



Title	口腔癌に対するマーカー酵素としての血清ジペプチジルペプチダーゼ (DPP) IV活性 : とくに末梢血Tリンパ球におけるDPPIV発現
Author(s)	上松, 隆司
Citation	大阪大学, 1995, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.11501/3081560">https://doi.org/10.11501/3081560</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	うえまつ たかし 上松隆司
博士の専攻分野の名称	博士(歯学)
学位記番号	第 11959 号
学位授与年月日	平成7年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	口腔癌に対するマーカーエンザイムとしての 血清ジペプチジルペプチダーゼ(DPP) IV活性 —とくに末梢血Tリンパ球におけるDPPIV発現—
論文審査委員	(主査) 教授 松矢 篤三  (副査) 教授 作田 正義 助教授 石田 武 講師 岩本 資己

### 論文内容の要旨

ジペプチジルペプチダーゼ(DPP) IVは、ペプチドのN末端よりX-プロリンを特異的に加水分解する膜結合酵素である。口腔癌患者血清中の本酵素活性が、健常人にくらべ有意に低下し、病態を反映して変動することから、口腔癌のマーカーエンザイムとしての有用性が示唆されてきた。さらに、本酵素活性が発癌の初期段階、すなわち上皮内癌あるいは初期浸潤癌形成期より低下することをジメチルベンツアントラセンを用いたハムスター頬嚢発癌実験で著者らは明らかにした。したがって、DPPIVは口腔癌の診断や予後判定に有用なマーカーエンザイムとなりうるものが強く示唆されるが、癌患者における酵素活性低下の機序については未だ明らかにされていない。最近、リンパ球の表面抗原であるCD26がDPPIVであり、Tリンパ球の活性化と密接に関係していることが報告されたことから、血清中の本酵素活性の変動に末梢血リンパ球が関与している可能性が推察される。本研究では、血清中の本酵素活性低下の機序を解明するために、健常人および口腔癌患者の末梢血リンパ球におけるDPPIV発現について検討した。

#### 【実験方法】

##### 1. 担癌患者および健常人の末梢血リンパ球サブセットの同定

同意を得た担癌患者および健常人より採血し実験に供した。末梢血リンパ球サブセットのCD3, CD4, CD8およびCD26陽性細胞の割合は、それぞれ蛍光標識のLeu-4, Leu-3a, Leu-2aおよびTal抗体を用いてフローサイトメトリーで算定した。

##### 2. Tリンパ球におけるDPPIV発現の検索

末梢血リンパ球は比重遠心法で分離し、培養にはRPMI1640培地に2-メルカプトエタノール( $5 \times 10^{-5}M$ )、非働化ウシ胎児血清(10%)を添加した基礎培地にTリンパ球刺激物質であるPHA( $10 \mu g/ml$ )あるいはConA( $10 \mu g/ml$ ) Tリンパ球増殖因子であるIL-2( $10u/ml$ )を添加した増殖培養液で7日間培養した。Tリンパ球は、2-アミノエチルイソチオウロニウム臭化水素酸塩にて処理したヒツジ赤血球を用いてロゼット形成法で分離した。Tリンパ球の細胞膜は、Mentleinらの方法に準じて調製し、蛋白定量はLowry法で測定した。CD26抗原の発現はTal抗体を用いた蛍光抗体法およびウエスタンブロッティング法にて検討した。

#### 【結果】

##### 1. 口腔癌患者および健常人におけるリンパ球サブセットと血清DPPIV活性

フローサイトメトリーより得られた結果では、癌患者の末梢血リンパ球数およびTリンパ球(CD3陽性細胞)数、

Tリンパ球サブセットであるCD4およびCD8陽性細胞数は、健常人に比べ癌患者では有意に低下していた。CD3陽性CD26陽性細胞は、数が少なく有意差はみられなかったものの癌患者では約2倍多かった。血清DPPIV活性は、末梢血リンパ球数、Tリンパ球数、CD4およびCD8陽性細胞数との間に正の相関を示したが、CD26陽性細胞数については健常人で相関するが癌患者では相関しないことが示された。

## 2. 口腔癌患者および健常人の末梢血Tリンパ球細胞膜におけるDPPIV活性とCD26抗原(DPPIV)の発現

Tリンパ球より分離した細胞膜蛋白あたりのDPPIV活性を測定すると、血清DPPIV活性と強い相関関係を認めたが、癌患者では活性値が有意に低下していた。Tリンパ球細胞膜蛋白に対して、ウエスタンブロッティングを行った後、デンストメーターでCD26(DPPIV)蛋白バンドの相対濃度を測定したところ、癌患者では健常人の約1/2であった。すなわち、癌患者の末梢血Tリンパ球細胞膜は、健常人に比べDPPIV活性の低下ばかりかCD26(DPPIV)抗原量も減少していることが明らかとなった。

## 3. リンパ球の増殖とDPPIV活性

PHA, ConAあるいはIL-2を添加してリンパ球を培養すると、健常人に比べ癌患者のリンパ球増殖反応は低下していた。PHA, ConAあるいはIL-2を添加した場合、健常人においてはリンパ球数の増加にともないリンパ球および培養上清中のDPPIV活性の上昇がみられたのに対し、癌患者ではいずれもわずかな増加しかみられなかった。この傾向は、PHAあるいはConAにIL-2を添加して培養すると増強された。

## 4. 培養リンパ球におけるCD26抗原の発現

培養リンパ球CD26抗原の発現を経日的に直接蛍光抗体法で観察すると、健常人では培養3日目にはすでにCD26抗原の強い発現がみられ、7日目まで発現が持続したが、癌患者では培養3日目にわずかな抗原の発現を認めるものの、7日目にはむしろ発現の減弱がみられた。培養リンパ球抽出液中のCD26抗原(DPPIV)の発現をウエスタンブロッティングで健常人と癌患者で比較したところ、PHA, ConA, PHAとIL-2あるいはConAとIL-2を添加して培養した健常人のリンパ球では、培養3日目にすでにCD26抗原蛋白が検出され、7日目にはさらに強い発現がみられた。一方、癌患者のリンパ球を3日間培養してもCD26抗原蛋白は明らかには検出されず、培養7日目には検出されたものの、健常人のリンパ球に比べ弱い発現であった。

### 【結語】

口腔癌患者の血清DPPIV活性低下の機序を解明することを目的とし、健常人および口腔癌患者の末梢血リンパ球を用いて検討した結果、健常人に比べ口腔癌患者では、外来刺激による末梢血Tリンパ球の反応性が著しく低下していること、Tリンパ球細胞膜のDPPIV活性とCD26抗原(DPPIV)蛋白の減少していることが明らかとなり、さらには細胞外へのDPPIVの移行も低下している可能性が示された。すなわち、癌患者末梢血Tリンパ球の活性化およびDPPIV発現の低下が、血清DPPIV活性低下に強く関与していることが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

本論文は、口腔癌患者における血清ジペプチジルペプチダーゼ(DPP)IV活性の低下機序を解明することを目的として、口腔癌患者の末梢血リンパ球におけるDPPIVの発現を健常人と比較検討したものである。フローサイトメトリーで測定した末梢血リンパ球数、Tリンパ球数およびそのサブセットであるCD4、CD8陽性細胞数は、血清DPPIV活性と正の相関を示し、癌患者では各細胞数、血清DPPIV活性とも低値を示した。また、遠心分離したTリンパ球細胞膜のDPPIV活性と血清DPPIV活性の間にも強い相関関係を認め、癌患者ではDPPIV活性が低値であるのみならずリンパ球表面抗原であるCD26(DPPIVに相当)の蛋白量も減少していた。さらに、Tリンパ球刺激物質を添加した末梢血リンパ球培養において、癌患者では幼若化反応の著しい低下、リンパ球のDPPIV活性とCD26抗原蛋白の減少が明らかとなり、培養上清中へのDPPIVの移行が低下していることが示唆された。

以上の知見は、癌患者末梢血Tリンパ球の活性化およびCD26抗原(DPPIV)発現の低下が血清DPPIV活性低下に強く関与していることを示唆するものであり、血清DPPIV活性が口腔癌のマーカーエンザイムとなりうるメカニズムを検討した価値ある研究として、本研究者は博士(歯学)の学位を得る資格があるものと認める。