

## 大腸癌における Cu/Zn-および Mn-superoxide dismutase

藤田保健衛生大学外科

岩瀬 克己 辻村 享 花井 恒一  
神保 慎 三浦 馥

Superoxide radicals ( $O_2^-$ ) を  $O_2$  と  $H_2O_2$  に変換する Cu/Zn および Mn superoxide dismutase (SOD) の大腸における生理的意義を検討する目的で、大腸癌組織26例の10%formalin 固定 paraffin 包埋薄切標本を材料として両 SOD の細胞内局在を免疫組織化学的に検索し、またこれらの病変の凍結保存組織を材料として組織内酵素濃度を酵素免疫測定法により測定した。

両 SOD は正常粘膜に比べ、癌組織でより明瞭に染色され、高分化型腺癌で高頻度に明瞭な染色陽性を示した。組織内濃度は、Mn SOD が癌組織で明らかな高値を示し、高分化型腺癌でより高く、Cu/Zn SOD に対する Mn SOD の比も高分化型で高値を示した。Cu/Zn SOD は正常粘膜の基底部位から、腫瘍の細胞質全体への分布と細胞内局在が変化した。両 SOD は腫瘍の発育に関わり、特に Mn SOD は腫瘍の分化に関与すると思われた。

**Key words:** superoxide dismutase, colo-rectal cancer, immunohistochemistry

### 緒言

Superoxide dismutase (SOD) は、細胞内で生成される superoxide ( $O_2^-$ ) を  $O_2$  と  $H_2O_2$  に変換する酵素で、酸素毒に対する細胞内防御因子として重要な役割を果たすものと考えられている<sup>1)</sup>。生体内には Cu と Zn を有し、細胞質に存在するとされる Cu/Zn SOD と、Mn を有しミトコンドリアに局在するとされる Mn SOD とがある<sup>2)</sup>。これまでに腫瘍をはじめ種々の病態における血中ならびに組織中の本酵素活性が変化することが報告され<sup>3)~6)</sup>、また発癌過程にも関与するとされているが<sup>7)</sup>、両酵素の役割はいまだ明らかにされていない。

今回、我々は大腸癌における SOD の意義を検討する目的で、高度に精製された抗ヒト SOD 抗体を用いて、大腸癌組織内の SOD の局在を免疫組織化学的に検索するとともに組織内濃度を測定し、臨床病理所見と比較検討した。

### 材料と方法

組織材料：外科手術により得られた大腸癌組織26例(上行結腸癌 5, 横行結腸癌 6, S 状結腸癌 8, 直腸癌 7) と癌症例の切除腸管断端部正常粘膜組織 8 の合計 34 組織を本研究の対象とした。組織の一部は切除後—

80°C に凍結保存し、また、他の一部は 10% formalin で固定し、組織学的ならびに免疫組織化学的検索に供した。凍結保存した組織 (0.5~1.0g) は 5mM EDTA を含む 50mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) を溶媒として Polytron homogenizer を用いて 10% homogenate を作製し、さらに 4°C で 20,000 × g 20 分間遠心分離し、その上澄を SOD 濃度の測定<sup>8)</sup>に供した。

免疫組織化学：Cu/Zn と Mn SOD の組織内局在は PAP 法を用いた免疫染色により検索した<sup>9)</sup>。各病変の代表的剖面のホルマリン固定、パラフィン包埋薄切切片 (5μm) を材料として、affinity column chromatography により高度に精製された抗ヒト Cu/Zn SOD (赤血球) ならびに抗ヒト Mn SOD (肝) 抗体 (ポリクロナール)<sup>8)</sup> を用いて免疫染色を行った。1 次抗体の反応は 4°C 終夜、他のステップは常温で 20 分間の反応とし、発色には 3,3'-DAB を用いた。それぞれの精製 SOD で飽和した抗体による染色所見をコントロールとし、染色の特異性を確認した。染色の程度を陰性 (-), 弱陽性ないし部分的陽性 (+), 明瞭な染色を示す強陽性 (++) の 3 段階に評価し、各病変の染色所見を比較検討した。

組織 SOD 濃度測定：大腸癌組織内 Cu/Zn ならびに Mn SOD 濃度の測定は、加藤ら<sup>10)11)</sup> の開発した高感度酵素免疫測定法により行った。SOD 濃度はそれぞれの精製 SOD を標準試料とし、ng/mg protein で算出し

<1997年2月12日受理> 別刷請求先：岩瀬 克己  
〒470-11 豊明市杣掛町田楽が窪 1-98 藤田保健衛生大学外科

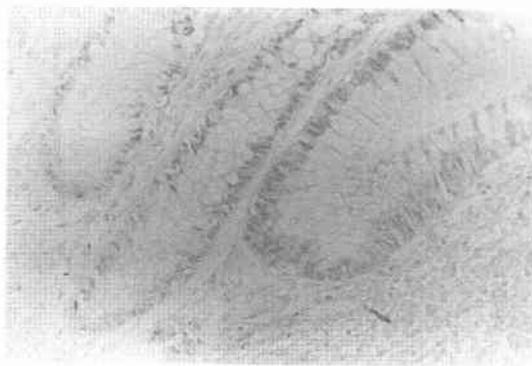
**Table 1** Immunohistochemical staining of SOD in the colorectal cancer

Histological diagnosis	No of specimens	Cu/Zn SOD			Mn SOD		
		-	+	++	-	+	++
normal mucosa #	26	22	4	0	0	0	0
cancer	26	9	8	9	5	8	13
well diff.	22	6	7	9	1	8	13
moderate diff.	3	3	0	0	3	0	0
mucinous	1	0	1	0	1	0	0

-, not stained. +, weakly or partly stained. ++, strongly stained. #, adjacent normal mucosa to each cancer

**Fig. 1** Immunohistochemical staining of Cu/Zn SOD in the normal mucosa of colon ( $\times 80$ ).

Cu/Zn SOD was stained weakly in the normal mucosa of colon, and localized predominantly in the basal part of them.



た。試料は各組織の細胞質分画 ( $20,000\times g$  上澄) でそれぞれ 2 検体ずつ測定した。

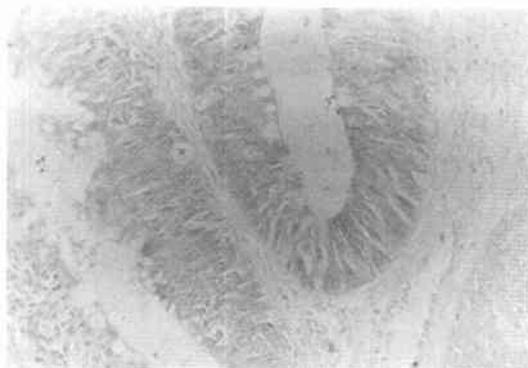
その他：精製 SOD 濃度は Lowry's Folin 法<sup>12)</sup>により、各試料の蛋白量は Bio-Rad Protein Assay キット<sup>13)</sup>を用いて行った。統計学的解析は non-paired Student's t-test で行い  $p < 0.05$  を有意とした。

### 結 果

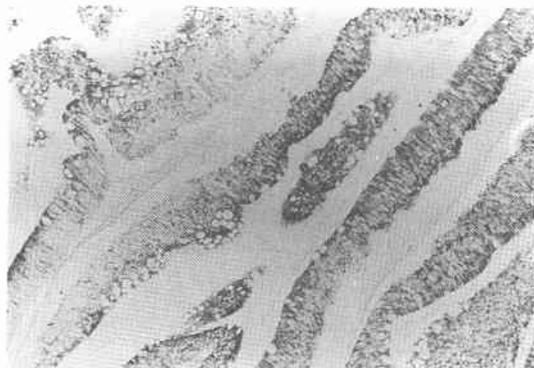
Cu/Zn SOD 免疫染色所見：各組織標本における Cu/Zn SOD の染色程度を評価し、隣接する正常大腸粘膜と大腸癌組織を比較検討した (Table 1)。Cu/Zn SOD は、検索対象 26 例中 17 例の腫瘍部分に染色陽性で、内 9 例は大部分の腫瘍細胞に明瞭な染色を認めた。正常粘膜細胞は 4 例に弱い染色を示したが、他は陰性であった (Fig. 1)。細胞内局在については、正常粘膜および弱い染色を示した腫瘍細胞では間質側の基底部に優位に存在する傾向を示したが、染色強陽性を示した腫瘍細胞では細胞質全体に一樣な分布を示した

**Fig. 2** Immunohistochemical staining of Cu/Zn SOD in the colon cancer ( $\times 80$ ).

Cu/Zn SOD was stained in many colo-rectal cancers, and was strongly stained in the well proliferative cells showing homogenous localization in the cytoplasm.

**Fig. 3** Immunohistochemical staining of Mn SOD in the colon cancer ( $\times 40$ ).

Mn SOD was stained in all colo-rectal cancers, and was stained granularly in the cytoplasm.



(Fig. 2).

Mn SOD 免疫染色所見：Cu/Zn SOD の場合と同様に、その染色程度を評価し、比較検討した (Table 1)。Mn SOD は 21 例に染色陽性となり、この内 13 例は大部分の腫瘍細胞に明瞭な染色を示した。しかし、隣接する正常粘膜細胞は全例染色されなかった。Mn SOD は細胞内に顆粒状に分布し、腺腔側に優位に存在する傾向を示した (Fig. 3)。Cu/Zn および Mn SOD ともに腫瘍組織において不均一な分布を示したが、腫瘍先端部と中心部で染色程度に明らかな差は認めなかった。

組織 Cu/Zn, Mn SOD 濃度：大腸癌および隣接する正常粘膜組織中の Cu/Zn ならびに Mn SOD 濃度を高

**Table 2** The concentration of SOD in the tissue of colorectal cancer

Histological diagnosis	No of specimens	Cu/Zn SOD (ng/mg protein)	Mn SOD	Mn SOD
				Cu/An SOD
normal mucosa #	15	380±101	457±113	1.3±0.5
well diff. ca.	14	372±100	877±235*	2.5±0.9*
moderate diff. ca.	3	342±100	501±256	1.5±0.6

The values are expressed by mean±S.D.

#, adjacent normal mucosa to each cancer.

\*, p<0.01 statistically significant, compared to that in normal mucosa (Student's t-test).

感度酵素抗体法により測定した (Table 2). Cu/Zn SOD は、正常粘膜と癌組織で違いはなかったが、Mn SOD は癌組織で高値を示し、特に高分化型腺癌で著明であり、それぞれの組織における Cu/Zn SOD に対する Mn SOD 濃度の比も高分化型腺癌で正常粘膜組織のそれに比べて有意に高値を示した。

臨床病理学的所見との対比では、高分化型腺癌22例中 Cu/Zn SOD 16例、Mn SOD 21例が染色陽性となったのに対し、その他の4例ではそれぞれ3例、4例が染色陰性を示した。患者の年齢、性、腫瘍の占居部位、大きさ、進行度による両酵素の染色の違いは認めなかった。

### 考 察

これまでの SOD に関する研究は、主として superoxide radicals (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) に対する細胞内防御因子という観点から、種々の腫瘍ならびに諸臓器の機能異常を対象として、その組織中ならびに血中の SOD 活性の比較検討が行われてきた<sup>3)~6)14)15)</sup>。しかし、その結果は報告により必ずしも一定しておらず、本酵素の細胞内防御因子としての特性も明らかにされるに至っていない。ヒトでは Cu/Zn SOD と Mn SOD の2種類の SOD が存在するが、それぞれの諸臓器における分布はさまざま、また動物種によって SOD の種類や分布も異なるなど種特異性、組織特異性も存在し<sup>2)</sup>、類似した病変でも組織によって異なる結果が得られており<sup>5)16)17)</sup>、各 SOD の生理的作用の解明を困難にしている。

今回の研究では、大腸癌組織を対象として、高度に精製された抗ヒト Cu/Zn SOD および Mn SOD 抗体を用いて、免疫組織化学的手法により両酵素の組織内分布を形態学的に観察し、高感度酵素免疫測定法によりその組織内濃度を測定した。その結果、大腸癌組織において、SOD は正常粘膜細胞に比べ特に高分化型腺癌細胞で明らかに高頻度に染色陽性の所見が得られ、大腸粘膜細胞の分化や腫瘍細胞の増殖に関与すること

が示唆された。しかし、組織内濃度においては、Mn SOD では同様に癌組織で正常粘膜組織に比べ高値を示したものの、Cu/Zn SOD は両者に差は認められなかった。これには試料に含まれる粘膜細胞以外の成分、すなわち同酵素が豊富に存在する血液成分が相対的に大きく影響した可能性も考えられる。

腫瘍と SOD の関連では、発癌の過程で本酵素は抑制的に作用するとされ<sup>4)17)</sup>、また癌が増殖する過程では、腫瘍により増加した細胞毒性のある superoxide radicals (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) に対応して酵素の誘導が起り、その酵素活性が高くなると解析している<sup>16)</sup>。また、腫瘍に対する放射線や抗癌剤治療の作用機序として O<sub>2</sub><sup>-</sup> の産生による組織障害性を挙げ、腫瘍の SOD 活性の高低がその治療に対する感受性に関連する可能性を推定する報告もある<sup>14)15)18)</sup>。近年、腫瘍の増殖に関して多くの研究がなされ、大腸癌においても種々の増殖因子や癌関連遺伝子の関与が報告されている<sup>19)~22)</sup>。癌細胞は増殖因子あるいは増殖抑制因子を過剰発現し、癌細胞ならびに間質細胞との間にオートクリンあるいはパラクリンループを構成し、その形態形成や増殖に深く関与しているとされている<sup>21)22)</sup>。これら増殖因子の発現は臓器組織によりその種類や程度が異なることも知られている<sup>20)</sup>。ある種の増殖因子は組織内 free radical の産生と密接に関連して発現することが知られ<sup>23)</sup>、今回検討した SOD もこれら増殖因子の発現とも関連しながら、腫瘍細胞の増殖分化に影響を及ぼしていることが推定される。

一般的には酵素活性はその濃度と相関すると考えられるが、必ずしもその濃度変化が生理的活性の違いにつながらない可能性を指摘する報告もある<sup>16)24)</sup>。すなわち、さらに何らかの局所的要因により、その作用発現のスイッチ on/off が成される可能性もある。本研究では、Cu/Zn SOD において、その細胞内局在が変化することが示されたが、そのような局所的な変化が、全

体の濃度変化ばかりでなく生理的作用発現に重要な関連を持つ可能性も考えられる。

近年、諸臓器における SOD の研究が進むにつれ、本酵素がさまざまな細胞機能に関わっている可能性が推定されている<sup>25)26)</sup>。すなわち、これまで本酵素の役割が主に病的状態における細胞毒、superoxide radicals に対する防御因子としてとらえられてきたが、superoxide radicals の果たす生理作用の解明が進むとともに、その代謝酵素である本酵素も、それによって産生される H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の役割<sup>27)</sup>など、生体諸臓器の本来の細胞機能の中での作用の解明が課題となってきている。本研究では、大腸癌細胞の増殖や細胞分化に伴って両 SOD の濃度のみならず細胞内分布も変化する結果が得られた。SOD が大腸癌の発育過程で果たしている細胞内機能のメカニズムについて、今後さらに詳細な検討が必要である。

稿を終えるに当たり、本研究の御指導を賜わり、快く抗 SOD 抗体を供与下さいました愛知県コロニー発達研究所生化学加藤兼房先生に深謝いたします。

#### 文 献

- McCord JM, Fridovich I: Superoxide dismutase; an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* 244 : 6049—6055, 1969
- Fridovich I: Superoxide dismutase. *Annu Rev Biochem* 44 : 147—159, 1975
- Del-Villano BC, Tischfield JA: A radioimmune assay for human cupro-zinc superoxide dismutase and its application to erythrocytes. *J Immunol Methods* 29 : 253—262, 1979
- Nakamura Y, Gindhart TD, Winterstein D et al: Early superoxide dismutase-sensitive event promotes neoplastic transformation in mouse epidermal JB6 cells. *Carcinogenesis* 9 : 203—207, 1988
- Nakada T, Koike H, Katayama T: Low of superoxide dismutase activity in pheochromocytoma. *J Urol* 139 : 9—13, 1987
- Elroy-Stein O, Groner Y: Impaired neurotransmitter uptake in PC12 cells overexpressing human Cu/Zn-superoxide dismutase; implication for gene dosage effects in Down syndrome. *Cell* 52 : 259—267, 1988
- Nakamura Y, Ohtaki S, Makino R et al: Superoxide anion is the initial product in the hydrogen peroxide formation catalyzed by NADPH oxydase in porcine thyroid plasma membrane. *J Biol Chem* 264 : 4759—4761, 1988
- Kurobe N, Suzuki F, Okajima K et al: Sensitive enzyme immunoassay for human Cu/Zn superoxide dismutase. *Clin Chim Acta* 187 : 11—20, 1990
- Sternberger LA, Hardy PH, Cuculis JJ et al: The unlabeled antibody enzyme method of immunocytochemistry, preparation and properties of soluble antigen antibody complex (horseradish peroxidase) and its use in identification. *J Histochem Cytochem* 18 : 315—333, 1970
- Kato K, Asai R, Shimizu A et al: Immunoassay of three enolase isozymes in human serum and in blood cells. *Clin Chim Acta* 127 : 353—363, 1983
- Kato K, Hamaguchi Y, Okawa S et al: Use of rabbit IgG-loaded silicone piece for the sandwich enzyme immunoassay for macromolecular antigens. *J Biochem* 81 : 1557—1566, 1977
- Layne E: Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. *Methods Enzymol* 3 : 447—450, 1957
- Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72 : 248—254, 1976
- Sykes JA, McCormack FX Jr, O'Brien TJ: A preliminary study of the superoxide dismutase content of some human tumors. *Cancer* 38 : 2759—2762, 1978
- Marklund SL, Westman NG, Lundgren E et al: Copper- and zinc-containing superoxide dismutase, manganese-containing superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in normal and neoplastic human cell lines and normal human tissues. *Cancer Res* 42 : 1955—1961, 1982
- Loven DP, Oberley LW, Rousseau FM et al: Superoxide dismutase activity in 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst* 65 : 377—381, 1980
- Hoffman CEJ, Webster NR, Wiggins PA et al: Free radical detoxifying systems in human colorectal cancer. *Br J Cancer* 51 : 127—129, 1985
- Sinha BK, Mimnaugh EG, Rajagopalan S et al: Adriamycin activation and oxygen free radical formation in human breast tumor cells; protective role of glutathione peroxidase in adriamycin resistance. *Cancer Res* 49 : 3844—3848, 1989
- Baker SJ, Fearon ER, Vogelstein B et al:

- Chromosome 17 deletion and p53 gene mutation in colorectal carcinoma. *Science* 244 : 217—221, 1989
- 20) Tahara E: Growth factors and oncogenes in human gastrointestinal carcinomas. *J Cancer Res Clin Oncol* 116 : 121—131, 1990
- 21) Yasui W, Sumiyoshi H, Hata J et al: Expression of epidermal growth factor receptor in human gastric and colonic carcinoma. *Cancer Res* 41 : 211—217, 1988
- 22) Derynck R, Goeddel DV, Ullrich A et al: Synthesis of messenger RNAs for transforming growth factors  $\alpha$  and  $\beta$  and the epidermal growth factor receptor by human tumors. *Cancer Res* 47 : 707—712, 1987
- 23) Shweiki D, Itin A, Soffer D et al: Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 359 : 843—845, 1992
- 24) Saito T: Superoxide dismutase level in human erythrocytes and its clinical application to the patients with cancers and thyroidal dysfunctions. *北海道医誌* 62 : 257—268, 1987
- 25) Sugawara M, Kita T, Lee ED et al: Deficiency of superoxide dismutase in endemic goiter tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 67 : 1156—1161, 1988
- 26) Nemeč J, Zamrazil V, Vana S et al: Clinical and pathologic problems in hyperthyroid syndrome in thyroid cancer. *Acta Univ Carol [Med] (Praha)* 28 : 119—167, 1982
- 27) Virion A, Michot JL, Deme D et al: NADPH-dependent  $H_2O_2$  generation and peroxidase activity thyroid particular fraction. *Mol Cell Endocrinol* 36 : 95—105, 1984

### Superoxide Dismutase in the Colo-rectal Cancer

Katsumi Iwase, Toru Tsujimura, Tsunekazu Hanai, Shin Jimbo and Kaoru Miura  
Department of Surgery, Fujita Health University School of Medicine

The localizations of Cu/Zn and Mn superoxide dismutase (SOD), which catalyzes the dismutation of superoxide radicals ( $O_2^-$ ) to  $O_2$  and  $H_2O_2$ , were studied in 26 colo-rectal carcinomas by an immunohistochemical technique. We employed 10% formalin fixed paraffin embedded thin sections and used anti-human Cu/Zn- and Mn-SOD antibodies. The concentrations of both SODs in these tissues were also measured by a sandwich enzyme immunoassay technique. Both Cu/Zn and Mn SOD were more clearly immunohistochemically stained in cancer cells than in the normal mucosal layer of the large intestine. Among cancer tissues, both stained more clearly in many well-differentiated carcinomas. The concentration of Mn SOD was significantly elevated in cancer tissues, especially in well-differentiated malignancies. The ratio of the tissue concentration of Mn SOD to that of Cu/Zn SOD was also high in the well-differentiated carcinomas. Cu/Zn SOD changed its intra-cellular localization from a predominance in the basal portions of normal mucosal cells to a homogeneous distribution in the cytoplasm of cancer cells. In conclusion, both SODs appear to be related to tumor growth, and Mn SOD may play a role in the differentiation of colo-rectal carcinoma.

**Reprint requests:** Katsumi Iwase Department of Surgery, Fujita Health University School of Medicine  
Kutsukake, Toyoake, 470-11 JAPAN

---