ヒト前立腺腫瘍のArginase

黛 卓爾, 今井強一, 山中英寿

群馬大学医学部泌尿器科教室

(主任: 志田圭三教授)

(昭和53年1月12日受付)

I. 緒 言

哺乳動物肝臓に存在する arginase (l-arginine-ureohydrolase E.C.3. 5. 3. 1) は尿素サイクルの一員として重要な役割を演じている¹⁾が, 肝臓外臓器に存在する arginase の存在意義については現在のところ明らかにされていない。

私達はさきにラットを対象とした検討において前立腺にも相当量の arginase 活性が存在し, その活性がホルモン環境により変動すること²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾及び arginase が proline, glutamate への変換に関与していることを報告している⁶⁾。また Pegg⁷⁾ はラット前立腺のポリアミン合成系に arginase が関与していると報告している。

一方腫瘍増殖と arginase との関連については, 実験動物を対象としていくつかの報告がみられているが⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾, ヒト前立腺腫瘍の arginase についての検討報告はみられない。今度私達は前立腺肥大結節組織及び癌組織の arginase 活性について検討を加え, さらに前立腺肥大結節組織に多量に存在する亜鉛に着目し, 亜鉛と arginase 活性との関連について検討を加え, いくつかの新知見を得たので報告する。

II. 実験材料と方法

材料: 前立腺被膜下剔除術によって得られた前立腺肥大結節組織を用いた。組織はただちに氷冷し研究室に運び実験に使用するまで -20°C にて保存した(保存後1週間を経ても arginase 活性の失活はほとんど見られていない)。

前立腺肥大結節組織12,000 G 上清分画の調整: 組織を3~5倍量の10mM maleic acid-solution (pH 7.1) にて teflon-glass ホモジナイザーを用いてホモジナイズ。ホモジネートをナイロンガーゼに通して後12,000×g 20分間遠心し, その上清を12,000 G 上清分画として以下の実験に使用した。

Arginase 活性の測定: 12,000 G 上清分画の一部を 55°C 20分間 preincubate した後, $40\mu\text{moles}$ arginine hydrochloride (pH 9.7) を加え, 37°C で30分間 incubate した。冷10% PCA を 1.5倍量加えて酵素反応を止め, 低速遠心にて得られた上清の一部を分取し, 生成された尿素を Archibald 変法²⁾にて定量することにより arginase 活性を測定した (arginase 活性は $\mu\text{moles urea}/\text{min}/\text{g}$ で表す)。

透析試料作製: 透析実験においては, 前立腺肥大結節組織12,000 G 上清分画をセルロースチューブに入れ, 約500倍量の10mM maleic acid solution (pH 7.1) に対して3時間毎に液交換を行いながら24時間透析し実験に使用した。

亜鉛の arginase 活性阻害実験方法: 前述の如くに調整された前立腺肥大結節組織12,000 G 上清分画を10mM maleic solution (pH 7.1) に対して24時間透析後, 0.03mM ZnCl_2 存在下にて酵素反応溶液中の MnCl_2 濃度を 0, 0.05, 0.1, 0.2, 2.0, 4.0 mM の6段階に変化させた場合の arginase 活性を測定し, 亜鉛の arginase 活性に対する阻害を検討した。

亜鉛とマンガンの置換による拮抗実験: 前述の如くに調整された前立腺肥大結節組織12,000 G 上清分画を24時間10mM maleic solution (pH 7.1) に対して透析し, $30\mu\text{M}$ MnCl_2 存在下にて添加 ZnCl_2

濃度を 0, 0.05, 0.1, 0.2, 2.0, 4.0mM と 6 段階に変化させた場合の被透析溶液の arginase 活性を測定, また 30 μ M ZnCl₂ 存在下にて添加 Mn²⁺ 濃度を 0, 0.05, 0.1, 0.2, 2.0, 4.0mM と 6 段階に変化させた場合の被透析溶液の arginase 活性を測定し亜鉛とマンガンの置換による拮抗について検討した。

III. 結 果

前立腺肥大結節組織及び前立腺癌組織の arginase 活性: 前立腺肥大結節組織の arginase 活性は 3 ~ 11 μ moles urea/min/g の範囲にあり, 同じ肥大結節でも腺の増生を主体とする組織の arginase 活性に対して, 筋繊維増生を主とする組織の arginase 活性はやや低値を示す傾向にあった。

未処置の分化型腺癌組織 2 例の arginase 活性は極めて高値を示したが, エストロゲン治療後の 2 例は肥大結節レベルまで arginase 活性は低下していた。未分化型腺癌組織の arginase 活性は 2 例共に著しい低値を示した (図 1)。

図 1. 前立腺腫瘍のアルギネース活性
*印: 腺の増生を主体とする肥大結節

前立腺肥大結節及び前立腺癌組織 arginase の Mn²⁺ による活性化: 前立腺癌組織 arginase の Mn²⁺ による活性化率は未分化型腺癌組織では 0.54, 分化型腺癌組織では 0.84 で軽度には阻害される傾向にあった。前立腺肥大症患者より得られた肥大結節組織 arginase の Mn²⁺ による活性化率は 14.3 ~ 26.1 と高値を示した (表 1)。

Source	Mn ²⁺	Arginase activity (μ mol urea/min/g)
Benign	1	0.35
prostatic	+	9.00 (26.1)
hypertrophy	2	0.18
	+	2.76 (14.3)
	3	0.39
	+	8.37 (21.8)
	4	0.30
	+	6.96 (22.7)
Prostatic	Ca. simplex	0.24
carcinoma	+	0.12 (0.54)
	Adenocarcinoma	15.69
	+	13.23 (0.85)

表 1. 前立腺腫瘍組織アルギネースの Mn²⁺ による活性化

Mn²⁺ による前立腺肥大結節組織 arginase 活性化に対する透析の効果: 0 ~ 4 mM まで Mn²⁺ の添加濃度を変化させた時の前立腺肥大結節組織 12,000 G 上清分画 arginase 活性をプロットすると図 2-A の如き sigmoid 曲線が得られた。すなわち Mn²⁺ 無添加時には arginase 活性が極く低値を示すが, Mn²⁺ 濃度が増加するにつれて arginase 活性も増加し, Mn²⁺ 濃度 2 mM にて最高活性が見られ, その後プラトーとなった。次に前立腺肥大結節組織 12,000 G 上清分画を 24 時間透析した後同様に添加 Mn²⁺ 濃度を 4 mM まで変化させた時の arginase 活性の変動は図 2-B の如くであった。すなわち Mn²⁺ 濃度が 0.05 mM という低濃度にて最高活性の約 95% まで達し, その後プラトーとなった。

以上両実験の結果から

- ① 前立腺肥大結節組織 12,000 G 上清分画の arginase 活性は Mn²⁺ により賦活化されること。
- ② 前立腺肥大結節組織 12,000 G 上清分画中には,

図 2. 12,000 G 上清アルギネース活性に対する透析及び Mn²⁺ の効果

- arginase 活性を阻害する物質が存在すること。
 ③この物質は透析可能な低分子物質であること。
 ④さらに Mn^{++} 添加による arginase 活性賦活化現象のメカニズムが阻害物質の抑制にあること、を推測させる。

前立腺肥大結節組織12,000 G 上清分画 arginase 活性に対する亜鉛の阻害効果：前立腺肥大結節組織12,000 G 上清分画を24時間透析後に、0.03 mM Zn^{++} 存在下にて 0 ~ 4 mM まで Mn^{++} 濃度を変化させた時の arginase 活性をプロットすると図2-Cの如くであった。この曲線は sigmoid 曲線を示し、興味深いことにはさきの実験図2-A、すなわち透析前の12,000 G 上清分画 arginase 活性の変化と全く同じ曲線であった。このことは、前立腺肥大結節組織12,000 G 上清分画に存在する arginase 活性阻害低分子物質は亜鉛である可能性を強く示唆している。

前立腺肥大結節組織12,000 G 上清分画 arginase 活性に対する亜鉛とマンガンの置換による拮抗：30 μ M Mn^{++} 存在下にて添加 Zn^{++} 濃度を 4 mM まで変化させた場合の arginase の残存活性をプロットすると図3-Aの如き曲線が得られ、 Zn^{++} 低下により著明な活性低下を起こすことが示された。また 30 μ M Zn^{++} 存在下にて添加 Mn^{++} 濃度を変化させた場合の arginase 残存活性の変化をプロットすると図3-Bの如き曲線が得られ、 Mn^{++} 添加により活性

の回復が見られることが明示された。この曲線(A)及び(B)より前立腺肥大結節組織12,000 G 上清分画 arginase 活性に対して、亜鉛とマンガンは置換による拮抗作用を示すということが明らかになった。

IV. 考 案

Arginase は金属活性化酵素の 1 つであり、 Mn^{++} により活性化されることは知られているが、肝臓以外の臓器に存在する arginase の生理的存在意義は明らかになってはいない。ラット前立腺のみならずヒト前立腺肥大結節組織及び前立腺癌組織にも arginase 活性が存在することを私達は示した(図1)。この前立腺肥大結節12,000 G 上清分画に存在する arginase の Mn^{++} による活性化率は他動物組織²⁾、ヒト尿路腫瘍(膀胱癌、尿管癌、腎癌)組織¹¹⁾のそれとは異なり著しく高値をとることを私達は明らかにした(表1)。しかし前立腺肥大結節組織12,000 G 上清分画 arginase の Michaelis 定数は前立腺癌のそれとも、また他尿路腫瘍の定数ともほとんど同じ範囲にあり、さらにこれ等 K_m 値はラットの肝及び腎のそれとも²⁾、ほとんど同じ範囲にある。Schimke¹²⁾ は免疫化学的方法を用いて哺乳動物に分布する arginase の同一性を指摘している。これ等のことから前立腺肥大結節組織12,000 G 上清分画の Mn^{++} による活性化の特異的現象には activator, inhibitor の関与が当然推測された。arginase のような金属活性化酵素の活性化、不活性化に関与するものとして、2価陽イオンの 1 つである亜鉛がこの現象にたずさわっていることを私達の実験(図2)は示している。ヒトのみならず各種哺乳動物の前立腺は他の臓器に比較して多量の亜鉛を含有している¹³⁾¹⁴⁾¹⁵⁾¹⁶⁾、ヒト前立腺の良性腫瘍である肥大結節組織中には正常前立腺組織、前立腺癌組織より多くの亜鉛を含有していると報告されている¹⁷⁾、このように多量に含有されている亜鉛の生理的意義については現在までのところ明らかにされていない。私達は今回前立腺肥大結節組織12,000 G 上清分画中の亜鉛、特に遊離型亜鉛に arginase 活性阻害作用のあることを明らかにした。Grant 等¹⁸⁾ は前立腺肥大結節組織の testosterone 5 α -

図3. アルギネース活性に対する亜鉛とマンガンの置換による拮抗

reductase 活性を遊離型亜鉛が阻害することを報告しており、さらに亜鉛の testosterone 5 α -reductase 活性阻害様式を Wallace 等¹⁹⁾ は検討し、NADPH との拮抗阻害であると報告している。私達もまた亜鉛の arginase 活性の阻害様式はマンガンの拮抗阻害であることを明らかにした。このことは arginase に対する亜鉛の作用部位がマンガンの作用部位と同じか、または近い部位であることを示している。

金属蛋白の金属が他の金属によりその奏効部位にて置換されることにより相互作用を発現することがあると言われている²⁰⁾。私達は前立腺肥大結節組織 arginase に対して亜鉛とマンガンの置換による相互作用について明らかにした (図 3) が、Smith 等²¹⁾ は α -mannosidase の亜鉛とカドミウムの置換による酵素活性の発現及び抑制現象について報告している。今回私達はヒト前立腺肥大結節組織に存在する遊離型亜鉛は arginase 活性をマンガンと拮抗作用を持ちつつ調節している可能性があるということを示したが、これら遊離型のみならず前立腺肥大結節組織に存在すると報告されている亜鉛結合蛋白²²⁾²³⁾ について、さらに遊離亜鉛と結合蛋白の相互作用について検討を加えることが必要であり、現在研究を進めているところである。

V. ま と め

- 1) 高い arginase (L-arginine ureohydrolase E. C. 3.5.3.1.) 活性が前立腺肥大結節組織及び前立腺癌組織にみられた。肥大症においては腺増生型の方が筋線維増生型に比して arginase 活性が高く、前立腺癌においては分化度の高いものほど arginase 活性が高かった。
- 2) 前立腺肥大結節 12,000 G 上清分画中に存在する arginase の Mn²⁺ による活性化率は著しく高値を示した。
- 3) 前立腺肥大結節 12,000 G 上清分画中の亜鉛、特に遊離型亜鉛に arginase 阻害作用がみられた。arginase に対して亜鉛とマンガンの間に置換による酵素活性発現及び抑制作用がみられた。

なお本研究に要した経費の一部は文部省科学研究補助及び厚生省がん研究助成金によった。

文 献

- 1) 内野仙治：酵素研究法 2, 6 版, (赤堀四郎編) 朝倉書店, 東京, 昭 38, 201 頁。
- 2) Yamanaka, H., Mayuzumi, T., Shimazaki, J. and Shida, K.: Properties and androgen-induced changes of arginase in kidney and ventral prostate of rats. *endocrinol. Japon.*, **18**: 487, 1971.
- 3) Yamanaka, H., Kirdani, R.Y., Saroff, J., Murphy, G.P. and Sandberg, A.A.: Effects of testosterone and prolactin on rat prostatic weight, 5 α -reductase and arginase. *Am. J. Physiol.*, **229**: 1102, 1975.
- 4) Yamanaka, H., Shimazaki, J., Imai, K., Sugiyama, Y. and Shida, K.: Effect of estrogen administration on activities of testosterone 5 α -reductase, alkaline phosphatase and arginase in the ventral and the dorsolateral prostates of rats. *Endocrinol. Japon.*, **22**: 297, 1975.
- 5) Koya, A., Yamanaka, H., Kitaura, K., Matsumura, Y., Uehara, H., Imai, K. and Shida, K.: The participation of pituitary gland in estrogenic effect on arginase activity in the rat prostate. *Endocrinol. Japon.*, **24**: 375, 1977.
- 6) Shimazaki, J., Taguchi, I., Yamanaka, H., Mayuzumi, T. and Shida, K.: Effect of testosterone administration on the free amino acids and conversion of arginine to proline and glutamate in the rat ventral prostate. *Endocrinol. Japon.*, **20**: 455, 1973.
- 7) Pegg, A.E., Lockwood, D.H. and Williams-Ashman, H.G.: Concentrations of putrescine and polyamines and their enzymic synthesis during androgen-induced prostatic growth. *Biochem. J.*, **117**: 17, 1970.
- 8) Hebert, G.J., Basrur, P.K., Gilman, J.P.W.: Arginase activity in nickel sulfide-induced rat tumors. *Cancer*, **25**: 1134, 1970.
- 9) Pitot, H.C.: Molecular pathogenesis of experimental liver cancer. *Federation Proc.*, **21**: 1124, 1964.

- 10) Knox, W.E.: The enzymic pattern of neoplastic tissue. *Advan. Cancer Res.*, **10**: 117, 1967.
- 11) Yamanaka, H., Mayuzumi, T., Matsuoka, M., Shimazaki, J. and Shida, K.: Arginase in human urogenital tumors. *GANN*, **63**: 693, 1972.
- 12) Schimke, R.T.: "Methods Enzymol.", **17A**: 313, 1970.
- 13) Mawson, C.A. and Fisher, M.I.: Zinc content of genital organs of the rat. *Nature*, **167**: 859, 1951.
- 14) Mawson, C.A. and Fisher, M.I.: Carbonic anhydrase and zinc in the prostate glands of rat and rabbit. *Arch. Biochem. Biophys.*, **36**: 485, 1952.
- 15) Lo, M.C., Hall, T. and Whitmore, W.F.: Some effects of dithizone on the canine prostate. *Cancer*, **13**: 401, 1960.
- 16) Aughey, E.: Zinc in the cat prostate. *J. Reprod. Fertil.*, **22**: 65, 1970.
- 17) Györkey, F., Min, K.W., Huff, J.A. and Györkey, P.: Zinc and magnesium in human prostate gland: normal, hyperplastic, and neoplastic. *Cancer Res.*, **27**: 1348, 1967.
- 18) Grant, J.K., Minguell, J., Taylor, P. and Weiss, P.: A possible role of zinc in the metabolism of testosterone by the prostate gland. *Biochem. J.*, **125**: 21, 1971.
- 19) Wallace, A.M. and Grant, J.K.: Effect of zinc on androgen metabolism in the human hyperplastic prostate. *Biochem. Soc. Trans.*, **3**: 540, 1975.
- 20) 和田攻: 金属の生体内拮抗・相互作用. 代謝, **12**: 219, 1975.
- 21) Snaith, S.M. and Levvy, G.A.: α -Mannosidase as a zinc-dependent enzyme. *Nature*, **218**: 91, 1968.
- 22) Reed, M.J. and Stitch, S.R.: The uptake of testosterone and zinc in vitro by the human hyperplastic prostate. *J. Endocr.*, **58**: 405, 1973.
- 23) Heathcole, J.G. and Washington, R.J.: Analysis of the zinc binding protein derived from the human benign hypertrophic prostate. *J. Endocr.*, **58**: 412, 1973.

ARGINASE IN HUMAN PROSTATIC TUMOR

TAKUJI MAYUZUMI, KYOICHI IMAI
AND HIDETOSHI YAMANAKA

Department of Urology, School of Medicine,
Gunma University, Maebashi Japan.

(Director: Prof. Keizo Shida.)

Arginase (E.c. 3.5.3.1., L-arginine ureohydrolase) in the liver of ureoteric animals plays an important role as a member of urea cycle enzyme system. However, the physiological role of the extrahepatic arginase is unclear. Arginase in rat prostate was reported to be under hormonal control. In this paper, we confirmed the activity of arginase in human prostatic tumors and investigated some properties of this enzyme. The following results were obtained:

- 1) The high enzyme activity was observed in benign prostatic hypertrophy and adenocarcinoma of prostate. In benign prostatic hypertrophy, tissues exhibiting the adenomatous type had higher activity than tissues exhibiting fibromuscular type. In prostatic cancer, the enzyme activity in undifferentiated adenocarcinoma was lower than that in well-differentiated ones, and treatment of the latter with estrogen decreased the enzyme activity.
- 2) The rate of Mn^{++} activation in the 12,000 g supernatant of benign prostatic hypertrophy was remarkably high, as compared with prostatic cancer. It was suggested that zinc might be concerned with this phenomenon.
- 3) Free zinc had an inhibitory action on arginase activity of 12,000 g supernatant of benign prostatic hypertrophy and this inactivation was prevented or reversed by manganese ion.