

Analysis About the Indicator to Predict Prognosis of Tongue Squamous Cell Carcinoma

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9279

舌癌の悪性度に関する因子についての検討

金沢大学医学部耳鼻咽喉科学講座 (主任: 古川 俊教授)

丸 山 裕 美 子

舌癌の潜在的悪性度を示す指標となりうる因子を探る目的でマトリックスメタロプロテアーゼ-2 (matrix metalloproteinase-2, MMP-2), 1型膜性マトリックスメタロプロテアーゼ (membrane type 1-matrix metalloproteinase, MT1-MMP), マトリックスメタロプロテアーゼ-2のインヒビター (tissue inhibitor of metalloproteinase-2, TIMP-2) の発現および血管新生度につき原発性舌癌56症例及び良性舌病変3症例を対象に検討を行った。ゼラチンゼイモグラフィ法では正常組織や非転移性リンパ節を含めた全ての組織で潜在型MMP-2の酵素活性を認めたのに対し, 原発腫瘍組織, 転移性リンパ節組織のみで活性化型MMP-2酵素活性の上昇が認められた。ノーザンブロット法により, 原発組織および転移性リンパ節においてMT1-MMP mRNAの過剰発現を認めた。また51症例, 110標本の免疫組織学的検索より, 病理組織学的に悪性所見を認める病変では, 良性病変に比してMMP-2, MT1-MMP, TIMP-2の各タンパクの発現が有意に高いことが確認された。さらに癌細胞においてMMP-2又はMT1-MMPの陽性群, 及び血管新生が高度であった群ではその陰性群や低度血管新生群に比して初発時の所属リンパ節転移例が有意に多く, かつ有意に予後不良であった。さらにMMP-2又はMT1-MMPの陽性群では初回治療後の局所再発例, 所属リンパ節再発例または遠隔転移での再発例が陰性群に比して有意に多かった。またMT1-MMP, MMP-2のタンパク発現量および微小血管数はそれぞれ順相関の関係を示していた。以上の結果から, 舌癌におけるMMP-2, MT1-MMPの評価は病理組織学的な良性・悪性の補助診断として有用であること, 舌癌症例におけるMT1-MMP, MMP-2発現及び血管新生度の評価は患者の予後を予測する指標として非常に有用であることが示唆された。

Key words membrane-type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP), matrix metalloproteinase 2 (MMP-2), carcinoma of tongue, recurrence, prognosis

頭頸部癌を含めた悪性腫瘍の病期分類は, 患者の予後を予測し, 的確な治療を行う上で必須である。頭頸部の悪性腫瘍については, わが国では一般に国際的に組織されたUICC分類に準拠し病期分類が行われ診断, 治療, 予後判定が行われている。しかし, 早期癌に分類される症例においても予後不良である症例や, 進行癌に分類されても予後良好である症例が存在する。癌の進展形式は複雑多岐な因子の影響を受けるため患者の経過と予後を予測することは困難である。

一般に悪性腫瘍の特徴として, その旺盛な増殖能と浸潤転移能が挙げられる。特に宿主を死に至らしめる最大の原因は浸潤転移能による。従って悪性腫瘍の浸潤転移能を正確に評価することが悪性度の評価に際し必要不可欠であるが, 現在までのところの確かな評価法は確立されていない。

癌細胞の浸潤転移機構は幾つかの段階に分類される。まず, E-カドヘリン等のいわゆる接着因子の発現低下であり, これにより癌細胞の遊離が容易になる。続いておこる基底膜の破壊は癌細胞が周囲正常組織に浸潤するために必須である。次にリンパ管, 血管への侵入が起こる。その際にも血管への侵入には血管の基底膜を破壊しなければならず, たとえリンパ管から侵入したとしても転移巣を形成するためには癌細胞が捕捉された血

管から転移標的臓器の間質への侵入の際にやはり基底膜の破壊が必要となる。すなわち基底膜への浸潤能はその腫瘍の浸潤転移能を評価するための重要な因子である。

基底膜を構成する主要骨格はIV型コラーゲンである。このIV型コラーゲンを特異的に分解する酵素としてマトリックスメタロプロテアーゼ (matrix metallo proteinase, MMP) 2と9が同定されており, 実際これらの酵素の発現とその腫瘍の転移能の正の相関性について様々な報告がある^{1)~9)}。これらの酵素は潜在型酵素として分泌されるためIV型コラーゲンの分解能を有する活性化型となるためにはさらにもう一段階の修飾を必要とする。

近年, Satoら¹⁰⁾がMMP-2を特異的に活性化する酵素, 1型膜性マトリックスメタロプロテアーゼ (membrane type 1-matrix metallo proteinase, MT1-MMP) の同定に成功したことにより, MMP-2の発現のみならず, その活性化因子についての評価も可能となった。一方, MMP-2はインヒビター (tissue inhibitor of metalloproteinase-2, TIMP-2) によって阻害される。正常な組織においては, MMPの活性化と抑制のバランスが保たれることにより組織の破壊と修復がコントロールされているが, 炎症や分化・成熟¹¹⁾¹²⁾, そして癌の浸潤・転移の場においてはMMPの発現量が相対的に上昇しているとされている。これら

平成9年11月28日受付, 平成10年1月22日受理

Abbreviations : kbp, kilo base pair; MMP, matrix metalloproteinase; MOPS, 3-N-Morpholino-propanesulfonic acid; MT1-MMP, membrane type 1-matrix metalloproteinase; TIMP-2, tissue inhibitor of metalloproteinase; vWF, von Willebrand factor

MMPの発現の増加は単に組織の破壊作用の増強を意味するのではなく、組織の再構築を示しているといわれている^{13)~15)}。

ところで、癌細胞巢はその直径が2mm以上に発育すると血管新生が必要となる。癌細胞が増殖し、腫瘍が増大するためには血管からの十分な栄養補給が必要であり、また腫瘍内や腫瘍周囲の新生血管の増大は腫瘍細胞の体内循環さらには転移の機会を増やす。すなわち血管新生の度合いと転移能とは相関する可能性があり、実際これを示す報告もある¹⁶⁾¹⁷⁾。また血管新生自身が一種の組織の再構築であり、MMPとの関連性も示唆される。

MMP-2は本来間質の線維芽細胞から分泌され¹⁴⁾¹⁸⁾¹⁹⁾、上皮系細胞からは分泌されないとの説もある。さらには癌細胞は浸潤転移能を獲得するにつれて、間葉系細胞としての性質を獲得するとの報告がある²⁰⁾。ビメンチン(vimentin)は間質系組織に特異的に存在する中間径フィラメントであり、乳癌由来の培養細胞においてその発現と転移能が相関すること、さらにビメンチンの発現とMT1-MMPの発現、MMP-2の活性化との間の関連性を示唆する報告がなされている^{18)20)~22)}。しかし現在までのところ、臨床材料によるビメンチンの検討についての報告はない。

舌癌は頭頸部領域の悪性腫瘍のうちでもその発生部位の性質上、原発腫瘍の拡がり(T)を比較的正確に評価でき、初診時のTNM分類と手術後のpTNM病理学的分類との間で大差が生じないことが多い。それにもかかわらず、I期、II期の症例においても初回治療後、全身性に転移再発し、予後不良な転機をたどる症例もあれば、逆にIII期、IV期の症例であっても、治療に対する反応もよく、経過良好な症例もある。舌癌は、現在行われている臨床学的、病理学的評価では予測が困難な、癌の「悪性度」の決定因子を検討するにあたり適切と考えられる。

以上により本研究では舌癌における癌の悪性度の評価の指標となりうる因子として浸潤転移に関連する因子に焦点を絞り検討した。

対象および方法

I. ゼラチンゼイモグラフィ

1. 臨床材料

1997年4月から1997年10月までに金沢大学医学部附属病院耳鼻咽喉科及び富山県立中央病院耳鼻咽喉科で初期治療として観血的治療を受けた舌癌患者7例において切除された腫瘍病変部と同一患者の正常組織の新鮮標本を用いた。病理組織学的には、いずれも高分化型扁平上皮癌と診断された。また頸部廓清が施行された7例中の3例についてはリンパ節におけるMMP-2の発現についても検討を加えた。そのうちの2症例は病理学的に転移性病変との診断を受けた。

2. ゼラチンゼイモグラフィ

各種MMPが分解可能な基質の差によりそれらの酵素の発現を定量することが可能である。MMP-2とMMP-9の2種はゼラチンを特異的に分解するため、MMP-2タンパクの発現の定量にはゼラチンゼイモグラフィを用いた。本実験ではHeussenら²³⁾の方法に準じて行った。すなわち、切除組織を1mgあたり10 μ lの試料溶解液[10mM Tris-HCl, pH7.6, 2.0%グリセロール, 2% SDS, 0.1% プロモフェノールブルー]で均質化し37℃で20分間静置した。その後室温で4000回転/分遠心した上清を上記の試料溶解液にて希釈して試料を得た。

試料20 μ lを0.1%ゼラチンを含む10%ポリアクリルアミドゲルでSDS-PAGEをおこなった。泳動終了後、ゲルを2.5%ト

ライトン-X100にて30分間室温で2回洗浄し、反応液[50mM Tris-HCl, pH7.6, 150mM NaCl, 10mM CaCl₂, 0.02%アジ化ナトリウム(NaN₃)]にて37℃24時間反応させた。反応後、ゲルを染色液[30%エタノール, 10%酢酸, 0.3%クマシーブリリアントブルー G-250 (Sigma Chemical, St.Louis, USA)]にて室温時間染色し、10%エタノール, 10%酢酸にて脱色してゼラチン分解能を観察した。ゼラチンを含む背景はクマシーブリリアントブルーで暗紫色に染色されるのに対し、分解されたゼラチンは染色されず透明なバンドとして検出される。

潜在型及び活性化型MMP-2はそれぞれ66kDa, 62kDaのバンドとして認識された。

II. RNAの抽出とノーザンブロットング法

1. 臨床材料

1997年4月から1997年10月までに金沢大学医学部附属病院耳鼻咽喉科を受診し、初期治療として観血的治療を行った舌癌患者6例につき、腫瘍組織と正常組織の新鮮標本を得た。腫瘍はいずれも病理組織学的に高分化型扁平上皮癌と診断された。さらに頸部廓清を施行した6例中3例についてはリンパ節におけるMT1-MMPについても検討を加えた。病理組織学的には1例が転移性リンパ節であり、残り2例は反応性の病変であった。

2. RNAの抽出

新鮮組織100mgあたり1mlのRNA抽出用試薬アイソゲン(ニッポンジーン, 富山)を加えて十分に均質化した。この材料に1/5容量のクロロホルムを加え混和し5分静置した。その後フェノール抽出をおこない、水層(上層)に等量のイソプロパノールを加え10分静置した後で4℃, 12000回転/分, 10分遠心した後エタノールで洗浄した。RNAの沈殿をジエチルピロカルボネート(diethyl pyrocarbonate)処理蒸留水にて溶解し、分光光度計(ベックマン, DU-65, 東京)を用いて260nmの吸光度を測定し、1ODを50 μ g/mlとして全RNA濃度を測定した。

3. ノーザンブロットング法

一検体につき20 μ gの全RNAを用いこれを42%ホルムアミド, 17%のホルムアルデヒドを含む2%3-N-モルホリノプロパンスルホン酸(morpholino-propanesulfonic acid, MOPS), pH7.0に溶解し、65℃で5分間反応させた後、16%ホルムアルデヒドを含む1%アガロースゲルにて1%MOPS中で電気泳動を行った。泳動後のゲルをハイボンドNメンブラン(Amersham, Buckinghamshire, UK)に転写した。転写後のメンブランをUVストラターリンカー1800(フナコシ, 東京)を用いて波長254nmの紫外線1200マイクロジュールを照射し、RNAをメンブランに固定した。

4. プローブの作成

本実験で使用した3.4キロ塩基対(kilo base pairs, kbp)のMT1-MMPプローブ用cDNAは金沢大学がん研究所ウイルス部佐藤博士から分与された¹⁰⁾。

このDNAをそれぞれ25ngずつメガプライム・ラベリングキット(Amersham, 東京)にて[α -³²P]dCTP(Amersham)を用いて標識した。

5. ハイブリダイゼーション

紫外線固定後のメンブランを50%ホルムアミド, 4倍濃度SCC, 5倍濃度デンハルト液(0.1%ポリビニールピロリドン, 0.1%牛血清アルブミン, 0.1%フィコール), 0.1% SDS, 90 μ g/ml変性サケ精子DNA(ペーリンガー・マンハイム山之内, 東京)からなるプレハイブリダイゼーション液32ml

と42℃で5時間反応させた。反応終了後この液を捨て、プレハイブリダイゼーション液1mlに標識したプローブを加えてメンブランと42℃で24時間反応させた。その後、メンブランを2倍濃度SSC-0.1% SDSにて室温で洗浄し、0.2倍濃度SSC-0.1% SDSにて55℃で30分間の洗浄を2回行い、36時間のオートラジオグラフィーを施行した。得られたバンドの放射活性はバイオイメージアナライザー (Bioimage analyzer BAS1500, 富士, 東京) を用いて測定した。

Ⅲ. 免疫組織染色法

1. 臨床材料

1984年2月から1997年10月までに前述の施設を受診し、切除された舌病変症例59例のうち経過観察が1年未満の5症例、腎癌の転移性舌癌1症例、及び経過観察が不十分となった2症例を除く51例について検討を行った。内容は原発性舌癌48症例、良性舌病変3症例であった。年齢は22歳から89歳、平均59.7歳であった。男性34例(66.7%)女性17例(33.3%)で、病理組織型分類では高分化型扁平上皮癌は37例(72.5%)、中分化型は4例(7.8%)、低分化型は1例(2.0%)、分化度不明扁平上皮癌4例(7.8%)、疣贅癌2例(3.9%)、良性病変症例は3例(5.9%)であった。組織型分類は日本頭頸部腫瘍学会の分類に従った。

パラフィン包埋ブロックを4μmに薄切し、免疫染色用スライドグラスであるプローブオンプラス (Fisher Scientific, Pittsburgh, USA) に付着させパラフィン切片を作成した。

2. 免疫組織染色

免疫組織染色はHsuら²⁴⁾のアビジン・ビオチン染色 (avidin biotin peroxidase complex) 法に準じて、またマイクロプローブシステム (MicroProbe system) (Fisher Scientific) を用いて行った²⁵⁾。すなわちパラフィン切片をキシレン、エタノール系列で脱パラフィンし、エンド/ブロッカー (Boimedia, Foster city, USA) 溶液にて内因性ペルオキシダーゼのブロックを37℃で5分行ったのち、ペプシン (Biomed) にて抗原性の賦活化を行った。1次抗体として抗MMP-2抗体 (42-5D11, 富士薬品工業, 高岡), 抗MT1-MMP抗体 (113-5B7, 金沢大学ガン研究所ウィルス部佐藤博士より分与), 抗TIMP-2抗体 (67-4H11, 富士薬品工業, 高岡), 抗von Willebrand 因子 (von Willebrand factor, vWF) 抗体 (DAKO, Glostrup, Denmark), 抗ビメンチン抗体 (V9, Zymed, South San Francisco, USA) を用いてそれぞれ37℃ 30分で反応させた。2次抗体にはユニバーサル2次抗体 (Research Genetics, Huntsville, USA) を使用して37℃ 20分で反応させた後、ストレプトアビジン・ビオチン・ペルオキシダーゼ複合体 (DAKO) とさらに37℃ 30分で反応させた。最後にジアミノベンチジン (3,3'-diaminobenzidine) 反応液 (Research Genetics) で5分間発色させた。核染色はメチルグリーンにて行い、鏡検した。抗MMP-2抗体, 抗MT1-MMP抗体, 抗TIMP-2抗体, 抗vWF抗体に対する陽性対照として肺組織を用い, 抗ビメンチン抗体に対しては頸部廓清組織を用いた。また陰性対照として1次抗体希釈液 (primary antibody diluent), (Research Genetics) を1次抗体のかわりに使用し同様の方法で反応を行った。

3. 免疫組織染色の評価

MT1-MMP, MMP-2, TIMP-2, ビメンチンの免疫組織標本については腫瘍細胞巣を含む200倍の鏡検視野2箇所においてそれぞれ200個の細胞中の陽性細胞数を計測し, その平均を百

分率で評価した。さらに陽性率が50%以上, 50%未満の標本をそれぞれ陽性, 陰性と定義した。

血管新生度検討の目的で, 抗vWF抗体にて血管を染色した標本については, 血管内腔の有無に関わらず, 腫瘍細胞巣部とその周囲の微小血管 (毛細血管と小静脈) に位置づけられる血管の数を200倍の視野にて2箇所計測し, その平均を微小血管数とした。さらに評価値が50以上を血管新生高度, 50未満を血管新生低度と定義した。

4. 統計処理法

各々の項目についての群間での有意差検定には χ^2 検定及びイーエツによる補正法を用いた。一方生存分析統計には Kaplan-Meier法を用いて危険率5%未満 ($P < 0.05$) を有意差ありとして判定した。また, 対応ある2群間の比較にはt検定法を用い, 対応のない2群間の比較にはMann-WhitneyのU検定を用いた。多重比較検定にはScheffe's F検定を用い, また相関分析にはPearsonの相関係数を用いた。

成 績

I. 舌癌におけるMMP-2タンパクの発現

ゼラチンゲル法にて潜在型MMP-2の発現は66kDa, 活性化型MMP-2は62kDaの明瞭なバンドとして認められた (図1, A)。潜在型MMP-2のバンドは原発腫瘍組織, 正常組織, 転移性リンパ節組織, 及び非転移性リンパ節組織のいずれの組織においても認められた。これに対し活性化型MMP-2については原発巣組織と転移性リンパ節組織において明らかなバンドを認めたが, 正常組織と非転移性反応性リンパ節組織

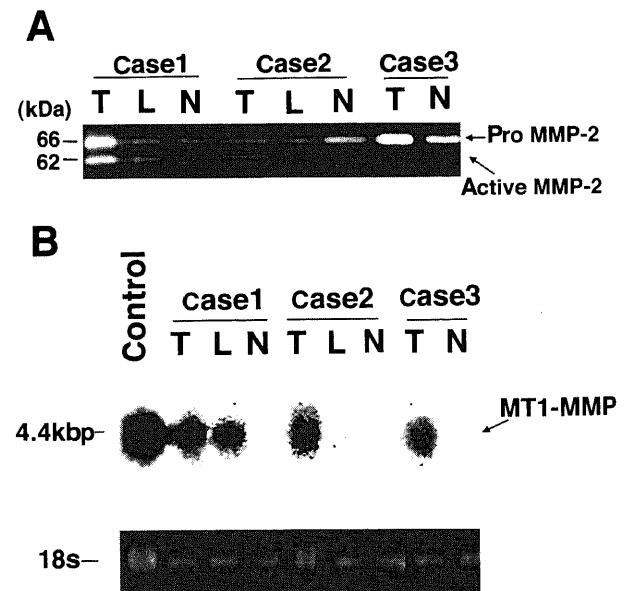


Fig. 1. (A) Gelatin zymography analysis of MMP-2 activation. (B) Northern blot analysis of MT1-MMP mRNA expression in well differentiated squamous cell carcinoma (SCC) of tongue. case 1, carcinoma with lymph node metastasis; case 2, carcinoma without lymph node metastasis; case 3, carcinoma which had difficulty to be distinguished SCC from verrucous carcinoma. T, tumor tissue of primary lesion; L, lymph node tissue; N, normal tissue. Control shows MT1-MMP mRNA from MDA-MB-231 cell line.

においては検出されなかった。病理学的に疣贅癌と診断される舌癌は転移性が低く、その予後が良好とされている。今回、疣贅癌との鑑別が困難であった高分化型の扁平上皮癌の1症例につきザイモグラフィーによる検討を行った結果、この症例では潜在型MMP-2のバンドは他の腫瘍組織のものと同様に認めら

れたが、活性化型MMP-2のバンドは他の腫瘍組織標本に比して微弱であった。

Ⅱ. 舌癌におけるMT1-MMPmRNAの発現

舌癌症例におけるMT1-MMPmRNAの発現をノーザンブロッティング法にて検出した(図1, B)。MT1-MMPmRNAの発現は

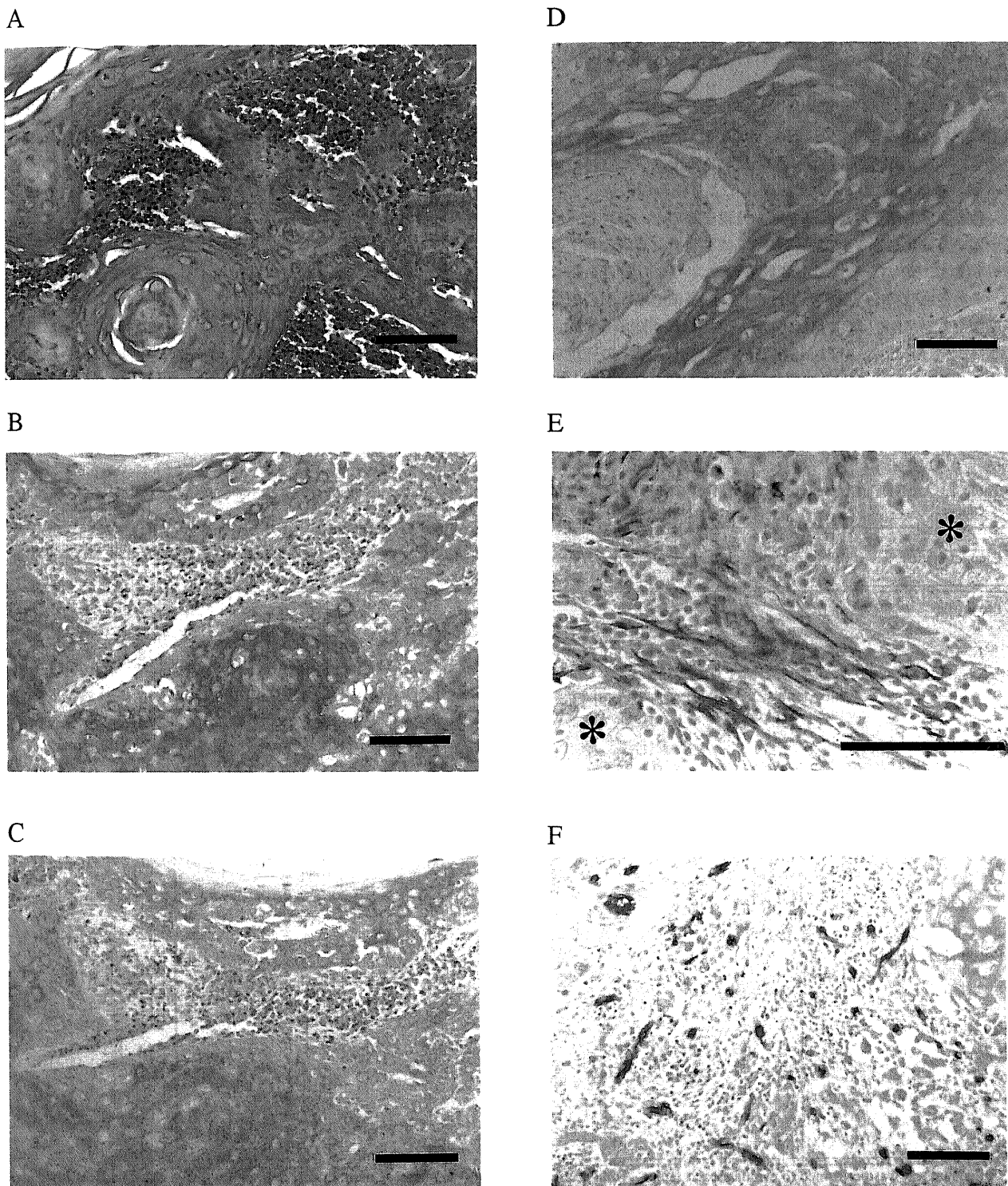


Fig. 2. Expression of protein for MMP-2 (B)MT1-MMP (C) TIMP-2 (D) vimentin (E) and vWF. (A) Metastatic lymph node of squamous cell carcinoma as the same specimen as B and C in hematoxylin-eosin staining.
* indicates cancer cell. Bar indicates 100 μ m.

4.4kbpのバンドとして検出され、舌癌組織に認められたものの、正常組織には検出されなかった。また、転移性リンパ節において原発巣と同程度のMT1-MMP mRNAが検出された。これに対し反応性腫大を見た頸部所属リンパ節組織では正常組織同様、mRNAの検出は認められなかった。今回、疣贅癌との鑑別が困難であった舌の高分化型扁平上皮癌の一症例についてもノーザンブロット法による検討を行ったところ、この症例におけるMT1-mRNAの発現量は他の腫瘍組織に比して微弱であった。

Ⅲ. 免疫染色法による舌癌症例の多角的検討

1. 免疫組織染色法による組織内のMMP-2, MT1-MMP, TIMP2, ビメンチンおよび血管の局在

免疫組織染色により舌癌の原発病変、及び転移性のリンパ節病変において腫瘍細胞でMMP-2, MT1-MMPタンパクの存在が確認された(図2B, C)。MMP-2, MT1-MMPタンパクはいずれも同一腫瘍組織内においても細胞により染色性の違いを認め、特に正常組織への浸潤部で強い発現を認めた。また角化傾向の強い高分化型扁平上皮癌においてはケラチン真珠の角下直前の表層に対応する細胞でもこれらのタンパクの発現を認めた。その他血管内皮細胞や炎症性細胞、腫瘍細胞巣周囲の線維芽細胞でもMMP-2, MT1-MMPタンパクの発現が認められた。

TIMP-2もMMP-2, MT1-MMPと同様、癌細胞でその発現を認めた(図2, D)。しかしその陽性例は認めるものの全体として

発現は微弱であった。

抗ビメンチン抗体による免疫染色では、血管内皮細胞、間質の組織球、線維芽細胞を含めた間質系組織にビメンチンの特異的染色を認めるが、舌癌原発の扁平上皮癌のいずれの腫瘍組織においてもビメンチンの発現は認められなかった(図2, E)。

微小血管は鏡検上はその内腔を認めないことも多く、その存在の確認は通常のヘマトキシリン・エオジン染色の標本では困難である(図2, A)。抗vWF抗体による血管内皮細胞の染色により血管構造の明確な識別が可能となった(図2, F)。微小血管の密集が腫瘍組織周囲に認められた。

2. 各症例の初発原発巣標本による悪性度の検討

対象とした51症例につき、種々の因子とMMP-2, MT1-MMP, TIMP2のタンパクの発現の陽性/陰性群や血管新生高度群/低度群との相関性につき検定を行った。尚、この検定の際に評価の対象とした標本はいずれもその症例における初発時に最も近い原発巣の切除標本、もしくはそれに準ずるものとした。

先ず、血管新生度についての検討では血管新生が高度とされた群では有意にその予後は不良であった($P < 0.001$)。しかし、血管新生度の高度群/低度群間において、初診時のリンパ節転移の有無や、再発時の遠隔転移の有無と相関を示すもの($P < 0.05$)、その他の因子とは明らかな関連は認められなかつ

Table 1. Analysis of the expression of MMP-2, MT1-MMP and TIMP-2 and the grade of angiogenesis in relation to clinical data of tongue cancer

Characteristics	Total n	MMP-2		MT1-MMP		TIMP-2		angiogenesis		
		n	%	n	%	n	%	n	%	
Prognosis	Alive	30	3	10	2	6.7	1	3.3	6	20
	Dead	22	17	77.3	16	72.7	2	9.1	18	81.8
T stage	T1, 2	32	10	31.3	8	25	1	3.1	14	43.8
	T3, 4	16	9	56.3	8	50	2	12.5	9	56.3
Nodal status	N (-)	31	8	25.8	7	22.6	1	3.2	11	35.5
	N (+)	17	11	64.7	10	58.8	2	11.8	12	70.6
Distant metastasis	M (-)	46	17	37	15	32.6	2	4.3	21	45.7
	M (+)	1	1	100	1	100	1	100	1	100
Stage	I, II	29	7	24.1	6	20.7	0	0	11	37.9
	III, IV	22	12	54.5	11	50	3	13.6	12	54.5
Locoregional recurrence	rT (-)	32	6	18.8	6	18.8	2	6.3	12	37.5
	rT (+)	16	13	81.3	11	68.8	1	6.3	11	68.8
Nodal recurrence	rN (-)	35	8	22.9	7	20	2	5.7	14	40
	rN (+)	13	11	84.6	10	76.9	1	7.7	9	69.2
Distant metastatic recurrence	rM (-)	38	11	28.9	9	23.7	1	2.6	15	39.5
	rM (+)	7	7	100	7	100	2	33.3	7	100

Chi-square test was performed to evaluate each factor. Total n, total number of each case; n, number of cases with positive expression of MMP-2, MT1-MMP or TIMP-2 and with high grade angiogenesis; N (-), negative for lymph node metastasis; N (+), positive for lymph node metastasis; M (-), negative for distant metastasis; M (+), positive for distant metastasis; rT (-), negative for locoregional metastasis; rT (+), positive for locoregional metastasis; rN (-), negative for nodal recurrence; rN (+), positive for nodal recurrence; rM (-), negative for distant metastatic recurrence; rM (+), positive for distant metastatic recurrence; NS, not significantly different; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

た(表1).

これに対し, MMP-2, MT1-MMPの発現は血管新生度と同様, その予後と明らかな相関関係を示すうに ($P < 0.001$), MMP-2, MT1-MMPはいずれも初発時のリンパ節転移の有無 ($P < 0.05$)とも関連を示していた. さらにMMP-2タンパクの陽性群では初回治療後局所再発, 所属リンパ節再発と強く相関し ($p < 0.001$), また遠隔転移による再発とも相関していた ($p < 0.01$). MT1-MMPタンパクの陽性群では所属リンパ節再発例, 遠隔転移による再発例が有意に多く ($p < 0.001$), また局所再発とも相関していた ($p < 0.01$) (表1).

TIMP2の発現についてはいずれの因子とも相関を示さなかった.

さらに初発時の原発巣の拡大 (T1~4), 遠隔転移 (M0, 1), 性別, 年齢についても検討を行ったが, いずれの因子についてもMMP-2, MT1-MMP, TIMP2, 血管新生度との間に相関関係は認められなかった.

カプランマイヤー法による生存分析においてはTIMP-2の発現の有無と予後には有意差を認めなかったが, MMP-2, MT1-MMPの陽性群, および血管新生が高度な群で有意に予後不良であった(図3).

ビメンチンは舌癌腫瘍組織においてその陽性例が認められなかった.

3. 転移性リンパ節と非転移性リンパ節における各タンパクの発現の相違の検討

次に14症例については頸部廓清に際し, 転移性リンパ節と非転移性反応腫大性リンパ節との両種類のリンパ節標本を得ることが可能であったことよりリンパ節の転移の有無とMMP-2, MT1-MMP, TIMP2の発現との関連性について検討した. 良性反応性リンパ節においてはいずれの蛋白も発現が微弱であったが, 転移性リンパ節においてはその発現を認め, 転移性, 非転移性のリンパ節群間に各タンパクの発現量に有意差を認めた.

4. 病理組織学的診断結果と免疫組織染色結果との比較検討

病理診断結果とMMP-2, MT1-MMP, TIMP2の発現との関連性について, 51症例, 110標本につき検討を加えた. これら

の標本中には臨床的に悪性腫瘍との鑑別が困難であった良性潰瘍や異型性病変の症例についての生検組織や, 舌癌症例治療後の経過観察中の生検標本を含んでいた.

まず, 110標本を病理組織学的診断上での良性病変 (14標本) と悪性病変 (96標本) の2群に大別し, 2群間においてそれぞれのタンパクの発現量の差を認めるかを調べた. その結果, MMP-2, MT1-MMP, TIMP2のいずれのタンパクについても悪性標本において有意に高い値を示した(図4).

更に病理学的分化度, 即ち同じ扁平上皮癌の中でも高分化型, 中分化型, 低分化型の分類に準じて, それぞれの蛋白の発現性が異なるか否かについて多重比較検定により検討してみたところ, 各群間で明らかな発現度の差は認められなかった

5. 各タンパク間の発現の相関性についての検討

MMP-2, MT1-MMP, TIMP2, 新生血管数の各因子の評価値が, それぞれ互いに相関するかを検定した. その結果MT1-

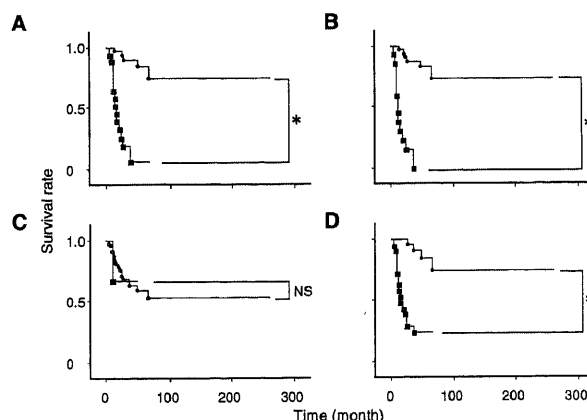


Fig. 3. Survival curves (Kaplan-Meier method). (A) MMP-2. (B) MT1-MMP. (C) TIMP-2. (D) angiogenesis. \blacksquare , positive or high grade group; \circ , negative or low grade group. * $p < 0.0001$; NS, not significant.

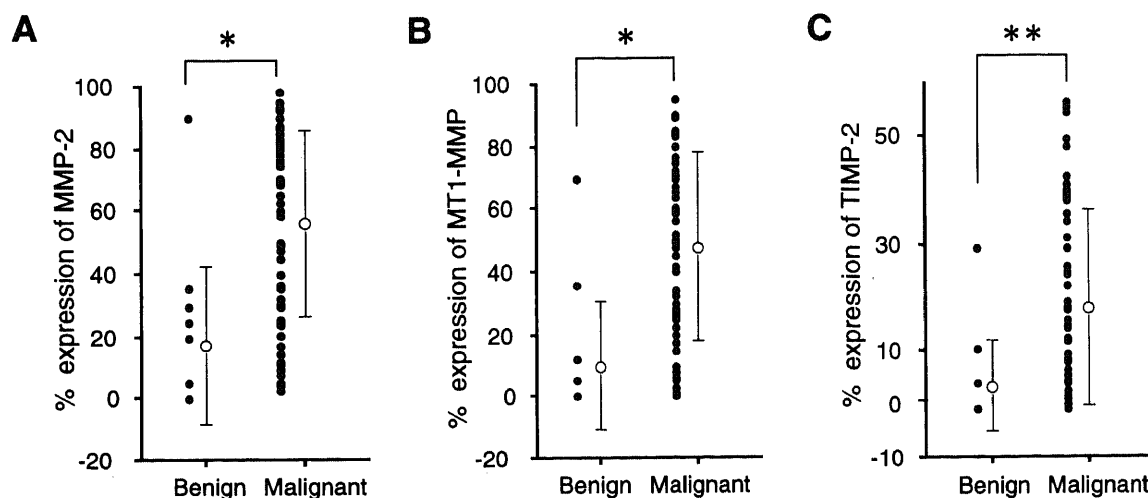


Fig. 4. Expression of MMP-2, MT1-MMP and TIMP-2 in benign and malignant specimen. Expression of MMP-2 (A) that of MT1-MMP (B) and that of TIMP-2 (C) in fourteen benign and ninety-six malignant specimens was plotted separately and the value was calculated. The value was indicated by $\bar{x} \pm SD$. Benign, benign tongue specimen; malignant, malignant tongue specimen. * $p < 0.0001$; ** $p = 0.001$.

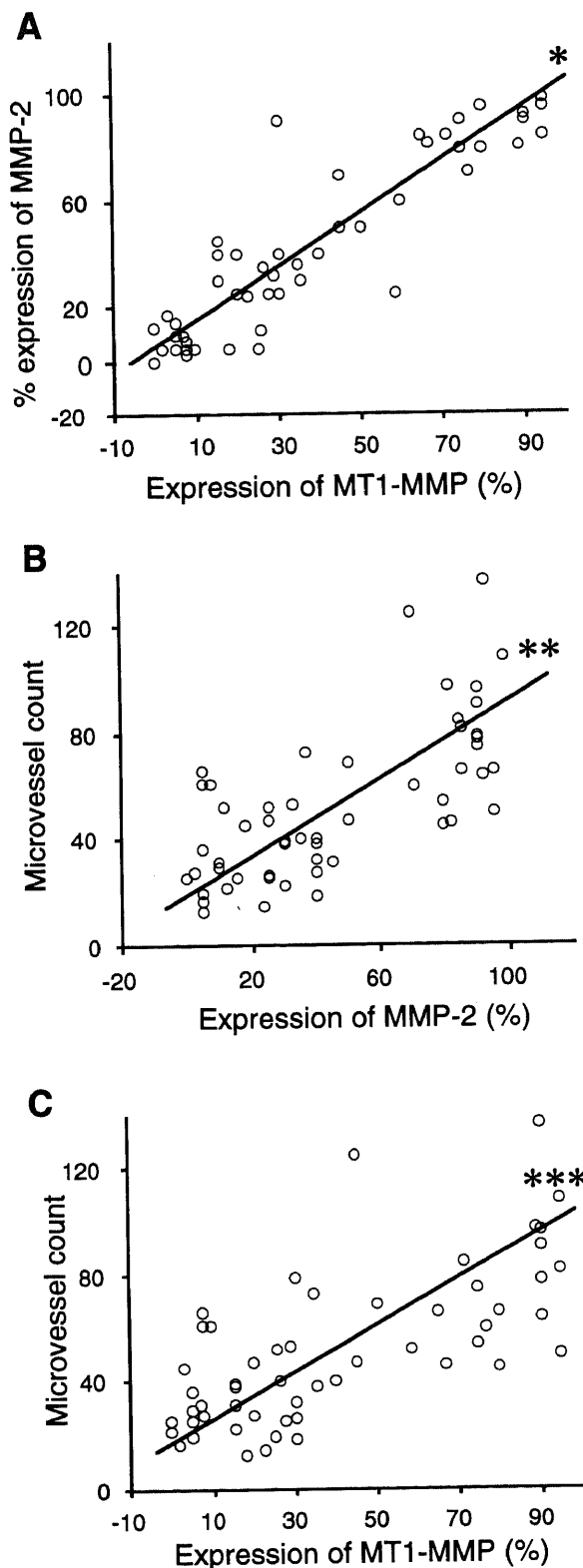


Fig. 5. The correlation among expression of MMP-2, that of MT1-MMP and microvessel count. The expression of MMP-2, that of MT1-MMP and microvessel count of fifty-five patients were plotted according to the evaluation about immunohistochemical staining. The correlation between expression of MT1-MMP and MMP-2 (A), between expression of MMP-2 and microvessel (B) and between expression of MT1-MMP and microvessel count (C). Correlation coefficient, r ; $*$ $r=0.916$; $**$ $r=0.704$; $***$ $r=0.688$.

MMPとMMP-2とが最も強い順相関の関係を示し (Pearsonの相関係数, 0.916), 以下MMP-2と新生血管数 (相関係数, 0.704), MT1-MMPと新生血管数 (相関係数, 0.688), MT1-MMPとTIMP2 (相関係数, 0.616), TIMP2とMMP-2 (相関係数, 0.565), TIMP2と新生血管数 (相関係数, 0.511)の順に順相関の関係を認めた. すなわちMT1-MMP, MMP-2および新生血管数の3つの因子の間には互いに比較的強い順相関の関係が認められたのに対して, TIMP2と他の因子の間における相関は比較的弱かった (図5).

考 察

良性腫瘍は周囲正常組織を圧迫しつつ発育する. これに対し癌はその旺盛な増殖力で増大しつつ周囲組織を破壊し, 浸潤してさらには転移する. 癌の早期診断早期治療が可能になった現在でも転移した癌に対する治療は極めて困難である. また, 再発した癌は初期治療時に比べさらに高い浸潤転移能を有していることが多く, この時点での根治的な治療はさらに困難となる.

このような浸潤転移能, 再発性を含めた癌の悪性度を評価する指標の確立が求められる中, 近年注目を浴びているのがMMP¹⁾⁻³⁾であり, 血管新生度¹⁶⁾¹⁷⁾である.

本研究では最初に近年浸潤転移能との相関が報告されているIV型コラゲナーゼの一種であるMMP-2の発現レベルが果たして舌癌についても相関するか否かについて検討を加えた.

まず, 舌癌症例の新鮮標本を用いて, ゼラチンザイモグラフィ法による潜在型MMP-2と活性化型MMP-2との酵素活性についての検討をおこなった. この結果, 潜在型MMP-2は対象とした舌癌症例全例の原発巣組織, 正常組織, 転移性リンパ節組織, 及び非転移性リンパ節組織に認められたのに対し, 活性化型MMP-2は原発腫瘍組織と転移性リンパ節組織においてのみ認められた. すなわち活性化型MMP-2は癌組織に特異的であり, これは舌癌の悪性病変においてMMP-2の活性化因子が作用していることを示唆する結果であった. MT1-MMPはMMP-2を活性化するとされている²¹⁾⁸⁾²⁶⁾²⁷⁾. そこで次にノーザンプロット法によるMT1-MMP mRNAの発現を検討したところ, 原発腫瘍組織及び転移性リンパ節組織ではMT1-MMP mRNAの発現が認められたのに対し, 正常組織及び非転移性リンパ節組織においてはその発現は検出されなかった.

次に免疫組織染色法によりパラフィン包埋の組織切片におけるMT1-MMP, MMP-2及びTIMP-2の各タンパクの発現につき検討を加えた.

まず, MT1-MMPとMMP-2とは舌癌の原発巣と転移性リンパ節の腫瘍細胞においてその発現を認めた. 1標本における発現の程度についてみると癌細胞巢の正常組織への浸潤先進部や高分化型扁平上皮癌におけるケラチン真珠の角化直前の表層にあたる細胞でその発現が特に強く現れていた. このことは同一癌組織内においてもMT1-MMPとMMP-2とはその働きを必要とする作用点に局在して機能しているものと考えられる. MT1-MMPは組織の再構築と関連してその発現が上昇することが指摘されており¹³⁾⁻¹⁵⁾ MMP-2の発現の上昇も考えあわせると浸潤先進部や角化直前においては細胞外マトリックスの破壊と細胞内の急激な再構築が行われていることが示唆される.

MT1-MMPとMMP-2の発現量の違いは病理組織学的には同類に分類される症例群内においても認められた. すなわち病理

組織学的には同じ高分化型扁平上皮癌と診断される症例群であってもMT1-MMPやMMP-2の発現が高度な例から、全く認めない例まで、それらの発現レベルは不均一であった。

そこで病理組織学的には分類し得ない悪性度の差がMT1-MMPやMMP-2等の発現量の差により判別可能か否かにつき免疫組織染色結果の検討を行った。

51症例の初期の舌癌の免疫組織染色標本につきレトロスペクティブに統計学的検索を行ったところ、MMP-2、MT1-MMPの発現は初発時のリンパ節転移の有無や、初期治療後の局所再発、所属リンパ節における再発または遠隔転移による再発の有無、さらに予後について有意に相関していた。また、MT1-MMPとMMP-2とのタンパク発現量の間には強い順相関の関係を確認した。

現在まで肺癌、胃癌、大腸癌、前立腺癌、乳癌そして頭頸部悪性腫瘍についてMMP-2とMT1-MMPの発現と腫瘍の浸潤能や転移能についての相関性が多く論じられてきているが^{1)2)5)13)26)28)~30)}、これらは標本採取時の1時点についての報告であり、各症例についての経過、再発との関連性を検討した報告はない。

本研究の結果は将来的に舌癌の初期病変の生検時、もしくは初回切除時の標本についてのMMP-2とMT1-MMPによる免疫組織染色が、その後の癌の進行と経過を予測するにあたっての指標の一つになる可能性を示唆する。ただしこの免疫組織染色で注意すべき点はMMP-2の発現は活性化型と潜在型の両MMP-2のタンパクを検出していることである。今後の症例の検討の際にはゼラチンザイモグラフィによる活性化型MMP-2の評価が望ましいが、この方法は新鮮材料を必要とするという欠点がある。今回の免疫組織染色結果の検討よりMT1-MMPタンパクの発現を評価することにより、活性化型MMP-2の存在が推測可能であることが判明した。

今回病理学的に比較的予後良好と予測される1症例の新鮮標本につき、ノーザンブロットング法、ゼラチンザイモグラフィ法、及びパラフィン切片による免疫組織染色法による検討を行った。この結果、前述の如くMT1-mRNAの発現と活性化型MMP-2の発現は他の症例の腫瘍組織に比較して微弱であり、また免疫組織染色の結果もこれに矛盾しなかった。以上の結果からもこの症例における再発の可能性は低く、また予後は良好であると予想される。

前述の如くMT1-MMPとMMP-2とのタンパク発現量の間には強い順相関性を認めた。Satoら²⁷⁾はMT1-MMPはMMP-2を活性化するのみでなく、MMP-2の細胞膜への接着を促すこと、MMP-2が完全に活性化されるためには細胞膜におけるMMP-2の一定以上の濃度の上昇が必要であることを報告している。今回の結果はMT1-MMPがMMP-2を活性化する因子であることを裏付けるとともに、MT1-MMPとMMP-2とが腫瘍内で同期して増加することを示しており、活性化されたMMP-2がMT1-MMPに対して正のフィードバックをかけている可能性を示唆している。

さらに免疫組織染色を行った110標本を病理診断結果から良性群と悪性群とに大別し、MMP-2、MT1-MMPの発現の相違の有無を検討したところ、各タンパクのいずれについても悪性群で有意にその発現が高かった。今回用いた良性病変としての標本とは悪性腫瘍との鑑別が困難な良性潰瘍や異型性病変、舌癌患者の経過観察中の生検病変の標本であったため、炎症をは

じめとした組織の破壊、修復が組織上で認められた。MMP-2やMT1-MMPは生体における炎症や分化発育や退縮の際の組織の破壊と修復過程の場においてもその発現が上昇する¹¹⁾¹²⁾。本検討の結果は今回のノーザンブロットング法とザイモグラフィ法との結果を裏付けるとともに悪性病変上で起こるMMP-2、MT1-MMPの発現の上昇は良性病変での変化に比して明らかに大きいことを示している。すなわち、病理組織学的検査とともにMMP-2、MT1-MMPについての免疫組織検査を施行することにより、良性、悪性の補助診断が可能と考えられる。

なお、Yoshizakiら¹³⁾は分化度の高い頭頸部悪性腫瘍にMMP-2やMT1-MMPの発現が強いとの結果を報告しているが、今回の検索においては病理組織学的な分化度の違いと各タンパクの発現量との間に有意差は認められなかった。この理由としては今回の研究ではその対象を舌癌症例のみにしぼったこと、高分化型扁平上皮癌の全体に占める割合が(72.5%)中分化型、低分化型のそれに比して高かったことが考えられる。

TIMP-2は本来活性化型MMP-2の阻害因子である。しかし少量のTIMP-2はMT1-MMPによるMMP-2の活性化を促進することが見出され、MT1-MMP-TIMP-2複合体と結合したMMP-2をMT1-MMPが活性化するというモデルが提唱されている³¹⁾³²⁾。本研究においても癌組織において軽度のTIMP-2の発現が認められ、そのモデルを支持する結果が得られた。

組織の再構築を伴う血管新生はMMPやマトリックスセリンプロテアーゼ(matrix serineproteinase)との相関が報告されている。そしてさらに血管新生が各種の癌細胞において浸潤転移能、悪性度と相関することが知られているため¹⁶⁾¹⁷⁾、今回微小血管の新生度についても免疫組織染色法による検討を加えた。その結果、血管新生は発症時のリンパ節転移の有無や再発時の遠隔転移の有無、そして予後に有意に相関していた。さらにMMP-2やMT1-MMPタンパクの発現量との相関性について検討したところ、微小血管数はMMP-2とは強い順相関を、MT1-MMPとは弱い順相関を示していた。微小血管の新生に伴う組織の再構築に際し、MMP-2、MT1-MMPの関与が示唆された。

最後に乳癌培養細胞においてビメンチンの発現の上昇と浸潤転移能の増加との相関が報告されているが^{20)~22)}、本研究においては舌原発性の扁平上皮癌におけるビメンチンの発現は認められなかった。ビメンチンは中間径フィラメントの1種であり、間葉系細胞の特異的マーカーである。MMP-2、MT1-MMPは本来間葉系細胞で発現するとされている^{18)~21)}。乳癌細胞では悪性度が増加する過程で間葉系細胞としての性質を発現するようになるとする報告がある¹⁸⁾²²⁾。本研究において舌癌症例の腫瘍組織にビメンチンの発現を認めなかった原因としては、乳癌は腺癌であるのに対し、舌癌は扁平上皮癌であること、本研究では臨床材料を用いたことなどが挙げられる。

結 論

原発性舌癌55症例及び良性舌病変症例3症例を対象にMMP-2、MT1-MMP、TIMP-2、ビメンチンの発現及び血管新生度を検討し、以下の結果を得た。

1. ゼラチンザイモグラフィ法により潜在型MMP-2の酵素活性は、舌癌原発巣組織、正常組織、転移性リンパ節組織および非転移性リンパ節の全ての組織で認められた。これに対し、活性化型MMP-2の酵素活性は癌の原発巣組織及び転移性リンパ節組織のみで認められた。

2. ノーザンプロット法により舌癌原発巣組織及び転移性リンパ節組織において、MT1-MMP mRNAの過剰発現が認められた。

3. 免疫組織染色法による検討の結果、MMP-2、MT1-MMP、TIMP-2の各タンパクは主として癌細胞に局在していた。ビメンチンの舌癌腫瘍細胞での発現は認められなかった。

4. 免疫組織染色におけるMMP-2又はMT1-MMPのタンパクの発現陽性群、及び血管新生が高度な群で有意に予後不良であり、また初発時の所属リンパ節転移の陽性例が有意に多かった。また、MMP-2やMT1-MMPの陽性群で初期治療後の局所再発例、所属リンパ節再発例、または遠隔転移での再発例が有意に多かった。

5. 免疫組織染色の結果からMT1-MMPとMMP-2の両タンパクの発現量は強い順相関を示すことが確認された。また、微小血管数もMMP-2やMT1-MMPのタンパク発現量と順相関を示した。

6. 免疫組織染色結果において、悪性病変におけるMMP-2、MT1-MMP及びTIMP-2のタンパクの発現量は良性病変のそれに比して有意に多かった。

7. MMP-2およびMT1-MMPタンパクに対する免疫組織染色は、舌癌の悪性度を評価する上で、大変有用であることが示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました恩師古川仰教授に深甚なる謝意を捧げます。また終始直接の御指導を賜りました吉崎智一博士ならびに金沢大学がん研究所ウイルス部佐藤博士に深く感謝致しますとともに、貴重なる標本を提供して下さいました富山県立中央病院臨床病理科三輪淳夫部長、同病院耳鼻咽喉科北川和久部長に感謝の意を表します。さらに本研究の遂行に際し多大なる御協力と御助言を頂きました耳鼻咽喉科学教室のならびに金沢大学がん研究所ウイルス部の皆様

文 献

- 1) Kusakawa J, Sasaguri Y, Shima I, Kameyama T, Morimatsu M. Expression of metalloproteinase-2 related to lymph node metastasis of oral squamous cell carcinoma. *Anatomic Pathology* 99: 18-23, 1993
- 2) Nomura H, Sato H, Seiki M, Mai M, Okada Y. Expression of membrane-type matrix metalloproteinase in human gastric carcinomas. *Cancer Res* 55: 3263-3266, 1995
- 3) Kawamata H, Kameyama S, Kawai K, Tanaka Y, Nan L, Barch DH, Stevenson WGS, Oyasu R. Marked acceleration of the metastatic phenotype of a rat bladder carcinoma cell line by the expression of human gelatinase. *Int J Cancer* 63: 568-573, 1995
- 4) Liotta LA, Stevenson SMWG. Tumor invasion and metastasis. An imbalance of positive and negative regulation. *Cancer Res* 51: 5054-5059, 1991
- 5) Liabakk NB, Talbot I, Smith RA, Wilkinson K, Balkwill F. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) type IV collagenases in colorectal cancer. *Cancer Res* 56: 190-196, 1996
- 6) Davis B, Miles DW, Happerfield LC, Naylor MS, Bobrow LG, Rubens RD, Balkwill F. Activity of type IV collagenases in benign and malignant breast disease. *Br J Cancer* 67: 1126-1131, 1993

- 7) Davies B, Waxman J, Wasan H, Abel P, William G, Krausz T, Nezl D, Thomas D, Hanby A, Balkwill F. Levels of matrix metalloproteinases in bladder cancer correlate with tumor grade and invasion. *Cancer Res* 53: 5365-5369, 1993
- 8) Naylor MS, Stamp GW, Davies BD, Balkwill FR. Expression and activity of MMPs and their regulators in ovarian cancer. *Int J Cancer* 58: 50-56, 1994
- 9) Hamdy FC, Fadlon EJ, Cottam D, Laury J, Thurrell W, Silcocks PB, Anderson JB, Williams JL, Rees RC. Matrix metalloproteinase 9 expression in primary human prostatic adenocarcinoma and benign prostatic hyperplasia. *Br J Cancer* 69: 177-182, 1994
- 10) Sato H, Takino T, Okada Y, Cao J, Shinagawa A, Yamamoto E, Seiki M. A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumor cells. *Nature* 370: 61-65, 1994
- 11) 岡田保典. マトリックスメタロプロテアーゼと炎症. *細胞培養* 19: 386-390, 1993
- 12) Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable lesions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 94: 2493-2503, 1994
- 13) Yoshizaki T, Sato H, Maruyama Y, Muroso S, Furukawa M, Park CS, Seiki M. Increased expression of membrane type 1-matrix metalloproteinase in head and neck carcinoma. *Cancer* 79: 139-144, 1997
- 14) Ohtani H, Motohashi H, Sato H, Seiki M, Nagura H. Dual over-expression pattern of membrane-type metalloproteinase-1 in cancer and stromal cells in human gastrointestinal carcinoma revealed by in situ hybridization and immunoelectron microscopy. *Int J Cancer* 68: 565-570, 1996
- 15) Okada A, Bellocq JP, Rouyer N, Chenard MP, Rio MC, Chambon P. Membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP) gene is expressed in stromal cells of human colon, breast, and head and neck carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 2730-2734, 1995
- 16) Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis. *N Engl J Med* 324: 1-8, 1991
- 17) Srivastava A, Laidler P, Hughes LE, Woodcock J, Shedden EJ. Neovascularization in human cutaneous melanoma. *Eur J Cancer & Clin Oncol* 22: 1205-1209, 1986
- 18) Pulyaeva H, Bueno J, Polette P, Birembaut P, Sato H, Seiki M, Thompson EW. MT1-MMP correlates with MMP-2 activation potential seen after epithelial to mesenchymal transition in human breast carcinoma cells. *Clin Exp Metastasis* 15: 111-120, 1997
- 19) Poulsam R, Pignatelli M, Stevenson WGS, Liotta LA, Wright PA, Jeffery RE, Longcroft JM, Rogers L, Stamp GWH. Stromal expression of 72kDa type IV collagenase (MMP-2) and TIMP-2 mRNAs in colorectal neoplasia. *Am J Pathol* 141: 389-396, 1992
- 20) Thompson EW, Paik S, Brunner N, Sommers CL, Zugmaier G, Clarke R, Shima TB, Torri J, Donahue S, Lippman ME, Martin GR, Dickson RB. Association of increased basement membrane invasiveness with absence of estrogen receptor and expression of

vimentin in human breast cancer cell lines. *J Cell Physiol* 150: 534-544, 1992

- 21) Thompson EW, Yu M, Bueno J, Jin L, Maiti SN, Palan-Marco FL, Pulyeava H, Tamborlane JW, Tirgari R, Wapnir I, Azzam H. Collagen induced MMP-2 activation in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 31: 357-370, 1994
- 22) Azzam HS, Arand G, Lippman ME, Thompson EW. Association of MMP-2 activation potential with metastatic progression in human breast cancer cell lines independent of MMP-2 production. *J Natl Cancer Inst* 85: 1758-1764, 1993
- 23) Heussen C, Dowdle EB. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyamide gels containing sodium dodecyl sulphate and copolymerised substrates. *Anal Biochem* 102: 196-202, 1980
- 24) Hsu SM, Raine L, Fangen H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immuno peroxidase technique: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedure. *J Histochem Cytochem* 29: 577-580, 1987
- 25) Reed JA, Manaham LJ, Park CS, Brigati DJ. Complete one-hour immunocyto-chemistry based on capillary action. *Biotechniques* 13: 434-443, 1992
- 26) Tokuraku M, Sato H, Murakami S, Okada Y, Watanabe Y, Seiki M. Activation of precursor of gelatinase A / 72kDa type IV collagenase / MMP-2 in lung carcinomas correlates with the expression of membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP) and with lymph node metastasis. *Int J Cancer* 64: 355-359, 1995
- 27) Sato H, Takino T, Kinoshita T, Imai K, Okada Y, Stavenson WGS, Seiki M. Cell surface binding and activation of gelatinase A induced by expression of membrane-type-1-matrix metalloproteinase (MT-MMP). *FEBS Lett* 385: 238-240, 1996
- 28) Emmert-Buck MR, Roth MJ, Zhuanq BF, Liotta LA, Stevenson WGS. Increased gelatinase A (MMP-2) and cathepsin B activity in invasive tumor lesions of human colon cancer samples. *Am J Pathol* 145: 1285-1290, 1994
- 29) 河田 了, 四ノ宮隆, 安田範夫, 竹中 洋, 村上 泰. 頭頸部扁平上皮癌組織のMatrix metalloproteinase (MMP)-2濃度とその臨床的意義. *日耳鼻* 99: 299-305, 1996
- 30) Pulyaeva H, Bueno J, Polette P, Birembaut P, Sato H, Seiki M, Thompson EW. MT1-MMP correlates with MMP-2 activation potential seen after epithelial to mesenchymal transition in human breast carcinoma cells. *Clin Exp Metastasis* 15: 111-120, 1997,
- 31) Imai K, Ohuchi E, Aoki T, Nomura H, Fujii Y, Sato H, Seiki H, Okada Y. Membrane-type matrix metalloproteinase 1 is a gelatinolytic enzyme and is secreted in a complex with tissue inhibitor of metalloproteinase 2. *Cancer Res* 56: 2707-2710, 1996
- 32) Ohuchi E, Imai K, Fujii Y, Sato H, Seiki M, Okada Y. Membrane type 1 matrix metallo proteinase digests interstitial collagens and other extra cellular matrix macromolecules. *J Biol Chem* 272: 2446-2451, 1997

Analysis About the Indicator to Predict Prognosis of Tongue Squamous Cell Carcinoma Yumiko Maruyama, Department of Otorhinolaryngology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — *J. Juzen Med Soc.*, 107, 64 — 73 (1998)

Key words membrane-type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP), matrix metalloproteinase 2 (MMP-2), carcinoma of tongue, recurrence, prognosis

Abstract

The present study was performed to search for the factors which indicate the prognosis of tongue carcinoma. The expression of matrix metalloproteinase 2 (MMP2), membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP), tissue inhibitor of metalloproteinase 2 (TIMP2), vimentin, and microvessel was investigated in squamous cell carcinoma (SCC) of the tongue. An active form of MMP2 was detected in seven of seven tongue SCC samples and two of two metastatic lymph nodes whereas it was not detected in either normal tissue or inflammatory lymph nodes by gelatin zymography. Increased expression of MT1-MMP mRNA was also detected in six of six tongue SCC and one of one metastatic lymph node but was detected in neither normal tissue nor inflammatory lymph nodes by Northern blot analysis. By immunohistochemical staining, the protein expression of MMP2, MT1-MMP, TIMP2 on tongue SCC was significantly higher in the malignant group than in benign ones. The expression level of MMP2, MT1-MMP, and the number of microvessels independently correlated with lymph-node metastasis and a poor outcome. Moreover, the expression of MMP2 and MT1-MMP also correlated with locoregional, distant metastatic recurrence. There was no correlation between expression of vimentin and any clinical factors. These results suggest that MMP2 and MT1-MMP are useful parameters for predicting prognosis of tongue SCC patients.