

ヒト胎盤における Glutathione S-transferase の 免疫組織化学的, 生化学的検討

弘前大学医学部産婦人科学教室

白取 祐子 羽田 義信 丸山 英俊 品川 信良

弘前大学医学部第2生化学教室

館岡 昇

Immunohistochemical and Biochemical Investigations on Glutathione S-transferases in Human Placenta

Yuhko SHIRATORI, Yoshinobu HADA, Hidetoshi MARUYAMA
and Shinryo SHINAGAWA

Department of Obstetrics and Gynecology,

Hirosaki University School of Medicine, Hirosaki

Noboru TATEOKA

Second Department of Biochemistry,

Hirosaki University School of Medicine, Hirosaki

概要 ヒト胎盤において Glutathione S-transferase 胎盤型(GST- π)は, 主な分子種として精製される。今回我々は, 胎盤より精製した GST- π , 肝臓より精製した neutral GST- μ と basic GST-I に対する抗体を用いて, ヒト早期(10例), 中期(3例), 末期胎盤(14例)につき, これらの分子種, 特に GST- π の局在を免疫組織化学的に検討した。また初期胎盤4例, 末期胎盤5例につき, total GST activity, それに対する GST- π relative activity, GST- π content を測定し, 以下の成績を得た。

1) GST- π は初期胎盤の cytotrophoblasts (C細胞), 末期胎盤の syncytiotrophoblasts (S細胞) に局在していた。

2) GST- μ は初期胎盤の S細胞の一部に, GST-I は初期, 中期, 末期胎盤の C細胞, S細胞を含む種々の細胞に弱陽性に認められた。

3) Total GST activity は初期胎盤で 5.8 ± 2.0 units/g (湿重量) (mean \pm S.D.), 末期胎盤で 14.8 ± 3.4 units/g; GST- π relative activity は $90 \pm 4\%$ と $85 \pm 6\%$; GST- π content は $41 \pm 31 \mu\text{g/g}$ と $106 \pm 29 \mu\text{g/g}$ であった。

以上, GST- π はどの時期の胎盤においても主な GST 分子種であり, trophoblasts に局在し, 胎盤の発達とともに増加することが判明した。

Synopsis GST- π can be purified as a major molecular form of glutathione S-transferase (GST) in human placenta. In this paper, the localization of GST- π as well as of neutral and basic GSTs in the first, second and third trimester placental tissues (10, 3 and 14 samples, respectively) was investigated immunohistochemically using antibodies to acidic GST- π from the placenta, neutral GST- μ and basic GST-I from the liver. Total GST activity was assayed using 1-chloro-2,4-dinitrobenzene as a substrate, and the relative activity and content of GST- π were determined by activity inhibition test and single radial immunodiffusion, respectively, on 4 first and 5 third trimester placental tissues. The results obtained were as follows.

1) In early placenta, cytotrophoblasts were strongly stained by anti-GST- π antibody, while in third placenta mainly syncytiotrophoblasts were stained.

2) GST- μ was stained only in syncytiotrophoblast in early placenta, while basic GST-I was weakly stained in the various cells in early to term placenta.

3) Total GST activity in early and term placentas was 5.8 ± 2.0 units/g of tissue (mean \pm S.D.) and 14.8 ± 3.4 units/g, respectively. GST- π relative activities were $90 \pm 4\%$ and $85 \pm 6\%$, and GST- π content

was $41 \pm 31 \mu\text{g/g}$ and $106 \pm 29 \mu\text{g/g}$, respectively.

These results indicate that GST- π is a major form of GST and localized mainly in trophoblasts at any developmental stage of the placenta, and it increases with development.

Key words: Placenta • Glutathione S-transferase • Isozyme

緒 言

GSTは種々の解毒機構に関係する多機能酵素である。肝臓を中心に多くの分子種が知られている¹⁰⁾。近年, 正常ラット肝にはほとんどない中性のGST分子種がラット胎盤から精製され, GST-Pと命名された。しかも, この分子種はラット化学発癌過程での前癌病変に著明に発現・増加することが明らかとなった¹²⁾。さらに免疫学的, 蛋白化学的, 酵素学的にラットGST-Pと類似するヒト胎盤型のGST- π も, ヒトのある種の臓器の(前)癌病変に発現増加していることが, 主として免疫組織化学的に認められている¹⁸⁾。ヒトGST分子種は塩基性, 中性, 酸性の分子種に大別され, 正常成人肝においては塩基性分子種を主とする少なくとも5種の分子種が知られている¹³⁾。GST- π はヒト肝では微量な酸性の分子種であるが¹³⁾。ヒト胎盤においては主な分子種として初めてGuthenberg et al.⁴⁾⁵⁾によつて精製され, GST- π と命名された。しかし, GST- π が胎盤組織中いかなる細胞に局在するかは不明であつた。そこで肝臓の主な分子種であるbasic GST-I¹³⁾, 微量分子種であるneutral GST- μ と合わせて, GST- π が胎盤の分化発達に伴い, いかなる細胞に局在するかを免疫組織化学的に検索した。さらに, GST- π relative activity, GST- π contentをtotal GST activityとともに, 酵素学的, 免疫化学的に定量測定した。

研究材料並びに方法

1. 検査対象

免疫組織化学的検索にはヒト早期胎盤10例, 中期胎盤3例, 末期胎盤14例を用いた。酵素学的, 免疫化学的検索には初期胎盤4例, 末期胎盤5例を用いた。

2. 免疫組織化学的染色

GST- π はヒト末期胎盤から, basic GST-I及びneutral GST- μ はヒト正常成人肝から, それぞれの細胞質画分を用いてS-hexyl-glutathione column chromatographyとchromatofocusingによ

り単一蛋白となるまで精製し, 家兎にFreundのcomplete adjuvantとともに免疫し, その血清から, γ -globulinを分画し, 抗体とした。その特異性はimmunoblotting法にてそれぞれの分子種のsubunitとのみ反応することで確認された¹³⁾。

10mM phosphate-buffered 10% formalinにて固定した初期, 中期, 末期の胎盤組織を, パラフィン包埋し, 6μ 超薄切片を作製し, 脱パラ後PBSにて洗浄し, ABC法(Avidin-Biotin Complex法)⁷⁾に従つて免疫組織化学的染色を行つた。先ず0.3% H_2O_2 にて内因性ペルオキシダーゼをblockしたのち, PBSにて10%に希釈した正常家兎血清にて非特異的蛋白結合をblockした。PBSで洗浄後, 抗GST- π , - μ , -I抗体を別々に添上し, 4°C でover night incubateした。PBSで洗浄後, Vector社(米国, ニュージャージー州)のbiotinylated goat anti-rabbit immunoglobulin G(指定通り希釈)を添上し, 室温で30分間incubateした後PBSで洗浄し, 同社のDH-biotinylated horseradish peroxidase complex(指定通り希釈)を加え, 同様にincubateした。PBSにて洗浄後, peroxidase substrate solution (0.1%3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, 0.01% H_2O_2 in 50mM Tris-HCl buffer, pH 7.6)を添上し, 室温で2分間酵素反応を行わせて染色した。hematoxylinにて核染後, 封入した。controlとして正常家兎血清(γ -globulin画分)を用いて同様の操作を行つた。

3. GST activity及びGST- π contentの測定
 -80°C に保存した初期胎盤(4例), 末期胎盤(5例)をそれぞれ5gずつ細切して, 154mM KCl, 4mM EDTA, 5mM dithiothreitolを含む50mM Tris-HCl buffer (pH 7.4)で20%homogenateを調製後, $5,000 \times g$ で10分間遠心し(日立冷却遠心機使用), その上清をさらに $105,000 \times g$, 45分間遠心し(日立55RP型分離用遠心機使用), 得られた上清をcytosol画分として以下の測定に用いた。

Total GST activityは10mM 1-chloro-2, 4-

dinitrobenzene (CDNB) を第1基質, 1mM glutathione を第2基質として, Habig et al.⁸⁾の方法に従い25°Cで測定した. 1分間あたり1 μ molの基質を glutathione 抱合するのに要する酵素量を1 unit とした.

GST- π relative activity は抗 GST- π 抗体を用いて次のごとく activity inhibition test により測定した. GST- π 抗体をそれぞれ PBS で任意に ($\times 5, \times 10, \times 20, \times 50, \times 100$) 希釈し, その50 μ l に100 μ l の cytosol を加え, PBS にて全量500 μ l とした. この液を4°Cで, over night 放置後, 15,000 rpm, 10分間遠心し, その上清の CDNB に対する GST activity を残存活性(R)とした. control として, non-immune 正常家兎血清の γ globulin 画

分を用い, 同様な操作を行い, 上清の GST activity を全活性(T)とした. $T-R/T \times 100$ を GST- π relative activity (%) とした.

GST- π content は GST- π 抗体を用いて Mancini et al.⁹⁾の single radial immunodiffusion 法にて測定した.

成 績

初期胎盤において GST- π は, cytotrophoblast (以下C細胞と略)の細胞質と核に強い陽性所見を示した. しかし syncytiotrophoblast (以下S細胞と略)には陽性所見を認めなかつた(写真1). また子宮内膜腺細胞や脱落膜細胞においても細胞質に弱陽性を示した(写真2). GST- π は中期胎盤ではS細胞と脱落膜細胞に, 末期胎盤においてはS細胞に陽性を示した(写真3).



写真1 妊娠初期絨毛組織における GST- π の免疫組織化学的局在 ($\times 100$).
C細胞の細胞質と核に陽性所見が認められる(矢印). しかし, S細胞には陽性所見を示さなかつた.



写真3 妊娠末期絨毛組織における GST- π の免疫組織化学的局在 ($\times 50$).
S細胞の細胞質に陽性を示している.

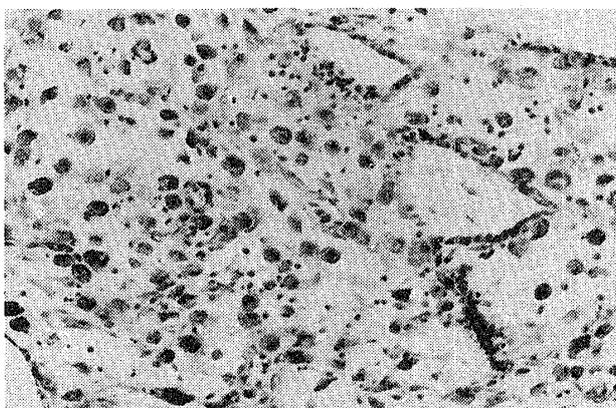


写真2 妊娠初期脱落膜組織における GST- π の免疫組織化学的局在 ($\times 100$).
脱落膜細胞に陽性所見を認める.

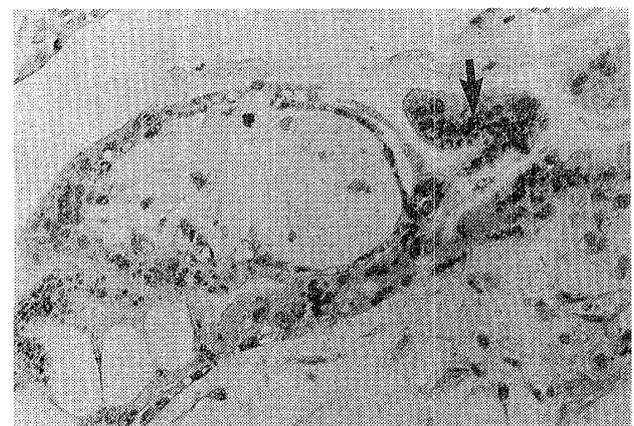


写真4 妊娠初期絨毛組織における GST- μ の免疫組織化学的局在 ($\times 200$).
S細胞の細胞質に細顆粒状に染まっている(矢印).

GST- μ は, 初期胎盤に隣接する子宮内膜腺細胞, 脱落膜細胞, C細胞に弱陽性を示した。時にS細胞の細胞質において細顆粒状に染まる例も認められた(写真4)。中期, 末期胎盤においては陰性であった。

GST-I は, 初期胎盤では子宮内膜腺細胞と脱落膜細胞(写真5), C細胞, S細胞の細胞質に陽性を示し, 中期並びに末期胎盤においてはそれら細胞質に弱陽性を示した。

正常家兎血清を用いた control はいずれの細胞においても陰性であった。免疫組織化学的所見は

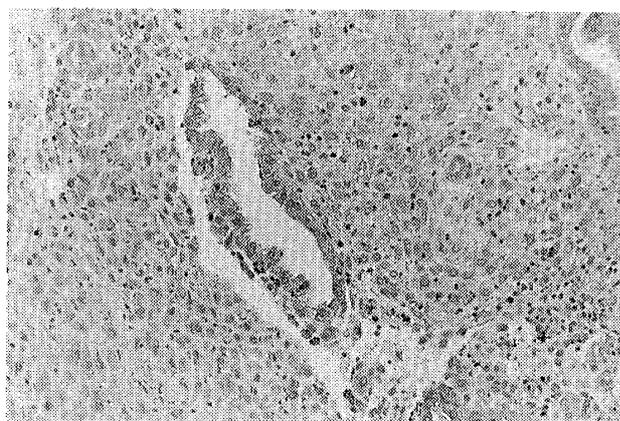


写真5 妊娠初期脱落膜組織におけるGST-Iの免疫組織化学的局在(×50)。

子宮内膜腺細胞と脱落膜組織に陽性所見を示している。

表1 ヒト胎盤におけるGST- π , - μ , -Iの免疫組織化学的局在性

	子宮内膜腺細胞	脱落膜細胞	C細胞	S細胞
GST- π				
初期胎盤	+	+	#	-
中期胎盤	-	+	+	-
末期胎盤	n.d.	-	n.d.	#
GST- μ				
初期胎盤	±	±	±	+
中期胎盤	-	-	-	-
末期胎盤	n.d.	-	n.d.	-
GST-I				
初期胎盤	+	+	+	+
中期胎盤	±	+	-	±
末期胎盤	n.d.	-	n.d.	±

- : negative, ± : weak positive

+ : positive, # : strongly positive

n.d. : these cells not detectable.

表2 ヒト胎盤におけるTotal GST activity, GST- π のrelative activityとcontent

	Total GST activity (units/g wet weight)	π relative activity (%)*	GST- π content (μ g/g of tissue)**
初期胎盤 1	8.9	92	88
2	5.0	86	51
3	5.8	95	13
4	3.4	88	13
mean±S.D.	5.8±2.0	90±4	41±31
末期胎盤 1	16.5	88	145
2	9.0	75	70
3	15.5	90	75
4	19.0	89	127
5	14.0	83	115
mean±S.D.	14.8±3.4	85±6	106±29

*by activity inhibition test

**by single radial immunodiffusion

表1のごとくにまとめられる。

CDNBに対するtotal GST activityは初期胎盤では 5.8 ± 2.0 units/g (湿重量) (mean±S.D.), 末期胎盤では 14.8 ± 3.4 units/gで, 有意に末期胎盤で高かった。GST- π relative activityはそれぞれ $90 \pm 4\%$ と $85 \pm 6\%$ で, total GST activityが末期胎盤で高いことを考慮するとGST- π activityの絶対値も末期胎盤で高いことを示唆していた。GST- π contentは $41 \pm 31 \mu$ g/g, $106 \pm 29 \mu$ g/gで, 有意に末期胎盤で高く, relative activityから予想された結果と一致していた。これらは表2のごとくにまとめられる。

考 察

胎盤の機能単位である絨毛はS細胞とC細胞の2層の絨毛上皮と間質よりなる。S細胞はC細胞からtransitional mononuclear cellをへて多核の合胞細胞になったもので分裂能を欠くが, C細胞は分裂能を有し, 特に妊娠初期に旺盛な増殖を示す。免疫組織化学的にGST- π は初期の胎盤のC細胞の細胞質と核に強く染色され, 末期におけるS細胞よりも多く発現していることが示唆された。それに対しGST- μ , -Iは胎盤の分化発達に伴いGST- π ほど明らかな局在性の変化を示さず, 核の陽性所見も認められなかった。これら分子種のrelative activityは, GST- π relative activityのデータから初期胎盤では約10%, 末期胎盤でも

約15%と推定され、ともに低かった。GST- π の relative activity 及び content がともに初期胎盤より末期胎盤において高かったことは免疫組織学的所見と必ずしも一致しなかった。これは初期胎盤が妊娠4週～9週と早期で、採取した組織中の絨毛組織が末期胎盤ほど均一に多く含まれていなかったことにも一因があると考えられた。ところで、GST- π はヒトのある種の(前)癌病変(子宮頸癌、大腸癌)⁹⁾において強い発現が認められることから、GST- π は他の分子種よりも細胞の増殖や癌化と係りが深いことが示唆される。増殖と癌化に関して、近年増殖細胞は自ら増殖因子を産生して自己増殖するという autocrine の考え方がある。しかも癌遺伝子が成長(増殖)因子の遺伝子あるいは成長因子受容体の遺伝子の一部であることが判明して、正常細胞の増殖のしくみと癌化とが関連づけて考えられるようになってきた。例えば、Pfeifer-Ohlsson et al.¹¹⁾は妊娠初期のC細胞でc-myc癌遺伝子の著明な発現を認め、myc癌遺伝子が、trophoblastの増殖に関与している可能性を示唆している。また丸尾と望月²⁾も抗myc gene product抗体を用いて免疫組織学的に、myc gene productはS細胞よりもC細胞に強く局在し、しかもその局在性は初期の絨毛組織ほど大であり、C細胞においてはその核に局在することを観察し、Pfeifer-Ohlsson et al.の考え方を支持している。これらの知見はGST- π の局在性とよく類似していて、興味深い。他方、胎盤はペプチドホルモンとステロイドホルモンを同時に産生する特異な内分泌臓器である。GSTの特定の分子種は以前からある種のステロイドホルモンや発癌剤のbindingまたはcarrier proteinとして知られており¹⁰⁾、胎盤中の主な分子種であるGST- π も母体や胎盤自身から産生されるステロイドホルモンのbinding(carrier) proteinとして、これらホルモンの作用発現に関与し、また逆にこれら過剰なホルモンの代謝的不活性化に関与している可能性が考えられる。また母体側から入ってくる薬物や発癌性物質などを胎盤組織においてglutathione抱合して解毒し、胎児を守るように働いていることも考えられる。いずれにしても今後の研究に待た

ねばならない。なお、GST- π はBohn et al.³⁾の胎盤特異的蛋白の一つPP₇と同一か、その主要成分とみなされている。

稿を終るにあたり、抗原の抽出精製、抗体の提供並びに生化学的検索に御指導及び御協力をいただきました相馬悌博士、及び佐藤清美教授(弘前大学医学部第二生化学教室)に深謝致します。

文 献

1. 牧野剛緒, 浦 等, 堤 雅弘, 白岩和巳, 小西陽一, 相馬 悌, 佐藤清美: 膵発癌における膵管上皮の新しい指標酵素胎盤型 glutathione S-transferase. 医学のあゆみ, 134: 273, 1985.
2. 丸尾 猛, 望月真人: 絨毛の機能分化と胎盤ホルモンのself-regulationの特性と成長因子の関与. 日産婦誌, 38: 610, 1986.
3. Bohn, H., Inaba, N. and Luben, G.: New placental proteins and their potential diagnostic significance as tumor markers. Oncodevelop. Biol. Med., 2: 141, 1981.
4. Guthenberg, C., Akerfelt, K. and Mannervik, B.: Purification of glutathione S-transferase from human placenta. Acta Chem. Scand., B33: 595, 1979.
5. Guthenberg, C. and Mannervik, B.: Glutathione S-transferase (transferase π) from human placenta is identical or closely related to glutathione S-transferase (transferase ρ) from erythrocytes. Biochim. Biophys. Acta, 661: 255, 1981.
6. Habig, W.H., Pabst, M.J. and Jakoby, W.B.: Glutathione S-transferases. J. Biol. Chem., 249: 7130, 1974.
7. Hsu, S.M., Raine, L. and Fanger, H.: Use of avidine biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. J. Histochem. Cytochem., 29: 577, 1981.
8. Kodate, C., Fukushi, A., Narita, T., Kudo, H., Soma, Y. and Sato, K.: Human placental form of glutathione S-transferase (GST- π) as a new immunohistochemical marker for human colonic carcinoma. Jpn. J. Cancer Res. (Gann), 77: 226, 1986.
9. Mancini, G., Carbonara, A.O. and Hermans, J. F.: Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. Immunochemistry, 2: 235, 1965.
10. Mannervik, B.: The isozymes of glutathione transferase. Adv. Enzymol., 57: 357, 1985.

11. Pfeifer-Ohlsson, S., Goustin, A.S., Rydnert, J., Wahlstrom, T., Bejersing, L., Stehelin, D. and Ohlsson, R. : Spatial and temporal pattern of cellular myc oncogene expression in developing human placenta: Implication for embryonic cell proliferation. *Cell*, 38 : 585, 1984.
12. Satoh, K., Kitahara, A., Sato, K., Ishikawa, T., Tatematsu, M. and Ito, N. : The placental form of glutathione S-transferase as a new marker protein for preneoplasia in rat chemical hepatocarcinogenesis. *Gann*, 75 : 199, 1984.
13. Soma, Y., Satoh, K. and Sato, K. : Purification and subunit-structural and immunological characterization of five glutathione S-transferases in human liver, and acidic form as hepatic tumor marker. *Biochim. Biophys. Acta*, 869 : 247, 1986.

(No. 6048 昭61・9・9受付)