

各種肝疾患におけるプロテオデルマタン 硫酸の局在に関する検討

新潟大学医学部第三内科学教室（主任：市田文弘教授）

桧 森 昌 門

An Immunohistological Study on Proteodermatan Sulfate
in Various Liver Diseases

Masato HIMORI

Third Department of Internal Medicine, Niigata University School of Medicine
(Director: Prof. Fumihiko ICHIDA)

Fibrotic process in liver diseases is based on the quantitative changes of extracellular matrix components.

In this study, the localization of proteodermatan sulfate (PDs) was investigated in 55 cases with various liver diseases. Polyclonal antibodies to the core protein of PDs isolated and purified from human placenta, fibronectin, laminin and type III collagen were used for this purpose.

Results indicated that PDs was mainly localized at the matured fibrotic areas rather than the areas of liver cell necrosis or of inflammatory cell infiltration where new fibrogenesis was predicted.

These data suggest that PDs has more close interrelationship with matured collagen fibers (type I collagen) in contrast to fibronectin or type III collagen and that PDs plays an important role in the conservation of hepatic fibrosis rather than in new fibrogenesis.

Key words: hepatic fibrosis, extracellular matrix, proteodermatan sulfate (PDs)

肝線維化, 細胞外基質, プロテオデルマタン硫酸

緒 言

プロテオグリカンはタンパク質（コア蛋白）と酸性ムコ多糖の複合体で、軟骨、骨、腱、皮膚などの結合組織に多く存在し、細胞外マトリックスの基質を構成する重

要な成分である。コラーゲンやフィブロンectin、ラミニンなど他の糖蛋白と共に臓器線維化において重要な役割を果たすが¹⁾、肝臓では native な形でのプロテオグリカンの抽出が困難なことから、主にその糖鎖部分であるグルコサミノグリカンについて組織化学的および生化

Reprint requests to: Masato HIMORI,
Third Department of Internal Medicine,
Niigata University School of Medicine,
Niigata City, 951, JAPAN.

別刷請求先: 〒951 新潟市旭町通1番町
新潟大学医学部第三内科学教室
桧 森 昌 門

学的に研究されてきた。グリコサミノグリカンにはヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸、ヘパラン硫酸、ヘパリン、ケラタン硫酸などが知られているが、プロテオグリカンのグリコサミノグリカン成分が明らかであるときにプロテオデルマタン硫酸、プロテオヘパラン硫酸などと呼ばれる。これらのグリコサミノグリカンのうち、肝臓の線維化に関わっているのはデルマタン硫酸とヘパラン硫酸であると言われている²⁾³⁾。

最近、プロテオグリカンを構成するコア蛋白についての研究が進み、線維化の進展過程におけるコア蛋白の役割が重要視され⁴⁾、線維化進展部位ではデルマタン硫酸のみでなくコア蛋白との複合体として働くことが必要であり⁵⁾、さらに、フィブロネクチンがコラーゲン蛋白およびプロテオグリカンと結合することにより可溶性コラーゲンが不溶化するといわれており⁶⁾、肝線維化過程におけるこれら細胞外基質構成成分の変動を知ることは線維化の機序を解明する上で重要である。今回、プロテオデルマタン硫酸のコア蛋白に対する抗体を用いて各種肝疾患における肝組織内分布を検討したのでフィブロネクチン、ラミニン、Ⅲ型コラーゲンの分布と対比しながら主として光顕的、一部電顕的に検討を加えた。

対象及び方法

対象は肝臓の組織的变化が軽微で、非特異性反応と診断した3例、急性肝炎5例、慢性肝炎（非活動性）10例、慢性肝炎（活動性）6例、アルコール性肝障害16例（肝線維症12例、アルコール性肝炎4例）、肝硬変10例、肝細胞癌5例の計55例である。標本の採取は肝細胞癌例では剖検、他の例では腹腔鏡下肝生検にて採取した標本を用いた。

使用した抗プロテオデルマタン硫酸抗体は、伊勢村により人成熟胎盤ホモジネート4M尿素抽出液より得られたフィブロネクチン非結合性画分中より精製した、側鎖として一つのデルマタン硫酸を持つ分子量約105,000のプロテオデルマタン硫酸のコア蛋白に対する家兎ポリクローナル抗体である。抗フィブロネクチン抗体は人血漿より精製して得たフィブロネクチンに対する家兎ポリクローナル抗体⁷⁾を用い、抗ラミニン抗体はBRL社製のマウスEHS肉腫由来のラミニンに対する家兎ポリクローナル抗体、抗Ⅲ型コラーゲン抗体はAbvance社製のウシ真皮Ⅲ型コラーゲンに対するポリクローナル抗体を使用した。陰性対照としてPBS、家兎のnon-immune serumを一次抗体の代わりに用いた。光顕的に

は10%中性緩衝ホルマリン固定後、パラフィン包埋を行った通常的光顕用ブロックより得られた切片を0.2%ペプシンで37℃120分処理後⁸⁾、一次抗体と反応させ、ベクター社のベクタステインABCキットを用いてA-BC (Avidin-Biotin-Peroxidase Complex) 法にて染色し、鏡検した。

発色基質にはDAB (3, 3'-diaminobenzidine, 4HCl)を用いた。電顕用には肝生検組織を2%パラホルムアルデヒドと飽和ピクリン酸溶液〔Zamboni液〕にて4℃、4時間固定後、エタノール脱水を行い、EPON-812に包埋した。1μmの厚切り切片のトルイジンブルー染色標本で、門脈域、肝小葉内、線維化部分などを選んでブロックをトリミング後、LKB8800型ミクロトームにて薄切し、コロジオン膜を張ったニッケルグリッドに切片を載せ、10%過酸化水素水にて10分間のエッチングを行ったのち、プロテオデルマタン硫酸のコア蛋白に対する抗体と4℃、over night 反応させ、10倍に希釈したプロテインAゴールド(EY Lab.)と60分間インキューベーションした後に、PBSにて洗浄し、酢酸ウラニルとクエン酸鉛による二重染色を行い、JEM1200EXにて観察した。

結 果

1. 光顕的検討

抗プロテオデルマタン硫酸コア蛋白抗体に対する反応産物は非特異性反応例では門脈域および中心静脈壁の既存の線維存在部位に認めたが、類洞には部分的な沈着を認めたにすぎなかった (Fig. 1)。各種肝疾患におけるプロテオデルマタン硫酸は正常肝と同様に既存のコラーゲン線維の存在部位に一致してその存在を認めたが、さらに門脈域の拡大と共に同部位に増加していた (Fig. 2a, 3a, 4)。しかし慢性肝炎の門脈域において浸潤細胞が存在する部位ではその増加は軽度であり (Fig. 2a)、同様に巣状壊死部分や piecemeal necrosis 部分にはプロテオデルマタン硫酸の沈着を殆ど認めなかった。アルコール性肝障害では門脈域と一部の肝細胞周囲性線維化部分に沈着を認めた (Fig. 3a)。肝硬変では拡大した門脈域及び線維性隔壁に著明な沈着の増加を認めた (Fig. 4)。肝細胞癌では癌細胞を取り巻く間質に強陽性であった。一方、他の肝細胞外マトリックスの局在をみると、フィブロネクチンは肝実質内では主に類洞に沿って沈着をみとめ、脈管周囲や既存のコラーゲン線維部分における沈着は軽度であった (Fig. 2b, 3b)。慢性肝炎では巣状壊死部分や piecemeal necrosis 部に沈着の増加を

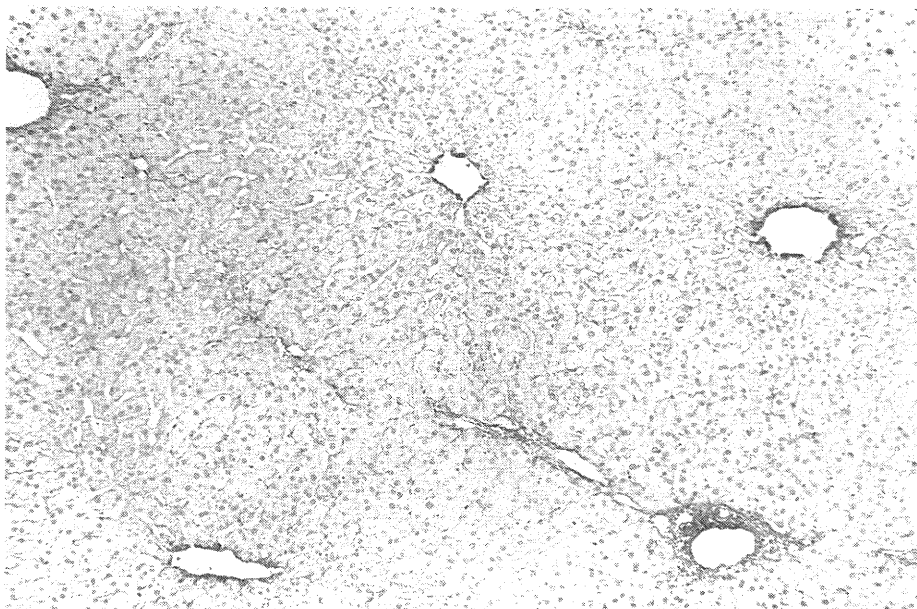


Fig. 1 Distribution of proteodermatan sulfate (PDs) in NSR (non-specific reaction). PDs is observed on fibrotic areas of portal and perivenular areas. PDs is detected in sinusoids only partially. (counterstained by methylgreen).

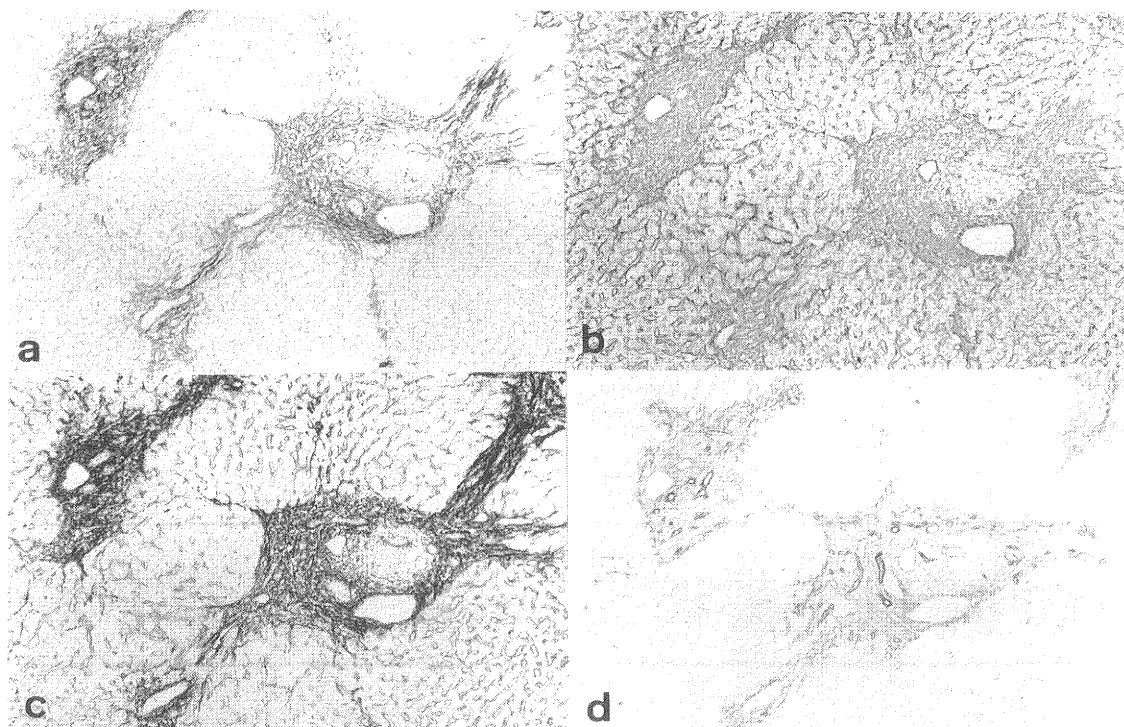


Fig. 2 Distributions of PDs(a), fibronectin(b), type III collagen(c), laminin(d) in chronic active hepatitis.

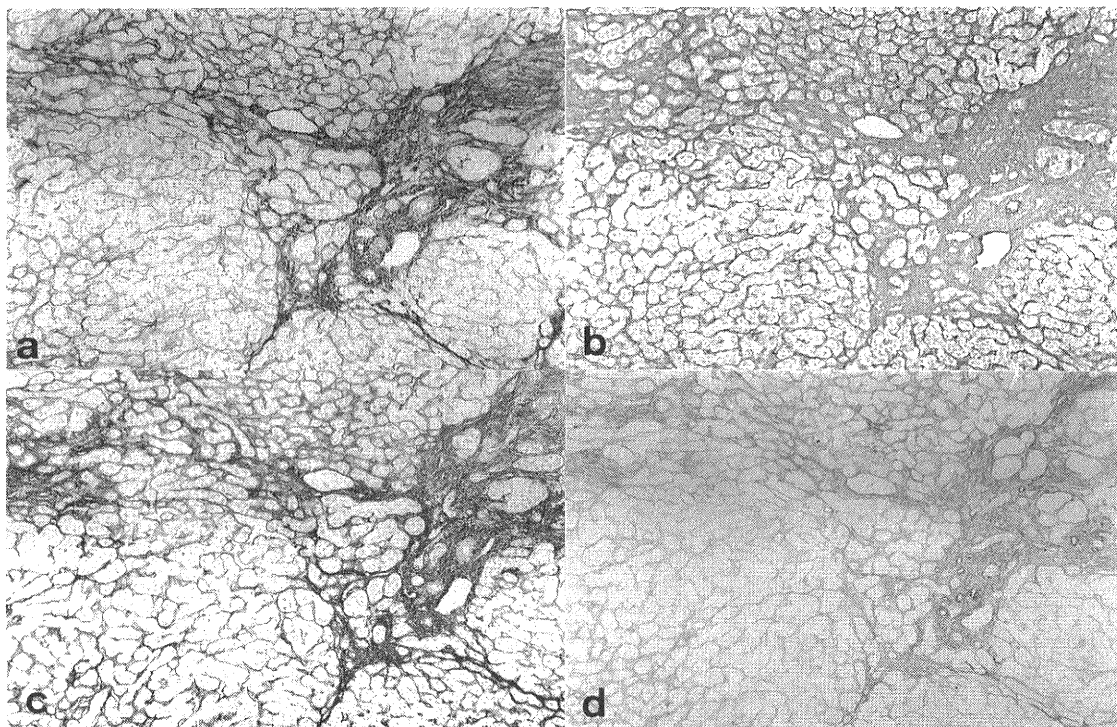


Fig. 3 Distributions of PDs(a), fibronectin(b), type III collagen(c), laminin(d) in alcoholic fibrosis.

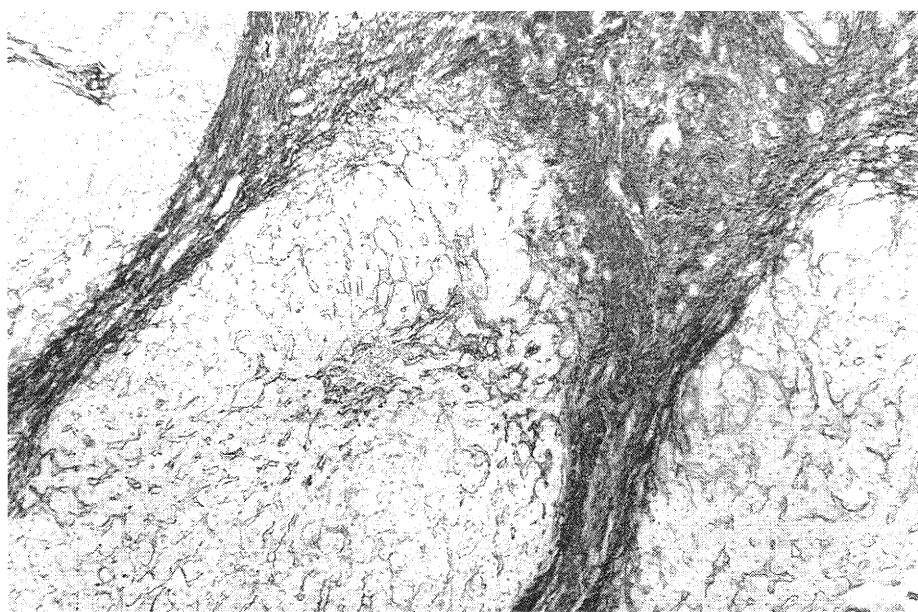


Fig. 4 Distribution of PDs in liver cirrhosis. PDs is markedly observed in fibrotic areas.

見た (Fig. 2b). III型コラーゲンは類洞及び既存のコラーゲン線維部分に認め、線維化の進展にともなって増加した (Fig. 2c, 3c). 更に慢性肝炎においては巣状壊死部分や piecemeal necrosis 部分においてもフィブロネクチンより軽度ながら増加を認めた (Fig. 2c). アルコール性肝障害の肝細胞周囲性線維化部における肝細胞周囲性沈着の強さはフィブロネクチン, III型コラーゲン, プロテオデルマトン硫酸の順に弱くなる傾向を認めた (Fig. 3a, b, c). ラミニンは脈管周囲特に動脈と胆管周囲の基底膜存在部位に陽性所見を認めた (Fig. 2b, 3b) が類洞に沿った局在は認めなかった. 慢性肝炎では拡大した門脈域の辺縁部分に沿って淡い沈着を認め、piecemeal necrosis や巣状壊死部分周囲を取り巻くように軽度増加し、増生した胆管や毛細血管の基底膜にも陽性所見を認めた (Fig. 2d). さらにアルコール性肝障害では一部の肝細胞周囲にも沈着していた (Fig. 3d).

2. 電顕的検討

今回の Post embedding method を用いた検討では特有な繰り返す構造を示す横紋を呈する径約 60nm の成熟した I 型コラーゲン線維が Disse 腔に時として見

られ、これらの線維と密接に関連してプロテオデルマトン硫酸のコア蛋白に反応した金粒子の存在を認めた (Fig. 5). しかし肝実質細胞や間質系細胞の細胞内には特異的な金粒子の付着を認めなかった.

考 察

今回使用した抗プロテオデルマトン硫酸抗体は I 型, III型, IV型コラーゲン, フィブロネクチン, ラミニンとは反応しないが、胎盤由来のフィブロネクチン結合性プロテオヘパラン硫酸とは交差反応することが固相酵素抗体法により示されている⁹⁾. しかし、このプロテオヘパラン硫酸に対するモノクローナル抗体が類洞に沿って明確な染色性を示す¹⁰⁾のに反し、同じ部位が抗プロテオデルマトン硫酸抗体ではほとんど染色されず (Fig. 1), 逆に抗プロテオデルマトン硫酸抗体で強く染色される線維化部位 (Fig. 4) が抗プロテオヘパラン硫酸では殆ど染色されない (未発表) ことから、組織染色レベルでは交差反応は無視できるものと考えた.

プロテオグリカンの中でも肝臓の線維化に最も関係するといわれるプロテオデルマトン硫酸は主にグリコサミ

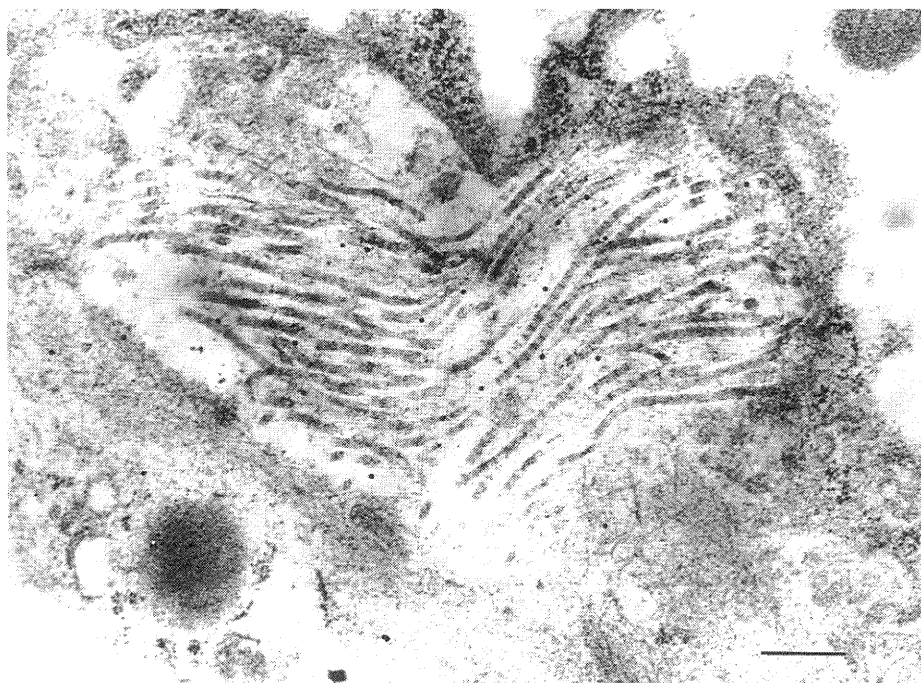


Fig. 5 Immuno-electron microscopy with post embedding method. Distributin of reacted gold particles is closely related to type I collagen fibers, which are observed in space of Disse. (bar=500nm).

ノグリカン部分であるデルマトン硫酸の変動について組織化学的ならびに生化学的に検討されてきた²⁾³⁾¹¹⁾。デルマトン硫酸は正常肝組織では全グリコサミノグリカンの2-30%⁴⁾を占めるに過ぎないが、線維化の進展にともなって増加し、最終的には正常肝の10数倍に増加する¹²⁾。動物の実験的障害肝作製による経時的なデルマトン硫酸の増加をみた成績¹³⁾では障害後約2〜3週間で増加し、コラーゲン細線維が線維束へと成熟する過程において重要な役割を果たしていると考えられている。更に、組織化学的にもコラーゲン線維が線維束形成過程にある時期にデルマトン硫酸は組織中に増加し、主としてI型コラーゲンと結合して存在するといわれる¹⁴⁾。今回の検討においても、急性肝炎の巣状壊死部や慢性肝炎における門脈域の細胞浸潤部位、piecemeal necrosis部位にはみられず、むしろ炎症所見に乏しいアルコール性肝障害における門脈域、肝細胞周囲性線維化部分や肝硬変の線維性間質部において著明な沈着が認められたことはI型コラーゲンとの親和性を考える上で興味深い。慢性肝炎やアルコール性肝障害および肝硬変に今回みられた拡大した門脈域や肝細胞周囲性線維化部分のフィブロネクチン、Ⅲ型コラーゲン、プロテオデルマトン硫酸の順にみられた増加は、肝障害時にまずフィブロネクチンが早期に増加してコラーゲン産生および沈着が刺激され、コラーゲンの組織内沈着の増加が生じ、さらにこれらにプロテオグリカンが結合することによってプロテオグリカン-コラーゲン-フィブロネクチン複合体を形成し、可溶性コラーゲンが不溶化して実験的障害肝における線維化の進展ならびに維持に関与するという報告とも一致している⁶⁾。織田ら¹³⁾、船津ら¹⁵⁾の四塩化炭素障害肝作製における線維化抑制実験で、プロテオグリカンの合成阻害薬を使用し線維化が抑制されたという報告も同様である。プロテオデルマトン硫酸の超微形態学的局在に関して糖鎖部分であるデルマトン硫酸についてルテニウムレッド¹⁶⁾や陽イオン染色液¹⁷⁾を用いての化学的反応を利用する方法で検討されてきた。かかる方法ではデルマトン硫酸はI型コラーゲンと特異的に結合し、ほぼ横紋周期に一致して約64nmの間隔で規則正しく配列した沈着物として認められる¹⁵⁾¹⁸⁾。今回のPost embedding methodによる検討では、反応金粒子は特有な横紋を示すI型コラーゲンの存在部位に一致して存在し、周期性には乏しいが、プロテオデルマトン硫酸がI型コラーゲンと特異的に結合するという緒家の報告と一致する。フィブロネクチン、Ⅲ型コラーゲンは共に急性肝炎の巣状壊死部や慢性肝炎のpiecemeal necrosisの部においてそ

の沈着が増加し、線維化のmediator及び進展に関与するものと考えられる¹⁹⁾。

これに対してプロテオデルマトン硫酸は急性肝炎では殆ど沈着の増加を認めないことや慢性肝炎でのpiecemeal necrosis部位では沈着の増加は軽度であり、むしろ炎症所見の消褪している部位に著明な増加がみられることから、慢性に経過する肝障害においてI型コラーゲンと特異的に結合することにより、線維化の維持成熟および不可逆性により重要な役割を果たすものと考えた。

In vitroにおける種々の培養細胞についての研究では肝実質細胞²⁰⁾、線維芽細胞²¹⁾、伊東細胞²²⁾などの細胞がプロテオデルマトン硫酸を産生すると報告されている。しかし、In vivoにおける産生細胞についての検討はほとんどない。今回の検討では産生細胞を同定するまでには至らず、この点に関しては今後更に検討する必要がある。

結 論

各種肝疾患55例を対象としてプロテオデルマトン硫酸のコア蛋白に対する抗体を用い、プロテオデルマトン硫酸の肝組織内局在を検討した結果、

- 1) プロテオデルマトン硫酸は門脈域及び中心静脈域の既存の線維の存在部位に認め、更に慢性肝疾患において増加した線維化部分にその存在を認めた。
- 2) 肝線維化過程におけるプロテオデルマトン硫酸の肝組織への沈着はフィブロネクチンの出現、コラーゲン蛋白の増加に引き続いて起こる変化と考えた。
- 3) プロテオデルマトン硫酸の沈着はコラーゲン線維の進展維持に強い関連を有しているものと考えた。
- 4) 電顕的に観察したプロテオデルマトン硫酸の局在はI型コラーゲンの存在部位に一致して多く認めた。

稿を終えるにあたり御指導、御校閲を賜りました市田文弘教授に深甚なる謝意を捧げると同時に、本研究に終始御指導、御協力をいただきました高橋達博士に心から深謝いたします。また、プロテオデルマトン硫酸、フィブロネクチンおよびプロテオヘパラン硫酸に対する抗体を快く供与戴きました静岡県立大学食品栄養科学部生化学教室伊勢村護教授、新潟市民病院中村享道博士に併せて深謝致します。

尚、本文の要旨は、第19回日本臨床電子顕微鏡学会および第74回日本消化器病学会総会において発表した。

参 考 文 献

- 1) Junqueira, L.C.U. and Montes, G.S.: Biology of collagen-proteoglycan interaction, *Arch. histol. jap.*, **46**: 589~629, 1983.
- 2) Gressner, A.M. and Koster-eiserfunke, W.: Proteoglycans in experimental liver diseases, In: Popper H, Gudat F, Kottgen E, Reutter W, eds. *Structural carbohydrates in the liver*. Lancaster; MTP Press, 419~430, 1983.
- 3) Murata, M., Ochiai, Y. and Akashio, K.: Polydispersity of acidic glycosaminoglycan components in human liver and the change at different stages in liver cirrhosis, *Gastroenterology*, **89**: 1248~1257, 1985.
- 4) Arenson, D.M.: Glycosaminoglycan, proteoglycan, and hepatic fibrosis, *Gastroenterology*, **92**: 536~540, 1987.
- 5) Vogel, K.G., Paulsson, M. and Heinegard, D.: Specific inhibition of type I and type II collagen fibrillogenesis by the small proteoglycan of tendon, *Biochem. J.*, **223**: 587~597, 1984.
- 6) Oldberg, A. and Ruoslahti, E.: Interactoins between chondroitin sulfate proteoglycan, fibronectin, and collagen, *J. Biol. Chem.*, **257**: 4859~4863, 1982.
- 7) Kojima, N., Isemura, M., Yosizawa, Z., Ono, T., Shinada, S., Soga, K., Aoyagi, Y. and Ichida, F.: Distribution of fibronectin in fibrotic human livers at various states, *Tohoku J. exp. Med.*, **135**: 403~412, 1981.
- 8) 高橋 達, 青柳 豊, 市田文弘: フィブロネクチンの染色, *肝胆膵*, **11**: 909~916, 1984.
- 9) 伊勢村護, 音谷 登, 黒沢孝成, 永井宏美, 本宮雅吉, 吉沢善作: ヒト胎盤プロテオデルマトン硫酸の単離とその特性, *結合組織*, **18**: 240, 1986.
- 10) Isemura, M., Sato, N., Yamaguchi, Y., Aikawa, J., Munakata, H., Hayashi, N., Yosizawa, Z., Nakamura, T., Kubota, A., Arakawa, M. and Chen-Chin, Hsu.: Isolation and characterization of fibronectin-binding proteoglycan carrying both heparan sulfate and dermatan sulfate chains from human placenta, *J. Bio. Chem.*, **262**: 1~8, 1987.
- 11) Koizumi, T. and Nakamura, N.: Glycosaminoglycans in hepatic fibrosis. In: Hirayama C, Kivirikko KI, eds. *Pathobiology of hepatic fibrosis*. Elsevier Science Publisher: 57~63, 1985.
- 12) 村田克己: 線維症変化—分子解剖学的立場より—, *最新医学*, **42**: 2057~2061, 1987.
- 13) 織田正也: 肝線維化の機序, *肝臓*, **10**: 501~529, 1969.
- 14) Scotte, J.E.: Collagen-proteoglycan interactions, *Biochem. J.*, **187**: 887~891, 1980.
- 15) 船津和夫: 実験的肝線維化及び Crude papain による肝線維化抑制過程における酸性ムコ多糖の超微形態学的研究, *肝臓*, **17**: 141~157, 1976.
- 16) Luft, J.H.: The fine structure of hyaline cartilage matrix following ruthenium red fixative and staining, *J. Cell. Biolo.*, **27**: 61A, 1964.
- 17) Scotte, J.E.: Histochemistry of alcian blue, *Histochemie*, **32**: 191~212, 1972.
- 18) Scotte, J.E., Orford, C.R. and Hughes, E.W.: Proteoglycan-collagen arrangements in developing rat tail tendon, *Biochem. J.*, **195**: 573~581, 1981.
- 19) Takahashi, T., Aoyagi, Y., Kamimura, T., Ichida, F. and Isemura, M.: Immunoelectron microscopic demonstration of fibronectin in normal and fibrotic human livers, *Pathobiology of hepatic fibrosis*, C. Hirayama and K.I. Kivirikko, eds. Elsevier Science Publishers (Biomedical Division): 47~56, 1985.
- 20) Ninomiya, Y., Hata, R. and Nagai, Y.: Glycosaminoglycan synthesis by liver parenchymal cell clones in culture and its change with transformation, *Biochi. Biophys. Acta*, **629**: 349~358, 1980.
- 21) Coster, L., Carlstedt, I., Malmstroem, A. and Sarnstrand, B.: Biosynthesis and secretion of dermatan sulfate proteoglycans in cultures of humanskin fibroblasts, *Biochem. J.*, **220**: 575~582, 1984.
- 22) Schafer, S., Zerbe, O. and Gressner, A.M.: The synthesis of proteoglycans in fat-storing cells of rat liver, *Hepatology*, **7**: 680~687, 1987.