

Functional significance of transgelin-2 in uterine cervical squamous cell carcinoma.

子宮頸部扁平上皮癌における Transgelin-2 の機能解析

矢壁 和之

山口大学大学院医学系研究科

情報解析医学専攻 生殖・発達医科学領域 産科婦人科学分野

平成 27 年 12 月

目次

要旨	3
研究の背景	4
目的	4
方法	4
結果	7
考察	11
結語	12
謝辞	12
参考文献	13

【要旨】

目的 ; プロテオーム解析の結果、子宮頸部扁平上皮癌(子宮頸癌)は正常組織に比べ、transgelin-2 (TAGLN2) の発現が高いことが明らかとなった。本研究では、in vitro および in vivo で子宮頸部扁平上皮癌における TAGLN2 の機能解析を行い、また、ヒトの子宮頸癌組織の免疫組織染色により TAGLN2 の臨床的な意義を検討した。

方法 ; TAGLN2 のアンチセンス cDNA(AS クローン)と空ベクター(コントロールクローン)をヒト子宮頸癌細胞株 SKG IIIa に遺伝子導入して、in vitro で TAGLN2 の悪性度を解析した。In vivo では、 1×10^7 個の AS クローンとコントロールクローンを、メスの BALB/c ヌードマウスの皮下に移植した。また、FIGO 進行期分類の IA 期と IB 期の子宮頸部扁平上皮癌患者の組織(n=75)を抗 TAGLN2 抗体で免疫組織染色し、weak パターンと strong パターンの 2 群に分類し、その発現パターンと予後の関係を解析した。

結果 ; TAGLN2 の発現抑制は細胞遊走能、マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)分泌能を抑制した。In vivo 実験において、マウスに皮下移植したコントロール細胞により形成された腫瘍は増大し続けたが、AS の腫瘍は明らかに腫瘍増大が止まっていた。移植後 6 週間で、AS クローンの腫瘍体積はコントロールクローンに比べて有意に抑制されていた。免疫組織染色では、Kaplan-Meier 法により strong パターンは weak パターンに比べ、全生存率に低下傾向を認めた。

結論 ; 子宮頸部扁平上皮癌において、TAGLN2 は腫瘍の進展に促進的な役割を持つことが明らかとなった。TAGLN2 の発現抑制は子宮頸癌の新たな治療戦略となる可能性が示された。

【研究の背景と目的】

子宮頸癌は、世界的にみると、女性において2番目に多い癌である[1]。残念なことに、進行癌患者や、化学療法、放射線治療後に再発する患者もいる。そのため、子宮頸部扁平上皮癌に対する新たな治療戦略が早急に必要である。しかし、その悪性度に関する分子メカニズムはまだ十分に解明されていない。

我々は、近年、プロテオーム解析により、子宮頸癌で発現が明らかに増加する蛋白として、3つの蛋白を同定したが、本研究では、その内の一つとして transgelin-2 (TAGLN2) に注目した[2]。TAGLN2 は、細胞の変化や形態において働くアクチン結合蛋白であるため、細胞骨格の構築に関与することが考えられている [3]。しかしながら、TAGLN2 の機能的な働きについては、まだ解明されていない。TAGLN2 は、直腸癌、結腸癌、頭頸部扁平上皮癌、肺腺癌、膀胱癌など様々な悪性腫瘍において、その発現が増加していることが報告されており、悪性腫瘍に対し促進的に働いていることが示唆されている[4-9]。その一方で、肺癌、乳癌、直腸癌では、TAGLN2 の発現が低下しているという報告もある[10, 11]。子宮頸癌において、TAGLN2 がどのような働きを持っているかは未だわかっておらず、本研究では、子宮頸癌における TAGLN2 の機能的役割を調べることを目的とした。

【材料と方法】

細胞培養

ヒト子宮頸癌細胞株である SKG IIIa (慶応大学の野沢先生より提供) を用いた。本研究では、TAGLN2 の発現を抑制することによって機能解析を行うため、他の子宮頸癌細胞株 (SKG II, BOKU, SiHa, ME-180) よりも TAGLN2 の発現が高かった SKG IIIa が選択された。細胞は 5%血清 Ham's F12 で 37 度、5%CO₂ インキュベーターで培養された。

遺伝子導入

TAGLN2 の機能解析をするため、TAGLN2 の発現を抑制した発現安定株のクローンを作成した。TAGLN2 の発現を抑制するため、TAGLN2 のアンチセンス cDNA(AS クローン) と空ベクター(コントロールクローン)をヒト子宮頸癌細胞株 SKG IIIa に遺伝子導入して、TAGLN2 の発現を抑制した [12]。この研究では、哺乳類のベクターとして pCEP4(Invitrogen, Carlsbad, USA)を使用し、アンチセンス cDNA は pCEP4 に組み込み作成した。TAGLN2 の発現が抑制されていることは Western blot 法で確認した。尚、遺伝子導入に用いられた試薬が、細胞移動性や TAGLN2 の発現に影響しないことを予備実験で確認している。

Western blot 法

TAGLN2 の発現レベルは western blot 法により解析した[12]。総蛋白量 70 μ g の蛋白を SDS-PAGE により分離し、セミドライ式ブロッティングで膜(ATTO, Tokyo, Japan)に転写した。膜は 5%スキムミルク、0.1%Tween-20 を溶かした Tris-buffered saline(TBS)でブロッキングを行った。ブロッキング溶液を洗った後に、抗 TAGLN2 抗体(Protein Tech, Chicago, USA)でインキュベートし、その後、2 次抗体でインキュベートした。最後に、ECL-Western blotting detection system(Amersham, Aylesburg, UK)をプロトコールに従って使用し、hyperfilm-ECL(Amersham)に暴露した。

Scratch assay

細胞遊走能力を評価するために scratch assay を用いた[13]。24 well 培養プレートに 1 well 当たり 8×10^5 個の細胞を入れた。細胞を引っ掻く前は、増殖能の影響を最小にするために血清を含まない培養液で 3 組ずつ 10 時間、細胞培養した。黄色ピペットチップで細胞層に引っ掻き傷を付け、その後、血清を含まない培養液で 3 回洗浄した。血清を含まない培養液で 24 時間の培養を行った後、顕微鏡で細胞が移動した距離を計測した。引っ掻いた 0 時間と 24 時間後の同じ部分の写真を撮影した。細胞遊走能は、同じ視野で引っ掻き傷の幅を計測することで定量化し、4 か所の幅の平均を計算した。3 回、同じ実験を行った。

MTT assay

細胞増殖能は MTT assay で計測した[14]。96 well プレートに 1well 当たり 5×10^3 個の細胞を入れ、5%血清 Ham's F12 100 μ l で培養した。培養 24 時間後、120 時間後のプレートにそれぞれ 0.5 mg/ml MTT を添加後、2 時間インキュベートし、上澄みを捨てた後、紫色のホルマザン色素を添加し、100 μ l DMSO で溶解し、540 nm で吸光度を測定した(BioTek Instruments, Bad Friedrichshall, Germany)。

ゼラチンザイモグラフィ

マトリックスメタロプロテアーゼ(MMPs)の分泌能を分析するために、まず、細胞を 6 well プレートに 1 well 当たり 1×10^6 個の細胞を入れ、細胞増殖能を最小限に抑えるために血清を含まない培養液を用い、37 度 5%CO₂ で 72 時間培養した。MMPs はゼラチンザイモグラフィで検出した[15]。その上澄み液 20 μ l と Red loading buffer (New England Biolabs, Tokyo, Japan) を混ぜ、0.9 mg/ml ゼラチンの検出ゲルを用い、電気泳動した。MMP 活性を戻すために、ゲルを 2.5% w/v aqueous Triton X-100 で 1 時間洗浄することで SDS を洗い流し、50 mM Tris-HCL, 200 mM NaCl, 5mM CaCl₂ を含む activation buffer で、pH 7.5、37 度で 120 時間インキュベートした。MPPs の活性は、CBB R-250 で染色したゲル上に透明なバンドとして検出した。

In vivo 実験

In vivo 実験は山口大学の動物実験倫理委員会により承認されている。1×10⁷個の AS クローンとコントロールクローンを、生後 5 週のマスの BALB/c ノードマウスの皮下に移植した。腫瘍の大きさは皮下注射後 6 週間まで、毎週計測され、腫瘍の大きさは $V = 0.52 \times a^2 \times b$ (a = 腫瘍の最も短い直径、 b = 腫瘍の最も長い直径) で計算した[16]。尚、マウスから摘出した腫瘍を TAGLN2 のモノクローナル抗体で免疫組織染色し、アンチセンスの遺伝子導入によって AGLN2 の発現が抑制されていることを確認した。

患者検体の免疫組織染色

本研究は山口大学医学部附属病院の倫理委員会にて承認を受けた。山口大学医学部附属病院、済生会下関総合病院、徳山中央病院において手術を受けた FIGO 進行期分類の IA 期と IB 期の子宮頸部扁平上皮癌患者 75 人を対象とした。リンパ節転移を 14 人に認め、そのリンパ節も手術の際に採取した。これらの検体の組織学的診断は婦人科病理医により行われた。手術の前に放射線療法、化学療法を受けた患者はいなかった。すべての検体は手術により採取された。

免疫組織染色について、ストレプトアビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合体技術を用いた。標本は 10% buffer ホルマリンで固定され、パラフィンに埋め込まれた。パラフィンブロックは 3 μ m の厚さに切り分けられ、免疫組織染色された。キシレンとエタノールで脱パラフィンを行った。PBS で洗浄し、内因性ペルオキシダーゼをブロックするために 0.5% 過酸化水素のエタノールに室温 50 分で静置し、PBS で 3 回洗浄し、非特異的バンドをブロックするため 10% ヤギ血清でインキュベートした。抗 TAGLN2 抗体を加え、4 度で一晩インキュベートした。PBS で洗った後、HISTFINE SAB-PO キット(Nichirei, Tokyo, Japan) のビオチン結合抗ウサギ抗体 IgG+IgA+IgM を 30 分、室温でインキュベートし、ストレプトアビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合体を添加しインキュベートした。この検体は、diaminobenzidine tetrahydrochloride chromogen mixture (Sigma, Saint Louis, USA) とヘマトキシリンによって染色した。

統計解析

グループ間の有意差は Turkey-Kramer 検定で解析し、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。TAGLN2 positive/negative と臨床組織学的所見はカイ 2 乗検定により解析した。無増悪生存期間(PFS)は初診日から再発した日まで、もしくは最後にフォローした日までの時間、全生存期間(OS)は初診日から死亡した日まで、もしくは最後にフォローした日までの時間と定義した。PFS と OS は Kaplan-Meier 法で解析し、PFS と OS 曲線は log-rank 検定により作成した。Cox 比例ハザード分析は独立予後因子を解析するために用いた。 $p < 0.05$ を有意差ありとした。データは IBM SPSS 統計で統計学的に分析した。

【結果】

TAGLN2 を発現抑制した発現安定株の作成

子宮頸癌細胞における TAGLN2 の役割を調べるため、SKG IIIa に TAGLN2 のアンチセンス cDNA(AS クローン)と空ベクター(コントロールクローン)をヒト子宮頸癌細胞株 SKG IIIa に遺伝子導入した。今回、2つの独立した AS クローン(TAGLN2-AS1、TAGLN2-AS2)とコントロールクローン(control)を使用した。Western blot 法で TAGLN2 発現が抑制されていることを確認した(図 1)。

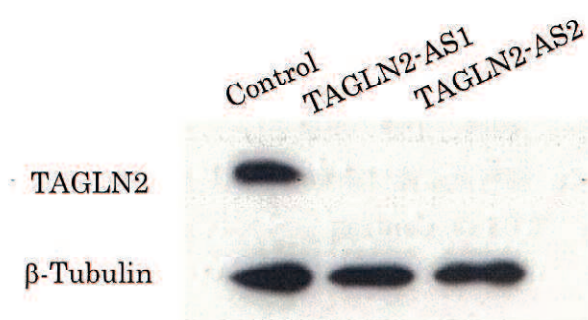


図 1. TAGLN2 の発現安定株

SKG IIIa に TAGLN2 のアンチセンス cDNA と、コントロールとして空ベクターを遺伝子導入した。TAGLN2 の発現抑制した 2 つの細胞株を作成した(TAGLN2-AS1、TAGLN2-AS2)。TAGLN2 の発現レベルを Western blot 法で確認し、インターナルコントロールは β -Tubulin を使用した。

TAGLN2 の発現抑制が細胞遊走能、細胞増殖能、MMPs 分泌能に与える影響

細胞遊走能は、TAGLN2-AS1、AS2 は Control に比べ、有意に抑制された(図 2)。細胞増殖能について、TAGLN2-AS1、AS2 と Control に有意差は見られなかった(data not shown)。MMPs 分泌能はザイモグラフィで分析され、図 3 のように TAGLN2-AS1、AS2 は Control に比べ、pro MMP-9 と pro MMP-2 の分泌が低下していた。

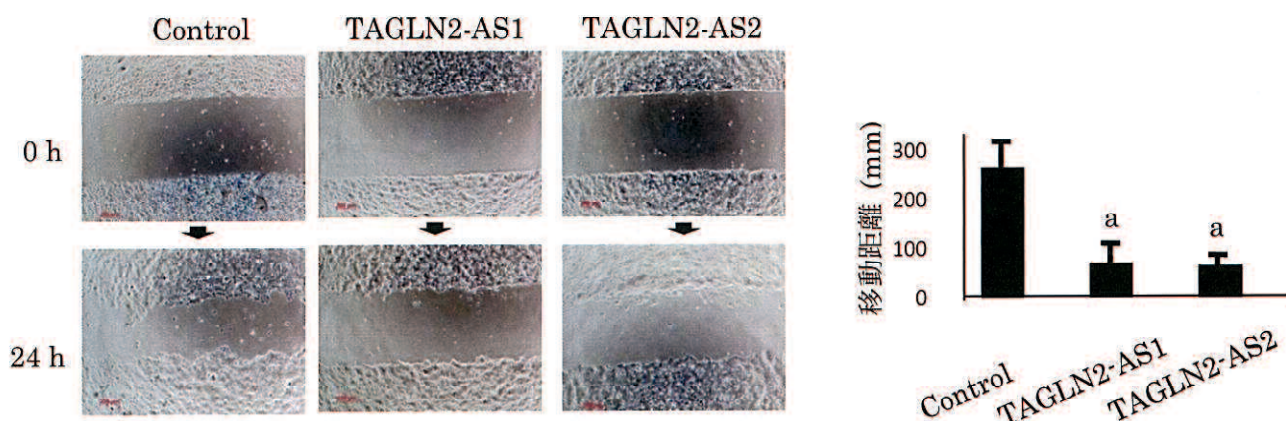


図 2. TAGLN2 の発現抑制が細胞遊走能に及ぼす影響

TAGLN2-AS1、AS2 と Control の細胞を用い、細胞遊走能の実験を行った。写真は細胞を引っ掻いた 0 時間と 24 時間後のものである。細胞遊走能は細胞が移動した距離を計測し、3 回の独立した実験の平均で評価した。a; $p < 0.05$ vs. Control。



図 3. TAGLN2 の発現抑制が MMP 分泌能に及ぼす影響

TAGLN2-AS1、AS2 と Control の細胞を用い、ゼラチンゼイモグラフィーで MMP-2 と MMP-9 の分泌能を分析した。3 回の独立した実験の平均で評価した。

In vivo における TAGLN2 の腫瘍形成能に与える影響

TAGLN2-AS1、AS2 と Control の細胞をメスの BALB/c ノードマウスの皮下に移植した。腫瘍の大きさは注射後 6 週間まで毎週計測された。6 週間後の腫瘍の大きさを比較した写真を図 4A に示す。TAGLN2-AS1、AS2 は Control に比べ、腫瘍の成長速度が低下していた(図

4B)。TAGLN2-AS1、AS2 は Control に比べ、6 週間後の腫瘍の大きさが有意に小さかった。腫瘍の免疫組織染色では、TAGLN2-AS1、AS2 は Control に比べ TAGLN2 の染色が薄く(図 4C)、TAGLN2-AS1、AS2 の腫瘍において、TAGLN2 の発現が抑制されていることを確認した。

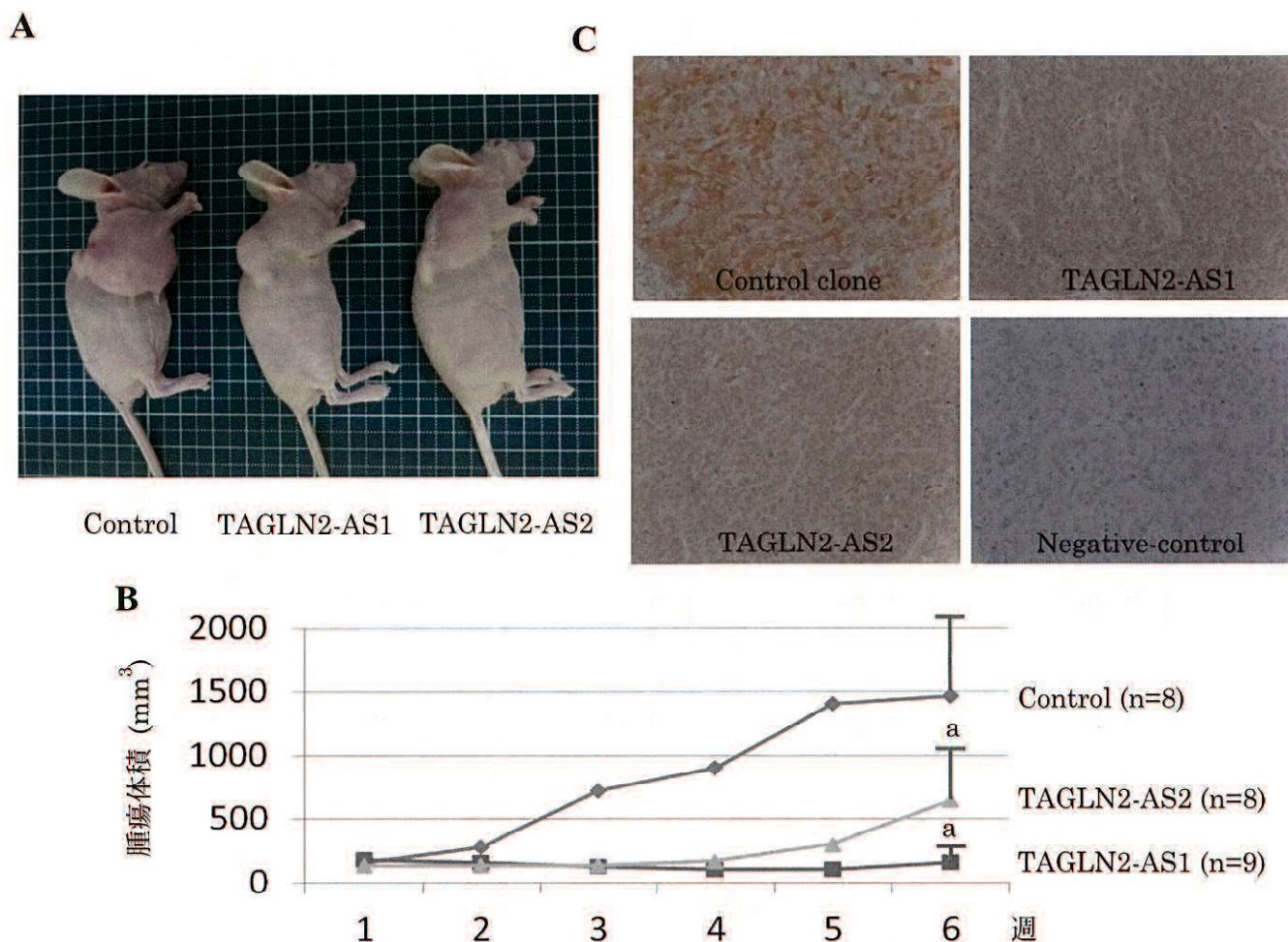


図 4. TAGLN2-AS1、AS2、および Control における腫瘍増殖能

1×10^7 個の TAGLN2-AS1、AS2 と Control の細胞を、生後 5 週のマスの BALB/c ノードマウスの皮下に移植した。腫瘍の大きさは皮下注射後 6 週間まで、毎週計測された。(A) 6 週間後の腫瘍の大きさを比較した写真。(B) 皮下注射後 6 週間の腫瘍の大きさの変化。a; $p < 0.01$ vs. Control。(C) マウスの腫瘍における TAGLN2 の発現。腫瘍は TAGLN2 のモノクローナル抗体で免疫組織染色された。

子宮頸癌患者における TAGLN2 発現と臨床病理学的因子及び予後との関係

患者背景を表 1 に示す。75 人の患者のうち、11 人が FIGO 進行期 IA 期(14.7%)、64 人が IB 期(85.3%)であった。37 人(49.3%)が脈管侵襲を認め、13 人(17.3%)がリンパ節転移を認め、7 人(9.3%)が死亡した。

表 1. TAGLN2 の発現と臨床病理学的因子の関係

		Strong パターン (n=36)	Weak パターン (n=39)		p value
年齢	≤ 50 歳	26	21	47 (62.7%)	0.160
	> 50 歳	10	18	28 (37.3%)	
FIGO 進行期	IA 期	7	4	11 (14.7%)	0.425
	IB 期	29	35	64 (85.3%)	
脈管侵襲	+	21	16	37 (49.3%)	0.205
	-	15	23	38 (50.7%)	
リンパ節転移	+	5	8	13 (17.3%)	0.651
	-	31	31	62 (82.7%)	
再発	+	8	4	12 (16.0%)	0.273
	-	28	35	63 (84.0%)	
死亡	+	6	1	7 (9.3%)	0.089
	-	30	38	68 (90.7%)	

組織標本における TAGLN2 の染色は、全体的に均一に染まったため、TAGLN2 の発現パターンはその濃度で weak パターンと strong パターンの 2 群に分類され(図 5)、約半分の患者が strong パターンであった(表 1)。表 1 では、TAGLN2 の発現と臨床病理所見の関係を示している。Strong パターンの患者は高い死亡率にある傾向が見られたが、統計学的に有意差はなかった(表 1)。TAGLN2 の発現は FIGO 進行期、脈管侵襲、リンパ節転移と有意な関連性は認めなかった(表 1)。

PFS と OS 曲線は weak パターンが strong パターンに比べ、良好な傾向があったが、統計学的に有意差は認めなかった(図 6)。

Cox 比例ハザード分析で、臨床病理学的因子(年齢、FIGO 進行期、脈管侵襲、リンパ節転移、TAGLN2 の発現)と PFS、OS の関連性について解析した。単変量解析では、不良な PFS とリンパ節転移に関連があり($p = 0.023$)、多変量解析では、リンパ節転移が PFS の独立予後因子として有意差を認めた($p = 0.014$) (data not shown)。OS について、単変量解析、多変量解析有意差を認める臨床病理学的因子は認めなかった(data not shown)。

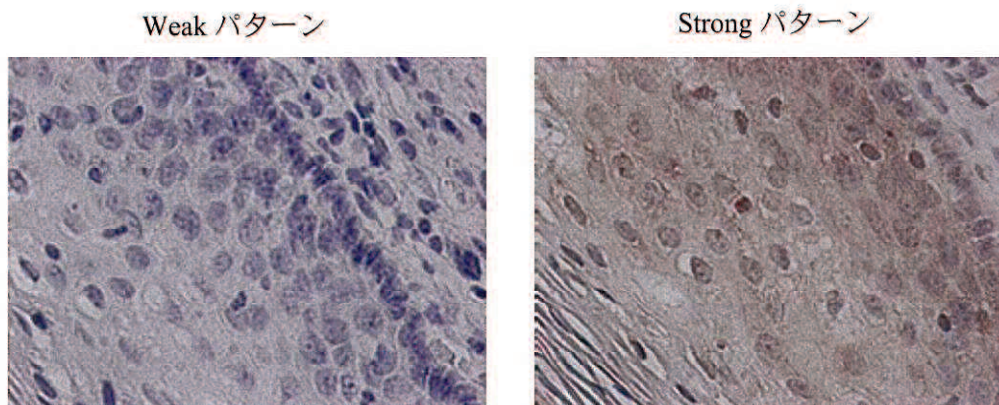


図 5. 子宮頸部扁平上皮癌における免疫組織染色による TAGLN2 の発現
組織標本における TAGLN2 の染色は、全体的に均一に染まったため、TAGLN2 の発現パターンはその濃度で weak パターンと strong パターンの 2 群に分類された。

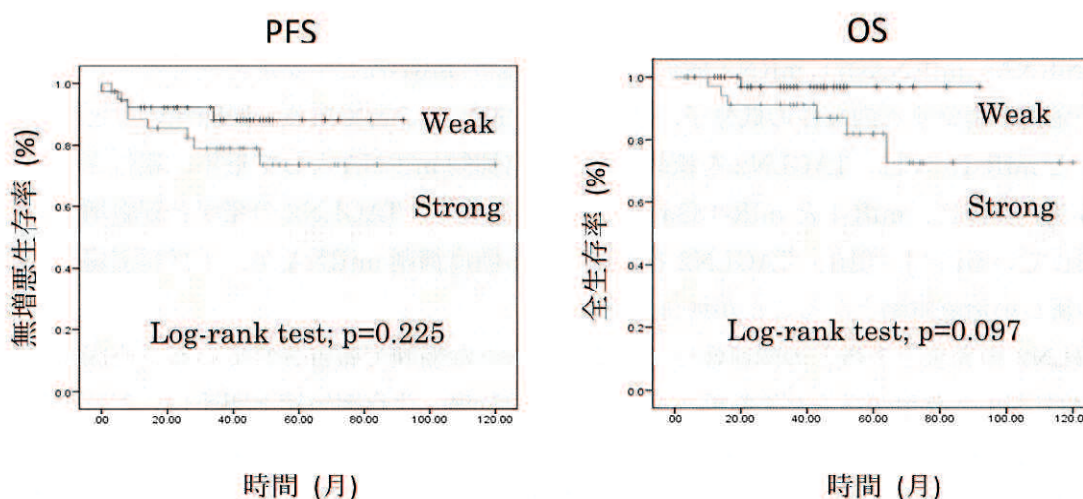


図 6. 子宮頸部扁平上皮癌における TAGLN2 の発現と予後の関係
TAGLN2 の発現(weak パターンと strong パターン)による Kaplan-Meier 曲線。(A) 無増悪生存期間(PFS)、(B) 全生存期間(OS)

【考察】

我々は近年、プロテオーム解析を用い、子宮頸癌において正常扁平上皮に比べ、強く発現している蛋白として TAGLN2 を同定した[2]。TAGLN2 はいくつかの癌腫では悪性度と関連性があると報告されているが、子宮頸癌における TAGLN2 と癌の進行や、その役割に

ついで報告はない。本研究の結果は、TAGLN2 が子宮頸癌の悪性動態に促進的に働いていることを示した。アンチセンス cDNA による TAGLN2 の発現抑制は、細胞遊走能、MMPs 分泌能を抑制した。また、*in vivo* 実験では、TAGLN2 の発現抑制は明らかに子宮頸癌細胞の腫瘍形成能を抑制した。MMPs は細胞遊走能を介し、腫瘍進展を促進することが知られている[17, 18]。これらの所見は TAGLN2 が子宮頸癌において腫瘍進展を促進していることを示すものである。実際に、直腸癌、結腸癌、頭頸部扁平上皮癌、肺腺癌、膀胱癌において、TAGLN2 の発現が増加しているという報告されている[4-9]。さらに、直腸癌、喉頭扁平上皮癌、頭頸部癌、膀胱癌において、TAGLN2 の発現は抑制することで細胞増殖能は抑制され、アポトーシスが増加すると報告されており[5-8]、本研究結果と矛盾するものではない。

TAGLN2 の発現を抑制することで *in vivo* 実験における腫瘍形成能は抑制されたが(図4)、*in vitro* 実験において、細胞増殖能に有意差はなかった。この *in vivo* と *in vitro* の結果が異なる理由は不明だが、考えられる理由の一つとして、*in vivo* では実験期間が6週間、*in vitro* では5日間という実験期間の違いが考えられる。また、他の可能性として、*in vivo* では、生体内に存在する免疫細胞や脈管侵襲などの腫瘍形成に関わる因子が関与した可能性が考えられる。

MicroRNAs (miRNAs) は、mRNA 翻訳抑制および標的 mRNA を不安定化させることで、遺伝子発現を調整する内在性の低分子、非コード RNA のことである。興味深いことに、miR-1 と miR-133a は、TAGLN2 を標的とする腫瘍抑制 miRNA として近年、報告されている[5-8]。実際に、miR-1 と miR-133a は、様々な癌腫で、TAGLN2 の発現と細胞増殖能を抑制している[5-8]。現在、TAGLN2 を標的とする腫瘍抑制 miRNA が、子宮頸部扁平上皮癌の新しい治療戦略となることが期待されている。

TAGLN2 の発現と予後との関連性については、様々な癌腫で報告されている。直腸癌では、TAGLN2 の発現がリンパ節転移、遠隔転移、進行癌、生存率短縮と関連しており、膀胱癌では腫瘍組織型の悪性度と関連していると報告されている[8]。本研究では、TAGLN2 の発現が低い患者は、PFS と OS が良好である傾向を認めたが、有意差はなかった。TAGLN2 は PFS と OS の独立予後因子にならなかった。その理由として、この研究の患者背景として FIGO 進行期の早期癌しか対象とされていなかったことが考えられる。TAGLN2 が予後因子として決定されるには、より多くの症例が必要と思われる。

【結語】

本研究では、TAGLN2 が子宮頸部扁平上皮癌の進展に重要な役割を果たしていることが示された。さらに、TAGLN2 の発現抑制が子宮頸部扁平上皮癌の新たな治療戦略となる可能性が示された。

【謝辞】

本研究は文部科学省の基礎研究 23592425、23791845、26462525、15K10719、15K10720
によって資金提供されている。

【参考文献】

1. Singh U, Ahirwar N, Rani AK, Singh N, Sankhwar P, Qureshi S. The efficacy and safety of neoadjuvant chemotherapy in treatment of locally advanced carcinoma cervix. *J Obstet Gynaecol India* 2013; 63: 273-278.
2. Fukushima C, Murakami A, Yoshitomi K, Sueoka K, Nawata S, Sugino N. Comparative proteomic profiling in squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Proteomics Clin Appl* 2011; 5: 133-140.
3. Shapland C, Hsuan JJ, Totty NF, Lawson D. Purification and properties of transgelin: a transformation and shape change sensitive actin-gelling protein. *J Cell Biol* 1993; 121: 1065-1073.
4. Zhang Y, Ye Y, Shen D, et al. Identification of transgelin-2 as a biomarker of colorectal cancer by laser capture microdissection and quantitative proteome analysis. *Cancer Sci* 2010; 101:523-529.
5. Kawakami K, Enokida H, Chiyomaru T, et al. The functional significance of miR-1 and miR-133a in renal cell carcinoma. *Eur J Cancer* 2012; 48: 827-836.
6. Nohata N, Hanazawa T, Kikkawa N, et al. Identification of novel molecular targets regulated by tumor suppressive miR-1/miR-133a in maxillary sinus squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* 2011; 39: 1099-1107.
7. Nohata N, Sone Y, Hanazawa T, et al. miR-1 as a tumor suppressive microRNA targeting TAGLN2 in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget* 2011; 2: 29-42.

8. Yoshino H, Chiyomaru T, Enokida H, et al. The tumour-suppressive function of miR-1 and miR-133a targeting TAGLN2 in bladder cancer. *Br J Cancer* 2011; 104: 808-818.
9. Rho JH, Roehrl MH, Wang JY. Tissue proteomics reveals differential and compartment-specific expression of the homologs transgelin and transgelin-2 in lung adenocarcinoma and its stroma. *J Proteome Res* 2009; 8: 5610-5618.
10. Li LS, Kim H, Rhee H, Kim SH. Proteomic analysis distinguishes basaloid carcinoma as a distinct subtype of nonsmall cell lung carcinoma. *Proteomics* 2004; 4: 3394-3400.
11. Shields JM, Rogers-Graham K, Der CJ. Loss of transgelin in breast and colon tumors and in RIE-1 cells by Ras deregulation of gene expression through Raf-independent pathways. *J Biol Chem* 2002; 277: 9790-9799.
12. Murakami A, Fukushima C, Yoshidomi K, et al. Suppression of carbonyl reductase expression enhances malignant behaviour in uterine cervical squamous cell carcinoma: Carbonyl reductase predicts prognosis and lymph node metastasis. *Cancer Lett* 2011; 311: 77-84.
13. Yoshidomi K, Murakami A, Yakabe K, Sueoka K, Nawata S, Sugino N. Heat shock protein 70 is involved in malignant behaviors and chemosensitivities to cisplatin in cervical squamous cell carcinoma cells. *J Obstet Gynaecol Res* 2014; 40: 1188-1196.
14. Murakami A, Suminami Y, Hirakawa H, Nawata S, Numa F, Kato H. Squamous cell carcinoma antigen suppresses radiation-induced cell death. *Br J Cancer* 2001; 84: 851-858.

15. Murakami A, Yakabe K, Yoshidomi K, et al. Decreased carbonyl reductase 1 expression promotes malignant behaviours by induction of epithelial mesenchymal transition and its clinical significance. *Cancer Lett* 2012; 323: 69-76.
16. Suminami Y, Nagashima S, Vujanovic NL, Hirabayashi K, Kato H, Whiteside TL. Inhibition of apoptosis in human tumour cells by the tumour-associated serpin, SCC antigen-1. *Br J Cancer* 2000; 82: 981-989.
17. Jeziarska A, Motyl T. Matrix metalloproteinase-2 involvement in breast cancer progression: a mini-review. *Med Sci Monit* 2009; 15: 32-40.
18. Smis JD, McCreedy J, Jay DG. Extracellular Heat Shock Protein (Hsp)70 and Hsp90 α assist in matrix metalloproteinase-2 activation and breast cancer cell migration and invasion. *PLoS ONE* 2011; 6: 1-12.