

子宮筋腫・子宮筋腫由来培養細胞の酵素抗体染色 —desmin, vimentin, fibronectin をつかつて—

産業医科大学産婦人科学教室 (主任: 岡村 靖教授)

大塚 治夫 吉田 耕治 草野 秀一

柏村 正道 岡村 靖

Staining of Leiomyoma Tissue and Myoma-derived Cultured Cells by Enzyme-labelled Antibody Method —Using Desmin, Vimentin and Fibronectin—

Haruo OTSUKA, Kohji YOSHIDA, Shuichi KUSANO,

Masamichi KASHIMURA and Yasushi OKAMURA

Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine,

University of Occupational and Environmental Health, Fukuoka

概要 子宮筋腫に対する pathogenesis を解明する目的で子宮筋腫及び子宮筋腫由来培養細胞の desmin, vimentin, fibronectin を酵素抗体法により染色した。

結果は desmin 染色では、子宮筋腫組織中の筋腫細胞及び子宮筋腫由来培養細胞共に、陽性であつた。vimentin は子宮筋腫組織では、血管内皮細胞にのみ染色陽性であつたが、子宮筋腫由来培養細胞はすべての細胞に染色陽性であつた。fibronectin は、子宮筋腫組織中の細胞及び子宮筋腫由来培養細胞共に染色陽性であつた。

これらの事より、子宮筋腫組織は myogenic cell 由来である事が酵素抗体法により証明された。子宮筋腫由来培養細胞は、myoblast 及び fibroblast の両者の性質をもつ myofibroblast と思われる単層細胞を形成し、成熟子宮筋腫が分化能を有する事が示唆された。

この事は子宮筋腫の起源となる細胞が myofibroblast になり、この myofibroblast が myoblast, fibroblast と分化し、筋腫を形成する可能性が考えられた。

Synopsis To elucidate the pathogenesis of leiomyoma, myoma tissues and myoma-derived cultured cells were stained with desmin, vimentin and fibronectin by the enzyme-labelled antibody method.

Desmin staining was positive in both the myoma tissues and the cultured cells. Vimentin staining was positive in endothelial cells in the blood vessels of the myoma and in the cultured cells. Fibronectin staining was positive in both the myoma and cultured cells.

These findings demonstrate that the leiomyoma was derived from myogenic cells. It was suggested that the myoma-derived cultured cells were myofibroblasts with myoblasts and fibroblasts, and had the ability to differentiate. It appears that the original cells of the myoma differentiate to myofibroblasts, which then differentiate into myoblasts and fibroblasts.

Key words: Uterine leiomyoma • Pathogenesis • Desmin • Vimentin • Fibronectin

緒 言

子宮筋腫は婦人科腫瘍中最も popular な腫瘍であり、多くの研究者により数々の研究がなされてきた。しかし筋腫の発生要因、組織発生起源に対する統一見解はいまだ得られていない。

子宮筋腫は、現在のところ外科的治療が一般的であり、内科的保存治療は確立されていない。し

かし、子宮筋腫は子宮と共存を許された良性腫瘍であり、今後更に内科的保存治療法が探究されるべきであろう。

今回、我々は子宮筋腫の pathogenesis を解明する目的で、子宮筋腫組織及び子宮筋腫由来培養細胞中の desmin, vimentin, fibronectin を酵素抗体法により染色し若干知見を得たので報告する。

研究方法

1. 材料

実験に用いた筋腫組織は、子宮筋腫と診断され、単純子宮全摘術を施行された、年齢37～52歳に至る10例の患者の摘出子宮より得られた。筋腫組織は、一部を病理検査と酵素抗体染色用とし残りを培養に供した。

2. 研究方法

1) 子宮筋腫由来細胞の培養

筋腫組織を小鋏で、1mm³角程度に細切し細切した筋腫組織を滅菌した三角フラスコ中に入れ、0.25% trypsin(Flow Laboratories, Va., U.S.A.) 15ml+0.1% collagenase(和光純薬, 大阪) 15ml溶液を加えた後、マグネチックスターラーでゆるやかに攪拌して浮遊細胞にした。最初の消化処理は30分行き、濾過して上清は廃棄した。2回目以降は1時間毎に同様な操作を行い、2回目よりの上清中の浮遊細胞を培養に供した。その後3回目、4回目と同様な処理をした。得られた細胞浮遊液を金属メッシュにて濾過し、濾過液を容量15mlのdisposable遠沈管(Corning Glass Works, Corning, N.Y., U.S.A.)中で、4℃, 300g, 5分間遠沈した。遠沈後は、decantationにて出来るだけtrypsin及びcollagenaseを取り除き、phosphate buffer solution中で再度遠沈した。遠沈後は、20%ウシ胎児血清(Fetal bovine serum, Flow Laboratories, Va., U.S.A.), Penicillin 100I.U./ml・Streptomycin 100μg/ml (GIBCO)を含むMcCoy 5A培地(Flow Laboratories)中に再浮遊させ、底面積25cm²のTissue culture flask(Corning)にて培養した。培養器の気相は5% CO₂・95% air 37℃下とし、培養液は週2回交換した。

2) 観察方法

培養細胞は位相差顕微鏡による観察とともに、colonyは10%中性ホルマリン固定後、Giemsa染色又は、0.1% crystal violet染色後肉眼的並びに光顕的観察を行い、適宜写真撮影した。

3) 酵素抗体染色

筋腫組織は95%冷アルコール24時間固定後パラフィンに包埋し薄切切片を作製し、培養細胞は

95%冷アルコール20分間固定後、各々desmin, vimentin, fibronectin染色を行つた。用いたdesmin(アマーシャムジャパン株式会社, 東京)は、monoclonal anti-desmin(IgG1)で53KDの単一ポリペプチドを認識するもので、desminのアミノ酸残基325～372間が、この抗体のエピトープである事が、Western blottingで確かめられている⁵⁾¹¹⁾¹³⁾。2次抗体以降は、Universal immunoperoxidase kit(DAKO Corporation, Santa Barbara, California, U.S.A.)を用いた。vimentin(日本ターナー株式会社, 神戸)は、monoclonal anti-vimentinで58KDの単一ポリペプチドを認識する事が、Western blottingで確かめられており、GFAP(Glial fibrillary acidic protein)と幾分crossする⁹⁾。fibronectin(日本ターナー株式会社, 神戸)は、polyclonal anti-fibronectinでantigenはfibronectin human purified proteinを用いており、humanのfibronectinとのみ反応する。vimentin, fibronectinに関しては、2次抗体以降はkit(日本ターナー株式会社, 神戸)を用いた。desmin, vimentin, fibronectin染色はこれらを基本として反応をよくするために、trypsin処理及び第1次抗体との反応をovernightするなどmodificationした。desmin, fibronectinは、PAP法(Peroxidase-antiperoxidase method)vimentinは、ABC法(Avidin-biotin peroxidase complex method)を用いた。表1にdesmin染色を挙げたが、基本的にはvimentin, fibronectinとも同様である。

研究成績

1. desmin 染色

写真1は、子宮筋腫組織のdesmin染色像である(×50)。amino-ethylcarbazoleで赤く染色されている部分が筋腫細胞の細胞質である。間質部分と明瞭な境界を形成するが、一部間質の細胞も染色されている。写真2は子宮筋腫由来培養細胞の染色である(×50)。細胞形態は、3種類認められ、細長くのびた紡錘形の細胞は、細胞質が均一に染色され細胞形態が明瞭である。紡錘形ではあるが長くのびていない細胞は、染色性が均一でなく濃淡が認められる。やや扁平な底辺の広い多角形の

表1 酵素抗体法 PAP 法による desmin 染色 (パラフィン切片)

1. 筋腫組織	2. 培養細胞
1. 筋腫組織の固定 (95%アルコール 24hrs)	1. 95%アルコール固定 (20分)
2. パラフィン包埋, 薄切	以下 左記と同じ。
3. 脱パラフィン, PBS washing	
4. 0.1% Trypsin 溶液 37°C 10分	
5. 内因性ペルオキシダーゼ阻止 (0.3% H ₂ O ₂ 30分)	
6. 組織蛋白との非特異反応 blocking (ブタ正常血清)	
7. 第1次抗体との反応 (マウス抗IgG1 monoclonal anti-desmin) over-night 4°C	
8. 架橋抗体との反応 (ペルオキシダーゼ標識ラビット抗マウス IgG) (30分)	
9. 基質溶液との反応 (40分)	
1. AEC (hydrogenperoxide amino-ethylcarbazole)	
2. 3% H ₂ O ₂	
3. Tris buffer	
10. 後染色 (ヘマトキシリン液)	
11. 封入	

細胞は、横紋様に濃淡のついた染色を呈する。これら3種類共 desmin 染色 positive である。

2. vimentin 染色

写真3は、子宮筋腫組織の vimentin 染色である(×50)。vessel の endothelium にあたる部分のみ染色され、他の部分は染色されていない。写真4は筋腫由来培養細胞の vimentin 染色である(×50)。紡錘形の細胞は細胞形態明瞭に染色されたが、やや底辺の広い多角形の細胞は濃淡がつよく、細胞形態も不明瞭である。しかし、両者共 vimentin 染色 positive である。

3. fibronectin 染色

写真5は、子宮筋腫組織の fibronectin 染色である(×50)。全ての細胞が染色されている。写真6は、子宮筋腫由来培養細胞における fibronectin 染色である(×50)。desmin, vimentin に比べ desmin 染色で述べた様な3種類の細胞は、3種類共細胞質全体が染色され染色も均一であり、細胞形態が明瞭である。

考 案

desmin は細胞骨格蛋白の一つであり、細胞骨格を主として構成する要素としては、① microtubule, ② microfilament, ③ intermediate filament の3種の線維性構造がある³⁾。desmin はこの3種のうち、intermediate filament に属する

ものであり、筋細胞に特異的なものである²⁾。同様に vimentin は線維芽細胞などの間葉由来の特異的な intermediate filament である¹⁰⁾。fibronectin は、肺、腎、皮膚、胎盤、脾、血管などほとんどの動物器官及び血液、羊水などの体液中に存在し、色々な細胞生理作用を持つ、単一の糖タンパク質である¹⁾。高等動物では血漿中にある血漿 fibronectin と培養細胞表面及び培養液中に分泌される細胞性 fibronectin がよく研究されてきた¹²⁾。生物学的活性は細胞接着の促進、細胞形態の調節、細胞社会性の促進、食作用の促進、細胞分化の調節、細胞増殖の促進、組織の修復、癌細胞の転移の抑制がある⁴⁾¹⁴⁾¹⁶⁾。

子宮筋腫は、電顕観察により平滑筋で構成されている事が報告されている⁶⁾。この報告及び、desmin, vimentin, fibronectin の各々の特徴より著者は、子宮筋腫組織が myogenic cell 由来である事を、子宮筋腫由来培養細胞に対しては、myoblast と fibroblast の区別が酵素抗体法で証明出来るのではと考えた。

子宮筋腫組織では当初の予想通りであつたが、子宮筋腫由来培養細胞においては、紡錘形の myogenic cell 由来と思われる細胞及び底面に広くひろがる多角形の fibroblast と思われる細胞の両者共、desmin, vimentin, fibronectin が positive

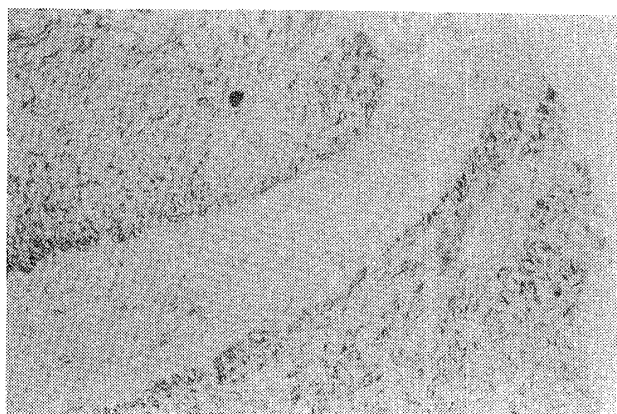


写真1 子宮筋腫組織の desmin 染色(×50). 筋腫細胞の細胞質が染色されており, 間質部分と明瞭な境界を形成する。

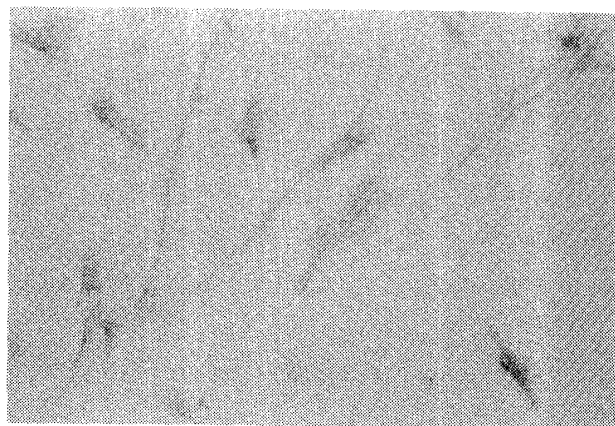


写真2 子宮筋腫由来培養細胞の desmin 染色(×50). 3種類の細胞形態がみられる。

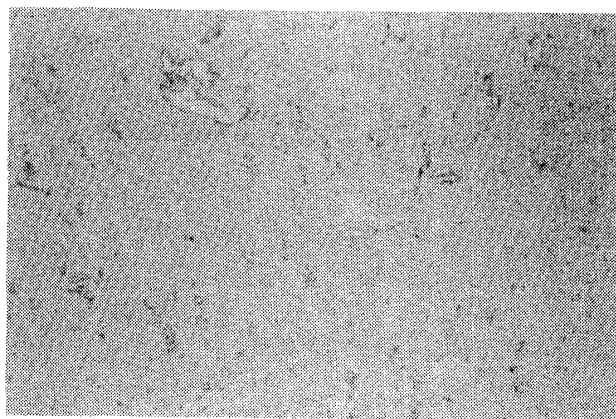


写真3 子宮筋腫組織の vimentin 染色(×50). vessel の endothelium 細胞のみ染色されている。

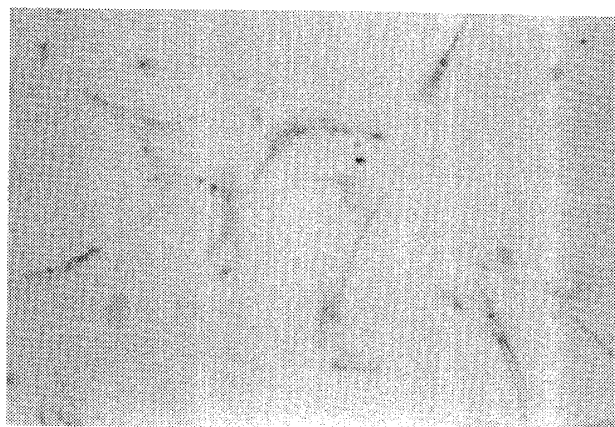


写真4 子宮筋腫由来培養細胞の vimentin 染色(×50). 写真2と比べ染色の濃淡がみられ, 細胞形態も不明瞭である。



写真5 子宮筋腫組織の fibronectin 染色(×50). 筋腫組織中いたる所が染色されている。

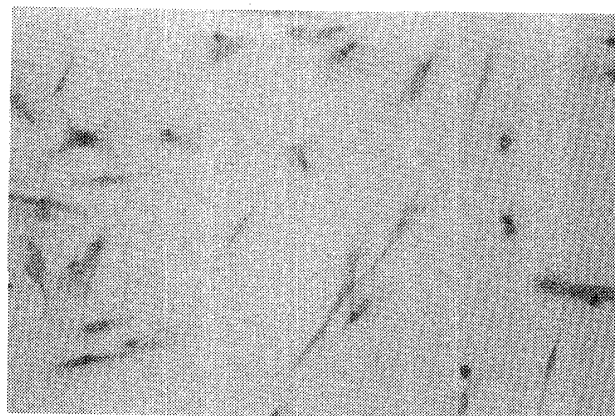


写真6 子宮筋腫由来培養細胞の fibronectin 染色(×50). すべての細胞が染色され, 染色性も均一で細胞形態が明瞭である。

に染色された。この事実は子宮筋腫由来培養細胞が, myoblast 及び fibroblast の両者の性質を持ちあわせる, myofibroblast の段階にある事をうかがわせた。Tavassoli et al.¹⁵⁾は, Leiomyomatosis peritonealis disseminata の電顕観察により smooth muscle cell が myofibroblast, fibroblast, endometrial stroma cell, decidual cell へと多分化能を有する事を言い, Fujii et al.⁷⁾⁸⁾は, leiomyomatosis peritonealis disseminata の電顕観察, 及び子宮筋腫発生モデルとしてのエストロゲン・プロゲステロン作用下での腹膜上皮下の腫瘍の観察により子宮筋腫の発生は, 胎生体腔上皮下に伴う未分化な間葉細胞を起源とする可能性を示唆している。これらの事を考え合わせると, 今回著者の培養した子宮筋腫由来細胞は, 培養下で smooth muscle cell が, myofibroblast から fibroblast, myoblast への分化の過程にある可能性を示唆し, 成熟子宮筋腫においてでさえ, その構成細胞は分化能を有することが想定されるに至った。したがって, 筋腫の原基から myofibroblast が作られ myofibroblast は fibroblast, myoblast へと分化し, 筋腫を構成すると推測される。しかし, 今回の筋腫由来培養細胞に対する desmin, vimentin, fibronectin の染色結果のみより, 筋腫の発生起序について言及するには問題点も多い。これらの培養細胞を別の観点からみて電顕等を併用する必要があるし, また, 起源となる細胞を見出す新たな実験計画をたてる必要もある。今後さらに子宮筋腫の pathogenesis を解明してゆきたい。

稿を終わるに臨み, 御協力下さった, 新日鉄八幡病院産婦人科, 川上昌男博士並びにスタッフの方々, 当病院中検病理のスタッフの方々に深甚なる謝意を表します。

文 献

1. 林 正男, 河野一郎: ファイブロンネクチン—基礎と呼吸器疾患—. 呼吸, 4: 274, 1985.
2. 石川春律: 血管内皮細胞と細胞骨格. 生体の化学, 36: 173, 1985.
3. 石川春律: 細胞骨格の微細構造. 蛋白質核酸酵素, 28: 624, 1983.
4. Akiyama, S.K. and Yamada, K.M.: Fi-

- bronectin in disease. In Connective Tissue Diseases (ed. B.M. Wagner), 55. Williams and Wilkins, Baltimore, 1983.
5. Debus, E., Weber, K. and Osborn, M.: Monoclonal antibodies to desmin, the muscle-specific intermediate filament protein. E.M.B.O. J., 12: 1305, 1983.
6. Ferenczy, A.: A comparative ultrastructural study of leiomyoma, cellular leiomyoma, and leiomyoma of the uterus. Cancer, 28: 1004, 1971.
7. Fujii, S., Nakashima, N. and Okamura, H.: Progesterone-induced smooth muscle-like cells in the subperitoneal nodules produced by estrogen. Am. J. Obstet. Gynecol., 139: 16, 1981.
8. Fujii, S., Okamura, H. and Nakashima, N.: Leiomyomatosis peritonealis disseminata. Obstet. Gynecol., 55: 79S, 1980.
9. Gown, A.M. and Vogel, A.M.: Monoclonal antibodies to human intermediate filament proteins —II. Distribution of filament proteins in normal human tissues—. Am. J. Pathol., 114: 309, 1984.
10. Lawson, D.: Epinemin: A new protein associated with vimentin filaments in non-nural cells. J. Cell Biol., 97: 1891, 1983.
11. Lazarides, E.: Intermediate filaments: A chemically heterogenous, developmentally regulated class of proteins. Ann. Rev. Biochem., 51: 219, 1982.
12. Mosher, D.F.: Physiology of fibronectin. Ann. Rev. Med., 35: 561, 1984.
13. Osborn, M. and Weber, K.: Biology of disease —Tumor diagnosis by intermediate filament typing: A novel tool for surgical pathology—. Lab. Invest., 48: 372, 1983.
14. Pierschbacher, M.D. and Rouslahti, E.: Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of molecule. Nature, 309: 30, 1984.
15. Tavassoli, F.A. and Norris, H.J.: Peritoneal leiomyomatosis (leiomyomatosis peritonealis disseminata): A clinical pathologic study of 20 cases with ultrastructural observations. Int. J. Gynecol. Pathol., 1: 59, 1982.
16. Yamada, K.M. and Hayashi, M.: Fibronectin and cell surface interactions. In The Role of Extracellular Matrix in Development, 89. Alan R. Liss, Inc. New York, 1984.

(No. 6076 昭61・11・14受付)