

ヒト胃癌高度関連抗原とその精製

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/2297/8933

ヒト胃癌高度関連抗原とその精製

金沢大学がん研究所病態生理部 (主任: 倉田自章教授)

程 明

(昭和56年8月6日受付)

Key words human gastric cancer, immunology, nonspecific cross-reacting antigen, tumor-associated antigen

腫瘍の免疫学的診断と治療には腫瘍細胞に特異的なマーカーの存在することが前提になるから、各種の癌についてその存在を求めた研究が数多く行われている。ヒト胃癌についてはCEA (carcinoembryonic antigen) のような癌関連抗原以外に、いくつかの糖蛋白性抗原が見いだされているが¹⁾⁻⁶⁾、それらには胃癌細胞との関連に問題のあるものが多く、胃癌に高度関連した抗原についてまだ研究の余地が多く残されている。筆者はヒト胃癌組織について免疫化学的な分析を行い、いわゆる nonspecific cross-reacting antigen (NCA)⁷⁾ と交叉反応性基を持ちながら胃癌に関連性の高い1抗原 (GCAA) の存在を明らかにし、その分離・精製を行ったのでここに報告する。

材料と方法

I 組織

剖検または手術で得られた原発性胃腺癌7例 (GC1-7) を使用したが、そのうち非常に小さな3例 (GC1-3) はプールし、GCmix として使用した。正常成人臓器や他種の癌は剖検時入手された。胎児臓器はいずれも5-6か月目の中絶胎児より得たものである。各組織は死後3-8時間以内に -20°C に保存された。

II 抗原と抗血清

1) Pfr と抗 Pfr 抗血清

GC 4 (湿量 104 g) から倉田及び協同研究者ら⁸⁾⁻¹⁰⁾の方法に従ってPfrを作製した。ついで、抗ヒト全血清家免抗血清のIg分画(硫酸アンモニウム33%飽和による)をBio-gel P-300に2mg/mlに結合させたものによりbatch法で吸収を行い¹¹⁾、Pfr中に混在する血清

成分を除去した。抗ヒト全血清家免抗血清は、ヒト血清1mlを等量の Freund complete adjuvant (FCA) で乳化して成熟家兎足趾と背部皮下数か所に分割注射し、1か月後から10日間隔で3回同組成の注射を背部皮下に行い、10日後に全採血して作製した。

血清成分をbatch法により吸収除去したPfr溶液(冷室でpervaporationにより1.8 mg/mlに濃縮)を1回1ml、FCA 1mlで乳化して成熟家兎の足趾・背部皮下に分割注射し、3週間後から10日間隔で4回背部皮下に同様の注射を追加し、10日後に全採血し、血清を -20°C に保存した。抗血清1mlあたり正常胃3M-KCl抽出液(後述)0.5ml、正常血清0.5mlを加え、 37°C 1時間、 4°C 1夜静置後、10,000 g 30分冷却遠心(以下遠心はすべて10,000 g 冷却遠心)して上清をとり、硫酸アンモニウム33%飽和によるIg分画を分離し、透析後もとの血清量またはその1/2量に生理食塩水で溶解したものを「吸収抗GC-Pfr抗血清」として使用した。一部の実験にはさらに抗血清1mlあたり粗NCA標品(後述)0.5mlによる吸収を加えた抗血清またはそのIg分画を使用した。

2) 3M-KCl 抽出液

胃癌、各種の癌、正常成人及び胎児臓器から作製した。組織1g(湿量)に3M-KClを含む磷酸緩衝液(以下PB)、0.01 M, pH 7.2, 2mlを加え、Polytron PCU-2 (Kinematica GmbH, Switzerland) を使用してhomogenateを作り、 4°C 16時間攪拌後、遠心60分の上清を0.01 M-PB, pH 7.2, に対し48時間冷室で透析した。外液は12時間ごとに交換した。透析後遠心30分の上清を使用時まで -20°C に保存した。

Demonstration and Isolation of an Antigen Highly Associated with Human Gastric Cancer. **Ming Cheng**, Department of Pathophysiology (Director: Prof. Y. Kurata), Cancer Research Institute, Kanazawa University.

3) 胃癌高度関連抗原 (GCAA) の精製

GC 7 の 3M-KCl 抽出液を攪拌しながら、過塩素酸 (PCA) を滴下して最終濃度 0.6 M とし、室温 30 分攪拌後遠心 30 分の上清をとり、0.01 M-PB, pH 7.2, に対し 48 時間冷室で透析後, pervaporation または凍結乾燥で濃縮し、トリス塩酸緩衝液 (以下 TB), 0.005 M, pH 8.0, で再透析する。

DEAE-Sephacel クロマトグラフィー: カラム 40 × 1.5 cm. 0.005 M, pH 8.0, の TB で平衡化した後上記透析資料をのせ、同緩衝液で十分洗浄し、150 ml の

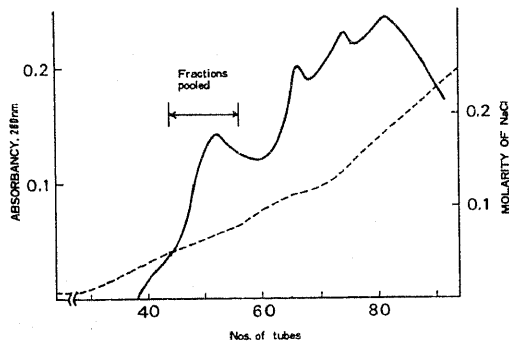


Fig. 1. DEAE-Sephacel chromatography of 0.6 M perchloric acid extract prepared from 3M-KCl extract of the gastric cancer. The fraction size was 4ml. The major activity of GCAA was detectable in fractions 44 to 56.

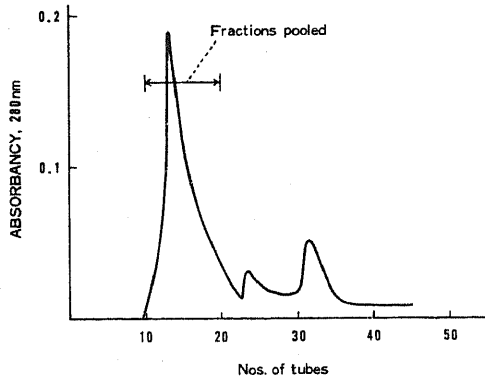


Fig. 2. Sephadex G-150 chromatography of the GCAA-containing fraction obtained from the DEAE-Sephacel column. The fraction size was 4ml. GCAA activity was recovered in fractions 10 to 20.

0.005 M, pH 8.0, の TB と 150 ml の 0.25 M NaCl - 0.005 M, pH 8.0, TB とでイオン強度 gradient を作って溶出した。280 nm の吸光度を測定して溶出曲線を作り (図 1), NaCl 0.05-0.075 M の間の溶出物をプールして濃縮し、つぎの操作にうつす。

Sephadex G-150 クロマトグラフィー: カラム 85 × 1.5 cm. 0.1 M-PB で流速 10 ml/h として溶出し (図 2), 第 1 ピークを濃縮して以下の操作にうつす。

Sephacryl S-200 クロマトグラフィー: カラム 40 × 1 cm. 0.15 M NaCl を含む 0.01 M-PB, pH 7.2, で流速 6 ml/h として溶出し (図 3), 1 ml ずつ分取して各管の活性をしらべる。ピーク前半 (CEA) と後半 (GCAA) を別にプールして濃縮する。

4) CEA, NCA 標品と抗血清

大腸癌肝転移巣から Krupey ら¹²⁾の方法に準じて抽出した粗 CEA 標品 (0.18 mgCEA/mg) を使用した。一部の実験には大腸癌肝転移巣を上記 3) の方法で処理し, Sephacryl S-200 ゲル濾過におけるピーク前半から得られた精製 CEA 標品を使用した。

正常肺の Polytron による 50% (W/V) 生理食塩水 homogenate を遠心 30 分, 上清に PCA を終濃度 0.6 M に滴下し, 室温 30 分放置後遠心 30 分, その上清を PB, 0.01 M, pH 7.2, に対し 48 時間透析した後, 3 mg 蛋白/ml に濃縮したものを粗 NCA 標品として用いた。一部の実験には同標品を上記 3) のように DEAE-Sephacel クロマトグラフィーにかけ, NaCl 濃度 0-0.05 M 間の溶出物を濃縮して得た NCA 標品を使用し

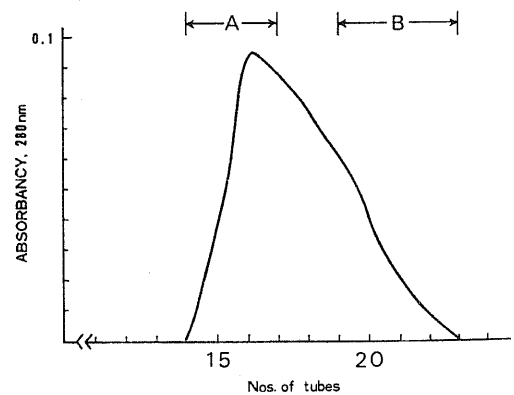


Fig. 3. Sephacryl S-200 chromatography of the GCAA-containing fraction obtained from the Sephadex G-150 column. The fraction size was 1ml. GCAA activity was recovered in the fraction B and CEA activity in the fraction A. Tube number 18 contained both activities.

た。また大腸癌肝転移巣を上記3)のように処理し、Sephacryl S-200 クロマトグラフィーで精製 CEA 標品を得た際、ピーク後半から得られた精製 NCA 標品も用いた。

抗 CEA 抗血清としては市販の抗ヒト CEA 家兎抗血清 Ig (DAKO-immunoglobulins Ltd., Denmark, Lot: C 69 D) を使用した。

抗 NCA 抗血清はつぎのように作製した。正常肺由来の粗 NCA 標品 1 ml を同量の FCA で乳化し、成熟家兎の足脛と背部皮下に分割注射し、1 か月後から 10 日間隔で 3 回同様の注射を行い、10 日後に採血する。この抗血清 1 ml に正常血清 0.5 ml, 正常胃と正常肝の 3M-KCl 抽出液各 0.25 ml を加え、37°C 1 時間、4°C 1 夜おいてから遠心 15 分後の上清をとり、さらに正常肺 PCA 抽出液の DEAE-Sephacel クロマトグラフィー(上述)における非 NCA 分画 (NaCl 濃度 0.075—0.25 M 間の溶出物) を濃縮したもので吸収を行い既述のように Ig 分画を分離して使用した。この分画は粗 NCA または精製 NCA 標品に対して沈降線を生じるが、CEA 標品に対しては反応しなかった。

III 分析方法

ゲル内重拡散法 (Ouchterlony 法) には 1% Agarose LE (Miles Laboratories), 溶媒 PB, pH 7.6, $\mu=0.06$, を用い、抗原孔は直径 4 mm, 抗体孔は直径 6 mm または 8 mm とした。

免疫電気泳動法には 1% Agarose HEE0 (Miles Laboratories), ベロナール緩衝液, pH 8.6, $\mu=0.05$ を用い、12.5 V/cm の定電圧で約 2 時間泳動した。

沈降線の蛋白染色には Amidoschwarz, 糖染色には ρ -phenylenediamine oxidation reaction¹⁹⁾ を用いた。

Disc 電気泳動は 7.5% polyacrylamide gel を用い、4mA/管、約 2.5 時間泳動後、Coomassie brilliant blue R-250 による染色と PAS 染色を行った。なお、同時に泳動したカラムを Agarose 板の溝におき、6 mm 間隔で平行する細溝を作って抗血清 Ig を入れ、湿潤に 4—5 日おいて、沈降アークの出現を観察した。

各抽出物の蛋白量は Lowry 法により測定した。

成 績

Ouchterlony 法によると、吸収抗 GC-Pfr 抗血清に対して GCmix 3M-KCl 抽出液は 1 本、GC 7 の抽出液は 2 本の沈降線を示したが、正常血清や成人の正常胃・肝・腎・脾、胎児の肝・腎・脾・腸の各 3M-KCl 抽出液または 25% (W/V) 生理食塩水ホルモジネートの遠心上清は沈降線を生じなかった(図 4)。しかし、Gcmix や GC7 の 3M-KCl 抽出液は CEA あるいは NCA を含

み、抗 CEA 抗血清または抗 NCA 抗血清と沈降線を作るし、吸収抗 GC-Pfr 抗血清は CEA あるいは NCA 各標品と沈降線を作る。そしてそれらの沈降線は胃癌 3M-KCl 抽出液と吸収抗 GC-Pfr 抗血清が作る沈降線と部分一致をする(図 5, 6)。なお、CEA による沈降線は

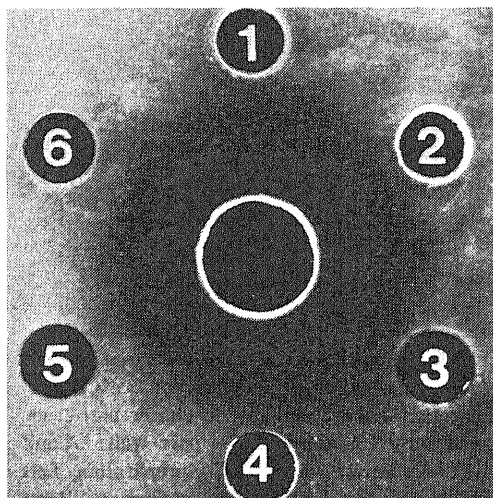


Fig. 4. Examples of Ouchterlony reaction patterns developed between absorbed anti-gastric cancer antiserum and various tissue extracts. Center well: absorbed anti-GC-Pfr antiserum, peripheral wells: (1) GC7 extract, (2) fetal gut extract, (3) normal serum, (4) Gcmix extract, (5) normal liver extract, (6) normal stomach extract.

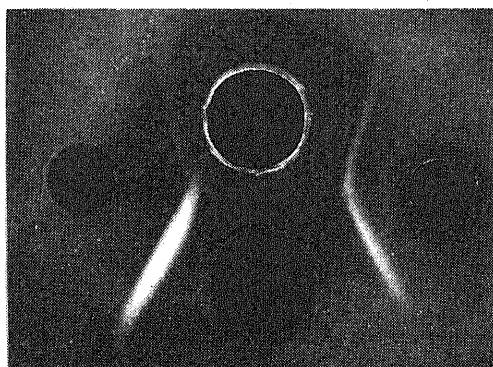


Fig. 5. Examples of Ouchterlony reaction patterns with a gastric cancer extract and a CEA preparation against anti-gastric cancer antiserum and anti-CEA antiserum. Upper well: absorbed anti-GC-Pfr antiserum, Lower well: anti-CEA antiserum (DAKO), Left well: a CEA preparation, Right well: Gcmix extract.

糖染色が陽性であるが、NCA や胃癌抽出液によって生じる沈降線は糖反応陰性である。

NCA による吸収を加えた吸収抗 GC-Pfr 抗血清を用いると、NCA や CEA 標品に対する沈降線は消失し、

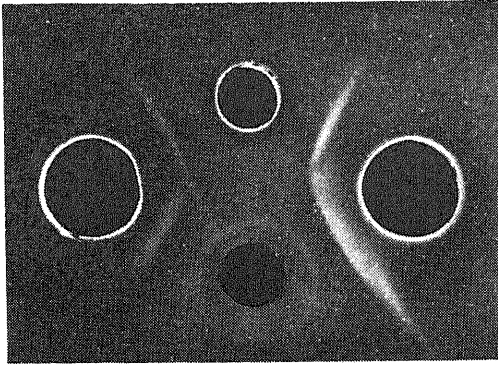


Fig. 6. Examples of Ouchterlony reaction patterns with a gastric cancer extract and a NCA preparation against anti-gastric cancer antiserum, and anti-NCA antiserum. Upper well: GCmix extract, Lower well: a NCA preparation, Left well: absorbed anti-GC-Pfr antiserum, Right well: anti-NCA antiserum.

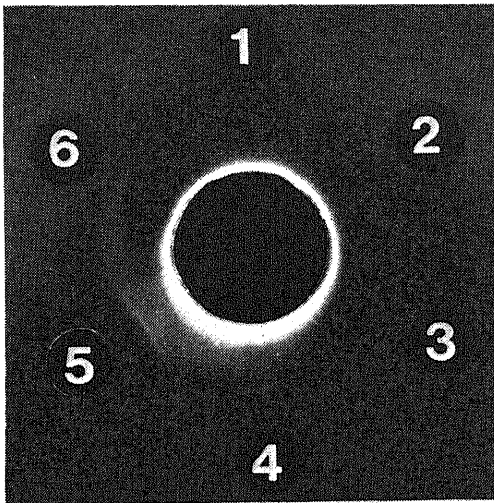


Fig. 7. Examples of Ouchterlony reaction patterns with anti-gastric cancer antiserum absorbed with NCA against gastric cancer extracts, CEA, and NCA. Center well: anti-GC-Pfr antiserum absorbed with NCA, peripheral wells (1) a NCA preparation, (2) a CEA preparation, (3) GC5 extract, (4) GC6 extract, (5) GCmix extract, (6) GC7 extract.

各胃癌 3 M-KCl 抽出液に対してそれぞれ 1 本の沈降線を生じた (図 7)。しかし大腸癌 2 例, 肝癌 2 例, 肺癌 1 例の各 3M-KCl 抽出液とは反応しなかった。

GC 7 の 3M-KCl 抽出液の disc 電気泳動カラムを agarose 層内で吸収抗 GC-Pfr 抗血清や抗 CEA 抗血清 (DAKO) と反応させると、いずれの抗血清に対しても $R_f=0.1$ と $R_f=0.23$ のアークを生じた。なお、NCA 標品は抗 NCA 抗血清や抗 GC-Pfr 抗血清との間に $R_f=0.38$ のアークのみを生じた (図 8)。

吸収抗 GC-Pfr 抗血清による沈降線形成活性を指標として GCAA の精製を行った。上述のように GC 7 の 3M-KCl 抽出液から作った PCA 抽出物を各カラムクロマトグラフィーで分画し、最後の Sephacryl S-200 ゲル濾過の分画 A から disc 電気泳動で $R_f=0.1$ の泳動度を持ち、糖染色陽性の CEA が得られた。それは大腸癌肝転移巣から同様にして得た分画 A のそれと性質が一致した。分画 B からは $R_f=0.23$ で、蛋白質染色・糖

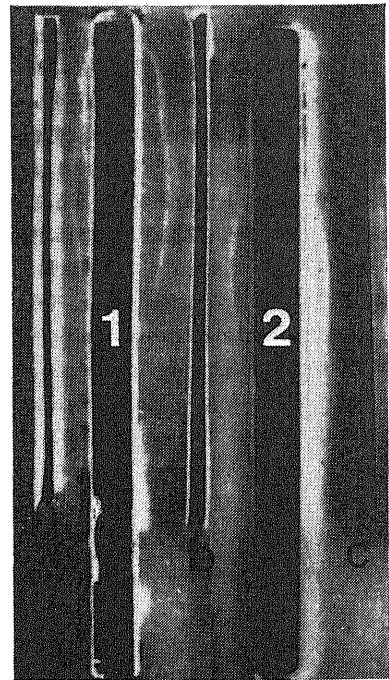


Fig. 8. Polyacrylamide disc gel analysis of 3 M-KCl extract of gastric cancer and a NCA preparation. Duplicate gels were subjected to electrophoresis: one was subjected to immunoanalysis, and the other was stained. Gels: (1) 3 M-KCl extract of GC7, (2) NCA. Troughs: (a) anti-CEA antiserum, (b) anti-GC-Pfr antiserum, (c) anti-NCA antiserum.

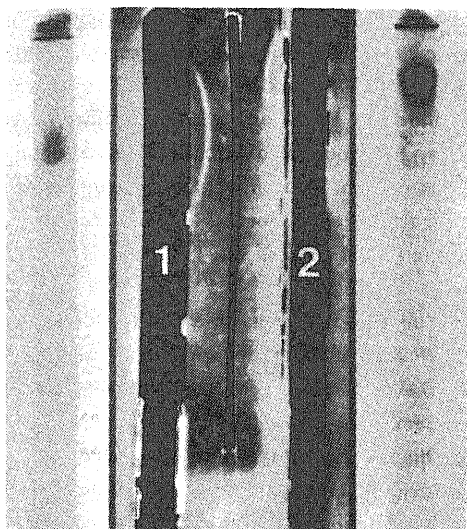


Fig. 9. Polyacrylamide disc gel analysis of Fraction A and B. Duplicate gels were subjected to electrophoresis: one was subjected to immunanalysis, and the other was stained with Coomassie blue. Gels: (1) Fraction B, (2) Fraction A. Trough: anti-GC-Pfr antiserum.

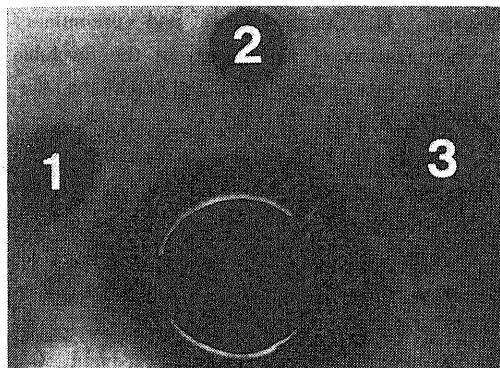


Fig. 10. Examples of Ouchterlony reaction patterns with purified GCAA against anti-GC-Pfr antiserum. Lower well: anti-GC-Pfr antiserum absorbed with NCA, peripheral wells: (1) GC7 extract, (2) purified GCAA, (3) GCmix extract.

染色ともに陽性で、CEA に対し交叉反応性を持たない抗 NCA 抗血清と沈降線を作る均質な物質 (GCAA) が得られた (図 9)。

精製 GCAA は NCA 吸収抗 GC-Pfr 抗血清に対し 1 本の沈降線を生じ、その沈降線は、同抗血清が胃癌 3 M-KCl 抽出液との間に生じる沈降線と完全一致像を示

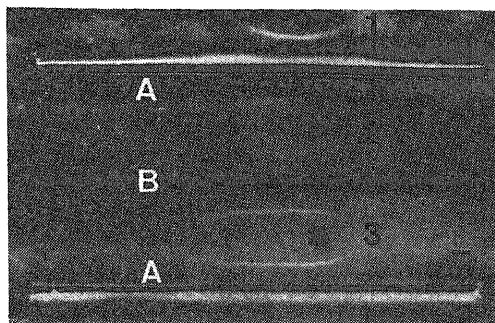


Fig. 11. Immunoelectrophoresis of GCAA, NCA and CEA. Wells: (1) GCAA purified from GC7, (2) NCA, (3) CEA. Troughs: (A) anti-GC-Pfr antiserum, (B) anti-CEA antiserum.

した (図 10)。

免疫電気泳動によると、GCAA は β 泳動度を示したが、同領域へ泳動する NCA や CEA よりわずかに遅れる (図 11)。

考 察

胃癌の不溶分画をデソキシコール酸塩で可溶化し、混在する血清成分を免疫化学的方法で除去した抗原分画を免疫抗原として作った家兎抗血清は適当な吸収を加えると、胃癌 3M-KCl 抽出液中に Ouchterlony 法で 1 抗原物質の存在を示すようになった。その抗原は正常成人臓器・胎児臓器・他種の癌の抽出液には証明されなかった。即ち、ゲル内拡散法の範囲で、胃癌特異性のある operationally monospecific な抗血清が得られたことになる。しかし、それに対応する抗原には抗 NCA 抗血清あるいは抗 NCA 抗体の混在する抗 NCA 抗血清との反応性があり、生じた沈降線は胃癌関連の沈降線と部分一致を示す。このことは抗原分子に胃癌関連決定基と NCA 様決定基の共存する可能性を暗示するが、同じことが disc 電気泳動カラムのゲル内埋込拡散実験でも示唆された。そこで胃癌関連抗原 GCAA の精製を行ったが、得られた均質な抗原分画は胃癌関連抗原性を持ちながら、NCA と交叉反応性の決定基も保持していた。正常胃には存在しない NCA が胃の癌化に伴って出現することはこの抗原分子が differentiation antigen であることを暗示している。また、それと結合していると思われる胃癌関連決定基は、ここで用いた方法で他の人癌に証明されている癌抗原⁹⁻¹⁰との相似性を考えると、胃癌細胞膜内 integral protein の 1 つと考えられる。このような抗原と従来知られている抗原との異同は明らかではないが、泳動度、

組織分布、胃癌から抽出可能な点などから見て FSA²³⁾, GCA⁹⁾, SGA⁶⁾や Kimoto ら⁴⁾の抗原とは異なるものと考えられる。

抗原の胃癌細胞膜上における存在様式の細胞学的検討や精製抗原あるいは monospecific な抗血清の臨床応用がこれからの問題である。

結 論

ヒト胃癌の不溶分画を可溶化して得た抽出液を免疫抗原として作製した家兎抗血清を用い、胃癌の 3M-KCl 抽出液中に胃癌に高度関連する抗原 (GCAA) の存在することをゲル内拡散法で明らかにした。同抗原は NCA と交叉反応性のある決定基も持っているが、disc 電気泳動や兎免電気泳動では NCA よりわずかに遅い泳動度を示した。胃癌 3M-KCl 抽出液を 0.6 M 過塩素酸で処理した後、クロマトグラフィーを行って精製抗原を得た。

稿を終えるに臨み、御指導・御校閲を賜った倉田自章教授に深く感謝します。あわせて御教示・御協力を戴いた岡田取司助教授、徳山春彦博士、また御協力戴いた清水弘子先生ならびに関 誠先生に謝意を表します。

文 献

- 1) 荒川 弥：胃癌の免疫学的解析，癌化における組織糖蛋白の変化について。十全医学誌，70，354-364 (1964)。
- 2) Häkkinen, I., Järvi, O. & Grönroos, J.: Sulphoglycoprotein antigens in the human alimentary canal and gastric cancer. An immunohistological study. *Int. J. Cancer*, 3, 572-581 (1968)。
- 3) Häkkinen, I., Korhonen, L. K. & Saxén, L.: The time of appearance and distribution of sulfoglycoprotein antigens in the human foetal alimentary canal. *Int. J. Cancer*, 3, 582-592 (1968)。
- 4) Kimoto, E., Kuranari, T., Masuda, H. & Takeuchi, M.: Isolation and characterization of a glycopeptide from mucinous carcinoma of human stomach. *J. Biochem.*, 63, 542-549 (1968)。
- 5) Deutsch, E., Appfel, C. A., Mori, H. & Walker, J. E.: A tumor-associated antigen in gastric cancer secretions. *Cancer Res.*, 33, 112-116 (1973)。
- 6) Bara, J., Paul-Gardais, A., Loissillier, F. & Burtin, P.: Isolation of a sulfated glycopeptidic antigen from human gastric tumors: its localization in normal and cancerous gastrointestinal tissues. *Int. J. Cancer*, 21, 133-139 (1978)。
- 7) Von Kleist, S., Chavanel, G. & Burtin, P.: Identification of a normal antigen that cross-reacts with the carcinoembryonic antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 69, 2492-2494 (1972)。
- 8) Okada, S., Itaya, K. & Kurata, Y.: Identification of a tumor-specific antigen in the insoluble fraction of human nephroblastoma. *Eur. J. Cancer*, 15, 1085-1093 (1979)。
- 9) Yamada, T., Iwa, T., Kurata, Y. & Okada, S.: Extraction and preliminary characterization of tumor antigens in human bronchogenic adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *Eur. J. Cancer*, 16, 781-792 (1980)。
- 10) Okada, S., Kurata, Y., Kitagawa, K. & Ookawa, M.: Demonstration and preliminary characterization of an antigen in the insoluble extracts of human transitional cell carcinoma. *Eur. J. Cancer*, 16, 1451-1458 (1980)。
- 11) Ternynck, T. & Avrameas, S.: Polymerization and immobilization of proteins using ethylchloroformate and glutaraldehyde, p29-35. *In* E. Ruoslahti (ed.), *Immunoabsorbents in protein purification*, Scand. J. Immunol., Suppl. 3. Aas & Wahl. Oslo, 1976。
- 12) Krupey, J., Gold, P. & Freedman, O.: Physicochemical studies of the carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *J. exp. Med.* 128, 387-398 (1968)。
- 13) Grabar, P.: Immuno-electrophoretic analysis, p1-38 *In* D. Glick (ed.), *Methods of biochemical analysis*, Vol 7. Interscience Publishers, New York, 1959。

Demonstration and Isolation of an Antigen Highly Associated with Human Gastric Cancer
Ming Cheng, Department of Pathophysiology (Director: Prof. Y. Kurata), Cancer Research Institute, Kanazawa University, Kanazawa 920 — J. Jusen Med. Soc., **90**, 669–675 (1981)

Key words: human gastric cancer, immunology, nonspecific cross-reacting antigen, tumor-associated antigen

Abstract

An antigen, cross-reacting with nonspecific cross-reacting antigen (NCA) from normal lung and colonic cancer, was demonstrated by gel diffusion in human gastric cancer extracts using xenoantiserum against the deoxycholate-solubilized fraction prepared from the insoluble extract of a gastric cancer. This antigen was not detected in normal adult and fetal organs or in several other cancers. Purified antigenic material was obtained from the extract of a gastric cancer. It migrated as a single band on polyacrylamide gel electrophoresis and its mobility was different from that of NCA and CEA. This antigen appeared on immunoelectrophoresis in the β region with a mobility smaller than in case of NCA and CEA.