〔シンポジウム：AFP 研究—その後の進展〕

AFP 糖鎖の癌胎児性変化

武 田 和 久

はじめに

ヒト α -フェトプロテイン (AFP) はアスパラギン結合型 2 本鎖複合型糖鎖を 1 分子当り 1 本有する癌胎児性糖蛋白であり、そのペプチド部分は肝細胞癌、ヨークサック腫瘍などの悪性腫瘍のみならず、肝炎、肝硬変でも再発現されるが、糖鎖部分に関しては肝細胞癌やヨークサック腫瘍で特異的な変化を示すことを明らかにしてきた。今回は糖鎖部分の発現を胎児肝培養液および羊水について検討し、腫瘍性変化と対比した。糖鎖の同定はオリゴ糖の特異性が明らかにされている種々のレクチンを用いた 1 次元および 2 次元親和電気泳動による。

材料と方法

ヒト血清、胎児肝組織¹⁾および肝癌株細胞²⁾の培養液中の AFP をレクチン親和電気泳動で分離し、抗体親和転写法で検出した。レクチンとしてはコンカナバリン A (Con A, 1 mg/ml)、レンズマメレクチン (LCA, 0.2 mg/ml)、赤血球凝集性インゲンマメレクチン (E-PHA, 0.3 mg/ml)、カプトムシ幼虫レクチン (allo A, 0.3 mg/ml) を用い、試料は 1 次元電気泳動では AFP 濃度を 100 ng/ml に希釈したものを $0.8 \times 0.5 \times 0.1$ mm のスロット当り 4 μ l、2 次元電気泳動では 200 ng/ml の AFP を径 2 mm のウェル当り 3 μ l 塗布し、遊離 BPB が 5.5 cm 移動するまで泳動した。得られた 1 次元電気泳動の AFP バンドはレクチンの頭文字に 1 から親和性が大きくなるに従って大きい数字を付して区別し、2 次元電気泳動のスポットは二つの 1 次元電気泳動の組合せで示した³⁾。

成 績

胎児肝培養液中の AFP 糖鎖の変化をまとめて図 1

に示した。肝細胞癌で高頻度 (69/104, 66%) に増加 (>15%) するレンズマメレクチン (LCA) 反応性のコアの *N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) にフコース (Fuc) が $\alpha 1 \rightarrow 6$ 結合した AFP-L 3 (図 2 の最下段の AFP-P 5-A 3 以外の +Fuc $\alpha 1 \rightarrow 6$ のもの) はすでに報告したごとく⁴⁾、13 週の胎児肝が産生した AFP では 46% を占めたが、23 週では約 21% に減少し、出生時には 9% となった。同じく肝細胞癌では陽性頻度が最も高い (80/104, 77%; >12%) モノシアロ AFP-P 4 (図 2 の P 4-A 3) は 13 週から 16 週で 23~24% を占め、出生時には 14% にまで低下した。肝外 AFP 産生腫瘍で増加を示す AFP-P 5 は胎児肝では著明な変化を示さなかった。コンカナバリン A (Con A) に非反応性の AFP-C 1 はバイセクト型の GlcNAc が存在する (図 2 の下段の P 5-A 3) か、3 本鎖ないし 4 本鎖の複合型糖鎖であるが、この糖鎖を有する AFP も胎児肝で著明

図 1. 胎児肝培養液中の各 AFP バンドの占める割合の変化

Oncofetal alterations of AFP sugar chains.

Kazuhiisa Taketa; 岡山大学医学部公衆衛生学

Correspondence address: Kazuhiisa Taketa, Department of Public Health, Okayama University Medical School, 2-5-1, Shikata-cho, Okayama 700, Japan.

第 45 回日本電気泳動学会総会・シンポジウム

AFP bands	Possible sugar chain structures
P 2 - A 3	$\begin{array}{l} \text{NeuAc } \alpha 2 \rightarrow 6\text{Gal } \beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc } \beta 1 \rightarrow 2\text{Man } \alpha 1 \\ \quad \searrow 6 \\ \quad \text{Man } \beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc } \beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc} \rightarrow \text{Asn} \\ \quad \nearrow 3 \\ \text{NeuAc } \alpha 2 \rightarrow 6\text{Gal } \beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc } \beta 1 \rightarrow 2\text{Man } \alpha 1 \end{array}$ <p style="text-align: right;">$\pm \text{Fuc } \alpha 1$ $\downarrow 6$</p>
P 3 - A 3	$\begin{array}{l} 4\text{GlcNAc } \beta 1 \rightarrow 2\text{Man } \alpha 1 \\ \quad \searrow 6 \\ \quad \text{Man } \beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc } \beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc} \rightarrow \text{Asn} \\ \quad \nearrow 3 \\ \text{NeuAc } \alpha 2 \rightarrow 6\text{Gal } \beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc } \beta 1 \rightarrow 2\text{Man } \alpha 1 \end{array}$ <p style="text-align: right;">$\pm \text{Fuc } \alpha 1$ $\downarrow 6$</p>
P 3 - A 1 s	$\begin{array}{l} \text{GlcNAc } \beta 1 \rightarrow 2\text{Man } \alpha 1 \\ \quad \searrow 6 \\ \quad \text{Man } \beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc } \beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc} \rightarrow \text{Asn} \\ \quad \nearrow 3 \\ \text{Gal } \beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc } \beta 1 \rightarrow 2\text{Man } \alpha 1 \end{array}$ <p style="text-align: right;">$\pm \text{Fuc } \alpha 1$ $\downarrow 6$</p>
P 3 - A 1 s	$\begin{array}{l} \text{GlcNAc } \beta 1 \rightarrow 2\text{Man } \alpha 1 \\ \quad \searrow 6 \\ \quad \text{Man } \beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc } \beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc} \rightarrow \text{Asn} \\ \quad \nearrow 3 \\ \text{GlcNAc } \beta 1 \rightarrow 2\text{Man } \alpha 1 \end{array}$ <p style="text-align: right;">$\pm \text{Fuc } \alpha 1$ $\downarrow 6$</p>
P 4 - A 3	$\begin{array}{l} \text{Gal } \beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc } \beta 1 \rightarrow 2\text{Man } \alpha 1 \\ \quad \searrow 6 \\ \quad \text{Man } \beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc } \beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc} \rightarrow \text{Asn} \\ \quad \nearrow 3 \\ \text{NeuAc } \alpha 2 \rightarrow 6\text{Gal } \beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc } \beta 1 \rightarrow 2\text{Man } \alpha 1 \end{array}$ <p style="text-align: right;">$\pm \text{Fuc } \alpha 1$ $\downarrow 6$</p>
P 4 - A 1 s	$\begin{array}{l} \text{Gal } \beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc } \beta 1 \rightarrow 2\text{Man } \alpha 1 \\ \quad \searrow 6 \\ \quad \text{Man } \beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc } \beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc} \rightarrow \text{Asn} \\ \quad \nearrow 3 \\ \text{Gal } \beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc } \beta 1 \rightarrow 2\text{Man } \alpha 1 \end{array}$ <p style="text-align: right;">$\pm \text{Fuc } \alpha 1$ $\downarrow 6$</p>
P 5 - A 3	$\begin{array}{l} \text{NeuAc } \alpha 2 \rightarrow 3\text{Gal } \beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc } \beta 1 \rightarrow 2\text{Man } \alpha 1 \\ \quad \searrow 6 \\ \quad \text{Man } \beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc } \beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc} \rightarrow \text{Asn} \\ \quad \nearrow 3 \\ \text{NeuAc } \alpha 2 \rightarrow 6\text{Gal } \beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc } \beta 1 \rightarrow 2\text{Man } \alpha 1 \end{array}$ <p style="text-align: right;">$\pm \text{Fuc } \alpha 1$ $\downarrow 6$</p>
P 5 - A 3	$\begin{array}{l} \text{GlcNAc } \beta 1 \\ \quad \downarrow 6,4 \\ \text{Gal } \beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc } \beta 1 \rightarrow 2\text{Man } \alpha 1 \\ \quad \searrow 6 \\ \quad \text{Man } \beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc } \beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc} \rightarrow \text{Asn} \\ \quad \nearrow 3 \\ \text{NeuAc } \alpha 2 \rightarrow 6\text{Gal } \beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc } \beta 1 \rightarrow 2\text{Man } \alpha 1 \end{array}$ <p style="text-align: right;">$\pm \text{Fuc } \alpha 1$ $\downarrow 6$</p>
P 1 - A 1	not identified
P 1 - A 2	"
P 3 - A 1	"
P 4 - A 1	"
P 5 - A 1	"

図2. E-PHA および allo A で分離される AFP スポットの推定糖鎖構造

な増加はみられなかった。

一方、羊水においては、バイセクト型 GlcNAc (可能性としては3本ないし4本の側鎖)を有する AFP-C 1 およびバイセクト型 GlcNAc を有するものにさらに Fuc がコアの GlcNAc に結合した AFP-L 2 (図2の Fuc α 1 $\rightarrow$ 6 を有する P 5-A 3) は妊娠6週でそれぞれ85%および98%に存在し、AFP-L 2 は16週前後で消失したが AFP-C 1 は16~18週では15%認められた。バイセクト型の GlcNAc をもたないコアの GlcNAc がフコシル化された AFP-L 3 は妊娠7週前後で45%と最高値を示し以後低下した。Man α 1 $\rightarrow$ 3 分岐側のモノシアロ AFP ないしアシアロ AFP (それぞれ図2の P 4-A 3 および P 4-AIs) は12~32%の変化に留まったが、AFP-P 5 (図2のシアル酸が Man α 1 $\rightarrow$ 6 分岐鎖の Gal に α 2 $\rightarrow$ 3 で結合した P 5-A 3 とバイセクト型の P 5-A 3) は6週で60%を占め、出生時には6%まで低下した。糖鎖構造未決定の AFP-P 1 は妊娠6,7週でのみ、また AFP-P 3 f は妊娠11週までのごく初期に認められたのみであった。一方, allo A に非反応性の構造未決定の AFP-A 1 は16週までの羊水にみられ、アシアロ AFP の AFP-P 4 (図2の P 4-AIs) は妊娠6,7週の初期の羊水に存在したのみであった。

図2に示した AFP の糖鎖構造を定める基本となった2次元のレクチン親和電気泳動において、Con A 非反応性の AFP-C 1 は LCA に対しては親和性が減弱した AFP-L 2 のスポットに (図3), E-PHA に対しては親和性が最も強い AFP-P 5 のスポットに (図4) 対応したが AFP-C 1 には AFP-P 5 以外の成分 (AFP-P 1, AFP-P 3 f—YO 例, AFP-P 4—TY 例) も含まれた。バイセクト型の AFP-P 5 と非バイセクト型の AFP-P 5 はそれぞれ AFP-C 1-P 5 と AFP-C 2-P 5 (図4の TY 例) として分かれたが、AFP-P 5-C 1 中の多分岐鎖の AFP はダツラレクチン (DSA) の使用によってはじめて DSA 反応性の AFP-P 5-C 1-D 4 として分離された。ただし、量的には全 AFP のごく一部にしか過ぎなかった。ノイラミニダーゼで消化されて AFP-P 4 となる AFP-P 5 はヒマレクチン RCA-120 で AFP-R 1 として分離され、一方ノイラミニダーゼで消化されない AFP-P 5 は AFP-R 3 として分離された (図5)。

考 察

肝細胞癌で高頻度に増加するコアの GlcNAc がフコシル化された AFP-L 3 および Man α 1 $\rightarrow$ 6 側鎖に露出した Gal を有するモノシアロ AFP-P 4 はいずれも

図3. LCA (1次元)—Con A (2次元) 親和電気泳動
YST, ヨークサック腫瘍; HCC, 肝細胞癌。

図4. Con A (1次元)—E-PHA (2次元) 親和電気泳動

妊娠23週ぐらいまでの胎児肝でその産生増加が認められたが、その増加の程度は肝細胞癌で80~90%にも達する AFP-L 3 のほうが50%前後までの増加しか示さない AFP-P 4 に比し、大であった。

一方、ヨークサック腫瘍で増加するバイセクト型の GlcNAc を有する AFP-L 2 あるいは AFP-C 1 はすで

図5.E-PHA (1次元) - RCA-120 (2次元) 親和電気泳動
Gast Ca, 胃癌.

に報告されているごとく⁵⁻⁷⁾ 妊娠初期の羊水 AFP のほとんどを占め, AFP-P 5 も 60% に認められ, ヨークサック腫瘍に特異的な AFP-P 1, AFP-P 3 f, AFP-AIs も妊娠のごく初期の 6, 7 週に羊水中に認められた. 羊水中のこれらの糖鎖偏倚は胎児肝が産生する AFP に比してより早期に認められ, 糖鎖に関しては肝よりも羊水でより早期に分化が進むともいえるが, 逆に肝では妊娠 13 週でほとんどの AFP が Con A に結合性であり, 胎児肝でのコア GlcNAc のフコシル化およびジシアル化が羊水中の AFP に比してむしろ遅れているともいえる.

各糖鎖の分化の相のずれを AFP のレクチンとの反応性から見る場合, 共通の変化は差し引いて考える必要がある. たとえば羊水の AFP-L 2 は妊娠 16 週前後で消失するのでバイセクト型の GlcNAc を有する糖鎖はそれ以後はないはずである. したがって, それ以後の AFP-C 1 は多分岐鎖を有するものか, Con A の認識に必要なトリマンノシルコアの欠損のあるものなども考える必要がある. しかし, DSA に反応する多分岐糖鎖⁸⁾ は AFP-C 1 の増加を認める例でもその一部にしか過ぎなかった.

今回の 2 次元のレクチン親和電気泳動で, AFP-P 5 を構成する糖鎖は, Man α 1 $\rightarrow$ 6 側鎖にシアル酸が α 2 $\rightarrow$ 3 結合したジシアロ AFP (AFP-C 2 に属す) と Con

A に反応性のない AFP-C 1 に分けられたが, Con A のほか RCA-120 でも両者を分離しうることが明らかとなった. ノイラミナーゼ処理で AFP-P 5-R 1 は消失 (AFP-P 4 に変換) するので, この分画にバイセクト型糖鎖を有するものがないことは明らかであるが, 多分岐鎖を有する AFP もノイラミナーゼに対して同様に反応して消失するか否かは今後に残された課題である. いずれにしても DSA 反応性の多分岐鎖糖鎖を有する AFP は AFP-P 5 に含まれ, 量的にはそのごく一部に過ぎない成分であることも同時に明らかとなった.

文 献

- 1) Tokiwa T, Miyagiwa M, Kawai A, Matsuura K, Taketa K, Okigaki T, Sato J. The effect of conditioned medium on fetal human liver cells in primary culture. *Res Exp Med* 1986; 186: 463-8.
- 2) Nakabayashi H, Taketa K, Miyano K, Yamane T, Sato J. Growth of human hepatoma cell lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res* 1982; 42: 3858-63.
- 3) Taketa K, Fujii Y, Taga H. Characterization of E-PHA-reactive α -fetoprotein isoforms by two-dimensional lectin affinity electrophoresis. *Electrophoresis* 1993; 14: 1333-7.
- 4) Yamashita K, Taketa K, Nishi S, Fukushima K, Ohkura T. Sugar chains of human cord serum α -fetoprotein: Characteristics of N-linked sugar chains of glycoproteins produced in human liver and hepatocellular carcinomas. *Cancer Res* 1993; 53: 2970-5.
- 5) Ruoslahti E, Engvall E, Pekkala A, Seppälä M. Developmental changes in carbohydrate moiety of human α -fetoprotein. *Int J Cancer* 1978; 22: 515-20.
- 6) Mackiewicz A, Bręborowicz J. The *in vitro* production of α -fetoprotein variants by human fetal organs. *Oncodev Biol Med* 1980; 1: 251-61.
- 7) Toftager-Larsen K, Kjaersgaard E, Jacobsen JC, Nørgaard-Pedersen B. Reactivity of amniotic fluid α -fetoprotein with concanavalin A in relation to gestational age: Clinical implications. *Clin Chem* 1980; 26: 1656-9.
- 8) Taketa K, Ichikawa E, Yamamoto T, Kato H, Matsuura S, Taga H, Hirai H. *Datura stramonium* agglutinin-reactive α -fetoprotein isoforms in hepatocellular carcinoma and other tumors. *Tumor Biol* 1990; 11: 220-8.