

涙腺多形腺腫複合糖質のレクチン組織化学的解析

上原 文行¹⁾, 大庭 紀雄¹⁾, 迫田由紀子¹⁾, 神村 浩策¹⁾, 有馬 知子¹⁾, 吉田 浩己²⁾

¹⁾鹿児島大学医学部眼科学教室, ²⁾鹿児島大学医学部病理学教室

要 約

多形腺腫に分布する複合糖質の糖鎖構造について、腫瘍組織切片のシアリダーゼ処理前後の5種類のビオチン標識レクチン結合分布について検索することによって解析した。多形腺腫の腺管の基底側の細胞と間質の細胞の表面には、galactose (Gal) β 1,3 N-acetylgalactosamine と Gal β 1,4 N-acetylglucosamine を含む複合糖質が共通して分布することが明らかになった。さらに腺管の基底側の細胞には、これらの糖質の Gal 残基にシアル酸が結合した型と、結合せずに Gal 残基が露出した型が

存在するのに対し、間質の細胞には Gal 残基にシアル酸が結合した型だけが存在することが明らかになった。糖鎖形成は Gal 残基にシアル酸が結合することによって終了することから、多形腺腫の複合糖質の糖鎖は、腺管の基底側の細胞から間質の細胞へ向かって成熟していくものと推定される。(日眼会誌 101: 355-358, 1997)

キーワード：多形腺腫, 複合糖質, レクチン, シアル酸

Lectin-histochemical Analysis of Pleomorphic Adenoma of the Lacrimal Gland

Fumiyuki Uehara¹⁾, Norio Ohba¹⁾, Yukiko Sakoda¹⁾, Kousaku Kamimura¹⁾,
Tomoko Arima¹⁾ and Hiroki Yoshida²⁾

¹⁾Department of Ophthalmology, Kagoshima University Faculty of Medicine

²⁾Department of Pathology, Kagoshima University Faculty of Medicine

Abstract

The sugar structures of the glycoconjugates in pleomorphic adenoma of the lacrimal gland were analyzed by examining the binding sites of 5 biotinylated lectins on tissue sections with or without sialidase digestion. Both galactose (Gal) β 1,3 N-acetylgalactosamine and Gal β 1,4 N-acetylglucosamine were present on the surfaces of ductal basal cells and stromal cells. The galactosyl residues in the glycoconjugates of ductal basal cells were

either sialylated or exposed, whereas those of stromal cells were all sialylated. Since the synthesis of sugar chains of glycoconjugates is terminated by sialylation, their structure may mature as they progress from ductal basal cells to stromal cells. (J Jpn Ophthalmol Soc 101: 355-358, 1997)

Key words: Pleomorphic adenoma, Glycoconjugate, Lectin, Sialic acid

I 緒 言

レクチンは特定の糖鎖構造を認識して結合する性質を有することから、様々な組織に分布する複合糖質の研究に用いられている¹⁾。涙腺多形腺腫のレクチン結合分布に関しては、過去に石川ら²⁾の報告がみられ、腫瘍構成要素間のレクチン染色性の差異について報告されているが、糖鎖末端に存在するシアル酸の動態に注目した視点からの検索はなされていない。著者らはこれまで、網膜、結膜などの眼球および眼付属器に分布する複合糖質の糖

鎖末端に存在するシアル酸の動態に注目した研究を進め、シアル酸はこれらの組織における種々の細胞間相互作用に、重要な役割を果たしている可能性を指摘してきた³⁾。一方、著者らは最近、糖鎖生物学的研究の対象を眼科領域の腫瘍まで拡大し、腫瘍細胞表面に分布する複合糖質のシアル酸の動態に注目した研究を進めつつある。そこで、涙腺多形腺腫に分布する複合糖質の糖鎖構造について、その糖鎖末端に存在するシアル酸の動態を明らかにする目的で、レクチン組織化学的手法を用いて解析した。

別刷請求先：890 鹿児島県鹿児島市桜ヶ丘 8-35-1 鹿児島大学医学部眼科学教室 上原 文行
(平成8年10月24日受付, 平成8年12月3日改訂受理)

Reprint requests to: Fumiyuki Uehara, M.D. Department of Ophthalmology, Kagoshima University Faculty of Medicine, 8-35-1 Sakuragaoka, Kagoshima-shi, Kagoshima-ken 890, Japan

(Received October 24, 1996 and accepted in revised form December 3, 1996)

II 方 法

鹿児島大学医学部附属病院眼科において、1992年から1996年にかけて腫瘍摘出術を施行した涙腺多形腺腫の3例(77歳男性, 63歳男性, 79歳女性)を研究の対象とした。0.5% グルタルアルデヒド, 4% パラフォルムアルデヒド/燐酸緩衝液(PBS, pH 7.4, 0.01 M)を固定液として用いて腫瘍組織を一晩浸漬固定した。アルコール脱水の後, パラフィン包埋して8 μ mの組織切片を作成, 脱パラフィンし, 0.1 M 酢酸緩衝液(pH 5.0)に浸漬した後, 一部の組織切片は, さらに α 2,3結合と α 2,8結合だけでなく, α 2,6結合したシアル酸も切断するシアリダーゼ(25 U/ml; *Clostridium perfringens*, Type V; Sigma, St. Louis, MO, 米国)⁴⁾を含む0.1 M 酢酸緩衝液(pH 5.0)に37°C 3時間浸漬した。PBSで洗浄した後, 0.2% 過酸化水素/メタノールを5分間浸漬させて内因性ペルオキシダーゼ活性を, 2% ウシ血清アルブミンを30分間浸漬させてレクチンの非特異的吸着をそれぞれ抑制した。次に, 組織切片にVector Laboratories社(Burlingame, CA, 米国)製の5種類のビオチン標識レクチンを室温で1時間ずつ反応させた。使用したレクチンは, *Maackia amurensis* lectin II (MAL II), *Sambucus nigra* agglutinin (SNA), peanut agglutinin (PNA), *Erythrina cristagalli* agglutinin (ECA) および jacalin で, いずれも10 μ g/mlの濃度となるようにPBSに溶解して使用した。対照としては, それぞれのハプテン糖(MAL II: 0.1 M 3'-シアリルラクトース; SNA: 0.1 M 6'-シアリルラクトース; PNA, ECA および jacalin: 0.2 M D-ガラクトース)を含むレクチン溶解液を同様に反応させた。Vectastain Elite ABCキット(Vector Laboratories社)とジアミノベンチジンをを用いて発色させ, 腫瘍組織のそれぞれのレクチン結合分布について光学顕微鏡的に観察した。

III 結 果

3例の腫瘍組織は, いずれも粘液腫状, 線維性あるいは軟骨様の間質組織の中に, 星芒状の腫瘍細胞が腺管様あるいは索状構造を形成しながら増生している像が観察されたことから, 病理組織学的に多形腺腫と診断した。77歳男性の腫瘍組織については, すべてのレクチン染色像を示した(図1A~G, J)。3例とも共通のレクチン染色像が得られたため, 他の2例の腫瘍組織については, それらを代表して jacalin の染色像を示した(図1H, I)。77歳男性と63歳男性の組織は, 線維性間質組織の中に腺管様構造を形成する腫瘍細胞が観察された部位の染色像(図1A~H)で, 79歳女性の組織は, 索状構造を形成する腫瘍細胞が観察された部位の染色像(図1I)である。MAL II と SNA は, 腺管の基底側細胞および間質を構成する細胞の表面にびまん性に結合した(図1A, B)。

PNA は腺管の基底側細胞の表面に限局性に結合したが(図1C), 組織切片をあらかじめシアリダーゼ処理しておいた場合, その結合分布が間質の細胞の表面まで拡大した(図1D)。ECA も腺管の基底側細胞の表面に特異的に分布していたのが(図1E), シアリダーゼ処理によって間質の細胞の表面までびまん性に分布するようになった(図1F)。Jacalin は, 組織切片のシアリダーゼ処理の有無にかかわらず, 腺管あるいは索状構造の基底側細胞および間質を構成する細胞の表面にびまん性に結合した(図1G~I)。対照では, いずれのレクチンともハプテン糖の存在下にその結合が減弱した(図1J; jacalin)。よって上記のレクチンは, それぞれの特異的な糖構造を認識して結合したものと判定した。

IV 考 按

本研究で使用したそれぞれのレクチンが認識する糖鎖構造は, MAL II がシアル酸 α 2,3 galactose (Gal) β 1,4 N-acetylglucosamine (GlcNAc) とシアル酸 α 2,3 Gal β 1,3 N-acetylgalactosamine (GalNAc)⁵⁾, SNA が α 2,6 Gal⁶⁾, PNA が Gal β 1,3 GalNAc⁷⁾, ECA が Gal β 1,4 GlcNAc⁸⁾, jacalin がシアル酸 Gal β 1,3 GalNAc と Gal β 1,3 GalNAc である⁹⁾。PNA と ECA は糖鎖末端にシアル酸が存在すると結合できないが, シアリダーゼでシアル酸が除去された場合, それぞれが認識する糖鎖に結合できるようになる。したがって, 多形腺腫を構成するそれぞれの腫瘍細胞の複合糖質の糖鎖構造は, 次のように特定される。腺管あるいは索状構造の基底側細胞の表面には, シアリダーゼ処理の有無にかかわらず, 5種類のすべてのレクチンが結合したことから, Gal β 1,3 GalNAc および Gal β 1,4 GlcNAc が露出した糖鎖と, これらにシアル酸が α 2,3結合, あるいは α 2,6結合した糖鎖とを含む複合糖質が分布しているものと考えられる。一方, 間質の細胞の表面の複合糖質には, MAL II と SNA の結合が陽性であったことから, シアル酸が α 2,3結合および α 2,6結合した Gal β 1,3 GalNAc あるいは Gal β 1,4 GlcNAc が分布しているものと考えられる。 α 2,3結合, および α 2,6に結合したシアル酸の両者とも切断し得るシアリダーゼを用いて組織切片を消化することによって, PNA と ECA が間質細胞に結合するようになったこともこのことを支持する所見といえる。一方, jacalin の Gal β 1,3 GalNAc への結合はシアル酸の有無に影響されないことから, 組織切片をシアリダーゼ処理しなくても, jacalin は腺管あるいは索状構造の基底側細胞だけでなく, 間質細胞にも結合し得たのであろう。

石川ら²⁾は, 8種類のレクチンを用いて多形腺腫の構成成分を染め分けることができたと報告している。彼らと著者らが用いたレクチンは, 1種類しか共通のものがないために厳密な比較はできないが, 今回の著者らの PNA の染色部位は, 石川らの *Glycine max* (SBA) およ

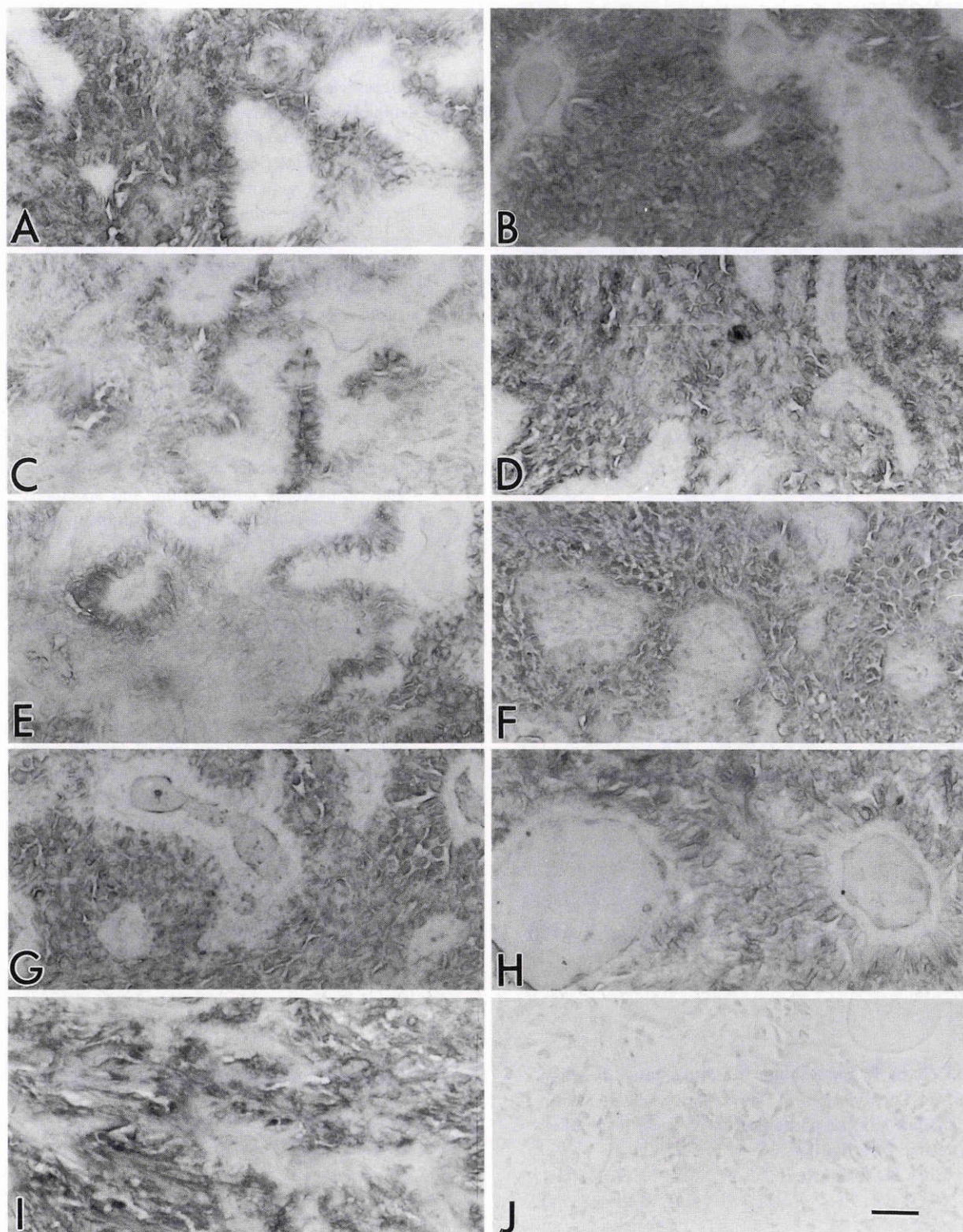


図1 多形腺腫のビオチン標識レクチン染色像.

A : 0.1 M 3'-シアリルラクトース (MAL II) 染色, B : 0.1 M 6'-シアリルラクトース (SNA) 染色, C : peanut agglutinin (PNA) 染色, D : シアリダーゼ処理後の PNA 染色, E : Erythrina cristagalli agglutinin (ECA) 染色, F : シアリダーゼ処理後の ECA 染色, G, H, I : jacalin 染色, J : 0.2 M D-galactose を混合した jacalin 染色. バーは 40 μm

び *Maclura pomifera* (MPA) の染色部位と類似していた. SBA は D-Gal あるいは GalNAc を¹⁰⁾, MPA は D-Gal を¹¹⁾それぞれ認識することから, Ga β 1,3 GalNAc

を認識する PNA の結合部位と類似した結果が得られたのであろう. 石川ら²⁾の報告でも間質の細胞は SBA と MPA では染色されていない. 彼らは糖鎖末端のシアル

酸の存在の有無によるこれらのレクチンの染色性の差異については検討, 考察していないが, 組織切片をあらかじめシアリダーゼ処理した場合には, 間質の細胞もSBAとMPAで染色されるようになるものと推定される。

多形腺腫は, 上皮性組織と間葉系組織が混在しているという病理組織学的所見から, 混合腫瘍と呼ばれることもある。しかしながら近年, 電子顕微鏡的, あるいは種々の免疫組織化学的検索によって, 間質細胞を構成する細胞は筋上皮由来であるとの研究報告が相次いでいる¹²⁾¹³⁾。今回のレクチン組織化学的研究では, 多形腺腫の腺管の基底側の細胞と間質の細胞の表面には, ともにGa β 1,3GalNAcとGa β 1,4GlcNAcを含む複合糖質が分布し, 腺管の基底側の細胞には, シアル酸が糖鎖末端に結合せずにGal残基が露出したものも存在するのに対し, 間質の細胞にはシアル酸が糖鎖末端に結合したもののしか存在しないことが明らかになった。一般に複合糖質の糖鎖は, シアル酸がその末端に結合することによって成熟する。したがって, 間質の細胞の複合糖質の糖鎖は完全に成熟した型のものだけが分布しているのに対し, 腺管の基底側の細胞の複合糖質の糖鎖は成熟したものと未熟なものが混在している状態にあると換言することができる。この観点からすれば, 腺管の基底側の細胞から間質の細胞への連続性が示唆され, 前者の糖鎖形成の段階は, より未熟な段階にあると推定される。著者らは現在, 多形腺腫のシアル酸転移酵素のmRNA分布について, *in situ* hybridization組織化学的検索を進めており, 上記の糖鎖形成機構の詳細について明らかにし得るものと考えている。

今後, 今回得られた多形腺腫のレクチン結合分布と, 正常涙腺組織の結合分布とを比較するとともに, 多形腺腫の悪性化に伴うレクチン結合分布の変化についても検索していく必要があるであろう。

本研究は, 文部省科学研究費(基盤C, 07671928)の補助によって行った。

文 献

- 1) Uehara F, Sameshima M, Muramatsu T, Ohba N: Localization of fluorescence-labeled lectin binding sites on photoreceptor cells of the monkey retina. *Exp Eye Res* 36: 113—123, 1983.
- 2) 石川 誠, 藤盛圭太, 小関 武: 涙腺多形腺腫における抗体およびレクチン結合部の検討. *臨眼* 48: 821—824, 1994.
- 3) 上原文行: 網膜複合糖質の分子細胞生物学的研究. *日眼会誌* 97: 1370—1393, 1993.
- 4) Drzeniek R: Substrate specificity of neuraminidases. *Histochem J* 5: 271—290, 1973.
- 5) Sata T, Lackie PM, Taatjes DJ, Peumans W, Roth J: Detection of the Neu5Ac(α 2,3)Gal(β 1,4)GlcNAc sequence with the leukoagglutinin from *Maackia amurensis*: Light and electron microscopic demonstration of differential tissue expression of terminal sialic acid in α 2,3- and α 2,6-linkage. *J Histochem Cytochem* 37: 1577—1588, 1989.
- 6) Shibuya N, Goldstein IR, Broekaert WF, Nsimba-Lubaki M, Peeters B, Peumans WJ: The elderberry (*Sambucus nigra* L.) bark lectin recognizes the Neu5Ac(α 2,6)Gal/GalNAc sequence. *J Biol Chem* 262: 1596—1601, 1987.
- 7) Lotan R, Skutelsky E, Danon D, Sharon N: The purification, composition, and specificity of the anti-T lectin from peanut (*Arachis hypogaea*). *J Biol Chem* 250: 8518—8523, 1975.
- 8) Vierbuchen M, Uhlenbruck G, Ortman M, Dufhues G, Fischer R: Occurrence and distribution of glycoconjugates in human tissues as detected by the *Erythrina cristagalli* lectin. *J Histochem Cytochem* 36: 367—376, 1988.
- 9) Hortin GL, Trimpe BL: Lectin affinity chromatography of proteins bearing O-linked oligosaccharides: Application of jacalin-agarose. *Analytical Biochem* 188: 271—277, 1990.
- 10) Lis H, Sela BA, Sachs L, Sharon N: Specific inhibition by N-acetyl-D-galactosamine of the interaction between soybean agglutinin and animal cell surfaces. *Biochim Biophys Acta* 211: 582—585, 1970.
- 11) Jones JM, Feldman JD: Binding of *Machura pomifera* to rat lymphoid cells and erythrocytes. *J Immunol* 111: 1765—1770, 1973.
- 12) Stead R, Koutozoglou T, Riddell RM: Immunohistochemical distribution of pleomorphic adenoma of the salivary gland. Glial fibrillary acidic protein-like immunoreactivity identifies a major myoepithelial component. *Hum Pathol* 19: 32—40, 1988.
- 13) 登坂良雄, 藤井 青: 涙腺多形腺腫に関する免疫組織化学的検討. *日眼会誌* 94: 307—313, 1990.