

WS2-5

硬組織 ISH：破骨細胞分化因子(RANKL)発現局在について

北澤 理子、北澤 莊平

神戸大学大学院医学系研究科 生体情報医学講座 分子病理学分野

【緒言】骨芽細胞に発現する破骨細胞分化因子(RANKL)と、破骨細胞前駆細胞に発現する受容体(RANK)との結合を介するシグナルは、破骨細胞の最終分化に必須とされている。私どもは、骨吸収亢進を来す種々の病態について、マウス実験モデルやヒト剖検検体の骨組織を用いて、RANKL 発現局在を検討した。【材料と方法】正常及び自己免疫関節炎モデルマウスの脛骨・大腿骨、培養癌細胞移植による溶骨性病変モデルマウスの頭蓋骨、病理解剖時に採取したヒト椎骨は、4% Paraformaldehyde にて2日間固定、20%EDTA/0.1M リン酸緩衝液にて5日間脱灰後にパラフィン包埋標本作製した。TRAP 染色を行い破骨細胞を確認した。対象核酸に特異的な primer にて RT-PCR を行い cDNA を合成の後、PCR にてジギキゲン標識 1 本鎖 DNA プローブ(センス鎖又はアンチセンス鎖)を作成して、ISH を施行した。

【結果と考察】正常マウス脛骨では、成長軟骨直下の骨軟骨移行部に破骨細胞形成が見られ、RANKL の局在は、破骨細胞より遠位側の幼弱な骨芽細胞と、近位側の肥大化軟骨細胞とに見られた。自己免疫関節炎マウスでは、滑膜増生とともに軟骨破壊・軟骨下骨吸収が進行した。滑膜増生部位では、滑膜細胞に RANKL 発現を認め、RANK 陽性の破骨細胞前駆細胞の増生を認めた。軟骨下骨吸収部位には成熟破骨細胞が観察された。自己免疫関節炎では滑膜細胞が RANKL 供給源として重要であることが示唆された。悪性腫瘍移植による溶骨性骨病変モデルを経時的に解析すると、移植腫瘍に近接した骨表面の骨芽細胞の RANKL 発現が先行した後に、骨表面に破骨細胞形成を認めた。ヒト癌の骨転移症例の剖検標本を用いた検索においては、約 3/4 が溶骨性骨転移を示し、腫瘍巣付近の骨芽細胞や間質細胞に RANKL 発現を認める部分と、破骨細胞による骨侵蝕が顕著な部分とが認められた。【結語】破骨細胞および RANKL は、骨吸収亢進が病態の中心となる疾患においては治療のターゲットとなりうるため、骨組織を用いた ISH 法により、病変を構成する細胞の同定と遺伝子発現を詳細に検討することが重要である。

ランチョンセミナー

LYVE-1 マーカーと病理組織学的応用

小宮山 一雄¹、石井 壽晴²

¹ 日本大学・歯学部・病理学講座

² 東邦大学・医学部・病理学講座

局所組織におけるリンパ管と毛細血管の鑑別・同定は、リンパ管の特異的なマーカーがないことから長い間困難とされてきた。しかし近年、リンパ管を内皮に発現する分子として、リンパ管増殖因子 VEGFR3, 内在性膜ムコプロテインのポドプラニン, 膜貫通ムコプロテイン PA2.26, シアログリコプロテイン D2-40, Prox-1, などが報告されている。今回、我々は LYVE-1 の親水性の 12mer (297-308, cytoplasmic tail 領域) の合成ペプチド【SKKTDKNPEESKC】を免疫源とし、そのタンパクに対するポリクロナール抗体を作製した。本抗体を評価すべく人の全身諸臓器のホルマリン固定、パラフィン包埋材料について、血管と対比しつつ免疫組織化学的に検討を行った。検索に用いたすべてのヒト組織において形態的にもリンパ管として矛盾しない管腔の内皮細胞に LYVE-1 発現を特異的に認めた。

今回の発表においては、特に口腔領域のリンパ管の問題を取り上げることとし、口腔粘膜リンパ管腫を用い、従来は困難であった病巣部におけるリンパ管と血管の同定を LYVE-1 と CD34, VIII 因子のそれぞれの抗体を用いて行い、腫瘍部における両者の分布を明らかにした。

また、LYVE-1 抗体は、癌のリンパ行性転移を理解する上で極めて有用であると考えられる。リンパ節転移は癌細胞がリンパ管形成を促すことによるのか、癌巣周囲の既存のリンパ管への浸潤によるものか未だ明らかでない。口腔癌は局所リンパ節転移が比較的早期から見られることが知られており、原発巣におけるリンパ管形成から転移予測ができるのであれば、臨床的に極めて重要であると考えられる。これらのことから、今回、我々は、口腔癌の診断に用いた生検組織を用いて、癌巣内および周囲のリンパ管の同定を、リンパ節転移の有無、Ki67, 腫瘍分化度などの指標とともに検討し、その概要を供覧する。LYVE-1 抗体はリンパ管内皮同定の分子マーカーとして、組織学的並びに病理学的検索に期待されるところの多いことを強調したい。