

Membrane-Type Matrix Metalloproteinase-1 (MT-MMP-1) Expression and Activation of Gelatinase A as Prognostic Markers in Advanced Neuroblastoma

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/2297/9361

神経芽細胞腫における膜型マトリックスメタロプロテアーゼ-1 (MT-MMP-1) の発現とゼラチナーゼA活性化の検討

金沢大学医学部小児科学講座 (主任: 小泉晶一教授)

榊原方枝

神経芽細胞腫は最も頻度の高い小児悪性固形腫瘍で、腫瘍細胞の分化度や発症年齢によって予後が左右される特異な性質を有する。腫瘍の進行や悪性度に関連するいくつかの予後因子が報告されている。膜型マトリックスメタロプロテアーゼ-1 (membrane-type matrix metalloproteinase-1, MT-MMP-1) は、腫瘍細胞表面に存在するゼラチナーゼA活性化因子として初めて同定された。ゼラチナーゼAは腫瘍細胞表面で酵素特異的に活性化され、基底膜の主要構成成分であるIV型コラーゲンを分解するので、これが癌の浸潤、転移の重要なひきがねとなっていると考えられている。本研究は30例の神経芽細胞腫を対象として、MT-MMP-1発現とゼラチナーゼA活性化率が予後因子として重要か否かを検討した。外科切除した30症例の神経芽細胞腫を分析した。潜在型ゼラチナーゼA (68kDa) と活性型ゼラチナーゼA (62kDa) の酵素活性はゼラチンザイモグラフィ法で測定した。MT-MMP-1発現はモノクローナル抗体を用いた免疫染色法で評価した。30例全てにゼラチナーゼA活性が認められたが、ゼラチナーゼA活性化率62 kDa/ (62 kDa+68 kDa) はMT-MMP-1高発現、進行病期、血清神経特異エノラーゼ (neuron specific enolase, NSE) 高値の症例において有意に高値であった。多変量解析では有意差に達しなかったもの ($p=0.0557$)、ゼラチナーゼA活性化率はMT-MMP-1発現量と強く相関し、ゼラチナーゼA活性化率が26%以上の場合は神経芽細胞腫において新しい予後不良因子である可能性が示唆された。

Key words membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT-MMP-1), gelatinase A, metastasis, neuroblastoma, prognosis

神経芽細胞腫は最も頻度の高い小児悪性固形腫瘍であるが、腫瘍の臨床病理学的性質と組織の分化度は多岐にわたり、それが生命予後の違いをもたらしている^{1,2)}。一部の症例に腫瘍の自然退縮がみられたり³⁾、発症時年齢が予後に影響するなど臨床的に多様性を示す。I期およびII期で発見された腫瘍は発症年齢にかかわらず比較的予後が良いが⁴⁾、発症年齢が高く診断時にすでに転移のある例は、強力な化学療法や骨髄移植にもかかわらず予後はなお悲観的である⁵⁾。神経芽細胞腫のこのような臨床的多様性を考えると、各症例のリスクに適応した治療を検討することが重要であるが、神経芽細胞腫のこのような臨床的多様性がどのような因子により規定されているかが議論的となっている。これまでにさまざまな臨床病理学的因子が報告されている。組織型^{6,7)}、細胞内DNA量または染色体数⁸⁾、N-myc遺伝子増幅⁹⁾、Ha-ras遺伝子発現¹⁰⁾、Trk-A発現¹¹⁾、細胞表面CD44発現¹²⁾などが報告され予後因子とされている。しかし、これらの因子は技術的な問題などから必ずしも診断時にルーチンでは行なわれ得ない。また強力な予後不良因子とされているN-myc遺伝子増幅は、予後不良症例の約半数にみられるのみとの報告もあり⁸⁻¹⁰⁾、同遺伝子増幅のない症例の的確な予後予測には他の予後因子がさらに必要である。

マトリックスメタロプロテアーゼ (matrix metalloproteinase, MMP) は亜鉛結合型蛋白分解酵素のひとつで、腫瘍細胞周囲の細胞外マトリックス (extracellular matrix, ECM) を分解する。特に基底膜はIV型コラーゲンを骨格とし、生体内で癌の浸潤過程における物理的な障壁となっている。MMPは腫瘍周囲のECMを分解して腫瘍細胞の浸潤、転移を可能にさせることから、MMPは腫瘍拡大の本質を担っていることが最近の研究から明らかになった^{13,14)}。少なくとも今までに11種類のMMPが同定されている¹⁵⁾。MMPはその構造と基質特異性から、コラーゲナーゼ、ゼラチナーゼ、ストロムライシン、それ以外の4つのサブグループに分類されている^{16,17)}。そのなかでゼラチナーゼAはIV型コラーゲナーゼに属し、72kDaゼラチナーゼ、又はMMP-2とも呼ばれる。ゼラチナーゼAは、IV型とV型のコラーゲン、エラスチン、ファイブロンectin、ラミニン、およびゼラチンを基質として分解する¹⁷⁻¹⁹⁾。ゼラチナーゼAが基質とするIV型コラーゲンは基底膜に不可欠な構成成分であり²⁰⁾、またしばしば悪性腫瘍でゼラチナーゼAの過剰発現が指摘されていることから^{21,22)}、ゼラチナーゼAが腫瘍拡大の重要なひきがねとなっているのではないかと考えられてきた。

平成9年11月12日受付, 平成9年12月9日受理

Abbreviations : BSA, bovine serum albumin; FH, favorable histology; GNB, ganglioneuroblastoma; MMP, matrix metalloproteinase; MT-MMP-1, membrane-type matrix metalloproteinase-1; NB, neuroblastoma; NSE, neuron specific enolase; TBS, Tris buffered saline; TIMP-2, tissue inhibitor of metalloproteinase-2; UH, unfavorable histology

他のMMPと同様に、ゼラチナーゼAは酵素活性を持たない潜在型酵素(プロゼラチナーゼA)として分泌されるので、癌細胞が浸潤するためにはプロゼラチナーゼAが活性化される必要がある。プロゼラチナーゼAは悪性腫瘍組織ばかりでなくいくつかの正常組織においてもみとめられるが、活性化型ゼラチナーゼAは癌組織特異的にみられることが知られ、転移能との相関が報告されている。Satoら²⁰⁾は最近プロゼラチナーゼAの特異的活性化物質として、新しい膜型-MMP-1(membrane type-MMP-1, MT-MMP-1)を発見した。MT-MMP-1は他のMMPには存在しない細胞膜貫通ドメインをカルボキシル基末端部に持ち、ゼラチナーゼAを特異的に細胞膜表面で活性化する²⁰⁾。最近の研究からMT-MMP-1の機能はゼラチナーゼAの活性化だけでなく、蛋白融解活性を制御するゼラチナーゼA/メタロプロテアーゼ組織インヒビター2(tissue inhibitor of metalloproteinase-2, TIMP-2)複合体のレセプターにもなっていることがわかってきた²⁴⁾²⁵⁾。MT-MMP-1は肺、腎、胎盤などの、細胞外マトリックスの再構築がさかんな正常組織にも発現がみられるが²⁴⁾²⁶⁾、過剰発現は肺癌²⁷⁾、乳癌²⁸⁾、胃癌²⁹⁾、大腸癌²⁹⁾など癌組織でみられる。これらの癌では、MT-MMP-1の過剰発現はゼラチナーゼA活性化率や腫瘍浸潤度に相関することが報告されている²⁷⁾。これらの事実から、MT-MMP-1/ゼラチナーゼA系は腫瘍の浸潤および転移において中心的な役割を果たしていると考えられ、悪性腫瘍組織においてMT-MMP-1の発現およびゼラチナーゼAの活性化を検索することは予後の判定に重要な意味を持つ。

本研究では、小児期に最も頻度の高い神経芽細胞腫の組織を用いてMT-MMP-1の発現とゼラチナーゼA活性化との相関を検討し、神経芽細胞腫においてMT-MMP-1発現は新しい予後因子となりうるかの評価を試みた。

対象および方法

I. 対 象

1987年5月から1996年8月までに金沢大学医学部小児科学教室および全国の研究協力施設で外科的切除を行った神経芽細胞腫症例のうち、新鮮あるいは凍結組織が保存されている30例を対象とした。男児14例、女児16例であり、発症年齢は1ヵ月から13歳であった。病期分類はEvans分類に従って行ない³⁾、I期2例、II期2例、III期3例、IV期23例であった。各症例の治療は同一のプロトコール(進行神経芽細胞腫研究グループ1990年³⁰⁾)によって行なった。IV期23症例の3年生存率は64.4%で、わが国の主要な小児癌研究グループにおける成績(3年生存率45-72%³⁰⁾³¹⁾)に比し標準的な母集団と考えられた。観察期間は2ヵ月から129ヵ月(中央値44ヵ月)であった。

II. 検体の調整

外科的切除された神経芽細胞腫の組織は-70℃に保存された。活性化型ゼラチナーゼAの陽性コントロール²⁰⁾として金沢大学医学部第一外科学教室において外科的切除された肺癌と正常肺組織を用いた。緩衝液は4℃に保存した。新鮮あるいは、凍結組織(20-50mg)を10μl/mgの緩衝液[10mM Tris-HCl(和光純薬工業, 大阪), 20%グリセリン(和光純薬工業), 2% SDS(和光純薬工業), pH6.8]でホモジナイズし12000回転で5分間遠心した。上清の蛋白量をブラッドフォード測定キット(大塚, 東京)で測定し-70℃に保存した。蛋白量は2μg/μlから5μg/μlであった。

III. ゼラチンゼイモグラフィ

ゼラチンゼイモグラフィは、酵素活性をポリアクリルアミドゲル電気泳動後のゲル中でのゼラチン分解能により検出する方法であり、ゼラチナーゼの検出に優れている。本実験ではHeussenら³²⁾の方法に準じて行なった。ゼラチン(Difco, Detroit, USA)1mg/mlを含む10%ポリアクリルアミドゲル(横90mm, 縦80mm, 厚さ1mm)を、ラビダス二連ミニスラブゲル作成キット(アトー, 東京)を用いて作成した。検体(蛋白量20μg)を37℃で20分間静置した後、ラビダス二連ミニスラブ電気泳動装置(アトー), およびサーモスタットサーキュレーター(precision thermostatic circulator AB1600, アトー)を用いて4℃で電気泳動した。ゲルを洗浄用緩衝液50mM Tris-HCl(和光純薬工業), 1μM ZnCl₂(和光純薬工業), 10mM CaCl₂(和光純薬工業), 2.5%トリトン-X100(和光純薬工業), 0.02%アジ化ナトリウム(NaN₃, 和光純薬工業), pH7.6で30分間室温で2回洗浄した。さらに反応液50mM Tris-HCl(和光純薬工業), 0.15M NaCl(和光純薬工業), 10mM CaCl₂(和光純薬工業), 0.02%アジ化ナトリウム(NaN₃, 和光純薬工業), pH7.6中に37℃で一晩反応させた。反応後、ゲルを0.1%コーマスプリリアントブルー R250(Fluka, Buchs, Switzerland)にて室温で2時間染色した後、30%エタノール, 10%酢酸で脱色しゼラチン分解パターンを観察した。潜在型および活性化型ゼラチナーゼAは、それぞれ68kDaおよび62kDaのバンドとして現われた。各バンドのゼラチン分解能をバイオプロフィール(Vilber Lourmat, Marne-La-Valee Cedex, France)を用いて画像解析し、それぞれの輝度を定量化した。ゲルの背景の輝度を0と設定した場合の各バンドの輝度をゼラチナーゼA活性の値とした。総ゼラチナーゼA(68kDa+62kDa)に対する活性化型ゼラチナーゼAの比62kDa/(68kDa+62kDa)をゼラチナーゼA活性化率として算出した。MMP阻害剤によるMT-MMP-1活性の阻害を見る

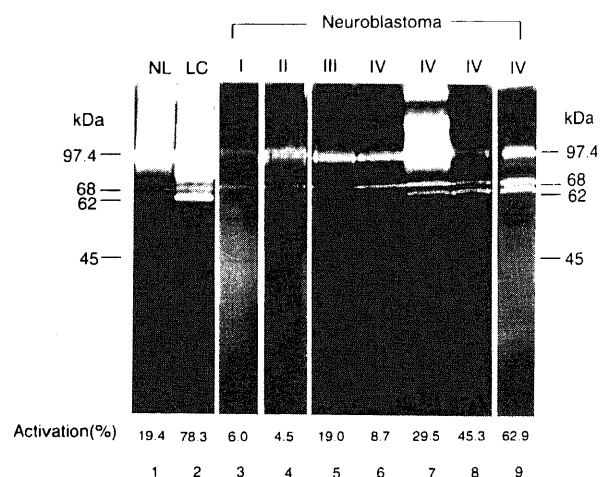


Fig. 1. Representative gelatin zymography of the samples including stage I to IV (lanes 3-9) neuroblastomas, normal lung tissue (lane 1), and lung carcinoma (lane 2) as a positive control. Pro-gelatinase A (68 kDa) and the activated form (62 kDa) are indicated by arrows. Gels were traced by a densitometer and the relative ratio of the bands 62 kDa / (68 kDa + 62 kDa) was calculated and is given as the gelatinase A activation ratio (%). The gelatinase A activation ratios are shown at the bottom of the figure.

場合には、反応液に2.5mMの1,10-フェナントロリン (1,10-phenanthroline, 和光純薬工業)を加えて反応させた後、同様に染色して観察した。

IV. 免疫組織染色法

1. 材料

外科切除された組織はTissue-Tek O.C.T.compound (Miles, Elkhart, USA)内に包埋し-70℃で保存した。各ブロックをクリオスタット (Tissue Tek II cryostat, Miles)を用い6μmの厚さに薄切し、0.02%ポリ-L-リジンコーティングスライドグラス (和光純薬工業)に付着させ凍結切片を作成した。

2. 免疫組織染色

免疫染色はアビジンビオチンアルカリフォスファターゼ (avidin-biotin-alkaline phosphatase, AB-AP)法で染色する方法をとった。使用した各抗体の希釈と洗浄は、牛血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA, Sigma, St.Louis, USA) 0.1%加トリス塩酸緩衝液 (Tris buffered saline, TBS, pH7.6)にて行い、反応は湿潤箱中で乾燥を防止して行った。凍結切片をアセトン (和光純薬工業)で10分間固定後ドライヤーにて数分間風乾した。4%正常ウサギ免疫グロブリン (normal rabbit immunoglobulin fraction, DAKO, Glostrup, Denmark)で非特異反応のブロックを室温で20分間行なった。1次抗体として抗MT-MMP-1モノクローナル抗体 (113-5B7²⁰) (金沢大がん研, 佐

藤博博士より恵与) 5μg/mlを含むTBS-BSAと4℃, 18時間反応させた。TBS-BSAにて5分間3回洗浄後, 200倍希釈したビオチン標識ウサギ抗マウスIgG抗体 (DAKO)と30分間反応させた。TBS-BSAにて3回洗浄後, 200倍希釈したストレプトアビジン化アルカリフォスファターゼ (DAKO)と30分間反応させた後, アルカリフォスファターゼ発色試薬 (Fast-red-TR SALT, Sigma)を用いて赤色に発色させた。その際基質溶液中には1mMレバミゾール (Sigma)を加え, 内因性アルカリフォスファターゼ活性を阻止した。核染色はカラッチヘマトキシリン (武藤化学薬品, 東京)で行った。免疫染色陽性は神経芽細胞腫細胞内および表面が淡紅色に染まった。染色の強度により, 背景と区別できない程度を陰性 (-), 背景に比し淡紅色に染まっているのが区別できる程度を弱陽性 (1+), ほとんどの細胞で淡紅色に染まっているのがはっきりわかる程度を強陽性 (2+)と評価した。染色強度の評価は, 公正を規するためほかの臨床データを隠して, 2人で行った。

V. 臨床病理学的因子

臨床病理学的因子として, 病期, N-myc遺伝子増幅, 血清神経特異エノラーゼ (neuron specific enolase, NSE)値, 組織型, および発症年齢を選択した。N-myc遺伝子増幅はサザンブロット法を用いて分析した。血清NSE値はラジオイムノアッセイ法を用いて分析した。組織型は凍結切片にHE染色を行い,

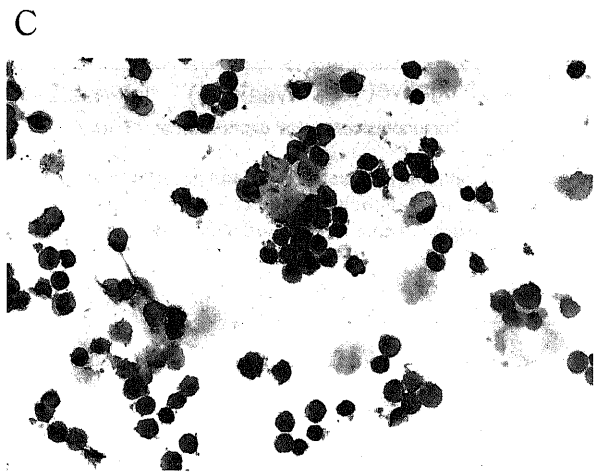
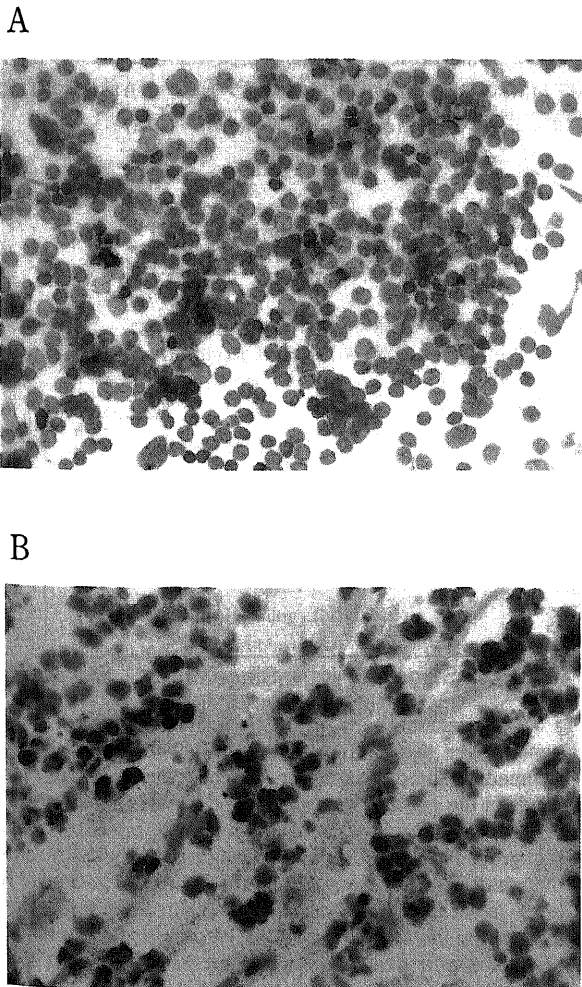


Fig. 2. Immunohistochemical expression of MT-MMP-1 in neuroblastomas. Expression of MT-MMP-1 is identified as a red deposit on the cell surface. The intensity of MT-MMP-1 expression was classified into one of three categories, negative (-) (A), weak (1+) (B), and intense (2+) (C).

Shimada分類⁹⁾に従って腫瘍細胞の分化度を評価した。

VI. 統計処理法

得られた値はすべて平均値±標準偏差で表した。平均値の有意差検定にはWelchのt検定を用いた。各臨床病理学的因子とゼラチナーゼA活性化率との相関はFisherの直接確率法³⁹⁾を用いて分析した。ゼラチナーゼA活性化率と免疫染色強度との相関はSpearmanの順位相関係数で表した。生存率はKaplan-Meier法³⁴⁾³⁵⁾にて算出し、その有意差検定はLogrank法³⁶⁾にて行った。また、生存率への関与度についての多変量解析にはCox比例ハザードモデル³⁹⁾を用いた。いずれも危険率が5%未満の場合($p < 0.05$)を統計的に有意差ありと判定した。

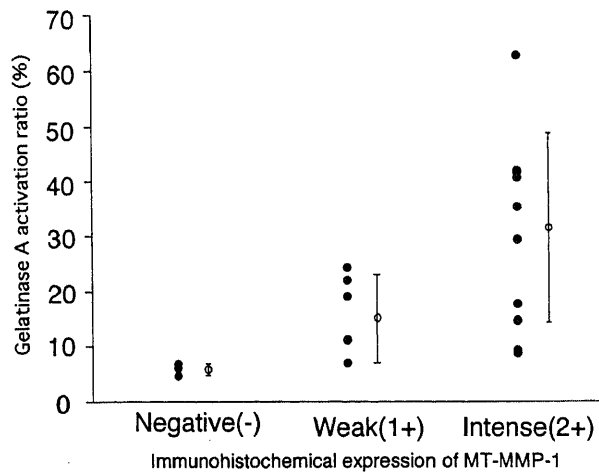


Fig. 3. Correlation between the gelatinase A activation ratio and the immunohistochemical expression of MT-MMP-1. Correlation coefficient, $r = 0.70$; $p < 0.005$.

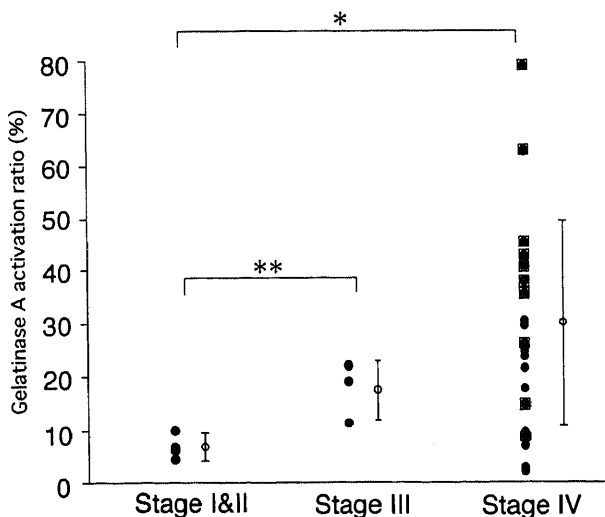


Fig. 4. Correlation between the gelatinase A activation ratio and tumor stages. The gelatinase A activation ratio in each of tumor samples was plotted and $\bar{x} \pm SD$ are indicated in the figure. * $p < 0.001$; ** $p = 0.016$. Patients who are alive and dead are indicated as (●) and (■), respectively.

成 績

I. 神経芽細胞腫における活性型ゼラチナーゼAの発現

ゼラチンゼイモグラフィ法で、潜在型および活性型ゼラチナーゼA活性はそれぞれ68kDaと62kDaのバンドとして検出された。ゼラチナーゼA活性の陽性コントロールには正常肺組織および肺癌組織を用いた²⁷⁾。68kDaと62kDaにおける活性は、反応緩衝液に1,10-フェナントロリンを2.5mM加えると完全に阻害された。1,10-フェナントロリンは亜鉛キレート剤で、既知のMMP阻害剤である。以上より68kDaと62kDaに検出された酵素活性は、分子量と、活性が1,10-フェナントロリンによって阻害されることからゼラチナーゼAと確認した。97.4kDaにみられる酵素活性はゼラチナーゼBと一致した¹⁷⁻¹⁹⁾(図1)。

II. MT-MMP-1発現とゼラチナーゼA活性化率の相関

1. MT-MMP-1の発現

腫瘍細胞上のMT-MMP-1発現をモノクローナル抗体113-5B7を用いた免疫組織染色で証明した。30検体中、19検体で免疫組織染色が可能だった。19検体中16検体でMT-MMP-1の発現が認められた。染色の強度を、陰性(-)、弱陽性(1+)、強陽性(2+)の3段階に分類した(図2A, B, C)。

2. MT-MMP-1の発現とゼラチナーゼA活性化

MT-MMP-1の染色強度とゼラチナーゼA活性化率の相関について、Spearmanの順位相関係数を用いて解析した。MT-MMP-1の染色強度とゼラチナーゼA活性化率の間には有意な相関関係が認められた(順位相関係数=0.70, $n = 19$, $p < 0.005$)。このことからMT-MMP-1は神経芽細胞腫の腫瘍細胞上に存在し、MT-MMP-1発現量は腫瘍組織中のゼラチナーゼA活性化率に比例することが確認できた(図3)。

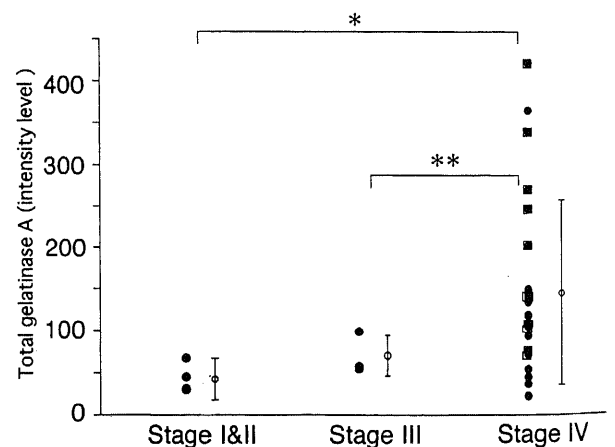


Fig. 5. Correlation between the total gelatinase A levels and tumor stages. Gels were set on the white light table, and were scanned by the densitometer. Intensity levels of the clear bands in the gel were quantitated and served as gelatinase A levels. Intensity level zero indicated the intensity of the background of the gel. Level -100 indicated the intensity when the white light table was turned off. The total gelatinase A levels in each of tumor samples were plotted and $\bar{x} \pm SD$ are indicated in the figure. * $p < 0.001$; ** $p = 0.011$. Patients who are alive and dead are indicated as (●) and (■), respectively.

Ⅲ. 神経芽細胞腫の病期とゼラチナーゼA活性の相関

1. 病期とゼラチナーゼA活性化率

30症例のゼラチナーゼA活性化率は2.2%から78.9%であった。病期分類別にみると、Ⅳ期におけるゼラチナーゼA活性化

率は29.9%±19.0% (平均±標準偏差) で、Ⅰ期およびⅡ期におけるゼラチナーゼA活性化率(6.8%±2.2%)より有意に高かった(p<0.001)。Ⅲ期におけるゼラチナーゼA活性化率は17.4%±5.6%で、Ⅰ期およびⅡ期に比し有意に高かった(p=

Table 1. Correlation between the higher gelatinase A activation ratio and other prognostic factors

Variable	No. of patients	No. of patients		Fisher's exact test p
		Gelatinase A activation ratio (%)		
		Low (≤26)	High (>26)	
Clinical stage				
Ⅳ	23	11	12	0.024
Ⅰ, Ⅱ, Ⅲ	7	7	0	
N-myc gene				
Amplified	6	1	5	0.063
Not amplified	23	15	8	
Serum NSE levels				
>50 ng/ml	13	6	7	0.034
≤50 ng/ml	11	10	1	
Histology (NB/GNB)				
Neuroblastoma	23	12	11	0.19
Ganglioneuroblastoma	7	6	1	
Histology (UH/FH)				
Unfavorable histology	12	6	6	0.087
Favorable histology	9	8	1	
Age at diagnosis				
≥12 months	22	12	10	0.42
<12 months	8	6	2	

FH, favorable histology ; UH, unfavorable histology ; NSE, neuron specific enolase.

Table 2. Univariate analysis of survival according to clinical and biologic variables in 29 patients with neuroblastoma

Variable	% survival of 5 years	Logrank	P
Gelatinase A activation ratio		10.9	0.0009
>26%	21.2		
≤26%	92.9		
N-myc gene		1.58	0.21
Amplified	46.0		
Not amplified	63.1		
Serum NSE levels		0.27	0.60
>50 ng/ml	56.6		
≤50 ng/ml	80.0		
Tumor Histology (NB/GNB)		3.96	0.047
Neuroblastoma	46.0		
Ganglioneuroblastoma	100		
Tumor Histology (UH/FH)		NA	
Unfavorable histology	38.5		
Favorable histology	100		
Tumor stage		NA	
Ⅳ	52.0		
Ⅰ-Ⅲ	100		
Age at diagnosis		NA	
≥12 months	53.9		
<12 months	100		

NA, not assesable.

0.016, 図4).

ゼラチナーゼA活性化率と生存期間の相関をみるために、臨床予後因子として有意なゼラチナーゼA活性化率の上昇は何%以上かをすることを試みた。ゼラチナーゼA活性化率の分割点を26%で設定し、手術関連死の1例を除いた29症例を、ゼラチナーゼA活性化率26%以下の群(低活性化率群)と、ゼラチナーゼA活性化率が26%より高い群(高活性化率群)に分けた。この分割点を用いた場合の感度は80% (死亡例10例中、8例が高活性化率群)、特異度は78.9% (生存例19例中、15例が低活性化率群)であった。陽性反応適中度は66.7% (高活性化率群12例中8例が死亡)、陰性反応適中度は88.2% (低活性化率群17例中15例が生存)、適中精度は79.3% (8+15/29例)で、母集団の実際の死亡率34.5%を上回り、この分割点は統計学的に有意であった。

I期からIII期の7例はすべて低活性化率群であった。IV期は23症例あったが、ゼラチナーゼA活性化率は2.2%から78.9%にわたり、12例が高活性化率群、11例が低活性化率群だった。ゼラチナーゼA活性化率と病期は有意な相関がみられた ($p=0.024$, Fisherの直接確率法)。

2. 病期と総ゼラチナーゼA活性

IV期における総ゼラチナーゼA活性は 147.7 ± 109.7 で、I期およびII期の 43.8 ± 26.2 に比し有意に高かった ($p < 0.001$, 図5)。

IV. ゼラチナーゼA活性化率と臨床病理学的予後因子との関連

ゼラチナーゼA活性化率とN-myc増幅、血清NSE値、組織分類、発症年齢との関連をFisherの直接確率法を用いて分析した(表1)。N-myc増幅はサザンプロット法により30症例中29例で検索が可能であった。N-myc増幅が認められた6症例中5例(83.3%)が高ゼラチナーゼA活性化率を示した。しかし、N-myc増幅が認められない23例中では8例(34.8%)が高ゼラチナーゼA活性化率を示したのみであった。N-myc増幅群はゼラチナーゼA活性化率が高い傾向があったが有意差はなかった

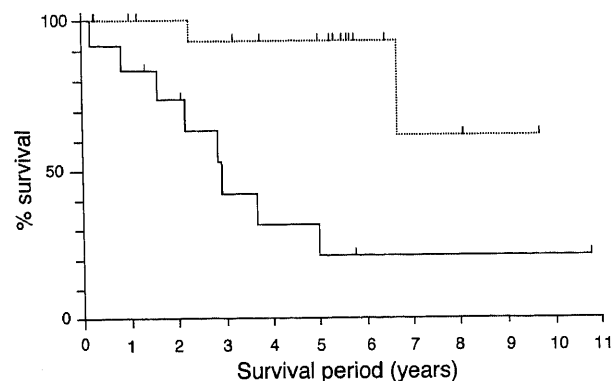


Fig. 6. The Kaplan-Meier overall survival curves for total 29 patients with neuroblastoma according to the gelatinase A activation ratio. —, high activation ratio (> 26%) group; ----, low activation ratio ($\leq 26\%$) group. Tick marks indicate patients who were alive at the time of the last follow-up visit. The patients with the high activation ratio group had significantly poorer outcome than that with the low activation ratio group by the Logrank test ($p=0.0009$).

($p=0.063$).

血清NSE値はラジオイムノアッセイ法を用い24症例で検索が可能であった。NSE値が50ng/mlより高い群を高NSE群、50ng/ml以下を低NSE群とした。高NSE群13例中7例が高ゼラチナーゼA活性化率を示した。低NSE群11例中では1例が高ゼラチナーゼA活性化率を示すのみだった。高NSE群は低NSE群に比し有意にゼラチナーゼA活性化率が高かった ($p=0.034$)。

組織分類は腫瘍細胞の分化度により分類し、23例が神経芽細胞腫(neuroblastoma, NB)、7例が神経節芽細胞腫(ganglioneuroblastoma, GNB)であった。また、Shimada分類⁹⁾による分類では、30症例中21例で検索が可能で、9例が良好群(favorable histology, FH)、12例が不良群(unfavorable histology, UH)であった。組織分類によるゼラチナーゼA活性化率の差はみられなかった。

発症年齢は1ヵ月から13歳で、8例が1歳以下であった。5例(I期1例、II期1例、III期2例、IV期1例)がマスキリング発見例であった。発症年齢によるゼラチナーゼA活性化率の差はなかった。

V. ゼラチナーゼA活性化率と生存率

30症例中10例が神経芽細胞腫で死亡し、1例が手術関連死であった。19例は生存中であった。手術関連死の1例を除いた29例につき、ゼラチナーゼA活性化率の予後因子としての有用性を検討するために、ゼラチナーゼA活性化率による生存率を、既知の予後因子である臨床病期、N-myc増幅、NSE値、組織型、および発症年齢による生存率と比較した(表2)。ゼラチナーゼAの高活性化率群の5年生存率は21.2%で、低活性化率群の92.9%に比し有意に低かった ($p=0.0009$, 図6)。組織型分類ではNB群の5年生存率は46.0%で、GNB群の100%に比し有意に低かった ($p=0.047$)。臨床病期、組織型(UH/FH)、発症年齢による分類でも5年生存率に差がみられたが、母集団が小さいためそれぞれの予後良好群に死亡例がなく、有意差が検定でき

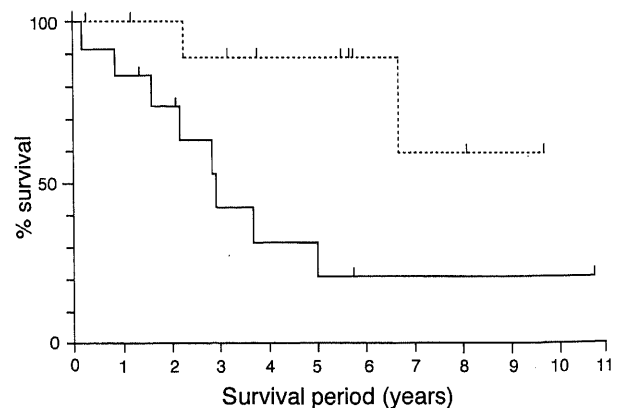


Fig. 7. The Kaplan-Meier overall survival curves for 23 patients with stage IV neuroblastoma according to the gelatinase A activation ratio. —, high activation ratio (> 26%) group; ----, low activation ratio ($\leq 26\%$) group. Tick marks indicate patients who were alive at the time of the last follow-up visit. The high activation ratio group had significantly poorer outcome than the low activation ratio group by the Logrank test ($p=0.0125$).

Table 3. Univariate analysis of survival according to clinical and biologic variables in 23 patients with stage IV neuroblastoma

Variable	% survival of 5 years	Logrank	P
Gelatinase A activation ratio		6.24	0.0125
>26%	21.2		
≤26%	88.9		
N-myc gene		0.017	0.89
Amplified	50.0		
Not amplified	45.7		
Serum NSE levels		0.64	0.42
>50 ng/ml	56.6		
≤50 ng/ml	60.0		
Tumor Histology (NB/GNB)		2.64	0.10
Neuroblastoma	32.4		
Ganglioneuroblastoma	100		
Tumor Histology (UH/FH)		NA	
Unfavorable histology	26.2		
Favorable histology	100		
Age at diagnosis		NA	
≥12 months	48.4		
<12 months	100		

NA, not assessable.

Table 4. Multivariate Cox regression analysis of survival according to clinical and biologic variables in 20 patients aged over 12 months at diagnosis with stage IV neuroblastoma

Variable	χ^2	p
Gelatinase A activation ratio	3.66	0.0557
N-myc amplification	1.31	0.25
NSE	3.12	0.077
Histology	0.72	0.39

考 察

本研究で潜在型ゼラチナーゼAの活性化は30例すべての神経芽細胞腫検体で検出された。また活性型ゼラチナーゼAの値は神経芽細胞腫におけるMT-MMP-1の発現と強い相関があった。一連の報告から、悪性腫瘍におけるMT-MMP-1の発現はその組織におけるゼラチナーゼAの活性化を直接表わしており、その腫瘍の生体内での浸潤能を示すことが解明されている。それは、MT-MMP-1 cDNAを形質導入したNIH3T3細胞が特異的に潜在型ゼラチナーゼAを活性化すること²³⁾、ゼラチンザイモグラフィで定量したゼラチナーゼA活性化率は免疫組織染色法²³⁾²⁷⁾³⁶⁾³⁷⁾や、ウエスタンブロット法³⁸⁾、ノザンブロット法³⁹⁾、インサイチュハイブリダイゼーション法³⁹⁾で定量化したMT-MMP-1量に強く相関すること、MT-MMP-1の高発現が様々な悪性腫瘍組織、たとえば肺癌、胃癌、大腸癌、乳癌などでみられることなどから^{27) 39)}明らかである。本研究でIV期の4例がMT-MMP-1の免疫組織染色が2+であるにもかかわらず、ゼラチナーゼA活性化率が低値を示し、MT-MMP-1発現量とゼラチナーゼA活性化率との間に相違がみられた。この相違の理由は明確ではないが、1例は化学療法後の切除であるので線維化やTIMP-2活性^{39) 40)}の増加、MT-MMP-1発現量の減少など、治療に伴う変化が組織内に起こった可能性が考えられる。他の例では組織の保存や輸送に伴い、MT-MMP-1の酵素活性が減弱した可能性が考えられる。

IV期23例ではゼラチナーゼA活性化率は2.2%から78.9%の範囲にあり、ゼラチナーゼA活性化率の高い例は予後が悪いものが多かった。正常副腎髄質や神経節におけるMT-MMP-1の基礎発現量およびゼラチナーゼA活性化率についてはまだ報告がないが、他組織での報告から正常副腎髄質においてもある程

なかった。N-myc増幅群と非増幅群の差は統計学的有意には達しなかったが、N-myc増幅量を連続変数としてCox比例ハザードモデルで解析すると有意な予後不良因子であった (p=0.015)。NSE値は5年生存率には差があったが有意ではなかった。ゼラチナーゼA活性化率は臨床病理学的因子の中でもっとも有意に予後に関与していた (表2)。

最も病期の進行したIV期は23例あり、12例 (52%) がゼラチナーゼA高活性化率群、11例 (48%) が低活性化率群であった。IV期においてもゼラチナーゼA高活性化率群の5年生存率は21.2%で、低活性化率群の88.9%に比し有意に予後が悪かった (p=0.0125, 図7)。組織型 (UH/FH)、発症年齢による分類でも5年生存率に差がみられたが、それぞれの予後良好群に死亡例がないため有意差は検定できなかった (表3)。

IV期で発症年齢が12ヵ月以上の20例についてCox比例ハザードモデルを用いた多変量解析を行なった (表4)。統計学的有意差に届かなかったが (p=0.0557)、高ゼラチナーゼA活性化率は他の臨床病理学的因子に比し予後不良に強く関与することが示唆された。

度のゼラチナーゼA活性化がみられることが推測できる。本研究では臨床予後因子として有意なゼラチナーゼA活性化率の上昇は何%以上かを知ることを試み、ゼラチナーゼA活性化率の分割点を26%で設定した。

この分割点を用いⅣ期23症例のゼラチナーゼA活性化率と生存率を検討すると、高活性化率群の5年生存率は21.2%で、低活性化率群の88.9%に比し有意に予後不良だった。Logrank法による単変量解析でも、ゼラチナーゼA活性化率は他の臨床病理学的因子に比し最も生存率に相関が強かった。母集団が少ないため多変量解析では統計学的有意差が得られなかったものの、ゼラチナーゼA活性化率とMT-MMP-1発現は神経芽細胞腫の新しい予後因子である可能性が示唆された。

既知の予後因子である、臨床病期、発症年齢、組織型、血清NSE値、およびN-myc増幅は本研究の母集団においても予後に関係があり、本研究の母集団は臨床的特徴において他の報告^{30,31}に比し標準的な集団であると考えられた。治療方法は、いずれも進行神経芽細胞腫研究グループのプロトコール³⁰(1990年)に従って行なった。1歳以上で発症したⅣ期症例では、強力な化学療法と外科的切除の後、骨髄移植を行なった。1歳以下で発症したⅣ期症例では外科的切除の後、化学療法における投与量を調節して行なった。マスキリング発見例では外科的切除と弱い化学療法を行なった⁴⁰。

わが国では神経芽細胞腫のマスキリングが、6カ月の乳児を対象に全国レベルで行なわれている^{42,43}。マスキリングでは尿中のバニルマンデル酸とホモマンデル酸の増加を検出し、患者は無症状のうちに発見される。マスキリング発見例のほとんどは病期が低く、組織型が良好でN-myc増幅がなく、予後の良いことが報告されている^{42,43}。マスキリング発見例の中にも進行神経芽細胞腫はみられるが、特別なプロトコールがないにもかかわらず非マスキリング例に比し予後がよい。マスキリングで発見される神経芽細胞腫は自然退縮するともいわれ、臨床病理学的に非マスキリング例の腫瘍と異なる可能性があり、神経芽細胞腫の多様性が指摘されている⁴⁰。本研究でもマスキリング発見例はⅠ期1例、Ⅱ期1例、Ⅲ期2例、Ⅳ期1例の計5例あった。5例ともゼラチナーゼA活性化率は低く(3.4%–19%)N-myc増幅はなく、NSEは低く、組織型は良好群であった。手術関連死の1例を除き4例が生存中であった。

本研究では神経芽細胞腫においてゼラチナーゼAの高活性化、すなわちMT-MMP-1の高発現は病期の進行度に強く相関し、予後不良であった。MT-MMP-1は神経芽細胞腫において、特に1歳以上発症のⅣ期症例においては、重要な予後因子である可能性がある。腫瘍組織のMT-MMP-1発現およびゼラチナーゼA活性化率を検索することにより、さらに的確な治療方針をたて得ることが期待できる。

結 論

神経芽細胞腫30症例を対象にMT-MMP-1の発現およびゼラチナーゼAの活性化を検討し、以下の結果を得た。

1. 30症例全てにゼラチナーゼAの活性化が認められた。
2. 病期別にみるとⅣ期のゼラチナーゼA活性化率は、Ⅰ期、Ⅱ期に比し有意に高値であった。
3. ゼラチナーゼA活性化率と、免疫染色法によるMT-MMP-1発現量は強い相関がみられた。

4. ゼラチナーゼA高活性化率群は低活性化率群に比し、有意に予後不良であった。

以上の結果から、神経芽細胞腫においてMT-MMP-1の発現とゼラチナーゼAの活性化は、病期の進行度と強い相関があり、神経芽細胞腫の新しい予後因子である可能性が示唆された。

謝 辞

稿を終るにあたり、御指導と御校閲を賜りました恩師小泉晶一教授に深甚なる謝意を捧げます。また、終始御指導を賜りました金沢大学がん研究所ウイルス部佐藤博博士に深謝致します。さらに、統計学的な御指導、御協力を賜りました金沢大学公衆衛生学教室長瀬博文博士、病理診断で御指導を賜りました第一病理学教室塚正彦博士に深謝致します。また、腫瘍組織の提供、症例の臨床経過など御協力をいただきました金沢大学第一外科渡辺洋宇教授、日本大学麦島秀雄先生、埼玉県立がんセンター金子安比古先生、信州大学小池健一先生、長野県立こども病院石井栄三郎先生、石川県立中央病院堀田成紀先生に深謝致します。本研究の遂行に際し、御協力を頂きました金沢大学小児科学教室の諸先生に感謝致します。

なお、本論文の要旨の一部は第12回日本小児がん学会(1996, 東京)、第38回日本小児血液学会(1996, 三重)、33rd Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology(1997, Denver, USA)において発表した。

文 献

- 1) Evans AE, D'Angio GJ, Randolph J. A proposed staging for children with neuroblastoma. *Childrens Cancer Study Group A. Cancer* 27: 374-378, 1971
- 2) Evans AE, D'Angio GJ, Propert K, Anderson J, Hann HW. Prognostic factors in neuroblastoma. *Cancer* 59: 1853-1859, 1987
- 3) Carlsen NLT. Neuroblastoma: Epidemiology and pattern of regression. Problems in interpreting results of mass screening. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 14: 103-110, 1992
- 4) Look AT, Hayes FA, Shuster JJ, Douglass EC, Castleberry RP, Bowman LC, Smith EL, Brodeur GM. Clinical relevance of tumor cell ploidy and N-myc gene amplification in childhood neuroblastoma: A Pediatric Oncology Group study. *J Clin Oncol* 9: 581-591, 1991
- 5) Ohnuma N, Takahashi H, Kaneko M, Uchino J, Takeda T, Iwafuchi M, Ohhira M, Nishihira H, Mugishima H, Yokoyama J, Okada A, Nagahara N, Taguchi N, Tsuchida Y. Treatment combined with bone marrow transplantation for advanced neuroblastoma: An analysis of patients who were pretreated intensively with the protocol of the Study Group of Japan. *Med Pediatr Oncol* 24: 181-187, 1995
- 6) Shimada H, Chatten J, Newton WA Jr, Sachs N, Hamoudi AB, Chiba T, Marsden HB, Misugi K. Histopathologic prognostic factors in neuroblastic tumors: definition of subtypes of ganglioneuroblastoma and an age-linked classification of neuroblastomas. *J Natl Cancer Inst* 73: 405-416, 1984
- 7) Look AT, Hayes FA, Nitschke R, McWilliams NB, Green AA. Cellular DNA content as a predictor of response to chemotherapy in infants with unresectable neuroblastoma. *N Engl J Med* 311: 231-235, 1984
- 8) Seeger RC, Brodeur GM, Sather H, Dalton A, Siegel SE, Wong KY, Hammond D. Association of multiple copies of N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas. *N Engl J Med* 313: 1111-1116, 1985

- 9) Brodeur GM, Seeger RC, Schwab M, Varmus HE, Bishop JM. Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science* 224: 1121-1124, 1984
- 10) Tanaka T, Slamon DJ, Shimada H, Shimoda H, Fujisawa T, Ida N, Seeger RC. A significant association of Ha-ras p21 in neuroblastoma cells with patient prognosis. *Cancer* 68: 1296-1302, 1991
- 11) Nakagawara A, Arima-Nakagawara M, Scavarda NJ, Azar CG, Cantor AB, Brodeur GM. Association between high levels of expression of the TRK gene and favorable outcome in human neuroblastoma. *N Engl J Med* 328: 847-854, 1993
- 12) Combaret V, Gross N, Lasset C, Frappaz P, Peruisseau G. Clinical relevance of CD44 cell-surface expression and N-myc gene amplification in a multicentric analysis of 121 pediatric neuroblastomas. *J Clin Oncol* 14: 25-34, 1996
- 13) Woessner JF. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J* 5: 2145-2154, 1991
- 14) Stetler-Stevenson WG, Aznavoorian S, Liotta LA. Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. *Annu Rev Cell Biol* 9: 541-573, 1993
- 15) Freije JM, Diez-Itza I, Balbin M, Sanchez LM, Blasco R, Tolivia J, Lopez-Otin C. Molecular cloning and expression of collagenase-3, a novel human matrix metalloproteinase produced by breast carcinomas. *J Biol Chem* 269: 16766-16773, 1994
- 16) Sato H, Kida Y, Mai M, Endo Y, Sasaki T, Tanaka J, Seiki M. Expression of genes encoding type IV collagen-degrading metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in various human tumor cells. *Oncogene* 7: 77-83, 1992
- 17) Collier IE, Wilhelm SM, Eisen AZ, Marmer BL, Grant GA, Seltzer JL, Kronberger A, He CS, Bauer EA, Goldberg GI. H-ras oncogene-transformed human bronchial epithelial cells (TBE-1) secrete a single metalloprotease capable of degrading basement membrane collagen. *J Biol Chem* 263: 6579-6587, 1988
- 18) Wilhelm SM, Collier IE, Marmer BL, Eisen AZ, Grant GA, Goldberg GI. SV40-transformed human lung fibroblasts secrete a 92-kDa type IV collagenase which is identical to that secreted by normal human macrophages. *J Biol Chem* 264: 17213-17221, 1989
- 19) Okada Y, Morodomi T, Enghild JJ, Suzuki K, Yasui A, Nakanishi I, Salvesen G, Nagase H. Matrix metalloproteinase 2 from human rheumatoid synovial fibroblasts. Purification and activation of the precursor and enzymic properties. *Eur J Biochem* 194: 721-730, 1990
- 20) Liotta LA, Rao CN, Wewer UM. Biochemical interactions of tumor cells with the basement membrane. *Ann Rev Biochem* 55: 1037-1057, 1986
- 21) Brown PD, Bloxidge RE, Anderson E, Howell A. Expression of activated gelatinase in human invasive breast carcinoma. *Clin Exp Metastasis* 11: 183-189, 1993
- 22) Yamagata S, Yoshii Y, Suh JG, Tanaka R, Shimizu S. Occurrence of an active form of gelatinase in human gastric and colorectal carcinoma tissues. *Cancer Lett* 59: 51-55, 1991
- 23) 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
- 24) Takino T, Sato H, Shinagawa A, Seiki M. Identification of the second membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP-2) gene from a human placenta cDNA library. *J Biol Chem* 270: 23013-23020, 1995
- 25) Monsky WL, Kelly T, Lin CY, Yeh Y, Stetler-Stevenson WG, Mueller SC, Chen WT. Binding and localization of Mr 72,000 matrix metalloproteinase at cell surface invadopodia. *Cancer Res* 53: 3159-3164, 1993
- 26) Takino T, Sato H, Yamamoto E, Seiki M. Cloning of a gene potentially encoding a novel matrix metalloproteinase having a trans-membrane domain at the C-terminus. *Gene* 115: 293-298, 1995
- 27) Tokuraku M, Sato H, Murakami S, Okada Y, Watanabe Y, Seiki M. Activation of the precursor of gelatinase A/ 72 kDa 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
- 28) Okada A, Bellocq JP, Rouyer N, Chenard MP, Rio MC, Chambon P, Basset 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
- 29) 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
- 30) Sawaguchi S, Kaneko M, Uchino J, Takeda T, Iwafuchi M, Matsuyama S, Takahashi H, Nakajo T, Hoshi Y, Okabe I, Yokoyama J, Nishihira H, Sasaki S, Sakurai M, Sawada T, Nagahara N, Tsuchida Y. Treatment of advanced neuroblastoma with emphasis on intensive induction chemotherapy. A report from the study group of Japan. *Cancer* 66: 1879-1887, 1990
- 31) Mugishima H, Iwata M, Okabe I, Sanuki E, Onuma N, Fujimoto T, Ohira M, Kaneko M, Tsuchida Y, Okuni M. Autologous bone marrow transplantation in children with advanced neuroblastoma. *Cancer* 74: 972-977, 1994
- 32) Heussen C, Dowdle EB. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulphate and copolymerized substrates. *Anal Biochem* 102: 196-202, 1980
- 33) Mehta CR, Patel NR. A network algorithm for performing Fisher's exact test in r x c contingency tables. *J Am Stat Assoc* 78: 427-434, 1983
- 34) Kaplan ES, Meier P. Nonparametric estimations from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 53: 457-481, 1958
- 35) Mantel H, Haenzel W. Statistical aspects of the analysis of data from retrospective studies of disease. *J Natl Cancer Inst* 22: 719-748, 1959
- 36) Yamada T, Yoshiyama Y, Sato H, Seiki M, Shinagawa A, Takahashi M. White matter microglia produce membrane-type matrix metalloproteinase, an activator of gelatinase A, in human

brain tissues. *Acta Neuropathol* 90: 421-424, 1995

- 37) Yamamoto M, Mohanam S, Sawaya R, Fuller GN, Seiki M, Sato H, Gokaslan ZL, Liotta LA, Nicolson GL, Rao JS. Differential expression of membrane-type matrix metalloproteinase and its correlation with gelatinase A activation in human malignant brain tumors *in vivo* and *in vitro*. *Cancer Res* 56: 384-392, 1996
- 38) Tsuchiya Y, Sato H, Endo Y, Okada Y, Mai M, Sasaki T, Seiki M. Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 is a negative regulator of the metastatic ability of a human gastric cancer cell line, KKLS, in the chick embryo. *Cancer Res* 53: 1397-1402, 1993
- 39) Veas RG, Schweigerer L, Medina MA. Matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 expression in paediatric tumor cells. Effects of tumor cell proliferation modulators on gelatinolytic activity. *J Cancer Res Clin Oncol* 121: 275-278, 1995
- 40) Imai K, Ohuchi E, Aoki T, Nomura H, Fujii Y, Sato H, Seiki

- M, Okada Y. Membrane-type matrix metalloproteinase 1 is a gelatinolytic enzyme and is secreted in a complex with tissue inhibitor of metalloproteinases 2. *Cancer Res* 56: 2707-2710, 1996
- 41) Suita S, Zaizen Y, Yano H, Akiyama H, Sera Y, Takamatsu H, Ueda K, Tasaka H, Miyazaki S, Kawakami K, Tsuneyoshi M, Ikeda K. How to deal with advanced cases of neuroblastoma detected by mass screening; A report from the pediatric oncology study group of the Kyushu area of Japan. *J Pediatr Surg* 29: 599-603, 1994
- 42) Sawada T, Kidowaki T, Sakamoto I, Hashida T, Matsumura T, Nakagawa M, Kusunoki T. Neuroblastoma: Mass screening for early detection and its prognosis. *Cancer* 53: 2731-2735, 1984
- 43) Bessho F, Hashizume K, Nakajo T, Kamoshita S. Mass screening in Japan increased the detection of infants with neuroblastoma without a decrease in cases in older children. *J Pediatr* 119: 237-241, 1991

Membrane-Type Matrix Metalloproteinase-1 (MT-MMP-1) Expression and Activation of Gelatinase A as Prognostic Markers in Advanced Neuroblastoma Masae Sakakibara, Department of Pediatrics, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920 — *J. J. J. Med Soc.*, **106**, 577 — 586 (1997)

Key words membrane-type matrix metalloproteinase-1, gelatinase A, metastasis, neuroblastoma, prognosis

Abstract

Neuroblastoma (NB), the most common pediatric solid tumor, has a unique characteristic in that the heterogeneity of the differentiating tumor cells and age at diagnosis are related to prognosis. Several factors have been reported that correlate with tumor aggressiveness and poor prognosis. Membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT-MMP-1) was identified as being expressed on the tumor cell surface and being capable of inducing activation of pro-gelatinase A. Pro-gelatinase A is activated by the enzyme specifically expressed on the tumor cell surface. Activated gelatinase A is reported to be overexpressed in a variety of malignant tumor tissues. Since activated gelatinase A degrades type IV collagen, one of the integral components of the basement membrane, this enzyme is thought to play a key role in triggering tumor spread. This study is an attempt to determine the possibility that the expression of MT-MMP-1 and gelatinase A activation can be a prognostic determinant in NB. Surgically excised NBs (n= 30) were analyzed. The total levels of pro-gelatinase A (68 kDa) and its activated form (62 kDa) in the tumor lysates were quantitated by a gelatin zymography. The expression of MT-MMP-1 was estimated by immunostaining with the monoclonal antibody. Pro-gelatinase A and the activated form were detected in each of the 30 specimens. The gelatinase A activation ratio 62 kDa / (62 kDa + 68 kDa) was significantly high in the patients with high levels of MT-MMP-1 expression on the tumor cells, at an advanced tumor stage, and with high serum neuron-specific enolase levels. The high gelatinase A activation had a strong association with an unfavorable clinical outcome in all cases and in the subgroup of stage IV (p = 0.0009, and p= 0.0125, respectively). Multivariate analysis suggested that high gelatinase A activation ratio was associated with poor prognosis (p= 0.0557) in the patients aged over 12 months with stage IV. Gelatinase A activation correlates with high expression of MT-MMP-1 on NB cells and is strongly associated with advanced stage and a poor clinical outcome in the pediatric patients. These results are consistent with the notion that MT-MMP-1 expression is an important prognostic determinant of the biologic behavior of NB.