

眼瞼腫瘍に観察されたアポトーシス小体の糖鎖組織化学的解析

上原 文行¹⁾, 大庭 紀雄¹⁾, 宮城 妙子²⁾¹⁾鹿児島大学医学部眼科学教室, ²⁾宮城県立がんセンター研究所

要 約

腫瘍組織におけるアポトーシスの病態と複合糖質の糖鎖末端のシアル酸との関係を明らかにする目的で, 眼瞼扁平上皮癌について免疫組織化学的手法と糖鎖組織化学的手法を用いて解析した. 免疫組織化学および *in situ* hybridization 組織化学によって, 腫瘍細胞ではシアル酸転移酵素によって糖鎖末端にシアル酸が付加される反応が優位であるのに対し, アポトーシス小体ではシアリダーゼによって糖鎖末端のシアル酸が切断される反応が優位であることが示唆された. レクチン組織化学で, 腫瘍細胞表面にはシアル酸 $\alpha 2, 3$ galactose $\beta 1, 3$ N-

acetylgalactosamine (Gal $\beta 1, 3$ GalNAc) が, アポトーシス小体表面には Gal $\beta 1, 3$ GalNAc がそれぞれ存在することが判明した. アポトーシスに陥った細胞は, 細胞表面のシアル酸が減少して, 露出した Gal $\beta 1, 3$ GalNAc がマクロファージの表面に存在する C 型レクチンによって認識されて, 貪食されるのではないかと考えられた. (日眼会誌 101: 611-616, 1997)

キーワード: 眼瞼腫瘍, アポトーシス, 複合糖質, シアル酸, 組織化学

Glycohistochemical Analysis of Apoptotic Bodies in Eyelid Tumor

Fumiyuki Uehara¹⁾, Norio Ohba¹⁾ and Taeko Miyagi²⁾¹⁾Department of Ophthalmology, Kagoshima University Faculty of Medicine²⁾Research Institute, Miyagi Cancer Center

Abstract

To clarify the relation between the mechanism of apoptosis in tumor tissues and sialic acids on the termini of sugar chains of glycoconjugates, a case of squamous cell carcinoma was examined using immunohistochemistry and glycohistochemistry. Immunohistochemistry and *in situ* hybridization histochemistry suggested that sialylation by the sialyltransferase is dominant in tumor cells, whereas hydrolysis of sialic acids by the sialidase is dominant in apoptotic bodies. Lectin histochemistry revealed that sialic acid $\alpha 2, 3$ galactose $\beta 1, 3$ N-

acetylgalactosamine (Gal $\beta 1, 3$ GalNAc) is present on the surfaces of tumor cells, and Gal $\beta 1, 3$ GalNAc is present on those of apoptotic bodies. The exposed Gal $\beta 1, 3$ GalNAc owing to the decrease in sialic acids on the surfaces of apoptotic bodies may be recognized by the C-type lectin on the macrophage for phagocytosis. (J Jpn Ophthalmol Soc 101: 611-616, 1997)

Key words: Eyelid tumor, Apoptosis, Glycoconjugate, Sialic acid, Histochemistry

I 緒 言

生命現象の基本である細胞死は大きく二つに分けられ, ネクロシスでは細胞が膨化して細胞膜が破裂してしまうのに対し, アポトーシスでは核と細胞が縮小化してアポトーシス小体を形成し, 微絨毛は消失するものの, 細胞膜に包まれたままの状態では, マクロファージや食細胞によって貪食除去される¹⁾. 現在までにアポトーシス

のシグナル伝達系に関しては多くの研究成果が得られてきているが, アポトーシスを起こした死細胞の除去機構の詳細については, まだ解明されていない状況にある¹⁾.

著者らは, これまで眼科領域の糖鎖生物学的研究を進め, 細胞表面の複合糖質の糖鎖末端に存在するシアル酸に注目し, 網膜視細胞変性に細胞表面のシアル酸の減少が関与している可能性を指摘してきた²⁾³⁾. 複合糖質の糖鎖は, 種々の細胞間認識機構においてシグナルの役割を

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9年2月18日受付, 平成9年3月24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 February 18, 1997 and accepted in revised form March 24, 1997)

果たしていることから、アポトーシスを起こした細胞においても、その表面の糖鎖の変化がマクロファージによって認識されて貪食される可能性がある^{4)~6)}。

一方、細胞の変性と癌化はコインの裏表の関係にあるとの観点から、眼瞼腫瘍の悪性形質の発現とシアル酸との関係に注目した研究を進める過程で、腫瘍細胞とアポトーシス小体が同時に観察されることを著者らは経験している。そこで本研究においては、腫瘍細胞およびアポトーシスの病態と複合糖質の糖鎖末端のシアル酸との関係を明らかにする目的で、眼瞼悪性腫瘍について免疫組織化学的手法と糖鎖組織化学的手法を用いて解析した。

II 実験方法

鹿児島大学医学部附属病院眼科において手術し、アポトーシス小体様の細胞の集積像が観察された眼瞼扁平上皮癌(78歳、女性)を対象とした。腫瘍組織は免疫・レクチン組織化学用には10%ホルマリン液を用いて、*in situ* hybridization組織化学用には0.5%グルタルアルデヒド、4%パラホルムアルデヒド/磷酸緩衝生理食塩水(PBS, PH 7.4)を用いてそれぞれ浸漬固定した後、パラフィン包埋した。5 μ mの厚さの組織切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色するとともに、下記に概略した方法を用いて組織染色を行った。

1. TUNEL(TdT-mediated dUTP nick end labeling)の方法⁷⁾

組織切片をあらかじめproteinase K(20 μ g/mlをPBSに溶解)を用いて37°Cで15分間消化した後、TUNEL反応混合液(Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany)を37°Cで60分間反応させた。DNAの切断部が蛍光標識されたTUNEL陽性の細胞核を有す

る細胞の腫瘍組織における分布について、蛍光顕微鏡を用いて観察した。

2. 免疫組織化学の方法

先に報告した方法⁸⁾を用いて、PBSに100倍希釈溶解した、Ki 67抗原(細胞分裂のマーカー⁸⁾)に対する抗体(MM 1; Novocastra 社, UK)、マクロファージに対する抗体(LN 5; Novocastra 社)、あるいは細胞質シアリダーゼに対する抗体⁹⁾をそれぞれ室温で1時間反応させた。対照としては、非免疫マウス血清を反応させた。二次抗体としてはビオチン標識した抗マウスIgG(MM 1; LN 5)、あるいは抗家兎IgG(シアリダーゼ)を室温で1時間反応させ、アビジン・ビオチン・コンプレックス(ABC)法を用いてペルオキシダーゼ発色させた。

3. レクチン組織化学の方法

先に報告した方法¹⁰⁾を用いて、10 μ g/mlの濃度になるように、2%ウシ血清アルブミン/PBSに溶解したビオチン標識の *Maackia amurensis* lectin II (MAL II)、peanut agglutinin(PNA)、あるいはjacalin(いずれもVector 社)を組織切片に室温で1時間反応させた。対照としては、それぞれのレクチンのハプテン糖(MAL II: 3'-sialyllactose; PNAとjacalin: D-galactose)を0.1 Mの濃度になるように混合したレクチンの溶液を反応させ、ABC法を用いてペルオキシダーゼ発色させた。

4. *In situ* hybridization 組織化学の方法

先に報告した方法²⁾を用いて、ジゴキシゲニン標識したgalactose β 1,3 N-acetylgalactosamine(Gal β 1,3 GalNAc) α 2,3シアル酸転移酵素のメッセンジャーRNA(mRNA)に対する、アンチセンスあるいはセンスのプロブを45°Cで36時間ハイブリダイズさせた。50%ホルムアミドを用いて洗浄、RNAase消化、ブロッ

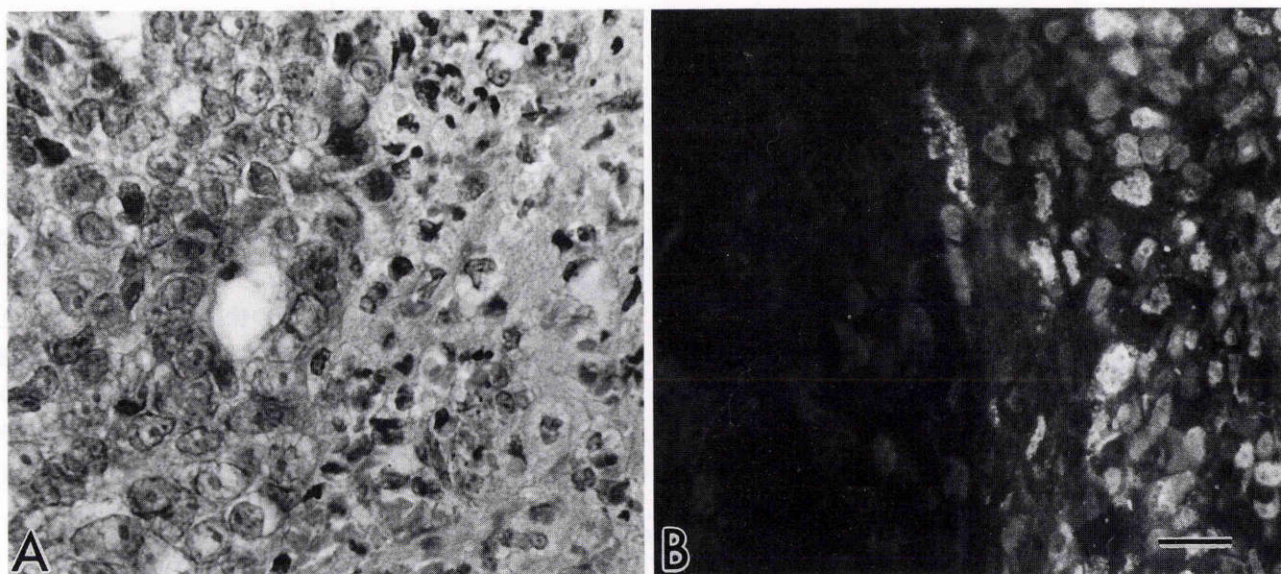


図1 眼瞼扁平上皮癌の組織染色像。

A: ヘマトキシリン・エオジン染色像で、左半分に腫瘍塊、右半分に小細胞群の集積像が観察される。B: TdT-mediated dUTP nick end labeling 像で、右半分の小細胞群に陽性細胞が多数観察される。バーは20 μ m

キング溶液に浸漬した後、アルカリホスファターゼ(AP)標識抗ジゴキシゲニン抗体(Boehringer-Mannheim)を室温で2時間反応させ、AP 発色させた。

III 結 果

まず HE 染色で、腫瘍塊(図1Aの左半分)に接して、断片状の小さな核を有している小細胞群が集積している部位(図1Aの右半分)が観察された。この部位には、TUNEL 反応陽性細胞が多数検出された(図1Bの右半分)。

免疫組織染色で、抗 Ki 67 抗原抗体は腫瘍塊側に存在する腫瘍細胞の半数以上の核に結合した(図2Aの左半分)のに対し、小細胞群側の細胞核には散在性にはしか結合

しなかった(図2Aの右半分)。抗マクロファージ抗体は、小細胞群側に散在性に分布している比較的大きな細胞に結合した(図2Bの右半分)。抗細胞質シアリダーゼ抗体は、小細胞群側に分布している小細胞の核の辺縁を取り囲むように結合した(図2Cの右半分)。非免疫マウス血清を反応させた腫瘍組織切片には、ほとんどペルオキシダーゼ発色像が観察されなかった(図2D)ことから、それぞれの抗体は特異的に結合したものとみなした。

次にレクチン組織染色では、MAL II は腫瘍塊側に密集しているほとんどの腫瘍細胞の表面に結合した(図3Aの左半分)のに対し、小細胞群側に分布している細胞には散在性にはしか結合しなかった(図3Aの右半分)。逆に、PNA は腫瘍塊側に分布している腫瘍細胞にはほと

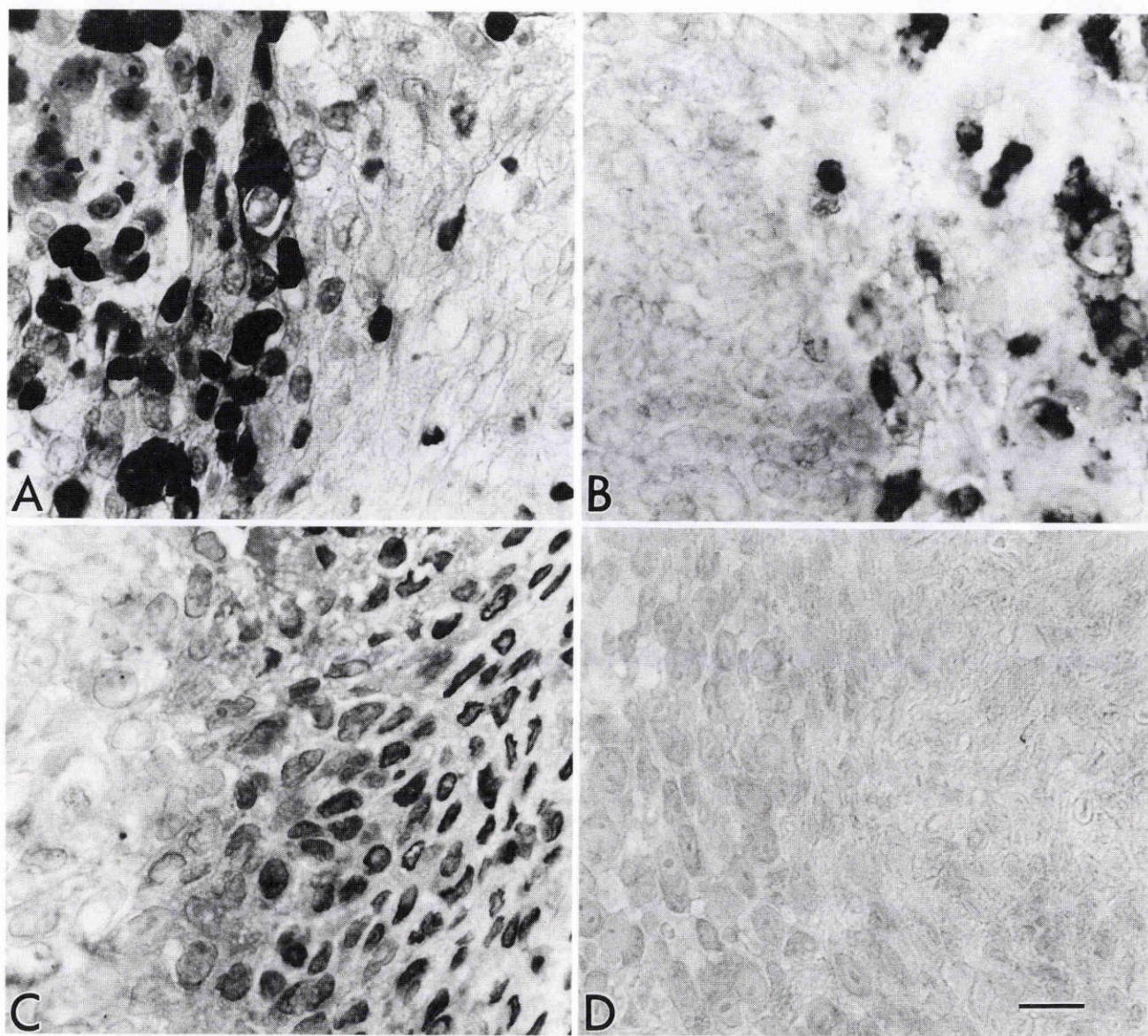


図2 眼瞼扁平上皮癌の免疫組織染色像。

A: 抗 Ki 67 抗原抗体反応像で、左半分の腫瘍塊に陽性細胞が多数観察される。B: 抗マクロファージ抗体反応像で、右半分の小細胞群の間に陽性細胞が散在性に観察される。C: 抗細胞質シアリダーゼ抗体反応像で、右半分の小細胞群に陽性細胞が多数観察される。D: 非免疫血清反応像で、微弱な発色像しか観察されない。バーは 20 μ m

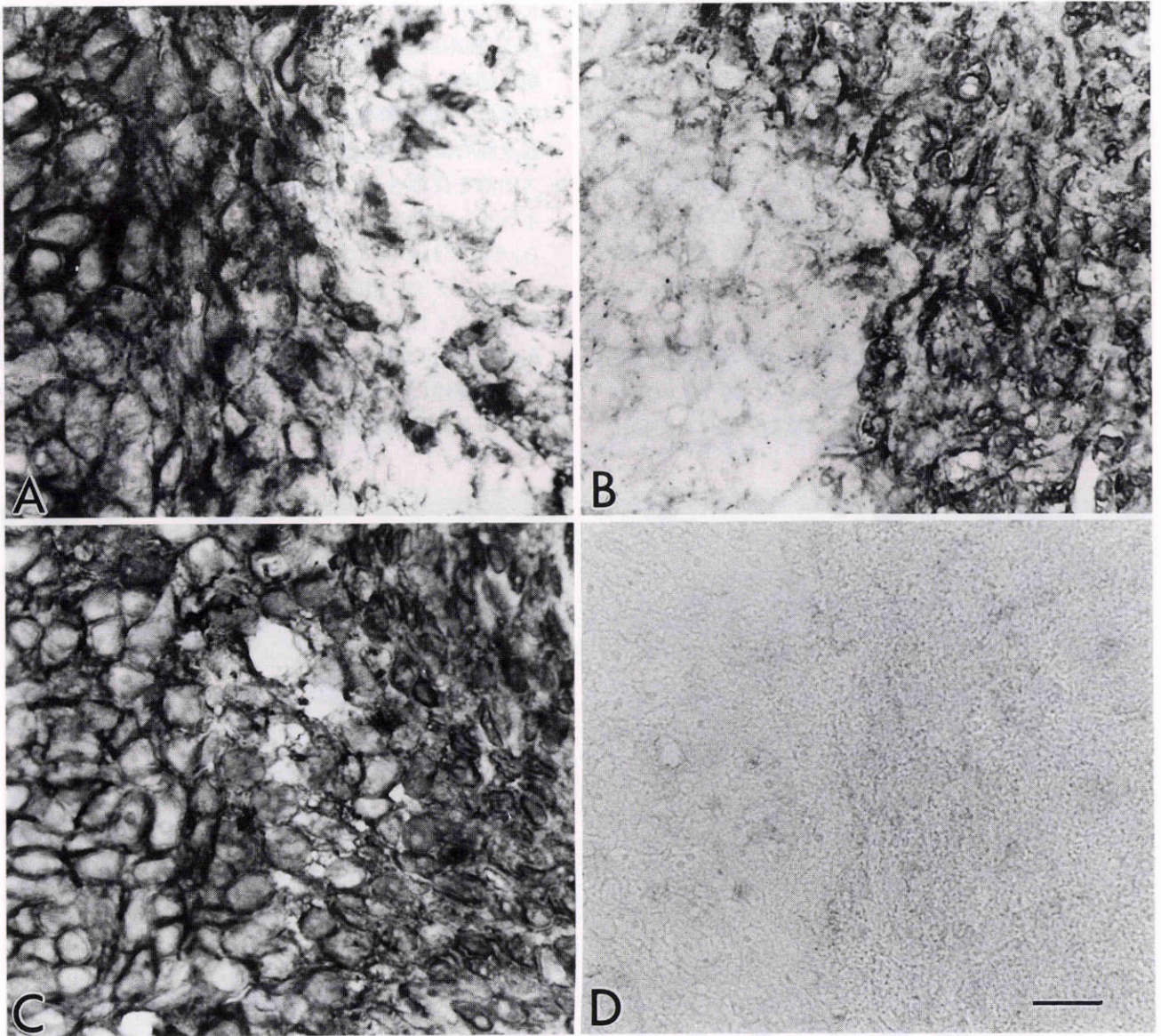


図3 眼瞼扁平上皮癌のレクチン組織染色像。

A: *Maackia amurensis* lectin II 反応像で、左半分の腫瘍細胞表面が染色されている。B: Peanut agglutinin 反応像で、右半分の小細胞表面が染色されている。C: Jacalin 反応像で、ほとんどすべての細胞表面が染色されている。D: Jacalin と D-galactose の混合液の反応像で、微弱な発色像しか観察されない。バーは 20 μ m

んど弱い染色像しか観察されなかった(図3Bの左半分)のに対し、小細胞集塊側に分布する多くの細胞の細胞表面に強く結合した(図3Bの右半分)。Jacalin は、腫瘍細胞と小細胞集塊側の小細胞のほとんどすべての細胞表面に結合した(図3C)。ハプテン糖を混合したレクチン溶液を反応させた場合、ほとんどペルオキシダーゼ発色像が観察されなかった(図3D, jacalin と D-galactose の混合液の反応像)ことから、それぞれのレクチンは特異的に結合したものとみなした。

In situ hybridization 組織化学では、Gal β 1,3 GalNAc α 2,3-シアル酸転移酵素 mRNA に対するアンチセンスプローブは、腫瘍細胞の細胞質に強くハイブリダイズした(図4Aの左半分)のに対し、小細胞群側に分布している細胞には微弱なハイブリダイズの信号しか観察

されなかった(図4Aの右半分)。センスプローブは、組織全体にわたってほとんど微弱なハイブリダイズの信号しか観察されなかった(図4B)ことから、アンチセンスプローブは腫瘍細胞の細胞質に特異的にハイブリダイズしたものとみなした。

IV 考 按

まず最初に、HE 染色で扁平上皮癌の腫瘍塊に接して、断片状の小さな核を有している小細胞群が集積している部位には、TUNEL 反応⁷⁾陽性細胞が多数検出されたことと、レクチン染色でそれらの細胞膜が保存されていることが確認されたことから、これらの小細胞の中の多くのものがアポトーシス小体であろうと考えた。そして、抗マクロファージ抗体陽性細胞が小細胞群側に散在するよ

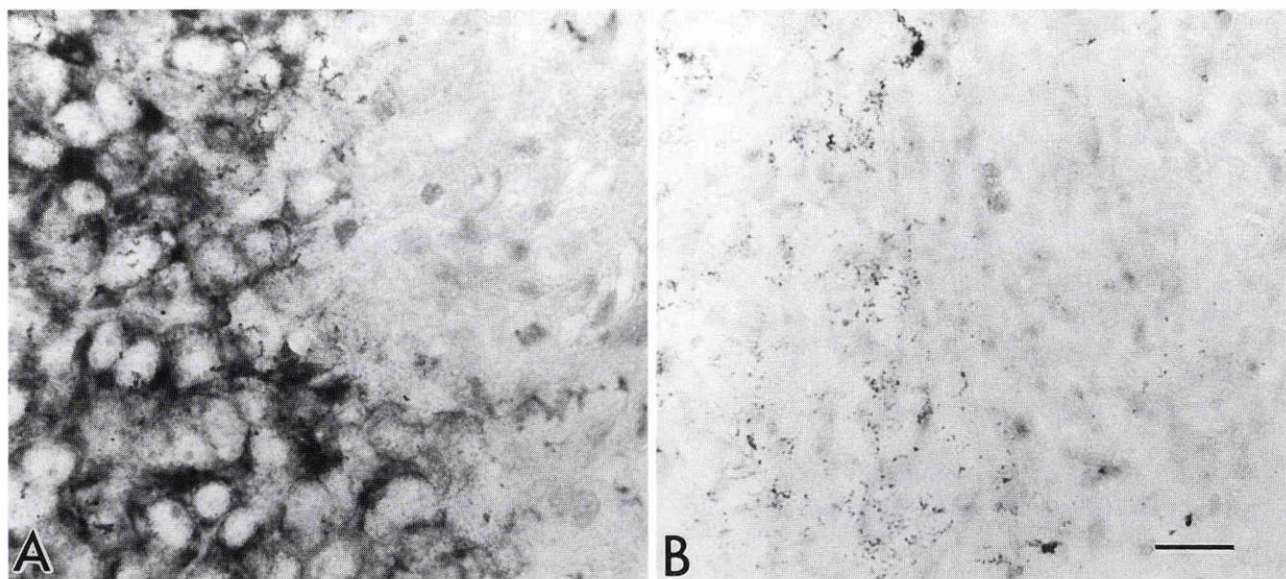


図4 眼瞼扁平上皮癌の *in situ* hybridization 組織染色像.

A: Galactose β 1,3 N-acetylgalactosamine α 2,3 シアル酸転移酵素の mRNA に対するアンチセンスプローブのハイブリダイズ像で、左半分の腫瘍細胞の細胞質に陽性像が観察される。B: センスプローブのハイブリダイズ像で、微弱な発色像しか観察されない。バーは 20 μ m

うに検出されたことから、マクロファージがアポトーシス小体を貪食、除去するために集積しているのであろうと考えた。一方、細胞分裂期の細胞核に出現する Ki 67 抗原⁸⁾が腫瘍塊側に存在する腫瘍細胞の半数以上の核に検出されたことから、これらの腫瘍細胞は増殖能に富むことが示唆された。これとは対照的に、小細胞群側の細胞核には Ki 67 抗原が散在性にしか検出されなかったことは、アポトーシス小体が既に増殖能を失って死につつつあることを表している。

次に糖鎖組織化学的観点から考察する。細胞質シアリダーゼ⁹⁾がアポトーシス小体に強く検出されたのに対し、腫瘍細胞にはほとんど検出されなかった。一方、シアル酸転移酵素の mRNA は、腫瘍細胞には強く検出されたのに対し、アポトーシス小体にはほとんど検出されなかった。これらの観察結果から、腫瘍細胞では糖鎖末端にシアル酸が付加される反応が優位であるのに対し、アポトーシス小体では糖鎖末端のシアル酸が切断される反応が優位であることが示唆された。このことはレクチン組織化学によって証明された。すなわち、腫瘍細胞の表面には、シアル酸 α 2,3 Gal に特異的な MAL II¹¹⁾が結合したのに対し、シアル酸が糖鎖末端に存在しない状態の Gal β 1,3 GalNAc を認識する PNA¹²⁾は結合しなかったことから、腫瘍細胞表面の複合糖質の糖鎖末端の Gal 残基は、すべてシアル酸が結合した状態で存在していることが明らかになった。逆に、アポトーシス小体群側の細胞表面への MAL II の結合は乏しく、PNA の結合が顕著であったことから、アポトーシス小体表面の糖鎖末端の Gal 残基はすべて露出した状態で存在していることも明らかになった。シアル酸の糖鎖末端における存在の

有無にかかわらず、Gal β 1,3 GalNAc を認識する jacalin¹³⁾は、腫瘍細胞とアポトーシス小体の両方の細胞表面に結合したことから合わせて考察すると、腫瘍細胞表面にはシアル酸 α 2,3 Gal β 1,3 GalNAc が、アポトーシス小体表面には Gal β 1,3 GalNAc がそれぞれ存在すると結論づけることができる。

これらの細胞表面の糖鎖の差異は、どのような生理学的意義を持つのであろうか。一般に転移能の高い悪性腫瘍細胞表面のシアル酸含有量は高いと報告¹⁴⁾¹⁵⁾されており、本研究における眼瞼扁平上皮癌の腫瘍細胞表面にシアル酸が存在するという観察結果と一致している。細胞表面のシアル酸の存在によって、腫瘍細胞は免疫細胞によって認識されにくくなる可能性がある。一方、本研究と同様に、アポトーシス小体表面のシアル酸が減少することがレクチンを用いた研究で最近指摘されてきているが⁴⁾⁵⁾、これらの研究ではシアリダーゼやシアル酸転移酵素については未検索の状態に留まっている。著者らは変性網膜に観察されるアポトーシス小体でも細胞質シアリダーゼが増加し、表面のシアル酸が減少することも観察している⁶⁾。腫瘍組織だけでなく、変性組織でも共通してアポトーシス小体表面の複合糖質の糖鎖末端のシアル酸が減少して、露出した Gal β 1,3 GalNAc がマクロファージの表面に存在する C 型レクチン¹⁶⁾によって認識されて、貪食されるのではないかと考えられる。

以上、本研究によって、腫瘍塊とアポトーシス小体とが同時に観察される部位について、免疫組織化学および糖鎖組織化学的に比較検討することによって、アポトーシス小体のマクロファージによる除去機構解明に有用な情報を得ることができた。まだアポトーシスを起こして

いない段階の腫瘍細胞でも、細胞表面のシアル酸を減少させることができれば、マクロファージによって認識・貪食されるようになることが期待されることから、悪性腫瘍の治療とも関連して、腫瘍細胞表面の複合糖質の糖鎖末端のシアル酸に注目した研究を、今後ともさらに発展させていく必要がある。

文 献

- 1) 山田 武, 大山ハルミ: 生命現象とアポトーシス, 内海耕造, 他(編): アポトーシスの分子機構と病態. 日本アクセル・シュプリングー出版, 東京, 12-23, 1996.
- 2) 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.
- 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) Savill J, Fadok V, Henson P, Haslett C: Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. Immunol Today 14: 131-136, 1993.
- 5) 田沼靖一, 丸太英晴: 貪食. 三浦正幸, 他(編): Bio Science 用語ライブラリー(アポトーシス). 羊土社, 東京, 24-25, 1996.
- 6) Uehara F, Ohba N, Sameshima M, Yanagita T, Okubo A, Iwakiri N, et al: Glycohistochemical study of light-induced retinal degeneration. In: LaVail MM, et al (Eds): Degenerative Retinal Diseases. Plenum Publishing Corp, New York, (in press).
- 7) Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA: Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. J Cell Biol 119: 493-501, 1992.
- 8) 上原文行, 大庭紀雄: 眼瞼腫瘍の Ki 67 抗原発現分布の免疫組織化学. あたらしい眼科 13: 1411-1413, 1996.
- 9) Miyagi T, Sagawa J, Konno K, Tsuiki S: Immunological discrimination of intralysosomal, cytosolic, and two membrane sialidase present in rat tissues. J Biochem 107: 794-798, 1990.
- 10) 上原文行, 大庭紀雄, 迫田由紀子, 神村浩策, 有馬知子, 吉田浩己: 涙腺多形腺腫複合糖質のレクチン組織化学的解析. 日眼会誌 101: 355-358, 1997.
- 11) Sata T, Lackie PM, Taatjes DJ, Peumans W, Roth J: Detection of the Neu 5 Ac (α 2, 3) Gal (β 1, 4) GlcNAc sequence with the leucoagglutinin 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.
- 12) 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.
- 13) Hortin GL, Trimpe BL: Lectin affinity chromatography of proteins bearing O-linked oligosaccharides: Application of jacalin-agarose. Analytical Biochem 188: 271-277, 1990.
- 14) Warren L, Buck CA, Tuszynski GP: Glycopeptide changes and malignant transformation. A possible role for carbohydrate in malignant behavior. Biochem Biophys Acta 516: 97-127, 1978.
- 15) 宮城妙子: シアリダーゼと癌転移, 細胞工学 15: 745-751, 1996.
- 16) 入村達郎: 糖鎖と細胞相互作用—マクロファージレクチンの機能を中心に, 福田 稔(編): 糖鎖研究の最先端. 羊土社, 東京, 24-38, 1996.