 活性化が生じた結果ではないかと仮説を立て、検討を進めた。

まず、PAR2 アンタゴニストを線維芽細胞に投与したところ、HAI-1 ノックダウンによって生じた線維芽細胞遊走亢進は有意に抑制された。次に、PAR2 欠損マウスから皮膚線維芽細胞を初代培養し同様に SAS 細胞 SFCM による遊走刺激アッセイを行った。その結果、野生型マウス由来線維芽細胞では SAS 細胞の HAI-1 ノックダウンに伴う遊走亢進が観察されたが、PAR2 欠損マウス由来の線維芽細胞では HAI-1 ノックダウンに伴う遊走惹起は確認されなかった。以上のことは、HAI-1 機能不全に伴う OSCC 細胞周囲の matriptase 活性亢進は、線維芽細胞 PAR2 活性化を介して、CAF の動員に参与する可能性を示している。

そこで、ヒト OSCC 組織に PAR2 陽性 CAF が実際に存在するのか、切除 OSCC 標本を用いた免疫組織学的検討を行った。癌浸潤先端部 CAF の PAR2 陽性率は 33/95 症例 (35%) であった。また、PAR2 陽性線維芽細胞は、ほとんどが  $\alpha$ -smooth muscle actin 陽性 CAF であることも確認された。病理組織学的に強い癌細胞浸潤を示す症例では、PAR2 陽性 CAF が有意に増加することが確認され、PAR2 陽性 CAF の増加は患者の術後無病生存率と負の相関を示すことが明らかとなった ( $p = 0.0011$ )。

これらの結果は、OSCC の浸潤先端部における癌細胞 matriptase 活性制御の破綻は、線維芽細胞 PAR2 活性化を介して CAF の動員や機能に影響を与える事を示している。この現象は matriptase による癌悪性形質亢進の一端を担っている可能性がある。

備考 論文要旨は、和文にあつては 2, 000 字程度、英文にあつては 1, 200 語程度とする。