

ヒ ト 腎 細 胞 癌 の 基 礎 的 研 究

第3報. 腎細胞癌組織内にみられた新しい γ -glutamyl
transpeptidase アイソザイムについて

大阪大学医学部第3内科学教室 (主任: 山村雄一教授)

波 田 寿 一
東 野 一 彌
山 本 英 雄
渡 辺 信 一 郎

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
宇 佐 美 道 之
古 武 敏 彦
園 田 孝 夫

A FUNDAMENTAL STUDY OF RENAL CELL CARCINOMA

PART 3. A NOVEL γ -GTP ISOZYME DETECTED IN RENAL
CELL CARCINOMA TISSUEToshikazu HADA, Kazuya HIGASHINO, Hideo YAMAMOTO
and Shinichiro WATANABE*From the Third Department of Internal Medicine, Osaka University Hospital**(Chairman: Prof. Y. Yamamura, M. D.)*Minoru MATSUDA, Masao OSAFUNE, Michiyuki USAMI,
Toshihiko KOTAKE and Takao SONODA*From the Department of Urology, Osaka University Hospital**(Chairman: Prof. T. Sonoda, M. D.)*

Gamma-glutamyl transpeptidase (γ -GTP, E.C. 2.3.2.1) has been considered to be a member of γ -glutamyl cycle and play a physiological role in the transport of amino acids across cell membrane through this cycle. This enzyme was extracted from cancerous tissue obtained from 10 patients with renal cell carcinoma. These enzyme preparations were investigated electrophoretically and enzymologically in comparison with the enzyme of normal renal tissue, normal liver tissue and fetal renal tissue. The results obtained were as follows.

1) Five cancerous tissues had a novel γ -GTP which was electrophoretically different from that of normal kidney, fetal kidney or normal liver. Other properties of the novel γ -GTP were almost the same as that of normal kidney except molecular weight.

2) Molecular weight of the novel γ -GTP was about 130,000, while that of normal kidney was approximately 90,000.

3) With regard to the possible relationship between the histopathological findings of the renal

cell carcinoma and the presence of the novel γ -GTP, it was revealed that the novel enzyme was detected more frequently in poorly differentiated renal cell carcinoma or in the tumor composed mainly of granular cells.

Further investigation is necessary to establish the clinical significance of the novel γ -GTP, but at least it is suggested that this enzyme might be a biochemical marker of poorly differentiated renal cell carcinoma.

は じ め に

腎細胞癌の病理組織学的形態は、すでによく知られているようにその増殖様式、細胞配列、組織構築はもとより、細胞質の染色性、異型性の程度など、いずれの点においても非常に多彩な変化を示し、また同一腫瘍内においても部分によりかなり異なった形態を示す場合も多い。このような多様性は組織学的観察にみられるにとどまらず、腎細胞癌症例においてみられるさまざまな全身性変化としても臨床的に観察されている。さて本腫瘍の生化学的構造の多様性もまた同様にみられることはすでに著者が、組織内アルカリフォスファターゼアイソザイムパターンにつき検討した結果として本報告第2報¹⁾において詳述したが、今回はアルカリフォスファターゼと同様、細胞膜を構成する酵素の1つと考えられる組織内 γ -glutamyl transpeptidase (γ -GTP) につき酵素化学的に追究し、すでに報告²⁾したようにこれまでその存在を知られていない新しい γ -GTP アイソザイムが見られる場合のあること、およびこの新しい γ -GTP アイソザイムの出現と腫瘍の病理組織学的所見との関係につき検討した結果をあわせて報告したい。

研究対象および方法

1. 研究対象

過去2年の間に当科ならびに関連病院にて手術的治療がなされた腎細胞癌症例のうち、Table 1 に示す10例より得られた腫瘍組織を対象とした。症例の平均年齢は55.7歳(中間値54.0歳) 男子6例、女子4例である。これらの腫瘍の病理組織学的悪性度は Skinner et al.³⁾ の基準により判定され、grade 1~2 を low grade, grade 3~4 を high grade と分類した。また細胞型は、腫瘍細胞のほぼ2/3以上が clear cell または granular cell より成る場合をそれぞれ clear cell type, granular cell type とし、これらの中間に位置する腫瘍を mixed cell type とした。腫瘍組織は摘除後十分生理食塩水にて洗滌し、 -70°C に保存され、必要に応じ室温にて融解し研究に使用した。対照として使用した正常腎組織、正常肝組織および胎児腎組織(妊娠3ヵ月目)は事故死または剖検例より得られたものを同様に保存したものである。

2. 研究方法

(1) 粗酵素標品、部分精製酵素標品の作成。

組織を細切したのち3倍容量の50 mM Tris-HCl

Table 1. Patient profiles, pathological findings and γ -GTP isozyme in renal cell carcinoma tissue.

Patient No.	Age	Sex	Grade	Cell type	Novel- γ -GTP isozyme
1 (S.A.)	67	female	2	granular	(+)
2 (K.Y.)	41	male	3	clear	
3 (T.O.)	44	male	3	granular	
4 (S.E.)	52	female	4	granular (anaplastic)	
5 (N.Y.)	47	male	3	mixed	
6 (E.E.)	54	female	2	clear	(-)
7 (S.Y.)	72	male	2	mixed	
8 (G.A.)	65	male	2	clear	
9 (Y.O.)	54	female	2	clear	
10 (T.Y.)	61	male	2	clear	

buffer pH 7.4 とともにガラス・テフロンホモジナイザーにて充分ホモジナイズする。これに bromelain (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) を 1 mg/15 mg protein of the homogenate となるように加え、攪拌しつつ 37°C にて 60 分間保温したのち 13,000g, 45 分の遠沈により上清分画を集める。沈渣には 50 mM Tris-HCl buffer pH 7.4 を加え充分攪拌したのち同様の遠沈にて再び上清を集める。さらに同様の操作で沈渣を数回洗滌し、このようにして回収した上清分画を粗酵素標品とした。

粗酵素標品より 50% 飽和硫酸により沈澱する部分を遠心除去したのち 10 mM Tris-HCl buffer pH 7.4 に対し十分に透析する。これを DEAE cellulose カラムクロマトグラフィー (11.5×3.3 cm, 10 mM Tris-HCl buffer pH 7.4 にて平衡化し、250 ml の同じ buffer で洗滌、酵素液は 50 mM より 300 mM に漸増する NaCl 溶液 600 ml にて溶出) により分画し、酵素活性を含む部分を回収、10 mM Tris-HCl buffer pH 7.4 に対し透析した。この標品をさらに Sephadex G-200 にてゲル濾過 (2.5×90 cm, 10 mM Tris-HCl pH 7.4 にて平衡化し、溶出は 7.5 ml/hour の同じ buffer により施行) し酵素活性を含む分画を回収したのち、

10 mM Tris-HCl buffer pH 7.4 に対し透析し、これを部分精製酵素標品とした。

なお正常腎組織の γ -GTP 部分精製は上記のような方法により施行したが、腎細胞癌組織を試料とした場合には硫酸分画は省略し、bromelain 処理後ただちに DEAE cellulose および Sephadex G-200 にて部分精製をおこなった。また正常肝ならびに胎児腎組織については bromelain 処理による粗酵素標品を以下の検討材料とした。

(2) γ -GTP 活性の測定

γ -GTP 活性は Szasz⁴⁾の方法を一部改変し、次のような方法により測定した。最終的に、3.75 mM L- γ -glutamyl-p-nitroanilide, 22.5 mM glycylglycine, 11.0 mM MgCl₂ および適量の酵素を含む 2 ml の 75 mM Tris-HCl buffer pH 8.5 の混合液を 37°C にて 20 分間保温する。酵素反応は 10% trichloroacetic acid, 2 ml を添加し停止せしめ、遠沈により上清を採取し、遊離された p-nitroaniline を 410 nm にて吸光測定する。酵素 1 単位は 37°C で 1 分間に L- γ -glutamyl-p-nitroanilide より 1 μ mol の p-nitroaniline を遊離させる酵素量と定義する。

(3) タンパク質の測定

Table 2. Purification of γ -GTP from a normal renal tissue.

	total protein (mg)	total activity (units)	specific activity (units/mg·protein)	recovery (%)
crude homogenate	1032	784.8	0.76	100
bromelain treatment	1016	835.5	0.82	106.3
ammonium sulfate fraction	333	666.0	2	89.2
DEAE-cellulose	43.9	429.7	9.8	54.7
sephadex G-200	6.7	353.7	52.8	45.1

Table 3. Purification of a novel γ -GTP from a renal cell carcinoma tissue.

	total protein (mg)	total activity (units)	specific activity (units/mg·protein)	recovery (%)
crude homogenate	318.5	39.4	0.12	100
bromelain treatment	212.6	23.0	0.11	58.3
DEAE-cellulose	21.4	17.6	0.84	44.7
sephadex G-200	2.4	12.8	5.34	32.5

Bovine serum albumin (Sigma Chemical Co. St Louis, Mo.) を標準とし, Lowry et al.⁵⁾ 方法により吸光測定した. 一部では 280 nm で吸光により測定した.

(4) ポリアクリルアミドディスク電気泳動

Davis⁶⁾ の方法により 7.5% ポリアクリルアミドゲルでディスク電気泳動をおこなった. 通電は 1 チューブ当たり 2 mA とし 4°C にて 90 分間おこない, 酵素活性帯は Miyazaki and Okumura⁷⁾ の方法に準じ, N- γ -L-glutamyl- β -naphthylamide および glycylglycine と保温したのち, 生じた β -naphthylamine を Fast Garnet GBC salt とカップリングさせ発色せしめて検出した.

(5) 酵素標品の neuraminidase 処理

10 mM Tris-HCl buffer pH 7.4 中にて 酵素標品を, その 40 倍量のタンパク質を有する neuraminidase (*Clostridium perfringens* より抽出, Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) と室温にて 16 時間反応せしめ, 分解産物を電気泳動, またはゲル濾過にかけた.

(6) ゲル濾過による分子量の測定

Sephadex G-200 カラム (1.6×32.0 cm, 10 mM Tris-HCl buffer pH 7.4 にて平衡化) に標品 0.5 ml をアプライし, 溶出は同じ buffer にておこない 0.9 ml づつの分画を採取した. 標準タンパク質として, ニワトリアルブミン, ウシ血清アルブミン, ヒト γ -グロブリンおよびフェリチンを使用し, これらとの比較により分子量を概算した.

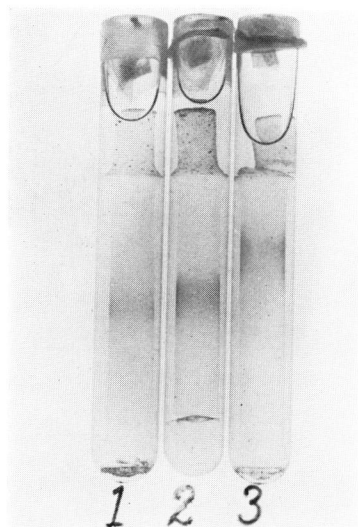


Fig. 1.

1. γ -GTP in normal liver tissue.
2. novel γ -GTP in renal cell carcinoma tissue.
3. γ -GTP in normal renal tissue.

結 果

1. 正常腎組織および腎細胞癌組織 γ -GTP 活性

Table 2 に正常腎組織 γ -GTP の部分精製過程における酵素活性値を示す. ゲル濾過後の回収率は 45.1% であるが比活性は約 70 倍に相当するまで部分精製され



Fig. 2.

1. novel γ -GTP in renal cell carcinoma tissue.
2. γ -GTP in fetal renal tissue.
3. γ -GTP in normal renal tissue.

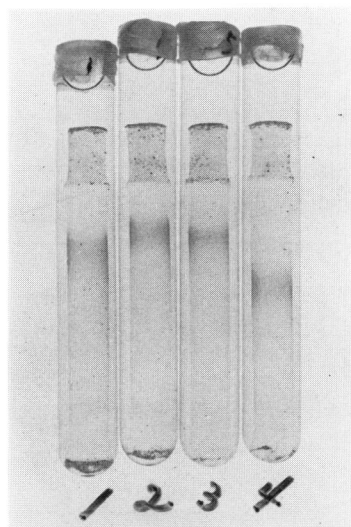


Fig. 3.

1. γ -GTP in normal renal tissue.
2. enzyme preparation 1, after the treatment with neuraminidase.
3. enzyme preparation 4, after the treatment with neuraminidase.
4. novel γ -GTP in renal cell carcinoma tissue.

ている。Table 3 に腎細胞癌症例 No. 1 より得られた腫瘍組織における精製過程を示すが、酵素活性は正常腎に比し著しく低く、またゲル濾過後の回収率も32.5%とやや低率であったが、比活性は約45倍にまで部分精製されている。

2. 正常腎組織および腎細胞癌組織の γ -GTP アイソザイム

正常肝組織 γ -GTP, 正常腎組織 γ -GTP とともに症例 No. 1 より得られた γ -GTP の電気泳動像を Fig. 1 に示す。検討した腎細胞癌組織10例中5例において Fig. 1 に示した症例 No. 1 と同じく、正常腎組織の γ -GTP よりも陽極寄りであるが、正常肝 γ -GTP よりもやや遅れて泳動される特異な泳動帯が認められた。Bromphenol blue をマーカーとしてみると Rf 値は正常肝では 0.53, 正常腎では 0.33 であるがこの特異な γ -GTP は 0.46 となる。胎児腎組織 γ -GTP は Fig. 2 にも示すように正常腎と同一の易動度を有している。正常腎ならびに腎細胞癌に特有な γ -GTP の neuraminidase 処理後の泳動像も Fig. 3 に示すようにやはり正常腎 γ -GTP は腎細胞癌に特有の γ -GTP にやや遅れて泳動されている。

このような腎細胞癌に特有な γ -GTP がみとめられなかった腫瘍組織においては正常腎と同じ易動度を示

す γ -GTP が検出された。

3. 正常腎ならびに腎細胞癌特有 γ -GTP の酵素化学的性質

a) 至適 pH

pH 8.0~9.0 にわたる 0.3 M Tris-HCl buffer において酵素活性を測定したが、至適 pH はともに 8.5 であった。

b) Km 値

L- γ -glutamyl-p-nitroanilide を基質とした場合の Michaelis 定数を、基質濃度を 0.5 mM から 2.5 mM の範囲で変化させ、酵素活性を測定し算出したが、正常腎組織 γ -GTP では 1.22 mM, 腎細胞癌特有 γ -GTP では 1.43 mM であった。

c) 陽イオンおよび EDTA の影響

各種イオンおよび EDTA のそれぞれの酵素活性におよぼす影響を検討したものが Table 4 である。Table 4 に示したようにこれらによる影響は正常腎 γ -GTP および腎細胞癌特有 γ -GTP のいずれに対しても同様であった。

d) 分子量

Sephadex G-200 カラムによるゲル濾過法により分子量を測定すると正常腎組織 γ -GTP は約 9 万, 腎細胞癌特有 γ -GTP は約 13 万と測定された。

Table 4. Effect of cations and EDTA. The activity was expressed as a percent of that of the control experiment.

addition	conc (M)	relative enzyme activity (%)	
		normal kidney γ -GTP	novel γ -GTP
none		100	100
MgCl ₂	10 ⁻²	96	93
CaCl ₂	10 ⁻²	88	86
MnCl ₂	10 ⁻²	72	71
ZnSo ₄	10 ⁻²	0	2
CuSo ₄	5 × 10 ⁻³	34	38
KCl	10 ⁻²	106	96
NaCl	10 ⁻²	105	102
EDTA	5 × 10 ⁻³	99	100

Table 5. Some properties of normal kidney γ -GTP and novel γ -GTP in renal cell carcinoma.

properties	normal kidney γ -GTP	novel γ -GTP
pH optimum	8.5	8.5
Km value	1.22 × 10 ⁻³ M	1.43 × 10 ⁻³ M
molecular weight	90,000	130,000

以上の結果はまとめて Table 5 に示した。

4. 腎細胞癌に特有な γ -GTP の出現と、病理組織学的所見

Table 1 にすでに示されているように、腎細胞癌に特有な γ -GTP が出現している腫瘍の病理組織学的所見は 1 例の例外をのぞき、悪性度では high grade に属し、逆にこの γ -GTP のみられない腫瘍はすべて low grade に属するものであった。また細胞型でみても正常腎 γ -GTP と同じアイソザイムのみられる腫瘍はすべて clear cell type であったが、腎細胞癌特有の γ -GTP のみられた腫瘍は clear cell type 1 例、mixed cell type 1 例、granular cell type 3 例（うち 1 例は anaplastic variety）となり、かなり明瞭な相異が観察された。

考 察

γ -GTP (E.C. 2.3.2.1.) は γ -glutamyl peptide より γ -glutamyl 基を各種 アミノ酸やペプチドに転移せしめる反応を触媒する。この酵素は最初 Hanes et al.⁸⁾ (1950) によりヒツジ腎組織中に見いだされたが、哺乳動物では他の組織にも広く分布していることが知られている。しかし各種の臓器内における活性は腎において著しく高く、ついで脾、肝、前立腺、脾、小腸、脳、心筋などに活性が見いだされる。またこの酵素は組織のミクロゾーム分画に高い活性がみられることより、大部分細胞膜に存在するものとされているが、その生理的機能についてはいまだ十分に解明されてはいない。しかし腎尿管細胞における活性の高ことから Orłowski⁹⁾, Meister¹⁰⁾ は γ -glutamyl cycle として知られる細胞外アミノ酸の細胞内への取り込み過程における機能を示唆している。

さて血清 γ -GTP はすでに広くその臨床的意義が検討され、肝・胆道疾患（慢性肝炎、肝硬変、閉塞性黄疸、原発性、または転移性肝癌など）、心筋梗塞、脾炎の診断や病態把握に重要な貢献がなされているが、その含有活性の最も高い腎の各種疾患との関係はあまり認められず、わずかに腎移植術後の拒絶反応にともなう血清 γ -GTP の上昇¹¹⁾や、腎細胞癌患者の一部において、肝転移を認めない場合でも、プロトロンビン時間の延長や肝腫大、血清アルカリフォスファターゼの上昇とともに血清 γ -GTP の上昇する場合のあることが知られているにすぎない。この腎細胞癌にともなう血清 γ -GTP の上昇は腎細胞癌組織に由来するものか、あるいは何らかの肝障害因子による肝由来の γ -GTP によるものかについては著者は少なくとも本報告第 2 報で詳述したアルカリフォスファターゼに関す

る検討より、 γ -GTP もまた肝に由来するものと考えているが、その最終的な結論は今後の検討をまたなければならぬ。

ヒト正常腎組織に含まれる γ -GTP に関する酵素化学的研究はすでに Richter¹²⁾, Miller et al.¹³⁾ によりかなり解明されている。酵素の抽出にタンパク分解酵素を使用した Richter の報告によれば、その電気泳動像は 1 本の活性帯を示すとされている。しかし Miller et al. は界面活性剤を使用して得た酵素標品で電気泳動をおこなった結果、3 本の活性帯が認められることを述べており、またその至適 pH は 8.2 と報告している。Bromelain を使用し酵素を抽出した著者の検討結果はすでに述べた通りであるが、この相異は酵素抽出方法の相異にもとづくものであるのかもしれない。

さて腎毒性物質の投与により腎組織内 γ -GTP が尿中に排泄される場合のあることはすでによく知られている¹⁴⁾。また正常人でも尿中 γ -GTP 活性値はかなり高く、必ずしも尿中にみられる γ -GTP の起源が腎に由来するものであるとはいいい切れないが、尿量やクレアチニン、尿素、ロイシンアミノペプチターゼ、アルカリフォスファターゼなどの尿中排泄量と尿中 γ -GTP 排泄には明らかな相関がみられることから¹⁵⁾、腎に由来するものである可能性も高く、今後各種腎疾患との関係の検討が必要であらう。

最後に著者の見出した腎細胞癌に特有な γ -GTP アイソザイムの意義につき簡単に考察してみたい。この γ -GTP アイソザイムの腎細胞癌特異性については、他に検討した組織が正常腎、正常肝、および胎児腎に限られているので明確に結論することはできない。さらにまた 3 カ月の胎児腎組織中にはみられないことより、CEA や α -fetoprotein のような carcino-fetal antigen でもないようである（他の胎児組織に見出される可能性はある）。しかしその出現は腫瘍の病理組織学的所見との比較検討より、分化度の低い腫瘍に多くみられることから、腎尿管細胞の癌化にともなう酵素の修飾または形質転換の 1 つの大きな指標となるであらう。

さてすでに Beck and Chaudhuri¹⁶⁾ より腎細胞癌組織中の γ -GTP は組織化学的にみて、その活性は正常腎皮質に比較して低いものであったと報告されており、また Hautman et al.¹⁷⁾ により悪性腎実質性腫瘍においては腫瘍組織内のみではなく、尿中 γ -GTP 排泄も低下していると報告されている。しかしながらこれらの報告においてはその酵素の電気泳動的性質、生化学的性質については検討されていないようである。たしかに著者の検討結果からも、腎細胞癌組織内

γ -GTP 活性は正常腎組織に比しかなり低い活性しか検出されなかったが、また一方、半数の腎細胞癌症例において正常腎組織とは異なっていることも明らかとなった。このような性質を利用し、尿中あるいは血中 γ -GTP アイソザイムのパターンを分析することにより、腎細胞癌の診断や治療に有益な情報のもたらされる可能性も高く、今後症例をかさね検討をくわえてゆきたいと考えている。

結 語

10症例より得られた腎細胞癌組織内 γ -GTP につき、その性質を検討し、以下の結果を得た。

1. 10例の腎細胞癌組織のうち5例からは、電気泳動において、正常腎、正常肝、胎児腎組織のものとは異なる易動度を示す γ -GTP が検出された。他の5例からは正常腎と同様の易動度を示す酵素が検出された。
2. 腎細胞癌に特有な γ -GTP の酵素化学的性質につき若干の検討を加えた。
3. 腎細胞癌に特有な γ -GTP の出現と、その腫瘍の病理組織学的所見につき比較検討し、この酵素が出現する場合は分化度が低く、また、granular cell type または mixed cell type のことが多いことを示した。
4. 尿中または血中 γ -GTP アイソザイムの分析は、腎細胞癌の診断、治療などの点で今後有益な情報をもたらす可能性があることを示した。

御協力をいただいた大阪厚生年金病院、大阪府立病院、大阪警察病院、大阪府立成人病センターに感謝いたします。

文 献

- 1) 松田 稔・長船匡男・宇佐美道之・古武敏彦・園田孝夫・波田寿一・渡辺信一郎・大河内寿一・東野一彌：泌尿紀要，**24**: 619, 1978.

- 2) Hada, T., Higashino, K., Yamamoto, H., Yamamura, Y., Matsuda, M., Osafune, M., Kotake, T. and Sonoda, T.: Clin. Chim. Acta, **85**: 267, 1978.
- 3) Skinner, D. G., Colvin, R. B., Vermillion, C. D., Pfister, R. C. and Leadbetter, W. F.: Cancer, **28**: 1,165, 1971.
- 4) Szasz, G.: Clin. Chem., **15**: 124, 1969.
- 5) Lowry, O. H., Rosebrugh, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: J. Biol. Chem., **193**: 265, 1951.
- 6) Davis, B. J.: Ann. N. Y. Acad. Sci., **121**: 404, 1964.
- 7) Miyazaki, S. and Okumura, M.: Clin. Chim. Acta., **40**: 193, 1972.
- 8) Hanes, C. S., Hird, F. J. R. and Isherwood, F. A.: Nature, **166**: 288, 1950.
- 9) Orlowski, M. and Meister, A.: Proc. Nat. Acad. Scien., **67**: 1,248, 1970.
- 10) Meister, A.: Science, **180**: 33, 1973.
- 11) Lehmann, D., Prentice, M. and Rosalki, S. B.: Ann. Clin. Biochem., **7**: 148, 1970.
- 12) Richter, R.: Arch. Imm. Ther. Exp., **17**: 476, 1969.
- 13) Miller, S. P., Awasthi, Y. C. and Sravastava, S. K.: J. Biol. Chem., **251**: 2,271, 1976.
- 14) 及川栄治：日消会誌，**62**: 253, 1965.
- 15) Szasz, G.: Zschr. Klin. Chem. u. Klin. Biochem., **8**: 1, 1970.
- 16) Beck, P. R. and Chaudhuri, A. K. R.: Clin. Chem., **22**: 528, 1976.
- 17) Hautman, R., Kisteres, R. and Lutzeyer, W.: Urology, **7**: 12, 1976.

(1978年5月21日受付)