

眼内腫瘍および網膜における修飾ヌクレオシド (1-methyladenosine) の発現

高橋 玲子¹⁾, 塩野 貴¹⁾, 玉井 信¹⁾, 伊藤 邦彦²⁾, 水柿 道直²⁾

¹⁾東北大学医学部眼科学教室, ²⁾東北大学医学部附属病院薬剤部

要 約

1-メチルアデノシンは、修飾ヌクレオシドの一種であり、悪性腫瘍患者尿中に増加する。我々は、腫瘍細胞と網膜における1-メチルアデノシンの免疫組織学的発現を報告する。対象は、ヒトでは、網膜芽細胞腫8例、脈絡膜悪性黒色腫4例、転移性脈絡膜腫瘍2例、網膜異形成3例、眼内出血1例、正常眼網膜5例で、ウサギでは実験脈絡膜腫瘍VX2が8例、正常ウサギ網膜5例である。1-メチルアデノシンは、ほとんどの悪性腫瘍細胞と腫瘍存在眼の網膜に発現がみられたが、一方良性腫瘍細胞とその網膜、および正常眼網膜においてはほとんど発現がみられなかった。ウサギにおける結果もヒトと同様であった。1-メチルアデノシンの発現の検討は、眼内腫瘍の組織学的診断上有用であると考えられる。(日眼会誌 97:43-49, 1993)

キーワード: 1-メチルアデノシン, 修飾ヌクレオシド, 免疫抑制物質, 腫瘍マーカー, 網膜芽細胞腫

Expression of Modified Nucleoside, 1-methyladenosine in Intraocular Tumors and the Retinas

Reiko Takahashi¹⁾, Takashi Shiono¹⁾, Makoto Tamai¹⁾,
Kunihiko Itoh²⁾ and Michinao Mizugaki²⁾

¹⁾Department of Ophthalmology, Tohoku University School of Medicine

²⁾Department of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University School of Medicine

Abstract

1-methyladenosine is one of the modified nucleosides, the levels of which are elevated in urine of patients with malignant tumors. We report herein immunohistological expression of 1-methyladenosine in tumor cells and retinas. Eight retinoblastomas, 4 malignant melanomas, two metastatic choroidal tumors, 3 retinal dysplasias, one intraocular hemorrhage and 5 normal eye retinas in human were examined. In addition, 8 experimental rabbit choroidal tumor XV2s, and 5 normal rabbit retinas were examined. 1-Methyladenosine was expressed in almost all malignant tumors and retinas with these tumors, while there was little expression in benign tumor cells, retinas with benign tumor and retinas in normal eyes. Results in rabbits were almost the same as in humans. Examination of expression of 1-methyladenosine is expected to be useful for the histological diagnosis of intraocular tumors. (J Jpn Ophthalmol Soc 97: 43-49, 1993)

Key words: 1-methyladenosine, Modified nucleoside, Immunosuppressive substance, Tumor marker, Retinoblastoma

別刷請求先: 980 仙台市青葉区星陵町1-1 東北大学医学部眼科学教室 高橋 玲子

(平成4年3月31日受付, 平成4年7月2日改訂受理)

Reprint requests to: Reiko Takahashi, M.D. Department of Ophthalmology, Tohoku University School of Medicine, 1-1 Seiryō-machi, Aoba-ku, Sendai 980, Japan

(Received March 31, 1992 and accepted in revised form July 2, 1992)

I 緒 言

悪性腫瘍患者が、その末期において免疫抑制状態に陥ることは周知の事実である。この状態を引き起こす免疫抑制因子に関しては、漆崎ら¹⁾²⁾の総説に詳しいが、最近多くのものが報告されており、それらは免疫担当細胞が産生するもの、悪性腫瘍細胞に由来するもの、宿主体液中に存在するもの、に分けることができる³⁾。免疫担当細胞が産生するもののうち、石田・田村らによって癌性腹水中から単離精製された免疫抑制酸性蛋白 (immuno-suppressive acidic protein; IAP) に関しては、すでに我々が網膜芽細胞腫における腫瘍マーカーとしての有用性を報告⁴⁾している。一方、悪性腫瘍細胞に由来するものの1つとして、修飾ヌクレオシドがある。修飾ヌクレオシドはその多くがt-RNAの構成成分であり、その生理作用としてはt-RNAのクローバー様構造の維持、コドン認識における特異性のコントロールなどが考えられている⁵⁾。これまでに、種々の修飾ヌクレオシドが悪性腫瘍患者尿中、血中に増加し、診断上や治療効果判定において有用なマーカーであることが報告^{6)~15)}されており、動物実験でも同様の報告^{16)~18)}が数多くある。特に本研究で取り上げた修飾ヌクレオシドの1つ1-methyladenosine (m¹Ado)は免疫抑制作用を有する化合物であり、マクロファージへの直接作用でその遊走を阻止すること、リステリア菌感染実験における肝での排除抑制などが報告¹⁹⁾²⁰⁾されている。図1にm¹Adoの構造を示す。今回の研究では、m¹Adoについて網膜芽細胞腫を中心とする眼内腫瘍、およびウサギ実験腫瘍VX2における免疫学的検討を行い、眼科領域における同ヌクレオシド検索の有用性を評価することが目的である。

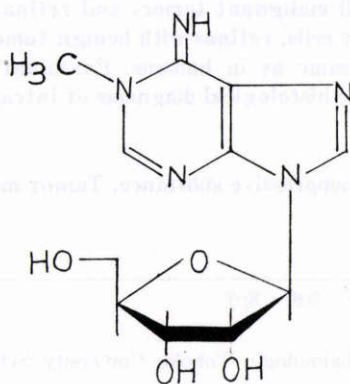


図1 1-methyladenosine の構造式。

II 実験方法

1. ヒトにおける m¹Ado の発現

ヒトに関して取り上げた対象疾患と症例数を表1に示す。そのうち網膜芽細胞腫8例、悪性黒色腫4例は治療として摘出されたもので、転移性脈絡膜腫瘍2例は剖検眼である。また、網膜異形成3例は、術前臨床診断上網膜芽細胞腫を否定しきれず摘出したもので、眼内出血例はやはり悪性黒色腫を否定できず、さらに視力0で緑内障による眼痛が著しかったため眼球摘出の適応としたものである。正常眼4例のうち3例は剖検眼、1例は上顎洞癌手術の際、同時に摘出されたものであるが、後者では眼球浸潤がないことが確認されている。これらすべてをホルマリン固定、パラフィン包埋したのち、一次抗体を抗1-methyladenosineモノクローナル抗体 (AMA2) とし、avidin-biotin peroxidase complex method (ABC法) にて免疫染色した。なお、抗1-methyladenosineモノクローナル抗体は、1-methyladenosine-KLH (キーホールリンベットヘモシアニン)コンジュゲートで頻回免疫したBALB/cマウスの脾細胞を、同系マウス由来の骨髓腫細胞株Sp/O-Ag 14-K 13をポリエチレングリコール4000を用いて融合し、ハイブリドーマをHAT培地により選択して得た⁶⁾。次にABC法の手順を示す。

- 1) ホルマリン固定、パラフィン切片3 μ m
- 2) 脱パラフィン (キシレン $\rightarrow$ アルコール)
- 3) 内因性 peroxidase 活性の阻害 (0.3% H₂O₂ + メタノール), 30分
- 4) 2% 正常マウス血清, 20分, 室温
- 5) 一次抗体: マウス抗1-methyladenosineモノクローナル抗体 (AMA2), 24時間, 4 $^{\circ}$ C
- 6) 二次抗体: ビオチン加ウマ抗マウス抗体, 24時間, 4 $^{\circ}$ C
- 7) ABC試薬 (ペルオキシターゼ添加ビオチンとア

表1 対象疾患と症例数

眼内悪性腫瘍	14例
網膜芽細胞腫	8例
脈絡膜悪性黒色腫	4例
転移性脈絡膜腫瘍	2例
眼内病変	4例
網膜異形成	3例
眼内出血	1例
正常眼	4例

ビチンとの混合) (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA) 2時間, 室温

8) DAB 反応, 10分, 室温

9) 核染色, 24時間 (メチルグリーン染色)

10) 脱色, 封入

2. ウサギにおける m¹Ado の発現

ウサギに関しては, anaplastic carcinoma の一種であり, 実験豚絡膜腫瘍として有用性が確立されている VX 2²¹⁾²²⁾ 8例, 正常ウサギを5例選んだ。VX 2は, 船橋農場より入手し, 一辺 0.5 mm 角に細切したものを白色ウサギの上耳側強膜に作った強膜ポケットの中に移植した。腫瘍の増大を検眼鏡的に確認のうえ眼球摘出し, 正常ウサギも同様であるが, ホルマリン固定, パラフィン包埋ののち1と同様の手順にて ABC 染色した。

ヒト, ウサギいずれの場合も, m¹Ado の発現を検討するにあたり, 免疫染色による染色性をその強さにより, 陰性(−), 弱陽性(±), 陽性(+), 強陽性(++), の4段階に分けて評価した。

III 結 果

表2にヒト悪性腫瘍細胞への発現について検討した結果を示す。悪性腫瘍細胞ではすべての例に(+), あるいは(++)の染色性が得られた。網膜の染色性を表3に示す。網膜の評価は, いずれも腫瘍と接していない離れた部の網膜において行った。悪性腫瘍存在眼の網膜はすべて(+)か(++)であった。なお, 腫瘍からの距離と染色性の強弱に一定の傾向はなかった。一

表2 悪性腫瘍細胞における 1-methyladenosine の発現

	(−)	(±)	(+)	(++)
網膜芽細胞腫	○	○	5/8	3/8
脈絡膜悪性黒色腫	○	○	1/4	3/4
転移性脈絡膜腫瘍	○	○	○	2/2

表3 網膜における 1-methyladenosine の発現

	(−)	(±)	(+)	(++)
網膜芽細胞腫	○	○	5/8	3/8
脈絡膜悪性黒色腫	○	○	1/4	3/4
転移性脈絡膜腫瘍	○	○	1/2	1/2
網膜異形成	2/3	1/3	○	○
眼内出血	1/1	○	○	○
正常眼	2/4	2/4	○	○

方良性疾患と正常眼では(±)が3例の他はすべて(−)であった。また, ウサギ VX 2においては, 腫瘍細胞では8例中7例に(++), 1例に(+)の染色が得られ, また網膜へも8例すべてに m¹Ado の発現が見られた。図2~11に免疫染色の組織所見を示す。網膜芽細胞腫ではほとんどその細胞質に発現が見られ染色パターンは粗大, 一部微細顆粒状であった(図2)。特にロゼットを形成している細胞は他に比べ発現が強い傾向にあり, ロゼットの内側の細胞質に, より強い発現がみられた。また, 同一腫瘍塊でも周辺には発現が著明で, 壊死に陥った中心部には発現がないか, あってもわずかであり, 一方, 栄養血管周囲の腫瘍への発現が著明である。なお, 今回の8例中7例が分化型, 1例が未分化型であったが, 組織型による発現のちがいは明らかではなかった。網膜芽細胞腫の網膜においては全体に m¹Ado の発現がみられたが, 特に視神経細胞層, 視細胞内節に明らかな例が多かった(図3)。

脈絡膜悪性黒色腫ではすべての例で腫瘍細胞の細胞質に粗大顆粒状, 一部微細顆粒状の発現がみられ(図4), それらの網膜にも全例に m¹Ado の発現がみられた(図5)。

転移性脈絡膜腫瘍でも腫瘍細胞の細胞質における粗大顆粒状の発現が主であり(図6)2例とも網膜に発現がみられた(図7)。

眼内良性疾患である網膜異形成, 眼内出血例ではいずれにも m¹Ado の発現は見られなかった(図8, 9)。

正常網膜においても, ほとんど m¹Ado の発現は認められなかった(図10)。

ウサギ VX 2においては, その細胞質に粗大顆粒状に m¹Ado の発現が見られた(図11)それらの網膜にも発現がみられたが, ヒト悪性腫瘍における網膜への発現と同様, 神経節細胞, 視細胞内節に強い例と, ミューラー細胞に強い例とがみられた(図12)。

正常ウサギ網膜にはほとんど発現が認められなかった(図13)。

IV 考 察

修飾ヌクレオシドの1つである m¹Ado に対するモノクローナル抗体を用い, 眼科領域で初めて眼内腫瘍において免疫組織学的検討を行った。その結果眼内悪性腫瘍のすべての例においてははっきりした m¹Ado の発現が認められた。これに対して, 正常眼, 良性疾患にはほとんど同ヌクレオシドの発現が見られなかった。同様の結果が VX 2を用いた実験から得られ, この

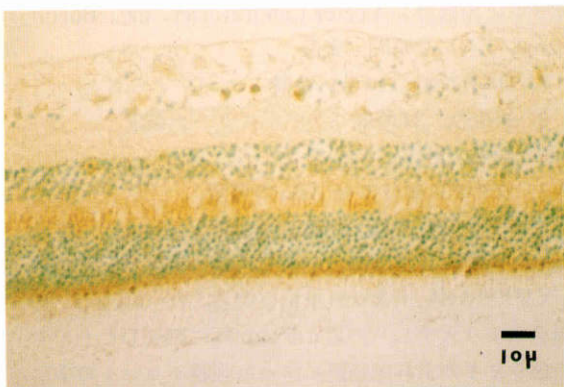
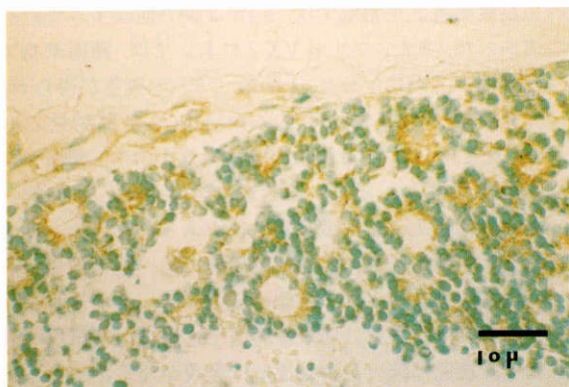


図2 (左) 網膜芽細胞腫における 1-methyladenosine の発現 (×740).

図3 (右) 網膜芽細胞腫の網膜における 1-methyladenosine の発現 (×370).

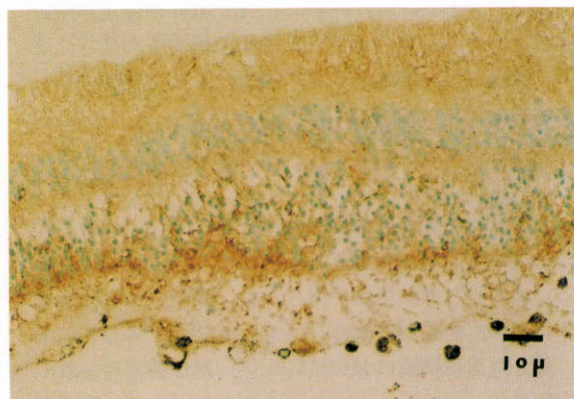
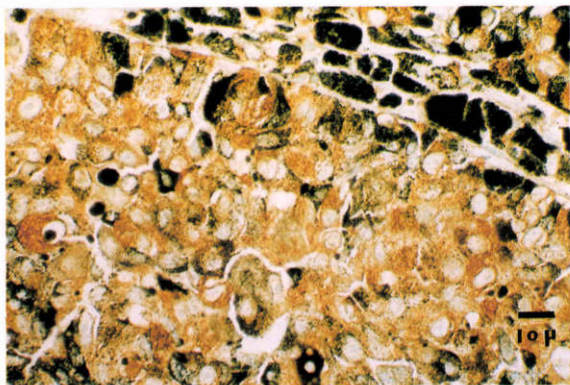


図4 (左) 脈絡膜悪性黒色腫における 1-methyladenosine の発現 (×370).

図5 (右) 脈絡膜悪性黒色腫の網膜における 1-methyladenosine の発現 (×370).

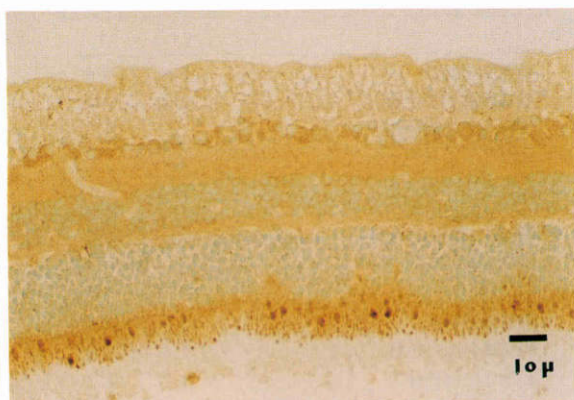
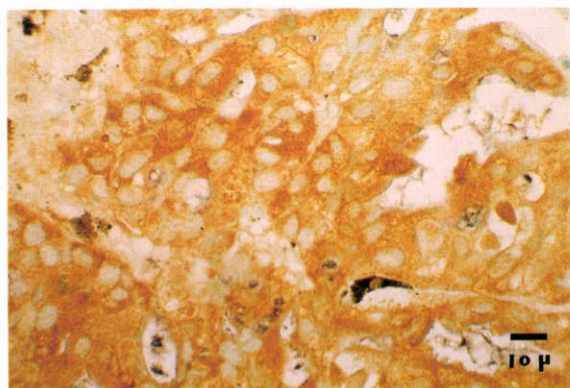


図6 (左) 転移性脈絡膜腫瘍における 1-methyladenosine の発現 (×370).

図7 (右) 転移性脈絡膜腫瘍の網膜における 1-methyladenosine の発現 (×370).

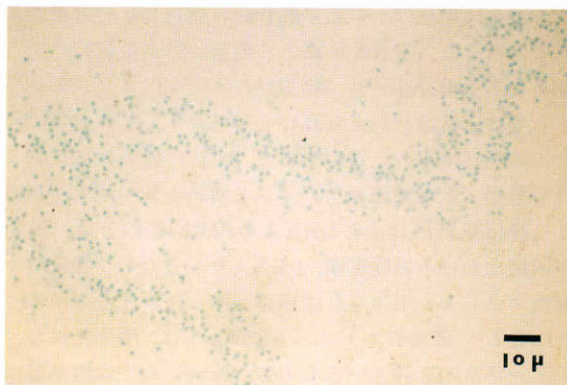
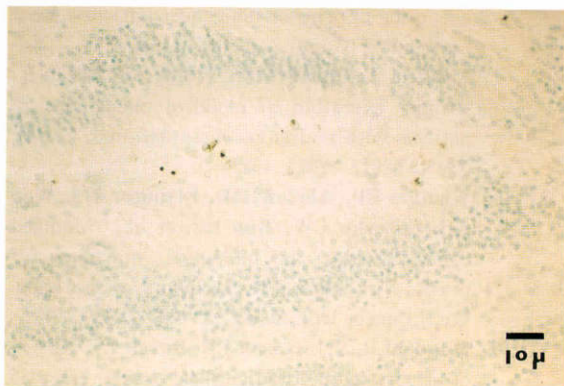


図8 (左) 網膜異形成における 1-methyladenosine の発現 (×370).

図9 (右) 眼内腫瘍における 1-methyladenosine の発現 (×370).

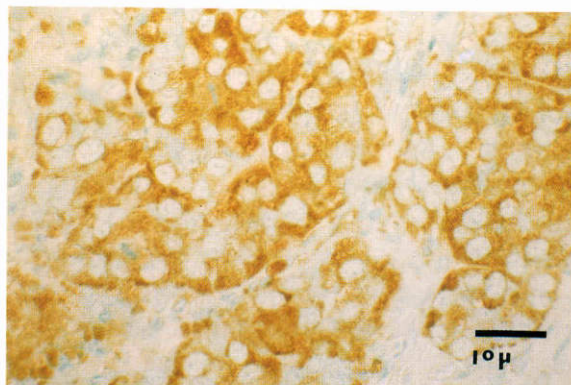
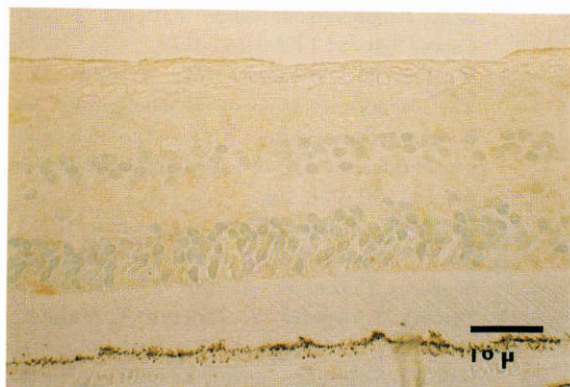


図10 (左) 正常網膜における 1-methyladenosine の発現 (×740).

図11 (右) ウサギ VX 2 における 1-methyladenosine の発現 (×740).

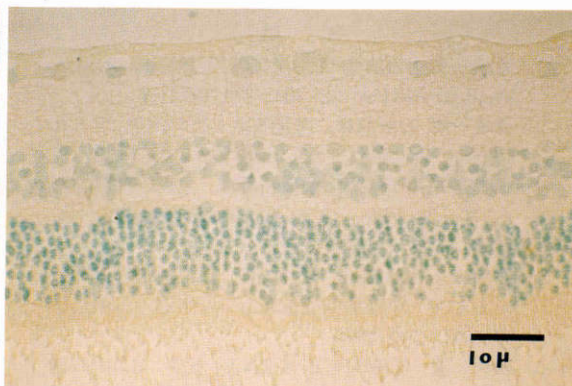
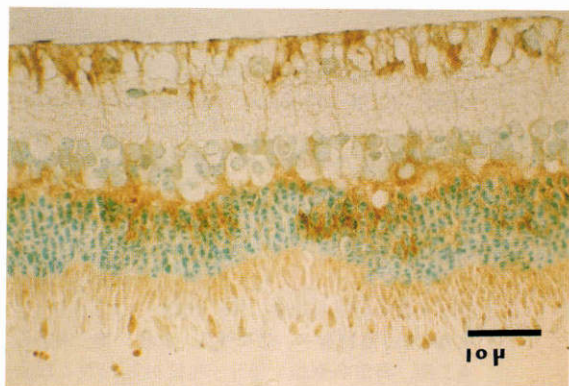


図12 (左) ウサギ VX 2 の網膜における 1-methyladenosine の発現 (×740).

図13 (右) 正常ウサギ網膜における 1-methyladenosine の発現 (×740).

ことから同染色は、組織学的診断の補助として有用であると考え、t-RNAと癌との関係に関する研究の先駆者であるBorek¹²⁾は、癌細胞のメチル化ヌクレオシド含量は正常のそれより高いとしており、これを裏づける結果が得られたといえよう。また、担癌生体における尿中・血中修飾ヌクレオシド増加メカニズムとしては腫瘍組織におけるt-RNAの代謝回転の亢進、腫瘍組織における細胞破壊、t-RNAを介さない、独自の修飾ヌクレオシドの合成経路が作られる、などが考えられる⁹⁾。最後のメカニズムに関しては、微生物において一部証明されているものの、Borekら²³⁾は腫瘍組織における細胞崩壊よりも腫瘍細胞におけるt-RNAの代謝回転の亢進が主因をなすとしており、西村⁵⁾も同様の見解を示している。今回の染色結果では同じ腫瘍塊でも壊死になり細胞が崩壊している部には染色性が低く、逆に周辺の腫瘍、あるいは栄養血管周囲の細胞には特に強い染色が得られた。このことは、代謝回転亢進説を支持する結果といえよう。

また、悪性腫瘍存在眼の網膜に発現がみられ、一方良性疾患、正常眼の網膜にはほとんど見られなかったが、この網膜への発現メカニズムとして、腫瘍部で生じた過剰修飾ヌクレオシドの網膜への取り込み、腫瘍から放出された何らかの因子が網膜における修飾ヌクレオシド産生を高める、などが考えられる。ヒトとウサギの腫瘍存在眼の網膜には発現の異なる部もあったが、理由は不明である。

さらに、ウサギ実験腫瘍VX2において、同様の免疫染色を施行した。染色結果もヒトにおける染色性と類似しており、今回の研究より明らかになったAMA2による組織診断上の有用性をさらに支持するものといえよう。

文 献

- 1) 漆崎一郎：血清中の免疫抑制因子 Minophagen. Medical Review 22: 260—270, 1977.
- 2) 漆崎一郎, 石谷邦彦：腫瘍免疫と抑制因子. 癌と化学療法 7: 1096—1104, 1980.
- 3) 田村啓二, 柴田芳実, 石田名香雄：免疫抑制酸性蛋白. 第5回. 阿蘇シンポジウム, 癌と免疫, 南山堂, 東京, 57—71, 1982.
- 4) 高橋玲子, 山口克宏, 玉井 信：網膜芽細胞腫におけるIAP（免疫抑制酸性蛋白）の測定. 日眼会誌 94: 593—596, 1990.
- 5) 西村 暎：癌細胞と転移RNA. 代謝 17(臨時増刊号, 癌80): 1417—1426, 1980.
- 6) Itoh K, Mizugaki M, Ishida N: Preparation of a monoclonal antibody specific for 1-methyladenosine in urines from cancer patients. Jpn J Cancer Res (Gann) 79: 1130—1138, 1988.
- 7) Fishbein A, Opendra KS, Irving JS, Borek E: Urinary excretion of modified nucleosides in patients with malignant mesothelioma. Cancer Res 43: 2917—2974, 1983.
- 8) Waalkes TP, Abeloff MD, Ettinger DS, Woo KB, Geherke CW, Kuo KC, et al: Modified ribonucleosides as biological markers for patients with small cell carcinoma of the Lung. Eur J Cancer Clin Oncol 18: 1267—1274, 1982.
- 9) Mandel LR, Srinivasan PR, Borek E: Origin of urinary methylated purines. Nature 209: 586—588, 1966.
- 10) Mrochek JE, Dinsmore SR, Waalkes TP: Analytic techniques in the separation and identification of specific purine and pyrimidine degradation products of tRNA: Application to urine samples from cancer patients. J Natl Cancer Inst 53: 1553—1563, 1974.
- 11) Waalkes TP, Dinsmore SR, Mrochek JE: The urinary excretion of the nucleosides N², N²-dimethyl-guanosine, 1-methylinosine and pseudouridine by cancer patients. J Natl Cancer Inst 51: 271—274, 1973.
- 12) Borek E: Introduction to Symposium: tRNA and tRNA modification in differentiation and neoplasia. Cancer Res 31: 596—597, 1971.
- 13) Tamura S, Amuro Y, Nakano T, Fujii J, Moriwaki Y, Yamamoto T: Urinary excretion of pseudouridine in patients with hepatocellular carcinoma. Cancer 57: 1571—1575, 1986.
- 14) Heldman DA, Grever MR, Miser JS, Trewyn RW: Relationship of urinary excretion of modified nucleosides to disease status in childhood lymphoblastic leukemia. JNCI 71: 269—273, 1983.
- 15) Vold BS, Kraus LE, Rimer VG, Coombes RC: Use of a monoclonal antibody to detect elevated of a modified nucleoside, N-[β -D-ribofuranosyl] purine-6-ylcarbamoyl]-L-threonine, in the urine of breast cancer patients. Cancer Res 46: 3164—3167, 1986.
- 16) 原田記子, 口野嘉幸, 河内 卓, 西村 暎：モリス肝癌7794Aを移植したラット尿中へのシチジン, デオキシシチジン, プソイドウリジンの排出. 第32回日本癌学会総会記事, 108, 1973.
- 17) 馬島敏郎, 高野昇一, 品川保弘, 上坂 博, 海老名卓三郎, 石田名香雄：低分子免疫抑制物質と細菌感染—担癌末期に増加する修飾核酸塩基のリストéria感染促進. 臨床免疫 17: 48—59, 1985.
- 18) Shimizu M, Fujimura S: Studies on the

- abnormal excretion of pyrimidine nucleosides in the urine of Yoshida ascites sarcoma-bearing rats. Increased excretion of deoxycytidine, pseudouridine and cytidine. *Biochim Biophys Acta* 517: 277—286, 1978.
- 19) **Itoh K, Majima T, Edo K, Mizugaki M, Ishida N**: Suppressive effect of 1-methyladenosine in the generation of chemiluminescence by mouse peritoneal macrophages stimulated with opsonized zymosan. *Tohoku J Exp Med* 157: 205—214, 1989.
- 20) **Takano S, Sami S, Majima T, Ishida N**: Low molecular weight immunosuppressive factors found in elevated amounts in cancer ascitic fluides of mice 2. 1-methyladenosine isolated from cancer ascitic fluides enhances listeria infection in mice. *J Immunopharmacology* 8: 59—73, 1986.
- 21) **玉井 信, 大村 真, 清沢源弘, 土屋牧雄**: ウサギ悪性腫瘍(VX2)を用いた実験的脈絡膜腫瘍. その1. 移植方法と成功の確率. *眼紀* 34: 2621—2624, 1983.
- 22) **大村 真, 玉井 信**: 実験的脈絡膜腫瘍. あたらしい眼科 3: 1087—1092, 1986.
- 23) **Borek E, Baliga BS, Gehrke CW, Kuo CW, Belman S, Troll W, et al**: High turnover rate of transfer RNA in tumor tissue. *Cancer Res* 37: 3362—3366, 1977.