口腔領域に発生した軟部肉腫の臨床病理学的検討

新谷 悟・浜川裕之・住田知樹

中原裕二・李 春男・鎌田道子

A clinicopathological study of oral soft tissue sarcomas

Satoru SHINTANI・Hiroyuki HAMAKAWA・Tomoki SUMIDA

Yuji NAKAHARA・Shunnan LI・Michiko KAMATA

Abstract: Because soft tissue sarcoma rarely arises in the oral cavity, there are few reports on this lesion in the head and neck region. Eight cases of soft tissue sarcoma treated at our department during the past two decades were studied clinicopathologically. Some small lesions were clinically given a diagnosis of benign tumor at presentation, followed by excisional biopsy. It was difficult to achieve an exact pathologic diagnosis from the biopsy specimens. The definitive diagnosis based on the resected material differed from the original diagnosis in some cases. Six of the eight cases were subjected to immunostaining to analyze their cytologic characteristics. Alteration of the p53 tumor suppressor gene was detected in 4 cases, and loss of p16 was noted in 5 cases. The average proliferation cell nuclear antigen labeling index of the soft tissue sarcomas was 31.3%, higher than the value for oral squamous cell carcinoma. All soft tissue sarcomas expressed metalloprotease (MMP) -2 and MMP-9 and showed low intratumoral microvessel density. These results suggest that soft tissue sarcomas have high proliferation potential and aggressive growth without angiogenesis.

Key words: oral (口腔), soft tissue sarcoma (軟部肉腫), cell proliferation (細胞増殖), angiogenesis (血管新生)

緒 言

軟部肉腫は、線維性組織、脂肪組織、筋肉、滑膜、血管、神経などの種々の非上皮性組織を発生母地とする悪性腫瘍であり、きわめて多彩な臨床像ならびに組織学的所見を呈することから、診断は必ずしも容易ではない。頭頸部悪性腫瘍における軟部肉腫の割合は約1%以下であり、口腔内の発生頻度はさらに少ない^{1, 2)}。本腫瘍は急速に発育増殖し、おもに血行性に肺、肝、骨髄などに、またリンパ行性に頸部リンパ節に早期に転移を示し、予後は悪い^{1, 2)}。

今回、われわれは過去20年間に当科で加療した軟部肉腫8例に対し、臨床診断、病理組織学診断、腫瘍の細胞増殖能と細胞増殖に関連する癌抑制遺伝子の異常、そして浸潤、転移に関連する因子としてマトリックスメタロプロテアー

ゼ(MMP)のMMP-2, MMP-9と腫瘍内血管について検討した。

対象ならびに方法

対象

対象は1980年から1999年の過去20年間に愛媛大学医学部歯科口腔外科にて加療した軟部肉腫8例である。

臨床病理学的検討

対象症例の、性別、年齢、発生部位、臨床経過などの臨床的因子と生検時および最終組織診断について検討した。

免疫組織化学的検討

病理組織学的検索のために、10%中性緩衝ホルマリン溶液にて固定後、パラフィン包埋された生検材料ならびに切除腫瘍組織を検討に用いた。通法に従い4 μ mのパラフィン薄切切片を作製し、ENVISIONシステム(Dako社製)により免疫組織化学染色を行った。すなわち、通常通り脱パラフィン後、内因性ペルオキシダーゼ阻止を行い、一次抗体をおのおのの希釈倍率にて、4℃で16時間反応させた

愛媛大学医学部歯科口腔外科学講座

(主任: 浜川裕之教授)

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Ehime University School of Medicine (Chief: Prof. Hiroyuki Hamakawa)

受付日: 平成13年7月4日

表1 一次抗体と前処理

抗 体	希釈倍率	前処理	入 手 先
PCNA (PC-10, IgG 2 a)	1 : 300		Dako patts (Denmark)
p53 (DO-7)	1 : 50	MW	Dako patts (Denmark)
pRb (Ab-5)	1 : 300	MW	Oncogene Research (MA, USA)
p16 (F-12)	1 : 50	MW	Santa Cruz Biotechnology (CA, USA)
MMP-2	1 : 50	MW	Sigma (MO, USA)
MMP-9	1 : 50	MW	Sigma (MO, USA)
CD31 (JC/70A)	1 : 50	Trypsin	Dako patts (Denmark)

MW; Microwave 20min.

Trypsin: 0.1% trypsin treatment 37°C, 1 hr.

表2 臨床所見と臨床診断

	性別	年齢	発生部位	大きさ	硬さ	境界	視診型	疼痛	臨床診断
1	女	21	左側上顎歯肉	10×25mm	弾性硬	明 瞭	膨隆型	な し	上 顎 腫 瘍
2	男	55	左 側 上 顎 洞	40×55mm	—	—	—	自発痛	上 顎 腫 瘍
3	男	40	左側下顎歯肉	42×55mm	弾性硬	不明瞭	膨隆型	圧 痛	非上皮性腫瘍
4	女	64	右側顎下部	50×70mm	弾性硬	不明瞭	膨隆型	自発痛	甲状腺癌再発
5	男	45	右側下顎歯肉	16×25mm	弾性軟	不明瞭	腫瘤型	自発痛	下顎歯肉腫瘍
6	男	76	左側下顎歯肉	40×57mm	弾性硬	明 瞭	腫瘤型	な し	左側下顎癌
7	女	31	右 側 頬 部	24×24mm	弾性硬	明 瞭	膨隆型	な し	頬 部 腫 瘍
8	男	68	右側上顎歯肉	25×35mm	弾性硬	明 瞭	腫瘤型	圧 痛	右側上顎癌

(表1). 次に Envision ポリマー試薬を室温で30分間反応後, DAB (3-3'-diaminobenzadine・4 HCl) にて発色させ, メチルグリーンにて対比染色後, 脱水, 透徹, 封入し検鏡した. 前処理として Target Retrieval Solution (Dako 社) 中でマイクロウェーブ処理 (マイクロウェーブオーブン: シャープ社製出力500W) 20分間ならびに0.1%トリプシン溶液中で37°C, 1時間処理した.

陽性細胞率は, 以前の報告と同様に, 強拡大顕微鏡写真下で無作為に少なくとも3か所, 1000個以上の腫瘍細胞を抽出し, 陽性細胞数の割合として算定した^{3, 4)}. p53, pRb, p16の評価についても, 以前の報告に準じ, 陽性細胞率5%以上のものを陽性とした^{5, 6)}. MMP-2, MMP-9に関しては, Banassi らの方法に準じて健常組織との比較により行い, 腫瘍内血管密度 intratumor microvessel density (ITMVD) は, 200倍検鏡下, 一視野内での CD31陽性血管数を算定した^{3, 4)}.

結 果

臨床所見ならびに臨床経過

1980年から1999年の過去20年間に愛媛大学医学部歯科口腔外科にて加療した顎口腔領域悪性腫瘍は258例であり, 軟部肉腫8例はその3.1%であった. 症例の性別は男性5

例, 女性3例, 年齢は21歳から68歳で平均50.0歳であった. 発生部位では下顎歯肉3例, 上顎歯肉2例, 上顎洞, 頬部, 顎下部が1例であった. 最終組織学的診断としては, 悪性線維性組織球腫2例, 横紋筋肉腫2例, 平滑筋肉腫, 悪性神経鞘腫, 未分化肉腫, 腎外性悪性 Rhabdoid 腫瘍が, おおの1例であった. 各症例の臨床所見では, 大きさは10×25 mm 程度のものから50×70mm のものまでみられ, ほとんどの症例で弾性硬の腫瘤として認められた. 境界は明瞭が4例, 不明瞭が3例であり, 肉眼的視診型でも膨隆型4例, 腫瘤型3例であった.

初診時の臨床診断はおおむね悪性腫瘍であったが, 腫瘍径の小さい症例 (症例1ならびに7) では, 良性腫瘍と考え, 切除生検を試みていた. 症例5も16×25mm と腫瘍径は大きくなかったが, オトガイ孔部に激痛を訴え同部の骨破壊像を認めたことから, 臨床的に悪性を疑った (表2).

臨床経過ならびに予後では, 手術を行った6例中3例に局所再発を認め, 8例中6例で遠隔転移を認めた. また, 予後も2例を除き不良であった (表3).

生検時と最終病理組織学的診断

生検時と最終病理組織学的診断では, 生検時におおむね非上皮性悪性腫瘍の診断が得られていた. 近年では, 免疫組織染色の日常化によって生検時の組織標本でケラチン,

表3 軟部肉腫の臨床経過ならびに予後

組織学的診断	治療	臨床経過			予後
		局所再発	転	移	
1 横紋筋肉腫	S+R+C	3 M	骨盤内 (6 Y 10 M)		死 (7 Y)
2 悪性線維性組織球腫	S+R+C	10 M	肩甲骨 (1 Y 2 M)		死 (2 Y 7 M)
3 横紋筋肉腫	S+R+C	なし	多発性骨 (10 M)		死 (1 Y 3 M)
4 腎外性悪性 Rhabdoid 腫瘍	R+C	NE	肺		死 (5 M)
5 悪性神経鞘腫	S+R+C	5 M	多発骨 (6 M)		死 (10 M)
6 平滑筋肉腫	R+C	NE	肺		死 (3 M)
7 悪性線維性組織球腫	S+C	なし	なし		生 (3 Y 2 M)
8 未分化肉腫	S	なし	なし		生 (2 Y)

S ; 手術, R ; 放射線治療, C ; 化学療法

NE ; 評価不能

表4 生検時の診断と最終診断

初診時臨床診断		生検時病理診断	最終診断
1	上顎腫瘍	悪性非上皮性腫瘍	横紋筋肉腫
2	上顎腫瘍	線維性組織球腫	悪性線維性組織球腫
3	非上皮性腫瘍	平滑筋肉腫・線維肉腫	横紋筋肉腫
4	転移性甲状腺癌	腎外性悪性 Rhabdoid 腫瘍	腎外性悪性 Rhabdoid 腫瘍
5	非上皮性腫瘍	悪性神経鞘腫	悪性神経鞘腫
6	上顎癌	平滑筋腫・紡錘細胞癌	平滑筋肉腫
7	頬部腫瘍	類上皮系肉腫	悪性線維性組織球腫
8	上顎癌	横紋筋肉腫	未分化肉腫

表5 腫瘍増殖能と癌抑制遺伝子産物の発現

組織学的診断	p53	pRb	p16	PCNA L.I.*
1 横紋筋肉腫	NE	NE	NE	NE
2 悪性線維性組織球腫	—	+	—	32.0%
3 横紋筋肉腫	+	+	—	25.3%
4 腎外性悪性 Rhabdoid 腫瘍	NE	NE	NE	NE
5 悪性シュワン鞘腫	+	+	—	38.8%
6 平滑筋肉腫	+	+	+	34.1%
7 悪性線維性組織球腫	—	+	—	25.5%
8 未分化肉腫	+	+	—	32.2%

NE ; 評価不能

ビメンチン, アクチン, ミオグロブリン, EMA, S-100などを検索しているが, 各組織型の診断までは確定し得ていない症例が多かった (表4)。

細胞増殖能ならびに癌抑制遺伝子産物

対象症例の8例中6例で十分な免疫組織化学的検索が可能であった。Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)ならびに癌抑制遺伝子産物の p53, pRb, p16の免疫染色では, いずれも核に陽性所見を認めた (写真1)。

PCNA L.I.は25.3%から38.8%, 平均31.3%であった。p53の異常は6例中4例 (66.7%) に, pRbは全例に陽性を示し, p16蛋白の欠失は6例中5例 (83.3%) に認められた (表5)。

MMPの発現と腫瘍内血管

MMP-2およびMMP-9の免疫染色では, 腫瘍の細胞質にびまん性にその発現を認め, すべての検索症例で陽性所見を示した。腫瘍内血管についてはCD31により免疫染色

写真1 病理組織像 (抗 p53, 抗 pRb, 抗 p16ならびに抗 PCNA 抗体による免疫染色 ×200)

症例6における癌抑制遺伝子産物の p53, pRb, p16ならびに proliferating cell nuclear antigen (PCNA) の染色 (×200). いずれも核に陽性所見を示す.

したが、扁平上皮癌とは異なり、腫瘍間質がほとんどなく、血管も腫瘍周囲において健常組織部分にすでに存在していたであろう比較的太い毛細血管を腫瘍が囲むという形では観察されなかった。また、腫瘍が血管を破壊するような像も認められた。腫瘍内血管密度に関しては、2.3から11.6 / area と非常に低値であった (写真2, 表6)。

考 察

臨床所見ならびに臨床経過

頭頸部に発生する軟部肉腫は全体の20%以下といわれている¹⁾。頭頸部悪性腫瘍のなかでの軟部肉腫の占める割合は1%以下であるとされ¹⁾、Gorsky ら²⁾も、頭頸部腫瘍の1.4%、口腔領域では0.14%の発生頻度であったと報告している。われわれの施設の発生頻度は3.1%と、過去の報告

に比して高かった。本腫瘍はその発生母地が非上皮性であることから、多様な部位に多様な病態を呈する。一般的に肉腫の初発症状としては無痛性の腫脹として現れることが多いとされている¹⁾。今回の検討においても、8例中5例は無痛性で弾性硬の腫瘤として認められた。自発痛を認めた3例では、オトガイ神経に発生した神経鞘腫の1例以外の2例でいずれも腫瘍径が大きかったことから、腫瘍の大きさと自発痛との関連が示唆された。腫瘍径の大きいものや、骨破壊像などの周囲組織への浸潤が明らかなものでは、臨床的にも悪性腫瘍を疑っていたが、腫瘍径の小さく境界の明瞭な症例 (症例1ならびに7) では、臨床的に良性腫瘍と考え、切除生検を試みていた。これらの症例では、臨床所見から悪性と診断することは困難であると考えられた。症例5は16×25mmと腫瘍径は大きくなかったが、オトガイ孔部に激痛を訴え同部の骨破壊像を認めたことから、臨

写真2 病理組織像（抗 MMP-2, 抗 MMP-9 ならびに抗 CD31 抗体による免疫染色 ×200）

症例6における MMP-2, MMP-9 ならびに CD31 による腫瘍血管の評価. MMP-2, MMP-9 は発現を認めたが, 腫瘍内に血管はほとんど認められなかった.

表6 マトリックスメタロプロテアーゼ2, -9の発現と腫瘍内血管密度

	組織学的診断	MMP-2	MMP-9	ITMVD*
1	横紋筋肉腫	NE	NE	NE
2	悪性線維性組織球腫	+	+	7.3
3	横紋筋肉腫	+	+	11.6
4	腎外性悪性 Rhabdoid 腫瘍	NE	NE	NE
5	悪性神経鞘腫	+	+	4.3
6	平滑筋肉腫	+	+	2.3
7	悪性線維性組織球腫	+	+	2.3
8	未分化肉腫	+	+	5.6

NE; 評価不能

ITMVD; Intratumoral microvessel density

床的に悪性を疑った. このような慎重な診断が大切であることを改めて認識した. 臨床経過では, 局所再発, 遠隔転移が認められ, 予後は悪かった.

生検時と最終病理組織学的診断

軟部肉腫は, 組織形態的な特徴すなわち分化傾向で分類される. 本腫瘍は, 非上皮性組織を母地として発生し, 多様な組織像を示す. おおの軟部肉腫がどの分化傾向をもつかは腫瘍全体をみて判断されるため生検材料で確定診断を与えることは非常に困難である. 今回の検索でも, 生検時に非上皮性悪性腫瘍の診断はされていたが, 組織型では, 多くの症例で最終診断と異なっていた. 症例2は, 生検時線維性組織球腫と診断され, 姑息的に腫瘍摘出術を施行後, 肩甲骨に転移を認めた症例であるが, 病理組織学的には最後まで Weiss の診断基準⁷⁾には合致しなかった. この症例の詳細はすでに報告しているが⁸⁾, 線維性組織球腫に関しては1994年改訂された WHO 分類⁹⁾でも良性, 悪性に加え中間の Intermediate を分類するなど議論の多いところであり, それを生検材料などの限られた材料で診断することは困難であると思われた.

細胞増殖能ならびに癌抑制遺伝子産物

PCNA L.I.は25.3%から38.8%であり平均31.3%であった. 口腔扁平上皮癌における PCNA L.I.は16%ないしは約20%であり^{3, 5)}, 軟部肉腫の高い増殖活性が示唆された.

p53遺伝子は染色体17p に存在し, 野生型 p53遺伝子産物は53kDa の核リン酸化蛋白である¹⁰⁾. 野生型 p53遺伝子産物は, 腫瘍の細胞増殖やアポトーシスを制御している¹¹⁾. p53の異常は, 口腔癌を含む種々の癌の約50%に生じているが^{12, 13)}, 検索において, 軟部肉腫での異常は66.7%に認められ, ほぼ同様かやや高い頻度で異常が生じていることが示された. Ayan らは, 横紋筋肉腫の症例において p53の異常が臨床病理学的所見や遠隔転移, 予後不良と関連することを報告しており興味深い¹⁴⁾.

Rb 蛋白は転写因子 E2F などと結合し, 活性型の Rb 蛋白として機能し, 細胞周期を G1 期に停止させるように働く. Rb 蛋白が cyclin D/CDK 4 (6) によりリン酸化され過リン酸化型 Rb 蛋白に変換されると, 不活性型 Rb 蛋白になり, 細胞周期は G1 期から S 期に進む. この cyclin D/CDK 4 (6) を阻害し, 細胞周期の進行を制御する因子として p15, p16 などの CDK 阻害因子がある^{15, 16)}. Rb 遺伝子の不活化は蛋白の欠失として現れ, 種々の固形癌でその報告をみる¹⁷⁾. 口腔扁平上皮癌でも56.4%に欠失を認めたとの報告がなされているが¹⁸⁾, 今回の検索での軟部肉腫ではその欠失は認めず, Rb 遺伝子の異常は示されなかった. しかし, 一方で Rb 経路で増殖抑制に働く p16の欠失は

1例を除いて全例に認められた. この結果は, 口腔扁平上皮癌で P16の異常を67.9%に認めたとの過去の報告とほぼ同様であり, これらの癌抑制遺伝子の異常が軟部肉腫においても高頻度に生じていることが示唆された. しかしながら, これらの癌抑制遺伝子と細胞増殖能との関連は明らかにできなかった.

MMP の発現と腫瘍内血管

軟部肉腫は急速な増大と局所への浸潤や血行性転移が特徴的な腫瘍である^{1, 2)}. 口腔癌を含む種々の癌の浸潤・転移において基底膜の破壊や周囲組織への浸潤, 転移に IV 型コラーゲンの分解酵素コラーゲナーゼ A/B である MMP-2 と MMP-9 が重要な役割を果たす^{19, 20)}. 今回の検索では, いずれの症例においても, この MMP-2 および MMP-9 の発現を認めた. Benassi ら²¹⁾は軟部肉腫における MMP の検討で, おおの腫瘍で, その発現量に差があること, 免疫組織学的な検索による発現の違いが転移と有意に関連することを報告している. 今回の検索で各腫瘍における発現量の差や浸潤転移との関連は明らかにできなかったが, MMP-2, MMP-9 が軟部肉腫においても浸潤, 転移に関与していることが示唆された.

血管新生は, 口腔癌を含む種々の固形癌で腫瘍の増大あるいは浸潤, 転移に密接に関連していることが報告されている^{3, 4, 22)}. 固形腫瘍ではある一定以上の大きさから急速に増大する場合, 酸素と栄養の供給のために腫瘍血管新生が必要であることが知られている. しかし, 今回検討した軟部肉腫では, 血管密度も 2.3-7.6/area と非常に少なく, 新生血管と思われるような微小血管の増生は認められなかった. また, 一方で腫瘍周囲の血管が, 腫瘍の浸潤により腫瘍内で破壊されているような所見が認められた. このことは, 軟部肉腫の血管新生を伴わない急速な局所浸潤性を示唆するものであったが, 血管への腫瘍細胞の浸潤などは明らかではなく, 血行性転移に関しての有意な知見は得られなかった.

ま と め

過去20年間に当科において加療した軟部肉腫8例(悪性線維性組織球腫2例, 横紋筋肉腫2例, 平滑筋肉腫, 悪性神経鞘腫, 未分化肉腫, 腎外性悪性 Rhabdoid 腫瘍おのおの1例)を検討した. 臨床診断では, 腫瘍径の比較的小さい症例で良性腫瘍と考え, 切除生検を試みたものがあり, これらの診断は困難と思われた. 病理診断では生検にておおむね非上皮性悪性腫瘍の診断は得られていた. 検索可能であった6例中 p53の異常は4例に, p16の欠失は5例に認められた. 高悪性で, 遠隔転移が多いという軟部肉腫の特徴

を、免疫組織学的に検討した。PCNA L.I.は扁平上皮癌よりも明らかに高値を示し、高い増殖活性が確認された。MMP-2, MMP-9はすべての症例において発現を認めた。腫瘍内血管密度は扁平上皮癌に比し、明らかに低値であり、血管新生を伴わない急速な局所浸潤性がうかがわれたが、血行性転移に関しての有意義な知見は得られなかった。

引用文献

- 1) Weber, R.S., Benjamin, R.S., et al.: Soft tissue sarcomas of the head and neck in adolescents and adults. *Am J Surg* 92: 386-392 1986.
- 2) Gorsky, M. and Epstein, J.B.: Head and neck and intra-oral soft tissue sarcomas. *Oral Oncol* 34: 292-296 1998.
- 3) Alcalde, R.E., Shintani, S., et al.: Cell proliferation and tumor angiogenesis in oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 15: 1417-1422 1995.
- 4) 新谷 悟, Alcalde, R.E., 他: ヒト口腔扁平上皮癌における微小血管に関する免疫組織化学的検討. *日口外誌* 40: 645-650 1994.
- 5) Shintani, S., Mihara, M., et al.: Apoptosis and p53 are associated with effect of preoperative radiation in oral squamous cell carcinomas. *Cancer Letters* 154: 71-77 2000.
- 6) Shintani, S., Mihara, M., et al.: Infrequent alternations of RB pathway (Rb-p16INK4A-cyclin D1) in adenoid cystic carcinoma of salivary glands. *Anticancer Res* 20: 2169-2176 2000.
- 7) Enzinger, F.M., Weiss, S.W., et al.: Soft tissue tumors. 3rd Ed, Mosby Co, St Louis, 1995, p539-577.
- 8) 二宮 香, 橋本 温, 他: 上顎洞に発現した悪性線維性組織球腫の1例. *日口外誌* 36: 575-579 1990.
- 9) Weiss, S.W.: Histological typing of soft tissue tumors. International histological classification of tumors. World Health Organization. 2nd Ed, Springer-Verlag, Berlin, 1994, p28-30.
- 10) Linger, D.J. and Levine, A.J.: Characterization of a 54K dalton cellular SV40-tumor antigen present in SV-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 17: 43-52 1979.
- 11) Yonish-Rouach, E., Grunwald, D., et al.: p53-mediated cell death: relationship to cell control. *Mol Cell Biol* 13: 1415-1423 1993.
- 12) Greenblatt, M.S., Bennet, W.P., et al.: Mutation in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 54: 4855-4878 1994.
- 13) Shintani, S., Yoshihama, Y., et al.: Overexpression of p53 is an early in the tumorigenesis of oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 15: 305-308 1995.
- 14) Ayan, I., Dogan, O., et al.: Immunohistochemical detection of p53 protein in rhabdomyosarcoma: association with clinicopathological features and outcome. *J Ped Hemato Oncol* 19: 48-53 1997.
- 15) Lukas, J.D., Agaars, L., et al.: Retinoblastoma-protein dependent cell cycle inhibition by the tumor suppressor p16. *Nature* 375: 530-536 1995.
- 16) Serrano, M., Hannon, G.J., et al.: A new regulatory motif in cell cycle control causing specific inhibition of cyclin/CDK4. *Nature* 366: 704-707 1993.
- 17) Boynton, R.F., Huang, Y., et al.: Frequent loss of heterozygosity at the retinoblastoma locus in human esophageal cancers. *Cancer Res* 51: 5766-5769 1991.
- 18) Nakahara, Y., Shintani, S., et al.: Alterations of Rb, P16 INK4A and Cyclin D1 in the tumorigenesis of oral squamous cell carcinomas. *Cancer Letters* 160: 3-8 2000.
- 19) Kurahara, S., Shinohara, M., et al.: Expression of MMPs, MT-MMP, and TIMPs in squamous cell carcinoma of the oral cavity: correlations with tumor invasion and metastasis. *Head Neck* 21: 627-638 1999.
- 20) Davies, B., Waxman, J., et al.: Levels of matrix metalloproteinases in bladder cancer correlate with tumor grade and invasion. *Cancer Res* 53: 5365-5369 1993.
- 21) Benassi, M.S., Gamberi, G., et al.: Metalloproteinase expression and prognosis in soft tissue sarcomas. *Ann Oncol* 12: 75-80 2001.
- 22) Folkman, J.: Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1: 31-37 1995.