

ヒト腎細胞癌の基礎的研究

第4報：腫瘍組織内ポリアミン類の含量について

大阪大学医学部泌尿器科学教室（主任：園田孝夫教授）

松田 稔・長船 匡男

中野 悦次・園田 孝夫

大阪府立成人病センター泌尿器科（主任：古武敏彦部長）

清原 久和・古武 敏彦

A FUNDAMENTAL STUDY ON RENAL CELL CARCINOMA

PART 4. CONCENTRATION OF POLYAMINES IN NEOPLASTIC RENAL
TISSUE IN COMPARISON WITH NORMAL RENAL CORTEXMinoru MATSUDA, Masao OSAFUNE, Etsuji NAKANO
and Takao SONODA*From the Department of Urology, Osaka University Hospital
(Chairman: Prof. T. Sonoda, M. D.)*

Hisakazu KIYOHARA and Toshihiko KOTAKE

*From the Department of Urology, The Center for Adult Disease, Osaka
(Chief: Dr. T. Kotake, M. D.)*

In order to obtain biochemical indicators for histopathological or biological malignancy of renal cell carcinoma, concentration of polyamines were measured in twenty-six cancerous tissues and nine normal renal cortex. Results obtained were as followings.

1. The cancerous tissues contained higher amount of polyamines than normal renal tissues; putrescine and spermine levels were found to be approximately two-folds and spermidine was about four-folds of each compound in normal renal tissues.
2. There was a statistically significant correlation between the level of spermidine and the histological grade of malignancy of the tumor. The ratio of spermidine / spermine was also proved to be biochemical indicator of histological malignancy.
3. No significant difference was detected in concentration of these compounds among the non-metastasis and distant-metastasis groups of renal cell carcinoma, as well as among the types of cytoplasmic staining property.

These results suggested that the determination of polyamines, especially of spermidine, in urine or serum would be useful for the diagnosis or the evaluation of therapeutic modalities of renal cell carcinoma.

はじめに

近年、ポリアミン類 (putrescine, spermidine, spermine) が、核酸やタンパク質の合成や安定化、あるいは細胞の増殖や機能的分化において重要な役割を担っていることが知られつつある。また悪性腫瘍の診断や治療効果判定のために、尿中、脊髄液中あるいは血清中などのポリアミン類の判定が臨床的に応用されはじめている。

本報告はヒト腎細胞癌の診断、悪性度の評価、あるいは治療効果判定などの目的で、患者の尿中、血清中のポリアミン類のレベルを測定し、これを臨床的に意義づけるにあたり、基本的に重要であると考えられる腫瘍組織そのものにおけるポリアミン類の含量、あるいはその代謝パターンと、腫瘍の病理学的所見との関係を、正常腎皮質組織を対照として検討したものである。

材料および方法

1. 測定対象症例

1975年10月以降、当院ならびにその関連病院にて手

術的治療が施行された26例（男子20例、女子6例、平均年齢57.3歳）の腎細胞癌症例の原発巣腫瘍組織を対象とした。病理組織学的所見は通常の hematoxylin-eosin 染色標本により観察し、 -20°C または -70°C に保存した腫瘍組織をポリアミン類の含量の測定に供した。対照として、剖検または腎部分切除術などにより得られた正常腎皮質組織を同様に保存し、測定に供した。

病理組織学的悪性度は Skinner et al.¹⁾ の規準により判定し、grade 1~grade 2 を low grade 群、grade 3~grade 4 を high grade 群とした。細胞型は腫瘍細胞のほぼ 2/3 以上が clear cell また granular cell よりなる場合をそれぞれ clear cell type, granular cell type とし、その中間に位置するものを mixed cell type とした。転移巣の有無は腫瘍の生物学的悪性度の1つの指標と考えられるので、術後経過観察中に発見されたものをも含めて検討してみた。対象症例の臨床像は Table 1 にまとめて示した。

2. 測定方法

約 200 mg の組織片を切り出し半切し、一方は凍結切片作成後 hematoxylin-eosin 染色をおこない、腫瘍

Table 1. Patients profiles.

Patient No.	Age	Sex	Histological findings		Distant metastasis	
			Type	Grade		
1	Y.O.	59	F	clear	2	(-)
2	Y.K.	74	M	clear	2	(-)
3	G.A.	65	M	clear	2	(-)
4	A.M.	60	M	clear	2	bone
5	T.Y.	64	M	clear	2	lymph node
6	E.E.	54	F	clear	2	brain
7	Y.Y.	68	M	clear	2	(-)
8	K.N.	60	M	clear	2	(-)
9	A.T.	62	M	clear	2	lymph node
10	A.Y.	58	M	clear	2	(-)
11	K.I.	50	M	clear	2	(-)
12	Y.Y.	32	F	clear	3	lymph node, lung, bone
13	K.S.	56	M	clear	3	(-)
14	K.Y.	41	M	clear	3	bone
15	H.M.	65	M	clear	3	bone
16	H.S.	46	M	clear	3	lung
17	H.K.	48	M	clear	3	liver, bone
18	Y.I.	56	M	clear	3	lymph node, liver
19	M.N.	68	M	clear	3	(-)
20	M.E.	52	F	granular	4	lymph node
21	S.Y.	72	M	mixed	2	lymph node
22	T.K.	74	M	mixed	2	lung
23	T.Y.	73	M	mixed	4	lymph node, lung, bone
24	S.A.	67	F	granular	2	lung
25	S.M.	22	F	granular	3	lymph node
26	T.A.	44	M	granular	3	lymph node, lung, liver

細胞よりなる組織であることを確認，他方をポリアミン類の測定に使用した。

組織片を 5 ml の 5% トリクロロ酢酸 (TCA) とともにホモジナイズし，1500 RPM，15 分の遠沈をおこない，この上清を Amberlith IR-120 (100~200 mesh, H⁺ 型，径 1.1 cm，高さ 2.5 cm) のカラムにアプライする。20 ml の脱イオン水にて洗滌後，20 ml の 1N-HCl にてアミノ酸類を除去，ついで 6N-HCl，20 ml にてポリアミン分画を溶出せしめた。これを減圧乾固したのち 1 ml の脱イオン水に溶解，このうちの 0.2 ml に 0.2 M-NaHCO₃，0.4 ml と dansyl chloride 0.5 ml (3 mg/ml of acetone) を加え，37°C，2 時間の保温をおこなった。これを再度減圧乾固後，脱イオン水 0.2 ml およびベンゼン 0.2 ml を加え攪拌，1500 RPM，10 分間の遠沈により分離したベンゼン層の 20 μl をシリカゲル G (250 μ 厚，Merk 社) にアプライし，cyclohexan-diethlether (1:9, vol/vol) により展開，二波長薄層クロマトスキャナー（島津製作所，CS-910 型）にて，励起波長 365 nm，測定波長 490 nm を使用し蛍光測定し，別に作成した putrescine, spermidine, spermine の標準液における蛍光強度と比較測定した。

上記ポリアミン分画精製過程におけるポリアミン類の回収率はいずれも 90% 以上であった。また 5% TCA 沈査は 0.5 N-NaOH に溶解し，Lowry et al.²⁾ の方法により，牛血清アルブミンを標準としてタンパク質量を測定した。

結 果

Table 2 に測定結果を示した。腎細胞癌組織内のポリアミン類の含量は，いずれも正常腎皮質と比較し有意の高値を示す。このうち putrescine および spermine はそれぞれ約 2 倍程度であるが spermidine は最も著明な差異を示し，約 4 倍の含量となっている。

腎細胞癌の病理組織学的悪性度とポリアミン類の含量との関係は，Table 3 および Fig. 1 に示すように，putrescine, spermine は low grade 群と high grade 群の間で有意差はみられないが，spermidine は low grade 群で 2.40±0.88 n mol/mg. protein, high grade 群で 3.28±1.11 n mol/mg. protein と high grade 群で有意の高値を示す (p<0.05)。

Table 4, Fig. 2 にポリアミン類の代謝過程にしたがい，putrescine/spermidine および spermidine/spermine の比の，正常腎皮質，low grade および high grade の腎細胞癌における値を示したが，前者は正常腎皮質，low grade 群，high grade 群の順に有意の高値をと

Table 2. Concentration of polyamines in normal renal cortex and renal carcinoma tissues.

Renal carcinoma				
	protein (g/mg, wet weight)	putrescine (n mol/mg protein)	spermidine (n mol/mg protein)	spermine (n mol/mg protein)
1	103	1.1	2.7	4.8
2	98	0.9	2.7	4.3
3	126	0.6	1.1	2.1
4	130	1.5	2.3	2.5
5	87	1.0	2.6	3.3
6	80	1.3	1.8	3.3
7	100	1.3	3.2	3.3
8	114	1.2	2.8	4.3
9	93	0.2	4.0	9.9
10	78	1.1	3.5	2.5
11	101	0.7	2.0	6.0
12	135	0.9	2.0	2.1
13	114	0.7	3.6	2.8
14	87	1.8	4.6	3.1
15	83	0.7	1.8	2.9
16	89	1.6	3.1	3.0
17	128	0.4	4.3	4.1
18	90	0.5	3.0	4.2
19	83	0.7	5.2	6.3
20	90	1.1	3.3	5.2
21	108	0.7	1.2	2.1
22	130	1.1	1.4	3.3
23	103	0.9	3.8	3.0
24	112	0.8	1.3	2.4
25	125	1.8	3.7	3.4
26	105	1.0	3.0	2.9
mean±S.D. 103.5±17.4 0.98±0.40 2.84±1.08 3.73±1.69				

Normal renal cortex				
	protein (μg/mg wet weight)	putrescine (n mol/mg protein)	spermidine (n mol/mg protein)	spermine (n mol/mg protein)
1	122	0.8	0.7	2.2
2	127	0.7	0.9	2.2
3	109	0.7	1.0	2.2
4	122	0.7	0.7	2.1
5	105	0.5	0.8	1.0
6	102	0.5	0.7	2.6
7	123	0.4	0.7	1.9
8	141	—	0.6	1.9
9	129	0.2	0.8	2.7
mean±S.D. 120.0±12.5 0.5±0.26 0.77±0.12 2.09±0.46				

り，後者は逆にこの順に有意の低値を示した。

Table 3 にも示したように，腎細胞癌の細胞型とポリアミン類の含量との間には有意の相関は認められず，また遠隔転移をきたした腫瘍と，これの認められなかった腫瘍の間でのポリアミン類含量の相異も特にならなかつた。

以上のような結果から，腎細胞癌組織においてみられるポリアミン類の含量変化の特長として，各ポリア

Table 3. Concentration of polyamines in renal carcinoma classified by histological or clinical findings.

	putrescine	spermidine	spermine
low grade	0.99 ± 0.46	2.40 ± 0.88*	3.97 ± 2.10
high grade	0.97 ± 0.35	3.28 ± 1.11*	3.49 ± 1.17
clear cell type	0.97 ± 0.43	2.96 ± 1.05	3.93 ± 1.86
granular cell or mixed type	1.05 ± 0.35	2.52 ± 1.17	3.18 ± 1.00
non-metastasis	0.92 ± 0.25	2.97 ± 1.13	4.04 ± 1.49
distant metastasis	1.01 ± 0.46	2.77 ± 1.08	3.57 ± 1.80

Values are mean ± S.D. *, p < 0.05.

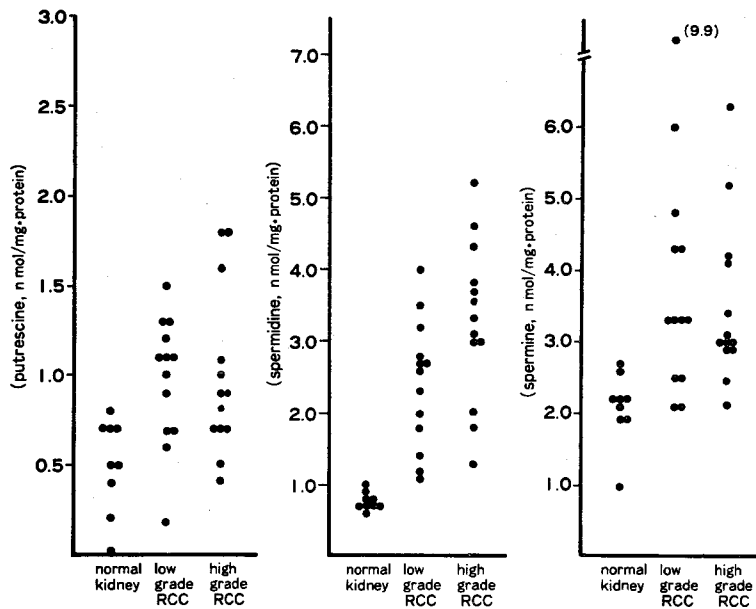


Fig. 1. Concentration of polyamines in normal renal cortex and renal carcinoma tissues.

Table 4. Ratio of polyamines in normal renal tissue, low grade and high grade type of renal carcinoma.

	putrescine/spermidine	spermidine/spermine
normal renal cortex	0.64 ± 0.34	0.39 ± 0.16
low grade renal cell carcinoma	0.45 ± 0.19*	0.67 ± 0.29
high grade renal cell carcinoma	0.33 ± 0.16*	0.96 ± 0.28

Values are mean ± S.D. *, not significantly different.

ミンはいずれも正常腎皮質に比し高値を示すようになるが、特に著しい変化は spermidine 含量の変化として認められ、またこの spermidine 含量は腫瘍の病理

組織学的悪性度と有意の相関を示すこと、あるいはポリアミン類の代謝過程よりみると、組織学的悪性度が高くなるに従い spermidine の量が増加するような代謝の変化をきたしていると結論することができるであろう。

考 察

生体内におけるポリアミン類の存在はすでに約 300 年前には知られていたといわれるが、それらの生合成過程や、細胞内における機能が明らかとされてきたのは比較的最近のことである^{3,4)}。現在ポリアミン類は Fig. 3 に示すように動物細胞では L-ornithine を前駆体として、重要な 4 つの酵素すなわち、① ornithine

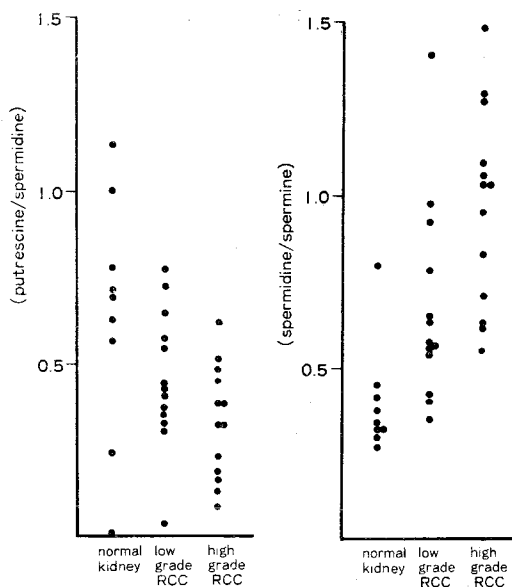


Fig. 2. Ratio of polyamines in normal renal cortex and renal carcinoma tissues.

decarboxylase ② S-adenosylmethionine decarboxylase ③ spermidine synthase ④ spermine synthase により合成がおこなわれていると考えられているが、そのうちでも律速酵素として重要なものは①と②であるとされている^{3,4)}。

ポリアミン類の生物学的機能に関しては現在まで多くの研究があり、決して単一の役割を担っているのでは

ないと思われるが、タンパク質合成や、核酸の合成、安定化、あるいは細胞膜の構造維持などきわめて重要であることが示されている。またこのような生化学的機能は細胞の増殖や機能的分化、あるいは発癌の過程において特異的なポリアミン類の代謝の変化をきたすことから裏付けられている⁵⁻⁷⁾。

一般にポリアミン類の含量は機能的に活動性の高い分泌細胞や細胞増殖の早い組織において高い値を示し、またラット肝癌においては、より早い倍加時間をもつ腫瘍ほどこれのおそい腫瘍に比し、ポリアミン、特に putrescine および spermidine の含量の high が知られている⁸⁾。このようなポリアミン類の性質から、尿中⁹⁻¹⁴⁾、脊髄液中¹⁵⁾、血中^{16,17)}の値を測定し、悪性腫瘍の診断や治療効果判定に臨床応用する試みが最近なされつつあり、泌尿器科的腫瘍についても Sanford et al.¹²⁾ は、腎細胞癌では、stage 1 の 3 例中 2 例の例外を除き、11 例中 9 例、82% に尿中ポリアミン類の増加を認め、CEA の陽性率に比し高いことから、その診断や治療効果判定における有用性を示している。尿中の各ポリアミンのレベルの意義については Russel et al.¹⁸⁾ は尿中 putrescine は腫瘍の増殖分画 (growth fraction) を示す指標となり、spermidine は腫瘍細胞の崩壊を示すとのべ、また Fair et al.¹³⁾ は前立腺癌患者尿中ポリアミン類の測定より、腫瘍の病理学的悪性度と spermidine 排泄量に相関のみられることを報告している。

さて腎細胞癌組織内ポリアミン含量について筆者は

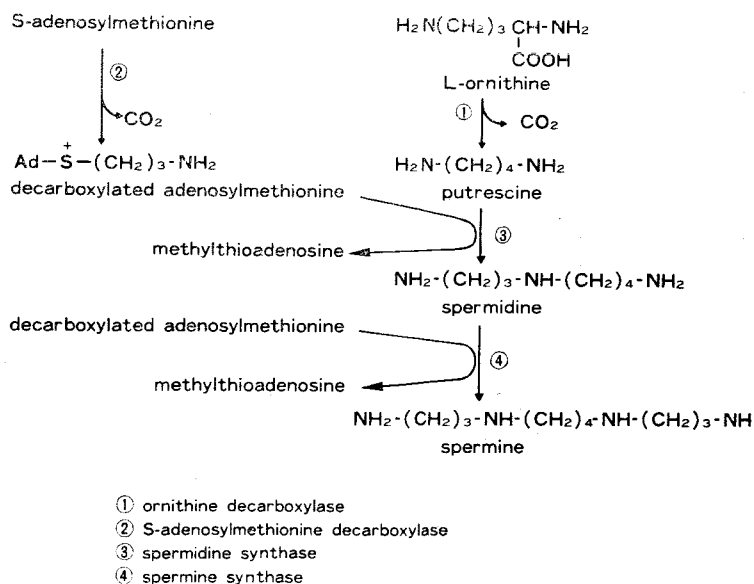


Fig. 3. Biosynthesis of polyamines in mammary cells.

すでに14症例の検討より、正常腎に比し、spermidine 含量が高いこと、およびこの値、あるいは spermidine/spermine の比は腫瘍の組織学的悪性度と有意の相関を示すことを報告した¹⁹⁾。また最近 Dunzendorfer and Russel²⁰⁾ は、測定方法は異なるが、腎細胞癌では正常腎に比しやはり同様に spermidine のみが有意の高値を示すこと、spermidine/spermine の値が正常腎では平均 0.24 であるのに比し、腎細胞癌組織では 1.08 と変化していることを報告している。しかしながら筆者は症例をかさね検討をつづけた結果、腫瘍組織内では spermidine ほど著しくはないが、putrescine や spermine も高値をとること、および spermidine/spermine のみならず、putrescine/spermidine の値も腫瘍の悪性度と有意の相関を示すことを認めた。このことはおのおののポリアミンの生理的意義を考察するための1つの基礎的資料を提供するものであるが、筆者が特に重要と考えた腫瘍の転移形成能の有無をポリアミン類のレベルによりみわけすることは不可能であった。

ヒト悪性腫瘍の一部はその発育が内分泌依存性であることはすでによく知られている。腎細胞癌もこのうちの10~15%は progesterone や testosterone の投与に対しある程度反応するとされている²¹⁾が、このような内分泌療法は腫瘍細胞の破壊ではなく、細胞増殖速度を低下せしめることを目的としていると考えられる。この増殖速度の指標としてポリアミン類、特に spermidine の尿中、血中レベルの測定が非常に有意義であろうことは筆者の今回の測定結果からも容易に想像されることであり、これを応用することにより、腫瘍の内分泌依存性を簡単に判定することが可能かもしれない。現在筆者の研究室では腎細胞癌培養細胞をもちい、ステロイドホルモンの細胞増殖やポリアミン類の代謝におよぼす影響につき検討中であり、稿をあらためて報告したい。

結 語

26症例の腎細胞癌組織内ポリアミン含量を測定し、つぎのような結論を得た。

- (1) 正常腎皮質に比し、腎細胞癌組織内ポリアミン類は高値を示し、putrescine, spermine はそれぞれ約2倍、spermidine は約4倍の値となる。
- (2) 腫瘍の病理組織学的悪性度と腫瘍組織内の spermidine 含量、および putrescine/spermidine spermidine/spermine の値は統計学的に有意の相関を示す。
- (3) 腫瘍の細胞型、あるいは転移形成能とポリアミ

ン類の含量との間には特に関係は認められなかった。

以上の結果より腎細胞癌の診断や治療効果判定に、尿中あるいは血清中のポリアミン類、特に spermidine のレベルを測定することはきわめて有意義なものと推定されることをのべた。

ポリアミン類の測定につき種々御教示いただいた大阪大学医学部 付属 高次神経研究施設、祖父江憲次、中嶋照夫両博士、ならびに御協力をいただいた大阪府立病院、大阪警察病院、大阪厚生年金病院、住友病院、各泌尿器科に感謝いたします。

文 献

- 1) Skinner, D. G., Colvin, R. B., Vermillion, C. D., Pfister, R. C. and Leadbetter, W. F.: *Cancer*, **28**: 1165, 1971.
- 2) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: *J. Biol. Chem.*, **193**: 265, 1951.
- 3) Raina, A. and Jänne, J.: *Med. Biol.*, **53**: 121, 1975.
- 4) Tabor, C. H. and Tabor, C.: *Ann. Rev. Biochem.*, **45**: 285, 1976.
- 5) Sobue, K. and Nakajima, T.: *J. Biochem.*, **82**: 1121, 1976.
- 6) Perin, A. and Sessa, A.: *Cancer Res.*, **38**: 1, 1978.
- 7) Roszel, J. A., Douglas, C. J. and Irving, C. C.: *Cancer Res.*, **37**: 214, 1977.
- 8) Russell, D. H.: *Polyamines In Normal And Neoplastic Growth*. ed. by Russell, D. H., p. 11, Raven Press Publishers, New York, 1973.
- 9) Russell, D. H.: *Nature*, **233**: 1971.
- 10) Lipton, A., Sheehan, L. M. and Kessler, G. F.: *Cancer*, **35**: 464, 1975.
- 11) Lipton, A., Sheehan, L. M., Mortel, R. and Harvey, H. A.: *Cancer*, **38**: 1344, 1976.
- 12) Sanford, E. J., Drago, J. R., Rohner, T. J., Kessler, G. F., Sheehan, L. and Lipton, A.: *J. Urol.*, **113**: 218, 1975.
- 13) Fair, W. R., Wehner, N. and Brorsson, U.: *J. Urol.*, **114**: 88, 1975.
- 14) Durie, B. G. M., Salmon, S. E. and Russell, D. H.: *Cancer Res.*, **37**: 214, 1977.
- 15) Marton, L. J., Heby, O., Levin, V. A., Lubich, W. P., Crafts, D. C. and Wilson, C. B.: *Cancer*

- Res., **36**: 973, 1976.
- 16) Marton, L. J., Russell, D. H. and Levy, C. C.: Clin. Chem., **19**: 926, 1973.
- 17) Nishioka, K. and Romsdahl, M. M.: Cancer Letters, **3**: 197, 1977.
- 18) Russell, D. H., Durie, B. G. and Salmon, S. E.: Lancet, **2**: 797, 1975.
- 19) Matsuda, M., Osafune, M., Kotake, T., Sonoda, T., Sobue, K. and Nakajima, T.: Clin. Chim. Acta., **87**: 93, 1978.
- 20) Dunzendorfer, U. and Russell, D. H.: Cancer Res., **38**: 2321, 1978.
- 21) Bloom, H. J. G.: Brit. J. Cancer, **25**: 250, 1971.

(1979年7月4日受付)