—대한치과의사협회지 : Vol. 11, No. 8, August, 1973—

結節型Tawa肉腫의 Collagenase에 關한 硏究

鄭泰英* 榊 鐵也** 多和敏一**

COLLAGENOLYTIC ACTIVITY OF SOLID TAWA SARCOMA

Tai Young Chung*, Tetsuya Sakaki**, and Toshikazu Tawa**.

Abstract

True collagenolytic enzymes in animal tissues were first demonstrated by Gross and Lapiere (1962), who showed the ability of such an enzyme in the culture medium of living explants of tadpole tissue to degrade a specific substrate of undenatured collagen under physiological conditions.

Recently, tumor-associated collagenolytic activity has been demonstrated in human neoplasm and in ascites V_2 carcinoma.

This investigation have been peformed to determine whether or not a collagen lytic enzyme could be found in isolated solid Tawa sarcoma of Donryu female rat obtained the culture medium.

The results were as follows.

1. 11.5mg% of hydroxyproline contained in Donryu rat skin collagen, which was extracted by 0.5 M acetic acid.
2. Cultivation of solid Tawa sarcoma tissues on reconstituted rat skin collagen gels showed lysis of adjacent gel after 18 hours, and much more extensive lysis after 5 days.
3. Collagen substrate was not attacked by the common proteolytic enzymes, trypsin, pepsin, and pronase.

緖 論

動物組織內의 collagen 吸收機轉은 一種의 collagen 分解酵素의 存在로 說明할 수 있다. 이와같은 collagen 分解酵素는 變性하지 않은 collagen을 基質로하여 生理的條件下에서 peptide bond를 分解한다.

Gross와 Lapiere(1962)가 最初로 올챙이 꼬리 組織을 組織培養하여 그 培養液이 collagen 分解能力을 含有함을 報告한 以來 올챙이꼬리 (Kang et al. 1966+ Nagai et al. 1966), 白鼠子宮(Jefferey와 Gross, 1966), 正常人皮膚 (Eisen et al. 1966), 白鼠皮膚 (Tokoro et al. 1972), 創傷治癒時 (Grillo와Gross, 1967 ; Donoff et al. 1971), 류마치스 滑液(Lazarus et al. 1968 ; Bauer et al. 1971 ; Harris et al. 1969), 齒齦 (Fullmer와 Gibson 1966 ; Gibson과 Fullmer 1966, ; Beutner et al. 1966 ; Fullmer et al. 1969 ; 1972), 骨組織 (Fullmer와 Lazarus 1969 ; Shimizu et al. 1969, Strates et al. 1972 ; Sakamoto et al. 1972) 및 granulocyte (Lazarus et al. 1968 ; Robertson et al. 1972)

*서울大學校 齒科大學 生化學敎室
**大阪齒科大學 生化學敎室
*Dept. of Biochemistry College of Dentistry S. N. U.
**Dept. of Biochemistry Osaka Dental University.

等의 組織培養液에서 檢出하고 部分精製하여 collagenase의 性狀을 究明한 많은 報告가 있다

腫瘍의 浸潤增殖은 腫瘍細胞의 collagen 分解酵素의 存在로 일어날 수 있다는 可能性을 報告한 例를 볼 수 있으나(Gersch와 Catchrole, 1947 ; Sylven et al. 1957와 Gröhowska, 1959), 이런 假定을 立證할만한 충분한 實驗的 證據가 아직도 이루워지지 않고 있다. 最近 腫瘍에서 collagen 分解酵素가 分離檢出되었는데 特히 人癌組織(Robertson과 Williams, 1969 ; Taylor et al. 1970 ; Yamanishi et al. 1972 ; Dresden et al. 1972)와 腹水型 V_2 carcinoma(Harris et al. 1972)等에서 報告하고 있다.

Collagen 分解는 먼저 上皮組織에서 일어나고 深層結締組織에서는 일어나지 않는다 하였다(Reley와Peacok, 1967). 또한 collagenase는 腫瘍組織自體에서 또 다른 한편으로는 腫瘍을 싸고 있는 宿主組織에서 形成된다고하였다(Harris, 1972).

本實驗은 DonRyu strain의 白鼠에 自然發生한 Tawa 肉腫(大阪齒科大學 生化學敎室)의 結節型에서 組織培養하여 collagen 分解酵素를 檢出하였기에 報告하는바이다.

實驗材料 및 方法

實驗動物 및 腫瘍 : 生後約 5週된 30匹의 白鼠(DonRyustrain)를 配合飼料와 飮料水를 供給하여 飼育하였다.

本 實驗에서 實驗腫瘍은 自然으로 發生한 Tawa 肉腫(Generation No. TS 910)의 結節型을 使用하였다. (Tawa et al. 1965). 즉 宿主인 DonRyu strain의 白鼠의 腹水癌細胞 約 10^7個를 移植할 白鼠의 背面皮下內에 移植하여 移植 7日後 比較的 巨大한 腫瘍을 觸知할 수 있는데 이때 白鼠를 犧牲시켜 腫瘍物을 無菌的으로 切除해 내어 使用하였다.

基質 collagen의 抽出 : 本 實驗에 使用한 collagen은 15匹의 白鼠의 皮膚와 꼬리(尾)에서 抽出하였다.

모든 實驗操作은 5°C以內의 冷凍室에서 行하였다.

Collagen抽出은 Kang et al. (1966)法에 準하였으며 抽出精製된 collagen은 凍結乾燥狀態에서 0°C에 保管하였다.

Collagen gel과 培養液의 準備 : 5°C에서 凍結乾燥 collagen 40mg을 氷冷 0.01M Tris-HCl buffer, pH 7.6, 10ml에 넣고 24時間동안 攪拌하여 溶解시켰다. 그後 13,000×g에서 30分間 遠心分離하여 粘液性 collagen溶液을 얻어 0.4M NaCl溶液에 24時間 透折하여 13,000×g에 1時間 遠心分離하여 不溶物을 除去하였다. Collagen溶液을 無菌的으로 하기 爲하여 Millipore filter(0.2μ)에 通過시켜서 無菌容器에 保管하였다. 培養液은 無菌collagen溶液과 Eagle's MEM medium을 1 : 1의 比로 混合하여 使用하였다. 各 組織培養器(Sterile tissue culture dish, Cat No. 3001, Falcon plastics)에 培養液을 2ml式 分注하고 37°C에서 3時間以上 放置하였다. 이 溫度에서 乳濁gel로 되어 典型的橫文纖維의 덩어리로 形成된다(Gross와 Kirk, 1959)

Collagenase 活性測定 : Tawa 肉腫의 外層 浸潤層(O)과 增殖部(I)를 2×3mm 크기로 細切하여 氷冷 Eagle's MEM medium에 넣고 培養할 때까지 保管하였다. 培養할 組織片을 collagen gel위에 놓고 95% O_2 와 5% CO_2를 含有하는 濕性空氣存在 하에 37°c에서 培養하여 時間에 따라 18, 36과 90時間과 5日에 collagen分解力을 觀察하였다.

培養組織이 얼마나 collagenase를 産出하나를 測定키 爲하여 두 方法을 選擇하였다.

첫째, Collagenase가 産出된 培養組織週圍의 collagen gel이 分解하여 形成되는 clear zone을 肉眼的으로 觀察하였고, 둘째, 組織培養後 5日에 培養液을 分解되지 않은 collagen과 13,000×g 30分間 遠心分離한 후 그 上淸液을 內因性 collagen의 分解産物의 基準으로 hydroxyproline測定과 Eagle's MEM medium과 比較로서 amino acid分析을 爲해 使用하였다.

Amino acid 分析 : Collagen分解産物의 amino acid分析을 爲해 上淸液을 두 方法으로 除蛋白하였다.

첫째, 5% TCA로 除蛋白하여 H_2O에 對해 透折하였고 둘째, 1% picric acid로 除蛋白하고 Dowex 2×8 column에 吸着시켜 0.02N HCl로 溶出하여 脫鹽시켰다.

各 除蛋溶液을 蒸發시켜 6N HCl에 다시 溶解하고 110°C 로 24時間 分解시켰다. 이 分解産物을 amino acid 自動分析計(Hitachi Co)로 分析하였다.

또한 hydroxyproline은 Newman과 Logan(1950[30])法으로 測定하였다.

實驗成績

Collagen抽出 : 1M NaCl과 0.5M acetic acid溶液으로 抽出한 collagen의 抽出量과 純度는 Table 1에서 보는 바와같다.

Table I : The extractibility of rat skin and tail collagen obtained by 1.0M NaCl and 0.5M acetic acid solutions.

	Skin(mg/180g)	Tail (mg/30g)
1.0 M NaCl	265	53
0.5 M Acetic acid	827	252
Total	1092	305

즉 180g의 皮膚에서 얻어진 collagen의 抽出量은 1.0M NaCl 溶液에서 256mg이고 0.5M acetic acid 溶液에서는 827mg이었다. 30g의 꼬리(尾)에서도 비슷한 比로 抽出되었다.

抽出한 collagen의 純度를 確定하기 爲하여 酸分解後에 hydroxyproline含量을 測定한 結果 Table Ⅱ에서 보는 바와 같이 各 分劃이 8.8mg에서 11.2mg%까지 含有하고 있다. 이는 他 硏究家의 實驗値와 약간 差異가 있는 것이다.

Table II; The hydroxyproline contents of acid hydrolysates of rat skin and tail collagen

	Hydroxyproline(mg%)
Skin; 1.0 M NaCl	9.6
0.5M Acetic acid	11.5
Tail; 1.0 M NaCl	8.8
0.5M acetic acid	9.6

Collagen 分解力의 確認 :

1) Collagen gel의 分解

各 培養器의 組織 collagenase 活性은 18, 36, 90時間과 5日에 觀察하였다. collagen gel의 分解液化部位의 선명한 帶를 結節型 Tawa 肉腫의 組織培養時에 collagen分解에 對한 基準으로 삼았다.

寫眞附圖에서 보는 바와같이 對照 gel과 比較하여 培養組織주위에 collagen gel의 分解를 觀察할 수 있는데 分解部位는 組織培養後 18時間내에 현저하고 점차 擴大하다가 5日에 最大에 達하게 된다.

번번히 나타나지는 않지만 細菌汚染은 不連續의 細菌集落을 명백히 보이고 있어 이는 觀察에서 除外하였다.

一般的으로 結節型Tawa肉腫은 3層으로 區分되는데 1) 灰白色의 中心壞死部, 2) 暗赤色의 內部增殖組織과 3) 핑크색의 浸潤層으로 構成되어 있다. 本實驗에서는 內部增殖組織과 外層浸潤組織을 使用하였는데 두 部位의 collagenase活性의 差異는 거의 없었다.

2. 槪知 Proteinase의 collagen gel基質에 對한 感受性

槪知의 Proteinase 즉 pepsin, trypsin과 pronase의 collagen分解力은 腫瘍組織과 比較하여 附圖2에서 보는 바와 같다. 즉 各 酵素 1% 溶液 1μl를 吸着시킨 直徑 2mm의 filter paper disk를 collagen gel 상에 놓고 37°C에서 36時間 培養한 後에 觀察한 結果 collagen 分解力을 認知하는 clear zone을 나타내지 않았다.

分解된 collagen의 amino acid

Table Ⅲ에서 보는 바와같이 組織培養 5日後의 分解된 collagen의 TCA와 picric acid로 除蛋白後의 amino acid分布는 差異가 있다. 兩分劃의 amino acid 分布는 除蛋白時에 amino acid의 變化로 差異가 있는 것으로 思料된다.

分解된 collagen의 amino acid 含量은 collagen-medium gel의 amino acid에서 Eagle's Medium의 amino acid를 除한것으로 計算하였다.

特히 hydroxyproline은 Newman과 Logan(1950)法으로 測定하였고 培養器(culture dish)當 유리한 量을 表示하고 있다.

Table III; The amino acid components of degraded collagen gel by explants of solid Tawa Sarcoma.*

	Deproteinized by	
	TCA	Picric acid
Hydroxyproline	21.85	—
Aspartic acid	158.12	16.76
Threonine	46.13	42.30
Serine	88.63	19.42
Glutamic acid	257.56	86.13
Proline	146.61	—
Glycine	276.20	19.80
Alanine	146.38	24.43
Valine	39.85	54.22
Methionine	4.51	14.78
Isoleucine	1.58	54.98
Leucine	38.99	52.14
Tyrosine	13.96	35.58
Phenylalanine	57.17	65.76
Histidine	16.16	33.51
Lysine	76.74	83.54
Arginine	70.93	—

Each values are microgram per each culture dishes.

考 案

Collagen은 대부분 成熟動物組織에서는 比較的 轉換率이 낮지만 病的狀態 特히 組織治癒期 및 成長發育期의 生理的 remodeling時에는 급격히 轉換率이 높아지는 것은 周知의 事實이다. 잘 알려진 例는 骨의remodeling, 産後子宮筋層의 吸收, Carageenan Granuloma의 退行期, 實驗肝硬變의 治癒初期等이다 (Harkness 1961).

腫瘍組織과 關聯되는 collagenase의 存在는 많은 硏究家에 依해 報告되었으나 collagenase를 檢出과정에서 낮은 pH와 高溫度에 의해 일어날 수 있는 蛋白構造의 變化 및 非特異性 cathepsin에 의해 分解될 수 있는 變異蛋白質을 誘發시킬 수 있기 때문에 true collagenase를 檢出하기에는 困難한 境遇가 많이 있다(Bornstein, 1958).

腫瘍의 增殖은 腫瘍細胞가 collagen分解酵素를 遊離하여 周圍結締組織을 分解하면서 增殖한다는 可能性을 報告한 例가 있으나 (Gersch와 Catchrole, 1949, Sylven, et al. 1957, Gröhowska, 1959)이를 立證할만한 充分한 實驗的 證據가 아직도 없다.

最近 人癌組織(Dresden, et al. 1972)과 腹水型 rabbit V2 carcinoma(Harrnis et al. 1972) 等의 組織培養에서 collagenase를 檢出하였다. 結節型 Tawa 肉腫은 皮下에 핑크색의 浸潤性增殖層과 腫瘍內部의 增殖組織 및 灰白色의 中心壞死部로 構成되어 있는데 本 實驗은 結節型 Tawa 肉腫에서 collagenase의 存在를 檢出하였다. 組織培養에서 Tawa 肉腫의 內部增殖組織과 浸潤層과의 差異는 거의 없이 共히 陽性으로 clear zone을 나타내고 있다. 이는 腹水型 rabbit V2 carcinoma에서 浸潤層에서 collagenase의 活性을 나타내고 있지 腫瘍自體는 初期培養에서 活性을 나타내지 않는다는 것과 거의 一致되는 結果이다(Hanis et al. 1972).

또한 Reley와 Peacock(1967)는 collagen分解는 먼저 上皮에서 일어나고 深層結締組織에서는 일어나지 않는다 하였고, Harris (1972)는 collagenase는 腫瘍組織自體에서 産出되고 또 한편으로는 腫瘍을 싸고 있는 宿主組織에서도 産出된다 하였다.

Robertson et al. (1972)는 rabbit Polymorphonuclear Leucocyle에서 collagenase는 alkaline phosphatase를 含有하고 있는 같은 granule과 함께 저장이 되어 있다 하였고, Harris et al. (1972)는 membrane-bound collagen 分解酵素는 腫瘍細胞가 浸潤增殖하는데 重要한 役割을 할 可能性이 있다 하였다. 本 實驗에서Tawa 肉腫의 組織培養後의 分解産物의 amino acid組成은 除蛋白條件에 따라 多少의 差異가 있어 hydroxyproline은 picric acid로 除蛋白時에는 檢出되지 않았다.

Collagenase는 細胞內에 저장되어 있다가 必要에 따라 유리되거나 혹은 *de novo* 合成을 유발시킨다고 하였는데(Gross Lapiere 1962) 本實驗에서 collagen分解力은 組織培養後 18時間내에 현저하고 점차 擴大하여 5日에 最大에 達하였는데 이 時期는 酵素의 *de novo* 合成에 必要한 榮養素가 고갈되어 더 以上의 酵素를 生産치못하는 것으로 思料된다.

槪知 proteinase의 collagen gel基質에 對한 感受性에서도 collagen gel의 分解를 認知하는 clear zone이 나타나지 않는 것으로 보아 collagenase외의 他 proteinase活性의 存在를 보이지 않아 이에 作用하는 酵素가 collagenase라 思料된다.

結　論

本 實驗은 DonRyu strain의 白鼠에 自然發生한 結節型 Tawa肉腫을 組織培養하여 collagen 分解酵素를 檢出하여 다음과 같은 意義있는 結果를 얻었다.

1) DonRyu 白鼠皮膚 collagen 基質의 hydroxy proline은 11.5mg%이었다.

2) Collagenase 活性은 結節型 Tawa肉腫의 組織培養後 18時間內에 顯著하고 5日에 最大에 達하였다.

3) 槪知 proteinase 즉 pepsin, trypsin, pronase에 對하여는 基質 collagen의 分解를 認知하지 못하였다.

REFERENCES

1. Bornstein, M.B. : Lab. Invest. 7; 134, 1958
2. Beutner, E., Thrifthauser, C. and Hazen, S. : Collagenase activity of gingival tissue from patients with periodontal disease. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 121; 1082, 1966
3. Bauer, E.A., Jeffrey, J.J. and Eisen, A. A.: Preparation of three vertebrate collagenases. Biochem. Biophy. Res. Comm. 44;813, 1971
4. Donoff, R.B., McLennan, J.E. and Grillo, H. C.: Preparation and properties of collagenases from epithelium and mesenchyme of healing mammalian wounds. Biochim. Biophy. Acta 227; 639, 1971
5. Dresden, M.H., Heilman, S.A. and Schmidt, J. D.; Collagenolytic enzymes in human neoplasms. Cancer Res. 32, 993, 1972
6. Eisen, A. Z., Jeffrey, J.J. and Gross, J. : Human skin collagenase. Isolation and mechanism of attack on the collagen molecule. Biochim. Biophy. Acta 151; 637, 1968
7. Fullmer, H.M. and Gibson, W.A. :Collagenolytic activity of gingivae of man. Nature 209; 728, 1966
8. Fullmer, H. M., Gibson, W.A., Lazarus, G.

S., Bladen, H.A. and Whedon, K.A. : Origin of collagenase in periodontal tissue in man. J. Dent. Res. 48 : 646, 1969
9. Fullmer, H.M. and Lazarus, G.S. : Collagenase in bone of man. J. Histochem. 17 : 793, 1969
10. Fullmer, H.M., Taylor, R. E. and Guthrie, R.W. : Human gingival collagenase: Purification, molecular weight, and inhibitor studies. J. Dent. Res. 51; 349, 1972
11. Gersh, I. and Catchpole, H.R. : Amer. J. Anat. 85; 457, 1949
12. Gross, J. and Kirk, D. : The heat precip itation of collagen from neutral salt solution: Some rate regulating factors. J. Biol. Chem. 233; 1959
13. Gröhowska, M. : Collagen content of normal connective tissue, of tissue surrounding a tumor and of growing rat sarcoma. Nature 183; 1186, 1959
14. Gross, J. and Lapiere, C. M. : Collagenolytic activity in amphibian tissues; A tissue culture assay, Proc. Nat. Acad. Sci., 48; 1014, 1962
15. Gibson, W. and Fullmer, H.M. : Collagenase activity of gingival tissues, in vitro. J. Dent. Res. 45 : 1225, 1966
16. Grillo, H. C. and Gross, J. : Collagenolytic activity during mammalian wound repair. Develop. Biol. 15; 300, 1967
17. Harkness, M. B. :Biol. Rev. 36; 399, 1961
18. Harris, E.D., Jr., Dibona, D.R. and Krane, S.M. : Collagenases in human synovial fluid. J. Clin. Invest. 48r 2104, 1969
19. Harris, E.D. Jr., Faulkner, C.S.II. and Wood S. Jr. : Collagenase in carcinoma cells. Biochem. Biophy. Res. Comm. 48; 1247, 1972
20. Jeffrey, J.J. and Gross, J. : Collagenase from rat uterus, Isolation and partial purifica tion. Biochemistry 9 ; 268, 1970
21. Kang, A.H., Nagai, Y., Piez, K. A. and Gross, J. : Studies on the structure of collage n util izing a collagenolytic enzyme from tadpole. Biochemistry 5 ; 509, 1966
22. Lazarus, G. S., Dacker, J.L., Oliver, C.H., Daniels, J.R., Multz, c.v. and Fullmer, H. M. : Collagenolytic activity of synovium in rheumatold arthritis, New Eng. J. Med. 279 914, 1968
23. Lazarus, G. S., Daniels, J. R., Brown, R.S., Bladen, H. A. and Fullmer, H. M. : Degradation of collagen by a human granulocyte collagenolytic system. J. Clin. Invest. 47 ; 2622, 1968
24. Newman, R.E. and Logan, M.A. : J. Biol. Chem. 184; 299, 1950 & J. Biol. Chem. 186; 549, 1950
25. Nagai, Y., Lapiere, C.M. and Gross, J. : Tadpole collagenase, Preparation and purification. Biochemistry 5 ; 3123, 1966
26. Riley, W. and Peacock, E. : Identification, distribution, and significance of a collagenolytic enzyme in human tissues. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 127 ; 207, 1967.
27. Robertson, D.M. and Williams, D.C : In vitro evidence of neutral collagenase activity in a invasive mammalian tumor. Nature 221 ; 259, 1969
28. Robertson, P.B., Ryel, R.B., Taylor, R.E., Shyu, K.W. and Fullmer, H.M. : Collagenase Localization in polymorphonuclear leucocyte granules in the rabbit. Science 177 ; 64, 1972
29. Sylven, B. and Malmgren, H. ; Acta Radiol. 154 ; 1, 1957
30. Schimizu, M., Glimcher, M. J., Travis, D. and Goldhaber, P. : Mouse bone collagenase : Isolation, partial purification, and mechanism. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 130; 1175, 1969
31. Strates, B. S. and Urist, M.K. : Collagenase and prteinase induction in implants of bone matrix. Biochem. Biophy. Res. Comm. 49; 752, 1972
32. Sakamoto, S., Goldhaber, P. and Glimcher, M.J. : The further purification and characterization of mouse bone collagenase. Calc. Tiss. Res. 10; 142, 1972
33. Tawa, T., Sakaki, T., Yokoda, Y., Yamada, S. and Shimada, S. : A new spontaeous transplantable tumor in Donryu rat. GANN, The Japanese J. of Cancer Res. 56; 75, 1965
34. Taylor, A.C., Levy, B. M. and Simpson, J.

W. : Collagenolytic activity of sarcoma tissue. in culture. Nature 228; 366, 1970
35. Tokoro, V., Eisen, A.Z. and Jeffrey, J.J.: Characterization of a collagenase from rat skin. Biochim. Biophy. Acta 258; 289, 1972
36. Yamanishi, Y., Dabbous, M.K. and Hashimoto, K. : Effect of collagenolytic activity in basal cell epithelioma of the skin on reconstituted collagen and physical properties and kinetics of the crude enzyme. Cancer Res. 32; 2551, 1972

=Photographsgraphs=

Collagenolytic activity of explants of Solid Tawa Sarcoma illustrated in photographs of dish culture.

1) before incubation

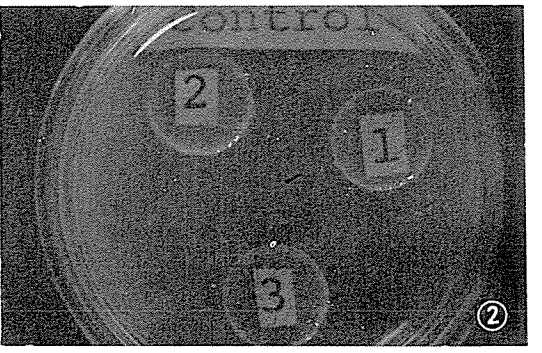
2) common proteolytic enzyme, trypsin, pepsin and pronase not attacked collagen gel.

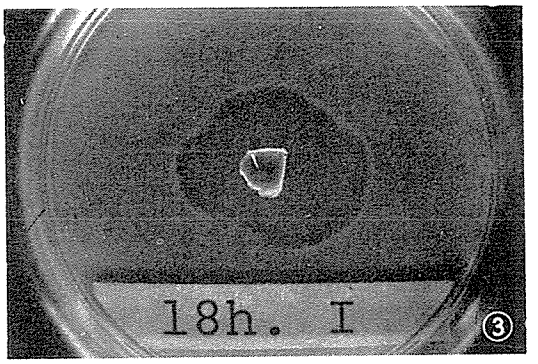
3) after 18 hours incubation, showing lysis of adjacent gel

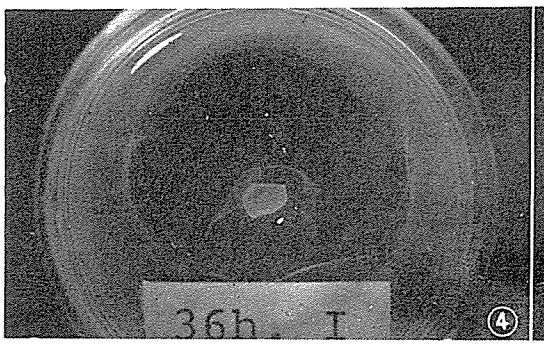
4) after 38 hours incubation, showing progressly lysis

5) after 5 days incubation, showing much more extensive lysis.

Control
①


Control
2
1
3
②


18h. I
③


36h. I
④

5 days I
⑤