

## ヒト腫瘍における型別コラーゲンの分布

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	<a href="http://hdl.handle.net/2297/8018">http://hdl.handle.net/2297/8018</a>

## ヒト腫瘍における型別コラーゲンの分布

金沢大学医学部第一病理学講座

中西 功夫

Key words Collagen types, Gastric carcinoma, Osteosarcoma, Schwannoma

## I. はじめに

コラーゲンは $\alpha$ 鎖と呼ばれるポリペプチド鎖3本が特有のヘリックス構造をとっている構造蛋白質で、結合組織の主要な構成成分である。これまで、この蛋白は300 nmの長さを有し、約1/4ずつづれて配列、結合して67 nmの周期を示すコラーゲン線維（膠原線維）を形成するものと信じられてきた。しかし、血管、上皮、糸球体などにみられる基底膜にはこのような縞模様も、線維状構造もみることができないにも拘らず、その主要構成蛋白はコラーゲンであることはよく知られるようになった。したがって、コラーゲンという蛋白は異った $\alpha$ 鎖、または $\alpha$ 鎖の組合せから構成される複数の分子種があり、それぞれこの蛋白分子の違いに応じて分子間結合を営み、生体内では細胞間マトリックスの主要成分として多彩な機能を営んでいるものと考えられる。

現在、コラーゲンの分子種はI型～XI型まで11種、 $\alpha$ 鎖は20種類が確定されており<sup>1)2)</sup>、さらに、最近、XII型が同定され<sup>3)</sup>、それぞれのコラーゲンの組織内分布やその役割については徐々に解明されつつある（表I）。本総説においては、これら分子種のうち、教室で精製したI型、III型、IV型、V型、およびVI型コラーゲンに対する型特異的抗体を用いて行った研究成果にもとづいて型別コラーゲンの腫瘍内分布について概説する。

型別コラーゲンは胎盤からペプシン消化後、酢酸で抽出、各型コラーゲンがpHと塩濃度に依存して溶解度が変わるのを利用して分別する。単離した各型コラーゲンをセルローズカラムクロマトグラフィーで非コラーゲン性蛋白を除去した後、SDS-PAGEでそれ

Isao Nakanishi: Department of Pathology (I), Kanazawa University.

ぞれの $\alpha$ 鎖に注目して純度を検定し精製標品とする。これをラットまたは家兔に免疫し、抗血清をとり、つづいて、抗血清を各型コラーゲンのアフィニティーカラムに繰返えし通して精製する<sup>4)6)</sup>。このようにして得られた型特異的抗コラーゲン抗体について、ELISA法のinhibition test<sup>7)</sup>で各型同志の交叉反応がないことを確認した上、実際には適当に希釈して使用する。

## II. 胃 癌

胃癌には間質成分が異常に豊富な硬癌がある。この硬癌間質の主要成分はコラーゲンであるが、コラーゲンの過剰産生一沈着という現象の成因については、胃癌のみならず、乳癌、肺癌において検討されてきた。代表的には、既存の間質の虚脱<sup>8)</sup>、癌細胞自身による産生<sup>9)10)</sup>、間質細胞が何らかの刺激をうけて過剰反応<sup>11)12)</sup>によるものなどが提示されている。

この問題を解明する一つの試みとして、組織内の各型コラーゲンの局在を型特異的抗体を用いて、硬癌と髄様癌とを対比しながら光顕的ならびに電顕的に観察してみた。光顕レベルでは、間質の主要コラーゲンは硬癌、髄様癌ともI型とIII型コラーゲンであった。注目されることは、硬癌におけるIV型コラーゲンの異常分布とV型コラーゲンの増加であった。IV型コラーゲンは通常基底膜領域に局在しているが（図I a）、硬癌の場合には癌細胞と無関係に太い線維間に線状に分布していた（図I b）。このような異常分布については既にNagaiらが胃癌<sup>13)</sup>で、源が乳癌<sup>14)</sup>において指摘している所であるが、その本態については、新生後に消失した毛細血管の基底膜の残存、遊走した癌細胞の基底膜の遺残などが推定されているにすぎない。そこで、免疫電顕で硬癌を観察してみると、筋線維芽細胞や平滑筋細胞の細胞周囲の基底膜領域に抗IV型コラーゲン抗体が反応することが判明した（図I c）。従って、硬

Abbreviations: ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; FLS, fibrous long-spacing; SDS-PAGE, sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis.

癌の場合には、増加する筋線維芽細胞<sup>15)16)</sup>がIV型コラーゲンの異常分布と密接に関与しているものと考えられる。つぎに、硬癌におけるV型コラーゲンの増加であるが、V型コラーゲンは光顕的にはびまん性に出現し、電顕的には一部の線維芽細胞や筋線維芽細胞の粗面小胞体内にも同定された(図I d)。このような事実は、光顕レベルで乳癌<sup>14)17)</sup>、肺癌<sup>12)18)</sup>、胃癌<sup>11)</sup>、において指摘され、さらに電顕レベルではわれわれが胃癌において報告<sup>19)</sup>したものであり、硬癌の特徴の一つであろうと思われる。しかし、V型コラーゲンは、創傷治癒<sup>20)</sup>や熱傷治癒<sup>21)</sup>の過程などの非癌性線維化とも密接に関連して増加するので、必ずしも硬癌に特異的なものではなく、とくに筋線維芽細胞が関与する進行性の線維化に普遍的な現象と考えるべきであろう。

今回の光顕的および電顕的観察において、癌細胞内に各型コラーゲンを明確に同定することはできなかった。癌細胞がコラーゲンを産生する能力を保有していること<sup>10)</sup>は問題ないとしても、硬癌における過剰のコラーゲンは何らかの刺激をうけて反応する間質細胞によると考えるのが妥当であろう。

### III. 骨 肉 腫

骨肉腫は類骨を形成する骨芽細胞由来の悪性腫瘍である。組織学的には、類骨の他に、軟骨や線維性間質成分を形成するなど多彩ではあるが、その予後、つまり悪性度はほとんど変わらないのが一般的である。しかし、この中で、分化型骨肉腫<sup>22)</sup>は悪性類骨を形成するにも拘らず、その予後は他の骨肉腫に比べ良好である。類骨は良性、悪性を問わずI型コラーゲンが主構成成分であると<sup>23)~25)</sup>いわれている。また、近年、腫瘍におけ

る間質の性格は腫瘍細胞の起源や形態と密接に関連して変化することが注目されている<sup>25)~27)</sup>。このような観点から、分化型骨肉腫を通常の骨形成性骨肉腫と比較検討した。

骨腫瘍は他の腫瘍に比べて十分量の生材料を検索できる機会に乏しいので、まずパラフィン標本で組織像と正確に対比しながら免疫染色を行ってみると、悪性類骨は骨形成性骨肉腫、分化型骨肉腫ともI型コラーゲンに濃染、V型コラーゲンが淡染、III型コラーゲンにはほとんど染まらない(図II a, b)。従って、この染色結果からは悪性類骨に関して両者に差異はなく、V型コラーゲンが線維性間質のみに存在<sup>28)</sup>するのではなく類骨にも若干含まれていることを示唆できるものであろう。注目されることは分化型骨肉腫の線維性間質にIV型コラーゲンが微細線維状に分布していること、および紡錘形腫瘍細胞内にもV型コラーゲンが観察されることである(図II c, d)。これらの所見は明らかに骨形成性骨肉腫とは異なっているので、これが見せかけではなく、腫瘍細胞自身によって産生される結果であることを確認するために、それぞれの腫瘍細胞を培養し、産生されるコラーゲンの型分析、各型コラーゲンの量比を検討した。培養細胞に<sup>3</sup>H-プロリンを取り込ませ、コラーゲン性蛋白を収集、SDS-PAGEで泳動後、X線フィルムに感光させて調べるフルオログラフ<sup>29)~31)</sup>を用い、デンストメーターで各々のフルオログラムを半定量的にI型、III型、IV型、V型コラーゲン量およびIII/I、IV/I、V/I比をとって比較検討してみると、分化型骨肉腫では明らかにIV型とV型コラーゲンの相対的増加がみられた(表2)。このことは、分化型骨肉腫にみとめられた型別コラーゲン分布の

Table 1. Classification of collagen family

	Collagen type	Tissue localization	
Group I	Type I	Skin, tendon, bone	
	Type II	Cartilage	
	* chain Mr $\geq 95,000$	Type III	Skin, tendon
	* uninterrupted helical domain	Type V	Interstitial tissues
		Type XI	Cartilage
Group II	Type IV	Basement membranes	
	* chain Mr $\geq 95,000$	Type VI	Interstitial tissues
	* helical domains interrupted by nonhelical segments	Type VII	Anchoring fibrils
		Type VIII	Endothelial cells
Group III	Type IX	Cartilage	
	* chain Mr $< 95,000$	Type X	Calcifying cartilage
		Type XII	Interstitial tissues

特徴は腫瘍細胞の生物学的態度を反映しているといえるであろう。紡錘形の形態をとる骨肉腫細胞周囲にはIV型コラーゲンが同定されることや<sup>24)</sup>、分化型骨肉腫のIV型およびV型コラーゲンの局在部位には紡錘形細胞が配列して丁度、線維性骨異形成に類似する組織像を呈するので、形態表現と型別コラーゲンの産生・分泌の間には密接な関係があるように思われる。

#### IV. Schwann 細胞性腫瘍

Schwann細胞の良性腫瘍として神経鞘腫と神経線維腫がある。Schwann細胞はI, III, IV, V型コラーゲンを産生し基底膜を形成する<sup>32)</sup>。さらに、最近、上記腫瘍にVI型コラーゲンが同定されている<sup>33)34)</sup>。VI型コラーゲンは $\alpha_1$  (VI),  $\alpha_2$  (VI),  $\alpha_3$  (VI)の3本鎖か

ら成り、ヘリックス部分が105 nmと短かく、大きいN末端とC末端の球状部分をもつ蛋白である<sup>35)</sup>。この蛋白はin vitroで100 nm周期のFLS線維を形成することから、神経鞘腫や神経線維腫にみられるFLS線維がVI型コラーゲンの凝集を示しているのだろうと考えられている<sup>36)</sup>。一方、免疫電顕では抗VI型コラーゲン抗体は間質にみられるmicrofibrilの大部分に陽性であるので、むしろもっと広く、神経鞘腫などにみられるmicrofibril性線維性構造物がVI型コラーゲンを代表しているともいわれている<sup>33)~35)</sup>。そこで、この点を確認するために、まず、神経線維腫を蛍光抗体法でVI型コラーゲン染色してみると、明らかに太い線維に沿って線状に染色される(図III a)。つぎに、Antoni AとBの部位を合わせもつ神経鞘腫をパラフィン標本で染

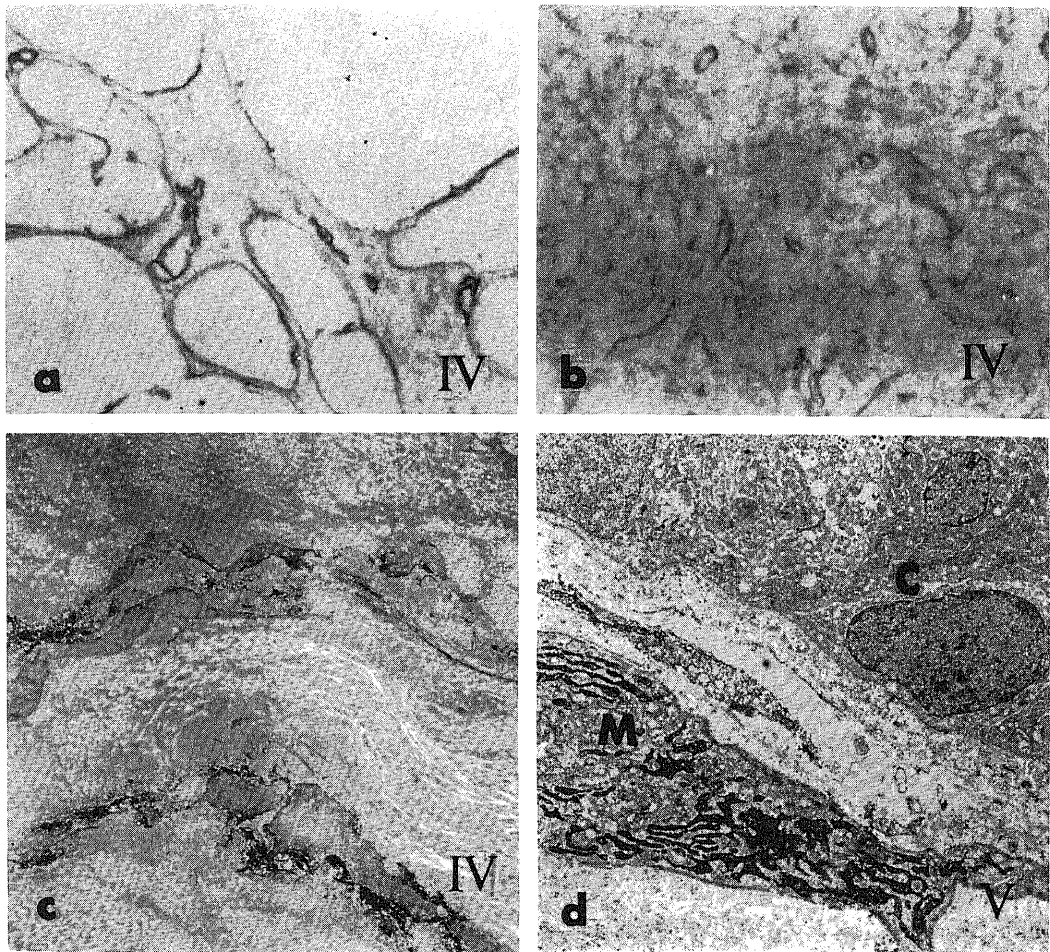


Fig. 1. Light micrographs of medullary carcinoma (a) and scirrhous carcinoma (b) of the stomach immunostained for type IV collagen.  $\times 250$ . Electron micrographs of scirrhous carcinoma immunostained for type IV collagen (c) and type V collagen (d). M indicates a myofibroblast and C carcinoma cells.  $\times 4,500$ .

めてみると、Antoni A にはVI型コラーゲンはほぼ陰性、Antoni B の部位で陽性を示した<sup>37)</sup>(図III b)。FLS 線維は Antoni A 部位に豊富であり、Antoni B 部位には太いコラーゲン線維と microfibril が点在するという形態学的特徴<sup>37)38)</sup>を考慮すると、microfibril の多

くがVI型コラーゲン抗体と反応し、FLS 線維の一部がVI型コラーゲン抗体に反応するにすぎないと推定される。VI型コラーゲンが microfibril の多くに組込まれているとすれば、このコラーゲンは生理的に広く全身に分布しているばかりでなく、病的にもヒアリン<sup>39)</sup>と

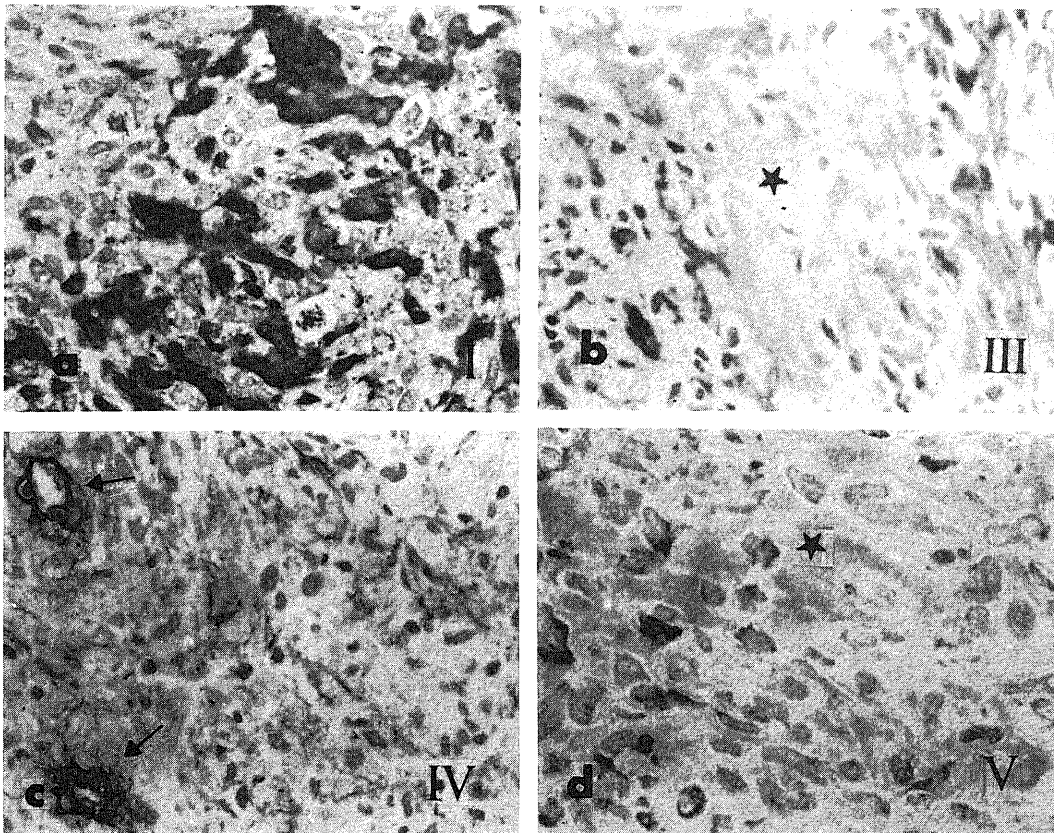


Fig. 2. Light micrographs of osteoblastic osteosarcoma immunostained for type I collagen (a), and well differentiated osteosarcoma immunostained for type III collagen (b), type IV collagen (c) and type V collagen (d). Asterisks indicate the osteoid tissue and arrows blood vessels.  $\times 400$ .

Table 2. Collagen production of cultured dermal fibroblast and tumor cells, and ratios of type III, IV or V to type I collagen

	Values of collagen types				Ratios		
	I	III	IV	V	III/I(%)	IV/I(%)	V/I(%)
Dermal fibroblast	505	48	0	21	9.5	0	4.2
Tumor cell of osteoblastic o.s.*	633	5	8	17	0.8	1.3	2.7
Tumor cell of well diff. o.s.*	759	16	29	35	2.1	3.8	4.6

value of each collagen was obtained by densitometry

\*o.s.: osteosarcoma

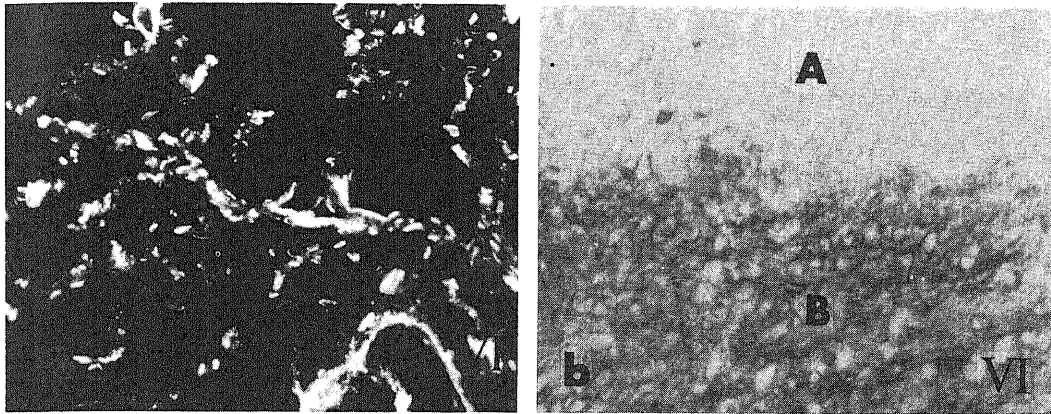


Fig. 3. Light micrographs of neurofibroma stained with anti-type VI collagen antibody by immunofluorescence (a) and Schwannoma immunostained with anti-type VI collagen antibody (b). A and B indicate Antoni A area and Antoni B area respectively.  $\times 187.5$  (a) and  $\times 400$  (b).

呼ばれる病変の主要な構成要素であることが予想され、その役割については今後の興味ある課題と考えられる。

本論文の要旨は、昭和62年度十全同窓会総会特別講演において発表した。発表の機会を与えていただきました梶川欽一郎会長ならびに会員諸兄に感謝します。研究遂行にあたり多大なご協力、ご支援をいただきました野村進教授、松原藤継教授、磨伊正義教授に深謝し、また、第一病理学教室教室員の協力を感謝する。

#### 文 献

- 1) Miller, E. J.: The structure of fibril-forming collagens. *Ann. New York Acad. Sci.*, **460**, 1-13 (1985).
- 2) Kuhn, K.: The collagens—molecular and macromolecular structures. In H. Tschesche (ed.), *Proteinases in Inflammation and Tumor Invasion*, p107-143, Walter de Gruyter & Co., Berlin, New York, 1986.
- 3) Gordon, M. K., Gereche, D. R. & Olsen, B. R.: Type XII collagen: Distinct extracellular matrix component discovered by cDNA cloning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**, 6040-6044 (1987).
- 4) Furuto, D. K. & Miller, E. J.: Isolation of a unique collagenous fraction from limited pepsin digests of human placental tissue. *J. Biol. Chem.*, **255**, 290-295 (1980).
- 5) Miller, E. J. & Rhodes, R. K.: Preparation and characterization of the different types of collagen. *Meth. Enzymol.*, **82**, 33-64 (1982).

6) 永井 裕, 源 利成: コラーゲン概説. 動物成分利用集成, 陸産動物編 (奥山隆編), 910-921 頁, R & Dプランニング, 東京, 1986.

7) 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).

8) Jackson, J. G. & Orr, J. W.: The ducts of carcinomatous breasts, with particular reference to connective-tissue changes. *J. Pathol. Bact.*, **74**, 265-273 (1957).

9) Al-Adnani, M. S., Kerrane, J. A. & McGee, J. O'D.: Inappropriate production of collagen and prolyl hydroxylase by human breast cancer cells in vivo. *Br. J. Cancer*, **31**, 653-660 (1975).

10) Sakakibara, K., Suzuki, T., Motoyama, T., Watanabe, H. & Nagai, Y.: Biosynthesis of an interstitial type of collagen by cloned human gastric carcinoma cells. *Cancer Res.*, **42**, 2019-2027 (1982).

11) Nagai, Y., Sunada, H., Sano, J., Onodera, S., Arai, K., Konimi, H., Minamoto, T., Hata, R., Hori, H., Nakanishi, I., Kitaoka, H. & Sakamoto, G.: Biochemical and immunohistochemical studies on the scirrhous carcinoma of human stomach. *Ann. New York Acad. Sci.*, **460**, 321-332 (1985).

12) El-Torky, M., Giltman, L. I. & Dabbous, M.: Collagens in scar carcinomas of the lung. *Am. J. Pathol.*, **121**, 322-326 (1985).

13) Kao, R. T., Hall, J. & Stern, R.: Collagen

and elastin synthesis in human stroma and breast carcinoma cell lines: Modulation by the extracellular matrix. *Connect. Tissue Res.*, **14**, 245-255 (1986).

14) 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*, **95**, 975-990 (1986).

15) Seemayer, T. A., Lagač, R., Schürch, W. & Tremblay, G.: Myofibroblasts in the stroma of invasive and metastatic carcinoma. A possible host response to neoplasia. *Am. J. Surg. Pathol.*, **3**, 525-533 (1979).

16) Nakanishi, I., Kajikawa, K., Okada, Y. & Eguchi, K.: Myofibroblasts in fibrous tumors and fibrosis in various organs. *Acta Pathol. Jpn.*, **31**, 423-437 (1981).

17) Barsky, S. H., Rao, C. N., Grotendorst, G. R. & Liotta, L. A.: Increased content of type V collagen in desmoplasia of human breast carcinoma. *Am. J. Pathol.*, **108**, 276-283 (1982).

18) Barsky, S. H., Huang, S. J. & Bhuta, S.: The extracellular matrix of pulmonary scar carcinomas is suggestive of a desmoplastic origin. *Am. J. Pathol.*, **124**, 412-419 (1986).

19) Minamoto, T., Ooi, A., Okada, Y., Mai, M., Nagai, Y. & Nakanishi, I.: Desmoplastic reaction of gastric carcinoma. A light and electron microscopic immunohistochemical analysis by using collagen type-specific antibodies. *Human Pathol.* (in press).

20) Dvorak, H. F.: Tumors: Wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *New Engl. J. Med.*, **315**, 1650-1659 (1986).

21) Hayakawa, T., Hashimoto, Y., Myokei, Y., Aoyama, H. & Izawa, Y.: The effect of skin grafts on the ratio of collagen types in human postburn wound tissues. *Connect. Tissue Res.*, **9**, 249-252 (1982).

22) Dahlin, D. C. & Unni, K. K.: Osteosarcoma. In *Bone Tumors, General Aspects and Data on 8,542 cases*, 4th ed., p269-307, Charles C Thomas • Publisher, Springfield, 1986.

23) Toole, B. P., Kang, A. H., Trestad, R. L. & Gross, J.: Collagen heterogeneity within different growth regions of long bones of rachitic and non-rachitic chicks. *Biochem. J.*, **127**, 715-720 (1972).

24) 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).

25) Stern, R., Wilczek, J., Thorpe, W. P., Rosenberg, S. A. & Cannon, G.: Procollagens as markers for the cell of origin of human bone tumors. *Cancer Res.*, **40**, 325-328 (1980).

26) Alitalo, K., Keski-Oja, J. & Vaheri, A.: Extracellular matrix proteins characterize human tumor cell lines. *Int. J. Cancer*, **27**, 755-761 (1981).

27) Scarpa, S., Modesti, A. & Triche, T. J.: Extracellular matrix synthesis by undifferentiated childhood tumor cell lines. *Am. J. Pathol.*, **129**, 74-85 (1987).

28) Broek, D. L., Madri, J., Eikenberry, E. F. & Brodsky, B.: Characterization of the tissue form of type V collagen from chick bone. *J. Biol. Chem.*, **260**, 555-562 (1985).

29) Laskey, R. A. & Mills, A. D.: Quantitative film detection of  $^3\text{H}$  and  $^{14}\text{C}$  in polyacrylamide gels by fluorography. *Eur. J. Biochem.*, **56**, 355-341 (1975).

30) Chamberlain, J. P.: Fluorographic detection of radioactivity in polyacrylamide gels with the water-soluble fluor, sodium salicylate. *Anal. Biochem.*, **98**, 132-135 (1979).

31) Peterkofsky, B., Chojkier, M. Bateman, J.: Determination of collagen synthesis in tissue and cell culture system. In H. Furthmayr (ed.), *Immunocytochemistry of the Extracellular Matrix*, vol. II, p19-47, CRC Press INC., Florida, 1982.

32) Bunge, M. B., Williams, A. K., Wood, P. M., Uitto, J. & Jeffrey, J. J.: Comparison of nerve cell and nerve cell plus Schwann cell cultures with particular emphasis on basal lamina and collagen formation. *J. Cell Biol.*, **84**, 184-202 (1980).

33) Fleischmajer, R., Timpl, R., Dziadek, M. & Lebwohl, M.: Basement membrane proteins, interstitial collagens, and fibronectin in neurofibroma. *J. Invest. Dermatol.*, **85**, 54-59 (1985).

34) Engel, J., Furthmayr, H., Odermatt, E., von der Mark, H., Aumailley, M., Fleischmajer, R. & Timpl, R.: Structure and macromolecular organization of type VI collagen. *Ann. New York Acad. Sci.*, **460**, 25-37 (1985).

- 35) von der Mark, H., Aumailley, M., Wich, G., Fleischmajer, R. & Timpl, R.: Immunohistochemistry, genuine size and tissue localization of collagen VI. *Eur. J. Biochem.*, **142**, 493-502 (1984).
- 36) Bruns, R. R., Press, W., Engvall, E., Timpl, R. & Gross, J.: Type VI collagen in extracellular, 100-nm periodic filaments and fibrils. Identification by immunoelectron microscopy. *J. Cell Biol.*, **103**, 393-404 (1986).
- 37) Oda, Y., Kawahara, E., Minamoto, T., Ueda, Y., Ikeda, K., Nagai, Y. & Nakanishi, I.: Immunohistochemical studies on tissue localization of collagen types in Schwannomas—The correlation with ultrastructural features of the extracellular matrix. *Virchows Arch. A.* (in submission).
- 38) Erlandson, R. A. & Woodruff, J. M.: Peripheral nerve sheath tumors. An electron microscopic study of 43 cases. *Cancer*, **49**, 273-287 (1982).
- 39) 梶川欽一郎: ヒアリンおよびフィブリノイド. 結合組織, 577-588 頁, 金原出版, 東京, 大阪, 1984.