



Title	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
Author(s)	上松, 隆司
Citation	大阪大学, 1995, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3081560
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

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—

上松隆司

Serum Dipeptidyl Peptidase (DPP) IV Activity as a Possible
Marker of Oral Cancer
: With Special Reference to the Expression of
DPP IV in Peripheral Blood T Lymphocytes

Takashi UEMATSU

緒 言

ジペプチジルペプチダーゼ IV (EC3.4.14.5, 以下 DPPIV) は, ペプチドのアミノ末端からジペプチドを水解遊離する膜結合酵素で, ラットの肝臓と腎臓において, 初めて見い出された¹⁾。ジペプチドとしては, X (アミノ酸) -Pro に特異性が高く, 人工基質である Gly-Pro-メチルクマリナムイドを用いて酵素活性を蛍光測定できるが, 酵素の生理学的役割については未だ不明な点が多い。近年, 血清中の本酵素活性が, 肝炎²⁾ および肝癌患者³⁾ で上昇し, 胃癌⁴⁾, 脾癌⁵⁾, リンパ性白血病⁶⁾, リンパ肉腫⁶⁾ などの悪性腫瘍患者や全身性エリテマトーデス^{7, 8)}, リウマチ性関節炎⁸⁾ などの自己免疫疾患患者では低下することが報告され, 臨床生化学的にも注目されてきた。とりわけ悪性腫瘍については, 担癌マーカーとして興味をもたれている。口腔癌患者に関しても, すでに血清中の本酵素活性が, 健常人に比べ有意に低下し, 病態を反映して変動することが報告されている⁹⁾。さらに著者らは, 口腔癌モデルとして化学発癌剤であ

るジメチルベンツアントラセンを用いたハムスター類囊発癌実験から、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明らかにした^{10, 11)}。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ことが強く示唆されるが、癌患者における活性低下の機序については未だ明らかにされていない。DPPIV活性低下に関する現在までの研究で、1)癌組織⁴⁾や培養癌細胞¹²⁾では正常組織や正常細胞に比べ、DPPIV活性が低下している、2)DPPIV活性阻害物質は、癌組織、培養癌細胞および担癌患者血清中に検出されない¹²⁾、3)癌患者血清中のDPPIV蛋白は、健常人に比べ、有意に減少している¹³⁾ことが示されたが、いずれも低下の原因を十分説明しうるものではなかった。

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¹⁴⁾。担癌患者における末梢血リンパ球数の減少と幼若化反応の低下は周知の事実であることから、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強く推察される。

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

I. 対象および採血法

1) 全血の採取

初診時未治療の口腔扁平上皮癌患者のうち、同意の得られた22名の患者（男性13名，女性9名，25～91歳，平均62.0歳）から採血した末梢血を口腔癌患者群として実験に供した。すなわち，組織学的には全て扁平上皮癌でUICCの病期分類¹⁵⁾では，Stage I：4名，Stage II：7名，Stage III：6名およびStage IV：5名であった。対照群には，健常人26名（男性15名，女性11名，26～79歳，平均50.3歳）の末梢血を用いた。但し，試料の関係で実験によっては対象患者数が異なっている。なお，実験対象の健常人および担癌患者に対しては，問診およ

び臨床検査上，肝機能障害，腎機能障害および自己免疫疾患の無いことを確認した。

採血は全血1mlあたり6単位のヘパリンナトリウム(ミドリ十字，大阪)を添加したディスポーザブルの注射筒で行い，血清DPPIV活性の測定およびフローサイトメトリーあるいはTリンパ球細胞膜の分離およびリンパ球の培養に供した。なお，別途採血した血液2mlをガラス試験管に移し，室温で30分間静置後， $250\times g$ で10分間遠心することにより，血清を分離し，実験に供するまで -80°C の超低温フリーザー(MDF-192AT：サンヨー，大阪)中で凍結保存した。

II. フローサイトメトリーによるリンパ球サブセットの同定

リンパ球サブセットのCD3，CD4，CD8に対する抗体としてフィコエリスリン(PE)標識抗ヒトLeu-4，Leu-3aおよびLeu-2aマウスモノクローナル抗体(Becton-Dickinson，MA，USA)を用い，CD26(DPPIV)に対する抗体として，フルオレッセイン・イソチオシアネイト(FITC)標識抗ヒトTa1マウスモノクロ

ーナル抗体(Coulter Immunology, FL, USA)を用いた。すなわち、ヘパリン添加血液 $100\mu\text{l}$ に、FITC標識抗体とPE標識抗体をそれぞれ $20\mu\text{l}$ 添加し、 4°C で30分間静置した。溶血試薬($0.155\text{M NH}_4\text{Cl}$, 0.01M KHCO_3 , 0.1mM EDTA-2Na 溶液)を 1.4ml 添加して軽く攪拌した後、室温で5分間静置して溶血させ、 $300\times g$, 5分間遠心して上清を除去した。沈澱したリンパ球は、 Ca^{2+} , Mg^{2+} を含まないリン酸緩衝液(以下PBS)で3回洗浄後、 0.2ml のPBSに再浮遊させて試料とした。これをフローサイトメーター(FACSCAN: Becton-Dickinson, MA, USA)にて、アルゴンレーザー(488nm)によるFITCおよびPE標識細胞の同時解析を行った。なお、リンパ球数は、自動血球計数機(Coulter Counter: Model T660, Coulter, FL, USA)を用いて算定した。

Ⅲ. Tリンパ球細胞膜の分離

1) Tリンパ球の分離

まず全血よりリンパ球を比重遠心法で分離した。すなわち、ヘパリン添加血液に同量の生理食塩水を加えて希釈後、 15ml ポリプロピレン製遠沈管

(Corning, NY, USA)にあらかじめ分注した LymphoprepTM(Nycomed, Oslo, Norway)上に界面を乱さないように重層した。室温で800×g, 20分間遠心して形成された中間層(リンパ球層)よりリンパ球を採取した。PBSでリンパ球を3回洗浄した後, 56℃で30分間非働化したウシ胎児血清(Filtron, Lot. 51901: Filtron Pty Ltd, Drooklyn, Australia)に 1×10^7 /mlの濃度で浮遊させた。つぎに 4% 2-アミノエチルイソチオウロニウム臭化水素酸塩(AET: 半井化学, 京都)溶液(pH9.0)で37℃, 15分間処理したヒツジ赤血球(以下SRBC: 日本バイオテスト, 東京)を非働化ウシ胎児血清で 2×10^9 個/mlの細胞密度とし, このAET処理SRBC浮遊液とリンパ球浮遊液を同量ずつ混和した。室温で200×g, 5分間遠心した後, 氷中に2時間静置してロゼット形成(以下E-ロゼット)させた。軽く混和して再浮遊させた後, 15mlポリプロピレン製遠沈管に予め分注したLymphoprep上に重層し, 室温で800×g, 20分間遠心してE-ロゼット細胞を沈降させた。上清を吸引除去後, 0.83% $\text{NH}_4\text{Cl} \cdot \text{Tris-HCl}$ 緩衝液

(pH7.4)で再浮遊させ、37℃で15分間静置してSRBCを溶血させた。得られたTリンパ球標品は、PE標識抗ヒトLeu-4抗体で染色することにより、95%以上がCD3陽性細胞であることを確認した。

2) Tリンパ球細胞膜の調製

Mentleinら¹⁶⁾の方法に準じて細胞膜を調製した。すなわち、Cell lysis buffer (75mM KCl, 65mM NaCl, 10mM Hepes, pH7.4) でTリンパ球を 1×10^7 個/mlの細胞懸濁液とした後、Cell disruption bomb(No.4639, Parr Instrument, IL, USA)に入れて密封し、窒素でボンベ内圧を50気圧とした。4℃で20分間静置した後、1滴ずつ滴下するようにバルブを解放して細胞懸濁液を回収した。高速遠心機(GS-15R Centrifuge: Beckman, CA, USA)で4℃で10,000×g, 15分間遠心後、上清を超高速遠心機(Optima XL: Beckman, CA, USA)で4℃で105,000×g, 120分間遠心して得られたミクロソーム画分を粗細胞膜成分として実験に供した。細胞膜の可溶化には 1% Triton X-100を含む 50mM Tris-HCl緩衝液(pH7.4)を用いた。

IV. 蛋白定量法

蛋白量は、ウシ血清アルブミン(BSA: Irvine Scientific, CA, USA)を標準として、Lowry法に準じて測定した¹⁷⁾。

V. DPPIV 活性の測定法

DPPIV 活性の測定はKatoら¹⁸⁾の方法に準じて行った。人工基質としてGly-Pro-メチルクマリナムイド(Gly-Pro-MCA: ペプチド研究所, 大阪)を用い、反応で遊離した7-アミノ-4-メチルクマリナム(AMC)の蛍光強度を測定した。すなわち、0.15M グリシン-NaOH緩衝液(pH8.7) 40 μ l, 2mM Gly-Pro-MCA 25 μ l に酵素標品と蒸留水を加え、標準には酵素標品の代わりにAMC (ペプチド研究所, 大阪)を加えてそれぞれ全量を100 μ lとした。37℃の恒温振とう水槽中で30分間反応させた後、1M 酢酸緩衝液(pH4.2)を1ml加えて反応を停止し、蛍光分光光度計(650-10S型: Hitachi, Tokyo)を用いて励起波長380nm, 蛍光波長460nmで蛍光強度を測定した。なお、酵素の1国際単位はこの条件下で1分間に1 μ moleのAMCを遊離する酵素量とした。Tリンパ

球細胞膜および培養リンパ球のDPPIV活性については、比活性としてnmole/min/mg proteinで表した。

VI. リンパ球培養法およびリンパ球抽出液の調整法

1) 培養液および培養法

培養にはRPMI1640培地(Sigma, MO, USA)に50 μ Mの2-メルカプトエタノール(Sigma, MO, USA)と10%非働化ウシ胎児血清を添加した培養液を基礎培地として用いた。基礎培地にTリンパ球刺激物質であるフィトヘムアグルチニン(PHA, 10 μ g/ml: Difco, MI, USA), コンカナバリンA(Con A, 10 μ g/ml: Sigma, MO, USA), Tリンパ球増殖因子であるインターロイキン2(IL-2, 10u/ml: Collaborative Biomedical Products, MA, USA)を添加したものを増殖培養液として用いた。基礎培地で培養したものを対照とし, PHA, Con A, IL-2, PHAとIL-2およびCon AとIL-2を添加した増殖培養液で培養したものを実験群とした。比重遠心法で分離した健常人と癌患者のリンパ球をそれぞれの増殖培養液で 1×10^6 個/mlの細胞密度とし,

16mm径浮遊細胞培養用平底マルチウエルプレート (Corning, NY, USA)に1mlずつまき, 37℃の5%炭酸ガス培養器中で7日間培養した。なお細胞浮遊液の調製に際し, 生細胞数はトリパンブルー染色法¹⁹⁾によりBürker-Türk型血球計算板で算定した。

2) 色素還元法による生細胞の測定

培養リンパ球の生細胞はMTS法で測定した。すなわち, 3-カルボキシメトキシフェニル-2-(4-スルフォニル)-2H-テトラゾリウム(MTS: 2mg/ml)-PBS溶液(pH6.0)とフェナジン・メトサルフェイト(PMS: 0.92mg/ml)-PBS溶液(pH7.3)を20:1の割合で使用直前に混合したMTS/PMS溶液を, リンパ球の浮遊した増殖培養液1mlに対し100 μ l添加し, 37℃の5%炭酸ガス培養器中で4時間培養した。MTSが生細胞のミトコンドリアで還元されて生ずるホルマジン産物をマイクロプレートリーダー(Model 3550-UV: Bio-Rad, Tokyo)を用いて490nmの吸光度で測定した。培養リンパ球の相対生細胞数は, 培養開始時にMTS/PMS溶液を添加して4時間培養したリンパ球 1×10^6 個/mlの吸光度を1として求めた。

3) リンパ球抽出液の調製

培養0, 3, 5および7日目のリンパ球と培養上清を4℃で250×g, 5分間遠心分離した。リンパ球をPBSで3回洗浄し, 細胞溶解液(1% Triton-X 100, 0.1M Tris-HCl緩衝液, pH7.4) 100 μlに懸濁溶解した後, 4℃で12,000×g, 5分間遠心して得られた上清を細胞抽出液とした。

VII. 蛍光抗体法による培養リンパ球CD26抗原発現の検索

リンパ球の浮遊した増殖培養液200 μlあたりFITC標識抗ヒトTa1マウスモノクローナル抗体を5 μl添加して軽く攪拌後, 氷中で30分間静置した。4℃で250×g, 5分間遠心し, 上清を除去した後, PBSにて3回洗浄したリンパ球を退色防止剤含有水溶性封入剤(FluorSave: Calbiochem, CA, USA)を用いて蛍光顕微鏡用スライドガラスとカバーガラス(マツナミガラス, 大阪)で封入した。リンパ球の形態は, 透過型ノマルスキー式微分干涉顕微鏡(BX50-34-DIC: オリンパス, 東京)で観察し, CD26抗原(DPPIV)の発現は, IB励起用ミラーユニッ

トを用いて蛍光顕微鏡(BX50-34-FLA1: オリンパス, 東京)で観察した。

VIII. ウエスタンブロッティング法によるCD26抗原(DPPIV)の検出

可溶化したTリンパ球細胞膜および培養リンパ球抽出液を二連スラブゲル電気泳動装置(AE-6410: アトー, 東京)を用いたSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(Laemmli系)にて20mAの定電流で7.5%ゲルの1レーンあたり20 μ gの蛋白を泳動した。泳動した蛋白は, 水平積層式転写装置(AE-6675: アトー, 東京)を用いてメタノールで処理したPVDF膜(Immobilon-P⁸⁰: Millipore, MA, USA)に転写した後, 5% BSAを含む50mM Tris-HCl緩衝液(pH7.6)により室温で1時間ブロッキング処理した。1次抗体として, 抗ヒトTa1マウスモノクローナル抗体(Coulter Immunology, FL, USA)を室温で2時間反応させ, さらに2次抗体としてビオチン化抗マウスIgGウサギ抗体(Tago, CA, USA)を室温で1時間作用させた。アルカリホスファターゼ標識StreptABComplex(Dako, Denmark)を室温で20分間

反応させた後、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルりん酸/ニトロブルーテトラゾリウム(BCIP/NBT: Sigma, MO, USA)で発色させた。なお、各段階で行うPVDF膜の洗浄には、0.05% Tween 20を含む50mM Tris-HCl緩衝液(pH7.6)を用いた。検出されたCD26抗原(DPPIV)のバンドはデンストメーター(AE-6900: アトー, 東京)により相対濃度を求め比較した。

結 果

I. 口腔癌患者および健常人における末梢血リンパ球サブセットと血清DPPIV活性

1) 末梢血リンパ球サブセットの比較(表1)

末梢血よりフローサイトメトリーを用いて得られたそれぞれのリンパ球サブセットの細胞数を健常人と癌患者で比較した。癌患者の末梢血リンパ球数およびその中のCD3陽性細胞であるTリンパ球数は、健常人の約1/2であり、有意($P < 0.001$)に低値を示した。さらに、Tリンパ球サブセットであるヘルパー/インデューサーCD4およびサプレッサ

ー/サイトトキシックCD8陽性細胞数についても、健常人に比べ、癌患者ではそれぞれ0.59, 0.68に低下しており、統計学的にも有意であった。しかし、末梢血リンパ球に対するTリンパ球の割合、Tリンパ球におけるCD4, CD8陽性細胞の割合は、健常人と癌患者で大きな差はなかった。リンパ球の表面抗原CD26(DPPIV)に関しては、CD3陽性および陰性細胞において、抗CD26(Ta1)抗体で蛍光染色される細胞の割合は予想に反して低かった。

CD3陽性CD26陽性細胞数は健常人で平均 34 ± 41 個/ μ l, 癌患者で平均 70 ± 70 個/ μ lであり、有意差はみられないが($P > 0.05$), 癌患者では約2倍多かった。CD3陰性CD26陽性細胞数は、健常人で 8 ± 11 個/ μ l, 癌患者で平均 11 ± 11 個/ μ lで差はなかった。

2) 血清DPPIV活性とリンパ球サブセットの相関性

癌患者22名(25~91歳, 平均62.0歳)と健常人26名(26~79歳, 平均50.3歳)の血清DPPIV活性を測定すると、健常人 47.8 ± 12.4 IU/L serumに対し、癌患者 29.9 ± 7.4 IU/L serumと有意に癌患者で低値を示した($P < 0.001$)。そこで、癌患者におけるDPP

IV 活性低下と、末梢血リンパ球数およびリンパ球サブセットの間に相関があるか否かを検索した(図1~4)。その結果、血清DPPIV活性と、末梢血リンパ球数($Y=0.01x+20.02$, $r=0.69$, $P<0.001$), Tリンパ球であるCD3陽性細胞数($Y=0.01x+23.83$, $r=0.70$, $P<0.001$), CD4陽性細胞数($Y=0.01x+30.60$, $r=0.51$, $P<0.01$)およびCD8陽性細胞数($Y=0.01x+32.28$, $r=0.44$, $P<0.05$)との間に正の相関を認めた。しかし、Tリンパ球以外のリンパ球であるCD3陰性細胞とは相関を認めなかった。CD26陽性細胞に関しては、CD3陽性CD26陽性細胞数において、健常人ではDPPIV活性と正の相関($Y=0.15x+42.60$, $r=0.50$, $P<0.01$)を認めたが、癌患者では相関を認めなかった($r=0.39$, $P>0.05$)。またCD3陰性CD26陽性細胞数については、細胞数が少なく、全く相関がみられなかった。

フローサイトメトリーより得られた結果から、血清DPPIV活性はTリンパ球数と強く相関するが、Tリンパ球のうちCD4陽性細胞数とCD8陽性細胞数の間には相関係数に大きな差がないこと、Tリン

パ球のうち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。

Ⅱ. 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

1) Tリンパ球細胞膜のDPPⅣ活性と血清DPPⅣ活性の相関性

血清DPPⅣ活性と末梢血Tリンパ球数に強い相関がみられたことから、Tリンパ球細胞膜におけるDPPⅣ活性および酵素蛋白量に変化があるか否かを検討した。

癌患者15名(25～91歳, 平均61.4歳)および健常人22名(26～69歳, 平均44.0歳)の末梢血Tリンパ球より遠心分離した細胞膜(ミクロソーム)画分のDPPⅣ活性を測定すると, mg蛋白あたり, 健常人では 2.7 ± 1.0 nmole/min/mg proteinであるのに対し, 癌患者では 0.8 ± 0.4 nmole/min/mg proteinと1/3以下の活性であった(表2)。各人に対する数値をプロットすると, 血清DPPⅣ活性とTリンパ球細胞膜のDPPⅣ活性の間には強い相関がみられた($Y=$

$10.34x+20.83$, $r=0.88$, $P<0.001$)(図5)。

2)末梢血Tリンパ球細胞膜におけるCD26抗原(DPP IV)の発現

健常人3名と口腔癌患者3名の末梢血Tリンパ球細胞膜画分 $20\mu g$ をSDS-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、抗CD26抗体であるTa1を用いてウェスタンブロッティングを行った。その結果、健常人のCD26(DPPIV)蛋白バンドに比べて、癌患者のものは明らかに薄く、デンストメーターで測定すると約1/2の量であった(図6)。

以上の結果から、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。

Ⅲ. 培養リンパ球におけるDPPIV活性および

CD26(DPPIV)抗原の発現

1)培養リンパ球におけるCD26抗原の発現

Tリンパ球は抗原提示細胞(Antigen presenting cell)からの抗原提示を認識し、細胞表面分子の変化や芽球化といった形態的变化を遂

げ、分裂増殖を経てサイトカイン産生に代表されるエフェクター活性を有する免疫応答を担う細胞へと最終的に分化していく²⁰⁾。このTリンパ球の機能は、外来刺激に対してのみならず、悪性腫瘍細胞表面から脱落(Shedding)してくる抗原を認識することから、自己細胞の悪性化に対する監視機構をも担っている²¹⁾。そこで、Tリンパ球刺激物質およびTリンパ球増殖因子を作用させた場合の反応性およびTリンパ球表面のCD26抗原量を検索した。Tリンパ球刺激物質であるPHAあるいはCon A、Tリンパ球増殖因子であるIL-2を培養液に添加し、末梢血リンパ球を培養すると、それらに反応、増殖するTリンパ球はコロニー状の凝集塊を形成するが、健常人と癌患者でその様相は著しく異なっていた(図7)。すなわち、健常人では、培養3日目にコロニー形成が始まり、5日目、7日目にはコロニーの増大とともに数も増加したが、癌患者では、培養3日目にはコロニー形成はほとんどみられず、5日目になりコロニー形成がみられたがその大きさや数は著しく抑制されていた。これら

の作用は調べられた濃度においてPHAとCon Aでは強かったが、IL-2では弱かった。

これら培養リンパ球に対して、経日的にリンパ球表面におけるCD26抗原の発現を直接蛍光抗体法で観察した(図8)。図にはPHAを添加した場合を示す。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。また、健常人の培養リンパ球の一部には、リガンド(抗体)が至適濃度で免疫複合体形成したことを示すパッチ形成や旺盛な代謝エネルギーの存在を示すカップリング現象がみられたのに対し、癌患者の培養リンパ球では、それらの発現頻度は低かった。

2) 培養リンパ球の増殖能とDPPIV活性

Tリンパ球刺激物質あるいは増殖因子による末梢血リンパ球の反応性が、健常人と癌患者で著しく異なったため、リンパ球の増殖とリンパ球におけるDPPIV活性および培養上清中のDPPIV活性を測定した。

刺激物質や増殖因子の添加されていない基礎培地で末梢血リンパ球を7日間培養した場合、健常人あるいは癌患者のどちらにおいても、生細胞数の増加はみられず、リンパ球および培養上清中のDPPIV活性の上昇も認められなかった。PHA、Con AあるいはIL-2を添加した場合、健常人においては生細胞数の増加と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。図9に無添加およびPHA添加の場合を代表例として示す。7日間培養後の値を比較すると健常人のリンパ球はそれぞれ3.40倍、3.44倍、2.16倍に増加したが、癌患者のリンパ球は増殖能が低く、それぞれ1.57倍、1.72倍、1.50倍にとどまった。この傾向は、PHAあるいはCon AとともにIL-2を添加して培養すると増強された。リンパ球の増殖能とともに、リンパ球におけるDPPIV活性および培養上清中のDPPIV活性は、健常人でそれぞれ2.1~5.5倍、1.2~1.9倍に増加したが、癌患者ではリンパ球で1.6~2.2倍、培養上清中で1.1~1.4倍の増加しかみら

れなかった(表3, 4)。

3)培養リンパ球におけるCD26抗原(DPPIV)蛋白

培養リンパ球抽出液の蛋白10 μ gあたりのCD26抗原(DPPIV)の発現をウエスタンブロッティング法で健常人と癌患者で比較した。基礎培地で培養したリンパ球では7日間培養しても健常人と癌患者のリンパ球CD26抗原蛋白は検出されなかった。PHA, Con A, PHAとIL-2およびCon AとIL-2を添加して3日間培養した健常人のリンパ球では,すでにCD26抗原蛋白が検出され, 培養7日目にはそれぞれCD26抗原(DPPIV)のさらに強い発現がみられた。また, 培養3日目には明らかなCD26抗原蛋白が検出されなかったIL-2のみを添加した増殖培養液でも, 培養7日目ではCD26抗原蛋白が検出された。一方, 癌患者のリンパ球を増殖培養液で3日間培養してもCD26抗原蛋白は明らかに検出されず, 培養7日に検出されたものの, 健常人のリンパ球にくらべ弱い発現であった(図10)。

以上の結果から, 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) 蛋白の発現が抑制されたことが明らかとなった。

考 察

癌の診断，治療効果，予後の判定の補助的手段として，種々の腫瘍マーカーが開発され臨床応用されている。これらの多くは，正常組織や正常細胞にも存在しているが，担癌状態になると，血清や病変部に増加し，腫瘍の消長を反映して変化するものであり，種類によって，癌胎児性蛋白（肝細胞癌における α -フェトプロテイン，大腸癌における CEA など），ホルモン（悪性絨毛上皮腫における絨毛性ゴナドトロピン，膵癌における ACTH など），アイソザイムを含めた酵素（肝細胞癌における γ -グルタミルトランスぺプチダーゼやアルカリフォスファターゼ，前立腺癌における前立腺酸性フォスファターゼなど），癌関連抗原（骨髄腫における M 蛋白，膵癌における CA19-9，卵巣癌における CA125 など）に大別される²²⁾。McIntire

²³⁾ は、理想的なマーカーが具備すべき条件として、1)治療前の値が正常値より数倍高いこと、2)腫瘍に特異性が高いこと、3)腫瘍での産生が確認されていることなどを挙げている。しかし、この条件を満たすマーカーは数少なく、上記の α -フェトプロテインやCEAが比較的臓器特異性の高いマーカーとして用いられているものの非特異的なマーカーが多い。口腔癌に関しても、これまで他臓器癌で有用とされる腫瘍マーカーが適用しうるか否か検討されてきたが、現在のところ決定的なものはない。最近比較的有用なマーカーとして、1977年にKatoら²⁴⁾により子宮頸部扁平上皮癌組織から分離・精製された分子量45,000の蛋白であるSCC抗原(Squamous cell carcinoma related antigen)が用いられているが、進行癌では陽性率が上昇するものの初期癌における陽性率はそれほど高くない。したがって、フェリチン(FER)や免疫抑制酸性蛋白(IAP)などの非特異的なマーカーを組み合わせることにより、診断の効率を高める努力がなされている²⁵⁾。

本研究の対象としたDPPIVは、1966年にHopsu-HavuとGlenner¹⁾が人工基質であるグリシルプロリン- β -ナフチルアミドを加水分解してグリシルプロリンと β -ナフチルアミドを生成する酵素として、ラットの肝臓と腎臓で発見したもので、その後顎下腺²⁶⁾、小腸²⁷⁾、肺胞内マクロファージ²⁸⁾、血管内皮細胞²⁹⁾、線維芽細胞³⁰⁾など多くの哺乳動物の細胞膜に存在することが明らかにされている³¹⁾。本酵素は、肝臓³²⁾、腎臓³³⁾、小腸上皮の微絨毛²⁷⁾に局在していることや結合組織のコラーゲンにGly-Proのアミノ酸配列が多いことから、ペプチドの水解吸収³⁴⁾やコラーゲン代謝³⁵⁾に関与していることが推測されているが、その生理学的意義は未だ明らかではない。また本酵素は、1968年にNagatsuら^{36, 37)}によって血清中にも存在することが示され、肝炎をはじめとする各種疾患において活性が上昇することから、臨床生化学的にも注目されてきた。それとは逆に、肝癌³⁾を除く、胃癌⁴⁾、膵癌⁵⁾などの固形癌や急性リンパ性白血病⁶⁾、リンパ肉腫⁶⁾、ホジキン病⁶⁾などの造

血器悪性腫瘍患者では血清中の本酵素活性が健常人に比べ有意に低下することから非特異的腫瘍マーカーあるいは担癌マーカーとしての応用が期待される。

口腔癌においても，Uradeら⁹⁾は初診時未治療の口腔扁平上皮癌患者血清中のDPPIV活性が，健常人に比べ有意に低下し，癌治療による腫瘍の消長あるいは臨床病態を反映して変動することから，担癌マーカーとしての有用性を報告した。しかし，UICCのTNM分類¹⁵⁾によるStage間で比較すると有意差はなく，Stage IにおいてもすでにDPPIV活性が低下していることから，担癌の早期から変化する酵素であることが示唆された。もし酵素活性の変化を発癌の初期段階で捉えることができれば，本酵素は癌診断上より有用なマーカーとなるであろう。そこで，著者らは，血清中の本酵素活性が発癌のいかなる段階より低下し始めるかを明らかにするため，口腔癌モデルとして化学発癌剤であるジメチルベンツアントラセン(DMBA)を用いたハムスター頬嚢発癌実験系により検討した。その結果，

血清 DPPIV 活性は DMBA 塗布 8 ～ 10 週後の乳頭腫形成期までは正常レベルを保っていたが、塗布 12 ～ 13 週後の上皮内癌あるいは初期浸潤癌形成期には有意に低下し、15 ～ 16 週後の扁平上皮癌形成期にはさらに低下して正常値の 1/2 以下となった。また、低下した DPPIV 活性は、腫瘍切除により上昇し、再発により再び低下することを明らかにした^{10, 11)}。したがって、血清 DPPIV 活性は、発癌の初期段階より変化する担癌マーカーと考えられる。

先に述べたように、DPPIV は膜結合酵素であるが、アルカリフォスファターゼや γ -グルタミルトランスぺプチダーゼとは異なり、癌性変化により活性が低下するという特徴を持っている。膜結合酵素で癌性変化により活性が低下するものは少なく、わずかに 5-ヌクレオチダーゼ³⁸⁻⁴⁰⁾、 γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ⁴¹⁾、グリコシルトランスフェラーゼ^{42, 43)}に低下例が報告されている。DPPIV については担癌患者における血清 DPPIV 活性低下の機序のみならず血清中酵素活性の由来についても未だ明らかとなっていない。正常細胞や癌

細胞表面に存在する抗原が細胞膜脱落現象 (Shedding)^{4,4)}により血清に反映されることが知られていることから、血清DPPIVが多くの細胞や組織に由来することが考えられる。Hinoら^{4,5)}は、四塩化炭素による肝炎ラットでは血清DPPIV活性の上昇にともない、肝臓におけるDPPIV活性が低下することから、血清中に増加したDPPIVが肝細胞由来であると報告している。肝臓は、生体における最大臓器であり、血清DPPIVの由来を考える上で重要な位置を占めると思われるが、口腔癌をはじめとする悪性腫瘍患者血清中のDPPIV活性低下の原因とは直接結びつかない。Yoshiiら⁴⁾は胃癌組織のDPPIV活性が、胃の正常組織に比べて約60%低下しており、これが胃癌患者における血清DPPIV活性低下の原因であろうと推察している。また、Komatsuら^{1,2)}は、ヒト扁平上皮癌組織および培養癌細胞、癌患者血清中には、正常血清中のDPPIV活性に対する抑制物質が検出されないこと、正常細胞に比べ培養癌細胞ではDPPIV活性が低下し、逆にDPP II活性が上昇していることより、癌細胞における酵素偏倚が血

清DPPIV活性低下の一因であることを示唆しているが、癌組織中のDPPIV活性低下のみでは説明できないと述べている。さらに、Mogiら¹³⁾は、癌患者血清中DPPIV活性の低下が、DPPIV蛋白量の低下に基づくと報告している。以上のことを考え併せると、発癌あるいは癌化により、血清酵素の由来する正常組織や細胞に何らかの影響が与えられ、2次的に血清DPPIV活性あるいは蛋白量が低下するものと思われる。

1977年、Lojda⁴⁶⁾は、グリシルプロリル-4-メトキシ-2-ナフチルアミドを基質とした酵素組織化学的手法により、ヒトリンパ球にDPPIVが存在することを見い出した。ヒトリンパ球におけるDPPIVの機能は不明であったが、Tリンパ球細胞膜に存在し、リンパ球の増殖に関与していることが示唆された。また正常リンパ球に比べ、ヒトT細胞性慢性リンパ性白血病細胞ではDPPIV活性が低下していることも明らかにされた¹⁶⁾。1989年、The 4th International Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigensにおいて、134-2C2ある

いはTS145モノクローナル抗体で認識される活性化Tリンパ球の表面抗原がDPPIVであることが明らかにされ、CD26と命名された¹⁴⁾。Schönら⁴⁷⁾は、1)末梢血リンパ球の活性化が、レクチンにより誘導されるが、DPPIV阻害剤で抑制されること、2)抗DPPIV抗体でリンパ球のDNA合成が抑制されること、3)DPPIV阻害剤の存在下でポークウィードマイトゲン(PWM)で刺激されたリンパ球の免疫グロブリン産生が抑制されることから、DPPIVがリンパ球の活性化と免疫機構に関与していることを示した。臨床的には、Kasaharaら⁴⁸⁾が、リウマチ性関節炎患者に対して胸管ドレナージを施行すると、末梢血リンパ球の減少とともに血清DPPIV活性の低下を認めたと報告し、またScharpéら⁴⁹⁾は、免疫抑制剤であるシクロスポリンAを投与した同種移植患者血清中のDPPIV活性が低下することを報告した。これらは、リンパ球数の減少あるいはリンパ球機能の低下が血清DPPIV活性の低下に影響を与えることを示唆している。生体内において、腫瘍細胞の排除に中心的な役割を担っている機構は、Tリンパ球、

NK細胞あるいは活性化マクロファージなどによる細胞性免疫である。細胞性免疫の減弱により免疫監視機構が低下するために癌細胞の増殖が始まると考えると、Tリンパ球数やその機能の変化がCD26抗原(DPPIV)の発現に影響を与え、これが血清に反映して血清DPPIV活性が低下する可能性は十分に考えられる。そこで本研究では、健常人と口腔癌患者の末梢血リンパ球におけるDPPIV発現を検索することにより、血清DPPIV活性低下の機序を明らかにしようとした。

フローサイトメトリーにより健常人と口腔癌患者末梢血リンパ球を解析すると、癌患者では、リンパ球総数とTリンパ球画分の減少、Tリンパ球サブセットであるCD4陽性細胞、CD8陽性細胞の数も減少しており、これら細胞数と血清DPPIV活性の間には正の相関がみられた。今回の実験では、検体数が少なかったためかCD4陽性細胞とCD8陽性細胞のいずれが血清DPPIV活性とより強い相関を示すかについては明らかな差を見い出せなかったが、Scholzら⁵⁰⁾は、DPPIV陽性Tリンパ球のうち71%

が T 4 陽性細胞， 22% が T 8 陽性細胞であると述べており， CD4陽性細胞により高い陽性率が認められている。 DPPIVであるCD26抗原をフローサイトメトリーで測定すると， 予想に反して陽性細胞が少なく， CD3陽性CD26陽性細胞数は健常人で平均 $34/\mu\text{l}$ ， 癌患者で平均 $70/\mu\text{l}$ であり， 数の上では癌患者で 2 倍高い結果となった。 しかし， 血清 DPPIV 活性との相関を調べてみると， 健常人では正の相関を認めたが， 癌患者では相関がなく， CD26陽性細胞数が癌患者で不均一であることが示唆された。

末梢血 T リンパ球より細胞膜を分離し， その DPPIV 活性を測定すると， 健常人に比べ癌患者では $1/3$ 以下に低下していた。 さらに， ウエスタンブロッティング法にて T リンパ球細胞膜の CD26 抗原， すなわち DPPIV 蛋白量を比較したところ， 癌患者では， 健常人の約 $1/2$ に減少していた。 T リンパ球数が癌患者で健常人の $1/2$ に低下していることから， 癌患者の末梢血 T リンパ球細胞膜の DPPIV 蛋白は， 健常人の約 $1/4$ に減少していると考えられる。

T リンパ球は， 生体の免疫機構の中心に位置し

て、細胞性免疫のみならず、体液性免疫に対しても調節的役割を果たしている。マクロファージからの抗原提示を認識し、個々の機能を有する細胞へと分化・増殖し、種々のサイトカインを産生して、生体の免疫機構を形成している。Tリンパ球の分化・増殖に際して、Tリンパ球細胞膜のDPPIV活性がいかに変化し、細胞外へ酵素が移行するかどうかを検討することは、癌患者における血清DPPIV活性低下の機序を明らかにするために必須である。そこで、Tリンパ球刺激物質として芽球化反応により有糸分裂とIL-2産生を促進するPHAとCon A、Tリンパ球増殖因子としてIL-2を添加して、健常人と癌患者の末梢血リンパ球を培養し、リンパ球の活性化とDPPIV発現を比較した。その結果、PHA、Con AおよびIL-2に反応してリンパ球が増殖するに伴い、リンパ球表面のCD26抗原(DPPIV)の発現は高まったが、健常人に比べ、癌患者リンパ球の増殖反応は明らかに低下し、リンパ球抽出液中のDPPIV活性とDPPIV蛋白および培養上清中のDPPIV活性も約1/2の低値を示した。このような癌患者末梢血T

リンパ球の活性化およびDPPIV発現の低下は、血清DPPIV活性低下を説明しうる重大な要因と考えられる。

現在のところ、癌患者におけるTリンパ球の活性化がなぜ抑制されているのかは不明である。しかし、腫瘍細胞由来のトランスフォーミング成長因子(TGF) β がCD4陽性Tリンパ球の機能を抑制すること⁵¹⁾、さらには、リンホカイン活性化キラー(LAK)細胞や細胞障害性Tリンパ球(CD8)の機能も強力に抑制し、Tリンパ球活性化の過程におけるIL-2刺激を阻害する作用のあること⁵²⁾が報告されている。これらは腫瘍細胞から産生されたサイトカインがリンパ球の活性化を抑制し、さらにはTリンパ球のCD26抗原の発現をも抑制する可能性を示唆する興味深いものであり、今後明らかにすべき課題と考えている。

結 語

本研究は、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、以下の知見を得た。

1. 癌患者の末梢血リンパ球数、Tリンパ球数、Tリンパ球サブセットのうちCD4およびCD8陽性細胞数は、健常人に比べ、癌患者では約1/2に低下していた。CD26(DPPIV)陽性細胞の割合は、健常人および癌患者とも少なかったが、健常人に比べ癌患者では有意差はみられなかったものの、約2倍の細胞数であった。

2. 血清DPPIV活性と末梢血リンパ球、Tリンパ球(CD3陽性細胞)、CD4およびCD8陽性細胞数との間には正の相関がみられたが、CD3陰性細胞とは相関が見られなかった。CD3陽性CD26陽性細胞数において、健常人ではDPPIV活性と正の相関を認めたが、癌患者では相関が見られなかった。

3. 血清DPPIV活性とTリンパ球細胞膜DPPIV活性の間には強い正の相関がみられたが、癌患者のT

リンパ球細胞膜DPPIV活性は約1/3に低下していた。
ウエスタンブロッティング法でTリンパ球細胞膜
CD26(DPPIV)蛋白を比較すると、健常人に比べ癌患
者では約1/2であった。

4. Tリンパ球刺激物質であるPHAあるいはCon A,
Tリンパ球増殖因子であるIL-2を培養液に添加し、
末梢血リンパ球を培養すると、癌患者では健常人
に比べ増殖反応は低下しており、蛍光抗体法によ
るCD26抗原発現の観察でも、癌患者の培養リンパ
球では抗原の発現が低下していた。

5. 健常人と口腔癌患者の末梢血リンパ球をTリ
ンパ球刺激物質(PHA, Con A)や増殖因子(IL-2)を
添加して7日間培養した場合、健常人に比べ口腔癌
患者のリンパ球の増殖反応は低下していた。リン
パ球の増殖能とともに、リンパ球におけるDPPIV活
性および培養上清中のDPPIV活性は、健常人では増
加したが、癌患者ではともにわずかな増加しかみ
られなかった。培養リンパ球抽出液のCD26抗原
(DPPIV)蛋白をウエスタンブロッティング法で比較
したところ、健常人に比べ癌患者のCD26抗原蛋白

は減少していた。

本研究の結果より、口腔癌患者の血清DPPIV活性低下の機序の一つとして、末梢血Tリンパ球におけるCD26(DPPIV)の発現とそれに伴う細胞外への移行の低下が強く関与していることが示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究課題を与えられ、かつ御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました大阪大学歯学部口腔外科学第一講座松矢篤三教授、ならびに松本歯科大学口腔外科学第二講座山岡稔教授に深甚なる謝意を表します。

また、本研究を遂行するにあたり数々の御助言と御配慮をいただきました兵庫医科大学歯科口腔外科学講座吉岡 済教授ならびに松本歯科大学口腔生化学講座原田 実教授に深謝いたします。

さらに、終始細部にわたる御指導と御教示下さいました兵庫医科大学歯科口腔外科学講座浦出雅裕助教授に心より感謝の意を表します。

本研究の円滑な進展のため特別の御配慮を頂き

ました大阪大学歯学部口腔外科学第一講座，兵庫
医科大学歯科口腔外科学講座，松本歯科大学口腔
生化学講座ならびに口腔外科学第二講座の教室員
の皆様に厚く御礼を申し上げます。

Serum Dipeptidyl Peptidase (DPP) IV
Activity as a Possible Marker of Oral
Cancer : With Special Reference to the
Expression of DPP IV in Peripheral Blood
T Lymphocytes

Takashi UEMATSU

The First Department of Oral and Maxillo-
facial Surgery, Osaka University, Faculty
of Dentistry, 1-8, Yamadaoka, Suita, Osaka
565, Japan

Key Words : Serum dipeptidyl peptidase IV,
Oral cancer, CD26, Tumor marker,
Peripheral blood T lymphocytes

DPP IV is a membrane-bound enzyme which
hydrolyzes N-terminal X-proline from
peptides. In the previous studies, it was

reported that serum DPP IV activity of oral cancer patients was significantly decreased as compared with healthy subjects and changed dynamically reflecting the clinical status during cancer therapies. Therefore, serum DPP IV activity was suggested to be a useful tumor marker of oral cancer. Since this enzyme activity was decreased in cancer patients other than oral cancer, it was considered to be a nonspecific tumor-burden marker. However, the precise mechanism of decrease of serum DPP IV activity in cancer patients is unclear. Recently, it has been shown that DPP IV is CD26, a surface antigen of T lymphocytes, and plays a role in the process of proliferation of T lymphocytes. In this study, therefore, the expression of DPP IV in peripheral blood T cells of oral cancer patients was analyzed in comparison with that of healthy subjects.

The numbers of peripheral blood lymphocytes (PBL), T cells and CD4 (helper/inducer) and CD8 (suppressor/cytotoxic)-positive T cells were about two-fold less in cancer patients than in healthy subjects. Although the ratio of CD26 (DPP IV)-positive cells to peripheral blood T cells was unexpectedly low, the cell number was two-fold more in cancer patients than in healthy subjects. When serum DPP IV activity was examined the correlation with the number of PBL and T cell subsets, it was found to correlate significantly with the numbers of PBL, T cells, CD4 and CD8-positive T cells. CD26 positive T cells showed a close relation with serum DPP IV activity in healthy subjects but not in cancer patients. Although DPP IV activity of T cell plasma membrane also demonstrated a strong correlation with serum DPP IV activity, DPP

IV activity and amount of CD26 in T cell plasma membrane were much less in cancer patients than in healthy subjects, as assayed by Western immunoblotting.

When peripheral lymphocytes were cultured with phytohemagglutinin (PHA), concanavalin A (Con A) and/or interleukin-2 (IL-2), which are T cell stimulants or T cell growth factor, proliferation of T cells and expression of CD26 (DPP IV) in T cells examined by direct immunofluorescence staining and Western blotting were greatly diminished in cancer patients as compared with healthy subjects. In addition, DPP IV activity in lymphocyte culture medium of cancer patients was lower than that in healthy subjects, indicating the decrease of shedding of DPP IV from T cells of cancer patients.

From these findings, it was suggested that

inhibition of expression of DPP IV in peripheral blood T cells is one of the important factors involved in the mechanism of decrease of serum DPP IV activity in cancer patients.

文 献

- 1) Hopsu-Havu, V.K. and Glenner, G.G.(1966)
:A new dipeptide naphthylamidase hydro-
lyzing glycyl-prolyl- β -naphthylamide.
Histochemie, 7, 197-201.
- 2) Hino, M., Fuyamada, H., Hayakawa, T.,
Nagatsu, T., Oya, H., Nakagawa, Y.,
Takemoto, T. and Sakakibara, S.(1976):
X-Prolyl dipeptidyl-aminopeptidase
activity, with X-proline p-nitroanili-
des as substrates, in normal and patho-
logical human sera. Clin.Chem., 22, 1256
-1261.
- 3) Kojima, J., Kanatani, M., Kato, M.,
Tojoh, F. and Nakamura, N.(1979):Serum
glycylproline dipeptidyl aminopeptidase
activity in human hepatic cancer. Clin.
Chim. Acta, 93, 181-187.
- 4) Yoshii, Y., Kasugai, T., Kato, T.,
Nagatsu, T. and Sakakibara, S.(1981):

Changes in serum dipeptidyl-aminopeptidase IV (glycylprolyldipeptidyl-aminopeptidase) activity of patients with gastric carcinoma after surgical excision and the enzyme activity in the carcinoma tissue. Biochem. Med., 25, 276-282.

- 5) Hino, M., Nagatsu, T., Kakumu, S., Okuyama, S., Yoshii, Y. and Nagatsu, I. (1975): Glycylprolyl β -naphthylamidase activity in human serum. Clin. Chim. Acta, 62, 5-11.
- 6) Fujita, K., Hirano, M., Tokunaga, K., Nagatsu, I., Nagatsu, T. and Sakakibara, S. (1977): Serum glycylproline p-nitroanilidase activity in blood cancers. Clin. Chim. Acta, 81, 215-217.
- 7) Fujita, K., Hirano, M., Ochiai, J., Funabashi, M., Nagatsu, I., Nagatsu, T. and Sakakibara, S. (1978): Serum glycyl-

prolin p-nitroanilidase activity in
rheumatoid arthritis and systemic lupus
erythematosus. Clin. Chim. Acta, 88, 15
-20.

- 8) Wago, K., Okazaki, K., Yoshida, K. and
Kaku, H. (1978): Serum glycyproline
p-nitroanilidase activity in rheumatoid
arthritis. The Ryumachi, 18, 231-237.
- 9) Urade, M., Komatsu, M., Yamaoka, M.,
Fukasawa, K., Harada, M., Mima, T. and
Matsuya, T. (1989): Serum dipeptidyl
peptidase activities as a possible
marker of oral cancer. Cancer, 64, 1274-
1280.
- 10) Urade, M., Uematsu, T., Mima, T., Ogura, T.
and Matsuya, T. (1992): Serum dipeptidyl
peptidase (DPP) IV activity in hamster
buccal pouch carcinogenesis with 9,10-
dimethyl-1, 2-benzanthracene. J. Oral
Pathol. Med., 21, 109-112.

- 11) 上松隆司, 浦出雅裕, 山岡 稔, 吉岡 済
(1994): 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IV活性.
頭頸部腫瘍, 20, 32-36.
- 12) Komatsu, M., Urade, M., Yamaoka, M.,
Fukasawa, K. and Harada, M. (1987):
Alteration in dipeptidyl peptidase
activities in cultured human carcinoma
cells. J. Natl. Cancer Inst., 78, 863-
868.
- 13) Mogi, M., Harada, M., Hiraoka, B.Y.,
Fukasawa, K., Komatsu, M. and Nagatsu,
T. (1986): Sandwich enzyme-immunoassay for
dipeptidyl aminopeptidase IV in the
serum of people with oral cancer. Archs.
Oral Biol., 31, 505-507.
- 14) Knapp, W., Rieber, P., Dorken, B.,
Schmidt, R.E., Stein, H. and Borne, A.E.G.
Kr. v. d. (1989): Towards a better
definition of human leucocyte surface

- molecules. Immunology Today, 10, 253-258.
- 15) Hermanek, P. and Sobin, L.H. (1987): UICC International Union against Cancer. TNM classification of malignant tumors. Fourth, fully revised edition,
- 16) Mentlein, R., Heymann, E., Scholz, W., Feller, A.C. and Flad, H-D. (1984): Dipeptidyl peptidase IV as a new surface marker for a subpopulation of human T-lymphocytes. Cell. Immunol., 89, 11-19.
- 17) Simpson, I.A., Sonne, O. (1982): A simple, rapid, and sensitive method for measuring protein concentration in subcellular membrane fractions prepared by sucrose density ultracentrifugation. Anal. Biochem., 119, 424-427.
- 18) Kato, T., Nagatsu, T., Kimura, T. and Sakakibara, S. (1978): Fluorescence assay of X-prolyl dipeptidyl-aminopeptidase activity with a new fluorogenic

- substrate., Biochem. Med., 19, 351-359.
- 19) Lefkovits, I. and Pernis, B. (1987): 免疫実験法. (監訳 右田俊介, 田中 渥), 1版, 西村書店, 新潟, 248-249, 昭和62.
- 20) 藤原大美 (1993): T細胞系の免疫学. 第2版, 中外医学社, 東京, 109, 平成3.
- 21) 藤原大美 (1993): T細胞系の免疫学. 第2版, 中外医学社, 東京, 292-295. 平成3.
- 22) 石井 勝 (1992): 腫瘍マーカーハンドブック, 第1版, サイエンスフォーラム, 東京, 18-22, 昭和60.
- 23) McIntire, K.R. (1979): Immunoassay of cancer. part I. ed.1, Dekker, Inc., New York & Basel, 523-539.
- 24) Kato, H., and Torigoe, T. (1977): Radioimmunoassay for tumor antigen of human cervical squamous cell carcinoma. Cancer 40, 1621-1628.
- 25) Kurokawa, H., Tsuru, S., Okada, M., Nakamura, T. and Kajiyama, M. (1993):

- Evaluation of tumor markers in patients with squamous cell carcinoma in the oral cavity. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, 22, 35-38.
- 26) Fukasawa, K.M., Fukasawa, K., Sahara, N., Harada, M., Kondo, Y. and Nagatsu, I. (1981): Immunohistochemical localization of dipeptidyl aminopeptidase IV in rat kidney, liver, and salivary glands. *J. Histochem. Cytochem.*, 29, 337-343.
- 27) Svensson, B., Danielsen, M., Staun, M., Jeppesen, L., Noren, O. and Sjostrom, H. (1978): An amphiphilic form of dipeptidyl peptidase IV from pig small-intestinal brush-border membrane. *Eur. J. Biochem.*, 90, 489-498.
- 28) Sannes, P.L. (1983): Subcellular localization of dipeptidyl peptidase II and IV in rat and rabbit alveolar macrophages. *J. Histochem. Cytochem.*, 31, 684-690.

- 29) Palmieri, F.E. and Ward, P.E. (1983):
Mesentery vascular metabolism of
substance P. Biochim. Biophys. Acta, 755,
522-525.
- 30) Saison, M., Verlinden, J., Van Leuven, F.,
Cassiman, J-J. and Van den Berghe, H.
(1983): Identification of cell surface
dipeptidylpeptidase IV in human
fibroblasts. Biochem. J., 216, 177-183.
- 31) Walter, R., Simmons, W.H. and Yoshimoto,
T. (1980): Proline specific endo- and
exo-peptidases. Mol. Cell. Biochem., 30,
111-127.
- 32) Fukasawa, K.M., Fukasawa, K., Hiraoka,
B.Y. and Harada, M. (1981): Comparison of
dipeptidyl peptidase IV prepared from
pig liver and kidney. Biochim. Biophys.
Acta, 657, 179-189.
- 33) Hama, T., Okada, M., Kojima, K., Kato, T.,
Matsuyama, M. and Nagatsu, T. (1982):

- Purification of dipeptidyl-amino-peptidase IV from human kidney by anti-dipeptidyl-aminopeptidase IV affinity chromatography. *Mol. Cell. Biochem.*, 43, 35-42.
- 34) Berteloot, A., Khan, A.H. and Ramswamy, K.(1982):Characteristics of dipeptide transport in normal and papain-treated brush border membrane vesicles from mouse intestine. *Biochim. Biophys. Acta*, 686, 47-54.
- 35) Hino, M., Nakano, G., Harada, M. and Nagatsu, T.(1975):Distribution of PZ-peptidase and glycylprolyl β -naphthylamidase activities in oral tissues. *Arch. Oral Biol.*, 20, 19-22.
- 36) Nagatsu, I., Nagatsu, T., and Glenner, G. G.(1968):Species differences of serum amino acid β -naphthylamidases. *Enzymologia*, 34, 73-76.

- 37) Nagatsu, I., Nagatsu, T. and Yamamoto, T.
(1968):Hydrolysis of amino acid
 β -naphthylamidases in human parotid
saliva and human serum. *Experientia*, 24,
347-348.
- 38) Ikehara, Y., Takahashi, K., Mansho, K.,
Eto, S. and Kato, K.(1977):Contrast
manifestation of alkaline phosphatase
and 5'-nucleotidase in plasma membranes
isolated from rat liver and ascites
hepatoma. *Biochim. Biophys. Acta*, 470,
202-211.
Spring-Verlag, Berlin, 13-36.
- 39) Koizumi, K., Ito, Y., Kojima, K. and
Fujii, T.(1976):Isolation and
characterization of the plasma membranes
from rat ascites hepatomas and from
normal rat livers, including newborn,
regenerating and adult livers.
J. Biochem., 79, 739-748.

- 40) Chatterjee, S.K., Bhattacharya, M. and Barlow, J.J. (1981): Evaluation of 5'-nucleotidase as an enzyme marker in ovarian carcinoma. *Cancer*, 47, 2648-2653.
- 41) Novogrodsky, A., Tate, S.S., and Meister, A. (1976): γ -Glutamyl transpeptidase lymphoid cell surface marker: Relationship to blastogenesis, differentiation, and neoplasia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73, 2414-2418.
- 42) Kim, Y.S. and Issacs, R. (1975): Glycoprotein metabolism in inflammatory and neoplastic diseases of the human colon. *Cancer Res.*, 35, 2092-2097.
- 43) Kesel, D., Sykes, E. and Henderson, M. (1977): Glycosyltransferase levels in tumors metastatic to liver and in uninvolved liver tissue. *J. Natl. Cancer Inst.*, 59, 29-32.
- 44) Black, P.H. (1980): Shedding from the cell

- surface of normal and cancer cells.
Adv. Cancer Res., 32, 76-199.
- 45) Hino, M., Fuyamada, H., Nagatsu, T.,
Kurokawa, S. and Okuyama, S. (1976):
Glycylprolyl β -naphthylamidase
activities in serum liver and kidney of
rats in chronic carbon tetrachloride.
Clin. Chim. Acta, 67, 103-105.
- 46) Lojda, Z. (1977): Studies on glycylproline
naphthylamidase. Histochem., 54, 299-309.
- 47) Schön, E., Jahn, S., Kiessig, S. T.,
Demuth, H-U., Neubert, K., Barth, A.,
Von Baehr, R. and Ansorge, S. (1987): The
role of dipeptidyl peptidase IV in human
T lymphocyte activation. Inhibitors and
antibodies against dipeptidyl peptidase
IV suppress lymphocyte proliferation and
immunoglobulin synthesis in vitro. Eur.
J. Immunol., 17, 1821-1826.
- 48) Kasahara, Y., Leroux-Roels, G., Nakamura,

- R. and Chisari, F. (1984): Glycylprolyl-diaminopeptidase in human leukocytes: Selective occurrence in T lymphocytes and influence on the total serum enzyme activity. Clin. Chim. Acta, 139, 295-302.
- 49) Scharpé, I., De Meester, I., Vanhoof, G., Hendriks, D., Uyttenbroeck, W. Ntakarutimana, V. and Deckx, R. (1990): Serum DPPIV activity in transplant recipients. Clin. Chem., 36, 984.
- 50) Scholz, W., Mentlein, R., Heymann, E., Feller, A.C., Ulmer, A.J. and Flad H-D. (1985): Interleukin 2 production by human T lymphocytes identified by antibodies to dipeptidyl peptidase IV. Cell. Immunol., 93, 199-211.
- 51) Tada, T., Ohzeki, S., Utsumi, K., Takiuchi, H., Muramatsu, M., Li, X-F., Shimizu, J., Fujiwara, H. and Hamaoka, T.

(1991):Transforming growth factor- β - induced inhibition of T cell function. :Susceptibility difference in T cells of various phenotypes and functions and its relevance to immunosuppression in the tumor-bearing state.

J. Immunol., 146, 1077-1082.

- 52) Smyth, M.J., Strobl, S.L., Young, H.A., Ortaldo, J.R. and Ochoa, A. C.(1991): Regulation of lymphokine-activated killer activity and pore-forming protein gene expression in human peripheral blood CD8⁺ T lymphocytes:Inhibition by transforming growth factor- β .

J. Immunol., 146, 3289-3297.

脚注

大阪大学歯学部口腔外科学第一講座（主任：松矢篤三教授）

本論文の要旨の一部は，第39回日本口腔外科学会総会（平成6年11月，名古屋），第31回日本口腔組織培養研究会（平成6年12月，東京）において発表した。

付図の説明

図 1 健常人および口腔癌患者の血清DPPIV活性と末梢血リンパ球数との相関関係

直線は、回帰関数を示す。

r : ピアソンの相関係数, P : 係数の危険率。

図 2 血清DPPIV活性とCD3陽性細胞数(A)およびCD3陰性細胞数(B)との相関関係

直線は、回帰直線を示す。

r : ピアソンの相関係数, P : 係数の危険率。

図 3 血清DPPIV活性とCD4陽性細胞数(A)およびCD8陽性細胞数(B)との相関関係

直線は、回帰直線を示す。

r : ピアソンの相関係数, P : 係数の危険率。

図 4 血清DPPIV活性とCD3陽性CD26陽性細胞数(A)およびCD3陰性CD26陽性細胞数(B)との相関関係

直線は、回帰直線を示す。

r : ピアソンの相関係数, P : 係数の危険率。

図 5 血清 DPPIV 活性と T リンパ球細胞膜の DPPIV 活性との相関関係

直線は、回帰直線を示す。

r : ピアソンの相関係数, P : 係数の危険率。

図 6 ウェスタンブロッティングによる健常人および口腔癌患者の T リンパ球 CD26 抗原 (DPPIV) の検出

$C_1 \sim C_3$: 健常人, $P_1 \sim P_3$: 口腔癌患者
1 レーンあたり $20 \mu g$ の T リンパ球細胞膜蛋白を泳動した後, Ta1 抗体を用いたウェスタンブロッティング法で CD26 抗原 (DPPIV) を検出した。下端に示す数値は, デンシトメトリーによる CD26 抗原 (DPPIV) バンドの相対濃度を示す。

図 7 培養リンパ球の位相差顕微鏡像

PHA ($10 \mu g/ml$) を添加して培養した場合の経

日的変化を示す($\times 35$)。

I : 健常人の末梢血リンパ球

II : 口腔癌患者の末梢血リンパ球

A : 培養 1 日, B : 培養 3 日, C : 培養 5

日, D : 培養 7 日。

図 8 培養リンパ球の CD26 抗原 (DPPIV) の発現

PHA($10 \mu\text{g/ml}$) を添加して培養したリンパ球
を経日的に FITC 標識 Ta1 抗体で染色したもの
を示す($\times 120$)。

I : 健常人の培養リンパ球

II : 口腔癌患者の培養リンパ球

A ~ C : 透過型ノマルスキー式微分干涉顕

微鏡像

D ~ F : 蛍光顕微鏡像

A・D : 培養 3 日, B・E : 培養 5 日,

C・F : 培養 7 日。

図 9 培養リンパ球の増殖曲線とリンパ球抽出液

および培養上清中の DPPIV 活性の経日的変
化

A : 基礎培地のみで培養した場合の経日的

変化

B : 基礎培地に PHA($10\mu\text{g/ml}$)を添加して培養した場合の経日的変化

● : 培養リンパ球の相対生細胞数

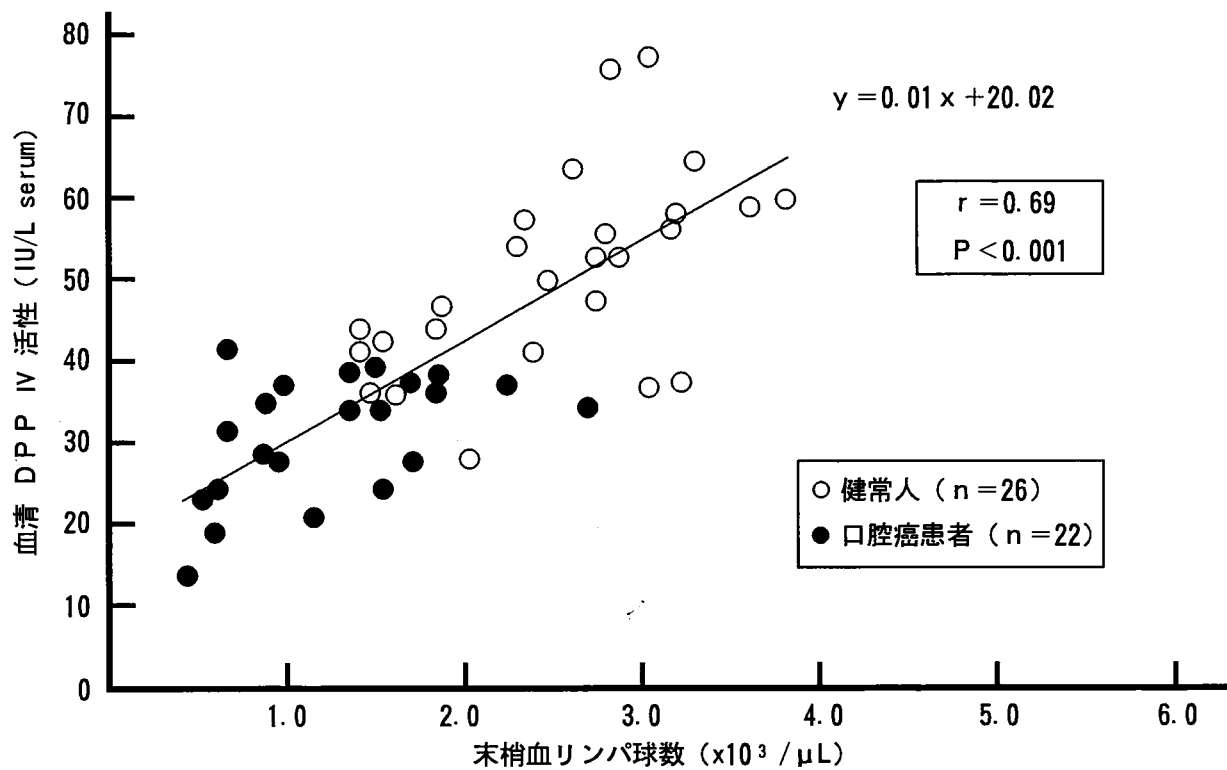
■ : 培養リンパ球抽出液中の DPPIV 活性
(nmole/mg protein)

▲ : 培養上清中の DPPIV 活性(IU/L serum)

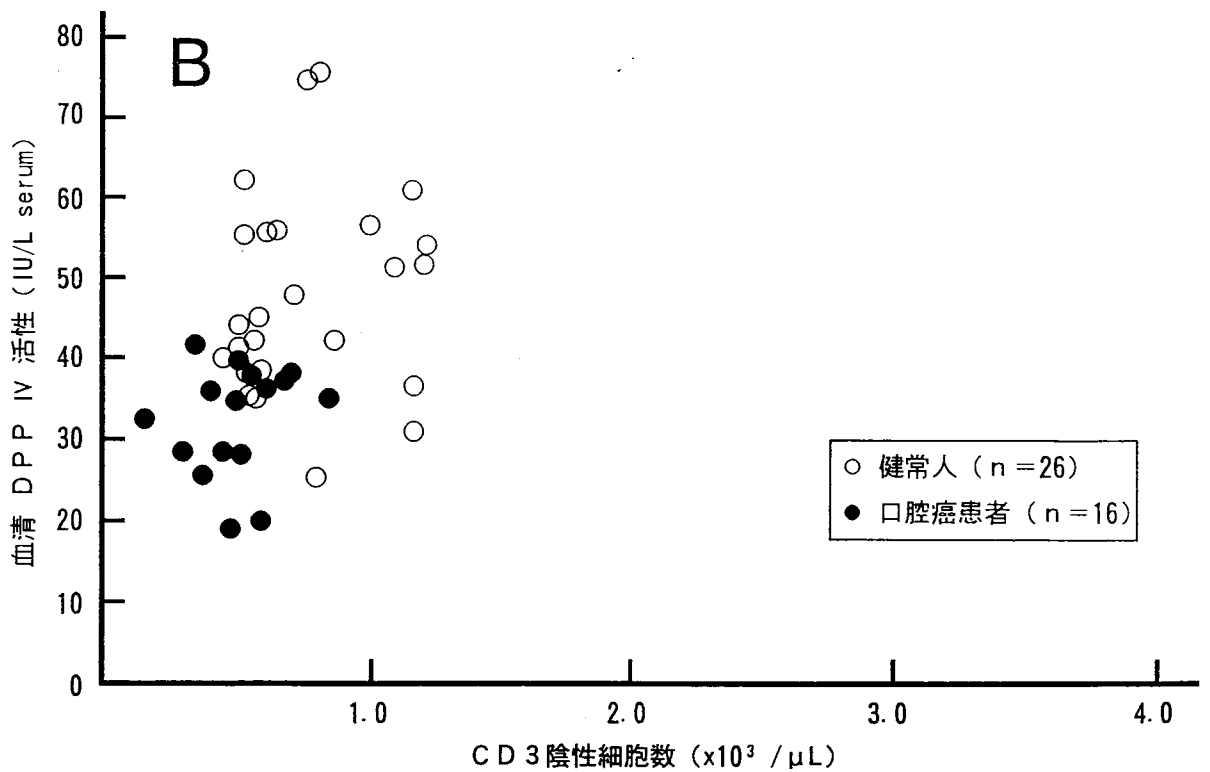
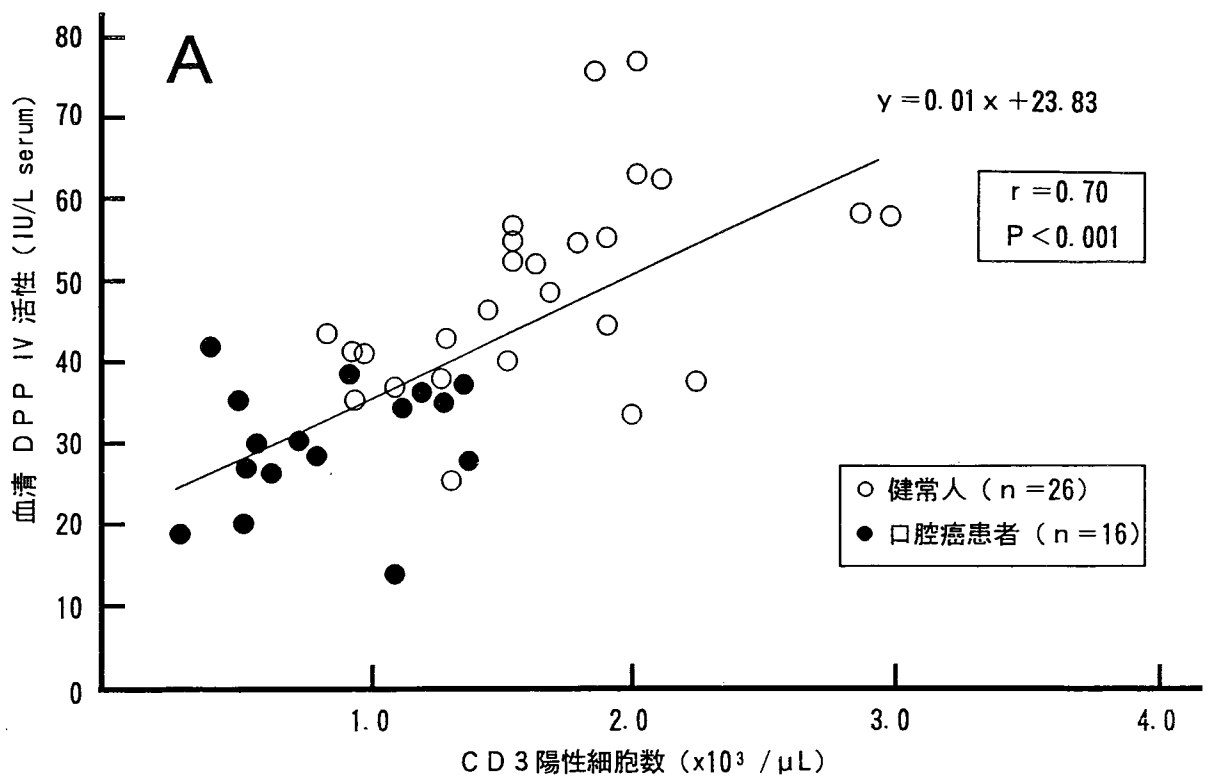
図10 ウエスタンブロッティングによる培養リンパ球の CD26 抗原(DPPIV)の検出
PHA($10\mu\text{g/ml}$)を添加して培養したものを示す。

A : 健常人の培養リンパ球

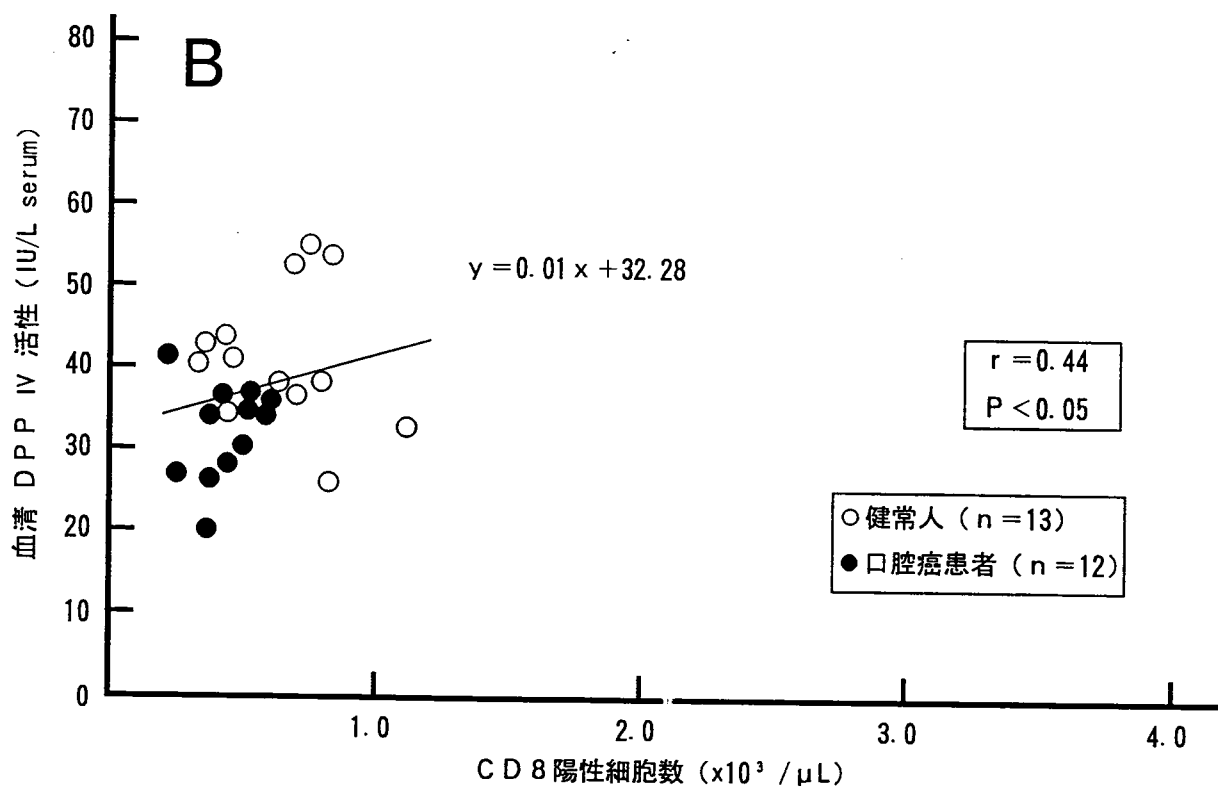
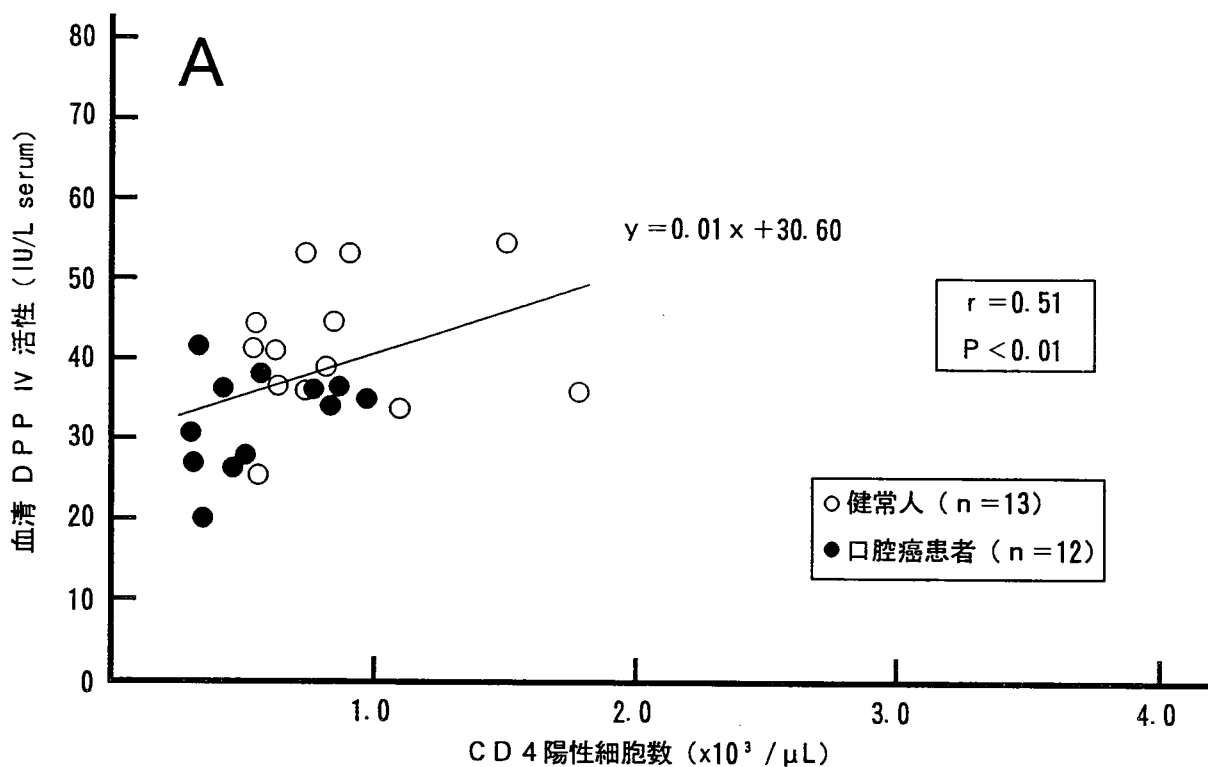
B : 口腔癌患者の培養リンパ球



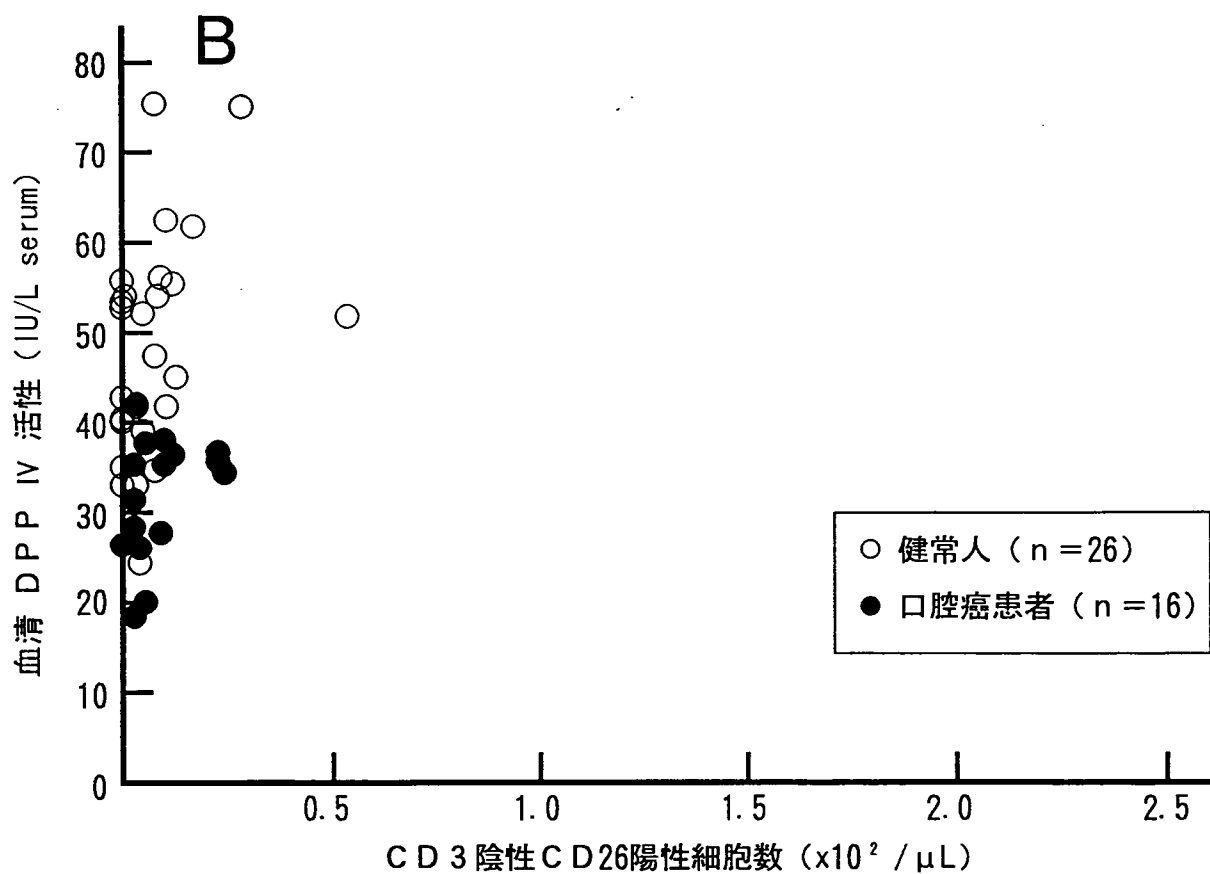
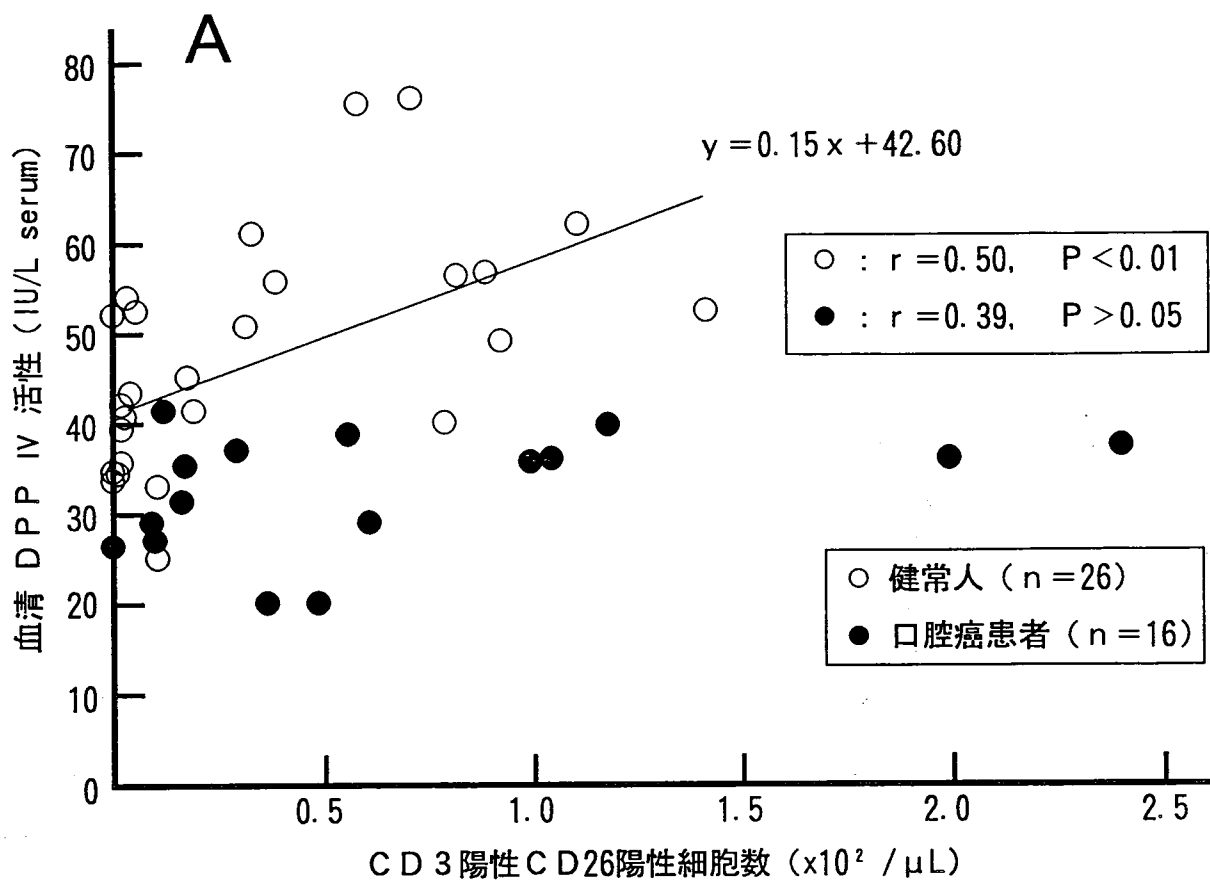
(図 1)



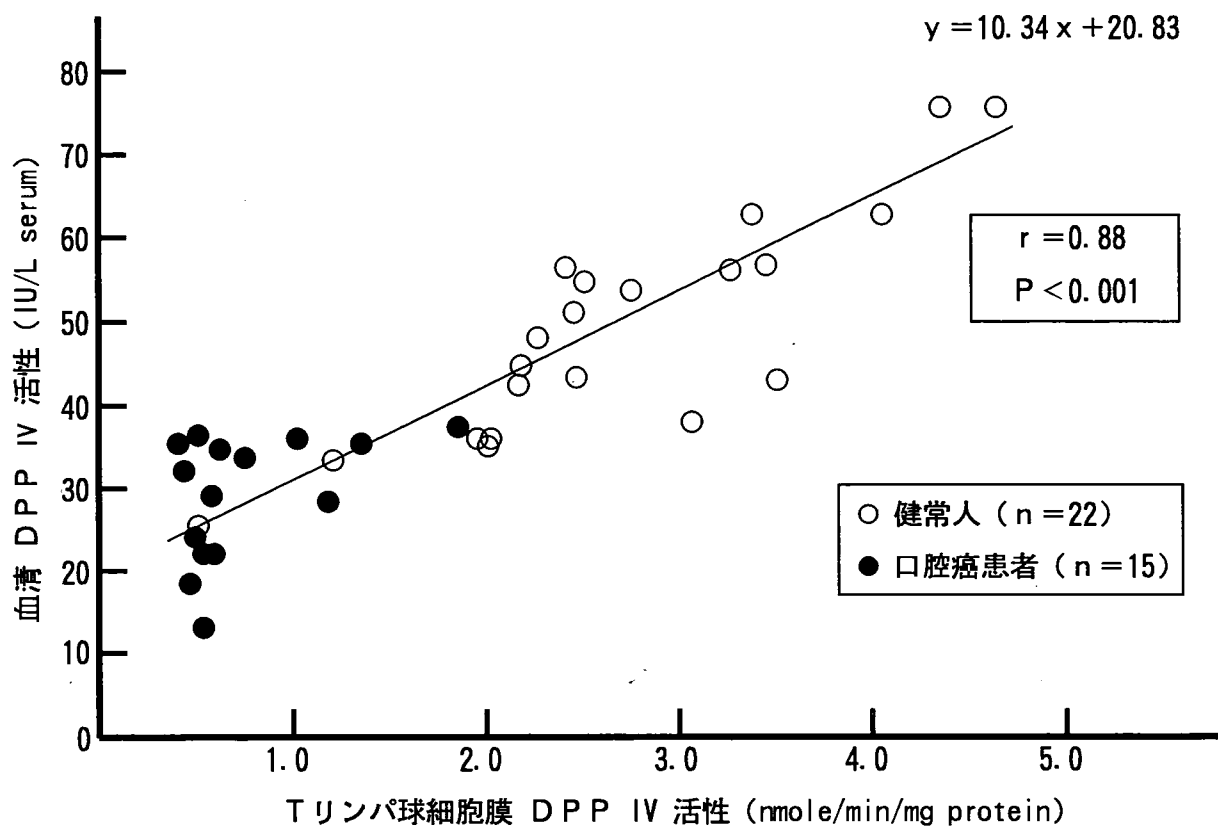
(図 2)



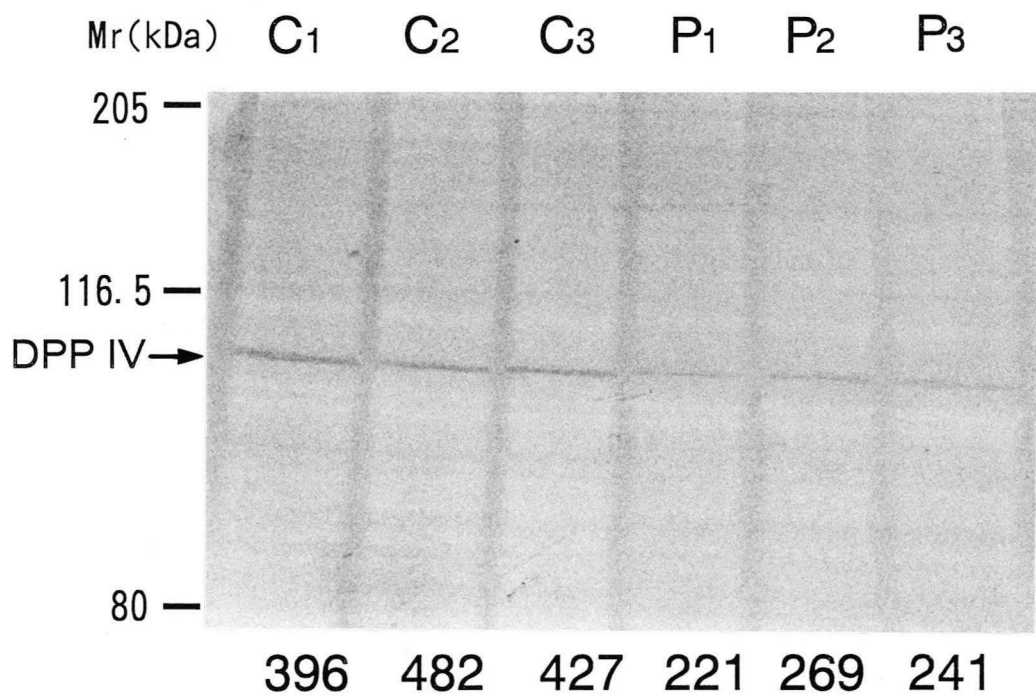
(図 3)



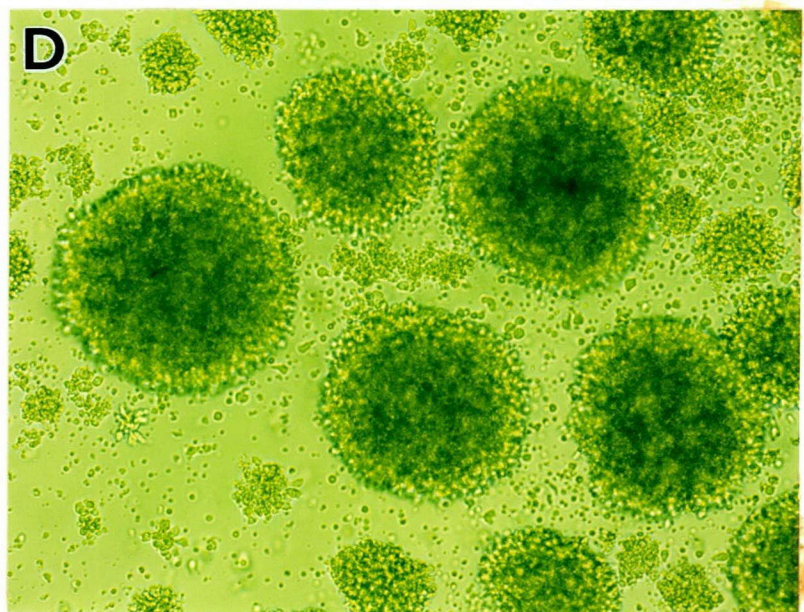
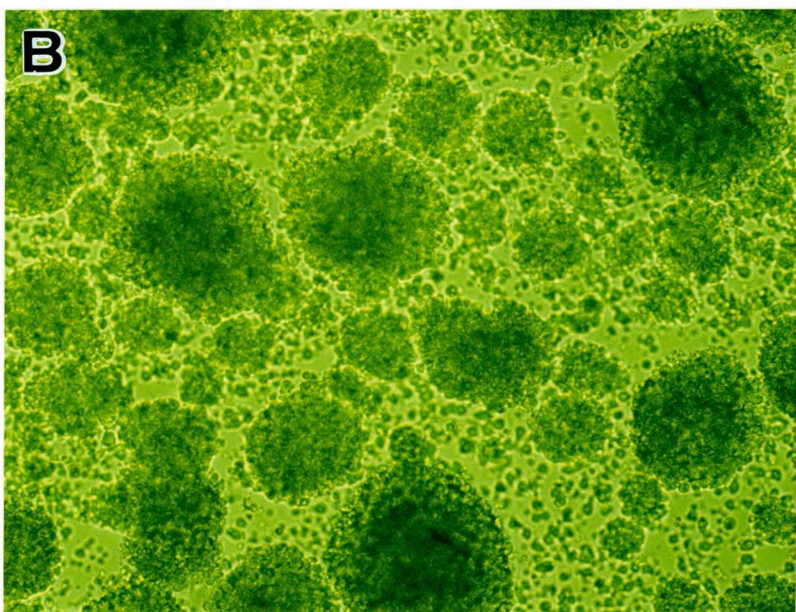
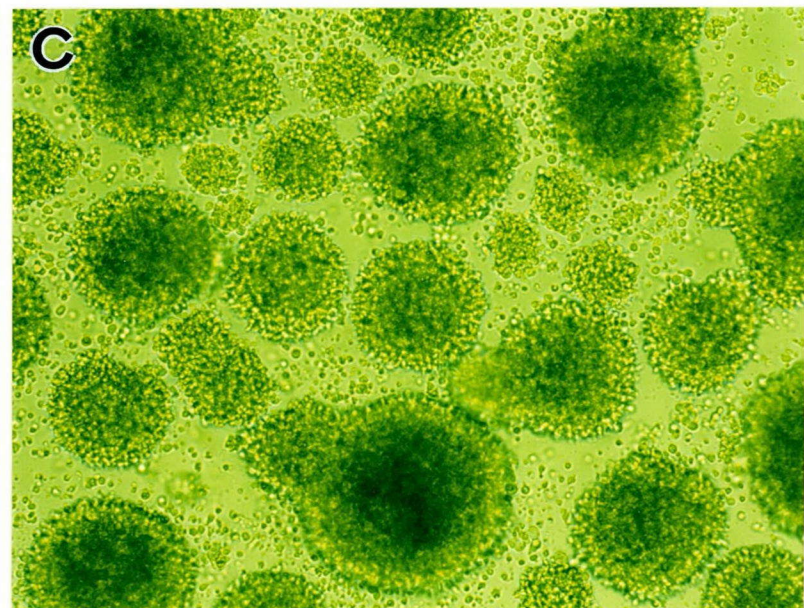
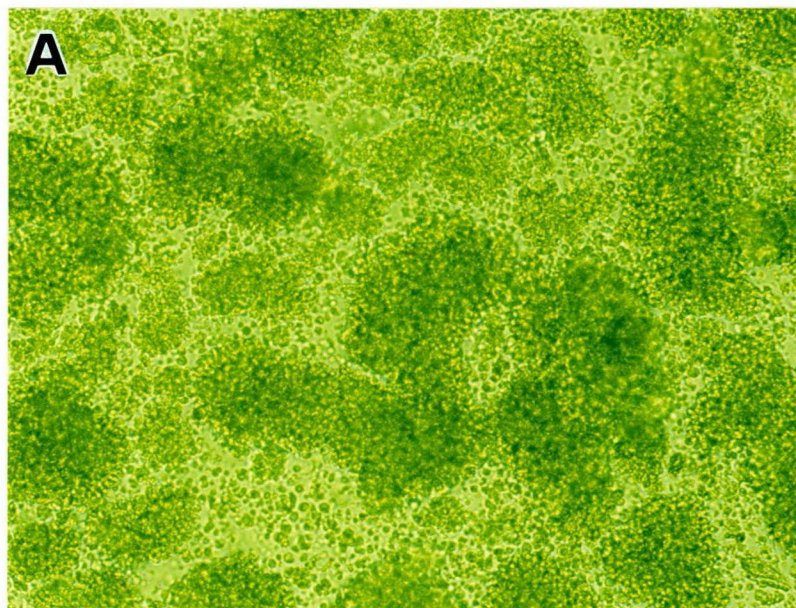
(図 4)



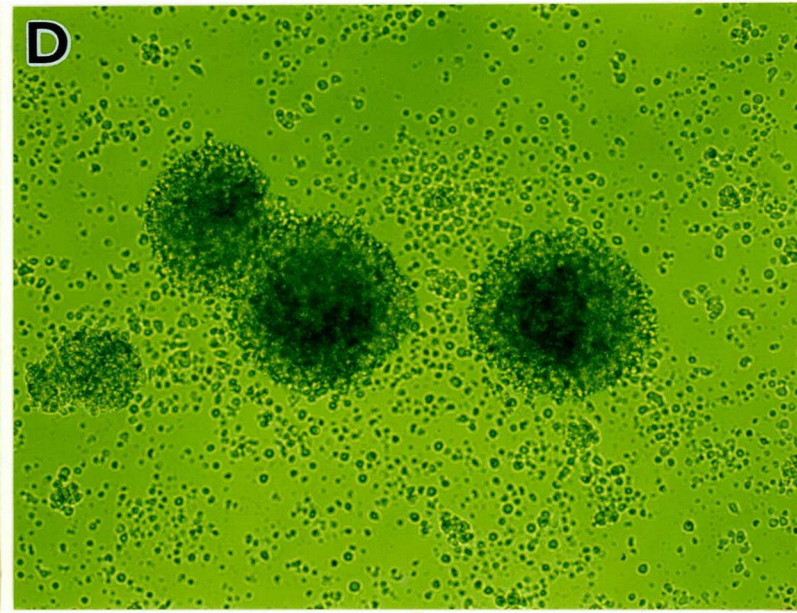
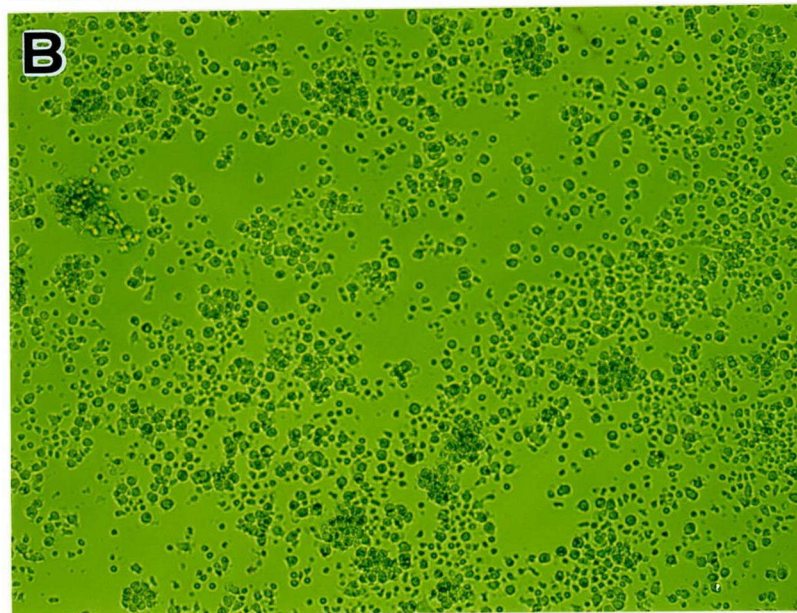
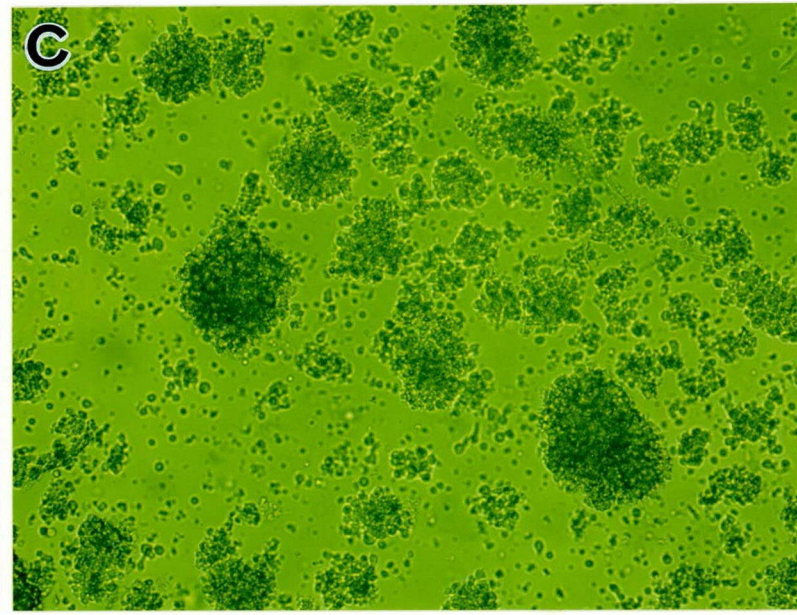
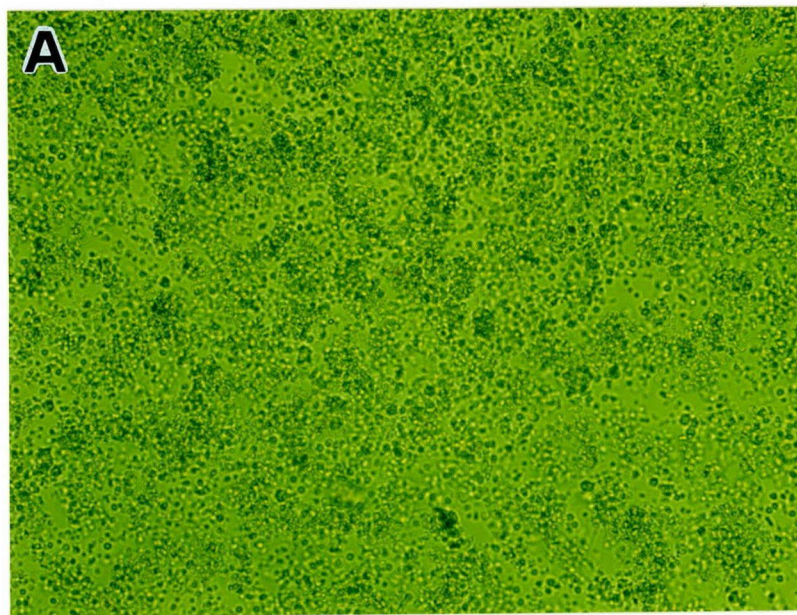
(図5)

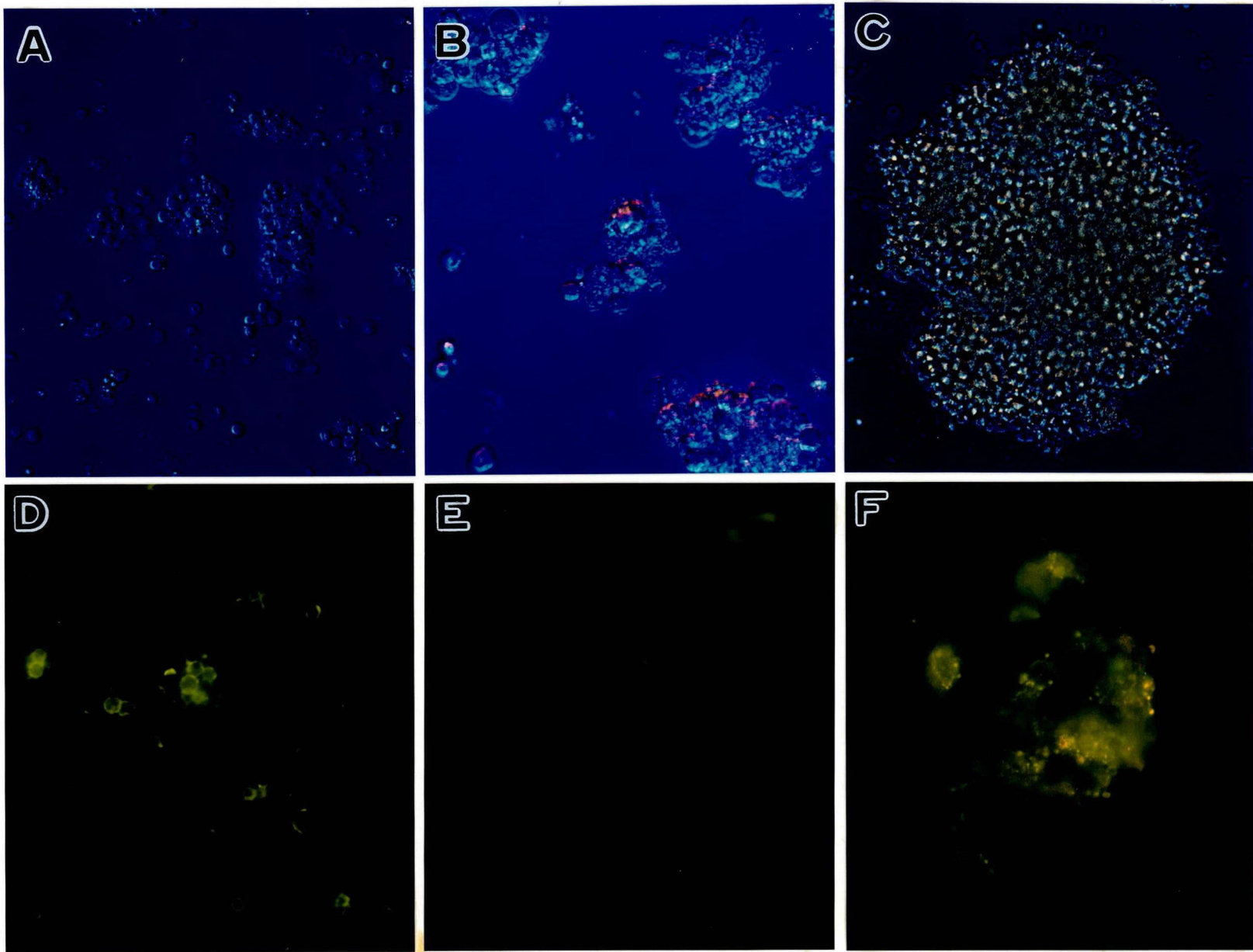


(图 6)



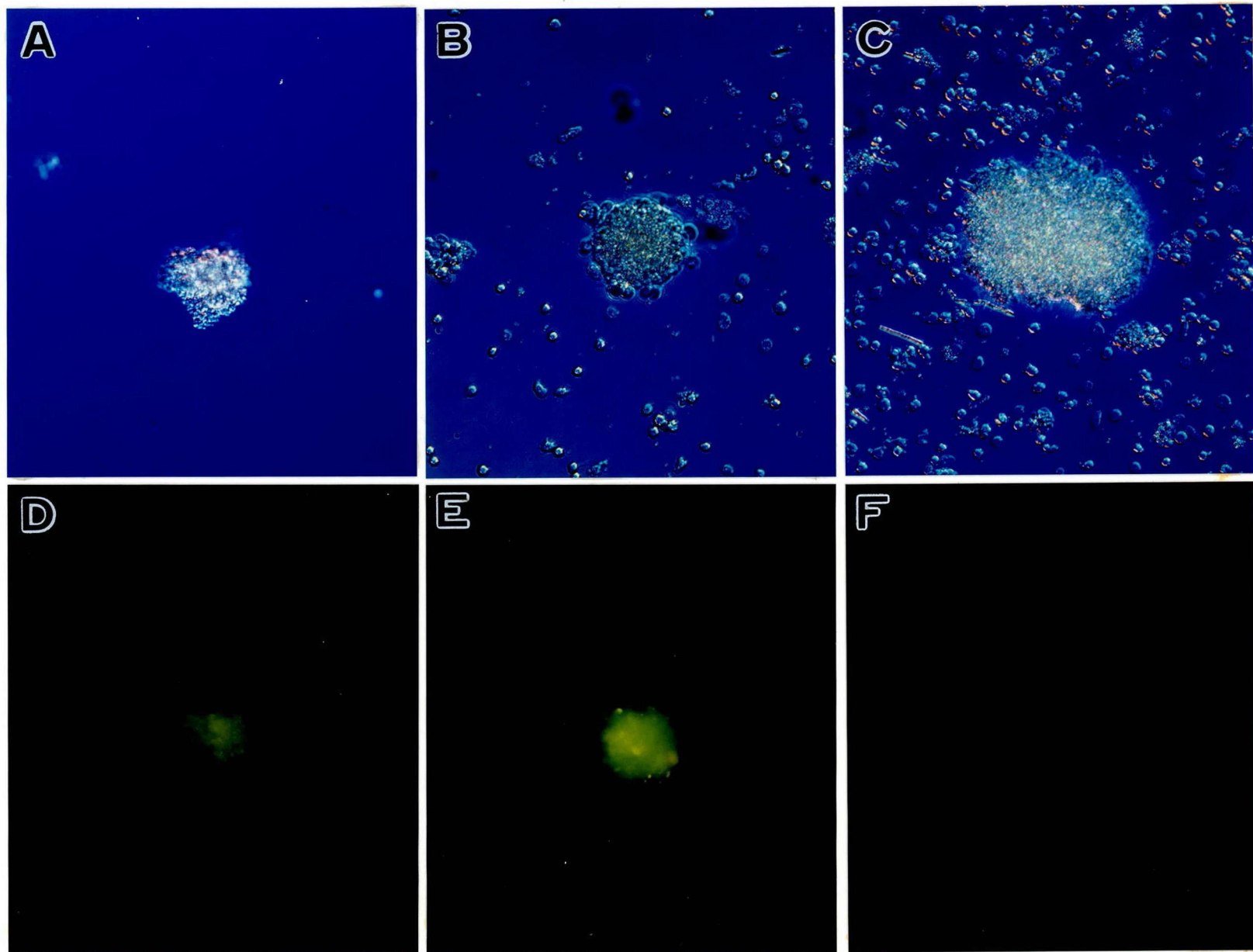
.(图 7)





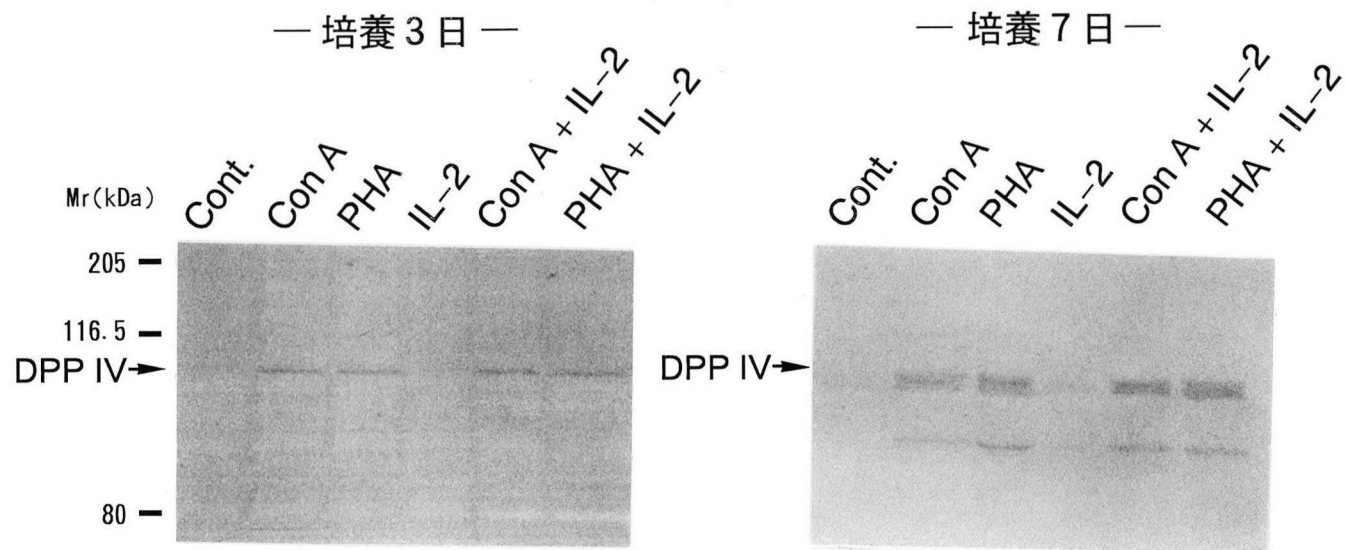
(图 8)

II

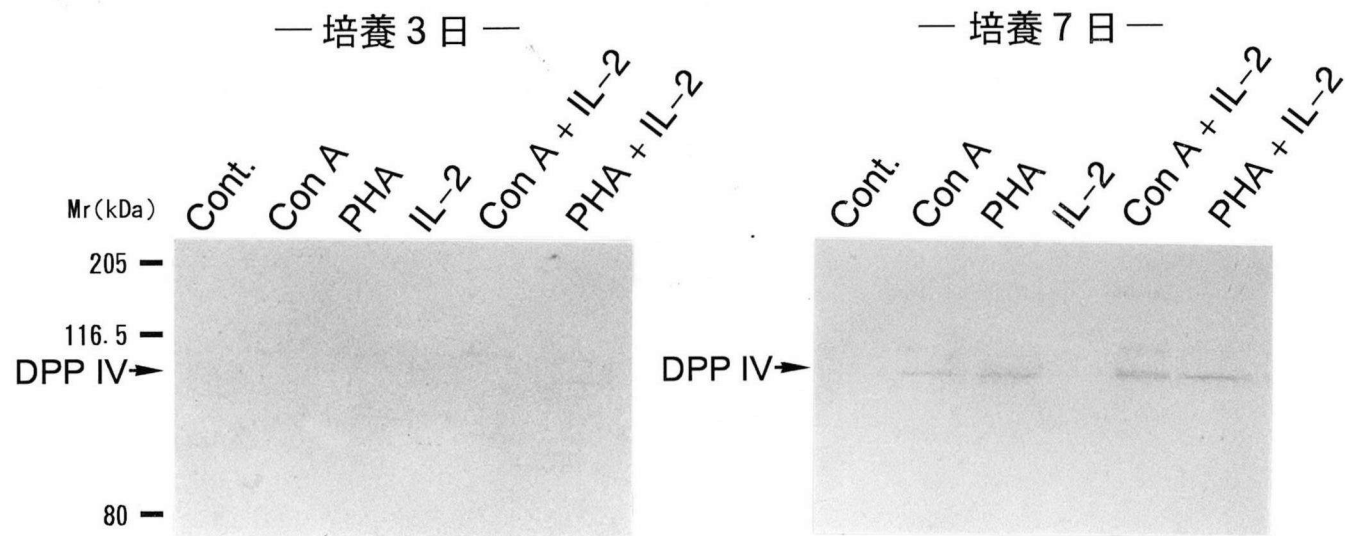


.(图8)

A



B



(図10)

表1 健常人および口腔癌患者の末梢血リンパ球数およびリンパ球サブセットの比較

	健常人	口腔癌患者	比率*	P値**
末梢血リンパ球数(個/ μ L)	2,456 $\pm$ 746 (n=26)	1,257 $\pm$ 638 (n=22)	0.51	<0.001
Tリンパ球(CD3+細胞)数 (個/ μ L)	1,660 $\pm$ 562 (n=26)	821 $\pm$ 368 (n=16)	0.49	<0.001
末梢血リンパ球数に対する CD3+細胞割合	67.6%	65.3%		
CD4+細胞数(個/ μ L)	892 $\pm$ 404 (n=13)	525 $\pm$ 282 (n=12)	0.59	<0.02
末梢血リンパ球数に対する CD4+細胞割合	36.3%	41.8%		
CD8+細胞数(個/ μ L)	646 $\pm$ 262 (n=13)	438 $\pm$ 135 (n=12)	0.68	<0.03
末梢血リンパ球数に対する CD8+細胞割合	26.3%	34.8%		
CD3+CD26+細胞数(個/ μ L)	34 $\pm$ 41 (n=26)	70 $\pm$ 70 (n=16)	2.06	>0.05
CD3-CD26+細胞数(個/ μ L)	8 $\pm$ 11 (n=26)	11 $\pm$ 11 (n=16)	1.38	>0.05

*：健常人値に対する口腔癌患者値の比率

**：健常人値と口腔癌患者値における差の危険率

(表1)

表 2 健常人および口腔癌患者の末梢血 T リンパ球細胞膜および血清における DPP IV 活性

	D P P IV 活性（平均値±標準偏差）		P 値*
	健常人 （n=22）	口腔癌患者 （n=15）	
T リンパ球細胞膜 （nmole/min/mg protein）	2.7± 1.0	0.8± 0.4	<0.001
血 清 （IU/L serum）	48.2±12.7	29.2± 7.4	<0.001

*：健常人値と口腔癌患者値における差の危険率

（表 2）

表3 健常人および口腔癌患者の培養リンパ球における DPP IV 活性

	D P P IV 活性 [平均値±標準偏差 (nmole/min/mg protein)]		P 値
	健常人 (n=13)	口腔癌患者 (n=11)	
無添加	3.29±0.47 (1)*	2.87±0.85 (1)	N. S.
PHA	14.40±3.41 (4.4)	5.34±1.14 (1.9)	<0.001
Con A	13.37±2.36 (4.1)	5.50±1.27 (1.9)	<0.05
IL-2	6.73±1.55 (2.1)	4.54±1.09 (1.6)	<0.001
PHA + IL-2	17.52±4.33 (5.5)	6.38±1.31 (2.2)	<0.001
Con A + IL-2	15.75±2.29 (4.8)	5.40±1.01 (1.9)	<0.001

* : 相対値

P 値 : 健常人値と口腔癌患者値における差の危険率

表4 健常人および口腔癌患者のリンパ球培養における培養上清中の DPP IV 活性

	D P P IV 活性 [平均値±標準偏差 (IU/L medium)]		P 値
	健常人 (n=13)	口腔癌患者 (n=11)	
無添加	1.49±0.18 (1)*	1.45±0.09 (1)	N. S.
PHA	2.18±0.42 (1.5)	1.80±0.33 (1.2)	<0.05
Con A	2.01±0.33 (1.4)	1.69±0.21 (1.2)	<0.05
IL-2	1.77±0.38 (1.2)	1.63±0.23 (1.1)	N. S.
PHA + IL-2	2.80±0.63 (1.9)	2.04±0.41 (1.4)	<0.01
Con A + IL-2	2.56±0.73 (1.7)	1.82±0.30 (1.3)	<0.01

* : 相対値

P 値 : 健常人値と口腔癌患者値における差の危険率