尿路癌における cathepsin B 様物質の検討

広島大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 碓井 亜教授)

上 田 光 孝

A STUDY ON CATHEPSIN B-LIKE SUBSTANCE IN CANCER OF THE URINARY TRACT

Mitsutaka Ueda

Department of Urology, Hiroshima University School of Medicine

(Director: Prof. T. Usui)

Cathepsin B, a cysteine proteinase, has been shown to be increased in tumor tissue and to be responsible for the process of invasion and metastasis. To study the biochemical characteristics of cathepsin B-like substance in the tissue of a non-cancerous kidney and some urologic cancer tissues, we extracted cathepsin B-like substances from a non-cancerous human kidney tissue, human renal tumor, human renal pelvic tumor and human bladder tumor. The cathepsin B-like substance extracted from the non-neoplastic human kidney has a molecular weight of approximately 28,000. On the result of western blotting with anti-human liver cathepsin B antibody, two types of protein were observed in the fraction extracted from urologic cancer tissues. The molecular weights of them were 28,000 and 35,000, respectively. Both types of cathepsin B-like substances had the same activities for benzyloxy-carbonyl-L-arginine-L-arginine-4-methyl-7-coumarylamide, and both activities were inhibited by (L-3-trans-carboxyoxiran-2-carbonyl)-L-leucyl-agmatin.

These findings suggest that both cancer cells of the renal parenchyma and urothelium secrete cathepsin B-like protease which express not only a normal cathepsin B but also a higher molecular weight of cathepsin B-like protease and that a higher one plays an important role in a process of invasion.

Key words: cathepsin B, urological cancer

要旨: 非癌腎組織, 腎癌組織および尿路上皮癌組織から cathepsin B 様物質を抽出精製し, その特性について比較した。組織抽出液からの精製は Sephadex G-25カラムクロマトグラフィーおよび DEAE-Sephacel, CM Bio-Gel を用いたイオン交換クロマトグラフィーで行い, 定性は benzyloxy-carbonyl-L-arginine-4-methyl-7-coumarylamide (Z-Arg-Arg-MCA) を基質として用いた cathepsin B 様活性値の測定と共に, 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (10% SDS-PAGE), 抗ヒト肝 cathepsin B 抗体を用いた western blot で行った。

非癌腎組織から抽出精製された cathepsin B 様物質は分子量約28,000であったのに対し, 腎癌組織および腎盂癌組織から抽出精製された cathepsin B 様物質は分子量約28,000と約35,000の2種のがみられた。膀胱癌組織から抽出精製された cathepsin B 様物質は high stage の腫瘍では分子量約28,000と約35,000の2種のがみられたが, low stage の腫瘍では約28,000のもののみであった。

尿路癌組織では cathepsin B 様プロテアーゼが産生されており, より分子量の大きい cathepsin B 様プロテアーゼは癌の浸潤過程に重要な役割を果たすものと考えられた。

キーワード: cathepsin B, 尿路癌

緒 言

癌の転移の第1段階は基底膜を含む細胞外マトリックスの破壊であり、癌細胞が産生・放出するプロテアーゼが重要な役割をはたしている。また、尿路癌においても、担癌患者尿中にプロテアーゼの cathepsin B 様酵素活性が高く、また癌細胞内に免疫学的に cathepsin B 抗体に反応する物質が局在する¹⁾が、癌細胞が産生する cathepsin B 様物質は正常人尿中 cathepsin B と同様のものか否かは不明である。今回、非癌腎から cathepsin B を、また、腎細胞癌、尿路上皮癌組織の抽出液から cathepsin B 様物質を抽出し、その生化学的特性について検討したので報告する。

対象と方法

1) 組織中 cathepsin B 様物質の抽出

ヒト腎組織は良性疾患で腎摘除術の行われた切除組織を、腎細胞癌組織は、根治的腎摘除術によって得られた組織の充実性病巣部を、また、膀胱癌および腎盂癌は、根治的切除術あるいは膀胱部分切除術によって得られた腫瘍組織を使用した。

今回実験に供した腫瘍は、腎細胞癌6例、腎盂癌2例、膀胱癌4例であり、これらの抽出はそれぞれ個別に行った。Table 1 にその背景を示す。

なお、摘出組織は直ちに十分量の生理食塩水にて洗浄し、使用まで -80°C で保存した。

cathepsin B の抽出方法は、組織重量を正確に測定、細断し、これに2倍量のbuffer (1%NaCl/0.1% EDTA/2%(v/v) butan-1-ol) を加えて混和後、 $1,350\times\text{g}$, 30分間遠心し、上清を1M-HCl でpH 4.2に調整、 37°C で4時間、その後 4°C で一晩静置した。ついで $1,350\times\text{g}$, 30分間遠心、その上清の20~80%硫酸分画を採取した。得られた分画を1mM EDTA 加20 mM 酢酸 buffer (buffer A, pH 5.5) にて溶解後、 $20,000\times\text{g}$, 30分間遠心して不溶物を除去した。この遠心上清をSephadex G-25 (Pharmacia AB, Uppsala, Sweden) column chromatography (2cm $\times$ 20cm) に移し、buffer A で溶出し、溶出液をCentriprep10,000 (Amicon, Inc., MA, USA) にて5倍に濃縮した。これをCM Bio-Gel (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) column chromatography (2cm $\times$ 20cm) に移し、20mM 酢酸 buffer (pH 5.5) にて洗浄後、80 mM NaCl 加20mM 酢酸 buffer で溶出し、これをCentriprep10,000で5倍に濃縮した。得られた濃縮液はDEAE-Sephacel (Pharmacia AB, Uppsala, Sweden) column chromatography (1cm $\times$ 10cm) に

Table 1 Patients profile

Case No.	Organ	TNM	Grade
1.	Renal parenchyma	T2N0M0	G2
2.	Renal parenchyma	T1N0M0	G1
3.	Renal parenchyma	T2N0M0	G2
4.	Renal parenchyma	T2N0M0	G2
5.	Renal parenchyma	T2N1M0	G2
6.	Renal parenchyma	T2N0M0	G2
7.	Renal pelvis	T2N0M0	G2
8.	Renal pelvis	T3N0M0	G3
9.	Bladder	T1N0M0	G2
10.	Bladder	TaN0M0	G1
11.	Bladder	T3N1M0	G3
12.	Bladder	T3N0M0	G3

移し、20mM 酢酸 buffer (pH 5.5) で溶出、この溶出液をCentricon10,000 (Amicon, Inc., MA, USA) で濃縮して定性検査に供した。

2) cathepsin B の定性および定量

cathepsin B 様酵素活性の測定はbenzyloxy-carbonyl-L-arginine-L-arginine-4-methyl-7-coumarylamide (Z-Arg-Arg-MCA, ペプチド研究所、大阪)を基質として用いたBarrettの方法²⁾に準じ、阻害剤として(L-3-trans-carboxyoxiran-2-carbonyl)-L-leucyl-agmatin (E-64, ペプチド研究所、大阪)を使用した。

抽出分画は10%sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electro-phoresis (SDS-PAGE) にて泳動後、gel をnitrocerullose膜 (Hybond-N^{TR}, Amersham International plc., England) にtransferし、3%skim milk 加PBS-0.1%Tween20で1晩、 4°C でblockingした。一次抗体として羊抗ヒト肝 cathepsin B 抗体 (The Binding Site, England) を使用し、染色はVECTASTAIN ABC キット (VECTER Laboratories, Inc., CA, USA)を用いた。以下の反応は常温で行い、次の反応に移る前には各5分間、3回のPBS-0.1%Tween20による洗浄を行った。nitrocerullose膜を200倍希釈羊抗ヒト肝 cathepsin B 抗体溶液と室温で1時間、ついで家兎抗羊ビオチン化抗体と1時間、さらにアビジン・ビオチン complex と30分間反応させた後、DAB 溶液と反応させ、呈色した。

結 果

1) cathepsin B の抽出 (Fig. 1, 2, Table 2)

非癌腎組織抽出液のイオン交換クロマトグラフィーの分離結果をFig. 1, 2に示す。CM Bio-Gel では、酢

Fig. 1 Elution profile of non-cancerous human kidney cathepsin B-like substance by ion-exchange chromatography on CM Bio-Gel.
○ : Protein ; ● : Z-Arg-Arg-MCA hydrolysing activity.

Fig. 2 Elution profile of non-cancerous human kidney cathepsin B-like substance by ion-exchange chromatography on DEAE-Sephacel.
○ : Protein ; ● : Z-Arg-Arg-MCA hydrolysing activity.

Table 2 Purification scheme of cathepsin B from human kidney

Stage	Protein (mg)	Total activity (μU)	Specific activity (μU/mg protein)	Purification (fold)
Kidny extract	37	2000	54.05	1
CM Bio-Gel	1.32	900	681.8	12.6
DEAE-Sephacel	0.12	650	5416.6	100.2

酸 buffer (Elusion Ne. 4～No. 8) および80mM NaCl 加酢酸 buffer (Elusion No. 32～No. 39) の溶出分画に A₂₈₀のピークがそれぞれみられたが、Z-Arg-Arg-MCA に対する活性を有するピークは80mM NaCl 加

酢酸 buffer 溶出分画 (Elusion No. 32～No. 43) にあり、DEAE-Sephacel では A₂₈₀および Z-Arg-Arg-MCA に対する活性は共に酢酸 buffer の溶出分画 (Elusion No. 3～No. 10) に存在した。各段階での非

Fig. 3 Molecular size of cathepsin B-like substance from non-cancerous human kidney.

(1) CM Bio-Gel 80mM fraction, (2) DEAE-Sephacel fraction, (3) Marker protein

(1) (2) (3)

Fig. 4 Immunoblotting of non-cancerous human kidney cathepsin B-like substance.

(1) Marker protein, (2) CM Bio-Gel fraction, (3) DEAE-Sephacel fraction

(1) (2) (3)

Fig. 5 Immunoblotting of human renal cell cancer and human urothelial cancer.

(1) non-cancerous human kidney cathepsin B-like substance, (2) Human renal cell cancer (Case 1), (3) Non-cancerous human kidney cathepsin B-like substance, (4) Renal pelvic cancer (Case 7), (5) Bladder cancer (Case 11), (6) Bladder cancer (Case 10)

(1) (2)

癌腎組織中 cathepsin B 様物質は Table 2 の如くで、37mg の粗抽出分画から120μg の最終分画が得られ、これは mg 蛋白量あたりの比活性でみると100.2倍に精製されたことになる。なお癌組織でも同様な溶出パターンを示し、腎癌および尿路上皮癌から抽出した分画は Z-Arg-Arg-MCA に対する活性を有し、これは非癌腎組織からの抽出物と同様に E-64 で阻害された。

Fig. 3 のごとく非癌組織の DEAE-Sephacel, および CM Bio-Gel で得られたレーン(2)の分画は SDS-PAGE 上、1本の染色バンドに精製されており、さらに抗ヒト肝 cathepsin B 抗体を用いた western blot においても Fig. 4 のごとく分子量約28,000の単一な染色バンドとしてレーン(3)に認められた。

尿路癌組織の DEAE-Sephacel, および CM Bio-Gel

によって得られた分画を western blot にて非癌腎組織の精製分画と比較した。Case 1のレーン(2)の腎癌、Case 7のレーン(4)の腎盂癌のいずれの組織においても分子量28,000と35,000の2本の染色バンドが認められた。今回検討した腎癌および腎盂癌症例では全例同じ結果であった。また、膀胱癌においても high stage であった Case 11, 12の癌組織に同様な2本の染色バンドが見られたのに対して low stage の Case 9, 10の癌組織では分子量28,000の単一の染色バンドのみであった (Fig. 5)。また、low stage の膀胱癌組織の染色バンドの抗 cathepsin B 抗体に対する反応性は、high stage の膀胱癌組織に比較して弱い結果であった。

考 案

カテプシン群は細胞内小器官であるリソソーム内に存在するプロテアーゼであり、B, H, L, D などが同

定されている³⁾⁴⁾。これらのカテプシン群プロテアーゼは細胞内蛋白代謝に関与しており、生体内においてはプロテアーゼインヒビターによって活性が調節されていると考えられている。

cathepsin B はプロテオグリカン、ラミニン、アクチン、トロポニンなどの多くの蛋白基質に対して分解能を有しており、生体内組織では肝臓、腎臓に多く分布している³⁾⁴⁾。腎における cathepsin B の局在は著者の免疫組織学的検討では¹⁾、主として近位尿細管にあり、糸球体や集合管には認められなかった。今回、非癌腎組織から抽出精製した cathepsin B は、分子量約 28,000 であり、従来の報告された肝 cathepsin B の 23,000 よりも若干大きい結果であった。酵素は proenzyme として産生され、エラスターゼなどの他のプロテアーゼの分解、修飾を受けて活性型になるといわれているが、Buttle らが述べているように⁵⁾、cathepsin B には数種類の分子量のものが存在し、組織あるいは細胞によって生成されるものが異なっていると考えられた。

癌の浸潤、転移の第一段階として、基底膜の破壊が必要であり、そのために癌細胞がプロテアーゼを産生、放出すると考えられている⁶⁾。また、種々の癌細胞は cathepsin B 様プロテアーゼを産生することが報告されており^{7)~15)}、黒色腫、卵巣癌などで転移性の高いもののほど cathepsin B 様活性は細胞膜分画に集中し、細胞外に多く放出されるという報告⁶⁾⁷⁾や、膀胱癌で浸潤性の高いもののほど cathepsin B 活性は細胞膜周辺に増強していると報告⁸⁾されている。さらに cathepsin B の特異的阻害剤である E-64 が動物実験で肺転移を抑制したとの報告¹⁶⁾もあり、cathepsin B が癌の浸潤、転移に関与していると推測される。

今回検討した腎細胞癌および尿路上皮癌組織の抽出液の western blot による検討では、癌細胞が産生している cathepsin B 様プロテアーゼには分子量の異なる 2 種類のものがあり、1 つは正常腎に存在する cathepsin B と同じ分子量で、他の 1 つはそれよりも分子量の大きいものであった。一般に癌細胞においては蛋白結合糖鎖の processing に異常のあるものが多いとされており、転移癌における cathepsin B 様プロテアーゼも異常な processing product として細胞外に放出されていると考えられる。これらのプロテアーゼは正常のものと同様な免疫活性を有しているが¹⁾、分子量は 35,000 と大きい結果であった。さらに膀胱癌組織で、low stage の腫瘍組織抽出液では、正常と同一な分子

量の蛋白の発現のみが見られたが、high stage の腫瘍組織抽出液では 2 種の分子量の蛋白が認められ、分子量の大きい蛋白の抗 cathepsin B 抗体に対する反応性が強かった。尿路上皮癌でも、浸潤性の強い腫瘍ほど cathepsin B 様活性は細胞膜周辺に増強するという報告⁸⁾や深達度の高い症例ほど抗 cathepsin B 抗体に対する染色性が高度である¹⁾ことより、癌細胞内で cathepsin B 様プロテアーゼの産生が亢進し、とくに浸潤性の強いものは分子量の大きい cathepsin B 様プロテアーゼを過剰に産生していると考えられる。

cathepsin B は炎症などでも増加する可能性はあるが、今回得られた成績では癌組織中に存在する cathepsin B 様プロテアーゼは浸潤度の高いものでは分子量が明らかに大きく、これが癌の浸潤・転移に重要な働きをしていると推測される。この cathepsin B 様プロテアーゼに対する血中あるいは尿中レベルを測定することにより、転移ハイリスク患者のスクリーニングや後療法の適応を考慮する指標として応用できる可能性があると考えられる。

結 語

1. 非癌腎組織から抽出した cathepsin B 様物質は分子量約 28,000 であった。

2. 腎癌、腎盂癌および膀胱癌組織からの抽出液の western blot の結果より癌細胞が生成している cathepsin B 様物質は主に 2 種類あり、分子量約 28,000 のものと約 35,000 のものであり、両者共に非癌腎組織中 cathepsin B 様物質と同様な酵素活性、免疫活性を有していた。

3. 浸潤性の高い癌細胞では正常の cathepsin B より分子量の大きい異常 cathepsin B 様プロテアーゼの産生が亢進していると考えられる。

稿を終えるにあたり、御校閲いただいた恩師碓井亜教授に感謝いたします。

文 献

- 1) 上田光孝：尿路癌患者におけるカテプシン B 様物質の検討。日泌尿会誌，84，355—363，1993。
- 2) Barrett, A.J. and Kirschke, H.: Cathepsin B, H, and L. in L. Lorand (ed.), Methods in Enzymology, 80, p. 535—569, Academic Press, London, 1981.
- 3) 勝沼信彦：リソゾーム・プロテアーゼの機能と調節。最新医学，43，720—724，1988。
- 4) 勝沼信彦：リソゾーム・システインプロテイナーゼと病態。実験医学，5，927—930，1987。
- 5) Buttle, D.J., Abrahamson, M., Burnett, D., Mort, J.S., Barrett, A.J., Dando, P.M. and Hill, S.L.:

- Human sputum cathepsin B degrades proteoglycan, is inhibited by α_2 -macroglobulin and is modulated by neutrophil elastase cleavage of cathepsin B precursor and cystatin C. *Biochem. J.*, **276**, 325–331, 1991.
- 6) Liotta, L.A.: Tumor invasion and metastasis — Role of the extracellular matrix: Rhoads memorial award lecture. *Cancer Res.*, **46**, 1–7, 1986.
 - 7) Sloane, B.F., Honn, K.V., Sadler, J.G., Turner, W.A., Kimpson, J.J. and Taylor, J.D.: Cathepsin B activity in B16 melanoma cells: A possible marker for metastatic potential. *Cancer Res.*, **42**, 980–986, 1982.
 - 8) Weiss, R.E., Liu, B.C.S., Ahlering, T., Dubeau, L. and Droller, M.J.: Mechanism of human bladder tumor invasion: Role of protease cathepsin B. *J. Urol.*, **144**, 798–804, 1990.
 - 9) Poole, A.R. and Tiltman, K.J.: Difference in secretion of the proteinase cathepsin B at the edge of human breast carcinomas and fibroadenomas. *Nature*, **273**, 545–547, 1978.
 - 10) Dufek, V., Matous, B. and Kral, V.: Serum alkaline-stable acid thiol proteinase—a possible marker for primary liver carcinoma. *Neoplasma*, **31**, 99–107, 1984.
 - 11) Reclies, A.D., Tiltman, K.J., Stoker, T.A.M. and Poole, A.R.: Secretion of proteinase from malignant and nonmalignant human breast tissue. *Cancer Res.*, **40**, 550–556, 1980.
 - 12) Graf, M., Baici, A. and Strauli, P.: Histochemical localization of cathepsin B at the front of the rabbit V2 carcinoma. *Lab. Invest.*, **45**, 587–596, 1981.
 - 13) Mort, J.S., Recklies, A.D. and Poole, A.R.: Release of Cathepsin B Precursors from Human and Murine Tumors. *Intracellular Protein Catabolism*, p. 243–245, 1985.
 - 14) Ryan, R.E., Crissman, J.D., Honn, K.V. and Sloane, B.F.: Cathepsin B-like activity in viable tumor cells isolated from rodent tumors. *Cancer Res.*, **45**, 3636–3641, 1985.
 - 15) Reckles, A.D., Poole, A.R. and Mort, S.: A cysteine proteinase from human breast tumors is immunologically related to cathepsin B. *Biochem. J.*, **207**, 633–636, 1982.
 - 16) Weiss, R.E., Hodge, D.E., Fair, W.R. and Liu, B.C.S.: In vivo inhibition of pulmonary metastasis with the use of protease inhibitor. *J. Urol.*, **147**, 403A, 1992.

(1994年11月7日受付, 1995年5月15日受理)