〔シンポジウム：レクチンの臨床応用〕

レクチンによるトランスフェリンの分画と その臨床的意義

小玉俊典・川原田信・今井浩三・谷内 昭

SUMMARY

Lentil lectin-reactive transferrin was isolated from the serum of the patients with hepatocellular carcinoma using a transferrin affinity Sepharose 4B, lectin blotting assay, cross line immunoelectrophoresis, dot blotting assay and enzyme immunosorbent assay. Lentil lectin-reactive transferrin was detected in the serum of the patients with hepatocellular carcinoma but not was detected in the serum of normal subjects. In addition, Lentil lectin-reactive transferrin derived from hepatocellular carcinoma was found to lose its Lentil lectin reactivity almost completely after treatment with fucosidase. The results suggested that Lentil lectin-reactive transferrin contained a fucosylated sugar chain and was a useful marker for the diagnosis of hepatocellular carcinoma.

Key words: Lentil lectin, transferrin, hepatocellular carcinoma, fucosidase.

緒 言

癌化に伴う糖タンパクや糖脂質の糖鎖構造異常として、シアル酸もしくはフコースの過剰結合や bisecting 型等の異常糖鎖構造が多く出現することが知られている。これら異常糖鎖構造の微小変異の診断法としては各種レクチンを用いた方法が開発されている。われわれは肝細胞癌患者血清トランスフェリンの糖鎖構造を fucosyl 化アスパラギン糖鎖構造と強い親和性をもつレンズ豆レクチンとの反応性を検討し、さらに、肝細胞癌におけるレンズ豆レクチン反応性トランスフェリンの出現の機序を明らかにする目的でレンズ豆レクチン反応性トランスフェリンの fucosidase 感受性につき検討した。

方 法

1) トランスフェリン-affinity Sepharose 4B による

トランスフェリンの抽出と Western blotting 法
による同定

血清トランスフェリンの抽出は CNBr 活性 Sepharose 4B (Pharmacia) と抗ヒト・トランスフェリン抗体 (DAKO) を NaHCO_3 緩衝液中で結合した既報のトランスフェリン-affinity Sepharose 4B を用いた¹⁾。

トランスフェリン-affinity Sepharose 4B 2ml に血清 100 μl を入れ 50 mM Tris-HCl 緩衝液, pH 7.2, 3 ml を加え 1,500 rpm で遠心操作を 10 回繰り返して十分に洗浄した後, 50 mM Tris-HCl 緩衝液, pH 3.0, 2.0 ml で 2 回洗浄し 50 mM Tris-HCl 緩衝液, pH 3.0, 1.0 ml を加え 10 分間抽出した液を 50 mM Tris-HCl 緩衝液, pH 8.0 で pH 7.2 に平衡化した。

抽出液のトランスフェリンの検出は Western blotting 法で行った。50 mM Tris-HCl 緩衝液, pH 3.0 で溶出した分画を SDS-PAGE (Tris-glycine SDS 緩衝

Clinical significant of Lentil lectin-reactive transferrin in the serum of the patients with hepatocellular carcinoma.

Toshinori Kodama, Shin Kawaharada, Kohzoh Imai and Akira Yachi; 札幌医科大学第一内科

Correspondence address: Toshinori Kodama, Department Internal Medicine (Section 1), Sapporo Medical College, South 1, West 16, Chuo-ku, Sapporo 060, Japan.

(194) 生物物理化学

液)で電気泳動後、ニトロセルロース膜に電氣的 (Tris-glycine methanol 緩衝液) に転写した。次いで、ニトロセルロース膜をウシ血清アルブミン (BSA) でブロックし抗トランスフェリン・マウス IgG 単クローン抗体 (Cedarlane, Canada) を反応させ、ビオチン化抗マウス IgG 抗体 (Vector, Calif) を反応させ、次いで、avidin biotin peroxidase complex (Vector, Calif) を反応させ、0.025% 3,3'-diaminobenzidine/0.01% 過酸化水素加 Tris-HCl pH 7.6 緩衝液 (DAB) で発色した。

2) レンズ豆レクチン反応性トランスフェリン分画の同定

a) Lectin blotting 法による検討

レンズ豆レクチンに対する反応性は既報の lectin blotting 法を一部改変し検討した¹⁾。すなわち、トランスフェリン溶出液を SDS-PAGE で電気泳動後、ニトロセルロース膜に電氣的に転写し、ニトロセルロース膜を BSA でブロックした後、ペルオキシダーゼ標識レンズ豆レクチン (生化学工業) を反応させ、ペルオキシダーゼ標識抗ペルオキシダーゼ抗体 (DAKO) を反応させ、DAB で発色した。

b) 二次元交差免疫電気泳動による検討

レンズ豆レクチンおよび抗トランスフェリン抗体を用いた二次元交差免疫電気泳動を行い血清トランスフェリンのレンズ豆レクチン反応性を検討した。血清 3 μ l をレンズ豆レクチン含有アガロースゲル (200 μ g/ml) 内で泳動後、抗トランスフェリン抗体含有アガロースゲルで泳動しペルオキシダーゼ標識プロテイン A を反応させ発色した。

c) Dot blotting 法による検討

レンズ豆レクチン反応性トランスフェリンの抽出はレンズ豆レクチン結合アガロースカラム (生化学工業) で行った¹⁾。すなわち、トランスフェリン溶出液をレンズ豆レクチン結合アガロースカラムに入れ 50 mM Tris-HCl 緩衝液, pH 7.2 で十分にカラムを洗浄した後、200 mM α -methyl-mannopyranoside/50 mM Tris-HCl, pH 7.2, 次いで 200 mM N-acetyl-D-glucosamine/50 mM Tris-HCl, pH 7.2 で溶出し、レンズ豆レクチン反応性トランスフェリンの抽出を行った。

Dot blotting 法は微量滴下装置を用い Tris-HCl 緩衝液, pH 7.2 で溶出したトランスフェリンおよび N-acetyl-D-glucosamine で溶出したトランスフェリン分画をニトロセルロース膜にプロットし、BSA でブロックした後、ペルオキシダーゼ標識レンズ豆レクチンを反応させ、さらにペルオキシダーゼ標識抗ペルオキシダーゼ

抗体 (DAKO) を反応させた後、DAB で発色した。

3) ELISA によるレンズ豆レクチン反応性トランスフェリン濃度の測定

ELISA は抗トランスフェリン monoclonal 抗体を固相化した 96 well microplate にレンズ豆レクチン結合アガロースカラムで得た溶出液を 100 μ l 入れ 4°C, overnight 反応させた後ビオチン化抗トランスフェリン polyclonal 抗体を反応させ avidin biotin peroxidase complex を反応した後、酵素基質として 2-2'-azinobis-thiazolin sulfonic acid を用い発色させ 405 nm の波長で吸光度を求めた。標準抗原としてヒト・トランスフェリン (Sigma) を用いた¹⁾。

4) レンズ豆レクチン反応性トランスフェリン α -L-fucosidase 感受性の検討

レンズ豆レクチン反応性トランスフェリンの α -L-fucosidase 感受性を α -L-fucosidase 処理前後のトランスフェリンで検討した。すなわち、前述の lectin blotting 法、二次元交差免疫電気泳動法および Dot blotting 法でレンズ豆レクチン反応性トランスフェリンが増加している肝細胞癌症例のトランスフェリン溶出液を 1 M HCl で pH 3.0 に平衡化しウシ副睾丸由来 α -L-fucosidase (Sigma), 4 μ g を血清 100 μ l に加え 20°C, 48 時間反応した。

α -L-fucosidase 処理前後のトランスフェリン溶出液を前述のレンズ豆レクチンアガロースカラムに入れ、200 mM N-acetyl-D-glucosamine/50 mM Tris-HCl, pH 7.2 で溶出し、さらに、レンズ豆レクチン反応性トランスフェリンを前述の lectin blotting 法で検討した。

成 績

1) Western blotting 法によるトランスフェリンの検出を Fig. 1 に示す。Lane 1 が標準トランスフェリン 500 ng で lane 1 と 2 の間が陰性コントロールである。Lane 2-9 が患者血清をトランスフェリン-affinity Sepharose 4 B column を用い 50 mM Tris-HCl 緩衝液, pH 3.0 で溶出した分画である。抗トランスフェリン単クローン抗体を用いた Western blotting 法で、すべてのサンプルで抗トランスフェリン単クローン抗体に反応するバンドが認められた。この分画をトランスフェリン溶出液として用いた。

2) レンズ豆レクチン反応性トランスフェリンの同定

a) レンズ豆レクチンによる lectin blotting 法で検討したところ、lane 1 は正常対照のトランスフェリン抽出液にはレンズ豆レクチン反応性分画は認められず、

Fig. 1. Western blotting of transferrin from a standard transferrin (Sigma) and a patients with hepatocellular carcinoma.

lane 1: Standard transferrin, lane 2-9: Each eluate of transferrin affinity Sepharose 4 B.

Fig. 2. Lectin blotting assay using horse radish peroxidase labeled Lentil lectin.

lane 1: Transferrin derived from normal subject. lane 2-5: Transferrin derived from hepatocellular carcinoma.

lane 2-5 の肝細胞癌症例のトランスフェリン抽出液にはレンズ豆レクチン反応性分画が認められた (Fig. 2).

b) Dot blotting 法でも, Tris-HCl 緩衝液のみで溶出したトランスフェリン分画にレンズ豆レクチンと反応する分画が認められず, N-acetyl-D-glucosamine で溶出した分画にはレンズ豆レクチンと反応するトランスフェリン分画が認められた (Fig. 3).

c) レンズ豆レクチンを用いた二次元交差免疫電気泳動法による検討では, 肝細胞癌トランスフェリンは陽極側への移動度の順に2峰性に分離した. すなわち, 陽極側より大きなA峰, 中程度のB峰が認められた (Fig. 4). 一方, 正常血清では, 陽極側へ移動度が早いA

Fig. 3. Cross line immunoelectrophoresis in the case of hepatocellular carcinoma.

Fig. 4. Sugar chain analysis of transferrins, isolated with transferrin affinity Sepharose 4 B, by dot blotting assay using horse radish peroxidase labeled Lentil lectin.

Fig. 5. Elution profile of Lentil lectin affinity Sepharose 4 B.

The gel volume was one ml and the fraction volume was 1.5 ml. Fraction was collected and their transferrin levels were measured with ELISA. Ordinate: logarithmic scale, AMM: alpha-methyl mannopyranoside, NAG: N-acetyl-D-glucosamine, TF: transferrin, AU: arbitrary unit (From Kodama, T. and Yachi, A.: Tumor Res., 23: 15-23, 1988).

峰のみが認められた.

3) ELISA 法によるトランスフェリン量は標準トランスフェリンを用いた検討により 0.7 ng より 200 ng までトランスフェリンの濃度依存性に直線性を認めた.

レンズ豆レクチンアガロースによるレンズ豆レクチン反応性トランスフェリンの抽出パターンを Fig. 5 に示

Fig. 6. Lectin blotting analysis using horse radish peroxidase labeled Lentil before and after treatment with fucosidase.

lane 1, 2 and 3 represented the Lentil-lectinreactive transferrin before treatment with fucosidase. lane 4, 5 and 6 represented the Lentil-lectinreactive transferrin after treatment with fucosidase.

す¹⁾. オープンサークルは正常血清の溶出パターンで、最初 Tris-HCl 緩衝液で溶出分画にトランスフェリンが検出され、次いで α -methyl-mannopyranoside さらに N-acetyl-D-glucosamine で溶出した分画には低濃度のトランスフェリンが検出された。クローズドサークルは肝細胞癌血清の溶出パターンで、Tris-HCl 緩衝液で溶出分画にトランスフェリンが認められたが α -methyl-mannopyranoside さらに N-acetyl-D-glucosamine で溶出した分画にもトランスフェリンが認められた。

4) α -L-fucosidase 処理前後のトランスフェリンのレンズ豆レクチン反応性を Fig. 6 に示す。Lane 1-3 が α -L-fucosidase 処理前で lane 4-6 が α -L-fucosidase 処理後のレンズ豆レクチンを用いた lectin blotting 法の成績である。 α -L-fucosidase で処理することによりレンズ豆レクチン反応性が減少ないし消失した。

考 案

肝細胞癌に特異性が高く肝細胞癌の血清診断に広く臨床応用されている腫瘍マーカーとして AFP²⁾、PIVKA-II³⁾ および γ -GTP isozyme⁴⁾ がある。とくに AFP は癌胎児性タンパクで胎生期に出現する糖タンパクであるが、肝細胞癌で血中に増加すると Tatarinov により報告⁵⁾されて以来、肝細胞癌の血清診断法として広く普及している。さらに、AFP はアスパラギン複合糖鎖構造を有している⁶⁾が、各種レクチンを用いた反応性の相異

が報告され⁷⁻⁹⁾、レンズ豆レクチンと反応する AFP の出現・増加が肝細胞癌で認められることが報告されている^{7,10,11)}。

青柳らはレンズ豆レクチンと反応する AFP を測定し AFP のフコシル化 index を求め肝細胞癌と肝硬変との鑑別診断に応用¹²⁾し、武田らはレンズ豆レクチン・抗体親和転写法を用い肝細胞癌の早期診断にレンズ豆レクチンと反応する AFP を応用している¹³⁾。

レンズ豆レクチンはアスパラギン複合糖鎖構造を認識し、とくにアスパラギン結合複合糖鎖末端の N-acetyl-glucosamine がフコシル化されている場合に強い親和性をもつことが知られている¹⁴⁾。

われわれはレンズ豆レクチンと反応するトランスフェリンが肝細胞癌患者血清中に出現・増加し肝細胞癌の診断に対する有用性を報告したが¹⁾、このレンズ豆レクチン反応性トランスフェリン糖鎖構造のアスパラギン結合複合糖鎖末端の N-acetyl-glucosamine がフコシル化されている可能性は容易に推測される。さらに、肝細胞癌のレンズ豆レクチン反応性トランスフェリンを α -L-fucosidase で処理することによりレンズ豆レクチン反応性の減少ないし消失することが認められたことより、肝細胞癌ではアスパラギン結合複合糖鎖末端の N-acetyl-glucosamine に fucose が結合する反応が亢進しているか、もしくは fucose を処理する反応が低下しているものと思われる。

肝細胞癌での fucosyl-transferase 活性については亢進しているとの報告がある¹⁵⁾。青柳らはレンズ豆レクチン反応性 AFP が低値の肝細胞癌症例でレンズ豆レクチン反応性トランスフェリンが高値を示す症例の存在につき報告している¹⁶⁾が、fucosyl-transferase は基質特異性が強いいためアスパラギン結合複合糖鎖構造をもつすべての糖タンパクの N-acetyl-glucosamine に fucose の結合は均等には起こらないものと考えられる。肝細胞癌では各種酵素活性の癌性変化が広く知られているが、肝細胞癌では AFP のみならずトランスフェリンを基質とした fucosyl-transferase 活性が亢進している可能性が強く示唆された。

結 論

1) Lectin blotting 法, Dot blotting 法, 二次元交差免疫電気泳動法および ELISA 法を用い肝細胞癌ではレンズ豆レクチン反応性トランスフェリンが増加していることが認められた。

2) レンズ豆レクチン反応性トランスフェリンは α -

L-fucosidase で処理することによりレンズ豆レクチン結合性の減少ないし消失することが認められた。

3) 肝細胞癌のトランスフェリンはアスパラギン結合複合糖鎖末端の N-acetyl-glucosamine がフコシル化されていることが示唆された。

4) 肝細胞癌におけるレンズ豆レクチン反応性トランスフェリン濃度は血清 AFP 濃度や血漿 PIVKA-II 濃度と相関はなかった。

5) レンズ豆レクチン反応性トランスフェリンは腫瘍マーカーとしての肝細胞癌診断に有用と思われた。

文 献

- 1) Kodama, T. and Yachi, A.: Tumor Res., 23: 15, 1988.
- 2) 谷内 昭, 他: 消化器外科, 8: 1867, 1985.
- 3) Kodama, T. et al.: Tumor Res., 22: 63, 1987.
- 4) Sawabu, N. et al.: Gann, 69: 601, 1978.
- 5) Tatarinov, Y.S.: Vopr. Med. Khim., 11: 22, 1965.
- 6) Morinaga, T. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80: 4604, 1983.
- 7) 宮崎 純, 他: 肝臓, 22: 1559, 1981.
- 8) Ishiguro, I. et al.: Cancer, 55: 156, 1985.
- 9) Aoyagi, Y. et al.: Cancer Res., 37: 3663, 1977.
- 10) Taketa, K. et al.: Tumor Biol., 6: 533, 1985.
- 11) Baumah, P.K. et al.: Clin. Chem., 32: 2083, 1986.
- 12) Aoyagi, Y. et al.: Cancer, 61: 769, 1988.
- 13) Taketa, K. et al.: Gastroenterology, 99: 508, 1990.
- 14) Kornfeld, K. et al.: J. Biol. Chem., 256: 6633, 1981.
- 15) Winston, L. H. et al.: Hepatology, 13: 683, 1991.
- 16) 鈴木康史, 他: 肝臓, 31 (suppl.): 232, 1990.

要 旨

肝細胞癌患者血清中トランスフェリン糖鎖構造の癌性変化をレンズ豆レクチンおよびフコシダーゼを用いて検討した。肝細胞癌血清トランスフェリンではレンズ豆レクチン反応性トランスフェリンの出現・増加が認められた。さらに、肝細胞癌血清由来レンズ豆レクチン反応性トランスフェリンをフコシダーゼ処理したところレンズ豆レクチン反応性が減少・消失が認められた。肝細胞癌におけるレンズ豆レクチン反応性トランスフェリンの出現・増加はトランスフェリンのアスパラギン結合複合糖鎖末端の N-acetyl-glucosamine がフコシル化されており、肝細胞癌では fucosyl-transferase 活性が亢進している可能性が示唆された。