

膀胱腫瘍間質におけるプロテオグリカンの免疫組織化学的局在

名古屋大学医学部泌尿器科学教室 (主任 : 三宅弘治教授)

高村 真一, 三宅 弘治

名古屋大学医学部附属病院検査部 (主任 : 竹内 純教授)

竹 内 純

IMMUNOHISTOCHEMICAL LOCALIZATION OF PROTEOGLYCANS IN INTERSTITIAL ELEMENTS OF HUMAN BLADDER CANCER

Shinichi Takamura and Kouji Miyake

From the Department of Urology, Nagoya University School of Medicine

Jun Takeuchi

From the Department of Clinical Laboratory, Nagoya University Hospital

The immunohistochemical localization of glycosaminoglycan side chains and core protein of proteoglycan was observed, using monoclonal antibodies, on 8 specimens of non-tumor bladder tissues and 26 specimens of bladder tumors obtained from total cystectomy or transurethral resection of bladder tumor (TUR-Bt). In non-tumor tissues of human bladder examined, the surface of urothelial epithelium consisted of heparan sulfate as revealed with antibody HepSS-1, and sub-mucosal interstitial elements consisted mainly of small proteoglycan having chondroitin 4-sulfate side chains as revealed with antibodies 6B6 and 9A2, respectively. On the other hand, in bladder tumors examined, the interstitial fibrous elements, the so-called "specific stroma" in cancer cell nests, consisted mainly of large proteoglycans having chondroitin 4-sulfate or 6-sulfate side chains as revealed with antibodies 2B1, 9A2 and 3B3, respectively. Antibodies 2B1 and 3B3 are considered to be useful to demonstrate the involvement by invasive growth of bladder tumor cells.

(Acta Urol. Jpn. 37: 329-334, 1991)

Key words: Immunohistochemistry, Large proteoglycans, Small proteoglycans, Chondroitin 6-sulfate, Bladder tumor

緒 言

プロテオグリカン (PG) は, 細胞外基質としてまたは細胞表層の構成成分として重要な役割をはたしている. 細胞は悪性化することにより, その増殖能および遊走能が増大することが知られているが, その場合 PG の量および質が劇的に変化することが推測されている. 今日までに, 多くの研究者¹⁾により腫瘍組織における PG の特性が報告されてきたがわれわれも膀胱上皮について, その悪性化に伴う間質 PG の質的变化を検討するため異なった PG 分子を特異的に認識する 6 種類のモノクローナル抗体を用い免疫組織化学的検索を行い, PG 糖鎖, およびコア蛋白の局在に興味ある変化を認めたので報告する.

材料および方法

1) 材料

経尿道的膀胱腫瘍切除術 (TUR-Bt) 21例および膀胱全摘術 5 例より得られた非腫瘍部膀胱組織 8 検体, 腫瘍 26 検体 (TCC-G1 7 検体, TCC-G2 12 検体, TCC-G3 7 検体) を対象とした. 非腫瘍部膀胱組織は病変のない部で, 腫瘍増殖部位から少なくとも 5 cm 以上離れた場所を選択した. (TCC: 移行上皮癌)

2) 抗体

用いたモノクローナル抗体は 9A2, 3B3, CS56, 6B6, 2B1, HepSS-1 の 6 種類で, その染色性を Table 1 に示す. 抗体 9A2, 3B3, CS56 は ICN

Table 1. Reactivity of antibodies raised against dermatan sulfate, chondroitin sulfate, heparan sulfate, small PG and large PG.

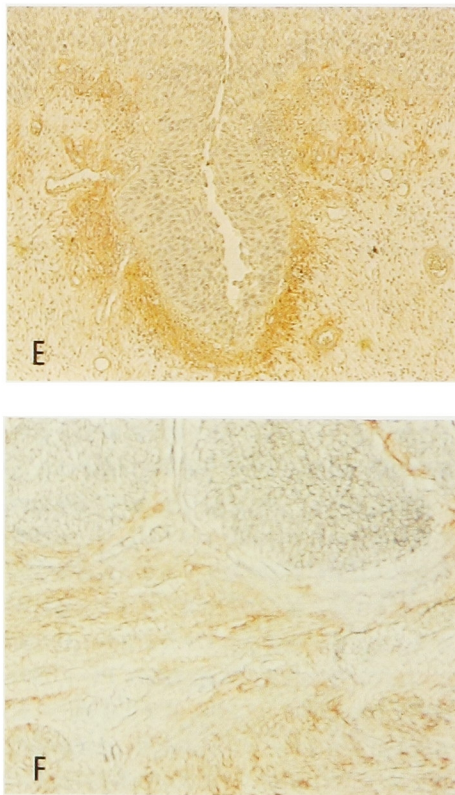
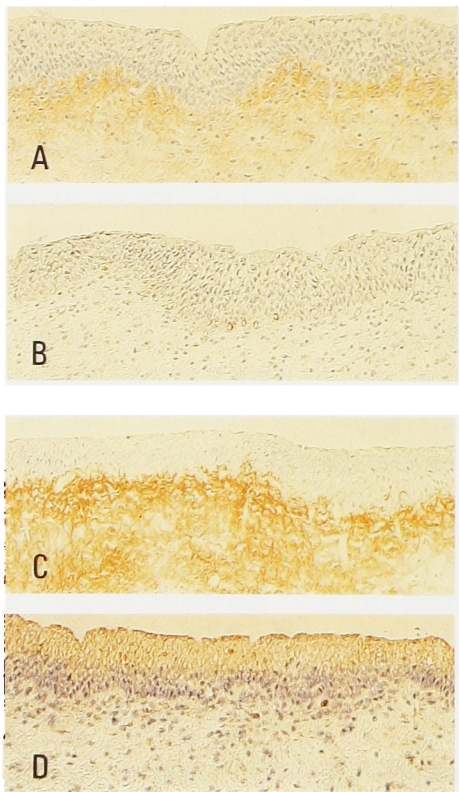
抗体名	デルマトン硫酸	コンドロイチン4硫酸	コンドロイチン6硫酸	ヘパラン硫酸
9A2 (AB Case 処理)	+	+	-	-
9A2 (B-lyase 処理)	+	-	-	-
3B3	-	-	+	-
CS56	-	+	+	-
Hep SS-1	-	-	-	+
2B1	large proteoglycan の core protein と反応 (分子量 20万前後)			
6B6	small proteoglycan の core protein と反応 (分子量 5万前後)			

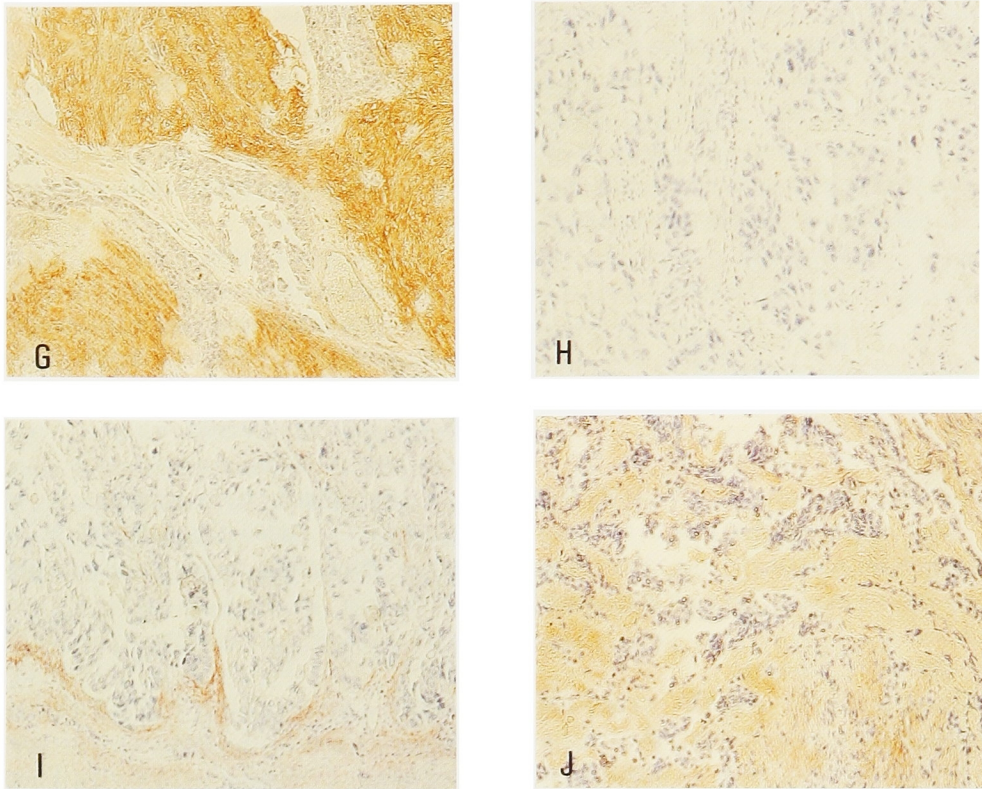
Immuno Biologicals 社 (California, USA) より入手した. 抗体 9A2 および 3B3 はそれぞれ, コンドロイチナーゼ ABC にてコンドロイチン4硫酸および6硫酸プロテオグリカンを分解した場合コア蛋白側に残った分解断端の2糖 (4Di-4S および 4Di-6S) をそれぞれ認識する²⁾. 抗体 CS56 はコンドロイチン4硫酸および6硫酸と反応するが, デルマトン硫酸とは反応しない³⁾, しかしその正確なエпитープは不明

である. 抗体 6B6 はヒト卵巣に生じた線維腫の被膜より単離したデルマトン硫酸 PG (small PG) を抗原として祖父江ら⁴⁾ が作製したもので, そのコア蛋白 (分子量 45,000) に特異的に反応する. またこの抗体は抗原としたコア部分だけでなく, 糖側鎖を有する intact molecule (酵素による前処理を施行していない糖側鎖を有する PG, 分子量 82,000) とも反応するとされている. 抗体 2B1 は, ヒト卵巣に発生した yolk sac tumor より分離精製した large PG を抗原として祖父江らが作製したものでコンドロイチナーゼ処理により糖側鎖を外したコア蛋白 (分子量約 200,000) と特異的に反応する⁵⁾. 抗体 HepSS-1⁶⁾ は, methylcholanthrene をマウス皮下に注射して発生した fibrosarcoma を抗原として Kure and Yoshie が作製したもので, ヘパラン硫酸を認識する. ヘパラン硫酸は, ほとんどすべての種類の正常細胞表面および基底膜に存在するグリコサミノグリカン (GAG) であるが⁷⁾, 抗体 HepSS-1 は主として細胞表面のヘパラン硫酸プロテオグリカンを認識する.

3) 免疫組織化学的染色

検体は直ちに95% (v/v) エタノール (1% (v/v) 酢酸を含む) にて 4°C 一晚固定後⁸⁾, 常法通りパラ





Figs. A~D. Immunohistochemical staining of non-tumor tissue of the human bladder (counterstained with haematoxylin). Staining with antibody 9A2 (Fig. A: $\times 25$), antibody 3B3 (Fig. B: $\times 25$), antibody 6B6 (Fig. C: $\times 25$), and antibody HepSS-1 (Fig. D: $\times 25$). Submucosal interstitial fibrous elements are intensely reactive to antibody 9A2 (Fig. A) and 6B6 (Fig. C), but not reactive to antibody 3B3 (Fig. B) and HepSS-1 (Fig. D). Surfaces of epithelial layers of bladder are stained with antibody HepSS-1 (Fig. D), but not reactive to the other antibodies. Figs. E~J. Immunohistochemical staining of transitional cell carcinoma (TCC) of human bladder (counterstained with haematoxylin). Staining with antibody 3B3 (Fig. E: TCC-G1: $\times 25$, Fig. F: TCC-G2: $\times 25$, Fig. G: TCC-G3: $\times 25$), antibody 6B6 (Fig. H: $\times 25$, Fig. I: $\times 25$), and antibody 2B1 (Fig. J: $\times 25$). The so-called "specific stroma" in cancer cell nests is reactive to antibody 9A2, 3B3 (Fig. E,F,G) and 2B1 (Fig. J), but not reactive to antibody 6B6 (Fig. H, I). In most of the non-invasive tumors, only the base of tumors is stained with antibody 3B3 (Fig. E), but in few of the non-invasive tumors and most of the invasive tumors, mesenchymal stroma is diffusely stained with antibody 3B3 (Fig. F, G).

フィン包埋を行い、4ミクロンの薄切切片を作製する。ついで切片を充分脱パラフィン後、99%のエタノールにつける。つぎに0.3%の過酸化水素を含むメタノールに20分浸漬し、内因性ペルオキシダーゼの活性を阻害する。エタノール系列(99.5%, 80.0%, 70.0%)に浸漬した後、PBSにて充分洗浄する。100倍稀釈した正常ヤギ血清に浸漬、blocking操作を施す。抗体9A2, 3B3, 6B6, による免疫化学染色には、予め、0.2 unit/ml のコンドロイチナーゼ ABC, 20 mM 酢酸ナトリウムを含む 20 mM の Tris-HCL

(pH 8.0) の溶液中で、37°C 1時間前処理を行う。抗体 6B6 の場合には、intact molecule と直接反応するので、かならずしも、この操作を必要としないがコンドロイチナーゼ ABC 処理によりさらに強い染色性が得られるので常に前処理を行った。抗体 CS 56, 2B1, HepSS-1 の染色には 10 μ g/ml の結晶トリプシンにて 37°C, 20分の前処理を行う。つぎに稀釈した1次抗体と1時間反応させる。一次抗体の稀釈度は 9A2: 1,000~5,000倍, 3B3: 1,000~3,000倍, 6B6: 5,000~10,000倍, CS56: 1,000~2,000倍, 2B1:

5,000倍, HepSS-1: 1,000倍である³⁾。余分な一次抗体を除去するため PBS にて充分洗浄し, StrAvidin ABC staining system (BioGenex) を用いて抗原をペルオキシダーゼで標識し, 基質としては 0.02% (w/v) の 3-amino-9-ethyl-carbazole を 0.008% (w/v) の過酸化水素を含む 50 mM の酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) に溶解し, それを用いてペルオキシダーゼの発色を行う。ヘマトキシリンで核染色を行い, グリセリン-ゼラチン溶液にて封入する。

結 果

非腫瘍部膀胱組織, および膀胱腫瘍組織の染色性を各抗体ごとに比較検討した。

1) 抗体 9A2 による染色性

非腫瘍部膀胱組織では全検体において粘膜下組織全体に (Fig. A), また膀胱腫瘍組織では, 腫瘍固有間質に陽性所見がみられた (G1 では 7 検体すべてが, G2 では 12 検体中 10 検体が, G3 では 7 検体中 6 検体が染色された)。

2) 抗体 3B3 による染色性

非腫瘍部膀胱組織では全検体において粘膜下組織および筋層に陽性所見を認めず, 粘膜下層に存在する一部の血管のみ染色された (Fig. B)。膀胱腫瘍組織では, 非浸潤性腫瘍と浸潤性腫瘍との間に染色性の相違が見られた。非浸潤性腫瘍では腫瘍基底部に接する結合組織に強い陽性所見が見られた。またその部位近傍の血管において, 血管壁および血管周囲の結合組織にも強い陽性所見が認められた (Fig. E, TCC-G1)。TCC-G2 で非浸潤性腫瘍の一部では腫瘍基底近傍の結合組織のみならず, 粘膜下組織および筋線維間にも染色性の見られるものがあった (Fig. F)。一方浸潤性腫瘍 (すべて TCC-G3) では, 7 検体すべてにおいて浸潤を受けている筋層部も含めて腫瘍固有間質が染色された (Fig. G)。

3) 抗体 6B6 による染色性

非腫瘍部膀胱組織では全検体において, 粘膜下組織がよく染色され, その他血管周囲, 筋周囲の結合組織に陽性所見が認められた。しかし動脈壁および筋組織には陽性所見を認めなかった (Fig. C)。膀胱腫瘍組織では, 非浸潤性, 浸潤性に関係なく, 全検体において腫瘍固有間質に陽性所見を認めなかった (Fig. H)。浸潤性腫瘍では, 粘膜下結合組織に, 非腫瘍部膀胱組織と同様に陽性染色が見られた (Fig. I) が, 腫瘍が浸潤傾向を示すにつれて粘膜下結合組織の陽性所見の低下をみた。

4) 抗体 2B1 による染色性

非腫瘍部膀胱組織では, 全検体においてほとんど染色性が見られなかったが, 膀胱腫瘍組織では, 腫瘍の固有間質に 2B1 の陽性所見が見られた (Fig. J)。ただし腫瘍の浸潤性, 非浸潤性による染色性の相違は見られなかった (TCC-G1 と G3 では全例に, TCC-G2 では 12 例中 11 例の腫瘍固有間質に陽性所見が見られた)。

5) 抗体 CS56 の染色性

非腫瘍部膀胱組織では全検体において粘膜下層全体に, また膀胱腫瘍組織では, 腫瘍固有間質に陽性所見が見られ (G1 では 7 検体すべてが, G2 では 12 検体中 11 検体が, G3 では 7 検体すべてが染色された) 抗体 9A2 とほぼ同様の染色性を示した。

6) 抗体 HepSS-1 の染色性

非腫瘍部膀胱組織では, 上皮細胞表面に強い陽性所見が見られた (7 検体中 5 検体が染色された; Fig. D) が, 膀胱腫瘍組織では全検体において染色されなかった。

考 察

従来ムコ多糖と称されてきた分子は生体内ではコア蛋白 (core protein) と多糖鎖 (グリコサミノグリカン: GAG) との複合体として存在することが明らかにされ, 現在ではプロテオグリカン (PG) と総称されている。今日までに PG について数多くの生化学的研究が行われ, その分子の多様性が認められてきたが, 近年 PG に対するモノクローナル抗体の開発により, はじめて化学構造の多様性を特徴とするこの分子ファミリーの正確な組織学的分布を知ることができるようになった¹⁰⁾。

抗体 6B6 は small PG (分子量約 45,000) のコア蛋白と特異的に反応し, また他の種々の組織から分離された small PG とも交叉反応することが報告されている⁴⁾。6B6 によって証明される small PG は成人の全身各組織の結合組織内に分布することが示されており^{4,9)}, これまで多くの研究者によって種々の組織から分離同定されている small PG と同じファミリーに属するものと考えられている。Fukatsu et al.¹¹⁾ は, 多くの腫瘍組織について検討し, 腫瘍固有間質には 6B6 陽性の small PG がほとんど証明されないことを見出した。一方抗体 2B1 は yolk sac tumor から分離精製された large PG のコア蛋白 (分子量約 200,000) と特異的に反応し, それによって証明される large PG の分布は正常胎児組織の間質結合組織の ECM (extracellular matrix; 細胞外基質) に認められるが, 成人では大動脈, 血管周囲組織

にごく少量認められるにすぎず, また腫瘍固有間質には多量認められることが報告されている⁵⁾. この large PG は, 胎児組織^{12,13)}, 筋肉腫¹⁴⁾, yolk sac tumor¹⁵⁾ 等から分離同定されているが, それらの生物学的意義についてはまったく解明されていない. そしてこれらのコア蛋白が同じ遺伝子に由来するものかどうかの解明が進められつつある. 本研究においても非腫瘍部膀胱組織の間質の主成分は 6B6 陽性の small PG よりなり, 一方膀胱腫瘍間質には, 2B1 陽性の large PG が存在することが確認された. Nakashima et al.¹⁶⁾ は 2B1 陽性 PG は増殖傾向を有する未分化な線維芽細胞 (immature mesenchymal cells) によって産生されることを示唆しているが, 腫瘍固有間質は, 腫瘍細胞の増殖に伴って増生しつつ, large PG を産生しているものと考えられた. 増殖しつつある腫瘍細胞から, 間葉系細胞の増生を強いるような因子が産生され, それによって線維芽細胞の幼若化, 増生傾向が促され, 胎児性と考えられる 2B1 陽性 PG を産生し, それぞれの腫瘍組織固有の間質組織へと分化誘導されていくことも想像できよう.

抗体 3B3, 9A2 は Couchman et al.²⁾ によって開発されたモノクローナル抗体で, それぞれ PG をコンドロイチナーゼ ABC 処理後, コア蛋白に結合している 4Di-6S および 4Di-4S を認識する. グリコサミノグリカンを構成する繰返し 2 糖の全容を証明するわけではないが, 主としてコンドロイチン 6 硫酸および, 4 硫酸を側鎖としている PG の同定には有用である. そして 9A2 陽性成績は成人各組織の間質結合組織に広く認められ⁹⁾, また腫瘍固有間質にもかなり広範に認められている¹¹⁾. 3B3 陽性成績は, 正常組織では軟骨と血管壁の ECM に認められるにすぎない. 最近骨髄の ECM が 3B3 陽性であることが報告された^{17,18)}. 一方増生しつつある筋組織は多量のコンドロイチン 6 硫酸を合成することが示され, 最近 3B3 陽性成績が筋肉腫組織の ECM に特異的な所見であることが報告されている¹⁹⁾. また Fukatsu et al.¹¹⁾ は胃癌組織について PG の局在を詳細に検索し, 癌細胞増殖に伴って近傍の粘膜筋板が 3B3 陽性所見を呈するようになることを示している. 本研究においても, 膀胱腫瘍の増殖, 進展に伴い, 近傍の結合組織および筋組織の ECM に抗体 3B3 陽性所見が認められたが, 非浸潤性膀胱腫瘍と浸潤性膀胱腫瘍を比較した場合, 非浸潤性腫瘍では, 腫瘍基底部に接する結合組織のみに 3B3 陽性所見が見られた (Fig. E) のに対して, 浸潤性腫瘍では, 腫瘍浸潤部周囲の間質に広範な 3B3 の染色性が見られた (Fig. G). しかし非浸

潤性腫瘍でも Fig. F のごとく腫瘍基底部に接する結合組織のみならず, 粘膜下結合組織及び筋層部結合組織に染色性を示すものも見られた. このような症例は, 将来浸潤性腫瘍に進展して行く可能性を示唆するものと思われ興味深かった.

3B3 陽性のコンドロイチン 6 硫酸 PG の生体内における役割意義については, 未だ解明されておらず, 最近, 抗体の開発により各組織内の局在, 分布が漸く明らかにされたところである. 軟骨, 骨髄の ECM, 血管壁等に限られて分布を見ることから, また腫瘍固有間質では主として myxomatous area に認められている¹¹⁾ことから線維増生傾向の弱い鬆粗結合組織の ECM に主として分布しているといえることができる. Fukatsu et al.¹¹⁾ は, コンドロイチン 6 硫酸は抗線維化作用と関係しているのではないかと記している. 本研究において見られた腫瘍固有間質およびその近傍組織における 3B3 陽性所見は抗体 2B1 陽性所見と同様, 腫瘍細胞増殖に伴って惹起された間葉系細胞の増殖傾向と関連しているように思われた.

結 語

プロテオグリカンのコア蛋白および糖側鎖を認識する 6 種類のモノクローナル抗体を用いて非腫瘍部膀胱組織および膀胱腫瘍組織の免疫組織化学的検索を行い, つぎのような結果をえた.

1) 非腫瘍部膀胱組織では, 粘膜上皮細胞表面にヘパラン硫酸が認められ, 粘膜下層においては, 主として側鎖にコンドロイチン 4 硫酸を有する small PG が認められたが, デルマタン硫酸, コンドロイチン 6 硫酸および large PG は, ほとんど認められなかった.

2) 膀胱腫瘍組織では, 腫瘍細胞表面にヘパラン硫酸がみとめられず, 腫瘍固有間質には側鎖にコンドロイチン 4 硫酸またはコンドロイチン 6 硫酸を有する large PG が主として認められ¹⁴⁾, デルマタン硫酸および small PG に対する反応は, ほとんど認められなかった.

3) コンドロイチン 6 硫酸の存在を示す抗体 3B3 の染色において, 非浸潤性腫瘍の一部に腫瘍基底部に接する結合組織のみならず粘膜下結合組織, 筋層部結合組織にまで広範に陽性所見を示すものが存在した. このような非浸潤性腫瘍は, 将来浸潤性腫瘍に進展する可能性を有するものと思量した.

なお論文作成にあたり技術的指導をしていただいた安井千景さんに深謝いたします.

文 献

- 1) Iozzo RV: Biology of disease. Proteoglycans: structure, function and role in neoplasia. *Lab Invest* 53: 373-390, 1985
- 2) Couchman JR, Caterson B, Christner JE, et al.: Mapping monoclonal antibody detection of glycosaminoglycans in connective tissues. *Nature* 307: 650-652, 1984
- 3) Avnur Z and Geiger B: Immunohistochemical localization of native chondroitin sulfate in tissues and cultured cells using specific monoclonal antibody. *Cell* 38: 811-822, 1984
- 4) Sobue M, Nakashima N, Fukatsu T, et al.: Production and characterization of monoclonal antibody to dermatan sulfate proteoglycan. *J Histochem Cytochem* 36: 479-485, 1988
- 5) Sobue M, Nakashima N, Fukatsu T, et al.: Production and immunohistochemical characterization of a monoclonal antibody raised to proteoglycan purified from a human yolk sac tumour. *Histochem J* 21: 455-459, 1989
- 6) Kure S and Yoshie O: A syngeneic monoclonal antibody to murine Meth-A sarcoma (HepSS-1) recognizes heparan sulfate glycosaminoglycan (HS-GAG): cell density and transformation dependent alteration in cell surface HS-GAG defined by HepSS-1. *J Immunol* 12: 3900-3908, 1986
- 7) 大平敦彦: 細胞表層に存在するヘパラン硫酸プロテオグリカンの構造と機能. *代謝* 21: 305-313, 1984
- 8) Sainte-Marie G: A paraffin embedding technique for studies employing immunofluorescence. *J Histochem Cytochem* 10: 250-256, 1962
- 9) 祖父江三津子, 深津俊明, 中島伸夫, ほか: コンドロイチン4硫酸, コンドロイチン6硫酸およびデルマタン硫酸の結合組織内分布—モノクローナル抗体による免疫組織化学的研究. *結合組織* 19: 117-126, 1987
- 10) 竹内 純: 細胞間マトリックスの構造と機能. *現代医学* 31: 383-390, 1984
- 11) Fukatsu T, Sobue M, Nagasaka T, et al.: Immunohistochemical localization of chondroitin sulphate and dermatan sulphate proteoglycans in tumor tissues. *Br J Cancer* 54: 74-78, 1988
- 12) Carrino DA and Caplan AI: Isolation and partial characterization of high-buoyant-density proteoglycans synthesized in ovo by embryonic chick skeletal muscle and heart. *J Biol Chem* 259: 12419-12430, 1984
- 13) Fisher LW, Termine JD, DeJter SW, et al.: Proteoglycans of developing bone. *J Biol Chem* 258: 6588-6594, 1983
- 14) Sobue M, Takeuchi J, Yoshida K, et al.: Isolation and characterization of proteoglycans from human nonepithelial tumors. *Cancer Res* 47: 160-168, 1987
- 15) Oldberg A, Hayman EG and Ruoslahti E: Isolation of chondroitin sulfate proteoglycan from a rat yolk sac tumor and immunohistochemical demonstration of its cell surface localization. *J Biol Chem* 256: 10847-10852, 1981
- 16) Nakashima N, Sobue M, Fukata S, et al.: Immunohistochemical characterization of extracellular matrix components of yolk sac tumors. *Virchows Arch (B)* 58: 309-315, 1990
- 17) Oguri K, Okayama E, Caterson B, et al.: Isolation, characterization, and localization of glycosaminoglycan in rabbit bone marrow. *Blood* 70: 501-510, 1987
- 18) Nagasaka T, Sobue M, Niwa M, et al.: Effects of β -D-xylosides on proliferation and matrix formation of adherent fibroblastic cells in mouse bone marrow culture. *Exp Hematol* 17: 923-928, 1989
- 19) Ohiwa N, Fukata S, Fukatsu T, et al.: Immunohistochemical localization of proteoglycans in non-epithelial tumor tissues. *Connective Tissue* 22: 1990, in press

(Received on July 24, 1990)

(Accepted on January 11, 1991)

(迅速掲載)