KB 細胞の産生するコラゲナーゼインヒビターについて

河合 俊彦

Synthesis of collagenase inhibitor by KB cells

Toshihiko KAWAI

Abstract: Collagenase inhibitor has been characterized and identified in a variety of connective tissues. This paper reports the purification and characterization of the collagenase inhibitor secreted by KB cells in culture.

Results were as follows:

1. KB cells in the serum free culture medium secreted collagenase inhibitor.
2. Collagenase inhibitor was divided into two peaks by CM-52 column chromatography. Molecular weights of the inhibitor were estimated to be 32,000 and 16,500 by gel filtration.
3. The addition of the inhibitor to activated collagenase resulted in a dose-dependent inhibition of the enzyme activity.
4. The KB cell inhibitor showed inhibitory activity against all the animal collagenase tested except for bacterial collagenase.
5. Trypsin, thermolysin and elastase were not inhibited by the KB cell inhibitor.
6. The collagenase inhibitory activity was stable after treatment with APMA (1 mM) at 35°C for 3 h., after incubation for 30 min. at 60°C, but was lost by reductive alkylation.

Key words: KB cell, collagenase inhibitor, connective tissues

I. 緒 言

動物性コラゲナーゼは、Gross and Lapierre¹⁾による発見や Nagai ら²⁾による報告以降、培養や直接抽出などの手段によって数多くの組織や細胞でその存在や合成能が見出されている³⁾。

コラゲナーゼが、温度、pH、イオン強度などの生理的条件下でタイプ I, II, III などのコラーゲン分子の α ヘリックス内の特定部位を切断すると、切断されたコラーゲン分子は生理的温度で変性し、他の蛋白質分解酵素によって分解され、代謝されていくようになる^{3,4)}。

このコラゲナーゼ活性は、発生分化、成長に伴う組織の改造、角膜潰瘍、歯周疾患、リウマチ性関節炎、悪性腫瘍の浸潤時などで認められ、本酵素は生理的条件下

や病態時の結合組織代謝において重要な役割を果たしていると考えられている⁵⁾。

また、その活性は、生成量の変化、アクチベーターの産生、コラーゲン線維との相互作用、阻害物質による阻害などの多くの段階で調節されている⁶⁾。

コラゲナーゼの生理的阻害物質には、血清中に存在する α_2 マクログロブリン (以下 α_2 -M) と $\beta 1$ アンチコラゲナーゼ、各種の結合組織や細胞由来のコラゲナーゼインヒビターなどが存在する^{8,9)}。

コラゲナーゼは不活性型として細胞より分泌され、アクチベーター⁷⁾などによって活性化されて初めてその酵素活性を発揮するが、コラゲナーゼインヒビターはこの活性型コラゲナーゼを 1 : 1 で阻害する^{8,9)}。

α_2 -M は分子量 72.5 万と大きく、一方コラゲナーゼインヒビターの分子量は約 3 万であり、 α_2 -M が血液中に存在するのに対し、コラゲナーゼインヒビターは主として組織内でコラゲナーゼ活性の調節をしていると考えられている¹⁰⁾。

また $\beta 1$ アンチコラゲナーゼはコラゲナーゼインヒビターと免疫学的に同一であることが報告されている¹¹⁾。

ヒト由来のコラゲナーゼインヒビターは、皮膚線維芽

愛知学院大学歯学部第 2 口腔外科学教室

(主任: 河合 幹教授)

The Second Department of Oral and Maxillo-facial Surgery, School of Dentistry, Aichi-gakuin University (Chief: Prof. Tsuyoshi Kawai)

受付日: 昭和 62 年 11 月 9 日

細胞¹¹⁾, 靱帯¹²⁾, 羊水¹³⁾, 滑膜¹⁴⁾などの材料から精製されている。

最近、皮膚線維芽細胞のコラゲナーゼインヒビターの一次構造が決定され¹⁵⁾, Tissue Inhibitor of Metalloproteinases (以下 TIMP)¹⁶⁾と同一であることが明らかにされた。

種々の結合組織細胞以外に腫瘍細胞由来のコラゲナーゼインヒビターの報告が散見されるが¹⁷⁾, 今回、著者はヒト口腔底扁平上皮癌より株化された KB 細胞¹⁸⁾も、無血清培養液で培養するとコラゲナーゼインヒビターを産生することを見出したので精製し、諸性質を検討したので報告する。

II. 実験材料

1. 試薬

[U-¹⁴C] グリシンは Amersham 社, HB 101 無血清培養液は Hana-Media 社, サーマリシン, 脾臓エラスターゼ, ウシ胎児血清 (以下 FCS) は Behringer-Mannheim 社, トリプシン, エラスチンコンゴアレッドは Sigma 社, 細菌性コラゲナーゼは Advance Biofacture 社, カゼインは Merck 社, ウルトロゲル AcA 54 は LKB 社, CM-52 セルロースは Whatmann 社, アミノフェール酢酸水銀 (以下 APMA) は東京化成, Eagle MEM は日本製薬社製を使用, その他の試薬は市販特級試薬を使用した。

2. KB 細胞の培養

KB 細胞を通法にしたがい、ファルコン 150 cm² フラスコを用い 5% FCS を含む MEM 培養液でコンフルエントになるまで培養した。

培養液除去後 FCS を含まない Eagle MEM 培養液で 4 回洗浄し、その後 HB 101 無血清培養液 50 ml を加え、さらに 2 週間培養を続けた。この間、培養液を 1 日ないし 2 日ごとに交換し、遠心により細胞成分を除き、培養上清を -30°C で凍結保存した。

3. 各種コラゲナーゼの調製

ウシ歯髄コラゲナーゼは、ウシ歯髄を Tyrode 液中で培養する Kishi らの方法¹⁹⁾によって調製した。

ウシ角膜、ウシ大動脈弓コラゲナーゼは、それぞれの MEM 培養液をウルトロゲル AcA 54 カラムで分画し部分精製したものを使用した。ヒヨコ皮膚コラゲナーゼはその MEM 培養液より得た。ヒト好中球コラゲナーゼは Kobayashi and Nagai の方法²⁰⁾にしたがい保存血より得た。細菌性コラゲナーゼは他の蛋白質分解酵素の混在しない²¹⁾市販品を使用した。

III. 実験方法

1. コラゲナーゼ基質の調製

[U-¹⁴C] グリシン 0.1 mCi を、体重 150~200 g の雄モルモット腹腔内に注射し、6 時間後に屠殺した。その背部皮膚を洗浄後細切し、1 M 塩化ナトリウム溶液によりコラーゲンを抽出した。その後塩化ナトリウムによる塩析をくり返して精製した後、凍結乾燥した。

2. 酵素活性測定法

1) コラゲナーゼ活性およびコラゲナーゼ阻害活性測定法

コラゲナーゼ活性は Terato らの方法²²⁾に準拠した溶液法で測定し、コラゲナーゼの 1 単位 (1 unit) は 35°C で 1 時間に 1 μg のコラーゲンを分解する酵素量とした。

反応液は基質 100 μl, 0.4 M 塩化ナトリウム, 10 mM 塩化カルシウム, 1 M グルコースを含む 0.1 M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.8) 100 μl, 蒸留水 150 μl に酵素溶液と 5 mM 塩化カルシウム, 0.2 M 塩化ナトリウムを含む 30 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.8) 以下緩衝液 A—を加え総量 550 μl とした。35°C, 15 時間のインキュベーション後、等量のジオキサンを加え、10 分間の振盪後、1,700 × g で 10 分間遠心分離した。その上清 550 μl を採取し、10 ml のプレートのシンチレーションカクテルに加え、放射活性を液体シンチレーションカウンター (Beckman LS 9800) で測定した。

コラゲナーゼ阻害活性の 1 単位 (1 unit) は、2 単位のコラゲナーゼを 50% 阻害する酵素量として表示した。

すべての動物性コラゲナーゼは、Sellers らの方法²³⁾に準じ 1 mM APMA を加え、35°C, 4 時間インキュベーションして活性型とし、透析により APMA を除去して実験に供した。

2) トリプシンおよびサーモリシン活性

0.2 M 塩化ナトリウム, 10 mM 塩化カルシウムを含む 50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.8) に 3 mg/ml の濃度で溶解したカゼイン溶液 0.8 ml に、0.01 mg/ml の濃度で同じ緩衝液に溶解したトリプシン溶液 0.2 ml を加えた。38°C, 20 時間インキュベーションし、5% トリクロル酢酸 2 ml を加え反応を終了させた。1,700 × g, 10 分間の遠心分離後、上清の 280 nm での吸光度を測定し酵素活性とした。

サーモリシン活性は、同一基質に 0.015 mg/ml のサーモリシン溶液を加える以外は、トリプシン活性測定法に準じて測定した。

3) エラスターゼ活性

100 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.8) に 1 mg/ml の濃度で懸濁したエラスチンコンゴアレッド懸濁液 2 ml に 0.3 mg/ml の濃度で同じ緩衝液に溶解したエラスターゼ溶液 0.2 ml を加え、38°C, 20 時間のインキュベ

ションを行った。1,700×g, 10分間の遠心分離後, 上清の 495 nm での吸光度を測定し酵素活性とした。

3. 精製方法

1) 濃 縮

KB 細胞の培養上清を透析チューブに入れ, ポリエチレングリコール 20,000 の溶液に浸すことにより, 培養上清を約 17 倍濃縮した。

2) CM-52 イオン交換カラムクロマトグラフィー

前記濃縮液を 20 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.4) に透析し, 同じ緩衝液で平衡化した CM-52 セルローズカラム (カラムサイズ 2.5×16 cm) を用い分画した。非吸着成分を同じ緩衝液で洗浄後, 0-0.7 M 塩化ナトリウムによる直線的濃度勾配法で溶出した。

3) ゲルクロマトグラフィー

緩衝液 A で平衡化したウルトログル AcA 54 を使用しゲルクロマトグラフィーを行い, ペリスタリックポンプを用いて展開, 分取した。カラムの分子量の校正には, ブルーデキストラン 2,000 (以下 BD), ウシ血清アルブミン (以下 BSA, 分子量 69,000), オボアルブミン (以下 OA, 分子量 45,000), ミオグロビン (以下 Mb, 分子量 17,200) を使用した。

4. 活性化コラゲナーゼに対するインヒビターの影響

100 m unit のウシ歯髄コラゲナーゼに Ⅲ-3-3) で得られたインヒビターを加え, インヒビター量の増加によるコラゲナーゼ阻害活性の変化を検索した。

5. コラゲナーゼ阻害活性の電気泳動による確認

Ⅲ-3-3) で得られたインヒビター 75 m unit, コラーゲン 30 ug, 活性化コラゲナーゼ 15 m unit を 20°C で 96 時間反応させた後, 反応混合物を Weber and Osborn の方法²⁴⁾にしたがって, 電気泳動した。ゲルはアクリルアミド 6% とし, 泳動は 80 mA の定電流でブロムフェノールブルーがゲルフロントに達するまで行った。

0.25% クマシーブリリアントブルー R で染色後, 7.5% 酢酸-5% メタノール混液で脱色した。

6. 各種コラゲナーゼに対するインヒビターの影響

ヒト歯肉コラゲナーゼ 34.2 m unit, ヒト好中球コラゲナーゼ 73.8 m unit, ウシ歯髄コラゲナーゼ 75.2 m unit, ウシ角膜コラゲナーゼ 78.7 m unit, ウシ大動脈

弓コラゲナーゼ 61.4 m unit, ヒヨコ皮膚コラゲナーゼ 91.8 m unit, 細菌性コラゲナーゼ 89.5 m unit のそれぞれに, Ⅲ-3-3) で得られたインヒビター 2,000 m unit を加えコラゲナーゼ活性に対する影響を検索した。

7. 他の蛋白質分解酵素に対するインヒビターの影響

トリプシン, サーマリシン, 膵臓エラスターゼにそれぞれ 4,000 m unit のインヒビターを加え, それら酵素活性に対するインヒビターの影響を検索した。

8. インヒビターのその他の性質

Ⅲ-3-3) で得られたインヒビターに以下の処理を行い, コラゲナーゼ阻害活性の変化を検索した。

1) 還元アルキル化

インヒビター標品に終濃度 10 mM のジチオスレイトールを加え, 室温で 2 時間放置し, ジスルフィド結合を還元した。つぎに生成した SH 基の保護のためにヨード酢酸を終濃度 20 mM となるように加え, 遮光したまま室温で 30 分間放置し, SH 基をアルキル化した。反応終了後緩衝液 A に透析し, コラゲナーゼ阻害活性の変化を検討した。

2) APMA 処理

終濃度 1 mM となるように APMA をインヒビター標品に加え, 35°C, 3 時間インキュベーションを行った。緩衝液 A に透析後コラゲナーゼ阻害活性の変化を検討した。

3) 加熱処理

60°C の恒温水槽中でインヒビター標品を 30 分間インキュベーションし, コラゲナーゼ阻害活性の変化を検討した。

9. 蛋白量の測定

蛋白量は Lowry 法の改良法である Hartree 法²⁵⁾ で測定し, 標準蛋白質として BSA を使用した。

IV. 実 験 結 果

1. コラゲナーゼインヒビターの精製

精製過程ならびにその結果を表 1 に総括した。

1) CM-52 カラムクロマトグラフィー

非吸着画分にはコラゲナーゼ阻害活性は認められず,

表 1 KB 細胞産生コラゲナーゼインヒビターの精製

	総容量 (ml)	蛋白質 (mg)	単位 (unit)	比活性 (u/mg)	回収率 (%)	精製度 (倍)
培養上清濃縮液	280	4,172	4,480	1.07	100	1
CM-I	20	1,896	2,634	1.37	58.8	1.3
CM-II	17.5	245	1,161	4.88	25.9	4.6
G-I	5.0	15.5	616.5	39.77	13.8	37.2
G-II	7.0	0.97	480.2	495.05	10.7	462.7

図 1 CM-52 カラムクロマトグラフィー

各画分の 280 nm での吸光度を●で示し、活性化コラゲナーゼ 450 m unit に対する各画分 150 μ l の阻害率(%)を○で示した。Eより吸着成分を溶出した。図中 I、II の画分の溶出液をブールし、以後の精製に供した。

図 2 ウルトロゲル AcA 54 カラムクロマトグラフィー

各画分の 280 nm での吸光度を●で示し、活性化コラゲナーゼ 200 m unit に対する各画分 100 μ l の阻害率(%)を○で示した。図中の|—|の画分の溶出液をブールし、以後の実験に供した。

塩化ナトリウムで溶出する画分にコラゲナーゼ阻害活性が存在し、2相性のピークを示した。阻害活性を有する画分を一緒にし、再度 CM-52 カラムで展開したが、前回と同様の結果を得た。この結果を図 1 に示した。画分数 238~260 (総容量 115 ml), 画分数 261~281 (総容量 105 ml) をそれぞれ集め、1 M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.8) で中和し、緩衝液 A に透析した。その後 Immiscible CX-10 (Millipore 社) を用いた限外濾過によって濃縮し、それぞれを仮に CM-I, CM-II と名づけた。この操作によってインヒビターは培養上清濃縮液

より CM-I で約 1.3 倍, CM-II で約 4.6 倍精製された。

2) ゲルクロマトグラフィー

CM-52 カラムクロマトグラフィーによって得られた CM-I, CM-II のそれぞれについてカラムクロマトグラフィーを行った。

a CM-I のゲルクロマトグラフィー

CM-I をサイズ 2.5×82.5 cm のカラムを用い、流速 5.9 $\cdot$ cm⁻¹ $\cdot$ h⁻¹ で展開した溶出パターンを図 2 に示した。

図3 ウルトロゲル AcA 54 カラムクロマトグラフィー

各画分の 280 nm での吸光度を●で示し、活性化コラゲナーゼ 125 m unit に対する各画分 35 μ l の阻害率(%)を○で示した。図中の |—| の画分の溶出液をブールし、以後の実験に供した。

図4 活性化コラゲナーゼに対するインヒターの影響

阻害活性のピークは OA と Mb の中間の分子量を示す画分数53に位置し、分子量約 3.2 万と推定された。

画分数49~59の溶出液を一緒にし Immersible CX-10 を用いて濃縮した後、再度ゲルクロマトグラフィーを行い、Immersible CX-10 を用いて 5 ml まで濃縮し（以後 G-I とよぶ）、以後の実験に供した。

インヒターはこの精製操作によって培養上清濃縮液から37.2倍に精製された。

b. CM-II のゲルクロマトグラフィー

CM-II をサイズ 2.5×83 cm のカラムを用い、流速 5.63 ml・cm⁻¹・h⁻¹ で展開した溶出パターンを図3に示した。コラゲナーゼ阻害活性のピークは Mb よりやや小さい分子量を示す画分数66に位置し、分子量約1.65 万と推定された。

画分数62~72の溶出液を一緒にし、Immersible CX-10 を用いて 7.0 ml まで濃縮し（以下 G-II とよぶ）、以後の実験に供した。この精製操作により培養上清濃縮液から約 463 倍精製された。

図5 コラゲナーゼ阻害活性の電気泳動による確認

- a コラーゲン
- b コラーゲン+コラゲナーゼ+G-I
- c : コラーゲン+コラゲナーゼ+G-II
- d : コラーゲン+コラゲナーゼ

2. 活性化コラゲナーゼに対するインヒターの影響

結果を図4に示した。ゲルクロマトグラフィーで得られた G-I、G-II はそれぞれ濃度依存性にコラゲナーゼを阻害した。

3. コラゲナーゼ阻害活性の電気泳動による確認

結果を図5に示した。b、c では対照である d と比較

表 2 各種コラゲナーゼに対するインヒビターの影響

コラゲナーゼ	酵素活性 (munit)				
	対照	+ G I	*	+ G II	*
ヒト 歯 肉	34.2	0	(100)	1.5	(95.5)
ヒト好中球	73.8	0	(100)	14.1	(80.7)
ウシ 歯 髄	75.2	0	(100)	1.3	(98.2)
ウシ 角 膜	78.7	0	(100)	4.0	(94.5)
ウシ大動脈弓	61.4	0	(100)	0.7	(98.8)
ヒヨコ皮膚	91.8	0	(100)	1.0	(98.9)
細菌 菌 (Cl. histolyticum)	89.5	100.4	(0)	91.3	(0)

* 阻害 (%)

表 3 他の蛋白質分解酵素に対するインヒビターの影響

酵 素	基 質	酵素活性 (吸光度)		
		対照	+ G- I (阻害%)	+ G- II (阻害%)
トリプシン (2 ng)	カゼイン	* 0.222	0.239 (0)	0.241 (0)
サーモリシン (3 ng)	カゼイン	* 0.226	0.245 (0)	0.243 (0)
膵臓エラハターゼ (30 ng)	ユラスチンコンゴレッド	** 0.059	0.085 (0)	0.056 (5.0)

* 280 nm での吸光度 ** 495 nm での吸光度

すると、コラゲナーゼによるコラーゲンの特異的分解産物である α_A , α_B の減少が認められた。

4. 各種コラゲナーゼに対するインヒビターの影響

結果を表 2 に示した。インヒビター標品 G- I, G- II の両者ともに細菌性コラゲナーゼに対する阻害活性は認められなかった。

また両者とも由来の異なる種々な動物性コラゲナーゼに対して阻害活性を有し 94~100% の阻害を示した。ヒト好中球コラゲナーゼに対しては、G- I は100%、G- II は80.7%の阻害を示した。

5. 他の蛋白質分解酵素に対するインヒビターの影響

表 3 に示したように、トリプシン、サーモリシン、膵臓エラハターゼに対する阻害活性は認められなかった。

6. インヒビターのその他の性質

結果を表 4 に示した。G- I, G- II の両者とも還元アルキル化によってコラゲナーゼ阻害活性を喪失した。

60℃ 加熱処理および 1 mM APMA 処理ではコラゲナーゼ阻害活性に変化はみられなかった。

V. 考 察

まず今回の実験では血清由来のコラゲナーゼインヒビター^{26,27)}の影響を避ける目的で、KB 細胞を無血清培養

表 4 インヒビターのその他の性質

処 理	コラゲナーゼインヒビター活性 (m unit)	
	G- I (対照)	G- II (対照)
還元アルキル化	0 (32.6)	0 (36.1)
APMA 処 理	32.8 (33.4)	18.6 (17.0)
加 熱 処 理	34.7 (39.6)	37.5 (42.3)

液で培養し、KB 細胞が培養液中に産生するコラゲナーゼインヒビターについて研究を行った。

得られた培養上清中のコラゲナーゼインヒビターは、Vater らの報告¹²⁾と同様 CM-52 セルロースカラムに結合した。さらに 0→0.7 M までの塩化ナトリウムによる直線的濃度勾配法によって溶出し分取すると、各画分のコラゲナーゼ阻害活性のパターンは Yasui らの報告²⁸⁾と同様 2 相性のピークを示した。

Kishi らはシアル酸残基数の相違により、等電点の異なる 2 種のコラゲナーゼインヒビターを報告²⁹⁾、Murphy らはコア蛋白質形成後に修飾する糖鎖構造の違いにより、等電点と分子量の異なる 2 種の TIMP の前駆体が存在することを報告している³⁰⁾

Mercer¹⁴⁾, Sakyo³¹⁾, Bunning³²⁾ らは Con-A カラムに結合するコラゲナーゼインヒビターと結合しないコラゲナーゼインヒビターの存在を報告している。

今回の CM カラムによる分画の結果も、このような糖鎖構造の相違によると想像されるが、その詳細や意義については検討されていない。

ゲルクロマトグラフィー後のコラゲナーゼ阻害物質は、G-I、G-II の両者とも活性化コラゲナーゼを濃度依存性に阻害し、電気泳動法によってもコラゲナーゼを阻害する結果が得られた。さらに両者は由来の異なる種動物性コラゲナーゼに対しては阻害活性を示し、種特異性のないことが判明した。

しかし、細菌性コラゲナーゼに対して阻害活性は示さなかった。

以上の結果は、すでに報告されているコラゲナーゼインヒビターの性質と一致している^{11-13, 28, 29, 35)}。

しかし好中球コラゲナーゼに対しては、同一単位数を使用したにもかかわらず、G-II は G-I と比較すると阻害が弱かった。

好中球コラゲナーゼは基質特異性、 α_2 -M に対する挙動、分子量、抗原性など^{33, 34)}の点で動物性コラゲナーゼと異なっている。

この実験結果が、G-I と G-II の特異性の違いを示唆しているのか、あるいは G-II の蛋白濃度が低いためコラゲナーゼインヒビターが管壁などへ吸着した結果なのかは明確でないが、Vater⁷⁾, Bunning³²⁾ の報告でも好中球コラゲナーゼに対する阻害が弱いように見受けられる。

トリプシン、サーモリシン、膵臓エラスターゼに対して阻害活性がないことは、他の多くの報告と同様であった^{7, 28, 29, 36)}。

報告されているコラゲナーゼインヒビターは比較的熱安定で、それは分子内の S-S 結合に起因すると考えられている。Kishi³⁾ らはウシ歯髄コラゲナーゼインヒビターに 6 個²⁹⁾, Docherty³⁾ らはヒト皮膚線維芽細胞由来コラゲナーゼインヒビターに 6 個の S-S 結合を認めている¹⁶⁾。

今回の実験でも、G-I、G-II とともに熱処理に対してかなり安定であった。さらに、還元アルキル化によってコラゲナーゼ阻害活性が消失したことは、少なくとも活性発現に必要な S-S 結合が両者に存在することを示している。また、APMA 処理に対する結果はすでに報告されているコラゲナーゼインヒビターと同様であった。

以上より KB 細胞はコラゲナーゼインヒビターを産生することが明らかとなったが、分子量に関しては、G-I は 3.2 万、G-II は 1.65 万であり、ヒト皮膚線維芽細胞由来のコラゲナーゼインヒビターの 2.85 万と比較すると G-II はかなり小さな値であった。

また、これら KB 細胞のインヒビターがいわゆる

TIMP に属するのかどうかを明確にするためには、セラチナーゼやストロメライシン^{38, 37)}など他のメタロプロテアーゼに対する阻害実験が必要であろう。

腫瘍浸潤に、動物性コラゲナーゼやタイプ IV コラゲナーゼが関与していることが知られているが¹⁷⁾、種々の腫瘍細胞がコラゲナーゼインヒビターを産生することも報告されている³⁸⁻⁴⁰⁾。このようにコラーゲン分解酵素とその阻害物質を腫瘍細胞が同時に産生する理由については明確にされていないが、Hicks³⁾ らは浸潤傾向の強い腫瘍細胞は、浸潤傾向の弱い腫瘍細胞や正常細胞と比較すると TIMP の産生量が 1/10~1/20 であると報告している⁴¹⁾。

また DeClerck³⁾ らは *in vivo* では血管内皮細胞が腫瘍細胞に反応して TIMP を産生すると報告している⁴²⁾。

現在、局所でのコラゲナーゼ阻害物質レベルが腫瘍浸潤に重要な役割を果たしていると考えられている^{42, 43)}が、KB 細胞が *in vivo* でもコラゲナーゼインヒビターを産生するのかどうかは臨床的にも興味深く、酵素阻害物質としての臨床応用の可能性とともに今後の研究課題である。

VI. 結 語

1. KB 細胞はコラゲナーゼインヒビターを無血清培養液中で産生した。
2. コラゲナーゼインヒビターは CM-52 カラムで 2 相性のピークを示し、それぞれの分子量はゲルクロマトグラフィーで 3.2 万と 1.65 万であった。
3. コラゲナーゼインヒビターは活性化コラゲナーゼを濃度依存性に阻害した。
4. コラゲナーゼインヒビターは細菌性コラゲナーゼを阻害せず、由来の異なる種動物性コラゲナーゼを阻害した。トリプシン、サーモリシン、膵臓エラスターゼは阻害しなかった。
5. コラゲナーゼインヒビターは熱処理に対して安定であり、APMA 処理に対しても安定であったが、還元アルキル化によってコラゲナーゼ阻害活性を失った。

稿を終えるにあたり、終始ご懇切なるご指導、ご校閲を賜った河合幹教授ならびに本学生化学教室早川太郎教授に深謝いたします。

さらに本研究を進めるにあたり終始ご指示下さった生化学教室来住準一博士、ご協力・ご援助を頂いた生化学および第 2 口腔外科学教室各位に深謝いたします。

引用文献

- 1) Gross, J. and Lapierre, C.M.: Collagenolytic activity in amphibian tissues: A tissue culture

- assay. *Proc Natl Acad Sci USA* 48: 1014-1022 1962.
- 2) Nagai, Y., Lapiere, C.M., et al.: Tadpole Collagenase. Preparation and Purification. *Biochemistry* 5: 3123-3130 1966.
- 3) Weiss, J.B. and Jayson, M.C.B.: *Collagen in Health and Disease*. Ed 1, Churchill Livingstone, New York, 1982, p121-134.
- 4) 永井 裕, 藤本大三郎, 他: コラーゲン実験法. 第1版, 講談社, 東京, 1985, 250-271頁.
- 5) Harper, E.: Collagenases. *Ann Rev Biochem* 49: 1063-1078 1980.
- 6) Harris, E.D. and Welgus, H.G.: Regulation of the Mammary Collagenases. *Coll Rel Res* 4: 493-512 1984.
- 7) Vater, C.A. and Nagase, H.: Purification of an Endogenous Activator of Procollagenase from Rabbit Synovial Fibroblast Culture Medium. *J Biol Chem* 258: 9374-9382 1983.
- 8) Welgus, H.G., Stricklin, G.P., et al.: A specific inhibitor of vertebrate collagenase produced by human skin fibroblast. *J Biol Chem* 254: 1938-1943 1979.
- 9) Cawston, T.E., Galloway, A., et al.: Purification of Rabbit Bone Inhibitor of Collagenase. *Biochem J* 165-195 1981.
- 10) Welgus, H.G., Jeffrey, J., et al.: Human skin fibroblast collagenase. Interaction with Substrate and Inhibitor. *Coll Rel Res* 5: 167-179 1985.
- 11) Stricklin, G.P. and Welgus, H.G.: Human Skin Fibroblast Collagenase Inhibitor. *J Biol Chem* 258: 12252-12258 1983.
- 12) Vater, C.A. and Mainardi, C.L.: Inhibition of Human Collagenase from Cultures of Human Tendon. *J Biol Chem* 254: 3045-3053 1979.
- 13) Murphy, G., Cawston, T.E., et al.: An inhibitor of collagenase from human amniotic fluid. *Biochem J* 195: 167-170 1981.
- 14) Mercer, E., Cawston, T.E., et al.: Purification of a metalloproteinase inhibitor from human rheumatoid synovial fluid. *Biochem J* 231: 505-510 1985.
- 15) Carmichael, D.F., Sommer, A., et al.: Primary structure and cDNA cloning of human fibroblast collagenase inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 2407-2411 1986.
- 16) Docherty, A.J.P., Lyons, A., et al.: Sequence of human tissue inhibitor of metalloproteinases and its identity to erythroidpotentiating activity. *Nature* 318: 66-69 1985.
- 17) Liotta, L.A., Rao, C.N., et al.: Tumor Invasion and the Extracellular Matrix. *Lab Invest* 49: 636-649 1983.
- 18) Eagle, H.: Propagation in a fluid medium of a epidermoid carcinoma, strain KB. *Proc Soc Ex Biol Med* 89: 362-364 1955.
- 19) Kishi, J., Iijima, K., et al.: Dental Pulp Collagenase: Initial demonstration and characterization. *Biochim Biophys Res Commun* 86: 27-31 1979.
- 20) Kobayashi, S. and Nagai, Y.: Human Leucocyte Neutral Proteases, with Special Reference to Collagen Metabolism. *J Biochem* 84: 559-567 1978.
- 21) Peterkofsky, B.: Bacterial Collagenase. *Methods in Enzymology* 82: 453-471 1976.
- 22) Terato, K. and Nagai, Y.: A RAPID METHOD OF COLLAGENASE ACTIVITY USING ¹⁴C-LABELED SOLUBLE COLLAGEN AS SUBSTRATE. *Biochim Biophys Acta* 445: 753-762 1976.
- 23) Sellers, A. and Cartright, E.: Evidence that Latent Collagenase and Enzyme-Inhibitor Complexes. *Biochem J* 163: 303-307 1977.
- 24) Weber, K. and Osborn, M.: The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem* 244: 4406-4412 1969.
- 25) Hartree, E.F.: Determination of Protein: A modification of the lowry method that gives a linear photometric response. *Anal Biochem* 48: 422-427 1972.
- 26) Travis, J. and Salveson, G.: Human Plasma Proteinase Inhibitors. *Ann Rev Biochem* 52: 655-709 1983.
- 27) Cooper, T.W., Eisen, A.Z., et al.: Platelet-derived collagenase inhibitor: Characterization and subcellular localization. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 2779-2783 1985.
- 28) Yasui, N., Hori, H., et al.: Production of Collagenase Inhibitor by the Growth Cartilage of Embryonic Chick Bone: Isolation and Partial Characterization. *Coll Res* 1: 59-72 1981.
- 29) Kishi, J. and Hayakawa, T.: Purification and Characterization of Bovine Dental Pulp Collagenase Inhibitor. *J Biochem* 96: 395-404 1984.
- 30) Murphy, G. and Werb, Z.: Tissue inhibitor of metalloproteinases. Identification of precursor forms synthesized by human fibroblast in culture. *Biochim Biophys Acta* 839: 214-218 1985.
- 31) Sakyō, K. and Ito, A.: Hormonal control of collagenase inhibitor production in rabbit uterine cervical fibroblast like cells. *Biochim Biophys Acta* 883: 517-522 1986.
- 32) Bunning, R.A.D., Murphy, G., et al.: Me-

- talloproteinase inhibitors from bovine cartilage and body fluid. *Eur J Biochem* 139: 75-80 1984.
- 33) Horowitz, A.L. and Hance, A.L.: Granulocyte collagenase: Selective digestion of type I relative to type III collagen. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 897-901 1977.
- 34) Hasty, K.A., Hibbs, M.S., et al.: Heterogeneity among human collagenases demonstrated by monoclonal antibody that selectively recognizes and inhibits human neutrophil collagenase. *J Exp Med* 159: 1455-1463 1984.
- 35) Nagayama, M., Sakamoto, S., et al.: Mouse Bone Collagenase Inhibitor: Purification and Partial Characterization of the Inhibitor from Mouse Calvaria Cultures. *Arch Biochem Biophys* 228: 653-659 1984.
- 36) Sellers, A., Murphy, G., et al.: Rabbit bone collagenase inhibitor blocks the activity of other neutral metalloproteinases. *Biochem Biophys Res Commun* 87: 581-587 1979.
- 37) Chin, J.R., Murphy, G., et al.: Stromelysin, a connective tissue-degrading metalloendopeptidase secreted by rabbit synovial fibroblasts in parallel with collagenase. *J Biol Chem* 260: 12367-12376 1985.
- 38) Welgus, H.G., and Stricklin, G.P.: Human skin fibroblast collagenase inhibitor. *J Biol Chem* 258: 12259-12264 1983.
- 39) Shavit, Z.B., Teitelbaum, S.L., et al.: Differentiation of a human leukemia cell line and expression of collagenase inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 5380-5384 1985.
- 40) Welgus, H.G., Connolly, N.L., et al.: 12-o-Tetradecanoyl-phorbol-13-acetate-differentiated U 937 cells express a macrophage like profile of neutral proteinases. *J Clin Invest* 77: 1675-1681 1986.
- 41) Hicks, S.J., Ward, R.V., et al.: A fibrosarcoma cells: Growth properties and secretion of collagenase and metalloproteinase inhibitor by tumor cell lines. *Int J Cancer* 33: 835-844 1984.
- 42) DeClerck, Y.A. and Laug, W.E.: Inhibition of Tumor Cell Collagenolytic Activity by Bovine Endothelial Cells. *Cancer Res* 46: 3580-3586 1986.
- 43) Thorgeirsson, U.P., Liotta, L.A., et al.: Effect of Natural Protease Inhibitors and a Chemoattractant on Tumor Cell Invasion *In Vitro*. *JNCI* 69: 1049-1054 1982.