

Title	マウス舌癌同所移植モデルを用いたMMP阻害剤ONO-4817の頸部リンパ節転移抑制効果
Sub Title	
Author	山下, 拓(Yamashita, Taku) 小川, 郁(Ogawa, Kaoru)
Publisher	慶應医学会
Publication year	2004
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.81, No.4 (2004. 12) ,p. T 233- T243
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	学位論文
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20041201-0233

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

学位論文

マウス舌癌同所移植モデルを用いた MMP 阻害剤
ONO-4817 の頸部リンパ節転移抑制効果

慶應義塾大学医学部耳鼻咽喉科学教室

(指導：小川 郁教授)

やま した たく
山下 拓

(平成 16 年 2 月 26 日受付)

Key Words : head and neck squamous cell carcinoma, matrix metalloproteinase inhibitor, ONO-4817, orthotopic implantation model, lymph node metastasis

口腔癌症例の約 50%に頸部リンパ節転移を認めると報告されている¹⁻³⁾ように、口腔癌を含む頭頸部扁平上皮癌は高率に頸部リンパ節転移をきたすことが知られている。また口腔、中咽頭扁平上皮癌において、頸部リンパ節転移を認めない症例の 5 年生存率が 81%であるの⁴⁾に比べ、リンパ節内転移を認める症例は 64%、リンパ節外浸潤を認める症例は 21%と頸部リンパ節転移が重要な予後因子であることも報告されている⁵⁾。さらに頭頸部扁平上皮癌の治療後頸部リンパ節再発症例の 5 年生存率が 29.2%と極めて不良であることも報告されている⁶⁾。このように頭頸部癌に対する手術的治療、放射線治療、化学療法の進歩にもかかわらず、現在でも頸部リンパ節転移の制御には難渋することも少なくない。したがって頸部リンパ節転移の分子機構の解明と治療および予防法の確立は、頭頸部扁平上皮癌の治療成績向上において重要な課題のひとつであると考えられる。

リンパ節転移の分子機構についてはまだ不明な点が多いが、癌細胞による上皮下の基底膜の破壊、結合組織への浸潤、リンパ管への侵入、リンパ管内での移動、リンパ節での増殖というプロセスは少なくとも必要である^{7, 8)}。この過程において、癌細胞は移動の障壁となっている周囲の細胞外マトリックスを分解する必要がある。なかでも基底膜の分解は最も重要であると考えられている。基底膜は IV 型コラーゲン、ラミニン、プロテオグリカンなどで構成される丈夫な網状構造を形成しており、

上皮細胞の基底膜を裏打ちするように存在する。基底膜は口腔粘膜上皮の基底膜に存在し、また毛細血管に比べると未発達であるが毛細リンパ管周囲にも存在する⁹⁾。すなわち癌細胞の局所浸潤、リンパ管内侵入の際に基底膜は一種のバリアーとして機能していると考えられ、その分解は、癌の局所浸潤やリンパ節転移において必須である。細胞外マトリックスの分解にはマトリックスメタロプロテアーゼ (matrix metalloproteinase, 以下 MMP と略す)、セリンプロテアーゼ、システインプロテアーゼなどの蛋白分解酵素が働いているが、そのうち基底膜の主要構成成分である IV 型コラーゲンを基質とする酵素には MMP 遺伝子ファミリーに属する MMP-2 と MMP-9 がある。したがって MMP-2、MMP-9 は癌の浸潤、リンパ節転移に重要な役割を担っていると考えられ、事実 MMP-2 および MMP-9 の発現や活性化率と頭頸部扁平上皮癌の頸部リンパ節転移が相関しているとの報告が散見される⁸⁻¹³⁾。また細胞膜表面で潜在型 MMP-2 を特異的に活性化する膜型マトリックスメタロプロテアーゼのひとつである membrane-type 1 matrix metalloproteinase (以下 MT1-MMP と略す)^{8, 14)} の発現も頸部リンパ節転移との関与を示す報告がある^{13, 15-18)}。このように MMP-2、MMP-9、MT1-MMP をはじめとする MMP 遺伝子ファミリーは癌の浸潤転移や予後に関与していることが知られている。またこれら MMP 遺伝子ファミリーの活性阻害が癌の浸潤転移

本論文は Yamashita T, Fujii M, Tomita T, Ishiguro R, Tashiro M, Tokumaru Y, Imanishi Y, Kanke M, Ogawa K, Kameyama K, Otani Y : The inhibitory effect of matrix metalloproteinase inhibitor ONO-4817 on lymph node metastasis in tongue carcinoma. *Anticancer Res* 23 : 2297-2302, 2003 の一部を含む。

の抑制や予後の改善に寄与することを示す多くの報告が動物実験においてなされている。MMP 阻害剤が血行性転移を抑制することについては多くの報告がある¹⁹⁻²³⁾。また胃癌の腹膜播種を抑制するとの報告もみられる^{24, 25)}。しかし、リンパ節転移の抑制に関する報告は少なく²⁶⁾、とくに頭頸部扁平上皮癌の頸部リンパ節転移抑制の報告はない。そこで本研究では、頭頸部癌の頸部リンパ節転移抑制における MMP 阻害剤の効果について動物実験で検討を行った。

リンパ行性転移の実験的研究は 1954 年 Zeidman や Buss らにより初めて報告され²⁷⁾、その後少数のリンパ行性転移モデルが開発された^{28, 29)}。頭頸部癌の頸部リンパ節転移に関しては、舌癌同所移植による頸部リンパ節転移モデル作成の報告がある³⁰⁾。また Matsui らはヒト舌癌由来の扁平上皮癌細胞株 HSC-3 の同所移植をくり返すことにより頸部リンパ節への高転移株 HSC-3-M3 を分離したことを報告している³¹⁾。そこで本研究では、頸部リンパ節への高転移能を有するヒト舌扁平上皮癌由来細胞株 HSC-3-M3 のヌードマウスへの同所移植モデルを用いて、舌癌の頸部リンパ節転移に対する MMP 阻害剤の抑制効果について検討した。MMP 阻害剤に関しては、経口投与が可能で MMP-2, MMP-9 に対し強い活性阻害作用を有する ONO-4817 を使用した³²⁾。

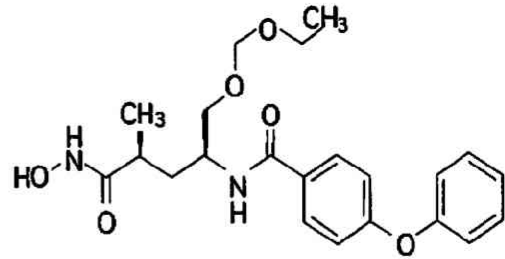
材料と方法

1. 細胞培養

本研究では、高い頸部リンパ節転移能を有する細胞株 HSC-3-M3 を用いた。HSC-3-M3 はヒト舌扁平上皮癌細胞株 HSC-3 より分離された細胞株亜型であり³¹⁾、太田隆英博士(金沢医科大学病理学教室)より供与された。HSC-3-M3 の標準培養液は抗生物質(100 IU/ml ペニシリン, 100 µg/ml ストレプトマイシン, 250 ng/ml アンホテリシン B)を含む Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) に 10% 仔牛血清を混合して作製した。細胞は 37°C, 5%CO₂ の条件下で培養した。培養液, 10% 仔牛血清, 抗生物質はいずれも Gibco BRL (Grand Island, NY, USA) より購入した。

2. MMP 阻害剤

使用した MMP 阻害剤 ONO-4817 ([2S, 4S]-N-Hydroxy-5-ethoxymethoxy-2-methyl-4-[4-phenoxybenzoyl] aminopentanamide) (第 1 図) は小野薬品工業株式会社で開発された。ONO-4817 は *in vitro* の実験では dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解したうえ種々



第 1 図 ONO-4817 の分子構造。(Yamashita T et al : Anti Cancer Res 23 : 2297-2302, 2003 の Figure 1 を許可を得て転載)

の濃度に調整し、*in vivo* の実験では 0.5% carboxymethyl cellulose sodium (CMC) に溶解し 40 mg/ml の濃度に調整して使用した。

3. MTT assay

HSC-3-M3 の増殖に対する ONO-4817 の影響を検討した。細胞増殖は tetrazolium-dye-based-assay (MTT assay) により検討した。1 ウェルあたり 2.0×10^4 個の癌細胞を 96 ウェルマイクロプレートに播種した。通常の培地(1 ウェルあたり 100 µl)にて 24 時間培養後、PBS で 2 回洗浄し、種々の濃度(0 nM, 1 nM, 10 nM, 1 µM, 100 µM)の ONO-4817 を添加した無血清培地(1 ウェルあたり 100 µl)に交換し、さらに 24 時間培養した。24 時間後に PBS で 5 mg/ml に希釈した MTT [3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide] 溶液を 1 ウェルあたり 10 µl ずつ添加した。さらに 4 時間反応させた後、溶液を吸引除去し、100 µl の溶解溶液(酸性イソプロパノール)を加えた。プレートを 30 分間攪拌し 570 nm 波長の吸光度を測定した。

4. 実験動物

4 週齢, 雄の BALB/cA ヌードマウス (CLEA Japan, Inc.) を購入し 5 週齢で実験に使用した。実験動物は慶應義塾大学実験動物センター内で飼育し、すべての実験は慶應義塾大学医学部動物実験ガイドラインに準拠し、これを遵守して施行した。

5. 組織ホモジネートの作成

マウス舌に移植した腫瘍の MMP-2 および MMP-9 の活性を測定するため、組織のホモジネートを作成した。マウスの舌腫瘍を摘出、細切し 0.15 M NaCl, 10 mM

CaCl₂, 0.02% NaN₃, 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 5 mM *N*-ethylmaleimide を含む 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) で氷冷下にホモジナネートした。次に 3000 rpm, 15 分遠心分離を行った後、上清を回収し、ゼラチンゼイモグラフィーによる分析用サンプルとして -20°C フリーザーで保存した。蛋白濃度は Bio-Rad Protein Assay Kit (Bio-Rad, Hercules, CA) にて測定し、単位蛋白量あたりの MMP-2, MMP-9 活性を比較検討した。

6. ゼラチンゼイモグラフィー

細胞株の培養上清および組織ホモジネート上清中の MMP-2, MMP-9 の活性はゼラチンゼイモグラフィーにより測定した。サンプルは 20% glycerol, 1% sodium dodecyl sulfate [SDS], 0.05% bromophenol blue tracking dye を含む電気泳動用 buffer で 37°C, 30 分間インキュベートした後、0.2% ゼラチンを含む 10% SDS-polyacrylamide gels で -4°C 下に電気泳動を行った。泳動後、ゲルを 2.5% Triton X-100 にて 30 分間室温で 2 回洗浄し、10 mM CaCl₂, 0.15 M NaCl, 50 mM Tris-HCl を含む buffer (pH 7.5) で 37°C, 17 時間インキュベートした。*In vitro* での ONO-4817 による MMP-2, MMP-9 活性阻害効果は、種々の濃度 (0, 1, 3, 10, 30 nM) の ONO-4817 を incubation buffer に加えることで検出した。その後、ゲルは 0.1% Coomassie Brilliant Blue R-250 で 30 分間染色し、5% イソプロパノール, 8% 酢酸水溶液で脱色した。ゼラチン分解を受けた部分は Coomassie Brilliant Blue R-250 で染色を受けた青色の背景の中の透明なバンドとして検出された。このバンドを反転化し NIH Image software (version 1.61) で半定量化した。MMP-9 の活性化率は (活性型のバンド濃度/非活性型のバンド濃度 + 活性型のバンド濃度) の式で算出した。

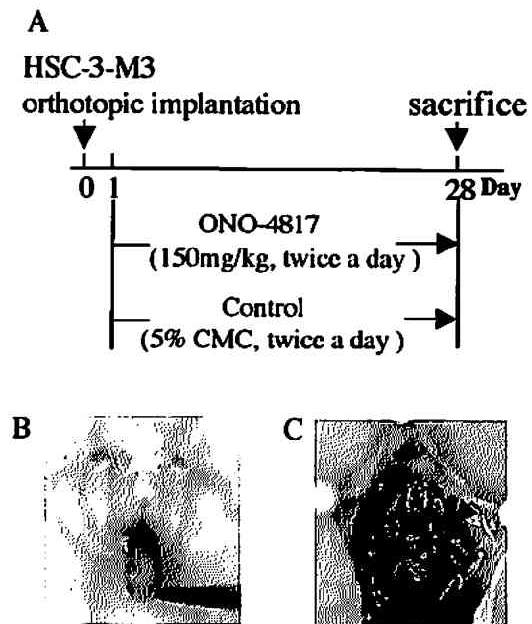
7. Film *in situ* zymography (以下 FIZ と略す)

マウスより摘出した腫瘍は、摘出後すぐに cryomold O.C.T. 4583 Compound (Miles, Inc., Elkhart, IN, USA) に入れ、ドライアイスで冷却した 2 メチルブタンで急速冷凍包埋した。冷凍ブロックは cryostat microtome (Leica model CM 1510-11) で薄切し 4 μm の連続切片を作製した。これら薄切片を 7 μm のゼラチンでコートされたフィルム (Fuji Photo Film Co., Ltd, Tokyo, Japan) にのせ、37°C で 16 時間 humidified chamber でインキュベートした。その後 Amido Black 10B (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan)

で染色し、70% メタノール, 10% 酢酸水溶液で脱色した。ゼラチン分解を受けた部分は Amido Black 10B で染色されないため、黒色の背景に対して、透明から薄い青色域として同定される。ゼラチン分解活性は光学顕微鏡で検出した。連続切片の一部は HE 染色を行いゼラチン分解を受けた部位を組織学的に同定した。

8. 舌癌同所移植モデルの作製と ONO-4817 治療実験

HSC-3-M3 細胞を 2.0 × 10⁶ cells/ml となるよう Hank's balanced salt solution (Gibco BRL, Grand Island, NY) に混和調整した。50 μl (1.0 × 10⁵ cells) を 30 ゲージ針にてヌードマウスの舌縁に同所移植した。移植後 21 日目に犠死させ舌腫瘍を摘出した。*In vitro* での、ONO-4817 による MMP-2, MMP-9 のゼラチン分解活性抑制効果の検討のため、舌腫瘍のホモジネート上清をサンプルとしてゼラチンゼイモグラフィーを行った。電気泳動後、種々の濃度 (0, 1, 3, 10, 30 nM) の ONO-4817 を含む溶液中でインキュベートした。



第2図 (A) HSC-3-M3 の同所移植によるマウス舌扁平上皮癌モデルを用いた治療実験。マウスを2つのグループ (ONO-4817 治療群, コントロール群) に分けた。治療群には HSC-3-M3 同所移植翌日 (day 1) から day 28 まで ONO-4817 を 150mg/kg を 1 日 2 回経口投与した。コントロール群には同期間 vehicle のみを投与した。(B) HSC-3-M3 同所移植後 28 日の舌腫瘍。(C) コントロール群の頸部リンパ節 (矢頭)。肉眼上、転移の有無は不明である。(Yamashita T et al: *Anti Cancer Res* 23: 2297-2302, 2003 の Figure 2 を改変, 許可を得て転載)

次に *in vivo* での ONO-4817 の効果を検出するため、 1.0×10^5 の HSC-3-M3 細胞を day 0 にヌードマウスの舌縁に同所移植した。移植 24 時間後 (day 1) に無作為にマウスを 2 つのグループ (ONO-4817 の投与を行う治療群と vehicle のみ投与するコントロール群) に分けた。治療群のマウスには day 1 から day 28 まで ONO-4817 を投与した。ONO-4817 は 0.5% carboxymethyl cellulose sodium (CMC) に 40 mg/ml の濃度になるよう混和し、投与量を 150 mg/kg として 1 日 2 回経口投与した。コントロール群では 28 日間 vehicle のみを 1 日 2 回経口投与した。すべてのマウスは day 28 の ONO-4817 あるいは vehicle の最終投与 2 時間後に犠牲させ、舌腫瘍と頸部リンパ節を摘出した。頸部リンパ節については、ルーベ下にオトガイ下、両側顎下、両側頸静脈周囲の探索を行い摘出した (第 2 図)。移植腫瘍におけるゼラチン分解活性はゼラチンゼイモグラフィーと FIZ により評価した。両群ともマウスの体重を day 1, 7, 14, 21, 28 に測定し比較を行った。摘出した頸部リンパ節は 20%ホルマリン溶液で固定した後、パラフィン包埋し、各リンパ節の全幅にわたり 100 μ m ごとに 4 μ m の切片を作成した。すべての切片は HE 染色を施した後に光学顕微鏡にて転移の有無を検索した。

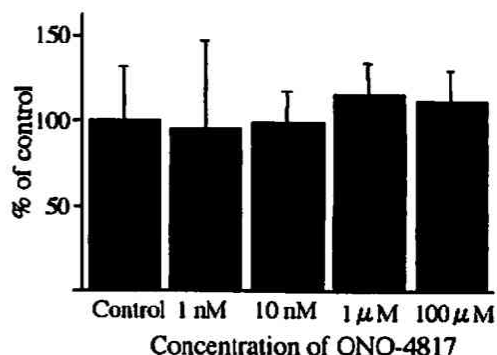
9. 統計学的検討

MTT assay の結果は Kruskal-Wallis test で評価した。2 群間での生存率、体重、頸部リンパ節転移陽性率は Wilcoxon test, Mann-Whitney's U test, Fisher's exact probability test をそれぞれ使用し検討した。いずれも危険率 $p < 0.05$ のとき統計学的に有意差ありと判定した。

結 果

1. HSC-3-M3 の細胞増殖に対する ONO-4817 の効果

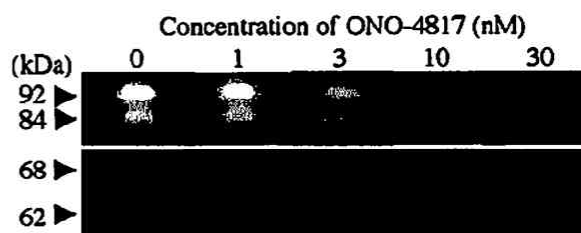
HSC-3-M3 の細胞増殖に対する ONO-4817 の効果を検討するため MTT assay を行った。その結果、*in vitro* において ONO-4817 は HSC-3-M3 に対して 100 μ M の濃度まで殺細胞効果をもたなかった ($p = 0.7536$; 第 3 図)。



第 3 図 MTT アッセイ。 *In vitro* において、ONO-4817 は 100 μ M の濃度まで HSC-3-M3 の細胞増殖に影響を及ぼさなかった。

2. *In vitro* における ONO-4817 の MMP-2, MMP-9 活性抑制効果

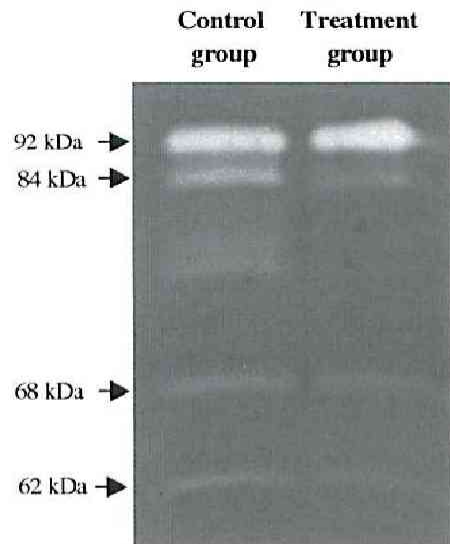
HSC-3-M3 細胞の培養上清をサンプルとしてゼラチンゼイモグラフィーを行った結果、潜在型 MMP-2 (68kDa) および潜在型 MMP-9 (92kDa) が検出された。HSC-3-M3 を移植したマウス舌腫瘍のホモジネート上清からはゼラチンゼイモグラフィーにて潜在型 MMP-2、活性型 MMP-2 (62kDa)、潜在型 MMP-9、活性型 MMP-9 (84kDa) が検出された。MMP-9 のゼラチン分解活性 (潜在型 MMP-9、活性型 MMP-9 活性の和) は *in vitro* において ONO-4817 により濃度依存性に阻害された (第 4 図)。コントロールの MMP-9 活性を 100% とすると 1 nM, 3 nM, 10 nM, 30 nM ONO-4817 添加時のそれぞれの活性は 86%, 64%, 36%, 12% であった。MMP-2 に関しても ONO-4817 添加によりゼラチン分解活性を抑制する傾向がみられたが、コントロールでの活性が低いため定量化は不可能であった。



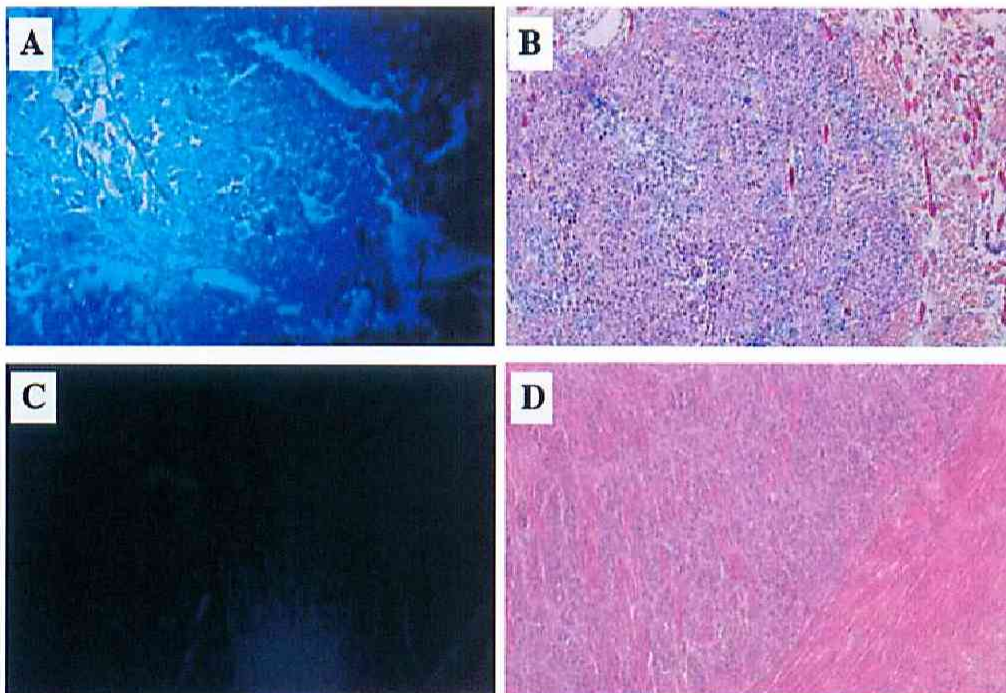
第 4 図 ONO-4817 による MMP-9 のゼラチン分解活性抑制効果 (*in vitro*)。ゼラチンゼイモグラフィーの結果、MMP-9 (92kDa; 潜在型, 84kDa; 活性型) のゼラチン分解活性は ONO-4817 の濃度依存性に抑制された。(Yamashita T et al: *Anti Cancer Res* 23: 2297-2302, 2003 の Figure 3 を許可を得て転載)

3. *In vivo* における ONO-4817 のゼラチン分解活性抑制効果

In vivo における ONO-4817 のゼラチン分解活性抑制効果はゼラチンザイモグラフィーおよび FIZ を用いて検出した。ゼラチンザイモグラフィーの結果、コントロール群と比較し、治療群の舌腫瘍組織において MMP-9 活性化率の低下が認められた。活性化率は治療群 21%、コントロール群 36%であった (第5図)。FIZ の結果、コントロール群の舌腫瘍組織に一致して強いゼラチン分解活性が認められたのに対して、治療群ではゼラチン分解活性は著しく抑制されていた (第6図)。



第5図 ONO-4817 による MMP-9 のゼラチン分解活性抑制効果 (*in vivo*)。ゼラチンザイモグラフィーの結果、コントロール群と比較し治療群において低い MMP-9 活性化率を示した。活性化率はコントロール群 0.36、治療群 0.21 であった。(Yamashita T et al : *Anti Cancer Res* 23 : 2297-2302, 2003 の Figure 4 を許可を得て転載)



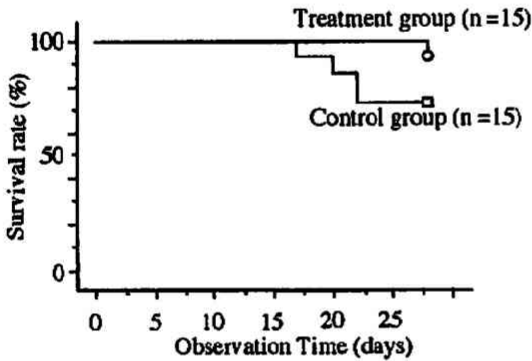
第6図 舌癌組織における ONO-4817 のゼラチン分解活性抑制効果。A (FIZ) と B (HE 染色) はコントロール群の舌癌組織の連続切片 (×40)。C (FIZ) と D (HE 染色) は治療群の舌癌組織の連続切片 (×40)。FIZ の結果、コントロール群 (A) と比較し治療群 (C) の舌癌組織ではゼラチン分解活性が抑制されている。コントロール群においては癌病巣に一致して強いゼラチン分解活性を認めるが、治療群においては非常に弱い。(Yamashita T et al : *Anti Cancer Res* 23 : 2297-2302, 2003 の Figure 5 を改変, 許可を得て転載)

4. 頸部リンパ節転移および体重変化に対する ONO-4817 の効果

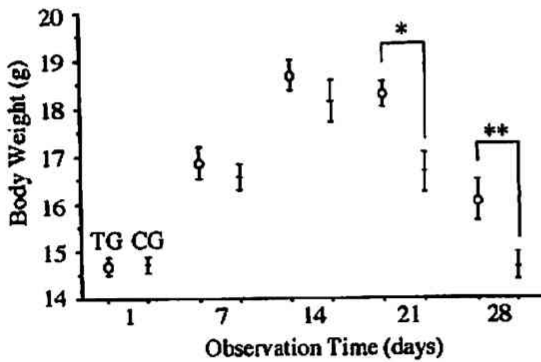
同所移植によるマウス舌への腫瘍形成は治療群, コントロール群ともにすべて成功した. 治療群の 15 匹中 14 匹 (93.3%), コントロール群の 15 匹中 12 匹 (80.0%) が同所移植後 28 日間生存した. 治療群のマウスのうち 1 匹は移植後 day 28 に, コントロール群のマウスの内 3 匹は day 17, 20, 22 にそれぞれ死亡した. 今回の検討では両群間の生存率に統計学的有意差は認められなかった (第 7 図; $p=0.1167$). 同所移植後 21 日と 28 日でのマウスの体重の比較では, コントロール群と比較し治

療群において, 有意に体重減少が抑制されていた (第 8 図). 第 21 日の平均体重±標準偏差は治療群 18.3 ± 1.1 g, コントロール群 16.7 ± 1.5 g ($p=0.0022$) であり, 第 28 日はそれぞれ 16.1 ± 1.6 g, 14.7 ± 1.0 g ($p=0.0288$) であった.

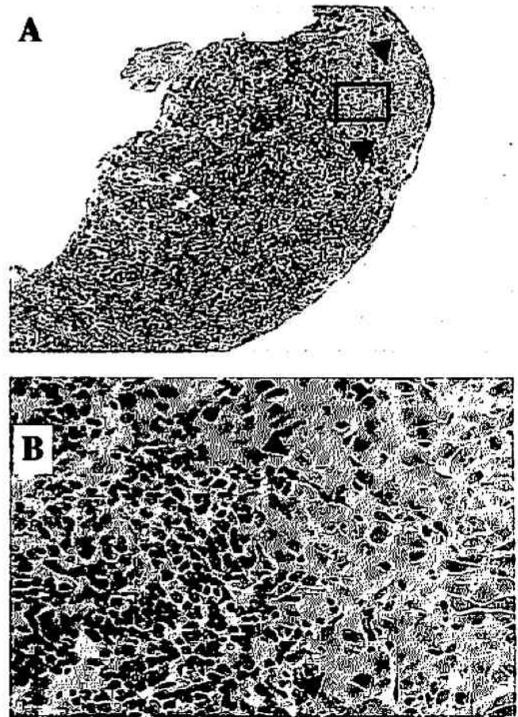
第 28 日またはマウスの死亡した日に舌腫瘍および頸部リンパ節を摘出した. いずれのマウスも肺や肝臓を含む舌以外の臓器に異常所見は認めなかった. 舌への視診上の潰瘍形成は治療群において 33.3% (15 匹中 5 匹), コントロール群において 66.7% (15 匹中 10 匹) にみられた. しかし舌腫瘍の大きさに関しては 2 群間で有意な相違を認めなかった. 頸部リンパ節は最低で 2 個, 最大で 5 個, 平均 2.6 個 (治療群 2.3 個, コントロール群 2.9 個) 摘出された. 頸部リンパ節転移はすべて顕微鏡的転移であり (第 9 図), 治療群の 13.3% (15 匹中 2 匹), コントロール群の 60.0% (15 匹中 9 匹) に認められた. この頸部リンパ節転移に対する ONO-4817 の効果は 2 群間で統計学的有意差を示した ($p=0.0209$; 第 1 表).



第 7 図 カプランマイヤー法による生存曲線. 2 群間での生存率には統計学的有意差は認めなかった ($p=0.1167$).



第 8 図 コントロール群 (CG) と治療群 (TG) でのマウスの体重変化. Day 21 および day 28 において, 治療群はコントロール群に比べ統計学的有意に体重が重かった. 平均体重±標準偏差は day 21 において治療群 18.3 ± 1.1 g, コントロール群 16.7 ± 1.5 g, day 28 においてそれぞれ 16.1 ± 1.6 g, 14.7 ± 1.0 g であった. * $p=0.0022$, ** $p=0.0288$; Mann-Whitney's *U*-test. (Yamashita T et al: Anti Cancer Res 23 : 2297-2302, 2003 の Figure 6 を改変, 許可を得て転載)



第 9 図 同所移植モデルでの頸部リンパ節転移. (A) リンパ節辺縁洞に顕微鏡的転移巣を認める (矢頭) ($\times 40$). (B) (A) の四角で囲まれた部分の拡大像, 転移巣を認める (矢頭) ($\times 100$).

第1表 ONO-4817 の頸部リンパ節転移抑制効果.

	Treatment group	Control group	p value*
Incidence of lymph node metastasis ^b	2/15 (13.3%)	9/15 (60.0%)	p=0.0209

*Fisher's exact probability test により検定

^b頸部リンパ節転移を認めたマウス数 / HSC-3-M3 を同所移植したマウス数

1 匹のマウスあたり 2 個から 5 個の頸部リンパ節を摘出し顕微鏡的リンパ節転移の有無を検索した.

(Yamashita T et al : Anti Cancer Res 23 : 2297-2302, 2003 の Table 1 を改変, 許可を得て転載)

考 察

今回使用した MMP 阻害剤 ONO-4817 は, 動物実験モデルで肝細胞癌の同所移植モデルにおける肝内転移や腎細胞癌の静脈内注射による血行性転移モデルにおける肺転移を抑制するとの報告がある^{33, 34)}. しかし, リンパ行性転移抑制に関する報告はない. そこで本研究では, MMP 阻害剤 ONO-4817 を用いて, 舌扁平上皮癌の頸部リンパ節転移に対する効果を検討すべく動物実験をおこなった. ONO-4817 の MMP-1 に対する IC₅₀値, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9 に対する Ki 値はそれぞれ 1600±265 nM, 0.73±0.407 nM, 42±5.51 nM, 2500±115 nM, 2.1±0.702 nM であり, ONO-4817 は MMP-2, MMP-9 に対して強い活性抑制効果を持つが MMP-1, MMP-3, MMP-7 に対してはその活性をほとんど抑制しない薬剤であることが報告されている³²⁾. MMP 阻害剤の高頻度かつ重大な副作用でヒドロキサン酸型 MMP 阻害剤の臨床試験における容量制限毒性でもある関節痛, 筋肉痛は MMP-1 の阻害が関与していると考えられている^{34, 35)}. MMP-1 に対する活性阻害作用をほとんど有さない ONO-4817 はこの副作用を減少させる可能性があり, 臨床試験における投与量の増加が期待できる薬剤であると考えられる.

HSC-3-M3 細胞はヌードマウスへの舌扁平上皮癌同所移植モデルにおいて, 頸部リンパ節への高転移能を有する細胞株である³¹⁾. 本研究では舌扁平上皮癌の頸部リンパ節転移に対する予防効果を検討するため, 頸部リンパ節へ高転移能を有する HSC-3-M3 細胞を使用した.

HSC-3-M3 の細胞増殖に対する ONO-4817 の効果を MTT アッセイにより検討した. MTT アッセイの結果, ONO-4817 は 100 μM の濃度まで, HSC-3-M3 に対し *in vitro* における直接的な細胞毒性を有しないことが示された. この結果は, ONO-4817 と同型の他のヒドロキサン酸型 MMP 阻害剤における MTT アッセイの結果と一致する^{21, 22, 36)}.

In vivo でのゼラチンザイモグラフィーの結果, HSC-3-M3 移植により形成された舌癌組織において, ONO-4817 の投与は MMP-2, MMP-9 の発現量にはほとんど影響を及ぼさないが, 潜在型 MMP-9 の活性化を抑制していることが判明した. 潜在型 MMP-9 の活性化因子として MMP-3³⁷⁾ や MMP-7³⁸⁾ が知られている. *In vivo* における MMP-9 活性化抑制の機序は今回の検討からは不明であるが, MMP-3 や MMP-7 の *in vivo* における発現量に間接的に関与している可能性がある.

MMP-2, MMP-9 活性の調節は, 遺伝子発現, 潜在型酵素の産生, 細胞外への分泌, 細胞外での活性化, 活性型酵素の内在性インヒビターによる阻害などのステップで極めて緻密になされている³⁹⁾. 従来より, ノーザンブロッティング, ゼラチンザイモグラフィー, 免疫染色などの結果として, MMP-2 や MMP-9 の mRNA や蛋白の発現が頭頸部扁平上皮癌のリンパ節転移や予後と相関するとの報告がなされているが, これらは MMP 活性調節の一部のステップとの相関であり, 総合的な MMP-2, MMP-9 の活性すなわち癌組織での細胞外マトリックス分解能との相関を見ることはできない. これに対し FIZ は MMP 活性調節の全ステップの結果としての, 組織局所における蛋白分解活性を直接観察できる利点がある. 本研究でも FIZ を行い, ONO-4817 の局所癌組織におけるゼラチン分解能抑制効果の有無を検討した. その結果, HSC-3-M3 のヌードマウスへの舌癌同所移植モデルにおいて, ONO-4817 は舌癌組織でのゼラチン分解能を強く抑制していることが判明した. ゼラチンザイモグラフィーの結果から考えると, 局所癌組織での ONO-4817 によるゼラチン分解能の抑制は MMP-2, MMP-9 の直接的な活性抑制と *in vivo* における MMP-9 活性化の抑制の少なくとも 2 つの機序が関与していると考えられる.

本研究から, ニューマウスへの舌癌同所移植モデルにおいて舌扁平上皮癌の頸部リンパ節転移は ONO-4817 により抑制されることが判明した. これは, 頭頸部扁平

上皮癌の頸部リンパ節転移が MMP 阻害剤投与により効果的に抑制されることを示した最初の研究である。リンパ節転移抑制の機序として、細胞外マトリックスの分解抑制による局所癌組織での癌細胞の浸潤やリンパ管への侵入の阻害が考えられる。またリンパ節転移が原発巣での微小脈管密度に相関するとの報告が大腸癌⁴⁰⁾、上咽頭癌⁴¹⁾においてなされている。さらに ONO-4817 が腎細胞癌において原発巣での脈管密度を濃度依存性に抑制するとの報告もある³⁴⁾。したがって本研究でのリンパ節転移抑制効果においても、原発巣における細胞外マトリックス分解抑制効果のほか、微小脈管密度抑制効果も機序として働いている可能性がある。

卵巣癌⁴²⁾や神経膠腫⁴³⁾の同所移植モデルで MMP 阻害剤の単独投与がマウスの生存期間を延長させるとの報告がある。本研究においてはコントロール群と ONO-4817 治療群での生存率に統計学的有意差を認めなかった。しかし観察数と観察期間が十分とはいえず、頭頸部扁平上皮癌の生存率に対する MMP 阻害剤の効果については本研究からは不明である。また同所移植後 21 日と 28 日において ONO-4817 投与により体重減少が抑制されることが示された。すべての頸部リンパ節転移が顕微鏡的転移であり、他臓器に異常所見を認めなかったことから、全身状態に影響する治療群とコントロール群間の相違点は原発巣の状態のみである。すなわち、ONO-4817 による体重減少抑制効果は、本薬剤の原発巣に対する効果によると考えられる。原発巣の腫瘍の大きさには有意な相違は認められなかったが、原発巣での潰瘍形成は治療群よりコントロール群に多く認められた。これは原発巣での ONO-4817 による MMP-2、MMP-9 活性抑制に伴う基底膜分解の抑制をはじめとした細胞外マトリックス分解抑制効果によると考えられる。潰瘍形成に伴う摂食時痛が、コントロール群の食事摂取量を減少させ、体重減少を促進させたとも考えられる。MMP 阻害剤の原発巣に対する効果については、大腸癌⁴⁴⁾、乳癌⁴⁵⁾、悪性黒色腫⁴⁶⁾、肺癌⁴⁷⁾において、その原発巣の発育と浸潤を抑制すると報告されている。ONO-4817 も原発巣に対する同様の効果をもつと考えられる。

本研究において、頸部リンパ節転移は HSC-3-M3 同所移植翌日からの ONO-4817 の投与で抑制され、またマウスの体重減少は day 21 および day 28 において抑制された。この結果は MMP 阻害剤が早期舌扁平上皮癌の頸部リンパ節転移抑制に効果が期待できるとともに、根治的治療が困難な進行期においても QOL の向上に寄与する有効な治療手段になりうることを示唆する。1984 年に最初の MMP 阻害剤の人への投与が行われ⁴⁸⁾、

1990 年代には各種進行癌に対する MMP 阻害剤の効果が臨床試験において検討された。切除不能胃癌症例での第 3 相試験において、MMP 阻害剤の生存率改善への寄与を認めたとの報告がある⁴⁹⁾が、肺癌、卵巣癌、肺小細胞癌、乳癌などに対するほとんどの第 3 相試験では MMP 阻害剤の生存率への寄与を認めていない^{50, 51)}。これらの結果から、癌に対する MMP 阻害剤の適応を疑問視する意見もある。しかし 1) 癌浸潤、転移の原因となる MMP に対しより特異的な阻害を行う、2) 関節痛、筋肉痛をはじめとする副作用なく長期間投与できる MMP 阻害剤を選択する、3) 早期の癌に対する MMP 阻害剤の効果を検討する、4) 現在まで MMP 阻害剤の臨床試験が行われていない癌(頭頸部、膀胱、腎など)に対する効果を検討する、などのような視点での臨床試験の再検討が可能であるとする意見もある⁵¹⁾。今後の新たな臨床試験のモデル作成のため、癌における MMP の役割、MMP 阻害剤の効果に関する知見の蓄積が必要と考えられるが、本薬剤、本モデルは 2)、3)、4) の点であらたな臨床試験のための基礎データとしての意義があると考えられる。

総 括

1. MTT アッセイの結果、MMP 阻害剤 ONO-4817 はヒト舌扁平上皮癌細胞株 HSC-3-M3 に対して 100 μ M の濃度まで殺細胞効果を示さなかった⁵²⁾。
2. HSC-3-M3 を移植したヌードマウス舌癌のホジネート上滑をゼラチンザイモグラフィーに供した結果、潜在型 MMP-2、活性型 MMP-2、潜在型 MMP-9、活性型 MMP-9 が検出された。また *in vitro* において MMP-9 のゼラチン分解活性は ONO-4817 により濃度依存性に阻害された⁵²⁾。
3. *In vivo* における ONO-4817 のゼラチン分解活性抑制効果をゼラチンザイモグラフィーおよび FIZ を用いて検出した。ゼラチンザイモグラフィーの結果、コントロール群に比較し ONO-4817 治療群の舌腫瘍において MMP-9 活性化率の低下が認められた。FIZ の結果、コントロール群に比較し ONO-4817 治療群の舌癌組織において、ゼラチン分解活性の著しい抑制が認められた。強いゼラチン分解活性がコントロール群の腫瘍巣に一致して認められたのに対して、治療群ではその活性は著しく抑制された⁵²⁾。
4. 舌扁平上皮癌のヌードマウス同所移植モデルを用いて MMP 阻害剤 ONO-4817 投与の効果を検討した。コントロール群と比較し治療群において統計学的有意にマ

ウスの体重減少が抑制された。またコントロール群と比較し治療群において統計学的有意に頸部リンパ節転移が抑制された⁵²⁾。

以上より、舌扁平上皮癌の頸部リンパ節転移が MMP 阻害剤 ONO-4817 により抑制されることが示された。その機序の一部と考えられる *in vitro*, *in vivo* での細胞外マトリックス分解抑制効果が確認された。この結果は、MMP 阻害剤が舌扁平上皮癌の付加的治療手段の 1 つになりうることを示唆するものである。

稿を終えるにあたり、御指導を賜りました慶応義塾大学医学部耳鼻咽喉科学教室小川郁教授に深甚なる謝意を表します。また本研究に対して直接御指導いただきました藤井正人助教授（現国立病院東京医療センター臨床研究センター部長）に深謝いたします。また御指導、御助言をいただきました外科学教室大谷吉秀講師、病理学教室亀山香織講師に厚く感謝いたします。また細胞を御供与いただきました金沢医科大学病理学教室の太田隆英博士、ONO-4817 を御供与いただきました小野薬品工業株式会社に感謝いたします。さらに本研究に御協力いただきました耳鼻咽喉科学教室諸兄に心より御礼申し上げます。

本研究の要旨は第 26 回日本頭頸部腫瘍学会（2002 東京）において発表した。

なお本研究の一部は文部科学省科学研究費奨励研究 A（平成 13 年度 No. 13770987）により行われた。

文 献

- 1) Woolgar JA, Rogers S, West CR, Errington RD, Brown JS, Vaughan ED : Survival and patterns of recurrence in 200 oral cancer patients treated by radical surgery and neck dissection. *Oral Oncol* 35 : 257-265, 1999
- 2) Li XM, Wei WI, Guo XF, YuenPW, Lam LK : Cervical lymph node metastatic patterns of squamous carcinomas in the upper aerodigestive tract. *J Laryngol Otol* 110 : 937-941, 1996
- 3) Snow GB, van den Brekel MW, Leemans CR, Patel P : Surgical management of cervical lymph nodes in patients with oral and oropharyngeal cancer. *Recent Results Cancer Res* 134 : 43-55, 1994
- 4) Grandi C, Mingardo M, Guzzo M, Licitra L, Podrecca S, Molinari R : Salvage surgery of cervical recurrences after neck dissection or radiotherapy. *Head Neck* 15 : 292-295, 1993
- 5) Fujihara T, Sawada T, Hirakawa K, Chung YS, Yashiro M, Inoue T, Sowa M : Establishment of lymph node metastatic model for human gastric can-

- cer in nude mice and analysis of factors associated with metastasis. *Clin Exp Metastasis* 16 : 389-398, 1998
- 6) Carr I : Lymphatic metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 2 : 307-317, 1983
- 7) 鉤スミ子, 小谷容子, 藤川和生, 西 厚生, 宮越一穂, 豊田徳雄, 大嶋雅美, 神原 忠 : リンパ管の構造とリンパ流. *脈管学*, 19 : 151-157, 1979
- 8) Shimada T, Nakamura H, Yamashita K, Kawata R, Murakami Y, Fujimoto N, Sato H, Seiki M, Okada Y : Enhanced production and activation of progelatinase A mediated by membrane-type 1 matrix metalloproteinase in human oral squamous cell carcinomas : implications for lymph node metastasis. *Clin Exp Metastasis* 18 : 179-188, 2000
- 9) Hong SD, Hong SP, Lee JI, Lim CY : Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 in oral squamous cell carcinomas with regard to the metastatic potential. *Oral Oncol* 36 : 207-213, 2000
- 10) O-Charoenrat P, Rhys-Evans PH, Eccles SA : Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors correlates with invasion and metastasis in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 127 : 813-820, 2001
- 11) Horikawa T, Yoshizaki T, Sheen TS, Lee SY, Furukawa M : Association of latent membrane protein 1 and matrix metalloproteinase 9 with metastasis in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer* 89 : 715-723, 2000
- 12) Tokumaru Y, Fujii M, Otani Y, Kameyama K, Imanishi Y, Igarashi N, Kanzaki J : Activation of matrix metalloproteinase-2 in head and neck squamous cell carcinoma : studies of clinical samples and *in vitro* cell lines co-cultured with fibroblasts. *Cancer Lett* 150 : 15-21, 2000
- 13) Imanishi Y, Fujii M, Tokumaru Y, Tomita T, Kanke M, Kanzaki J, Kameyama K, Otani Y, Sato H : Clinical significance of expression of membrane type 1 matrix metalloproteinase and matrix metalloproteinase-2 in human head and neck squamous cell carcinoma. *Hum Pathol* 31 : 895-904, 2000
- 14) Emonard HP, Remacle AG, Noel AC, Grimaud JA, Stetler-Stevenson WG, Foidart JM : Tumor cell surface-associated binding site for the M(r) 72,000 type IV collagenase. *Cancer Res* 52 : 5845-5848, 1993
- 15) 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
- 16) Sato H, Takino T, Kinoshita T, Imai K, Okada Y, Stetler-Stevenson WG, Seiki M : Cell surface binding and activation of gelatinase A induced by expression of membrane-type-1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP). *FEBS Lett* 385 : 238-240, 1996
- 17) Du B, Wang P, Guo X, Du B : Expression of membrane type 1-matrix metalloproteinase in laryngeal

- carcinoma. *Pathol Oncol Res* 52 : 214-217, 1999
- 18) 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
 - 19) Oba K, Konno H, Tanaka T, Baba M, Kamiya K, Ohta M, Kaneko T, Shouji T, Igarashi A, Nakamura S : Prevention of liver metastasis of human colon cancer by selective matrix metalloproteinase inhibitor MMI-166. *Cancer Lett* 175 : 45-51, 2002
 - 20) Maekawa R, Maki H, Wada T, Yoshida H, Nishida-Nishimoto K, Okamoto H, Matsumoto Y, Tsuzuki H, Yoshioka T : Anti-metastatic efficacy and safety of MMI-166, a selective matrix metalloproteinase inhibitor. *Clin Exp Metastasis* 18 : 61-66, 2000
 - 21) Jimenez RE, Hartwig W, Antoniu BA, Compton CC, Warshaw AL, Fernandez-Del CC : Effect of matrix metalloproteinase inhibition on pancreatic cancer invasion and metastasis : an additive strategy for cancer control. *Ann Surg* 231 : 644-654, 2000
 - 22) Bu W, Tang ZY, Sun FX, Ye SL, Liu KD, Xue Q, Chen J, Gao DM : Effects of matrix metalloproteinase inhibitor BB-94 on liver cancer growth and metastasis in a patient-like orthotopic model LCI-D20. *Hepato-gastroenterology* 45 : 1056-1061, 1998
 - 23) Sledge GW Jr, Qulali M, Goulet R, Bone EA, Fife RJ : Effect of matrix metalloproteinase inhibitor batimastat on breast cancer regrowth and metastasis in athymic mice. *J Natl Cancer Inst* 87 : 1546-1550, 1995
 - 24) Otani Y, Kubota T, Sakurai Y, Igarashi N, Yokoyama T, Kimata M, Wada N, Kameyama K, Kumai K, Okada Y, Kitajima M : Expression of matrix metalloproteinases in gastric carcinoma and possibility of clinical application of matrix metalloproteinase inhibitor *in vivo*. *Ann N Y Acad Sci* 30 : 541-543, 1999
 - 25) Igarashi N, Kubota T, Otani Y, Matsuzaki SW, Watanabe M, Teramoto T, Kumai K, Tamaki K, Tanzawa K, Kobayashi T, Kitajima M : Preventive effect of matrix metalloproteinase inhibitor, R-94138, in combination with mitomycin C or cisplatin on peritoneal dissemination of human gastric cancer cell line TMK-1 in nude mice. *Jpn J Cancer Res* 90 : 116-121, 1999
 - 26) Matsuoka T, Yashiro M, Sawada T, Ishikawa T, Ohira M, Hirakawa-YS Chung K : Inhibition of invasion and lymph node metastasis of gastrointestinal cancer cells by R-94138, a matrix metalloproteinase inhibitor. *Anticancer Res* 20 : 4331-4338, 2000
 - 27) Zeidman I, Buss JM : Experimental studies on the spread of cancer in the lymphatic system. I. Effectiveness of the lymph node as a barrier to the passage of embolic tumor cells. *Cancer Res* 14 : 403-405, 1954
 - 28) Van de velde CJH, Carr I : Lymphatic invasion and metastasis. *Experientia* 33 : 837-884, 1977
 - 29) Carr I, Carr J : Experimental models of lymphatic metastasis. *Tumor Invasion and Metastasis*. (Ed) Liotta LA, Hart IR, Martinus Nijhoff, The Hague, p. 189-205, 1980
 - 30) Kawashiri S, Kumagai S, Kojima K, Harada H, Yamamoto E : Development of a new invasion and metastasis model of human oral squamous cell carcinomas. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 31 : 216-221, 1995
 - 31) Matsui T, Ota T, Ueda Y, Tanino M, Odashima S : Isolation of a highly metastatic cell line to lymph node in human oral squamous cell carcinoma by orthotopic implantation in nude mice. *Oral Oncol* 34 : 253-256, 1998
 - 32) Yamada A, Uegaki A, Nakamura T, Ogawa K : ONO-4817, an orally active matrix metalloproteinase inhibitor, prevents lipopolysaccharide-induced proteoglycan release from the joint cartilage in guinea pigs. *Inflamm Res* 49 : 144-146, 2000
 - 33) Sawada S, Murakami K, Yamaura T, Mitani N, Tsukada K, Saiki I : Therapeutic and analysis model of intrahepatic metastasis reflects clinical behavior of hepatocellular carcinoma. *Jpn J Cancer Res* 93 : 190-197, 2002
 - 34) Muraishi Y, Mitani N, Fuse H, Saiki I : Effect of a matrix metalloproteinase inhibitor (ONO-4817) on lung metastasis of murine renal cell carcinoma. *Anti-cancer Res* 21 : 3845-3852, 2001
 - 35) Chirivi RG, Garofalo A, Crimmin MJ, Bawden LJ, Stoppacciaro A, Brown PD, Giavazzi R : Inhibition of the metastatic spread and growth of B16-BL6 murine melanoma by a synthetic matrix metalloproteinase inhibitor. *Int J Cancer* 58 : 460-464, 1994
 - 36) Noha M, Yoshida D, Watanabe K, Teramoto A : Suppression of cell invasion on human malignant glioma cell lines by a novel matrix-metalloproteinase inhibitor SI-27 : *in vitro* study. *J Neurooncol* 48 : 217-223, 2000
 - 37) Ogata Y, Enghild JJ, Nagase H : Matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) activates the precursor for the human matrix metalloproteinase 9. *J Biol Chem* 267 : 3581-3584, 1992
 - 38) Imai K, Yokohama Y, Nakanishi I, Ohuchi E, Fujii Y, Nakai N, Okada Y : Matrix metalloproteinase 7 (matrilysin) from human rectal carcinoma cells. Activation of the precursor, interaction with other matrix metalloproteinases and enzymic properties. *J Biol Chem*. 270 : 6691-6697, 1995
 - 39) 大谷吉秀, 木全 大, 五十嵐直喜, 久保田哲朗, 北島政樹, 藤井正人, 亀山香織, 岡田保典 : 消化器癌転移抑制における MMP 活性阻害の意義 臨床応用への展望. *Biotherapy* 13 : 679-685, 1999
 - 40) Oh-e H, Tanaka S, Kitadai Y, Shimamoto F, Yoshihara M, Haruma K : Angiogenesis at the site of deepest penetration predicts lymph node metastasis of submucosal colorectal cancer. *Dis Colon Rectum*

- 44 : 1129-1136, 2001
- 41) Wakisaka N, Wen OH, Yoshizaki T, Nishimura T, Furukawa M, Kawahara E, Nakanishi I : Association of vascular endothelial growth factor expression with angiogenesis and lymph node metastasis in nasopharyngeal carcinoma. *Laryngoscope* 109 : 810-814, 1999
- 42) Davies B, Brown PD, East N, Crimmin MJ, Balkwill FR : A synthetic matrix metalloproteinase inhibitor decreases tumor burden and prolongs survival of mice bearing human ovarian carcinoma xenografts. *Cancer Res* 53 : 2087-2091, 1993
- 43) Price A, Shi Q, Morris D, Wilcox ME, Brasher PM, Rewcastle NB, Shalinsky D, Zou H, Appelt K, Johnston RN, Yong VW, Edwards D, Forsyth P : Marked inhibition of tumor growth in a malignant glioma tumor model by a novel synthetic matrix metalloproteinase inhibitor AG3340. *Clin Cancer Res* 5 : 845-854, 1999
- 44) Wang X, Fu X, Brown PD, Crimmin MJ, Hoffman RM : Matrix metalloproteinase inhibitor BB-94 (batimastat) inhibits human colon tumor growth and spread in a patient-like orthotopic model in nude mice. *Cancer Res* 54 : 4726-4728, 1994
- 45) Low JA, Johnson MD, Bone EA, Dickson RB : The matrix metalloproteinase inhibitor batimastat (BB-94) retards human breast cancer solid tumor growth but not ascites formation in nude mice. *Clin Cancer Res* 2 : 1207-1214, 1996
- 46) Conway JG, Trexler SJ, Wakefield JA, Marron BE, Emerson DL, Bickett DM, Deaton DN, Garrison D, Elder M, McElroy A, Willmott N, Dockerty AJ, McGeehan GM : Effect of matrix metalloproteinase inhibitors on tumor growth and spontaneous metastasis. *Clin Exp Metastasis* 14 : 115-124, 1996
- 47) Anderson IC, Shipp MA, Docherty AJP, Teicher BA : Combination therapy including a gelatinase inhibitor and cytotoxic agent reduces local invasion and metastasis of murine Lewis lung carcinoma. *Cancer Res* 56 : 715-718, 1996
- 48) McCullagh K, Wadsworth H, Hann M : Carboxyalkyl peptide derivatives. European Patent Application EU126 : 1-111, 1984
- 49) Bramhall SR, Hallissey MT, Whiting J, Scholefield J, Tierney G, Stuart RC, Hawkins RE, McCulloch P, Maughan T, Brown PD, Baillet M, Fielding JW : Marimastat as maintenance therapy for patients with advanced gastric cancer : a randomised trial. *Br J Cancer* 86 : 1864-1870, 2002
- 50) Bramhall SR, Schulz J, Nemunaitis J, Brown PD, Baillet M, Buckels JA : A double-blind placebo-controlled, randomised study comparing gemcitabine and marimastat with gemcitabine and placebo as first line therapy in patients with advanced pancreatic cancer. *Br J Cancer* 87 : 161-167, 2002
- 51) Pavlaki M, Zucker S : Matrix metalloproteinase inhibitors (MMPi) : the beginning of phase I or the termination of phase III clinical trials. *Cancer Metastasis Rev* 22 : 177-203, 2003
- 52) Yamashita T, Fujii M, Tomita T, Ishiguro R, Tashiro M, Tokumaru Y, Imanishi Y, Kanke M, Ogawa K, Kameyama K, Otani Y : The inhibitory effect of matrix metalloproteinase inhibitor ONO-4817 on lymph node metastasis in tongue carcinoma. *Anticancer Res* 23 : 2297-2302, 2003