ヒト膀胱癌による異所性 hCG β の in vitro ならびに in vivo における産生様式

—膀胱腫瘍マーカーとしての尿中 β -core fragment (β -CF) の基礎的研究—

神鋼病院泌尿器科 (医長: 山中 望)

森 末 浩 一¹⁾ 山 中 望

神戸大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 守殿貞夫)

江 藤 弘 守 殿 貞 夫

兵庫県立成人病臨床研究所 (総長: 馬場茂明)

西 村 隆 一 郎

ECTOPIC PRODUCTION OF HCG β BY BLADDER CARCINOMA IN VITRO AND IN VIVO

Kouichi Morisue and Nozomu Yamanaka

Department of Urology, Shinko Hospital

(Chief: N. Yamanaka, M.D.)

Hiroshi Eto and Sadao Kamidono

Department of Urology, Kobe University School of Medicine

(Director: Prof. S. Kamidono, M.D.)

Ryuichiro Nishimura

Hyogo Institute of Clinical Research

(President: S. Baba, M.D.)

(Background) Ectopic production of immunoreactive hCG/hCG β (IR-hCG β) by bladder transitional cell carcinoma cell lines was investigated in vitro and in vivo.

(Methods) As an in vitro study, IR-hCG β in culture media from 2 bladder transitional cell carcinoma cell lines (KoTCC-1 and HT-1197) was analyzed by three kinds of enzyme immunoassays (EIA) which were specific for intact hCG, free hCG β and β -core fragment (β -CF). As an in vivo study, distribution of IR-hCG β was analyzed in tumor tissues, sera, and urine of the nude mice and the nude rat transplanted with KoTCC-1 cell line.

(Results) Both of the cell lines were determined to secrete IR-hCG β into the media, which consisted principally of free hCG β . Intact hCG and β -CF were scarcely detected in the media. Immunohistochemical study revealed the localization of IR-hCG β in transitional cell carcinoma cells of the transplanted tumor. Although a large amount of IR-hCG β could be detected in both of the serum and urine from the animals, there were quantitative and qualitative differences between serum and urinary IR-hCG β . Quantitatively, the concentrations of IR-hCG β in the urine were consistently much higher than those in the serum. Qualitatively, free hCG β was exclusively detected in the serum whereas a large amount of β -CF, in addition to free hCG β , were found in the urine. Intact hCG could not be detected in both serum and urine. These distributions of IR-hCG β in the animals bearing tumors were completely analogous to those in patients with bladder carcinoma.

¹⁾現 兵庫県立成人病センター泌尿器科

(Conclusion) The present results suggested that ectopic production of IR-hCG β by bladder carcinoma is not rare phenomenon and it is clinically useful as a tumor marker when β -CF is measured in the urine.

Key words: bladder carcinoma, β -core fragment, tumor marker

要旨: (背景と目的) 膀胱癌による hCG β 免疫活性物質 (immunoreactive hCG β ; IR-hCG β) 産生の基礎的研究として, 膀胱癌細胞株の IR-hCG β 産生を in vitro ならびに in vivo において検討した。

(対象と方法) 生体中の IR-hCG β には, intact hCG だけでなく, free hCG β や β -CF などの異なる分子種が関与することから, これら各 hCG β 分子種に対する 3 種類のエンザイムイムノアッセイ (EIA) を用いて以下の研究を行った。in vitro 実験は, 2 種類の膀胱移行上皮癌細胞株 (KoTCC-1, HT-1197) が培養液中へ分泌する IR-hCG β を各 EIA で測定し, かつ, 培養液を Sephadex G-100 によりゲル濾過した分画についても EIA で測定した。in vivo 実験では, KoTCC-1 株をヌードマウスとヌードラットに移植して, IR-hCG β の生体内分布を調べた。

(結果) 両株とも培養液中への活発な IR-hCG β の放出が確認されたが, その実体は free hCG β であり, intact hCG や β -CF は検出されなかった。一方, 移植動物では, 原腫瘍と同じ移行上皮癌組織からなる腫瘍塊が形成され, 免疫組織化学的に IR-hCG β の局在が観察された。また, 移植動物の血清中では free hCG β のみが検出されたが, 尿中では加えてさらに大量の β -CF が検出された。しかし, intact hCG はいずれの場合にも検出されなかった。

(結論) このような生体内 IR-hCG β 分布は IR-hCG β 産生膀胱癌患者とまったく同じであることから, 尿中 β -CF の膀胱腫瘍マーカーとしての妥当性が支持された。

キーワード: 膀胱癌, 尿中 β -core fragment, 腫瘍マーカー

緒 言

ヒト絨毛性ゴナドトロピン (human Chorionic Gonadotropin, hCG) は胎盤から産生, 分泌される糖蛋白ホルモンであり, α と β の二つの異なる subunit が非共有結合して構成されている。hCG は絨毛性疾患のきわめて有用な腫瘍マーカーとして汎用されているが¹⁾, 非絨毛細胞性の腫瘍が hCG あるいは hCG の β -subunit (hCG β) に類似した免疫活性物質 (immunoreactive hCG β ; IR-hCG β) を異所性に産生, 分泌する現象もよく知られてきた²⁾。泌尿器系腫瘍においても精巣腫瘍で血中 hCG β が腫瘍マーカーとしてすでに臨床応用されている³⁾。膀胱癌患者においても, その血中や尿中で IR-hCG β が検出される場合のあることは知られていたが⁴⁾⁵⁾, 腫瘍マーカーとしての有用性は確立されるに至っていない。しかし近年, 免疫組織化学的研究により約 3 分の 1 の症例の膀胱癌組織中で IR-hCG β の局在が証明されたという報告⁶⁾⁷⁾から, 我々は膀胱癌による IR-hCG β の異所性産生は稀な現象ではないと考え, 膀胱癌患者の血中や尿中に含まれる IR-hCG β を量的, 質的に分析してきた⁸⁾。その結果, (1) 膀胱癌患者の血中では異常高値の IR-hCG β が検出される頻度は低く, 検出された場合の血中 IR-hCG β の

実体はほとんどの場合, intact hCG ではなく free hCG β であること, (2) 血中 IR-hCG β が検出されない膀胱癌患者でも, その尿中で 30~40% に異常高値の IR-hCG β が検出されること, (3) そのような尿中 IR-hCG β は β -core fragment (β -CF) と呼ばれる糖蛋白物質で占められていること, などが明らかとなったことから, 尿中 β -CF の膀胱腫瘍マーカーとしての可能性を指摘してきた⁹⁾。今回, 膀胱癌による IR-hCG β 産生について, 膀胱癌細胞株による in vitro での IR-hCG β 産生を調べるとともに, それをヌードマウスならびにヌードラットに移植して in vivo におけるその産生と代謝について検討した。

対象・方法

1. IR-hCG β のエンザイムノアッセイ (EIA)

既報¹⁰⁾のように 2 種類の抗体を用いたサンドイッチ法 EIA により IR-hCG β 各分子種 (intact hCG, free hCG β , β -CF) の濃度を測定した。3 種類の EIA の感度と特異性については¹⁰⁾ (表 1), EIA-1 と EIA-2 はそれぞれ intact hCG と free hCG β にほぼ特異的であり, β -CF 測定系である EIA-3 には β -CF とほぼ同程度に free hCG β が交差反応を示す。そのため, β -CF の定量に際しては, その実測値から free hCG β の交差量

表1 hCG β 分子種に対する EIA の感度, 特異性および交差率

Assay	Epitopes		Specific IR-hCG β	Sensi- tivity (ng/ml)	Crossreactivity (%)		
	1st Ab	2nd Ab			intact hCG	free hCG β	β -CF
EIA-1	β -CTP	β -subunit	intact hCG	0.1	100	15	<1.0
EIA-2	β -subunit	β -core	free hCG β	0.05	1.9	100	1.98
EIA-3	β -core	β -core	β -CF	0.05	3.3	100	100

[β -CTP: hCG β のカルボキシル末端ペプチド部分]
[β -core: hCG β の内部構造]

を引いたものを β -CF の単独量とした¹⁾。

2. 膀胱癌細胞株の培養と移植

ヒト膀胱癌 (移行上皮癌: TCC, G3) から樹立された KoTCC-1¹¹⁾ と HT-1197 (原 ATCC [American Type Culture Collection] 株 CRL-1473 で ICN Biomedicals Inc. より購入) の 2 種類の細胞株を実験に供した。

in vitro 実験としては, 75cm² flask に kanamycin sulfate を添加した medium GIT (日本製薬(株)) 培養液25ml を注入し, KoTCC-1, HT-1197株をそれぞれ培養し, その最初の培養液交換後から経時的に少量の上清を採取し各分子種の EIA に供した。

in vivo 実験としては, 第 5 週齢の雄ヌードマウス (BALB/cA Jcl -nu, 日本クレア) と雄ヌードラット (F-344/N Jcl-rnu, 日本クレア) の背部皮下に KoTCC-1株 (細胞数約 1×10^7) を移植し, 約 2 週間後に径2~3 cm の腫瘤形成を確認後, 血清と尿を採取し EIA に供した。さらに, 摘出した腫瘤を組織培養し, その上清を経時的に採取し各分子種の EIA に供した。コントロールとして妊娠性絨毛癌由来の細胞株である NJG についても同様に in vitro および in vivo 実験を行った。

3. Sephadex G-100ゲルクロマトグラフィー

移植したヌードマウスとヌードラットの血清と尿ならびに組織培養上清を Sephadex G-100ゲルクロマトグラフィーに供した。0.15M NaCl 含有の 0.05M sodium phosphate buffer (pH 7.4) で緩衝化した Sephadex G-100カラム (1.6×90cm) に血清, 尿, 組織培養上清等のサンプルを添加し, 溶出液を2.6ml 分画採取し, EIA にて各 hCG β 分子種を測定した。

4. 移植膀胱癌における IR-hCG β の免疫組織化学的局在

ヌードマウスとヌードラットに移植した腫瘍組織をホルマリン固定後, パラフィン切片とした標本について DAKO 社の LSAB キットを用いて IR-hCG β の免

図1 EIA-2 (free hCG β 測定系) における hCG β 標準線と KoTCC-1株培養上清の希釈線

疫組織化学的局在を検討した。一次抗体として hCG β の内部構造 (β -core) に対する抗体と hCG β の C 末端側ペプチド (β -CTP) に対する抗体の 2 種類を使用した。

結 果

1. 膀胱癌細胞株の in vitro における IR-hCG β 産生
培養細胞がほぼ飽和状態になった KoTCC-1 と HT-1197 の培養上清中にはともに明瞭な IR-hCG β が含まれていた。それらの免疫活性は EIA-2 と EIA-3 に強く反応し, 培養上清の希釈直線 (図 1) の単一実験では EIA-2 の標準直線と完全な平行性を示し, EIA-1 には全く反応しなかった。free hCG β は EIA-2 と EIA-3 の両方にほぼ等しく交差する (表 1) のに対して, β -CF は EIA-3 にのみ特異的に反応し, EIA-2 での交差率は 1.98% に過ぎない。従って, EIA-2 と EIA-3 の両者ではほぼ同じ測定値が得られた場合, その検体中には free hCG β のみが含まれていることになる。この測定結果は両株の培養上清についての Sephadex G-100 によるゲルクロマト分析 (図 2) において, free hCG β のピークのみが観察された成績でも裏付けられた。つまり,

図2 KoTCC-1, HT-1197, NJG 株培養上清の Sephadex G-100 溶出プロフィール

図3 KoTCC-1と HT-1197 の培養上清中の free hCGβ

図4 KoTCC-1細胞数別培養上清中の free hCGβ

KoTCC-1と HT-1197の培養上清中に含まれている IR-hCGβ は intact hCG や β-CF ではなく, free hCGβ であることが判明した。KoTCC-1と HT-1197の培養上清中に放出される free hCGβ の濃度推移 (図3) をみると, 培養時間の経過とともに両株の上清中 free hCGβ 濃度は高まり, 培養細胞数と free hCGβ 濃度の間には正の相関が確認された (図4) ことから, free hCGβ がこれらの直接分泌産物と考えられた。一方, 妊娠性絨毛癌株 (NJG) 上清で検出される IR-hCGβ は EIA-1による intact hCG が主なものであったが, その約3分の1量の free hCGβ の分泌も認められた (図

2)。

2. 膀胱癌細胞株 (KoTCC-1) 移植ヌードマウスならびにヌードラットの血・尿中 IR-hCGβ

KoTCC-1株を移植したヌードマウス2匹とヌードラット1匹の血清中 IR-hCGβ (図5) は free hCGβ しか検出されなかったが, それらの尿中では free hCGβ とともに大量の β-CF が検出された。一方, NJG 株を移植したヌードラットとヌードマウス各1匹の IR-hCGβ (図5) は, 血清中では intact hCG と free hCGβ の両者が検出され, 尿中では β-CF も含まれていた。しかし, KoTCC-1株および NJG 株のいずれの場合にも

図5 膀胱癌株 (KoTCC-1) ならびに絨毛癌株 (NJG) 移植動物における血清および尿中 hCG β 免疫活性 (IR-hCG β)

血清中 β -CF は検出されなかった。KoTCC-1株を移植したヌードラット 1 匹の血清と尿についての Sephadex G-100ゲルクロマトグラフィーの結果 (図6) も、血清では free hCG β の単一ピークが、尿中ではさらに β -CF のピークも観察された。

3. 移植腫瘍の組織培養

ヌードマウスとヌードラットに移植した膀胱癌 (KoTCC-1株) の摘出腫瘍の組織培養上清中への IR-hCG β の分泌 (図7) は、細胞株の場合とまったく同じように、free hCG β のみが検出され、 β -CF は検出されなかった。

4. 移植膀胱癌組織における IR-hCG β の局在

ヌードマウスとヌードラットに移植した膀胱癌組織の病理像は原腫瘍と同じく移行上皮癌 G3で、絨毛癌様細胞は認められなかった。IR-hCG β の免疫組織化学的局在は抗 hCG β -CTP 抗体と抗 hCG β -core 抗体ともまったく同様に、移行上皮癌細胞に認められた (図8)。

図6 KoTCC-1株移植ヌードラットの血清ならびに尿の Sephadex G-100溶出プロファイル

図7 KoTCC-1 Tissue Culture Medium 中の IR-hCG β

考 察

膀胱癌の細胞株がその培養液中に IR-hCG β を分泌する現象は、すでに Iles ら¹²⁾により報告されてきた。彼らは調べた 9 種類の膀胱癌細胞株の内 7 種類の培養上清中で IR-hCG β を検出し、その際使用したアッセイの特異性から、それらは intact hCG によるものでは

図8 移植膀胱癌組織の病理組織像は移行上皮癌であり、免疫組織化学的局在は移行上皮癌細胞に認められた。

なく、free hCG β あるいは β -CF によるものと推定している。今回検討した2種類の膀胱癌細胞株でも旺盛な IR-hCG β の分泌が確認されたが、これら培養液中 IR-hCG β の実体は intact hCG ではなく、free hCG β であることが判明した。Iles ら¹²⁾の用いたアッセイでは free hCG β と β -CF は全く区別不能であることから培養液中での β -CF の有無は明らかにされていないが、今回我々が用いた3種類のアッセイの特異性からは、KoTCC-1株と HT-1197株の培養上清中には少なくとも測定感度以上の β -CF は含まれていないことが判明した。さらに、このことは Sephadex G-100 によるゲルクロマトグラフィーの結果ともよく一致していた。

今回の in vivo 実験結果から KoTCC-1株は動物に移植された後も IR-hCG β 産生能を維持していることが確認された。ヌードラットやヌードマウスに移植した KoTCC-1株腫瘍組織中には IR-hCG β の局在が免疫組織化学的に証明され、それら移植動物の血中には free hCG β に起因する IR-hCG β が検出された。さらに、それらの尿中には血中の数倍も高い濃度の IR-hCG β が含まれており、それは free hCG β と共存する大量の β -CF によることが分かった。このような KoTCC-1株移植動物における IR-hCG β の生体内分布は、すでに我々が報告してきた膀胱癌患者の血中、尿中における IR-hCG β プロフィール⁸⁾とまったく同じであり、尿中 β -CF の膀胱癌の腫瘍マーカーとしての可能性を支持するものである。

すでに、婦人科癌¹³⁾や肺癌¹⁴⁾などにおいて尿中 β -CF の腫瘍マーカーとしての有用性が報告されているが、

その産生源は未だ不明である。 β -CF の構造が hCG β -subunit の一部分で構成されている¹⁵⁾¹⁶⁾ところから、その分解産物である可能性が強く推定され、現在までに2つの産生経路が考えられている。第1の経路は β -CF が腎を代謝部位とした末梢代謝産物とするものである¹⁷⁾。事実、intact hCG や free hCG β を生体に静注すると尿中に β -CF が排泄されてくる¹⁸⁾ことが確かめられている。第2の経路は β -CF が細胞あるいは組織からの直接分泌産物とするものである。Cole と Birken¹⁹⁾は胎盤の組織培養で β -CF が放出されてくると報告し、これが hCG β -subunit の細胞内分解産物である可能性を指摘し、その血中半減期がきわめて短く血中濃度が速く低下するため検出されないと推定している。しかし、本研究においては、膀胱癌ならびに絨毛癌の細胞株の培養液中でも、またそれらの移植腫瘍の組織培養液中でも、 β -CF はまったく検出されず、腫瘍組織からの直接的放出は確認されなかった。

以上、KoTCC-1株の細胞と腫瘍組織の培養液中では free hCG β のみが検出されたことから、腫瘍組織からは free hCG β として血中に分泌され、その後いずれかの部位で β -CF が産生され、尿中に証明されるものと推察される。なお、KoTCC-1株は背部皮下に移植されており、腫瘍細胞から尿路へ直接 IR-hCG β が放出される可能性はない。

マウスやラットの細胞は hCG β の遺伝子を有していない²⁰⁾ことから、尿中で検出された IR-hCG β は移植されたヒト膀胱癌株由来とみなすことができる。また、in vivo 実験での生体内分布が膀胱癌患者とまったく同じプロフィールを示したことから、これらの動物での IR-hCG β の分泌と代謝についてはヒトと同様のメカニズムが存在しているものと推察され、膀胱癌患者の尿中に出現する β -CF の腫瘍マーカーとしての妥当性を支持するものと考えられた。

結 語

膀胱移行上皮癌の細胞株である KoTCC-1と HT-1197の in vitro における IR-hCG β 産生、ならびにそれら移植動物モデルの in vivo における IR-hCG β 産生および代謝について検討し、以下の結果を得た。

(1) 両細胞株の培養液中には IR-hCG β が明確に検出され、それらはいずれも free hCG β に由来するものであった。

(2) KoTCC-1株移植動物の血中、尿中における IR-hCG β の分布は、IR-hCG β 産生膀胱癌患者のそれとまったく同じで、血中では free hCG β が主体をなし、

尿中では free hCG β とともに大量の β -CF が検出された。

(3) β -CF はこの血中 free hCG β を前駆体として尿中へ出現してくるものと推定された。

以上より尿中 β -CF の膀胱癌における腫瘍マーカーとしての妥当性が示された。

絨毛癌細胞株 NJG を御供与いただいた慶応義塾大学医学部婦人科学教室野澤志朗教授に感謝致します。本研究の一部は厚生省がん研究助成金（野澤班）によった。

文 献

- 1) 北島隆史, 西村隆一郎, 望月真人: 絨毛性疾患患者尿中 hCG の分子多様性とその臨床的意義. 日産婦誌, 43, 297—303, 1991.
- 2) Hussa, R.O.: Human chorionic gonadotropin; a clinical marker: Review of its biosynthesis. Legand Rev., 3(Suppl. 2), 1—44, 1981.
- 3) Javadpour, N.: The value of biological markers in diagnosis and treatment of testicular cancer. Semin. Oncol., 6, 37—47, 1979.
- 4) Kawamura, J., Machida, S., Yoshida, O., Oseko, F., Imura, H. and Hattori, M.: Bladder carcinoma associated with ectopic production of gonadotropin. Cancer, 42, 2773—2780, 1978.
- 5) Fukutani, K., Libby, J.M., Panko, W.B. and Scardino, P.T.: Human chorionic gonadotropin detected in urine concentrates from patients with malignant tumors of the testis, prostate, bladder, ureter and kidney. J. Urol., 129, 74—77, 1983.
- 6) Rodenburg, C.J., Nieuwenhuyzen kruseman, A. C., DeMaaker, H.A., Fieuren, E.J. and Van Oosterom, A.T.: Immunohistochemical localization and chromatographic characterization of human chorionic gonadotropin in a bladder carcinoma. Arch. Pathol. Lab. Med., 109, 1046—1049, 1985.
- 7) Martin, J.J., Jenkins, B.J., Zuk, R.J., Oliver, R.T. D. and Baithun, S.J.: Human chrionic gonadotropin expression and histological findings as predictors of response to radiotherapy in carcinoma of the bladder. Virch. Arch. Path. Anat., 414, 273—277, 1989.
- 8) 山中 望, 西村隆一郎: 膀胱腫瘍で産生される hCG β 様免疫活性の質的分析とその局在. 日泌尿会誌, 82, 1150—1156, 1991.
- 9) 山中 望, 川端 岳, 森末浩一, 羽間 稔, 西村隆一郎: 膀胱腫瘍における尿中 β -core fragment の腫瘍マーカーとしての意義. 日泌尿会誌, 84, 700—706, 1993.
- 10) 西村隆一郎, 小林 潔, 勝野 誠, 小林高久: 尿中 β -core fragment の存在様式に関する基礎的検討とその測定系の確立. 日産婦誌, 42, 143—148, 1990.
- 11) 江藤 弘, 武市佳純, 荒川創一, 守殿貞夫, 水野禄仁: ヒト膀胱癌細胞株 KoTCC-1 の樹立とその性状. 西日泌尿, 56, 529—532, 1994.
- 12) Iles, R.K., Oliver, R.T.D., Kitau, M., Walker, C. and Chard, T.: In vitro secretion of human chorionic gonadotropin by bladder tumour cells. Brit. J. Cancer, 55, 623—626, 1987.
- 13) 衣笠万里, 西村隆一郎, 長谷川和男, 岡村昌幸, 木村あずさ, 大津文子, 武内久仁生: 尿中 hCG β -core fragment の子宮頸癌における腫瘍マーカーとしての臨床的有用性. 日産婦誌, 44, 188—194, 1992.
- 14) Yoshimura, M., Nishimura, R., Murotani, A., Miyamoto, Y., Nakagawa, T., Hasegawa, K., Koizumi, T., Shii, K., Baba, S. and Tsubota, N.: Assessment of urinary β -core fragment of human chorionic gonadotropin as a new marker of lung cancer. Cancer, 73, 2745—2752, 1994.
- 15) Birken, S., Armstrong, E.G., Grwinowicz-Kolks, M.A., Cole, L.A., Agost, G.M., Krichevsky, A., Vaitukaitis, J.L. and Canfield, R.E.: Structure of the human chorinic gonadotropin β -subunit fragment from pregnancy urine. Endocrinology, 123, 572—583, 1988.
- 16) Endo, T., Nishimura, R., Saito, S., Kanazawa, K., Nomura, K., Katsuno, M., Mukhopadhyay, K., Baba, S. and Kobata, A.: Carbohydrate structures of β -core fragment of human chorionic gonadotropin isolated from a pregnant individual. Endocrinology, 130, 2052—2058, 1992.
- 17) Whemann, R.E., Blith, D.L., Akar, A.H. and Nisura, B.C.: Disparity between beta-core levels in pregnancy urine and serum: Implications for the origin of urinary beta core. J. Clin. Endocrinol. Metab., 70, 371—378, 1990.
- 18) Lefort, G.P., Stock, J.M., Nisula, B.C.: Renal metabolism of the β -subunit of human choriongonadotropin in the rat. Endocrinology, 119, 924—927, 1988.
- 19) Cole, L.A. and Birken, S.: Origin and occurrence of human chorionic gonadotropin β -subunit core fragment. Mol. Endocrinol., 2, 825—828, 1988.
- 20) Strauss, B.L., Pittman, R., Pixley, M.R., Nilson, J.H. and Boime, I.: Expression of the β -subunit of chorionic gonadotropin in transgenic mice. J. Biol. Chem., 269, 4968—4973, 1994. (1995年6月15日受付, 11月20日受理, 特別掲載)