

腫瘍マーカーに関する研究

《研究の概要》

各種固形癌、白血病患者ではしばしば血清フェリチンが増加する。しかし、その増加したフェリチンは、悪性腫瘍細胞にのみ由来したものではない。そこで悪性腫瘍細胞由来のフェリチンと正常組織フェリチンの相違を追及する目的で、腫瘍細胞である HeLa 細胞のフェリチンで、モノクローナル抗体を作成した。そのうちの 1 つ MoAb 04231 は、腫瘍細胞や組織を特異的に染色することが確認された。MoAb 04231 は H サブユニットのみと反応するので、つぎに慢性白血病細胞 (K562 細胞) フェリチンの H サブユニットの cDNA を作成し、その塩基配列を決定した。その結果、翻訳領域の配列は、既知の正常肝細胞フェリチンのそれとまったく同一であった。従って、両者の相違は翻訳後の修飾にあると考え、それらのリン酸化について検討したところ、K562 細胞フェリチンのほうが多くリン酸化されていた。

L サブユニットの cDNA では 1 コのアミノ酸の相違が認められた。

上述の MoAb 04231 の対応エピトープは、リン酸化部位ではなかったが、フェリチン H サブユニットの 19 番目の Ala から 135 番目の Glu の間に存在する。現在なお検討中である。

研究者氏名及び所属機関

研究者氏名	所属機関及び地位	分担研究課題
浅川 英男	東京理科大学薬学部 教授	癌細胞、癌組織由来フェリチンと正常組織 フェリチンとの相違について
山口 稽子	東京理科大学薬学部 講師	K562 細胞フェリチンの H サブユニット及び L サブユニットの cDNA の解析

研究報告

I 研究目的

肺癌、膵癌、乳癌、肝細胞癌、転移性肝癌などの固形癌および各種白血病患者の血清フェリチンはしばしば著明に増加する。その増加したフェリチンの由来が多様であることも明らかにされている。血中に増加したフェリチンのうち、腫瘍由来のフェリチンのみを測定することが可能なら、腫瘍マーカーとしての有用性は増大する。私どもはフェリチン測定法への利用および正常と腫瘍細胞由来のフェリチン分子の相違を明らかにするために、まず HeLa 細胞フェリチンを抗原として用い、モノクローナル抗体の作成を試みた。その結果、HeLa 細胞フェリチンに特異性が高く、いろいろな正常組織のフェリチンとは反応しない抗体が得られた。

本研究では、そのことをさらに組織免疫染色によって確認するために、各種腫瘍組織お

よび白血病細胞の染色を行い、正常組織や細胞の染色結果と比較検討した。つぎに腫瘍細胞フェリチンに高い特異性を示したモノクローナル抗体の1つ、MoAb 04231のエピトープを解明するためまた正常と腫瘍細胞フェリチンの相違を明らかにするために、まず、両フェリチンのHサブユニットとLサブユニットの一次構造の比較を行った。慢性白血病(erythroleukemia)細胞、K562細胞のフェリチンのcDNAを作成し、その塩基配列の決定を行ない、既知のヒト正常肝フェリチンのそれと比較した。さらに、正常および腫瘍細胞フェリチンの翻訳後の修飾についても検討した。

II 研究計画及び材料と方法

1. HL-60、U937、K562の各種培養細胞、正常ヒト末梢血のbuffy coatおよび急性白血病(AML)患者の末梢血等の塗抹標本は常法により作成した。酵素免疫染色はPAP法(DAKO PAP kit system、ダコジャパン)で行った。一次抗体にはMoAb 04231をPBSで100倍希釈して用い、発色剤としてDABを用いた。正常マウス血清を用いて同様に酵素免疫染色したものをコントロールとした。
2. Costanzoら¹⁾のヒト肝フェリチンHサブユニットの遺伝子の塩基配列を基に、Fig.1に示した20塩基から成る6つのプライマーを合成した。また、各々のプライマーの5'末端には、EcoRIの認識配列を導入した。K562細胞より調製したpoly(A)⁺RNAを鋳型として、ランダムプライマーとMMLV逆転写酵素を用いて、1本鎖cDNAを合成した後、1a-1b、2a-2b、3a-3bをプライマーセットとして、VentDNAポリメラーゼを用いてPCRを行った。なお、PCR反応はDNAの編成を94°C、1分、アニーリングを55°Cで2分、DNA合成を72°Cで3分間を1サイクルとして、thermal cyclerを用いて計25回行った。RT-PCRで増幅したそれぞれのDNA断片を5%PAGEで分離した後、クローニングベクターpUC119のEcoRIサイトに連結し、大腸菌JM109に導入した。それぞれから得られたクローンについてジデオキシ法により塩基配列を決定した。
3. Fig.2に示したLサブユニット遺伝子の塩基配列をもとに合成したプライマーセットの1a-1b、2a-HindIII、HindIII-2bから得られた388、232、182bpのDNA断片を用い、上記のHサブユニットと同じ方法でLサブユニットの塩基配列を決定した。
4. 濃度を等しくした(1mg/ml)K562細胞フェリチンおよび正常肝フェリチンを、それぞれTris-HCl buffer saline、pH7.4(TBS)を用いて倍々希釈し、インムノドットプレートを用いて、PVDF膜に転写した。2%BSA加TBSでブロッキングを行い、0.05%Tween加TBSで洗浄した後、MoAb 04231、抗リン酸化タイロシン(APT、Boehringer Mannheim)、抗リン酸化セリン(APS、BioMaker、Israel)、抗リン酸化スレオニン(APTh、同上)とインキュベーションし、ついでビオチン標識抗マウスIgG、POD標識ストレプトアビジンを用いて、酵素免疫染色を行った。
5. K562細胞フェリチンと正常肝フェリチンをβメルカプトエタノール/SDSで処理したものを、SDS-PAGE用ゲルの試料溝に入れ、その上にV8プロテアーゼを重層してゲル内で分解し、さらに泳動を続けた。PVDF膜に転写した後、一次抗体としてAPT、APS、APThを、二次抗体としてビオチン標識抗マウスIgGヤギ血清を用い、POD標識ストレプトアビジンを用いた酵素免疫染色を試みた。
6. 5と同様に処理して得たPVDF膜を、一部はCBB染色、残りは一次抗体としてMoAb

04231 を用いて酵素免疫染色した。

7. MoAb 04231 をコートした ELISA プレートに、HeLa 細胞フェリチンを入れてインキュベートした。洗浄した後、同量のビオチン標識 MoAb 04231 と APT あるいは APTh、APS を加えて反応させた。POD 標識ストレプトアビジンついで発色剤を加えてインキュベート後、490nm の吸光度を測定した。

III 研究成果

1. 各培養細胞のライトギムザ染色では、細胞周期の各ステージを示す所見が認められた。正常マウス血清を用いたコントロールと比較して、MoAb 04231 によってすべての細胞で陽性所見が得られた。いずれも細胞質が染色され、核はまったく染色されなかった。そのうち K562 細胞の染色が最も濃く、ついで HL-60、U937 細胞の順であった。正常ヒト末梢血の buffy coat のライトギムザ染色では、各種正常白血球が認められたが、それらの免疫染色の結果は、いずれも陰性であった。AML 患者の末梢血塗抹標本では多くの myeloblast cell が観察された。これらの細胞は、MoAb 04231 を用いた酵素免疫染色によって、コントロールよりも強く細胞質が染色された。
2. Fig. 1A に示したプライマーセット 1a-1b、2a-2b、3a-3b を用いて、K562 細胞の poly (A)⁺RNA を鋳型として RT-PCR を行った結果、それぞれから 310、370、320bp を主バンドとする増幅された DNA 断片が得られた (Fig. 1B)。各々の DNA 断片から 4 つのクローンが得られたので、それらの塩基配列を決定した。その塩基配列をヒト正常肝組織フェリチン H サブユニットの遺伝子のそれと比較したところ、アミノ酸をコードする領域において、まったく相違は認められなかった。しかし、K562 細胞フェリチンの H サブユニットの cDNA では、5'-非翻訳領域 (5'-UTR) の鉄応答エレメント (IRE) と翻訳開始点の中間の G (正常肝フェリチン H サブユニット cDNA の翻訳開始点の上流 99 番目に相当) の欠失が認められた。その意義については現在のところ不明である。
3. プライマーセット 1a-1b から得たものでは、正常の L サブユニットと同じ配列をもつものが 1 クローンしかなく、他の 3 クローンのすべてでアミノ酸の 55 番目の first letter の C から T への変異が認められた。しかし、アミノ酸そのものの変異にはつながらなかった (Ala のまま)。また、そのうちの 1 つでは 55 番目の変異とともに 27 番目のアミノ酸の third letter の C から A への変異が認められたが、この変異もアミノ酸の変化にはならず、Leu のままであった。2a-HindIII については 6 つのクローンの塩基配列の決定を行った。1 つのクローンで 89 番目のアミノ酸の third letter の変異が 1 つ認められたが、他はすべて正常であった。しかしこの変異もまた、アミノ酸そのものは Glu のままで変化はなかった。HindIII-2b の 6 つのクローンのうち、5 つのクローンについてはまったく正常と同じであったが、1 つのクローンに変異が認められた。この変異は 159 番目の first letter の G が A に変化しており、アミノ酸が Glu から Lys に変る可能性を示した。
4. イムノドット法による成績を Fig. 3 に示した。抗リン酸化アミノ酸抗体のうち APT によって、K562 細胞フェリチンは最も強く染色された。正常肝フェリチンはほとんど染色されず、MoAb 04231 を用いた時と同様に、両フェリチン間で明瞭な相違が認められた。APS、APTh では、高濃度の時に正常肝フェリチンより K562 細胞フェリチンが濃く染色さ

れた。

V8 プロテアーゼで分解したものを Western blotting した後、APT、APS、APTh を用いて酵素免疫染色した結果も、イムノドット法の成績とよく一致した。すなわち、APT、APTh で K562 細胞フェリチンは正常肝フェリチンよりも高い反応性を示した。しかし、APS との反応性については両フェリチン間でほとんど差が認められなかった。

5. K562 細胞フェリチンを V8 プロテアーゼで分解して得られたバンドのうち、約 15Kd と 13Kd の 2 本のバンドが MoAb 04231 によって検出された。CBB 染色したバンドのうち、それぞれに対応するものを切りだし、アミノ酸シーケンサーによる分析を行った。そのうちの 13Kb のバンドから、ヒト肝フェリチンの H サブユニットの、19 番目の Ala から 28 番目の Glu の配列に一致する 10 コのアミノ酸が決定された。分子量が約 13Kd であることから、正常肝フェリチン H サブユニットの 19 番目の Ala から、135 番目の Glu に相当するアミノ酸 117 コのペプチドと考えられた。従って、MoAb 04231 はこの配列上に存在する修飾部位を認識しているものと思われる。そこで、その反応がアミノ酸のリン酸化に基づくものか否かを検討するために、ELISA 法による阻止試験を行った。その結果、ビオチン標識 MoAb 04231 と K562 細胞フェリチンの反応は、非標識 MoAb 04231 を加えたとき、その添加量に従って抑制されたのに対し、APT、APTh、APS のいずれによってもまったく阻止されなかった (Fig. 4)。従って、MoAb 04231 が認識するエピトープはリン酸化部位ではないと考えられた。

IV 考察

腫瘍細胞や組織に由来するフェリチンが正常のそれと、もし異なるなら、フェリチンが本来の腫瘍マーカーとしての意味を持つことになる。今回まず、HeLa 細胞フェリチンに対するモノクローナル抗体を作成し、肝細胞癌組織、²⁾ K562 細胞、HL-60 細胞、U937 細胞、AML 患者の骨髄および末梢血細胞³⁾ を特異的に染色する抗体を得た。

つぎに、K562 細胞フェリチンの H サブユニットの cDNA の塩基配列を決定し、正常フェリチンのそれとの比較した結果、翻訳領域においてはまったく同一であった。HeLa、HL-60 細胞フェリチンについても同様の結果がすでに報告^{4) 5)} されている。しかし、L サブユニットについては、1 つのクローンで正常フェリチンとアミノ酸が 1 コ異なるものが確認された。場所は異なるが、U937 細胞フェリチンの L-cDNA についても、正常肝フェリチンのそれと異なることが報告されている。⁶⁾

MoAb 04231 は HeLa および K562 細胞フェリチンの H サブユニットのみを認識する。腫瘍細胞フェリチンと正常フェリチンでは少なくとも、H サブユニットの一次構造が同じであったことから、両フェリチンでは、翻訳後の修飾が異なるのではないかと考えた。そこでまず、リン酸化について検討したところ、K562 細胞と正常肝フェリチンで明らかな差が認められ、前者が後者より特にそのチロシンが、多くリン酸化されていることが観察された。⁷⁾ しかし、MoAb 04231 の認識部位はリン酸化アミノ酸ではないことが確認された。

正常細胞フェリチンと腫瘍細胞フェリチンでは、フェロキシダーゼ活性等の性状⁸⁾ が異なることが指摘されている。今回さらに MoAb 04231 との反応性にも相違が認められた。しかし、両フェリチンのアミノ酸配列は同じであった。腫瘍フェリチンは正常フェリチンよりも多くリン酸化されていたが、MoAb の認識部位ではなかった。腫瘍細胞ではタンパク質

の糖鎖が正常と異なる例が多く報告されている。現在、MoAb 04231 の認識するエピトープに関連して、HeLa 細胞、K562 細胞フェリチンの糖鎖について検討している。正常フェリチンと腫瘍フェリチンの差はリン酸化や糖鎖など、翻訳後の修飾に由来するものであることが推測された。

V 文献

- 1) Costanzo F et al, Structure of gene and pseudogenes of human apoferritin H: *Nucleic Acids Res.*, 14, 721, 1986.
- 2) 浅川 英男他、HeLa フェリチンに特異的なモノクローナル抗体の作成とその性状の検討：医学の歩み、153, 545, 1990.
- 3) 山口 稽子他、日本血液学会抄録集、p241, 1993.
- 4) Boyd D et al, Isolation and characterization of a DNA clone for human ferritin heavy chain: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 4751, 1984.
- 5) Chauan-chu et al, Structure and expression of ferritin genes in a human promyelocytic cell line that differentiates in vitro: *Mol. Cell Biol.*, 6, 566, 1986.
- 6) Dorner M. H., Structure of human ferritin light subunit messenger RNA; comparison with heavy subunit message and functional implication: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 3139. 1985.
- 7) 浅川 秀男他、K562 細胞フェリチンと正常ヒト肝組織フェリチンの比較検討：生物物理化学、39、No2 に掲載予定（平成 7 年 4 月発行予定）
- 8) 山口 稽子他、3' Me-DAB 誘発肝癌フェリチンと正常フェリチンの比較研究－鉄取り組みと Ferroxidase 活性について－：生物物理化学、35、129、1991.

VI 研究成果の発表

浅川 秀男他、K562 細胞フェリチンと正常ヒト肝組織フェリチンの比較検討：生物物理化学、39、No2 に掲載予定（平成 7 年 4 月発行予定）

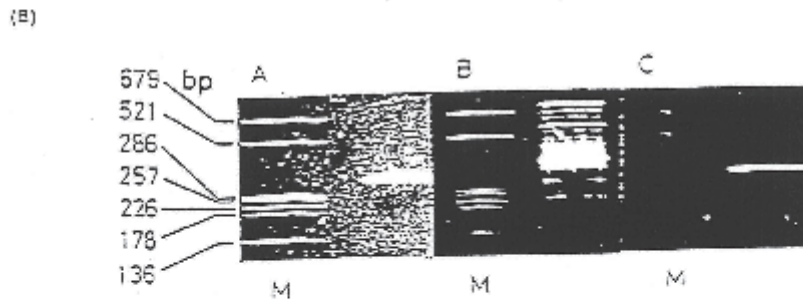
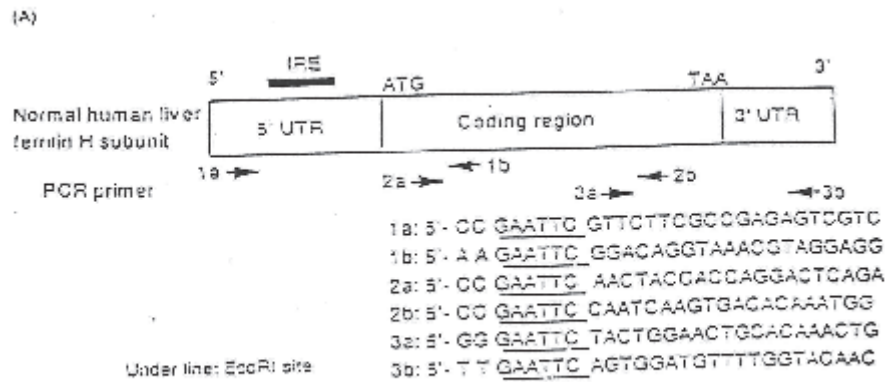
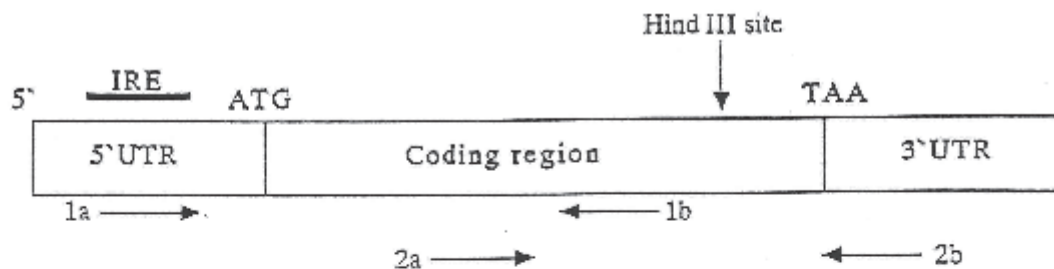


Fig.1 The positions and nucleotide sequences of primers for the amplification of K562 ferritin H subunit cDNA fragments by RT-PCR(A) and SDS-PAGE of RT-PCR products (B)



Primer

1a: 5'- GAATTCATCCGGGGACTCTCTTCCAG -3'

1b: 5'- AAGCTTGATGTCTCTGGAAGAGAGCGC -3'

2a: 5'- GAATTCCGAGCGTCTCTCTGAAGATGC -3'

2b: 5'- AAGCTTTCGCTGGGCTCAGAAGGCTC -3'

— : EcoRI 認識配列

— : Hind III 認識配列

Fig.2 The positions and nucleotide sequences of primers for the amplification of K562 ferritin L subunit cDNA fragments by RT-PCR

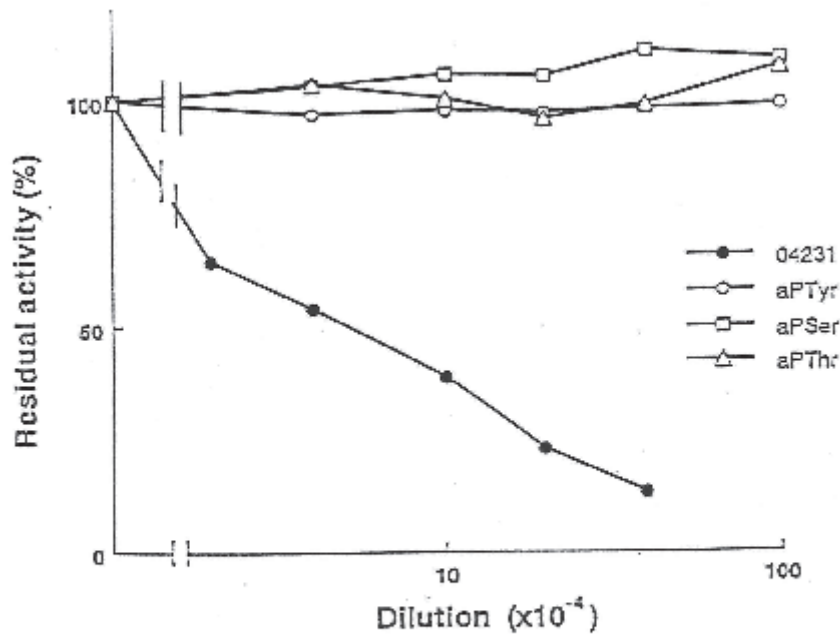


Fig.3 Effect of APT,APS and APTh on the reactivity of biotinated MoAb 04231 to HeLa cell ferritin

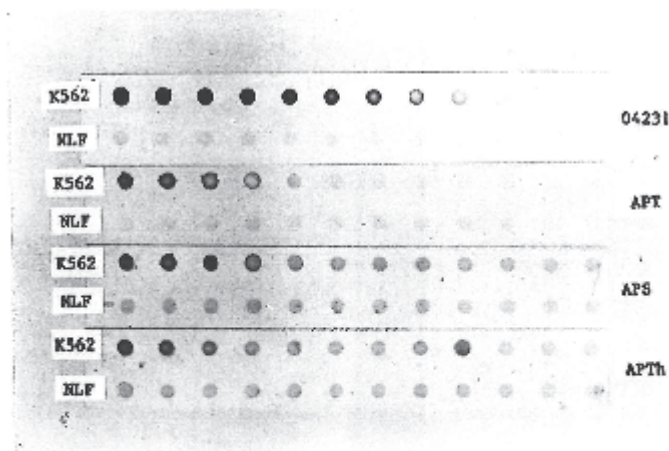


Fig.4 Reactivities of APT,APS and APTh to normal liver and K562 cell ferritins