

## 学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	榎木 徹
学位論文題目			
Gamma-carboxyglutamic acid content of hepatocellular carcinoma-associated des-gamma-carboxy prothrombin (肝細胞癌患者血中に出現するDes-gamma-carboxy prothrombinのgamma-carboxyglutamic acid含量に関する研究)			
共著者名			
河野典厚、斎藤浩之、藤本佳範、大平基之、森田隆司、高後 裕			
Biochimica et Biophysica Acta 掲載予定			
研究目的			
<p>Prothrombinは肝細胞で合成された後、Gla domain中にある10残基のGlutamic acid (Glu<sup>6,7,14,16,19,20,25,26,29,32</sup>)がビタミンKを補酵素としたgamma-carboxylationを受けてgamma-carboxyglutamic acid (Gla)になり、血液凝固活性のあるprothrombinとして血中に放出される。1984年にLiebmanら<sup>1)</sup>により、gamma-carboxylationの不十分なDes-gamma-carboxy prothrombin (DCP)が原発性肝細胞癌(HCC)で高頻度に出現することが報告されて以来、HCCの診断補助として多くの施設でMU-3抗体を使用した測定系によりDCPが測定されている<sup>2)</sup>。しかしながら、低率ではあるが良性肝疾患でもDCPは出現する。良性肝疾患で生じるDCPとHCCで生じるDCPとは、ただ単に量的な違いだけであるのか、あるいは質的な違いがあるのかについてはいまだ明確になっていない。これを解決することは、HCCにおけるDCPの産生機序及びその分子特性の解明に結びつくと考えられる。</p> <p>本研究は、MU-3抗体の反応特性(エピトープ)を明らかにし、良性肝疾患とHCCで生じるDCPの分子特性の違いを明らかにすることを目的とした。</p>			
材料・方法			
蛋白質の精製及び脱炭酸			
Prothrombinはヒト血漿よりバリウム吸着、硫酸沈殿の後、DEAE Sepharose FF、Heparin Sepharose CL-6B、Blue Sepharose CL-6Bによるクロマトグラフィーで精製した後さらに、Sephacryl S-200 HR			

によるゲルろ過で精製した。Gla domain (残基1~41) は、精製したprothrombinから調製したprothrombin fragment 1 (残基1~155) に、alpha-Chymotrypsinを3000:1(W/W)、30°Cで30分間反応させて限定分解した後、Q Sepharose FF により精製した。純度はSDS-PAGE電気泳動で単一バンドを確認した。Prothrombin及びGla domain中のGlaの脱炭酸は、Bajajらの方法に準じて実施し、合成DCPとして使用した。

#### 合成ペプチド

全てのペプチドは、prothrombinの1から41残基のGla domainの一部に相当し、GlaをGluに置換したものを含む。いずれもHPLCにより99%以上の純度であることを確認し、更にアミノ酸組成分析とアミノ酸配列分析により純度を確認した。

#### Direct Binding 及びSandwich ELISA

脱炭酸prothrombin、脱炭酸Gla domain及び合成ペプチドに対するMU-3抗体の結合活性の検討は、microplateのwellに直接抗原を結合し、そのwellに種々の濃度に希釈したMU-3抗体を100  $\mu$ l加えてDirect Binding ELISA法で行った。またSandwich ELISA法としては、MU-3抗体あるいは抗prothrombin抗体をwellに吸着し、ブロッキング後、種々の濃度に希釈したsampleを各wellに100  $\mu$ l加え、2時間室温で反応させた後、酵素標識抗体を加えて発色させた。標準抗原としては脱炭酸prothrombinあるいは精製prothrombinを3%BSA-TBSで希釈して使用した。

#### 患者血清中のTotal DCP濃度及びMU-3抗体と反応するDCP量の測定

同意を得た24名の肝疾患患者及び2名の健康成人の血清にBaCO<sub>3</sub>を10%(W/V)に添加し、良く攪拌した後、ただちに3000rpmで5分間遠心して上清を採取し、その液のprothrombin 抗原濃度を測定して、Total DCP濃度とした。Total DCP 中のMU-3 抗体と反応するDCP量の測定は、採取した上清にMU-3抗体を結合した磁気ビーズを加え、室温で2時間反応後、磁石により磁気ビーズを除去した。その上清液を使用してprothrombin抗原濃度を測定し、Total DCP中にMU-3抗体と反応するDCPが何パーセントあるかについて計算した。統計学的検定は、Mann Whitney U検定で行った。

## 成 績

#### Ca<sup>2+</sup>イオンがMU-3抗体の反応性へ及ぼす影響

ProthrombinのGla domain中にCa<sup>2+</sup>イオン依存的に立体構造が変化する部分が存在し、しかも報告されているDCPモノクローナル抗体はこのような立体構造変化を認識する抗体が大多数である。このような抗体ではDCPの分子特性を解析することが不可能であるので、MU-3抗体がCa<sup>2+</sup>イオンの有無でDCP及びprothrombinとどのような反応性を示すかについて検討した。精製ヒトprothrombin、脱炭酸prothrombin及びHCC患者血清を10mM CaCl<sub>2</sub>あるいは20mM EDTA存在下及び非存在下にて種々の濃度に希釈し、Sandwich ELISAを実施した。その結果、MU-3抗体は精製ヒトprothrombinとはCaCl<sub>2</sub>及びEDTAの有無にかかわらず反応しなかった。また、MU-3抗体は脱炭酸prothrombin及びHCC患者血清とはCaCl<sub>2</sub>及びEDTAの有無にかかわらず同一の反応性を示した。

### MU-3抗体のエピトープの決定

脱炭酸prothrombin、脱炭酸Gla domain及び種々の合成ペプチドとMU-3抗体の反応性をDirect Binding ELISA法及びSandwich ELISA法のcompetition法にて検討した。その結果、MU-3抗体のエピトープはGla domain上だけにあり、fragment 1を含む他の領域は反応に全く関与していないことが明らかとなり、さらに、Gla domain内のアミノ酸残基17から27位内にあることが明らかとなった。

### エピトープ中のGlaとGluの位置

Gla domain内の17から27位は、19、20、25、26位がGla残基である領域であり、この4GlaをそれぞれGluに変える組み合わせは16通りある。この16通りについてSandwich ELISA法のcompetition法で脱炭酸prothrombinの反応抑制率を測定した結果、MU-3抗体と強く反応するのはGlu<sup>19</sup>Glu<sup>20</sup>Glu<sup>25</sup>Glu<sup>26</sup>又はGlu<sup>19</sup>Glu<sup>20</sup>Glu<sup>25</sup>Gla<sup>26</sup>であり、19、20、25位がGluであることが必須であった。25位がGla化したGlu<sup>19</sup>Glu<sup>20</sup>Gla<sup>25</sup>Glu<sup>26</sup>又はGlu<sup>19</sup>Glu<sup>20</sup>Gla<sup>25</sup>Gla<sup>26</sup>とは弱く反応し、Glu<sup>19</sup>とGlu<sup>20</sup>の一方あるいは両方がGla化すると全く反応しなかった。

### 患者血清中のMU-3抗体と反応するDCPの割合

Total DCP濃度は、HCCで39.5ng/mlから413.6ng/mlまで分布しており、良性肝疾患で35.1ng/mlから368.6ng/mlまで分布しており、疾患別に差異は認められなかった。一方、Total DCP中でMU-3抗体と反応するDCPの割合は、良性肝疾患では0%から42.1%であったのに対してHCCで41.0%から76.8%であり、HCCでの割合が高かった。

## 考 案

Gla残基がgamma-carboxylationを受ける順番に関してBorowskiらは、Gla<sup>6,14,19,20</sup>が最初にgamma-carboxylationを受けると報告している。また、RatcliffeらはGlu<sup>16</sup>→Glu<sup>26</sup>→Glu<sup>29</sup>→Glu<sup>19</sup>→Glu<sup>7</sup>→Glu<sup>25</sup>→Glu<sup>20</sup>→Glu<sup>14</sup>→Glu<sup>32</sup>→Glu<sup>6</sup>の順番であると報告しており、Ueharaら<sup>3)</sup>は、Glu<sup>26</sup>→Glu<sup>25</sup>→Glu<sup>16</sup>→Glu<sup>29</sup>→Glu<sup>20</sup>→Glu<sup>19</sup>→Glu<sup>14</sup>→Glu<sup>32</sup>→Glu<sup>7</sup>→Glu<sup>6</sup>の順番であると報告している。MU-3抗体はGlu<sup>19</sup>又はGlu<sup>20</sup>がgamma-carboxylationを受けると反応性が著しく低下した。従って、MU-3抗体が測定しているDCPのGla含有量はBorowskiらの順番を採用した場合には最大で2 Gla、Ratcliffeらの順番を採用すると3 Gla、Ueharaらの順番の場合には4 Glaを含むDCPとなる。

このようにHCCではMU-3抗体と反応するDCPを多く含んでいることが明らかとなったので、MU-3抗体の特性を考慮すると、HCC患者血中のDCPはGla含有量が4 Gla以下のDCPに富んでいると考えられる。逆に、良性肝疾患では5 Gla以上のGla含有量であるDCPを多く含んでいると考えられる。このように、HCCではgamma-carboxylationがほとんど進行しないと考えられるのに対して、良性肝疾患ではgamma-carboxylationは弱い不全状態になっているだけであると考えられる。今後のHCCにおけるDCPの産生機序の解明は、この点に考慮して進める必要がある。

## 結 論

MU-3抗体はGla domain中の10個のGlaが全てGluになっているか、あるいは1残基がGlaであるDCPと強く反応し、2 Glaから4Glaを含むDCPとは弱く反応し、5 Gla以上を含むDCPとは全く反応しないと考えられた。Gamma-carboxylationの順番を考慮すると、HCCに出現するDCPは、全くGla残基の無いDCPであるか、あるいはgamma-carboxylationを受けていたとしても26位が主であり、25位、16位および29位に関してはGlaあるいはGluのどちらの場合もあるが、残りの5Gla残基 (Gla<sup>6,7,14,19,20,32</sup>) は全てGluのままであるDCPを大量に含んでいると考えられた。

## 引用文献

1. Liebman H A, Furie B C, Tong M J, Blanchard R A, Lo K J, Lee S D, Coleman M S, Furie B. Des-gamma-carboxy (Abnormal) prothrombin as a serum marker of primary hepatocellular carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 310: 1427-1431, 1984.
2. Naraki T, Watanabe K, Shimozuru Y, Motohara K, Matsuda I. Development and evaluation of EIA kit for the detection of PIVKA-II using double antibody sandwich system: Monoclonal antibody to PIVKA-II and polyclonal antibody to prothrombin. (in Japanese). *Clin. Immunol.* 18: 479-492, 1986.
3. Uehara S, Gotoh K, Handa H, Honjo K, Hirayama A. Process of carboxylation of glutamic acid residues in the Gla domain of human des-gamma-carboxyprothrombin. *Clin. Chim. Acta* 289: 33-44, 1999.

## 参考論文

1. Sugo T, Watanabe K, Naraki T, Matsuda M. Chemical modification of gamma-carboxyglutamic acid residues in prothrombin elicits a conformation similar to that of abnormal (des-gamma-carboxy) prothrombin. *J. Biochem.* 108: 382-387, 1990.
2. Ono M, Kohda H, Naraki T, Ohta H, Ohhira M, Sekiya C, Namiki M. The effect of IL-6 on the des-gamma-carboxy prothrombin synthesis in human hepatoma cells. *Gastroenterol. Jpn.* 27: 745-750, 1992.
3. Okuda H, Nakanishi T, Takatsu K, Saito A, Hayashi N, Watanabe K, Magario N, Yokoo T, Naraki T. Measurement of serum levels of des-gamma-carboxy prothrombin in patients with hepatocellular carcinoma by a revised enzyme immunoassay kit with increased sensitivity. *Cancer* 85: 812-818, 1999.
4. Ohhira M, Ohtake T, Saito H, Ikuta K, Tanaka K, Tanabe H, Kawashima T, Fujimoto Y, Naraki T, Ono M, Kohgo Y. Increase of serum des-gamma-carboxy prothrombin in alcoholic liver disease without hepatocellular carcinoma. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 23: 67S-70S, 1999.
5. Ohhira M, Saito H, Suzuki Y, Naraki T, Sakurai S, Ohtake T, Suzuki M, Ohhira M, Fujimoto Y, Kohgo Y. A variant of des-gamma-carboxy prothrombin was increased in alcoholic liver disease without hepatocellular carcinoma. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 25: 46S-50S, 2001.

## 学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士 (医学)	氏 名	楢 木 徹
<p>審査委員長 牧 野 勲 ㊦</p> <p>審査委員 高 後 裕 ㊦</p> <p>審査委員 伊 藤 亮 ㊦</p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Gamma-carboxyglutamic acid content of hepatocellular carcinoma-associated des-gamma-carboxy prothrombin (肝細胞癌患者血中に出現するdes-gamma-carboxy prothrombin のgamma-carboxyglutamic acid 含有量に関する研究)</p>			
<p>Prothrombinは肝細胞で合成された後、gamma-carboxylationを受けて 血液凝固活性のあるprothrombinとして血中に放出されるが、原発性肝細胞癌ではgamma-carboxylationが不十分なdes-gamma-carboxy prothrombin (DCP) が高頻度に出現することが報告され、それ以来、肝細胞癌の診断補助に多くの施設でMU-3抗体を使用した測定系によりDCPが測定されている。しかし、DCPは良性肝疾患でも生じるが、肝細胞癌との量的、質的相違が明確になっていない。本研究はMU-3抗体の反応特性 (エピトープ) を明らかにし、良性肝疾患と肝細胞癌で生じるDCPの分子特性を明らかにすることを目的とした。</p> <p>本研究により下記の点を明らかにした。</p> <p>(1) MU-3抗体のエピトープの決定はdirect binding ELISA法などを用いて検討し、エビ</p>			

トープはgamma-carboxy glutamic acid domain にあり、その内のアミノ酸残基17位から27位内にあることを明らかにした。

(2) エピソープ中のgamma-carboxy glutamic acidとglutamic acidの位置についてはSandwich ELISA法のcompetition法で検討し、MU-3抗体と強く反応するのは19、20、25位がglutamic acidであることが必須であった。

(3) 患者血清中のtotal DCP濃度は疾患別の差異は認められなかったが、total DCP中でMU-3抗体と反応するDCPの割合は良性肝疾患より肝細胞癌で高値であった。

これらの所見を基に著者は肝細胞癌で出現するDCPは全くgamma-carboxy glutamic acid残基のないDCPか、gamma-carboxylationを受けたにしても26位が主であることを推定している。本研究はMU-3抗体を利用するDCP測定法の原理とメカニズムを明らかにし、良性肝疾患と肝細胞癌との鑑別研究に貢献するところが大きく、高く評価されるべき研究と考える。

論文審査後、同人に対して諮問審査を行い、その結果、本論文の内容は学位論文として価値あるものと認め、諮問審査の内容からも審査に合格と判定致しました。

以上御報告申し上げます。