

## 異所子宮内膜腺管培養細胞と卵巣癌培養細胞より分泌される CA125の分子 heterogeneity に関する研究

浜松医科大学産科婦人科学教室

小林 浩 井田 若葉 藤井 俊朗  
寺尾 俊彦 川島 吉良

### Heterogeneity of CA 125 Antigens Released from Human Endometrial Heterotopic Epithelium and Ovarian Cancer

Hiroshi KOBAYASHI, Wakaba IDA, Toshiro FUJII,  
Toshihiko TERA0 and Yoshiro KAWASHIMA

*Department of Obstetrics and Gynecology, Hamamatsu University School of Medicine, Hamamatsu*

**概要** 正所子宮内膜腺管上皮細胞(正所内膜), 異所子宮内膜腺管上皮細胞(異所内膜)および卵巣癌細胞より分泌されるCA125の分子量にheterogeneityが存在するかどうか検討するため, それぞれの培養細胞の上清からCA125抗原を精製した。培養は2例の正所内膜, 5例の異所内膜と2種類の卵巣癌培養細胞(SHIN-3, HOC-I)について行った。培養上清から部分精製したcrude CA125を6M ureaで処理した後, OC125 affinity columnにて精製した。6M ureaで処理しない高分子量CA125は3~7% polyacrylamide gradient gelには入っていかなかった。Urea処理後の低分子CA125についてSDS-PAGE後, Western blotを行ったところ, 正所内膜培養上清からは分子量200KDaの単一のbandが認められた。異所内膜からは全症例において培養時期に関係なく分子量110KDaの主なbandが認められ, また, 分子量約200KDaのbandは一部に認められた。一方, 卵巣癌培養細胞からは分子量200KDa以下の数本のbandが認められ, HOC-I, SHIN-3ともそのCA125分子のパターンは類似したが, 分子量110KDaのbandは確認されなかった。したがって, 6M urea処理後の分子量110KDaのbandは異所内膜と正所内膜および卵巣癌細胞との鑑別に有用であることが証明された。

**Synopsis** We purified CA125 antigen from the conditioned media (CM) of eutopic and heterotopic endometrial epithelial cells (EC) as well as ovarian cancer cell lines, SHIN-3 and HOC-I, to determine what molecular weight forms of CA125 antigen were identifiable. Treatment of the high-molecular-weight CA125 antigen with 6M urea yielded a much lower molecular mass peak. After purification by OC125 affinity column chromatography, samples were applied to 3 to 7% polyacrylamide gradient gel and analyzed by Western blot. A single band with a molecular weight (MW) of 200KDa was identified in eutopic EC materials. The CA125 polypeptide of the 110KDa molecule could be detected in all of the CM obtained from heterotopic EC, irrespective of the length of time in the cell culture. A MW of approximately 200 KDa was also observed in some heterotopic EC samples. On the other hand, although the multiple bands with a MW equal to or less than 200KDa were observed in the CM of two ovarian cancer cells, the CA125 polypeptide of 110KDa molecules could not be detected. This preliminary finding offers promise that the 110KDa molecule detection method may be a useful adjunct in the differential diagnosis of heterotopic EC and ovarian cancer.

**Key words:** Adenomyosis • CA125 • Heterogeneity • Molecular weight • Ovarian cancer

#### 緒 言

CA125の血清値により卵巣癌と子宮内膜症を鑑別することは不可能である。CA125の抗原解析に関しては2種類の卵巣癌培養細胞(OVCA 433, SHIN-3)について報告されている<sup>2)5)~7)</sup>。しかし,

使用した培養細胞の相違か,あるいはCA125抗原の精製法の相違のためか,両者の成績は異なり, Davis, H.M. et al.<sup>5)</sup>はCA125の分子量は200KDaであると報告しているが, Imai, S. et al.<sup>6)7)</sup>は49 KDaがCA125の最小抗原決定基として同定し

た。前者の200KDaのCA125は電気泳動上 broad であるが、後者の49KDaのCA125は非常に sharp な band であり、糖鎖の含有量は極めて少ないものと思われ、後者は前者の分解産物(OC125-reactive domain を含んだ)と考えられる。

また、Mojiminiyi, O.A. et al.<sup>12)</sup>はチョコレート嚢胞患者血清、内容液、組織中のOC125 immunoreactive fragments について解析した結果、非還元および還元状態においてそれぞれ、140KDa および55KDa の分子量を同定したが、抗原の精製や分析は行っていない。

われわれは以前<sup>3)</sup>に、正所子宮内膜腺管上皮細胞(正所内膜)と異所子宮内膜腺管上皮細胞(異所内膜)を培養した結果、CA125抗原に関する根本的な相違は次の2点であつた。すなわち、(1)細胞膜上のCA125発現には正所内膜と異所内膜において量的相違を認めないが、異所内膜では、特に定常期に高いCA125分泌能が存在すること、さらに、(2)正所内膜から精製されたCA125の分子量は200KDaであるが、異所内膜から精製されたCA125の分子量は200KDaのみならず、110KDaのCA125が確認され、この110KDaのCA125が異所内膜に特異的であつたことである。

そこで今回の研究の目的は、2種類の卵巣癌培養細胞(SHIN-3<sup>1)</sup>, HOC-I<sup>3)</sup>)の上清からCA125抗

原を精製し、その分子量を正所内膜と異所内膜の精製CA125と比較することである。さらに、ヒト子宮内膜組織(正所内膜と異所内膜)の採取時期(増殖期か分泌期か)、あるいは、培養時期(対数増殖期か定常期か)によりCA125分子量に相違が認められるかどうかにつき培養例数を追加し検討した。

#### 材料および方法

Monoclonal antibody (moAB) OC125は東レフジバイオニクスより提供されたものを使用した。この抗体はセントコア社製CA125 radioimmunoassay キットに使用されている抗体と同一のものである。

#### 細胞培養

卵巣癌培養細胞 HOC-I<sup>3)</sup>はわれわれが樹立した cell line であり、SHIN-3<sup>2)</sup>は清塚康彦博士により樹立された卵巣癌培養細胞である。この2種類の培養細胞上清からCA125抗原を精製した。正所内膜と異所内膜培養細胞は Satyaswaroop, P.G. et al.<sup>14)</sup>の変法により行つた。いずれの細胞も対数増殖期と定常期の培養上清をそれぞれ別々に集めてCA125精製のために使用した。培養に供した子宮内膜細胞の検体採取時期、細胞培養時期および手術直前(2週間以内)の患者血清CA125値等は表1に示したとおりである。

表1 CA125精製に用いた検体(正所内膜と異所内膜)

Lane	採取部位	症例	年齢	月経周期	培養上清採取時期	血清 CA125値
1	正所内膜	MY	45	増殖期	対数増殖期	259
2	正所内膜	MY	45	増殖期	定常期	259
3	正所内膜	SS	38	分泌期	対数増殖期	370
4	正所内膜	SS	38	分泌期	定常期	370
5	異所内膜	KS	40	増殖期	対数増殖期	261
6	異所内膜	KS	40	増殖期	定常期	261
7	異所内膜	KT	46	増殖期	対数増殖期	423
8	異所内膜	KT	46	増殖期	定常期	423
9	異所内膜	HW	39	分泌期	対数増殖期	389
10	異所内膜	HW	39	分泌期	定常期	389
11	異所内膜	AK	42	分泌期	対数増殖期	500<
12	異所内膜	AK	42	分泌期	定常期	500<
13	異所内膜	EI	44	分泌期	対数増殖期	460
14	異所内膜	EI	44	分泌期	定常期	460

症例 MY, SS は子宮筋腫の正所内膜を、症例 KS, KT, HW, AK, EI は子宮腺筋症の異所内膜を用いて培養に供した。血清 CA125値は検体採取時期における値 (U/ml) を示す。

### CA125抗原の測定

培養上清中の CA125抗原量はセントコア社製 CA125 RIA kit を用いて、いずれも duplicate で測定した。なお、Ham' F12や FCS 中の CA125濃度は8U/ml 以下であった。

### CA125抗原の精製

CA125抗原の精製は Davis, H.M. et al.<sup>9)</sup>の方法に準じた。正所、異所内膜および卵巣癌細胞の培養上清を遠心後、Amicon filter (Centricon-30) で分子量30KDa 以上を濃縮し、0.6M 過塩素酸沈殿上清を回収し、中和、透析後 Sephacryl S-300 カラム<sup>11)</sup>に流し、各 fraction ごとに CA125濃度と蛋白量を測定した<sup>10)</sup>。必要な fraction(void volume に一致した分画) をそれぞれ集めて、透析した後濃縮した。なお、カラムから遅れて溶出される分画にも CA125活性が認められたが、この分画には他の蛋白の混入が多く精製が困難であったので分析することができなかつた。この sample を6M urea (30min, 45°C) で処理した後、Sephacryl S-300 カラムに流し (50mM Tris, 6M urea, 0.1% SDS, pH 8.0), 低分子 CA125分画を回収し、OC125 : protein A : Sepharose 4B アフィニティカラム (0.1%SDS, 6M urea で平衡) に流し、diethylamine (50mM, pH 11.3) で溶出し精製した。最終的には CA125抗原は300~500倍に精製された。

Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) と Western blot による CA125抗原の解析

精製された CA125抗原を sample buffer (0.5M Tris-HCl, pH 6.8, 2.0%SDS, 25%glycerol) と混ぜ、加熱せずにただちに 3~7% polyacrylamide gradient gel で泳動した。約1.0ug の精製抗原を電気泳動した (30~40mA/gel, 60 min<sup>9)</sup>)。SDS-PAGE 後、Western blot (semi-dry blotting apparatus ; 40mA/gel, 90min, 23°C, <sup>15)</sup>) を行い、polyvinylidene difluoride (PVDF ; Millipore) membrane に electroblot した。今回の SDS-PAGE の条件では urea 処理前の高分子 CA125分画は gel に入っていかなかった。

### 結 果

以前にわれわれは子宮内膜腺管上皮細胞の培養上清から精製した CA125の低分子分画の解析の結果、正所内膜からは分子量200KDa の単一 band が、異所内膜からは分子量200KDa と110KDa の二つの band が認められ、110KDa の band が異所内膜に特異的に出現することを報告した<sup>3)</sup>。

そこで今回は採取する子宮内膜組織の時期 (増殖期か分泌期か) により CA125抗原の分子量に差が認められるかどうか、また、対数増殖期と定常期の培養上清で相違が認められるかどうかを検体数を追加して検討した。図1および2に正所内膜、異所内膜および卵巣癌細胞 (SHIN-3と HOC-I) における培養上清中の CA125抗原の溶出パターンを示す。Sephacryl S-300によるゲルろ過ではすべての CA125抗原の main peak は void volume に一致するため、分子量1,000KDa 以上の CA125が分泌されていた。この分画に含まれる大分子量の CA125分子を6M urea で45°C, 30min 処理することにより、CA125の抗原性を失活させることなく

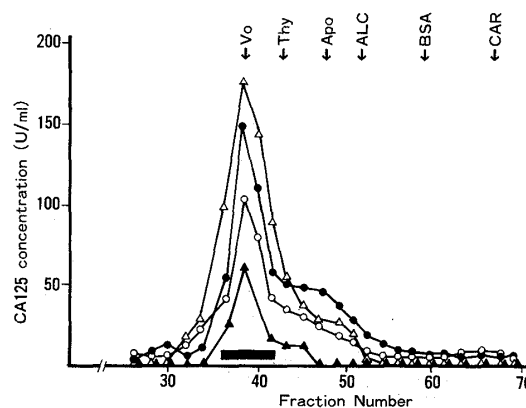


図1 Sephacryl S-300カラムによる CA125抗原の溶出パターン

(○) 正所子宮内膜腺管上皮細胞の培養上清 ; (●) 異所子宮内膜腺管上皮細胞の培養上清 ; (▲) 卵巣癌細胞 (SHIN-3) の培養上清 ; (△) 卵巣癌細胞 (HOC-I) の培養上清

子宮内膜細胞の場合には約70%の CA125抗原が void volume (分子量1,000KDa 以上) に溶出されるのに対して、卵巣癌細胞では約90%が void volume に溶出された。

VO, Blue dextran ; Thy, thyroglobulin ; Apo, Apoferritin ; Alc, Alcohol dehydrogenase ; BSA, Bovine serum albumin ; CAR, Carbonic anhydrase.

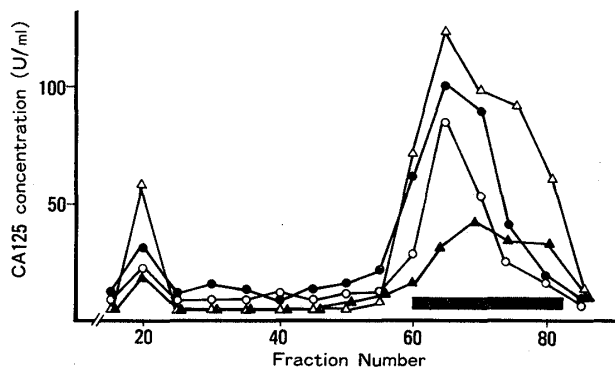


図2 Sepharose 6B カラムによる CA125 抗原の溶出パターン

(○) 正所子宮内膜腺上皮細胞の培養上清；(●) 異所子宮内膜腺上皮細胞の培養上清；(▲) 卵巣癌細胞 (SHIN-3) の培養上清；(△) 卵巣癌細胞 (HOC-I) の培養上清

Sephacryl S-300 で得られた CA125 分画を 6M urea (45°C, 30min) で処理した後、Sepharose 6B カラムでさらに精製した。Sepharose 6B カラムには SDS : urea : Tris buffer を使用した。

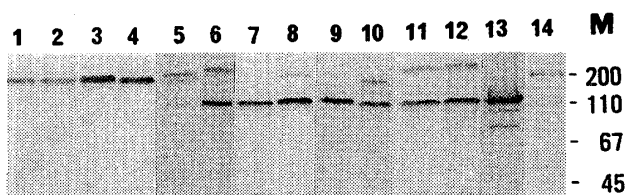


図3 精製 CA125 抗原の SDS-PAGE および Western blot による解析 (正所内膜と異所内膜の比較)

Lane 1 から lane 14 までの sample の詳細は表 1 に示す。

低分子に disaggregate することが可能であった。この disaggregate された CA125 分子を回収するため Sepharose 6B カラムにて精製した。最後に OC125 アフィニティカラムにより、最終的には 300~500 倍に精製された。これらの精製 CA125 抗原を用いて SDS-PAGE, Western blot を行った。その結果、正所内膜では培養に供するために採取した子宮内膜組織の時期が増殖期の子宮内膜であつても分泌期の子宮内膜であつても、また、それぞれの培養時期が対数増殖期であつても定常期であつても分子量 200KDa の単一 band しか確認されなかつた(図 3)。また、一方、培養に供した異所内膜 5 例のうち、分子量 200KDa の band は lane 5, 8, 10, 14 に認められ、lane 6, 11, 12 の

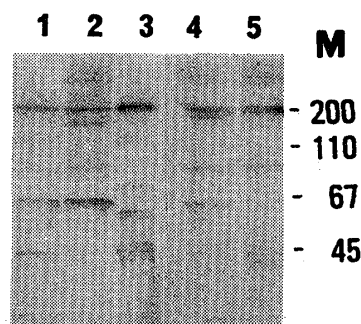


図4 精製 CA125 抗原の SDS-PAGE および Western blot による解析 (卵巣癌細胞)

CA125 精製に用いた卵巣癌培養細胞の種類および培養上清採取時期は以下のとおりである。

Lane 1, SHIN-3, 対数増殖期；lane 2, SHIN-3, 定常期；lane 3, HOC-I, 定常期 (64 代目)；lane 4, HOC-I, 対数増殖期 (97 代目)；lane 5, HOC-I, 定常期 (97 代目)

分子量は 200KDa よりやや高い band が認められた。しかし、検体において濃度の差は認められるものの、分子量 110KDa の band はすべてに認められ、この band が異所内膜に特異的に出現することを確認した。異所内膜においても子宮内膜組織の採取時期や、培養細胞の対数増殖期か定常期かによる CA125 の分子量における明らかな差異は確認されなかつた。

卵巣癌細胞の培養上清から精製した CA125 抗原に関しては OVCA 433 を使用した Davis, H.M. et al. の報告<sup>5)</sup>と SHIN-3 を用いた清塚<sup>2)</sup>, Imai, S. et al. の報告<sup>6)</sup>をみるにすぎない。前者は urea 処理により分子量 200KDa の CA125 を、後者は SDS と mercaptoethanol の存在下でさらに低分子の CA125 抗原 (49KDa) を検出したが、CA125 の精製法が異なるため、同一には論じられない。そこで、今回は子宮内膜細胞と同様に、Davis, H.M. の方法に準じて卵巣癌細胞 (SHIN-3, HOC-I) を用いて CA125 抗原を精製した(図 4)。彼らの報告と同様に分子量 200KDa の CA125 はすべてに確認されたが、さらに低分子の CA125 が数本認められた。しかし、分子量 110KDa の band はすべてのサンプルにおいて認められなかつた。培養細胞の種類や細胞の対数増殖期か定常期かによる CA125 の分子量における差異もほとんど確認されなかつた。また、最小 CA125 抗原決定基として 45

KDaのbandが確認できた。HOC-Iにおいてはpassageにより多少低分子量CA125抗原の分子量に相違を認めたが、200KDaのCA125はいずれにも認められた(図4, lane 3と5)。

### 考 案

卵巣癌の腫瘍マーカーとしてのCA125が出現して以来、膨大な臨床研究が行われてきた<sup>4)8)</sup>。CA125の欠点である子宮内膜症における高い偽陽性率を利用して、CA125を子宮内膜症の血清診断に使用することもある程度可能となつた<sup>13)</sup>。しかし、同一のmoAB OC125を使用する限り、抗原性や血清濃度により癌と子宮内膜症を鑑別することは不可能であるので、両者を鑑別するために、それぞれの細胞から産生されるCA125抗原の生化学的な性質の差や分子量の相違が存在するかどうかを検討する必要がある。卵巣癌培養細胞OVCA 433とSHIN-3についてはその生化学的性質がDavis, H.M. et al.<sup>5)</sup>, Imai, S. et al.<sup>6)7)</sup>によつて詳細に報告された。そこで、以前われわれは子宮内膜症でも比較的細胞を採取しやすい子宮腺筋症について正所内膜と異所内膜腺管上皮培養細胞からCA125を精製し、その生化学的性質を比較した<sup>9)</sup>。しかし、残念なことに正所内膜、異所内膜および卵巣癌細胞のいずれもその生化学的性質は類似し、moAB OC125はCA125分子のうちの蛋白質部分を認識することが確認された。

そこで今回は、精製CA125蛋白質の分子量に相違がないかどうかを各種の培養細胞を用いて検討した。培養上清中のCA125抗原はSephacryl S-300カラムによるゲルろ過では正所内膜、異所内膜および卵巣癌細胞のいずれにおいてもそのほとんどが分子量1,000KDa以上の分画に回収された。しかし、加熱、urea処理することにより低分子のCA125に分解された。Sephacryl 6Bの分離パターンだけではその差異が不明確であつたが、SDS-PAGE, Western blotにより、CA125分子量の相違は明瞭になつた。興味深いことに110KDaのCA125分子は異所内膜にしか存在しなかつた。したがつて、110KDaのCA125分子の存在の確認が、癌と子宮内膜症の鑑別に有用であると思われる。

moAB OC125が主に蛋白部分を認識し、同じmoABでsandwich assayが可能ということは、蛋白分子上にCA125のくり返し構造が存在するか、低分子CA125の集合体が巨大分子を形成している可能性が推定される。あるいはその両者である可能性も存在するが、一つの蛋白質が分子量1,000KDa以上もあるのは考えにくいので、低分子CA125の集合体と考えるほうが妥当かもしれない。今回のSDS-PAGE, Western blot解析の結果、卵巣癌の場合の最小CA125抗原決定基は45KDaの蛋白分子上につけている可能性が示唆された。また、加熱、urea処理によるCA125蛋白質のdisaggregationの程度が子宮内膜細胞と卵巣癌細胞では異なり、卵巣癌細胞由来のCA125蛋白質がより不安定でその影響を受けやすいことも考えられた。

CA125精製に関する本実験の手技が繁雑であるためその方法論の改善が要求されよう。また、加熱、urea処理によるCA125蛋白質のdisaggregationの方法以外に抗原性を失活させることなく低分子化させる方法を見つける必要がある。CA125の抗原解析のためには以上の基礎的検討を行う必要がある。現在、実際の子宮内膜症の患者血清を用いて110KDaのCA125分子の存在を確認しているところであるが、簡便な方法論が確立すれば臨床応用も可能であると思われる。

### 文 献

1. 藤井俊朗：ヒト卵巣類内膜癌由来細胞株HOC-Iの樹立とその性状。日産婦誌, 41: 161, 1989.
2. 清塚康彦：Establishment of human ovarian carcinoma cell line: Characterization and tumor marker expression in vitro. 奈良医学雑誌, 38: 459, 1987.
3. 小林 浩, 井田若葉, 寺尾俊彦, 川島吉良：正所および異所子宮内膜腺管上皮培養細胞からのCA125産生に関する基礎的検討。日産婦誌, 44: 303, 1992.
4. Bast, R.C. Jr., Feeney, M., Lazarus, H., Nadler, L.M., Colvin, R.B. and Knapp, R.C.: Reactivity of a monoclonal antibody with human ovarian carcinoma. J. Clin. Invest., 68: 1331, 1981.
5. Davis, H.M., Zurawski, V.R., Bast, R.C. Jr. and Klug, T.L.: Characterization of the CA125

- antigen associated with human epithelial ovarian carcinoma. *Cancer Res.*, 46: 6143, 1986.
6. *Imai, S., Kiyozuka, Y., Maeda, H., Noda, T. and Hosick, H.L.* : Establishment and characterization of a human ovarian serous cystadenocarcinoma cell line that produces the tumor markers CA125 and Tissue Polypeptide Antigen. *Oncol.*, 47: 177, 1990.
  7. *Imai, S., Maeda, H., Kiyozuka, Y., Noda, T., Moriyama, I. and Ichijo, M.* : Characterization of the CA125 antigen secreted from a newly established human ovarian cancer cell line (SHIN-3). *Acta Pathol. Jpn.*, 39: 43, 1989.
  8. *Kabawat, S.E., Bast, R.C. Jr., Bhan, A.K., Welch, W.R., Knapp, R.C. and Colvin, R.B.* : Tissue distribution of a coelomic epithelium-related antigen recognized by the monoclonal antibody OC125. *Int. J. Gynecol. Pathol.*, 2: 275, 1983.
  9. *Laemmli, U.K.* : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680, 1970.
  10. *Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.* : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265, 1951.
  11. *Matsuoka, Y., Nakashima, T., Endo, K., Yoshida, T., Kunimatsu, M., Sakahara, H., Koizumi, M., Nakagawa, T., Yamaguchi, N. and Torizuka, K.* : Recognition of ovarian cancer antigen CA125 by murine monoclonal antibody produced by immunization of lung cancer cells. *Cancer Res.*, 47: 6335, 1987.
  12. *Mojiminiyi, O.A., Bramwell, M.E., Kennedy, S. H., Shepstone, B.J., Humm, S.M. and Barlow, D.H.* : Immunoreactive determinants of CA125 in women with endometriosis. *J. Clin. Pathol.*, 42: 1272, 1989.
  13. *Pittaway, D.E. and Favez, J.A.* : The use of CA125 in the diagnosis and management of endometriosis. *Fertil. Steril.*, 45: 790, 1986.
  14. *Satyaswaroop, P.G., Bressler, R.S., De La Pena, M.M. and Gurbide, E.* : Isolation and culture of human endometrial glands. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 48: 639, 1979.
  15. *Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J.* : Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 76: 4350, 1979.
  16. *Wild, R.A., Podczaski, E.S., Hirisave, V., Demers, L.M. and Bianco, A.* : Endometrial antibodies versus CA125 for the detection of endometriosis. *Fertil. Steril.*, 55: 90, 1991.

(No. 7143 平3・12・16受付)