ヒト甲状腺腫瘍の I 型および IV 型コラーゲン 分解酵素活性の研究

近畿大学医学部耳鼻咽喉科学教室（主任：村田清高教授）

中 野 貴 之, 楠 威 志, 船 阪 有 彦, 村 田 清 高

近畿大学医学部生化学 I 教室（主任：戸村隆訓教授）

西 田 升 三, 戸 村 隆 訓

STUDY OF TYPE I AND IV COLLAGENASE ACTIVITY IN HUMAN THYROID DISEASES

TAKAYUKI NAKANO, M.D., TAKESHI KUSUNOKI, M.D., KUNIHIKO FUNASAKA, M.D.
and KIYOTAKA MURATA, M.D.

Department of Otolaryngology, Kinki University School of Medicine, Osaka

SHOZO NISHIDA, Ph. D and TAKANORI TOMURA, M.D.

First Department of Biochemistry, Kinki University School of Medicine, Osaka

The activity of type I and IV collagenase was measured in thyroid tissue obtained from 6 non-diseased thyroids, 4 patients with Graves' diseases, 5 with follicular adenoma, 6 with papillary carcinoma and 4 with follicular carcinomas. The relationship between these enzyme activities and invasion or metastasis of the original tumors was studied. The activity of type I collagenase in papillary carcinomas and follicular carcinomas was higher than in non-diseased thyroids, Graves' disease and follicular adenoma. Carcinoma tissue with invasion beyond the capsule in particular had higher type I collagenase activity. Type IV collagenase activity in carcinoma with lymph node metastasis was higher than in non-diseased thyroids, Graves' disease and follicular adenoma, and especially higher than carcinoma without lymph node metastasis. These findings suggest that increased type I collagenase activity plays an important role in local invasion in thyroid carcinoma, and that increased type IV collagenase activity plays an important role in lymph node metastasis.

Key words: ヒト甲状腺腫, I 型コラーゲン分解酵素
IV 型コラーゲン分解酵素

A 98—0937—92346

緒 言

悪性腫瘍が進展する場合、腫瘍自身の増殖と周囲への浸潤および遠隔転移が行われる。その際、癌周囲の障害物として基底膜および周囲間質が存在し、その主要成分の一つであるコラーゲンを溶解し浸食、破壊しなければならない¹⁾。コラーゲンを特異的に分解する

酵素の活性については、すでに諸家たちによって検討がなされており、その中で癌の浸潤、転移の際に働くコラーゲン分解酵素についての報告をみると、窪地²⁾は胃癌と肺癌を用いて I 型コラーゲナーゼ活性が局所浸潤に働くとし、Liotta ら³⁾や Fessler⁴⁾は、IV 型コラーゲン分解酵素活性が転移傾向の強い悪性腫瘍で高値を

示すとしている。しかし、ヒト甲状腺腫瘍を用いて、I型およびIV型コラーゲン分解酵素について報告しているものはない。そこで、ヒト甲状腺正常組織、良性病変および悪性病変についてI型およびIV型コラーゲン分解酵素活性を測定し、母腫瘍の浸潤および転移の有無との関連について検討した。

研究方法

1. 実験材料

実験材料として、1989年から1990年に外科的手術により摘出されたヒト甲状腺病変組織を使用した。内訳はGraves' disease 4例、濾胞腺腫5例、乳頭癌6例、濾胞腺癌4例および病変組織より十分離れた正常組織6例を用いた。また、実験に使用する前に甲状腺病変部および正常甲状腺は病理組織学的に確認を行った。

2. 試料液の調整

組織は採取後、直ちに液体窒素にて凍結させ、 -80°C で酵素活性測定まで凍結保存した。測定時、凍結組織切片の病変辺縁部約0.2～0.5gに50mM Tris HCl Bufferを加えポリトロン (NIHONSEIKI) およびPorter型ホモジナイザー (OMEGA ELECTRIC) にてホモジネートを行い、周波数20kHz、出力130W (COSMO BIO) にて超音波処理後、600Xg、10分間遠心し、その上清を以下の実験の試料液として用いた。

3. 試料液の蛋白濃度測定

サンプル液の蛋白濃度は、BCA Protein Assay kit (Pierce 社) を用いて測定した³⁾。Bicinchoninic acid (BCA) 液と第二銅イオン液との混合液2.0mlを標準液または未知の試料液を0.1mlを加え、室温2時間反応させた。その後、562nmの吸光度計 (HITACHI) で測定し、標準曲線を作製し、各サンプル液の蛋白濃度を算定した。

4. I型コラーゲン分解酵素活性測定

甲状腺組織中のI型コラーゲン分解酵素活性は、New England Nuclear (NEN) 社のコラゲナーゼキットで測定した。10% ^3H -標識I型コラーゲン10 μl とカルシウム緩衝液80 μl をマイクロチューブ (Eppendorf) に入れ恒温槽で 4°C にて2時間インキュベーションしゲルを作製した。前述したサンプル液5 μl を45 μl の50mM PBSで10倍希釈し、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度のTrypsin溶液 (Sigma) 20 μl を加え、 37°C 、10分間インキュベーション後、300 $\mu\text{l}/\text{ml}$ 濃度Soybean溶液 (Sigma) 30 μl を加えて同じく 37°C で10分間反応させTrypsinの働きを止めた。次いで処理済のサンプル液

100 μl 中10 μl を、先ほどゲル化したI型コラーゲン基質に加えて混和させた。その後、 37°C 、24時間インキュベーション施行後、13,500Xg、10分間、室温で遠心分離 (HITACHI) し、上清液10 μl に溶媒であるアトムライト (NEN) 5mlを加え上清液中の放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。コラーゲン分解酵素活性値は、組織ホモジネートに含まれる蛋白量1mgに対して 37°C 、24時間に分解させたコラーゲン量 (μg collagen degraded/24hrs/mg protein) で表示した (図1)。

5. IV型コラーゲン分解酵素活性測定

甲状腺組織内のIV型コラーゲン分解酵素活性はLiottaら³⁾の方法に準じて行った。すなわち、サンプル液160 μl に100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度のTrypsin溶液40 μl を加え10分間反応させ潜在型酵素を活性させた。その後、500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度のSoybean溶液40 μl を加えて10分間 37°C に保ち反応を止めた。得られた反応液の160 μl に0.2% ^3H 標識IV型コラーゲン溶液 (NEN) 50 μl および50mM Tris HCl Buffer 50 μl を加え混和させた。その後、 37°C 、24時間インキュベーション施行した。24時間経過後、トリクロル酢酸、タンニン酸をそれぞれ終濃度2%、0.5%になるように添加し、反応停止させ30分間水冷させた。13,500Xg、10分間室温で遠心分離し、上清液10 μl に溶媒であるアトムライト5mlを

サンプルホモジネート希釈液

・ Trypsinを添加

10分間、 37°C 、incubation

・ Soybeanを添加

10分間、 37°C 、incubation

・

コラーゲンゲル⁴⁾と混和

・

24時間、 37°C 、incubation

・

13,500Xg、10分間、centrifuge

・

液体シンチレーションカウンターにて測定

⁴⁾ コラーゲンゲルの作製

^3H 標準I型コラーゲン溶液

calcium buffer

↓

2時間、 4°C 、incubation

図1 I型コラーゲン分解酵素活性の測定法

サンプルホモジネート希釈液
 ・ Trypsin を添加
 10分間, 37°C, incubation
 ↓ Soybean を添加
 10分間, 37°C, incubation
 ・
³H-標準IV型コラーゲン溶液を添加
 ・
 24時間, 37°C, incubation
 ・ Trichloracetic acid
 Tannic acid を添加
 30分間, on ice
 ・
 13,500Xg, 10分間, centrifuge

液体シンチレーションカウンターにて測定

図2 IV型コラーゲン分解酵素活性の測定法

加え、上清液中の放射能を液体シンチレーションカウンターで測定した。コラーゲン分解酵素活性値は、組織ホモジネートに含まれる蛋白量1mgに対する37°C、24時間に分解されたコラーゲン量 (μg collagen degraded/24hrs/mg protein) で表示した (図2)。

実験結果

1. I型コラーゲン分解酵素活性

図3にI型コラーゲン分解酵素活性を示した。さらに悪性病変については1985年WHO術後規約分類(pTNM)を示した。その平均値をみると正常甲状腺は、 $0.679 \pm 0.219 \mu\text{g}$ collagen degraded/24hrs/mg protein (Mean $\pm$ SE, 以下コラーゲン分解酵素活性の単位省略), Graves' disease では 0.626 ± 0.154 と両者に差がなかった。しかし、濾胞腺腫では 1.284 ± 0.218 と正常甲状腺の約2倍を示し有意に高値であった (Wilcoxon検定, $p < 0.01$)。同じく、乳頭癌では 3.090 ± 1.837 と約3倍を示し正常甲状腺や Graves' disease と有意差を認め、また濾胞腺腫に対しても有意差を認めた。

乳頭癌においてI型コラーゲン分解酵素活性とpTNM分組と比較した。T4を示した症例つまり被膜外浸潤を認めたものは、I型コラーゲン分解酵素活性が2,000以上を示した。その中でも症例1は6,590と最も高値を示し術前右反回神経麻痺を認め、また術中所見では、腫瘍が両葉に認められ右反回神経や右内頸静

図3 I型コラーゲン分解酵素活性

I.T.: 正常甲状腺組織

G.D.: Graves' disease

F.A.: 濾胞腺腫 P.C.: 乳頭癌

F.C.: 濾胞腺癌

*: $p < 0.01$, 正常甲状腺および Graves' disease と有意差あり

** : $p < 0.05$, 正常甲状腺, Graves' disease および濾胞腺腫と有意差あり

症例1-5: T4N1M0 (UICC, 1985)

症例7-9: T4N0M0

症例6, 10: T1N0M0

脈および上皮小体への浸潤、さらには両側頸部リンパ節転移が認められた。被膜外浸潤を認めなかった症例6は2,000未満であった。濾胞癌においても被膜外浸潤を認めた症例7, 8, 9においては2,000以上を示し、被膜外浸潤を認めなかった症例10においては、1,362と2,000未満であった。

リンパ節転移において、乳頭癌では5例がT4N1M0で1例がT1N0M0であった。本実験においてT4N0M0症例はなかったが、T1N0M0症例ではI型コラーゲン分解酵素がT4N1M0症例に比べ低値を示した。しかしながら、濾胞癌のリンパ節転移を認めないT4N0M0症例の3例と乳頭癌のリンパ節転移を認めるT4N1M0症例の5例との間には有意な差を認めなかった。また、濾胞癌での本実験においてリンパ節転移を示す症例を得ることができなかった。

2. IV型コラーゲン分解酵素活性

正常甲状腺, Graves' disease, 濾胞腺腫のIV型コラーゲン分解酵素活性値の平均値は、 0.280 ± 0.076 , 0.241 ± 0.119 , 0.353 ± 0.079 と低値を示した (図4)。

図4 IV型コラーゲン分解酵素活性

I.T.: 正常甲状腺組織

G.D.: Graves' disease

F.A.: 濾胞腺腫 P.C.: 乳頭癌

F.C.: 濾胞腺癌

*: $p < 0.01$, 正常甲状腺, Graves' disease および濾胞腺腫と有意差あり

* *: $p < 0.05$, 正常甲状腺, Graves' disease, 濾胞腺腫および乳頭癌と有意差あり

症例1—5: T4N1M0 (UICC, 1985)

症例7—9: T4N0M0

症例6, 10: T1N0M0

それに対し乳頭癌は 1.003 ± 0.357 と高値を示し, 正常甲状腺, Graves' disease, 濾胞腺腫の3者に対し有意差を認めた。しかし, 濾胞癌の平均値は, 0.571 ± 0.236 と乳頭癌の約半分で有意差を認めた ($p < 0.05$)。

乳頭癌症例についてみると症例1から5のようにT4N1M0を示したものの, つまり被膜外浸潤, リンパ節転移を共に認めた症例は, IV型コラーゲン分解酵素活性0.800以上を示した。その中でも高値を示した症例1は, 広範囲の被膜外浸潤とリンパ節転移を認めた。症例6のように被膜外浸潤, リンパ節転移いずれも認めなかった症例は, IV型コラーゲン分解酵素活性0.600と0.800未満であった。濾胞癌においても, 被膜外浸潤やリンパ節転移のいずれも認めなかった症例10は0.254と低値を示した。

興味深いことに, 乳頭癌, 濾胞癌を合わせてリンパ節転移群と非転移群に分けると非転移群のIV型コラーゲン分解酵素活性が 0.576 ± 0.205 に対し, 転移群は 1.083 ± 0.356 と有意に高値を示した。

考 察

1. I型コラーゲン分解酵素活性

窪地²⁾は, 肺癌, 胃癌のI型コラーゲン分解酵素活性と各々の非癌組織のI型コラーゲン分解酵素活性とを比べ前者が有意に高値を認めたことを報告した。水谷⁶⁾は, ヒト胃癌において低分化癌が高分化癌よりI型コラーゲン分解酵素活性が高いとしている。この場合, 低分化癌であるスキルス胃癌はび慢性浸潤増殖を示し, 分化癌の多くは限局型に増殖を示した。今回の自験例において, 癌性病変である乳頭癌, 濾胞癌が正常甲状腺および良性病変であるGraves' disease, 濾胞腺腫より高値のI型コラーゲン分解酵素活性を示したと一致し, 癌性病変において被膜外浸潤を認めた症例は認めない症例よりI型コラーゲン分解酵素活性が高値を示したことも前述の諸報告と符合する。今回の結果では被膜外浸潤を認めた症例は, I型コラーゲン分解酵素活性が2.000以上を示し, 被膜外浸潤を認めなかった症例は2.000未満であったことは将来種々の診断に役立つ可能性を示唆するものと考えられた。また, このような事実から考えると症例1のように広範囲の周囲浸潤を認め, I型コラーゲン分解酵素活性が高値を示す症例の母腫瘍は, 強い浸潤能を持つ癌細胞から形成されていることが考えられる。

加藤ら⁷⁾は, 甲状腺乳頭癌の組織学的特徴の一つとして, 濾胞癌に比べ間質の強い結合組織増生を示すと報告している。この説明としては, 甲状腺乳頭癌はスキルス胃癌のごとく間質膠原繊維の破壊が強いが, 同時に線維芽細胞のコラーゲン産生能も強く促進させる結果であると考ええる。しかし, 間質の強い結合組織増生を示す乳頭癌とそうでない濾胞癌を本実験結果でみると被膜外浸潤を認めた乳頭癌5例, 濾胞癌3例は共にI型コラーゲン分解酵素活性値が高く両者に差はなかった。つまり, 被膜外浸潤と間質の強い結合組織増生のI型コラーゲン分解酵素の上昇は, 強い浸潤能を有する母腫瘍の存在を示唆するものと言える。

2. IV型コラーゲン分解酵素活性

IV型コラーゲンは基底膜を構成し, I型コラーゲン分解酵素で破壊されない⁸⁾。また, 悪性腫瘍が組織を破壊し浸潤や転移する際に, 基底膜を破壊するIV型コラーゲン分解酵素が生産されていることをLiottaら⁹⁾は報告している。自験例においても, 乳頭癌, 濾胞癌の癌性病変は正常甲状腺およびGraves' disease, 濾胞腺腫の良性病変よりIV型コラーゲン分解酵素が高値を示し, 中でもリンパ節転移を示す症例は, 特に0.800以

上の高値を示した。

一般に甲状腺癌では肺などの血行性転移例が少なく、自験例でも血行性転移の認められた症例がなかったため、IV型コラーゲン分解酵素が、脈管壁の基底膜を破壊し遠隔転移に関与しているかについての検索ができなかった。しかし、甲状腺乳頭癌、濾胞癌を合わせてリンパ節転移群と非転移群に分けると転移群のIV型コラーゲン分解酵素は 1.083 ± 0.356 で、非転移群が 0.576 ± 0.205 と有意な差が認められ、甲状腺癌でのリンパ節転移においてもIV型コラーゲン分解酵素が重要な因子の一つであることが認められた。

本実験結果より、乳頭癌、濾胞癌の区別なく甲状腺癌においては、I型コラーゲン分解酵素が局所浸潤に、IV型コラーゲン分解酵素がリンパ節転移に関与していることが認められ、コラーゲン分解酵素が甲状腺癌の浸潤や転移の程度を示す生化学的なマーカーとなり得る可能性を示唆するものと考えた。

結 語

甲状腺疾患切除例 (Graves' disease 4例、濾胞腺腫5例、乳頭癌6例、濾胞癌4例および遠隔非腫瘍部甲状腺6例)を用いて、腫瘍内のI型およびIV型コラーゲン分解酵素活性を測定した。

1. I型、IV型コラーゲン分解酵素活性は癌性病変である乳頭癌、濾胞癌が正常甲状腺、Graves' disease、濾胞腺腫に比べ高値を示した。

2. 癌性病変において、被膜外浸潤を認める症例は、認めない症例よりI型コラーゲン分解酵素活性が高値を示した。同じく癌性病変においてリンパ節転移を認めた症例は、認められない症例よりIV型コラーゲン分解酵素活性が高値を示した。

参 考 文 献

- 1) Woolley DE: Collagenolytic mechanisms in tumor cell invasion. *Cancer Metastasis Reviews* 3: 361-372, 1984.
- 2) 窪地 淳: 組織内IV型コラゲナーゼ活性値測定法の確立とそれによる胃、肝癌組織内同酵素活性に関する研究. *日外会誌* 91: 174-182, 1990.
- 3) Liotta LA, Tryggvason K, Garbsisa S et al: Partial purification and characterization of a neutral protease which cleaves type IV collagen. *Biochemistry* 20: 100-104, 1981.
- 4) Fessler LI, Duncan KG, Fessler JH: Characterization of the procollagen IV cleavage products produced by a specific tumor collagenase. *J Biol Chem* 259: 9783-9787, 1984.
- 5) Smith PK, Krohn GT, Hermanson AK: Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analy Biochem* 150: 76-85, 1985.
- 6) 水谷 均: 培養細胞によるスキルス胃癌の成因に関する研究. *大阪医科大誌* 46: 11-25, 1987.
- 7) 加藤良平, 小野貞英, 佐々木 純 他: 甲状腺乳頭癌の間質における各種Collagenの分布と癌細胞のProcollagen III peptide (pIIIp)の発現. *癌の臨床* 36: 967-972, 1990.
- 8) McCroskery PA, Richards JF, Haris ED: Purification and characterization of a collagenase extracted from rabbit tumors. *J Biochem* 152: 131-135, 1975.
- 9) Liotta LA, Tryggvason K, Garbsisa S: Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature* 284: 67-68, 1980.

(1994年9月22日受稿 1995年4月6日受理)

別刷請求先 〒589 大阪狭山市大野東377-2

近畿大学医学部耳鼻咽喉科学教室 中野貴之

A 98-0931-25592

日耳鼻

エアーカーリック刺激装置を用いたフロセミドテストの検討

——刺激温度の設定とフロセミドテストの再検討——

畑 裕子 (三井記念) 深谷 卓 (関東通信)

フロセミドテストには、44℃、30℃、20秒の注水刺激を用いてきた。しかし水刺激は温度設定が困難で不正確になりやすく、このことは、前後で同一の刺激を必要とする本検査の最大の欠点となる。この欠点を補うため、エアーストームを用いることを検討した。正常耳28耳を用いて水刺激と同等の刺激量を求めると、 $37 \pm 11^\circ\text{C}$ 、6l/min、60秒となり水刺激とも良く相関することが確かめられた。エアーストームを用いてフロセミドテストを行ったところ、正常群では4.7%に陽性例が見られ従来の結果とはほぼ一致した。エアーストームを用いることで温度設定が正確で容易、しかもより苦痛の少ない検査が可能となった。

A 98-0937-92346

日耳鼻

ヒト甲状腺腫瘍のI型およびIV型コラーゲン分解酵素活性の研究

中野貴之・楠 威志・船阪有彦・村田清高 (近畿大)
西田升三・戸村隆訓 (同・生化学1)

甲状腺疾患切除例 (Graves' disease 4例、濾胞腺腫 5例、乳頭癌 6例、濾胞癌 4例) および遠隔非腫瘍部甲状腺 (6例) を用いて、腫瘍内および非腫瘍部内のI型およびIV型コラーゲン分解酵素活性を測定し、以下の結果を得た。

- 1) I型、IV型コラーゲン分解酵素活性は癌性病変である乳頭癌、濾胞癌が正常甲状腺、Graves' disease、濾胞腺腫に比べ高値を示した。
- 2) 癌性病変において、被膜外浸潤を認める症例は、認めない症例よりI型コラーゲン分解酵素活性が高値を示した。同じく癌性病変においてリンパ節転移を認めた症例は、認められない症例よりIV型コラーゲン分解酵素活性が高値を示した。

A 98-0942-23020

日耳鼻

蝸牛内電気現象に対するKチャンネル

開口薬、NicoRandilの作用

河合晃充 (川崎医大)

ATP感受性K⁺チャンネル開口薬として知られているNicoRandil (NCR) を外リンパ灌流し、EPとCMに対する影響を調べた。 10^{-4}M ではEPは $23.8 \pm 12.6\text{mV}$ 低下し、CMは 78.6% となった。 $5 \times 10^{-4}\text{M}$ ではEPは $30.5 \pm 8.2\text{mV}$ 低下し、CMは 16.7% となった。 10^{-3}M ではEPは $69.5 \pm 4.8\text{mV}$ 低下し、CMは 28.0% となった。すべての濃度でEPとCMは平行して低下した。この変化は一部の例においては可逆性を示した。これらの結果により、血管系またはコルチ器においてNCRに反応するチャンネルの存在が示唆され、EPやCMの維持にK⁺チャンネルの作用が重要であることが示唆された。

A 98-0951-24571

日耳鼻

前庭神経炎の診断および治療における問題点:

——突発性めまい症例の臨床的検討からの考察——

武田憲昭・肥塚 泉・河野幹子・西池季隆
久保 武 (阪大) 荻野 仁 (大手前病院)

突発性めまいを突発性難聴に対応する前庭疾患として突然に一侧の末梢前庭機能が障害される疾患として考え、CPの有無に関係なく自覚症状により診断した。20例の突発性めまい症例において、CP(+)群とCP(-)群との間には臨床経過、背景について差を認めず、障害の範囲(外側半規管が含まれるか)の違いであると考えた。CP(+)の突発性めまい症例を前庭神経炎と診断するのが現実的と考え、10例のCP(+)の突発性めまい(前庭神経炎)症例の内、約2年後に4例にCPが消失した。CPが消失していた症例は誘発性のめまいを自覚し、頭振後眼振が残存していた。前庭神経炎では急性期にステロイド治療により前庭機能の回復を図ることが予後の改善に必要と考えられる。