

Experimental Study on Properties of Gamma-Glutamyltranspeptidase from Pancreatic Cancer

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/2297/7951

膵癌 gamma-glutamyltranspeptidase の性状に関する研究

金沢大学がん研究所内科部門 (主任: 澤武紀雄教授)

太 田 英 樹

(昭和62年3月26日受付)

膵の gamma-glutamyltranspeptidase (γ -GTP)が癌化に伴ってどのような質的变化を発現するかを明らかにする目的で、膵癌組織より γ -GTP を精製し、同様な方法で精製した正常膵などの他の組織の γ -GTP と比較しながら、膵癌 γ -GTP の各種性状を検討した。正常膵2例、膵癌5例、正常肝1例、肝細胞癌2例および正常腎1例の各組織を材料とし、デオキシコール酸塩とトリトン X-100 で可溶化後、アセトンとブロメリン処理により抽出し、DEAE-Sepharose fast flow, Phenyl-Sepharose CL-4B および MonoQ HR 5/5 を用いたカラムクロマトグラフィーを行い、 γ -GTP を分離精製した。抗腎 γ -GTP 抗体を用いた免疫学的検討では、膵癌 γ -GTP は正常膵、正常肝、肝細胞癌および正常腎の γ -GTP との間に抗原性の差は認められなかった。膵癌 γ -GTP の電気泳動度は、5例中4例で肝細胞癌 γ -GTP と同様に、正常組織の γ -GTP に比して明らかに遅れていた。膵癌 γ -GTP の等電点は、症例により異なるものの、肝細胞癌 γ -GTP と同様にいずれも正常組織の γ -GTP に比して高かった。このような癌組織と正常組織の γ -GTP の等電点の差はノイラミニダーゼ処理により小さくなった。各種レクチンの親和性カラムクロマトグラフィーによる分析では、膵癌 γ -GTP の concanavalin A (Con A) に対する親和性は、5例中2例で正常膵 γ -GTP のそれより増加していた。膵癌 γ -GTP の Lens culinaris agglutinin (LCA) に対する親和性は、5例中4例で正常膵 γ -GTP より明らかに増加しており、このような性状は肝細胞癌 γ -GTP においても明らかに認められた。また、正常膵や正常肝の γ -GTP は Phaseolus vulgaris erythroagglutinating (E-PHA) に対して殆ど親和性を示さないのに比して、膵癌 γ -GTP の E-PHA に対する親和性は5例中2例で明らかに増加し、他の1例でもその傾向が認められた。また、肝細胞癌 γ -GTP でも、E-PHA に対する親和性は明らかに増加していた。以上の成績より、膵癌 γ -GTP では正常膵 γ -GTP に比較して、シアル酸含量の減少、フコースと bisecting N-アセチルグルコサミン (bisecting N-acetylglucosamine, bisecting GlcNAc) 残基数の増加など、糖鎖構造において質的变化の発現していることが示唆される。また、それは肝細胞癌 γ -GTP にみられる癌性変化と類似した点を有するものと推察される。

Key words pancreatic cancer, gamma-glutamyltranspeptidase, sugar chain, hepatocellular carcinoma

gamma-glutamyltranspeptidase (γ -GTP) は哺乳動物の種々の臓器に広く分布し、膜結合酵素として存在するが¹⁾、各種の実験的研究より、癌胎児性蛋白に類した性格も有することが示唆されている²⁾⁻⁵⁾。実際、ラットの個体発生における肝の γ -GTP 活性は、胎児期に最も高く、生後急激に下降し、成熟肝ではその活

性はきわめて低くなる²⁾。一方、各種のラット実験肝癌の発癌過程では、前癌性病変ともみなされている酵素変異巣や過形性結節の時期において、すでに高度な γ -GTP 活性の増加がみられ、癌化が進行するに従い、活性が著明になることが知られている³⁾⁻⁵⁾。このような点に注目した臨床的研究により、ヒト肝細胞癌患者血

Abbreviations: AFP, α -fetoprotein; Con A, concanavalin A; E-PHA, Phaseolus vulgaris erythroagglutinating; FPLC, fast protein liquid chromatography; γ -GTP, gamma-glutamyltranspeptidase; GlcNAc, N-acetylglucosamine; LCA, Lens culinaris agglutinin; PBS, phosphate-buffered saline.

清中に特異的に出現する Novel γ -GTP が発見されるなど^{9)~11)}、従来、 γ -GTP の癌性変化に関しては、専ら、肝癌を中心として研究がなされてきた。

一方、肝癌では γ -GTP 活性の高いことは知られているものの⁹⁾¹⁰⁾、癌 γ -GTP が癌化に伴ってどのような質的变化を発現するかは明らかにされていない。このような点を明らかにするため、肝癌組織より γ -GTP を精製し、同様な方法で精製した正常脾、正常肝、肝細胞癌および正常腎の γ -GTP と比較しながら、肝癌 γ -GTP の各種性状を検討した。

対象および方法

I. 対 象

金沢大学がん研究所内科およびその関連施設において、手術あるいは剖検により得た正常脾 2 例、肝癌 5 例、正常肝 1 例、肝細胞癌 2 例および正常腎 1 例を実験材料とし、実験まで -70°C に凍結保存した。なお、肝癌 5 例中 3 例 (症例 1, 4, 5) は肝癌原発部位を、他の 2 例 (症例 2, 3) は肝転移部位を材料として用いた。

II. γ -GTP 活性の測定

γ -GTP 活性は Tate ら¹¹⁾の方法に従って測定し、 37°C において γ -L-glutamyl-p-nitroanilide から 1 分間に $1\ \mu\text{mol}$ の p-nitroaniline を生ずるときの力価を 1 単位とした。また、蛋白量の測定は Lowry 法に従った¹²⁾。

III. γ -GTP の精製

表 1 に示すごとく、 γ -GTP の抽出は Orlowski ら¹³⁾の方法に準じて行った。まず、組織を 3 倍量の $0.08\ \text{M}$ MgCl_2 溶液にてホモジナイズし、 $1\ \text{N}$ NaOH で pH 10 に調整後、 37°C 、2 時間インキュベーションした。その後、 $25,000\times\text{g}$ 、40 分間の冷凍遠心により膜成分を含む沈渣を得、これを 1.5% デオキシコール酸ナトリウムと 5% トリトン X-100 を含む $0.1\ \text{M}$ Tris HCl 緩衝液 (pH 8.0) 中で 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脱塩後、 -15°C 下で 2 倍量のアセトンを加えて脱脂した。その沈澱物を $0.1\ \text{M}$ Tris HCl 緩衝液 (pH 8.0) でホモジナイズ後、脱塩し、プロメリン ($1\ \text{mg}/15\ \text{mg}$ protein) と 2-メルカプトエタノール ($5\ \mu\text{l}$) を加え、 37°C 、60 分間消化した。

このようにして可溶化した γ -GTP を含む試料を DEAE-Sepharose fast flow (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden) のカラム ($2.5\times 10\ \text{cm}$) を用いて $0.01\ \text{M}$ Tris HCl 緩衝液 (pH 8.0) 中で NaCl 濃度を $0\ \text{M}$ から $0.5\ \text{M}$ まで連続的に変化させ、イオン交換クロマトグラフィーを行った。溶出さ

せた有活性分画を回収後、 $1.0\ \text{M}$ 硫酸アンモニウムを含む $0.01\ \text{M}$ リン酸塩緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline, PBS, pH 6.8) で平衡化した Phenyl-Sepharose CL-4B (Pharmacia) のカラム ($2.5\times 10\ \text{cm}$) を用いてハイドロフォービッククロマトグラフィーを行った。溶出液には 50% エチレングリコールを含む PBS を用い、 0% から 100% まで連続的勾配で溶出した。最後に、その溶出した有活性分画を $0.01\ \text{M}$ Tris HCl 緩衝液 (pH 8.0) で調整後、Pharmacia 製の高速液体クロマトグラフィー装置 Fast protein liquid chromatography (FPLC) system のもとで、MonoQ HR 5/5 (Pharmacia) を用いて、前述した DEAE-Sepharose fast flow と同じ条件でイオン交換クロマトグラフィーを行い、 γ -GTP を分離精製した。

IV. ゲル電気泳動法

電気泳動は Pharmacia 製の電気泳動装置 Phast system を用いて行った。8~25% のポリアクリルアミドグラディエントゲル (Pharmacia) を支持体とし、まず、 $10\ \text{mA}$ の定電流で 5 分間泳動後、試料を添加し、 $1\ \text{mA}$ 5 分間、ついで $6\ \text{mA}$ 70 分間の本泳動を行った。泳動後、澤武ら⁷⁾の方法により γ -GTP 染色を行った。

V. 各種レクチン親和性カラムクロマトグラフィー

レクチンとしては、concanavalin A (Con A), Lens culinaris agglutinin (LCA) および Phaseolus vulgaris erythroagglutinating (E-PHA) を用いて検討した。Con A-Sepharose (Pharmacia) のカラム ($0.8\times 15\ \text{cm}$) と LCA-Sepharose 4B (Pharmacia) のカラム ($0.8\times 15\ \text{cm}$) には、いずれの場合も $0.01\ \text{M}$ MgCl_2 、 $0.01\ \text{M}$ MnCl_2 、 $0.01\ \text{M}$ CaCl_2 および $0.5\ \text{M}$ NaCl を溶解した $0.05\ \text{M}$ Tris HCl 緩衝液 (pH 7.5) 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 $0.2\ \text{M}$ メチル- α -D-マンノピラノシド (E·Y Laboratories Inc., San Mateo, U.S.A.) 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-Agarose (E·Y) のカラム ($0.8\times 15\ \text{cm}$) には、 $0.15\ \text{M}$ NaCl を含む $6.7\ \text{mM}$ リン酸緩衝液 (pH 7.4) で平衡化し、溶出液には $1.0\ \text{M}$ NaCl を含む $6.7\ \text{mM}$ リン酸緩衝液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、カラムの溶出速度はいずれのレクチンの場合も $12\ \text{ml}/\text{hr}$ とし、 $1.0\ \text{ml}$ ずつ分画採取した。

VI. エレクトロフォーカシングカラムクロマトグラフィー

FPLC system のもとで MonoP HR 5/20 (Pharmacia) を用い、 $0.02\ \text{M}$ Tris HCl 緩衝液 (pH 7.5) で平衡化した。溶出液にはポリバッファー PB 74 (Pharmacia) とファルマライト 2.5-5

(Pharmacia) を3対1で混合し、10倍希釈したもの(HClでpH 2.5に調整)を使用した。溶出液はpH 7.5からpH 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、2.0 M NaClを含む0.02 M Tris HCl緩衝液(pH 7.5)を加え、等電点の2.5以下のものを溶出させた。

VII. ノイラミナーゼ処理

ノイラミナーゼ処理は試料のpHを0.2 M 酢酸緩衝液(pH 3.0)で5.0に調整後、 γ -GTP活性70 mUに対し、0.1 M 酢酸緩衝液(pH 5.0)に溶解したArthrobacter ureafaciensノイラミナーゼ(半井化学, 京都)を50 mU加え、37°C, 16時間反応させた¹⁴⁾。

VIII. 免疫学的検討

分離精製したヒト腎 γ -GTPを抗ヒト全血清を結合させたCNBr-活性化Sephacryl 4B (Pharmacia)によるネガティブアフィニティクロマトグラフィーを行い、夾雑蛋白を除去した。これをFreund's complete

adjuvant (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¹⁵⁾。この抗血清をDEAE-Sephacryl fast flow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抗体を用いてOuchterlony法を行った。さらに、既述の方法⁷⁾により γ -GTP活性染色をして、沈降線を確認した。

成 績

I. 正常膵, 膵癌, 正常肝, 肝細胞癌および正常腎の γ -GTPの精製

膵癌 γ -GTPの精製過程は表1に示すごとくであり、最終段階での比活性は816 mU/mg proteinで、デオキシコール酸塩とトリトンX-100で可溶化した段階と比較して、精製倍率は995倍、収率は13%であった。一方、正常膵, 正常肝, 肝細胞癌および正常腎から精製した γ -GTPの比活性と収率はそれぞれ804 mU/mg proteinと14%, 1230 mU/mg proteinと

Table 1. Purification profile of γ -GTP from pancreatic cancer.

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	1,300	130,936	108 × 10 ³	0.82	1	100
Acetone precipitation	1,000	4,484	63.0 × 10 ³	14.0	17	58
Bromelain treatment	1,000	2,114	50.0 × 10 ³	23.7	29	46
Chromatography on DEAE-Sephacryl fast flow	440	352.0	27.0 × 10 ³	78.8	96	26
Chromatography on Phenyl-Sephacryl CL-4B	400	40.0	23.6 × 10 ³	590	720	23
Chromatography on MonoQ HR 5/5	18	17.6	14.4 × 10 ³	816	995	13

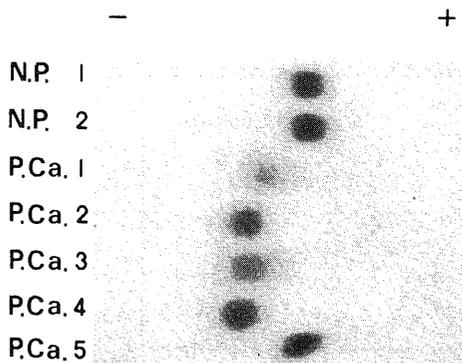


Fig. 1. Electrophoretic pattern of the purified γ -GTP fractions using 8-25% polyacrylamide gradient gel slab. Case 1 (N.P. 1) and case 2 (N.P. 2) of normal pancreas, and case 1 (P.Ca. 1), case 2 (P.Ca. 2), case 3 (P.Ca. 3), case 4 (P.Ca. 4) and case 5 (P.Ca. 5) of pancreatic cancers.

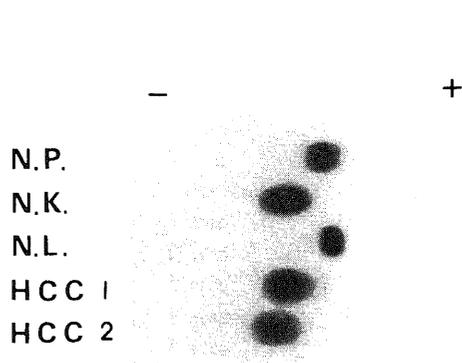


Fig. 2. Electrophoretic pattern of the purified γ -GTP fractions using 8-25% polyacrylamide gradient gel slab. Normal pancreas (N.P.), normal kidney (N.K.), normal liver (N.L.), and case 1 (HCC 1) and case 2 (HCC 2) of hepatocellular carcinomas.

12%, 2270 mU/mg protein と 11%, 4884 mU/mg protein と 14%であった。

II. 電気泳動度

8~25%のポリアクリルアミドグラディエントゲル電気泳動では、図1、図2に示すごとく、各組織より精製した γ -GTPはいずれも単一の活性帯に泳動された。正常膵 γ -GTPの2例と膵癌 γ -GTPの5例中1例(症例5)はほぼ等しい泳動度を示したが、他の膵癌 γ -GTPの4例(症例1, 2, 3, 4)は正常膵 γ -GTPに比して明らかに遅い泳動度を示した。ただし、その4例中2例(症例2, 4)の泳動度はほぼ一致し、最も遅れたが、他の2例(症例1, 3)は前2者よりやや陽極寄りの位置に泳動された。一方、正常肝 γ -GTPは正常膵 γ -GTPと同様に最も陽極寄りにほぼ一致した位置に泳動されたが、肝細胞癌 γ -GTPの2例と正常腎 γ -GTPは正常膵 γ -GTPより遅い泳動度を示し、肝細胞癌 γ -GTPの2例中1例(症例1)は正常腎 γ -GTPとほぼ同じ位置に、他の1例(症例2)はそれよりやや遅い位置に泳動された。

III. 各種レクチン親和性カラムクロマトグラフィーによる検討

1. Con A に対する親和性

正常膵 γ -GTPの2例のCon A結合率はそれぞれ78%, 77%であったのに対し、膵癌 γ -GTPのCon A結合率は5例中3例(症例1, 2, 4)がそれぞれ77%, 78%, 78%と正常膵 γ -GTPと等しかったが、他の2例(症例3, 5)はそれぞれ89%, 99%と高値を示した。また、正常肝 γ -GTPのCon A結合率は90%

であったのに対し、肝細胞癌 γ -GTPの2例はそれぞれ95%, 97%とやや高いCon A結合率を示した。一方、正常腎 γ -GTPは15%と低いCon A結合率を示した(表2)。

このように、Con Aの場合、正常の各臓器間で親和性にかかなりの差異がみられた。また、膵癌 γ -GTPでは5例中3例は正常膵 γ -GTPと同様のCon A結合率を示したが、他の2例では結合率が増加し、Con Aに対する親和性の高くなっている可能性が示唆された。

2. LCA に対する親和性

正常膵 γ -GTPの2例はそれぞれ17%, 20%のLCA結合率を示すのに比較し、膵癌 γ -GTPでは5例中4例(症例1, 3, 4, 5)が30%以上の高いLCA結合率を示した(表2)。また、正常肝 γ -GTPは34%のLCA結合率を示すのに比較し、肝細胞癌 γ -GTPの2例はいずれも50%前後の高いLCA結合率を示した。一方、正常腎 γ -GTPのLCA結合率は0%でLCAカラムに結合しなかった。

以上のごとく、膵癌 γ -GTPは肝細胞癌 γ -GTPと同様に、多くの場合LCAに対して親和性の増加するものと考えられた。

3. E-PHA に対する親和性

図3および図4は各組織 γ -GTPのE-PHA親和性カラムクロマトグラフィーのパターンを示す。正常膵 γ -GTPと正常肝 γ -GTPはどちらもノイラミニダーゼ処理に関係なく、E-PHAカラムを素通りし、E-PHAに対して殆ど親和性を示さなかった。一方、膵癌 γ -GTPでは5例中2例(症例2, 4)がE-PHAに対

Table 2. Affinity of γ -GTPs purified from normal pancreas, pancreatic cancer, normal liver, hepatocellular carcinoma and normal kidney to Con A-and LCA-Sepharose column.

Tissue	Con A-bound fraction	LCA-bound fraction
Normal pancreas		
case 1	78 %	17 %
case 2	77 %	20 %
Pancreatic Ca.		
case 1	77 %	37 %
case 2	78 %	11 %
case 3	89 %	31 %
case 4	78 %	37 %
case 5	99 %	47 %
Normal liver	90 %	34 %
Hepatocellular Ca.		
case 1	95 %	49 %
case 2	97 %	54 %
Normal kidney	15 %	0 %

し親和性を有し、その溶出の遅れるパターンを示した。また、他の1例(症例5)ではその溶出の遅延は軽度であったが、1.0 M NaClを含む溶出液で小さなピークを示すことより、正常膵 γ -GTP に比して E-PHA

に対する親和性の増加している傾向が示唆された。このような溶出の遅延するパターンは肝細胞癌 γ -GTP の2例と正常腎 γ -GTP においてより明瞭であり、その遅延パターンは肝細胞癌 γ -GTP で最も著明であつ

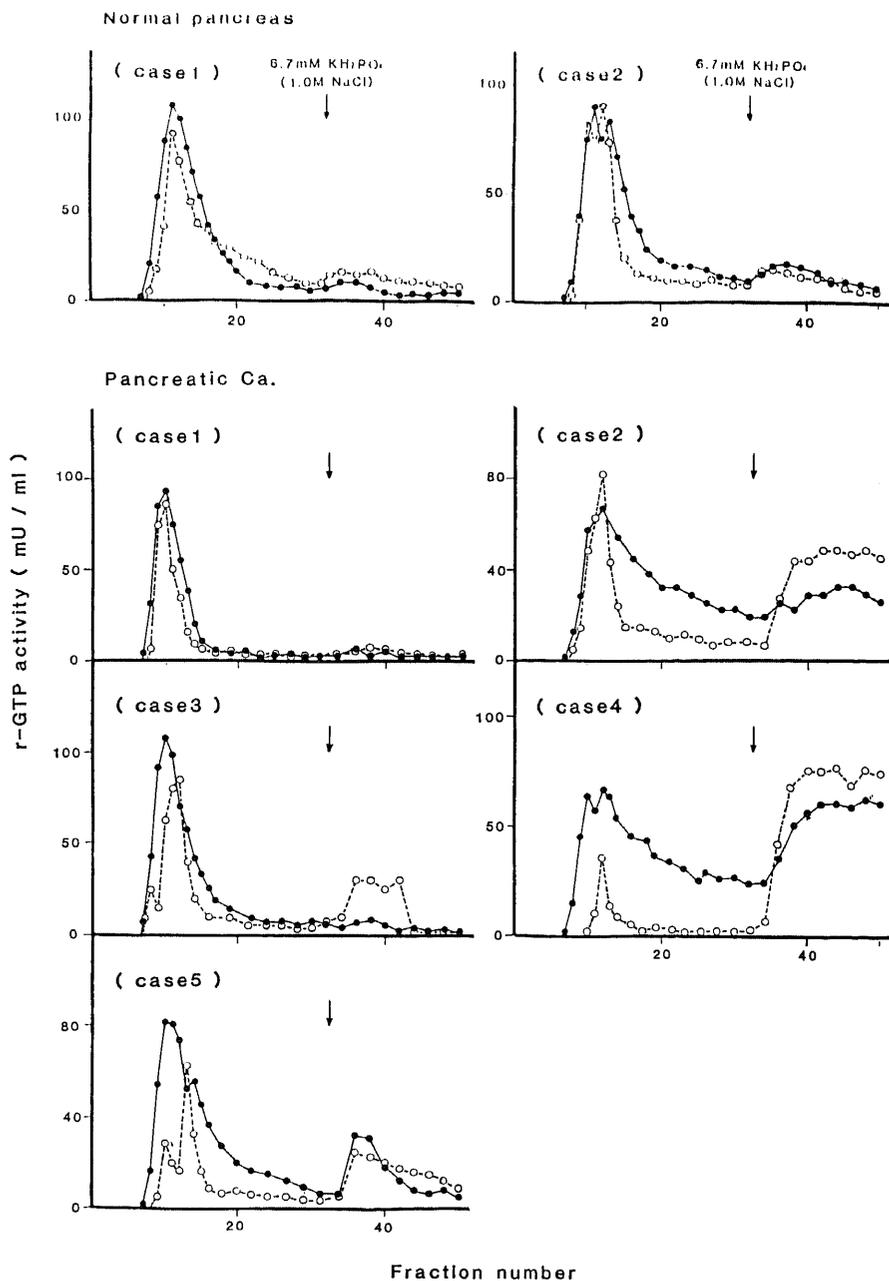


Fig. 3. Affinity chromatography of γ -GTPs purified from normal pancreas (case 1,2) and pancreatic cancers (case 1,2,3,4,5) on an E-PHA agarose column. The arrows show where elution was begun with 6.7 mM KH_2PO_4 , 1.0 M NaCl. ●—●, γ -GTP without neuraminidase treatment; ○····○, γ -GTP with neuraminidase treatment.

た。

ノイラミニダーゼ処理後、膀胱癌、肝細胞癌および正常腎の γ -GTP では、一般にフラクション11にピークを有する素通り分画と 1.0 M NaCl を含む溶出液で溶出される分画により明瞭に分かれ、多分に後者の分画の増量するパターンが認められた。さらに、ノイラミニダーゼ処理前は溶出の遅延の認められなかった膀胱癌 γ -GTP (症例3) においても、ノイラミニダーゼ処理後では 1.0 M NaCl を含む溶出液添加後に小さなピークを示した。これは、シアル酸を除くと E-PHA に対し親和性を有する部分が露出し、E-PHA に対する親和性がより明瞭になったためと思われる。

III. 等電点の検討

図5に各組織 γ -GTP のノイラミニダーゼ処理前後におけるエレクトロフォーカシングクロマトグラフによる溶出像を示す。これより求めた各組織 γ -GTP の等電点は表3に示すごとくである。正常膵 γ -GTP 2例の等電点はいずれも 4.0 であった。一方、膵

癌 γ -GTP の等電点は症例により異なっているものの、いずれも正常膵 γ -GTP に比して高値であり、膵癌 γ -GTP と正常膵 γ -GTP の間には等電点にかなりの差異がみられた。正常肝 γ -GTP と肝細胞癌 γ -GTP についてみても、前述の膵の場合と同様、肝細胞癌 γ -GTP の等電点は正常肝 γ -GTP のそれより高値であり、くわえて膵癌 γ -GTP に比しても高い等電点を有した。

ノイラミニダーゼ処理後では、各組織 γ -GTP の等電点の多くは 6.0 から 6.2 の間に移動し、各臓器間あるいは癌組織と正常組織の間の等電点の差は殆どみられなくなった。しかし、膵癌 γ -GTP では 5 例中 2 例 (症例 1, 5) がそれぞれ 5.2, 5.6 と比較的低い等電点を示し、ノイラミニダーゼ処理後も膵癌 γ -GTP の等電点には軽度な不均一性がみられた。

IV. 免疫学的検討

図6に抗体として抗ヒト腎 γ -GTP 抗体を、抗原として正常膵、膵癌、正常肝、肝細胞癌および正常腎の

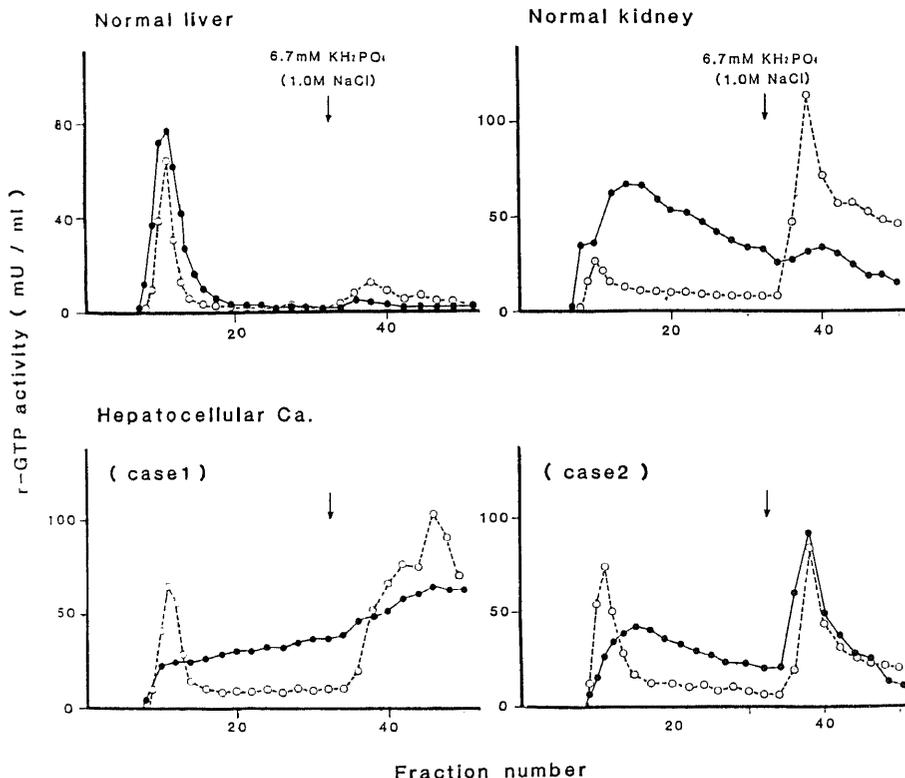


Fig. 4. Affinity chromatography of γ -GTPs purified from normal liver, normal kidney and hepatocellular carcinomas (case 1,2) on an E-PHA agarose column. The arrows show where elution was begun with 6.7 mM KH_2PO_4 , 1.0 M NaCl. ●—●, γ -GTP without neuraminidase treatment; ○····○, γ -GTP with neuraminidase treatment.

γ -GTPを用いて Ouchterlony法を行い、さらに γ -GTP 染色した像を示す。各抗原は抗ヒト腎 γ -GTP 抗体との間に互いに完全に融合する 1本の沈降線を形成しているのが認められ、免疫学的に区別し得なかった。

考 察

γ -GTPは各種のラット実験肝癌などの研究より、癌胎児性蛋白に類した性格を有することが示唆され、癌化に伴う本酵素の動態が注目されてきた^{2)~5)}。実際、ヒト肝細胞癌における γ -GTP に注目した澤武ら^{6)~8)}

の臨床的研究により、ヒト肝細胞癌患者血清中に特異的に出現する活性帯が見出され、Novel γ -GTP と称して報告されている。さらに、本アイソエンザイムは他の活性帯と各種レクテンやノイラミニダーゼに対する反応性などにおいて異なっているが、酵素的性質やポリクローナル抗体による免疫学的性状において区別し得ないことなどより、 γ -GTPの癌性変化は蛋白部分ではなく糖鎖部分に起こっている可能性が示唆されている⁸⁾¹⁵⁾¹⁶⁾。また、山下ら¹⁷⁾はラットにおいてであるが、腹水肝癌 AH-66 とラット正常肝由来の γ -GTP の

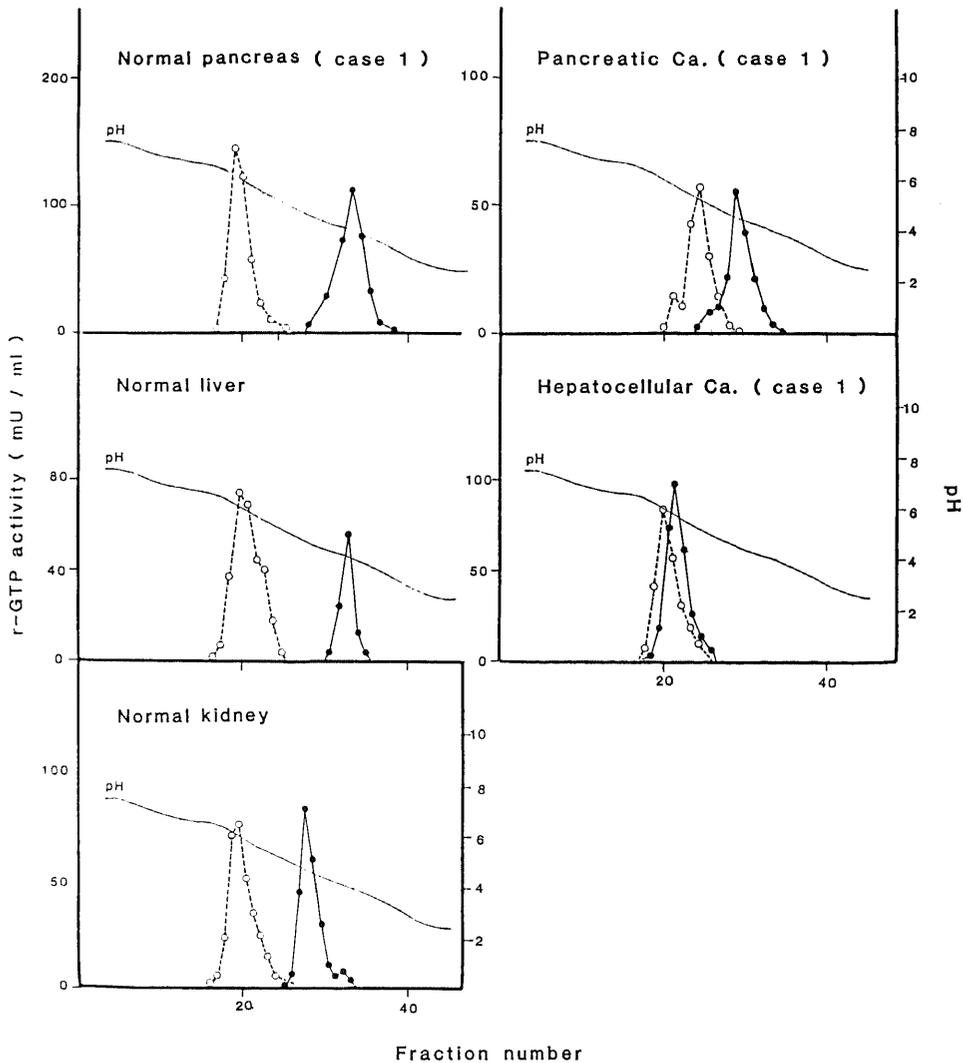


Fig. 5. Electrofocusing column chromatography of γ -GTPs purified from normal pancreas (case 1), pancreatic cancer (case 1), normal liver, hepatocellular carcinoma (case 1) and normal kidney. ●—●, γ -GTP without neuraminidase treatment; ○····○, γ -GTP with neuraminidase treatment.

Table 3. Isoelectric points of γ -GTPs purified from normal pancreas, pancreatic cancer, normal liver, hepatocellular carcinoma and normal kidney.

Tissue	pI (before neuraminidase treatment)	pI (after neuraminidase treatment)
Normal pancreas		
case 1	4.0	6.1
case 2	4.0	6.2
Pancreatic Ca.		
case 1	4.3	5.2
case 2	5.9	6.0
case 3	4.9	6.0
case 4	4.5	6.2
case 5	4.1	5.6
Normal liver	4.1	6.0
Hepatocellular Ca.		
case 1	6.0	6.2
case 2	5.8	6.0
Normal kidney	4.7	6.1

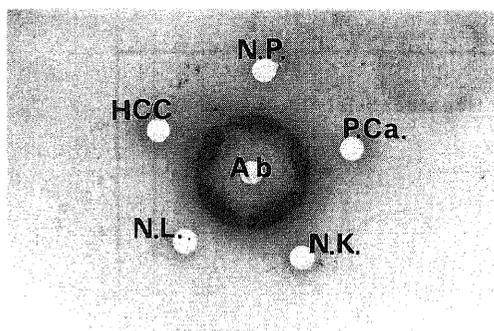


Fig. 6. Double immunodiffusion in agarose gel stained with γ -GTP activity. γ -GTPs purified from normal pancreas (N.P.), pancreatic cancer (P.Ca.), normal liver (N.L.), hepatocellular carcinoma (HCC) and normal kidney (N.K.). Antibody against γ -GTP purified from normal kidney (Ab).

糖鎖構造を比較研究し、その糖鎖の癌性変化を具体的に明らかにしている。このように、従来 γ -GTP の癌性変化については、専ら肝癌を中心として研究されてきた。

一方、膵においても γ -GTP 活性の高いことが知られている⁹⁾¹⁰⁾が、膵癌の γ -GTP について検討した研究は山口ら¹⁸⁾の報告以外にはない。それによると、正常膵 γ -GTP と膵癌 γ -GTP の間で分子量、等電点、Con A や LCA に対する反応性などの各種性状に明らかな差異は認められなかったとし、膵 γ -GTP の癌性変化に

対しては否定的な報告がなされている。著者はこのような点を明らかにするため、各種分画法を用いて膵癌から γ -GTP を精製し、同様な方法で精製した正常膵、正常肝、肝細胞癌および正常腎の γ -GTP と比較しながら、各種性状について検討を試みた。一般に酵素である γ -GTP の性状を論じる場合には、基質に対する Km 値、至適 pH、各種金属イオンによる影響、各種アミノ酸のアクセプターとしての反応、耐熱性などの物理化学的性状についても検討すべきであろう。しかし、正常の各種組織の γ -GTP あるいは肝癌の γ -GTP の性格を検討した従来の報告をみると、いずれも酵素学的性格には差異はなく、肝癌の γ -GTP では糖鎖部分の偏倚を示唆する成績が報告されている⁹⁾¹⁵⁾¹⁶⁾。このような点を考慮して、本研究では主として糖鎖部分の変化を反映する各種レクチンに対する反応、電気泳動度や等電点の変化などを中心として検討を試みたわけである。

まず、家兔に免疫して作製した抗ヒト腎 γ -GTP 抗体を用いて Ouchterlony 法によりその免疫学的検討を行ったところ、膵癌 γ -GTP は正常膵や他の組織の γ -GTP と免疫学的に共通の抗原性を有しており、ポリクローナル抗体で検索する限りでは、膵癌 γ -GTP には従来、報告されている肝細胞癌 γ -GTP⁹⁾¹⁵⁾と同様に、免疫学的に特異な性状は認められない。

電気泳動度についてみると、膵癌 γ -GTP の泳動度は症例により多少異なるものの、5 例中 4 例で正常膵 γ -GTP に比較して明らかに遅い泳動度を示した。ま

た、肝細胞癌 γ -GTP も正常肝 γ -GTP に比して明らかに泳動度が遅れており、肝癌 γ -GTP と肝細胞癌 γ -GTP はいずれも同様な方向性を有する変化を示している。電気泳動におけるこのような γ -GTP の泳動度の差異には、まず、本酵素の荷電に影響を与えるシアル酸などの糖鎖構造の変化が関与している可能性が問題になる。実際に、各組織の γ -GTP の等電点を比較してみると、正常膵 γ -GTP と正常肝 γ -GTP の等電点はどちらも 4.0 前後であり、一方、肝癌 γ -GTP と肝細胞癌 γ -GTP の等電点は症例により異なるものの、それぞれ正常膵 γ -GTP と正常肝 γ -GTP に比して高い等電点を有していた。さらに、ノイラミナーゼ処理によりシアル酸を除去すると、癌組織と正常組織の γ -GTP の等電点の差が小さくなることより、肝癌 γ -GTP および肝細胞癌 γ -GTP は正常組織の γ -GTP に比してシアル酸含量の少なくなっていることが推測される。このことはラット腹水肝癌 AH-66 で産生される γ -GTP ではその酸性糖鎖が増加し、正常に比して等電点の低くなっているというラットにおける成績¹⁷⁾と対照的であり興味深い。

γ -GTP の糖鎖構造に関しては、正常の哺乳動物ではアスパラギン結合糖鎖で高マンノース型糖鎖と多様な複合型糖鎖からなることが明らかにされている¹⁹⁾²⁰⁾。そこで各組織より分離精製した γ -GTP の糖鎖構造の質的差異をみるために、各種レクチン親和性カラムクロマトグラフィーによる検討を行った。

Con A の場合、高マンノース型糖鎖や β マンノース残基の C-4 に結合した N-アセチルグルコサミン (bisecting N-acetylglucosamine, bisecting GlcNAc) を有さない 2 本鎖の複合型糖鎖に親和性のあることが知られている²¹⁾。今回の成績では、各臓器間で Con A 親和性にかなりの差異がみられたことより、 γ -GTP の糖鎖構造には臓器特異性のあるように思われる。また、肝癌 γ -GTP では一部の症例で正常膵 γ -GTP に比して Con A 結合率の増加がみられており、肝癌 γ -GTP では Con A 親和性に関与する糖鎖に癌性変化の発現している可能性が示唆される。

LCA は 2 本側鎖の糖鎖の還元末端のフコースと特異的に反応することが知られており²²⁾、肝細胞癌の典型的な腫瘍マーカーである α -fetoprotein (AFP) の LCA 結合性を検討した成績によると、肝硬変では LCA 非結合分画が大部分を占めるが、肝細胞癌では LCA 結合分画の増加している場合が多いことより、癌化に伴って fucosylated AFP の増加することが推測されている²³⁾²⁴⁾。著者の γ -GTP における LCA 親和性の検討では、正常膵 γ -GTP の LCA 結合率は 20% 以下であるのに対し、肝癌 γ -GTP では 5 例中 4 例が

30%以上の LCA 結合率を示し、また、肝細胞癌 γ -GTP も同様に LCA 結合率が増加するという成績が得られた。このことより、肝癌 γ -GTP および肝細胞癌 γ -GTP では、癌化に伴いその糖鎖の fucosylation が肝細胞癌の AFP でみられるのと同様に増加しているものと思われる。

E-PHA に関しては、bisecting GlcNAc 残基のあることおよび Gal β 1 \rightarrow 4 GlcNAc β 1 \rightarrow 2 Man α 1 \rightarrow 6 グループが置換されていないことが E-PHA に対する親和性において重要であるといわれている²⁵⁾²⁶⁾。この bisecting GlcNAc 残基はラット正常肝の γ -GTP では一切認められないが、ラット AH-66 腹水肝癌の γ -GTP では糖鎖の 40% に出現している¹⁷⁾ことや、ヒト肝細胞癌患者血清の γ -GTP をノイラミナーゼ処理後、E-PHA 親和性クロマトグラフィーを行うと、遅延した溶出像を示すことなどが報告されている¹⁴⁾。著者の成績でも、正常膵 γ -GTP や正常肝 γ -GTP はノイラミナーゼ処理に関係なく E-PHA カラムを素通りし殆ど親和性を示さないのに対し、肝細胞癌 γ -GTP では 2 例ともにその溶出が大きく遅れた。このような溶出の遅延するパターンは、肝癌 γ -GTP の 5 例中 2 例で明らかに、他の 1 例でもその傾向が認められた。さらに、肝癌 γ -GTP と肝細胞癌 γ -GTP のいずれにおいても、ノイラミナーゼ処理により、Gal β 1 \rightarrow 4 GlcNAc β 1 \rightarrow 2 Man α 1 \rightarrow 6 の側鎖に結合したシアル酸がとれ、E-PHA に対する親和性が強くなり、1.0 M NaCl を含む溶出液で溶出される分画の増加するパターンが認められた。このように、肝癌 γ -GTP においても肝細胞癌 γ -GTP と同様に bisecting GlcNAc 残基数の増加している可能性が示唆されよう。

以上のように、肝癌 γ -GTP は正常膵 γ -GTP に比較して種々の糖鎖構造において相違のあることが示唆され、その差異は肝細胞癌 γ -GTP の糖鎖においてみられる癌性変化と類似した点を有している。このような成績は、これまでの肝細胞癌 γ -GTP に関する研究からみてある程度予想されることであるが、未だ、報告されていない。今回、肝癌 γ -GTP において、著者が始めてその癌性変化の一端を明らかにしたものといえよう。肝細胞癌 γ -GTP においてもどのような糖鎖構造が特異的なのかは未だ具体的に明らかではないが、今後、肝癌 γ -GTP についても糖鎖構造を詳細に解析し、それを具体的に明らかにする必要がある。

ところで、その機序は不明であるが、肝癌や膵炎などの各種膵疾患では各種肝疾患のように γ -GTP 活性は血中に反映されないの、肝癌 γ -GTP の変化が肝細胞癌 γ -GTP における Novel γ -GTP^{6)~8)} のように血中で把握されることは期待できないように思われ

る。しかし、膵は本来、外分泌臓器でもあり、膵液中へ各種成分を積極的に分泌するため、膵の病的状態が増加する物質は血中より膵液中へ流出され易く、膵液でより鋭敏に膵の異常を反映する場合の多いことが予想される。実際、膵液中では膵に由来する γ -GTP 活性がみられており、膵液中の γ -GTP を分析すればその癌性変化を腫瘍マーカーとしてとらえることが可能かもしれない。さらに、このような γ -GTP の特異的糖鎖構造に対するモノクローナル抗体が開発されるならば、免疫画像診断やいわゆるターゲティング治療法などにも応用し得ることも期待できよう。

結 論

膵における γ -GTP の癌性変化を解明するため、膵癌組織より γ -GTP を精製し、同様な方法で精製した正常膵、正常肝、肝細胞癌および正常腎の γ -GTP と比較しながら、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. 膵癌 γ -GTP はポリクローナル抗体を用いた免疫学的検討では、正常膵、正常肝、肝細胞癌および正常腎の γ -GTP との間に抗原性の差は認められなかった。

2. 膵癌 γ -GTP の電気泳動度は、5例中4例で正常膵 γ -GTP に比して明らかに遅れていた。同様の性状は肝細胞癌 γ -GTP においても認められた。

3. 膵癌 γ -GTP の等電点は、症例により異なるものの肝細胞癌 γ -GTP と同様にいずれも正常に比して高かった。ノイラミナーゼ処理後はいずれも癌組織と正常組織の γ -GTP の等電点の差が小さくなることより、癌組織 γ -GTP は正常組織 γ -GTP に比してシアル酸含量の少ないことが推測された。

4. 膵癌 γ -GTP の Con A に対する親和性は、5例中2例で正常膵 γ -GTP のそれより増加していた。

5. 膵癌 γ -GTP の LCA に対する親和性は、5例中4例で正常膵 γ -GTP のそれより増加していた。この傾向は肝細胞癌 γ -GTP においても認められ、これらでは fucosylation の増加していることが示唆された。

6. 膵癌 γ -GTP の E-PHA に対する親和性の増加は、5例中2例で明らかに、他の1例でもその傾向が認められた。また、肝細胞癌 γ -GTP 2例においても E-PHA に対する親和性は明らかに増加していた。

以上より、膵癌 γ -GTP は正常膵 γ -GTP に比してシアル酸含量の減少、フコースと bisecting GlcNAc 残基数の増加などの糖鎖構造の変化を起している可能性が示唆され、これは肝細胞癌 γ -GTP にみられる変化と類似した点を有するものと推察された。

謝 辞

稿を終るにあたり御指導、御校閲を賜った澤武紀雄教授に深甚なる謝意を表します。また、研究遂行にあたり御支援いただいた医学部第一内科服部信教授に心から深謝いたします。更に御協力いただいた小谷博子女史をはじめ教職員各位に謝意を表します。

文 献

- 1) Meister, A., Tate, S. S. & Griffith, O. W.: γ -Glutamyltranspeptidase. *Methods in Enzymol.*, 77, 237-253 (1981).
- 2) Albert, Z., Rzcudlo, Z. & Starzyk, H.: Comparative biochemical and histochemical studies on the activity of γ -GTP in the organs of fetus, newborns and adult rats. *Acta histochem.*, 37, 34-39 (1970).
- 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 B₁ induced carcinogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.*, 55, 579-582 (1975).
- 5) Cameron, R., Kallen, J., Kolin, A., Malkin, A. & Farber, E.: γ -Glutamyltransferase in putative premalignant liver cell populations during hepatocarcinogenesis. *Cancer Res.*, 38, 823-829 (1978).
- 6) Sawabu, N., Nakagen, M., Yoneda, M., Makino, H., Kameda, S., Kobayashi, K., Hattori, N. & Ishii, M.: Novel γ -GTP isoenzyme specifically found in sera of patients with hepatocellular carcinoma. *Gann*, 69, 601-605 (1978).
- 7) 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).
- 8) Sawabu, N., Toya, D., Ozaki, K., Wakabayashi, T., Nakagen, M. & Hattori, N.: Clinical value and some properties of novel γ -GTP isoenzyme specific to sera of hepatocellular carcinoma. In A. Makita, S. Tsuiki, S. Fujii & L. Warren (eds.), *Gann Monograph on Cancer Re-*

search No. 29, 1st ed. p.291-298, Japan Scientific Societies Press, Tokyo, 1983.

9) Masuike, M., Ogawa, M., Kosaki, G., Minamiura, N. & Yamamoto, T.: Purification and characterization of gamma-glutamyltranspeptidase from human pancreas. *Enzyme*, **27**, 163-170 (1982).

10) Yamaguchi, N., Sugimoto, M. & Kawai, K.: Two types of human pancreatic gamma-glutamyltranspeptidase. *Clin. Chim. Acta*, **147**, 75-83 (1985).

11) Tate, S. S. & Meister, A.: Identity of maleate-stimulated glutaminase with γ -glutamyl transpeptidase in rat kidney. *J. Biol. Chem.*, **250**, 4619-4627 (1975).

12) Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951).

13) Orłowski, M. & Meister, A.: Isolation of γ -glutamyl transpeptidase from hog kidney. *J. Biol. Chem.*, **240**, 338-347 (1965).

14) 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 -glutamyl transpeptidase in serum. *Gann*, **75**, 301-304, (1984).

15) Toya, D., Sawabu, N., Ozaki, K., Wakabayashi, T., Nakagen, M. & Hattori, N.: Purification of γ -glutamyltranspeptidase from human hepatocellular carcinoma, and comparison with the enzyme from human kidney. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **417**, 86-96 (1983).

16) Selvaraj, P. & Balasubramanian, K. A.: Soluble forms of γ -glutamyltransferase in human adult liver, fetal liver, primary hepatoma compared. *Clin. Chem.*, **29**, 90-95 (1983).

17) 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).

18) Yamaguchi, N., Sugimoto, M. & Kawai, K.:

Characterization of gamma-glutamyltranspeptidase from human exocrine pancreatic carcinomas. *Clin. Chim. Acta*, **149**, 47-54 (1985).

19) Yamashita, K., Hitoi, A., Matsuda, Y., Tsuji, A., Katunuma, N. & Kobata, A.: Structural studies of the carbohydrate moieties of rat kidney γ -glutamyltranspeptidase. *Cancer Res.*, **258**, 1098-1107 (1983).

20) 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.*, **225**, 993-996 (1983).

21) Ogata, S., Muramatsu, T. & Kobata, A.: Fractionation of glycopeptides by affinity column chromatography on concanavalin A-Sepharose. *J. Biochem.*, **78**, 687-696 (1975).

22) Kornfeld, K., Reitman, M. L. & Kornfeld, R.: The carbohydrate-binding specificity of pea and lentil lectins. *J. Biol. Chem.*, **256**, 6633-6640 (1981).

23) 宮崎 純, 遠藤康夫, 織田敏次: Crossed immuno-affino-electrophoresis による α -フェトプロテインのレクチン親和性の分析. *肝臓*, **22**, 1559-1568 (1981).

24) 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).

25) Cummings, R. D. & Kornfeld, S.: Characterization 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).

26) Yamashita, K., Hitoi, A. & Kobata, A.: Structural determinants of phaseolus vulgaris erythroagglutinating lectin for oligosaccharides. *J. Biol. Chem.*, **258**, 14753-14755 (1983).

Experimental Study on Properties of Gamma-Glutamyltranspeptidase from Pancreatic Cancer Hideki Ohta, Department of Internal Medicine, Cancer Research Institute, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med. Soc., **96**, 537—548 (1987)

Key words : pancreatic cancer, gamma-glutamyltranspeptidase, sugar chain, hepatocellular carcinoma

Abstract

To elucidate the specific changes of pancreatic gamma-glutamyltranspeptidase (γ -GTP) associated with malignant transformation, some properties of γ -GTP purified from pancreatic cancer were compared with those of γ -GTPs from normal pancreas and other tissues. γ -GTPs were solubilized by sodium deoxycholate and Triton X-100 from five specimens of pancreatic cancer, two of normal pancreas, two of hepatocellular carcinoma and one each of normal liver and normal kidney. After acetone and bromelain treatment, γ -GTPs were separated by DEAE-Sepharose fast flow, Phenyl-Sepharose CL-4B and MonoQ HR 5/5 column chromatography. In the double diffusion test using the antibody against γ -GTP purified from normal kidney, the pancreatic cancer γ -GTP was immunologically identical to the γ -GTPs from normal pancreas, normal liver, hepatocellular carcinoma and normal kidney. Four of five pancreatic cancer as well as hepatocellular carcinoma γ -GTPs showed distinctly slower electrophoretic mobility than the normal enzymes. Isoelectric points of pancreatic cancer as well as hepatocellular carcinoma γ -GTPs varied in each case, but all of them were higher than those of the normal enzymes. This difference in isoelectric points of γ -GTPs between cancerous tissue and normal tissue was reduced by neuraminidase treatment. Lectin affinity chromatography revealed two of five pancreatic cancer γ -GTPs with greater affinity to concanavalin A (Con A) than normal pancreas γ -GTPs. Four of five pancreatic cancer γ -GTPs had a greater affinity to Lens culinaris agglutinin (LCA) than normal pancreas γ -GTPs. This property was also found in hepatocellular carcinoma γ -GTPs. Normal pancreas and normal liver γ -GTPs had little affinity to Phaseolus vulgaris erythroagglutinating (E-PHA), but two of five pancreatic cancer γ -GTPs had an apparent affinity to E-PHA and the one other had a slight affinity to E-PHA. Furthermore, hepatocellular carcinoma γ -GTPs had also an apparent affinity to E-PHA. These results indicate that the transformational changes of pancreatic cancer γ -GTP are mainly induced in the sugar chains of the enzyme molecules such as lower content of sialic acid and higher content of fucose and bisecting N-acetylglucosamine (GlcNAc) residue as compared to the normal pancreatic enzyme. These changes seem to be similar to the associated malignant transformation in hepatocellular carcinoma γ -GTP.