

Localization of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitor in Pulmonary Carcinomas

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/2297/8322

肺癌におけるマトリックスメタロプロテナーゼ

—その産生、局在と癌細胞の浸潤・転移における役割—

金沢大学医学部病理学第一講座 (主任: 中西功夫教授)

木 村 顕 子

(平成4年2月4日受付)

肺癌の浸潤・転移におけるマトリックスメタロプロテナーゼ (matrix metalloproteinases, MMPs) とそのインヒビター (tissue inhibitor of metalloproteinase-1, TIMP-1) の果たす役割を調べる目的で、外科的に切除された肺癌組織 (腺癌47例, 扁平上皮癌30例, 腺癌と扁平上皮癌の両成分の混在した癌7例, 大細胞癌3例, 小細胞癌3例, 類表皮癌2例) を対象として, MMP-1 (組織コラゲナーゼ), MMP-2 (72kDa ゼラチナーゼ/Ⅳ型コラゲナーゼ), MMP-3 (ストロムライシン-1), MMP-9 (92kDa ゼラチナーゼ/Ⅳ型コラゲナーゼ) および TIMP-1 の免疫組織学的局在を検討した。これらの MMPs のうち, MMP-1 と MMP-9 はそれぞれ68.5%と64.1%の肺癌症例で癌細胞に陽性を示した。癌細胞巢に占める陽性細胞の比率は MMP-1 が $27.8 \pm 33.3\%$ (陽性スコア 1.97 ± 1.70), MMP-9 が $12.9 \pm 20.5\%$ (陽性スコア 1.30 ± 1.38) であった。一方, MMP-2 と MMP-3 は肺癌症例のわずか3.3%と5.4%で陽性を示すのみであった。TIMP-1 は18.5%の肺癌症例で陽性を示したが, 癌巢中の陽性細胞の比率は $1.2 \pm 6.5\%$ (陽性スコア 0.25 ± 0.63) に留まった。肺癌組織の培養上清中に分泌された MMP-3, MMP-9, および TIMP-1 をサンドイッチイムノアッセイにより定量した。その結果, MMP-9 分泌量は肺癌症例 ($0.29 \pm 0.40 \text{ nmol/g}$ 組織重量) と肺炎症例 ($0.20 \pm 0.22 \text{ nmol/g}$ 組織重量) において正常肺症例 ($0.12 \pm 0.16 \text{ nmol/g}$ 組織重量) よりも有意に高値であった ($p < 0.05$)。一方, TIMP-1 分泌量は肺癌 ($2.77 \pm 0.92 \text{ nmol/g}$ 組織重量), 肺炎 ($3.55 \pm 2.38 \text{ nmol/g}$ 組織重量) および正常肺 ($3.19 \pm 2.22 \text{ nmol/g}$ 組織重量) の各群間で有意差は認められなかった。MMP-3 はごく少数の症例でのみ検出され, 肺癌 ($0.11 \pm 0.27 \text{ nmol/g}$ 組織重量) では正常肺 ($0.04 \pm 0.25 \text{ nmol/g}$ 組織重量) に比較して有意に高値であった ($p < 0.01$)。ゼラチン分解活性も肺癌症例 ($24.7 \pm 46.9 \text{ u/g}$ 組織重量) において正常肺症例 ($6.6 \pm 12.9 \text{ u/g}$ 組織重量) よりも有意に高値を示した ($p < 0.01$)。ゼラチンサブストレートゲル電気泳動では, 主要なゼラチン分解活性は分子量87,000, 64,000, 61,000, 52,000, および49,000に相当する部位に出現した。これらのうち前二者はそれぞれ潜在型の MMP-9 と MMP-2 に相当すると考えられ, 分子量87,000のゼラチン分解活性が全症例においても最も強く認められた。以上のデータは, 肺癌においては癌細胞で産生された MMP-1 と MMP-9 が TIMP-1 との間不均衡を生じ, 癌細胞の浸潤・転移に伴う細胞外マトリックスの分解に主要な役割を果たすことを示唆している。

Key words lung cancer, invasion and metastasis, matrix metalloproteinases, tissue inhibitor of metalloproteinases, immunolocalization

肺癌は悪性腫瘍の中でも増加率の最も著しい腫瘍で, 診断や治療技術の向上にもかかわらず血行性転移のために極めて予後不良な悪性腫瘍である。肺癌細胞が血行性転移をきたす第一のステップは, 癌細胞による周囲結合組織の細胞外マトリックスの分解と, 血管基底膜の破壊および血管内腔への侵入である。このような癌細胞の浸潤・転移に伴う細胞外マトリックスの分解に蛋白分解酵素が関与することはよく知られた事実であり, これまで全てのクラスの蛋白分解酵素が報告されたこと¹⁾。それらのうちでも, ことにマトリックスメタロプロテナーゼ (matrix metalloproteinases, MMPs) と呼ばれる一群の酵素は生体内に存在する殆ど全ての細胞外マトリックス成分を中性域で分解し得ることから, 癌細胞の浸潤・転移に重要と考えられている²⁻⁶⁾。MMP 遺伝子ファミリーは, 現在までに一次構造の知られた少なくとも8種類の酵素から構成されているが^{4,5)}, それ

らの酵素活性は共通のインヒビター (tissue inhibitors of metalloproteinases, TIMPs) によって厳重にコントロールされている^{7,8)}。従って, 生体内での MMP 活性は TIMPs との間不均衡が生じた場合のみ作用すると考えられている。癌の浸潤・転移に関するこれまでの MMPs に関する研究は, 癌細胞株や実験動物を用いた報告が多く⁹⁻¹³⁾, ヒト癌組織では乳房癌¹⁴⁻¹⁶⁾と消化器癌¹⁶⁾における MMP-2 の役割が検討されているにすぎない。また, ヒト癌組織において複数の MMPs と TIMPs の局在やその分泌量を検索した報告はこれまで認められない。

本研究では, 肺癌組織における MMP-1 (組織コラゲナーゼ), MMP-2 (72kDa ゼラチナーゼ/Ⅳ型コラゲナーゼ), MMP-3 (ストロムライシン-1), MMP-9 (92kDa ゼラチナーゼ/Ⅳ型コラゲナーゼ) および TIMP-1 の免疫組織化学的局在を検討すると

Abbreviations: DAB, 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride; MMP, matrix metalloproteinase; PLP, periodate-lysine-paraformaldehyde; RA, rheumatoid arthritis; TIMP, tissue inhibitor of metalloproteinases

もに, MMP-9, MMP-3 および TIMP-1 の癌組織による分泌量とゼラチン分解活性を測定し, これらの MMPs が肺癌組織の浸潤・転移に果たす役割について考察した。

材料および方法

1. 抗ヒト MMP-1, -2, -3, -9, および TIMP-1 抗体

MMP-1 に対する抗体は, 他の MMPs と相同性の少ないカルボキシル基末端部のアミノ酸配列 (Val-Gln-Gly-Gln-Asn-Val-Leu-His-Gln-Tyr-Pro-Lys-Asp-Ile-Tyr-Ser-Ser-Phe-Gly) に対する合成ペプチドを抗原として作製した。また, MMP-3 に対する抗体は, 慢性関節リウマチ (rheumatoid arthritis, RA) 滑膜細胞培養液から Okada らの方法¹⁷⁾で潜在型 MMP-3 を精製し, それを抗原としてモノクローナル抗体を作製した。さらに, TIMP-1 に対する抗体も Kodama らの方法¹⁸⁾でヒト胎盤より TIMP-1 を精製し, 同様に作製した。MMP-2 と MMP-9 に対するモノクローナル抗体 (それぞれ 42-5D11 と 56-2A4) については, その特異性と免疫染色に使用し得ることが既に報告されている^{19,20)}。

MMP-1, -3, および TIMP-1 に対するモノクローナル抗体は, 抗原として用いた合成ペプチドあるいは蛋白を用いた酵素結合抗体免疫アッセイで一次スクリーニングした。陽性クローンについては, RA 滑膜細胞培養液を用いてイムノブロット法で再スクリーニングした。イムノブロットは, 電気泳動で分離された蛋白をニトロセルロース膜に転写後, モノクローナル抗体とビオチン化抗マウス IgG 抗体を用いて, アビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合法 (avidin-biotin-peroxidase complex method, ABC 法)²¹⁾で発色させた。これらの方法で得られた陽性クローンについては, さらにモネンシン (Sigma, St. Louis, U. S. A.) 処理した RA 滑膜組織²²⁾を用いて免疫組織染色に使用し得るクローンを選択した。モネンシンは合成された蛋白の細胞内移動をゴルジ装置のレベルで停止させることから, 持続性に分泌される MMP-1, -3 および TIMP-1 の免疫組織化学的局在を検索する際に組織のモネンシン処理が行われている^{22,23)}。これらにより MMP-1, -3, TIMP-1 に対する特異抗体 41-1E5, 55-2A4, 50-2F6 を得た。

II. 肺癌組織と対照群肺組織

手術的に切除された原発性肺癌組織92症例と非癌部組織94症例を材料とした (本学第一外科学教室, 小田誠博士と渡辺洋宇教授より供与)。原発性肺癌症例の内訳は, 男性60例, 女性32例で, その平均年齢は67.3±9.0才 (40才-85才) であった。また, 非癌部組織は肺癌症例において合併切除された肺組織を用いた。これらの肺組織を無菌的に厚さ 2-3mm に細切し, 2 μM モネンシン存在および非存在下で37℃ 3時間培養した。これらの培養標本と未処理材料を PLP 固定液で4℃, 15~24時間固定後, パラフィン包埋した。また, パラフィン切片をヘマトキシリン・エオジン染色, エラスチカ・ワンギーソン染色, および鍍銀染色し光顕的に観察した。肺癌の組織型は, 肺癌取扱い規約²⁴⁾に従って分類した。

III. 肺癌の免疫組織染色

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, トリプシン (Sigma), アクチナーゼ E (科研製薬, 東京), プロナーゼ E (Sigma), あるいはプロテアーゼ XXIV (Sigma) で37℃ 10分間処理した。その後, 0.3%過酸化水素 (三菱瓦斯化学, 東京) と0.1%アジ化ナトリウム (和光製薬, 大

阪) による内因性ペルオキシダーゼのブロックと, 正常ウマ血清 (DAKO, Glostrup, Denmark) による非特異的反応のブロック後, 抗 MMP-1, -2, -3, -9 あるいは TIMP-1 抗体と90分間室温で反応させた。次いで, ウマービオチン化抗マウス IgG 抗体 (Vector, Burlingame, U. S. A.) と30分間反応し, 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30分間反応後, ジアミノベンチジン (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, DAB) (Sigma) 反応液 (0.05M Tris-HCl, 0.03%DAB, 1%H₂O₂, pH8.0) で発色させた。また, 陰性対照として500倍に希釈した正常マウス血清 (DAKO) を一次抗体のかわりに使用し, 同様の方法で反応を行った。

IV. 免疫組織染色性の判定

染色性は陽性細胞の癌細胞巢に占める陽性細胞の割合を定量化して, 陽性スコアとして表した。陽性細胞の認められない材料を0, 癌細胞巢に対する陽性細胞の比率が0~10%, 10~30%, 30~50%, および50%以上の場合をそれぞれ陽性スコア 1, 2, 3, 4 と評価した。

V. 組織培養液中の MMP-3, -9, および TIMP-1 の定量

肺癌, 肺炎, および正常肺の新鮮組織を無菌的に約1×1×1mm 大に細切し, その組織片約10個を0.2%ラクトアルブミン分解液 (Gibco, New York, USA) を含む Roswell Park Memorial Institute Media-1640 液 (Gibco) 2ml 中で37℃ 24時間培養した。培養液と組織片を分けて採取後, 培養液を遠心して壊死細胞や血球などを除去してその上清を-20℃で保存した。また, 組織片は凍結乾燥した後重量を測定した。この培養上清を用いてサンドイッチイムノアッセイ法²⁵⁾で MMP-3, -9, および TIMP-1 を定量した。得られた測定値から24時間培養中に分泌されたこれら蛋白重量 (μg) を潜在型の MMP-3 と MMP-9, および TIMP-1 の分子量 (それぞれ52,220, 78,426, および20,685) より分子量 (mnol) を計算し, 乾燥組織重量当たりの産生量 (nmol/g 組織重量) を求めた。

VI. ゼラチン分解活性の測定

上述の培養上清を, 潜在型 MMPs の活性化剤である p-アミノフェニル酢酸第二水銀 (1mM) (Sigma) と, セリンプロテイナーゼとシステインプロテイナーゼインヒビターであるフェニルメタンスルフォニルフルオリド (2mM) (Sigma) と N-エチルマレイמיד (5mM) (Sigma) 存在下で, Harris ら²⁶⁾の方法に従って¹⁴C-ゼラチンを基質としてゼラチン分解活性をアッセイした。¹⁴C-ゼラチンは, 精製した酸可溶性 I 型コラーゲンを,¹⁴C-無水酢酸 (Amersham, 東京) で標識し, 熱変性 (60℃, 30分間処理) によりゼラチン化して使用した。ゼラチン分解活性は, 乾燥組織重量 1g 当りの単位 (u) で表した。なお, 1単位のゼラチン分解活性は, ゼラチンを37℃において1分間に1 μg 分解する活性である。

VII. ゼラチンサブストレートゲルによるゼラチン分解パターンの検索

Hibbs ら²⁷⁾の方法に従い, ゼラチン (0.5mg/ml) を含むポリアクリルアミドゲル (8%アクリルアミド) を作製した。上述の培養上清を非還元状態で4℃でゼラチンサブストレートゲル上に電気泳動し, ゲルを緩衝液 (50mM Tris-HCl, 1 μM ZnCl₂, 10mM CaCl₂, 2.5% Triton X, 0.02% NaN₃, pH7.5) で洗浄後37℃で反応し, ゼラチン分解パターンを検討した。なお, ゼラチンサブストレートゲルでは電気泳動中に活性化が生じるため, 活性化処理は不必要であった。電気泳動用スタンダードと

して、ホスホリラーゼb (94kDa) (Sigma), ヒトトランスフェリン (77kDa) (Sigma), ウシ血清アルブミン (68kDa) (Sigma), ヒト免疫グロブリン重鎖 (55kDa) (Sigma), 卵白アルブミン (43kDa) (Sigma), カルボニックアンヒドラーゼ (29kDa) (Sigma) を用い、分解活性陽性蛋白の分子量を算定した。

Ⅶ. 統計学的検討

組織培養液中の MMP-3, -9, TIMP-1 量, およびゼラチン分解活性の肺癌, 肺炎, および正常肺の各群間における検定は Mann-Whitney 検定で行った。

成 績

1. 肺癌の病理組織像

原発性肺癌92例中, 47例は腺癌 (高分化型32例, 中分化型8例, 低分化型7例), 30例は扁平上皮癌 (高分化型9例, 中分化型17例, 低分化型4例) であり, 他は腺癌と扁平上皮癌の両成分の混在した癌7例 (腺癌>扁平上皮癌4例, 腺癌<扁平上皮癌2例, 腺癌=扁平上皮癌1例), 粘表皮癌2例, 大細胞癌3例, 小細胞癌3例であった。脈管内侵襲の有無をエラスチカ・ワンギーソン染色を併用して検討したところ, 静脈侵襲のみが認められた症例は23例 (腺癌10例, 扁平上皮癌9例, 大細胞癌2例および腺癌と扁平上皮癌の両成分の混在した癌2例) で, 静脈とリンパ管の両方に侵襲を認めた症例は5例であった。また, リンパ管侵襲のみを認めた症例はみられなかった。

対照として非癌部より得られた94症例の肺組織のうち, 明らかな炎症所見のみられた症例は23例で, 肺炎群として分類した。その内訳は肺癌に続発した閉塞性肺炎2例, 器質性肺炎4例, 結核性肉芽腫1例, 異物肉芽腫1例, および非特異的な慢性炎症 (間質のリンパ球浸潤と線維症, および肺胞腔への大食細胞と泡沫細胞の浸潤) 15例であった。正常肺組織は71症例であったが, これらには種々の程度の肺胞大食細胞の浸潤が認められた。

Ⅱ. 免疫組織染色条件の検討

1. 固定法による免疫組織染色性の変化

MMP-1, -2, -3, -9, および TIMP-1 は, いずれも RA 滑膜組織で合成・分泌されることが知られている。そこで, モネンシン処理した RA 滑膜組織を periodate-lysine-paraformaldehyde (PLP), カルノア, およびホルマリンの各固定液で固定し, そのパラフィン切片につき MMP-1, -2, -3, -9 および TIMP-1 に対する抗体を用いて免疫染色した。その結果, PLP 固定標本で最も強い陽性所見が得られたので, 本実験では材料を全て PLP 固定した。

2. パラフィン切片の酵素処理による免疫染色性の変化

免疫組織免疫の増強効果を検索する目的で, モネンシン処理

した RA 滑膜組織と肺癌組織切片を脱パラフィン後, 0.1% のトリプシン, アクチナーゼ E, プロナーゼ E, あるいはプロテアーゼ XXIV で 37°C, 10 分間処理した後に免疫染色した。その結果, これら酵素のうちでトリプシンが最も免疫染色性を増強した。しかし, 0.1% の濃度では時に切片の消化が進み, 組織構造の不明瞭化が見られた。そこで, 適正濃度を決定するために, 0.01%, 0.02%, 0.04% のトリプシンで同様に処理したところ, 0.04% が組織構造の保存と染色性の増強の点で最適濃度であった。

3. モネンシン処理による免疫染色性の変化

肺癌組織, 対照群肺組織および RA 滑膜組織をモネンシン存在および非存在下で 3 時間培養した材料と未処理標本を作製し, MMPs および TIMP-1 に対する免疫染色所見を比較検討した。RA 滑膜においては, MMP-1, -3 と TIMP-1 の局所はモネンシン処理標本で明瞭にみられるのに対し, 未処理材料ではごく少数の表層細胞のみが陽性であった。しかし, MMP-2 と MMP-9 の免疫染色性に対しては増強効果は明らかではなかった。癌組織における結果を表 1 に示す。MMP-1 陽性症例数はモネンシン処理標本とその対照標本および未処理標本でそれぞれ 68.5% (63/92 症例), 73.6% (67/91 症例), 63.6% (14/22 症例) であり, MMP-9 陽性症例数はそれぞれ 64.1% (59/92 症例), 62.6% (57/91 症例), 59.1% (13/22 症例) であった。また, TIMP-1 陽性症例数は 18.5% (17/92 症例), 17.6% (16/91 症例), 9.1% (2/22 症例) であった。一方, MMP-2 と MMP-3 の癌組織における免疫染色性については, 全ての群で陽性症例は数% 以下であった。このように, 未処理標本と比較し 3 時間培養した材料では, モネンシンの有無にかかわらず免疫染色性の増強効果が見られた。癌組織においてはモネンシン処理効果は必ずしも明らかではなかったが, 本研究ではモネンシン処理標本について免疫組織所見を詳しく解析した。

Ⅲ. MMP-1, -2, -3, -9 および TIMP-1 の免疫組織化学的局在

モネンシン処理した肺癌組織 (92 症例) について MMP-1, -2, -3, -9 および TIMP-1 の癌細胞における局在を免疫組織化学的に検討した。その結果, 表 2 の如く肺癌細胞に陽性所見を示すのは, 主として MMP-1 (63/92 症例, 68.5%) と MMP-9 (59/92 症例, 64.1%) であった。MMP-1 と MMP-9 の両者が陽性の症例は 47.8% (44/92 例) で, MMP-1 あるいは MMP-9 のみ陽性の症例はそれぞれ 20.7% (19/92 例) と 16.3% (15/92 例) であった。また, 癌細胞巢における MMP-1 と MMP-9 の陽性スコアは, それぞれ 1.97 ± 1.70 ($27.8 \pm 33.3\%$) と 1.30 ± 1.38 ($12.9 \pm 20.5\%$) であった。これに対して, MMP-2 と MMP-3 染色陽性を示した症例は, それぞれ肺癌症例の 3.3% (3/92 例) と 5.4%

Table 1. Effect of monensin treatment on the detection of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in the pulmonary carcinomas

Treatment	Number of cases	Rate (%) of immunoreaction-positive cases of				
		MMP-1	MMP-2	MMP-3	MMP-9	TIMP-1
Culture in the presence of monensin	92	68.5	3.3	5.4	64.1	18.5
Culture alone	91	73.6	2.2	5.5	62.6	17.6
No treatment	22	63.6	0	4.5	59.1	9.1

(5/92例)と少数であった。一方、TIMP-1は18.5% (17/92例)の症例で癌細胞が陽性所見を示した。しかし、TIMP-1陽性細胞の癌細胞巢における陽性スコアは、わずかに 0.25 ± 0.63 ($1.2 \pm 6.5\%$)であった。癌細胞におけるMMP-1とMMP-9の陽性傾向は、腺癌、扁平上皮癌、腺癌と扁平上皮癌の混合した症例、および未分化癌の全てで共通していた(表2)。一方、MMP-2とMMP-3は陽性の肺癌は全般に少ない傾向であったが、扁平上皮癌においてのみMMP-3陽性症例は13.3% (4/30

例)と比較的多く、未分化癌でMMP-2陽性症例を1例(16.7%)認めた。TIMP-1は、未分化癌で陽性症例は6例中3例(50%)、粘表皮癌で2例中1例(50%)であったが、扁平上皮癌やその他の組織型では少数の症例のみ陽性であった。

MMP-1とMMP-9は腺癌症例の70%以上に陽性であり、特に癌細胞巢辺縁部に陽性細胞が分布している傾向があった(図1, 2)。この傾向はMMP-9で顕著であり、癌細胞の分化度とは関係なかった。一方、MMP-1陽性癌細胞は大部分びまん性

Table 2. Summary of the histological and immunohistochemical data

Histology	Number of cases	MMP-1		MMP-2		MMP-3		MMP-9		TIMP-1	
		Rate (%) of positive cases*	Positive score ^b (%) ^c	Rate (%) of positive cases	Positive score (%)	Rate (%) of positive cases	Positive score (%)	Rate (%) of positive cases	Positive score (%)	Rate (%) of positive cases	Positive score (%)
Adenocar.	47	72.3	2.28 ± 1.72 (35.2 ± 35.4)	2.1	0.02 ± 0.15 (0.21 ± 1.46)	2.1	0.02 ± 0.15 (0.01 ± 0.07)	70.2	1.51 ± 1.44 (16.5 ± 23.4)	25.5	0.36 ± 0.76 (2.05 ± 8.92)
Squa. cell car.	30	56.7	1.30 ± 1.53 (13.9 ± 23.0)	3.3	0.03 ± 0.18 (0.02 ± 0.09)	13.3	0.13 ± 0.35 (0.08 ± 0.23)	63.3	1.23 ± 1.38 (11.2 ± 18.6)	3.3	0.03 ± 0.18 (0.03 ± 0.18)
Adenocar. + Squa. cell car.	7	83.3	2.3	0	0	0	0	71.4	0.71	0	0
Mucoepider. car.	2	100	3.5	0	0	0	0	33.3	2	50	0.5
Large and small cell car.	6	66.7	3.3	16.7	0.67	0	0	33.3	0.33	50	1
Total cases	92	68.5	1.97 ± 1.70 (27.8 ± 33.3)	3.3	0.07 ± 0.44 (1.09 ± 9.43)	5.4	0.05 ± 0.23 (0.03 ± 0.15)	64.1	1.30 ± 1.38 (12.9 ± 20.5)	18.5	0.25 ± 0.63 (1.20 ± 6.53)

Abbreviation is as follows: Adenocar., adenocarcinoma; Squa. cell car., squamous cell carcinoma; Adenocar. + Squa. cell car., carcinoma with both adenocarcinoma and squamous cell carcinoma components; Mucoepider. car., mucoepidermoid carcinoma; Large and small cell car., large cell carcinoma and small cell carcinoma.

* Rate of immunoreaction-positive cases.

^b Positive scores of immunohistochemistry (mean \pm SD).

^c Rate of immunoreaction-positive cells (mean \pm SD).



Fig. 1. Immunolocalization of MMP-1 in the papillary adenocarcinoma of the lung. Paraffin sections from the lung tissue treated with 2μ M monensin for 3hr were stained by avidin-biotin-peroxidase complex method using a monoclonal antibody against MMP-1. Most carcinoma cells are intensely labeled. Hematoxylin stain. $\times 185$.

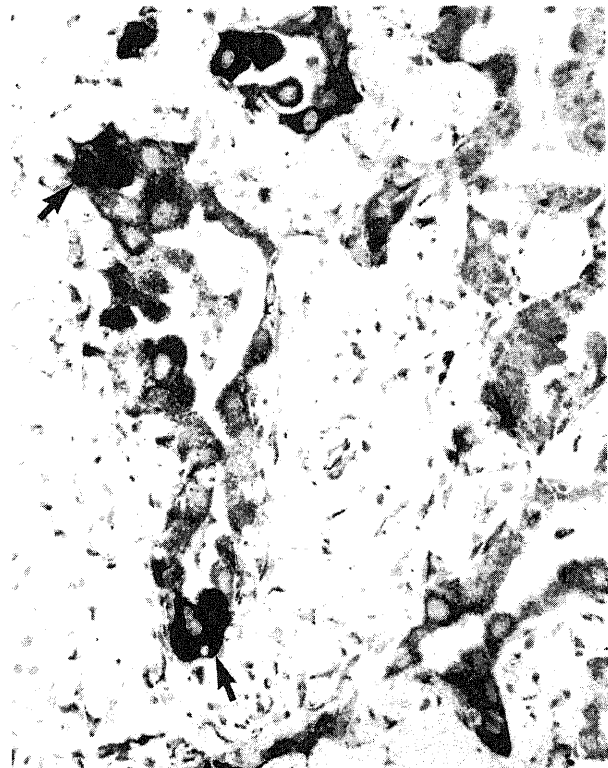


Fig. 2. Immunolocalization of MMP-9 in the papillary adenocarcinoma of the lung. The tissue was prepared and stained using a monoclonal antibody against MMP-9 as described in Fig. 1. Note intense labeling in the peripheral cells of the carcinoma cell nests. (arrows). Hematoxylin stain. $\times 370$.

あるいは癌巣内に不規則散在性に分布するパターンを示した(図1)。このうち扁平上皮癌では、癌巣内に不規則散在性ないし癌巣辺縁部に局在し(図3)、また、MMP-9は腺癌と同様に分化の程度にかかわらず癌巣辺縁部の癌細胞に陽性を示す症例が多かった(図4)。腺癌と扁平上皮癌の両成分を含む腫瘍や未分化癌では、MMP-1およびMMP-9陽性癌細胞が癌細胞巢中に不規則散在性に認められた。MMP-2陽性の3症例のうち大細胞癌では約90%の癌細胞がMMP-2強陽性を示したが、他の腺癌と扁平上皮癌ではそれぞれ約10%と約0.5%の癌細胞が不規則散在性に陽性を示すに過ぎなかった。MMP-3は扁平上皮癌4例に反応がみられたが、陽性癌細胞は癌巣中では0.5~1%程度に過ぎなかった(図5)。TIMP-1陽性細胞も、全ての組織型において癌細胞巢中にごく少数が分布するに過ぎなかった(図6)。また、血管内侵襲の有無とこれらのMMPsやTIMP-1の染色陽性細胞の比率やその染色パターンに一定の関係は認められなかった。

癌細胞以外の細胞のうちでは、癌の間質にみられる線維芽細胞が高頻度にTIMP-1とMMP-2陽性を示し、ごくまれにMMP-1とMMP-9も陽性であった(図6, 7)。また、血管内皮細胞は大部分がTIMP-1陽性であり時にMMP-9も強染した(図8)。さらに、血管平滑筋細胞もしばしばTIMP-1とMMP-9が陽性であった。癌組織に隣接した気管支線毛上皮細胞の多くはMMP-1陽性であり、再生あるいは扁平上皮化をきたした場合にはMMP-9も強陽性に染まった。また、炎症所見を示す部位のII型肺胞上皮細胞も時にMMP-9陽性であっ

た。肺胞や間質内に浸潤した大部分の大食細胞は抗MMP-1および抗MMP-9抗体に反応し、このうち異物型巨細胞は特にMMP-9に強陽性であった。正常肺組織においても、間質の線維芽細胞はしばしばMMP-2とTIMP-1陽性であり、肺胞大食細胞はMMP-9とMMP-1が陽性を示した。しかし正常肺組織における陽性細胞の絶対数や染色強度は癌組織や肺炎のそれより明らかに軽度であった。

IV. MMP-3, -9, および TIMP-1 の定量

肺癌、正常肺、および肺炎組織が培養液中に分泌したMMP-9, TIMP-1, MMP-3量をサンドイッチイムノアッセイ法により測定した。MMP-9は肺癌88症例中48例、肺炎22症例中15例、正常肺71症例中33例で測定閾値以上の値を示した。癌と肺炎組織のMMP-9分泌量は、組織1gあたりそれぞれ 0.29 ± 0.40 nmol, 0.20 ± 0.22 nmolで、正常肺の 0.12 ± 0.16 nmolに比べ有意に高値であった(いずれも $p < 0.05$)(図9)。一方、TIMP-1は癌、肺炎、および正常肺組織の全例で検出され、それぞれ組織1gあたり 2.77 ± 1.92 nmol, 3.55 ± 2.38 nmol, 3.19 ± 2.22 nmolであり、各グループ間においてその分泌量に有意差は認められなかった(図10)。また、TIMP-1のMMP-9に対するモル比は、癌、肺炎、および正常肺でそれぞれ9.6倍、17.8倍、26.6倍であった。MMP-3は癌17例、正常肺3例、および肺炎4例でのみ検知された。それぞれの平均値は 0.11 ± 0.27 , 0.04 ± 0.25 , 0.18 ± 0.52 nmol/g組織重量であり、癌症例群では正常肺群に比較し有意に高値であった($p < 0.01$)(図11)。



Fig. 3. Immunolocalization of MMP-1 in the moderately differentiated squamous cell carcinoma of the lung. The monesin-treated tissue was stained as described in Fig. 1. The carcinoma cells located at the periphery of the cell nest are positively stained (arrows). Hematoxylin stain. $\times 370$.

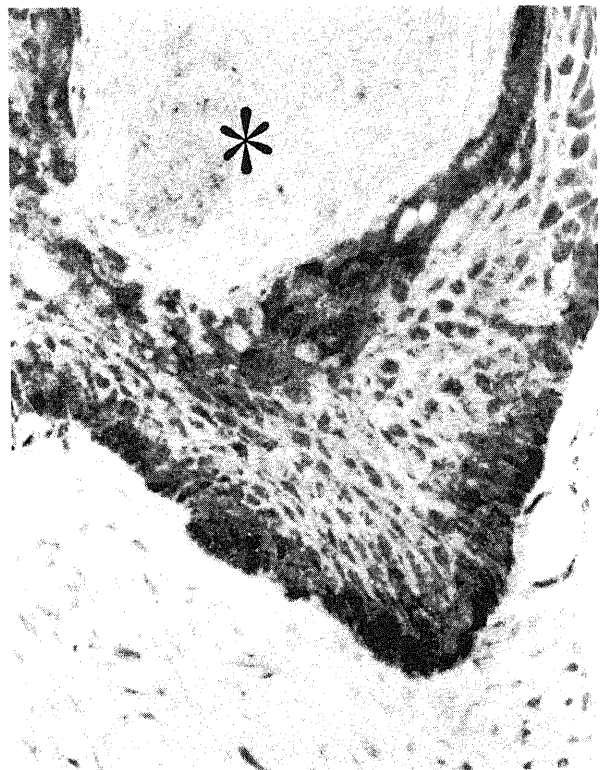


Fig. 4. Immunolocalization of MMP-9 in the well differentiated squamous cell carcinoma of the lung. The carcinoma tissue was immunostained as described in Fig. 1, using a monoclonal antibody against MMP-9. Most carcinoma cells are intensely labeled with the antibody. *, keratin materials in the carcinoma cell nest. Hematoxylin stain. $\times 370$.

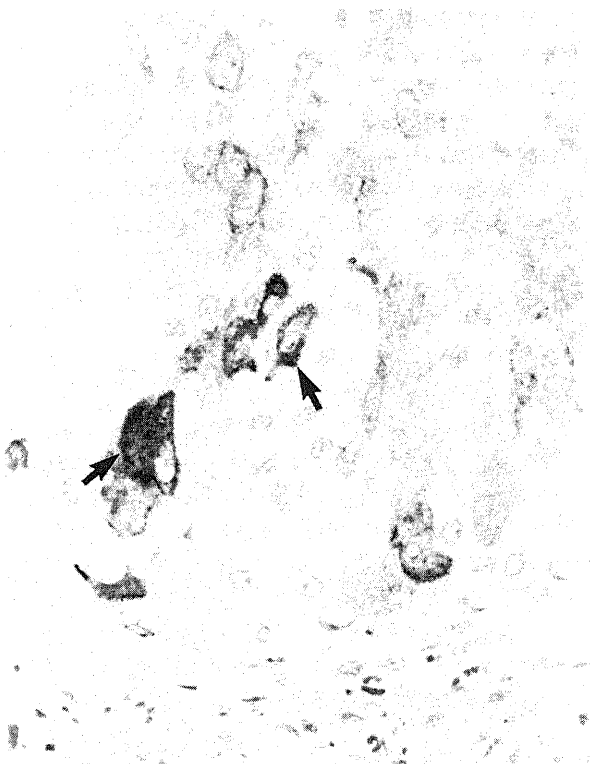


Fig. 5. Immunolocalization of MMP-3 in the well-differentiated squamous cell carcinoma of the lung. MMP-3 was localized using a monoclonal antibody against MMP-3 as described in Fig. 1. A few cells (arrows) are positively labeled. Hematoxylin stain. $\times 370$.

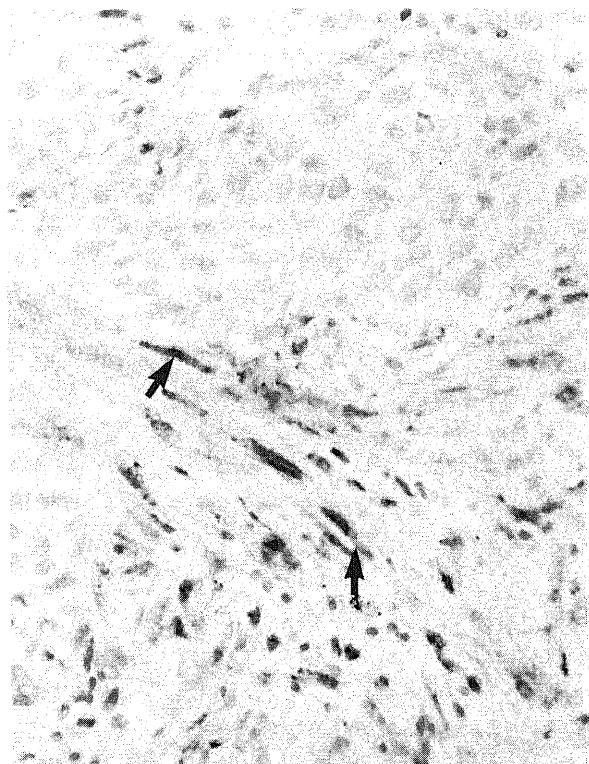


Fig. 7. MMP-2 immunolocalization in the moderately differentiated squamous cell carcinoma of the lung. Many fibroblasts (arrows) are labeled but the carcinoma cells are not stained in this field. Hematoxylin stain. $\times 370$.



Fig. 6. Immunolocalization of TIMP-1 in the mucoepidermoid carcinoma of the lung. The monensin-treated tissue was stained as described in Fig. 1. using a monoclonal antibody against TIMP-1. Fibroblasts (arrows) as well as the carcinoma cell (arrow head) are labeled. Hematoxylin stain. $\times 370$.

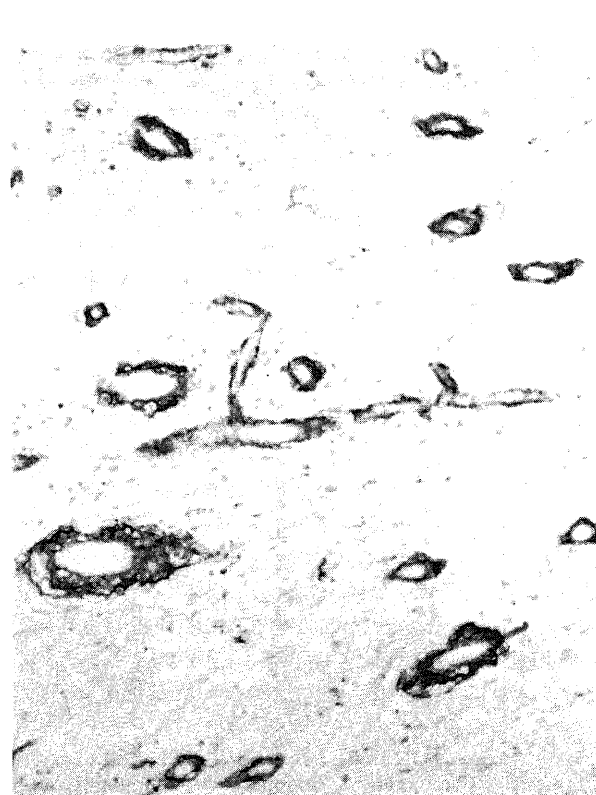


Fig. 8. Immunolocalization of TIMP-1 in the lung tissue with fibrotic changes. Most capillary endothelial cells are intensely labeled with the antibody. Hematoxylin stain. $\times 185$.

V. ゼラチン分解活性

1. アッセイによる定量

¹⁴C-ゼラチンを用いてアッセイしたゼラチン分解活性の結果を図12に示す。活性は癌88症例中64例, 正常肺は71症例中41例, 肺炎は22症例中10例で検出された。癌組織の分解活性(24.7±46.9u/g 組織重量)は正常肺の活性(6.6±12.9u/g 組織重量)に比較して有意に高値を示した(p<0.01)。しかし、これ

らの活性と肺炎組織の活性(28.5±51.3u/g 組織重量)との間には有意差は認められなかった。

2. ゼラチンサブストレートゲルによるゼラチン分解パターン

癌組織, 正常肺, および肺炎組織の培養上清をゼラチンサブストレートゲル上に泳動すると, 大部分の症例で分子量約87,000, 約64,000, 約61,000, 約52,000, および約49,000のバ

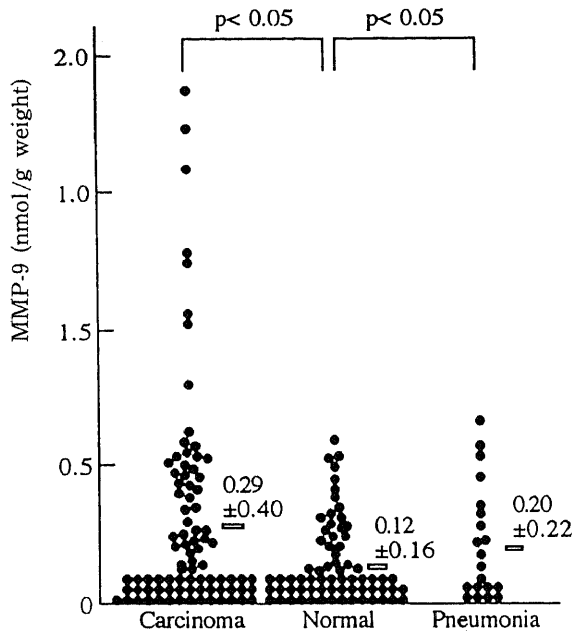


Fig. 9. Amounts of MMP-9 secreted in the culture media by the lung tissues. The tissue fragments from pulmonary carcinoma, pneumonia and normal control were cultured for 24 hr in the serum free medium and MMP-9 protein was measured by the sandwich enzyme immunoassay. Each number and bar represents mean (±SD).

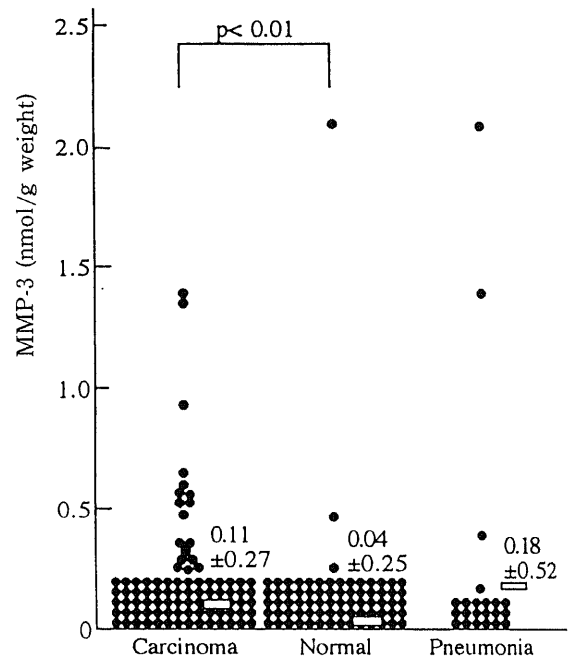


Fig. 11. Amounts of MMP-3 secreted in the culture media by the lung tissues. The assay method was as described in Fig. 9. Each number and bar represents mean (±SD).

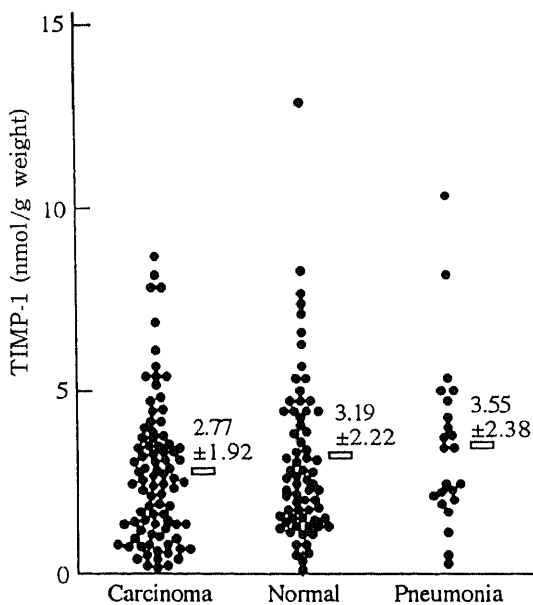


Fig. 10. Amounts of TIMP-1 secreted in the culture media by the lung tissues. The assay was performed as described in Fig. 9. Each number and bar represents mean (±SD).

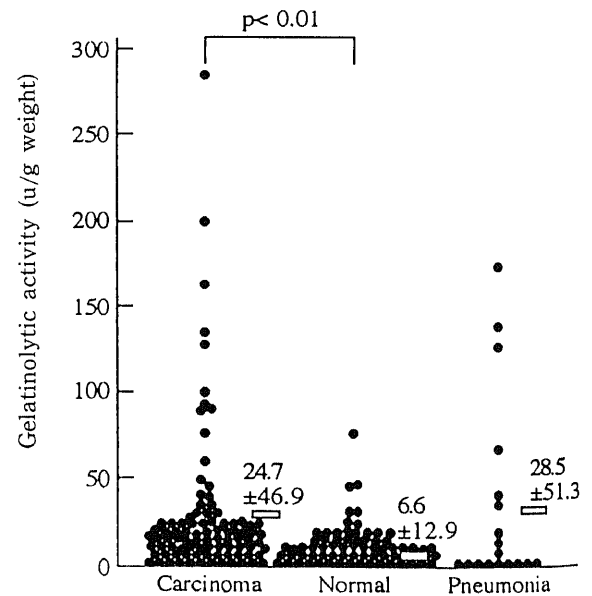


Fig. 12. Gelatinolytic activities in the culture media of the lung tissues. The culture media were prepared as described in Fig. 9. and the activities were assayed against ¹⁴C-gelatin at 37°C in the presence of 1 mM p-aminophenylmercuric acetate, 2mM phenylmethan sulfonyl fluoride and 5 mM N-ethylmaleimide.

ンドが出現した(図13)。これらゼラチン分解活性のうち前二者は、その分子量の大きさからそれぞれ MMP-9 と MMP-2 に相当すると考えられた。MMP-9 活性のバンドは癌、正常肺、肺炎の全サンプルで認められた。一方、MMP-2 活性バンドは癌では64/88例、正常肺では51/72例、肺炎では16/22例でみられ、分子量52,000と49,000のバンドは癌39/88例、正常肺46/71例、肺炎13/22で確認された。これらのゼラチン分解活性のうち MMP-9 (分子量約87,000) のバンドは肺癌あるいは対照群を問わず全ての場合で他のバンドより太く明瞭に認められた(図13)。

考 察

MMPs は、種々の細胞外マトリックス成分を分解する一群のメタロプロテナーゼで、これまでに異なる10種類の酵素が報告されている⁴⁹⁾。また、8種類については既にその一次構造が決定されている⁴⁹⁾。これらの MMPs が癌細胞の浸潤・転移に関与することは、浸潤性ヒト扁平上皮癌の局所でコラーゲン線維の分解像とコラーゲナーゼ活性の上昇が観察されたとの報告²⁹⁾や、培養腫瘍細胞株が MMP-1 を分泌する所見⁹⁾からその可能性は古くより指摘されてきた。しかし、この分野で最も注目された所見は、Ⅳ型コラーゲン分解活性と癌組織の転移能とが

正の相関を示すという Liotta ら¹⁰⁾の報告である。Ⅳ型コラーゲンは血管基底膜の主要コラーゲンであり、現在では MMPs のうちでは MMP-2、-3、-9、および MMP-10 (ストロムライシン-2) が、本コラーゲンを分解し得ることが知られている⁴⁹⁾。これらのⅣ型コラーゲン分解酵素のうちでは、MMP-2 と MMP-3 がまず転移能との関係で検討された^{10)~16)}。特に、MMP-3 は、マウスの実験的皮膚腫瘍において、癌化に伴ってその mRNA が特異的に発現される酵素であると報告され注目された¹⁹⁾。その後、MMP-3 に関しては、ヒト扁平上皮癌において mRNA の高い発現がみられることから研究が進み、その腫瘍組織 cDNA ライブラリーから新たに MMP-10 が分離された²⁰⁾。一方、MMP-9 は種々の癌細胞株のうちでも高転移性腫瘍細胞株によって選択的に分泌されると報告されている^{11)~13)}。しかし、ヒト腫瘍組織において腫瘍細胞自身が MMP-9 を合成・分泌し、浸潤・転移能とどのように関与しているかについては未だ検討されていないのが現状である。今回著者はヒト肺癌組織について局在、産生ならびにゼラチン分解活性を精査したところ、MMP-1、-2、-3、-9 のうち肺癌細胞で合成・分泌される主要酵素は MMP-1 と MMP-9 であることが判明した。

MMP-1 は、動物に移植した胃癌細胞や悪性黒色腫細胞にその局在が報告されている³⁰⁾。本酵素は癌細胞間質の線維性コラーゲンであるⅠ型とⅢ型コラーゲンの特異的分解酵素であることから³¹⁾、癌細胞による MMP-1 の産生は腫瘍細胞の間質への浸潤に重要であると推定される。一方、MMP-9 は、1989年にその一次構造が解明された比較的新しい MMP 遺伝子ファミリーのメンバーである³²⁾。当初、本酵素の基質特異性は MMP-2 と全く同様で、ゼラチンやⅣ型およびⅤ型コラーゲン分解酵素と考えられてきた^{32)~33)}。しかし、最近、五之治³⁴⁾は MMP-9 がそれらの基質以外にⅢ型コラーゲン分解能を持つ他、Ⅰ型コラーゲンのα2鎖をも限定分解することを見いだした。また、本酵素は酸不溶性Ⅰ型コラーゲン分解能を有することも報告されている³⁰⁾。Ⅰ型やⅢ型コラーゲンは MMP-1 や MMP-9 の作用によりその分子が限定分解されると、体温で3本鎖構造が消失しゼラチンに変換することが知られている³¹⁾。MMP-9 は、その基質のうちでもゼラチンに対し最も強い比活性を有する³⁴⁾。また、基底膜の主要コラーゲンであるⅣ型コラーゲンに対する分解活性は、37℃においては MMP-2、-3、-9のうちでは MMP-9 が最も強いことが Murphy ら³⁵⁾によって報告されている。さらに、Senior ら³⁶⁾は本酵素にエラスチン分解能があることを観察している。従って、このような MMP-9 の基質特異性は、肺癌細胞の浸潤・転移に伴う細胞外マトリックスの分解に本酵素が極めて適しているといえよう。このような観点から本研究における肺癌細胞の MMPs の分布を見ると、MMP-9 が浸潤先端部の肺癌細胞に特に局在していたことは極めて注目される。おそらく癌細胞自身が MMP-9 を分泌し自己の基底膜を分解し、さらに周囲間質の細胞外マトリックスを破壊して増殖するとともに、肺癌細胞では MMP-1 との協同作用で線維型コラーゲンを分解して強い浸潤性を発揮しているものと思われる。

これまで癌細胞の転移能とⅣ型コラーゲン分解酵素に関する研究では、MMP-2 の役割が強調されてきた^{11)~31)~37)}。実際、肺癌^{14)~16)}、胃癌¹⁶⁾、および大腸癌¹⁶⁾においては MMP-2 が同定されている。しかし、MMP-2 は肺癌組織では癌細胞のみならず、むしろ導管周囲の筋上皮細胞、正常の導管終末部の細胞¹⁵⁾や、

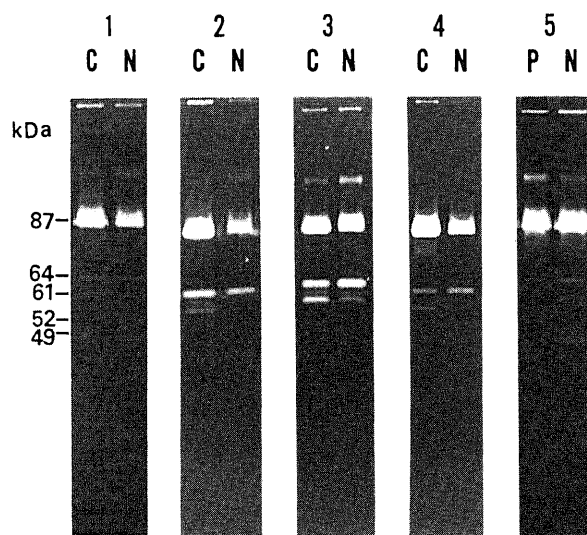


Fig.13. Gelatin-gel electrophoresis of the culture media of the lung tissues. The culture media were electrophoresed under the non-reduced conditions on 8% sodium dodesyl sulphate-polyacrylamide gels containing gelatin (0.5mg/ml) at 4°C. The gels were washed with 50mM Tris-HCl, pH7.5/1 μM ZnCl₂/10mM CaCl₂/2.5% Triton X/0.02% Na₂S₂O₈ and incubated in the buffer containing 1% Triton X for 20hr at 37°C. The representative cases of squamous cell carcinoma (lane 1), adenocarcinoma (lane 2), carcinoma with adenocarcinoma and squamous cell carcinoma components (lane 3), large cell carcinoma (lane 4) and pneumonia (lane 5) are shown together with their normal counterparts. The molecular weight of gelatinolytic activities was calculated on the basis of the mobility of the protein standards including phosphorylase b(94kDa), human transferrin (77kDa), bovine serum albumin (68kDa), IgG-heavy chain (55kDa), ovalbumin (43kDa) and carbonic anhydrase (29kDa). Major gelatinolytic activities with Mr 87,000, 64,000, 61,000, 52,000 and 49,000 are indicated. C, carcinoma; N, normal; P, pneumonia.

慢性関節リウマチ滑膜組織では表層細胞下層の線維芽細胞に局在する¹⁹⁾。従って、MMP-2は必ずしも癌細胞に特有な酵素ではないのかも知れない。本研究においても、MMP-2が肺癌細胞に陽性を示すのは全症例のわずかに3.3%にすぎないのに対し、癌組織や正常肺組織の間質に存在する線維芽細胞に高頻度で陽性であった。従って、少なくとも肺癌においてはMMP-2がその浸潤・転移に重要な役割を果たすとは考えにくい。

MMP-3はすでに述べたようにIV型コラーゲンを分解し、浸潤・転移と関係のあるMMPsの一つとも考えられる。しかし今回の検索で示されるように肺癌においては全肺癌症例の5.4%にしか陽性ではなく、肺癌での主要酵素でない判断される。しかし、扁平上皮癌に限定してみると、MMP-3は13.3%の症例で陽性であり、その発現は癌細胞の組織型に依存する傾向があると考えられる。MMP-3はマウス皮膚扁平上皮癌やヒト扁平上皮癌においてそのmRNAレベルでよく発現されるというこれまでの報告^{19,29)}を考慮すると肺癌においても組織型の違いに伴って異なるMMPsの合成・分泌がなされている可能性が高い。

MMPsの活性は、それらに共通のインヒビターであるTIMPsによって厳重に調節されている⁴⁰⁾。TIMPsにはアミノ酸配列において41%の相同性を示すTIMP-1⁷⁾とTIMP-2⁸⁾が区別され、いずれもMMP活性を1:1のモル比で阻害する。従って、生体内ではMMPsの産生量が局所におけるTIMPs量を上回った場合のみ酵素活性が出現すると考えられている。また、近年TIMP-1とTIMP-2はそれぞれ潜在型のMMP-9とMMP-2との間に複合体を形成し^{32,33)}、これらのTIMPsはMMP-9やMMP-2の活性のみならず潜在型酵素の活性化機序をも制御していることが明らかとなっている^{34,35)}。これらのことは、癌細胞によるMMP産生量が一定の場合では、TIMPの発現レベルが癌細胞の浸潤・転移能を決定する可能性を示唆している。実際、Swiss3T3細胞においてアンチセンスRNAを用いてTIMP-1発現レベルを低下させると、造腫瘍性と転移能が出現すると報告されている⁴⁰⁾。また、高転移性腫瘍細胞株におけるMMP活性の上昇は、TIMP産生能の低下に基づくとの指摘が近年されている⁴¹⁾。本研究はこのようなインヒビターの関与を明らかにするためにTIMP-1の局在と培養上清への分泌量を測定し比較検討した。その結果、肺癌におけるTIMP-1局在の最も大きな特徴は、大部分の症例(81.5%)で癌細胞による産生が全く見られない点であった。また、癌細胞にTIMP-1が陽性である場合においても、癌細胞内に占める陽性細胞の比率は $1.20 \pm 6.53\%$ (陽性スコア 0.25 ± 0.63)とMMP-1やMMP-9の場合に比較して10~20倍低い値を示した。このことは、癌細胞の産生するMMPsとTIMP-1との間に不均衡があるのみならず、肺癌組織におけるMMPs特にMMP-9、MMP-1とTIMP-1との間に不均衡が生ずることを示唆している。

肺癌組織におけるMMP-9産生量が正常肺組織に比較し有意に高く、また肺炎組織のMMP-9も正常肺組織に比べて高かった。MMP-9は大食細胞によっても分泌されることから、正常肺組織ではMMP-9は大食細胞に由来すると考えられる。また、組織に浸潤した多数の大食細胞や好中球によって肺炎組織のMMP-9産生量は有意に上昇したのものであろう。しかし、肺癌の場合にはMMP-9の組織局在は肺癌細胞で、かつ浸潤先端部に局在していることは重要な所見であろう。おそらくTIMP-1は主として肺組織間質の線維芽細胞や血管構成細胞に

由来し、MMP-9は癌組織と大食細胞の両者に由来すると思われる。培養液中のMMP-9とTIMP-1量を組織重量当たりの分子数でみると、肺癌、肺炎、および正常肺組織でいずれもTIMP-1量の方が優位であった。このことは、各組織で合成されたMMP-9とTIMP-1量に不均衡がないことを示している。しかし、MMP-1のMMP-9に対するモル比が正常肺組織では26.6倍であるのに対し、肺癌や肺炎では9.6倍や17.8倍と低い。このことはMMP-9以外のMMPs産生が加わるとMMP-9とTIMP-1量との間に不均衡を生ずる可能性を示唆している。今回検索した肺癌の多くの症例ではMMP-1を同時に産生していることや、組織培養液中のMMP-3産生量が高い肺癌をみることなどは、癌細胞が周囲の細胞外マトリックスを分解する局所にこれらの酵素とインヒビターとの不均衡が生じている可能性が高い。実際、培養液中のゼラチン分解活性を測定すると、肺癌や肺炎症例では正常肺症例に比べ有意に高い活性が検出された。このことは、少なくとも肺炎や肺癌組織のように組織の改造特に分解系の優位な場合には、酵素とインヒビターとの間に不均衡が存在することを示している。ゼラチン分解活性測定に当たっては、セリンプロテイナーゼやシステインプロテイナーゼのインヒビター存在下で行っていることから、その活性は主としてメタロプロテイナーゼに由来すると考えられる。また、ゼラチンサブストレートゲルによる分析では、ゼラチン分解活性の主要酵素は分子量87,000に位置するMMP-9であった。これらの一連のデータを考え合わせると、肺癌においては癌細胞が産生するMMP-9とMMP-1が、主に間質細胞に由来するTIMP-1に対して優位に作用し、特にMMP-9は癌細胞の浸潤局所の細胞外マトリックス分解に最も重要な役割を演じているものと推定される。

結 論

原発性肺癌組織におけるMMP-1(組織コラーゲナーゼ)、MMP-2(72kDaゼラチナーゼ/IV型コラーゲナーゼ)、MMP-3(ストロムライシン-1)、MMP-9(92kDaゼラチナーゼ/IV型コラーゲナーゼ)とそのインヒビター(TIMP-1)の免疫組織化学的局在を検討するとともに、その組織培養液中におけるMMP-3、MMP-9、およびTIMP-1の産生量とゼラチン分解活性を測定し、次の結果を得た。

1. 免疫組織染色により、MMP-1とMMP-9が肺癌症例のそれぞれ68.5%(63/92症例)、64.1%(59/92症例)において癌細胞に陽性を示した。癌細胞内に占める陽性細胞の比率は、MMP-1が $27.8 \pm 33.3\%$ (陽性スコア 1.97 ± 1.70)、MMP-9が $12.9 \pm 20.5\%$ (陽性スコア 1.30 ± 1.38)であった。一方、MMP-2とMMP-3の陽性症例はそれぞれ3.3%、5.4%と少数で、癌中の陽性細胞の比率も低かった。TIMP-1は18.5%の症例で癌細胞に陽性であったが、癌内での陽性細胞の比率は $1.2 \pm 6.5\%$ (陽性スコア 0.25 ± 0.63)と低値であった。癌間質の線維芽細胞はMMP-2とTIMP-1陽性となる頻度が高く、血管構成細胞はTIMP-1に陽性を示すものが多かった。

2. 組織培養上清中のMMP-9分泌量は、肺癌、正常肺、および肺炎組織においてそれぞれ 0.29 ± 0.40 nmol/g組織重量、 0.12 ± 0.16 nmol/g組織重量、 0.20 ± 0.22 nmol/g組織重量であり、肺癌と肺炎組織の分泌量は正常肺組織に比べ有意に高値であった。一方、TIMP-1分泌量は、肺癌(2.77 ± 1.92 nmol/g組織重量)、正常肺(3.19 ± 2.22 nmol/g組織重量)、および肺炎

($3.55 \pm 2.38 \text{ nmol/g}$ 組織重量) 群間ではその分泌量に有意差は認められなかった。MMP-3 は癌、非癌症例共に少数でのみ検出され、癌組織 ($0.11 \pm 0.27 \text{ nmol/g}$ 組織重量) の方が正常肺組織 ($0.04 \pm 0.25 \text{ nmol/g}$ 組織重量) に比べて有意に高値であった。

3. ゼラチン分解活性は、肺癌、正常肺、および肺炎組織においてそれぞれ $24.7 \pm 46.9 \text{ u/g}$ 組織重量、 $6.6 \pm 12.9 \text{ u/g}$ 組織重量、 $28.5 \pm 51.3 \text{ u/g}$ 組織重量の値を示し、肺癌組織における活性は正常肺組織に比較して有意に高値であった。

4. ゼラチンサブストレートゲル電気泳動では、分子量約 87,000, 約 64,000, 約 61,000, 約 52,000, 約 49,000 のバンドが出現した。前二者はそれぞれ潜在型の MMP-9 と MMP-2 に相当すると考えられ、MMP-9 活性のバンドはゼラチン分解活性の大部分を占め、肺癌、正常肺、および肺炎の全症例に認められた。

以上のデータから、肺癌組織において癌細胞は MMP-1 と MMP-9 を主として合成・分泌しており、その共通のインヒビターである TIMP-1 との間の不均衡が生じ、その結果としてこれらの MMPs が癌の浸潤・転移に重要な役割を果たしていると推定した。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導、御校閲を賜りました恩師中西功夫教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究を直接御指導、御教授頂きました金沢大学医療技術短期大学部岡田保典助教授に衷心より謝意を表します。本研究遂行に際し、組織材料を御供与頂きました本学医学部外科学第一講座渡辺洋宇教授と小田誠博士に深謝致します。また、モノクローナル抗体の作製とサンドイッチイムノアッセイ法による測定に御協力戴いた富士薬品工業岩田和士博士と愛知学院大学歯学部早川太郎教授に厚く感謝致します。最後に本研究に御助力戴きました第一病理学教室の各位に感謝致します。

文 献

- 1) Tryggvason, K., Höyhyä, M. & Salo, T.: Proteolytic degradation of extracellular matrix in tumor invasion. *Biochim. Biophys. Acta*, 907, 191-217 (1987).
- 2) Liotta, L. A., Rao, C. N. & Barsky, S. H.: Tumor invasion and the extracellular matrix. *Lab. Invest.*, 49, 636-649 (1983).
- 3) Liotta, L. A.: Tumor invasion and metastases—Role of the extracellular matrix. *Cancer Res.*, 46, 1-7 (1986).
- 4) Woessner, J. F. Jr.: Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J.*, 5, 2145-2154 (1991).
- 5) Nagase, H., Barrett, A. J. & Woessner, J. F. Jr.: Nomenclature and glossary of the matrix metalloproteinases. *Matrix*, (1992) in press.
- 6) 岡田保典: Matrix metalloproteinases の活性調節. *実験医学*, 10, 44-50 (1992).
- 7) Docherty, A. J. P., Lyons, A., Smith, B. J., Wright, E. M., Stephen, 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).
- 8) Stetler-Stevenson, W. G., Krutzsch, H. C. & Liotta, L. A.: Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-2). A new

member of the metalloproteinase inhibitor family. *J. Biol. Chem.*, 264, 17374-17378 (1989).

9) Harris, E. D. Jr., Faulker, C. S. & Wood, S. Jr.: Collagenase in carcinoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 48, 1247-1253 (1972).

10) Liotta, L. A., Tryggvason, K., Garbisha, S., Hart, I. Foltz, C. M. & Shafie, S.: Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature*, 284, 67-68 (1980).

11) Yamagata, S., Ito, Y., Tanaka, R. & Shimizu, S.: Gelatinase of metastatic cell lines of murine colonic carcinoma as detected by substrate-gel electrophoresis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 151, 158-162 (1988).

12) Ballin, M., Gomez, D. E., Sinha, C. C. & Thorgeirsson, U. P.: Ras oncogene mediated induction a 92kDa metalloproteinase; strong correlation with the malignant phenotype. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 154, 832-138 (1988).

13) Matrisian, L. M., Bowden, G. T., Krieg, P., Fürstenberger, G., Briand, J-P., Leroy P. & Breathnach, R.: The mRNA coding for the secreted protease transin is expressed more abundantly in malignant than in benign tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 83, 9413-9417 (1986).

14) Barsky, S. H., Siegal, G., Jannotta, F. & Liotta, L. A.: Loss of basement membrane components by invasive tumors but not by their benign counterparts. *Lab. Invest.*, 49, 140-148 (1983).

15) Monteagudo, C., Merino, M. J., San-juan, J., Liotta, L. A. & Stetler-Stevenson, W. G.: Immunohistochemical distribution of type IV collagenase in normal, benign, and malignant breast tissue. *Am. J. Pathol.*, 136, 585-592 (1990).

16) D'Errico, A., Garbisa, S., Liotta, L. A., Cactronovo, V., Stetler-Stevenson, W. G. & Grigioni, W. F.: Augmentation of type IV collagenase, laminin receptor, and Ki67 proliferation antigen associated with human colon, gastric, and breast carcinoma progression. *Mod. Pathol.*, 4, 239-246 (1987).

17) Okada, Y., Harris, E. D. Jr., & Nagase, H.: The precursor of a metalloendopeptidase from human rheumatoid synovial fibroblasts. Purification and mechanisms of activation by endopeptidases and 4-aminophenylmercuric acetate. *Biochem. J.*, 254, 731-741 (1988).

18) Kodama, S., Kishi, J., Obata, K., Iwata, K., & Hayakawa T.: Monoclonal antibodies to bovine collagenase inhibitor. *Collagen Rel. Res.*, 7, 341-350 (1987).

19) 岡田保典, 木村顕子, 中西功夫, 岩田和士: 慢性関節リウマチ滑膜細胞由来 matrix metalloproteinase 2 の性質と滑膜細胞内局在. *日病会誌*, 79, 285 (1990).

20) 仲 克己: 骨吸収における matrix metalloproteinase 9 (92kDa ゼラチナーゼ/IV型コラゲナーゼ) —その性質と破骨細胞での局在に関する研究—. *十全医会誌*, 100, 948-961 (1991).

21) Hsu, S. M., Raine, L., & Fanger, H.: A comparative study of the peroxidase-antiperoxidase method and an avidin-biotin-complex method for studying polypeptide

- hormones with radioimmunoassay antibodies. *Am. J. Clin. Pathol.*, **75**, 734-738 (1981).
- 22) Okada, Y., Takeuchi, N., Tomita, K., Nakanishi, I. & Nagase, H.: Immunolocalization of matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) in rheumatoid synovioblasts (B cells): correlation with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, **48**, 645-653 (1989).
- 23) Okada, Y., Gonoji, Y., Nakanishi, I., Nagase, H. & Hayakawa, T.: Immunohistochemical demonstration of collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) in synovial lining cells of rheumatoid synovium. *Virchows Arch. [B]*, **59**, 305-312 (1990).
- 24) 日本肺癌学会 (編): 肺癌取扱い規約, 改訂第3版, 87-115頁, 金原出版, 東京, 1987.
- 25) Kodama, S., Yamashita, K., Kishi, J., Iwata, K. & Hayakawa, T.: A sandwich enzyme immunoassay for collagenase inhibitor using monoclonal antibodies. *Matrix*, **9**, 1-9 (1989).
- 26) Harris, E. D. Jr. & Krane, S. M.: An endopeptidase from rheumatoid synovial culture. *Biochim. Biophys. Acta*, **258**, 566-576 (1972).
- 27) Hibbs, M. S., Hasty, K. A., Kang, A. H. & Mainardi, C. L.: Biochemical and immunologic characterization of the secreted forms of human neutrophil gelatinase. *J. Biol. Chem.*, **260**, 2493-2500 (1985).
- 28) Hashimoto, K., Yamanishi, Y., Maeyens, E., Dobbo- us, M. K. & Kanzaki, T.: Collagenolytic activities of squamous cell carcinoma of the skin. *Cancer Res.*, **33**, 2790-2801 (1973).
- 29) Muller, D., Quantin, B., Gesnel, M-C., Millon-Collard, R., Abecassis, J. & Breathnach, R.: The collagenase gene family in human consists of at least four members. *Biochem. J.*, **253**, 187-192 (1988).
- 30) Wolley, D. E.: Collagenase immunolocalization studies of human tumors. *In* L. A. Liotta & I. R. Hart (eds.), *Tumor Invasion and Metastasis*. 1st ed., p391-404, Martinus Nijhoff, Boston 1982.
- 31) Harris, E. D. Jr. & Krane, S. M.: Collagenases. *N. Engl. J. Med.*, **291**, 605-609 (1974).
- 32) Wilhelm, S. M., Collier, I. E., Marmer, B. L., Eisen, A. Z., 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).
- 33) Mackay, A. R., Hartzler, J. L., Pelina, M. D. & Thorgeirsson, U. P.: Studies on the ability of 65-kDa and 92-kDa tumor cell gelatinases to degrade type IV collagen. *J. Biol. Chem.*, **265**, 21929-21934 (1990).
- 34) 五之治行雄: ヒト線維肉腫 (HT1080) 細胞由来 matrix metalloproteinase 9 (92kDa ゼラチナーゼ/IV型コラゲナーゼ) の性質と活性化機構. *十全医会誌*, **100**, 933-947, (1991).
- 35) Murphy, G., Cockett, M. I., Ward, R. V. & Docherty, A. J. P.: Matrix metalloproteinase degradation of elastin, type IV collagen and proteoglycan. A quantitative comparison of the activities of 95kDa and 72kDa gelatinases, stromelysin-1 and -2 and punctuated metalloproteinase (PUMP). *Biochem. J.*, **277**, 277-279 (1991).
- 36) Senior, R. M., Griffin, G. L., Fliszar, C. J., Shapiro, S. D., Goldberg, G. I. & Welgus, H. G.: Human 92- and 72-kilodalton type IV collagenases and elastases. *J. Biol. Chem.*, **266**, 7870-7875 (1991).
- 37) Stetler-Stevenson, W. G.: Type IV collagenase in tumor invasion and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.*, **9**, 289-308 (1990).
- 38) 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 metalloproteinases designated TIMP-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **86**, 8207-8211 (1989).
- 39) Howard, E. W., Bullen, E. C. & Banda, M. J.: Regulation of the autoactivation of human 72-kDa progelatinase by tissue inhibitor of metalloproteinase-2. *J. Biol. Chem.*, **266**, 13064-13069 (1991).
- 40) Khokha, R., Waterhouse, P., Yagel, S., Lala, P. K., Overall, C. M., Norton, G. & Denhardt, D. T.: Antisense RNA-induced reaction in murine TIMP levels confers oncogenicity on Swiss 3T3 cells. *Science*, **243**, 947-950 (1989).
- 41) 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).

Localization of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitor in Pulmonary Carcinomas Akiko Kimura, Department of Pathology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Japen Med Soc., **101**, 344—355 (1992)

Key words lung cancer, invasion and metastasis, matrix metalloproteinases, tissue inhibitor of metalloproteinases, immunolocalization

Abstract

In order to study the roles of matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitor (tissue inhibitor of metalloproteinases-1) in invasion and metastasis of lung cancer, MMP-1 (tissue collagenase), MMP-2 (72kDa gelatinase/type IV collagenase), MMP-3 (stromelysin-1), MMP-9 (92kDa gelatinase/type IV collagenase) and TIMP-1 were immunolocalized in the carcinoma tissues surgically removed from a total of 92 cases: pulmonary adenocarcinoma (47 cases), squamous cell carcinoma (30 cases), adenosquamous carcinoma (7 cases), large cell carcinoma (3 cases), small cell carcinoma (3 cases), and mucoepidermoid carcinoma (2 cases). Among these MMPs, MMP-1 and MMP-9 were immunolocalized in the carcinoma cells in 68.5% and 64.1% of the lung cancers, respectively. The ratio of immunoreactive cells to the total carcinoma cells in the specimens was $27.8 \pm 33.3\%$ (positive score, 1.97 ± 1.70) for MMP-1 and $12.9 \pm 20.5\%$ (positive score, 1.30 ± 1.38) for MMP-9. On the other hand, of the total samples, MMP-2 and MMP-3 were positively stained only in 3.3% and 5.4% respectively. TIMP-1 was immunolocalized in 18.5% of the cases, but the ratio was only $1.2 \pm 6.5\%$ (positive score, 0.25 ± 0.63). Amounts of MMP-3, MMP-9 and TIMP-1 secreted in the culture media by the lung tissues were measured by sandwich enzyme immunoassays. The levels of MMP-9 were significantly higher in the lung carcinomas (0.29 ± 0.40 nmol/g weight) and pneumonia (0.20 ± 0.22 nmol/g weight) than in the normal lung tissues (0.12 ± 0.16 nmol/g weight) ($p < 0.05$). However, there were no significant differences among TIMP-1 levels of the samples from the carcinomas (2.77 ± 1.92 nmol/g weight), pneumonia (3.55 ± 2.38 nmol/g weight) and normal control (3.19 ± 2.22 nmol/g weight). MMP-3 was detected only in a few samples and the amount in the carcinoma (0.11 ± 0.27 nmol/g weight) was significantly higher than that of normal control sample (0.04 ± 0.25 nmol/g weight) ($p < 0.01$). Gelatinolytic activity was also remarkably higher in the culture media of the carcinomas (24.7 ± 46.9 u/g weight) than that of normal control (6.6 ± 12.9 u/g weight) ($p < 0.01$). Gelatin-substrate gel electrophoresis showed that among the major gelatin-degrading activities with molecular weight (Mr) of 87,000, 64,000, 52,000 and 49,000, the former two of which were considered to be precursor forms of MMP-9 and MMP-2 respectively, the Mr 87,000 species is a predominant activity in all the samples. The results of the present study suggest that MMP-1 and MMP-9 play pivotal roles in degradation of the extracellular matrix macromolecules during pulmonary carcinoma cell invasion and metastasis, probably as a result of the imbalance between the production of the MMPs and TIMP-1 by the cancer cells.