

Immunohistochemical Localization of Human Type IX Collagen in Cartilaginous Tumors

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8253

軟骨性腫瘍におけるIX型コラーゲンの分布特性

金沢大学医学部病理学第一講座 (主任: 中西功夫教授)

川 島 篤 弘

(平成3年1月21日受付)

軟骨性腫瘍における間質の性状, 特にIX型コラーゲンの分布特性を内軟骨腫7例, 軟骨肉腫10例について胎児軟骨と比較して検討した。ヒト胎児および小児の肋軟骨から精製したIX型コラーゲンをラットに免疫してIX型コラーゲンに特異的な抗体を作製し, 本抗体と, 既に作製済みの抗I型, II型, III型, V型およびVI型コラーゲンの抗体を用いてその局在について観察した。胎児軟骨では, II型およびIX型コラーゲンが軟骨基質に均等にびまん性に分布し, 軟骨細胞の周囲にはIX型コラーゲンが局在する特徴があった。I型, III型およびV型コラーゲンは陰性であった。内軟骨腫および軟骨肉腫異型度1の基質は胎児軟骨とほぼ同様の性状を示したが, IX型コラーゲンが不規則に分布する傾向があった。軟骨肉腫では, 組織学的異型度の増加とともに間質型コラーゲン (I型, III型, V型) が沈着し, VI型コラーゲンがびまん性に出現し, IX型コラーゲンはII型コラーゲンとともに減少し弱陽性に染め出されるにすぎなかった。従って, 腫瘍性軟骨の特徴は, II型コラーゲンの免疫染色性の減弱化に先立ちIX型コラーゲンが不均等に分布すること, 並びに組織学的異型度の増加とともに本来の軟骨性コラーゲンに代って非軟骨性間質型コラーゲンが沈着することであった。また, 軟骨性腫瘍における間質構成成分の多様性が悪性度の指標となる可能性が示唆された。

Key words chondrosarcoma, enchondroma, collagen, immunohistochemistry

軟骨コラーゲンの構成要素の一つであるIX型コラーゲンは, 4個の非ヘリックス領域 (NC1~NC4) とCOL1, COL2, COL3の3個のヘリックス領域をもつファシット (fibril associated collagen with interrupted triple helix, FACIT) コラーゲンであり, $\alpha 1$ (IX), $\alpha 2$ (IX), $\alpha 3$ (IX), の3本の異なった α 鎖より構成されている¹²⁾。IX型コラーゲンは, II型とXI型コラーゲンにより形成されるコラーゲン細線維上に規則的に配列し³⁻⁵⁾, 線維の太さを規制するとともにNC4領域を介して周辺のマトリックス成分との親和性を高めるのに関与していると考えられている⁶⁾。従って, 正常軟骨では, プロテオグリカンとII型, XI型およびIX型コラーゲンが有機的に統合され, それぞれ軟骨基質内ではびまん性に分布しているという

特徴がある⁷⁾。軟骨性腫瘍におけるこれらの成分の量的, 質的变化については最近いくつかの報告がみられる。たとえば軟骨肉腫のプロテオグリカンについては, そのコア蛋白が正常軟骨に比べて長さが短いという報告⁸⁾や, 悪性度の高い軟骨肉腫ではケラタン硫酸の量と側鎖の長さが正常軟骨に比べて減少するという報告⁹⁾などがある。また, 軟骨肉腫における型別コラーゲンの分布については最近 Ueda ら¹⁰⁾が, 組織学的異型度の増加とともにII型コラーゲンの免疫染色性が低下し, 間質型コラーゲン (I型, III型, V型) が沈着し, VI型コラーゲンがびまん性に分布するようになり, このことが悪性度の指標として有用であると報告している。しかし, 軟骨基質の主要成分の一つであるIX型コラーゲンが腫瘍内でII型コラーゲンと同様の分

Abbreviations: ABC, avidin biotin complex; ALP, alkaline phosphatase; CNBr, cyanogen bromide; DAB, diaminobenzidine; DEAE, diethylaminoethyl; EDTA, ethylenediamine tetraacetic acid; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; H.E., hematoxylin and eosin; HMW, heavy molecular weight fragments; LMW, light molecular

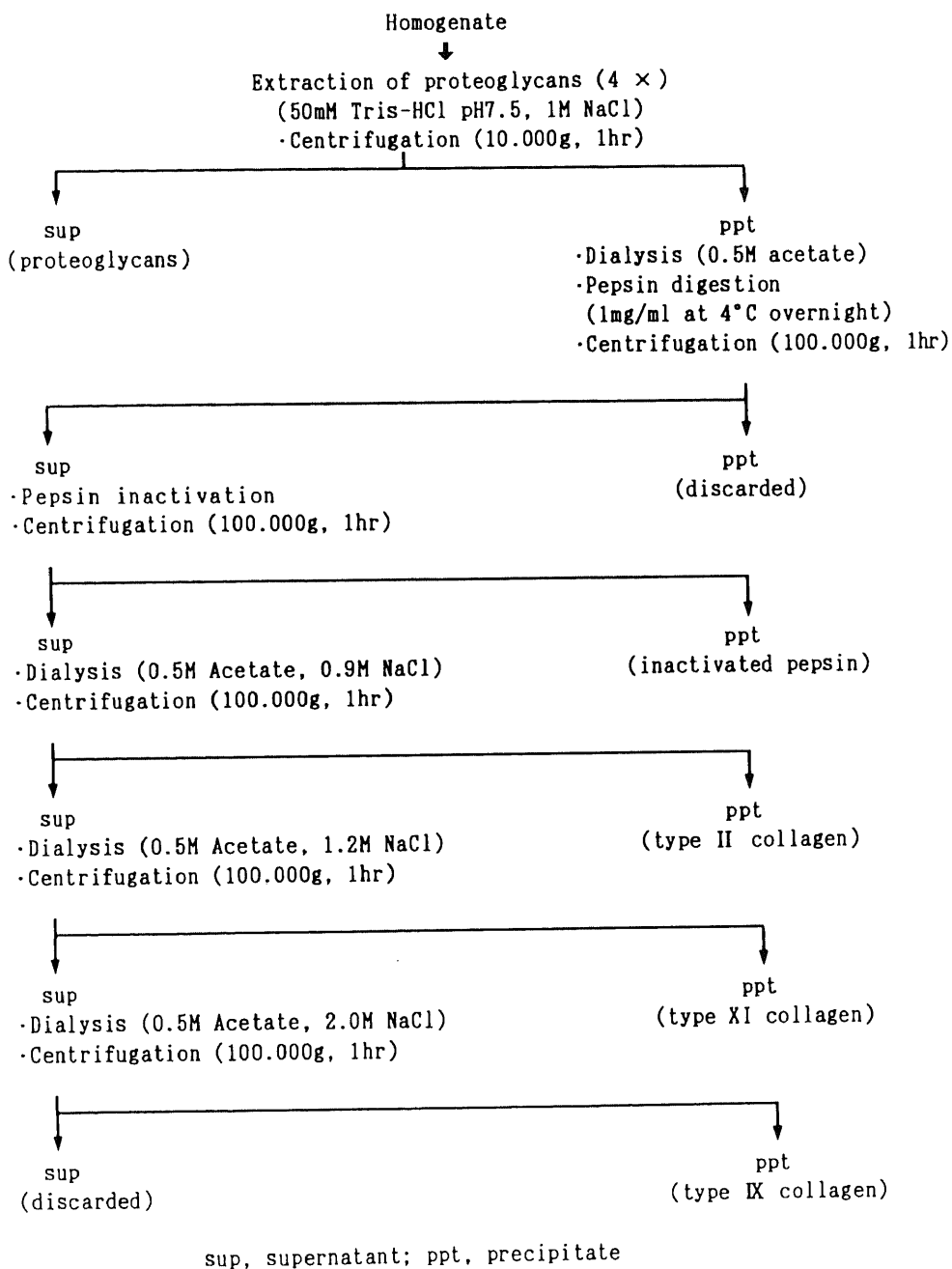


Fig. 1. Outline of the purification procedure used for isolation of types II, XI and IX collagen from the human hyaline cartilage. sup, supernatant; ppt, precipitate

weight fragments; NEM, N-ethylmaleimide; PBS, phosphate buffered saline; PMSF, phenylmethanesulfonyl fluoride; SD, Sprague-Dawley; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

布をとるのか、または他の分子種とどのようにかかわり合い、腫瘍性基質を形成しているのかについては十分解明されていない。今回著者は、ヒトIX型コラーゲンに対する特異抗体を作成し、これを用いて軟骨性腫瘍における型別コラーゲンの分布の特性について調べた。

材料および方法

I. 型別コラーゲンの調整

ヒト胎児および小児の肋軟骨(湿重量約50g)を、軟骨膜を除去した後に、脱脂済みカミソリ刃にて細切した。ステンレス製乳鉢および乳棒で液体窒素を加えながら粉碎後、血液成分を除くために、中性蛋白分解酵素阻害剤(ethylenediamine tetraacetic acid, EDTA 5mM; N-ethylmaleimide, NEM 2mM; phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF 1mM)を含む50mM Tris-HCl (pH7.5)緩衝液を用いて4°Cで洗浄した。以後の実験操作は、ことわりがないかぎり、すべて4°Cで行った。次にプロテオグリカン等の非コラーゲン蛋白質を除去するために、中性蛋白分解酵素阻害剤を含む1M NaCl/50mM Tris-HCl (pH7.5)緩衝液を用いて4回洗浄した。遠心して上清を除き、沈澱を500mlの0.5M 酢酸に懸濁し、ペプシン(Boeinger Mannheim Co., Mannheim, Germany)を1mg/mlの濃度になるように加え、24時間後に抽出した。抽出後、遠心(10000g, 1時間)により、上清を分離した。この抽出操作を2回行い、計11の抽出上清を得た。上清のペプシンを不活性化するために、6Nの水酸化ナトリウムを加え上清のpHを8とし、24時間放置後、遠心(10000g, 1時間)により、不活性化したペプシンを除いた。この上清をII型、XI型およびIX型コラーゲン調整の出発材料とし、Reeseらの方法¹³⁾を一部改良した方法で、それぞれ単離した(図1)。型別コラーゲ

ン調整の各段階において、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)により¹²⁾各型コラーゲンの同定を行った。単離した各型コラーゲンについては、細菌性コラーゲナーゼフォームIII(Advance Biofactures Co., New York, USA)で消化した後、SDS-PAGEにより解析し、非コラーゲン蛋白質の有無を確認した¹³⁾。

II. ヒトIX型コラーゲンの精製

ペプシン処理で抽出されたコラーゲン溶液を2.0M NaCl/0.5M 酢酸溶液に対して透析した場合に生じる沈澱は、大部分がIX型コラーゲンであるが、わずかにXI型コラーゲンが混入していた。この部分精製状態のIX型コラーゲンを完全に精製するために、Bio-Gel 5m (Bio-Rad Laboratories, Richmond, USA)を用いたアガロースカラムクロマトグラフィを行った。すなわち、2.0M NaCl/0.5M 酢酸分画を1M CaCl₂/50mM Tris-HCl (pH7.5)/2mM NEM/0.02NaN緩衝液に透析し42°Cで30分間変性させた後、同液で平衡化したBio-Gel 5m アガロースカラムクロマトグラフィ(1.5×90cm)に供した。

III. 抗ヒトIX型コラーゲン抗体の作製

ゲルクロマトグラフィにて精製したヒトIX型コラーゲン(heavy molecular weight fragments, HMW)をSprague-Dawley (SD) ラット(7週齢, オス)に免疫し、抗血清を得た。初回感作量および追加感作量とともに、250μgとし、合計4回感作した。抗血清は、ヒトII型コラーゲンを結合させた活性化CH-Sepharose 4B (Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden)カラムを用いて交叉反応する成分を除いた後に、diethylaminoethyl (DEAE)セルロースクロマトグラフィを行い、アルブミンなどの血清主要蛋白を除去した。精製した抗ヒトIX型コラーゲン抗体の型特異性は表1に示した条件で、エライザ(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)法による阻害試験¹⁴⁾およびウェスタンブロッティング法¹⁵⁻¹⁷⁾により検定した。なお、エライザ法においては、二次抗体として500倍希釈したalkaline phosphatase (ALP)標識ヤギ抗ラットIgG (Cappel, Cochranville, USA)を用いた。ウェスタンブロッティング法においては、クリアプロット・P膜(アトー, 東京)に転写し、二次抗体として200倍希釈したビオチン化ラビット抗ラットIgG (Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA)を用いた。

IV. 対象

ヒト胎児軟骨(大腿骨軟骨2例; 肋軟骨1例)内軟骨

Table 1. Experimental conditions of ELISA inhibition tests

1. Concentration of antigen coated in well: 10μg/ml
2. Dilution of 1st antibody: ×100
3. Antigen used for inhibition;
10 to 5000ng/ml of each type of collagen
preincubated with 1st antibody for 1 hr at 37°C
4. Dilution of ALP-labeled 2nd antibody: ×500
5. Substrate for enzyme (ALP)
paranitrophenyl phosphate 1 tab./5 ml of diethanolamine buffer

1st antibody, rat anti-human type IX (HMW) collagen antibody; 2nd antibody, rabbit anti-rat IgG

腫 (7例) および軟骨肉腫 (異型度 1, 5例; 異型度 2, 3例; 異型度 3, 2例) を, 組織学的ならびに免疫組織化学的に検討した. (表 2). 組織学的には, 10% 緩衝ホルマリン固定後, パラフィン切片を作製し, ヘマトキシリン・エオジン (hematoxylin and eosin, H.E.) 染色, PAS 染色, アザン染色および鍍銀染色を施した. 軟骨肉腫の異型度分類は, Evans らの方法¹⁸⁾ に従って分類した.

V. 免疫組織化学的検索

上記の症例について, 免疫組織化学的にIX型コラーゲンの局在を検索した. また, 当教室で精製した I 型, II 型, III 型, V 型およびVI型コラーゲンに対する型特異的抗体^{19)~22)} を用いて各型別コラーゲンの分布についても合わせて検討した. 抗IX型コラーゲン抗体および抗II型コラーゲン抗体を用いる免疫染色の場合にはホルマリン固定パラフィン切片を脱パラフィンし, 0.05%プロテアーゼ Type XXIV (Sigma Chemical Co., St Louis, USA) で37°C30分処理後, 0.5%ヒアルロニダーゼ (Sigma Chemical Co.) で37°C 2時間処理した. つぎに, 1%過酸化水素加無水メタノールにて

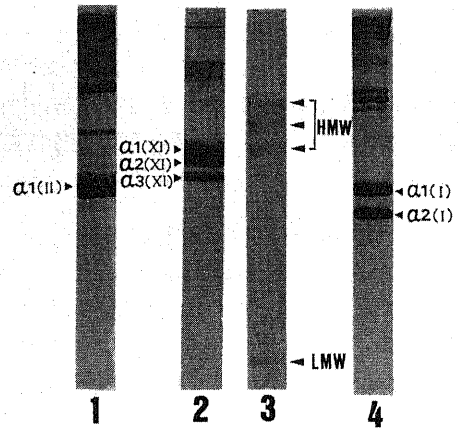


Fig. 2. SDS-PAGE (6% total acrylamide) pattern of types II, XI and IX collagen isolated from the human hyaline cartilage. Lanes 1, 2, 3 and 4 are types II, XI, IX and I collagen respectively. Lanes 1 to 4 are electrophoresed without reduction. Small arrowheads show the electrophoretic positions of α chains of each collagen. Large arrowheads indicate HMW and LMW of type IX collagen.

Table 2. 3 cases of human fetus and 17 cases of cartilaginous tumors

Case	Age	Sex	Location	Histology	
1			Fetus 3 month		
2			Fetus 9 month		
3			Fetus 10 month		
4	31	M	Lt hand phalanx	Enchondroma	G0
5	15	F	Lt hand phalanx	Enchondroma	G0
6	31	M	Rt foot phalanx	Enchondroma	G0
7	17	F	Lt hand metacarpus	Enchondroma	G0
8	5	F	Rt hand phalanx	Enchondroma	G0
9	57	M	Lt humerus	Enchondroma	G0
10	18	F	Rt costa	Enchondroma	G0
11	56	M	Rt tibia	Chondrosarcoma	G1
12	70	M	Rt costa**	Chondrosarcoma	G1
13	48	M	Rt tibia	Chondrosarcoma	G1
14*	46	F	Lt ischium	Chondrosarcoma	G1
15	30	F	Lt femur	Chondrosarcoma	G1
16*	60	F	Rt femur	Chondrosarcoma	G2
17	53	F	Rt femur	Chondrosarcoma	G2
18	65	M	Rt femur	Chondrosarcoma	G2
19	17	F	Lt femur	Chondrosarcoma	G3
20	71	M	Rt crural soft tissue	Chondrosarcoma	G3

M, male; F, female; Lt, left; Rt, right; G, grade

* Ollier's disease

** Specimen obtained recurrent chest wall tumor

30分間反応させて内因性ペルオキシダーゼ活性を阻止した。抗I型、III型、V型、VI型コラーゲン抗体の場合には、プロテアーゼ処理後、直ちに1%過酸化水素加無水メタノールに30分間反応させて内因性ペルオキシダーゼ活性を阻止した。一次抗体として、抗IX型抗体は50倍に希釈し、抗I型、II型、III型、V型およびVI型抗体は、それぞれ40倍、20倍、40倍、20倍、200倍に希釈して使用した。

それぞれの一次抗体を4°Cで一晩反応させた。つぎに冷 phosphate buffered saline (PBS) で10分間、3回洗浄した後、200倍に希釈した二次抗体 (I型、III型、V型およびIX型コラーゲンに対しては、ビオチン化ウサギ抗ラット IgG 抗体を、II型、VI型コラーゲンに対しては、ビオチン化ヤギ抗ウサギ IgG 抗体を用い

た)を30分間反応させて、冷 PBS で10分間3回洗浄した。なおビオチン化抗体は Vector 社の製品を使用した。つぎに、アビジン・ビオチン・コンプレックス (avidin biotin complex, ABC) を30分間反応させた後、冷 PBS で10分間3回洗浄し、ジアミノベンゼン (diaminobentidine, DAB) 反応を行った。DAB 反応後、流水で水洗し、ヘマトキシリンにて核染色を行い、脱水・透徹・封入を施行し、各型別コラーゲンの局在を光学顕微鏡にて検索した。なお、対照として、一次抗体のかわりに正常ラット血清または正常ウサギ血清を反応させ、陽性所見が得られないことを確認した。

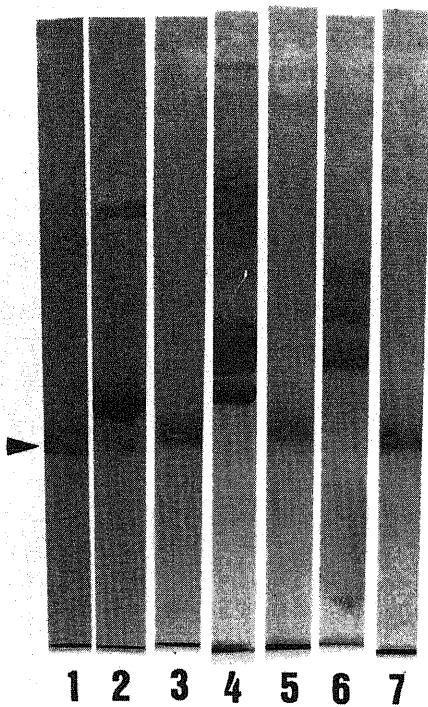


Fig. 3. SDS-PAGE (5% total acrylamide) pattern of types II, XI and IX collagen with or without bacterial collagenase digestion under nonreduced condition. Lane 1, only bacterial collagenase; lanes 2 and 3, type II collagen; lanes 4 and 5, type XI collagen; lanes 6 and 7, type IX collagen. Lanes 2, 4 and 6 are without collagenase digestion, and lanes 3, 5 and 7 are with collagenase digestion. Arrowhead indicates that of bacterial collagenase derived from *Clostridium histolyticum*.

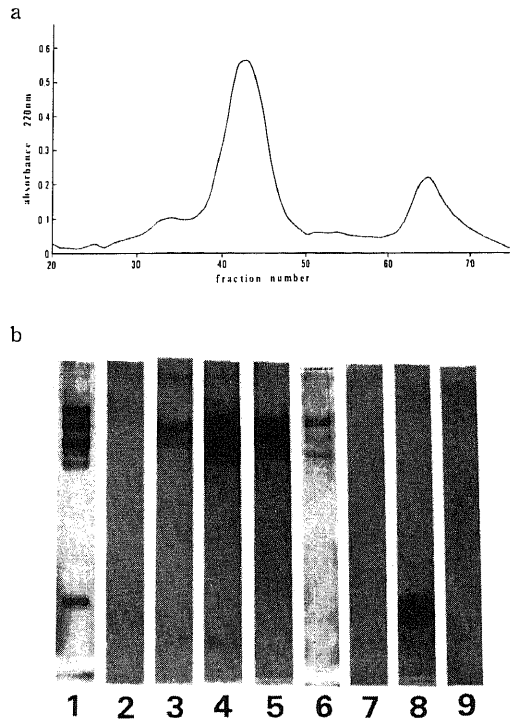


Fig. 4. (a) Gel filtration chromatography on agarose Bio-Gel 5m. Salt-precipitated collagen obtained at 2.0M NaCl/0.5M acetate was dialysed against 1M CaCl₂/50mM tris-HCl (pH7.5)/2mM NEM. This starting sample was denatured for 30 min. at 42°C, applied to the Bio-Gel column (1.5×90cm) and eluted with the same buffer. (b) Samples are subjected to SDS-PAGE (6% total acrylamide) without reduction and the gel is stained with silver nitrate. Lanes 1 to 9 show starting sample, fraction number 25, 34, 43, 46, 50, 60, 65, 72, respectively.

成 績

I. II型, XI型およびIX型コラーゲンの性状

ヒト胎児および小児の肋軟骨から単離されたII型, XI型およびIX型コラーゲンの SDS-PAGE のパターン

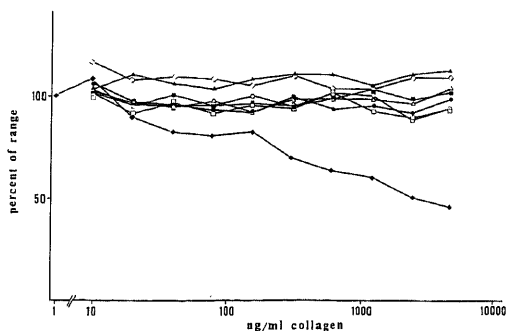


Fig. 5. ELISA inhibition test of the antibody to type IX (HMW) collagen. The experimental conditions are explained in table 1. The ordinate shows % optimal density compared with that of non-inhibited condition, and the abscissa shows the concentration of collagen (antigen) used for inhibition. —○—, type I collagen; —●—, type II collagen; —□—, type III collagen; —■—, type IV collagen; —△—, type V collagen; —▲—, type VI collagen; —◇—, type XI collagen; —◆—, type IX collagen.

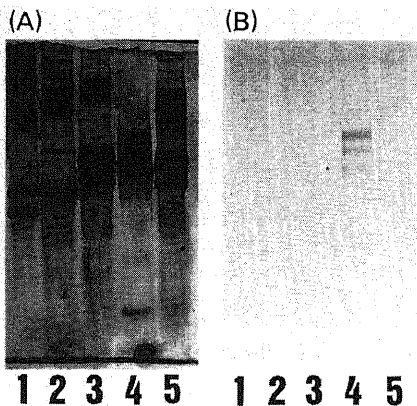


Fig. 6. Western blotting of anti-human type IX collagen (HMW) antibody. (A) Collagens were transferred from 5% SDS-PAGE gel to clear blot membrane and stained with AuroDye. Lane 1, type I collagen; lane 2, type II collagen; lane 3, type V collagen; lane 4, type IX collagen; lane 5, type XI collagen. (B) Western blot analysis of types I, II, V, IX and XI collagen using anti-human type IX collagen antibody.

を 図 2 に 示 した. 各 コラーゲン 分子 の α 鎖 に 注 目 し て み る と, 軟 骨 マトリックス の 主 要 成 分 で あ る II 型 コラーゲン は, 3 本 の $\alpha 1$ (II) 鎖 から な る ホモトリマー で 構 成 さ れ て お り, XI 型 コラーゲ ン は $\alpha 1$ (XI), $\alpha 2$ (XI) お よ び $\alpha 3$ (XI) 鎖 から 構 成 さ れ て い る. IX 型 コラーゲ ン も $\alpha 1$ (IX), $\alpha 2$ (IX) お よ び $\alpha 3$ (IX) 鎖 から 構 成 さ れ て い る が, 分 子 内 に ペプシン 感 受 性 部 分 が 存 在 す る た め, 電 気 泳 動 上 で は HMW (heavy molecular weight fragments) と LMW (light molecular weight fragments) と い う 2 つ の 断 片 と し て 認 め ら れ, こ の 結 果 は 従 来 の 報 告 に 一 致 し て い た.⁴⁾²³⁾²⁴⁾ 各 コラーゲ ン を 細 菌 性 コラゲナーゼ で 消 化 後, SDS-PAGE で 解 析 し た 結 果, い ず れ の コラーゲ ン 画 分 に お い て も, SDS-PAGE で 認 め ら れ た す べ て の バ ン ド が 消 失 し た (図 3). IX 型 コラーゲ ン 画 分 に わ ず か に 混 入 す る XI 型 コラーゲ ン を 除 く た め に, ゲル クロマト グラフィ を 施 行 し た. こ の 結 果 を 図 4 に 示

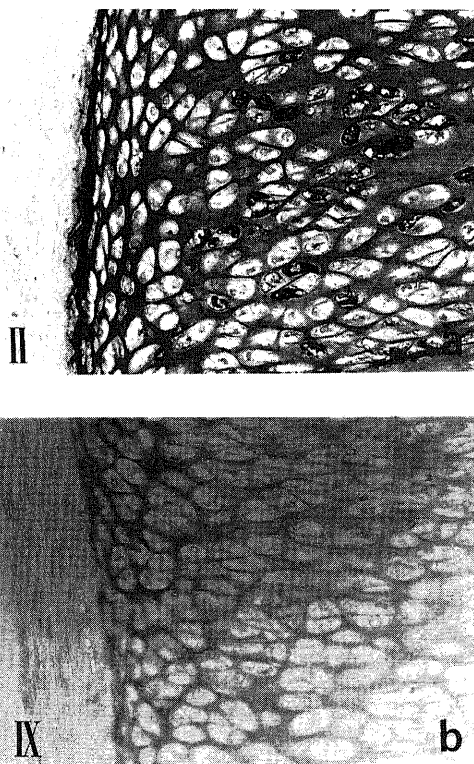


Fig. 7. Light micrographs of human fetal cartilage (case 1) immunostained for type II collagen (a) and type IX collagen (b). Cartilage matrix is stained diffusely with antibodies to type II collagen and type IX collagen. $\times 300$.

す、ゲルクロマトグラフィにより2つのピークが得られた。はじめに HMW が、つぎに LMW が溶出され、2つのピーク間にわずかに XI 型コラーゲンが溶出された。このようにして精製したIX型コラーゲンの HMW を SD ラットに免疫し、抗血清を得た。

II. 抗IX型コラーゲン抗体の特異性

II型アフィニティークロマトグラフィおよび DEAE セルロースクロマトグラフィにより精製した抗IX型コラーゲン抗体に対する、エライザ法による阻害試験の結果を図5に示した。抗IX型コラーゲン抗体の反応は

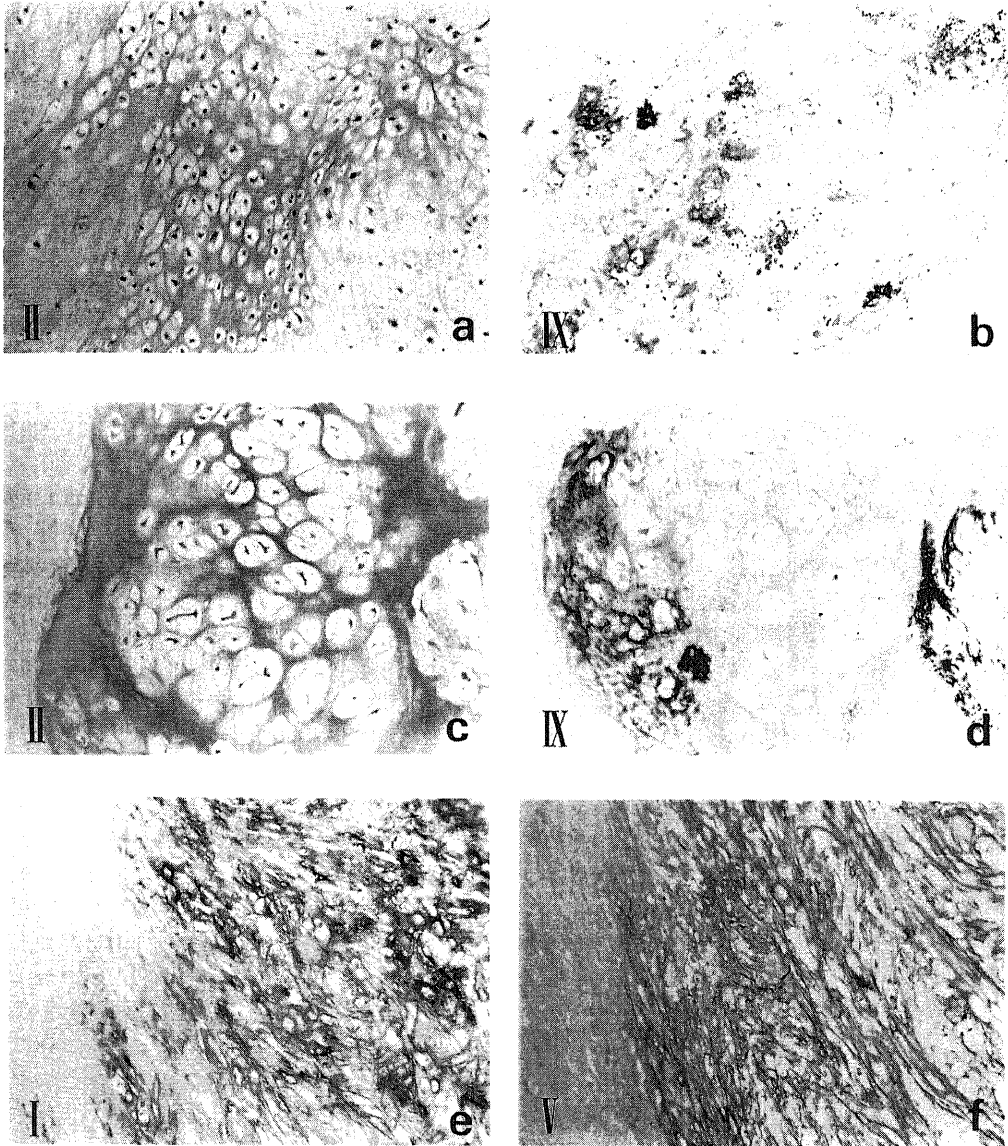


Fig. 8. Light micrographs of enchondroma (case 4) (a, b), chondrosarcoma grade 1 (case 11) (c, d) and chondrosarcoma grade 2 (case 16) (e, f) immunostained for type II collagen (a, c), type IX collagen (b, d) type I collagen (e) and type V collagen (f). Cartilaginous matrices of enchondroma and grade 1 chondrosarcoma are stained diffusely with antibody to type II collagen. Type IX collagen is irregularly localized in the matrices of enchondroma and grade 1 chondrosarcoma. Type I and type V collagen distribute in the matrix of grade 2 chondrosarcoma diffusely. $\times 150$ (a, b, e, f) and $\times 300$ (c, d)

同型コラーゲンにより選択的に抑制され、他の型のコラーゲンでは、5000ng/mlにおいても抑制されなかった。また、ウェスタンブロッティング法においてもIX型コラーゲンのHMWのみバンドが確認された(図6)。

III. 型別コラーゲンの分布

1. 胎児軟骨

II型コラーゲン及びIX型コラーゲンは、軟骨基質に均等にびまん性に分布していた(図7)。II型コラーゲンは、症例1では軟骨細胞内にも同定されたがIX型コラーゲンは、軟骨細胞内には陽性所見は得られなかった。VI型コラーゲンは、軟骨細胞の周囲に主に局在し、領域間基質にもわずかに陽性を示した。I型、III型およびV型コラーゲンは陰性であった。

2. 内軟骨腫

II型コラーゲンは、軟骨基質にびまん性、網状に分布していた(図8a)。これに対してIX型コラーゲンは軟骨基質にびまん性に分布しているものの、顆粒状、線状ないし網状に反応産物が沈着し、とくに軟骨細胞

周囲に強く染色される傾向が見られた(図8b)。また、II型コラーゲンは軟骨細胞内にも一部陽性を示したがIX型コラーゲンは軟骨細胞内には陽性所見は見られなかった。VI型コラーゲンは軟骨細胞の周囲に分布しており、領域間基質部分にも一部斑状にみられ正常軟骨とほぼ同様の所見であった。また大部分の例ではI型、III型およびV型コラーゲン染色は陰性であったが、症例6のみで軟骨基質にI型とV型コラーゲンが一部弱陽性に染まった。

3. 軟骨肉腫

1) 軟骨肉腫異型度1

II型コラーゲンは、軟骨基質にびまん性、網状に分布していた(図8c)。しかし、II型コラーゲン抗体による染色性は必ずしも均一ではなく、一部では斑状に染色された。また、軟骨細胞内にも染まることがあった。これに対してIX型コラーゲンは、軟骨基質に顆粒状、線状ないし網状に分布しており、とくに軟骨細胞周囲に強く染色される傾向や軟骨基質内で不規則に染まることが注目された(図8d)。軟骨細胞内には陽性

Table 3. Composition of collagen types in human fetus and cartilaginous tumors

Case	Grade	Immunoreactivity with type-specific anti-collagen antibodies					
		I	II	III	V	VI	IX
1	Fetus	-	+ ^c	-	-	±	+
2	Fetus	-	+	-	-	+	+
3	Fetus	-	+	-	-	+	+
4	G0	-	+ ^c	-	-	+	+
5	G0	-	+ ^c	-	-	+	+
6	G0	±	+ ^c	-	±	+	+
7	G0	-	+ ^c	-	- ^c	+	+
8	G0	-	+ ^c	-	-	+	+
9	G0	-	+ ^c	-	±	+	+
10	G0	-	+	-	-	±	±
11	G1	±	+ ^c	-	-	+	+
12	G1	-	+ ^c	-	-	+	+
13	G1	±	±	-	±	±	+
14	G1	±	± ^c	-	±	±	+
15	G1	±	+ ^c	-	-	+	+
16	G2	+	+ ^c	+	+	±	+
17	G2	+	+ ^c	±	±	+	+
18	G2	±	+ ^c	-	-	±	± ^c
19	G3	±	±	-	±	±	±
20	G3	±	-	-	-	±	-

+, positive; ±, variably and faintly positive;
-, negative; ^c, positive in the cytoplasm

所見は得られなかった。VI型コラーゲンは、軟骨細胞の周囲に染色されるとともに領域間基質にも弱陽性を示したが、症例14では軟骨細胞周囲に染まる傾向が明確ではなかった。また、I型コラーゲンは症例12を除き全例で軟骨基質内に弱陽性を示し、V型コラーゲンは症例13と14で軟骨基質内に弱陽性となった。III型コラーゲンは陽性所見を認めなかった。

2) 軟骨肉腫異型度 2

II型コラーゲンでは、異型度1の軟骨肉腫とほぼ同じ染色態度を示したが、IX型コラーゲンでは、軟骨基質に対する染色性がやや低下した。症例18では、II型、IX型ともに軟骨細胞内に局在していた。I型、III型およびV型コラーゲンは、軟骨基質内で弱陽性ないし陽性に染まる部位が見られた(図8e, f)。また、VI型コラーゲンは弱陽性ながらびまん性に染まった。

3) 軟骨肉腫異型度 3

II型およびIX型コラーゲンは、軟骨基質に対する染色性が低下あるいは消失していた。また、II型、IX型ともに、軟骨細胞内に陽性所見は見られなかった。これに対して、I型コラーゲンは軟骨基質に弱陽性を示した。症例19では、V型コラーゲンも軟骨基質に弱陽性を示した。VI型コラーゲンはびまん性に弱陽性を示した。III型コラーゲンの陽性所見は得られなかった。

表3は、以上の胎児軟骨および軟骨性腫瘍における型別コラーゲンの分布をまとめたものである。

考 察

コラーゲンは細胞外マトリックスの主な成分で、皮膚や腱の67nm周期の特徴的な縞模様を示す線維として古くからよく知られている^{25,26)}。コラーゲンには遺伝子の異なる多くの種類が存在し、現在までに13種類の分子種(I型~XIII型)が同定されている^{27~32)}。このうち軟骨には、少なくともII型、VI型、IX型、X型、XI型のコラーゲンが含まれている^{33,34)}。軟骨コラーゲンの主要成分であるII型、IX型およびXI型コラーゲンは、ほぼ8:1:1の割合で存在し³⁴⁾、プロテオグリカンとともに直径10~80nmの細線維を形成している。軟骨のコラーゲン細線維は、II型コラーゲンとXI型コラーゲンで形成される線維のまわりをIX型コラーゲンが周期的に枝を出すように配列し、コラーゲン細線維の太さを調節していると考えられている^{32,33)}。X型コラーゲンは、1982年にGibsonら³⁴⁾、Schmidら^{35,36)}により同定されたコラーゲンで、分子量が59Kの $\alpha 1(X)$ 鎖のホモトリマーで構成されている。Gibsonら³⁴⁾は軟骨細胞の遺伝子発現に対する細胞外マトリックスの影響をみるために、18日目のニワトリ

胚胸骨の軟骨細胞をI型コラーゲングル内で培養すると、II型ともI型とも異なる59Kのコラーゲンの合成が活性化されることを見いだした。これはペプシン消化で45Kとなり、そのcyanogen bromide(CNBr)ペプチドの型も既知のコラーゲンと異なることから、Gコラーゲンと名づけられた³⁴⁾。一方、Schmidら^{35,36)}は12日目のニワトリ胚の軟骨からこれと同様のコラーゲンを見だし、その合成は軟骨に石灰化が起こる軟骨細胞の肥大化部位で活発であることを報告した。後にこのコラーゲンは、X型コラーゲンと命名され、このコラーゲンに対する抗体を用いた研究でも、X型コラーゲンのこの部位への局在が明らかとなり、休止軟骨細胞、増殖軟骨細胞、骨などには発現しないことがわかった^{37~40)}。すなわち、X型コラーゲンは軟骨が骨に移行する過程においてある時期にのみ発現するコラーゲンであり、軟骨内骨化において重要な役割を担っていると考えられている。

軟骨コラーゲンのもう一つの主要な成分であるXI型コラーゲンは、1979年にBurgesonらがヒト関節軟骨より分離精製し、最初は 1α 、 2α 、 3α と呼ばれた⁴¹⁾。その後の研究でこれらの3本の α 鎖は、一つのトリプルヘリックス分子を作っていると考えられる結果が得られ、 $\alpha 1(XI)$ 、 $\alpha 2(XH)$ 、 $\alpha 3(XI)$ と名称が付けられた²⁹⁾。 $\alpha 1(XI)$ 鎖と $\alpha 2(XI)$ 鎖が独立した遺伝子産物であるということは、CNBrペプチドの型や得られた遺伝子より明らかとなったが、 $\alpha 3(XI)$ 鎖に関してはCNBrペプチドの型が、II型コラーゲンの $\alpha 1(II)$ 鎖と似ているために、その独立性に関してはまだ完全には確定されていない^{42,43)}。

今回著者が精製し、その分布について検討したIX型コラーゲンについては、1980年、Shimokomakiらにより、II型と異なる新しいコラーゲンMが軟骨中に存在することを報告したこと⁴⁴⁾に始まる。その後数グループから次々と独自に、C-PS1,2⁴⁵⁾；HMW, L-MW⁴⁶⁾；M1, M2⁴⁶⁾；H, J⁴⁷⁾コラーゲンと名づけられたコラーゲンペプチドが、それぞれ異なった方法で抽出された。これらの報告は、いずれもペプシン消化によってコラーゲンを抽出しており、したがって、得られた断片が一つの分子から由来したのか否かの結論が得られなかった。1984年、Ninomiyaら⁴⁸⁾は、軟骨特異的蛋白質のcDNAを作製する途中でII型コラーゲンとは異なるコラーゲン構造を含んだある種のcDNAを得た。3200塩基対の長さのcDNA塩基配列から予想した蛋白質の構造と、上記のペプチドの構造とが同じものであることが判明し、IX型コラーゲンの存在が初めて明らかとなった。一方、1983年、軟骨から得られたブ

ロテオグリカンのうちのひとつのコア蛋白質 (PG-Lt) が、コラーゲン様構造をもつという報告が Noro ら⁴⁸⁾により発表され、後にこのコア蛋白質がIX型コラーゲンと同一であるという事実が Vaughan ら⁴⁹⁾によって確かめられ、IX型コラーゲンの存在が確定した。

ヒトのIX型コラーゲンは α 1 (IX), α 2 (IX), α 3 (IX) の3本の異なる α 鎖より構成され¹¹²⁴⁾、SDS-PAGEによる分子量は還元後で α 1 (IX)が84K, α 2 (IX)が115K, α 3 (IX)が72Kで、全体の分子量は約270Kである²³⁾。IX型コラーゲンの α 1鎖はN末端に25Kの非コラーゲン性ペプチド (NC4) が結合し、 α 2鎖のNC3にはグリコサミノグリカン鎖 (コンドロイチン硫酸あるいはデルマトン硫酸) が結合している^{50)~52)}。さらに、II型コラーゲンとの間にリジン残基由来の架橋共有結合を形成し、軟骨のコラーゲン細線維を構成している⁵³⁾⁵⁴⁾。IX型コラーゲンが形成する三重らせん構造の中に2箇所の非コラーゲン性ドメイン (NC2, NC3) が存在し、この部位がペプシン消化され、今回の精製で見られたように HMW および LMW として抽出されてくるものである。HMW と LMW をゲルクロマトグラフィ (Bio-Gel A-5m) によって HMW のみに精製し、これを SD ラットに免疫して抗IX型コラーゲン抗体を作製したが、この抗体は、ヒトII型コラーゲンとも交叉反応する可能性が高い。そこで、さらにヒトII型コラーゲン充填のアフィニティーカラムにかけてII型コラーゲンと交叉する抗体を吸着させ除去することによって、IX型コラーゲン (HMW) と特異的に反応する抗体を得ることができた。この抗体はウェスタンブロッティング法で HMW のバンドのみを認識するとともに胎児正常軟骨パラフィン切片上で従来の報告⁷⁾⁵⁵⁾⁵⁶⁾と同様の反応を示した。本研究ではこのようにして作製した抗IX型コラーゲンポリクローナル抗体を用いて軟骨性腫瘍におけるIX型コラーゲンの分布特性を調べたものである。免疫染色に際しては、IX型コラーゲンの抗原決定基 (エピトープ) が多量のプロテオグリカンにより覆われ、染色性が失われる⁵⁵⁾という事実が確認されているので、前処置としてヒアルロニダーゼ消化を十分行った上で免疫染色を行い良好な結果を得た。他の型別コラーゲン (I型, II型, III型, V型, VI型) を併用して、ABC法によりその局在を調べてみると、胎児軟骨では、従来の報告⁷⁾⁵⁵⁾⁵⁶⁾と同様にII型コラーゲン、IX型コラーゲンともに、軟骨基質に均等にびまん性に分布していた。一方、内軟骨腫と軟骨肉腫異型度1では、II型コラーゲンは、軟骨基質にびまん性で網状に分布しているのに対し、IX型コラーゲンは軟骨基質に

顆粒状、線状ないし網状に染色される特徴を有していた。従って、IX型コラーゲンの不均等不規則な免疫染色性が、腫瘍性軟骨基質の初期変化と考えられる。軟骨肉腫異型度2, 異型度3と異型度が高くなるにつれて軟骨型コラーゲンであるII型とIX型コラーゲンの免疫染色性は低下または消失した。これに代って非軟骨性間質型コラーゲン (I型, III型, V型) が沈着出現することが注目された。おそらく腫瘍細胞は、組織学的異型度の増加とともに軟骨細胞としての性質がうすれ、多様なコラーゲン分子種を発現するようになると思われる。これまでに軟骨肉腫のコラーゲンの分布特性については若干報告されている。まず、Remberg ら⁵⁷⁾は、2例の軟骨腫と6例の軟骨肉腫について免疫組織化学的に調べた結果、II型コラーゲンは、軟骨腫と高分化型軟骨肉腫の場合にのみ染色性が見られるが、低分化型軟骨肉腫では陰性であると報告している。間質型コラーゲンの出現については著者の成績と異なり、軟骨肉腫全例においてI型コラーゲンが陰性、III型コラーゲンが陽性であったと述べている。しかし、最近教室の Ueda ら¹⁰⁾は内軟骨腫6例と軟骨肉腫9例について、抗ヒト型別コラーゲン (I型, II型, III型, V型, VI型) ポリクローナル抗体を用いて精査してみると、内軟骨腫のコラーゲン分布は正常軟骨と非常に類似しているが、軟骨肉腫では、組織学的異型度が増加するにつれて非軟骨型間質型コラーゲン (I型, III型, V型) が出現し、逆にII型コラーゲンは減少するという結果を報告した。著者の成績は Ueda ら¹⁰⁾の所見と同様であったが、IX型コラーゲンの局在を加えて軟骨性腫瘍の基質を考えると、腫瘍性軟骨においてはIX型コラーゲンの沈着異常がII型コラーゲンのそれに先立っていることを指摘できるように思われる。免疫染色性の異常がコラーゲンの質的または量的変化をどの程度反映するかについては推測の域を出ないが、IX型コラーゲンの α 2鎖にはグリコサミノグリカンが結合していることからプロテオグリカンの変化と密接に関連している異常病変を表しているのかも知れない。Buckwalter⁵⁸⁾は8例のヒト軟骨肉腫 (異型度1, 1例; 異型度2, 6例; 異型度3, 1例) のプロテオグリカンについて電子顕微鏡を使って調べ、ウシ正常鼻中隔軟骨と比較した。その結果、軟骨肉腫によって産生されるプロテオグリカンの基本構造は正常軟骨と同じであるが、プロテオグリカンのコア蛋白は正常軟骨に比べて長さが短いと報告している。また、大部分の例で軟骨肉腫のプロテオグリカンにおけるコンドロイチン硫酸の側鎖は、正常軟骨に比べて長いと述べている。症例数が限られているので軟骨肉腫の異型度

との関連については記載されていないが、軟骨基質が正常軟骨と軟骨性腫瘍において質的に異なるという可能性を示唆した点は重要と思われる。また、Palら⁹⁾は、6例のヒト軟骨肉腫からプロテオグリカン抽出し生化学的に調べ、正常関節軟骨と比較した。その結果、高分化型軟骨肉腫では、ケラタン硫酸の量と側鎖の長さは正常小児の関節軟骨とほぼ同じであるが、より悪性度の高い軟骨肉腫では、ケラタン硫酸の量も側鎖の長さも減少すると報告しており、ケラタン硫酸の量と側鎖の長さは軟骨肉腫の組織学的異型度と関連があると報じている。また、Herwigら⁵⁸⁾は、4例のヒト軟骨肉腫からプロテオグリカンとグリコサミノグリカンを抽出し生化学的に調べた結果、異型度の増加とともにプロテオグリカンサブユニットの分子量とグリコサミノグリカンの量が減少し、腫瘍性軟骨が質的にも量的にも異なると報告した。しかし、Palら⁹⁾の報告とは異なり、ケラタン硫酸の量に異型度との相関性は見られなかったと報告している。一方、Thonarら⁵⁹⁾は、軟骨肉腫は、正常軟骨に含まれるすべてのグリコサミノグリカンをもっており、ケラタン硫酸の大きさは正常軟骨と同じであると報告している。従って、軟骨性腫瘍においてはその基質を構成するコラーゲンやプロテオグリカンに質的ならびに量的な多様性がもたらされるものと解釈されよう。著者の指摘した内軟骨腫におけるII型コラーゲンとIX型コラーゲンの局在の差異が質的なものかまたは量的にIX型コラーゲンがもともと少ないことに由来するかについては分からない。つまり、腫瘍においてはII型コラーゲン線維上にIX型コラーゲンが規則的に配列しているのか否かについては免疫電顕で確かめる必要がある。

軟骨肉腫は、良性の内軟骨腫ときわめてよく似た組織像を取る^{60)~62)}。また、異型度1の軟骨肉腫においては、しばしば内軟骨腫との鑑別に苦慮し、臨床経過や画像所見なくしては診断できない場合が多い。本邦における軟骨肉腫の5年生存率は1972年の登録例より追跡を行った調査では約63%である⁶³⁾。またEvansら¹⁸⁾は71例の軟骨肉腫で5年生存率を調べ、軟骨肉腫異型度1が90%、異型度2が81%、異型度3が43%と報告している。異型度1あるいは異型度2の軟骨肉腫を生検時に内軟骨腫と鑑別ができず腫瘍搔爬術のみ施行された場合には、軟骨肉腫は局所再発し、予後不良となる。このように、軟骨肉腫においては、化学療法や放射線療法があまり有効でないこともあって、初期に適切な腫瘍摘出手術を行なうことがきわめて重要である。本研究においてIX型コラーゲンの分布特性から、軟骨性腫瘍の良悪性を考えると次の2点が強調され

る。第一は内軟骨腫ではII型コラーゲンがびまん性均等に染まり、IX型コラーゲンが不規則に分布し、非軟骨性間質型コラーゲン(I型、III型、V型)は胎児軟骨と同様に陰性であるということ。第二には、既にUedaら¹⁰⁾が報告しているように軟骨肉腫では組織学的異型度の増加とともに非軟骨性間質型コラーゲンが染め出され、軟骨型コラーゲンであるII型とIX型コラーゲンの染色性が低下することである。このことは基質成分の構成異常が、細胞学的異型度や組織学的異型度とともに悪性度の指標として有用であることを意味する。このように腫瘍細胞が産生する基質成分に着目して良悪性の補助判定を行なうことは、XI型コラーゲンやX型コラーゲン、プロテオグリカンのコア蛋白の分布特性を加えることによりさらに役立つものと考えられる。

結 論

胎児軟骨、内軟骨腫および軟骨肉腫における型別コラーゲン(I型、II型、III型、V型、VI型およびIX型)の分布を、型特異的抗コラーゲン抗体を用いて免疫組織化学的に観察し、その分布特性について検討した。

1. ヒト胎児および小児の肋軟骨からペプシン消化にてコラーゲンを抽出し、塩析法およびゲルクロマトグラフィによりIX型コラーゲンを精製した。コラーゲンの純度は、SDS-PAGEと細菌性コラゲナーゼ消化試験を併用して確認した。

2. IX型コラーゲンをSDラットに免疫して得られた抗血清から、アフィニティクロマトグラフィでIX型コラーゲンに特異的な抗体を精製した。エライザ法による阻害試験およびウェスタンブロッティング法により抗体特異性を検定した。

3. 胎児軟骨では、II型およびIX型コラーゲンは軟骨基質に均等にびまん性に分布していた。VI型コラーゲンは軟骨細胞の周囲に局在していた。I型、III型およびV型コラーゲンは陰性であった。

4. 内軟骨腫では、I型、II型、III型、V型、VI型コラーゲンは胎児軟骨と同様の所見であったが、IX型コラーゲンが不規則な分布を示すという点で胎児軟骨との間に違いがみられた。

5. 軟骨肉腫では、組織学的異型度が増加するにつれて間質型コラーゲン(I型、III型、V型)が沈着し、VI型コラーゲンがびまん化し、IX型コラーゲンがII型コラーゲンとともに減弱化した。

以上の所見から、軟骨性腫瘍ではII型コラーゲンの免疫染色性が減弱化すると同時にIX型コラーゲンが不

均等に分布するようになり、また、組織学的悪性度の増加とともに非軟骨性間質型コラーゲン分子種が発現されるものと推測された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました中西功教授に深く感謝の意を表します。また、貴重な材料を提供していただきました整形外科富田勝郎教授および金沢大学医学部附属病院病理部長松原藤継教授に深謝致します。本研究遂行に際して御助言、御協力をいただきました金沢大学医療技術短期大学部岡田保典助教授および第一病理学教室の各位に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) **Ninomiya, Y. & Olsen, B. R.:** Synthesis and characterization of cDNA encoding a cartilage-specific short collagen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 3014-3018 (1984).
- 2) **van der Rest, M., Mayne, R., Ninomiya, Y., Seidah, N. G., Chretien, M. & Olsen, B. R.:** The structure of type IX collagen. *J. Biol. Chem.*, **260**, 220-225 (1985).
- 3) **Mendler, M., Eich-Bender, S. G., Vaughan, L., Winterhalter, K. H. & Bruckner, P.:** Cartilage contains mixed fibrils of collagen types II, IX, and XI. *J. Cell Biol.*, **108**, 191-197 (1989).
- 4) **Vaughan, L., Mendler, M., Huber, S., Bruckner, P., Winterhalter, K. H., Irwin, M. I. & Mayne, R.:** D-periodic distribution of collagen type IX along cartilage fibrils. *J. Cell Biol.*, **106**, 991-997 (1988).
- 5) **Svoboda, K. K., Nishimura, I., Sugrue, S. P., Ninomiya, Y. & Olsen, B. R.:** Embryonic chicken cornea and cartilage synthesize type IX collagen molecules with different amino-terminal domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 7496-7500 (1988).
- 6) **Vasios, G., Nishimura, I., Konomi, H., van der Rest, M., Ninomiya, Y. & Olsen, B. R.:** Cartilage type IX collagen-proteoglycan contains a large amino-terminal globular domain encoded by multiple exons. *J. Biol. Chem.*, **263**, 2324-2329 (1988).
- 7) **Muller-Glauser, W., Humbel, B., Glatt, M., Strauli, P., Winterhalter, K. H. & Bruckner, P.:** On the role of type IX collagen in the extracellular matrix of cartilage: Type IX collagen is localized to intersections of collagen fibrils. *J. Cell Biol.*, **102**, 1931-1939 (1986).
- 8) **Buckwalter, J. A.:** The structure of human chondrosarcoma proteoglycans. *J. Bone Joint Surg.*, **65A**, 958-974 (1983).
- 9) **Pal, S., Strider, W., Margolis, R., Gallo, G. & Lee-Huang, S.:** Isolation and characterization of proteoglycans from human chondrosarcomas. *J. Biol. Chem.*, **253**, 1279-1289 (1978).
- 10) **Ueda, Y., Oda, Y., Tsuchiya, H., Tomita, K. & Nakanishi, I.:** Immunohistological study on collagenous proteins of benign and malignant human cartilaginous tumours of bone. *Virchows Arch. A Pathol. Anat.*, **417**, 291-297 (1990).
- 11) **Reese, C. A. & Mayne, R.:** Minor collagens of chicken hyaline cartilage. *Biochemistry*, **20**, 5443-5448 (1981).
- 12) **Laemmli, U. K.:** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685 (1970).
- 13) **Hata, R., Ninomiya, Y., Nagai, Y. & Tsukada, Y.:** Biosynthesis of interstitial types of collagen by albumin-producing rat liver parenchymal cell (hepatocyte) clones in culture. *Biochemistry*, **19**, 169-176 (1980).
- 14) **Rennard S. I., Berg, R., Martin, G. R., Foidart, J. M. & Robey, P. G.:** Enzyme-linked immunoassay (ELISA) for connective tissue components. *Anal. Biochem.*, **104**, 205-214 (1980).
- 15) **Harper, D. R., Liu, K. M. & Kangro, H. O.:** The effect of staining on the immunoreactivity of nitrocellulose bound proteins. *Anal. Biochem.*, **157**, 270-274 (1986).
- 16) **Svoboda, M., Meuris, S., Robyn, C. & Christophe, J.:** Rapid electrotransfer of proteins from polyacrylamide gel to nitrocellulose membrane using surface-conductive glass as anode. *Anal. Biochem.*, **151**, 16-23 (1985).
- 17) **Burnette, W. N.:** "Western Blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.*, **112**, 195-203 (1981).
- 18) **Evans, H. L., Ayala, A. G. & Romsdahl, M. M.:** Prognostic factors in chondrosarcoma of

- bone. A clinicopathologic analysis with emphasis on histologic grading. *Cancer*, **40**, 818-831 (1977).
- 19) 源 利成: 乳癌の間質における型別コラーゲン (I型, III型, IV型およびV型) およびラミニンの局在. *十全医会誌*, **6**, 975-990 (1986).
- 20) Minamoto, T., Ooi, A., Okada, Y., Mai, M., Nagai, Y. & Nakanishi, I.: Desmoplastic reaction of gastric carcinoma: A light-and electron-microscopic immunohistochemical analysis using collagen type-specific antibodies. *Hum. Pathol.*, **19**, 815-821 (1988).
- 21) Oda, Y., Kawahara, E., Minamoto, T., Ueda, Y., Ikeda, K., Nagai, Y. & Nakanishi, I.: Immunohistochemical studies on the tissue localization of collagen types I, III, IV, V and VI in schwannomas. Correlation with ultrastructural features of the extracellular matrix. *Virchows Arch. B Cell Pathol.*, **56**, 153-163 (1988).
- 22) Ueda, Y. & Nakanishi, I.: Immunohistochemical and biochemical studies on the collagenous proteins of human osteosarcomas. *Virchows Arch. B Cell Pathol.*, **58**, 79-88 (1989).
- 23) Bruckner, P., Mendler, M., Steinmann, B., Huber, S. & Winterhalter, K. H.: The structure of human collagen type IX and its organization in fetal and infant cartilage fibrils. *J. Biol. Chem.*, **263**, 16911-16917 (1988).
- 24) Bruckner, P., Mayne, R. & Tuderman, L.: p-HMW-collagen, a minor collagen obtained from chick embryo cartilage without proteolytic treatment of the tissue. *Eur. J. Biochem.*, **136**, 333-339 (1983).
- 25) 澤田 元, 許斐博史: 細胞外基質タンパク質, コラーゲン. *生体の化学*, **41**, 254-260 (1990).
- 26) 畑隆一郎: コラーゲン, その機能と代謝. *蛋白質核酸酵素*, **31**, 29-52 (1986).
- 27) Miller, E. J.: Recent information on the chemistry of the collagens. *In*: Proceedings of 2nd international conference on the biochemistry and biology of mineralized tissues, p80-93, Ebsco Media, Birmingham, Alabama, 1985.
- 28) Lu Valle, P., Ninomiya, Y., Rosenblum, N. D. & Olsen, B. R.: The type X collagen gene. Intron sequences split the 5'-untranslated region and separate the coding regions for the non-collagenous amino-terminal and triple-helical domains. *J. Biol. Chem.*, **263**, 18378-18385 (1988).
- 29) Morris, N. P. & Bachinger, H. P.: Type XI collagen is a heterotrimer with the composition (1 α , 2 α , 3 α) retaining non-triple-helical domains. *J. Biol. Chem.*, **262**, 11345-11350 (1987).
- 30) Gordon, M. K., Gerecke, D. R. & Olsen, B. R.: Type XII collagen: distinct extracellular matrix component discovered by cDNA cloning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 6040-6044 (1987).
- 31) Dublet, B. & van der Rest, M.: Type XII collagen is expressed in embryonic chick tendons. Isolation of pepsin-derived fragments. *J. Biol. Chem.*, **262**, 17724-17727 (1987).
- 32) Sandberg, M., Tamminen, M., Hirvonen, H., Vuorio, E. & Pihlajaniemi, T.: Expression of mRNAs coding for the α 1 chain of type XIII collagen in human fetal tissues: Comparison with expression of mRNAs for collagen types I, II, and III. *J. Cell Biol.*, **109**, 1371-1379 (1989).
- 33) Ayad, S., Marriott, A., Morgan, K. & Grant, M. E.: Bovine cartilage types VI and IX collagens. Characterization of their forms in vivo. *Biochem. J.*, **262**, 753-761 (1989).
- 34) Gibson, G. J., Schor, S. L. & Grant, M. E.: Effects of matrix macromolecules on chondrocyte gene expression: Synthesis of a low molecular weight collagen species by cells cultured within collagen gels. *J. Cell. Biol.*, **93**, 767-774 (1982).
- 35) Schmid, T. M. & Conrad, H. E.: A unique low molecular weight collagen secreted by cultured chick embryo chondrocytes. *J. Biol. Chem.*, **257**, 12444-12450 (1982).
- 36) Schmid, T. M. & Conrad, H. E.: Metabolism of low molecular weight collagen by chondrocytes obtained from histologically distinct zones of the chick embryo tibiotarsus. *J. Biol. Chem.*, **257**, 12451-12457 (1982).
- 37) Poole, A. R. & Pidoux, I.: Immunoelectron microscopic studies of type X collagen in endochondral ossification. *J. Cell Biol.*, **109**, 2547-2554 (1989).
- 38) Summers, T. A., Irwin, M. H., Mayne, R. & Balian, G.: Monoclonal antibodies to type X collagen. Biosynthetic studies using an antibody to the amino-terminal domain. *J. Biol. Chem.*, **263**,

581-587 (1988).

39) **Schmid, T. M. & Linsenmayer, T. F.:** Immunohistochemical localization of short chain cartilage collagen (Type X) in avian tissues. *J. Cell Biol.*, **100**, 598-605 (1985).

40) **Schmid, T. M. & Linsenmayer, T. F.:** Developmental acquisition of type X collagen in the embryonic chick tibiotarsus. *Dev. Biol.*, **107**, 373-381 (1985).

41) **Burgeson, R. E. & Hollister, D. W.:** Collagen heterogeneity in human cartilage: Identification of several new collagen chains. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **87**, 1124-1131 (1979).

42) **Eyre, D. R., Wu, J. & Wolley, D. E.:** All three chains of $1\alpha 2\alpha 3\alpha$ collagen from hyaline cartilage resist human collagenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **118**, 724-729 (1984).

43) **Swoboda, B., Holmodahl, R., Stoß, H. & von der Mark, K.:** Cellular heterogeneity in cultured chondrocytes identified by antibodies specific for $\alpha 2$ (XI) collagen chains. *J. Cell Biol.*, **109**, 1363-1369 (1989).

44) **Shimokomaki, M., Duance, V. C. & Bailey, A. J.:** Identification of a new disulphide bonded collagen from cartilage. *FEBS Lett.*, **121**, 51-54 (1980).

45) **Ayad, S., Abedin, M. Z., Grundy, S. M. & Weiss, J. B.:** Isolation and characterization of an unusual collagen from hyaline cartilage and intervertebral disc. *FEBS Lett.*, **123**, 195-199 (1981).

46) **von der Mark, K., van Menxel, M. & Wiedemann, H.:** Isolation and characterization of new collagens from chick cartilage. *Eur. J. Biochem.*, **124**, 57-62 (1982).

47) **Gibson, G. J., Kielty, C. M., Garner, C., Schor, S. L. & Grant M. E.:** Identification and partial characterization of three low-molecular-weight collagenous polypeptides synthesized by chondrocytes cultured within collagen gels in the absence and in the presence of fibronectin. *Biochem. J.*, **211**, 417-426 (1983).

48) **Noro, A., Kimata, K., Oike, Y., Shinomura, T., Maeda, N., Yano, S., Takanashi, N. & Suzuki, S.:** Isolation and characterization of a third proteoglycan (PG-Lt) from chick embryo

cartilage which contains disulfide-bonded collagenous polypeptide. *J. Biol. Chem.*, **258**, 9323-9331 (1983).

49) **Vaughan, L., Winterhalter, K. H. & Bruckner, P.:** Proteoglycan Lt from chicken embryo sternum identified as type IX collagen. *J. Biol. Chem.*, **260**, 4758-4763 (1985).

50) **Konomi, H., Seyer, J. M., Ninomiya, Y. & Olsen, B. R.:** Peptide-specific antibodies identify the $\alpha 2$ chain as the proteoglycan subunit of type IX collagen. *J. Biol. Chem.*, **261**, 6742-6746 (1986).

51) **Bruckner, P., Vaughan, L. & Winterhalter, K. H.:** Type IX collagen from sternal cartilage of chicken embryo contains covalently bound glycosaminoglycans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 2608-2612 (1985).

52) **Huber, S., Winterhalter, K. H. & Vaughan, L.:** Isolation and sequence analysis of glycosaminoglycan attachment site of type IX collagen. *J. Biol. Chem.*, **263**, 752-756 (1988).

53) **Scott, J. E.:** Review article. Proteoglycan-fibrillar collagen interactions. *Biochem. J.*, **252**, 313-323 (1988).

54) **van der Rest, M. & Mayne, R.:** Type IX collagen proteoglycan from cartilage is covalently cross-linked to type II collagen. *J. Biol. Chem.*, **263**, 1615-1618 (1988).

55) **Vilamitjana, J., Barge, A., Julliard, A. K., Herbage, D., Baltz, T., Garrone, R. & Harmand, M. F.:** Problems in the immunolocalization of type IX collagen in fetal calf cartilage using a monoclonal antibody. *Connect. Tissue Res.*, **18**, 277-292 (1989).

56) **Irwin, M. H., Silvers, S. H. & Mayne, R.:** Monoclonal antibody against chicken type IX collagen: Preparation, characterization, and recognition of the intact form of type IX collagen secreted by chondrocytes. *J. Cell Biol.*, **101**, 814-823 (1985).

57) **Remberger, K. & Gay, S.:** Immunohistochemical demonstration of different collagen types in the normal epiphyseal plate and in benign and malignant tumors of bone and cartilage. *Z. Krebsforsch.*, **90**, 95-106 (1977).

58) **Herwig, J., Roessner, A. & Buddecke, E.:** Isolation and characterization of proteoglycans

- and glycosaminoglycans from human chondrosarcoma. *Exp. Mol. Pathol.*, **45**, 118-127 (1986).
- 59) Thonar, E. J.-M. A., Sweet, M. B. E., Immelman, A. R. & Lyons, G.: Structural studies on proteoglycan from human chondrosarcoma. *Arch. Biochem. Biophys.*, **194**, 179-189 (1979).
- 60) O'Neal, L. W. & Ackerman, L. V.: Chondrosarcoma of bone. *Cancer*, **5**, 551-577 (1952).
- 61) Pritchard, D. J., Lunke, R. J., Taylor, W. F., Dahlin, D. C. & Medley, B. E.: Chondrosarcoma: A clinicopathologic and statistical analysis. *Cancer*, **45**, 149-157 (1980).
- 62) Dahlin, D. C. & Henderson, E. D.: Chondrosarcoma, a surgical and pathological problem. Review of 212 cases. *J. Bone Joint Surg.*, **38A**, 1025-1038 (1956).
- 63) Dahlin, D. C. & Salvador, A. H.: Chondrosarcomas of bones of the hands and feet. A study of 30 cases. *Cancer*, **34**, 755-760 (1974).
- 64) Mirra, J. M. & Eckardt, J. J.: Enchondroma versus chondrosarcoma. In J. M. Mirra, P. Picci & R. H. Gold (eds.), *Bone Tumors. Clinical, Radiologic, and Pathologic Correlations*, 1st ed., p476-535, Lea & Febiger, Philadelphia, 1989.
- 65) 骨・軟部腫瘍委員会編: 悪性骨腫瘍取扱い規約. 第2版, 61-62頁, 金原出版, 東京, 1990.

Immunohistochemical Localization of Human Type IX Collagen in Cartilaginous Tumors

Atsuhiko Kawashima, Department of Pathology (I), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med. Soc., **100**, 177—191 (1991)

Key words chondrosarcoma, enchondroma, collagen, immunohistochemistry

Abstract

The distinctive tissue localization of collagen types, particularly of type IX collagen in human cartilaginous tumors (7 cases of enchondroma and 10 cases of chondrosarcoma) was examined immunohistochemically using affinity-purified antibodies against type I, II, III, V, VI and IX collagen, and were compared with human fetal cartilage. In the fetal cartilage matrix, types II and IX collagen were diffusely distributed, and type VI collagen localized pericellularly. Types I, III, and V collagen were not found. The matrices of enchondromas and grade I chondrosarcomas were similar to fetal cartilage except that type IX collagen was irregularly distributed. In chondrosarcomas, types II and IX collagen became decreased and poorly immunostained with increasing grades of malignancy, and instead, non-cartilaginous interstitial collagen (I, III and V) appeared diffusely in the matrix. Type VI collagen was also dispersed in the intercellular area and tended to lose its territorial localization. These findings suggest that the neoplastic cartilage could be characterized initially by an uneven distribution of type IX collagen prior to alteration of type II collagen, and in higher grade chondrosarcomas it is formed by the deposition of interstitial collagens instead of the ordinary collagenous proteins of cartilage matrix. This diverse expression of intercellular components in cartilaginous tumors may be one of indicators for malignancy.