

## 眼瞼脂漏性角化症の糖鎖組織化学的解析

上原 文行<sup>1)</sup>, 大庭 紀雄<sup>1)</sup>, 米澤 傑<sup>2)</sup>, 小澤 政之<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>鹿児島大学医学部眼科学教室, <sup>2)</sup>鹿児島大学医学部第二病理学教室, <sup>3)</sup>鹿児島大学医学部第二生化学教室

### 要 約

眼瞼脂漏性角化症に分布する複合糖質について, シアル酸転移酵素(ST)メッセンジャーRNA(mRNA)の *in situ* hybridization 組織化学とレクチン組織化学とを組み合わせ解析した. ST mRNA が細胞質に, シアル酸を認識するレクチンが細胞表面にともに検出された細胞は, シアル酸含有糖鎖を活発に合成している細胞であるとみなされた. レクチン結合は検出されているのに, ST mRNA が検出されない細胞は, これらの糖鎖の合成が既に終了した細胞であるとみなされた. これらの観点から, 脂漏性角化症の腫瘤を構成する肥厚した有棘細胞層

には, 全層にわたって turnover 速度が遅いと考えられるシアル酸含有 O-結合型糖鎖が分布し, 脂漏性角化症の病態と関係している可能性が示唆される. 一方, 有棘細胞層に分布する N-結合型糖鎖末端のシアル酸の turnover 速度は速いものと推定される. (日眼会誌 101: 429-433, 1997)

キーワード: 眼瞼腫瘍, 脂漏性角化症, 複合糖質, シアル酸転移酵素, レクチン

## Glycohistochemical Analysis of Seborrhic Keratosis in Eyelids

Fumiyuki Uehara<sup>1)</sup>, Norio Ohba<sup>1)</sup>, Suguru Yonezawa<sup>2)</sup>  
and Masayuki Ozawa<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Ophthalmology, Kagoshima University Faculty of Medicine

<sup>2)</sup>Department of Pathology, Kagoshima University Faculty of Medicine

<sup>3)</sup>Department of Biochemistry, Kagoshima University Faculty of Medicine

### Abstract

The glycoconjugates of seborrhic keratosis in the eyelids were examined by *in situ* hybridization histochemistry using cRNA probes for sialyltransferase (ST) and lectin histochemistry. We considered that the cells, which expressed both cytoplasmic distribution of ST-mRNA and binding of lectins specific for sialic acids to the cell surfaces, were actively producing sialoglycans. We also considered that the cells whose surfaces were stained with the lectins without cytoplasmic distribution of ST-mRNA have completed the synthesis of sialoglycans. These viewpoints suggest that the O-linked

sialoglycan, whose turnover-rate is slow, may be distributed over the cells of the thickened spinocellular layer in the tumor of seborrhic keratosis and involved in its pathomechanism. It also appears that the turnover rate of the terminal sialic acids in the N-linked glycan in the spinocellular layer may be fast. (J Jpn Ophthalmol Soc 101: 429-433, 1997)

Key words: Eyelid tumor, Seborrhic keratosis, Glycoconjugates, Sialyltransferase, Lectin

## I 緒 言

複合糖質の糖鎖は, 様々な組織において細胞間接着, 細胞間認識などの種々の相互作用の発現に重要な役割を果たしている<sup>1)</sup>. 著者らは先に, 網膜視細胞層の複合糖質に

関し, シアル酸転移酵素メッセンジャーRNA(mRNA)の *in situ* hybridization 組織化学とレクチン組織化学を組み合わせ解析し, 網膜視細胞においては, N-結合型と O-結合型複合糖質の代謝の動態が異なることを報告<sup>2)</sup>した. すなわち, N-結合型の複合糖質は turnover 速度が

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11月15日受付, 平成9年1月20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 November 15, 1996 and accepted in revised form January 20, 1997)

速いのに対し、O-結合型の複合糖質は turnover 速度が遅く、比較的安定であることを明らかにした<sup>2)</sup>。一方、糖鎖末端に分布するシアル酸と網膜変性との関係についても注目し、シアル酸の減少が視細胞変性の発現に関与する可能性を指摘した<sup>3)</sup>。

ところで、癌細胞が様々な特性を発揮する際にも、細胞表面の糖鎖異常によって引き起こされる細胞間識別異常が重要な役割を果たしている可能性が指摘されている。特にシアル酸の動態は、悪性腫瘍の転移と関連して注目されている<sup>4)</sup>。著者らは、細胞の変性と癌化はコインの裏表の関係にあり、両者の複合糖質の研究結果を比較、検討することによって、両方の研究を相乗的に発展させられるのではないかとこの観点から、最近、網膜変性に加え、眼科領域の腫瘍の糖鎖生物学的研究を開始した。

そこで、その研究のための第一歩として、先に網膜複合糖質の研究に使用した、シアル酸転移酵素 mRNA の *in situ* hybridization 組織化学とレクチン組織化学を組み合わせた糖鎖組織化学的手法を、眼瞼腫瘍の研究に適用することにした。今回は、同法を用いて眼瞼脂漏性角化症の複合糖質を解析した結果と、同法のもつ利点について報告したい。

## II 方 法

鹿児島大学医学部附属病院眼科において腫瘍切除術を施行し、脂漏性角化症と病理組織診断された5例(81歳女性, 60歳男性, 72歳男性, 61歳男性, 55歳女性)を対象とした。腫瘍組織を0.5% glutaraldehyde, 4% paraformaldehyde/燐酸緩衝液(PBS, pH 7.4)を用いて浸漬固定した。アルコール脱水の後、パラフィン包埋して、8 $\mu$ mの組織切片を作製した。

### 1. シアル酸転移酵素 mRNA の *in situ* hybridization 組織化学

先に報告した方法<sup>5)</sup>に従ったが、この概略を述べる。組織切片を脱パラフィンし、proteinase K (20  $\mu$ g/ml PBS)を用いて37°C, 60分間消化することによって、mRNA周囲の蛋白質を除去した。次に、先に報告した方法<sup>2)</sup>で調整した、galactose  $\beta$  1,3 N-acetylgalactosamine (Gal  $\beta$  1,3 GalNAc)  $\alpha$  2,3 シアル酸転移酵素 ( $\alpha$  2,3-ST) mRNA<sup>6)</sup>に対する antisense のコンプリメンタリー-RNA (cRNA) probe と、galactose  $\beta$  1,4 N-acetylglucosamine (Gal  $\beta$  1,4 GlcNAc)  $\alpha$  2,6 シアル酸転移酵素 ( $\alpha$  2,6-ST) mRNA<sup>7)</sup>に対する antisense cRNA probe, およびそれぞれの mRNA に対する sense cRNA probe をそれぞれ45°Cで、1昼夜ハイブリダイズさせた。50% formamide を用いて45°C, 1時間洗浄した後、RNAase (20  $\mu$ g/ml 500 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0)を用いて37°C, 30分間消化して、非特異的に吸着した probe を分解させた。次に、1%ブロッキング緩衝液(Boehringer Mannheim)に2%ヒツジ血清を混合した

液を室温で30分間浸漬させた後、alkaline phosphatase (AP)標識ヒツジ抗 digoxigenin 抗体(Boehringer Mannheim; 4  $\mu$ l/ml 150 mM NaCl, 0.1 M Tris-HCl, pH 7.5)を室温で2時間反応させた。AP 発色液(nitroblue tetrazolium, X-phosphate)を用いて室温で16時間発色させ、それぞれの probe のハイブリダイズした部位について光学顕微鏡(以下、光顕)的に観察した。

### 2. レクチン組織化学

組織切片を脱パラフィンし、0.2% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を5分間浸漬させて内因性 peroxidase 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)製のビオチン標識 *Maackia amurensis* lectin II (MAL II; 10  $\mu$ g/ml PBS), ビオチン標識 peanut agglutinin (PNA; 10  $\mu$ g/ml PBS), ビオチン標識 *Sambucus nigra* agglutinin (SNA; 10  $\mu$ g/ml PBS), ビオチン標識 *Erythrina cristagalli* agglutinin (ECA; 10  $\mu$ g/ml PBS)のいずれかを室温で1時間ずつ反応させた。対照としては、それぞれのハプテン糖(MAL II: 0.1 M 3'-sialyllactose; PNA, ECA: 0.2 M D-Gal; SNA: 0.1 M 6'-sialyllactose)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 diaminobenzidine を用いて発色させ、それぞれのレクチン結合分布について光顕的に観察した。

## III 結 果

### 1. シアル酸転移酵素 mRNA の *in situ* hybridization 組織化学

5例とも共通の観察結果が得られた(図1: 61歳男性の腫瘍組織の染色像を示した)。ヘマトキシリン・エオジン染色で、有棘細胞層を中心とする表皮の肥厚像が観察された(図1A)。Gal  $\beta$  1,3 GalNAc  $\alpha$  2,3-ST の antisense の probe は、胚芽細胞層から有棘細胞層にかけてびまん性に、それらを構成する細胞の細胞質にハイブリダイズしたのに対し、顆粒細胞層を構成する細胞の細胞質には微弱なハイブリダイズ像しか観察されなかった(図1B)。Gal  $\beta$  1,4 GlcNAc  $\alpha$  2,6-ST の antisense の probe は、有棘細胞層の中間部~基底側寄りに分布する細胞の細胞質にびまん性にハイブリダイズしたが、その他の部位の細胞の細胞質には微弱なハイブリダイズ像しか観察されなかった(図1C)。一方、sense の probe は、いずれの細胞層にもほとんど微弱なハイブリダイズ像しか観察されなかった(図1D)。したがって、それぞれの antisense probe は、シアル酸転移酵素の mRNA の塩基配列を特異的に認識してハイブリダイズしたものと判断した。

### 2. レクチン組織化学

5例とも共通の観察結果が得られた(図2: 61歳男性の腫瘍組織の染色像を示した)。MAL II は、表皮のほぼ

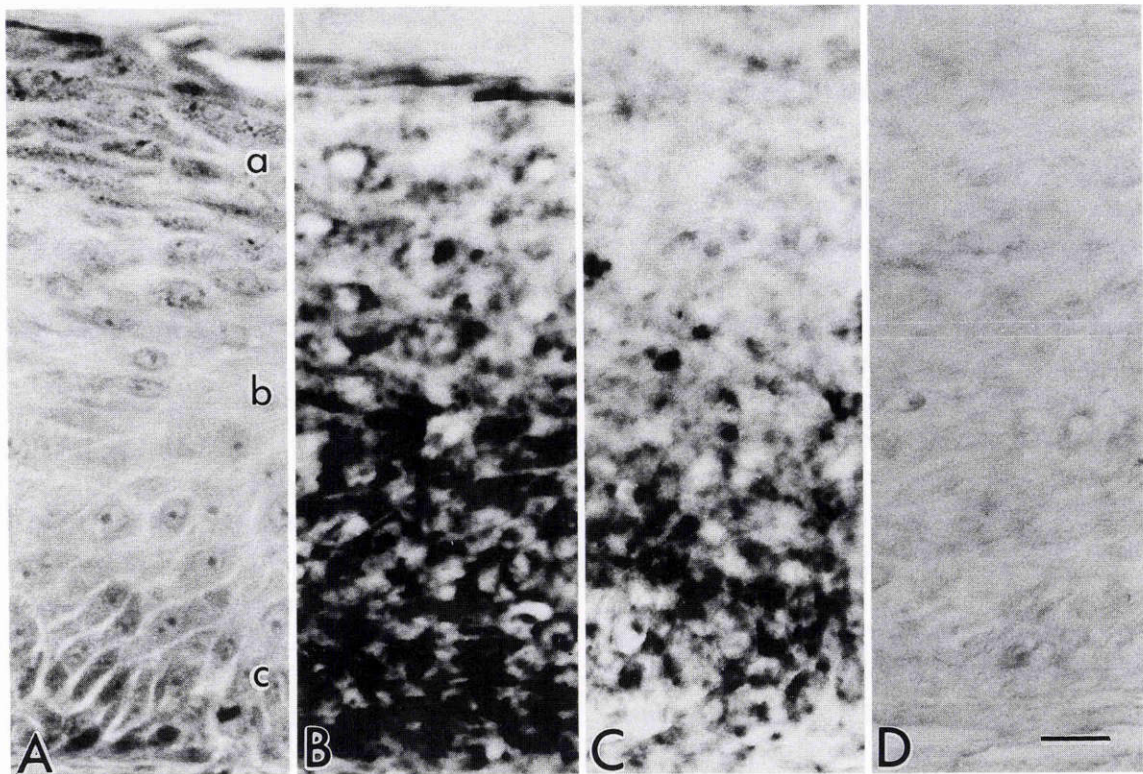


図1 脂漏性角化症腫瘍のコンプリメンタリーRNA (cRNA) probe を用いた *in situ* hybridization 組織染色像。

A: ヘマトキシリン・エオジン染色像, B: Gal  $\beta$  1,3 GalNAc  $\alpha$  2,3 シアル酸転移酵素 mRNA に対する antisense probe のハイブリダイズ像, C: Gal  $\beta$  1,4 GlcNAc  $\alpha$  2,6 シアル酸転移酵素 mRNA に対する antisense probe のハイブリダイズ像, D: Gal  $\beta$  1,4 GlcNAc  $\alpha$  2,6 シアル酸転移酵素 mRNA に対する sense probe のハイブリダイズ像。

a: 顆粒細胞層, b: 有棘細胞層, c: 胚芽細胞層, バーは 20  $\mu$ m

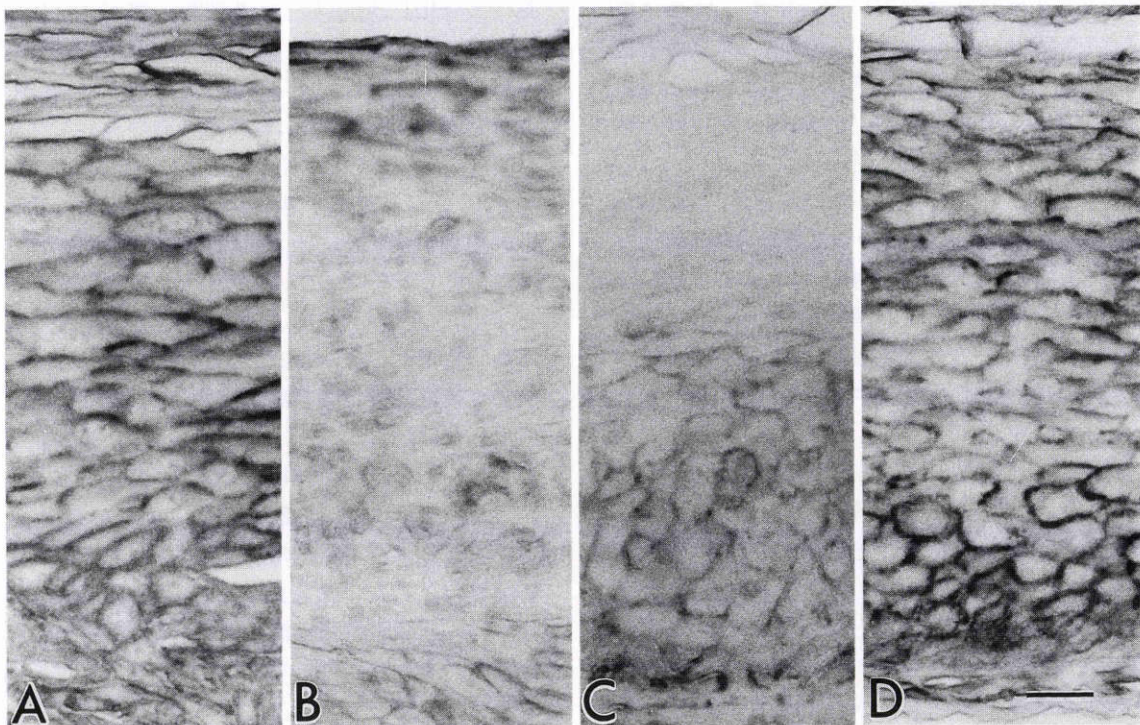


図2 脂漏性角化症腫瘍のビオチン標識レクチン染色像。

A: *Maackia amurensis* lectin II 染色像, B: Peanut agglutinin (PNA) 染色像, C: *Sambucus nigra* agglutinin 染色像, D: *Erythrina cristagalli* agglutinin 染色像, バーは 20  $\mu$ m

全層にわたって、それらを構成する細胞の表面に強く結合している像が観察された(図2A). PNAは胚芽細胞層と、顆粒細胞層の表層を構成する細胞の表面に、軽度~強く結合している像が観察されたのに対し、有棘細胞層を構成する細胞の表面にはほとんど結合しなかった(図2B). SNAは、有棘細胞層の中間部~基底側寄りに分布する細胞の表面に、中等度に結合している像が観察された(図2C). ECAは、有棘細胞層の中間部に分布する細胞の表面に弱く、それ以外の細胞の表面に強く結合している像が観察された(図2D). ハプテン糖を含むレクチン溶解液を反応させた組織切片では、いずれのレクチンでも発色の強さが著しく減弱したことから、それぞれのレクチンが特異的に糖鎖を認識して結合したものと判断した。

#### IV 考 按

Gal  $\beta$  1,3 GalNAc  $\alpha$  2,3-ST の mRNA が細胞質に検出され、かつシアル酸  $\alpha$  2,3 Gal を認識する MAL II<sup>8)</sup>で細胞表面が染色された胚芽細胞層から有棘細胞層にかけて分布する細胞は、これらの糖鎖が活発に合成されている細胞であると考えられる。MAL II で細胞表面が染色されたにもかかわらず、Gal  $\beta$  1,3 GalNAc  $\alpha$  2,3-ST の mRNA が検出されない顆粒細胞層の細胞は、有棘細胞層との連続性を考慮した場合、これらの糖鎖の合成が既に終了した細胞であるとみなされるとともに、シアル酸  $\alpha$  2,3 Gal を含む O-結合型糖鎖の turnover が遅いため、それらの細胞表面に分布し続けているものと推定される。一方、シアル酸が結合していない状態の O-結合型糖鎖(Gal  $\beta$  1,3 GalNAc)を認識する PNA<sup>9)</sup>が、胚芽細胞層と顆粒細胞層の表層の細胞の表面に検出された理由は、次のように説明し得る。胚芽細胞層にはシアル酸がまだ結合していない未熟な糖鎖が混在しているために、それらが PNA によって認識されたのであろう。顆粒細胞層の表層には apoptosis に陥りつつある細胞が分布し、それらの細胞表面の複合糖質の糖鎖末端のシアル酸がはずれるために<sup>10)</sup>、Gal が露出した糖鎖が PNA によって認識されたのであろう。この細胞層には、未だシアル酸がはずれていない複合糖質も混在するため、MAL II でも染色されたのであろう。

一方、Gal  $\beta$  1,4 GlcNAc  $\alpha$  2,6-ST の mRNA の検出された有棘細胞層の中間部~基底側寄りに分布する細胞の表面だけが、シアル酸  $\alpha$  2,6 Gal を認識する SNA<sup>11)</sup>で染色されたことから、シアル酸  $\alpha$  2,6 Gal を含む N-結合型糖鎖末端の turnover は速く、Gal  $\beta$  1,4 GlcNAc  $\alpha$  2,6-ST の mRNA を発現しなくなった有棘細胞層の表層側寄りに分布する細胞の表面は、SNA で染色されないものと推定される。また、シアル酸が結合していない状態の N-結合型糖鎖(Gal  $\beta$  1,4 GlcNAc)を認識する ECA<sup>12)</sup>の結合が有棘細胞層の中間部で弱かった理由は、この部位

にはシアル酸が糖鎖末端に結合した糖鎖が主として分布するからであろうと考えられる。事実、この部位には SNA が結合している像が観察された。SNA と ECA の結合がともに観察された有棘細胞層の基底側寄りの部位には、N-結合型糖鎖の末端にシアル酸が結合したものと、しないものが混在しているのであろう。また、有棘細胞層の表層側寄りに分布する細胞の表面は、SNA では染色されなかったが、ECA では染色されたことから、シアル酸がはずれた N-結合型糖鎖は分布し続けるものと推定される。

次に、本研究によって得られた脂漏性角化症の複合糖質のシアル酸を中心とした動態が、脂漏性角化症の病態とどのように関係するののかという点について考察したい。著者らは先に、今回検索した5例すべての脂漏性角化症の肥厚した有棘細胞層の全層にわたって、sialosyl-Tn 抗原が陽性であることを免疫組織化学的に観察している(第100回日本眼科学会総会で報告)。Sialosyl-Tn 抗原は、O-結合型糖鎖のコア部分の GalNAc にシアル酸が結合した糖鎖であり、脂漏性角化症の他には扁平上皮癌でその陽性率が高かった。今回の糖鎖組織化学的検索によって、脂漏性角化症に同定された turnover 速度の遅いシアル酸含有 O-結合型糖鎖とともに、共通の病態を形成している可能性が高い。光受容体間基質の O-結合型複合糖質は、視細胞と色素上皮細胞との間の接着に関与しており、その turnover 速度が遅いことが網膜の安定した構造を維持するのに役立っている<sup>13-15)</sup>。眼瞼皮膚においては通常、胚芽細胞層から新生してくる有棘細胞と顆粒細胞へと分化し、脱落していく細胞の数がバランスがとれているために肥厚することはないものと考えられる。脂漏性角化症では、シアル酸含有 O-結合型糖鎖の turnover 速度が遅いため、有棘細胞層が互いに接着した形で肥厚してしまい、腫瘤を形成するのかも知れない。

以上、シアル酸転移酵素 mRNA の *in situ* hybridization 組織化学とレクチン組織化学を組み合わせ、比較検討することによって、眼瞼腫瘍組織の複数の静止像から、時間的要素を加味した個々の細胞の糖鎖合成に関する動的情報まで読み取ることが可能であった。すなわち、シアル酸含有糖鎖の合成が活発な細胞、既にその合成が終了した細胞および、これが行われていない細胞を識別でき、シアル酸含有糖鎖の turnover 速度などを推測することができた。本法は、個々の細胞レベルで、眼瞼上皮細胞の生理および、種々の腫瘍組織の病態とシアル酸含有糖鎖発現との関係を理解するのに有用であると考えられ、今後、健常部眼瞼組織および、脂漏性角化症以外の眼瞼腫瘍についても同様の糖鎖組織化学的検索を進めていきたい。

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) 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.
- 2) Uehara F, Ozawa M, Sameshima M, Unoki K, Okubo A, Yanagita T, et al: Differential expression of mRNA for  $\alpha$ 2,3-sialyltransferase during development of rat retina. Jpn J Ophthalmol 39: 248—253, 1995.
- 3) Uehara F, Ohba N, Sameshima M, Yanagita T, Iwakiri N, Ozawa M: Sialoglycoconjugates and retinal degeneration. In: Kato S, et al (Eds): Retinal Degeneration and Regeneration. Kugler Publications, Amsterdam, 73—80, 1996.
- 4) Yogeewaran G, Salk PL: Metastatic potential is positively correlated with cell surface sialylation of cultured murine tumor cell lines. Science 212: 1514—1516, 1981.
- 5) Uehara F, Ohba N, Nakashima Y, Yanagita T, Ozawa M, Muramatsu T: A fixative suitable for *in situ* hybridization histochemistry. J Histochem Cytochem 41: 947—953, 1993.
- 6) Gillespie W, Kelm S, Paulson JC: Cloning and expression of the Gal $\beta$ 1,3 GalNAc $\alpha$ 2,3-sialyltransferase. J Biol Chem 267: 21004—21010, 1992.
- 7) Weinstein J, Lee EU, McEntee K, Lai P-H, Paulson JC: Primary structure of  $\beta$ -galactoside  $\alpha$ 2,6-sialyltransferase. J Biol Chem 262: 17735—17743, 1987.
- 8) Sata T, Lackie PM, Taatjes DJ, Peumans W, Roth J: Detection of the Neu5Ac ( $\alpha$ 2,3)Gal( $\beta$ 1,4)GlcNAc sequence with the leukoagglutinin from *Maackia amurensis*: Light and electron microscopic demonstration of differential tissue expression of terminal sialic acid in  $\alpha$ 2,3- and  $\alpha$ 2,6-linkage. J Histochem Cytochem 37: 1577—1588, 1989.
- 9) 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.
- 10) Uehara F, Ohba N, Yanagita T, Sameshima M, Iwakiri N, Okubo A, et al: Glycohistochemical study of light-induced retinal degeneration. Removal system of apoptotic cells. In: LaVail MM, et al (Eds): Degenerative Retinal Diseases. Plenum Publishing Corporation, New York, in press.
- 11) Shibuya N, Goldstein IR, Broekaert WF, Nsimba-Lubaki M, Peeters B, Peumans WJ: The elderberry (*Sambucus nigra* L.) bark lectin recognizes the Neu5Ac ( $\alpha$ 2,6)Gal/GalNAc sequence. J Biol Chem 262: 1596—1601, 1987.
- 12) Vierbuchen M, Uhlenbruck G, Ortmann 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.