〔会長講演〕

ペプシノゲンの基礎と臨床

三 木 一 正

SUMMARY

As the lecture of Prediscent of the 50th Spring Meeting of the Japanese Electrophoresis Society, covered the own group's research field during the past about 20 years periods. Basic aspect and clinical significance of pepsinogens were reviewed. Contents of the lecture were the cellular localization of pepsinogen granules in the one cell, the activation mechanism of it, the entire human pepsinogen A and C genes, and the nucleotide sequence of all the exon and the 5'-and 3'-flanking regions. Topics of isozymes of human pepsinogen A (I), the schema of pepsinogen-producing mechanisms from mRNA, and electrophoretic pattern of pepsinogen A (I) from human gastric mucosa using agar-gel, were included. On the other hand, as for the clinical significance of pepsinogens, the first case report of pepsinogen producing gastric carcinoma with high pepsinogen II levels in both serum and ascites, and pepsinogen I and II immunohistochemical staining in gastric carcinoma tissues using the monoclonal antibodies, were presented. Finally, the clinical application of the serum pepsinogen levels in the research of *Helicobacter pylori* infection, gastric cancer development in the course of carcinogenesis from atrophic gastritis to gastric cancer in the population level, gastric cancer screening using serum pepsinogen test kits, which were commercially available now in Japan, and the significance of low serum pepsinogen levels to detect stomach cancer associated with extensive chronic gastritis, which was a precancerous condition of gastric cancer, were discussed.

Key words: pepsinogen A (I), pepsinogen C (II), primary structure of pepsinogens, gastric cancer, atrophic gastritis.

ペプシノゲンの基礎

1. ペプシノゲングループ

蛋白分解酵素にはいくつかのグループが存在する。ペプシノゲンの活性型であるペプシンは、活性中心にアスパラギン酸を有するアスパラギン酸蛋白分解酵素の代表的酵素である。その中で、ペプシン、ペプシノゲンはさらに3つのグループ、ペプシノゲンA(I)、ペプシノゲンB(II)およびプロカイモシンに分けられる。

2. ペプシノゲンの細胞内動態

核の中にあるペプシノゲンの遺伝子が発現されてmRNAができ、mRNAは、リボソームと結合したもの

が、さらに粗面小胞体の膜上に結合した形で翻訳され、生合成が行われ、プレペプシノゲンの形で小胞体の中に取り込まれ、小胞体の膜を通過する時にシグナルペプチドがとれ、ペプシノゲンに変換され、ゴルジ装置を通り、最終的には分泌顆粒に入り、必要に応じて胃の内腔に開口分泌される。最後に胃の内腔に酸性条件下で活性化される。

3. ペプシノゲンの分子内動態と活性化機構

ペプシンのアミノ末端に約60個のアミノ酸からなるペプチドがついている。この先端部分が活性化ペプチドで、ペプシノゲンがペプシンに変換される際に切断、放出される。生合成の直後には、活性化ペプチドの前にさらに、余分なペプチドが付いており、これがシグナルペプチドであ

Basic aspect and clinical significance of pepsinogens.

Kazumasa Miki; 東邦大学医学部第1内科

Correspondence address: Kazumasa Miki, First Department of Internal Medicine, Toho University, School of Medicine, 6-11-1, Ohmori Nishi, Ohta-ku, Tokyo 143-8541, Japan.

略号一覧: PG, pepsinogen; PG I (A), pepsinogen I (A); PG II (C), pepsinogen II (C); RIA, radioimmunoassay; EIA, enzymeimmunoassay; LIA, lateximmunoassay.

第50回日本電気泳動学会春季大会・会長講演

Fig. 1. プタペプシノゲンと活性化ペプチド.

る。このものは、生合成されるとすぐに小胞体の中に取り込まれ、シグナルペプチダーゼの作用で、シグナルペプチドがはずれる。シグナルペプチドは膜通過にだけ必要な部分である。

このような形でできたペプシノゲンは、細胞内の中性付近では非常に安定な分子である。酸性条件下で蛋白分解活性が出現する。すなわち、酸性条件下で分子のコンフォメーション変化が起きて N 末端部位の附近のペプチド鎖は自分の分子の活性部位に当たり、活性化ペプチドの切断が生じ、この結果ペプシン分子が誕生する。このペプシノゲンの活性化は、分子的には酸性条件下で、ペプシノゲンから活性化ペプチド鎖がはずれることによって起こり、この機構は現在では十分に解明されている。すなわち、分子内および分子間の反応として生じる。また、N 末端から活性化ペプチドが、one-step あるいは multi-step に切断され、ペプシンに変換される。ペプシノゲンの活性化は、酸性条件下で、コンフォメーション変化が生じ、N 末端の活性化ペプチドが活性中心にはさまり切断され、これにより中間型、そして活性型であるペプシンができる。これらの分子は直ちにペプシノゲンに作用し、分子間反応による活性化を生じる。このように、分子間および分子内反応により、胃内膜で急速に活性化が起こる。

4. ペプシノゲンの立体構造

プタペプシノゲンの X 線結晶解析による立体構造 (Fig. 1) を示す。I 45 から先がペプシン部分、L 1 P から L 44 P の部分が活性化ペプチドである。触媒残基と考え

Fig. 2. アスパラギン酸プロテアーゼファミリーの分子の系統樹.

られている 2 つのアスパラギン酸からなる活性中心は分子の中央にある。酸性条件下での活性化に際しては活性化ペプチドがこの活性中心に近づくことで自己切断を受ける。

5. ペプシノゲンの一次構造

ペプシノゲン A (ペプシノゲン I) は 373 アミノ酸残基からなる蛋白で、3 カ所に S-S 結合、すなわちジスルフィド結合があり、これは、すべての種族のペプシノゲン A で共通に認められる。N 末端には活性化ペプチドがあり、リジン、アルギニン等の塩基性アミノ酸が多く存在する。これが、はずれたペプシン部分は非常に酸性蛋白となる。活性中心はアスパラギン酸が存在する。ペプシノゲン C (ペプシノゲン II) も構造上、S-S 結合の位置はペプシノ

Fig. 3. ヒトペプシノゲン A 遺伝子 (λ HPGA 1) の構成。

Fig. 4. ヒトペプシノゲン A, ヒトペプシノゲン C, ヒトレンニンおよびラットペプシノゲン C 遺伝子の構成。

ゲン A と全く同じで、活性部位、アスパラギン酸の位置も同じである。ペプシノゲンの一次構造は、種を越えて相溶性が高く、S-S 結合の位置は保存されている。このようにペプシノゲンは種族差を越えて共通の構造を頑固に維持している。進化に対して非常に保守的な分子である。この一次構造より作製したペプシノゲンの分子系統樹 (Fig. 2) を示すが、最初に存在した共通の祖先となるプロテアーゼ蛋白から、ペプシノゲン C (ペプシノゲン II) が分かれ、ペプシノゲン A とプロカイモシンのグループが分かれ、その後種族差による分化によって分かれていることが推定されている。

6. ペプシノゲン遺伝子の構造

ペプシノゲン A (ペプシノゲン I) 遺伝子の構造 (Fig. 3) は、通常の遺伝子と同様に、5' 側の領域には TATA box 等、転写調節部位のシグナルとなる配列をはじめ種々の調節配列が存在する。TATA box の前にはパンドローム様の構造があり、転写調節に役立っていると考えられている。また、3' 側の領域には mRNA のポリ A を付着させるための配列が存在する。ペプシノゲンをコードとする配列は 8 つの介在配列 (イントロン) により 9 つの領域 (エクソン) に分かれて存在する。シグナル配列は第一番のエクソンに存在し、活性化ペプチド部分は、第二エクソンに存在する。同様に、ペプシノゲン C 遺伝子の 5' 側と 3' 側の構造も、イントロンの位置は全く同じで 8 つあり、9 つのエクソンから構成されている。シグナルペプチド、活性化ペプチド、ペプシン部分の各ドメインの割付けは A とほぼ同じである。ペプシン部分は一部第二エクソン

Fig. 5. 遺伝子重複による酸性プロテアーゼで起こりうる進化のシエマ。

部分に存在するが、主要部分は第三エクソン以降の部分に存在する。ヒトとラットのペプシノゲンおよびレンニンのエクソンとイントロンの位置を比較する (Fig. 4) と、酸性プロテアーゼグループのレンニンは、ペプシンよりもさらに多い 10 のエクソンから構成されているが、このことは、各ドメインが進化的に寄り集まって本酵素のファミリーが出来上がった可能性を示唆する。ペプシノゲンについては各エクソン部分のアミノ酸の数は各ペプシノゲンで厳密に保存され共通であるが、イントロンの長さはペプシノゲンの種類によっても、また、種族によってもかなり異なっており、規則性は認められない。構造上に厳密性は要求されない領域である。また、エクソン 3, 4, 6, 7 の部位は蛋白構造上と同様に、お互いに共通性の高い領域が存在する。

これらの蛋白レベルおよび遺伝子構造の研究から、ペプシノゲンをはじめとする酸性プロテアーゼの遺伝子は、最

Fig. 6. ペプシノゲンアイソザイム Pg3 および Pg5 の一次構造.
E: グルタミン酸, K: リジン.

Fig. 7. ペプシノゲン遺伝子からペプシン産生のシエマ.

初, 今の半分位, 17,000 位の分子量を持つものが, 遺伝子重複を起こして 2 つに分かれ, さらに多少変異した後に融合して, 2 倍の 35,000 前後の分子量の酵素となるに至ったと考えられており (Fig. 5), 遺伝子構造からもこのことが支持される.

7. ペプシノゲンアイソザイム

ヒトでは複数のアイソザイムが知られている. 遺伝子クローニングにより, 複数の遺伝子の tandem (団子状) な配列が判明しており, 日本人では少なくとも 3 つ, 欧米では 4 つの遺伝子が確認されている.

遺伝子をコードするペプシノゲンの構造上の差異はわずかだ, 点突然変異のレベルで説明できる. ペプシノゲン A (ペプシノゲン I) のアイソザイムである Pg3 と Pg5 の活性化ペプチド上の違いは 43 番目の 1 アミノ酸の差異のみである (Fig. 6). このことは活性化の過程の差異として反映されるが, これ以外の部位の変異の機能的な差異は不明である.

このような構造 (Fig. 7) からなるペプシノゲン遺伝子から転写後, キャップ構造, poly(A) 付加, スプライシングを経た mRNA が, 翻訳されて, ペプシノゲン A の場合, 388 アミノ酸残基からなるプレペプシノゲンが出来上

Fig. 8. 胃粘膜酸性プロテアーゼの寒天ゲル電気泳動像.

がり, シグナルペプチドがとれて 373 アミノ酸残基のペプシノゲンが出来上がることになる. このペプシノゲンが胃内腔の酸性環境下で 326 アミノ酸残基のペプシンに変換され, 消化酵素としての役割を果たすとともに, 上部消化管では, 攻撃因子としての一翼を担うことになる.

ペプシノゲンの臨床

1. 胃粘膜酸性プロテアーゼ

胃特異の消化酵素ペプシンの前駆体であるペプシノゲン (PG) は, ヒトでは免疫学的にグループ I ペプシノゲン (PGI) とグループ II ペプシノゲン (PGII) の 2 種類に大別される (Fig. 8). PGI は 5 種 (Pg1~5), PGII は 2 種 (Pg6 および 7) のサブバンドでそれぞれ構成されており, 生化学的にはそれぞれ PGI は PGA, PGII は PGC に相当する. 寒天ゲル電気泳動を行うと, それぞれ PGI は移動度が早く陽極側に, PGII は陰極側に泳動される. 原点に最も近く泳動される酸性プロテアーゼが slow moving proteinase (SMP) であり, onco-fetal protein の 1 つである.

2. RIA 法および EIA 法による測定系の開発

われわれは, 高橋らと共同して得られた PGA (I) および C (II) の精製標品を用いて, 抗ヒト PGI 抗体および II 抗体のポリクローナル抗体, ついでモノクローナル抗体の

作製を行うとともに、PGI および II の測定系である RIA 法、ついで EIA 法を開発した。

3. 胃癌組織 PGI および PGII 免疫組織化学的検討

胃癌細胞が PG を産生することは抗ペプシン抗体および抗ガストリクシン抗体を用いて、また、抗ヒト・PGI および II 抗体を用いての報告があるが、いずれもポリクローナル抗体での報告である。われわれは抗ヒト PGI および II モノクローナル抗体を用いて胃癌 ($n=107$) で免疫組織化学的に検討し報告した。正常胃底腺組織で ABC 法を行った免疫組織化学染色像では正常胃粘膜胃底腺および幽門腺の両者で主細胞および副細胞が褐色調に染色される。正常細胞での PGI および II の細胞内局在は、PGI は主細胞および副細胞のみに存在するのに対し、PGII は主細胞、副細胞だけでなく、噴門腺、幽門腺およびブルネル腺にも存在し、胃内全域および十二指腸にまたがって広く存在する。胃粘膜内 PG の含有量比は幽門腺粘膜内 PGII 量を 1 とすると、胃底腺粘膜内 PGII 量が 3、PGI 量が 9 (すなわち I:II=9:4) である。PGI および II の胃粘膜内局在と胃酸およびガストリン分泌領域との関係では PGI は塩酸 (胃酸) の分泌領域に存在し、II は胃酸とガストリンの分泌領域にまたがって存在し、I と II が 2 階建のような構造となっている。胃癌では染色される場合でも、正常粘膜より弱い染色像を示す。PGI 陽性 (産生) は 2.8% で、PGII 陽性は 17.8% であり、PGI 陽性例は全て PGII も陽性であり、胃癌の PG 陽性率に I と II で差異を認めないが、早期癌と進行癌で PG 陽性率に差異を認めないが、早期癌の PGII 陽性率は隆起型に高率である。組織型別では、未分化型に高率である。リンパ腺転移の有無別では差異を認めない。また、PG 陽性率に年齢差、性差を認めないが、未分化型胃癌で PGII 陽性は全例女性であり陰性との間で性差を認める。

4. 胃癌患者血清 PG 値

胃癌が産生する PG はその背景胃粘膜 PG とは識別できない。したがって胃癌 ($n=137$) では性、年齢をマッチさせた健常対象群 ($n=288$) と対比すると、血中 PGI が減少し、II が不変ないし軽度上昇し、PGI/II 比は低値となる。また、病期別、組織型別では、早期分化型胃癌で血清 PGI および II 値が早期未分化型胃癌より低値を示し、早期未分化型胃癌は進行未分化型胃癌より高値を示す。また、われわれは高濃度の PGII が胃癌患者の血清および腹水中に認められる症例を報告したが、PGII の tumor marker としての意義は確実である。

5. 血清 PG 値による胃癌一次スクリーニング (ペプシノゲン法)

PGI/II 比が内視鏡的慢性萎縮性胃炎の進展度も忠実に反映するとともに、さらに胃癌発症の高危険群把握の可能性から、早期胃癌の診断に役立つ。慢性萎縮性胃炎が胃癌

の先行病変ないし前癌病変との予測もある。また、ヘリコバクター・ピロリの感染と PG との意義なども認められている。胃集検の一次スクリーニングに血清 PG の測定を導入するとなれば、これまでのいずれよりも、胃癌ハイリスクとして進展した萎縮性胃炎を精度よく検出できる。血清 PG の測定系はすでに RIA 法、EIA 法および LIA 法など数種類上市されて、胃癌検診システムの実用化に問題は無い。世界有数の胃癌死亡率を有するわが国において、その簡便性、経済性等から福祉・医療に直接的に貢献するものである。すでに PG 法として国内外での成果を上げつつある。

おわりに

われわれの成績を中心にペプシン・ペプシノゲン研究の基礎からその臨床応用までを述べた。

会長講演としての発表の機会をお勧め下さった第 50 回日本電気泳動学会春季大会プログラム委員会の諸先生に深謝いたします。

参考文献

- 1) Miki K, Ichinose M, Furihata C, Niwa H, Oka H, Oda T, Matsushima T. Potential peptic activity of pepsinogen of human gastroduodenal mucosa determined by fluorescent microassay method using succinyl albumin. Clin Chim Acta 1982; 121: 337-44.
- 2) Ichinose M, Miki K, Furihata C, Kageyama T, Niwa H, Oka H, Oda T, Matsushima T, Takahashi K. Radioimmunoassay of group II pepsinogen in human serum. Clin Chim Acta 1982; 122: 61-9.
- 3) Ichinose M, Miki K, Furihata C, Kageyama T, Hayashi R, Niwa H, Oka H, Matsushima T, Takahashi K. Radioimmunoassay of serum group I and group II pepsinogen in normal controls and patients with various disorders. Clin Chim Acta 1982; 126: 183-91.
- 4) Sogawa K, Fujii-Kuriyama Y, Mizukami Y, Ichihara Y, Takahashi K. Primary structure of human pepsinogen gene. J Biol Chem 1983; 258: 5306-11.
- 5) Furihata C, Tatematsu M, Miki K, Katsuyama T, Sudo K, Miyagi N, Kubota T, Jin S, Kodama K, Ito N, Konishi Y, Suzuki K, Matsushima T. Gastric and intestinal-type properties of human gastric cancer transplanted into nude mice. Cancer Res 1984; 44: 727-33.
- 6) Tatematsu M, Furihata C, Katsuyama T, Miki K, Honda H, Konishi Y, Ito N. Gastric and intestinal phenotypic expressions of human signet ring cell carcinomas revealed by their biochemistry, mucin histochemistry, and ultrastructure. Cancer Res 1986; 46: 4866-72.
- 7) Miki K, Ichinose M, Shimizu A, Huang S, Oka H, Furihata C, Matsushima T, Takahashi K. Serum pepsinogens as a screening test of extensive chronic gastritis. Gastroenterol Jpn 1987; 22: 133-41.
- 8) Huang S, Miki K, Hirano K, Hayashi Y, Furihata C, Shimizu A, Ichinose M, Oka H, Matsushima T, Takahashi K. Enzyme-linked immunosorbent assay

- of serum pepsinogen I. Clin Chim Acta 1987; 162: 85-96.
- 9) Hayano T, Sogawa K, Ichihara Y, Fujii-Kuriyama Y, Takahashi K. Primary structure of human pepsinogen C gene. J Biol Chem 1988; 263: 1382-5.
- 10) Ichinose M, Miki K, Furihata C, Tatematsu M, Ichihara T, Katsura I, Sogawa K, Kuriyama Y, Tanji M, Oka H, Matsushima T, Takahashi K. DNA methylation and expression of the rat pepsinogen gene in embryonic, adult and neoplastic tissues. Cancer Res 1988; 48: 1603-9.
- 11) Huang S, Miki K, Sano J, Ichinose M, Kawamura N, Oka H, Hirano K, Furihata C, Masugi Y, Takahashi K. Pepsinogens I and II in gastric cancer; An immunohistochemical study using monoclonal antibodies. Jpn J Cancer Res 1988; 79: 1139-46.
- 12) Miki K, Ichinose M, Kawamura N, Matsushima M, Ahmad HB, Kimura M, Sano J, Tashiro T, Kakei N, Oka H, Furihata C, Takahashi K. The significance of low serum pepsinogen levels to detect stomach cancer associated with extensive chronic gastritis in Japanese subjects. Jpn J Cancer Res 1989; 80: 111-4.
- 13) Kagayama T, Ichinose M, Miki K, Athauda SBP, Tanji M, Takahashi K. Difference of activation processes and structure of activation peptides in human pepsinogens A and progastricsin. J Biochem 1989; 105: 15-22.
- 14) Sano J, Miki K, Ichinose M, Kimura M, Kurokawa K, Aida T, Ishizaki M, Asano G, Masugi Y, Wong RNS, Takahashi K. In situ localization of pepsinogens I and II mRNA in human gastric mucosa. Acta Pathol Jpn 1989; 39: 765-71.
- 15) Ichinose M, Miki K, Tatematsu M, Furihata C, Matsushima M, Ichihara R, Tanji M, Konishi T, Obara M, Inoue H, Kurokawa K, Takahashi T, Kageyama T, Takahashi K. Hydrocortisone-induced enhancement of expression and changes in methylation of pepsinogen genes in stomach mucosa of the developing rat. Biochem Biophys Res Commun 1990; 172: 1086-93.
- 16) Ichinose M, Miki K, Wong RNS, Tatematsu M, Furihata C, Konishi T, Matsushima M, Tanji M, Sano J, Kurokawa K, Takahashi T, Kageyama T, Tang JJN, Takahashi K. Methylation and expression of human pepsinogen genes in normal tissues and their alteration in stomach cancer. Jpn J Cancer Res 1991; 82: 686-92.
- 17) Yakabe E, Tanji M, Ichinose M, Goto S, Miki K, Kurokawa K, Ito H, Kageyama T, Takahashi K. Purification, characterization and amino acid sequences of pepsinogens and pepsins from the esophageal mucosa of Bullfrog (*Rana catesbeiana*). J Biol Chem 1991; 266: 22436-43.
- 18) Asaka M, Kimura T, Kudo M, Takeda H, Mitani S, Miyazaki T, Miki K, Graham DY. Relationship of *Helicobacter pylori* to serum pepsinogens in an asymptomatic Japanese population. Gastroenterology 1992; 102: 760-6.
- 19) Tsukada S, Ichinose M, Miki K, Tatematsu M, Yonezawa S, Matsushima M, Kakei N, Fukamachi H, Yasugi S, Kurokawa K, Kageyama T, Takahashi K. Tissue- and cell-specific control of guinea pig cathepsin E gene expression. Biochem Biophys Res Commun 1992; 187: 1401-8.
- 20) Miki K, Ichinose M, Ishikawa K, Yahagi N, Matsushima M, Kakei N, Tsukada S, Ishihama S, Shimizu Y, Kurokawa K. Clinical application of serum pepsinogen I and II levels for mass screening to detect gastric cancer. Jpn J Cancer Res 1993; 84: 1086-90.
- 21) Fukamachi H, Ichinose M, Ishihama S, Tsukada S, Yasugi S, Shiokawa K, Furihata C, Yonezawa S, Miki K. Fetal rat glandular stomach epithelial cells differentiate into surface mucous cells which express cathepsin E in the absence of mesenchymal cells in primary culture. Differentiation 1994; 56: 83-9.
- 22) Kikuchi S, Wada O, Miki K, Nakajima T, Nishi T, Kobayashi O, Ihaba Y. Serum pepsinogen as a new marker for gastric carcinoma among young adults. Cancer 1994; 73: 2695-702.
- 23) Asaka M, Kato M, Kudo M, Katagiri M, Nishikawa K, Yoshida J, Takeda H, Miki K. Relationship between *Helicobacter pylori* infection, atrophic gastritis and gastric carcinoma in a Japanese population. Eur J Gastroenterol Hepatol 1995; 7: 7-10.
- 24) Kato I, Miki K, Munoz N, Vivas JH, Lopez G, Peraza S, Carillo E, Castro D, Andrade O, Sanchez V, Cano E, Ramirez H, Muggli R, Benz M, Oliver W. Determinants of plasma pepsinogen levels in a population at high risk for stomach cancer in Venezuela. Int J Cancer 1995; 62: 512-8.
- 25) Kikuchi S, Nakajima T, Nishi T, Kobayashi O, Konishi T, Inaba Y, Wada O, Satou H, Ishibashi T, Ichikawa S, Okamoto N, Hirata T, Kubo T, Sato N, Miki K, Myoga A. Association between family history and gastric carcinoma among young adults. Jpn J Cancer Res 1996; 87: 332-6.
- 26) Watanabe Y, Kurata HJ, Mizuno S, Mukai M, Inokuchi H, Miki K, Ozasa K, Kawai K. *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer, a nested case-control study in a rural area of Japan. Dig Dis Sci 1997; 42: 1383-7.
- 27) Ozasa K, Kurata HJ, Higashi A, Hayashi K, Inokuchi H, Miki K, Tada M, Kawai K, Watanabe Y. *Helicobacter pylori* infection and atrophic gastritis, a nested case-control study in a rural town in Japan. Dig Dis Sci 1999; 44: 253-6.
- 28) Muto M, Saito Y, Koike T, Miki K. A case of gastric cancer with high pepsinogen II levels in both serum and ascite. Dig Endosc 2000; 12: 42-5.
- 29) Namekata T, Miki K, Kimmey M, Fritsche T, Hughes D, Moore D, Suzuki K. Chronic atrophic gastritis and *Helicobacter pylori* infection among Japanese Americans in Seattle. Am J Epidemiol 2000; 151: 820-30.
- 30) 三木一正(編). ペプシノゲン法. 東京: 医学書院, 1998.
- 31) 三木一正. 血清ペプシノゲンの臨床的意義. 日本医事新報 1999; 3935: 1-16.
- 32) 三木一正(編). 胃悪性腫瘍(図説消化器病シリーズ 7). 東京: メディカルビュー社, 2000.