

トロホプラストにおける Matrix Metalloproteinase (MMP)-2 および MMP-9 の産生とその浸潤能との関連性

白 田 三 郎

東京医科大学産科婦人科学講座
(指導: 高山雅臣主任教授)

【要旨】 トロホプラストによる子宮内膜への侵入は厳密にコントロールされており、絨毛癌のように、子宮筋層を越えて無秩序に浸潤することはない。本研究では、浸潤の指標として matrix metalloproteinase 2 (以下 MMP-2) および matrix metalloproteinase 9 (以下 MMP-9) に注目し、正常胎盤のトロホプラストにおけるその活性と浸潤能について検討を行った。

正常妊娠初期および満期胎盤組織より連続凍結切片及びパラフィン切片を作成し、免疫染色, in situ hybridization (以下 ISH), film in situ zymography (以下 FIZ) を行い, MMP-2, MMP-9 の産生ならびに活性細胞の同定を行った。また Percoll 非連続法および magnetic cell sorting を用い胎盤より cytotrophoblast (以下 CT) を各部位別 (villous CT, column CT, placental bed CT) に分離し, MMP-2, MMP-9 の局在, 活性ならびに各 CT 浸潤能を invasion assay により検討した。

初期胎盤において MMP-2 は extravillous trophoblasts (以下 EVT), MMP-9 は主に villous cytotrophoblasts (以下 VCT) に局在および m-RNA の発現が認められた。FIZ では特に EVCT の局在に一致した部分に著明なゼラチナーゼ活性を認めた。一方満期胎盤では初期と同様の局在および発現を認めたが、ゼラチナーゼ活性は減弱あるいは消失した。部位別 CT の検討では, column CT に強い MMP-2 の局在を認めた。また初期 CT において認められた著明なゼラチナーゼ活性と浸潤能は, 満期 CT ではいずれも減弱あるいは消失した。

以上の結果より, トロホプラストの浸潤能は妊娠初期で強く, 満期では抑制されることが明らかとなり, その浸潤能は MMP-2, MMP-9 の酵素活性により調節され, 特に MMP-2 が重要な役割を演じていることが示唆された。

はじめに

癌の転移が成立するためには, 癌細胞と基底膜や間質の成分である細胞外マトリックスとの相互作用が必要不可欠と考えられている¹⁾²⁾。一般に癌細胞の浸潤転移には, 細胞外基質を破壊し進んでいくような細胞の運動性や細胞の接着性を調節する因子, また細胞自体の増殖能を亢進させる多くの因子が複雑に関与していることが, in vitro あるいは in vivo の研究により

報告されている^{3)~5)}。一方, 卵管で受精した妊卵は卵割を繰り返しながら受精後約 4 日で子宮腔内に到達し 13~14 日目に絨毛形態が形成されるに至り, 絨毛先端より脱落膜化した子宮内膜に向かってトロホプラストの細胞浸潤がみられるようになる。その侵入形態は癌の浸潤と非常に類似している。しかし, 妊娠におけるトロホプラスト浸潤は, 絨毛癌や子宮の悪性腫瘍細胞のそれとは異なり子宮筋層を越えて無秩序に浸潤することはなく厳密にコントロールされている⁶⁾⁷⁾。こ

2001 年 12 月 26 日受付, 2002 年 2 月 13 日受理

キーワード: トロホプラスト, マトリックスメタロプロテナーゼ-2, マトリックスメタロプロテナーゼ-9, 浸潤, Film in situ zymography

(別刷請求先: 〒160-0023 東京都新宿区西新宿 6-7-1 東京医科大学産婦人科講座 白田三郎)

のことは癌の転移を考える上で非常に興味深い、そのメカニズムについての解明は殆どなされていない。また、妊娠初期絨毛は脱落膜化した子宮内膜に侵入し増殖しながら胎盤を形成する。病理学的には、cell columnより extravillous trophoblasts (以下 EVT) が子宮内膜に侵入し、子宮筋層付近においてその浸潤が呈している所見が観察されている。しかし、その侵入は妊娠の経過とともに減弱し、脱落膜内にとどまった EVT はいわゆる placental bed cytotrophoblasts (以下 CT) を形成するようになる。このような EVCT の浸潤のメカニズムについても現在まで詳細は明らかでないが、matrix metalloproteinases (以下 MMP)⁸⁾、tissue inhibitors metalloproteinase (以下 TIMP)⁹⁾、Integrins¹⁰⁾ の関与が報告されている。この中で MMP-2, MMP-9 は、基底膜成分である IV 型コラーゲンを分解することから種々の細胞の浸潤に関連性があると報告されている^{11)~13)}。MMP は通常潜在型の形で産生され、活性化することにより浸潤能を持つ。しかし活性化型は、TIMP と結合することで非活性化されるため、実際にはその真の活性を捉えることは難しい。

本研究では、トロホプラストがどのような機構で浸潤するのか、そしてなぜ癌細胞のように増殖しないのか、そのメカニズムを解明するために基底膜の主成分である IV 型コラーゲンを分解すると言われている MMP-2¹⁴⁾¹⁵⁾ および MMP-9¹⁶⁾ に着目し、正常妊娠初期および満期胎盤組織を用いて妊娠中における絨毛細胞の浸潤と MMP の関連性について検討を行なった。

研究方法

人工妊娠中絶 15 症例および帝王切開 15 例から患者の承諾を得て採取した妊娠 5 週から 40 週までの絨毛組織を用いた。検体の一部は採取後直ちに OCT compound にて包埋し、クライングスプレー (日酸商事, Japan) にて急速凍結し、使用まで -80°C にて保存した。残りは 20% 中性緩衝ホルマリン液にて固定後、パラフィンブロック包埋し薄切した。CT 分離実験の際には、絨毛の採取後直ちに calcium and magnesium-free Hanks' solution (以下 CMF-Hanks') にて数回洗浄した後、実験開始 (通常 3 時間以内) まで 4°C にて保存した。

1. 細胞の準備

CT は、Kliman et al. の方法¹⁷⁾ に準じ、0.125%

Table 1 Cell types separated by cell sorting

antibodies for cell sorting	methods of selection	types of cell population separated by cell sorting
CD45	positive	lymphomyeloid cell
Integrin β 5	positive	villous CT
Integrin α 1	positive	placental bed CT
Integrin α 1	negative	column CT

trypsin 処理後、Percoll 非連続勾配法を用いて各々妊娠初期および満期胎盤絨毛組織より分離した。また血球系の細胞の混入を防ぐため、さらに抗 LCA (CD45) 抗体を吸着させた磁気ビーズ (NIHON DYNAL K. K., Japan) を用いて血球系の細胞を分離し¹⁸⁾、より純粋な CT を得た。その後、我々が以前報告⁷⁾ したように Integrin α 1, β 3, β 5 を用いて villous CT, column CT, placental bed CT の各部位におけるトロホプラスト分離を行なった (Table 1)。絨毛癌細胞株は BeWo, JAR, JEG-3, SCH を用いた。BeWo, SCH は国立衛生試験所より供与、JAR, JEG-3 は ATCC より購入した。

2. ISH

ISH 用 RNA プローブの作成は、Genbank (NCBI) より MMP-2, MMP-9 の塩基配列を呼びだし、primer として MMP-2 (1s: TGGAGATACAATGAGGTG-GTGAAGA, 2s: ATTGGATCCTGGCTTCCC-CAAGCT/1a: AGGGGTGGCTCTGAGGGTTG-GTGGA/2a: AGGGTCCGCCTGGGAG-GAGTACAG) と MMP-9 (1s: ATGAGCCTCTGG-CAGCCCCTGGTCC, 2s: GGGCTGCTGCTTTGC-TGCCCCAGA/1a: ACCACAACCTCGTCATCG-TCGAAATG, 2a: GGCCTCTCCCTGAATGCCG-GGGCCA) を各々デザインし、目的部分の cDNA を PCR により増幅精製した。これを pGEM-T vector (Promega, Japan) にサブクローニング (TA cloning) した後、各々 T7, SP6 promoter にて RNA の合成を行い、Digoxigenin にて標識した。ISH 用組織は、組織採取後直ちに 4% パラフィンフォルムアルデヒドで 4°C、一晚固定した後、さらに 12% ショ糖溶液に浸し順次高濃度のものへと置き換え、18% ショ糖溶液まで浸透したものを OCT compound に包埋し、使用まで -80°C にて保存した。保存標本から cryostat にて 5 μ m の凍結切片を作成、proteinase K 処理後、50% formamide/2x SSC にて 65°C、10 分間プレハイブリゼー

ションを行った。次に作製したRNAプローブを mRNA in situ hybridization solution (DAKO, Japan) に混合し、これを切片上に滴下して 42°C で一晩ハイブリゼーションを行った。シグナルの検出はプローブの洗浄後、アルカリフォスファターゼ標識抗 digoxigenin 羊抗体 (Boehringer Mannheim, Germany) を反応させ、BCIP/NBT Color Development Substrate (Promega, Japan) にて発色を行った。

3. 免疫組織化学的染色

凍結保存標本は cryostat にて 5 μm の連続切片を作成し、冷アセトンにて 5 分間固定し、パラフィン切片は脱パラフィン後、microwave 処理を 5 分間 3 回行い、染色はヒストファイブ SAB キット (ニチイ, Japan) にて行った。一次抗体としては抗ヒト MMP-2 マウス抗体 (富士薬品, Japan), 抗ヒト MMP-9 マウス抗体 (富士薬品) を各々使用した。発色は diaminobenzidine で行い、核染色はヘマトキシレンを用いた。

4. FIZ (Fig. 1)

本法はゼラチンを薄層コートしたフィルム上でゼラチナーゼ活性を検出する新しい方法であり、MMP-2, MMP-9 の産生細胞および活性細胞の同定が可能である¹⁹⁾²⁰⁾。cryostat にて免疫染色用標本に隣接した 5

μm の連続切片を作成し、ゼラチンを薄層したポリエステルフィルムに貼付した。その後 37°C にて 8 時間および 24 時間反応を行い、ポンソー 3R (和光製薬, Japan) およびヘマトキシレン溶液 (和光製薬, Japan) にて二重染色を行った。ゼラチナーゼ活性が存在すれば、フィルム上のゼラチンが消化されるため、ポンソー 3R 溶液による赤色の染色が消退した透明帯として観察確認が可能となる。

5. in vitro での浸潤能の検討

CT 及び絨毛癌細胞の浸潤能の検討は、Matrigel がコートされた 8 μm ポアサイズの PET メンブレン (Becton Dickinson, USA) を用いて in vitro における invasion assay を施行した。2.5 × 10⁴ 個の細胞を PET メンブレン上室に播き込み 37°C, 5% CO₂, 95% air の湿潤環境条件下で静置培養し、24 時間後に PET メンブレンの反対側に移動した細胞数を算定した。算定は光学顕微鏡を用い 400 倍率にて triplicate にて行い平均の細胞数を取った。

6. 統計学的処理

本研究における有意差の検討は t 検定を用いて行い、p < 0.05 をもって有意差ありと判定した。

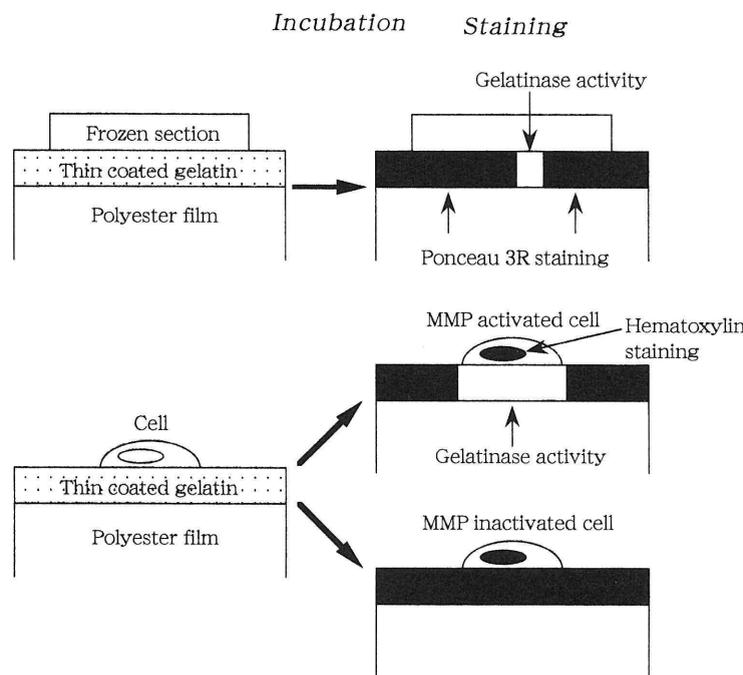


Fig. 1 The principle of film in situ zymography (FIZ)

Table 2. Gelatinase activity by FIZ and expression of mRNA and protein of MMP-2, MMP-9 in 1st and 3rd trimester placenta

type of trophoblasts		villous CT	ST	EVT	
1st trimester placenta	gelatinase activity	-	-	+	
	MMP-2	mRNA	-	-	+
		protein	-	-	+
	MMP-9	mRNA	+	-	-/+
		protein	+	-	-/+
	3rd trimester placenta	gelatinase activity	-	-	-
MMP-2		mRNA	-	-	+
		protein	-	-	+
MMP-9		mRNA	-	-	-
		protein	-	-	-

CT: cytotrophoblast, ST: syncytiotrophoblast, EVT: extravillous trophoblast
 -: negative, -/+ : negative or positive, +: positive

研究成績

1. 胎盤における MMP-2, MMP-9 の mRNA および蛋白局在の発現およびゼラチナーゼ活性 (Table 2)

1) ISH による m-RNA の発現

初期胎盤において MMP-2 mRNA は EVTs に発現が認められた (Fig. 2A, 2B) が, MMP-9 mRNA は VCTs, 絨毛間質細胞および一部の EVTs にも発現が認められた. 一方 Syncytiotrophoblasts (以下 STs) には MMP-2, MMP-9 の発現は認められなかった. 満期胎盤では MMP-2 mRNA は初期胎盤と同様に EVCT にも発現が認められた (Fig. 2C, 2D) が, MMP-9 mRNA の発現は認められなかった.

2) 免疫組織学的染色による局在

初期胎盤において MMP-2 は EVTs に局在が認めら

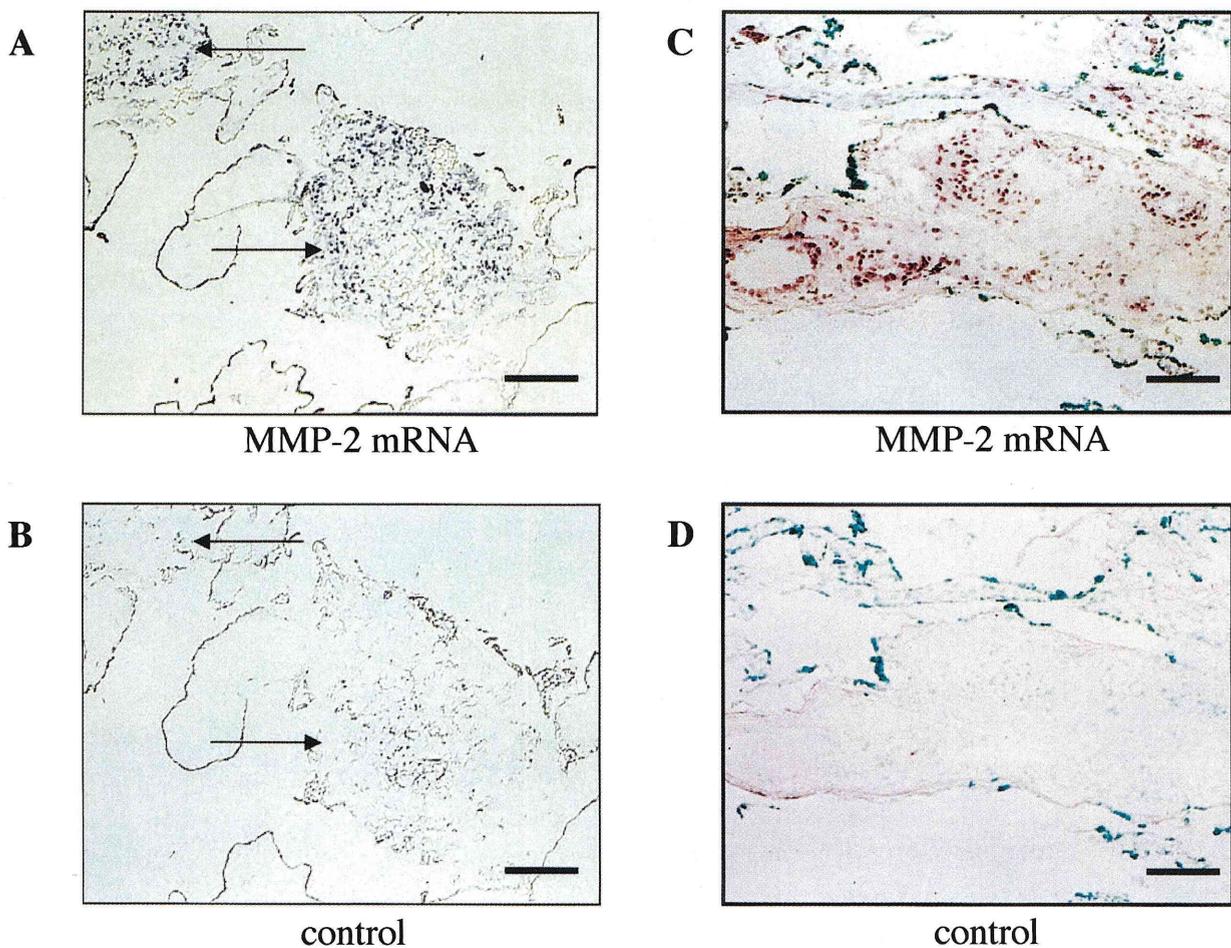


Fig. 2 The mRNA expression of MMP-2 in human first trimester and full-term placenta. MMP-2 mRNA was expressed in extravillous trophoblasts (EVTs, arrows) in cell islands (A), and negative controls using a sense probe in the serial frozen section were counterstained with methyl green (B). MMP-2 mRNA was expressed in EVTs in the basal plate (C), and a negative control using a sense probe in a serial frozen section counterstained with methyl green (D). Bar=100 mm.

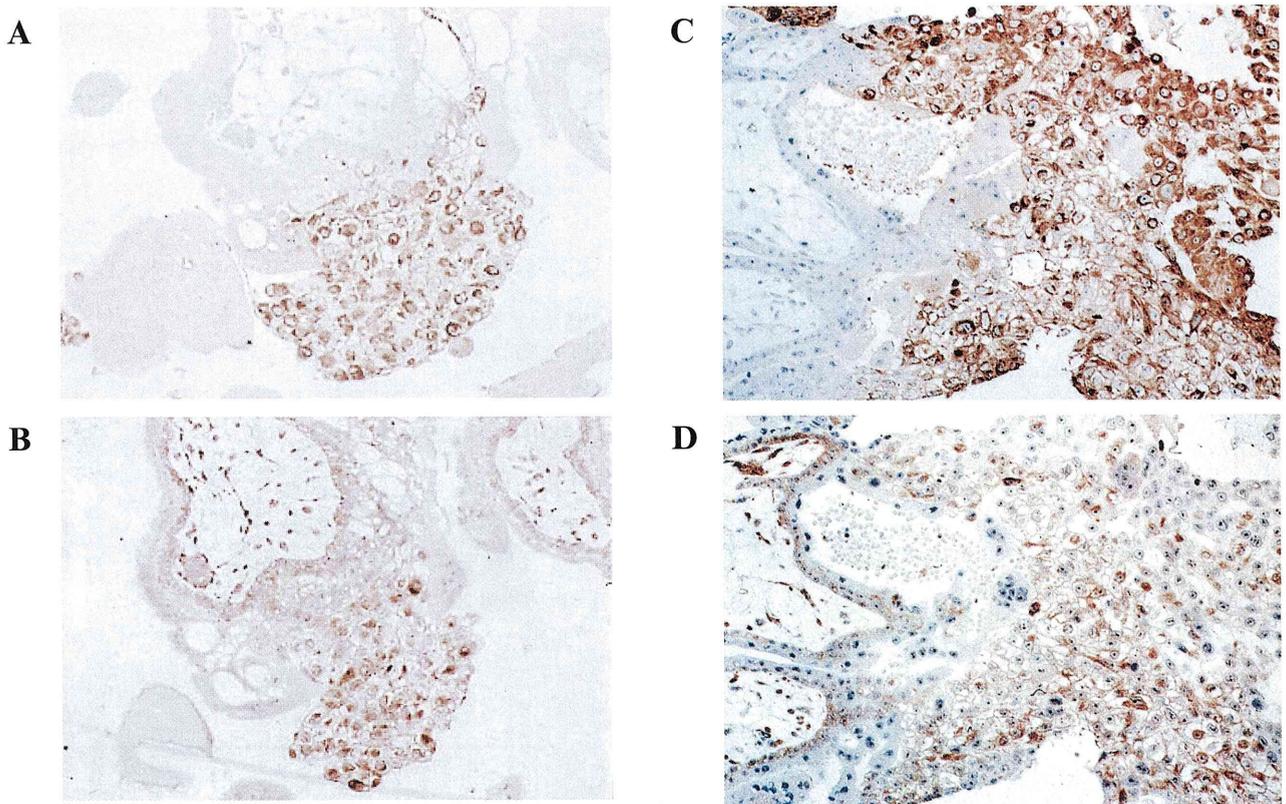


Fig. 3 Localization of MMP-2 and MMP-9 in human first trimester and full-term placenta. MMP-2 was stained in EVT cells (A), and MMP-9 stained in villous cytotrophoblasts (CTs) and EVT cells in cell islands (B). In cell column of EVT cells, MMP-2 was strongly stained in invasive EVT cells (C), and MMP-9 in proliferative EVT cells (D). Bar = 100 μ m.

れた (Fig. 3A). 一方, MMP-9 は, 主に VCTs に局在が認められたが, 一部 EVT cells および絨毛間質細胞にも認められた (Fig. 3B). EVT cells における局在に関しては, MMP-2 は cell column より離れたいわゆる distal column CT に, MMP-9 は proximal column CT に著明な局在を認めた (Fig. 3C, 3D). 満期胎盤において MMP-2 は初期と同様に EVT cells にのみ局在が認められたが, MMP-9 は CT, ST いずれの細胞にも局在は認められなかった. これらの局在は, mRNA 発現結果と一致していた.

3) FIZ によるゼラチナーゼ活性の検討

初期胎盤では, MMP-2 の局在と一致して EVT cells において著明なゼラチナーゼ活性が認められた. しかし, その活性は妊娠経過とともに減弱し, 満期胎盤では消失した (Fig. 4).

2. CT における MMP-2, MMP-9 の局在およびゼラチナーゼ活性

1) 分離 CT における MMP-2, MMP-9 の局在

妊娠初期絨毛組織より分離した CT (以下初期 CT) の各部位別における検討では, MMP-2 は EVT cells に局

在を認めたが, その染色性は integrin $\alpha 1$ で選別した placental bed CT は column CT に比べ著明に認められた (Fig. 5A, 5B). MMP-9 は, いずれの分画 CT にも局在は認められなかった (Fig. 5C, 5D). 一方, 満期胎盤より分離した CT (以下満期 CT) では, 初期 CT と同様に MMP-2 の局在のみが認められた (Fig. 5E, 5F).

2) FIZ を用いたゼラチナーゼ活性の検討

初期 CT は, 絨毛癌細胞株 JAR と比べて著明なゼラチナーゼ活性を認めた (Fig. 6), が満期 CT ではその活性は認められなかった.

3. in vitro invasion assay を用いた浸潤能

初期 CT は, 満期 CT に比べ著明な浸潤能を示した (Fig. 7). また, 絨毛癌細胞株 BeWo, JAR, JEG-3, SCH と比べても同程度の浸潤能を示し, 満期とは明らかな有意差が認められた (Fig. 8).

考 察

受精卵の着床現象におけるトロホプラストの子宮内膜へ侵入には matrix metalloproteinase や serine

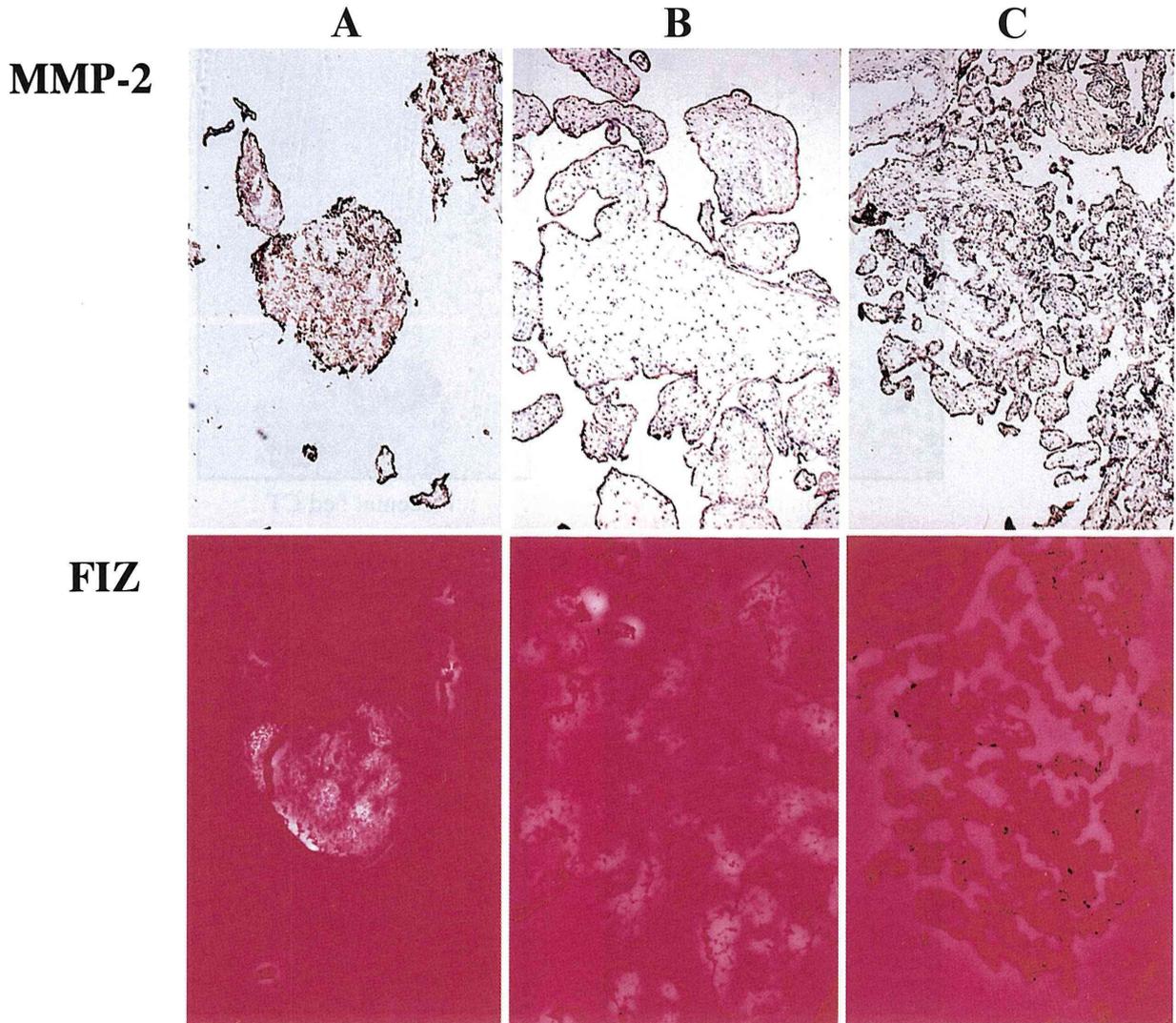


Fig. 4 Localization of MMP-2 and gelatinase activity in serial frozen sections from human 1st trimester, 2nd and term placentas. MMP-2 positive staining and gelatinase activity was recognized in EVT's in 1st trimester placenta (A), weak staining and gelatinase activity in 2nd trimester placenta (B), and no staining and gelatinase activity in term trimester placenta (C). Gelatinase activity is recognized as a white area in serial frozen sections incubated for 24 hrs. Bar = 100 mm.

proteinase など、いわゆる蛋白分解酵素の関与が指摘され、in vivo や in vitro における数多くの研究成果が報告されている。この中では、特に基底膜の主成分である IV 型コラーゲンを分解する MMP-2 および MMP-9 の関与が注目されている²¹⁾²²⁾。しかし、これら MMP-2 および MMP-9 に関する報告の多くは蛋白、m-RNA レベルでの時間的、空間的な発現についてであり、それらが持つ実際のゼラチナーゼ活性を評価した報告は少ない。その理由としては、実際に活性型の MMP-2、MMP-9 を捕まえることが難しいことが大きな要因として挙げられる。通常、MMP-2、MMP-9 は潜在型酵素の形で産生され、種々のプロテアーゼや他の MMP の作用によって活性型となり細胞外基質を分解

するが、一方で活性型は、TIMP などの内在性阻害物質によりブロックされるため²³⁾²⁴⁾、実際の活性の強さは活性型ゼラチナーゼの量と阻害物質の量とのバランスによって左右される。それ故、活性化した MMPs の m-RNA や蛋白の発現だけでは実際に局所で起きている蛋白分解反応を論ずることは難しい。そこで今回、我々はゼラチナーゼ活性を細胞レベルにて認識可能である新しいゼラチナーゼ検出法である FIZ さらに in vitro invasion assay を用いる事により、胎盤におけるゼラチナーゼ (MMP-2 および MMP-9) の時間的、空間的な発現以外に、それらが持つ実際のゼラチナーゼ活性、及び浸潤能との関連性も併せて検討した。

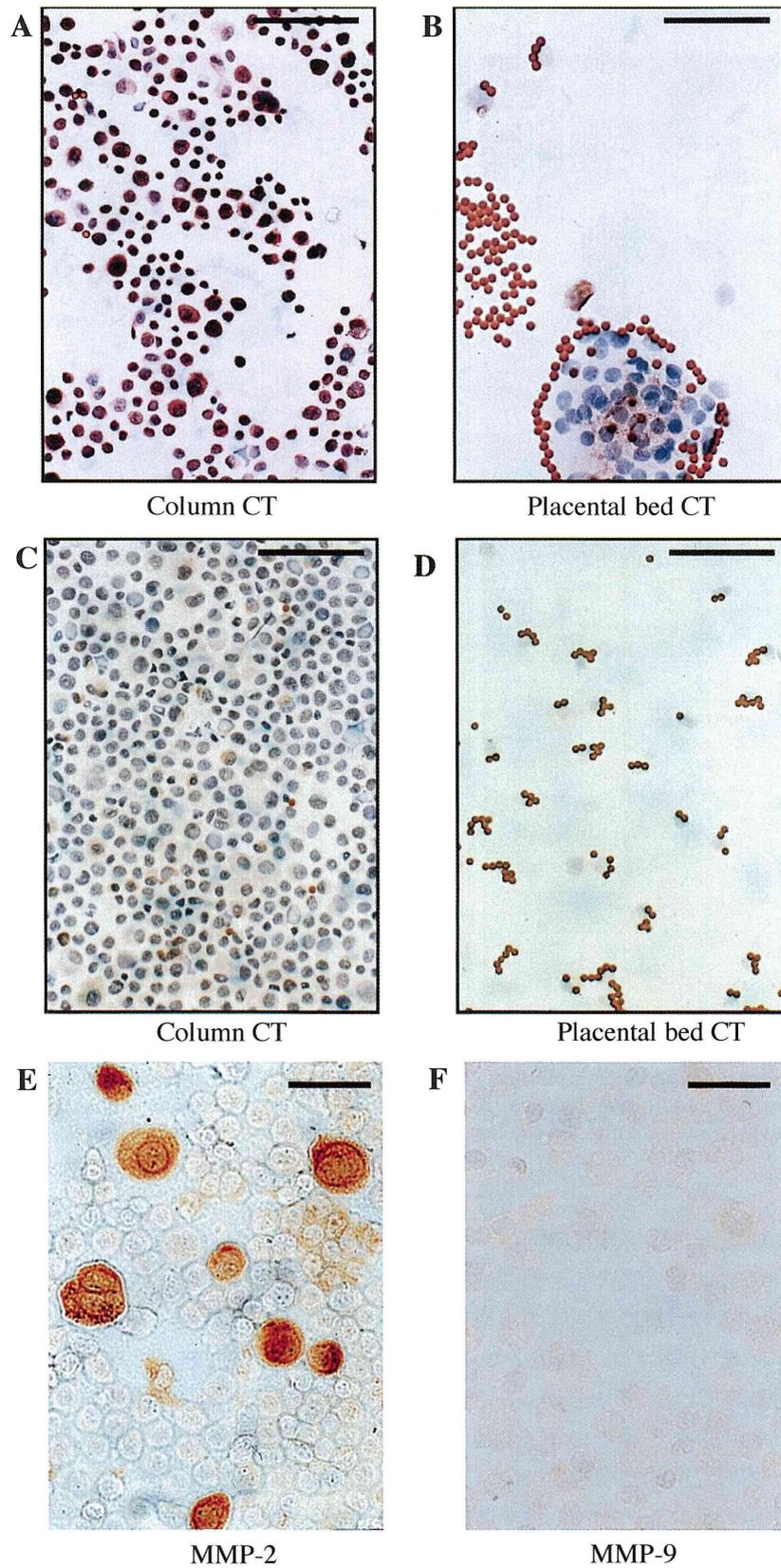


Fig. 5 Localization of MMP-2 and MMP-9 in column and placental bed CTs separated from first trimester placenta (early CTs) and full-term placenta (term CTs) by Percoll discontinuous gradient centrifugation and magnetic cell sorting. In early CTs, MMP-2 was stained in column CTs (A), and not in placental bed CTs (B) separated by immunobeads absorbed integrin $\alpha 1$, respectively. While MMP-9 was weakly stained in column CTs (C), and not in placental bed CTs (D), bar=50 mm. In term CTs, MMP-2 was stained in a part of CTs (E), and MMP-9 not stained in them (F), bar=25 mm.

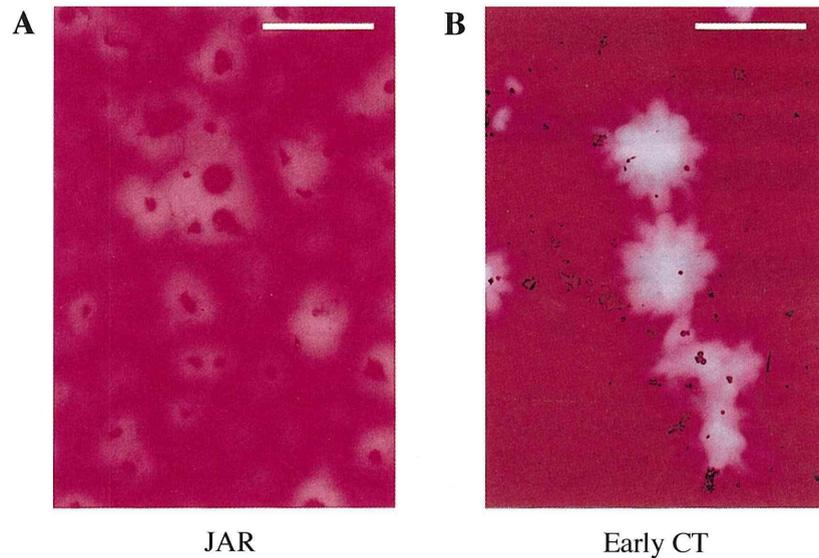


Fig. 6 Gelatinase activity after 8 hours of incubation in a choriocarcinoma cell line, JAR and early CTs. As compared with weak gelatinase activity in JAR (A), marked activity was recognized in early CTs (B), bar=100 μ m.

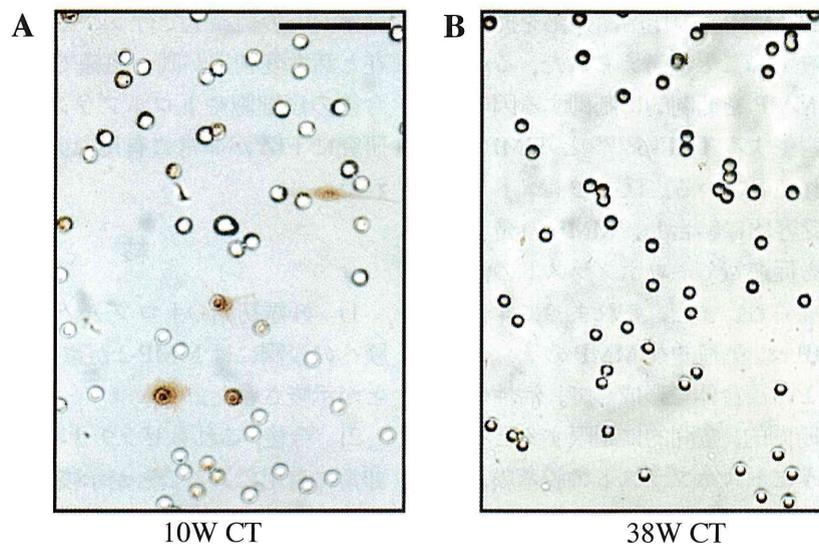


Fig. 7 In vitro invasion assay of JAR and early CTs. Several cells invaded the filter in both JAR (A) and early CTs (B). Counter staining was done by 0.4% trypan blue (GIBCO BRL, Tokyo, Japan).

胎盤組織における mRNA および蛋白の発現について、MMP-2 は初期、満期ともに EVTs (特に distal column CT), MMP-9 は初期の主に VCT と一部の EVTs (proximal column CT) に発現を認めた。さらに、分離 CT を用いた実験においてもそれらの局在は、Integrin $\alpha 1$ により分離した column CT において著明な局在を示し、MMP-2 は初期、満期 CT, MMP-9 は初期 CT に発現が認められた。これらの結果より、浸潤には無関係と考えられる VCTs に主に発現が認められる MMP-9 よりも、浸潤に関与する EVTs に著明な発現を認める MMP-2 が、トロホプラストの浸潤

過程においては重要な役割を果たしている事が示唆された。これらの結果と共に、分離された column CT では MMP-2 の局在が認められ、子宮内膜に奥深く入り込んだ placental bed CT では認められなかった事もトロホプラストの浸潤能を考えるうえで非常に重要であると思われる。CT は基底膜を離れて cell column を形成しながら子宮内膜間質に浸潤し、さらに筋層の 1/3 にまで達する²⁵⁾²⁶⁾。この過程で母体血管を破壊し、母体血と直接接触することにより胎盤胎児循環が形成されるが、通常 CT はそれ以上深く子宮筋層へと浸潤することはない。つまり、MMP-2 を分泌して浸潤し

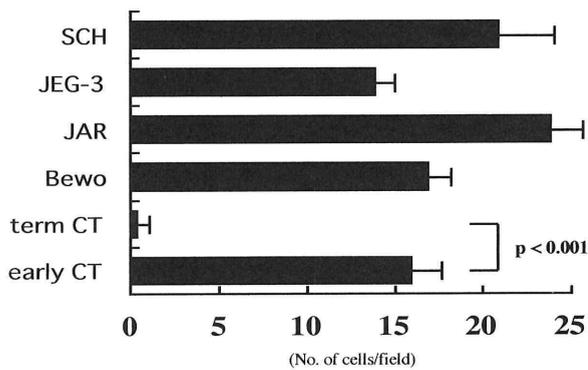


Fig. 8 Results of in vitro invasion assay of CTs and choriocarcinoma cell lines, BeWo, JAR, JEG-3 and SCH. Early CTs showed significantly greater invasive ability than term CTs, and their invasive ability was comparable to that of choriocarcinoma cell lines. There were no significant differences between early CTs and each choriocarcinoma cell lines (Student's t-test). Bars shows mean values \pm S.D.

ていく過程で子宮側に MMP-2 の作用，分泌を抑制的に制御する因子が存在することが考えられた。これまでに，活性化された MMP を抑制的に制御する因子として，脱落膜細胞が産生する TGF- β ²⁷⁾²⁸⁾ と TIMP²⁹⁾³⁰⁾ が報告され，注目されてきている。TGF- β は，トロホプラストの TGF- β 受容体に結合し，MMP の発現を抑制，TIMP の産生を促進してトロホプラストの浸潤を抑制していると考えられ，また，これまでに 4 種類報告されている TIMP は，生理的な MMP のインヒビターで，MMP と 1:1 の複合体を形成して，活性化された MMP の働きを時間的，空間的に制限すると考えられている。このようにトロホプラストの脱落膜，子宮内膜への浸潤には，MMP-2 を含めた複数の促進因子に対し TGF- β や TIMP のような抑制因子が複雑に作用しあうことにより，癌細胞による浸潤とは異なり時間的，空間的に限定されたものとなっていると考えられ，このメカニズムの解明には今後さらに抑制因子を含めた検討が必要と思われた。

一方，in vitro invasion assay において，初期 CT は満期 CT に比べ高い浸潤能を有し，その浸潤能は絨毛癌細胞株と同程度であった。さらに FIZ において妊娠初期胎盤は，満期胎盤に比べ著明なゼラチナーゼ活性を認め，絨毛癌細胞株と比べても強い活性を認めたことより，トロホプラストの浸潤過程においてゼラチナーゼ活性が重要な鍵を握っていることが示唆された。同程度の浸潤能を示す初期 CT と絨毛癌株のゼラチナーゼ活性の違いに関しては，対象が初期培養の細

胞と株化した細胞あることから，正確な比較は難しいと考える。しかし文献的には，絨毛癌株は extracellular matrix と接することによりゼラチナーゼの産生が増加し，またその活性も増強すると報告されている³¹⁾ ことから，今回のようにサイトスピンでフィルムに貼付した場合は，invasion assay において Matrigel 上で培養した場合と比べゼラチナーゼの産生ならびに活性は低いものと推定される。これが初期 CT と絨毛癌株においてゼラチナーゼ活性と浸潤能とが相関しない結果となったものと推測される。

また，従来の免疫染色法や ISH 法を駆使した実験においては，MMP-2 や MMP-9 の mRNA や蛋白（活性型を含め）の同定をすることは可能であってもそれらが実際に局所においてゼラチナーゼ活性機能を持っているかどうかは分からなかった。本研究では従来法に加え FIZ 法を用いることにより，MMP-2 や MMP-9 の m-RNA，蛋白の発現，ゼラチナーゼ活性をほぼ同一の組織上で行うことが可能であった。蛋白局在と活性度判定が同一組織で評価できることにより，今後の癌細胞やトロホプラスト等を用いた浸潤能の研究に FIZ が非常に有用な方法であることが示唆された。

結 語

- 1) 妊娠初期のトロホプラストの脱落膜，子宮内膜への浸潤には MMP-2 が重要な役割を演じていることが示唆された。
- 2) 今後，これらゼラチナーゼ活性の研究に FIZ が非常に有用であることが示唆された。

謝 辞

本稿を終えるにあたり，御指導ならびに御校閲を賜りました東京医科大学産科婦人科学教室高山雅臣教授に深甚なる謝意を捧げます。また，実験の御指導，御協力を賜りました産科婦人科学教室井坂恵一助教授に深謝致します。

文 献

- 1) Stetler-Stevenson WG, Aznavoorian S, Liotta LA: Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. *Annu Rev Cell Biol* **9**: 541~573, 1993
- 2) 中嶋元夫: 転移に関する細胞外マトリックス分解酵素. *実験医学* **40**: 249~255, 1992
- 3) Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevenson WG: *Cancer*

- metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation: *Cell* **64**: 327~336, 1991
- 4) Kleinman HK, Cannon FB, Laurie GW, Hassell JR, Aumailley M, Terranova VP, Martin GR, DuBois-Dalcq M: Biological activities of laminin. *J Cell Biochem* **27**: 317~325, 1985
 - 5) Sweeney TM, Kibbey MC, Zain M, Fridman R, Kleinman HK: Basement membrane and the SI-KVAV laminin-derived peptide promote tumor growth and metastases. *Cancer Metastasis Rev* **10**: 245~254, 1991
 - 6) Berkowitz RS, Goldstein DP: Chorionic tumors. *N Engl J Med* **335**: 1740~1748, 1996
 - 7) Isaka K, Nishi H, Ito H, Fujitoh A, Sagawa Y, Takayama M: Telomerase Activity In Human Trophoblast. *Trophoblast Research* **13**: 377~394, 1999
 - 8) Bischof P, Martelli M, Campana A, Itoh Y, Ogata Y, Nagase H: Importance of matrix metalloproteinases in human trophoblast invasion. *Early Pregnancy* **1**: 263~269, 1995
 - 9) Kliman HJ, Feinberg RF: Human trophoblast extracellular matrix (ECM) interactions in vitro: ECM thickness modulates morphology and proteolytic activity. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 3057~3061, 1990
 - 10) Damsky CH, Fitzgerald ML, Fisher SJ: Distribution patterns of extracellular matrix components and adhesion receptors are intricately modulated during first trimester cytotrophoblast differentiation along the invasive pathway, in vivo. *J Clin Invest* **89**: 210~222, 1992
 - 11) Levy AT, Cioce V, Sobel ME, Garbisa S, Grigioni WF, Liotta LA, Stetler-Stevenson WG: Increased expression of the Mr 72,000 type IV collagenase in human colonic adenocarcinoma. *Cancer Res* **51**: 439~444, 1991
 - 12) Pyke C, Ralfkiaer E, Huhtala P, Hurskainen T, Dano K, 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
 - 13) Sato H, Seiki M: Regulatory mechanism of 92 kDa type IV collagenase gene expression which is associated with invasiveness of tumor cells. *Oncogene* **8**: 395~405, 1993
 - 14) Sato H, Takino T, Okada Y, Cao J, Shinagawa A, Yamamoto E, Seiki M: A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature* **370**: 61~65, 1994
 - 15) Yamamoto H, Itoh F, Hinoda Y, Imai K: Inverse association of cell adhesion regulator messenger RNA expression with metastasis in human colorectal cancer. *Cancer Res* **56**: 3605~3609, 1996
 - 16) Wilhelm SM, Collier IE, Marmar BL, Eisen AZ, Grant GA, Goldberg GI: 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
 - 17) Kliman HJ, Nestler JE, Sermasi E, Sanger JM, Strauss JF 3d: Purification, characterization, and in vitro differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae. *Endocrinology* **118**: 1567~1582, 1986
 - 18) Bischof P, Friedli E, Martelli M, Campana A: Expression of extracellular matrix-degrading metalloproteinases by cultured human cytotrophoblast cells: effects of cell adhesion and immunopurification. *Am J Obstet Gynecol* **165**: 1791~1801, 1991
 - 19) 根守良一, 立川 哲: In situ zymography プロテアーゼ活性の局在の検出法. *組織培養工学* **25**: 29~32, 1999
 - 20) 伊東宏絵, 井坂恵一, 白田三郎, 佐川泰一, 宮田真千子, 高山雅臣: 子宮腺筋症における子宮内膜の侵入とゼラチナーゼ (MMP-2, MMP-9) との関連性についての検討. *日産婦誌* **52**: 795~802, 2000
 - 21) Morgan M, Kniss D, McDonnell S: Expression of metalloproteinases and their inhibitors in human trophoblast continuous cell lines. *Exp Cell Res* **242**: 18~26, 1998
 - 22) Huppertz B, Kertschanska S, Demir AY, Frank HG, Kaufmann P: Immunohistochemistry of matrix metalloproteinases (MMP), their substrates, and their inhibitors (TIMP) during trophoblast invasion in the human placenta. *Cell Tissue Res* **291**: 133~148, 1998
 - 23) Ogata Y, Itoh Y, Nagase H: Steps involved in activation of the pro-matrix metalloproteinase 9 (progelatinase B)-tissue inhibitor of metalloproteinases-1 complex by 4-aminophenylmercuric acetate and proteinases. *J Biol Chem* **270**: 18506~18511, 1995
 - 24) Itoh Y, Binner S, Nagase H: Steps involved in activation of the complex of pro-matrix metalloproteinase 2 (progelatinase A) and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-2 by 4-aminophenylmercuric acetate. *Biochem J* **308**: 645~651, 1995
 - 25) Nishi H, Ohyashiki K, Fujito A, Yahata N, Ohyashiki JH, Isaka K, Takayama M: Expression of telomerase subunits and localization of telomerase activation in hydatidiform mole. *Placenta* **20**: 317~323, 1999
 - 26) Nishi H, Yahata N, Ohyashiki K, Isaka K, Shiraiishi K, Ohyashiki JH, Toyama K, Takayama M: Comparison of telomerase activity in normal chorionic villi to trophoblastic diseases. *Int J Oncol* **12**: 81~85, 1998
 - 27) 弓立 環, 井坂恵一, 小杉好紀, 興石 真, 白石賢

- 也, 保坂 真, 高山雅臣: トロフォブラストの浸潤に関するメカニズムの解析. 日産婦誌 **48**: 191~198, 1996
- 28) Graham CH, Lysiak JJ, McCrae KR, Lala PK: Localization of transforming growth factor-beta at the human fetal-maternal interface: role in trophoblast growth and differentiation. Biol Reprod **46**: 561~572, 1992
- 29) Higuchi T, Kanzaki H, Nakayama H, Fujimoto M, Hatayama H, Kojima K, Iwai M, Mori T, Fujita J: Induction of tissue inhibitor of metalloproteinase 3 gene expression during in vitro decidualization of human endometrial stromal cells. Endocrinology **136**: 4973~4981, 1995
- 30) Bischof P, Campana A: Trophoblast differentiation and invasion: its significance for human embryo implantation. Early Pregnancy **3**: 81~95, 1997
- 31) Maquoi E, Noel A, Foidart J-M: Matrix metalloproteinases in choriocarcinoma cell lines: A potential regulatory role of extracellular matrix components. Trophoblast Research **10**: 123~142, 1997

Relationship between the production of MMP-2 and MMP-9 and the invasive ability of trophoblasts

Saburo USUDA

Department of Obstetrics and Gynecology, Tokyo Medical University

Abstract

Invasion of the endometrium by normal trophoblasts is strictly regulated unlike the indiscriminate invasion by choriocarcinoma cells. In this study, we focused on the activities of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) as parameters of invasion, and compared the production of the two proteinases and the invasive ability of trophoblasts in normal first trimester and full-term human placental tissues.

Serial frozen sections were prepared from placental tissues for in situ hybridization (ISH), immunohistochemical staining and film in-situ zymography (FIZ), to identify cells producing MMP-2 and MMP-9. Various types of cytotrophoblasts (CTs), (villous CT, column CT and placental bed CT), were separated using Percoll discontinuous gradient centrifugation and magnetic cell sorting, then the localization of MMP-2 and MMP-9, and their activities and invasive ability were examined by an invasion assay.

In first-trimester placental tissue, the mRNA and protein expression of MMP-2 were observed in extravillous trophoblast (EVT), and those of MMP-9 were noted mainly in villous cytotrophoblasts (VCTs). FIZ revealed marked gelatinase activity in the EVT in which MMP-2 localization was observed. In full-term placental tissue, the mRNA and protein expression of MMP-2 were observed in the same cells as in the first trimester placenta, however, the gelatinase activity in these cells was decreased or completely lost. The mRNA and protein expression of MMP-9 were not observed in any cells. The localization of MMP-2 was the strongest in the column CT. While the gelatinase activity and invasive ability of the CT in first trimester placenta were marked, those of the CT in full-term placental tissue were decreased or completely lost.

These findings suggest that the invasive ability of the trophoblasts may be regulated by the enzyme activities of MMP-2 and MMP-9. In particular, MMP-2 may play an important role in regulating the invasive ability of the trophoblasts.

<Key words> Trophoblast, MMP-2, MMP-9, Invasion, Film in situ zymography
