肺癌における膜型マトリックスメタロプロテアーゼ(MT-MMP)の発現とゼラチナーゼA(MMP-2)活性化に際しての意義

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 徳楽, 正人 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9331

金沢大学十全医学会雑誌　第106巻　第3号　320－326（1997）

肺癌における膜型マトリックスメタロプロテアーゼ (MT-MMP)の発現とゼラチナーゼA（MMP-2）活性化に際しての意義

金沢大学医学部医学科外科学第一講座（主任：渡辺洋宇教授）
徳　楽　正　人

癌の浸潤，転移の過程で細胞外マトリックス，特に基底膜の骨格をなすⅣ型コラーゲンの分解が必須である．Ⅳ型コラーゲン分解能を有する活性型ゼラチナーゼAはさまざまな悪性腫瘍での発現が認められている．ゼラチナーゼAの活性化については不明な点も多かったが，その活性化因子として膜型マトリックスメタロプロテアーゼ (membrane type matrix metalloproteinase, MT-MMP) が初めて同定された．本研究では58例の原発性肺癌症例を対象としてMT-MMPの発現とその生体内におけるゼラチナーゼA活性化因子としての可能性を検討した．ノーザンブロッティング法でMT-MMP mRNAの癌組織における過剰発現が認められ，その正常肺組織に対する比 (tumor tissue/normal lung tissue, T/N) は腺癌3.19±1.62 (29例)，扁平上皮癌3.09±1.44 (24例)，大細胞癌4.40±0.47 (3例)，小細胞癌3.63±2.11 (2例) であった．MT-MMPに対する免疫組織染色では主として癌細胞が染色され，一部の間質線維芽細胞や血管内皮細胞も染色された．ゼラチナーゼA mRNAの発現については癌組織と正常肺組織に差異を認めなかったが，ゼラチンザイモグラフィーでは活性型ゼラチナーゼAの発現は癌組織において有意に高値であった．また，ゼラチナーゼA活性化率はリンパ節転移陽性例で有意に高値でありMT-MMP mRNAの発現とよく相関した．以上の結果から，MT-MMPは生体内においても潜在型ゼラチナーゼAの活性化因子として機能しており，複雑多岐な癌の浸潤，転移の一局面で中心的役割を果たしていることが示唆された．

Key words membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP), gelatinase A, cancer metastasis, lung cancer

癌細胞の転移成立には多くの複雑なステップが必要であるが，なかでも癌細胞を取りかこみ，その浸潤過程において物理的障壁となっている細胞外マトリックス (extracellular matrix, ECM) の破壊が不可欠である．特に，その一形態である基底膜はⅣ型コラーゲンを骨格構造とし，ラミニン，フィブロネクチン，ヘパラン硫酸，プロテオグリカンなどから構成される生体内の強固な障壁であり，癌細胞が浸潤，転移するためにはこれらの構成成分を分解する必要がある[1)2)]．これらの分解酵素としてマトリックスメタロプロテアーゼ (matrix metalloproteinase, MMP) が，その発現と転移能との相関性から注目され，特にⅣ型コラーゲンを分解するⅣ型コラゲナーゼが重要視されてきた[3)4)]．

Ⅳ型コラゲナーゼにはゼラチナーゼA (72kDa-Ⅳ型コラゲナーゼ/MMP-2) とゼラチナーゼB (92kDa-Ⅳ型コラゲナーゼ/MMP-9) があり，いずれも高転移性癌細胞における高発現が報告されてきた[5)6)]．しかし，これらのMMPは，酵素活性を持たない潜在型酵素として分泌されるため，この過剰発現をもって直ちに癌細胞の転移能を論じることはできない．癌細胞が周囲のECMを破壊し浸潤するためにはこれらの潜在型MMPsを活性化する必要がある[7)8)]．事実，活性型ゼラチナーゼ-Aは癌特異的にみられることが知られ転移能との相関が示唆されている[9)10)]．

潜在型ゼラチナーゼAは他の潜在型MMPsとは異なりプラスミン，トリプシンなどのセリンプロテアーゼには活性化されず[11)12)]癌細胞表面での特異な活性化機構が想定されてきた[13)-16)]．膜型マトリックスメタロプロテアーゼ (membrane-type MMP, MT-MMP) は細胞膜貫通ドメインを持ち，ゼラチナーゼAを特異的に活性化するMMPとして，Satoら[17)]，Takinoら[18)]により同定された．

本研究では原発性肺癌切除材料を用いてMT-MMPの発現と潜在型ゼラチナーゼA活性化との相関を検討し，生体内においてMT-MMPが潜在型ゼラチナーゼAの活性化因子であり，癌の浸潤，転移に重要な役割を果たしていることを立証することを試みた．

平成9年3月19日受付，平成9年5月6日受理

Abbreviations：bp, base pair; DAB, 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride; DEPC, diethylaminoethyl cellulose; ECM, extracellular matrix; HSA, hoase serum albumin; MMP, matrix metalloproteinase; MOPS, 3-N-Morpholinopropanesulfonic acid; MT-MMP, membrane type matrix metalloproteinase; PBS, phosphate-buffered saline; T/N, tumor tissue/normal lung tissue

対象および方法

Ⅰ．臨床材料

1993年7月から1994年3月までに金沢大学医学部第一外科で切除された原発性肺癌症例から58例の新鮮腫瘍組織と，対照として同一症例の正常肺組織を得た．年齢は40～79才（平均65.2才），性別は男性40例，女性18例であった．病理組織型分類では，腺癌29例，扁平上皮癌24例，大細胞癌3例，小細胞癌2例であった．組織分類は日本肺癌学会取扱い規約[19]にしたがった．

Ⅱ．ゼラチンザイモグラフィー

ゼラチンザイモグラフィー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AおよびゼラチナーゼBの検出に優れている．本実験ではHeussenら[20]の方法に準じて行った．すなわち，切除組織を1mgあたり10μlの試料溶解液［10mM Tris-HCl, pH6.8, 20%グリセロール，2%SDS，0.1%ブロモフェノールブルー］で均質化し37℃で20分間静置した．次に室温で4000回転/分（rpm），5分間遠心分離し試料を得た．

試料10ul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を行った．泳動終了後，ゲルを2.5%トライトン-X 100にて30分間室温で2回洗浄し，反応液［50mM Tris-HCl, pH7.6, 150mM NaCl, 10mM $CaCl_2$, 0.02%アジ化ナトリウム（NaN_3）］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%コーマスブリリアントブルー G-250 (Sigma Chemical, St. Louis, USA)］にて室温で2時間染色し，30%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．

潜在型および活性型ゼラチナーゼAはそれぞれ66kDa，62kDaのバンドとして現れた．各バンドよりゼラチン分解活性をデンシトメーターにて測定し，全ゼラチナーゼAに対する活性型ゼラチナーゼAの比（62kDa/62kDa＋66kDa）をゼラチナーゼA活性化率として算出した．

Ⅲ．RNAの抽出とノーザンブロッティング法

1．RNAの抽出

新鮮組織1gあたり10mlのD液（4Mグアニジンチオシアネート，25mMクエン酸ナトリウム，0.1M 2-メルカプトエタノール，0.5% N-ラウロイルサルコシン酸ナトリウム）を加えて十分に均質化した．この材料に，1/10容量の2M 酢酸ナトリウム，pH4.0，1容量の水飽和フェノール，1/5容量のクロロホルム-イソアミルアルコール 49:1 混合液を順次加え，添加ごとに混和した．15分氷冷した後，フェノール抽出を行い水層（上層）に等量のイソプロパノールを加え，よく混和して-20℃1時間放置した．4℃，10,000rpm，20分遠心して上清を捨てた後，RNAの沈澱を0.5mlのD液で十分溶解して等量のイソプロパノールを加えて前述のようにRNAを沈澱させた．RNAの沈澱をジエチルピロカルボネート（diethyl pyrocarbonate, DEPC）処理蒸留水にて溶解し，フェノール抽出，エタノール沈澱を行った．RNAの沈澱をDEPC処理蒸留水で溶解し，分光光度計（モデルUV160，島津，京都）を用い，260nmのODを測定し，1ODを40μg/mlとして全RNA濃度を測定した．

2．ノーザンブロッティング法

一検体につき10μgの全RNAを用い，これを50%ホルムアミド（ナカライテスク，京都），17.5%のホルマリンを含む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15分間反応させた後，1.0%アガロースゲルにて2%MOPS中で電気泳動を行った．泳動終了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．

3．プローブの作成

本実験で使用したプローブ用DNAを含むプラスミド，ゼラチナーゼA, MT-MMP, Actin 遺伝子は全て金沢大学がん研究所ウイルス部清木元治教授から分与された．

ゼラチナーゼA遺伝子は制限酵素 *Eco*RI（制限酵素はすべて宝酒造，京都を使用した），*Bam*HIで切り出される1.5キロ塩基対（kilo base pairs, kbp）のcDNA，MT-MMP遺伝子は *Eco*RI で切り出される3.4kbpのcDNA，Actin遺伝子は *Pst* 1で切り出される1.2kbpのcDNAである．

これらのDNAをそれぞれ25ngずつマルチプライム・ラベリング・キット（Amersham，東京）にて［α-32P］dCTP (Amersham) を用いて標識し，2.0-5.0 cpm/ugの比活性を持つプローブを得た．

4．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SSC，5倍濃度デンハルト液（0.2%ポリビニールピロリドン，0.2%牛血清アルブミン，0.2%フィコール），0.1% SDS，20 ug/ml 変性サケ精子DNA（ベーリンガー・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 10mlと42℃で6時間反応させた．反応後この液を捨て，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，メンブランと42℃で16時間反応させた．反応終了後，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，12時間のオートラジオグラフィーを実施した．得られたバンドの単位面積あたりの放射活性をバイオイメージアナライザー（Bioimage analyzer BAS1000, 富士，東京）を用いて測定した．

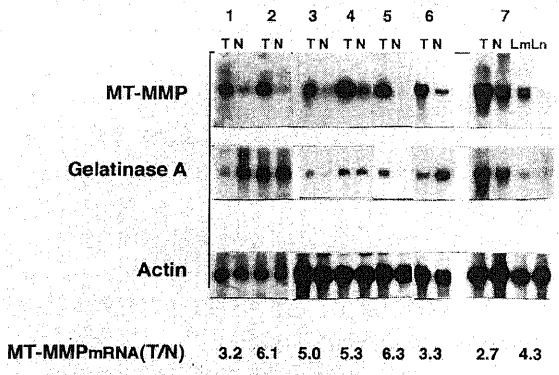
Ⅳ．免疫組織染色法

1．材料

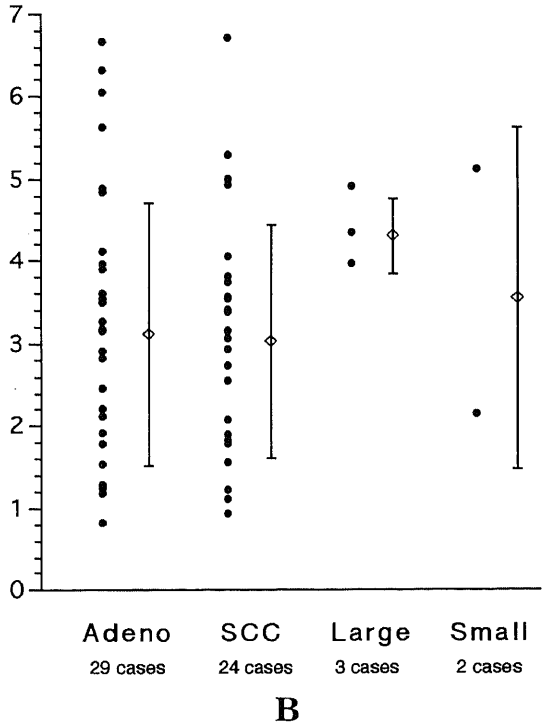
本実験に用いた58例の中から10例のパラフィン包埋ブロックを選択し免疫染色を実施した．内訳は腺癌4例，扁平上皮癌4例，大細胞癌1例，小細胞癌1例である．各ブロックを3μmの厚さに薄切し，0.02%ポリ-Lリジンでスライドに付着させパラフィン切片を作成した．

2．免疫組織染色

パラフィン切片をヒストクリア・エタノール系列で脱パラフィンし，0.3%過酸化水素水で内因性ペルオキシダーゼのブロックを室温で30分行い，次に，0.15Mリン酸緩衝液（phosphate-buffered saline, PBS）(pH7.2) - 3% ウマ血清アルブミン (horse serum albumin, HSA) で非特異的反応のブロックを室温で15分行った．1次抗体として抗MT-MMP抗体（113-5B7，富士薬品工業，高岡）4μg/mlを含むPBS-0.1% HSAと4℃で16時間反応させた．ビオチン標識ウマ抗マウスIgG抗体 (Vector, Glostrup, USA) と室温で30分反応させ，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, Glostrup, Denmark) とさらに30分反応させた．最後にジアミノベンチジン（3,3'-



A



B

Fig.1. MT-MMP mRNA expression in human lung carcinomas. (A) RNA was extracted from surgically resected specimens and northern blotting was carried out. Filters were probed with ^{32}P-labeled cDNA fragment of MT-MMP gene and the same filters were successively reprobed with gelatinase A and actin gene probes after washing the previously hybridized probes. Molecular sizes of the transcripts were 4.5 kb for MT-MMP, 3.1 kb for gelatinase A and 2.0 kb for actin. T, N, Lm and Ln are the tissue samples from tumor, normal and lymph node with or without metastasis, respectively. The radioactivities of each band were counted by a Bioimage analyzer and the ratio of the values between the tumor and corresponding normal tissue (T/N) is indicated at the bottom of the figure. (B) T/N ratios for adenocarcinomas, squamous cell carcinomas, large cell carcinomas and small cell carcinomas were compared and the $\bar{x}$ value for each type of carcinoma is indicated. Adeno, adenocarcinomas; SCC, squamous cell carcinomas; Large, large cell carcinomas; small, small cell carcinomas

diaminobenzidine tetrahydrochloride, DAB) (Sigma) 反応液 (50mM Tris-HCl, pH7.6, 0.006%H_2O_2, 0.03% DAB) で発色させ, ヘマトキシリンで核染色し鏡検した. また, 陰性対照として500倍に希釈した正常マウスIgG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.

V. 統計処理法

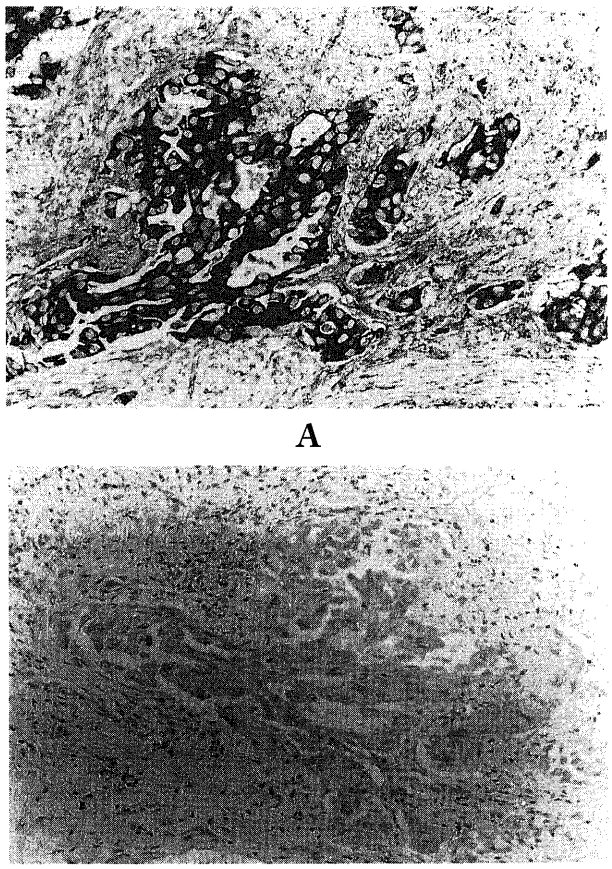
得られた値はすべて平均値±標準偏差で表した. 平均値の有意差検定にはWelchのt検定を用い, 危険率5%未満 ($p < 0.05$) を有意差ありと判定した. また2つの変数間の相関についてはPearsonの相関係数で表し, 危険率5%未満 ($p < 0.05$) を有意差ありと判定した.

成　　績

I. 肺癌組織におけるMT-MMPの発現

1. ノーザンブロッティング法

肺癌組織におけるMT-MMP mRNAの発現をノーザンブロッティング法にて検討した. MT-MMPmRNAの発現は4.5kbpのバンドとして検出され, 肺癌組織および正常肺組織ともに認められた (図1A). また, ほとんどすべての症例で, 正常肺組織に比べて肺癌組織での過剰発現が確認された. 一方, ゼラチナーゼA mRNAの発現は3.1kbpのバンドとして検出されたが, 肺癌組織と正常肺組織のあいだに発現量の差異は認めなかった



A

B

Fig.2. Immunolocalization of MT-MMP. Sections of a resected lung adenocarcinoma were prepared with anti-MT-MMP (A) and with pre-immune serum (B). MT-MMP was mainly localized in and on carcinoma cells.

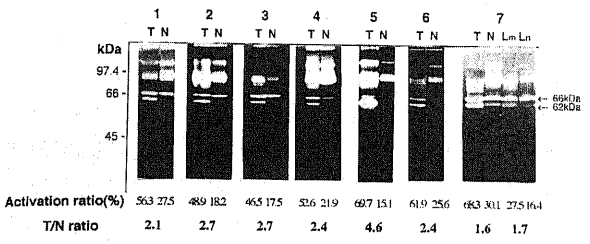


Fig.3. Gelatin zymography of lung carcinoma samples. Tissue lysates were prepared from the same samples as those analyzed in Fig.1 and gelatin zymography was carried out. Pro-gelatinase A (66kDa) and the activated form (62kDa) are indicated by arrows. Gels were traced by a densitometer and the relative ratio of the bands (62kDa/62kDa+66kDa) was calculated and is given as an activation ratio(%). The T/N ratio is also shown at the bottom of the figure.

(図1A).

2．MT-MMP mRNAの発現と肺癌組織型

ノーザンブロッティング法で検出された4.5kbpのバンドの単位面積あたりの放射活性をバイオイメージアナライザーBAS1000にて計測し，正常肺組織に対する肺癌組織の値(tumor tissue / normal lung tissue, T/N)を算出した．各組織型別のT/N値は腺癌3.19±1.62，扁平上皮癌 3.09±1.44，大細胞癌 4.40±0.47，小細胞癌3.63±2.11であり，全58例では3.23±1.52であった(図1B)．各群間に有意差はなく肺癌組織におけるMT-MMP mRNAの過剰発現は肺癌の組織型との間には差がないと考えられた．

3．免疫組織染色法によるMT-MMPの局在

10症例に免疫組織染色を実施した．抗MT-MMP抗体(113-5B7)により主として癌細胞が染色されたが，一部の癌間質線維芽細胞や血管内皮細胞も染色された(図2A,B)．実施した10症例の癌細胞は全てMT-MMPに対する免疫染色が陽性であった．

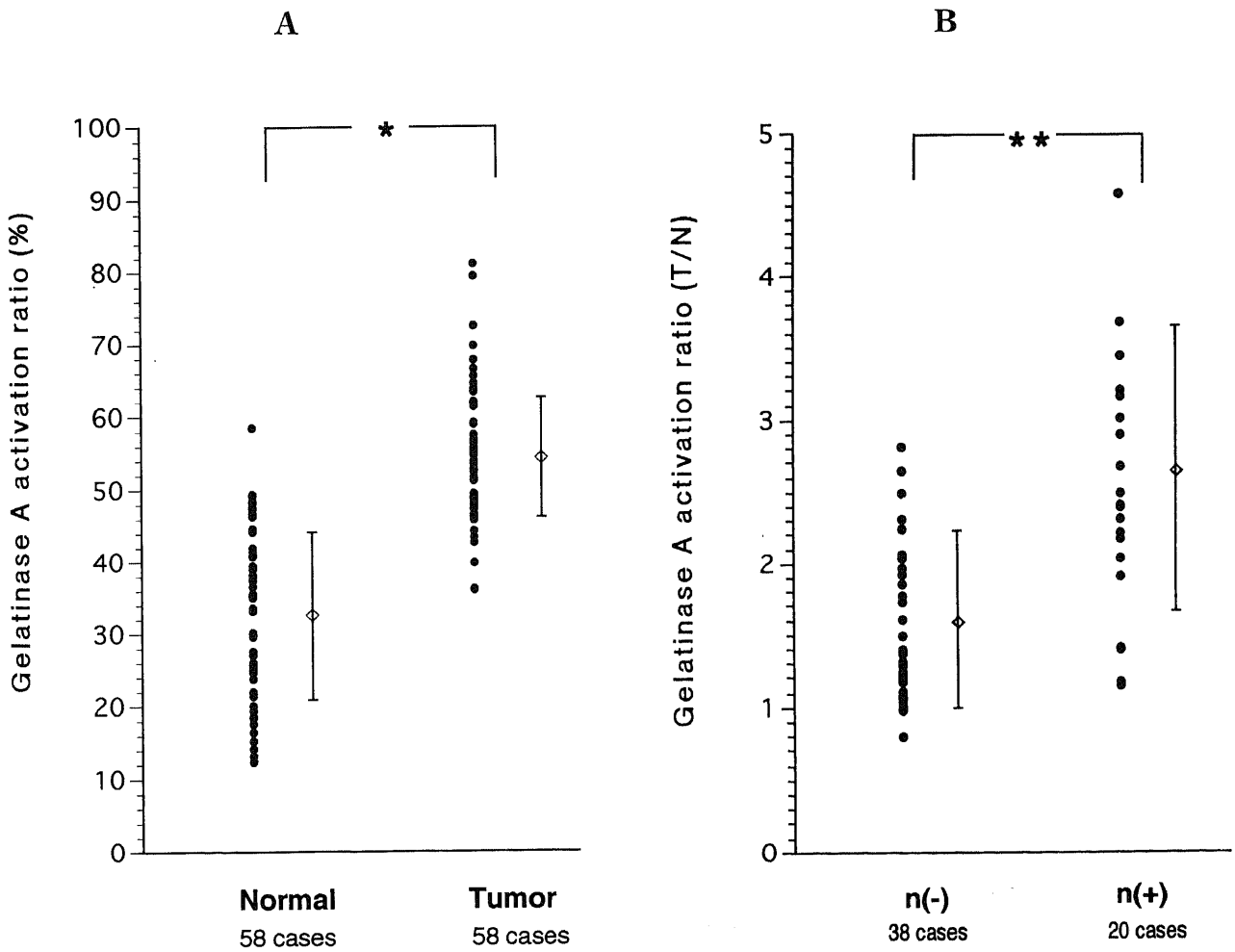


Fig.4. Activation ratio of gelatinase A in lung carcinomas. (A) The activation ratio of gelatinase A in nomal and tumor samples was plotted separately and the $\bar{x}$ value was calculated. The value was indicated by $\bar{x}\pm$ SD; *,$p<0.01$. (B) T/N ratio of tumors with (n^+) or without (n-) lymph node metastasis was calculated and plotted. The value was indicated by $\bar{x}\pm$ SD; **,$p<0.01$. Normal, normal lung tissues; tumor, tumor tissues; n(-), negative for lymph node metastasis; n($^+$), positive for lymph node metastasis.

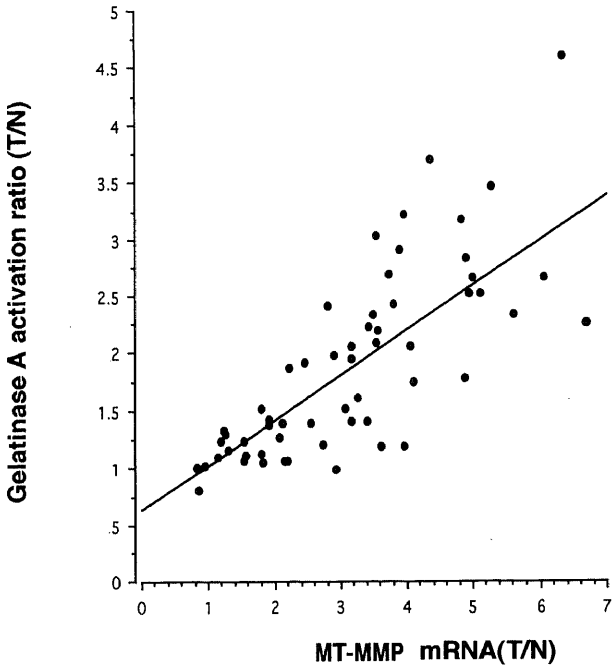


Fig.5. The activation ratio of gelatinase A correlates with the mRNA levels of MT-MMP in tissue. The T/N ratio of gelatinase A activation (Fig.3) was plotted against the T/N ratio of the MT-MMP mRNA levels (Fig.1A). Correlation coefficient, r=0.750; p<0.0001.

Ⅱ．肺癌組織における活性型ゼラチナーゼAの発現

1．ゼラチンザイモグラフィー

潜在型ゼラチナーゼAは66kDa，活性型 ゼラチナーゼAは62kDaの明瞭なバンドとして認められた．62kDaのバンドは正常肺組織にもわずかに現れたが常に肺癌組織においてより明瞭であった (図3)．

2．ゼラチナーゼA活性化率

58症例のゼラチナーゼA活性化率は肺癌組織で54.1±9.4%，正常肺組織で32.9±11.4%であり有意に肺癌組織で高率であった (図4A)．

3．活性型 ゼラチナーゼAの発現とリンパ節転移

対象とした58症例のうち20症例で病理学的にリンパ節転移が陽性であった．ゼラチナーゼA活性化率の比 (T/N) (図3) は，リンパ節転移陽性20症例で2.50±0.88，リンパ節転移陰性28症例で1.57±0.55であり，リンパ節転移陽性例で有意に高値であった (図4B)．

Ⅲ．MT-MMP mRNAの発現とゼラチナーゼA活性化

MT-MMP mRNAの発現とゼラチナーゼA活性化の相関についてPearsonの相関係数を用いて判定した．すなわちMT-MMP mRNA放射活性とゼラチナーゼA活性化率の2変数に対し，それぞれのT/Nをプロットした．図5に示すようにMT-MMP mRNAの発現とゼラチナーゼA活性化率はよく相関した．このことから肺癌組織内でMT-MMPがゼラチナーゼAの活性化因子として機能していることが示唆された．

考　　察

基底膜は癌細胞の浸潤，転移に対し最大の物理的障害となっている．その主成分であるⅣ型コラーゲンを基質とするⅣ型コラゲナーゼ (ゼラチナーゼA,B) は，癌細胞の浸潤，転移にもっとも関係の深い細胞外マトリックス分解酵素と考えられている[1)2)]．なかでもゼラチナーゼAの高発現は乳癌，大腸癌，胃癌など多くの悪性腫瘍で指摘されてきた[21)-25)]．しかし，ゼラチナーゼAの発現は癌細胞自体よりもその近傍の間質線維芽細胞に局在しており[2)4)26)]，ゼラチナーゼAがどのようにして癌の浸潤，転移に関与しているのか不明な点も多かった[27)28)]．一方，酵素活性を有する活性型ゼラチナーゼAの発現は乳癌および肺癌においてその浸潤，転移能と相関すると報告されている[9)29)]．MT-MMPは遺伝子導入された細胞表面で潜在型ゼラチナーゼAを活性化する事実から潜在型ゼラチナーゼAの組織内での活性化因子と考えられている[17)30)]．

本実験で58例の原発性肺癌症例におけるMT-MMP mRNAの発現は，肺癌組織においてその組織型にはよらず正常肺組織より有意に高値であった．また，免疫組織染色法による検討ではMT-MMPの局在は主として癌細胞であり，一部に間質線維芽細胞や血管内皮細胞にもみられた．Takinoら[18)]がヒト組織におけるMT-MMP mRNAの発現を検討した研究結果では，ヒト肺臓はもっとも強く発現のみられた臓器のひとつであった．正常肺組織でのMT-MMP発現細胞は線維芽細胞やマクロファージであり[31)]，肺気腫など肺胞の炎症性組織破壊が関与しているのかもしれない．本研究でも正常肺組織でMT-MMP mRNAは検出されたが，癌組織での過剰発現は歴然としていた．

ゼラチナーゼA mRNAの発現は正常肺組織にも癌組織と同等にみられたが，ザイモグラフィーで明らかなように，正常肺組織ではその多くが酵素活性のない潜在型ゼラチナーゼAであった．ゼラチナーゼA活性化率は癌組織において有意に高値であり，さらにリンパ節転移陽性例において一層顕著であった．このことは活性型ゼラチナーゼAの発現が腫瘍の悪性形質のひとつであることを示唆する．また，ゼラチナーゼA活性化率はMT-MMP mRNAの発現とよく一致した．このことから癌細胞に発現されたMT-MMPが潜在型ゼラチナーゼAの活性化，腫瘍の浸潤，転移という一連の過程で中心的役割を果たすことが示唆される．潜在型ゼラチナーゼAは癌間質の線維芽細胞から産生されることが知られている[5)32)-34)]．MT-MMPを発現した癌細胞は，これらの間質線維芽細胞に近接したとき高浸潤性を獲得すると予想される．

図5に示したようにゼラチナーゼA活性化率とMT-MMP mRNAの発現はよく相関しており，MT-MMPは生体内においても潜在型ゼラチナーゼAの活性化因子として機能していることが強く示唆された．

結　　論

原発性肺癌58症例を対象にMT-MMPおよびゼラチナーゼAの発現を検討し，以下の結果を得た．

1．ほとんど全ての症例で肺癌組織におけるMT-MMP mRNAの過剰発現が確認されたが，ゼラチナーゼA mRNAについては肺癌組織と正常肺組織に差異を認めなかった．

2．免疫組織染色の結果よりMT-MMPの局在は主として癌細胞であり，一部の間質線維芽細胞や血管内皮細胞にもみられた．

3．ゼラチナーゼA活性化率は癌組織において有意に高値であり，また，リンパ節転移陽性例ではリンパ節転移陰性例より

有意に高値であった.

4．ゼラチナーゼA活性化率とMT-MMP mRNAの発現はよく相関した.

以上の結果から，MT-MMPは生体内においても潜在型ゼラチナーゼAの活性化因子として機能しており，複雑多岐な癌の浸潤，転移の一局面で中心的役割を果たしてい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渡辺洋宇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金沢大学がん研究所ウイルス部清木元治教授，佐藤　博博士に深謝致します．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金沢大学医学部外科学第一講座ならびに金沢大学がん研究所ウイルス部の皆様に厚く御礼申し上げます.

なお，本論文の要旨は第53回日本癌学会総会 (1994年，名古屋)，第48回日本胸部外科学会総会 (1995年，東京)，第36回日本肺癌学会総会 (1995年，千葉) において発表した.

文　献

1) Liotta LA,Tryggvason K, Garbisa S, Hart I, Foltz CM,Shafie S. Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. Nature 284: 67-68, 1980

2) 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

3) Matrisian LM. The matrix-degrading metalloproteinases. Bioassays 14: 455-463, 1992

4) Stetler-Stevenson WG, Liotta LA, Kleiner DE Jr. Extracellular matrix 6: Role of matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. FASEB J 7: 1434-1441, 1993

5) Tryggvason K, Hoyhtya M, Pyke C. Type Ⅳ collagenases in invasive tumors. Breast Cancer Res Treat 24: 209-218, 1993

6) Ballin M, Gomez DE, Sinha CC, Thorgeirsson UP. Ras oncogen mediated induction a 92kDa metalloprotainases; Strong correlation with the malignant phenotype. Biochem Biophys Res Commun 154: 832-838, 1988

7) Kleiner DJ, Stetler-Stevenson WG. Structual biochemistry and activation of matrix metalloproteinases. Curr Opin Cell Biol 5: 891-897, 1993

8) Woessner JFJ. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. FASEBJ 5: 2145-2154, 1991

9) Brown PD, Bloxidge RE, Anderson E, Howell A. Expression of activated gelatinase in human invasive breast carcinoma. Clin & Exp Metastasis 11: 183-189, 1993

10) Yanagata 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

11) Nagase H, Suzuki K, Morodomi Y, Enghild JJ, Salvesen G. Activation mechanism of the precursors of matrix metalloproteinases 1,2 and 3. Matrix Suppl 1: 237-244, 1992

12) 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

13) Azzam HS, Thompson EW. Collagen-induced activation of the Mr 72,000 type Ⅳ collagenase in normal and malignant human fibroblastoid cells. Cancer Res 52: 4540-4544, 1992

14) Brown PD, Kleiner DE, Unworth EJ, Stetler-Stevenson WG. Cellular activation of the 72kDa type Ⅳ procollagenase/TIMP-2 complex. Kidney Int 43: 163-170, 1993

15) Strongin AY, Marmer BL, Grant GA, Goldberg GI. Plasma membrane-dependent activation of the 72kDa type Ⅳ collagenase is prevented by complex formation with TIMP-2. J Biol Chem 268: 14033-14039, 1993

16) Ward RV, Atkinson SJ, Slocombe PM, Docherty AJ, Reynolds JJ, Murphy G. Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 inhibits the activation of 72kDa progelatinase by fibroblast membranes. Biochim Biophys Acta 1079: 242-246, 1991

17) Sato H, Takino T, Okada Y, Cao J, Shinagawa A, Yamamoto E, Seiki M. A matrix metalloprotainase expressed on the surface of invasive tumor cells. Nature 370: 61-65, 1994

18) Takino T, Sato H, Yamamoto E, Seiki M. Cloning of a human gene potentially encoding a novel matrix metalloprotainase having a C-terminal transmembrane domein. Gene 15: 293-298, 1995

19) 日本肺癌学会編：臨床・病理，肺癌取扱い規約．改訂第3版，15-115項，金原出版，東京，1990

20) Heussen C, Dowdle EB. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulphate and copolymerised substrates. Anal Biochem 102: 196-202, 1980

21) Poulsom R, Pignatelli M, Stetler SW, Liotta LA, Wright PA, Jeffery RE, Longcroft JM, Rogers L, Stamp GW. Stromal expression of 72kDa type Ⅳ collagenase (MMP-2 and TIMP-2 mRNAs in colorectal neoplasia. Am J Pathol 141: 389-396, 1992

22) Stearns ME, Wang M. Type Ⅳ collagenase (Mr 72,000) expression in human prostate: benign and malignant tissue. Cancer Res 53: 878-883, 1993

23) Urbanski SJ, Edwards DR, Maitland A, Leco KJ, Watson A, Kossakowska AE. Expression of metalloproteinases and their inhibitors in primary pulmonary carcinomas. Br J Cancer 66: 1188-1194, 1992

24) Campo E, Merino MJ, Tavassoli FA, Charonis AS, Stetler-Stevenson WG, Liotta LA. Evaluation of basement membrane components and the 72kDa type Ⅳ collagenase in serous tumors of the ovary. Am J Surg Pathol 16: 500-507, 1992

25) Campo E, Merino MJ, Litta LA, Neumann R, Stetler-Stevenson WG. Distribution of the 72kDa type Ⅳ collagenase in nonneoplastic neoplastic thyroid tissue. Hum Pathol 23: 1395-1401, 1992

26) Amberger VR, Paganetti PA, Seulberger H, Eldering JA, Schwab ME. Characterization of a membrane-bound metalloendoprotease of rat C6 glioblastoma cells. Cancer Res 54: 4017-4025, 1994

27) Emonard HP, Remacle AG, Grimaud JA, Stetker-Stevenson WG, Foidart JM. Tumor cell surface-associated binding site for the Mr 72,000 Type Ⅳ collagenase. Cancer Res 52: 5845-5848,

1992
28) Monsky WL, Kelly T, Lin CY, Yeh Y, Stetler-Stevenson WG, Mueller SC, Chen WT. Binding and localization of Mr 72,000 matrix metalloprotainase at cell surface invadopodia. Cancer Res 53: 3159-3164, 1993
29) Brown PD, Bloxidge RE, Stuart NSA, Gatter KC, Carmichael J. Association between expression of activated 72-kilodalton gelatinase and tumor spread in non-small-cell lung carcinoma. J Natl Cancer Inst 85: 574-578, 1993
30) Cao J, Sato H, Takino T, Seiki M. The C-terminal region of membrane type matrix metalloproteinase is a functional transmembrane domain required for pro-gelatinase A activation. J Biol Chem 270: 801-805, 1995
31) 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 92: 2730-2734, 1995
32) Autio-Harmainen H, Karttunen T, Hurskainen T, Hoyhtya M, Kauppila A, Tryggvason K. Expression of 72 kilodalton Type Ⅳ collagenase (gelatinase A) in benign and malignant ovarian tumors. Lab Invest 69: 312-321, 1993
33) Polette M, Clavel C, Cockett M, Girod DBS, Murphy G, Birembaut P. Detection and localization of mRNAs encording matrix metalloproteinases and their tissue inhibitor in human breast pathology. Invasion & Metastasis 13: 31-37, 1993
34) Pyke C, Ralfkiaer E, Tryggvason K, Danq K. Messenger RNA for two type Ⅳ collagenases is located in stromal cells in human colon cancer. Am J Pathol 142: 359-365, 1993

Expression of Membrane-Type Matrix Metalloproteinase (MT-MMP) in Lung Carcinomas, and Its Signification for Activation of Gelatinase A (MMP-2) Masato Tokuraku, Department of Surgery (Ⅰ), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920 — J. Juzen Med Soc., **103,** 320 — 326 (1997)

Key words membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP), gelatinase A, cancer metastasis, lung cancer

Abstract

Degradation of the extracellular matrix (ECM), especially type Ⅳ collagen in the basement membrane, is a critical step for tumor invasion and metastasis. Gelatinase A that has type Ⅳ collagenolytic activity is expressed in a variety of malignant tumor tissues in an activated form. Pro-gelatinase A has been reported to be activated by the enzyme specifically expressed on the tumor cell surface. Membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP) was identified as being expressed on the cell surface and being capable of inducing activation of pro-gelatinase A in vitro. This study was wacle in an attempt to clarify the possibility that MT-MMP can be the activator of pro-gelatinase A in tumor tissues as well as in experiments in vitro. Expression of MT-MMP mRNA in 58 cases of human lung carcinomas was analyzed by northern blotting. MT-MMP mRNA expression was nigher in tumor tissues than in the adjacent normal lung tissues. The ratio of MT-MMP mRNA levels in tunor/normal tissues (T/N ratio) was 3.19 ± 1.62 for 29 cases of adenocarcinoma, 3.09 ± 1.44 for 24 cases of squamous cell carcinoma, 4.40 ± 0.47 for 3 cases of large cell carcinoma and 3.62 ± 2.11 for two cases of small cell carcinoma, respectively. Immunohistochemical analysis revealed that MT-MMP was mainly localized in and on the carcinoma cells, some of the tumor stromal fibroblasts and vascular endotherial cells. Activated gelatinase A detected by gelatin zymography was also predominant in tumor tissues compared to that in normal counterparts while the difference between their mRNA levels was not significant. The activation ratio of gelatinase A in tumor/normal tissues (T/N ratio) correlated well to that of MT-MMP mRNA expression and to the lymph node metastasis. These results suggest that MT-MMP is indeed the tumor-specific activator of pro-gelatinase A in lung carcinomas and is an important enzyme in initiating invasion of the basement membrane by the carcinoma cells, through activation of type Ⅳ collagenolytic pro-gelatinase A.