

学位論文
Doctor's Thesis

論文題名 : 泌尿生殖器の上皮基底膜 IV 型コラーゲン α 鎖の
臓器特異性と移行上皮癌における基底膜の動態
(Differential expression of epithelial basement membrane
type IV collagen α chains in human urogenital organs and
transitional cell carcinoma)

著者名 : 清藤 政昭
Masa-aki Kiyofuji

指導教官名指導教官 : 泌尿器科学担当教授
上田 昭一

審査委員名 : 病理学第一学担当教授 伊藤 隆明
病理学第二学担当教授 竹屋 元裕
生化学第二学担当教授 堀内 正公
歯科口腔外科学担当教授 篠原 正徳

2003年度

目次

要旨	1
Summary	4
発表論文	5
謝辞	6
略号	7
第1章 研究の背景と目的	8
1) 基底膜とIV型コラーゲン	8
2) 移行上皮の構造と基底膜	9
3) 癌の浸潤とIV型コラーゲン α 鎖分子の動態について	10
4) 目的	10
第2章 対象と実験方法	12
1) 対象	12
2) 実験方法	12
i) 組織検体作製	12
ii) Avidin-biotin免疫染色	12
iii) 共焦点レーザー顕微鏡(CLSM)	13
iv) 統計処理	13
第3章 結果	14
1) 正常泌尿生殖器上皮基底膜における IV型コラーゲン α 鎖の構成	14
2) 共焦点レーザー顕微鏡による α (IV)鎖の定量的解析	14
3) 膀胱癌におけるIV型コラーゲンの α 鎖の動態	15

第4章 考察 17

- 1) 膀胱移行上皮基底膜の特殊性とその伸縮機能について . . . 17
- 2) 共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) を用いた
IV型コラーゲン α 鎖の定量的解析の試み 18
- 3) 膀胱癌の浸潤とIV型コラーゲン α 鎖の動態について . . . 19
- 4) 今後の検討課題 19

参考文献 21

要旨

[目的]

基底膜は上皮と間質の間に存在する膜様構造物で、主要な構成成分の一つはIV型コラーゲンである。近年その α (IV)鎖には6種類のサブタイプがあり、構成成分に組織特異性があることが知られてきている。この6種類のサブタイプに特異的抗体を用いて、免疫組織化学的に上皮基底膜の特異的分布を証明する事が可能となった。泌尿器尿路系における上皮基底膜の構成は、腎尿細管基底膜では α 1(IV)鎖、 α 2(IV)鎖が連続性に陽性像を示すが、 α 3(IV)鎖、 α 4(IV)鎖、 α 5(IV)鎖は不連続に一部陽性を示す。尿管、膀胱の移行上皮および尿道扁平上皮の基底膜では、 α 1(IV)鎖、 α 2(IV)鎖、 α 5(IV)鎖、 α 6(IV)鎖が連続性に陽性を示す。 α 1(IV)鎖、 α 2(IV)鎖、 α 5(IV)鎖、 α 6(IV)鎖で構成される上皮基底膜でも臓器の機能の違いによる特異性の有無を、正常泌尿生殖器および膀胱癌組織において検討した。

[方法]

正常膀胱上皮21例、正常尿管上皮20例、正常尿道上皮5例、正常亀頭包皮10例を検索材料とした。凍結切片による α (IV)鎖特異的抗体を用いた免疫染色と共焦点レーザー顕微鏡(CLSM)による解析、およびパラフィン切片による免疫染色を行った。腫瘍病変では、内反型乳頭腫3例、表在性移行上皮癌(pT1)症例5例、浸潤性移行上皮癌(pT2-3)15例、移行上皮癌転移巣2例のパラフィン切片による免疫染

色を行った。

[結果]

膀胱・尿管・尿道・包皮において、移行上皮・扁平上皮の基底膜は $\alpha 1(\text{IV})/\alpha 2(\text{IV})$ 鎖および $\alpha 5(\text{IV})/\alpha 6(\text{IV})$ 鎖で構成されていた。しかしその構成比に違いがみられ、特に膀胱移行上皮において $\alpha 5(\text{IV})/\alpha 6(\text{IV})$ 鎖の発現が扁平上皮の $\alpha 5(\text{IV})/\alpha 6(\text{IV})$ 鎖に比較し有意に高かった。また、移行上皮癌においては深達度の高い浸潤癌でも基底膜の $\alpha 5(\text{IV})/\alpha 6(\text{IV})$ 鎖は完全には消失しなかった。

[考察]

大血管・胃など伸展性に富む臓器では、平滑筋基底膜に $\alpha 5(\text{IV})/\alpha 6(\text{IV})$ 鎖が発現している。本研究での膀胱移行上皮基底膜に $\alpha 5(\text{IV})/\alpha 6(\text{IV})$ 鎖の発現が高い事は伸展性に富んだ臓器の上皮の特質と考えられた。

移行上皮癌における、異型度 G1~G2 の乳頭状胞巣を形成して浸潤するもので比較的深い浸潤胞巣でも、 $\alpha 5(\text{IV})/\alpha 6(\text{IV})$ 鎖が完全に消失しない事と関連があるものと思われる。

[結論]

尿路系移行上皮の基底膜は $\alpha 1(\text{IV})/\alpha 2(\text{IV})$ 鎖に加え、 $\alpha 5(\text{IV})/\alpha 6(\text{IV})$ 鎖によって構成されていた。臓器の伸展性に富む膀胱移行上皮の基底膜が、亀頭包皮の扁平上皮の基底膜に比較して $\alpha 5(\text{IV})/\alpha 6(\text{IV})$ 鎖の発現が高かった。異型度の高くない移行上皮癌(Grade 1-2)では腫瘍胞巣の基底膜は、 $\alpha 5(\text{IV})/\alpha 6(\text{IV})$ 鎖が良く保存されていた。

これは癌化に伴っても $\alpha 5(\text{IV})/\alpha 6(\text{IV})$ 鎖の持続的発現と合成が
おこっているものと考えられる。

Summary

Type IV collagen is a major component of basement membrane(BM), which consists of six distinct α (IV) chains. Recently, there has proved that there was a specific distribution of type IV collagen in skin, prostate, mammary gland, colorectal epithelia. In addition, loss of $\alpha 5/\alpha 6$ (IV) chains in the BM of cancer cell nests is associated with carcinoma invasion. In this study, we demonstrated the distribution of type IV collagen of human urogenital epithelial BMs immunohistochemically. $\alpha 1$ (IV), $\alpha 2$ (IV), $\alpha 5$ (IV) and $\alpha 6$ (IV) chains were immunoreactive in the epithelial BM of bladder, ureter, urethra and foreskin. No evidence of $\alpha 3$ (IV) and $\alpha 4$ (IV) chains were in these epithelial BM. The quantitative analysis revealed that the amount of $\alpha 2$ (IV) and $\alpha 5$ (IV) chains differed in each urogenital epithelial BM. The content of $\alpha 5$ (IV) chains in the epithelial BM of the bladder was differentially high, and that of the foreskin was differentially low. In the bladder cancer, $\alpha 5$ (IV)/ $\alpha 6$ (IV) chains do not always disappear in the BM of invasive cancer cell nests, although $\alpha 5/\alpha 6$ (IV) chains disappeared in the invasive high grade cancer cell nests and in the lymph node metastatic cancer cell nest. It is concluded that the elasticity of epithelial BM of the bladder and papillary growth of bladder cancer may be structurally related to the high content of $\alpha 5/\alpha 6$ (IV) chains.

発表論文

主論文 1冊

著者名

Masa-aki Kiyofuji, Ken-ichi Iyama, Mitsuhiko Kitaoka,
Yoshikazu Sado, Yoshifumi Ninomiya, Shou-ichi Ueda

論文題

Quantitative analysis of type IV collagen α chains in the basement
membrane of human urogenital epithelium

(ヒト泌尿生殖器上皮における IV 型コラーゲン α 鎖の
定量的検討)

雑誌名

The Histochemical Journal

巻、頁、年

34, 479-486, 2002

謝辞

本研究は、熊本大学大学院医学研究科泌尿器科学講座
上田昭一 教授の下において行いました。

医局の主な研究課題と深い関連がある分野でなく、私の希望を受け入れてくださり、病理学分野での研究をお許し戴いた事に、深く感謝いたします。また、単位修得退学後も、私の研究が続けられるよう、様々な面で御配慮して戴いた事に、御礼申し上げます。

熊本大学医学部附属病院病理部助教授 猪山賢一 助教授には、本研究の主題であるコラーゲンについての知識のみならず、研究者として今後も自立して研究発表できるよう、実験手法・学会発表・論文提出など細部にわたるまで御指導いただきました。また、社会人としても御相談にのって頂いた事もあり、助教授に御心労をおかけした事もありました。今後、医師、そして一社会人としてやっていく上で、非常に貴重な経験となりました。誠に有難うございました。

また、本研究を行うにあたり、IV型コラーゲンに関する共同実験者であり α 鎖特異抗体を供与して戴いた、岡山大学医学部分子医科学講座 二宮善文教授、重井医学研究所免疫部門 佐渡義一博士、および貴重な検体を供与して戴いた、熊本中央病院病理部 北岡光彦博士に深謝申し上げます。

略号

ABC	avidin-biotin complex
APS	3-aminopropyl triethoxysilane
BM	basement membrane
CLSM	confocal laser scanning microscopy
COL	collagen
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
G	grade
HE	hematoxylin and eosin
NC	Non-collagenous
PBS	phosphate-buffered saline
RIA	radioimmuno assay
TCC	transitional cell carcinoma

第1章 研究の背景と目的

1) 基底膜とIV型コラーゲン

基底膜は、上皮と間質の間に存在する膜様物質であり、その機能は細胞構築の保持と様々な分子に対するフィルターやバリアー機能の他に、細胞との相互作用による細胞の接着・伸張・移動・分化・増殖・蛋白合成などにも重要な役割をはたしている。

基底膜はIV型コラーゲンを足場として、ラミニン・エンタクチン/ナイドジェン・プロテオグリカンなどと共に、高分子のネット構造を形成している。基底膜の主要構成成分であるIV型コラーゲンは現在まで異なる6つの α 鎖($\alpha 1(\text{IV}) \sim \alpha 6(\text{IV})$)が存在する事が明らかとなっており(Hudson et al., 1993)、遺伝子解析の結果、これらは $\alpha 1(\text{IV})$ 鎖と $\alpha 2(\text{IV})$ 鎖、 $\alpha 3(\text{IV})$ 鎖と $\alpha 4(\text{IV})$ 鎖、 $\alpha 5(\text{IV})$ 鎖と $\alpha 6(\text{IV})$ 鎖、各々2つずつがhead-to-headの形で隣り合わせに対をなしており、 $\alpha 1(\text{IV})$ 鎖と $\alpha 2(\text{IV})$ 鎖の遺伝子(COL4A1とCOL4A2)が第13染色体q33-34の部位に(Soinen et al., 1988)、 $\alpha 3(\text{IV})$ 鎖と $\alpha 4(\text{IV})$ 鎖の遺伝子(COL4A3とCOL4A4)が第2染色体q36-37の部位に(Mariyama et al., 1994)、 $\alpha 5(\text{IV})$ 鎖と $\alpha 6(\text{IV})$ 鎖の遺伝子(COL4A5とCOL4A5)がX染色体q22の部位に(Oohashi et al., 1994; Zhou et al., 1993)存在している。その構造は α 鎖が3本でtriple helixを形成し、アミノ基末端の7S領域で4分子が会合し、カルボキシル基末端のNC(non-collagenous)領域で2分子が結合する事により立体的メッシ

ネットワーク構造を作る。そして triple helix の組み合わせとして $[\alpha 1(\text{IV})]_2 \alpha 2(\text{IV})$ (Timpl, 1989)、 $\alpha 3(\text{IV}) \alpha 4(\text{IV}) \alpha 5(\text{IV})$ (Gunwar et al., 1998)、 $[\alpha 5(\text{IV})]_2 \alpha 6(\text{IV})$ (Borza et al., 2001)が知られている。 $[\alpha 1(\text{IV})]_2 \alpha 2(\text{IV})$ 分子は全ての基底膜に存在しているのに対し、 $\alpha 3(\text{IV}) \alpha 4(\text{IV}) \alpha 5(\text{IV})$ 、および $[\alpha 5(\text{IV})]_2 \alpha 6(\text{IV})$ は臓器によって異なった分布を示す。 $\alpha 3(\text{IV}) \alpha 4(\text{IV}) \alpha 5(\text{IV})$ 分子は腎臓糸球体や一部の尿細管基底膜および肺胞上皮基底膜、 $\alpha 5(\text{IV}) \alpha 6(\text{IV})$ 分子は皮膚基底膜、平滑筋基底膜、前立腺基底膜、気管支上皮基底膜などに存在する事が明らかになっている (Dehan et al., 1997; Ninomiya et al., 1995; Mariyama et al., 1994; Sado et al., 1995; Tanaka et al., 1997)。遺伝的に腎不全を起こす事が知られているアルポート症候群では、常染色体 $\alpha 3(\text{IV}) \alpha 4(\text{IV})$ 遺伝子あるいはX染色体の $\alpha 5(\text{IV})$ 遺伝子の異常により、 $\alpha 3(\text{IV}) \alpha 4(\text{IV}) \alpha 5(\text{IV})$ 、および $[\alpha 5(\text{IV})]_2 \alpha 6(\text{IV})$ の基底膜が欠損する事が知られている (Ninomiya et al., 1995)。このことより、IV型コラーゲン α 鎖の組織特異的発現が組織の構造もしくは機能に関連する事が示唆される。

2) 移行上皮の構造と基底膜

尿路上皮は多列の被覆上皮であり、7層までの移行上皮の層状配列からなる。基底層・中間層・傍表層・表層に分類され、最表層は広い細胞質を持ち1~2核の細胞(被蓋細胞 umbrella cell)よりなり、相互に蜜に結合し、尿が壁内に侵入しないような構造となっている。

そして全ての上皮の細胞突起は下層細胞間に下垂し基底膜と結合しており、伸展時には扁平上皮のように扁平化し、排尿による収縮や蓄尿に対する壁の進展に対応できる構造となっている。一方基底膜は200~300 Åと薄く、電子顕微鏡によって確認されるまで、尿路上皮には基底膜が存在しないと考える人もいた。

このように、泌尿器系の臓器では特異な上皮・基底膜の構造を有している。

3) 癌の浸潤と IV 型コラーゲン α 鎖分子の動態について

近年、大腸癌 (Hiki Y et al., 2002)、肺腺癌 (Nakano K et al., 2001)、乳癌 (Nakano S et al., 1999)、皮膚基底細胞癌 (Tanaka K et al., 1997)、前立腺癌 (Dehan P et al., 1997)、腎細胞癌 (Lohi J et al., 1997) において、癌浸潤における IV 型コラーゲン α 鎖分子のネットワークの動態が解明されてきた。癌の初期浸潤と基底膜における [$\alpha 5(IV)$]₂ $\alpha 6(IV)$ の消失との関連が指摘され、癌浸潤過程における基底膜の再構築についても様々な仮説が立てられている。

4) 目的

正常尿路上皮基底膜における、IV 型コラーゲン $\alpha 1(IV)$ ~ $\alpha 6(IV)$ 鎖分子の動態を免疫組織学的に解析し、そのタンパクの局在と発現を明らかにし、膀胱癌における IV 型コラーゲン α 鎖分子の動態についても検討を行った。また、尿路上皮基底膜における IV 型コラーゲン

α 鎖分子ネットワークのユニークな構成について、共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析を行い、膀胱移行上皮基底膜の特殊性について検討を行った。さらに、膀胱の移行上皮癌の浸潤過程における $\alpha 5(\text{IV}) \alpha 6(\text{IV})$ 鎖の動態について検討を行った。

第2章 対象と実験方法

1) 対象

1995～2002年の間に熊本大学医学部附属病院および1997～2000年に高宮医院でインフォームド・コンセントのもとに、膀胱癌・尿管癌・包茎にて切除された組織を検索対象とした。癌病巣における病理学的組織分類は膀胱癌取り扱い規約、腎盂・尿管癌取り扱い規約に基づいて行った。

2) 実験方法

i) 組織検体作製

a) 凍結薄切標本

切除検体をOCTコンパウンドで包埋後、アセトンドライアイスにて凍結し、6 μ mの凍結連続切片を作製し、APSコートスライドガラス上へのせ、風乾後、-80 $^{\circ}$ Cにて保存した。

b) パラフィンブロック薄切標本

切除検体を15%中性緩衝ホルマリンにて固定し、パラフィンに包埋、5 μ mの連続切片を作製し、APSコートスライドガラス上へのせ、4 $^{\circ}$ Cにて保存した。

ii) Avidin-biotin 免疫染色

IV型コラーゲン α 1～ α 6鎖に対する特異抗体は、共同実験者である佐渡らが開発したラットリンパ節法により作製した抗ヒトラットモノクローナル抗体を使用した(Sado Y et al., 1995)。

前処理として凍結切片はアセトンで10分固定、6M尿素を含む0.1Mグリシン-塩酸バッファー(pH 3.5)で10分間浸し、抗原の賦活化を行った。一方パラフィン切片は脱パラフィン処理後、オートクレーブ(132 $^{\circ}$ C 303kPa)10mM/1クエン酸バッファー(pH 3.5)5分にて抗原賦活化処理を行った。

前処理の終了した切片を、内因性ペルオキシダーゼ処理のため1%過酸化水素メタノールにて30分洗浄後、5%ウサギ血清0.01M 燐酸緩衝食塩水(PBS)にて30分洗浄、一次抗体処理を4 $^{\circ}$ C overnight法で行った。免疫反応はVectastain peroxidase ABCキット(Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)を用いて行った。切片をPBSにて洗浄後、抗原抗体反応部位は0.01%過酸化水素加0.05%

3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Dojin Chemical, Tokyo, Japan) 0.05M Tris-HCl 溶液 7 分で発色させた。核染色は凍結切片はメチルグリーンで、パラフィン切片はヘマトキシリンで行った。対象コントロールは泌尿生殖器の上皮基底膜が染色されない、抗 $\alpha 3$ (IV) 抗体と抗 $\alpha 4$ (IV) 抗体を用いた。

iii) 共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM)

a) 直接法

凍結切片を PBS にて洗浄後、Texas red 標識 $\alpha 2$ (IV) 抗体と FITC 標識 $\alpha 5$ (IV) 抗体 (Shigei Medical Research Institute, Okayama, Japan) (Kagawa et al., 1997) を用いて、室温で 1 時間反応させた。PBS にて 3 回洗浄後、PBS-グリセロールで封入し、CLSM (TCS SP2; Leica Lasertechnik, Heiderberg, Germany) を用い、40 倍の対物レンズ、 1024×1024 pixel の解像度で画像を解析した。励起光波長とフィルター波長は表に記した。得られた画像の上皮基底膜上の 5 ポイントで intensity を測定し平均した数値を用いた。

b) 間接法

凍結切片を同様に前処理後、5% ヤギ血清 PBS 30 分にて処理し、各 α (IV) 1 次抗体を 4°C overnight 法で反応させた。FITC 標識抗ラットヤギ IgG(H+L) (Nordic Immunological Laboratories, Tilburg, Netherland) を 2 次抗体として使用した。その後の CLSM での評価は直接法と同様に行った。

iv) 統計処理

$\alpha 2$ (IV) 鎖と $\alpha 5$ (IV) 鎖の intensity は Wilcoxon signed-ranks test を用いて、 $\alpha 5$ (IV) と $\alpha 2$ (IV) の比は Mann-Whitney test を用いて統計処理を行った。それぞれ、5%以下を有意と判定した。

第3章 結果

1) 正常泌尿生殖器上皮基底膜におけるIV型コラーゲン α 鎖の構成

膀胱・尿管・尿道・亀頭包皮いずれも上皮の基底膜は $\alpha 1(\text{IV})$ 、 $\alpha 2(\text{IV})$ 、 $\alpha 5(\text{IV})$ 、 $\alpha 6(\text{IV})$ で構成され、 $\alpha 3(\text{IV})$ 、 $\alpha 4(\text{IV})$ は存在しなかった(図1)。

2) 共焦点レーザー顕微鏡による $\alpha(\text{IV})$ 鎖の定量的解析

a) 直接法

粘膜下小血管では $\alpha 2(\text{IV})$ 鎖を示すTexas redの強い蛍光が認められるが、上皮基底膜においては、臓器によって $\alpha 2(\text{IV})$ 鎖と $\alpha 5(\text{IV})$ 鎖の蛍光の強さが異なっていた。膀胱・尿管・尿道においてはFITCが優勢であり、特に膀胱の移行上皮基底膜においては強い緑色($\alpha 5(\text{IV})$)の蛍光を認めた。それに対し、亀頭包皮の扁平上皮基底膜は赤色($\alpha 2(\text{IV})$)が優勢であった(図2)。

蛍光のintensity(図3)(表1)を評価したところ、膀胱・尿管・尿道の上皮基底膜において $\alpha 5(\text{IV})$ が $\alpha 2(\text{IV})$ より高く、亀頭包皮の扁平上皮基底膜においては $\alpha 2(\text{IV})$ が $\alpha 5(\text{IV})$ より高かった。統計処理でも膀胱・尿管・亀頭包皮において有意差がみられた($p < 0.01$; Wilcoxon signed-ranks test)。しかし、尿道においては有意差は見られなかった。

また、 $\alpha 5(\text{IV})/\alpha 2(\text{IV})$ 比は、尿管と尿道との間では有意差はないものの、それ以外では各々の上皮で有意差が見られた(Mann-Whitney test)(図4)。

b) 間接法

蛍光標識抗体による直接法の結果をもとに、間接法による検討も行った。膀胱の移行上皮基底膜において $\alpha 5(\text{IV})$ が $\alpha 2(\text{IV})$ より強く、亀頭包皮の扁平上皮基底膜において $\alpha 2(\text{IV})$ が $\alpha 5(\text{IV})$ より強いという、直接法と同じ結果が得られた(図5)。

3) 膀胱癌におけるIV型コラーゲンの α 鎖の動態

乳頭状増殖と一部浸潤を示す移行上皮癌(TCC, G2, pT1)の腫瘍基底膜は正常膀胱と同様の $\alpha 5(\text{IV})$ 、 $\alpha 6(\text{IV})$ の強い連続性陽性像が見られる。一方、 $\alpha 1(\text{IV})$ 、 $\alpha 2(\text{IV})$ の染色性は弱い連続陽性像を示した(図6)。

異型度が増した移行上皮癌(TCC, G3>G2, pT1)の腫瘍基底膜は、浸潤先進部に $\alpha 5(\text{IV})$ 、 $\alpha 6(\text{IV})$ の不連続陽性ないし完全消失がみられた(図7)。

高度異型を伴う浸潤した膀胱癌(TCC, G3, pT3b)の腫瘍基底膜は大部分の $\alpha 5(\text{IV})$ 、 $\alpha 6(\text{IV})$ は消失していた(図8)。

膀胱癌のリンパ節転移巣では $\alpha 5(\text{IV})$ 、 $\alpha 6(\text{IV})$ は完全に消失しており、 $\alpha 1(\text{IV})$ 、 $\alpha 2(\text{IV})$ は腫瘍胞巣周囲に不連続陽性像が見られるが、腫瘍胞巣周囲に集簇した線維筋芽細胞由来の $\alpha 1(\text{IV})$ 、 $\alpha 2(\text{IV})$ と考え

られる(図 9)。

第4章 考察

1) 膀胱移行上皮基底膜の特殊性とその伸縮機能について

Seki 等(1998)は、蛍光免疫染色にて大きく伸縮する管腔臓器の固有筋層の基底膜について検討を行っている。膀胱平滑筋・胃底部平滑筋・子宮平滑筋において、 $\alpha 5(\text{IV})/\alpha 6(\text{IV})$ 鎖の発現が見られる事を確認し、 $\alpha 5(\text{IV})/\alpha 6(\text{IV})$ 鎖が臓器の拡張や伸張性と圧に対する防御機能に関連する事を示唆している。また、Borza 等(2001)は膀胱平滑筋における $\alpha 1/\alpha 2/\alpha 5/\alpha 6(\text{IV})$ からなる6量体が、動脈壁平滑筋の基底膜より多い事を示している。本研究では共焦点レーザー顕微鏡(CLSM)を用いて上皮基底膜 $\alpha(\text{IV})$ 鎖の発現の定量的解析を行ったのであるが、膀胱・尿管において $\alpha 5/\alpha 6(\text{IV})$ が $\alpha 1/\alpha 2(\text{IV})$ に比して有意に発現量が高く、逆に亀頭包皮においては $\alpha 1/\alpha 2(\text{IV})$ が $\alpha 5/\alpha 6(\text{IV})$ より有意に発現量が高い事がわかった。また、検討した尿路系組織の上皮基底膜の中で、 $\alpha 5/\alpha 6(\text{IV})$ 鎖が最も多いのは膀胱である事を明らかにした。尿路系上皮は、収縮・拡張いずれの状態でも尿が漏れないようなデスモゾーム結合を持つ移行上皮で覆われており、基底膜においても同様の理由でIV型コラーゲンの質的に特異なメッシュワーク構造をもつのではないかと推察される。膀胱の移行上皮基底膜が $\alpha 5/\alpha 6(\text{IV})$ 鎖を最も多く有するという今回の結果は、膀胱が400ml程の蓄尿に耐え、排尿時には空虚となる状態を一日の間に何度も繰り返す事と関連して考えれば、基底膜の伸縮性と密接に関連して

いるといえる。

2) 共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) を用いた IV 型コラーゲン α 鎖 の定量的解析の試み

組織内・細胞内のタンパクの定量法は、Western blot を含めて様々な方法が存在する。これらの方法は有益な定量的データを得る事ができるが、細胞・組織の破壊、目的とするタンパクの抽出が必要であり、このことは組織学的な局在との比較検討を不可能にしている。そのため、免疫組織化学的手法で得られた検体を用いて、1 視野あたりの染色された細胞の数を数えるといった、簡便な方法が良く行われる。これは鏡頭者の主観が入り込みやすく、しかも (+++, ++, +, -) で表記するなかばおおざっぱな定性的解析である。また、免疫組織化学法では抗原の正確な量を測定できないとの報告もある (Watanabe J et al., 1991)。

近年 CLSM を用いた定量方法が確立されつつある (Brown A et al., 1993, Verschure PJ et al., 1997)。CLSM は焦点外の構造物の影響がなく (Haas KM et al., 2001)、適切なフィルターを用いれば組織の自家蛍光を取り除く事ができる (Verschue PJ et al., 1997)。膀胱の移行上皮基底膜は非常に薄く、生化学的に適切な量を抽出する事が困難なため、本研究では CLSM を用いた α (IV) 鎖の定量的解析を試みた。直接法によって自家蛍光の影響を殆んど受けることなく、膀胱・尿管・尿道・亀頭包皮の上皮基底膜の IV 型コラーゲン α (IV) 鎖の定量とその有意差検定を行う事ができた。

3) 膀胱癌の浸潤と IV 型コラーゲン α 鎖の動態について

大腸癌 (Hiki Y et al., 2002)、肺腺癌 (Nakano K et al., 2001)、乳癌 (Nakano S et al., 1999)、皮膚基底細胞癌 (Tanaka K et al., 1997)、前立腺癌 (Dehan P et al., 1997)、腎細胞癌 (Lohi J et al., 1997) において、明らかな浸潤癌では基底膜の消失が見られるのは当然として、早期浸潤癌において $\alpha 1(\text{IV})/\alpha 2(\text{IV})$ 鎖は残存し $\alpha 3(\text{IV})/\alpha 4(\text{IV})/\alpha 5(\text{IV})$ 鎖、もしくは $\alpha 5(\text{IV})/\alpha 6(\text{IV})$ 鎖が消失する事が現在までに知られている事実である。また、癌の浸潤の過程において癌と間質との相互作用によって、基底膜の再構成が行われる事の仮説が提唱されている。

膀胱癌では初期浸潤では $\alpha 5(\text{IV})/\alpha 6(\text{IV})$ 鎖の消失はなく、高度異型や高度浸潤を示す膀胱癌で初めて $\alpha 5(\text{IV})/\alpha 6(\text{IV})$ 鎖が完全に消失する事が、本研究で明らかになった。これは、膀胱移行上皮の基底膜の構造が $\alpha 5(\text{IV})/\alpha 6(\text{IV})$ 鎖に富み、他の上皮基底膜と明らかに異質なため、癌の浸潤過程における基底膜の再構成の過程で、他の癌と異なる発現調節が起こっているためと考えられた。

4) 今後の検討課題

CLSMでの定量的解析は、適切な抗体と検体があれば、非常に簡便で短時間に施行できる方法である。しかし、ホルマリン固定標本ではタンパクのcrosslinkingがおこるため (Craven RA et al., 2002)、凍結切片でしか行う事ができない。また、対照切片と比較しての相対

値を検討したものであり、実際のタンパク量とCLSMによる定量的解析の相関性を検討した報告は見られず、我々も現在データをもちあわせていない。今後、radioimmuno assay (RIA) やenzyme - linked immunosorbent assay (ELISA) など、実際のタンパク量とCLSMの解析データとの相関性に関する検討や、recombinant 蛋白を用いてのin vitroの系でCLSMとタンパク量との相関性の検討が必要であると思われる。

参考文献

Borza DG, Bondar O, Ninomiya Y, Sado Y, Naito I, Todd P, Hudson BG (2001) The NC1 domain of collagen IV encodes a novel network composed of the $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 5$, and $\alpha 6$ chains in smooth muscle basement membranes. *J Biol Chem* 276: 28532-28540

Brown A, Li Y, Slaughter T, Black MM (1993) Composite microtubules of the axon: quantitative analysis of tyrosinated and acetylated tubulin along individual axonal microtubules. *J Cell Sci* 104: 339-352

Craven RA, Totty N, Harnden P, Selby PJ, Banks RE (2002) Laser capture microdissection and two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis: evaluation of tissue preparation and sample limitations. *Am J Pathol* 160: 815-822

Dehan P, Waltregny D, Beschin A, Noel A, Castronovo V, Tryggvason K, De Leval J, Foidart JM (1997) Loss of type IV collagen alpha 5 and alpha 6 chains in human invasive prostate carcinomas. *Am J Pathol* 151: 1097-1104

Gunwar S, Ballester F, Noelken ME, Sado Y, Ninomiya Y, Hudson BG (1998) Glomerular basement membrane. *J Biol Chem* 273: 8767-8775

Haas KM, Berndt A, Stiller KJ, Hyckel P, Kosmehl H (2001) A comparative quantitative analysis of laminin-5 in the basement membrane of normal, hyperplastic, and malignant oral mucosa by confocal immunofluorescence imaging. *J Histochem Cytochem* 49: 1261-1268

Hiki Y, Iyama K, Tsuruta J, Egami H, Kamio T, Suko S, Naito I, Sado Y, Ninomiya Y, Ogawa M (2002) Differential distribution of basement membrane type IV collagen $\alpha 1(IV)$, $\alpha 2(IV)$, $\alpha 5(IV)$, and $\alpha 6(IV)$ chains in colorectal epithelial tumors. *Pathol Int* 52: 224-233

Hudson BG, Reeders ST, and Tryggvason K (1993) Type IV collagen: structure, gene organization, and role in human diseases. *J Biol Chem* 268: 26033-26036

Kagawa M, Kishiro Y, Naito I, Nemoto T, Nakanishi H, Ninomiya Y, Sado Y (1997) Epitope-defined monoclonal antibodies against type-IV collagen for diagnosis of Alport's syndrome. *Nephrol Dial Transplant* 12: 1238-1241

Lohi J, Korhonen M, Leivo I, Kangas L, Tani T, Kalluri R, Miner JH, Lehto VP, Virtanen I (1997) Expression of type IV collagen $\alpha 1(IV)$ - $\alpha 6(IV)$ polypeptides in normal and developing human kidney and in renal cell carcinomas and oncocytomas. *Int J Cancer* 72: 43-49

Mariyama M, Leinonen A, Mochizuki T, Tryggvason K, Reeders ST (1994) Complete primary structure of the human $\alpha 3(IV)$ collagen chain. *J Biol Chem* 269: 23013-23017

Nakano K, Iyama K, Mori T, Yoshioka M, Hiraoka T, Sado Y, Ninomiya Y (2001) Loss of alveolar basement membrane type IV collagen $\alpha 3$, $\alpha 4$, and $\alpha 5$ chains in bronchioloalveolar carcinoma of the lung. *J Pathol* 194: 420-427

Nakano S, Iyama K, Ogawa M, Yoshioka H, Sado Y, Oohashi T, Ninomiya Y (1999) Differential tissular expression and localization of type IV collagen $\alpha 1(IV)$, $\alpha 2(IV)$, $\alpha 5(IV)$, and $\alpha 6(IV)$ chains and their mRNA in normal breast and in benign and malignant breast tumors. *Lav Invest* 79: 281-292

Ninomiya Y, Kagawa M, Naito I, Kishiro Y, Seyer JM, Sugimoto M, Oohashi T, Sado Y (1995) Differential expression of two basement membrane collagen genes, COL4A6 and COL4A5, demonstrated by immunofluorescence staining using peptide-specific monoclonal antibodies. *J Cell Biol* 130: 1219-1229

Oohashi T, Sugimoto M, Mattei MG, Ninomiya Y (1994) Identification of a new collagen IV chain, alpha 6(IV), by cDNA isolation and assignment of the gene to chromosome Xq22, which is the same locus for COL4A5. *J Biol Chem* 269: 7520-7526

Sado Y, Kagawa M, Kishiro Y, Sugihara K, Naito I, Seyer JM, Sugimoto M, Oohashi T, Ninomiya Y (1995) Establishment by the rat lymph node method of epitope-defined monoclonal antibodies recognizing the six different α chains of human type IV collagen. *Histochem Cell Biol* 104:267-275

Seki T, Naito I, Oohashi T, Sado Y, Ninomiya Y (1998) Differential expression of type IV collagen isoforms, $\alpha 5(\text{IV})$ and $\alpha 6(\text{IV})$ chains, in basement membranes surrounding smooth muscle cells. *Histochem Cell Biol* 110: 359-366

Soininen R, Huotari M, Hostikka SL, Prockop DJ, Tryggvason K (1988) The structural genes for alpha 1 and alpha 2 chains of human type IV collagen are divergently encoded on opposite DNA strands and have an overlapping promoter region. *J Biol Chem* 263: 17217-17220

Tanaka K, Iyama K, Kitaoka M, Ninomiya Y, Oohashi T, Sado Y, Ono T (1997) Differential expression of $\alpha 1(\text{IV})$, $\alpha 2(\text{IV})$, $\alpha 5(\text{IV})$ and $\alpha 6(\text{IV})$ collagen chains in the basement membrane of basal cell carcinoma. *Histochem J* 29: 563-570

Timpl R (1989) Structure and biological activity of basement membrane proteins. *Eur J Biochem* 180: 487-502

Verschure PJ, Van Marle J, Van Noorden CJF, Van Den Berg WB. (1997) The contribution of quantitative confocal laser scanning microscopy in cartilage research: chondrocyte insulin-like growth factor-1 receptors in health and pathology. *Microsc Res Techniq* 37: 285-298

Watanabe J, Kanai K, Kanamura S (1991) Measurement of NADPH-ferrihemoprotein reductase content in sections of liver. *J Histochem Cytochem* 39: 1635-1643

Zhou J, Mochizuki T, Smeets H, Antignac C, Laurila P, de Paepe A, Tryggvason K, Reenders ST (1993) Deletion of the paired alpha 5(IV) and alpha 6(IV) collagen genes in inherited smooth muscle tumors. *Science* 261: 1167-1169

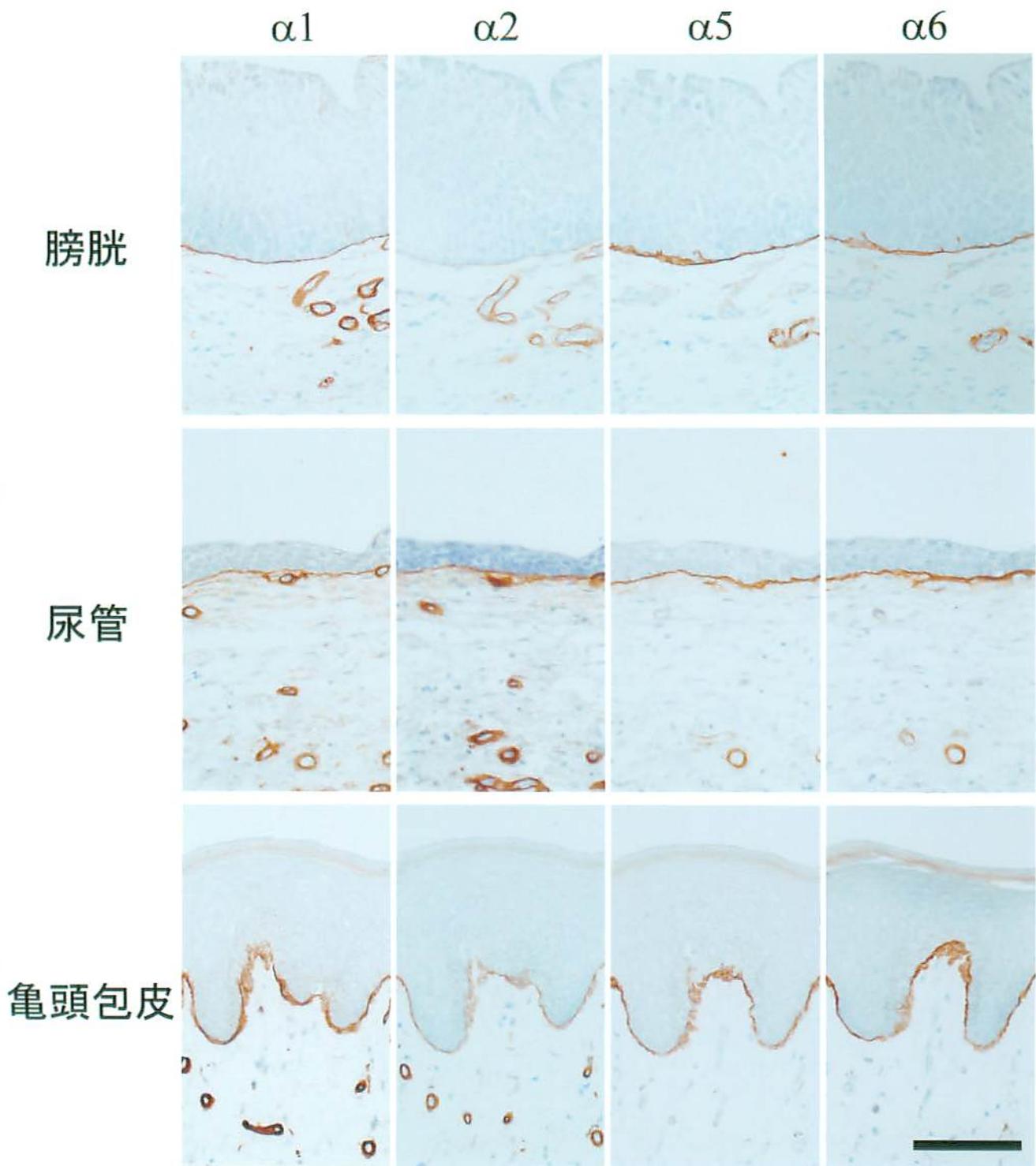


図1. 正常泌尿生殖器における $\alpha 1$ (IV)鎖 $\sim\alpha 6$ (IV)鎖の発現
膀胱・尿管・亀頭包皮、いずれも上皮の基底膜には $\alpha 1$ (IV)・ $\alpha 2$ (IV)・ $\alpha 5$ (IV)・ $\alpha 6$ (IV)が存在する。

Scale bar = 100 μ m

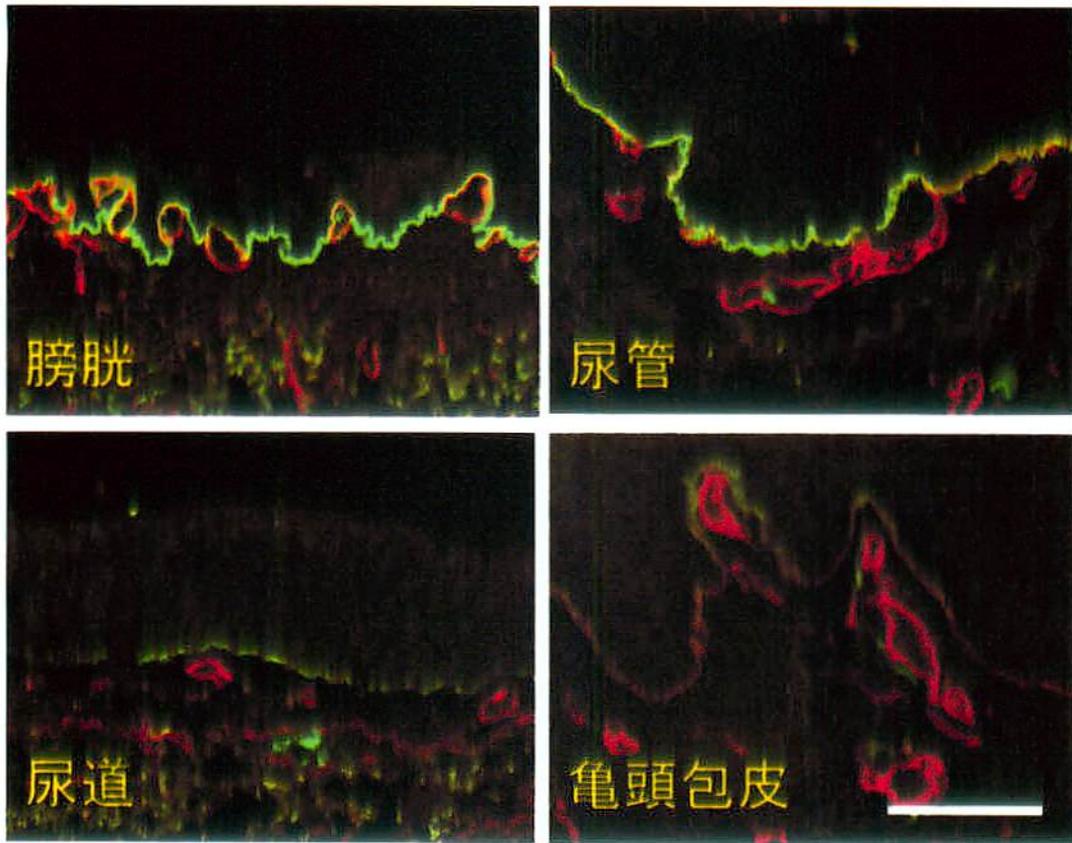


図2. 共焦点レーザー顕微鏡 直接法

膀胱上皮基底膜において緑色($\alpha 5(\text{IV})$)の強い蛍光が見られる。一方亀頭包皮の上皮基底膜は赤色($\alpha 2(\text{IV})$)の強い蛍光が認められる。何れの検体でも粘膜下毛細血管は赤色($\alpha 2(\text{IV})$)のみの強い蛍光を認める。

Scale bar = 50 μm

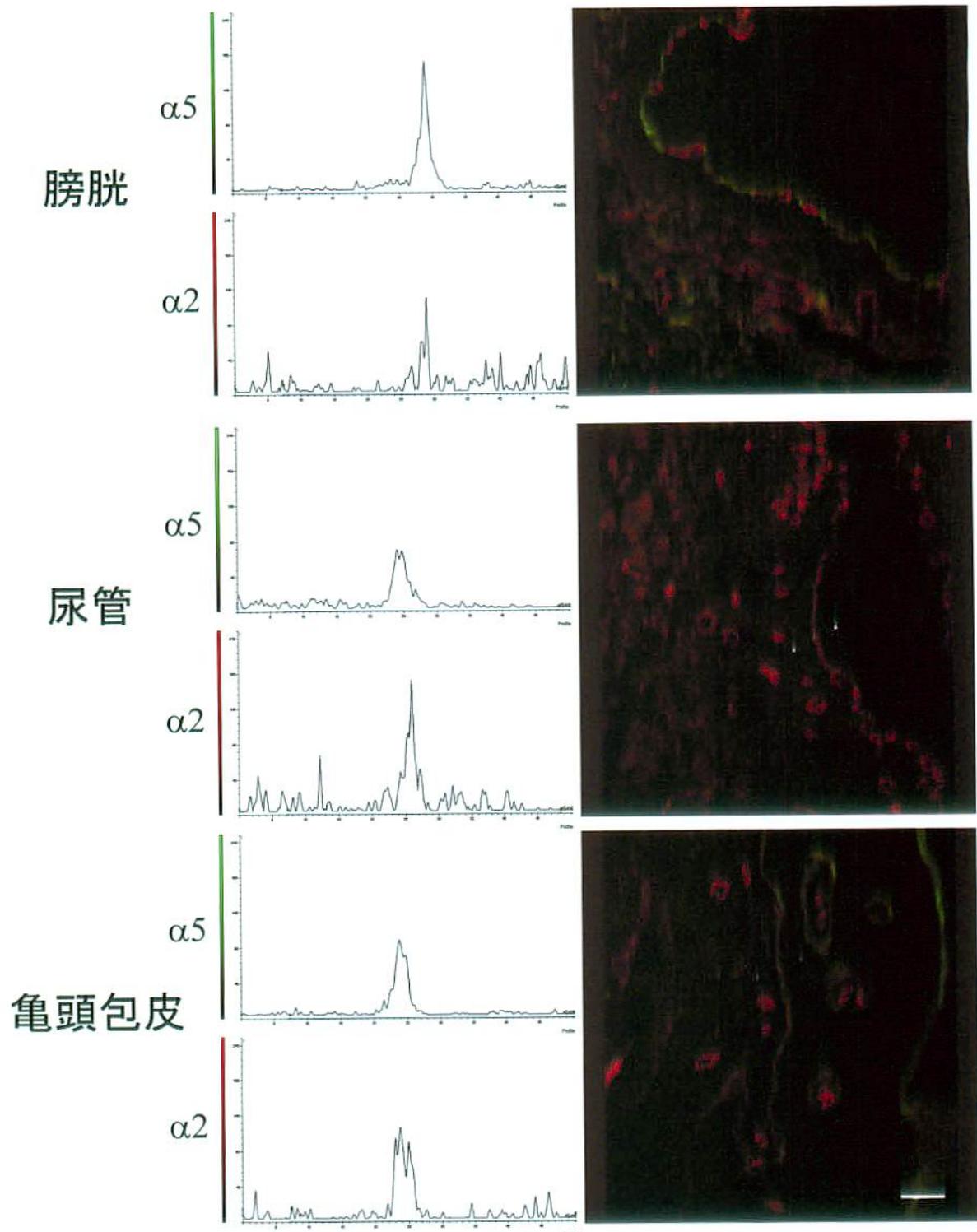


図3. Intensityの測定

左側が測定値、右に測定位置を示す。
 右CLSM画像上の白線が測定したラインで、左パネル、上が $\alpha 5$ 、下が $\alpha 2$ の測定値である。

Scale bar = 50 μ m

CLSM data of the immunofluorescent intensity values of urogenital epithelial BMs

Case no	Organ	MI of $\alpha 5$ chain	MI of $\alpha 2$ chain	$\alpha 5/\alpha 2$ ratio	Case no	Organ	MI of $\alpha 5$ chain	MI of $\alpha 2$ chain	$\alpha 5/\alpha 2$ ratio
1	bladder	156.0	55.0	2.84	29	ureter	214.8	150.2	1.43
2	bladder	214.0	84.0	2.55	30	ureter	151.8	159.6	0.95
3	bladder	177.0	73.6	2.40	31	ureter	179.6	200.4	0.90
4	bladder	231.2	65.6	3.52	32	ureter	219.2	135.6	1.62
5	bladder	220.4	65.8	3.35	33	ureter	207.8	157.0	1.32
6	bladder	224.6	56.4	3.98	34	ureter	191.4	142.8	1.34
7	bladder	207.6	63.4	3.27	35	ureter	226.8	129.6	1.75
8	bladder	175.2	62.6	2.80	36	ureter	177.8	183.4	0.97
9	bladder	228.8	109.6	2.09	37	ureter	189.6	209.8	0.90
10	bladder	255.0	137.4	1.86	38	ureter	218.8	205.0	1.07
11	bladder	250.0	143.8	1.42	39	ureter	222.4	198.6	1.12
12	bladder	235.8	143.8	1.64	40	ureter	197.6	214.0	0.92
13	bladder	223.2	119.8	1.86	41	ureter	221.4	177.2	1.25
14	bladder	245.0	104.8	2.34	42	urethra	218.2	102.2	2.14
15	bladder	207.0	166.4	1.24	43	urethra	130.6	137.4	0.95
16	bladder	240.0	160.0	1.50	44	urethra	190.6	160.8	1.19
17	bladder	248.4	114.6	2.17	45	urethra	231.8	153.6	1.51
18	bladder	242.6	80.8	3.00	46	urethra	221.6	136.6	1.62
19	bladder	238.2	96.2	2.48	47	foreskin	76.2	82.0	0.93
20	bladder	247.8	104.0	2.38	48	foreskin	64.2	109.6	1.03
21	bladder	246.0	94.4	2.61	49	foreskin	50.2	131.6	0.38
22	ureter	237.2	115.4	2.06	50	foreskin	69.6	150.2	0.46
23	ureter	219.4	153.2	1.43	51	foreskin	89.2	127.2	0.70
24	ureter	221.6	116.0	1.91	52	foreskin	73.0	138.6	0.53
25	ureter	196.4	153.6	1.28	53	foreskin	64.4	104.4	0.62
26	ureter	178.6	139.2	1.28	54	foreskin	101.4	89.8	1.13
27	ureter	180.2	177.4	1.02	55	foreskin	56.2	105.0	0.54
28	ureter	155.4	165.6	0.94	56	foreskin	66.8	92.2	0.72

*M.I. : mean intensity

表1. 測定結果

The ratios of $\alpha 5 / \alpha 2(\text{IV})$ fluorescent intensity by CLSM

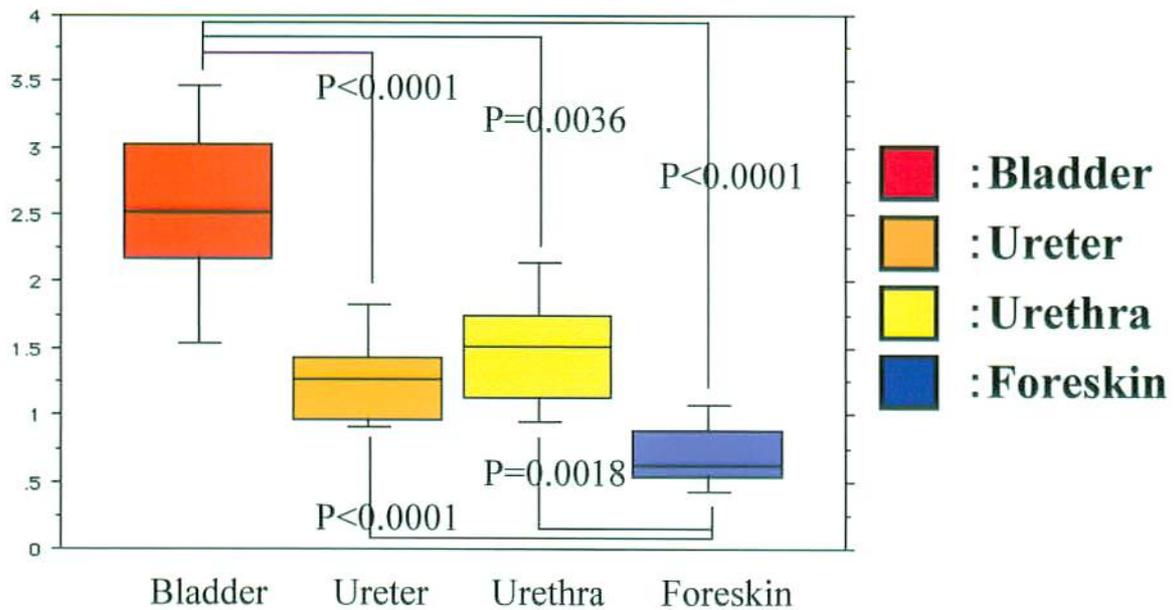


図4. $\alpha 5(\text{IV}) / \alpha 6(\text{IV})$ 比の比較

尿道—尿管との有意さは認めないものの、それ以外では各々の上皮で有意差が見られた。
特に膀胱の移行上皮基底膜に $\alpha 5(\text{IV}) / \alpha 2(\text{IV})$ が著しく高い事が確認できる。

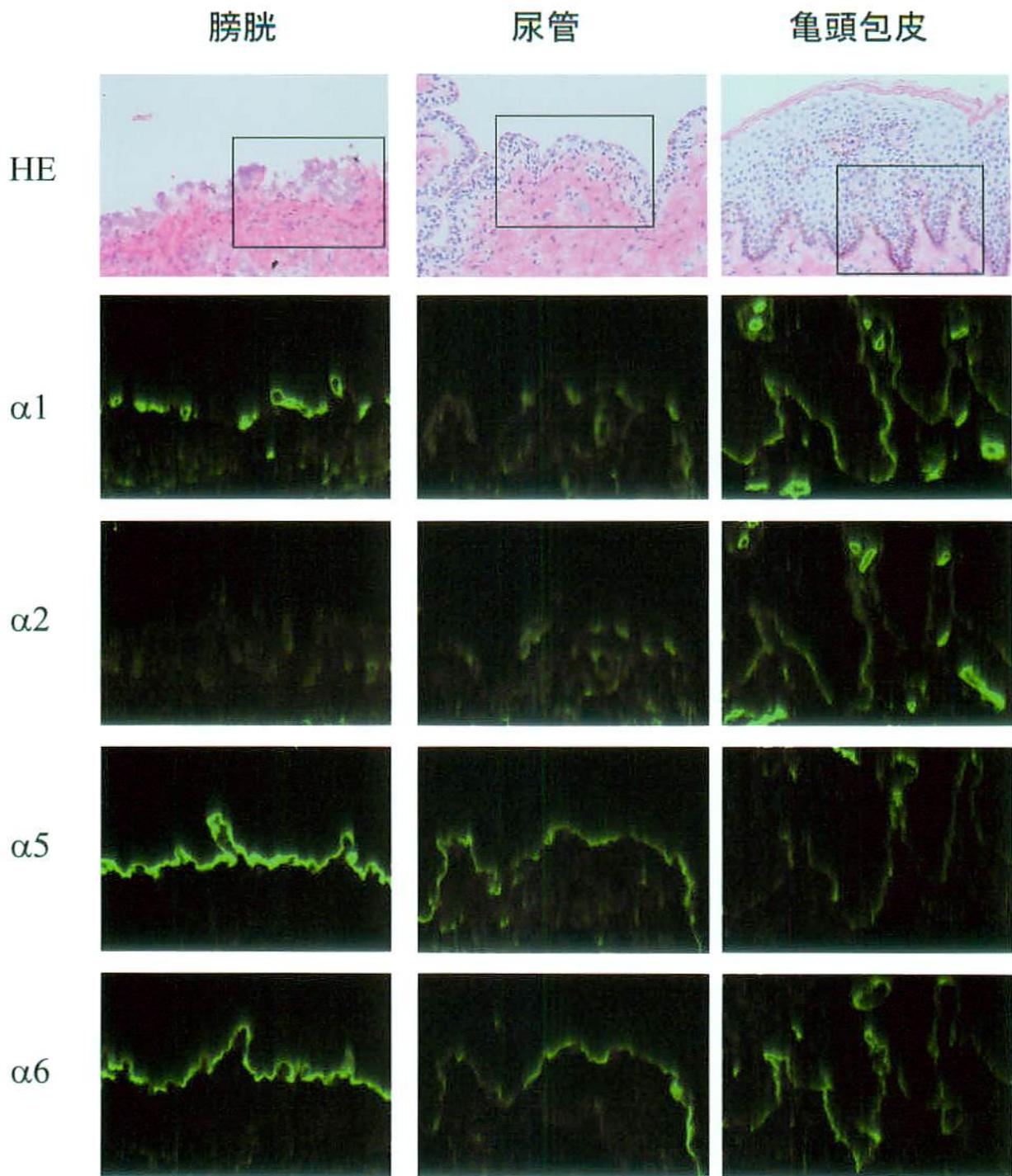


図5. 間接法におけるCLSMデータ

膀胱上皮基底膜は $\alpha 5/\alpha 6$ 鎖の発現が尿管や包皮の上皮基底膜に比較して明らかに蛍光の強さが高い。一方、 $\alpha 1/\alpha 2$ 鎖は膀胱での発現が、包皮の基底膜に比較して明らかに低い。

これは、直接法で得られた結果と同様であった。



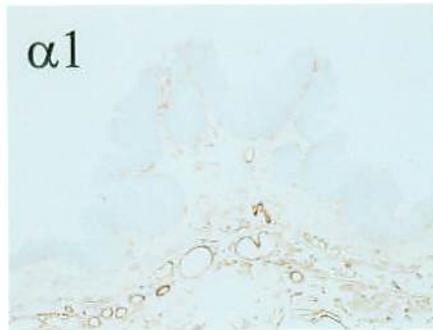
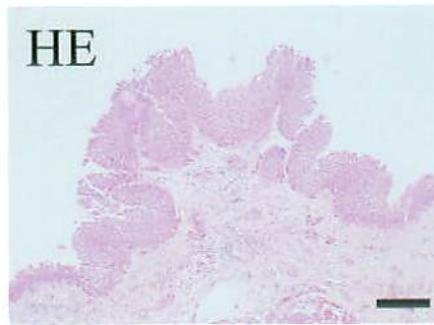


図6. Transitional Cell Carcinoma, G2, pT1

乳頭状に増殖した移行上皮癌の基底膜において $\alpha 5(\text{IV}) \cdot \alpha 6(\text{IV})$ の連続性は良く保たれている。

Scale bar = 200 μm



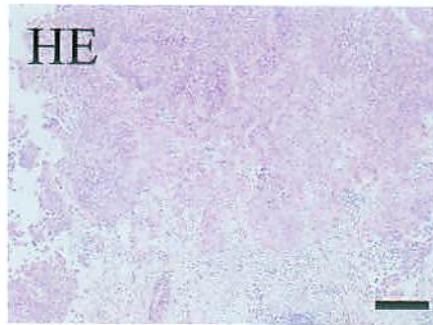


図7. Transitional Cell Carcinoma, G3>G2, pT1

乳頭状移行上皮癌の浸潤先端部において $\alpha 5(\text{IV})$ ・ $\alpha 6(\text{IV})$ の消失が見られる。
Scale bar = 200 μm

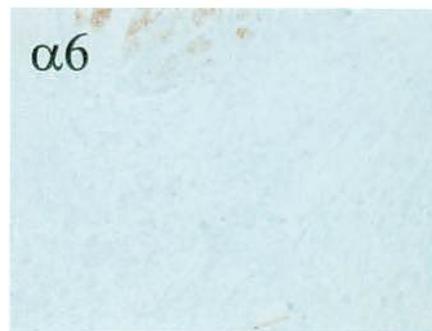
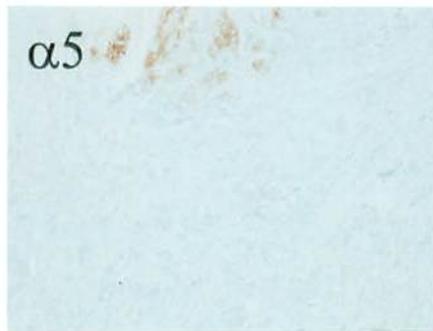
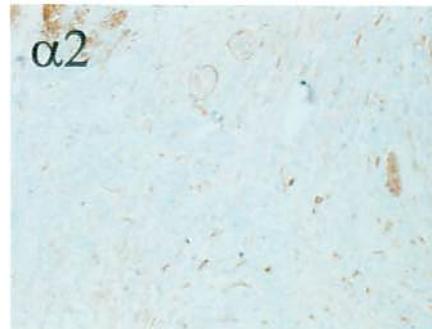
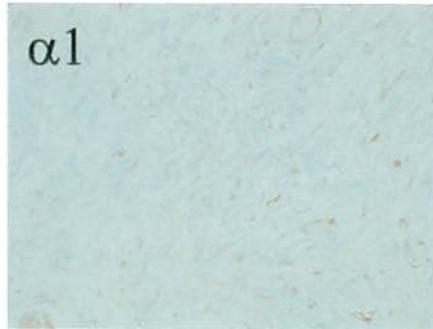
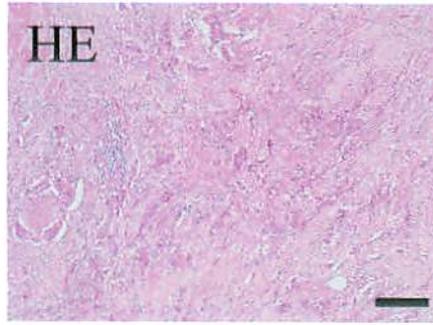


図 8. Transitional Cell Carcinoma, G3, pT3b

高度異型を伴う移行上皮癌においても $\alpha 1(\text{IV}) \cdot \alpha 2(\text{IV}) \cdot \alpha 5(\text{IV}) \cdot \alpha 6(\text{IV})$ の消失傾向が目立つ。

Scale bar = 200 μm



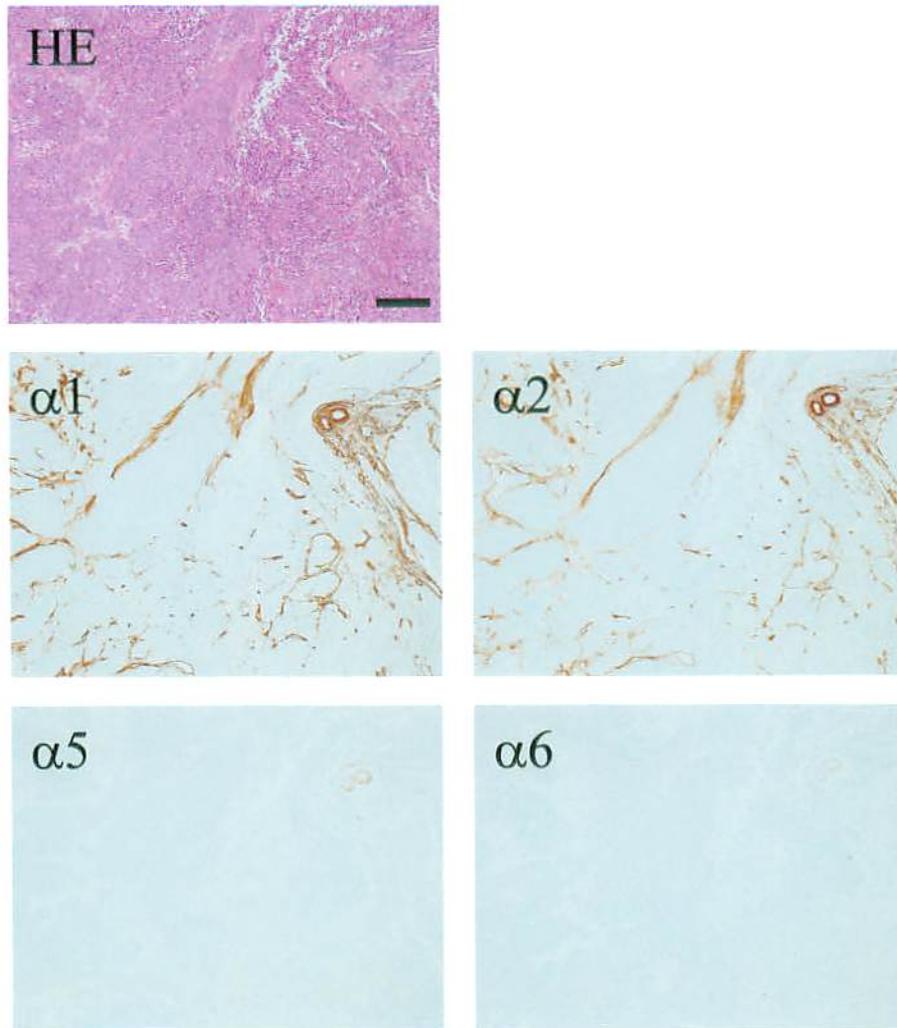


図 9. Lymph Node Metastasis

移行上皮癌のリンパ節転移巣では癌胞巣周囲の基底膜は $\alpha 5(\text{IV}) \cdot \alpha 6(\text{IV})$ は完全に消失している。右上の血管平滑筋は陽性コントロールとして、 $\alpha 5(\text{IV}) \cdot \alpha 6(\text{IV})$ の染色が見られる。

また、腫瘍胞巣に $\alpha 1(\text{IV}) \cdot \alpha 2(\text{IV})$ の不連続陽性が見られるが、周囲に集簇した線維筋芽細胞由来と考えられる。

Scale bar = 200 μm