

原 著

三次元解析による口腔扁平上皮癌の浸潤様式と MMP-2,
MMP-9 および MT1-MMP の発現に関する研究宇都宮記念病院 歯科口腔外科¹⁾いわせ歯科口腔外科耳鼻咽喉科クリニック²⁾獨協医科大学 口腔外科学講座³⁾城守 美香¹⁾ 佐々木忠昭¹⁾ 岩瀬 博建^{1,2)} 今井 裕³⁾

要 旨 われわれは口腔扁平上皮癌の浸潤様式に対してはじめて三次元解析による検討を行ない、その有用性について報告してきた。今回は、癌の浸潤・転移において重要な役割を担う細胞外マトリックス分解酵素のうち、Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2)、MMP-9 および Membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) の発現と三次元解析による浸潤様式との関係について検討を行ったので報告する。対象は獨協医科大学病院口腔外科で加療した口腔扁平上皮癌一次症例 175 例のうち、三次元解析が可能であった根治的手術症例 31 例を用いた。MMP-2、MMP-9 および MT1-MMP のそれぞれの発現陽性率は 38.7%、67.7%、100% であった。非連続型は連続型に比較し、MMPs の発現頻度は高く、また発現部位は腫瘍細胞だけでなく、間質の細胞にも発現していた。非連続型は MMPs が単独で、あるいは相互に作用しあい、び慢性に浸潤することが示唆された。今回の検討により、MMPs の発現と三次元解析による浸潤様式は密接に関連し、両者とも口腔癌の治療法の決定や予後予測に有用であることが示された。

Key Words : 口腔癌, 浸潤様式, 三次元解析, 予後, マトリックスメタロプロテアーゼ (matrix metalloproteinase)

緒 言

口腔扁平上皮癌において病理組織学的悪性度と予後とは関連することがこれまで多くの論文において報告されている^{1~5)}。また数多く存在する病理組織学因子の中でも、特に、浸潤様式と予後のかかわりは重要であることが指摘されている^{1~2,6~8)}。しかし他方では浸潤様式が必ずしも予後と相関しないことも報告されている^{9,10)}。この問題を解決すべく、われわれは三次元解析によって口腔癌の浸潤様式と予後との関連について検討を行った¹¹⁾。その結果、三次元解析による浸潤様式は、従来の二次元解析による浸潤様式よりも口腔癌の治療成績をより正確に反映することが示された。

一方、癌の浸潤・転移には、癌細胞による Extracellular matrix (ECM) 分解と細胞運動の協調作用が不可欠である。1980 年に Liotta ら¹²⁾ は、基底膜の主要構成成分である IV 型コラーゲンを特異的に分解する IV 型コラーゲナーゼ Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) と癌転移との相関を示し、癌浸潤・転移研究において MMP-2 が注目されるようになった。1989 年には Wilhelm ら¹³⁾ によって MMP-9 の精製、cDNA のクローニングが成された。1994 年には Sato ら¹⁴⁾ が MMP-2 の活性化因子として Membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) を発見した。MT1-MMP は C 末端に貫通領域を有し、細胞表面に発現して MMP-2 を活性化することが判明した。MT1-MMP は、MMP-2 の他に MMP-9 と MMP-13 を活性化することで ECM 分解カスケードの活性化を行い、また自らも直接 I, II, III 型コラーゲン、ラミニン、プロテオグリカン、フィブロネクチンなどの ECM 構成成分を分解する¹⁵⁾。MT1-MMP による ECM 分解は細胞-ECM 間接着や細胞運動も制御していることが知られており、臨床研究からは

平成 23 年 10 月 31 日受付, 平成 24 年 1 月 13 日受理
別刷請求先: 佐々木忠昭

〒320-0811 栃木県宇都宮市大通り 1 丁目 3 番
16 号

宇都宮記念病院 歯科口腔外科

表1 対象症例の臨床的背景

性別	男性 18例	女性 13例
年齢	30~80歳 (平均 58.9±12.6歳)	
発生部位	舌	22例
	下顎歯肉	3例
	頬粘膜	3例
	口底	2例
	軟口蓋	1例
T分類	T1: 5例	
(2002, UICC)	T2: 19例	
	T3: 0例	
	T4: 7例	
N分類	N0: 14例	
	N1~3: 17例	

表2 浸潤様式の三次元分類 (2006)

浸潤様式	組織学的特徴
連続型	
圧迫型	境界が明瞭で周囲を圧迫しながら浸潤するタイプ
索状型	境界は不明瞭で、大小索状にあるいはコード状に連続しながら浸潤するタイプ
非連続型	胞巣を形成せず、び慢性に浸潤するタイプ

とんどの癌組織で MT1-MMP の発現レベルの上昇と MMP-2, MMP-9 の活性化や癌の浸潤・転移に正の相関関係があることが認められた。

今回は、三次元解析による口腔癌の浸潤様式と MMP-2, MMP-9 および MT1-MMP との関連について検討を行った。

対象および方法

対象は、1990年から2001年までの過去11年間に獨協医科大学病院口腔外科で加療した口腔癌一次症例175例のうち、三次元解析の検索が可能であった根治的手術症例31例であった。組織型はすべて扁平上皮癌で特殊な組織形態は含まれていなかった。その内訳は、男性18例、女13例で、年齢は30歳から80歳まで分布し、平均年齢は58.9±12.6歳であった。部位別では舌22例、下顎歯肉ならびに頬粘膜各3例、口底2例、および軟口蓋1例であった。TNM分類(2002年, UICC)¹⁶⁾ではT1:5例, T2:19例, T3:0例, T4:7例で、N0:14例, N1~3:17例で、全例ともM0であった(表1)。三次元画像の再構築はすでに報告した¹¹⁾方法に準じて行った。腫瘍の浸潤様式は三次元分類法の基準(表2)に従い連続型と非連続型の2つに大別し、さらに連続型は圧迫型と索状型に分けた。そして腫瘍制御、非制御別

表3 三次元的浸潤様式と腫瘍制御の関係

浸潤様式	例数	制御別		p値
		制御例	非制御例	
連続型	圧迫型	3	3	0.0002
	索状型	20	19	
非連続型	8	2	6	

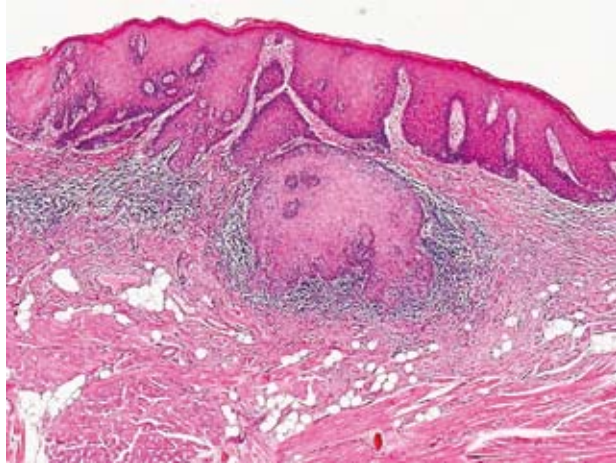
(局所再発、後発頸部転移、ならびに遠隔転移の有無)との関係について検討を行なった。

免疫組織化学染色はホルマリン固定パラフィン包埋ブロックを用い、脱パラフィン後、マイクロウエーブ照射(95℃, 20分)で抗原賦活化処理を施行後、0.3%過酸化水素水にて内因性ペルオキシダーゼを不活化させた。一次抗体はすべてコスモバイオ社から購入した抗ヒトマウスモノクローナル抗体(MMP-2(42-5D11, 200倍希釈), MMP-9(56-2A4, 250倍希釈), MT1-MMP(113-5B7, 70倍希釈))を用い、4℃にて14時間反応させた後、アビジン・ビオチン染色法を施行した。次いでDAB-H₂O₂溶液で発色させ、水洗後メチルグリーンで核染色をし、脱水、透徹、封入した。なお、一次抗体を除いて反応させたものを陰性コントロールとした。組織学的および免疫組織学的評価は、病理診断に精通した病理医1名と口腔外科医2名によって行われた。発現評価は柏尾ら¹⁷⁾, Ge Liuら¹⁸⁾の方法に準じ、半定量的に判定を行った。具体的には、作成標本内の腫瘍細胞において、MMP-2では発現頻度が全体の10%未満のものを陰性(-), 10%以上のものを陽性(+)とした。MMP-9およびMT1-MMPでは発現頻度が10%未満認められるものを陰性(-), 10~50%認められるものを弱陽性(+), 50%以上を強陽性(++)とした。さらに腫瘍周囲の間質細胞での発現の有無をみた。統計学的検討には χ^2 検定(Fisherの直説法)を用い、有意水準を5%未満とした。

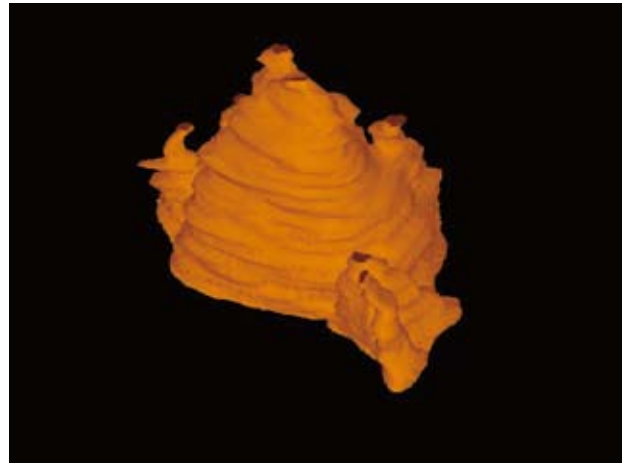
結果

1. 三次元解析による腫瘍の浸潤様式(図1-a, b, 2-a, b, 3-a, b, 表3)

三次元解析による腫瘍の浸潤様式は連続型が23例(74.2%)で、その内訳は圧迫型(図1-a, b)が3例(9.7%), 索状型(図2-a, b)が20例(64.5%), また、非連続型(図3-a, b)は8例(25.8%)であり、全体では索状型が最も多かった(表3)。

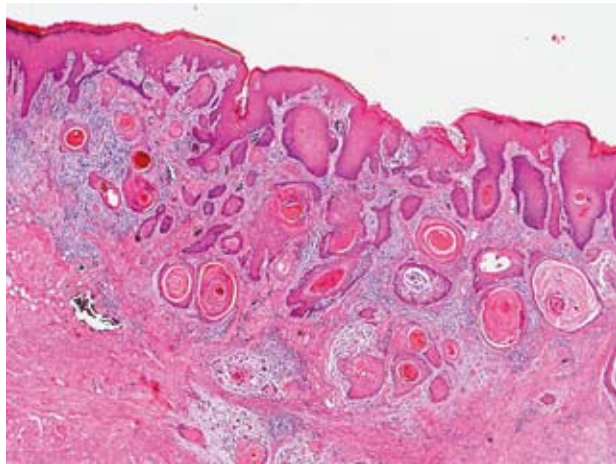


a. 二次元画像

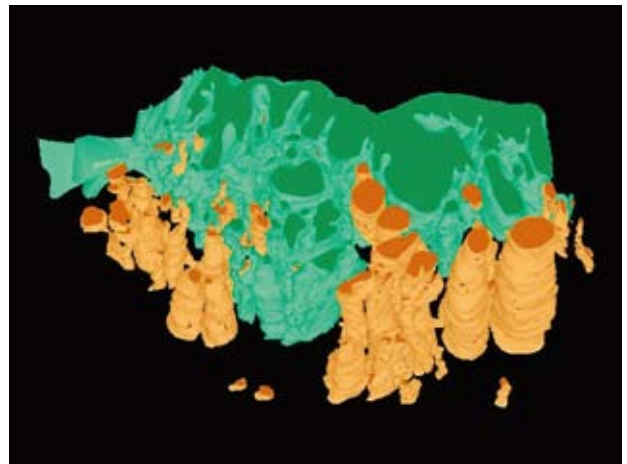


b. 三次元画像

図 1 連続型（圧迫型）の二次元および三次元画像

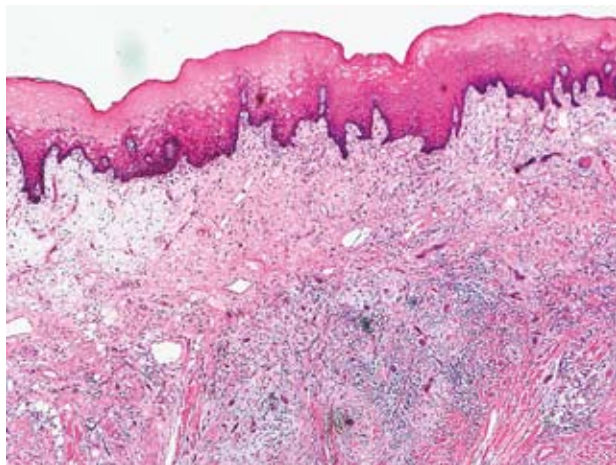


a. 二次元画像

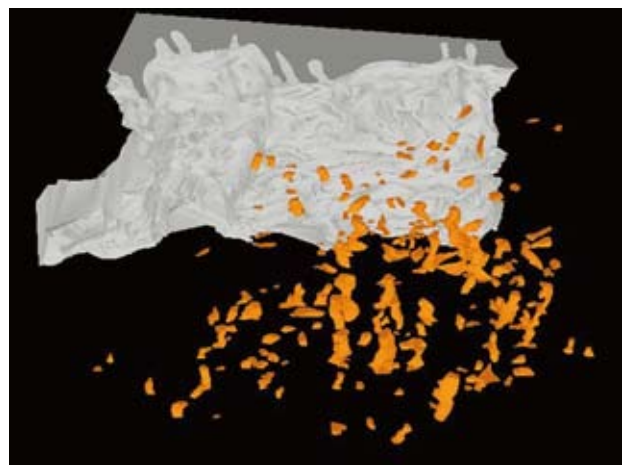


b. 三次元画像

図 2 連続型（索状型）の二次元および三次元画像



a. 二次元画像



b. 三次元画像

図 3 非連続型の二次元および三次元画像

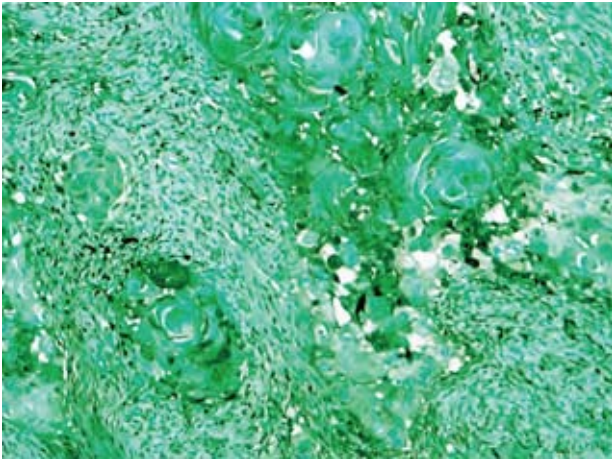


図4 腫瘍細胞における MMP-2 発現 (×400)

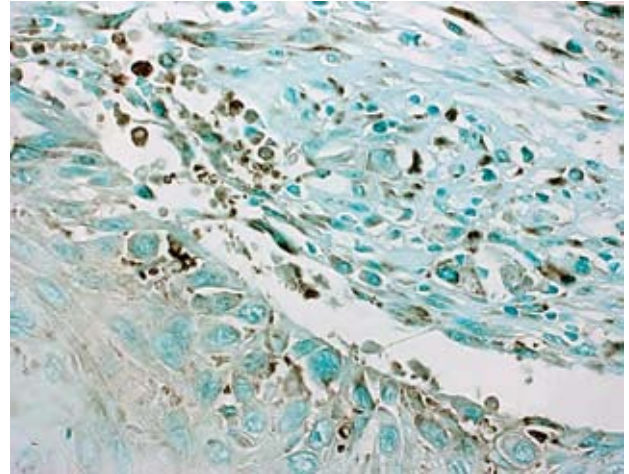


図6 間質細胞における MMP-9 発現 (×400)

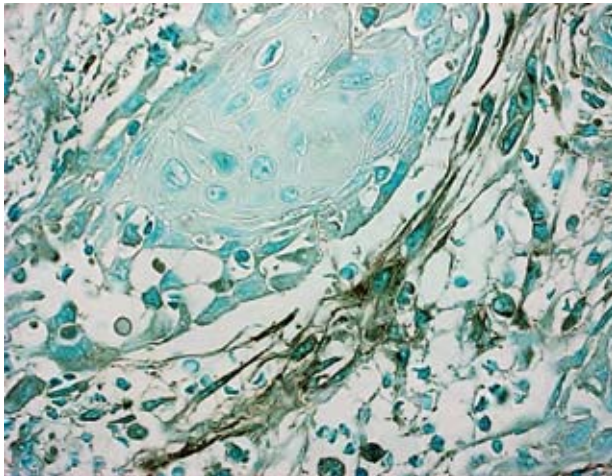


図5 間質細胞における MMP-2 発現 (×400)

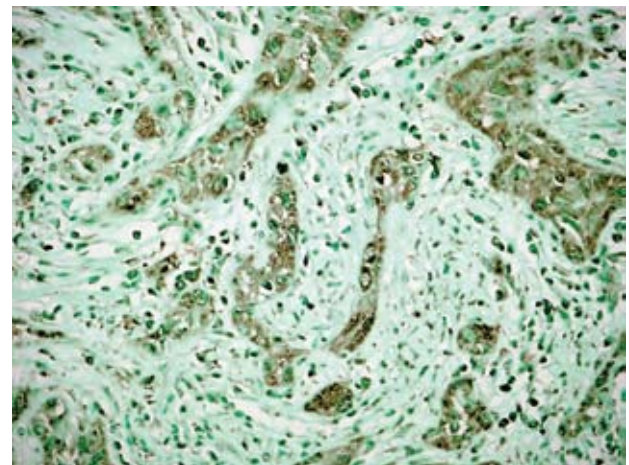


図7 腫瘍細胞における MT1-MMP 発現 (×400)

2. 三次元解析結果と腫瘍制御, 非制御別との関係 (表3)

三次元解析により分類した腫瘍の浸潤様式と, 腫瘍の制御, 非制御別について検討したところ, 連続型では23例中22例(95.7%)が制御, 1例(4.3%)が非制御であり, 連続型のうち圧迫型は3例全例が制御例であり, 索状型は20例中19例(95.0%)が制御例, 1例(5.0%)が非制御例であった. 一方, 非連続型では8例中2例(25.0%)が制御例であり, 連続型の制御率(95.7%)と比較すると有意に低い結果で, すべて局所再発であった($p=0.0002$) (表3).

3. MMP-2, MMP-9 および MT1-MMP 発現部位と三次元的浸潤様式との関係について (図4~7)

MMP-2 陽性細胞は腫瘍細胞の細胞質 (図4) に, また腫瘍胞巣に近接した間質の線維芽細胞にもみられた (図5). MMP-9 陽性細胞は主に間質細胞中に認められ,

特に好中球やマクロファージに陽性を示した (図6). 一方, MT1-MMP 陽性細胞は腫瘍細胞の細胞質および一部細胞膜に発現し, また, 腫瘍近傍の間質にも陽性細胞が散見された (図7). MMP-2, MMP-9 および MT1-MMP のそれぞれの陽性率は38.7%, 67.7%, 100%であった. 三次元解析による浸潤様式と発現部位の関連についてみると, 連続型では MMP-2, MT1-MMP とも間質細胞よりも腫瘍細胞に高頻度に発現していたのに対し, 非連続型は腫瘍細胞ならびに間質細胞に共発現していた. 一方, MMP-9 は連続型・非連続型とも間質細胞主体に発現していた.

4. MMP-2, MMP-9 および MT1-MMP の発現頻度と浸潤様式 (三次元) との関係について (表4~6)

MMP-2 では連続型23例中6例(26.1%)が陽性であったのに対し, 非連続型では8例中6例(75.0%)が陽性で両者間に有意な差を認めた ($P=0.0316$). また,

表4 三次元的浸潤様式と MMP-2 発現の関係

浸潤様式	例数	MMP-2		p 値
		-	+ / ++	
連続型	圧迫型	3	0	0.0316
	索状型	20	6	
非連続型	8	2	6	

- : 陰性, + : 弱陽性, ++ : 強陽性

表5 三次元的浸潤様式と MMP-9 発現の関係

浸潤様式	例数	MMP-9		p 値
		-	+ / ++	
連続型	圧迫型	3	0	0.0317
	索状型	20	13	
非連続型	8	0	8	

- : 陰性, + : 弱陽性, ++ : 強陽性

連続型では圧迫型はすべて陰性であったのに対し、索状型では20例中6例(30.0%)で、索状型の陽性率が高かった(表4)。MMP-9では連続型23例中13例(56.5%)が陽性であったのに対し、非連続型では8例すべて(100%)が陽性で両者間に有意な差を認めた(P=0.0317)(表5)。一方、MT1-MMPでは全例陽性であったため、発現強度で比較したところ、連続型では23例中13例(56.5%)が弱陽性、10例(43.5%)が強陽性であった。非連続型では8例中2例(25.0%)が弱陽性、6例(75.0%)が強陽性で、非連続型において強陽性の割合が高かったものの、発現強度において連続型と非連続型の間に有意な差はみられなかった(表6)。

5. MMP-2, MMP-9 および MT1-MMP の発現の相互関係について (表7)

MT1-MMPについては全例に発現していたためMMP-2ならびにMMP-9両者の発現状況と三次元的浸潤様式との関連を調べる目的でMMP-2/MMP-9発現共陽性例、どちらか一方陰性例、共陰性例について検討したところ、連続型では共陽性例4例、どちらか陰性例12例、共陰性例7例であったのに対し、非連続型では共陽性例6例、どちらか陰性例2例、共陰性例はなく、非連続型では有意に共陽性例が多い結果であった(p=0.0059)(表7)。以上の結果とMT1-MMPは全例陽性であったことを勘案すると、結果的には非連続型では

表6 三次元的浸潤様式と MT1-MMP 発現の関係

浸潤様式	例数	MT1-MMP		p 値
		+	++	
連続型	圧迫型	3	0	0.2200
	索状型	20	10	
非連続型	8	2	6	

+ : 弱陽性, ++ : 強陽性

表7 三次元的浸潤様式と MMP-2 および MMP-9 発現の関係

浸潤様式	例数	MMP-2/MMP-9		p 値
		共陽性	共陽性以外	
連続型	23	4	19	0.0059
非連続型	8	6	2	

MMP-2, MMP-9 および MT1-MMP とも全て発現している症例が多いことが示された。

考 察

個々の癌の悪性度をいろいろな角度から検討し、よりの確な治療法の選択とより良き予後を目標にわれわれはこれまで口腔癌の研究に携わってきた。いろいろな研究方法の中でも、古くから病理組織学的研究がなされ、その中で予後に重大な影響を及ぼす多くの因子が報告されてきた。病理組織学的検討において大切なことは、検討結果が治療後の後発頸部リンパ節転移や遠隔転移を含めた予後にどれだけの確に反映されるかということである。このことのために、できるだけ客観的な評価ができるようにとこれまで一つの因子だけでなく、いくつかの因子を総合的に評価する研究が多数なされてきた¹⁻⁵⁾。その結果、それらの因子の中でも浸潤様式が重要な予後因子であることが報告されている^{1,2,6-8)}。さらにいろいろな予後因子に対して多変量解析を用いて有用な因子を検討する研究もなされ、われわれの検討結果では浸潤様式が最も有用な予後因子であることが判明した²⁾。山本・小浜分類³⁾は口腔癌の二次元的浸潤様式の分類において最も頻用されている。しかしながら、臨床的には必ずしもすべての症例で浸潤様式と治療成績が相関するとは限らず^{9,10)}、検討課題のひとつと考えられていたため、この問題を解決するために、われわれは三次元解析を用いて検討を行ない、その結果三次元解析による浸潤様式は臨床的に有用であることを既に報告してきた¹¹⁾。今回は、生物学的特性の観点から、癌浸潤におけるマトリッ

クス分解の中心的役割をなし、癌の浸潤性増殖に不可欠であると考えられているマトリックスメタロプロテアーゼ、特に MMP-2, MMP-9 および MT1-MMP と三次元解析結果との関連について検討を行った。MMP-2 は IV 型コラーゲナーゼとも呼ばれ、Salo¹⁹⁾、Collier²⁰⁾ らによって精製、cDNA のクローニングがなされた。MMP-2 は IV 型コラーゲン、ラミニンやフィブロネクチンなどの基底膜成分を基質とすることから、癌の浸潤・転移の第一段階である基底膜の分解に関与していると考えられている²¹⁻²³⁾。MMP-9 は Wilhelm¹³⁾ によって精製、cDNA のクローニングが成された。MMP-9 は MMP-2 同様 IV 型コラーゲンに対する強い分解能を有し²⁴⁾、ras-オンコジーンを導入した 3T3 細胞で MMP-9 を発現し²⁵⁾、高転移性株では低転移性株よりその産生量が多い^{26,27)} ということでも浸潤、転移に関係するとされている。MT1-MMP はヒト癌細胞における MMP-2 活性化因子として同定され、癌浸潤・転移のキーエンザイムとして注目されている¹⁴⁾。MT1-MMP は、MMP-2 の他に MMP-9 と MMP-13 を活性化することで ECM 分解カスケードの活性化を行い、また自らも直接 I, II, III 型コラーゲン、ラミニン、プロテオグリカン、フィブロネクチンなどの ECM 構成成分を分解する¹⁵⁾。MMPs と癌の浸潤・転移についての関連はこれまで口腔癌以外の部位について多数報告されている。MMPs と口腔癌との関係では MMP-2, MMP-9 および MT1-MMP とも所属リンパ節転移や予後の指標として有用であることがこれまで報告されている²⁸⁻³¹⁾。口腔癌においては熊谷ら³²⁾ が浸潤様式と MMPs との関係について浸潤様式が山本・小浜分類 1 型から 4D 型になるにつれて、MT1-MMP および MMP-2 の陽性症例率はいずれも高くなる傾向を示し、4C, 4D 型では 88.9% 両者の同時発現がみられたことを報告した。Zhang ら³³⁾ は舌癌における MMP-9 の発現と浸潤様式との関係について検討した結果、山本・小浜分類 1~3 型の MMP-2 陽性率は 56.8% であったのに対し、4C, 4D 型では 90.9% と高く、癌浸潤度が進行した症例において MMP-9 発現頻度が統計学的に有意に高かった ($p=0.038$) ことを報告している。田中ら³⁴⁾ は口腔扁平上皮癌 84 症例の生検材料を対象にした報告で、MMP-2 と MT1-MMP は浸潤様式 4C・4D において癌細胞と線維芽細胞に共発現している頻度が有意に高く、MMPs と浸潤様式が関連することを示した。

以上のようにこれまでの二次元的解析結果では口腔癌の浸潤様式と MMPs の発現が関連することは明らかである。三次元的解析による浸潤様式と MMPs の発現との関係はこれまで検討されたことはなく、今回のわれわれ

の報告がはじめてである。最初に MMPs の発現部位から腫瘍宿主関係についてみると、連続型では MMP-2, MT1-MMP とも癌巣内の細胞主体に発現がみられたのに対し、非連続型では癌巣の細胞だけでなく、間質の細胞にも高い発現を認めた。MMP-9 は癌巣よりも間質の細胞に多くみられた。高度浸潤性癌の非連続型では MMP-2, MMP-9 および MT1-MMP の局在は癌の浸潤と強く関連しており、癌・間質相互作用の重要性が示唆された。次に発現頻度からみると、非連続型は連続型に比較し、MMP-2, MMP-9 および MT1-MMP とも単独で高い発現頻度を示したのに加え、さらに MMP-2, MMP-9 ならびに MT1-MMP の共発現が有意に高くみられた ($p=0.0059$)。これらのことより非連続型では連続型に比較し各 MMPs の産生・分泌がより活発であること、さらに MT1-MMP が MMP-2 および MMP-9 を活性化することで、相乗的に非連続型のび慢性浸潤に関与していることが示唆された。以上のように三次元解析による口腔癌の浸潤様式は MMPs との関連からみても有用であるが、現時点では操作が非常に煩雑であること、特別な解析ソフトが必要であることなどの短所も有する。また、三次元構築のために 70~100 枚程度の H-E 染色プレパラートを作成するため、生検時十分な厚さの組織量が必要で、今回は 175 例中 31 例しか検討できなかった。今後は三次元解析をより簡潔に施行できるようにコンピュータシステムの改良を図り、さらにこの分類法が他施設でも用いられるよう努める次第である。

結 語

われわれは三次元解析による浸潤様式は従来の代表的二次元解析である山本・小浜分類よりもよりの確に予後を反映することを報告してきた。今回は基底膜分解酵素である MMPs との関連性について検討した結果、三次元解析による浸潤様式において、非連続型は連続型に比較し、MMPs の発現が高頻度に見られ、そして発現部位においても腫瘍細胞および間質細胞の両者に発現し、MMPs が相互に関与し、び慢性に浸潤することが示唆された。非連続型は生物学的に悪性度が高く、非連続型の口腔癌においては治療法の決定や予後の予測において慎重に対処すべきと思われた。

謝 辞 稿を終えるに臨み、病理学にご指導を賜りました国立病院機構水戸医療センター病理診断科 大谷明夫先生に心より謝意を表します。

参考文献

- 1) 今井裕, 佐々木忠昭, 鈴木克昌, 他: 顎口腔領域扁平上皮癌の臨床病理学的検討. 日口外誌 **38**: 450-455, 1992.
- 2) Sasaki T: Multivariate evaluation of prognostic determinant factors for oral squamous cell carcinoma. Dokkyo Journal of Medical Sciences **24**: 109-115, 1997.
- 3) Yamamoto E, Kohama G, Sunakawa H, et al: Mode of invasion, bleomycin sensitivity and clinical course in squamous cell carcinoma of the oral cavity. Cancer **51**: 2175-2180, 1983.
- 4) Anneroth G, Batsakis J, Luna M: Review of the literature and a recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinomas. Scand J Dent Res **95**: 229-249, 1987.
- 5) Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, et al: New malignancy grading is a better prognostic indicator than Broder's grading in oral squamous cell carcinomas. J Oral Pathol Med **18**: 432-437, 1991.
- 6) Yamamoto E, Miyakawa A, Kohama G, et al: Mode of invasion and lymph node metastasis in squamous cell carcinoma of the oral cavity. Head Neck Surg **6**: 938-947, 1984.
- 7) 平塚博美, 小浜源郁, 宮川明, 他: 原発巣のみ切除を行った口腔粘膜癌の後発転移に関する検討. 頭頸部腫瘍 **21**: 85-92, 1995.
- 8) 黒川英雄, 山下義弘, 三浦恵子, 他: 口腔扁平上皮癌の被膜外頸部リンパ節転移と臨床病理組織像との関連性. 日口外誌 **46**: 409-415, 2000.
- 9) 岡本学, 大関悟, 原広子, 他: 腫瘍の浸潤様式からみた舌癌の予後. 日口外誌 **33**: 615-622, 1987.
- 10) 草間幹夫, 岸豊子, 堀越勝, 他: 口腔癌の頸部リンパ節転移に関する臨床的, 病理組織学的研究. 日口外誌 **37**: 370-379, 1991.
- 11) 横山朋子, 佐々木忠昭, 酒井英紀, 他: 口腔扁平上皮癌の浸潤様式に対する三次元的解析. Dokkyo Journal of Medical Science **33**: 71-78, 2006.
- 12) Liotta LA, Tryggvason K, Garbisa S, et al: Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. Nature **284**: 67-68, 1980.
- 13) Wilhelm SM, Collier IE, Marmer BL, et al: SA 40-transformed human lung fibroblast secrete a 92-kDa type IV collagenase which is identical to that secreted by normal human macrophages. J Biol Chem **264**: 17213-17221, 1989.
- 14) Sato H, Takino T, Okada Y, et al: A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumor cells. Nature **370**: 61-65, 1994.
- 15) Ohuchi E, Imai K, Fujii Y, et al: Membrane type 1-matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules. J Biol Chem **272**: 2446-2451, 1997.
- 16) UICC: TNM classification of malignant tumors. 6th edition, Wiley-Liss, New York, 22-26, 2002.
- 17) 粕尾明: 原発性肝細胞癌における Matrix Metalloproteinases の検討. 慈恵医大誌 **116**: 33-48, 2001.
- 18) Ge Liu: Expression of matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) and their tissue inhibitors (TIMP-1 and TIMP-2) in human colorectal cancer association with liver metastasis. J Tokyo Med Univ **62**: 72-80, 2004.
- 19) Salo T, Liotta LA, Tryggvason K, et al: Purification and characterization of a murin basement membrane collagen-degrading enzyme secreted by metastatic tumor cells. J Biol Chem **258**: 3058-3063, 1983.
- 20) Collier IE, Wilhelm SM, Eisen AZ, et al: H-ras oncogene-transformed human bronchial epithelial cells (TAE-1) secrete a single metalloproteinase capable of degrading basement membrane collagen. J Biol Chem **263**: 6579-6587, 1988.
- 21) Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevenson WG: Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. Cell **64**: 327-336, 1991.
- 22) Liotta LA, Stetler-Stevenson WG: Metalloproteinases and cancer invasion, Seminars in Cancer Biology **1**: 107-115, 1990.
- 23) Deryugina EI, Luo GX, Reisfeld RA, et al: Tumor cell invasion through matrigel is regulated by activated matrix metalloproteinase-2. Anticancer Res **17**: 3201-3210, 1997.
- 24) Nagase H, Ogata Y, Suzuki K, et al: Substrate specificities and activation mechanisms of matrix metalloproteinases. Biochem Soc Trans **19**: 715-718, 1991.
- 25) Ballin M, Gromez D, Shiha CC, et al: Ras oncogene mediated induction of a 92kDa metalloproteinase: Strong correlation with the malignant phenotype. Biochem. Biophys. Res Commun **154**: 832-838, 1988.
- 26) Nakajima M, Morikawa K, Febra A, et al: Influence of organ environment on extra cellular matrix degradative and metastasis of human colon carcinoma cells. J

- Natl Cancer Inst **82** : 1890-1898, 1990.
- 27) Kimura Y, Hashimoto N, Higashi T, et al : Elevation of serum type IV collagen-degrading enzyme in hepatocellular carcinoma with metastasis. Clin Biochem **23** : 135-138, 1990.
- 28) Vicente JC, Lequerica-Fernandez P, Santamaria J, et al : Expression of MMP-7 and MT1-MMP in oral squamous cell carcinoma as predictive indicator for tumor invasion and prognosis. J Oral Pathol Med **36** : 415-424, 2007.
- 29) Petel BP, Shah SV, Shukla SN et al : Clinical significance of MMP-2 and MMP-9 in patients with oral cancer. Head Neck **29** : 564-572, 2007.
- 30) Zhou CX, Gao Y, Johnson NW et al : Immunoeexpression of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in the metastasis of squamous cell carcinoma of the human tongue. Aust Dent J **55** : 385-389, 2010.
- 31) Singh RD, Haridas N, Patel JB et al : Matrix metalloproteinases and their inhibitors : correlation with invasion and metastasis in oral cancer. Indian J Clin Biochem **25** : 250-259, 2010.
- 32) 熊谷茂宏, 川尻秀一, 中村博幸, 他 : ヒト口腔扁平上皮癌組織における膜型マトリックスメタロプロテアーゼの発現. 口腔腫瘍 **10** : 9-15, 1998.
- 33) Zhang Y, Jinbu Y, Hiroto I, et al : Expression of matrix metalloproteinase-9 in tongue squamous cell carcinoma correlates with lymph node metastasis-A clinicopathologic study. Oral Med Pathol **10** : 89-94, 2005.
- 34) 田中彰, 川尻秀一, 野崎晋一, 他 : 口腔扁平上皮癌の間質線維化と細胞外基質分解酵素の発現に関する病理組織学的検討. 癌浸潤との関連性について. 口腔腫瘍 **16** : 169-181, 2004.

Three-dimensional Analysis the Mode of Invasion in Oral Squamous Cell Carcinoma and the Correlation Between its Results and the Expression of Matrix Metalloproteinases (MMPs)

Mika Shiromori¹⁾, Tadaaki Sasaki¹⁾, Hirotate Iwase^{1,2)}, Yutaka Imai³⁾

*Dokkyo Division of Oral and Maxillofacial Surgery, Utsunomiya Memorial Hospital, Utsunomiya¹⁾
Iwase Dental, Oral Surgery and Otolaryngology Clinic, Nikko²⁾
Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Dokkyo Medical University³⁾
School of Medicine*

We studied the mode of invasion of oral squamous cell carcinoma (OSCC) by three-dimensional (3-D) analysis for the first time and reported its clinical usefulness. The purpose of this study is to discuss the relationship between the expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-9 and membrane type 1-metalloproteinase (MT1-MMP) and the mode of invasion of OSCC by 3-D analysis. In this present 31 of 175 patients with OSCC treated with curative surgery at first were able to be examined. The expression of MMP-2, MMP-9 and MT1-MMP was examined by immunohistochemical techniques. The rate of MMP-2 expression was 38.7%, MMP-9 67.7% and MT1-MMP 100%. The rates of the expression of MMPs were significantly higher

in discontinuous type than in continuous type. The positive expression of MMPs were detected not only in tumor cells but also in stromal cells in discontinuous type. These results indicate that MMPs contribute to the diffused invasion of OSCC with discontinuous type independently or mutually. In conclusion, the mode of invasion of OSCC by 3-D analysis is closely related with the expression of MMPs and they can be useful to planning therapeutic strategy and predicting prognosis of the patient with OSCC.

Key Words : Oral Squamous Cell Carcinoma, Mode of Invasion, Three-dimensional analysis, Prognosis, Matrix Metalloproteinases