

学位論文題名

胎児肝臓および婦人科領域腫瘍により産生される
alpha-fetoprotein 糖鎖不均一性に関する検討

学位論文内容の要旨

緒言

Alpha-fetoprotein (AFP) は、癌胎児性蛋白質であり分子量は約 7 万で 591 個のアミノ酸からなり、N 末端から 233 番目のアミノ酸に、アスパラギン結合型糖鎖を 1 本有している。1970 年、AFP の精製と化学的同定がなされて以来、卵黄嚢や胎児肝臓あるいは肝細胞癌や卵黄嚢腫瘍などから得られる AFP の間には分子構造的に差はないとされてきたが、レクチン結合性の変化などにより、その違いは肝細胞癌と肝硬変などとの鑑別診断などにも応用されるようになってきている。

本研究では、胎児肝臓組織・臍帯血・羊水・妊娠母体血から得られた AFP のレクチン結合性の変化を分析することにより、母体血中に移行する過程における AFP 糖鎖の変化を検討することを目的とした。

また肝細胞癌と同一の形態学的特徴を有する異所性肝細胞癌とも考えられる肝様腺癌ならびに卵巣および腔に発症した卵黄嚢腫瘍をはじめとする胚細胞性腫瘍の患者血清から得られた AFP のレクチン結合性の変化を分析することにより、AFP 産生腫瘍の発症臓器や組織型、あるいは分化度の違いによる AFP 糖鎖の不均一性の変化も併せて検討した。

材料と方法

1) 妊娠 16-17 週において羊水穿刺を行い染色体分析により胎児 trisomy 21 妊娠と診断され、十分なインフォームドコンセントの得られた 5 症例 (36±2 歳) を対象とした。羊水穿刺直前に採取された母体血、羊水穿刺時における羊水、人工妊娠中絶時に得られた胎児肝臓組織と、1 例においては臍帯血を研究材料とした。2) 胎児肝臓組織は血液除去後、ガラスホモジナイザーを用いて細胞を破壊した。5 例中 3 例は超音波処理を追加したが 2 例は施行せず、遠心後上清を胎児肝臓組織抽出液とした。3) 150 U/ml の濃度に調整したシアリダーゼに、胎児肝臓組織抽出液を加え 24 時間後、電気泳動に供した。4) AFP 産生婦人科腫瘍として、卵巣原発胚細胞性腫瘍 7 例 (未熟奇形腫 4 例、未分化細胞腫 1 例、卵黄嚢腫瘍 2 例) と腔原発卵黄嚢腫瘍 1 例および肝様腺癌 4 例 (子宮体部原発 2 例、卵巣原発 2 例) を対象とした。5) AFP 濃度は、AFP 測定キット(RIA)を用いて測定した。6) コンカナバリン A (Con A), レンズマメレクチン(LCA), 赤血球凝集性インゲンマメレクチン

ン(E-PHA) , ヒマレクチン(RCA120) , シロバナヨウシュチヨウセンアサガオレクチン(DSA)およびカブトムシ幼虫レクチン(allo A)を含む, アガロースプレートを作成し, AFP濃度を調整した検体を電気泳動した. 泳動後ウマ抗 AFP 抗体結合ニトロセルロース膜を圧着し AFP を転写し, 家兎抗 AFP 抗体, ヤギ抗家兎 IgG 抗体を加え, ホルマザン発色により可視化した. band 強度は総和に対する比率で数値化した. 7) 統計学的有意差検定には Student's *t* test を用いた.

結果

羊水中の AFP 濃度は, 胎児肝臓組織の AFP 濃度よりも有意($p<0.05$)に, また母体血清中の AFP 濃度よりも有意($p<0.005$)に高値を示した.

肝臓の C3+C2 分画比は最も高値で, 羊水は肝臓に比較し有意($p<0.0001$)に, また母体血清に比較し有意($p<0.01$)に低値を示した.

肝臓の L3 分画比は, 母体血清に比較し有意($p<0.01$)に低値を示し, 羊水に比較し低い傾向($p=0.0578$)を認めた. 羊水中に認められた L2 分画($11.7\pm 1.5\%$)は, 肝臓と母体血清においては認められなかった.

肝臓の P5 分画比は羊水より有意($p<0.0001$)に, 母体血清より有意($p<0.05$)に低値を示した. 母体血清 P5 分画比は, 羊水より有意($p<0.005$)に低値を示した. 肝臓 P4 分画比は羊水に比較し有意($p<0.05$)に低値を示した. 肝臓 P5+P4 分画比は羊水に比較し有意($p<0.005$)に低く, 母体血清より低い傾向($p=0.0593$)を認めた. 母体血清 P5+P4 分画比は羊水に比較し有意($p<0.05$)に低値であった.

羊水の R3+R2 分画比は, 肝臓より有意($p<0.001$)に, 母体血清より有意($p<0.005$)に高値を示した. 肝臓組織抽出液では超音波処理を追加した 3 例においては, $49.1\pm 3.6\%$ が R0 分画であった.

肝臓腺癌に関しては, 原発臓器の違いに, また胚細胞性腫瘍に関しても, 組織型あるいは原発臓器の違いにより C2 分画比に差を認めなかった. しかし肝臓腺癌は胚細胞性腫瘍に比較し, 有意($p<0.01$)に高い C2 分画比を示した. 肝臓腺癌において明確な L2 分画を認めなかったが, 胚細胞性腫瘍では明確な L2 分画の存在が確認された. しかし組織型あるいは原発臓器の違いによる L2 分画比に差を認めなかった. また L3+L2 分画比での肝臓腺癌と胚細胞性腫瘍の間に差を認めなかった. 肝臓腺癌における P5+P4 分画比は, 胚細胞性腫瘍よりも有意($p<0.05$)に低値を示した. 肝臓腺癌は胚細胞性腫瘍に比較して有意($p<0.001$)に低い R3 分画比を示した. 肝臓腺癌と胚細胞性腫瘍の間に D1 分画比と A3 分画比の差を認めなかった.

考察

糖鎖の生合成は一連の厳密な基質特異性を持った糖転移酵素により行われ, それらの酵素を中心とした糖鎖生合成系は, 細胞の分化や癌化に伴い変動することが知られている. 胎児肝臓組織から抽出液を得るにあたりガラスホモジナイザーのみによる細胞破壊と, それに超音波処理による細胞破壊を追加する 2 種類の方法を用いたが, 超音波処理を追加した 3 症例においては R0 分画比は 49.1% と, シアリダーゼ消化を行ってもほぼ同じ効果が得られたこと, また 32.4% もの C3 分画を認め Con A とのより強い結合能を示したことが

ら、後者ではシアル酸に加えて β -D-Galをも切断していることが考えられた。

Trisomy 21 胎児の肝臓組織における AFP 糖鎖の特徴は、C1 分画比が 1.5%、L3 分画が 28.7%、L2 分画が検出感度以下、P5 分画比が 3.1%であることを考え合わせると、ほとんどすべてが 2 本鎖複合糖鎖であること、また約 30%はフコシル化 AFP であり、バイセクト GlcNAc 残基をもつ糖鎖は極めて少ないことが明らかとなった。一方、羊水あるいは母体血清では高分岐の糖鎖が増加し、2 本鎖糖鎖が減少していることが、本研究により明らかとなった。

肝臓腺癌由来 AFP に比較し胚細胞性腫瘍由来 AFP は、バイセクト GlcNAc あるいは 3・4 本などの多分岐側鎖を持つフコシル化 AFP の比率が高く、また両者とも 70-80%がジガラクトースであるものの、肝臓腺癌由来 AFP の方がより多くの割合で末端にシアル酸を結合していることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 西 信 三
副 査 教 授 長 嶋 和 郎
副 査 教 授 藤 本 征 一 郎

学 位 論 文 題 名

胎児肝臓および婦人科領域腫瘍により産生される alpha-fetoprotein 糖鎖不均一性に関する検討

Alpha-fetoprotein (AFP) は、癌胎児性蛋白質であり分子量は約 7 万で 591 個のアミノ酸からなり、N 末端から 233 番目のアミノ酸に、アスパラギン結合型糖鎖を 1 本有している。

本研究では、胎児肝臓組織・臍帯血・羊水・妊娠母体血から得られた AFP のレクチン結合性の変化を分析することにより、母体血中に移行する過程における AFP 糖鎖の変化を検討することを目的とした。また肝細胞癌と同一の形態学的特徴を有する異所性肝細胞癌とも考えられる肝様腺癌ならびに卵巣および腔に発症した卵黄嚢腫瘍をはじめとする胚細胞性腫瘍の患者血清から得られた AFP のレクチン結合性の変化を分析することにより、AFP 産生腫瘍の発症臓器や組織型、あるいは分化度の違いによる AFP 糖鎖の不均一性の変化も併せて検討した。

妊娠 16-17 週の羊水染色体分析により胎児 trisomy 21 妊娠と診断され、十分なインフォームドコンセントの得られた 5 症例を対象とし、羊水穿刺直前の母体血、羊水穿刺時の羊水、人工妊娠中絶時に得られた胎児肝臓組織などを研究材料とした。また、AFP 産生婦人科腫瘍として、卵巣原発胚細胞性腫瘍 7 例（未熟奇形腫 4 例、未分化細胞腫 1 例、卵黄嚢腫瘍 2 例）と腔原発卵黄嚢腫瘍 1 例および肝様腺癌 4 例（子宮体部原発 2 例、卵巣原発 2 例）を研究の対象とした。コンカナバリン A (Con A)、レンズマメレクチン(LCA)、赤血球凝集性インゲンマメレクチン(E-PHA)、ヒマレクチン(RCA120)、シロバナヨウシュチョウセンアサガオレクチン(DSA)およびカプトムシ幼虫レクチン(allo A)を含む、アガロースプレートを作成し、AFP 濃度を調整した検体を電気泳動した。泳動後ウマ抗 AFP 抗体結合ニトロセルロース膜を圧着し AFP を転写し、家兎抗 AFP 抗体、ヤギ抗家兎 IgG 抗体を加え、ホルマザン発色により可視化した。band 強度は総和に対する比率で数値化した。

羊水中の AFP 濃度は、胎児肝臓組織の AFP 濃度よりも有意に、また母体血清中の AFP 濃度よりも有意に高値を示した。肝臓の C3+C2 分画比は最も高値で、羊水は肝臓に比較し有意に、また母体血清に比較し有意に低値を示した。肝臓の L3 分画比は、母体血清に比較し有意に低値を示し、羊水に比較し低い傾向を認めた。羊水中に認められた L2 分画は、肝臓と母体血清においては認められなかった。肝臓の P5 分画比は羊水より有意に、母体血清より有意に低値を示した。母体血清 P5 分画比は、羊水より有意に低値を示した。肝臓 P4 分画比は羊水に比較し有意に低値を示した。肝臓 P5+P4 分画比は羊水に比較し有

意に低く、母体血清より低い傾向を認めた。母体血清 P5+P4 分画比は羊水に比較し有意に低値であった。羊水の R3+R2 分画比は、肝臓より有意に、母体血清より有意に高値を示した。肝臓組織抽出液では超音波処理を追加した 3 例においては、 $49.1 \pm 3.6\%$ が R0 分画であった。

すなわち、羊水には、胎児肝臓あるいは母体血清の AFP に比較し、高分岐型の糖鎖とバイセクト GlcNAc 残基やフコース残基による修飾を受けた糖鎖を持つ AFP が有意に増加していることが明かとなった。

肝臓癌に関しては、原発臓器の違いに、また胚細胞性腫瘍に関しても、組織型あるいは原発臓器の違いにより C2 分画比に差を認めなかった。しかし肝臓癌は胚細胞性腫瘍に比較し、有意に高い C2 分画比を示した。肝臓癌において明確な L2 分画を認めなかったが、胚細胞性腫瘍では明確な L2 分画の存在が確認された。しかし組織型あるいは原発臓器の違いによる L2 分画比に差を認めなかった。また L3+L2 分画比での肝臓癌と胚細胞性腫瘍の間に差を認めなかった。肝臓癌における P5+P4 分画比は、胚細胞性腫瘍よりも有意に低値を示した。肝臓癌は胚細胞性腫瘍に比較して有意に低い R3 分画比を示した。肝臓癌と胚細胞性腫瘍の間に D1 分画比と A3 分画比の差を認めなかった。

すなわち、胚細胞性腫瘍の患者血清では、肝臓癌に比較して、バイセクト GlcNAc 残基による修飾を受けた糖鎖をもつ AFP が増加していることが明らかになった。

公開発表に際し、副査の長嶋教授より、AFP 糖鎖の違いが羊水・母体血・臍帯血の間でみられる理由について、ヨークザック腫瘍と他の組織型の胚細胞性腫瘍との糖鎖の相違について、胚細胞性腫瘍・肝臓癌における糖鎖自体の発生母地の反映について、肝臓組織抽出液の糖鎖が超音波処理の有無で異なる理由について、ヨークザック腫瘍と羊水ならびに肝臓癌と肝臓の糖鎖構造上の関連について、質問があった。次いで、主査の西教授からは、超音波処理による細胞酵素流出と糖鎖の変化について、3 本鎖・4 本鎖糖鎖の呼称について、ヒト羊水中の AFP の起源について、などの質問があった。最後に、副査の藤本教授からは、21 トリソミー胎児と正常胎児の肝臓組織における未分化糖鎖の出現の差について、糖鎖の種類による組織透過性・親和性の相違について、などの質問があった。

いずれの質問に対しても、申請者は、実験成績の統計学的解析結果、これまでの文献的知見、自身の臨床経験などをもとに概ね妥当な回答をなした。

胎児肝臓、臍帯血、羊水、母体血における AFP 糖鎖不均一性ならびに AFP 産生腫瘍における AFP 糖鎖不均一性をそれぞれ明らかにした本研究の成果は高く評価され、今後 AFP 糖鎖の組織特異性、親和性の解明および病的胎児の早期診断、AFP 産生腫瘍のより正確な診断に役立つことが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。