

Characterization of γ -Glutamyltranspeptidase from Hepatocellular Carcinoma and Comparison with Those from Normal Liver, Cirrhotic Liver and other Tissues

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8287

ヒト肝細胞癌 γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ (γ -GTP) の性状に関する研究

—正常肝、肝硬変および他臓器 γ -GTP との比較—

金沢大学がん研究所内科部 (主任: 澤武紀雄教授)

尾崎 監 治

(平成3年6月22日受付)

癌化に伴うヒト肝細胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) の γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ (γ -glutamyltranspeptidase, γ -GTP) の変化を明らかにする目的で、6例の HCC より γ -GTP を精製し、同様な方法で精製した正常肝、肝硬変肝、正常脾および正常腎の γ -GTP と比較しながら、HCC γ -GTP の各種性状を検討した。ドデシル硫酸ナトリウム (sodium dodecyl sulfate, SDS) 電気泳動で HCC γ -GTP の分子量は26,000と63,000のサブユニットに分かれ、他の組織の γ -GTP との間には差異はみられなかった。しかし、密度勾配電気泳動では HCC γ -GTP はいずれも正常肝や肝硬変などの良性肝 γ -GTP に比べ、明らかに遅い泳動度を示した。ノイラミニダーゼ処理後の泳動度では HCC γ -GTP には殆ど変化はみられなかったが、良性肝 γ -GTP の泳動度は著しく遅くなり、両者の泳動度の差は、非常に小さくなった。HCC γ -GTP の等電点は個々には多少異なるものの、良性肝 γ -GTP に比べ明らかに高値であったが、ノイラミニダーゼ処理後には後者の等電点が高くなり、両者の差は殆どみられなくなった。各種レクチンの親和性クロマトグラフィーを用いた検討では、レンズ豆レクチン (Lens culinaris agglutinin, LCA) では一定の傾向はみられなかったが、コンカナバリン A (concanavalin A, Con A) では HCC 6例中4例の γ -GTP は良性肝に比べ、低い結合率を示した。赤血球凝集性インゲン豆レクチン (Phaseolus vulgaris erythroagglutinin, E-PHA) に対しては良性 γ -GTP は殆ど親和性を示さなかったが、HCC γ -GTP は総ての例で明らかに親和性を示した。以上の結果より、HCC γ -GTP の癌性変化は主にシアル酸の減少と、いわゆるバイセクティング N-アセチルグルコサミン残基 (bisecting GlcNAc) または C-2, -6 外側糖鎖を有するオリゴ糖の増加などの糖鎖構造において発現しているものと推定される。

Key words hepatocellular carcinoma, gamma-glutamyltranspeptidase, carbohydrate moieties, sialic acid, lectin affinity

γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ (γ -glutamyltranspeptidase, γ -GTP) は哺乳動物の諸臓器に広く分布し、グルタミルペプチドから γ -グルタミル基を他のアミノ酸やペプチドに転換させる膜結合酵素である¹⁾。本酵素は実験肝癌の発癌過程において、その前癌病変とされる過形成結節においても既に活性が上昇

し、癌化が進むに従い活性が著明になることより、実験肝癌の推移を知る有力な指標として用いられてきた²⁻⁹⁾。加えて、 γ -GTP 活性はラットの胎児肝では著しく高く、生後急速に下降し成熟肝ではその活性は低い⁹⁾が、癌化とともにその活性が再び上昇することより、本酵素は、癌胎児性抗原としての性状を有してい

Abbreviations; AFP, alpha-fetoprotein; Con A, concanavalin A; E-PHA, Phaseolus vulgaris erythroagglutinin; FPLC, fast protein liquid chromatography; γ -GTP, gamma-glutamyltranspeptidase; GlcNAc, N-acetylglucosamine; HCC, hepatocellular carcinoma; LCA, Lens culinaris agglutinin; PBC, phosphate buffered saline; SDS, sodium dodecyl sulfate

るとも言われてきた。一方、臨床的にはほとんどの肝細胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 患者では血清 γ -GTP 活性は高くなるが、アルコール性肝炎や胆道閉塞性疾患などの良性肝疾患においても活性が増加するので、単に活性を測定するだけでは HCC の特異な診断はできない。Sawabu らは⁸⁻¹⁰ 上述したような γ -GTP の癌胎児性抗原としてその性状に注目した臨床的研究より HCC 患者血清中に特異的に出現する γ -GTP 分画を見出し、Novel γ -GTP と呼称している。この Novel γ -GTP は HCC 患者血清の55%に見られるが、他の良性肝疾患患者血清ではわずか3%にしか見いだせず、HCC の有力な腫瘍マーカーとして期待されている。ヒトの HCC と正常腎 γ -GTP は酵素的な諸性質は同一で、通常のポリクロナール抗体では両者を区別し得ないことよりペプチド部分ではなく、その糖鎖構造において差異があるものと推察されている¹¹。しかし、ヒト HCC での γ -GTP の癌性変化については不明のままである。本研究ではこのような点を解明しようとしてヒト HCC 組織より γ -GTP を精製し、正常肝、肝硬変肝、HCC 非癌部、さらには正常膵、正常腎の各組織の γ -GTP とも比較しながらその癌性変化について検討した。

対象および方法

I. 対 象

手術ないし剖検にて得られた HCC 6例、正常肝2例、肝硬変肝1例、正常膵2例、および正常腎2例の各組織を実験材料として用いた。いずれも手術または剖検にて2時間以内に得られたものを使用し、実験まで -70°C にて凍結保存した。HCC の6例中1例(症例1)ではその非癌部からも γ -GTP を精製し比較検討した。尚、非癌部分は組織学的に肝硬変であった。

II. γ -GTP 活性の測定

γ -GTP の測定は L- γ -グルタミル-D-ニトロアニリド (L- γ -glutamyl-p-dinitroanilide) を基質とし、グリシルグリシン (glycylglycine) を受容体とする方法を用い¹²、1分間に $1\mu\text{M}$ の p-ニトロアニリン (p-nitroaniline) を生じる酵素量を1単位とした。蛋白濃度は Lowry ら¹³の方法で行った。

III. γ -GTP の精製

γ -GTP の精製は表1に示すごとく Orłowski と Meister¹⁴の方法に準じて行った。組織を3倍量の 0.08M MgCl_2 溶液にて3分間均一化し、 1N NaOH で pH10 に調節後、 37°C 、2時間消化した。その後 $25,000\times\text{g}$ 40分間の冷凍遠心にて得られた沈渣を、 1.5% デオキシコール酸ナトリウムと 5% トライト

ンX100 を含む 0.1M トリス塩酸緩衝液 (pH8.0) 中で 4°C 、48時間攪拌して可溶化した。ついで、 $25,000\times\text{g}$ 40分間の冷凍遠心にて得られた上清を蒸留水にて48時間脱塩し、 0°C に冷却後等量の -15°C の冷アセトン を滴下、攪拌により脱脂した。それを $25,000\times\text{g}$ 30分間の冷凍遠心により分離し、その沈渣を 0.1M トリス塩酸緩衝液 (pH8.0) 中に懸濁し、一晚脱塩した。それに試料の蛋白量 10mg 当たり 1mg のプロメリンと2-メルカプトエタノール ($5\mu\text{l}$) を加え、 37°C で1時間消化した。このようにして得られた溶液を 0.01M トリス塩酸緩衝液 (pH8.0) にて予め平衡化させた DEAE-セファロースファーストフロー (Pharmacia, Uppsala, Sweden) のカラム ($25\times 100\text{mm}$) にて NaCl 濃度を 0.0M から 0.5M まで連続的に変化させるイオン交換クロマトグラフィーを行った。 γ -GTP の酵素活性をもつ蛋白質の大部分は 0.3M NaCl 濃度の分画に溶出された。それを予め 1.0M 硫酸アンモニウムを含む 0.1M phosphate buffered saline (PBS) (pH6.8) で平衡化したフェニールセファロース CL-4B (Pharmacia) のカラム ($2\times 100\text{mm}$) を用い、0 から 50% に連続的に変化させ、エチレングリコール溶液にて溶出するハイドロフォビッククロマトグラフィーを行った。酵素活性を示す分画は約 10% のエチレングリコール溶液の濃度にて溶出された。得られた活性分画を集め、 0.01M トリス塩酸緩衝液 (pH8.0) で調整後、同じ緩衝液で平衡化した MonoQ HR5/5 (Pharmacia) カラムによる高速液体クロマトグラフィー (fast protein liquid chromatography, FPLC system, Pharmacia) を用いて NaCl 濃度を 0.0M から 0.5M まで連続的に変化させて溶出した。酵素活性を有する分画は 0.3M NaCl の濃度分画に溶出され、このようにして精製したものを各種濃度分析に用いた。

IV. ゲル電気泳動法

ドデシル硫酸ナトリウム (Sodium dodecyl sulfate, SDS) 電気泳動は (Weber と Osborn¹⁵の方法に従い 0.1% SDS (和光純薬、大阪) を含有した 7.5% ポリアクリルアミドグラジエントゲルを用いて行った。密度勾配電気泳動はファルマシア製電気泳動装置 (Phast system, Pharmacia) を使用し $8\sim 25\%$ の密度勾配ゲルを用いて 6mA 、70分の泳動を行った。泳動後、Sawabu ら⁸の方法により γ -GTP を染色し、また、コマシーブリリアント・ブルー (Sigma, St. Louis, U. S. A.) にて蛋白染色を行った。

V. エレクトロフォーカシングクロマトグラフィー
エレクトロフォーカシングクロマトグラフィーには FPLC system (Pharmacia) のもとで予め 0.02M トリ

ス塩酸緩衝液 (pH7.5) にて平衡化した MonoQ HR5/20カラム (Pharmacia) を用いて行った。溶出液には7.5%ポリバッファー PB74 (Pharmacia) と2.5%ファルマライト2.5~5 (Pharmacia) を3対1で混合し、10倍希釈したものを1N塩酸でpH2.5に調整後使用した。溶出液はpH7.5から2.5までほぼ直線的なpH勾配が得られ、pHが2.5に達した後、2.0MNaClを含む0.02Mトリス塩酸緩衝液 (pH7.5) を加え、等電点2.5以下のものを溶出させた。

VI. 各種レクチン親和性クロマトグラフィー

レクチンとしてコンカナバリン A (Concanavalin A, Con A), レンズ豆レクチン (*Lens culinaris agglutinin*, LCA) および赤血球凝集性インゲン豆レクチン (*Phaseolus vulgaris erythroagglutinin*, E-PHA) を用いて検討した。Con A セファロース 4B (Pharmacia) カラム (8×150mm) と LCA セファロース 4B (Pharmacia) のカラム (8×150mm) にはいずれも1mMMnCl₂, 1mMMgCl₂, 1mMCAcCl₂ および0.5MNaCl を溶解させた0.05M トリス塩酸緩衝液 (pH7.5) で平衡化後、試料を添加し、カラムを素通りする非結合分画と、0.2Mメチル- α -D-マンノピラノシッド (Sigma) を含む緩衝液で溶出される結合分画に分離し、 γ -GTP のレクチンに対する結合率を求めた。また、E-PHA アガロース (EY Laboratories, San Mateo, U. S. A.) のカラム (8×150mm) には0.15MNaCl を含む6.7mMリン酸緩衝液 (Phosphate buffered saline, PBS, pH7.4) にて平衡化し、溶出液には1.0MNaCl を含む6.7mMKH₂PO₄を用いて親和性クロマトグラフィーを行い、その溶出像を比較検討した。なお、いずれの場合もそのカラムクロマトグラ

フィーは4°Cにて行い、その流出速度は12ml/時で1.0mlずつ分画採取した。

VII. ノイラミニダーゼ処理

ノイラミニダーゼ処理は試料を0.2M PBS (pH3.5) でpH5.0に調節後、 γ -GTP 活性70mUに対し、0.1M酢酸緩衝液 (pH5.0) に溶解したシアリダーゼ (*Arthrobacter urea faciens neuraminidase*, 半井化学, 京都) を50mU加えて、37°C, 16時間反応させた。

VIII. 免疫学的検討

分離精製したヒト腎 γ -GTPあるいはヒトHCC γ -GTPを抗ヒト全血清を結合させたCNBr-セファロース4B (Pharmacia) によるネガティブアフィニティークロマトグラフィーを行い、爽雑蛋白を除去した。これをフロイント完全アジュバント (ヤトロン, 東京) と混和し、エマルジョンとしてニュージーランドホワイトラビットに免疫し、型のごとく抗血清を得た¹⁰⁾。この抗血清をDEAE-セファロースファーストフローカラムクロマトグラフィーによりIgG分画を分離し、得られた抗ヒト腎 γ -GTP抗体あるいは抗ヒトHCC γ -GTP抗体を用いて免疫拡散法 (Ouchterlony 法) を行った。さらに、既述の方法⁹⁾により γ -GTP活性染色をして、沈降線を確認した。

成 績

I. γ -GTP の精製

HCC γ -GTP の精製は表1に示すごとく、最終段階での比活性は11,400mU/mg蛋白で、デオキシコール酸塩とトライトン X100 で可溶化した段階に比較して、最終精製倍率は2,562倍、収率は約24%であった。また、正常肝、肝硬変肝、正常腎及び正常膵から精製

Table 1. Purification Profile of γ -GTP from Hepatocellular Carcinoma

Step	Total volume (ml)	Total protein (mg)	Total activity (mU)	Specific activity (mU/mg)	Total purification (-fold)	Yield (%)
Sodium deoxycholate and Triton X-100 extraction	1,500	94,710.0	421×10	4.45	1	100
Acetone precipitation	1,450	18,922.5	302×10	16.0	4	72
Bromelain treatment	1,450	11,018.5	298×10	27.0	6	71
Chromatography on DEAE-Sepharose fast flow	600	602.8	170×10	282	63	40
Chromatography on Phenyl-Sepharose CL-4B	400	59.5	149×10	2,500	562	35
Chromatography on Mono Q HR 5/5	9	9.0	102×10	11,400	2,562	24

した γ -GTPの比活性はそれぞれ2,600, 2,587, 4,884 および 804mU/mg 蛋白であった。

II. 電気泳動

γ -GTPの電気泳動は SDS を含む7.5%ポリアクリルアミドゲルと SDS を含まない8~25%の密度勾配ゲルとで検討した。SDS 電気泳動では HCC γ -GTP は分子量26,000と63,000の2つの異なったサブユニットに分かれた。また、他の正常組織から精製した γ -GTPはいずれも同様な位置に泳動され、HCC γ -GTPとの間には差異は見られなかった。一方、8~25%の密度勾配電気泳動ではいずれの組織の

γ -GTPもやや幅広いが、単一の活性帯として泳動された(図1)。正常肝 γ -GTPは非癌部肝や肝硬変肝のそれとほぼ同じ位置で、最も陽極よりに泳動された。しかし、HCCの γ -GTPは6例とも症例により多少異なるものすべてで正常肝や肝硬変肝のそれよりも明らかに泳動度が遅延していた。また、正常膵 γ -GTPは正常肝や肝硬変肝 γ -GTPと同じ泳動度を示したが、正常腎 γ -GTPはHCC γ -GTPと同様に、正常肝 γ -GTPや肝硬変肝あるいは正常膵よりも明らかに泳動度が遅延していた。試料をノイラミナーゼ処理後に泳動すると、図2に示すごとく HCC γ -GTPの泳

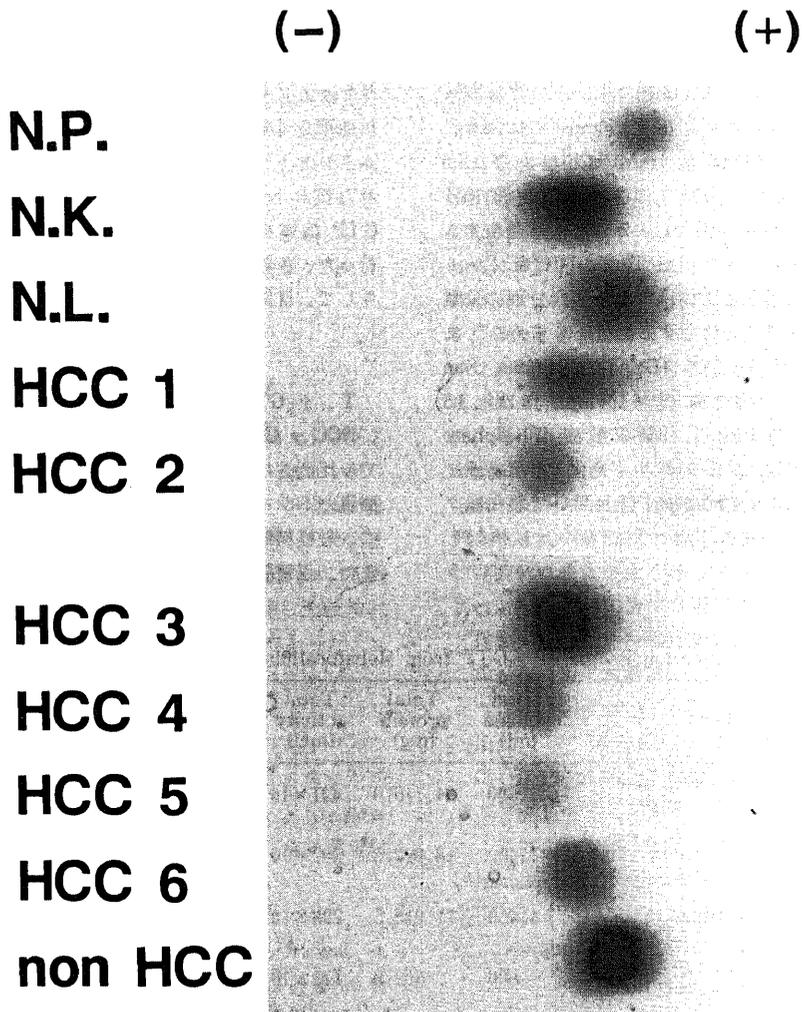


Fig. 1. Electrophoretic patterns of γ -GTP_s from various tissues in 8-25% polyacrylamide gradient gel slabs. N. P., normal pancreas γ -GTP; N. K., normal kidney γ -GTP; N. L., normal liver γ -GTP; HCC, hepatocellular carcinoma γ -GTP; non HCC, non-cancerous tissue γ -GTP of hepatocellular carcinoma.

動度はほとんど変化しなかったのに対し、正常肝や肝硬変肝の γ -GTPの泳動度は著しく遅くなり、HCC γ -GTPとの差は非常に小さくなった。

III. 等電点の検討

ノイラミニダーゼ処理前後の正常肝 γ -GTP (症例1)とHCC γ -GTP (症例1)のエレクトロフォーカシングクロマトグラフィーの溶出像を図3に示す。また、同様にして求めた各組織の γ -GTPの等電点は表2に示すごとくである。正常肝 γ -GTP (症例1, 2)、肝硬変肝 γ -GTPおよびHCCの非癌部 γ -GTPの等

電点はそれぞれ4.1, 4.4, 4.3および4.0であり、比較的低い等電点がみられた。また、正常腎 γ -GTPの等電点はいずれも4.0を示した。しかし、正常腎 γ -GTPのみは5.7~5.8と高い等電点であった。一方、HCC γ -GTP 6例の等電点は症例により異なるものの5.4~6.0を示し、いずれも正常肝や肝硬変肝あるいは非癌部肝の γ -GTPよりも明らかに高値を示した。しかし、ノイラミニダーゼ処理後に等電点をみるとHCC γ -GTPの等電点はいずれも6.0の近傍にあり、大きな変動はみられなかったのに対し、正常肝、

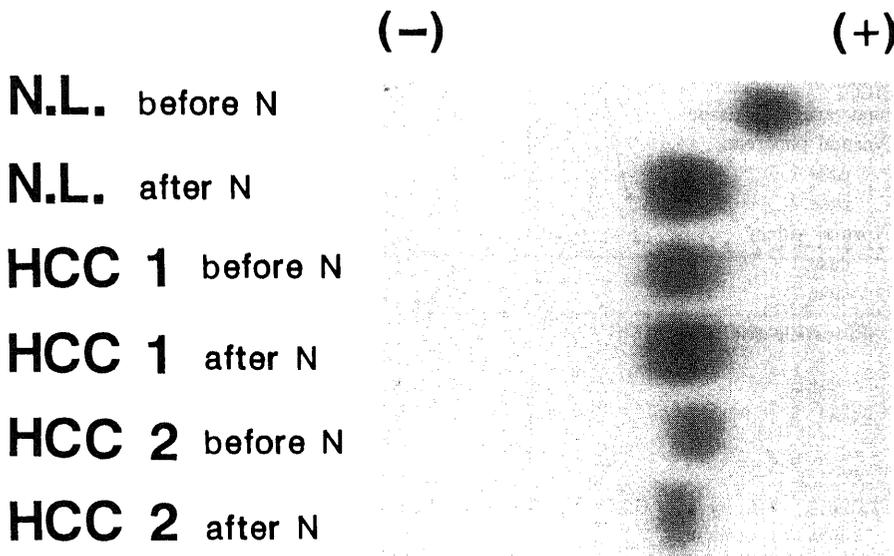


Fig. 2. Electrophoretic patterns of γ -GTPs from normal liver (N. L.) and hepatocellular carcinoma (HCC) before and after neuraminidase treatment (before N and after N) in 8-25% polyacrylamide gradient gel slab.

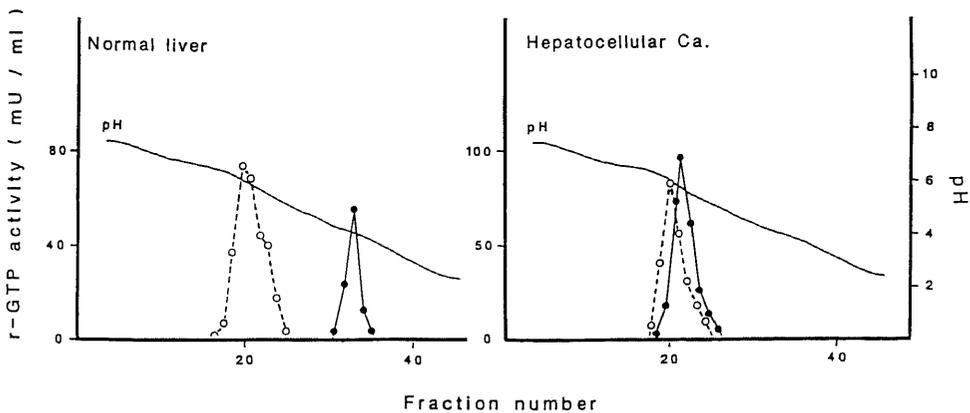


Fig. 3. Electrofocusing column chromatography of γ -GTPs purified from normal liver and hepatocellular carcinoma (Ca). ●—●, before neuraminidase treatment; ○··○, after neuraminidase treatment.

Table 2. Isoelectric Points of γ -GTPs Purified from Various Tissues

Tissue	PI ^a (before neuraminidase treatment)	PI ^a (after neuraminidase treatment)
HCC (cancerous tissue)		
case 1	6.0	6.2
case 2	5.9	6.0
case 3	5.8	6.0
case 4	5.6	5.8
case 5	5.8	6.0
case 6	5.4	5.7
Normal liver		
case 1	4.1	6.7
case 2	4.4	5.9
Cirrhotic liver	4.3	5.9
HCC (non-cancerous tissue)		
	4.0	5.7
Normal pancreas		
case 1	4.0	6.1
case 2	4.0	6.2
Normal kidney		
case 1	5.7	6.1
case 2	5.8	6.1

^aPI=isoelectric pointTable 3. Affinity of γ -GTPs Purified from Various Tissues to Con A- and LCA-Sepharose Column

Tissue	Con A-bound fraction	LCA-bound fraction
HCC (cancerous tissue)		
case 1	95%	49%
case 2	97%	54%
case 3	37%	11%
case 4	49%	10%
case 5	36%	9%
case 6	39%	22%
Normal liver		
case 1	90%	34%
case 2	97%	49%
Cirrhotic liver	84%	21%
HCC (non-cancerous tissue)		
	93%	33%
Normal pancreas		
case 1	78%	17%
case 2	77%	20%
Normal kidney		
case 1	15%	0%
case 1	12%	0%

肝硬変肝, 非癌部肝あるいは正常脾の等電点は6.0近傍に移動し, HCC γ -GTP との等電点の差が殆どみられなくなった. また, 正常腎 γ -GTP の等電点も6.0近傍にあり, HCC γ -GTP と同様にノイラミニダーゼ処理前後で大きな変動はみられなかった.

IV. 各種レクチンに対する親和性の検討

各組織 γ -GTP の Con A カラムに対する結合率をみると, 正常肝, 正常脾および正常腎 γ -GTP の Con

A に対する親和性は表3に示すようにそれぞれかなり異なっていた. 正常肝, 肝硬変肝および HCC の非癌部 γ -GTP は90%前後の高い結合率を示したが, HCC 6例中4例(症例3~6)は50%以下の低い結合率を示した. また, 正常腎もいずれも10%台の低い結合率であった.

次に, LCA カラムに対する親和性をみると(表3), 正常肝, 非癌部 γ -GTP は30~50%の結合率を示した

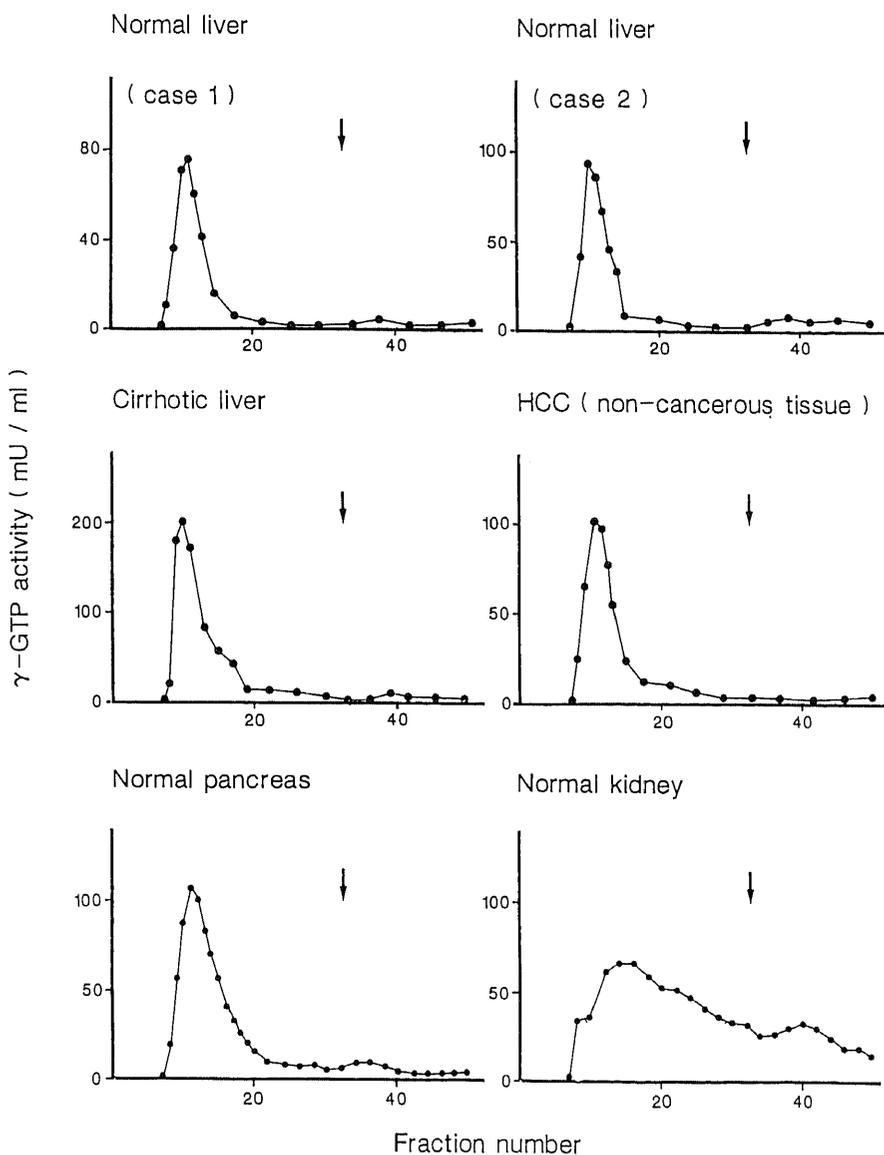


Fig. 4. Affinity chromatography of γ -GTPs purified from normal liver, cirrhotic liver, non-cancerous tissue from a hepatocellular carcinoma (HCC), normal pancreas and normal kidney on an E-PHA agarose column. The arrows (\downarrow) show the points where elution was started with 6.7 mM KH_2PO_4 containing 1.0 M NaCl.

のに対し、HCC γ -GTP は 6 例中 3 例 (症例 3 ~ 5) では 10% 前後の低い結合率であったが、2 例 (症例 1, 2) では 50% 前後の結合率であり、LCA に対する親和性には一定の傾向は見られなかった。また、正常膵 γ -GTP の結合率は 17 ~ 20% と正常肝のそれに比してやや低かったが正常腎 γ -GTP は LCA に対して 2 例とも全く親和性を示さなかった。

正常肝、肝硬変肝、非癌部肝、正常膵、正常腎 γ -GTP の E-PHA アガロースカラムによる溶出像を図 4 に示す。正常肝、肝硬変肝、非癌部肝の γ -GTP はいずれも E-PHA に対してほとんど親和性を示さなかった。これに対し、HCC γ -GTP は図 5 に示すごとく 6 例すべてが E-PHA カラムに結合し、溶出が著しく遅延し、明らかに E-PHA に対し高い親和性を示し

た。また、正常膵 γ -GTP も E-PHA にほとんど結合しなかったが正常腎 γ -GTP は HCC γ -GTP の場合と同様なパターンを呈し高い親和性を有していた。

V. 免疫学的検討

抗体として抗ヒト HCC γ -GTP 抗体あるいは抗ヒト正常腎 γ -GTP 抗体を用い、HCC、正常肝、正常腎、正常膵ならびに肝硬変肝 γ -GTP を用いて免疫拡散法を行い、さらに、 γ -GTP 染色も行い、沈降線を観察した。いずれの場合も図 6 に示すごとく各抗体の間にお互いに完全に融合する 1 本の沈降線を形成し、免疫学的に区別し得なかった。

考 察

種々の実験的肝癌における研究などにより、

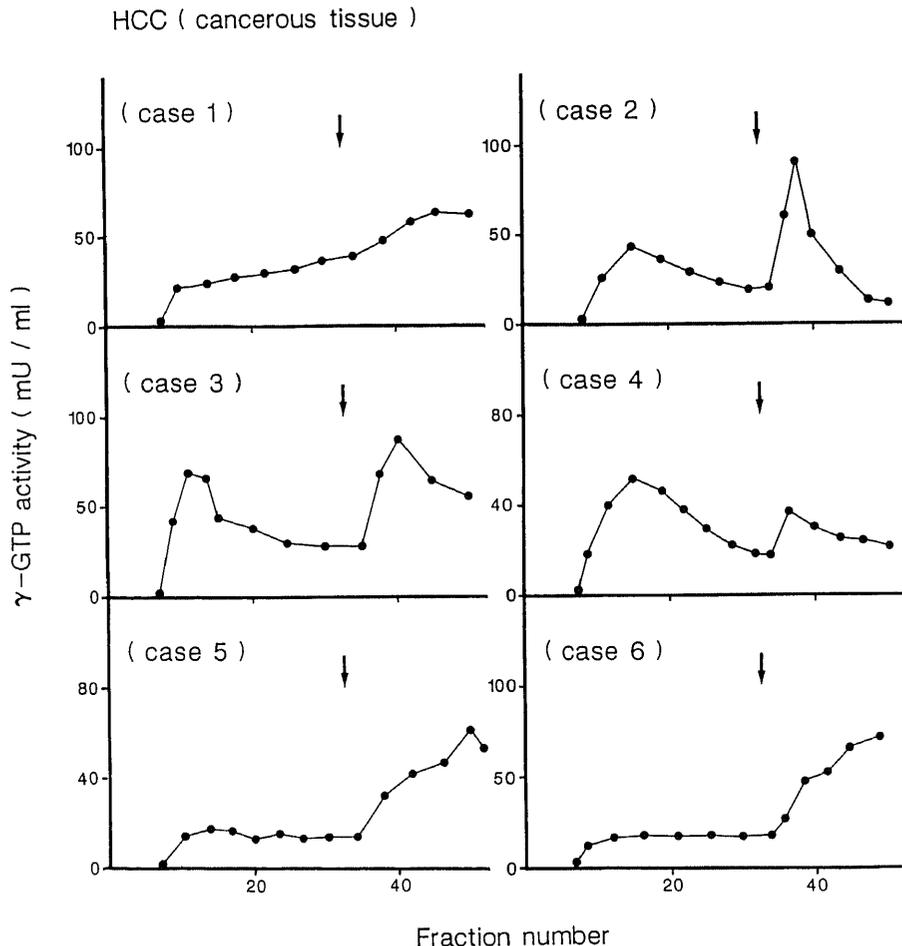


Fig. 5. Affinity chromatography of γ -GTPs purified from hepatocellular carcinoma (HCC) tested on an E-PHA agarose column. The arrows (\downarrow) shows the oints where elution was started with 6.7 mM KH_2PO_4 containing 1.0 M NaCl.

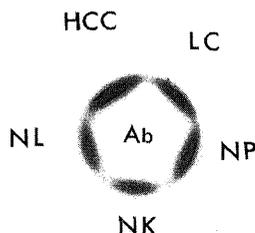


Fig. 6. Double immunodiffusion in agarose gel stained with γ -GTP activity. γ GTPs purified from hepatocellular carcinoma (HCC), normal liver (NL), normal kidney (NK), normal pancreas (NP) and liver cirrhosis (LC) were placed in the peripheral wells. Antibody against γ -GTP purified from hepatocellular carcinoma (Ab) was put in the central well.

γ -GTP は癌胎児性蛋白としての性状を有し、肝の発癌に際して胎児性活性の増加することが示唆されている⁴⁻⁷。また、実験肝癌において増加する γ -GTPと正常肝の γ -GTPにはペプチド部分には差異はないが、糖鎖構造に違いのある可能性が以前より指摘されていた^{10,11}。このような点に注目した Sawabu ら⁹⁻¹⁰はポリアクリルアミドグラディエントゲル電気泳動を用いた臨床的研究より HCC 患者血清中に特異的に発現する γ -GTP の分画を発見し、Novel γ -GTP と呼称している。そして、その特異分画はペプチド部分ではなく、糖鎖部分の違いを反映している可能性を示唆している^{10,11}。また、Shaw ら²⁰はヒトの各種正常組織の γ -GTPにはペプチド部分の構造に殆ど差異はないが、その糖鎖部分で大きく異なっている可能性を推察している。一方、Selvaraj ら²¹はヒト成熟肝、胎児肝および HCC の γ -GTPには構造的に違いはないと報告している。このようにヒトの HCC においてみられる癌性変化の詳細については依然として不明なことが多い。著者はヒト HCC γ -GTP の特異的な変化を明らかにしようとして、HCC γ -GTP を精製し、肝、脾、腎の正常組織や非癌部肝組織の γ -GTP を比較し、その癌性変化について検討した。まず、SDS 電気泳動では HCC γ -GTP と各種正常組織や非癌性肝組織の γ -GTPには分子量やサブユニット組成においては差異はみられなかった。また、既に報告されているが²⁰、本研究においてもポリクロナール抗体による検討では HCC γ -GTP は正常肝などの他の組織の γ -GTP と免疫学的に区別しえなかった。これらのこと

より、HCC γ -GTP は、少なくともペプチド構造において正常肝や他の組織の γ -GTP とは差はないと考えられる。一方、ポリアクリルアミドグラディエントゲル電気泳動による泳動度では γ -GTP は症例により多少差はあるものの6例総てが正常肝や肝硬変肝の γ -GTP より明らかに遅延していた。このような泳動度の差は上述したようにペプチド部分に差異はないことより酵素分子の荷電に影響するシアル酸などの糖鎖構造の差異による可能性が最も考えられる。実際、ノイラミダーゼ処理により HCC γ -GTP と正常肝や肝硬変肝 γ -GTP の泳動度の差は著明に減少した。さらに、HCC γ -GTP の等電点は症例により異なるもののいずれも正常肝や肝硬変肝の γ -GTP の等電点よりも明らかに高く、ノイラミダーゼ処理によりこのような等電点の差はほとんど消失した。Matsuda ら²²はラットの各種 γ -GTP にはいくつかの分画あり、その等電点はシアル酸含有量と平行することを示している。以上のことより HCC γ -GTP は正常肝や非癌性肝組織の γ -GTP に比して、シアル酸の含有量がかなり少ないものと推測される。また、Ohta ら²³は脾癌 γ -GTP は正常脾のそれに比べ、HCC γ -GTP の場合と同様に泳動度が遅く、等電点が高いことよりシアル酸含有量の少ないことを指摘している。このように肝および脾の癌化において発現する γ -GTP の変化には類似したものがあると思われる。

哺乳動物の γ -GTP は高マンノース型と多様な複合型糖鎖から成るアスパラギン結合糖鎖を含む糖蛋白であり²⁴、 γ -GTP の糖鎖構造には特異性あるいは臓器特異が存在すると言われている²⁵。本研究でもヒトの種々の正常組織の γ -GTP をレクチン親和性クロマトグラフィーを用いて比較したところ、正常肝、正常脾および正常腎において γ -GTP の Con A や LCA に対する親和性が各組織で異なっていた。このことは、ヒト γ -GTP の糖鎖構造にも臓器特異性の存在することを示すものであろう。HCC γ -GTP の Con A に対する親和性をみると6例中4例で正常肝や肝硬変肝 γ -GTP に比して明らかに低い結合率を示していた。Con A は高マンノース型糖鎖や β -マンノース残基の C-4 に結合するバイセクティング GlcNAc (bisecting N-acetylglucosamine, bisecting GlcNAc) を有さない2本鎖の複合型糖鎖に親和性があると言われている。一方、詳細は後述するが、HCC γ -GTP ではいずれの症例においてもバイセクティング GlcNAc に親和性を有する E-PHA に対する結合率が増加していることを考慮すると、HCC γ -GTP の Con A に対する親和性の低下はバイセクティング GlcNAc の増加

と関連しているかもしれない。

LCA は 2 本鎖の糖鎖の還元末端のフコースと特異的に反応すると言われている²⁹⁾。HCC の代表的な腫瘍マーカーである α -フェトプロテイン (α -Fetoprotein, AFP) では、良性肝疾患に由来した AFP は LCA に結合しないが、HCC に由来した AFP は LCA に対しては高い親和性を有することより HCC において増加するものはフコシル AFP といわれている²⁹⁾。著者の HCC γ -GTP の LCA に対する結合性を検討した成績では 6 例中 2 例は増加傾向にあり、3 例では低下し、一定の傾向は得られていないので、HCC γ -GTP ではフコシル化した糖鎖が増加するか否かは明らかではない。一方、3 本側鎖および 4 本側鎖の糖鎖は LCA に親和性を示さないと言われているので、HCC γ -GTP の LCA 結合率の低下はこのような糖鎖の変化を反映している可能性も考慮されよう²⁹⁾。

E-PHA の親和性に関して正常肝や肝硬変肝の γ -GTP は E-PHA に対して全く親和性を示さないのに対し HCC γ -GTP は明らかに高い親和性を示した。E-PHA の親和性にバイセクティング GlcNAc が重要であると言われている¹⁷⁾³⁰⁾。Yamashita ら¹⁹⁾はこのバイセクティング GlcNAc はラット正常肝の γ -GTP 糖鎖には全く見いだされませんが、ラット AH-66 腹水肝癌 γ -GTP では全糖鎖の 40% に発現していると報告している。また、Narasimhan ら³¹⁾はラット肝の発癌過程において肝小結節中にバイセクティング GlcNAc の形成の律速酵素である N-アセチルグルコサミントランスフェラーゼ III が強く誘導されるとしている。一方、Yamashita ら²⁹⁾は 1 例のヒト HCC γ -GTP の糖鎖の分析より、意外なことにバイセクティング GlcNAc の増加はみられず、3 本側鎖や 4 本側鎖の複合糖鎖が大量に増加していると報告している。しかし、この成績はただ 1 例のみの検討であり、一般にどの種の悪性腫瘍においても一様に形質発現がみられることはないのので、この成績は結論的とは言えない。著者の成績では HCC γ -GTP は 6 例いずれにおいても、程度の差はあるものの E-PHA に対しては明らかに親和性が増加しており、バイセクティング GlcNAc 残基の増加していることが示唆される。但し、E-PHA の調整時に C-2, -6 外側糖鎖を含むオリゴ糖構造に親和性を有するイソレクチンである L-PHA が混入すれば³⁰⁾、L-PHA は C-2, -6 外側糖鎖を有するオリゴ糖に親和性を有するので E-PHA に混入した L-PHA によりこのような複合糖鎖の反応を見ている可能性も十分ありえると思われる。いずれにしても γ -GTP は非常に異質な糖鎖をもつため、その複雑な構造をレクチンのみで分析する

ことは容易ではないと思われる。それには、HCC γ -GTP の特異な糖鎖構造を認識し得るモノクローナル抗体を開発する必要があるが、糖蛋白の糖鎖部分を認識しうる単クローン抗体を得ることも非常に困難であり、著者らも数回試みているが成功していない。以上のように、HCC γ -GTP は正常肝に比してペプチド構造には差異はなく、種々の糖鎖構造において相違のあることが示唆される。著者の検討でいずれの HCC 症例にも共通してみられる所見として、ポリアクリルアミドグラディエントゲル電気泳動による泳動度は遅く、等電点は明らかに高いが、ノイラミニダーゼ処理後はこれの差異はいずれも殆ど消失する。E-PHA に対しては明らかに親和性が増加している、などが認められる。これらのことからヒト HCC γ -GTP の変化としては、主にシアル酸の含有量の減少とバイセクティング GlcNAc 残基あるいは C-2, -6 外側糖鎖を含むオリゴ糖の増加が指摘できると考えられる。

結 論

癌化にともなうヒト HCC γ -GTP の変化を明らかにする目的で、6 例の HCC 組織より γ -GTP を精製し、同様な方法で精製した正常肝、肝硬変肝、正常脾および正常腎の γ -GTP と比較しながら、その生化学的および免疫学的性状の検討を行い、以下の結論を得た。

1. SDS 電気泳動にて HCC γ -GTP は分子量 26,000 と 63,000 の 2 つのサブユニットに分かれたが、他の正常組織の γ -GTP との間には分子量、組成のいずれにおいても差異はみられなかった。

2. ポリアクリルアミドグラディエントゲル電気泳動では HCC γ -GTP は症例により多少異なるものの 6 例すべてが正常肝や肝硬変肝あるいは正常脾 γ -GTP よりも明らかに泳動度が遅延していた。また、正常腎 γ -GTP は HCC γ -GTP と同様に正常肝や肝硬変肝あるいは正常脾の γ -GTP よりも明らかに泳動度が遅延していた。ノイラミニダーゼ処理後の泳動では HCC γ -GTP や正常腎 γ -GTP の泳動度はほとんど変化しなかったのに対し、正常肝や肝硬変肝の γ -GTP の泳動度は著しく遅くなり HCC γ -GTP との差は非常に小さくなった。

3. 正常肝、肝硬変肝、HCC の非癌部および正常脾の γ -GTP の等電点はそれぞれ、4.0~4.3 であったが、HCC γ -GTP 6 例の等電点は症例により異なるものの 5.4~6.0 を示し、いずれも正常肝、肝硬変肝、非癌部肝あるいは正常脾 γ -GTP の等電点よりも明らかに高値を示した。また、正常腎 γ -GTP も 5.7~5.8 の高い等電点を示した。ノイラミニダーゼ処理後の

HCC および正常腎の γ -GTPの等電点はいずれも6.0の近傍にあり大きな変動はみられなかったのに対し、正常肝、肝硬変肝、非癌部肝あるいは正常膵の等電点は6.0の近傍に移動し、HCC γ -GTPの等電点との差は殆どみられなくなった。

4. 各種レクチンに対する親和性についてみると、正常肝、肝硬変肝およびHCCの非癌部 γ -GTPはCon Aに対し90%前後の高い親和性を示したが、HCC 6例中4例は50%以下の、また、正常腎も10%台の低い結合率であった。LCAに対し正常肝、非癌部肝 γ -GTPは30~50%の結合率を示したのに対し、HCC γ -GTPは6例中3例で10%の低い結合率であったが、2例では50%前後の結合率であり、一定の傾向は見られなかった。正常膵 γ -GTPの結合率は17~20%と正常肝のそれに比してやや低く、正常腎 γ -GTPはLCAに対して全く親和性を示さなかった。

E-PHAに対しては正常肝、肝硬変肝、非癌部肝および正常膵の γ -GTPはいずれも殆ど親和性を示さなかったが、HCC γ -GTPは6例中全てが高い親和性を示した。また、正常腎 γ -GTPもHCC γ -GTPと同様に高い親和性を示した。

5. 抗ヒト腎 γ -GTP抗体を用いた検討ではHCC γ -GTPは、正常肝などの他の組織の γ -GTPとは免疫学的に区別し得なかった。

以上のことより、HCC γ -GTPは正常肝 γ -GTPとペプチド構造に差異はなく、主にシアル酸の含有量の減少とバイセクティングGlcNAc残基あるいはC-2,-6外側糖鎖を含むオリゴ糖の増加などの糖鎖構造において相違のあるものと推定される。

謝 辞

稿を終るにあたり御指導、御検閲を賜った恩師澤武紀雄教授に深甚なる謝意を捧げます。また、御支援いただいた金沢大学第一内科服部信前教授ならびに小林健一教授に深謝の意を表します。研究遂行にあたり終始御協力いただいた金沢大学がん研究所内科太田英樹博士に深く謝意を表します。さらに、御協力いただいた金沢大学がん研究所内科五味由希子女史ならびに小谷博子女史をはじめとした教室員各位に謝意を表します。

なお、本論文の要旨の一部は第46回日本癌学会(1987年9月)および第6回International Conference on Human Tumor Markers(1989年5月)において発表した。

本研究は文部省科学研究補助金一般研究(C)課題番号(59570297)、がん特別研究課題番号(01010058)および昭和62年度北国がん基金の補助を受けたもので、付記して謝意を表す。

文 献

1) Meister, A., Tate, S. S. & Griffith, O. W. :

γ -glutamyltranspeptidase. *Methods Enzymol.*, **77**, 237-253 (1981).

2) Fiala, S. & Fiala, A. E. : Activation by chemical carcinogens of γ -glutamyl transpeptidase in rat and mouse liver. *J. Natl. Cancer Inst.*, **51**, 151-158 (1973).

3) Fiala, S., Fiala, A. E. & Dixon, B. : γ -Glutamyltranspeptidase in transplantable, chemically induced rat hepatomas and spontaneous mouse hepatomas. *J. Natl. Cancer Inst.*, **48**, 1393-1401 (1972).

4) Kalengayi, M. M. R., Ronchi, G. & Desmet, V. J. : Histochemistry of gamma-glutamyl transpeptidase in rat liver during aflatoxin B induced carcinogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.*, **55**, 579-582 (1975).

5) Cameron, R., Kellen, J., Kolin, A., Malkin, A. & Farber, E. : γ -Glutamyltransferase in putative premalignant liver cell populations during hepatocarcinogenesis. *Cancer Res.*, **38**, 823-829 (1978).

6) Albert, Z., Rzuclido, Z. & Starzyk, H. : Comparative biochemical and histochemical studies on the activity of gammaglutamyltranspeptidase in the organs of fetuses, newborns and adult rats. *Acta Histochem.*, **37**, 34-39, (1970).

7) W. Bornschein. : Isoenzyme der Alaninamylamidase und Gamma-glutamyltranspeptidase bei chronischer Pankreatitis und Pankreasneoplasma. *Clin. Chim. Acta*, **61**, 325-333 (1975).

8) Sawabu, N., Nakagen, M., Yoneda, M., Makino, H., Kameda, D., Kobayashi, K., Hattori, N. & Ishii, M. : Novel γ -glutamyltranspeptidase isoenzyme specifically found in sera of patients with hepatocellular carcinoma. *Gann*, **69**, 601-605 (1978).

9) Sawabu, N., Nakagen, M., Ozaki, K., Wakabayashi, T., Toya, D., Hattori, N. & Ishii, M. : Clinical evaluation of specific γ -GTP isoenzyme in patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer*, **51**, 327-331 (1983).

10) Sawabu, N., Toya, D., Ozaki, K., Wakabayashi, T., Makagen, M. & Hattori, N. : Clinical value and some properties of novel γ -glutamyltranspeptidase isoenzyme specific to sera of hepatocellular carcinoma. A. Makita, S. Tsuiki, S. Fujii & L. Warren, (eds.). *Monograph on Cancer Research No29*, 1st ed. p291-298, Japan Scientific

Societie Press, Tokyo, 1983.

- 11) **Toya, D., Sawabu, N., Ozaki, K., Wakabayashi, T., Nakagen, M. & Hattori, N.:** Purification of γ -glutamyltranspeptidase from human hepatocellular carcinoma and comparison of γ -GTP with the enzyme from human kidney. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **417**, 86-96 (1983).
- 12) **Yamashita, K., Hitoi, A., Taniguchi, N., Yokosawa, N., Tsukada, Y. & Kobata, A.:** Comparative study of the sugar chains of γ -glutamyltranspeptidase purified from rat liver and rat AH-66 hepatoma cells. *Cancer Res.*, **43**, 5059-5063 (1983).
- 13) **Tamaoki, H., Minato, S., Takei, S. & Fujisawa, K.:** A clinical method for the determination of serum gamma-glutamyltranspeptidase. *Clin. Chim. Acta*, **65**, 21-27 (1975).
- 14) **Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J.:** Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951).
- 15) **Orlowski, M. & Meister, A.:** Isolation of γ -glutamyltranspeptidase from hog kidney. *J. Biol. Chem.*, **240**, 338-347 (1965).
- 16) **Weber, K. & Osborn, M.:** The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406-4412 (1969).
- 17) **Hitoi, A., Yamashita, K., Ohkawa, J. & Kobata, A.:** Application of a phaseolus vulgaris erythroagglutinating lectin agarose column for the specific detection of human hepatoma γ -glutamyltranspeptidase in serum. *Gann*, **78**, 301-304 (1984).
- 18) **Tsuchida, S., Hoshino, K., Sato, T., Ito, N. & Sato, K.:** Purification of γ -glutamyltransferases from rat hepatomas and hyperplastic hepatic nodules and comparison with the enzyme from rat kidney. *Cancer Res.*, **39**, 4200-4205 (1979).
- 19) **Yokosawa, N., Taniguchi, N., Tukada, Y. & Makita, A.:** Physicochemical and immunochemical characterization of γ -glutamyltranspeptidase from yolk sac tumor and ascitic hepatoma (AH-66) cells. *Oncodev. Biol. Med.* **2**, 165-177 (1981).
- 20) **Shaw, L. M., Peterson-Archer, L., London, J. W. & Marsh, E.:** Electrophoretic, kinetic and immunoinhibition properties of γ -glutamyltransferase from various tissues compared. *Clin. Chem.*, **26**, 1523-1527 (1980).
- 21) **Selvaraj, P. & Balasubramanian, K. A.:** Comparative structural and lectin-binding studies on γ -glutamyltransferase from human adult liver, fetal liver and primary hepatoma. *Eur. J. Biochem.*, **153**, 485-490 (1985).
- 22) **Matsuda, Y., Tsuji, A. & Katamura, N.:** Studies on the structure of γ -glutamyltranspeptidase. *J. Biochem.*, **87**, 1243-1248 (1980).
- 23) **Ohta, H., Sawabu, N., Odani, H., Kawakami, H., Watanabe, H., Toya, D., Ozaki, K. & Hattori, N.:** Characterization of γ -glutamyltranspeptidase from human pancreatic cancer. *Pancreas*, **5**, 82-90 (1990).
- 24) **Yamashita, K., Hitoi, A., Matsuda, Y., Tsuji, A., Katunura, N. & Kobata, A.:** Structural studies of the carbohydrate moieties of rat kidney γ -glutamyltranspeptidase. *J. Biol. Chem.*, **258**, 1098-1107 (1983).
- 25) **Yamashita, K., Hitoi, A., Tateishi, N., Higashi, T., Sakamoto, Y. & Kobata, A.:** Organ-specific difference in the sugar chains of γ -glutamyltranspeptidase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **993-996** (1983).
- 26) **Aoyagi, Y., Suzuki, Y., Isemura, M., Soga, K., Ozaki, T., Ichida, T., Inoue, K., Sasaki, H. & Ichida, F.:** Differential reactivity of α -fetoprotein with lectins and evaluation of its usefulness in the diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Gann*, **75**, 809-815 (1984).
- 27) **Kornfeld, K., Reitman, M. L. & Kornfeld, R.:** The carbohydrate binding specificity of pea and lentil lectins. *J. Biol. Chem.*, **256**, 6633-6640 (1981).
- 28) **Aoyagi, Y., Isemura, M., Yoshizawa, Z., Suzuki, Y., Sekine, C. Ono, T. & Ichida, F.:** Fucosylation of serum α -fetoprotein in patients with primary hepatocellular carcinoma. *Biochim. Biophys. Acta*, **830**, 217-223 (1985).
- 29) **Yamashita, K., Totani, K., Iwai, Y., Takamisawa, I., Takeishi, N., Higashi, T., Sakamoto, Y. & Kabata, A.:** Comparative study of the sugar chains of γ -glutamyltranspeptidase purified from human hepatocellular carcinoma and from human liver. *J. Biochem.*, **105**, 728-735 (1989).
- 30) **Cummings, R. D. & Kornfeld, S.:** Character-

ization of the structural determinants required for the high affinity interaction of asparagine-linked oligosaccharides with immobilized phaseolus vulgaris leucoagglutinating and erythroagglutinating lectins. *J. Biol. Chem.*, **257**, 11230-11234 (1982).

31) Narasimhan, S., Schachter, H. & Rajalakshmi, S.: Expression of N-acetylglucosaminyltransferase III in hepatic nodules during rat liver carcinogenesis promoted by orotic acid. *J. Biol. Chem.*, **263**, 1273-1281 (1988).

Characterization of γ -Glutamyltranspeptidase from Hepatocellular Carcinoma and Comparison with Those from Normal Liver, Cirrhotic Liver and other Tissues Kenji Ozaki, The Department of Internal Medicine, Cancer Research Institute, Kanazawa 920—J. *Juzen Med Soc.*, **100**, 665—677 (1991)

Key words hepatocellular carcinoma, gamma-glutamyltranspeptidase, carbohydrate moieties, sialic acid, lectin affinity

Abstract

We examined the alteration of human liver γ -glutamyltranspeptidase (γ -GTP) which appears to occur during the process of malignant transformation. γ -GTP was purified from six Hepatocellular carcinoma (HCC) tissues, and their properties were compared with the enzymes purified from a normal liver, cirrhotic liver and other tissues. Sodium sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis showed the purified enzyme consisted of heavy and light sub-units and there were no significant differences in molecular weight or sub-unit composition among the enzymes from all sources. However, on polyacrylamide gradient gel electrophoresis, all six HCC γ -GTPs showed slower electrophoretic mobilities than the enzymes from non-cancerous liver tissue. After neuraminidase treatment, the mobility of HCC γ -GTPs was virtually unchanged, while that of the non-cancerous liver tissue enzymes was markedly reduced. This difference in electrophoretic mobility was rendered inconspicuous after neuraminidase treatment of γ -GTPs. Isoelectric points of HCC γ -GTPs were variable, but in all cases were higher than those of the non-cancerous liver tissue enzymes. The difference in isoelectric points between HCC γ -GTP and non-cancerous liver tissue γ -GTPs became insignificant after neuraminidase treatment of γ -GTPs. The carbohydrate moieties of γ -GTP were examined using lectin affinity chromatography. The affinity to Lens culinaris agglutinin (LCA), HCC γ -GTPs was very variable. On the other hand, four of the six HCC γ -GTPs had a lower binding affinity for the concanavalin A (Con A) column compared with γ -GTPs purified from non-cancerous liver tissues. γ -GTPs from non-cancerous liver tissue showed a very low affinity for Phaseolus vulgaris erythroagglutinin (E-PHA), but all six HCC γ -GTPs had a much stronger affinity to E-PHA. These results indicate that the transformational changes of HCC γ -GTP are mainly induced in the sugar chains of enzyme molecules, such as lower sialic acid contents, and higher contents of bisecting N-acetylglucosamine (GlcNAc) residue or oligosaccharides containing C-2, -6 branched outer chains.