

膵癌進展過程における matrix metalloproteinases (MMPs) の役割と膵癌血清診断への応用に関する基礎的研究

伊木 勝道

ヒト膵管癌の実験系であるハムスター膵発癌系において、細胞外基質分解酵素である matrix metalloproteinases (MMPs) の膵癌発生および、進展過程に対する役割を明らかにするとともに、血清中の MMPs の測定による膵癌血清診断の可能性を検索することを目的とした。材料としてニトロサミンにより誘発された原発性膵癌 (primary pancreatic cancer, PC), ハムスター膵管癌皮下継代移植株 (transplantable hamster pancreatic duct carcinoma, HPDt) および HPDt より培養樹立したハムスター膵管癌培養株 (hamster pancreatic duct carcinoma cell line, HPDc) を用い、MMP-2, -9, TIMP-1, -2, 膜型 MMP (MT1-MMP) の mRNA 発現をノーザン解析にて、MMP-2 蛋白の発現を免疫組織化学染色にて、更に、その酵素活性をゼラチンザイモグラフィにより解析した。また HPDt をハムスター背部皮下に移植し、腫瘍の増大にともなう血清中の MMPs 発現をゼラチンザイモグラフィ解析により検討した。ハムスター正常膵臓 (normal pancreas, NP) と比較して PC および HPDt では MMP-2, -9, TIMP-2, MT1-MMP の mRNA の過剰発現がみられた。HPDc ではいずれも有意な発現上昇はみられなかった。抗 MMP-2 抗体による免疫組織化学染色では、膵管上皮の過形成、異型過形成、膵管内癌、浸潤癌と病変が進展するにつれ MMP-2 蛋白発現が強くなる傾向がみられた。さらに、活性型 MMP-2 の発現は PC, HPDt で上昇しており、また MMP-2 活性化率と MT1-MMP の mRNA 発現量が正の相関を示した。血清中の MMPs 発現量は腫瘍の増大と相関していた。以上の結果よりハムスター膵癌の発生および進展に MMP-2 の発現活性化が重要であること、MMPs をマーカーとした膵癌の腫瘍血清診断の可能性が示唆された。

(平成11年2月23日受理)

Expression of Matrix Metalloproteinases (MMPs) during Hamster Pancreatic Duct Carcinogenesis and Detection of Serum MMPs in Tumor-bearing Hamsters

Katsumichi IKI

The expression of matrix metalloproteinases (MMPs), tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs), and the membrane type of metalloproteinase-1 (MT1-MMP) was investigated in pancreatic ductal carcinomas (PC) induced by N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine (BOP), transplantable hamster pancreatic duct carcinoma (HPDt) and pancreatic duct carcinoma cell lines (HPDc) in hamsters. Northern analysis revealed overexpression of MMP-2, MMP-9, TIMP-2 and

MT1-MMP mRNAs in PC and HPDt. Immunohistochemically, elevated MMP-2 levels were apparent in early duct epithelial hyperplasias and staining increased from atypical hyperplasias to carcinomas. Gelatin zymography demonstrated clear activation of MMP-2 in carcinomas, and proMMP-2 activation correlated with the MT1-MMP mRNA level. Sera from hamsters with HPDt possessed serum MMP-2 levels five times higher than the control sera as determined by gelatin zymographic analysis. These results suggest that overexpression of MMP-2, MMP-9, TIMP-2, and MT1-MMP and activation of proMMP-2 is involved in the progression of pancreatic duct carcinomas and that MMP-2 protein expression appears in the early phase of pancreatic duct carcinogenesis in hamsters. Therefore, serum MMPs may be useful markers for monitoring patients with pancreatic adenocarcinoma. (Accepted on February 23, 1999) *Kawasaki Igakkaishi* 25(1): 1-10, 1999

Key Words ① Matrix metalloproteinase (MMP)
② Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) ③ Hamster
④ Pancreatic cancer ⑤ Serum

はじめに

近年、癌の局所浸潤、転移を助長するものとして細胞外基質分解酵素である、matrix metalloproteinases (MMPs) が注目されている。現在までおよそ20種類の MMP ファミリーが同定されており^{1), 2)}、そのなかでも、タイプIVコラーゲンを基質とする MMP-2、および MMP-9が癌の遠隔転移、局所浸潤に強く関わっていると報告が見られる^{3), 4)}。ヒト癌では、肺^{5), 6)}、胃⁷⁾、乳線^{8)~10)}、膵臓^{11)~12)}および数種類の cell line¹¹⁾で本酵素と癌の浸潤、転移の相関が報告されている。MMPs を特異的に阻害する tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs) は現在まで4種類報告されているが、MMPs 阻害酵素としてのみならず、MMPs の調節物質としての役割が注目されている^{11), 12)}。特に、TIMP-2は膜型 MMP (membrane type-matrix metalloproteinase, MT-MMP) との協調作用により、MMP-2の活性化に関わっていると考えられている^{8), 13)~18)}。

本邦における癌死の第5位をしめる膵癌¹⁹⁾は、難治性癌の代表であり、その特異な浸潤過程や、早期の肝転移などにより、診断時には手術不能例が少なくなく、予後不良の経過をたどるもの

がほとんどである。このため、膵癌の早期発見、および、予防法の確立が本疾患をコントロールするうえで重要な課題となっている。しかしながら、in vivo の実験系における癌の浸潤、転移に関する本酵素群の知見は乏しく、膵癌の発生・増殖・進展の各段階における検索は充分になされていない。今回、N-nitrosobis(2-oxopropyl) amine (BOP) 誘発ハムスター膵癌²⁰⁾、その膵癌株の cell line (HPDc)、および、可移植性膵癌株 (HPDt)^{21), 22)}を用い、膵管癌の発癌、進展過程における MMPs, TIMPs, MT-MMP の関与を検討し、更に、担癌動物の血清中 MMPs を測定することにより、MMPs の診断的意義について検索した。

材料および方法

1) 動物および処置

動物は7週齢雌シリアンハムスター (日本 SLC, 静岡) を用いた。実験プロトコールは Figure 1 に示した。70 mg/kg 体重の BOP をイニシエーションとして皮下投与し、その12日後より、短期膵発癌モデル^{23)~25)}に従い、コリン欠乏食 (choline deficiency diet, CD diet), エチオニン (500 mg/kg), メチオニン (800 mg/kg), BOP (20 mg/kg) 投与よりなる一連の操作 (促

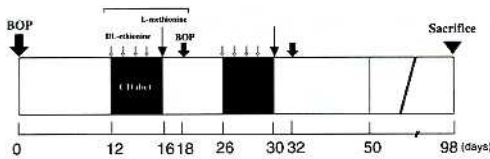


Fig. 1. Experimental protocol of the rapid production model for pancreatic duct adenocarcinomas in hamsters. ↓ : 70 mg/kg BOP, s.c. ↓↓ : 20 mg/kg BOP, s.c. ↓↓ : 500 mg/kg DL-ethionine, i.p. ↓ : 800 mg/kg L-methionine, i.p. ▼ : sacrifice. CD diet : choline deficiency diet.

進圧力操作)を2回行い、実験開始98日目に全動物をエタノール麻酔下で屠殺、剖検した。肉眼的に確認可能な膵臓の腫瘍を摘出し、RNA抽出、酵素活性測定のためにその一部を速やかに液体窒素に凍結保存した。残りを病理組織学的検索のために中性緩衝ホルマリンにて固定後、パラフィン包埋し、薄切切片を作製した。週齢の合致した無処置のハムスター膵臓を対照として用いた。

2) HPDt および cell lines

可移植性膵癌培養細胞株および cell lines の詳細は文献^{(21), (22)}に報告されている。本実験では、HPDt は同系ハムスターに継代移植した145代目を用いた。この膵癌株は組織標本で膵管腺癌であることが確認され、doubling time は5日であった。本腫瘍も同様に液体窒素に凍結保存した。cell line の培養には、抗生物質(100 U/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin), 2 mmol/l L-glutamine を加えた Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) に10%胎児牛血清 (FBS) を混合させて使用した。

3) ノーザンプロット解析

ノーザンプロット解析の為に reverse transcription-polymerase chain reaction 法(RT-PCR 法)により MMPs, TIMPs, の cDNA プロローベを作製した。シーケンスは以下のとおりである。MMP-2, 5'-TGATCTCCAGTGGCCCTC-3', および5'-TGGCGAACACAGCACTC-3', MMP-9, 5'-AGCGAGACACTAAAGGCCAT-3' および5'-TGCAGGACAAATAGGAGCGT-3', TIMP-1, 5'-CCAGAAATCATCGAGACCACT-3' および6'-GGCAGGCAAAGTGATCGCTCT-3', TIMP-2,

5'-TGACAAAGAGGACAGAAAGT-3' および5'-TATTCCTTCTTTCTCCAAC-3'.

PCR により増幅した目的の DNA 断片は direct sequencing を行い、DNA 塩基配列を確認後、プローベとして用いた。

なお MT1-MMP に関しては金沢大学、佐藤博博士からプローベの供与を受けた。先の凍結標本より、リチウムクロライドウレア法により total RNA を抽出した⁽²⁶⁾。20 μg の total RNA を1%アガロース/ホルマインゲルで電気泳動の後、Hybond-N ナイロンメンブレン (Amersham Int. plc, Buckinghamshire, England) に転写、固定した。α-³²P-dCTP 標識した MMP-2, -9, TIMP-1, -2, MT1-MMP 各々の cDNA プロローベを用い、ノーザンハイブリダイゼーションを行った。ハイブリッドされたバンドのデンストメトリーを測定し、GAPDH にて標準化後、定量を行った。

4) 免疫組織化学染色およびウエスタンブロット

免疫組織化学染色は、得られた組織を中性緩衝ホルマリンで24時間固定した後、パラフィン切片を作成し、抗ヒト MMP-2モノクローナル抗体 (Fuji Chemical Industries, Ltd. Takaoka, Japan) を一次抗体として、LSAB キット (DACO Japan, Kyoto, Japan) を用いたストレプトアビジンビオチン法にて行った。光学顕微鏡にて400倍で検鏡し、細胞質が褐色に染色された細胞を陽性細胞とし、無作為に選出した3視野において各々細胞200個を計測して得られた陽性細胞率をもとに以下の4段階にわけた。すなわち、5%以下の陽性率を negative, 5%から30%の陽性率を slightly positive, 30%から60%の陽性率を positive, 60%以上の陽性率を strong positive として評価した。また同じ抗体を用いたウエスタンブロットを行い、抗体の交叉性および MMP-2 のサイズ (62 kDa) を確認した。10 mg 凍結標本を溶出 buffer (1% Triton X-100, 50 mM Tris, 300 mM NaCl) 内でホモジネートし、遠心分離の後その上清を10% SDS-PAGE にて泳動し、polyvinylidene difluoride transfer

membrane (Millipore Co., Bedford, MA) に転写した。蛋白が転写されたメンブレンは5%スキนมilk, 抗マウス IgG 抗体でブロッキングした後, 上記抗ヒト MMP-2モノクローナル抗体を反応させ, enhanced chemiluminescence detection 法 (ECL kit, Amersham) にて発色させた。

5) ゼラチンゼイモグラフィー

MMPs の酵素活性を測定するために, ゼイモグラフィーを行った²⁷⁾。凍結標本をホモジナイズした後, 蛋白を含む上清を 1 mg/ml のゼラチンを重合させた 10% SDS-PAGE にて電気泳動し, インキュベーション buffer (50 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 10 mM CaCl₂) 内で 37℃ 16時間インキュベートした。その後 Coomassie blue R-250 (SIGMA, Tokyo, Japan) にて染色, 洗浄し, 脱色部分のデンストメトリーを測定し, 酵素活性の指標とした。

6) 担癌動物における血清中 MMPs 活性の測定

血清中 MMPs 活性と腫瘍増殖の関係を検討するために, HPDt 細胞を皮下に移植したハムスターを用いた。30 mg/body HPDt をトロッカーで皮下に移植後, 7日目, 14日目, 21日目に皮下の腫瘍を摘出し, 腫瘍重量を測定, 同時に血液を採取し, 血清中の MMPs 活性をゼイモグラフィーで定量した。コントロールとして無処置ハムスターの血清を用いた。

7) 統計処理

統計学的処理として, χ^2 テスト, Mann-Whitney U テスト, Student's t テストを行った。P < 0.05 を有意差ありとした。

動物の取扱については, 奈良医科大学動物実験管理規程に基づき, 実験計画の承認を

うけた (受付 No. 2587-3319)。

結 果

1) ノーザンブロット解析

ハムスター膀胱癌系にて作成した PC, HPDc, HPDt および NP より抽出した RNA を用い, MMPs, TIMPs, MT1-MMP についてノーザン解析を行った。全ての PC と HPDt, NP の一部に発現が認められた (Fig. 2)。HPDc では NP に比して優位な発現はみられなかった。得られ

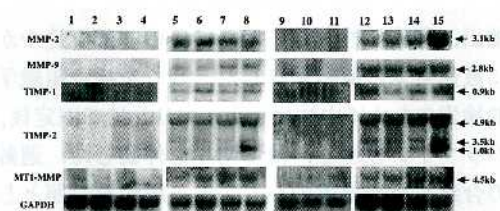


Fig. 2. Representative results of Northern blot analysis for mRNA expression of MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2, and MT1-MMP in NP (lanes 1-4), PC (lanes 5-8), HPDc (lanes 9-11), HPDt (lanes 12-15). A single mRNA transcript was evident for each enzyme in all of the examined samples with the exception of three transcripts noted for TIMP-2.

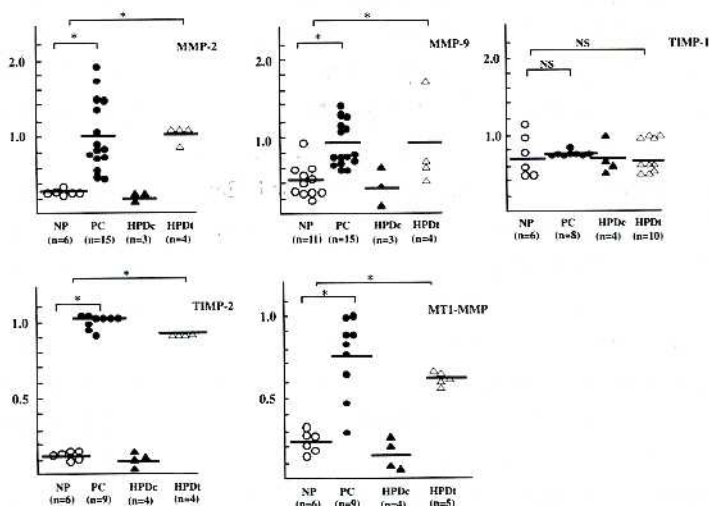


Fig. 3. Results of densitometric analysis of mRNA levels of MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2, and MT1-MMP in NP, PC, HPDc and HPDt standardized to GAPDH mRNA levels (arbitrary units). Bars, means; *, with significant difference; NS, not significant. The mRNA levels of MMP-2, MMP-9, TIMP-2, and MT1-MMP all significantly increased in both PC and HPDt as compared with NP. In contrast, no alterations in TIMP-1 mRNA levels were evident.

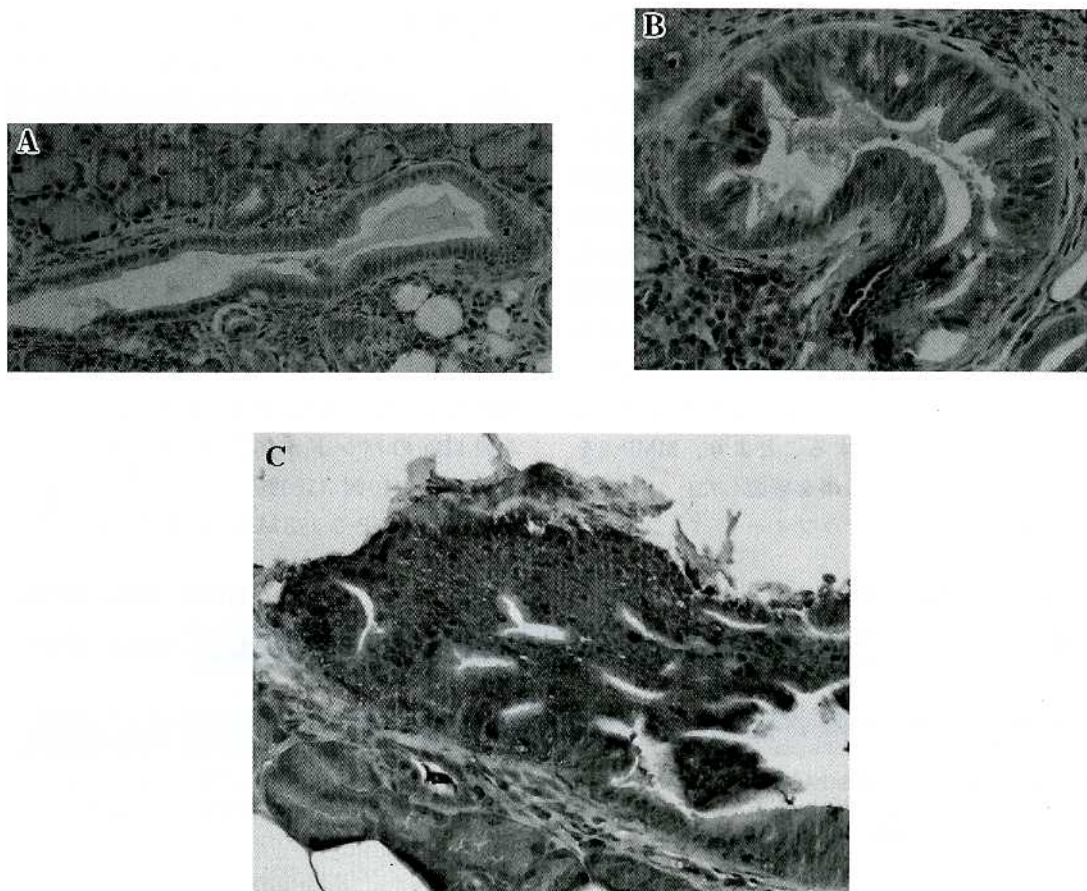


Fig. 4. Immunohistochemical findings of MMP-2 protein in hamster pancreatic lesions. A, normal pancreatic duct; B, hyperplasia; C, atypical hyperplasia. Gradual increase in the incidence and extent of staining was observed with progression to malignancy.

Table 1. Immunohistochemical findings of MMP-2 protein expression in hamster pancreatic ductal lesions.

Lesion category	Number stained positively or negatively *			
	Negative	Slightly positive	Positive	Strongly positive
N (n=36)	36 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
H (n=54)	37 (68.5)	16 (29.6)	1 (1.9)	0 (0)
AH (n=24)	0 (0)	6 (25.0)	16 (66.7)	2 (8.3)
PC (n=11)	0 (0)	1 (9.0)	6 (54.5)	4 (36.4)

N, non-treated sample; H, hyperplasia; AH, atypical hyperplasia; PC, Pancreatic ductal adenocarcinoma

*. Values in parentheses show the incidence (%)

たバンドのデンストメトリー解析結果を Figure 3 に示す。PC における MMP-2, および MMP-9 のシグナルインテンシティーはそれぞれ 1.02 ± 0.46 , 0.87 ± 0.32 で, NP (0.32 ± 0.04 , 0.43 ± 0.21) に比して有意に増加してい

た ($P < 0.001$, $P < 0.01$)。また, PC における TIMP-2, MT1-MMP のシグナルインテンシティーはそれぞれ 1.02 ± 0.03 , 0.76 ± 0.09 で NP (0.16 ± 0.04 , 0.20 ± 0.02) に比し有意な増幅を示した ($P < 0.01$, $P < 0.001$)。TIMP-1 に関しては PC, HPDc, HPDt, NP の間で有意差は認めなかった。

2) 免疫組織化学染色およびウエスタンブロット解析

NP では, acinar cell や islet cell が negative-slightly positive に染まるものもみられたが, 正常膵管上皮は全て negative であり, その異型度が増すにしたがい強く染まる傾向にあった (Fig. 4A, B, C)。膵管病変における MMP-2 発現の検索結果を Table 1 に示す。正常膵管上皮

(negative: 100%), 膵管上皮過形成 (slightly positive-positive: 31.5%) の染色性は低かったが, 異型過形成 (positive-strong positive: 75%), 初期浸潤癌 (positive-strong positive: 90.9%) と病変が進展していくにつれ, 染色性の増強がみられた。また, MMP-2蛋白は異型細胞の細胞質内のみならず, 癌細胞周囲の間質組織および, 癌細胞巣 (cancer nest) 内における間質成分にもその局在を認めた。上述の抗体がハムスターに特異的に反応していることを示すために, ウェスタンブロットを行い, この抗体が分子量 62 kDa の蛋白と反応することより, MMP-2を特異的に認識している事を確認した。

3) ゼラチンゼイモグラフィー

Figure 5 に示す様に, 施行した NP を含む全てのサンプルで MMP-2 の前駆体である潜在型 MMP-2 (proMMP-2) の存在を示す 62 kDa のバンドが認められた。またより大きな 92 kDa の潜在型 MMP-9 (proMMP-9) のバンドは HPDt において有意に認められた。16例中12例 (75%) の PC, 10例中10例 (100%) の HPDt において生体内で活性を示すとされる 58 kDa の活性型 MMP-2 のバンドが検出された。NP においてはこの 58 kDa のバンドはほとんど検出されなかった。また, proMMP-9 を示すとされる 92 kDa のバンドが 16例中2例 (12.5%) の PC, 10例中10例 (100%) の HPDt にみられたが活性型 MMP-9 (78 kDa) は検出されなかつ

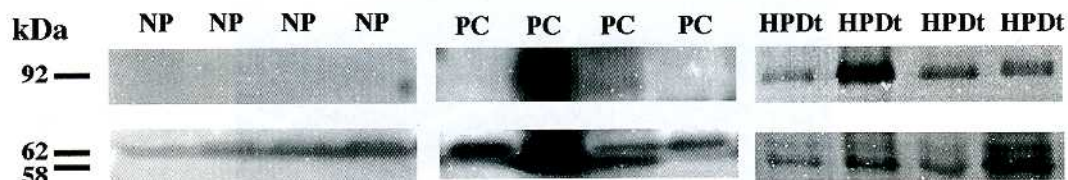


Fig. 5. Representative SDS-PAGE zymography findings for the gelatinase activity of MMP-2 in PC, HPDt, and NP. The bands of 92, 62 and 58 kDa were attributed to proMMP-9, proMMP-2 and the active form of MMP-2, respectively. The active form of MMP-9 was not detected in any of the samples.

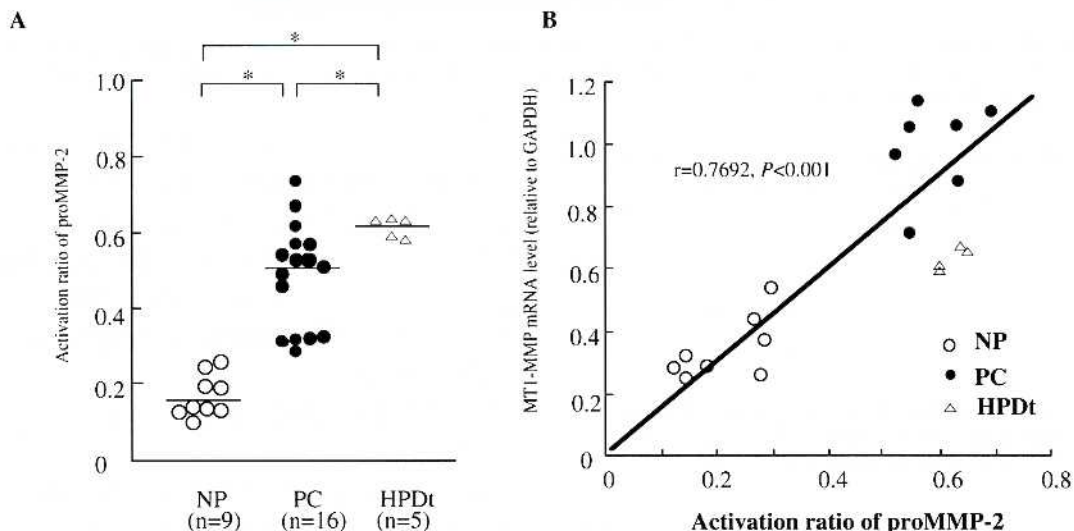


Fig. 6. A: Activation ratios of proMMP-2 (the ratio of the 58 kDa active form to proMMP-2 and active forms) in the tissue homogenates from PC, HPDt and NP. Bars, means. *, $P < 0.05$. The ratios in PC and HPDt were significantly higher than in NP.

B: Correlations of proMMP-2 activation ratio with MT1-MMP mRNA expression in pancreatic lesions. proMMP-2 activation correlated linearly with the MT1-MMP mRNA level.

た。デンシトメトリー測定による MMP-2 の活性化率 (活性型 MMP-2 (58 kDa) / proMMP-2 (68 kDa) + 活性型 MMP-2) をみると (Fig. 6A) PC (0.46 ± 0.15) は NP (0.18 ± 0.04) に比べ有意に高く ($P < 0.001$), HPDt (0.60 ± 0.03) は PC より有意に高値であった ($P < 0.05$)。また, MMP-2 の活性化率と MT1-MMP の相関をみるために, ノーザンブロットで定量した同一サンプルを用い (NP, $n=8$; PC, $n=7$; HPDt, $n=4$), MT1-MMP の mRNA レベルに対応する MMP-2 の活性化率をグラフ上にプロットすると正の相関が得られた ($r=0.7692$, $P < 0.001$) (Fig. 6B)。

4) 血清中 MMPs 活性と腫瘍増殖

血清中 MMPs 活性と腫瘍増殖の相関をみた。皮下移植後では, わずかに 92 kDa (proMMP-9), 62 kDa (proMMP-2) のバンドが認められたが, 腫瘍が増大していくにつれ, 92 kDa (proMMP-9), 78 kDa (活性型 MMP-9), 62 kDa (proM

MP-2), 58 kDa (活性型 MMP-2) のバンドの intensity が増加していた。21 日目ではコントロールに比して約 5 倍のデンシトメトリー強度を示した (Fig. 7A)。腫瘍重量の増加と 62 kDa (proMMP-2), および 58 kDa (活性型 MMP-2) のバンドの intensity は, 正の相関 ($P=0.01$) を示した (Fig. 7B)。

考 察

細胞外基質分解酵素である MMP-2 や MMP-9 の発現が, 腫瘍の進展, 転移に関わっており, その発現が癌の診断や, 予後を知るうえで重要であるという事が知られている。今回検討した結果では, RNA レベルでは, PC, HPDt ともに MMP-2 の高発現がみられたが, 蛋白レベルでのその活性化率をみると HPDt が PC に比してより有意な活性上昇がみられた。即ち, 腭癌のなかでもより悪性度が高い腭癌²²⁾では, 活性

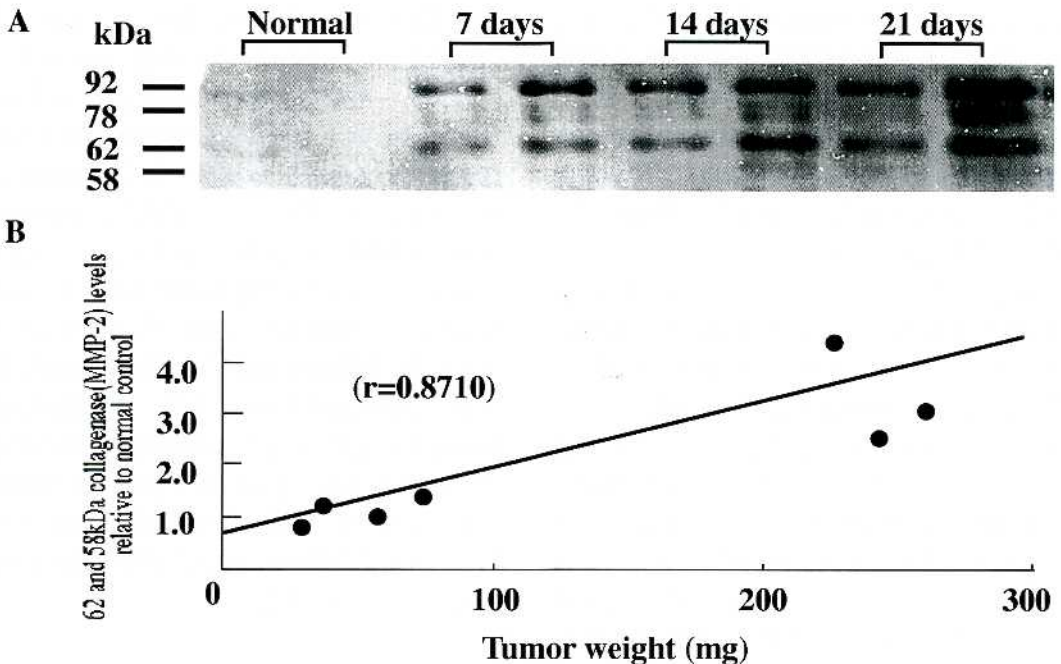


Fig. 7. Detection of MMPs in the serum of tumor-bearing hamsters.

A: Representative SDS-PAGE zymography findings for gelatinase activity of serum MMPs in hamsters with HPDt. A gradual increase in the density of the bands was observed with progression of HPDt.

B: Correlations of 62 and 58 kDa collagenase (MMP-2) levels with the tumor weight of HPDt. MMP-2 levels correlated linearly with the tumor weight levels.

型 MMP-2 蛋白の発現がより顕著である事が示された。さらに、免疫組織化学染色の結果より、MMP-2 が腫瘍発生過程の初期段階、つまり、過形成から異型過形成へ進展する段階で発現の増加がみられること、さらに、ザイモグラフィの結果より、腫瘍の進展に伴って、MMP-2 の活性化率も上昇してくる事が示され、MMP-2 の発現、活性化が腫瘍の発生に重要であることが示唆された。一方、MMP-9 は RNA レベルでの高発現は見られるものの、蛋白レベルでは、proMMP-9 は存在するが活性型としてみられるものは存在しなかった。この結果より、癌の局所浸潤においてはむしろ MMP-2 が関与し、MMP-9 の関与は少ないことが示唆される。Koshiba T らの報告^{12), 13)}においても、切除標本のみの検索結果ではあるが、本実験と同様の見解が示されている。しかしながら、腫瘍モデルを用いて多段階に MMPs の発現を検索している報告は世界的にみても皆無に等しく、この点において本実験は重要な意味があると思われる。また、HPDc で MMPs の発現が認められないのは、間質細胞の存在により MMPs の発現が制御されている可能性が考えられる。また、免疫組織化学染色の結果、MMP-2 の局在が癌細胞のみならず間質細胞にも認められていることから MMPs の発現には癌細胞と間質の相互作用が重要であると考えられる^{3), 11), 12)}。

MMP の阻害物質として知られる TIMPs は、MMPs との協調関係により、局所での MMP 活性を調節していると考えられており、癌細胞、あるいは、癌周囲組織においては両者のバランスの不均衡が、癌の進展を助長していると言われている¹¹⁾。特に TIMP-2 は MT1-MMP、proMMP-2 との複合体形成による MMP-2 の活性化機構に関与している事が明らかになってきており^{14)~18)}、本実験における TIMP-2 mRNA の過剰発現は、単に、MMPs に対する拮抗的な増加反応のみならず、MMP-2 の活性化にも関わっている可能性が示唆された。更に、MMP-2 の活性化率と MT1-MMP の mRNA レベルでの発現が正の相関を示す事により、TIMP-2 と

同様、MT1-MMP の発現が MMP-2 の活性化に作用していることが示唆される。

腫瘍の増大に伴い、血清中の MMPs レベルの上昇が示されたが、この MMPs は非常に早期の段階である皮下移植後 7 日目の血清中より検出され、さらに腫瘍重量と MMPs レベルが相関関係を示すことから MMPs が診断のマーカーとして有用である可能性が示唆された。

近年、癌の発生・増殖・進展には多くの遺伝子異常が多段階的に蓄積することが明らかにされ、腫瘍においても多くの遺伝子異常が報告されているが、腫瘍発生の分子機構についての解明はまだ充分にはなされていない。ハムスターの肺管癌は病理組織学的にヒト肺管癌と近似しており、ヒトでは検索困難な肺管癌の発生初期から段階的に肺管病変を検索しうることによりヒト肺管癌の研究に重要な実験系であるとされている。これまでにハムスター腫瘍発生過程において、K-ras の point mutation が発癌早期からみられ、p 53 の mutation はより late stage に生じる事が明らかになっている^{28)~34)}。また最近話題になっているテロメラーゼ活性の上昇も、ハムスターの原発性肺管癌のみならず、cell line (HPDc) や、ニトロサミン誘発の胆管癌でも確認されている^{35), 36)}。本実験における MMPs の異常発現がそれ自身の遺伝子異常によるものか、あるいは MMPs 誘発因子 (各種サイトカイン) の機構異常なのかは今後の実験結果を待たねばならないが、癌の発生、進展が多因子であると考えれば、MMPs の発現異常も腫瘍発生過程における一つの作用因子とみなされ、その発現は腫瘍の発生・浸潤・増生に重要な役割を果たすものと考えられる。さらに本実験結果は MMPs の腫瘍早期診断への応用の可能性、MMPs を標的とした新たな腫瘍の予防や治療法の開発の可能性を示すものである。

稿を終えるにあたり、終始直接の指導を賜りました奈良県立医科大学腫瘍病理学教室小西陽一教授、堤 雅弘講師ならびに、川崎医科大学外科学 (消化器) 教室角田 司教授に謝意を捧げます。

本研究の一部は、第57回日本癌学会総会、第99回日本外科学会総会にて発表した。さらに、川崎医科大学プロジェクト研究費（10-302）ならびに文部省科学研

究費補助金基盤研究（c）（2）09671347,（c）（2）10671229の援助によって行われた事を付記し、感謝の意を表します。

文 献

- 1) Den Besten PK, Panzi JS, Li W : Purification and sequencing of a 21 kDa and 25 kDa bovine enamel metalloproteinase. *Eur J Oral Sci* 106 : 345-349, 1998
- 2) Llano E, Pendas AM, Knauper V, Sorsa T, Salido E, Murphy G, Simmer JP, Bartlett JD, Lopez-Otin C : Identification and structural and functional characterization of human enamelysin (MMP-20). *Biochemistry* 36 : 15101-15108, 1997
- 3) Zena W : ECM and cell surface proteolysis : Regulating cellular ecology. *Cell* 91 : 439-442, 1997
- 4) Ohtani H : Stromal reaction in cancer tissue : Pathophysiologic significance of the expression of matrix-degrading enzymes in relation to matrix turnover and immune/inflammatory reactions. *Pathol Int* 48 : 1-9, 1998
- 5) Tokuraku M, Sato H, Murakami S, Okada Y, Watanabe Y, Seiki M : Activation of the precursor of gelatinase A/72 kDa type IV collagenase/MMP-2 in lung carcinomas correlates with the expression of membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP) and with lymph node metastasis. *Int J Cancer* 64 : 355-359, 1995
- 6) Brown PD, Bloxide R, Stuart NSA, Gatter C, Carmichael J : Association between expression of activated 72-kDa gelatinase and tumor spread in non-small-cell lung carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 85 : 574-578, 1993
- 7) Nomura H, Sato H, Seiki M, Mai M, Okada Y : Expression of membrane-type matrix metalloproteinase in human gastric carcinomas. *Cancer Res* 55 : 3263-3266, 1995
- 8) Ueno H, Nakamura H, Inoue M, Imai K, Noguchi M, Sato H, Seiki M, Okada Y : Expression and tissue localization of membrane-types 1, 2, and 3 matrix metalloproteinases in human invasive breast carcinomas. *Cancer Res* 57 : 2055-2060, 1997
- 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) Davies B, Miles DW, Happerfield LC, Naylar MS, Bobrow L, Rubens RD, Balkwill FR : Activity of type IV collagenases in benign and malignant breast disease. *Br J Cancer* 67 : 1126-1131, 1993
- 11) Simon RB, Jhon PN, Goldon WHS, Nicholas RL : Imbalance of expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in human pancreatic carcinoma. *J Pathol* 182 : 347-355, 1997
- 12) Koshiba T, Hosotani R, Wada M, Fujimoto K, Jeon UL, Doi R, Arai S, Imamura M : Detection of matrix metalloproteinase activity in human pancreatic cancer. *Surg Today* 27 : 302-304, 1997
- 13) Koshiba T, Hosotani R, Wada M, Yoshiharu M, Fujimoto K, Jeon UL, Doi R, Arai S, Imamura M : Involvement of matrix metalloproteinase-2 activity in invasion and metastasis of pancreatic carcinoma. *Cancer* 82 : 642-650, 1998
- 14) 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 : 721-731, 1990
- 15) Ward RV, Atkinson SJ, Reynolds JJ, Murphy G : Cell surface activation of progelatinase A in cell surface binding and activation of progelatinase A by primary fibroblasts. *Biochem J* 304 : 263-269, 1994
- 16) Sato H, Takino T, Okada Y, Cao J, Shinagawa A, Yamamoto E, Seiki M : A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumor cells. *Nature* 370 : 61-65, 1994
- 17) 上野浩久, 岡田保典 : 膜結合型メタロプロテアーゼとマトリックス代謝. *生体の科学* 48 : 301-306, 1997
- 18) 今井一志 : がん細胞の浸潤, 転移とマトリックスメタロプロテアーゼ, 蛋白質 核酸 酵素 42 : 1694-

1701, 1997

- 19) Health and Welfare Statistics in Japan, Tokyo : Health and Welfare Association 40, 1993
- 20) Pour PM, Salmasi SZ, Runge RG : Selective induction of pancreatic ductular tumors by single dose of N-nitrosobis (2-oxopropyl) amine in syrian golden hamsters. *Cancer Lett* 4 : 317-323, 1978
- 21) Egawa S, Tsutsumi M, Konishi Y : The role of angiogenesis in the tumor growth of Syrian hamster pancreatic cancer cell line HPD-NR. *Gastroenterology* 108 : 1526-1533, 1995
- 22) Mori T, Tsutsumi M, Noguchi O, Horiguchi K, Hohnoki K, Okita S, Suzuki F, Konishi Y : Characterization of three cloned cell lines from a N-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine-induced transplantable hamster pancreatic ductal adenocarcinoma. *Int J Pancreatol* 16 : 171-177, 1994
- 23) Mizumoto K, Kitazawa S, Ito S, Takashima Y, Tsutsumi M, Denda A, Konishi Y : Cycles of repeated augmentation pressure in rapid production of pancreatic and cholangiocellular carcinomas in hamsters initiated with N-nitrosobis(2-oxopropyl) amine. *Carcinogenesis* 10 : 1457-1459, 1989
- 24) Mizumoto K, Tsutsumi M, Kitazawa S, Denda A, Konishi Y : Rapid production of pancreatic carcinoma by initiation with N-nitrosobis(2-oxopropyl) amine and repeated augmentation pressure in hamsters. *J Natl Cancer Inst* 80 : 1564-1567, 1988
- 25) Mizumoto K, Tsutsumi M, Kitazawa S, Denda A, Konishi Y : Usefulness of a rapid production model for pancreatic carcinoma in male hamsters. *Cancer Lett* 49 : 211-215, 1990
- 26) Cathala G, Savouret JF, Mendez B, West DL, Martial JA, Baxter JP : Laboratory methods. A method for isolation of intact transcriptionally active ribonucleic acid. *DNA* 2 : 329-335, 1983
- 27) Nakajima IA, Sasaguri S, Nagase H, Mori Y : Coculture of human breast adenocarcinoma MCF-7 cells and human dermal fibroblasts enhance the production of matrix metalloproteinases 1, 2, and 3 in fibroblasts. *Br J Cancer* 71 : 1039-1045, 1995
- 28) Konishi Y, Tsutsumi M, Tsujiuchi T : Mechanistic analysis of pancreatic ductal carcinogenesis in hamsters. *Pancreas* 16 : 300-306, 1998
- 29) 堤 雅弘, 小西陽一 : 膵癌における遺伝子変化. 胆と膵 14 : 1077-1080, 1993
- 30) 堤 雅弘, 小西陽一 : 膵癌と癌遺伝子. 消化器病セミナー 63 : 135-150, 1996
- 31) Konishi Y, Mizumoto K, Kitazawa S, Tsujiuchi T, Tsutsumi M, Kamano T : Early ductal lesions of pancreatic carcinogenesis in animals and hamsters. *Int J Pancreatol* 7 : 83-89, 1990
- 32) Tsutsumi M, Kondoh S, Noguchi O, Horiguchi K, Kobayashi E, Okita S, Ohashi K, Hohnoki K, Tsujiuchi T, Konishi Y : K-ras gene mutation in early ductal lesions induced in rapid production model for pancreatic carcinomas in Syrian hamsters. *Jpn J Cancer Res* 84 : 1101-1105, 1993
- 33) Tsutsumi M, Murakami Y, Kondoh S, Tsujiuchi T, Hohnoki K, Noguchi O, Kobayashi E, Okita S, Sekiya T, Konishi Y : Comparison of K-ras oncogene activation in pancreatic duct carcinomas and cholangiocarcinomas induced in hamsters by N-nitrosobis(2-oxopropyl) amine. *Jpn J Cancer Res* 84 : 956-960, 1993
- 34) Okita S, Tsutsumi M, Onji M, Konishi Y : p53 mutation without allelic loss and absence of mdm-2 amplification in a transplantable hamster pancreatic ductal adenocarcinoma and derived cell lines but not primary ductal adenocarcinomas in hamsters. *Mol Carcinog* 13 : 266-271, 1995
- 35) Kobitsu K, Tsutsumi M, Tsujiuchi T, Suzuki F, Kido E, Okajima T, Fukuda T, Sakaki T, Konishi Y : Shortened telomerase length and increased telomerase activity in hamster pancreatic duct adenocarcinomas and cell lines. *Mol Carcinog* 18 : 153-159, 1997
- 36) Iki K, Tsujiuchi T, Majima H, Sakitani H, Tsutsumi M, Takahama M, Yoshimoto M, Nakae D, Tsunoda T, Konishi Y : Increased telomerase activity in intrahepatic cholangiocarcinomas induced by N-nitrosobis(2-oxopropyl) amine in hamsters. *Cancer Lett* 131 : 185-190, 1998