

# 口腔扁平上皮癌における Matrix metalloproteinase と Tissue inhibitor of metalloproteinase の発現と局在についての検討

奈良県立医科大学第1病理学教室

松岡弘樹, 美島健二, 山田英二, 市島國雄

奈良県立医科大学口腔外科学教室

高山賢一, 山本一彦, 杉村正仁

## EXPRESSION AND LOCALIZATION OF MATRIX METALLOPROTEINASES AND TISSUE INHIBITOR OF METALLOPROTEINASES IN ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA

HIROKI MATSUOKA, KENJI MISHIMA, EIJI YAMADA and KUNIO ICHIJIMA

*First Department of Pathology, Nara Medical University*

KENJI TAKAYAMA, KAZUHIKO YAMAMOTO and MASAHIKO SUGIMURA

*Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Nara Medical University*

Received April 16, 1999

*Abstract*: Immunohistochemical stainings of matrix metalloproteinase (MMP)-2, 9 and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1, 2, 3 with specific antibodies in paraffin sections of 14 human oral squamous cell carcinomas and 8 normal tissues were performed by labeled streptavidinbiotin method. The expression and localization of mRNA of TIMP-1, 2, 3 were studied by in situ hybridization with digoxigenin (DIG) RNA probe in the same specimens. Positive immunostaining for MMP-2, 9 and TIMP-1 were detected in stromal cells of carcinoma, whereas positive staining for TIMP-3 was detected in both stromal cells and cytoplasm of carcinoma cells. Diffuse expression of MMP-2, 9 was observed in carcinomas with advanced stages. They were not detected in normal tissues. Expressions of TIMP-3 mRNA were observed in 11 out of 14 carcinomas. They were seen in stromal cells and in cytoplasm of carcinoma cells (7/4 in only stromal cells and 4/14 in both stromal cells and carcinoma cells). Carcinomas expressing TIMP-3 mRNA tended to be smaller in size than those which were non-expressing. TIMP-3 mRNA was not detected in normal tissues. Our results suggest that MMP-2, 9 are important for the development of oral squamous cell carcinoma and TIMP-3 is an important inhibitor of it.

(*奈医誌*. J. Nara Med. Ass. **50**, 201~207, 1998)

**Key words**: Matrix metalloproteinase (MMP), Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP), Squamous cell carcinoma

## 緒言

Matrix metalloproteinase(以下 MMP)は、ほとんど全ての細胞外マトリックスと基底膜の構成成分を分解する酵素の一群である。そのうちでも MMP-2, 9 は基底膜を構成する type IV コラーゲンの分解に不可欠であり、結合織の成分である V, VIII, X の collagen, fibronectin, elastin, gelatin の分解をする事が知られている<sup>1,2)</sup>。

そのため、これらの酵素は、腫瘍の浸潤と転移に欠くことができないと考えられており、皮膚癌や乳癌を含めて、いくつかの癌の浸潤と関係づけられている<sup>3)</sup>。

MMPs の活性化の調節は、Tissue inhibitor of metalloproteinase(以下 TIMP)によってされており、これらには TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 の3種類の存在が知られていたが<sup>4,5,6,7)</sup>、最近 Green ら<sup>8)</sup>によって、TIMP-4 が追加されている。TIMPs は約 40% の homology をもっていて、MMP の抑制と脈管新生を抑制することにより、癌浸潤と転移を抑制すると考えられている<sup>9)</sup>。また、細胞外マトリックスの分解酵素である MMPs とその阻害物質である TIMPs の細胞外での活性の不均衡が癌腫、関節炎及び心臓血管病<sup>10,11,12)</sup>などで明らかにされている。

口腔扁平上皮癌においては、MMP-2 蛋白や MMP-9 蛋白と MMP-2 mRNA の発現が癌周囲の間質細胞に認められている<sup>13,14)</sup>。阻害因子である TIMPs は、TIMP-1 mRNA の弱い発現が高分化癌の周囲結合織や血管内皮細胞に存在することが知られている<sup>13,15)</sup>。TIMP-2 mRNA はごくわずかながら浸潤癌周囲の結合織と血管内皮細胞に発現が報告<sup>16)</sup>されているが、Sutinen<sup>13)</sup>らの研究では発現を認めないという報告がされている。TIMP-3 mRNA は癌周囲の間質細胞での発現が知られている<sup>13)</sup>。また、TIMP-1, 3 の蛋白は免疫染色によって mRNA の発現場所とほぼ同じ部位に存在することが報告されている<sup>13)</sup>。このように、いろいろな報告が口腔扁平上皮癌についてされているが、これらの報告の中で同じサンプル上で MMPs とその対応する TIMPs の関係を解析したものは少ない。

この為、我々は MMPs と TIMPs の口腔扁平上皮癌に対する役割を検討する為に、MMP-2, 9 と TIMP-1, 2, 3 の免疫染色および、TIMP-1, 2, 3 の in situ hybridization(以下 ISH)を施行し、これらと臨床上的特徴との関係を検討した。

## 材料と方法

### 材料

奈良県立医科大学口腔外科で生検および手術された 14 例の口腔扁平上皮癌(高分化 6 例, 中分化 5 例, 低分化 3 例)と 8 例の正常口腔粘膜を用いた。また、扁平上皮癌の 14 例中 5 例は上顎洞癌で 4 例が舌癌で 5 例が口底癌であった。8 例の正常口腔粘膜は剖検症例を用いた。扁平上皮癌、および正常口腔粘膜の組織は切除後直ちに、4℃ 4%パラホルムアルデヒドで昼夜固定し、その後、通常のパラフィン包埋標本を作製した。

### 免疫染色

使用抗体: 42-5 D 11(MMP-2・富士薬品工業)42-5 D 11(MMP-9・富士薬品工業)147-6 D 1(TIMP-1・富士薬品工業)67-4 H 11(TIMP-2・富士薬品工業)136-13 H 4(TIMP-3・富士薬品工業)を 1 次抗体に用いて、免疫染色を行った。パラフィン包埋標本を、4 μm に薄切しスライドグラスに張り付け 43℃で一晩放置した。脱パラフィン処理後 0.1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/PBS で 20 分間浸漬し内因性ペリオキシダーゼ阻害を行った後、上記抗体を一次抗体として 200 倍に希釈し 4℃で一晩反応をおこなった。PBS で洗浄後 DAKO の LSAB 2 Kit を用いて、LSAB 法で反応を行い、その反応後ヘマトキシリンで核染した。

### RNA probe

TIMP-1 蛋白の code 領域の codon 94~546 の 453 bp (TIMP-2 との homology は 55.3%, TIMP-3 との homology は 53.8%), TIMP-2 蛋白 code 領域の codon 434~915 の 482 bp (TIMP-1 との homology は 52.9%, TIMP-3 との homology は 58.8%), TIMP-3 蛋白 code 領域の codon 384~844 の 461 bp (TIMP-1 との homology は 52.4%, TIMP-2 との homology は 56.5%)を PCR で増幅し、増幅産物を pcDNA II プラスミドに挿入し大腸菌に transformation し plasmid を抽出した。シーケンスで確認後、Dig labeling Kit. SP 6/T 7(ベリンガーマンハイム社)で digoxigen に標識された RNA probe を作製した。

### ISH

標本は 4℃ 4%パラホルムアルデヒドで一晩固定し、脱水後パラフィン包埋し、6 μm に薄切しスライドグラスに張り付け 43℃で一晩乾燥した。切片を脱パラフィン処理後、PB で 5 分間洗いさらに 0.2 N HCl 中に 10 分間、10 mg/ml proteinase K (Sigma, St. Louis, MO, UA) 20 分間処理した。その後、4%パラホルムアルデヒドで 10 分間再固定し、0.25%の酢酸が入った 0.1 M triethanolamine で 10 分間浸潤した。さらに、プレハイブリゼーション液(50% formamide, 1 X Denhardt's, 10 mM tris-HCl (pH 7.6), 1 mM EDTA, 0.25% SDS, 150 μg/ml salmon testis sperm DNA, 200 μg/ml tRNA)で

50°C 3時間、インキュベートした後、digoxigen でラベルされた 25 ng/ml の RNAsprobe を 10 % Dextran sulfate を加えたプレハイブリダイゼーション液に入れ、50 °C 一晚ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション後、標本を 2 XSSC、50 %ホルムアミドで 55 °C、30 分間洗い、0.5 M NaCl、10 mM Tris(pH 8.0) 1 mM EDTA 37°C で溶解した RNaseA(20 μg/ml、Sigma)で 30 分間処理し、ハイブリダイゼーションしていない RNA を取り除いた。その後、2 XSSC 55°C で 20 分間、0.2 XSSC 55°C で 20 分間 2 回洗い、その後、切片を Tris-buffer(0.1 M tris-HCl, pH 7.5, 0.15 M NaCl) で浸漬し、アルカリフォスファターゼ標識された抗 digoxigen 抗体(Boehringer-Man-nheim)を 500 倍希釈したものと、37°C で一時間、反応させた。0.1 M Tris-buffer で洗った後、nitroblue tetrazolium(NBT, Boehringer Man-heim)5-bromo-4-chloro-3-indoylphosphatb で反応させ発色した。2~4 時間の反応後、1 mM EDTA を含む 0.01 M Tris-HCl(pH 8.0)で 5 分間浸漬し反応を停止させた。反応終了後にホルマリンで再固定し、メチルグリーンで核染した。

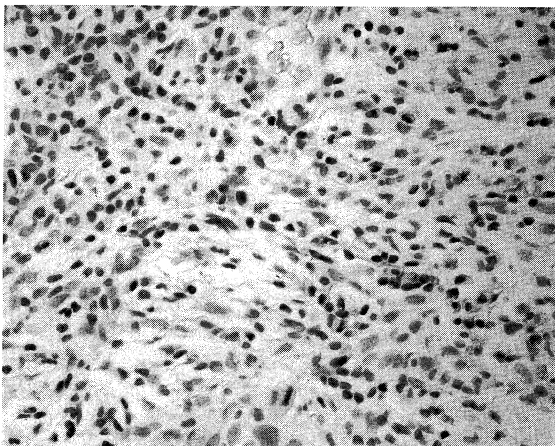
結 果

免疫染色

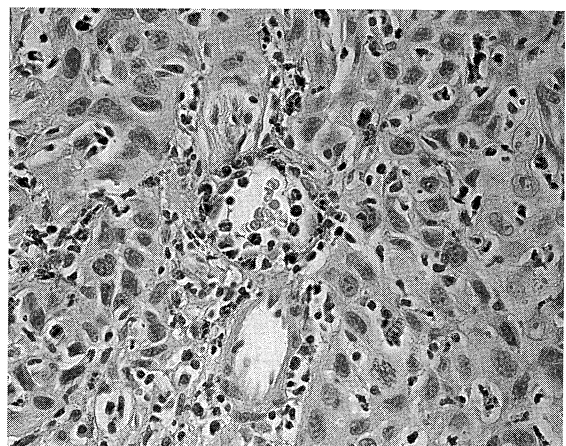
正常組織では、MMP-9 は多核白血球のごく一部に陽

性であったが、MMP-2、TIMP-1、2、3 はともに陰性であった。扁平上皮癌では、MMP-2 は癌周辺の線維芽細胞と多核白血球の胞体内に陽性であったが癌細胞には陰性であった(Fig. 1 A)。間質細胞にびまん性に陽性となるものは 9 例(64 %)で局所的に陽性となるものは 5 例(36 %)であった。MMP-9 は癌周辺の多核白血球と線維芽細胞の胞体内で陽性であったが癌細胞には陰性であった(Fig. 1 B)。間質細胞にびまん性に陽性となるものは 11 例(79 %)で局所的に陽性となるものは 3 例(11 %)であった。TIMP-1 は主に線維芽細胞と血管内皮細胞の一部で陽性であったが癌細胞には陰性であった(Fig. 2 A)。間質細胞にびまん性に陽性となるものは 6 例(43 %)で局所的に陽性となるものは 8 例(57 %)であった。TIMP-2 はいずれの標本でも、陰性であった。TIMP-3 は主に組織球、線維芽細胞と血管内皮細胞の一部で陽性となった。また、弱くではあるがほとんどの癌細胞の胞体内に陽性となり、特に癌浸潤部先端の癌細胞で強く陽性となった(Fig. 2 B)。間質細胞にびまん性に陽性となるものは 4 例(29 %)で局所的に陽性となるものは 10 例(71 %)であった。癌細胞には 14 例(100 %)で発現がみられた。

局所的に陽性であるものを score(+), びまん性に陽性であるものを score(+++)とし、臨床病期分類と比較して insitu hybridization の結果と共に Table 1 に示した。MMP-2 および、MMP-9 は score(+)のものに比



A



B

Fig. 1. Results of immunohistochemical stainings for MMP-2, 9 (×400).

A : A positive staining reaction for MMP-2 is seen in some stromal cells.

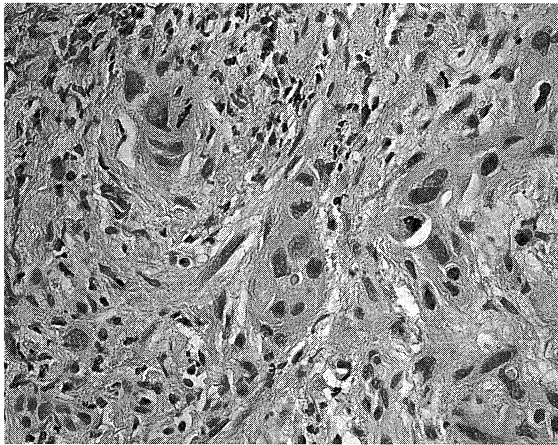
B : A positive staining reaction for MMP-9 is seen in some stromal cells and granuloctyes surrounding the carcinoma.

べ、score(++)のものは、臨床病期が進んでいる傾向があった。(各々  $X^2$ test  $P < .05$  および  $X^2$ test  $P < .1$ )TIMP-1, 3 では score(+)のもの、score(++)のものとの間に差異は認められなかった。また、癌の分化度や部位と MMP-2, 9 TIMP-1, 2, 3 の免疫染色の結果は相関が

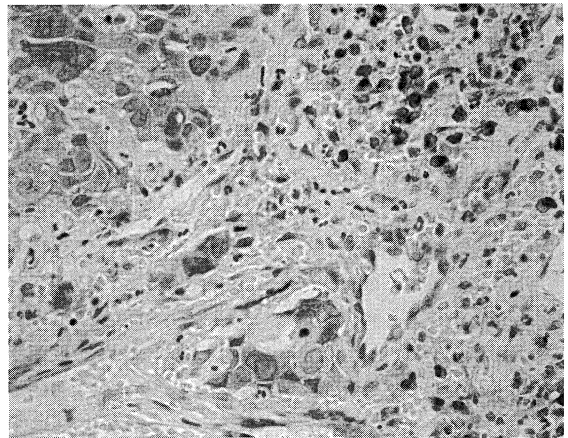
認められなかった。  
ISH

TIMP-1 mRNA, TIMP-2 mRNA の発現は、正常組織、癌組織のいずれでも見られなかった。

TIMP-3 mRNA の発現は正常の上皮では見られな



A



B

Fig. 2. Results of immunohistochemical stainings for TIMP-1, 3 ( $\times 400$ ).

A : A positive staining reaction for TIMP-1 is seen in some stromal cells.

B : A Positive staining reaction for TIMP-3 is seen in both stromal cells and carcinoma cells.

Table 1. Profile representing the clinicopathological data of patients with squamous cell carcinoma and the results of immunostaining and in situ hybridization

Case No.	Age	staging	size (mm)	Staining Intensity					In situ hybridization	differentiation	location
				MMP-2	MMP-9	TIMP-1	TIMP-2	TIMP-3			
1	41	I	18×15	+	+	++	-	+	+	moderate	gingiva
2	74	II	25×27	+	++	+	-	+	+++*	moderate	tongue
3	59	II	27×32	+	+	++	-	+	+	well	tongue
4	63	III	40×30	++	++	+	-	+	-	well	sinus
5	73	III	25×35	+	++	+	-	+	+	well	tongue
6	58	III	22×23	+	++	+	-	+	++	poor	gingiva
7	48	III	30×15	++	++	++	-	++	+++*	moderate	gingiva
8	38	III	20×30	++	+	++	-	+	+++*	well	tongue
9	39	III	18×45	++	++	+	-	+	+	well	tongue
10	53	III	26×16	++	++	++	-	+	+++*	moderate	sinus
11	59	IV	60×35	++	++	++	-	++	-	well	gingiva
12	81	IV	25×55	++	++	+	-	+	-	moderate	lip
13	58	IV	45×45	++	++	+	-	++	++	poor	sinus
14	51	IV	45×30	++	++	+	-	++	+	poor	gingiva

+ : focally positive

++ : diffusely positive

\* : positive in carcinoma cells

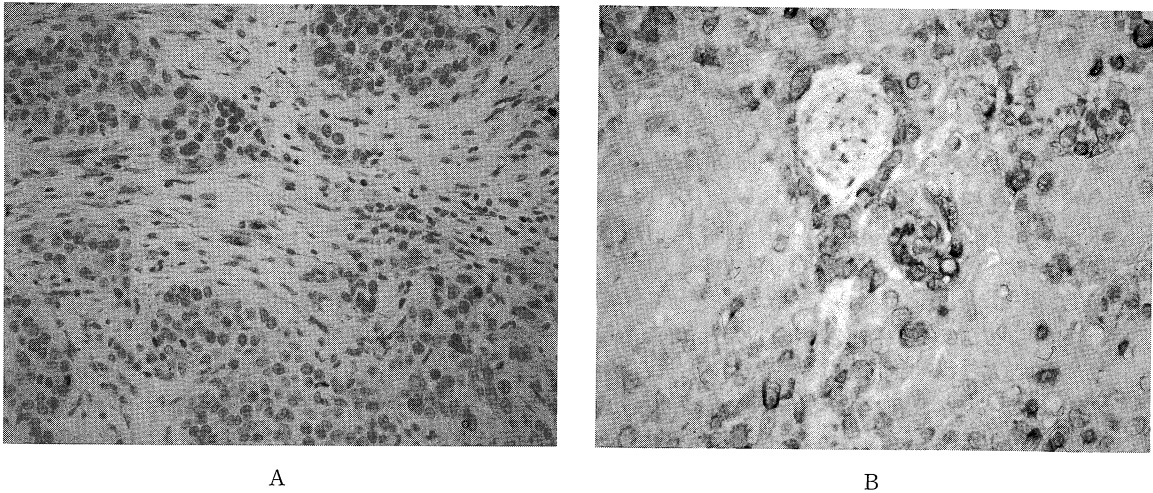


Fig. 3. Result of in situ hybridization for TIMP-3mRNA.

A : Expression of TIMP-3mRNA is seen in stromal cells ( $\times 200$ ).

B : Expression of TIMP-3mRNA is seen in both stromal cells and carcinoma cells ( $\times 400$ ).

ったが、扁平上皮癌では14例中7例(50%)で間質細胞のみ(線維芽細胞と血管内皮細胞)に見られ(Fig. 3 A)4例では(27%)では間質細胞と癌細胞の胞体内に検出され(Fig. 3 B)癌細胞のみに検出されるものはなかった。発現は扁平上皮癌の癌浸潤先端部に強い傾向があった。センスプローブをもちいたネガティブコントロールは、全ての標本で発現を認めなかった。

TIMP-3 mRNA の発現が、局所的に発現するものを score(+), 癌の間質細胞にびまん性に発現するものを score(++)とし、癌細胞の胞体内に発現のあったものは、\*として臨床病期分類と比較して免疫染色の結果と共に Table 1 に示した。score(+)と score(++)の間には差異は認められなかったが、癌細胞の胞体内に TIMP-3 mRNA の発現のあるものでは、癌最大径が小さい傾向があった。(X 2 test  $P < .1$ ) また、癌の分化度や部位と、TIMP-3 mRNA の発現は相関が認められなかった。

## 考 察

MMP-2, 9 は基底膜を構成する type IV コラーゲンの分解に不可欠なものであり腫瘍の転移に欠かせない要素であると考えられており、TIMPs はそれらの酵素の最も重要な抑制物質である。腫瘍の浸潤転移に関係すると考えられる MMPs とこれらの調節因子である TIMPs については種々の方法論で研究が行われている。しかし

ながら、これらの報告の中で同じサンプル上で MMPs とその対応する TIMPs の関係を解析したものは少ない。特にその中でも口腔の癌に関して MMPs と TIMPs との関係を述べたものは Sutinen ら<sup>13)</sup> による報告のみである。そこで我々は口腔の扁平上皮癌における MMP-2, 9 蛋白と TIMP-1, 2, 3 mRNA の発現を ISH で検討した。

MMP-2 蛋白の免疫染色は扁平上皮癌の周囲の線維芽細胞に陽性となることが Sutinen ら<sup>13)</sup> により報告されている。我々の結果もほぼ同様であり癌の周囲間質細胞に陽性であった。また、河田ら<sup>17)</sup> は MMP-2 蛋白の産出が強い頭頸部の癌は転移が多いと報告している。我々の結果でも、びまん性に陽性となるものは局所的に陽性となるものよりも臨床病期が進んでいる傾向が認められた。MMP-9 蛋白の免疫染色は癌周囲の間質細胞と血管内皮細胞や好中球に陽性となる事が報告されている<sup>17)</sup>。我々の結果でも、同様の部位に認められ強さに差はあったが全ての症例で陽性となった。また、びまん性に陽性となるものは局所的に陽性となるものに比べて、臨床病期が進んでいる傾向がみられた。以上の結果から MMP-2, 9 が癌の転移に重要な役割を持つことが示唆された。

TIMP-1 蛋白の免疫染色は Sutinen ら<sup>13)</sup> により癌の周囲間質細胞に陽性となることが報告されている。これは我々の結果と同様である。また、我々の今回の検索で

は mRNA の発現を認めなかった、これは発現量が TIMP-3 に比較して少ない為にとらえる事ができなかったと思われる。TIMP-2 蛋白の免疫染色および mRNA の発現は Sutinen ら<sup>13)</sup> によって陰性であったと報告されているが Polette ら<sup>16)</sup> は癌周囲の間質細胞にごく弱い mRNA の発現を認めたと報告している。今回の我々の結果では TIMP-2 mRNA の発現および蛋白の免疫染色は陰性であった。以上より、口腔癌の浸潤において TIMP-2 は重要な働きをもっていないと考えられる。

TIMP-3 蛋白の免疫染色と mRNA の発現は Sutinen ら<sup>13)</sup> によって癌の周囲間質細胞で陽性であったと報告されている。今回の我々の検索では TIMP-3 蛋白の免疫染色は癌の間質細胞と弱くではあるが殆どの症例の癌細胞に陽性となり、TIMP-3 mRNA は癌の周囲間質細胞と一部の症例で癌細胞の胞体内の発現を認めた。口腔扁平上皮癌細胞の胞体内に TIMP-3 mRNA の発現を認めたのは、我々が知るかぎり今回の報告が始めてであるが、Airola ら<sup>18)</sup> は皮膚の基底細胞癌の胞体内での発現を報告している。免疫染色と ISH では、癌細胞が陽性となる症例の割合が異なっているが、Ahonen ら<sup>19)</sup> が TIMP-3 は TIMP-1, 2 と違い培地中に分泌されずマトリックスに蓄積されると報告していることから、癌細胞周囲の間質に蓄積された TIMP-3 蛋白をとらえた為免疫染色では、より多くの症例で陽性になったと思われる。また、TIMP-3 は MMP の抑制に加えて結合織の代謝回転と改築の役割をもっている事が報告されている<sup>20)</sup>。しかしながら、Sun ら<sup>21)</sup> のマウスの JB 6 腫瘍細胞を用いた実験では TIMP-3 過剰発現が腫瘍細胞の成長を抑制する効果をもたなかったと報告している。その為、TIMP-3 が腫瘍の発育にどのような影響を与えるのかは分かっていない。今回の我々の結果では、TIMP-3 の免疫染色や TIMP-3 mRNA の発現と、部位、臨床病期との関係は認められなかったが、TIMP-3 mRNA が癌細胞の胞体内に発現している症例では癌の大きさが小さい傾向が認められた。この事から TIMP-3 の癌細胞での生産は癌の発育を遅らせる可能性が示唆された。また、TIMP-3 mRNA の発現は TIMP-1, 2 mRNA に比較して明らかに強い発現を認めた事から、TIMP-3 は癌の浸潤における組織構築により強い影響をもつものと考えられる。また、癌の存在する組織のみに、MMP-2, 9 と TIMP-1, 3 の免疫染色の陽性所見がみられ正常組織では認められなかったことは、口腔扁平上皮癌においても、皮膚癌や他の癌腫と同様に MMPs と TIMPs が癌浸潤における細胞外マトリックスの破壊に強く関与していることを示唆している。MMP-2, 9 蛋白の免疫染色の結果や

mRNA の発現が相関しないことから、蛋白分解酵素である MMP-2, 9 はその抑制因子である TIMPs よりも腫瘍の発育、転移に関して強い影響をもっている事が示唆される。

以上により、口腔扁平上皮癌においては、周囲間質の TIMP-1, 3 の産生は Poulsom ら<sup>22)</sup> によって提案されるように癌発育の抑制の為ではなく、むしろ、悪性細胞の浸潤による組織破壊の結果生じた二次的なものであったことが示唆された。それに対し、腫瘍細胞中の TIMP-3 の発現は腫瘍細胞の発育を遅らせる傾向があることから、なんらかの腫瘍に対する生体の防御機構の一つであると考えられる。この事は、腫瘍自身が自らの発育を抑制する物質を生産する事を意味し、この機序の解明を進める事によって新たな腫瘍浸潤のメカニズムの解明の手掛かりになるのではないかと考えられる。

## 文 献

- 1) Seltzer, J. L., Weingarten, H., Akers, K. T., Eschbach, M. L., Grant G. A. and Eisen A. Z.: Cleavage specificity of type IV collagenase (galatinase) from human skin. Use of synthetic peptides as model substrates. *Biol. Chem.* **264**: 19583-19586, 1989.
- 2) Senior, R. M., Griffin, G. L., Fliszar, C. J., Shapiro, S. D., Goldberg, G. I. and Welgus, H. G.: Human 92-and 72-kilodalton type IV collagenases are elastases. *J. Biol. Chem.* **25**: 7870-7875, 1991.
- 3) Pyke, C., Ralfkiaer, E., Huhtala, P., Hurskainen, T., Dano, K. and Tryggvason, K.: Localization of messenger RNA for Mr 72,000 and 92,000 type IV collagenases in human skin cancers by in situ hybridization. *Cancer Res.* **52**: 1336-1341, 1992.
- 4) Welgus, H. G. and Stricklin, G. P.: Human skin fibroblast collagenase inhibitor Comparative studies in human connective tissues, serum, and amniotic fluid. *J. Biol. Chem.* **258**: 12259-12264, 1983.
- 5) Stetler-Stevenson, W. G., Krutzsch, H. C., Wachter, M. P., Margulies, I. M. and Liotta, L. A.: The activation of human type IV collagenase proenzyme. Sequence identification of the major conversion product following organomercurial activation. *J. Biol. Chem.* **264**: 1353-1356, 1989.

- 6) **Stetler-Stevenson, W. G., Krutzsch, H. C. and Liotta, L. A.** : Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-2). A new member of the metalloproteinase inhibitor family. *J. Biol. Chem.* **264** : 17374-17378, 1989.
- 7) **Apte, S. S., Mattei, M. G. and Olsen, B. R.** : Cloning of the cDNA encoding human tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) and mapping of the TIMP 3 gene to chromosome 22. *Genomics* **19** : 86-90, 1994.
- 8) **Greene, J., Wang, M., Liu, Y. E., Raymond, L. A., Rosen, C. and Shi Y. E.** : Molecular cloning and characterization of human tissue inhibitor of metalloproteinase 4. *J. Biol. Chem.* **271** : 30375-80, 1996.
- 9) **DeClerck, Y. A., Perez, N., Shimada, H., Boone, T. C., Langley, K. E. and Taylor, S. M.** : Inhibition of invasion and metastasis in cells transfected with an inhibitor of metalloproteinase. *Cancer Res.* **52** : 701-708, 1992.
- 10) **Liotta, L. A. and Stetler-Stevenson, W. G.** : Tumor invasion and metastasis : an imbalance of positive and negative regulation. *Cancer Res.* **15** : 5054 S-5059 S, 1991.
- 11) **Brinckerhoff, C. E.** : Regulation of metalloproteinase gene expression : implications for osteoarthritis. *Crit. Rev. Eukaryot Gene Expr.* **2** : 145-164, 1992.
- 12) **Armstrong, P. W., Moe, G. W., Howard, R. J., Grima, E. A. and Cruz, T. F.** : Structural remodeling in heart failure : gelatinase induction. *Can. J. Cardiol.* **10** : 214-220, 1994.
- 13) **Sutinen, M., Kainulainen, T., Hurskainen, T., Vesterlund, E., Alexander, J. P., Overall C. M., Sorsa T. and Salo T.** : Expression of matrix metalloproteinases (MMP-1 and-2) 194 their inhibitors (TIMP-1, -2 and-3) in oral lichen planus, dysplasia, squamous cell carcinoma and lymph node metastasis. *Br. J. Cancer* **77** : 2239-2245, 1998.
- 14) **Charous, S. J., Stricklin, G. P., Nanney, L. B., Netterville, J. L. and Burkey, B. B.** : Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in head and neck squamous cell carcinoma. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* **106** : 271-278, 1997.
- 15) **Gray, S. T., Wilkins, R. J. and Yun K.** : Interstitial collagenase gene expression in oral squamous cell carcinoma. *Am. J. Pathol.* **141** : 301-306, 1992.
- 16) **Polette, M., Clavel, C., Birembaut, P. and De Clerck Y. A.** : Localization by in situ hybridization of mRNAs encoding stromelysin 3 and issue inhibitors of metallo-proteinases TIMP-1 and TIMP-2 in human head and neck carcinomas. *Pathol. Res. Pract.* **189** : 1052-1057, 1993.
- 17) **河田了, 四宮隆, 安田範夫, 竹中洋, 村上泰** : 扁平上皮癌の Matrix metalloproteinase(MMP)-2 濃度とその臨床的意義. *日耳鼻.* **99** : 299-305, 1996.
- 18) **Airola, K., Ahonen, M., Johansson, N., Heikkila, P., Kere, J., Kahari, V. M. and Saarialho-Kere, U. K.** : Human TIMP-3 is expressed during fetal development, hair growth cycle, and cancer progression. *J. Histochem. Cytochem.* **46** : 437-47, 1998.
- 19) **Ahonen, M., Baker, A. H. and Kahari, V. M.** : Adenovirus-mediated gene delivery of tissue inhibitor of metalloproteinase-3 inhibits and induces apoptosis in melanoma cells. *Cancer Res.* **58** : 2310-5, 1998.
- 20) **Uria, J. A., Ferrando, A. A., Velasco, G., Freije, J. M. and Lopez-Otin, C.** : Structure and expression in breast tumors of human TIMP-3, a new member of the metalloproteinase inhibitor family. *Cancer Res.* **54** : 2091-2094, 1994.
- 21) **Sun, Y., Kim, H., Parker, M., Stetler-Stevenson, W. G. and Colburn, N. H.** : Lack of suppression of tumor cell phenotype by overexpression of TIMP-3 in mouse JB 6 tumor cells identification of a transfectant with increased tumorigenicity and invasiveness. *Anticancer Res.* **16** : 1-7, 1996.
- 22) **Poulsom, R., Hanby, A. M., Pignatelli, M., Jeffery, R. E., Longcroft, J. M., Rogers, L. and Stamp, G. W.** : Expression of gelatinase A and TIMP-2 mRNAs in desmoplastic fibroblasts in both mammary carcinomas and basal cell carcinomas of the skin. *J. Clin. Pathol.* **46** : 429-436, 1993.