Japan Society of Obstetrics and Gynecology

日本産科婦人科学会雑誌 ACTA OBST GYNAEC JPN Vol. 44, No. 10, pp. 1277—1278, 1992（平4，10月）

速　報

Fibrin Autographyによる子宮癌腫瘍マーカー（Plasminogen activator, Plasmonogen activator inhibitor）の検出

愛知医科大学放射線医学教室
*愛知医科大学産婦人科学教室
伊藤　要子　野崎　宗信*　澤口　啓造*　増田　知之*
藪下　廣光*　野口　昌良*　宮田　伸樹　中西　正美*

Detection of Tumor Markers in Uterine Cancer (Plasminogen Activators, Plasminogen Activator Inhibitors) Using Fibrin Autography

Youko ITOH, Soushin NOZAKI*, Keizou SAWAGUCHI*,
Tomoyuki MASUDA*, Hiromitsu YABUSHITA*, Masayoshi NOGUCHI*,
Nobuki MIYATA and Masami NAKANISHI*
Department of Radiology, Aichi Medical University, Aichi
**Department of Obstetrics and Gynecology, Aichi Medical University, Aichi*

Key words: Fibrin autography・Uterine cancer・Tissue type plasminogen activator・Urokinase type plasminogen activator・Plasminogen activator inhibitor

緒　言

生体内の種々の組織及び体液中に存在するPlasminogen activator（PA）にはtissue type PA（tPA）と尿由来のurokinase type PA（uPA）の2種類がある．特に癌細胞の浸潤，転移には癌細胞表面に局在するuPA及びPA inhibitor（PAI）が重要な役割を果たしている[1]．そこで，Fibrin Autographyを用いて，uPA, tPA, PAIを同時に検出し，癌の進展，浸潤度との関連を比較し子宮癌診断におけるその有効性を検討した．

実験材料及び実験方法

子宮筋腫手術症例6例での正常子宮頚部上皮組織，正常子宮内膜組織及び子宮体癌6例について，各々の組織細片に10倍量の0.1M Tris-HCl, pH 7.5 bufferを加えhomogenizeし，12,000rpm, 30分遠心後の上清を組織抽出液とした．各組織抽出液の0.025 mgを4～20% gradient SDS polyacrylamide gel（SDS-PAGE）で電気泳動後，25% Triton X-100でgelを洗浄し，SDS gelをFibrin-Agar gelの上に乗せ37℃のincubator内で4時間反応後，SDS gelはBrilliant Blueにて蛋白染色した．Fibrin-Agar gelは，50℃で乾燥させた．Fibrin-Agar gel[2]は，0.4%Human Fibrinogen（KABI社，Plasminogenを含む）溶液15mlと，煮沸し溶解した2.5%Agarose液15mlを45℃のincubator内に浸し，この加温したAgarose液に50U/ml Thrombin 10ulを添加後Human Fibrinogen溶液を素早く混和し作成した．

結　果

図1上段は各抽出液をSDS-PAGEで泳動後の蛋白染色像を示した．Lane 1, 3は子宮頚部染色像を示したのに対し，ほかのLane 2, 4, 5, 6, 7, 8は子宮体部染色像を示した．頚部組織抽出液は200～116KDaの間の幅広い不明瞭なbandとほぼ50KDaの強い鮮明なband及び約12KDaのbandが特徴的に強く染色された．体部組織抽出液では，ほぼ55KDaの強いbandと200～12KDaに多数の細いbandが認められ，各々頚部，体部で特徴的なパターンを示した．下段はFibrin-Agar gel上にSDS gelを乗せ37℃で反応後のFibrin Autographyを示した．Fibrinが溶解され透明になつた部位（写真では黒色band）がPA活性部位であり，Fibrin溶解bandの位置（SDS-PAGEの分子Markerから算出）から物質を同定し，溶解bandの濃度（黒色度）からPA活性の強度を測定した．Lane 1, 2, 3, 4は正常子宮組織であり，分子量70KDaのtPAによるFibrin溶解が強くbroadであつたが，分子量55KDaのuPAの溶解bandは弱く細かつた．

子宮体癌ではLane 9の精製uPAに一致して溶解bandが増強された．興味あることに，Lane 5, 6, 7と体癌の浸潤度が増すにつれuPAによる溶解が強くなり，tPAの溶解bandも若干増強された．また，PAとPAIのcomplex（PA・PAI complex）が分子量約110～130KDaの位置に認められた．このcomplexはLane 6の1/3浸潤ではご

NII-Electronic Library Service

Japan Society of Obstetrics and Gynecology

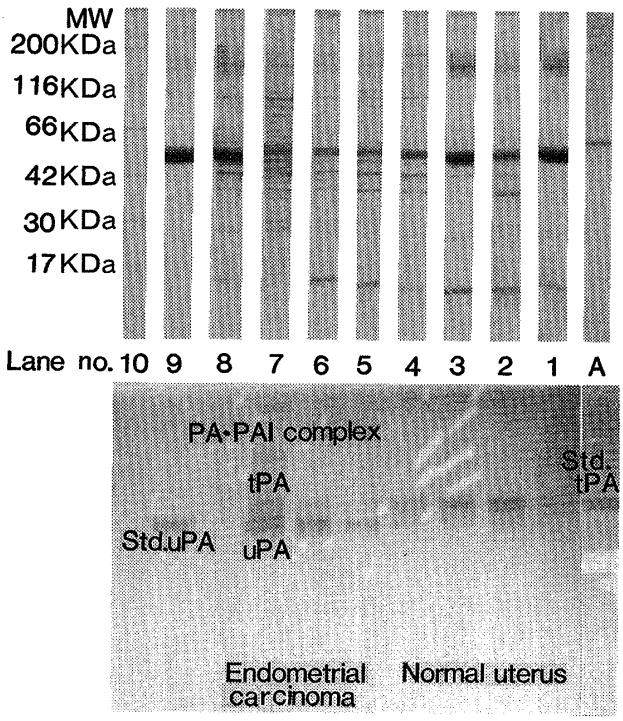

図1 SDS-PAGE and fibrin autography of tissue extracts obtained from normal uterus and endometrial carcinoma.
Lane no. A; tPA, 1, 3; normal cervix, 2, 4; normal endometrium, 5; endometrial carcinoma (depth: <1/3), 6; endometrial carcinoma (depth: 1/3～2/3), 7; endometrial carcinoma (depth: >2/3), 8; endometrial carcinoma, 9; standard uPA, 10; molecular marker (200KDa, 116KDa, 66KDa, 42KDa, 30KDa, 17KDa)

くわずかに，またLane 7の2/3以上浸潤では強い溶解bandが認められ，体癌の浸潤度と共にPA・PAI complexが増強していることが認められた．Lane 8は内膜に限局の体癌の組織抽出液であり，PA活性は非常に低かつた．

考　察

既に我々は，正常子宮頚部・体部及びそれらの悪性腫瘍で，tPA，uPA，PAI抗体による組織染色率及びELISAの結果，正常子宮頚部・体部共に有意に高いtPA活性を認め，悪性腫瘍ではuPA活性の高値を認めた[3]．特に子宮体癌でのuPA及びPAIは浸潤度に伴い高値を示し，Fibrin Autographyの結果と非常によく一致し，子宮癌診断法におけるFibrin Autographyの意義を高めた．また，1枚のFibrin-Agar gel上でtPA，uPA，PAIが同時に容易に検出可能であり，しかも低コストで実施できるなど利点も多い．

一般にはPA・PAI complexではPA活性は消失するが，Levin[4]，坂田らの報告のごとくSDS処理により，複合体の立体構造に変化が生じPAの活性基が露呈したものと考えられる．なお，本実験で認められたPA・PAI complexに関しては，抗tPA抗体又は抗uPA抗体を含んだFibrin Autographyによる結果から主としてtPA・PAI complexと推察されたが，現在詳細については検討中である．

また，Fibrin AutographyとSDS-PAGEの蛋白染色像の組合せは正常と癌の鑑別，体部・頚部の組織分類が可能であり，Fibrinの溶解bandの大きさは癌の浸潤度を示し，更にPA・PAIのcomplexが容易に検出可能であるなど多くの有用な情報を与えることから，特にPA，PAIの変動が重要な意義を持つ産婦人科領域の新しい癌診断法として大きく期待された．

ま と め

子宮正常及び悪性腫瘍組織抽出液のFibrin Autographyを行つた結果下記の成績を得た．

1. 正常子宮体部・頚部共にtPA（MW：70 KDa）の位置に強いFibrin溶解bandを認め，uPA（MW：55KDa）の位置に弱いbandを認めた．
2. 子宮体癌では，その浸潤度に伴いuPAのFibrin溶解bandが強くなり，tPAも若干増強した．PA・PAI complexも浸潤度と共に増強した．
3. SDS-PAGEの蛋白染色像では，子宮体部組織は体部の，頚部組織は頚部の特徴的染色パターンを示した．

以上Fibrin AutographyはuPA，tPA，tPA・PAI complexが同時に容易に検出でき，子宮癌診断法として非常に有意義な情報を提供した．

文　献

1. *Ossowski L.* In vivo invasion modified choroallantoic membrane by tumor cells: The role of cell surface-bound urokinase. J Cell Biol 1988; 107: 2437—2445
2. *Erickson LA, Lawrence DA, Joskutoff DJ.* Reverse fibrin autography: A method to detect and partially characterize protease inhibitors after sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. Analy Biochem 1984; 137: 454—463
3. **野崎宗信，伊藤要子．** 子宮癌におけるPlasminogen activator及びPlasminogen activator inhibitorの組織内局在の意義．腫瘍マーカー研究会誌 1991; 7: 47—49
4. *Levin EG.* Latent tissue plasminogen activator produced by human endothelial cells in culture. Proc Natl Acad Sci USA 1983; 80: 6804—6808

（No. 7250 平4・7・17受付）

NII-Electronic Library Service