腎細胞癌患者における胎盤型膜結合性アリル アミダーゼの出現に関する研究

愛媛大学医学部第二内科

横山マサ子 日和田邦男[◇] 国府 達郎

A PLACENTAL TYPE OF MEMBRANE-BOUND ARYLAMIDASE FOUND IN PATIENTS WITH RENAL CELL CARCINOMA

Masako YOKOYAMA, MD, Kunio HIWADA, MD and Tatsuo KOKUBU, MD

The Second Department of Internal Medicine, Ehime University School of Medicine, Ehime

概要 私達は腎細胞癌7例の組織（全例淡明細胞癌）から膜結合性アリルアミダーゼをトリプシンで溶出させ、5例（すなわち71%）に胎盤型膜結合性アリルアミダーゼの出現を認めた。さらに第1症例で、腹水と血清中に癌組織中のものと同じ胎盤型膜結合性アリルアミダーゼを証明した。胎盤型膜結合性アリルアミダーゼが出現した5例は近接あるいは遠隔いずれかに転移を認めた。しかし手術の時点で転移が証明できなかった残り2例からは正常腎由来の膜結合性アリルアミダーゼしか認められなかった。私達は癌組織における胎盤型アリルアミダーゼの出現を、癌化によるアイソエンザイムの偏倚と考え、この酵素を第1症例の患者名にちなんでShiba-isoenzymeと命名した。

はじめに

膜結合性アリルアミダーゼ（EC 3, 4, 11, 2）（以下Mb-AAと略す）は、古典的にロイシンアミノペプチダーゼ（EC 3, 4, 11, 1）と呼ばれる酵素とは異なっている。私達はヒト小腸、肺、肝、腎および胎盤組織の膜成分から本酵素をトリプシンで溶出し、それぞれ臓器固有のアイソエンザイムであることを明らかにした¹⁾。一方私達が最初に入手した腎細胞癌組織から溶出したMb-AAは、正常腎由来のMb-AAとは電気泳動の易動度、耐熱性の点で異なり、化学的な諸性質はむしろ胎盤由来のMb-AAによく似ていること

から、癌性胎盤型偏倚に基づくアイソエンザイムである可能性を発表してきた²⁾⁻⁴⁾。今回は腎細胞癌7例と、第1症例の剖検時に得た転移組織、血清および腹水を材料として、Mb-AAの胎盤型への偏倚の頻度と血中などへの出現について研究した成績を報告する。

材料と方法

酵素材料：腎細胞癌組織は手術時に得たものを直ちに-20℃で凍結保存し、これを材料とした。また第1症例の剖検時に得た血清、腹水および肝転移組織を用いた。胎盤は正常分娩胎盤を用い、また正常腎組織は癌手術のため偏腎摘出した腎の正常部分および法医解剖時に得たものを材料とした。なお本酵素は非常に安定であり、材料の出所が異なっても酵素活性の大きな失活は認められなかった。

〔昭和53年10月23日受稿〕

本研究の要旨は第21回日本腎臓学会総会および第76回日本内科学会講演会（昭和54年4月5日）にて発表した。

試薬： L-alanyl- β -naphthylamide, L-leucyl-4-methoxy- β -naphthylamide 塩酸塩, Fast Blue B塩はSigma社 (St. Louis, Mo., アメリカ) から購入した。トリプシンはDifco Laboratories(Detroit, Mich., アメリカ) より, Sephadex G-200, concanavalin A-Sepharose 4BはPharmacia社 (Uppsala, スウェーデン), 分子量測定用キットはBoehringer社 (Manheim, 西ドイツ), ampholine pH 3.5~5.0, pH 6.0~8.0はLKB社 (Bromma, スウェーデン) より購入した。DE52はWhatman社 (Maidstone, Kent, イギリス), p-dimethylaminocinnamaldehydeは第一化学薬品(東京), ポリアクリルアミドディスク電気泳動に用いた各試薬およびsodium dodecylsulfate(SDS)と α -D-methylmannosideは和光純薬(大阪)から購入した。

酵素活性測定法： 酵素活性の測定は, L-alanyl- β -naphthylamideを基質に用いて松谷らの方法⁵⁾で測定した。

組織からの酵素精製法： 腎細胞癌組織は肉眼的に腫瘍部分のみを切り取り, 3倍容の0.1Mトリス塩酸緩衝液, pH 7.3でホモジナイズし, 1,000 $\times$ g, 15分遠心した。この上清を酢酸でpHを5.0

に調整し, 8,000 $\times$ g, 15分遠心後, 沈渣に0.1Mトリス塩酸緩衝液pH 8.0を加え, トリプシン・トルエン処理で(トリプシン:蛋白=1:20) Mb-AAを溶出した。これをSephadex G-200カラムでさらに精製したものを酵素材料とした。腎細胞癌転移組織, 胎盤および正常部腎組織についても同様の方法で酵素材料を得た。

血清と腹水からの酵素精製法： 血清と腹水は各々100mlを硫酸45~80%で塩析した。活性部分をDE52によるカラムクロマトグラフィーを行ない, 0~0.3M食塩の直線勾配法で溶出した。さらに活性部分をconcanavalin A-sepharose 4Bカラムにて精製(0.1M α -D-methylmannosideにて活性は溶出)した。この3段階で比活性は血清, 腹水中の本酵素活性とも約500倍に上昇した。

ポリアクリルアミド電気泳動： 6.5%ポリアクリルアミドゲルディスク電気泳動はゲル1本当たり2.5mAの電流を通じ, 4時間泳動を行なった。ゲルの酵素活性部位の発色はNachlasらの変法⁶⁾を用いた。

Isoelectric focusing法： LKB 110カラムを用いて蔗糖密度勾配法による1%アンホライン

表1. 症例概要

症例番号	氏名	性別	年齢	specific activity μ mol/min/mg		酵素材料 (g)	電気泳動		転移		臨床症状	
				homogenized	gel filtrated		正常腎	胎盤	近接	遠隔	血尿	
1	A S	♀	59	0.0046	6.1	18.5		●	●	●		発熱 貧血
2	K T	♀	70	0.003	1.3	21.4	●	●	●		●	
3	K M	♂	44	0.051	1.23	29.0		●	●		●	発熱 腹痛
4	T K	♀	52	0.16	1.19	45.0	●				●	10年前、子宮癌にて子宮全摘出。今回腎細胞癌と同時に甲状腺癌と肺に過剰腫瘍が発見され、それぞれ全摘出した。組織像は4者すべて異っていた。現在健康に日常生活を営んでいる。
5	M I	♀	8	0.198	2.95	5.2	●				●	腹部腫瘍
6	Y W	♂	62	0.043	3.45	18.0		●	●		●	腹痛
7	K T	♂	65	0.0029	4.9	33.5	●	●	●	●		転移による病的骨折

(●で示したところは上記項目の存在を示す)

pH3.5~5.0でエレクトロフォーカシングを行なった⁸⁾。

蛋白定量：蛋白量はLowry法⁷⁾で測定した。

成 績

表1に7症例の概要を示した。男3例女4例で、平均年齢は51才（第5症例を除くと59才）であつた。組織型は全例淡明細胞癌であつた。

1. ポリアクリルアミドゲル電気泳動による解析

電気泳動の成績を図1に示した。No.1は正常腎由来のMb-AAであり、No.5は胎盤由来のMb-AAである。No.4の位置にバンドが出現したのは第1, 3, 6症例で、これはNo.5の胎盤由来のものと一致する。No.2の位置にバンドが泳動されたものは第4, 5症例で、これは正常腎由来のものと一致する。No.3の位置にバンドが出現したのが第2, 7症例で、これは胎盤由来のMb-AAと正常腎由来のMb-AAのものに一致する両者のバンドを含んでいる。しかしこの場合肉眼的には腫瘍部のみを取り出したが、組織学的には正常腎組織が混入していた可能性も考えられる。

1. 正常腎 膜結合性アリルアミダーゼ
2. 正常タイプの腎細胞癌 膜結合性アリルアミダーゼ
3. 正常タイプと胎盤型腎細胞癌 膜結合性アリルアミダーゼ
4. 胎盤型腎細胞癌 膜結合性アリルアミダーゼ
5. 胎盤膜結合性アリルアミダーゼ

図1. ポリアクリルアミドゲル電気泳動像

なお第1, 2症例で肉眼的に正常腎組織部分由来のMb-AAを電気泳動すると、No.1の正常腎由来のMb-AAと重なるバンドのみが認められた。表1に示すように胎盤由来のMb-AAと一致する位置にバンドを認めた症例は、すべて近接あるいは遠隔転移が証明された。また第1症例の剖検時に得た肝転移癌組織由来のMb-AAは、原発癌組織由来のMb-AAと同様の、すなわち胎盤型Mb-AAの電気泳動の易動度を示した。

2. 癌細胞由来のMb-AAの酵素学的性質

第1症例を腎細胞癌の酵素材料として、正常腎臓部および胎盤由来のMb-AAとの酵素学的性質を比較した。表2に示すようにカイネテックスのうえでは3者は区別できなかった。しかし熱処理

表2. 腎細胞癌、正常腎および胎盤各組織由来の膜結合性アリルアミダーゼの諸性質

酵素材料	腎細胞癌	正常腎	胎盤
分子量	24万	24万	24万
至適pH	7.25	7.25	7.25
K _m 値(基質L-ala-β-naphthylamide)	$8.7 \times 10^{-5} \text{M}$	$8.7 \times 10^{-5} \text{M}$	$8.7 \times 10^{-5} \text{M}$
Ala-β-NA/Leu-β-NAの活性比	2.3	2.4	2.2
L-メチオニン1mMの阻害率	50%	50%	50%
L-フェニルアラニン1mMの阻害率	55%	55%	55%
EDTAによる50%阻害濃度	$4 \times 10^{-5} \text{M}$	$4 \times 10^{-5} \text{M}$	$4 \times 10^{-4} \text{M}$
O-phenanthrolineによる50%阻害濃度	$2.5 \times 10^{-3} \text{M}$	$2.5 \times 10^{-3} \text{M}$	$2.5 \times 10^{-3} \text{M}$
尿素による50%阻害濃度	0.8M	0.8M	0.8M

図2. 耐熱性 (65°C)

図 3. SDSによる酵素の失活

図 4. 腎細胞癌患者腹水のisoelectric focusing プロフィール

とSDS処理による酵素蛋白変性に基づく活性の低下を調べると、腎細胞癌由来のMb-AAと正常腎由来のMb-AAとの間に違いが認められた。図2に0.1Mリン酸緩衝液、pH 7.0中で65°Cでそれぞれの酵素材料をインキュベーションした時の残存酵素活性の時間的变化を示した。腎細胞癌由来のMb-AAは正常腎由来のMb-AAよりも熱に弱く、胎盤由来のMb-AAと一致した。SDS処理は0.1Mリン酸緩衝液、pH 7.0の中にSDSを 5×10^{-4} Mになるように加え、37°Cで5分から30分インキュベーションして酵素活性の低下をみた。また図3に示すように、腎細胞癌由来のMb-AAと胎盤由来のMb-AAのSDSに対する抵抗性は正常腎由来のMb-AAよりも強かった。

3. 腎細胞癌患者血清と腹水中への胎盤型Mb-AAの出現

第1症例の患者腹水と血清から精製した酵素材料をそれぞれisoelectric focusingを行ない、両者ともに胎盤型Mb-AAを証明した。図4はisoelectric focusingによる腹水中のアリルアミダーゼのパターンである。右側のやや小さいピークが胎盤型Mb-AAと分子量、等電点、Kmおよびディスク電気泳動の易動度がすべて一致した。左側の大きなピークは正常血清中のアリルアミダーゼである。患者血清中にも腹水中よりも量は少ないが胎盤型Mb-AAを証明できた。

考 察

癌細胞中に胎児型アイソエンザイム、あるいは胎盤型アイソエンザイムが認められることは多くの酵素で証明されている⁹⁾。私達は腎細胞癌組織より、トリプシンにて溶出したMb-AAアイソエンザイムが胎盤型を示したことはすでに報告した²⁾³⁾⁴⁾。

本研究においては、さらに腎細胞癌患者の症例を増し、胎盤型Mb-AAの出現頻度や悪性度との関連などについて研究を進めた。第1症例を含む7症例中5例、すなわち71%の高率で腎細胞癌組織中に胎盤型Mb-AAの出現を認めた。しかし正常腎由来のMb-AAしか認めなかつた2症例では、近接あるいは遠隔いずれの転移も手術時には認めず、腎被膜内に腎細胞癌組織は局限していた。これに対して、胎盤型Mb-AAを証明した5症例では全例腎被膜外への浸潤を組織学的にあるいは手術時に認めた。組織型は7症例全例淡明細胞癌であつた。したがって組織型の上では同じであつても、私達の成績から胎盤型Mb-AAの出現を証明できた癌組織では、そうでない癌組織より悪性度が高い可能性が考えられる。

腎細胞癌中の胎盤型に偏倚したMb-AAは、分子量および種々のカイネティックスの成績からは正常腎や胎盤由来のMb-AAとは区別できなかった。しかし腎細胞癌由来の胎盤型Mb-AAは電気泳動の易動度、等電点、耐熱性やSDSに対する失

活の程度などから、正常腎由来のMb-AAと明確に区別できたが、胎盤由来のMb-AAとは前記の諸性質に関しても完全に一致していた。また第一症例の血清と腹水中に胎盤型Mb-AAが出現していることを証明できた。腎細胞癌組織の膜成分からトリブシンで溶出したMb-AAの分子量が、血清や腹水中で証明されたMb-AAと区別できないことや、等電点、耐熱性およびSDS処理による失活の程度などの点でも完全に一致することから、トリブシン処理で溶出して得た酵素が人工産物でなく、天然の型の酵素であることが強く示唆された。上記の成績から癌細胞中で胎盤型に偏倚したMb-AAは、現段階では新しいアイソエンザイムであると思われる。私達は第1症例の患者名にちなみ、癌細胞中に新しく出現してきたMb-AAアイソエンザイムにShiba-isoenzymeと命名した。

まとめ

- 1) 腎細胞癌患者7名のうち、5名の癌組織から胎盤型膜結合性アシルアミダーゼの出現を認めた。
- 2) 胎盤型膜結合性アシルアミダーゼの出現を認めた5症例全例に、手術時近接あるいは遠隔いづれかの転移巣を認めた。他方正常腎型膜結合性アシルアミダーゼしか認められなかつた2症例では、組織学的にも手術時にも被膜外への転移は認められなかつた。
- 3) 癌組織から胎盤型膜結合性アシルアミダーゼの出現を認めた1例の患者の腹水および血清からも、本酵素を証明した。
- 4) 癌細胞中に新しく出現してきた胎盤型膜結合性アシルアミダーゼを、患者名にちなんで

Shiba-isoenzymeと命名した。

謝辞 本研究の一部は病態代謝研究会（昭和53年度）および日本応用酵素協会（昭和53年度）からの援助をうけた。また腎細胞癌組織の提供をうけた愛媛大学医学部泌尿器科竹内正文教授、高羽津助教授に感謝いたします。

文 献

- 1) Hiwada K, et al: Comparison of human membrane-bound neutral arylamidases from small intestine, lung, kidney, liver and placenta. Clin Chim Acta 76: 267, 1977.
- 2) Hiwada K, et al: Placental form of membrane-bound neutral arylamidase found in renal cell carcinoma. Clin Chim Acta 79: 569, 1977.
- 3) 日和田邦男, 他: Grawitz 腫瘍組織に見出された胎盤型膜結合性中性アシルアミダーゼ. 医学のあゆみ 101: 540, 1977.
- 4) 国府達郎, 他: 胎盤型膜結合性中性アシルアミダーゼを産生したGrawitz腫瘍の1例. 代謝 1223, 14: 1977.
- 5) 松谷 衛, 他: 新血清ロイシンアミノペプチダーゼ測定法について. 臨床検査 11: 300, 1967.
- 6) Wachsmuth ED and Donner P: Conclusions about aminopeptidase in tissue sections from studies of amino acid naphthylamide hydrolysis. Histochemistry 47: 271, 1976.
- 7) Lowry OH, et al: Protein measurement with Folin phenol reagent. J Biol Chem 193: 265, 1951.
- 8) Hiwada K, et al: A placental type of membrane-bound arylamidase in serum and ascites from a patient with renal cell carcinoma. Clin Chim Acta 88: 311, 1978.
- 9) 東野一弥: 癌胎児性アイソザイム. 蛋白質核酸酵素 23: 594, 1978.