

# Expression of Matrix Metalloproteinases in Various Human Tumor Cell Lines Compared with Their Metastatic Potential

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	<a href="http://hdl.handle.net/2297/8313">http://hdl.handle.net/2297/8313</a>

## ヒト腫瘍細胞培養株におけるマトリックスメタロプロテナーゼ (MMPs) の発現と転移能についての検討

金沢大学がん研究所外科部 (主任：磨伊正義教授)

木 田 百 合

(平成4年1月22日受付)

癌細胞の転移にはⅣ型コラーゲンの分解酵素が関与すると言われているが、現時点では腫瘍細胞における発現の状態および転移能との関連について基本的情報が不足している。そこでⅣ型コラーゲンの分解酵素であるマトリックスメタロプロテナーゼ (matrix metalloproteinase, MMP)-2, MMP-3, MMP-9 およびメタロプロテナーゼ組織阻害因子 (tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP)-1, TIMP-2 の発現が細胞の転移能の指標となり得るかを検討する目的で、ヒト腫瘍由来培養細胞株26種におけるノーザン法による MMPs と TIMPs の mRNA の発現と鶏卵法による転移能との比較を行った。その結果、MMP-2 は間葉系細胞では9株全例に、上皮系細胞では4/17例に発現がみられた。MMP-9 は間葉系細胞で7/9例、上皮系細胞では2/17例で発現がみられ、この二者の発現は間葉系と上皮系で有意な差があった。MMP-3 の発現頻度は低く、間葉系で1/9例、上皮系細胞では2/17例であった。TIMP-1 の発現レベルは細胞によって異なっていた。TIMP-2 はほとんどの細胞で発現が認められた。鶏卵法による転移は、間葉系細胞の3/9例、上皮系細胞の2/17例に認められた。MMPs と転移能との相関を検討したところ、間葉系細胞では転移した細胞は全て MMP-9 を発現していた細胞であったが、上皮系細胞では転移が認められた2株で MMP-9 の発現はなかった。MMP-2, MMP-3 の発現はいずれの細胞株においても転移能との相関はみられなかった。間葉系細胞で MMP-9 を発現していたが転移しない細胞は TIMP-1 の発現が高く、逆に高転移性細胞では3例中2例に TIMP-1 の発現低下が認められた。以上の事から間葉系細胞では MMP-9 の発現昂進と TIMP-1 の発現低下が転移能と関連する事が示された。しかし一方で、MMP-2, MMP-3 についてはこれまで報告されている転移能との相関が必ずしも一般的に成立しない事が判明した。

**Key words** matrix metalloproteinases (MMPs), type Ⅳ collagenase, tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMPs), cancer metastasis,

癌の転移において細胞外マトリックスは癌細胞による周辺組織への浸潤に対する物理的障壁として働いている。特に細胞外マトリックスの一形態である基底膜は癌細胞の間質への浸潤、血管内への侵入、血管外への脱出の際に重要な障壁となっている<sup>1-4)</sup>。癌細胞の基底膜への浸潤にはまず基底膜構成成分のラミニン、ファイブロンネクチンなどに対して癌細胞がレセプターを介して接着し、次にその接着部位にて細胞の表面より蛋白分解酵素を分泌しⅣ型コラーゲンなどの主要構成成分を分解し<sup>5,6)</sup>、最後に癌細胞が移動していく、という3段階説が考えられている<sup>7)</sup>。

細胞外マトリックスの構成成分を分解する酵素は多く報告されてきているが、なかでもマトリックスメタロプロテナーゼ (matrix metalloproteinases, MMPs) という一群の酵素群が重要な役割を持つと考えられている<sup>8,9)</sup>。MMPs は (1) 細胞外マトリックス構成成分を分解する蛋白分解酵素で、(2) アミノ酸配列の相同性を有し、(3) 活性部位に亜鉛イオンをもち、(4) 前駆

体 (不活性型) で分泌され、(5) 特異的な阻害因子であるメタロプロテナーゼ組織阻害因子 (tissue inhibitors of metalloproteinase, TIMPs) によって活性が阻害される。MMPs はそれぞれ異なる基質特異性をもち、Ⅳ型コラーゲンの分解に関与するのはⅣ型コラーゲナーゼ<sup>10)</sup> と MMP-3 (ストロメライシン)<sup>11-13)</sup> である。Ⅳ型コラーゲナーゼには72キロダルトン (kilo Dalton, kD) の MMP-2 (72kD ゲラチナーゼ/Ⅳ型コラーゲナーゼ)<sup>14,15)</sup> と 92kD の MMP-9 (92kD ゲラチナーゼ/Ⅳ型コラーゲナーゼ)<sup>16,17)</sup> がある。研究の初期には MMP-2 と MMP-9 の区別がされていないこともあったが現在はそれぞれ精製されその遺伝子がクローニングされている。

Ⅳ型コラーゲンは基底膜の主要構成成分であり、Ⅳ型コラーゲンの分解にたざさわる3つの酵素 MMP-2, MMP-3, MMP-9 は癌の転移の際に重要な役割をはたしていると考えられている<sup>18,19)</sup>。Ⅳ型コラーゲナーゼの発現は正常細胞では低く、高転移能を有する癌細胞で増加し<sup>20,21)</sup>、がん遺伝子導入などによって

Abbreviations: ATP, adenosine triphosphate; cDNA, complementary DNA; CsCl, cesium chloride; dCTP, deoxy-cytidine triphosphate; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; EGF, epidermal growth factor; GTC, guanidine thiocyanate; IL-1, interleukin-1; kb, kilo base pairs; kD, kilo Dalton; mRNA, messengerRNA; MMPs, matrix metalloproteinases; MNNG, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine; MOPS, 3-N-Morpholino-prop-

生じた転移形質の変化とⅣ型コラーゲナーゼの発現が相関する<sup>22)~27)</sup>と報告されている。また、実験的に再構成された基底膜へのがん細胞の浸潤は、キレート剤やⅣ型コラーゲナーゼに対する抗体を用いてⅣ型コラーゲナーゼの活性を阻害することにより抑制される<sup>28)~30)</sup>との報告もある。しかしこれらは一ないし数種類の高転移株における結果であり、その細胞系で言えた事がどこまで一般化できるか明らかではない。

また MMPs の酵素活性を阻害する TIMPs には TIMP-1<sup>31)32)</sup>, TIMP-2<sup>33)34)</sup>が報告されており、TIMP-1, TIMP-2 ともに活性型 MMPs と結合し、酵素活性を阻害する。そのうえ TIMP-1 は MMP-9 の、TIMP-2 は MMP-2 の前駆体とも 1 対 1 に結合して<sup>17)35)~38)</sup>その活性化を調節する。よって MMPs の活性は MMPs の活性型の量ばかりでなく TIMPs とのバランスのうえで考えなければならぬ。

以上のように腫瘍細胞における MMPs, TIMPs の一般的な発現の状態、および転移能との関連については系統的な基礎的情報が不足しているのが現状である。そこで今回著者は、MMPs の発現は各種の培養細胞でどのくらいの頻度でみられるか、その発現は細胞の種類や由来する臓器により特徴はあるか、などの MMPs の一般的な発現の状態および転移能とその発現の相関の有無を知り、MMPs の発現は転移能の指標となり得るのか、を検討する為に、Ⅳ型コラーゲンの分解に関わる酵素、MMP-2, MMP-3, MMP-9 およびその阻害物質、TIMP-1, TIMP-2 のヒト腫瘍由来培養細胞株における messengerRNA (mRNA) 発現の状態を調べた。26種(間葉系細胞9株、上皮系細胞17株)の細胞株を対象とした。また鶏卵法により転移能を測定し、MMPs の発現と転移能との関連を比較検討した。

#### 対象および方法

##### 1. 細胞培養

###### 1. 使用細胞とその培養条件

使用した培養細胞はすべてヒト細胞由来である。線維肉腫由来 HT1080, 骨肉腫由来 MG-63, U-20S, SK-ES-1, SAOS-2, HOS, KHOS312H, MNNG/HOS, 胃癌 KATOⅢ, 大腸癌 COLO320, 膀胱癌 T24, 咽頭癌 Hep-2 はアメリカンタイプカルチャーコレクション社 (Mayland, USA), NUGC-4 は JCRB 細胞バンク (東京) より入手した。その他の細胞のうち胃癌由来細胞 KKLS, NKPS は当教室で樹立されたもので、NAKAJIMA, ST-KM は、神奈川がんセンター, MKN28 は福島医科大学、鈴木博士より供与をうけた。肺癌細胞 PC-3, PC-6, PC-8, PC-9, PC-13, QG-56 は国立九州がんセンター、麻生博士より供与された。悪性繊維細胞腫由来の MFH-ST は神奈川県がんセンター、矢野間博士より、腎細胞癌 KN41 は、金沢大学泌尿器科、久住教授より供与された。KMS-6 細胞はヒト胎児組織より分離培養された線維芽細胞であり、KMST は KMS-6 細胞に $\gamma$ 線照射を行い不死化させ樹立した培養株<sup>39)</sup>で、兵庫医科大学、難波博士より供与された。KMST-ras は KMST 細胞に活性型 c-H-ras 癌遺伝子を導入して形質転換した細胞株で金沢大学がん研究所ウイルス部田中博士より供与された。以上の細胞はす

べて、10%非動化ウシ胎児血清 (M. A. Bioproducts, Walkersville, USA), 0.2mg/ml カナマイシン (和光, 大阪; 以下、試薬類で特に記載のないものは当社の製品を用いた。)を含むダルベッコ変法イーグル培地 (日本, 東京) を培養液とし、炭酸ガス培養器にて37℃, 5% CO<sub>2</sub> 存在下で培養した。

##### II. mRNA の解析

###### 1. 全 RNA の抽出

直径 15cm の細胞培養用ディッシュ (FALCON, New jersey, USA) にて細胞を培養しほぼ一面に増殖した時点で採取した。採取した細胞を 10mM リン酸緩衝液 (phosphate-buffered saline, PBS) にて 2 回洗浄し、20ml の guanidine thiocyanate 溶液 (GTC 溶液) [4M Guanidine thiocyanate (Fluka, Buchs, Switzerland), 25mM クエン酸ナトリウム, 0.5% N-ラウロイルサルコシン酸ナトリウム, 0.1M 2-メルカプトエタノール] を加えて、十分に懸濁する。懸濁した試料を 18ゲージの注射針を十数回通して DNA を分断する。ポリアロマー遠心チューブ (ベックマンジャパン, 東京) に 10ml の塩化セシウム溶液 (cesium chloride, CsCl) [5.7M CsCl, 0.1M エチレンジアミン四酢酸 (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)] を入れ、その上に試料を重層する。ベックマン SW27 スイングローター (ベックマンジャパン) にて、20℃, 27,000rpm, 22時間超遠心後、上清を DNA のバンドの下まで除く。CsCl 層の液面より少し上でチューブを切断し、液を除く。RNA の沈澱を 70% エタノールですすいだ後、沈澱を 1ml の蒸留水に溶解した。1/10 容量の 3M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.5) を加え、次いで 2.5容量のエタノールを加え、-80℃に 20分放置しエタノール沈澱を行った。沈澱を 1ml の Tris EDTA (TE) [10mM tris-hydroxymethyl-aminomethane (Tris)-HCl pH 8.0, 1mM EDTA pH 8.0] に溶解し、260nm の吸光度を測定し総 RNA 濃度を求めた。

###### 2. mRNA の抽出

90 $\mu$ l の全 RNA に対して 10 $\mu$ l の割合で 5M NaCl を加え、これを 6mg のオリゴ-dT セルロース (フナコン, 東京) と混合し室温で 1時間ゆっくり振とうして mRNA をセルロースに吸着させた。次ぎに遠心して得られた沈澱を 0.1% ドデシル硫酸ナトリウム (sodium dodecyl sulfate, SDS) に溶解し 37℃で 5 分間反応させて吸着している mRNA を溶出させた。最後に遠心してセルロースを除き、mRNA を含む上清を回収した。

###### 3. ノーザンブロットリング法

1 検体につき全 RNA 20 $\mu$ g に相当する mRNA 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-Morpholino-propanesulfonic acid (MOPS) (pH 7.5) に溶解し 65℃で 10分間反応させて mRNA の高次構造を崩した後、1.0%アガロースゲルにて 2% MOPS 中で電気泳動を行った。泳動終了後のゲルは 10X Saline sodium citrate (SSC) (3M NaCl, 0.3M Trisodium citrate) に浸し 15分間室温でゆっくり振とうさせた後、20X SSC を使用してイモビロニンフィルター (Millipore, Bedford, USA) に転写した。転写後のフィルターを 10X SSC に 5分間浸した後、UV ストラターリンカー 1800 (フナコン) を用いて波長 254nm の紫外線 1200マ

anesulfonic acid; PBS, phosphate-buffered saline; PCR, polymerase chain reaction; SDS, sodium dodecyl sulfate; SSC, saline sodium citrate; TE, Tris EDTA; TIMPs, tissue inhibitors of metalloproteinase; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor  $\alpha$ ; TPA, 12-0-tetradecanoylphorbol-13-acetate; Tris, tris-hydroxymethyl-aminomethane

マイクロジェールを照射し mRNA をフィルターに固定した。

#### 4. プロブの作成

本実験で使用したプロブ用 DNA を含むプラスミッド, MMP-2, MMP-3, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2, Actin 遺伝子は全て金沢大学がん研究所ウイルス部清水元治教授より分与された。

MMP-2 遺伝子は制限酵素 EcoRI (制限酵素類はすべて宝酒造, 京都を用いた), BamHI で切り出される 1.5 キロ塩基対 (kilo base pairs, kb) の相補的 DNA (complementary DNA, cDNA), MMP-3 遺伝子は SmaI, XhoI で切り出される 1.4 kb の cDNA, MMP-9 遺伝子は PstI, EcoRI で切り出される 1.2 kb の cDNA, TIMP-1 遺伝子は ClaI, BamHI で切り出される 600 bp の cDNA, TIMP-2 遺伝子は EcoRI, BglII で切り出される 690 bp の cDNA, Actin 遺伝子は PstI で切り出される 1.2 kb 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 (アマシャム・ジャパン, 東京) にて [ $\alpha$ - $^{32}$ P]デオキシリボシリン酸 (deoxycytidine triphosphate, dCTP) (アマシャム・ジャパン) を用いて標識し 2.0-5.0 CPM/ $\mu$ g の比活性を持つプロブを得た。

#### 5. ハイブリダイゼーション

mRNA を固定したフィルターを 50% ホルムアミド, 4X SSC, 5X デンハルト液 (1% ポリビニールピロリドン, 1% ウンシャルブミン, 1% フィコール), 0.1% SDS, 20  $\mu$ g/ml 変性サケ精子 DNA (ベーリンガー・マンハイム山之内, 東京), 200  $\mu$ g/ml polyA (コスモ・バイオ, 東京) からなるプレハイブリダイゼーション液 5ml と共にプラスチックバックに入れ, 42°C で 4 時間反応させた。続いてこのプレハイブリダイゼーション液を捨て 1ml のハイブリダイゼーション液 (プレハイブリダイゼーション液に標識したプロブ 10ng を加えたもの) を入れ, 42°C で 16 時間反応させた。

反応の終了したフィルターはまず 1X SSC にて室温 15 分間で洗浄し, さらに 0.2X SSC にて 68°C で 30 分間, 2 回洗浄した。洗浄後のそれぞれのフィルターの放射活性に準じて -80°C で 3 時間から 240 時間のオートラジオグラフィーを試行した。なお検出される断片の大きさの評価はアガロース電気泳動の際に, Hind III で切断し [ $\alpha$ - $^{32}$ P] dCTP にて標識した  $\lambda$  DNA 約 100ng を標準として同時に泳動しその位置から計算した。

### III. 鶏卵法による転移能検定<sup>40)</sup>

#### 1. 鶏卵法

授精鶏卵 (Plymouth Rock  $\times$  White Leghorn) は後藤ふ卵場 (岐阜) より購入後, 加湿したふ卵器内 37°C でふ卵した。ふ卵 11 日目の鶏卵を透光し漿尿膜の血管を確認し, 血管の発達した部位にて回転式のヤスリを用いて卵殻膜に約 1cm 四方の傷をつけ, ピンセットで卵殻を除去した。露出した卵殻膜に流動パラフィン (Merck, Darmstadt, Germany) を塗布して血管を見やすくして, 30 ゲージ針をつけた注射器を用いて  $10^6$  個の腫瘍細胞を漿尿膜の血管内に注入した。なお腫瘍細胞は  $1 \times 10^7$  個/ml の濃度に調製した。

腫瘍注入後 7 日目に鶏卵を解剖し, 鶏卵胎児より肝臓を取り出した。

#### 2. DNA の抽出

肝臓を鉢にて細切した後 20ml の GTC 液を加え素早くホモジナイザー (ヤマト科学, 東京) にてホモジナイズした。先の方

法と同様に超遠心を行い全 RNA を抽出した。この時遠心後のチューブより DNA の層をパスツールピペットにて取り出し透析チューブ (三光純薬, 東京) にて 5L の TE にて 24 時間透析を行い DNA を抽出し 260nm の吸光度を測定し濃度を求めた。

#### 3. 試験管内 DNA 増幅反応 (polymerase chain reaction, PCR) 法

鶏卵胎児肝臓より抽出した DNA 1  $\mu$ g を鋳型として PCR 法にてヒト  $\beta$  グロビン鎖遺伝子を増幅し転移能の有無を検出した。1 検体 50  $\mu$ l にて熱変性 94°C 2 分, アニーリング 55°C 1 分, 伸長反応 72°C 1 分を 25 サイクル繰り返した。ヒト  $\beta$  グロビン鎖遺伝子のプラス鎖 AGAGCCATATTGCTTACA 20 塩基, マイナス鎖 TATGACATGAACTAA 20 塩基をプライマーとして 567 塩基対の PCR 産物を得た。なおプライマーおよびプロブとして使用した合成オリゴヌクレオチドは金沢大学がん研究所化学療法部遠藤良夫博士より分与を受けた。

#### 4. サザンブロットング法

PCR 法にて得られた試料を 6% アクリルアミドゲルにて電気泳動した。泳動を行ったゲルを 0.1 規定の水酸化ナトリウム水溶液内にて 10 分間振とうしてアルカリ変性を行った。セミドライ式エレクトロブロットング装置 (マリソル, 東京) を用い 15V 定電圧, 2 時間にて, イモビロン N フィルター (Millipore, Bedford, USA) に転写した。転写後のフィルターを 10X SSC に 5 分間浸した後, UV ストラターリンカー 1800 (フナコシ) を用いて波長 254nm の紫外線 1200 マイクロジェールを照射し DNA をフィルターに固定した。

#### 5. プロブの作成

PCR 法により増幅して得られる 567 塩基対内で特異性の高い配列をプロブとして使用した。20 塩基 (ACACAACGTGTGTCCTAGC) の合成オリゴヌクレオチド 10 pmole を T4 ポリヌクレオチドキナーゼを用いて, 5' 末端 OH 基を [ $\gamma$ - $^{32}$ P] adenosine triphosphate (ATP) (アマシャム・ジャパン) にて標識した。

#### 6. ハイブリダイゼーション

DNA を固定したフィルターをラピッド・ハイブリダイゼーション・バッファー (アマシャム・ジャパン) 2ml と共にプラスチックバックに入れ, 68°C で 1 時間反応させた。続いてこのプレハイブリダイゼーション液を捨て, 1ml のハイブリダイゼーション液 (ラピッド・ハイブリダイゼーション・バッファーに標識したプロブを加えたもの) を入れ, 42°C で 4 時間反応させた。

反応の終了したフィルターはまず 2X SSC にて室温 15 分間で洗浄し, さらに 2X SSC にて 55°C で 15 分間, 2 回洗浄した。洗浄後のそれぞれのフィルターは, イメージアナライザー BA100 (富士フイルム, 東京) にて放射活性を定量した。なお検出される断片の大きさの評価はアクリルアミド電気泳動の際に, Sau3A で切断し [ $\alpha$ - $^{32}$ P] dCTP にて標識した puc19 プラスミッド DNA 約 100ng を標準として同時に泳動しその位置から計算した。

#### 7. 転移能の評価

腫瘍細胞を注入していない鶏卵胎児より抽出した DNA に HT1080 細胞より抽出した DNA を  $10^{-1}$  ~  $10^{-5}$   $\mu$ g までの 10 段階希釈量をそれぞれ加え, 総 DNA 量 1  $\mu$ g としたものを鋳型 DNA として PCR 法を行った。PCR 産物をサザンブロットハイブリダイゼーション法により検出し, その放射活性より標

準曲線を得た。各検体の放射活性を標準曲線より鋳型 DNA 1  $\mu\text{g}$  当たりの DNA 量に換算し、転移能を評価した。1  $\mu\text{g}$  当たり 10ng 以上を転移+, 0.5~10ng/ $\mu\text{g}$  を土, 0.5ng/ $\mu\text{g}$  以下を-とした。

## 成 績

### 1. ヒト培養細胞における MMPs およびその阻害因子の mRNA 発現

#### 1. ヒト培養細胞26株における発現

##### 1) MMP-2, MMP-3, MMP-9 の mRNA 発現 (図 1. A)

ヒト腫瘍由来培養細胞26株について MMPs の mRNA 発現をノーザンブロットハイブリダイゼーション法にて検討した。間葉系細胞は, HT1080, MFH-ST, および骨肉腫 7 株, 上皮系細胞は胃癌 7 株, 肺癌 6 株, その他 4 臓器の腫瘍由来細胞を対象とした。MMP-2 と MMP-9 において間葉系と上皮系ではその発現は明らかな差を示した。MMP-2 は間葉系の細胞では 9 株全てにその発現がみられたが, 上皮系の細胞で発現があったものは, 17 株中 4 株にすぎず, MMP-9 の発現も間葉系腫瘍細胞では 9 株中 6 株と高頻度に発現していたが上皮系においてはその発現のみられたものは, 2 細胞 (NKPS, PC-8) だけであっ

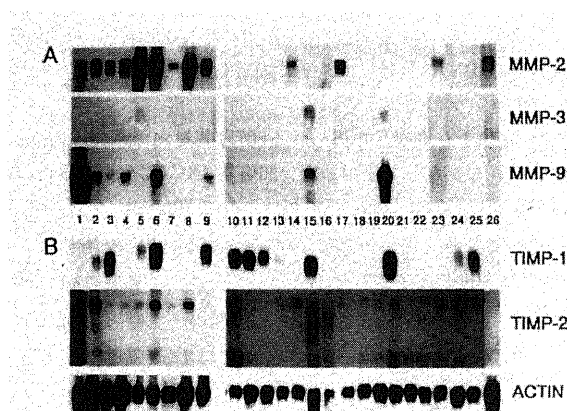


Fig. 1. Expression of mRNA for type IV collagen degrading metalloproteinases and TIMPs in various tumor cells. Northern blots of mRNA isolated from human tumor cell lines in culture were performed. Lanes 1 to 9 are cell lines originating from mesenchymal tumors and lanes 10 to 26 are from epithelial tumors. 20  $\mu\text{g}$  of each sample was electrophoresed and transferred to membranes as described in "Materials and Methods". A, Northern blots were hybridized with  $^{32}\text{P}$ -labeled cDNA probes of MMP-2, MMP-3, MMP-9 and Actin. Molecular sizes of the transcripts are 3.1, 2.0 and 2.8 kb for MMP-2, MMP-3 and MMP-9 respectively. B, Northern blots were hybridized with  $^{32}\text{P}$ -labeled cDNA probes of TIMP-1, TIMP-2. Molecular sizes of the transcripts are 0.9 kb for TIMP-1 mRNA and two messages of 3.5 and 1.0 kb for TIMP-2 mRNA. Cell lines: lane 1, HT1080; lane 2, MSH-ST; lane 3, SAOS-2; lane 4, SK-ES-1; lane 5, MG-63; lane 6, U-20S; lane 7, KHOS312H; lane 8, HOS; lane 9, MNNG/HOS; lane 10, MKN-28; lane 11, ST-KM; lane 12, NAKAJIMA; lane 13, KATOIII; lane 14, NUGC-4; lane 15, NKPS; lane 16, KKLS; lane 17, QG-56; lane 18, PC-13; lane 19, PC-9; lane 20, PC-8; lane 21, PC-6; lane 22, PC-3; lane 23, COLO320; lane 24, Hep-2; lane 25, T24; lane 26, KN41.

た。MMP-3 の発現は検討した 26 株中 3 株 (MG-63, NKPS, PC-8) のみでみられ, 他の MMPs に比してその発現が限られておきかつ弱かった。上皮系の細胞で MMP-3 の発現がみられた NKPS, PC-8 では, MMP-9 の発現が同時に認められた。

#### 2) TIMP-1, TIMP-2 の発現 (図 1. B)

TIMP-1 の発現はほとんどの細胞でみられたが, その発現量には細胞間でかなり差があり, 約半数の細胞にて低下していた。TIMP-1 は MMPs の活性型と複合体を作りその酵素活性を阻害する。MMP-9 とはその前駆体と特異的に 1:1 の複合体を形成する<sup>17)35)</sup>とされているが, 培養細胞における TIMP-1 の発現のパターンと MMP-9 の発現とは特に関連はみられなかった。一方 TIMP-2 は, TIMP-1 同様 MMPs の酵素活性を阻害し, MMP-2 の前駆体と 1:1 の特異的複合体を形成する<sup>35)~38)</sup>ことが報告されている。TIMP-2 の mRNA として 1.0

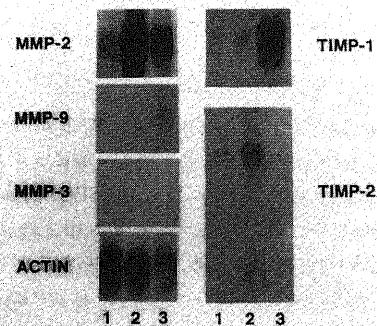


Fig. 2. Expression of Metalloproteinases mRNA in HOS and their transformants. Northern blots were performed with mRNA from human osteosarcoma (HOS) (lane 1), revertant of HOS cells transformed by Kirsten murine sarcoma virus, KHOS312H (lane 2) and HOS cells transformed in vitro by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG), MNNG/HOS (lane 3). Probes were  $^{32}\text{P}$ -labeled cDNAs as in Fig. 1.

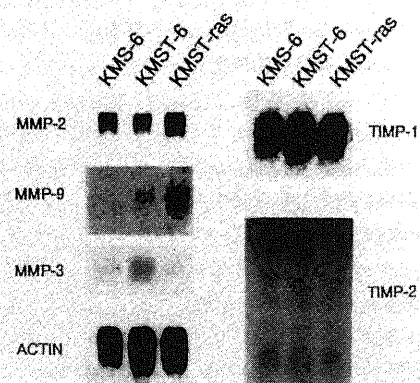


Fig. 3. Expression of MMP-9 mRNA in human embryonic fibroblasts transformed with c-H-ras. Northern blots were performed with mRNA from human embryonic fibroblasts (KMS-6), cells immortalized by  $\gamma$ -ray irradiation (KMST-6), and cells transformed by transfecting c-H-ras oncogene (KMST-ras). Probes were  $^{32}\text{P}$ -labeled cDNAs as in Fig. 1.

kb および 3.5kb 二つの転写物が得られ、これらの発現は間葉系、上皮系共に広範にほぼ同程度にみられ、MMP-2 の発現とは関連も認められなかった。

## 2. HOS 細胞およびその形質転換株における MMPs の発現 (図 2)

間葉系細胞 HOS は骨肉腫由来の細胞で造腫瘍性のないことが報告されている。KHOS312H は HOS を Kirsten murine sarcoma virus により形質転換したものの復古体であり、MNNG/HOS は HOS 細胞を発ガン物質である N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) にて処理を行い形質転換させた株である<sup>41)</sup>。これらの細胞株において MMP-2 は MNNG/HOS だけでなく HOS, KHOS312H 細胞にても程度の差はあれ発現が見られるのに対して、MMP-9 は HOS, KHOS312H で発現はほとんどみられず、ヌードマウスにおける造腫瘍性を持つ MNNG/HOS でその発現が強く認められた。

## 3. ヒト胎児由来線維芽細胞の形質転換と MMPs およびその阻害因子の発現 (図 3)

KMS-6 はヒト胎児より分離培養された線維芽細胞で、KMST は KMS に  $\gamma$  線照射を行い不死化し株化したもの<sup>40)</sup>、KMST-ras は KMST に c-H-ras 遺伝子を導入して形質転換したものである。ヌードマウスにおいて KMST-ras は造腫瘍性を示すが KMS-6, KMST には造腫瘍性はみられない。ノーザンブロットハイブリダイゼーションにて MMP-2 の mRNA 発現は線維芽細胞である KMS-6 にてもみられ発現レベルに差はなかった。一方 MMP-9 は KMS-6 では発現はみられず、造腫瘍性を有する KMST-ras において高い発現がみられた。MMP-3, TIMP-1, TIMP-2 の発現にはいずれも変化はなかった。

## II. 鶏卵法による転移能の測定 (図 4, 表 1)

ヒト腫瘍由来培養細胞の転移能を鶏卵法により検討したところ、間葉系細胞では HT1080, SK-ES-1, MNNG/HOS, 上皮系では KKLS, T24 細胞にてヒト  $\beta$  グロビン遺伝子に由来する PCR 産物が検出され、肝臓に転移したヒト腫瘍細胞の増殖が確認された。サザンブロットハイブリダイゼーションによる PCR 産物の放射活性を鋳型 DNA 1  $\mu$ g 当たりの HT1080 細胞の DNA 量に換算して転移能を検討した。上記の 5 細胞は転移 + (100ng/ $\mu$ g 以上), MG-63, PC-8, Hep2, COLO320 は  $\pm$  (0.5–10ng/ $\mu$ g), そのほかの細胞では転移 - (0.5ng/ $\mu$ g 以下) であった。間葉系でこれら転移が認められた細胞では MMP-9 の発現がみられ、特に HT1080, SK-ES-1 細胞では MMP-9 の発現は高く、TIMP-1 は発現が低かった。3 細胞とも MMP-2 の発現は中程度みられ、MMP-3 の発現は認められなかった。転移が認められない細胞のうち HOS, KHOS312H では MMP-9, MMP-3 の発現はみられなかった。SAOS-2, U2OS 細胞では MMP-9 は発現しているが TIMP-1 のレベルが高かった。先に述べたように MMP-2 の発現は間葉系細胞で恒常的にみられておりその発現量と転移能とは関連はみられなかった。

一方、上皮系細胞で転移巣形成がみられた KKLS, T24 細胞では MMP-2, MMP-3, MMP-9 いずれの発現もみられなかった。KKLS では TIMP-1 の発現は低かったが、T24 細胞では中程度の発現が認められた。また、MMP-9 の発現が見られた NKPS では転移がみられなかった。MMP-2 の発現がみられた NUGC-4, QG-56, KN41 も転移は認められなかった。その他の転移がみられなかった細胞は MMP-2, MMP-3, MMP-9 いずれ

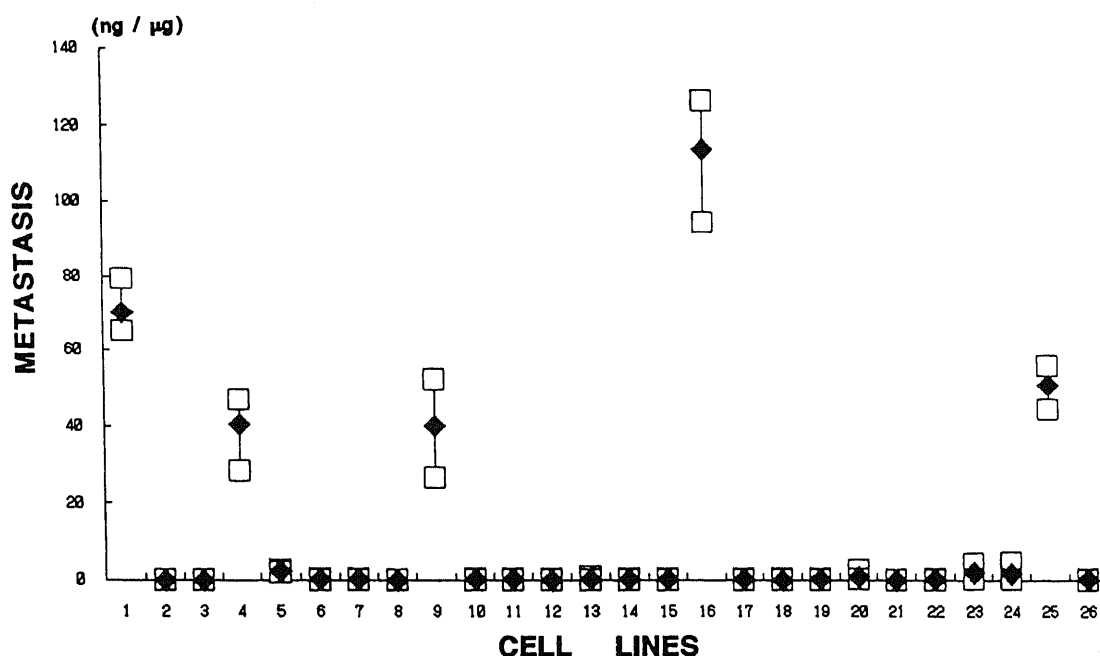


Fig. 4. Metastatic potential of various human tumor cell lines analyzed by detecting metastasized human tumor cells in embryonic chicks using the polymerase chain reaction (PCR). Tumor cells were inoculated into the chorioallantoic membrane vein of the chick embryo and DNA of each embryonic liver was extracted. A human  $\beta$ -globin-related sequence (567bp) in the DNA from the chick liver was amplified and detected by specific  $^{32}$ P-labeled oligonucleotide probes. Radioactivity of amplified PCR-products were measured by the image analyzer BA100 (Fuji film) and presented as (DNA contents)/(template DNA 1  $\mu$ g). Numerals in the abscissa indicate cell lines described in Fig. 1;  $\blacklozenge$ , the average value;  $\square$ — $\square$ , the range from maximum to minimum values.

の発現も認められなかった。MMP-3 の発現のみられた 3 細胞のうち、MG-63, PC-8 では弱く転移能を示したが、NKPS では転移はみられなかった。以上、MMPs の発現と腫瘍細胞の転移能との間には一般的に成立する関連は認められなかった。しかし間葉系細胞では MMP-9 を発現している腫瘍細胞のみが転移巣を形成した。

### 考 察

N 型コラーゲンを分解する酵素 MMP-2, MMP-3, MMP-9 およびその阻害物質である TIMP-1, TIMP-2 のヒト腫瘍由来培養

Table 1. Metastatic potential of various human tumor cell lines

cell lines	meta.
1 HT1080	+
2 MFH-ST	N.D.
3 SAOS-2	-
4 SK-ES-1	+
5 MG-63	±
6 U-20S	-
7 KHOS312H	-
8 HOS	-
9 MNNG/HOS	+
10 MKN28	-
11 ST-KM	-
12 NAKAJIMA	-
13 KATOIII	-
14 NUGC-4	-
15 NKPS	-
16 KKLS	+
17 QG-56	-
18 PC-13	-
19 PC-9	-
20 PC-8	±
21 PC-6	-
22 PC-3	-
23 COLO320	±
24 Hep-2	±
25 T24	+
26 KN41	-

Metastasis were assessed by analyzing metastasized human tumor cells in embryonic chicks by polymerase chain reaction (PCR) as described in Fig. 4. Metastatic potential was determined by radioactivity of the PCR-products: metastasis +, more than 10 ng/ $\mu$ g; ±, 0.5-10ng/ $\mu$ g; -, less than 0.5ng/ $\mu$ g; N.D., not determined.

細胞における mRNA 発現を調べ、その鶏卵法による転移能との相関を検討した。ヒト腫瘍由来培養細胞における MMPs の発現は間葉系細胞と上皮系細胞ではその発現に明らかな差がみられた。

MMP-2 は間葉系の細胞では検討した 9 株全てにその発現がみられ正常線維芽細胞である KMS-6 にても発現していたが、上皮系の細胞で発現があったものは 17 株中 4 株にすぎなかった。また既に Collier らにより報告されている様に MMP-2 の発現が線維芽細胞ではみられるが正常の上皮細胞ではみられない<sup>15)</sup> ことより、MMP-2 の発現は腫瘍に特徴的であると言うよりも細胞の種類によるものと考えられる。間葉系細胞におけるこのような MMP-2 の恒常的な発現は間葉系細胞を取り巻く細胞外マトリックス成分の分解と合成、間質の維持において MMP-2 が基本的な役割を果たしていることを示唆する。上皮系細胞で MMP-2 の発現がみられた 4 株も鶏卵法では肝臓に転移巣を形成しなかった。これまで MMP-2 の mRNA 発現と酵素活性が、c-H-ras 遺伝子により形質変換した気管支上皮細胞株における浸潤転移能と密に関連する<sup>40)41)</sup> など、癌の転移の際の MMP-2 の関与が報告されているが、今回の検討では培養細胞における MMP-2 の発現と転移能とは相関は認められず、MMP-2 の発現が転移能の指標とはならない事が示された。

MMP-3 については、その発現は検討した 26 株中 3 株 (MG-63, NKPS, PC-8) のみでみられ、他の MMPs に比してその発現が限られておるか弱かった。またその発現と転移能とは関連は認めなかった。

一方 MMP-9 の発現は間葉系細胞では 9 株中 6 株で発現がみられたがヌードマウスにおける造腫瘍性がない HOS, KHOS312H では MMP-9 の発現はみられなかった。HOS 細胞に MNNG 処理する事により得られた MNNG/HOS 細胞<sup>42)</sup> はヌードマウスでの造腫瘍性を持ち、MMP-9 が強く発現していた。また正常線維芽細胞 KMS-6 およびその株化した造腫瘍性がない KMST<sup>39)</sup> では MMP-9 の発現はみられなかったが、活性型 c-H-ras 癌遺伝子により形質転換した造腫瘍性を有する KMST-ras において MMP-9 の発現は強くみられるようになった。この事は、癌遺伝子により形質転換した細胞株において、その転移能と MMP-9 の分泌が相関する<sup>29)27)</sup> ことと合致し、MMP-9 はその発現が悪性化形質と相関があると考えられる。鶏卵法にて強く転移が示された HT1080, SK-ES-1, MNNG/HOS 細胞では MMP-9 の発現がみられ、特に HT1080, SK-ES-1 では MMP-9 の発現が高く TIMP-1 の発現は低く、相対的 MMP-9 の活性が高い事が予想された。鶏卵法にて転移の認められなかった細胞のうち、HOS, KHOS312H は MMP-9 の発現がなく、SAOS-2, U-20S では MMP-9 は発現しているも TIMP-1 のレベルが高く、転移のみられなかった細胞では MMP-9 の活性が低いことが推測された。これらの事より間葉系細胞において MMP-9 は癌細胞の転移に必要な条件の一つとして重要な役割を果たしていると考えられる。また他の転移形成の必要条件として TIMP-1 の発現低下が考えられた。

しかし、上皮系細胞においては強く転移のみられた KKLS, T24 細胞では MMPs いずれの発現もみられなかった。また、MMP-9, MMP-3 の発現がみられた NKPS 細胞では転移がみられず、試験管内培養における MMPs の発現と転移能とはなら相関がみられなかった。

ところで MMPs の発現は、MMP-3 は 12-*o*-tetradecanoylp-

horbol-13-acetate (TPA)<sup>48</sup>, インターロイキン-1 (Interleukin-1, IL-1)<sup>49-50</sup>, epidermal growth factor (EGF)<sup>51</sup>などで誘導されることが, MMP-9 は TPA<sup>48,49</sup>, IL-1, 腫瘍壊死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF  $\alpha$ )<sup>50</sup>などで誘導されることが報告されており, 現に MMP-9 の発現の見られなかった T24 細胞も TPA 刺激により MMP-9, MMP-3 が誘導され<sup>51</sup>, 試験管内培養にて MMP-9 の発現がみられなかった場合も遺伝子の欠損などではなく誘導可能な状態にあることが判明した. さらに腫瘍細胞をヌードマウスの腹腔内に投与することにより MMP-9 が誘導される<sup>50</sup>ことや, ヌードマウス移植細胞が移植部位により IV 型コラーゲナーゼの誘導が起こる<sup>52,53</sup>ことが既に報告されており, 生体内ではサイトカイン等で MMP-9 が誘導されるであろうことが推察される. 転移能との関連をみるためには生体内, 転移能における発現を検討する事が必要と考えられた.

以上, MMPs と転移との関連についてまとめると, 培養細胞における MMP-2, MMP-3 の発現と細胞の悪性化形質, 転移能とは相関はみられなかった. 間葉系細胞においては, MMP-9 の発現とヌードマウスにおける造腫瘍性ならびに鶏卵法による転移能とに相関がみられた. しかし, MMP-9 の発現があっても転移のみられない細胞があり, MMP-9 の発現は転移において十分条件ではないと考えられる. 転移に関与する因子の1つとして TIMP-1 の発現のレベルが影響することが考えられた. TIMP-1 の発現量をアンチセンス RNA により低下させると Swiss 3T3 細胞が造腫瘍性を獲得すること<sup>54</sup>, リコンビナント TIMP-1 により実験的癌の浸潤転移が抑制される<sup>55-57</sup>ことなどより, TIMPs は MMPs の働きを阻害することによって転移の抑制因子として働くと考えられる. 転移能の高い細胞では TIMP-1 蛋白の量が少ない<sup>58</sup>との報告もある. 鶏卵法で転移が認められた HT1080, SK-ES-1, KKLS では TIMP-1 の発現が少なく, 反対に MMP-9 の発現はあったが TIMP-1 の発現が高かった NKPS, SAOS-2, U-20S 細胞では転移は認められなかった. これらのことより転移抑制に対する TIMP-1 の関与が示唆された. また, 試験管培養にて MMP-9 の発現がみられなかった場合でも生体内ではサイトカイン等で誘導されるであろうことが推察された. MMP-9 の活性は, mRNA への転写の段階, タンパクの合成量, 活性化, そして阻害物質 TIMPs とのバランスと他段階で調節されている. 今後は, 生体内, 転移形成時における MMPs の発現誘導, 活性化, TIMPs との関連についても検討していく予定である.

## 結 論

ヒト腫瘍細胞株26種における IV 型コラーゲンの分解に関わる酵素, MMP-2, MMP-3, MMP-9 およびその阻害物質 TIMP-1, TIMP-2 の mRNA 発現ならびに鶏卵法による転移能を比較, 検討し, 癌の転移における MMPs の役割を検討した.

1. MMP-9 を発現している間葉系細胞のうち, 7 例中 3 例が転移能を示し, これら 3 例の細胞では 2 例に TIMP-1 の発現低下が認められた.

2. MMP-9 を発現していない間葉系細胞は鶏卵法で転移能がほとんどみられなかった. MMP-9 を発現していて転移がみられなかった間葉系細胞では TIMP-1 の発現が高かった.

3. 上皮系細胞では MMP-9 の発現と転移能とは相関がみられなかった.

4. MMP-2, MMP-3 の発現は間葉系, 上皮系いずれのがん

細胞においても転移と相関はなかった.

以上の事から間葉系細胞においては MMP-9 の発現と TIMP-1 の発現低下が転移能の指標となり得るが, MMP-2, MMP-3 についてはその試験管培養での発現は転移能の指標とはなり得ない事を結論した.

## 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磨伊正義教授に深甚なる謝意を表します. また終始直接の御指導を戴きました金沢大学がん研究所ウイルス部清水元治教授, 佐藤博助手に深謝致します. さらに鶏卵法の検討に際して御教示, ご協力いただきました金沢大学がん研究所化学療法部佐々木琢磨教授, 遠藤康夫博士に深謝します. 最後に多大なる御協力を賜りました金沢大学がん研究所外科部ならびにウイルス部の皆様へ厚く御礼申し上げます.

なお, 本論文の要旨の一部は, 第50回日本癌学会総会 (1991年, 東京) において発表した.

## 文 献

- 1) Nicolson, G. L.: Cancer metastasis, organ colonization and the cell-surface properties of malignant cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **695**, 113-176 (1982).
- 2) Schirrmacher, V.: Cancer metastasis: experimental approaches, theoretical concepts, and impacts for treatment strategies. *Adv. Cancer Res.*, **43**, 1-65 (1985).
- 3) Liotta, L. A., Kleinerman, J., Carnzara, P. & Rynbrandt, D.: Degradation of basement membrane by murine tumor cells. *J. Natl. Cancer Inst.*, **58**, 1427-1439 (1977).
- 4) Martinez-Hernandez, A. & Amenta, P. S.: The basement membrane in pathology. *Lab. Invest.*, **48**, 656-677 (1983).
- 5) Liotta, L. A., Tryggvason, K., Garbisa, S., Hart I., Foltz, C. M. & Shafie, S.: Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature*, **284**, 67-68 (1980).
- 6) Liotta, L. A.: Tumor invasion and metastasis-role of the extracellular matrix. *Cancer Res.*, **46**, 1-7 (1986).
- 7) Liotta, L., A.: Tumor invasion and metastasis-role of the basement membrane. *Am. J. Pathol.*, **117**, 339-348 (1984).
- 8) Matrisian, L. M.: Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Trends Genet.*, **6**, 121-125 (1990).
- 9) Frederick Woessner, J. Jr.: Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEBJ.*, **5**, 2145-2154 (1991).
- 10) Fessler, L. I., Duncan, K. G. & Flessler J. H.: Characterization of the procollagen IV cleavage products produced by a specific tumor collagenase. *J. Biol. Chem.*, **259**, 9783-9789 (1984).
- 11) Chin, J. R., Murphy, G. & Werb, Z.: Stromelysin, a connective tissue-degrading metalloendopeptidase secreted by stimulated rabbit synovial fibroblasts in parallel with collagenase. *J. Biol. Chem.*, **260**, 12367-12376 (1985).
- 12) Okada, Y., Nagase, H. & Harris, E. D. Jr.: A



- metalloproteinase from human rheumatoid synovial fibroblasts that digests connective tissue matrix components. *J. Biol. Chem.*, **261**, 14245-14255 (1986).
- 13) **Willhelm, S., Collier, I., Kronberger, A., Eisen, A., Marmer, B., Grant, G., Bauer, E. A. & Goldberg, G. I.**: Human skin fibroblast stromelysin: structure, glycosylation, substrate specificity, and differential expression in normal and tumorigenic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 6725-6729 (1987).
- 14) **Liotta, L. A., Abe, S., Robey, P. G. & Martin G. R.**: Preferential digestion of basement membrane collagen by an enzyme derived from a metastatic murine tumor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 2268-2272 (1979).
- 15) **Collier I. E., Wilhelm, S. M., Eisen, A. Z., Marmer, B. L., Grant, G. A., Seltzer, J. L., Kronberger, A., He, C., Bauer, E. A. & Goldberg G. I.**: H-ras oncogene transformed human bronchial epithelial cells (TBE-1) secrete a single metalloproteinase capable of degrading basement membrane collagen. *J. Biol. Chem.*, **263**, 6579-6587 (1989).
- 16) **Murphy, G., Rynolds, J. J., Bretz, U. & Baggiolini, M.**: Partial purification of collagenase and gelatinase from human polymorphonuclear leukocytes. Analyses of their actions on soluble and insoluble collagens. *J. Biol. Chem.*, **203**, 209-221 (1982).
- 17) **Wilhelm, S. M., Collier, I. E., Eisen, A. Z., Marmer, B. L., Grant, G. A. & Goldberg G. I.**: 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).
- 18) **Mc Donnell, S. & Matrisian, L. M.**: Stromelysin in tumor progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.*, **9**, 305-319 (1990).
- 19) **Stetler-Stevenson, W. G.**: Type IV collagenases in tumor invasion and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.*, **9**, 289-303 (1990).
- 20) **Moteagudo, C., Merino, M., San-Juan, J., Liotta, L. A. & Stetler-Stevenson W. G.**: Immunohistologic distribution of type IV collagenase in normal, benign and malignant breast tissue. *Am. J. Pathol.*, **136**, 585-592 (1990).
- 21) **Levy, A. T., Cioce, Y., Sobel, M. E., Garbisa, S., Grigioni, W. F., Liotta, L. A. & Stetler-Stevenson W. G.**: Increased expression of the Mr 72000 type IV collagenase in human colonic adenocarcinoma. *Cancer Res.*, **51**, 439-444 (1991).
- 22) **Nakajima, M., Welch, D., Belloni, P. N. & Nicolson, G. L.**: Degradation of basement membrane type IV collagen and lung subendothelial matrix by rat mammary adenocarcinoma cell clones of differing metastatic potentials. *Cancer Res.*, **47**, 4869-4876 (1987).
- 23) **Turpeenniemi-Hujanen, T., Thorgeirsson, U. P., Hart, I. R., Grant, S. S. & Liotta, L. A.**: Expression of collagenase IV (basement membrane collagenase) activity in murine tumor cell hybrids that differ in metastatic potential. *J. Natl. Cancer Inst.*, **75**, 99-103 (1985).
- 24) **Garbisa, S., Pozzatti, R., Muschel, J., Saffiotti, U., Ballin, M., Goldfarb, R. H., Khoury, G. & Liotta, L. A.**: Secretion of type IV collagenolytic protease and metastatic phenotype: Induction by transfection with c-H-ras but not c-H-ras plus Ad2-Ela. *Cancer Res.*, **47**, 1523-1528 (1987).
- 25) **Bernhard, E. J., Muschel, J. & Hughes, E. N.**: Mr 92,000 gelatinase release correlates with the metastatic phenotype in transformed rat embryo cells. *Cancer Res.*, **50**, 3872-3877 (1990).
- 26) **Yamagata, S., Ito, Y., Tanaka, R. & Shimizu, S.**: Gelatinases of metastatic cell lines of murine colonic carcinoma as detected by substrate-gel electrophoresis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **151**, 158-162 (1988).
- 27) **Ballin, M., Gmez, D. E., Sinha, C. C. & Thorgeirsson, U. P.**: Ras oncogene mediated induction of a 92kDa metalloproteinase; Strong correlation with the malignant phenotype. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **154**, 832-838 (1988).
- 28) **Wang, M. & Stearns, M. E.**: Blocking of collagenase secretion by estamustine during *in vitro* tumor cell invasion. *Cancer Res.*, **48**, 6262-6271 (1988).
- 29) **Reich, R., Thompson, E., Iwamoto, Y., Martin G. R., Deason, J. R., Fuller, G. C. & Miskin, R.**: Effects of inhibitors of plasminogen activator, serine proteinases, and collagenase IV on the invasion of basement membranes by metastatic cells. *Cancer Res.*, **48**, 3307-3312 (1988).
- 30) **Hoyhtya, M., Hujanen, E., Turpeenniemi-Hujanen, T., Thorgeirsson, U., Liotta, L. A. & Tryggvason, K.**: Modulation of type IV collagenase activity and invasive behavior of metastatic human melanoma (A2058) cells *in vitro* by monoclonal antibodies to type IV collagenase. *Int. J. Cancer*, **46**, 282-286 (1990).
- 31) **Carmichael, D. F., Sommer, A., Thompson, R., Anderson, D. C., Smith, C. G., Welgus, H. G. & Stricklin, G. P.**: Primary structure and cDNA cloning of human fibroblast collagenase inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 2407-2411 (1986).
- 32) **Docherty, A. J. P., Lyons, A., Smith, B. J., Wright, E. M., Stephens, P. E., Harris, T. J. R., Murphy, G. & Reynolds, J. J.**: Sequence of human tissue inhibitor of metalloproteinases and its identity to erythroid potentiating activity. *Nature*, **318**, 66-69 (1985).
- 33) **Stetler-Stevenson, W. G., Krutzsch, H. C. & Liotta, L. A.**: Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-2). *J. Biol. Chem.*, **264**, 17374-17378 (1989).
- 34) **Boone, T. C., Johnson, M. J., De Clerck, Y. A. & Langley, K. E.**: cDNA cloning and expression of a metalloproteinase inhibitor related to tissue inhibitor of metalloproteinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 2800-2804 (1990).
- 35) **Goldberg, G. I., Marmer, B. L., Grant, G. A., Eisen, A. Z., Wilhelm, S. & He, C.**: Human 72-kilodalton type IV collagenase forms a complex with a tissue inhibitor of metalloproteinase designated TIMP-2. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

- USA, 86, 8207-8211 (1989).
- 36) Holkenbrock, H., Orgel, D., Hecker-Kia, A., Noack, W. & Ulbrich, N.: The complex between a tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP-2) and 72-kDa progelatinase is a metalloproteinase inhibitor. *Eur. J. Biochem.*, 198, 775-781 (1991).
- 37) Howard, E. W., Bullen, E. C. & Banda, M. J.: Regulation of the autoactivation of human 72-kDa progelatinase by tissue inhibitor of metalloproteinases-2. *J. Biol. Chem.*, 266, 13065-13069 (1991).
- 38) Howard, E. W., Bullen, E. C. & Banda, M. J.: Preferential inhibition of 72- and 92-kDa gelatinases by tissue inhibitor of metalloproteinases-2. *J. Biol. Chem.*, 266, 13070-13075 (1991).
- 39) Namba, M., Nishitane, K., Hyodoh, F., Fukushima, F. & Kimoto, T.: Neoplastic transformation of human diploid fibroblasts (KMST-6) by treatment with <sup>60</sup>Co gamma rays. *Int. J. Cancer*, 35, 275-280 (1985).
- 40) Endo, Y., Sasaki, T., Harada, F. & Noguchi M.: Specific detection of metastasized human tumor cells in embryonic chicks by the polymerase chain reaction. *Jpn. J. Cancer Res.*, 81, 723-726 (1990).
- 41) Rhim, J. S., Putman, D. L., Arnstein, P., Huebner, R. J. & McAllister, R. M.: Characterization of human cells transformed *in vitro* by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Int. J. Cancer*, 19, 505-510 (1977).
- 42) Bonfil, D. R., Reddel, R. R., Ura, H., Reich, R., Fridman, R., Harris, C. C. & Klein-Szanto, A. J. P.: Invasive and metastatic potential of v-Ha-ras-transformed human bronchial epithelial cell line. *J. Natl. Cancer Inst.*, 81, 587-594 (1990).
- 43) Ura, H., Bonfil, R. D., Reich, R., Reddel, R., Pfeifer, A., Harris, C. C. & Klein-Szanto, A. J. P.: Expression of Type IV collagenases and procollagen genes and its correlation with the tumorigenic, invasive, and metastatic abilities of oncogene-transformed human bronchial epithelial cells. *Cancer Res.*, 49, 4615-4621 (1989).
- 44) Frisch, S. M. & Earl Ruley, H.: Transcription from the stromelysin promoter is induced by Interleukin-1 and repressed by dexamethasone. *J. Biol. Chem.*, 262, 16300-16304 (1987).
- 45) Quinones, S., Saus, J., Otani, Y., Harris, E. D. Jr. & Kurkinen, M.: Transcriptional regulation of human stromelysin. *J. Biol. Chem.*, 264, 8339-8344 (1989).
- 46) Case, J. P., Lafyatis, R., Kumkumiam, G. K., Remmers, E. F. & Wilder, R. L.: IL-1 regulation of transin/stromelysin transcription in rheumatoid synovial fibroblasts appears to involve two antagonistic transduction pathways, an inhibitory, postaglandin-dependent pathway mediated by cAMP, and a stimulatory, protein kinase c-dependent pathway. *J. Immunol.*, 145, 3755-3761 (1990).
- 47) McDonnell, S. E., Kerr, L. D. & Matrisian, L. M.: Epidermal growth factor stimulation of stromelysin mRNA in rat fibroblasts requires induction of proto-oncogenes c-fos and c-jun and activation of protein kinase C. *Mol. Cell. Biol.*, 10, 4284-4293 (1990).
- 48) Moll, U. M., Youngleib, G. L., Rosinski, K. B. & Quigley, J. P.: Tumor promoter-stimulated Mr 92000 gelatinase secreted by normal and malignant human cells: isolation and characterization of the enzyme from HT1080 tumor cells. *Cancer Res.*, 50, 6162-6170 (1990).
- 49) Tryggvason, K., Huhtala, P., Tuuttila, A., Chow, L., Keski-Oja, J. & Lohi, J.: Structure and expression of type IV collagenase genes. *Cell Differ. Dev.*, 32, 307-312 (1990).
- 50) Okada, Y., Tsuchiya, H., Shimizu, H., Tomita, K., Nakanishi, I., Sato, H., Seiki, M., Yamashita, K. & Hayakawa, T.: Induction and stimulation of 92-kDa gelatinase/type IV collagenase production in osteosarcoma and fibrosarcoma cell lines by tumor necrosis factor  $\alpha$ . *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 171, 610-617 (1990).
- 51) Sato, H., Kida, Y., Mai, M., Endo, Y., Sasaki, T., Tanaka, J. & Seiki M.: Expression of genes encoding type IV collagen-degrading metalloproteinases and their inhibitor TIMPs in various human tumor cells. *Onogene*, in press.
- 52) Morikawa, K., Walker, S. M., Nakajima, M., Pathak, S., Jessup, J. M. & Fidler, I. J.: Influence of organ environment on the growth, selection, and metastasis of human colon carcinoma cells in nude mice. *Cancer Res.*, 48, 6863-6867 (1988).
- 53) Nakajima, M., Morikawa, K., Fabra, A., Bucana, C. D. & Fidler, I. J.: Influence of organ environment on extracellular matrix degradative activity and metastasis of human colon carcinoma cells. *J. Natl. Cancer Inst.*, 82, 1890-1898 (1990).
- 54) Khokha, R., Waterhouse, P., Yagel, S., Lala, P. K., Overall, C. M., Norton, G. & Denhardt, D. T.: Antisense RNA-induced reduction in murine TIMP levels confers oncogenicity on Swiss 3T3 cells. *Science*, 243, 947-243 (1989).
- 55) Schultz, R. M., Silberman, S., Persky, B., Bajkowski, A. S. & Carmichael, D. F.: Inhibition by human recombinant tissue inhibitor of metalloproteinases of human amnion invasion and lung colonization by murine B16-F10 melanoma cells. *Cancer Res.*, 48, 5539-5545 (1988).
- 56) Alvarez, O. A., Carmichael, D. F. & DeClerck, Y. A.: Inhibition of collagenolytic activity and metastasis of tumor cells by a recombinant human tissue inhibitor of metalloproteinases. *J. Natl. Cancer Inst.*, 82, 589-595 (1990).
- 57) DeClerck, Y. A., Yean, T-D., Chan, D., Shimada, H. & Langley, K. E.: Inhibition of tumor invasion of smooth muscle cell layers by recombinant human metalloproteinase inhibitor. *Cancer Res.*, 51, 2151-2157 (1991).
- 58) Ponton, A., Coulombe, B. & Skup, D.: Decreased expression of tissue inhibitor of metalloproteinases in metastatic tumor cells leading to increased levels of collagenase activity. *Cancer Res.*, 51, 2138-2143 (1991).

**Expression of Matrix Metalloproteinases in Various Human Tumor Cell Lines Compared with Their Metastatic Potential** Yuri Kida, Department of Surgery, Cancer Research Institute, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med Soc., **101**, 227—236 (1992)

**Key words** matrix metalloproteinases (MMPs), type IV collagenase, tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMPs), cancer metastasis

#### Abstract

Proteolytic enzymes such as type IV collagenase are thought to play an important role in tumor invasion and metastasis. To determine whether these enzymes could serve as indicators of metastatic potential, expression of metalloproteinases (MMPs) which can degrade type IV collagen and their inhibitors, tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMPs), in various cell lines were examined. Northern hybridization of mRNA for MMP-2, MMP-3, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2 from 26 human tumor cell lines were performed. Furthermore, metastatic potentials of these cells were analyzed in chick embryo. Transcripts for MMP-2 were expressed in all mesenchymal cells and in 4 of 16 epithelial cells and these for MMP-9 were expressed in 7 of 10 mesenchymal cells and in 2 of 16 epithelial cells. Only 3 of 26 tested tumor cell lines expressed MMP-3 mRNA. Various expression levels were observed for TIMP-1. Almost all cell lines were expressed at the same level of transcription for TIMP-2. Three mesenchymal cell lines and 2 epithelial cell lines showed a higher metastatic potential in chick embryo. Mesenchymal cell lines which expressed MMP-9 were shown to be metastatic, whereas 2 high metastatic cell lines of epithelial origin showed no transcripts for MMPs. There was no correlation between metastatic ability and expression of transcripts for MMP-2 and MMP-3. High levels of TIMP-1 expression were observed in non-metastatic cells which expressed MMP-9 while low levels of TIMP-1 expression were observed in metastatic cells of mesenchymal origin. Our data suggests that the enhanced expression of MMP-9 and decreased levels of TIMP-1 expression have a significant correlation with metastatic potential in mesenchymal cells. However, the expression of MMP-2 and MMP-3 had no evident relationship to metastasis in contradiction to reports from other laboratories.