

Immunoblot and Immunohistochemical Analysis of Cell Adhesion Molecule : E-cadherin in Arachnoid villi and Meningiomas

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/2297/8254

クモ膜絨毛と髄膜腫における細胞接着分子—カドヘリン—に関する生化学的，免疫組織化学的研究

金沢大学医学部脳神経外科学講座（主任：山下純宏教授）

東 馬 康 郎

（平成3年1月21日受付）

カドヘリンはカルシウム依存性の細胞接着分子で，組織の形態形成や腫瘍形成において重要な役割を果たすとされている。本研究においては，髄膜腫の発生に際しカドヘリンがどのような役割を果たしているかを明らかにするために，髄膜腫とその発生母地であるクモ膜絨毛について，生化学的ならびに免疫組織化学的な研究を行った。対象は3例のクモ膜絨毛と31例の髄膜腫であり，後者の内訳は合胞細胞型 (syncytial type) が11例，移行型 (transitional type) が12例および線維芽細胞型 fibroblastic type) が8例である。モノクローナル抗体はヒト上皮型カドヘリン (E型カドヘリン) に特異的に反応するHECD-1を用いた。ウエスタンブロッティングでは，クモ膜絨毛および合胞細胞型と移行型の髄膜腫において全例に分子量約124kDのE型カドヘリンが検出されたのに対し，線維芽細胞型では1例も検出されなかった。免疫組織化学的には，クモ膜絨毛ではクモ膜細胞層 (arachnoid cell layer)，集簇部 (cap cell cluster) および中芯部 (central core) のクモ膜細胞にE型カドヘリンの発現がみられたが，線維性被膜 (fibrous capsule) ではみられなかった。一方，髄膜腫においては，合胞細胞型と移行型の合胞体を形成する部分にE型カドヘリンの発現が強くみられたが，移行型の束状配列 (stream) を形成する部分では弱く，線維芽細胞型ではみられなかった。免疫電顕による検索において，クモ膜絨毛ではE型カドヘリンは，隣接するクモ膜細胞間に斑点状に凝集して存在したのに対し，髄膜腫では接着装置を含め細胞間のほぼ全体に分布し，しかもその発現量は増加していた。以上の結果より，カドヘリンの発現様式の違いが髄膜腫の組織学的多様性と密接に関連していること，および腫瘍化に伴いカドヘリンの分布や発現量に変化が生ずることが示唆された。

Key words meningioma, arachnoid villi, cadherin, immunoblotting, immunohistochemistry

髄膜腫は原発性脳腫瘍の約15%をしめる比較的頻度の高い脳腫瘍で¹⁾，クモ膜絨毛やクモ膜を構成するクモ膜細胞を発生母細胞とし²⁾，組織学的に十数種類に分類されている³⁾。単一のクモ膜細胞から発生する髄膜腫がなぜこの様な多彩な組織型を示すかについてはこれまで数多くの研究がなされてきたが，現在なお不明な点が多い。従来の研究では，クモ膜細胞が間質細胞と上皮細胞の両者の性質を持つことが，髄膜腫の組織学的多様性と関連があるとされている⁴⁾⁻⁹⁾。最近，

Yamashima らはヒトのクモ膜絨毛を免疫組織化学的ならびに電顕的に検索した結果，クモ膜絨毛は基本的に4つの部分から構成され，しかも，部位によりクモ膜細胞の形態が異なることから，クモ膜細胞の形態学的多様性が髄膜腫の多彩な組織型と関連しているものと推定した¹⁰⁾⁻¹²⁾。

近年，細胞接着分子に関する研究が進み，これらの分子が秩序正しく細胞を制御し，組織や腫瘍の形成に重要な働きを担うことが明らかにされている。これら

Abbreviations: ABC, avidin biotin peroxidase complex; mAb, monoclonal antibody; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; SDS, sodium dodecyl sulfate; 光顕, 光学顕微鏡; 電顕, 電子顕微鏡

の細胞接着分子はその遺伝子構造, 生化学的特徴からカドヘリンスーパーファミリー¹³⁾, 免疫グロブリンスーパーファミリー¹⁴⁾, インテグリンスーパーファミリー¹⁵⁾⁻¹⁷⁾などに分類されている。カドヘリンは, Takeichi ら¹⁸⁾¹⁹⁾によって同定されたカルシウム依存性の細胞接着分子で, 上皮型 (E型)²⁰⁾, 胎盤型 (P型)²¹⁾, 神経型 (N型)²²⁾ および血管型 (V型)²³⁾²⁴⁾ などいくつかの型に分けられている。カドヘリンは各型における特異性が高く, 細胞の選択結合に際して重要な役割を果たすとされている²⁵⁾。また, 動物胚の形成過程において各型のカドヘリンが変動することにより, 細胞層の分離と結合が制御され組織の構築がなされることや, モノクローナル抗体でカドヘリンの作用を阻害すると正常な細胞構築が障害されることなどから, 動物の組織形成に重要な働きを担っていることが示唆されている²⁶⁾⁻²⁹⁾。

本研究においては, 髄膜腫の組織学的基本型を成す合胞細胞型, 移行型および線維芽細胞型と, その発生母地であるクモ膜絨毛における上皮型 (E型) カドヘリンの発現を比較検討することにより, カドヘリンが髄膜腫の発生や組織学的多様性とどのような関連を持っているかを考察した。

対象および方法

開頭手術により採取された髄膜腫31例 (合胞細胞型11例, 移行型12例および線維芽細胞型8例) と死後2時間以内の剖検により採取されたクモ膜絨毛3例を対象とした。E型カドヘリンの発現は, ウェスタンブロットリングと光顕的, 電顕的な免疫組織化学により検索した。

I. 抗体

ヒトの腺管型乳癌に由来する MCF-7 細胞に Freund's Adjuvant を加えホモジナイズし, 溶解液を BALB/c, +/-マウスの腹腔内に注射した。血清中に細胞接着阻害活性を認めたマウスから脾臓細胞を取り出し, マウスミエローマ細胞 P3-X63-Ag8-U1 と融合させたハイブリドーマを得た。細胞阻害活性を指標にハイブリドーマのスクリーニングを行ない, 活性を認めたハイブリドーマを10% FCS を含む RPMI 1640培地で培養し, 上清液を回収した。この上清液を透析し抗ヒト上皮型 (E型) カドヘリンモノクローナル抗体 HECD-1 を作製した³⁰⁾³¹⁾。

II. ウェスタンブロットリング

クモ膜絨毛および腫瘍塊の約 200mg に細胞溶解液 (50mM Tris-HCl, 2mM phenylmethane sulfonyl fluorid, 0.15M NaCl, 1% Triton X, 1% sodium

deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate, 2mM CaCl₂) を加えホモジナイズし, 10,000rpm で10分間遠心することにより上清液を得た。この上清液0.2μl に同量の電気泳動用緩衝液 (50mM Tris-HCl, 10% glycerine, 1% mercaptoethanol, 1% sodium dodecyl sulfate) を加え4°Cで一晩静置し, 試料とした。SDS 電気泳動は, laemmli 法³²⁾に従い7.5%ポリアクリルアミドゲルを用いて行い, 分離された蛋白質をナイロン膜に転写した。このナイロン膜をブロッキング用緩衝液 (5% skim milk, 1% bovine serum albumin, 0.1% Antifoam A) に3時間浸透し, 1次抗体として10,000倍希釈した HECD-1 を6時間反応させた後, アビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合体 (avidin biotin peroxidase complex, ABC) 法にて抗原を検出した。なお, 陽性コントロールとしてヒト直腸上皮を用いた。

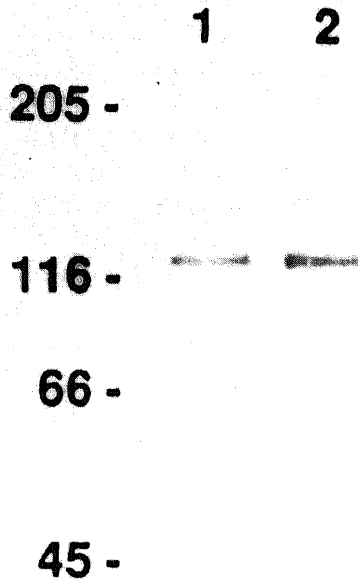


Fig. 1. Western blot analysis of colon epithelium (lane 1) and arachnoid villi (lane 2). The samples were fractionated by SDS-PAGE in 7.5% polyacrylamide gel, and were transferred onto a nylon membrane. The latter was stained with mAb HECD-1 using peroxidase-conjugated anti-mouse IgG. Bars indicate mobilities of molecular markers in kilodaltons.

III. 免疫組織化学的検索

1. 光学顕微鏡

標本を $2\text{mM}\text{Ca}^{2+}$ を加えた 4% パラホルムアルデヒドにて 12 時間固定した後、10%、15%、20% 蔗糖液に 4 時間ずつ浸透させた。これを OCT compound (マイルズ・三共株式会社、東京) に凍結包埋し、クライオスタットで厚さ $6\ \mu\text{m}$ の凍結切片を作製した。メタノール処理を施し、正常血清で非特異的反応を阻止した後、1 次抗体として 1000 倍希釈した HECD-1 を 4°C で 3 時間反応させた。2 次抗体は biotinylated anti-mouse IgG を用い、ABC 法 (Vector, Burlingame, USA) にて抗原の検出を行った。

2. 電子顕微鏡

ウエスタンブロッティングの結果、E 型カドヘリンを強く発現していた 5 例の合胞細胞型の髄膜腫およびクモ膜絨毛の集簇部について、酵素抗体法による免疫電顕 (pre-embedding method) を行った。光顕と同様に作製した凍結切片に 1 次抗体、2 次抗体をそれぞれ 6 時間反応させ、1% グルタルアルデヒドで 10 分間再固定した。次に、不完全 Graham-Karnovsky 溶液に 30 分間、完全 Graham-Karnovsky 溶液に 10 分間浸した後、2% 四酸化オスミウムにて 1 時間反応させた³³⁾³⁴⁾。最後に、アルコール希釈系列にて脱水し、エポンに包埋して超薄切片を作製し、無染色または鉛染色後、日立 H-600 型電子顕微鏡 (東京) にて観察した。

これらの免疫組織化学的検索においては、1 次抗体を正常血清に置換したものを対照群として用いた。

成 績

I. ウエスタンブロッティング

クモ膜絨毛と髄膜腫より抽出された試料を用いて、ウエスタンブロッティングによる解析を行った。クモ膜絨毛では、全例においてナイロン膜に転写された蛋白質の中に E 型カドヘリンを示す分子量約 124kD のバンドがみられた (図 1, 2 列)。髄膜腫では、合胞細胞型 (図 2, 2-4 列) と移行型 (図 2, 5-8 列) に E 型カドヘリンのバンドがみられたが、線維芽細胞型 (図 2, 9-11 列) には 1 例もみられなかった。この結果は、31 例の髄膜腫全てについて同様であった。なお、陽性コントロールであるヒト直腸上皮においても同様なバンドがみられた (図 1, 2, 1 列)。

II. 免疫組織化学的研究

1. クモ膜絨毛

クモ膜絨毛は、その表層を被うクモ膜細胞層と局所的に細胞が集めた集簇部、中心をなす中芯部および硬膜から翻転しクモ膜絨毛の最外層を被う線維性被膜の 4 つの部分から構成されている¹⁰⁾¹¹⁾。E 型カドヘリンは、クモ膜細胞層 (図 3-A, C, 矢印) と集簇部 (図 3-A, 星印) および中芯部 (図 3-B) のクモ膜細胞に発現がみられた。しかし、線維性被膜の細胞には発現がみ

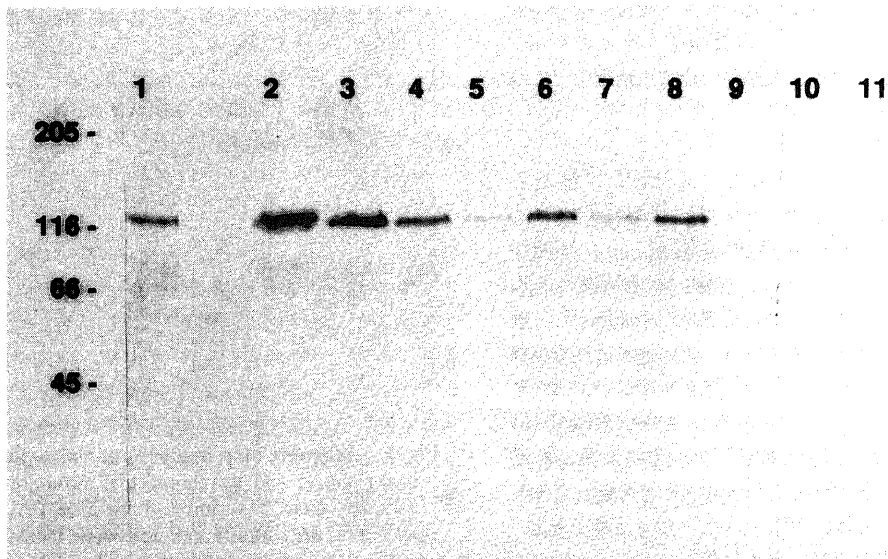


Fig. 2. Western blot analysis of colon epithelium (lane 1) and meningiomas (lanes 2-11). Cell lysates of syncytial type (lane 2-4), transitional type (lanes 5-8) and fibroblastic type (lanes 9-11) were loaded on 7.5% polyacrylamide gel, transferred onto a nylon membrane and were detected by HECD-1.

られず(図3-C, 矢頭), 硬膜や血管内皮細胞などの周辺組織にもみられなかった。

2. 髄膜腫

表1に髄膜腫の各組織型におけるE型カドヘリンの発現の頻度をまとめた。合胞細胞型と移行型では、それぞれ全例にE型カドヘリンがみられた。しかし、線維芽細胞型では8例中1例のみみられず、ウエスタンブロットングの結果とよく一致した。

1) 合胞細胞型は、組織学的に卵円形の核を持つ境界不明瞭な細胞が島状に増生する合胞体と、隣接する合胞体を区画する線維性隔壁から構成されている^{35,36)}。線維性隔壁には硬膜境界細胞(dural border cell)¹⁰⁾に似た線維芽細胞が散在し、一部は硬膜に連続していた。E型カドヘリンの発現は、合胞体を形成する腫瘍細胞間には強くみられたが、線維性隔壁の細胞にはみられなかった(図4)。

2) 移行型は、組織学的に合胞細胞型と線維芽細胞

型の中間的な特徴を示し、前者に似た合胞体の部分と後者に似た紡錘形の細胞が束状配列(stream)を形成する部分とから成っていた。E型カドヘリンの発現は合胞体や渦紋状配列(whorl)には強くみられたが(図5-A)、流線型の細胞が束状配列を形成する部分では発現が弱くなっていた(図5-B)。

3) 線維芽細胞型では、紡錘形の細胞が束状配列を形成し、その間隙には線維がみられた。この組織型では、E型カドヘリンは全く認められなかった(図6)。

III. 免疫電顕所見

クモ膜細胞と髄膜腫では、E型カドヘリンの分布や発現量に違いがみられた。すなわち、E型カドヘリン

Table 1. Expression of E-cadherin detected by HECD-1 in 31 meningiomas

Histological types	Expression of E-cadherin		Incidence (%)
	Present	Absent	
Syncytial	11	0	100
Transitional	12	0	100
Fibroblastic	0	8	0

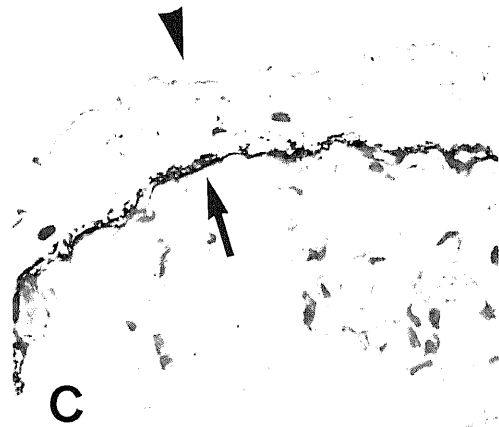
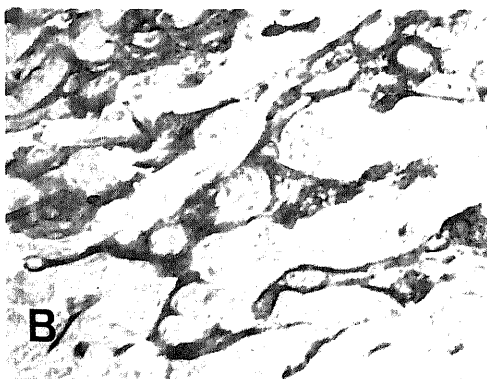
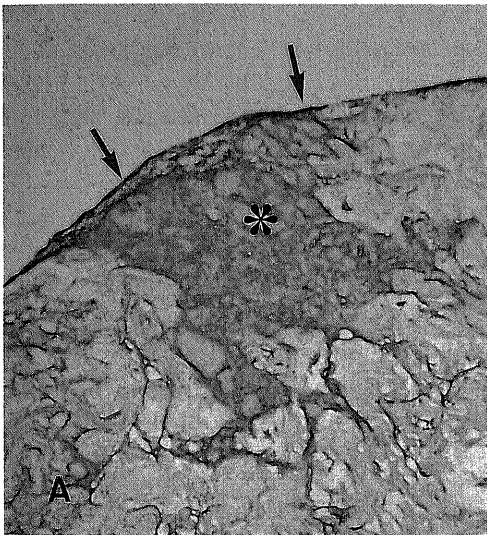


Fig. 3. Immunohistochemical staining of E-cadherin in an arachnoid villus. The latter was stained with mAb HECD-1 using biotinylated anti-mouse IgG and avidin-biotin-peroxidase complex, and was counterstained with hematoxylin. Arachnoid cell layer (A, C-arrows), cap cell cluster (A-asterisk), and arachnoid cells of central core (B) were positive, whereas fibrous capsule (C-arrowhead) was negative. A, C, $\times 200$. B, $\times 400$.

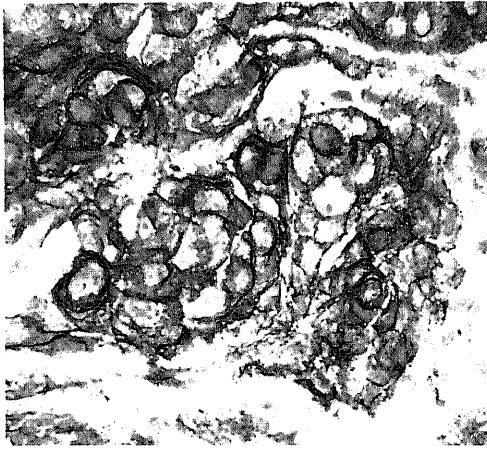


Fig. 4. Immunohistochemical staining of E-cadherin in the syncytial meningioma. E-cadherin was detected at the cell border, but was not detected in the fibrous septum. $\times 400$.

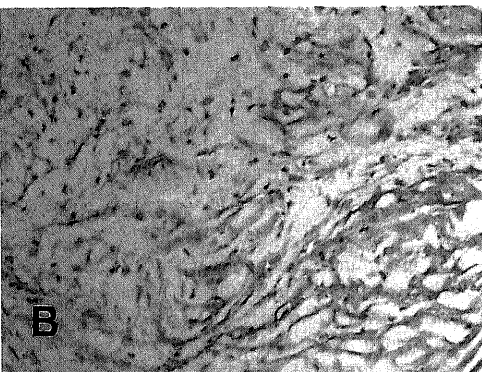
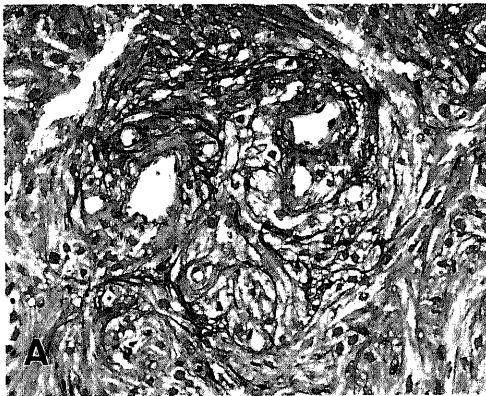


Fig. 5. Immunohistochemical staining of E-cadherin in the transitional meningioma. E-cadherin was detected in the syncytial area (A), but the expression was weak in the fibroblastic area (B). $\times 200$.

は、クモ膜細胞では隣接するクモ膜細胞間に斑点状に凝集していたのに対し(図7)、髄膜腫では細胞接着装置のみならず細胞間のほぼ全体に分布し、その発現量は多くなっていた(図8A, B)。なお、対照群はいずれも陰性所見を呈した。

考 察

カドヘリンはカルシウム依存性の細胞接着分子で、機能上カルシウムを必要とし、カルシウムイオンの存在下ではトリプシンなどの蛋白分解酵素による分解を免れている。現在までに、E型²⁰⁾、P型²¹⁾、N型²²⁾、およびV型²³⁾²⁴⁾などが同定されている。各型は、分子構造や生化学的性状が互いに類似しており²⁵⁾、いずれも約720から750個のアミノ酸からなる。カドヘリン分子は細胞膜を1回通過し、細胞内と細胞外の2つの領域に分けられているが²⁶⁾、細胞接着を阻害するモノクローナル抗体が細胞外領域のN末端に近い部位を認識していることから、同部位が細胞接着機能を持つものと考えられている²⁶⁾。カドヘリンは各型により抗原性や組織分布が異なっており^{19)~22)}、それぞれ細胞結合に際し特異性を示す。すなわち、同じ型のカドヘリンを持つ細胞同志は互いに結合し集塊を形成するが、異なった型を持つ細胞では結合せず分離してしまうという性質がみられる²⁵⁾。

Takeichiらはマウスやニワトリの胚を用いてさまざまな発生段階におけるカドヘリンの発現について検索した。その結果、たとえばE型を発現している胚がP型を発現している子宮に着床する際、胚の外胚葉性胎盤円錐体にP型カドヘリンが発現することにより両組織は結合し胎盤が形成される²¹⁾。また、神経管の形

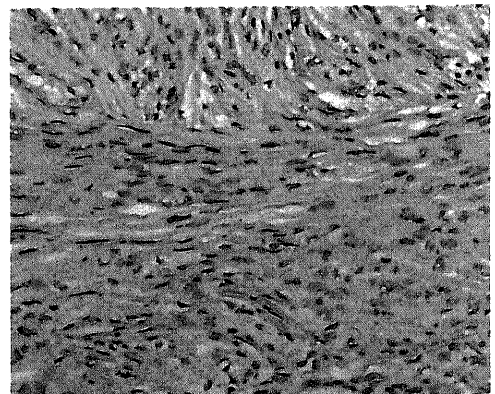


Fig. 6. Immunohistochemical staining of E-cadherin in the fibroblastic meningioma. There were no cells positive for HECD-1. $\times 200$.



Fig. 7. Immunoelectron microscopy of E-cadherin in the cap cell cluster of an arachnoid villus. The specimen was stained with the mAb HECD-1 followed by avidin-biotin peroxidase complex method. The reaction products were localized at the cell surface where the cells come into contact (arrows). N: nucleus. $\times 15,000$. No stain.

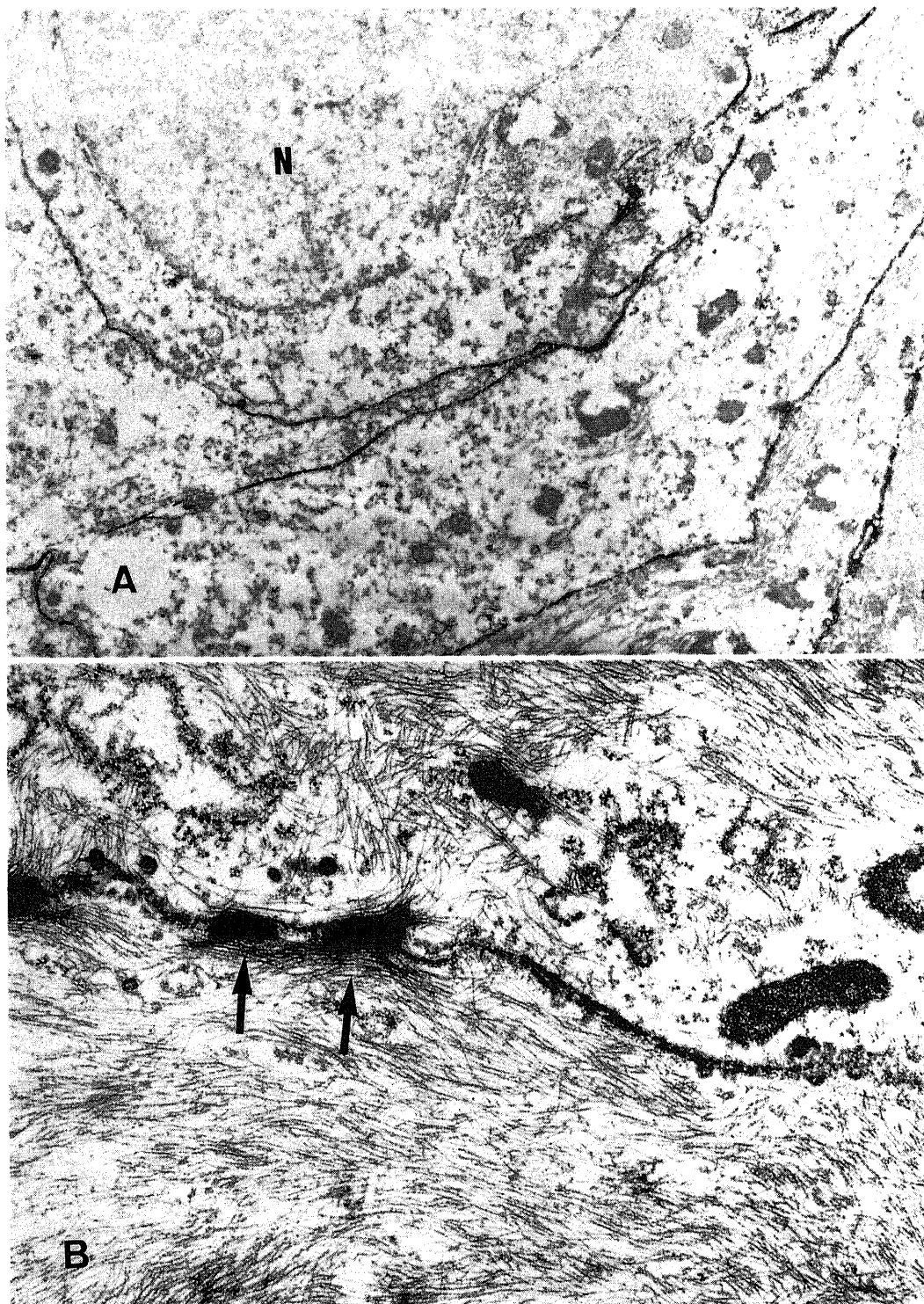


Fig. 8. Immunoelectron microscopy of E-cadherin in the syncytial meningioma. E-cadherin was detected at almost all of the cell surface (A) and its localization was also associated with cell junctions (B). N: nucleus. arrows: junction. A, $\times 15,000$. B, $\times 25,000$. Lead stain.

成において、神経板は表皮から分離する際に、E型の発現を停止しN型カドヘリンを発現して神経管を形成する²⁶⁾²⁹⁾。これらと同様な現象が肺胞上皮や皮膚の形成においてもみられている²⁷⁾²⁸⁾。さらに、胎生期の組織に抗カドヘリン抗体を加えると正常な組織形成が行なわれないことから、カドヘリンの発現は細胞群の分離や結合と密接な関連を持ち、動物の形態形成において重要な働きを担うことが明らかになった。一方最近になり、カドヘリンが癌細胞の転移や浸潤とも関連を持つ可能性が指摘されている。すなわち、マウス卵巣癌の培養細胞において、転移能が高い細胞株ほどカドヘリンが減少していた³⁹⁾。サルやヒトの癌細胞においては、集塊を形成している癌細胞はカドヘリンを発現していたが、周囲組織に浸潤している癌細胞では、その発現は、低下ないし消失していた⁴⁰⁾⁴¹⁾。また、癌細胞ではカドヘリンを発現していても細胞骨格蛋白との結合が失われているために接着能が失活していることが推定されており、転移や浸潤の端緒となる原発巣からの離脱現象にカドヘリンの発現や機能の消失が関係していると推定されている。

E型カドヘリンは、Uvomorulin⁴²⁾⁴³⁾、ニワトリのL-CAM (cell adhesion molecule)⁴⁴⁾、ヒトの cell-CAM 120/80⁴⁵⁾ と同一の接着分子と考えられており、ヒトにおいてはほとんど全ての上皮細胞に発現している³⁹⁾。正常な腸管や肺胞上皮では、カドヘリンは接着帯 (zonula adhaerens) に局在し²⁶⁾⁴⁶⁾、C末端は細胞内のアクチンフィラメントと結合していることが⁴⁷⁾⁴⁸⁾、免疫電顕的および生化学的に証明されている。したがって、腸管や肺胞上皮などの運動を伴う正常上皮組織においては、カドヘリンは各種の細胞接着装置と共に組織形態の維持をはかっているものと推定されている。髄膜腫の発生源地であるクモ膜細胞がE型カドヘリンを発現しているという事実は、クモ膜細胞が上皮細胞と間質細胞の両方の性格を持つ特殊な細胞である¹⁾⁻³⁾ というこれまでの報告と一致する。クモ膜細胞は髄液の流出路であるクモ膜絨毛を形成し常に髄液の拍動を受けていることから⁴⁹⁾⁵⁰⁾、クモ膜絨毛におけるカドヘリンの役割も他の上皮組織と同様に組織の安定化をはかっているものと推定された。

髄膜腫は、従来、単一のクモ膜細胞から発生するものと考えられているが²⁹⁾、その細胞由来については、現在なお不明な点が多い。Yamashima ら¹⁰⁾⁻¹²⁾は、髄膜腫の組織学的多様性はクモ膜絨毛にみられるクモ膜細胞の形態学的多様性に起因するとした。彼らによれば、クモ膜絨毛の集簇部は合胞細胞型の髄膜腫に、線維性被膜は線維芽細胞型に、また、集簇部と線維

性被膜の中間的性状を持つクモ膜細胞層は移行型にそれぞれ類似している。本研究で示したごとく、E型カドヘリンの発現様式もこの形態学的類似性と一致する点が多かった。つまり、クモ膜絨毛においては、集簇部とクモ膜細胞層にE型カドヘリンの発現がみられたが、線維性被膜においては、みられなかった。一方、髄膜腫においては、組織型によって明らかな差異がみられ、合胞細胞型および移行型では全例に発現がみられたが、線維芽細胞型では全くみられなかった。従って、合胞細胞型および移行型の髄膜腫は集簇部およびクモ膜細胞層に、また、線維芽細胞型の髄膜腫は線維性被膜に由来することが示唆された。

免疫電顕による検索では、腫瘍化にともないE型カドヘリンの発現や分布に変化がみられた。つまり、E型カドヘリンは、クモ膜絨毛では隣接するクモ膜細胞間に斑点状に凝集して存在していたのに対し、髄膜腫では細胞間のほぼ全体に分布し、その発現量は増加していた。同様な所見は、胎生期の動物胚においてもみられている²⁶⁾⁵¹⁾。胎生期のマウスの胚細胞において、E型カドヘリンはトロホプラストと胎盤上皮との結合に関与しているが、免疫電顕的に両者の細胞が隣接する細胞間全体にE型カドヘリンの発現がみられた。また、培養皮膚細胞を用いた実験では、細胞が物理的な接着をおこした早期にカドヘリンが細胞接着部位に集合し、その後デスモゾームや閉鎖帯などの細胞接着装置が形成された⁵²⁾。以上のことから、増殖過程にある腫瘍細胞や胚細胞では、分化して安定した上皮細胞と異なり、カドヘリンが細胞膜表面に多く発現し細胞相互の結合を促しているものと推定された。

線維芽細胞型においてはどのような細胞接着分子が機能しているかは現在のところ不明である。Nitta ら³⁵⁾³⁶⁾は髄膜腫の間質について免疫組織化学的な検索を行い、線維芽細胞型の腫瘍細胞突起の表層にIV型コラーゲンとラミニンが線状に分布していることを示した。従って、線維芽細胞型においては、これらの細胞外マトリックスと細胞とを結合させるインテグリンファミリーの接着分子が関与している可能性がある。また、線維芽細胞においてもカルシウム依存性の細胞接着分子が存在することが示唆されており⁵³⁾、E型以外のカドヘリンが関与する可能性も考えられる。

結 論

ヒトのクモ膜絨毛と髄膜腫において、カルシウム依存性の細胞接着分子であるE型カドヘリンの発現について生化学的ならびに免疫組織化学的な比較検討を行い、E型カドヘリンが髄膜腫の発生や組織学的多様性

とどのような関連を持っているかを考察した。

1. クモ膜絨毛では、その表層を被うクモ膜細胞層と局所的に細胞が集合する集簇部および中芯部のクモ膜細胞において、E型カドヘリンの発現がみられた。しかし、硬膜から翻転シクモ膜絨毛の最外層をなす線維性被膜では、その発現はみられなかった。

2. 髄膜腫では、合胞細胞型と移行型において全例に発現がみられたが、線維芽細胞型では1例もみられなかった。

3. E型カドヘリンは上皮細胞としての性格を持つ集簇部およびクモ膜細胞層のクモ膜細胞と、これらのクモ膜細胞から発生したと考えられる合胞細胞型および移行型の髄膜腫の形態形成に関与しているものと推察された。

4. E型カドヘリンは免疫電顕的に、クモ膜絨毛では隣接するクモ膜細胞間に斑点状に凝集して存在したが、髄膜腫では細胞間の全域に多量に分布しており、腫瘍化に伴いカドヘリンの分布や発現量に変化が生じていた。

5. 以上の結果より、組織型によるE型カドヘリンの発現の差異が髄膜腫の組織学的多様性をもたらす一因であると推察される。

謝 辞

稿を終えるに臨み、終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました脳神経外科学教室山下純宏教授に深甚の謝意を表します。また、直接御指導を頂きました同教室山嶋哲盛助教授に深謝いたします。更にモノクローナル抗体を提供して下さいました京都大学理学部竹市雅俊教授および平野伸二先生に厚く御礼申し上げます。本研究に御協力頂いた、福井医科大学医学部付属実験実習機器センター松川 茂助教授、金沢大学医学部第一生化学教室の諸先生、脳神経外科学教室の諸先生、電子顕微鏡技術員横田輝一氏ならびに今村明子技官に感謝の意を表します。

文 献

- 1) Cushing, H.: The meningiomas (dural endotheliomas). Their source, and favoured seats of origin. *Brain*, **45**, 282-316 (1922).
- 2) Bailey, P. & Bucy, P. C.: The origin and nature of meningeal tumors. *Am. J. Cancer*, **15**, 15-54 (1931).
- 3) Wolman, L.: Role of the arachnoid granulation in the development of meningioma. *AMA Arch. Pathol.*, **53**, 70-77 (1952).
- 4) Zülch, K. J.: Histological typing of tumors of the central nervous system. *International histological classification of tumours*, No. 21.

p21-22, WHO, Geneva, 1979.

5) Cushing, H. & Eisenhardt, L.: *Meningiomas, Their Classification, Regional Behavior, Life History, and Surgical End Result*. Part 1, 1st ed. p30-55, Hafner publishing company, New York, 1962.

6) Schachenmayr, W. & Friede, R. L.: The origin of subdural neomembranes. I. Fine structure of dura-arachnoid interface in man. *Am. J. Pathol.*, **92**, 53-68 (1978).

7) Tani, E., Ikeda, K., Yamagata, S., Nishiura, M. & Higashi, N.: Specialized junctional complexes in human meningioma. *Acta Neuropathol (Berl)*, **28**: 305-315 (1974).

8) Napolitano, L., Kyle, R. & Fisher, E. R.: Ultrastructure of meningiomas and the derivation and nature of their cellular components. *Cancer*, **17**, 233-241 (1964).

9) d'Avella, D., Cicciarello, R., Albiero, F. & Andrioli, G.: Scanning electron microscope study of human arachnoid villi. *J. Neurosurg.*, **59**: 620-626 (1983).

10) Kida, S., Yamashima, T., Kubota, T., Ito, H. & Yamamoto, S.: A light and electron microscopic and immunohistochemical study of human arachnoid villi. *J. Neurosurg.*, **69**, 429-435 (1988).

11) Yamashima, T., Kida, S. & Yamamoto, S.: Ultrastructural comparison of arachnoid villi and meningiomas in man. *Mod. Pathol.*, **1**, 224-234 (1988).

12) 山下純宏・山嶋哲盛: 脳腫瘍の組織診断アトラス (6) Meningiomas (髄膜腫). *脳神経外科*, **17**, 703-711 (1989).

13) Hatta, T., Nose, A., Nagafuchi, A. & Takeichi, M.: Cloning and expression of cDNA encoding a neural calcium-dependent cell adhesion molecule: Its identity in the cadherin gene family. *J. Cell Biol.*, **106**, 873-881 (1988).

14) Williams, A. F.: Immunoglobulin-related domains for cell surface recognition. *Nature*, **314**, 579-580 (1988).

15) Kishimoto, T. K., O'Connor, K., Lee, A., Robert, T. M. & Springer, T. A.: Cloning of the β subunit of the leukocyte adhesion proteins: Homology to an extracellular matrix receptor

defines a novel supergene family. *Cell.*, **48**, 681-690 (1987).

16) **Hynes, R. O.** : Integrins: A family of cell surface receptors. *Cell.*, **48**, 549-554 (1987).

17) **Ruoslahti, E. & Pierschbacher, M. D.** : New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science.*, **238**, 491-497 (1987).

18) **Takeichi, M.** : Functional correlation between cell adhesive properties and some cell surface proteins. *J. Cell Biol.*, **75**, 464-747 (1977).

19) **Yoshida, C. & Takeichi, M.** : Teratocarcinoma cell adhesion: Identification of a cell-surface protein involved in calcium-dependent cell aggregation. *Cell.*, **28**, 217-224 (1982).

20) **Yoshida-Noro, C., N. Suzuki. & M. Takeichi.** : Molecular nature of the calcium-dependent cell-cell adhesion system in mouse teratocarcinoma and embryonic cells studied with a monoclonal antibody. *Dev. Biol.*, **101**, 19-27 (1984).

21) **Nose, A. & Takeichi, M.** : A novel cadherin cell adhesion Molecule: its expression patterns associated with implantation and organogenesis of mouse embryos. *J. Cell Biol.*, **103**, 2649-2658 (1986).

22) **Hatta, K. & M. Takeichi.** : Expression of N-cadherin molecules associated with early morphogenetic events in chick development. *Nature (Lond.)*, **320**, 447-449 (1986).

23) **Albelda, S. M., Oliver, P. D., Romer, L. H. & Buck, C. A.** : EndoCAM: a novel endothelial cell-cell adhesion molecule. *J. Cell Biol.*, **110**, 1227-1237 (1990).

24) **Heinmark, R. L., Degner, M. & Schwartz, S. M.** : Identification of a Ca²⁺-dependent cell-cell adhesion molecule in endothelial cells. *J. Cell Biol.*, **110**, 1745-1756 (1990).

25) **Nose, A., Nagafuchi, A. & Takeichi, M.** : Expressed recombinant cadherins mediate cell sorting in model systems. *Cell.*, **54**, 993-1001 (1988).

26) **Takeichi, M.** : The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. *Development.*, **102**, 639-655 (1988).

27) **Hirai, Y., Nose, A., Kobayashi, S. & Takeichi, M.** : Expression and role of E- and P-cadherin adhesion molecules in embryonic histogenesis. II. Skin morphogenesis. *Development.*, **105**, 271-277 (1989).

28) **Hirai, Y., Nose, A., Kobayashi, S. & Takeichi, M.** : Expression and role of E- and P-cadherin adhesion molecules in embryonic histogenesis. I. Lung epithelial morphogenesis. *Development.*, **105**, 263-270 (1989).

29) **Hatta, K., Okada, T. S. & Takeichi, M.** : A monoclonal antibody disrupting calcium-dependent cell-cell of brain tissues: possible role of its target antigen animal pattern formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **82**, 2789-2793 (1985).

30) **Shimoyama, Y., Hirohashi, S., Hirano, S., Noguchi, M., Shimosato, Y., Takeichi, M. & Abe, O.** : Cadherin cell-adhesion molecules in human epithelial tissues and carcinomas. *Cancer Res.*, **49**, 2128-2133 (1989).

31) **Shimoyama, Y., Yoshida, T., Terada, M., Shimosato, Y., Abe, O. & Hirohashi, S.** : Molecular cloning of a human Ca²⁺-dependent cell-cell adhesion molecule homologous to mouse placental cadherin: its low expression in human placental tissues. *J. Cell Biol.*, **109**, 1787-1794 (1989).

32) **Laemmli, U. K.** : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature (Lond.)*, **227**, 680-685 (1970).

33) **Nakane, P. K. & Pierce, G. B.** : Enzyme-labeled antibodies for the light and electron microscopic localization of tissue antigens. *J. Cell Biol.*, **33**, 307-318 (1967).

34) **Nakane, P. K.** : Recent progress in the peroxidase-labeled antibody method. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **254**, 203-211 (1975).

35) **新多 寿** : 髄膜腫における間質の光顕的、電顕的ならびに免疫組織化学的研究. 十全医会誌, **97**, 29-43 (1988).

36) **Nitta, H., Yamashima, T., Yamashita, J. & Kubota, T.** : An ultrastructural and immunohistochemical study of extracellular matrix in meningiomas. *Histol. Histopathol.*, **5**, 267-274 (1990).

37) **Shirayoshi, Y., Hatta, K., Hosoda, M., Tsunazawa, S., Sakiyama, F. & Takeichi, M.** : Cadherin cell adhesion molecules with distinct binding specificities share a common structure. *EMBO J.*, **5**, 2485-2488 (1986).

- 38) **Nose, A., Tsuji, K. & Takeichi M.:** Localization of specificity determining sites in cadherin cell adhesion molecules. *Cell.*, **61**, 147-155 (1990).
- 39) **Hashimoto, M., Niwa, O., Nitta, Y., Takeichi, M. & Yokoro, k.:** Unstable expression of E-cadherin adhesion molecules in metastatic ovarian tumor cells. *Jpn. J. Cancer Res.*, **80**, 459-463 (1989).
- 40) **Behrens, J., Birchmeier, W., Goodman, S. L. & Imhof, B. A.:** Dissociation of Madin-Darby canine kidney epithelial cells by the monoclonal antibody anti-Arc-1: mechanistic aspects and identification of the antigen as a component related to uvomorulin. *J. Cell Biol.*, **101**, 1307-1315 (1985).
- 41) **Behrens, J., Maree, M. M., Van Roy, F. M. & Birchmeier, W.:** Dissecting tumor cell invasion: Epithelial cells acquire invasive properties after the loss of uvomorulin-mediated cell-cell adhesion. *J. Cell Biol.*, **108**, 2435-2447 (1989).
- 42) **Peyrieras, N., Hyafil, F., Louvard, D., Ploegh, H. L. & Jacob, F.:** Uvomorulin: a nonintegral membrane protein of early mouse embryo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **80**, 6274-6227 (1983).
- 43) **Gumbiner, B., Stevenson, B. & Grimaldi, A.:** The role of the cell adhesion molecule uvomorulin in the formation and maintenance of the epithelial junctional complex. *J. Cell Biol.*, **107**, 1575-1587 (1988).
- 44) **Gallin, W, J., Edelman, G. M. & Cunningham, B. A.:** Characterization of L-CAM, a major cell adhesion molecule from embryonic liver cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **80**, 1038-1042 (1983).
- 45) **Eidelman, S., Demsky, C. H., Wheelock, M. J. & Damjanov, I.:** Expression of the cell-cell adhesion glycoprotein cell-CAM 120/80 in normal human tissues and tumors. *Am. J. Pathol.*, **135**, 101-110 (1989).
- 46) **Boller, K., Vestweber, D. & Kemler, R.:** Cell-adhesion molecule uvomorulin is localized in the intermediate junctions of adult intestinal epithelial cells. *J. Cell Biol.*, **100**, 327-332 (1985).
- 47) **Hirano, S., Nose, A., Hatta, K., Kawakami, A. & Takeichi, M.:** Calciumdependent cell-cell adhesion molecules (cadherins): subclass specificities and possible involvement of actin bundles. *J. Cell Biol.*, **105**, 2501-2510 (1987).
- 48) **Nagafuchi, A. & takeichi M.:** Cell binding function of E-cadherin disregulated by the cytoplasmic domain. *EMBO J.*, **7**, 3679-3684 (1988).
- 49) **yamashima, T.:** Functional ultrastructure of cerebrospinal fluid drainage channels in human arachnoid villi. *Neurosurgery.*, **22**, 633-641 (1988).
- 50) **Upton, L. M. & Weller, R. O.:** The morphology of cerebrospinal fluid drainage pathways in human arachnoid granulations. *J. Neurosurg.*, **63**, 867-875 (1985).
- 51) **kadokawa, Y., Fuketa, I., Nose, A., Takeichi, M. & Nakatsuji, N.:** Expression pattern of E- and P-cadherin in mouse embryos and uteri during the periimplantation period. *Develop. Growth & Differ.*, **31**, 23-30 (1989).
- 52) **楠見明弘:** ケラチノサイトにおける細胞接着構造の形成機構. *実験医学*, **7**, 45-52 (1989).
- 53) **能瀬聡直:** 特異的細胞接着の分子的基础—カドヘリンの役割—. *細胞工学*, **8**, 479-488 (1989).

Immunoblot and Immunohistochemical Analysis of Cell Adhesion Molecule: E-cadherin in Arachnoid villi and Meningiomas Yasuo Tohma, Department of Neurosurgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920 - J. Juzen Med. Soc., **100**, 192 - 203 (1991)

Key words meningioma, arachnoid villi, cadherin, immunoblotting, immunohistochemistry

Abstract

Cadherin is a family of calcium-dependent cell adhesion molecules playing an important role in organogenesis and oncogenesis. These cell adhesion molecules are known to be indispensable for the connection of epithelial, neuronal and placental cells and are divided into several subclasses. Expression of epithelial (E) type cadherin was studied in 31 meningiomas (11 syncytial, 12 transitional, 8 fibroblastic) and 3 arachnoid villi, by immunoblot and immunohistochemical analysis using a monoclonal antibody against human E-cadherin: HECD-1. In the immunoblot analysis, E-cadherin was detected at the main band of Mr 124kD in all of the syncytial and transitional types, but not in the fibroblastic types. The immunohistochemical examination showed that E-cadherin was expressed at the cell borders of the syncytial cells and whorls, but the expression was absent in the fibroblastic cells. In the arachnoid villi, it was detected among the arachnoid cells, especially in the cap cell cluster. Immunoelectron microscopy of the arachnoid villi showed that E-cadherin was localized at the cell surface, where the neighboring cells come into contact. In contrast, E-cadherin was detected almost all over the cell surface including the junctional complexes in meningiomas. It is suggested from these data that the expression of E-cadherin is closely related to the differentiation of meningioma cells.