

肝癌の組織中カテプシン B 活性と 血清中カテプシン B 活性阻害因子の 動態とその臨床的意義

岡山大学第一内科学教室 (主任：辻 孝夫教授)

橋 本 誠

(昭和63年2月18日受理)

Key words : 肝癌, カテプシン B, 血清中カテプシン B 阻害因子, 浸潤, 転移

緒 言

肝細胞癌は硬変肝に生じるだけでなく、早期に脈管（とくに門脈）内へ浸潤し、肝内転移や他臓器へ遠隔転移するため、その根治的治療は今日でも容易でない。多くの肝細胞癌症例に対し、抗癌剤併用による肝動脈塞栓療法や免疫賦活療法などが集学的におこなわれ、予後の改善には今後一層の努力が必要とされている。このような現状から、肝細胞癌転移の生化学的機構を明らかにし、それを抑制しようとする試みがみられる。

教室の波辺ら¹⁾は、非癌部の胃粘膜や胃潰瘍の再生上皮に比し、胃癌組織では有意にカテプシン B 活性が高く、胃癌の増殖や浸潤とカテプシン B 活性の密接な関連性を明らかにした。さらに、Abecassis ら²⁾は乳癌とその転移リンパ節で、Köppel ら³⁾はラットの高転移能 sarcoma 培養系でそれぞれカテプシン B 活性の増加を認め、悪性腫瘍の増殖や浸潤・転移とプロテアーゼ、特にカテプシン B との関連性が注目されている。

従来、プロテアーゼにはアクチベーターやインヒビターの存在が知られ、その活性調節機構は極めて複雑で、十分解明されたとはいえない。カテプシン B などシステインプロテアーゼには α_2 -マクログロブリンをはじめ各種のインヒビターが血清中に存在し⁴⁾⁵⁾、システインプロテアーゼに特異的な分子量12,000前後の細胞内インヒビターの存在⁶⁾も報告されている。これらは分子

進化論上、同一起源のものであることが明らかにされ、cystatin superfamily として分類整理されている⁷⁾。

著者は、肝細胞癌や胆管細胞癌など肝癌の浸潤や転移における組織中カテプシン B 活性とその血清中阻害因子の動態と臨床的意義を明らかにする目的で、肝癌の剖検肝組織と手術時切除肝を用い、癌部と非癌部における組織中カテプシン B 活性ならびに血清中のカテプシン B 活性阻害因子について検討し、興味ある知見を得たので報告する。

対 象 と 方 法

実験 I : 肝癌の組織中カテプシン B 活性の検討

肝細胞癌 7 例と胆管細胞癌 1 例の剖検肝並びに術中に切除肝を得た肝細胞癌 1 例（手術例）の合計 9 例を対象とした (Table 1)。年齢は 25-73 歳で、男女比は 8 : 1 であった。肝細胞癌は 8 例で、AFP が全例 500ng/ml 以上の高値を示し、肝硬変の合併（全例肝細胞癌）は 6 例で認められた。Edmondson 分類では II 型 3 例、II + III 型 1 例、III 型 3 例、III + IV 型 1 例であった。胆管細胞癌は 1 例で、肝硬変は伴わなかった。

得られた肝組織を非癌担癌部、非癌部の癌境界部、癌発育先端部から、それぞれ 30-50mg 採取し、99 倍の生理食塩水を加えてフロンホモナイザーでホモジネーションし、1,000 × g, 10 分間遠沈し、その上清を生理食塩水で 10 倍に希釈

Table 1 Clinical features of patients examined in the present study for liver cathepsin B and L activity

Case No.	Age Sex	HBsAg/HBsAb /Alcohol/LC	AFP ng/ml	CEA ng/ml	TAE (times)	Cause of death	Gross type (capsule)	Size of main tumor (mm × mm)	Edmondson	Metastasis
1.	59M	-/-/+	164600	2.0	2	HF	Spreading (-)	132×93	III+IV	Lung, Portal vein, Splenic vein
2.	64F	-/+/-/+	4150	7.6	0	GI-B	Spreading (-) Multinodular	40×80	III	Lung, Portal vein
3.	63M	-/-/+	686	4.9	0	Pneumonia	Spreading (-) Multinodular	61×52 51×76	III	Lung, Vertebra (L1), Rt hepatic vein
4.	25M	+/-/-/+	1390000	1.1	0	RF	Spreading (-) Multinodular	94×53 41×41	II+III	Portal vein, Splenic vein
5.	57M	-/+/-/-	957	2.1	0	Alive	Expanding (+)	30×47	II	None
6.	50M	-/+/-/-	323000	1.0	1	GI-B	Multinodular	20×30	II	Lung
7.	69M	-/-/±/+	71000	40.5	3	GI-B	Expanding (+)	85×75	III	Lt axillary LN, Para-aortic LN
8.	73M	+/-/±/+	534	...	3	HF	Expanding (+) Multinodular	20×30	II	Peritoneum
9.	65M	-/-/+/-	29	6.0	0	HF	Spreading (-) Multinodular	85×80 30×30	CCC	Lung, Hepatic hilar LN, Peripancreatic LN

No.5 is an operated case. Alcohol: + and ++, 80g and more than 80g ethanol daily over 10 years, respectively. LC: Liver cirrhosis, AFP: α -Fetoprotein, CEA: Carcinoembryonic antigen, TAE: Transcatheter arterial embolization, RF: Respiratory failure, HF: Hepatic failure, GI-B: Gastrointestinal bleeding, LN: Lymphnode, CCC: Cholangiocellular carcinoma.

して酵素活性測定用の資料とした。酵素活性測定には、その250 μ lに0.1% Brij-35 (半井化学, 京都)250 μ lを加えた後、さらにシステイン加リン酸緩衝液 [0.1M phosphate buffer, pH6.0, 2.7mM cysteine (free base) and 1.33mM disodium EDTA] 250 μ lを加え、30℃, 1分間プレインキュベーションした。酵素反応は基質, 20 μ MのN-carbobenzoxyl-L-arginyl-L-arginine-4-methyl-7-coumarilamide (Z-Arg-Arg-MCA) (蛋白研究所, 大阪) 250 μ lを加えることで開始し、30℃, 10分間インキュベーションした後、反応停止試薬 (100mM sodium monochloroacetate-30mM sodium acetate-70mM acetic acid, pH4.3) 1mlを加えて反応を終了させた。カテプシンBにより分解され、遊離されるaminomethylcoumarine (MCA)を、日立分光蛍光光度計 (650-10形)を用い、励起波長370nm, 蛍光波長460nmで測定した。0.05 μ MのMCAの蛍光強度を0.01mUと定義し、ホモジネートの蛋白量をLowryら³⁾の方法で測定し、カテプシンB活性を比活性 (10⁻²mU/mg蛋白)で表現した⁹⁾。

カテプシンL活性は、N-carbobenzoxyl-L-phenylalanyl-L-arginine-4-methyl-7-coumarilamide (Z-Phe-Arg-MCA) (蛋白研究所, 大阪)を基質として同様に測定した⁹⁾。

実験II: 血清中の肝カテプシンB活性阻害因

子の検討

実験II-a: 等電点電気泳動後の肝カテプシンB活性染色

剖検で得られた肝組織を19倍量の生理食塩水で上記と同様にホモジネーションした。この上清20 μ lに血清20 μ lを加えてよく混和し、室温で30分間おいた後、Mortら¹⁰⁾の方法に準じてLKB2117マルチフォーを用いたポリアクリルアミド薄板ゲルで等電点電気泳動 (20ワット, 3時間)した。活性染色の基質としてN-carbobenzoxyl-L-arginyl-L-arginine-4-methoxy- β -naphthylamide (Bachem, 米国)を用い、カテプシンB活性により分解、遊離したnaphthylamine (NA)を4-amino-2, 3-dimethyl-azobenzene (Fast Garnet) (Sigma, 米国)で発色させた。対照として7 g/dlの牛血清アルブミン (BSA) (Sigma, 米国) 20 μ lを肝組織上清に加えて、同様に電気泳動し、染色した。

実験II-b: コンカナバリンAセファロースゲル濾過

コンカナバリンAセファロース (ConA) (Pharmacia, 米国) 1mlを充填したミニカラム (総容量: 6.5ml, 内径: 7.5mm, フラクション容量 1mlで20本のフラクションを集めた)を用い、実験II-aで使用した肝組織上清の200 μ lをゲル濾過した。はじめに、実験Iのリン酸緩衝液 (本実験ではシステインを加えない)でConA

Table 2 Clinical features of cirrhotic patients examined in the present study for serum inhibitory factor of cathepsin B activity

Case No.	Age Sex	Diagnosis	Portal thrombus	GPT IU/L	ALP IU/L	CHE IU/L	T.Cho mg/dl	T.Bil mg/dl	Alb g/dl	K _{ICG}	AFP ng/ml
1	54M	LC	—	64	120	284	179	2.2	3.3	...	6
2	55F	LC	—	60	137	139	114	0.8	3.5	...	34
3	58F	LC	—	54	177	265	216	0.6	3.8	0.08	22
4	54M	LC	—	77	98	131	86	2.6	3.3	0.05	8
5	72M	LC	—	43	62	362	154	0.6	4.0	...	8
6	61M	LC	—	70	230	133	104	5.2	3.2
7	65M	LC	—	46	71	171	175	1.1	4.0	0.07	34
8	54M	LC	—	56	201	98	110	2.8	2.9
9	58M	LC	—	28	177	208	179	1.1	4.1	...	234
10	50M	LC	—	1101	59	160	185	1.8	3.9	...	413
11	50M	LC	—	69	81	93	104	1.4	2.6	0.04	418
12	57M	LC	—	62	190	54	116	5.6	11
13	30M	LC	—	71	254	58	135	7.1	3.2	0.06	103
14	44F	LC	—	59	224	134	157	11.5	3.7	0.04	13
15	52F	HCC	—	106	127	230	170	1.0	4.2	...	10
16	50M	HCC	—	43	87	61	56	2.2	3.7	0.04	4
17	73M	HCC	—	24	113	293	185	1.0	4.1	...	4
18	67F	HCC	—	43	89	86	140	1.3	3.7	0.06	663
19	60M	HCC	—	120	145	109	140	1.4	3.4	0.13	3
20	59M	HCC	—	21	74	162	109	5.2	4.2	0.07	8150
21	54M	HCC	—	35	139	323	89	1.9	4.5	0.06	9
22	46M	HCC	—	58	154	153	107	1.0	3.4	0.07	5
23	51F	HCC	—	65	132	224	198	0.9	4.2	...	9
24	53M	HCC	—	70	71	98	104	1.1	2.9	0.08	49
25	61M	HCC	—	46	201	133	175	2.8	3.2	0.04	123
26	64M	HCC	+	43	163	193	99	1.4	3.7	0.04	23
27	62M	HCC	+	256	1183	99	286	14.6	3.0	0.11	27100
28	48M	HCC	+	60	187	72	66	21.4	3.5	...	114
29	62F	HCC	+	554	166	181	89	1.9	3.5
30	50M	HCC	+	285	381	120	127	1.7	3.5	0.09	192
31	50M	HCC	+	191	142	110	260	2.8	3.4	0.06	41300
32	40M	HCC	+	56	156	210	118	2.0	3.2	0.05	30
33	54M	HCC	+	62	254	134	116	7.1	3.7	...	103
34	52M	HCC	+	71	224	54	135	1.4	3.2	0.06	13
35	48M	HCC	+	62	81	151	104	1.8	3.3	...	423

GPT : Alanine aminotransferase, ALP : Alkaline phosphatase, CHE : Cholinesterase, T. Cho : Total cholesterol, T. Bil : Total bilirubin, Alb : Albumin, K_{ICG} : Disappearance rate of indocyanine green, AFP : α -Fetoprotein.

と結合しない ConA 非結合型カタプシン B の分子種を溶出した。ついで、ConA と結合したカタプシン B を 200mM の α -methylmannoside で溶出される ConA 結合型カタプシン B の 2 分子

種に分別した。20本のフラクションの各々の 50 μ l に、生理食塩水で 10 倍に希釈した血清 200 μ l を加えた後、実験 I の方法でカタプシン B 活性を測定した。対照として 0.7g/dl の BSA 200 μ l を加

え、同様に測定した。

実験Ⅲ：血清によるカテプシン B 活性阻害率の検討

健康対照例 9 例、慢性肝炎例 16 例、肝硬変例 14 例、肝細胞癌例 21 例、他の悪性疾患 7 例を対象とした。肝疾患の診断は主として血液生化学検査や各種画像診断（腹部超音波、CT や血管造影検査）でおこなった。なお、実験Ⅰの対象と重なる症例は含まれない。肝硬変症例は 35 例で（Table 2）、年齢は 30-73 歳、男女比は 28：7 であった。肝細胞癌の合併が 21 例にみられ、そのなかで 10 例に門脈腫瘍塞栓を認めた。

剖検で得られた肝（非肝・脾・胆道疾患の死亡例）400g を 4 倍容量の生理食塩水でホモジネーションした後、11,700×g で 35 分間超遠心した。その上清を生理食塩水でさらに 80 倍に希釈しカテプシン B 酵素溶液を作製した。カテプシン B 活性の阻害率の測定には、カテプシン B 酵素溶液 100 μ l と、生理食塩水で 64 倍に希釈した血清 100 μ l を、あらかじめ 30℃、15 分間インキュベーションした。この 50 μ l に生理食塩水 200 μ l を加えて測定用の資料とし、実験Ⅰの方法でカテプシン B 活性を測定した。活性阻害因子による阻

害率は、同量の BSA 溶液（7 g/dl の BSA を生理食塩水で 64 倍に希釈）を加えた活性値を対照として、その減少率を百分率で表現した。

実験Ⅳ：血清中の阻害因子の Sephadex G-75 ゲル濾過による検討

Sephadex G-75（Pharmacia、米国）カラム（2.6×95cm、フラクション容量 5 ml、流速 0.7 ml/分で 100 本のフラクションを集めた）を用いて、健康対照 2 例のプール血清 13ml をゲル濾過した。100 本のフラクションのカテプシン B 活性の阻害率は、実験Ⅲで用意したカテプシン B 酵素溶液 100 μ l に各フラクションの溶出液 200 μ l を加え、30℃、15 分間インキュベーションして求めた。さらに、0.1% Brij-35 200 μ l を加えた後、実験Ⅰの方法で酵素活性を測定した。阻害率は、フラクションの溶出液の代わりに同量の生理食塩水を加えた活性値を対照として、その減少率を百分率で表現した。

結 果

実験Ⅰ：肝癌の組織中カテプシン B 活性

肝細胞癌例のカテプシン B 活性（Table 3）は非癌担癌部（Tb）：43±35×10⁻²mU/mg 蛋白（mean±SD）、非癌部の癌境界部（Br）：39±26、癌発育先端部（Fr）：44±34 で、各群間に有意の差は認めなかった。しかし、個々の症例で検討すると、非癌部の癌境界部と癌発育先端部のカテプシン B 活性は非癌担癌部の活性に比し、4 例で上昇し、2 例で不変、2 例で低下した。肺への遠隔転移を認めた 4 例では非癌部の癌境界部と癌発育先端部のカテプシン B 活性は非癌担癌部より高値を示した。カテプシン L 活性も同様の傾向であった。

胆管細胞癌では非癌部の癌境界部と癌発育先端部のカテプシン B と L 活性が非癌担癌部より著しく高値を示し、肺転移も認められた。

実験Ⅱ：血清中の肝カテプシン B 活性阻害因子

BSA を添加した肝ホモジネートを等電点電気泳動した後のカテプシン B 活性染色では、等電点 4.5-5.5 にかけ 5 本の染色帯が認められた。

（Fig. 1）。しかし、BSA の代わりに血清を加えて等電点電気泳動すると、肝カテプシン B の活

Table 3 Liver cathepsin B and L activities in patients with liver cancer.

Case No.	Diagnosis	Cathepsin B			Cathepsin L		
		Tb	Br	Fr	Tb	Br	Fr
1.	HCC*	10	16	26	54	67	68
2.	HCC*	19	20	25	70	82	96
3.	HCC*	14	27	18	47	79	55
4.	HCC	105	73	97	359	263	306
5.	HCC	23	22	21	91	76	74
6.	HCC*	52	85	99	135	238	279
7.	HCC	86	36	28	231	91	64
8.	HCC	33	35	34	98	103	107
9.	CCC*	396	779	733	373	673	738

Enzyme activity in tissue homogenates is expressed as 10⁻² mU/mg protein. NO.5 in an operated case. Tb: Tumor-bearing, non-cancerous tissue, Br: Non-malignant, circumferential tissue (Border), Fr: Cancer-front tissue, *: Lung metastasis.

性染色帯はいずれも完全に消失した。

ConA ミニカラムの実験では、カテプシン B は ConA 結合同型 (ConA と結合するが200mM の α -methylmannoside で溶出される) と非結合同型 (ConA と結合せず、リン酸緩衝液で溶出される) の2分子種に溶出された (Fig. 2)。20本のフラクションの各溶出液に血清を加えて活性を測定すると、両分子種ともカテプシン B 活性は完全に消失した。

実験Ⅲ：血清のカテプシン B 活性阻害率

肝カテプシン B 溶液100 μ lに0.1-1.6 μ lの血清を生理食塩水で100 μ lに希釈して加え、加えた血清量とカテプシン B 活性の阻害率との関係を見ると、添加した血清量が0-0.8 μ lの範囲で直線関係が得られた (Fig. 3)。対照として同量の BSA 溶液 (7 g/dl) を同様に加えたが、活性は全く阻害されなかった。また、カテプシン B と血清中阻害因子との反応時間を変化させその阻害率

を検討したところ、30℃の測定条件では反応時間30分間まで直線関係を示した (Fig. 3 の中の図)。

肝疾患を中心とした患者血清による肝カテプシン B 活性の阻害実験から、慢性肝炎、肝硬変、肝細胞癌や肝癌以外の悪性疾患では、健康対照例に比し阻害率が有意に低値をとることが示された (Fig. 4)。肝細胞癌では慢性肝炎より有意に低値で、肝硬変に比較しても低い傾向にあった。

この実験Ⅲで検討した肝細胞癌例では全例肝硬変を合併していた。肝細胞癌例の中で、超音波診断で門脈本幹から2次分枝迄に門脈腫瘍塞栓を伴うものと伴わないものに分けて検討した。門脈腫瘍塞栓のない肝細胞癌例では、肝硬変例や門脈腫瘍塞栓のない肝細胞癌例に比し、血清中の阻害因子による肝カテプシン B 活性の阻害率は有意に低下しており、また、門脈腫瘍塞栓のある群に2例の肺転移例を認めた (Fig. 5)。

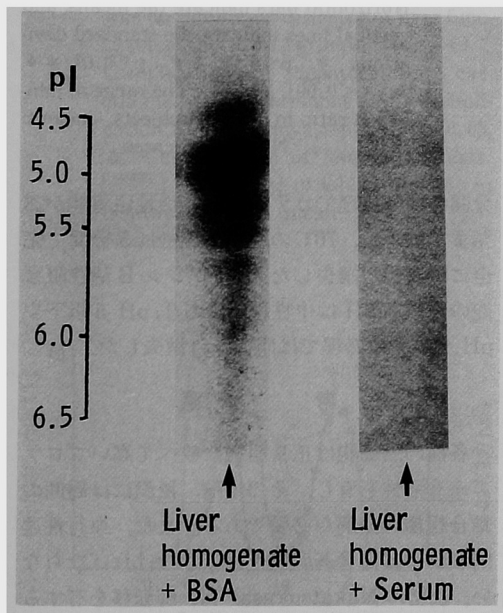


Fig. 1 Staining of liver cathepsin B activity on thin layer polyacrylamide gel after isoelectric focusing (constant power of 20 watts, 3 hours). Five bands of cathepsin B activity (pI 4.5-5.5) were seen, but they were completely disappeared by serum addition prior to isoelectric focusing.

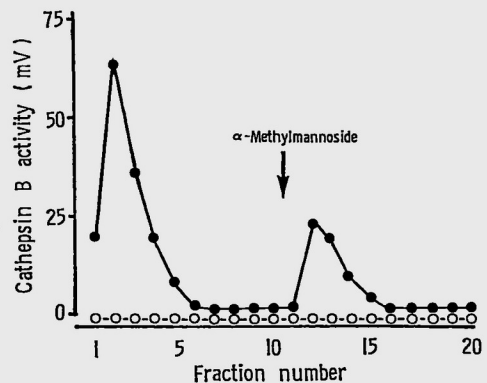


Fig. 2 Chromatographic pattern of liver cathepsin B on a ConA-Sepharose minicolumn (7.5mm \times 2.3cm, 1 ml column collection) and complete inhibition of the activity by serum addition. Two hundred μ l of liver homogenate was applied and eluted with 100mM phosphate buffer (pH6.5) at first, and then with 200mM α -methylmannoside after the 11th fraction came out. Closed circle (●—●) showed 2 molecular forms of cathepsin B activity by addition of BSA. Open circle (○—○) showed disappearance of cathepsin B activity by addition of serum.

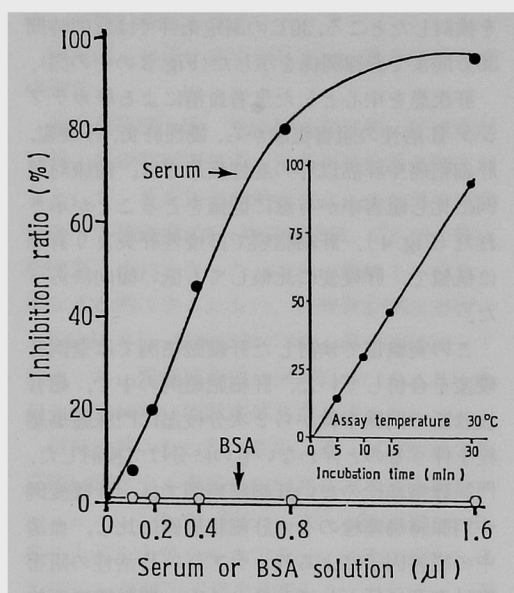


Fig. 3 Inhibition of liver cathepsin B activity by serum. Small volumes of serum (0.1–1.6 μ l) were diluted to 100 μ l with saline and mixed with 100 μ l cathepsin B solution. Two hundred and fifty μ l of them were applied to the assay system. The inhibition ratio linearly increased in the range of 0–0.8 μ l serum. It was also shown that the inhibition ratio linearly increased upto 30 min of incubation (inset).

これらの3群間で阻害率と肝機能検査成績との相関をみると、血清コリンエステラーゼ(CHE)活性、総コレステロール(T. Cho)やアルブミン(Alb)濃度との間に正の相関が認められた(Table 4)。

実験Ⅳ：阻害因子の Sephadex G-75 濾過

血清を Sephadex G-75 カラムでゲル濾過し、肝カテプシン B に対する各フラクションの阻害率を調べ、阻害因子がいかなる分子量を有するかを明らかにした。その結果、64K と 9 K の2つの阻害因子の分画が認められた (Fig. 6)。

健常者、肝硬変と肝細胞癌例の血清でゲル濾過パターンを比較検討したが、症例別や疾患別の明らかな差は認められなかった。9 K の阻害因子は 0 °C、2 時間のインキュベーションではカテプシン B 活性を阻害しなかった。50 °C、30

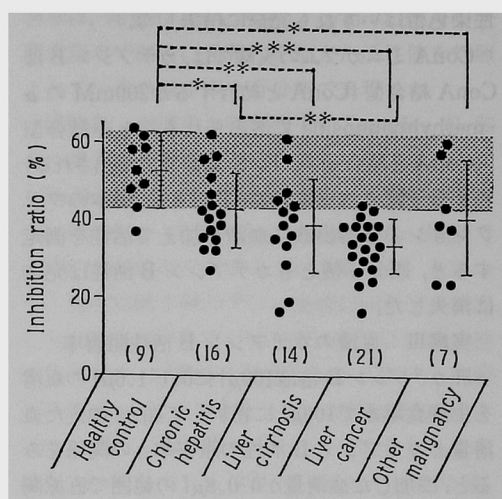


Fig. 4 Inhibition of liver cathepsin B activity by serum from patients with various liver and non-liver diseases. Details of the assay procedure were described under the methods section of the text. Horizontal bars indicate the means, and vertical lines indicate the standard deviations. * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$. \square : The range of inhibition ratio in healthy subjects (mean \pm SD). () : Number of cases.

分間の加熱処理でカテプシン B 活性阻害能が23 %まで低下し、70 °Cの加熱処理では5分間で完全に阻害能が消失した。カテプシン B 活性阻害能の至適な pH は中性付近にあり、pH 5 以下や pH 9 以上の処理では阻害能は消失した。

考 察

各種の癌細胞は正常組織に較べて高いプロテアーゼ活性を有し、その増殖、浸潤には周囲の結合組織の分解が必要である。また、血行性遠隔転移には血管基底膜を進入しなければならない。教室の Nakatsukasa¹¹⁾は、肺転移を有する肝細胞癌例で癌発育先端部のⅣ型(基底膜)コラーゲン分解酵素活性の上昇を報告した。カテプシン B はコラーゲナーゼを活性化すると報告¹²⁾、また直接にコラーゲンを分解するとの報告もある¹³⁾。従って、癌細胞の浸潤や転移に、カテプシン B の蛋白分解作用が密接に関与すると思われる。

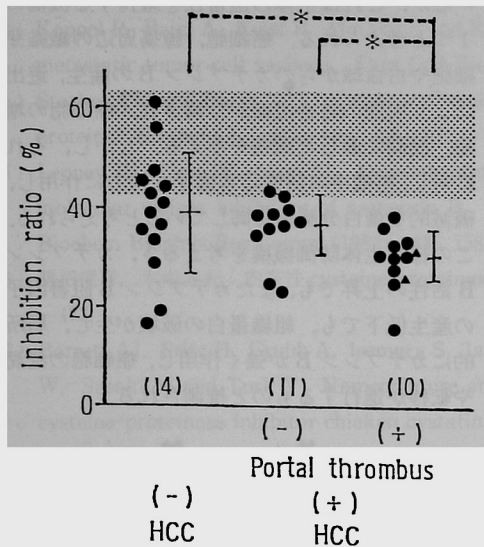


Fig. 5 Inhibition of liver cathepsin B activity by serum from cirrhotic patients with and without portal thrombus. There was no significant difference of liver function tests between 3 groups. HCC (-): Complication of hepatocellular carcinoma. Portal thrombus (+): Complication of portal invasion. *: $p < 0.05$, \blacktriangle : Complication of lung metastasis, shaded area : The range of inhibition ratio in healthy subjects (mean \pm SD). (): Number of cases.

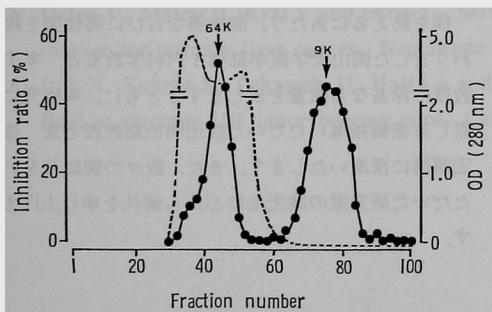


Fig. 6 Chromatographic pattern on Sephadex G-75 column (2.6 \times 95cm, 5ml fraction, speed 0.7ml/min) of serum inhibitory factor of cathepsin B activity. Closed circle (●—●) showed inhibition ratio of cathepsin B activity. Broken line (— —) showed optical density at 280nm.

Table 4 Correlation between serum inhibition and laboratory data

	r	p
GPT	-0.079	NS
ALP	-0.126	NS
CHE	0.448	0.01
T.Cho	0.337	0.05
T.Bil	-0.203	NS
Alb	0.351	0.05
K _{ICG}	0.482	NS
AFP	-0.087	NS

r: Correlation coefficient, p: Significance, NS: Not significant. GPT: Alanine aminotransferase, ALP: Alkaline phosphatase, CHE: Cholinesterase, T.Cho: Total cholesterol, T.Bil: Total bilirubin, Alb: Albumin, K_{ICG}: Disappearance rate of indocyanine green, AFP: α -Fetoprotein.

肝細胞癌例での今回の成績 (実験 I, Table 3) では、癌部と非癌部でのカテプシン B 活性に有意の差を認めず、他の悪性腫瘍でカテプシン B 活性が高いという諸家の報告¹⁾²⁾とは異なる結果であった。しかし、肺への遠隔転移例では、癌浸潤部 (癌発育先端部と非癌部の癌境界部) の活性が非癌担癌部より高いことは興味深い事実である。癌浸潤部でカテプシン B が周囲の結合組織を分解し、血管やリンパ管内に癌細胞を侵入させ、遠隔転移の成立を容易にしていると思われる。

悪性腫瘍例の血清カテプシン B 活性が高いとの報告がある¹⁴⁾¹⁵⁾。しかし、著者も追試をおこなったが、血清中にカテプシン B 活性を検出することはできなかった。等電点電気泳動後にカテプシン B 活性を染色する実験 II-a で、血清は肝カテプシン B の染色帯を完全に消失させる (Fig. 1) こと、また、ConA カラムの実験 II-b でも ConA 結合型ならびに非結合型カテプシン B 活性ともに血清により完全に失活する (Fig. 2) ことなどから、血清中にはカテプシン B の強力な阻害因子が存在することは明らかである。従って、活性測定法によって血清中にカテプシン B 活性を証明することは困難であると考えられた。

血清によるカテプシン B 活性の阻害率 (実験

Ⅲ) は、肝細胞癌例や他の悪性疾患例で低下したが、慢性肝炎例や肝硬変例でも低下した (Fig. 4)。また、血清コリンエステラーゼ活性、総コレステロールやアルブミン濃度など蛋白合成能が栄養状態を示す指標との相関が認められた (Table 4)。これらの成績は、肝障害の重症度に応じて阻害因子の産生が低下することを示唆している。しかし、肝硬変を肝細胞癌の合併と門脈浸潤の有無で3群に分けた検討 (Fig. 5) では、門脈腫瘍塞栓を伴う肝細胞癌例で有意に低く、しかも、3群間で肝機能検査成績に差を認めなかったことは、血清によるカテプシン B 活性の阻害率の低下と門脈浸潤との関連性を示している。

血清中の非特異的プロテアーゼ活性阻害因子である α_2 -マクログロブリン (分子量725K) はカテプシン B も阻害する⁹⁾とされているが、低分子量の基質である MCA 化合物を用いる測定系では、 α_2 -マクログロブリンは酵素の阻害活性を示さない。本実験Ⅳでも、 α_2 -マクログロブリンの溶出する分画には阻害活性を認めなかった (Fig. 6)。Itoh ら¹⁰⁾はマウスの腹水と血漿中に分子量67K のチオールプロテアーゼインヒビターを報告し、生化学的性質から低分子量のキニノーゲンとしている。Sephadex G-75ゲル濾過で認められた64K のカテプシン B 阻害因子と同一のものと思われる。勝沼ら⁹⁾は α と β の2種の Tissue Protease Inhibitor (TPI) を報告し、分子量は共に12K で本来細胞内に存在し、多量の組織の破壊や炎症時に血液中に遊出するとしている。今回明らかにした血清中の9 K のカテプシン B 阻害因子は正常対照例の血清中に存在しており、炎症時に血液中に遊出する TPI とは明らかに異なるものである。

血清中には各種プロテアーゼ活性阻害因子が存在し、プロテアーゼ作用から生体を防御して

いるが、これは生体の恒常性を維持する機構の1つと考えられる。癌細胞、腫瘍周辺の繊維芽細胞や白血球からのカテプシン B の産生、遊出により周囲の結合組織が分解され、癌細胞の増殖、浸潤に適した環境を与える。しかし、それに対し、組織中の活性阻害因子が強力に作用し、破滅的な蛋白分解を防御していると考えられる。この様な生体防御機構を考えるとき、カテプシン B 活性の上昇でも、またカテプシン B 阻害因子の産生低下でも、組織蛋白の破壊が生じ、局所的にカテプシン B が強く作用し、癌細胞の浸潤や転移が進行するものと推測される。

結 論

肝癌例で癌部、非癌部など各部位ににおける肝組織カテプシン B 活性と、血清中のカテプシン B 活性阻害因子を測定し、次の結論を得た。

- (1) 肺転移を伴う肝細胞癌例では、癌浸潤部 (癌発育先端部と非癌部の癌境界部) のカテプシン B 活性が高値を示した。
- (2) 肝細胞癌例では血清中のカテプシン B 活性阻害因子が低下し、門脈腫瘍塞栓を有する例で著しく低下した。

なお、本論文の要旨は第27回日本消化器病学会大会 (昭和60年11月8日於松山)、第23回日本肝臓学会総会 (昭和62年6月11日於岡山) において発表した。

稿を終えるにあたり、御指導ならびに御校閲を賜りました岡山大学医学部第1内科学教室辻孝夫教授に深甚なる謝意を表しますとともに、本研究に際し直接御指導いただいた渡辺明治助教授と東俊宏講師に深謝いたします。また、数々の御助言をいただいた研究室の諸先生に心から御礼を申し上げます。

文 献

- 1) Watanabe M, Higashi T, Hashimoto M, Tomoda J, Tominaga S, Hashimoto N, Morimoto S, Yamauchi Y, Nakatsukasa H, Kobayashi M, Watanabe A and Nagashima H: Elevation of tissue cathepsin B and L activities in gastric cancer. *Hepato-Gastroenterol* (1987) **34**, 120-122.
- 2) Abecassis J, Collard R, Eber M, Pusel J, Fricker JP and Methlin G: Proteinases and siaryltransfer-

- ase in human breast tumors. *Int J Cancer* (1984) **33**, 821—824.
- 3) Köppel P, Baici A, Keist R, Matzku S and Keller R : Cathepsin B-like proteinases as a marker for metastatic tumor cell variants. *Expt Cell Biol* (1984) **52**, 293—299.
 - 4) Starkey PM and Barrett AJ : Human cathepsin B1, inhibition by α_2 -macroglobulin and other serum proteins. *Biochem J* (1973) **131**, 823—831.
 - 5) Lenney JF, Liao JR, Sugg SL, Gopalakrishnan V, Wong HCH, Ouye KH and Chan PWH : Low molecular weight inhibitors of cathepsin B, H and T in human serum, synovial fluid and CSF. *Biochem Biophys Res Comm* (1982) **108**, 1581—1587.
 - 6) 勝沼信彦, 木南英紀 : 内在性 cysteine proteinase inhibitor family 最近の進歩. *生化学* (1986) **58**, 470—477.
 - 7) Barrett AJ, Fritz H, Grubb A, Isemura S, Jarvinen M, Katunuma N, Machleidt W, Muller-Esterl W, Sasaki M and Turk V : Nomenclature and classification of the proteins homologous with the cysteine-proteinase inhibitor chicken cystatin. *B J Letters* (1986) **236**, 312.
 - 8) Lowry OH, Rosenbrough NJ, Fare AL and Randall RJ : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* (1951) **193**, 265—275.
 - 9) Higashi T, Hashimoto M, Watanabe M, Yamauchi Y, Fujiwara M, Nakatsukasa H, Kobayashi M, Watanabe A and Nagashima H : Assay procedures for cathepsin B, H and L activities in rat tissue homogenates. *Acta Med Okayama* (1986) **40**, 27—32.
 - 10) Mort JS and Leduc M : A simple, economical method for staining gels for cathepsin B-like activity. *Anal Biochem* (1982) **119**, 148—152.
 - 11) Nakatsukasa H : Type IV collagen-degrading enzyme activity in hepatocellular carcinoma. *Acta Med Okayama* (1986) **40**, 83—91.
 - 12) Graf M, Baici A and Strauli P : Histochemical localization of cathepsin B at the invasion front of the rabbit V2 carcinoma. *Lab Invest* (1981) **45**, 587—596.
 - 13) Davies M, Hughes KT and Thomas GJ : Evidence that kidney lysosomal proteinases degrade the collagen of glomerular basement membrane. *Anal Biochem* (1980) **3**, 116.
 - 14) Pietras RJ, Szego CH, Mangan CE, Seeler BJ, Burtnett MM and Overi M : Elevated serum cathepsin B1 and regional pathology after DES exposure. *Obstet Gynecol* (1978) **52**, 321—327.
 - 15) Dufek V, Matou B, Kral V and Bures L : Serum alkaline-stable acid thiol proteinase……a possible marker for primary liver cancer. *Neoplasma* (1984) **31**, 99—107.
 - 16) Itoh N, Yokota S, Takagishi U, Hatta A and Okamoto H : Thiol proteinase inhibitor in the ascitic fluid of sarcoma 180 tumor-bearing mice. *Cancer Res* (1987) **47**, 5560—5565.

**Tissue cathepsin B activity and serum inhibitory factor
of cathepsin B activity in patients with liver cancer**

Makoto HASHIMOTO

First Department of Internal Medicine,

Okayama University Medical School, Okayama 700, Japan

(Director : Prof. T. Tsuji)

Liver tissue cathepsin B (EC 3. 4. 22. 1) activity was measured with N-benzyloxy-carbonyl-L-arginyl-L-arginine-4-methyl-7-coumarilamide (Z-Arg-Arg-MCA) as the substrate in order to clarify the role of this enzyme in tumor invasion or metastasis of liver cancer. Serum inhibitory factor of cathepsin B activity was also determined in cirrhotic patients with hepatocellular carcinoma and in patients with other liver diseases.

Cathepsin B activity of liver cancer tissues in patients with lung metastasis was higher than that in non-cancerous tissue surrounding the main tumor. The levels of serum inhibitory factor of cathepsin B activity in patients with hepatocellular carcinoma were lower than those in healthy subjects or non-malignant chronic liver diseases. Furthermore, in hepatocellular carcinoma patients with portal invasion, serum levels of inhibitory factor of cathepsin B activity were much lower than those with no portal invasion.

The results suggest that cathepsin B activity participates in tumor invasion and metastasis of liver cancer due to imbalance of enzyme-inhibitor relationship.