

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

浜松医科大学産科婦人科学教室

小林 浩 井田 若葉 寺尾 俊彦 川島 吉良

Qualitative Assessment and Characterization of CA125 Antigen Produced from Human Endometrial Epithelial Cells

Hiroshi KOBAYASHI, Wakaba IDA, Toshihiko TERAO
and Yoshiro KAWASHIMA

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

概要 正所子宮内膜細胞と子宮腺筋症より得られた異所子宮内膜細胞を腺管上皮細胞と間質細胞に分離、培養し、それぞれの細胞からのCA125産生を比較した。CA125産生に関しては細胞膜上へのCA125の発現と培養液中への分泌について検討した。

腺管上皮培養細胞からは、細胞の対数増殖期よりも定常期にCA125産生の亢進を認め、異所子宮内膜腺管上皮培養細胞（異所腺管）は正所子宮内膜腺管上皮培養細胞（正所腺管）に比べ、定常期に約9倍のCA125を分泌した。一方、間質細胞からのCA125産生は認められなかった。Flow cytometryを用い、CA125とDNAの二重染色を行った結果、CA125産生は細胞周期により変動し、G0/G1期に著明であった。しかし、正所および異所腺管の両者において、細胞の対数増殖期と定常期で細胞表面に発現されるCA125抗原量には量的相違は観察されなかった。

培養液中のCA125を精製し、SDS-PAGE, Western blotを行った結果、正所腺管と異所腺管とではCA125の分子量が一部異なり、正所腺管からは200KDaの単一のバンドが、異所腺管からは200KDaと110KDaの二つのバンドが確認され、110KDaのCA125が異所腺管にのみ認められた。CA125抗原決定基の生化学的検討の結果、110KDaのCA125は高分子CA125と同様に蛋白質（peptide）であった。

以上より、子宮腺筋症における高CA125血症は定常期の異所腺管からのCA125分泌亢進により起こっていることが推定され、110KDaのCA125を効率よく測定できれば子宮腺筋症の血清診断が可能である。

Synopsis We have established an in vitro system in which epithelial cells (EC) and stromal cells (SC) from the human endometrium are placed in culture to examine the production of CA125. There was a much greater amount of CA125 in heterotopic EC after culture cells reached confluence than during the logarithmic growth phase. Heterotopic EC in culture secreted nine times as much CA125 constitutively after reaching confluence as eutopic EC. Flow cytometry (FCM) analysis indicated that the changes in CA125 expression correlated with the cell cycle. The CA125 expression was mainly observed in the G0/G1-phase in the cell cycle. There was no amplification of the CA125 expression in heterotopic EC membranes. The results of SDS-PAGE and Western blot indicated that the 110 KDa molecule of CA125 might be specific for adenomyosis. The biochemical and physical nature of CA125 was examined to characterize the antigenic determinant of this antigen. These results strongly suggested that the CA125 antigenic determinant from EC was composed of conformationally dependent peptides. We conclude that significantly increased secretion of CA125 from heterotopic EC could be attributed to the increase in serum CA125 in patients with adenomyosis.

Key words: Adenomyosis • CA125 • Endometrial epithelial cells • Flow cytofluorometry • Western blot

緒 言

CA125は卵巣漿液性嚢胞腺癌細胞 OVCA 433
を免疫源として作成されたマウスモノクローナル

抗体 OC125が認識する抗原であり、卵巣癌の血清
腫瘍マーカーとして汎用されている²⁾³⁾。しかし、
CA125が子宮内膜症でも高値を示すことは周知の

事実である。また、CA125は月経期、妊娠初期や腹膜炎でも血清値が高値を示し、卵巢癌に特異的なマーカーではない¹¹⁾。子宮内膜症の場合には進行例に比較的陽性例が多い反面、初期の病変では血清CA125値が高値を示さない場合が多いので、現時点では感度の点で子宮内膜症の血清診断には使えない¹¹⁾。

卵巢癌由来のCA125と子宮内膜症由来のCA125の生化学的異同が問題であるが、卵巢癌細胞の培養上清中のCA125抗原を解析した報告は散見される⁶⁾が、子宮内膜症のCA125抗原解析に関する研究は見当たらない。

今回の実験の目的は、(1) ヒト子宮内膜組織(正所と異所内膜)を腺管上皮細胞と間質細胞に分離、培養し、CA125産生のoriginを決定する¹⁾。(2) CA125産生に関しては培養上清中へのCA125の分泌と細胞膜上でのCA125の発現の両者について検討する。すなわち、培養細胞からのCA125産生が細胞の対数増殖期なのか定常期なのかを調べ、細胞周期におけるCA125発現時期をflow cytometry (FCM)を用いて検討する。(3) 培養上清中に分泌されたCA125を精製し、SDS-PAGE, Western blotを行い、分子量を決定し、子宮内膜症に特異的なバンドが存在するかどうかを検討する。さらに、(4) 精製CA125を用いて、生化学的性質を比較することである。

材料および方法

マウスモノクローナル抗体OC125は東レフジバイオニクス社より提供されたものを使用した。

細胞培養

ヒト子宮内膜組織からの細胞培養はSatyaswaroop, P.G. et al.¹⁰⁾の変法により行つた。正所内膜は9例の子宮筋腫から得られたものを、異所内膜は17例の子宮腺筋症から得られたものを培養に供した。培養方法の詳細は文献¹⁾に示した通りである。分離した腺管組織から単離細胞を得るためには、0.1%collagenase/1%EDTA(関東化学、東京)でVortex mixerで振動を加え分散させた。子宮内膜腺管上皮培養細胞(正所および異所腺管)の初代培養細胞が90%confluenceに達した時に培養上清を回収し、CA125抗原の精製の

ために-20℃に保存した。

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 radioimmunoassay kitを用いて測定し、検体はいずれもduplicateで測定した。なお、Ham's F12やFCS中のCA125濃度は8U/ml以下であつた。

Flow cytometryによる細胞表面CA125抗原の発現

正所と異所腺管を単離後、遠心し(1,200rpm, 10min), cell pelletを作成し、phosphate buffered saline (PBS)+0.1%bovine serum albumin (BSA) (PBS-BSA)にて 1×10^6 cells/mlに調整した。200 μ lの細胞浮遊液に対して各種濃度のOC125抗体を添加し(0~120nM, 4℃, 30min), 洗浄後、さらに2 μ lのFITC goat anti-mouse IgG (1mg/ml, 4℃, 30min)を添加し、ただちにFCM (EPICS profile, Coulter)により、波長488nmにてFluorescence mean channel (FMC)を測定した。非特異的反応はOC125無添加で測定した。

培養細胞の各時期における細胞膜上のCA125発現に関して、培養各時期の細胞を使つて同様に検討した。なお、この時のFCMによる実験には12nMのOC125濃度を使用した(細胞表面のCA125は12nMのOC125で完全に飽和される)。さらに、培養細胞におけるCA125の発現時期と細胞周期との関係を調べるため、propidium iodide (PI)によるDNAとCA125による二重染色を行つた。二重染色の解析は2C, 3C, 4Cにgateをかけた場合と、gateをかけずに測定した場合で比較した⁵⁾。

CA125抗原の精製

正所と異所腺管の培養上清を遠心後、約10倍に濃縮し、Sephacryl S-300カラムに流し、各fractionごとにCA125濃度と蛋白量を測定した⁹⁾。必要なfractionをそれぞれ集めて、透析した後濃縮した(図5には正所腺管の培養上清のパターンを示したが、異所腺管の培養上清の溶出パターンも全く同じであつた)。高分子量CA125分画と低分子量CA125分画をそれぞれ別に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、diethylamin (50

mM, pH 11.3)で溶出し精製した。OC125アフィニティカラムは Davis, H.M. et al. の方法により行つた⁶⁾。

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 0.5~1.0 μ g の精製抗原を電気泳動した (30~40mA/gel, 60min)¹⁵⁾。SDS-PAGE 後、Western blot(semidry blotting apparatus; 40mA/gel, 90min, 23°C) を行い、polyvinylidene difluoride (PVDF; Millipore) membrane に electroblot した。今回の SDS-PAGE の条件では高分子量分画の CA125 は gel に入っていかなかった。

精製 CA125 抗原の生化学的性質

正所および異所腺管培養上清から精製された高分子量および低分子量の CA125 抗原の性質を検討するため、各 CA125 抗原を化学修飾、glycosidase および protease 処理を行つた。いずれの方法も Davis, H.M. et al.⁶⁾、あるいは Imai, S. et al.⁷⁾の方法に準拠した。

結 果

正所および異所腺管と間質細胞からの培養上清中への CA125 分泌

正所腺管の培養上清中の CA125 濃度 (CA125 U/10⁵cells/24h, mean \pm SD) は、細胞の対数増殖期 (76 \pm 39) より定常期 (98 \pm 45) でやや高値を示した。一方、異所腺管の培養上清中の CA125 濃度は対数増殖期 (320 \pm 68) よりも定常期 (894 \pm 203) のほうが明らかに高値を示し、異所腺管の定常期の CA125 産生能は正所腺管の定常期の約 9 倍高値を示した。子宮内膜腺管上皮細胞からの CA125 産生能は子宮内膜組織を採取した時期 (増殖期か分泌期) には影響されなかった。一方、正所および異所間質細胞の培養上清中には CA125 抗原がほとんど検出されなかった。

FCM による細胞膜表面 CA125 抗原の発現

正所および異所腺管の細胞表面の CA125 抗原は 12nM の OC125 により完全に飽和され (図 1),

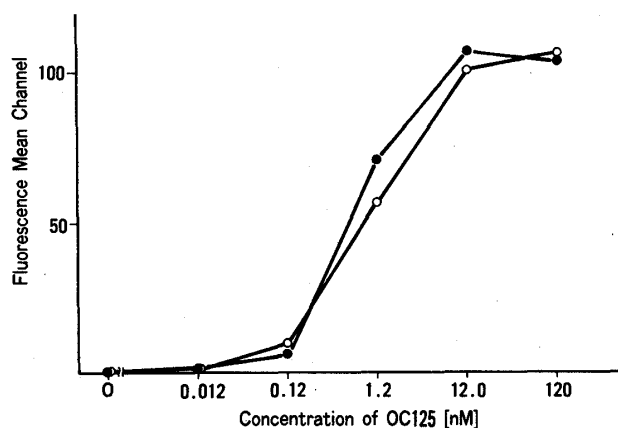


図1 正所および異所子宮内膜腺管上皮培養細胞膜に対する OC125 結合能—Flow cytometry による解析—

(○) 正所子宮内膜腺管上皮培養細胞, (●) 異所子宮内膜腺管上皮培養細胞

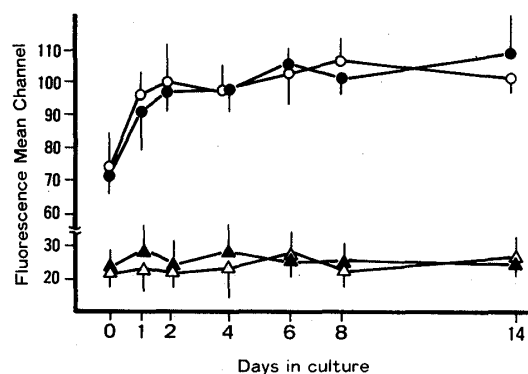


図2 培養期間中における細胞膜 CA125 抗原の発現動態

各時期とも 3 から 5 検体の培養細胞における平均値を示し、縦線は standard deviation を表す。(○) 正所子宮内膜腺管上皮培養細胞, (●) 異所子宮内膜腺管上皮培養細胞, (△) 正所子宮内膜間質細胞, (▲) 異所子宮内膜間質細胞。

異所腺管の細胞膜に発現されている CA125 抗原量は正所腺管と同じであり、増幅は認められなかった。

細胞膜の CA125 抗原量を培養の経過日数ごとに測定した (図 2)。培養開始前の細胞膜 CA125 抗原量はやや低値を示したが、2 日目以降は一定の CA125 発現を呈した。この結果は正所および異所腺管の両者とも同じであつた。

CA125 発現と細胞周期との関係を検討するため、CA125 と DNA の二重染色を行つた。まず、培養 7 日目 (対数増殖期, A) の正所腺管を材料にし

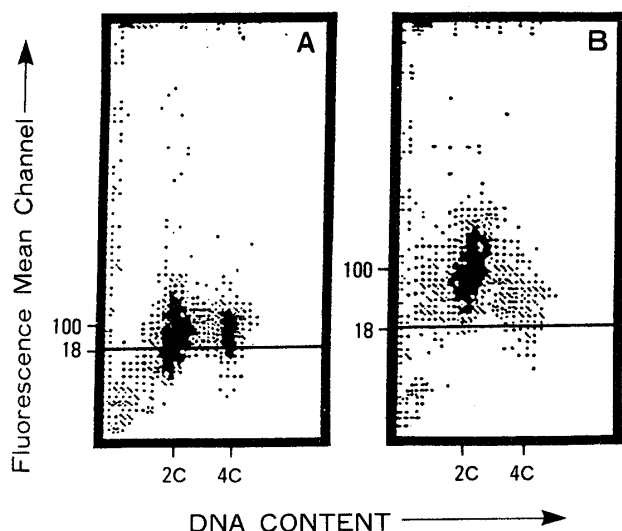


図3 Flow cytometry による CA125 と DNA の二重染色

コントロール細胞との比較により fluorescence mean channel が18以上を CA125陽性細胞とした。A. 正所子宮内膜腺管上皮培養細胞の対数増殖期（培養7日目）における二重染色の結果。B. 正所子宮内膜腺管上皮培養細胞の定常期（培養12日目）の二重染色の結果を示す。正所および異所子宮内膜腺管上皮培養細胞とも差を認めなかった。

た検討では、2C領域を占める細胞数は全体の70.2%であり、4C領域は20.2%であった。培養12日目（定常期、B）の正所腺管の2C領域を占める細胞数は全体の90.2%であり、4C領域は4.1%であった。異所腺管も正所腺管と全く同じパターンを示したので、図3には正所腺管の結果を示した。正所腺管AのCA125陽性細胞は全体の71.9%であり、2C領域の細胞の68.8%がCA125陽性細胞であった。3Cおよび4C領域にはそれぞれ、全体の9.6%および20.2%の細胞が存在し、そのうちCA125陽性細胞はそれぞれ、88.5%および74.8%であった。S期やG2+M期の細胞でもCA125産生能を有する結果が得られたが全体に占めるCA125陽性細胞の割合は少なかった。これに対し、正所腺管Bでは全体の92.0%を占める2C領域の細胞のうち94.9%はCA125陽性細胞であり、G0/G1細胞のほとんどがCA125を発現した。この結果は異所腺管でも同じであった。

正所および異所腺管より分泌されたCA125分子量の heterogeneity

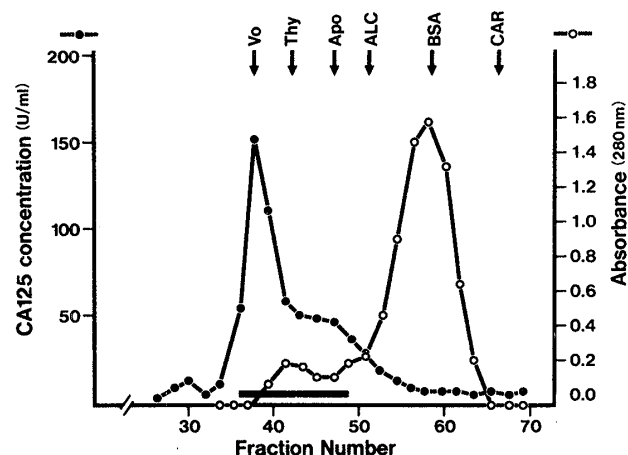


図4 Sephacryl S-300ゲルろ過を用いた培養上清からの CA125抗原の精製

正所子宮内膜腺管上皮培養細胞の培養上清からのCA125抗原の精製を示す。各 fraction 中のCA125濃度と蛋白量 (OD 280nm) を測定した結果、全体の70%は fraction No. 36~42のCA125分画であり、分子量は1,000KDa以上を示した。残りの30%は fr. No. 43~49の分画であり、分子量は200KDa以下を示した。Vo, Blue dextran; Thy, thyroglobulin; Apo, Apoferritin; ALC, Alcohol dehydrogenase; BSA, Bovine serum albumin; CAR, Carbonic anhydrase

正所および異所腺管培養上清中のCA125抗原の分子量を検討するため抗原の精製を行った。CA125抗原はSephacryl S-300でゲルろ過すると、その70%は分子量1,000KDa以上の高分子分画 (fraction No. 36~42) に溶出され、30%は分子量200KDa以下の分画 (fr. No. 43~49) に溶出された (図4)。それぞれの分画をOC125アフィニティカラムで精製した後、3~7%SDS-PAGEに泳動すると、正所腺管も異所腺管の場合も、分子量1,000KDa以上の高分子分画に溶出されたCA125はゲルに入っていかなかった。一方、分子量200KDa以下の分画に溶出されたCA125はSDS-PAGEおよびWestern blotの結果、正所腺管からは分子量200KDaの単一のバンドが、異所腺管からは分子量200KDaと110KDaの二つのバンドが認められた (図5)。正所と異所腺管とでは、少なくとも低分子のCA125抗原に関してはその分子量に heterogeneity が認められた。

最近、高分子量CA125抗原を6M ureaで45℃、30min処理することにより低分子化することが可

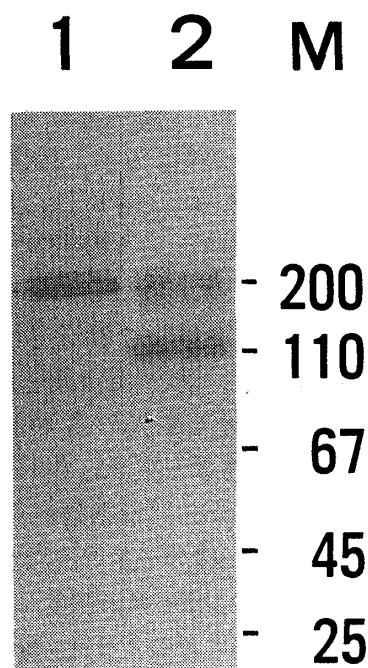


図5 培養上清から精製されたCA125抗原のWestern blotによる解析

分子量1,000kDaのCA125は通常のSDS-PAGEに入らなかったため、分子量200kDa以下のCA125抗原についての解析結果である。Lane 1は正所子宮内膜腺管上皮培養細胞の培養上清からの低分子CA125抗原、lane 2は異所子宮内膜腺管上皮培養細胞の培養上清からの低分子CA125抗原である。

能となった。その結果、正所腺管の高分子量CA125抗原からは分子量200kDaの単一のバンドのみ得られ、異所腺管からは分子量200kDaと110kDaの二つのバンドが認められ、上記と同じ結果が得られた（データ未発表）。

CA125抗原決定基の生化学的性質（表1）

以下の4種類の精製CA125抗原について生化学的性質を比較した。すなわち、(1) 正所腺管から得られた分子量1,000kDa以上の高分子分画に溶出されたCA125、(2) 正所腺管から得られた分子量200kDa以下の低分子分画に溶出されたCA125、(3) 異所腺管から得られた分子量1,000kDa以上のCA125、(4) 異所腺管から得られた分子量200kDa以下のCA125について表1にその結果を示した。この4種類のCA125抗原は各種glycosidaseの影響はほとんど受けず、protease処理によつてその活性は完全に失活し、それぞれの生化学的性質は非常に類似し、低分子CA125の抗原決定基も蛋白質部分にあることが確認された。

考 案

子宮腺筋症患者で血中に高濃度のCA125抗原が証明されるという事実は細胞表面のCA125抗

表1 培養細胞から精製されたCA125抗原のchemical, glycosidase, protease処理の影響

	正 所 腺 管		異 所 腺 管	
	高分子 CA125	低分子 CA125	高分子 CA125	低分子 CA125
化学処理				
periodate oxidation	112	108	109	95
reduction+alkylation	7	<5	6	<5
heat(100℃, 20min)	0	0	0	0
Glycosidase 処理				
neuraminidase	90	92	89	93
mannosidase	90	92	91	96
α-galactosidase	91	101	94	97
β-galactosidase	98	100	93	97
Protease 処理				
trypsin	0	0	0	0
chymotrypsin	0	0	0	0
pronase	0	0	0	0

正所腺管とは、正所腺管の培養上清を示す。異所腺管とは、異所腺管の培養上清を示す。高分子CA125は、分子量1,000kDa以上の高分子量CA125抗原を、低分子CA125は、分子量200kDa以下の低分子量CA125抗原を意味する。

原が血中に分泌されていることを意味している。子宮腺筋症で観察されるCA125と卵巣癌のCA125は本質的には同じ抗体OC125により認識されるため、抗原的には同一であり、同一の分子を認識していると思われるが、異なつた分子上の同一の epitope を認識している可能性も否定できない。今回の子宮内膜培養細胞を使つた *in vitro* の実験系では、子宮内膜腺管培養細胞においては、異所腺管が正所腺管よりCA125分泌が著しいにもかかわらず、細胞膜へ発現されるCA125抗原量には差を認めなかつた。また、培養開始と同時にCA125は細胞膜へ発現され、細胞膜上には培養期間を通して一定のCA125が存在したが、CA125の発現に関しては細胞周期による差異を認めた。正所腺管でも異所腺管においてもその定常期にはCA125陽性細胞のほとんどがG0/G1期の細胞に認められ、一方、対数増殖期においてもCA125陽性細胞の67.2%はG0/G1細胞に認められたことより、CA125発現は細胞の増殖とは関連しないと考えられた。

この事実は Bishof, P. et al.⁴⁾の報告とは異なっているように思われる。彼らは間質細胞からのCA125産生を *in vitro* 実験系で確認しており、間質細胞からのCA125産生は細胞の増殖と関連したものであると結論づけているが、子宮内膜腺管上皮細胞からのCA125産生については言及していない。一方、間質細胞にはCA125の局在を認めず、子宮内膜細胞にのみCA125を認めた Kabawat, S.E. et al. の免疫組織染色の結果は、我々の結果を支持するものと思われる⁸⁾。

Bast, R.C. Jr. et al. は卵巣癌培養細胞からのCA125産生はその細胞周期のG0期に起こることを報告している。また、Imai, S. et al.⁷⁾によれば、卵巣癌培養細胞(SHIN-3)からのCA125産生は細胞が cell cycle に介入する時に起こるので、対数増殖期よりはその直前にCA125が産生され、少なくともG2+M期にはCA125が発現されにくいと報告している。正常細胞と癌細胞との差異はあるが、CA125産生細胞はG0あるいはG1期の細胞に認められることは普遍的な事実であろう。

子宮腺筋症におけるCA125抗原の生理的作用

や、その生化学的性質は全く分かつていない。CA125の分子量や生化学的性質の決定は、子宮内膜腺管細胞と癌細胞から産生されるCA125の異同を知る有力な手がかりになる。悪性細胞(PC-9肺腺癌細胞)の場合には、1,000KDa以上の高分子CA125のみ認められるという報告⁹⁾に対し、子宮内膜腺管細胞から産生されたCA125の分子量は、その70%は1,000KDa以上の高分子量であるが30%は200KDa以下であつた。最近、今井らはSHIN-3培養上清中のCA125の最小抗原決定基は49KDaの分子量であると報告しているので、今後詳細な検討を用するが、悪性細胞と子宮腺筋症から分泌されるCA125は分子量の点で異なり、110KDaの分子量のCA125が異所腺管に特有のものである可能性が示唆された。最近、urea 処理にて高分子量CA125をdisaggregateし、低分子量CA125を得る方法で検討しても同様の結果を得た。さらに、CA125の生化学的性質の検討の結果、分子量にかかわらずOC125が認識する epitope は蛋白質であることが確認され、異所腺管由来のCA125は過去に報告された悪性細胞由来のCA125の性質⁶⁾と非常に類似した。

以上より、疾患によるCA125抗原の分子量の相違に関しては、以下のような可能性が示唆された。すなわち、1,000KDa以上の高分子量CA125は低分子CA125蛋白の集合体より形成されており、異所腺管由来のCA125は悪性細胞や正所腺管に比べて一部はその集合体において低分子CA125蛋白の性質は同じであるがその数が少なくなっているか、又は、低分子CA125蛋白が高分子 native CA125 molecule の protease などによる分解産物と考えることもできる。しかし、いずれにしても抗体OC125を使用する限り、抗原性によつて癌と子宮腺筋症を鑑別することは不可能である。そこで現在、110KDaの分子量のCA125が子宮腺筋症の患者の血清中にも特異的に証明されるかどうか、また、より簡便な測定法についても検討中である。

文 献

1. 井田若葉, 小林 浩, 内藤恭久: 子宮内膜培養細胞におけるCA125産生動態に関する研究—正所

- 内膜と異所内膜の比較一. 日産婦誌, 42 : 1161, 1990.
2. 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.
 3. Bast, R.C. Jr., Klug, T.L., St. John, E., Jenison, E., Niloff, J.M., Lazarus, H., Berkowitz, R.S., Leavitt, T., Griffiths, C.T., Parker, L., Zurawski, V.R. Jr. and Knapp, R.C. : A radioimmunoassay using a monoclonal antibody to monitor the course of epithelial ovarian cancer. *N. Engl. J. Med.*, 309 : 883, 1983.
 4. Bishof, P., Tseng, L., Brioschi, P.A. and Herrmann, W.L. : Cancer antigen 125 is produced by human endometrial stromal cells. *Hum. Reprod.*, 7 : 423, 1986.
 5. Bretton, P.R., Myc, A., Cordon-Cardo, C., DeAngelis, P., Fair, W.R. and Melamed, M.R. : Initial evaluation of a new epithelial antigen (T16) for bivariate flow cytometry of bladder irrigation specimens. *Cytometry*, 10 : 339, 1989.
 6. 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.
 7. 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.
 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. Matsuoka, Y., Nakashima, T., Endo, K., Yoshida, T., Kunitatsu, M., Sakahara, H., Kozumi, 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.
 10. Satyaswaroop, P.G., Bressler, R.S., De La Pena, M.M. and Gurside, E. : Isolation and culture of human endometrial glands. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 48 : 639, 1979.
 11. Wild, R.A., Podczaski, E.S., Hrisave, V., Demers, L.M. and Bianco, A. : Endometrial antibodies versus CA125 for the detection of endometriosis. *Fertil. Steril.*, 55 : 90, 1991.

(No. 7103 平 3・10・7 受付)