

免疫組織染色を用いた $\alpha 2$ -HS glycoprotein の臓器分布

奈良県立医科大学新生児集中治療部

吉田 裕 慈, 高橋 幸 博, 川口 千 晴

奈良県立医科大学小児科学教室

中島 充, 吉岡 章

SYSTEMIC DISTRIBUTION OF $\alpha 2$ -HS GLYCOPROTEIN BY IMMUNOHISTOLOGICAL STAINING

YUJI YOSHIDA, CHI HARU KAWAGUCHI and YUKIHIRO TAKAHASHI

Division of Neonatal Intensive Care, Nara Medical University

MITSURU NAKAJIMA and AKIRA YOSHIOKA

Department of Pediatrics, Nara Medical University

Received September 24, 2003

Abstract : Alpha2-HS glycoprotein ($\alpha 2$ -HS) is a plasma glycoprotein with a molecular weight of 49 kDa and is synthesized in the liver. Although it is generally accepted that $\alpha 2$ -HS is involved in bone metabolism, its physiological functions have not been fully elucidated. Hence, in order to clarify the function of $\alpha 2$ -HS, its distribution in the body was investigated by immunohistological staining using tissue samples obtained by autopsy. The results showed that, as previously known, $\alpha 2$ -HS existed abundantly in the liver and bones, and was also detected in organs such as heart, pancreas, kidney, small intestine and brain, but not in the lung, spleen or adrenal gland. The results of the present study clarify that $\alpha 2$ -HS exists in many organs besides the bones, suggesting that $\alpha 2$ -HS is a multi-function protein involved not only in bone metabolism, but also in other physiological reactions.

Key words : $\alpha 2$ -HS glycoprotein, immunohistological staining, bone metabolism, autopsy

緒 言

$\alpha 2$ -HS glycoprotein (以下 $\alpha 2$ -HS) は肝臓で合成され^{1,2)}, 骨に多く分布することから骨の構成成分として骨代謝に何らかの関与がある^{3,4)}と考えられている分子量 49kDa の血漿糖蛋白である⁵⁾. われわれは既に enzyme-linked immunosorbent assay を用いて $\alpha 2$ -HS を測定する系を確立し, 新生児期から成人にいたる血漿中

の $\alpha 2$ -HS 濃度を測定した. その結果, 新生児の中でも特に早産児の血漿 $\alpha 2$ -HS が満期産児, 乳児ならびに小児, 成人に比し高値であることを明らかにした⁶⁾. $\alpha 2$ -HS は, *in vitro* の実験成績から骨の石灰化に関与することが推定されている^{2,7)}. また, 骨代謝以外にオプソニン作用を有していたり⁸⁾, インスリンレセプターの阻害作用⁹⁾などを有していたりすることも報告されている. そこで, $\alpha 2$ -HS の骨代謝を含めた生理機構をさらに解明するた

め、体内での局在を明らかにすべく、剖検組織を用いて $\alpha 2$ -HS の臓器分布について検討を加えた。

材料と方法

剖検の許可の得られた早産児(在胎 32 週)の椎骨、肺、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、小腸および大脳の組織標本を用いた。組織標本は 10% 中性ホルムアルデヒドで固定されたパラフィン包埋標本で、その $3\mu\text{m}$ 切片をシランコーティングスライド上に固定し、以下の方法で免疫組織染色を行った。

組織標本切片の脱パラフィンは既報の如く、キシレン・エタノールを用いた。脱パラフィン後の切片標本を、3% 過酸化水素水と 10 分間反応させ、内因性ペルオキシダーゼをブロックした。さらに、1% ウシ血清アルブミン加 0.01M リン酸バッファー、pH7.4(1%ALB-PBS)と 10 分間反応させブロッキングを行った。次に組織切片上の水分を除去したのち、上記バッファーで 200 倍に希釈した抗ヒツジ $\alpha 2$ -HS 抗体(The Binding Site Limited, Birmingham, England)を添加し、4°C にて一昼夜反応させ、その後、1%ALB-PBS で 5 分間 3 回振盪洗浄後、組織切片上の水分を再び除去し、二次抗体として 1%ALB-PBS で 200 倍希釈したペルオキシダーゼ標識抗ヒツジ IgG 抗体(和光純薬、大阪)と 37°C にて 1 時間反応させた。次に、0.01M PBS で 5 分間 3 回振盪洗浄後、

3,3'-Diaminobenzidine 発色基質を用い染色を行い、ヘマトキシリンで核染色した。その後、組織標本を再びエタノール・キシレンで脱水し、Bioleit(応研商事株式会社、東京)で封入し検鏡に共した。

結 果

$\alpha 2$ -HS が強く染色された臓器は、椎骨および肝臓で、その他の臓器では、心臓、腎臓、脾臓、空腸および大脳で弱く染色された。しかし、脾臓、副腎、肺では染色されなかった。また、各臓器における $\alpha 2$ -HS の組織内局在は、椎骨では骨全体に $\alpha 2$ -HS が認められたが、特に骨周囲に $\alpha 2$ -HS が多く認められた(Fig. 1)。肝臓では肝細胞内に多数認められた(Fig. 2)。一方、心臓では心筋線維内に $\alpha 2$ -HS が認められ(Fig. 3)、腎臓では尿管部分に $\alpha 2$ -HS が認められたが糸球体には認められなかった(Fig. 4)。脾臓では腺房細胞の部分に $\alpha 2$ -HS が認められ(Fig. 5)、空腸では絨毛の上皮細胞の部分に認められた(Fig. 6)。

考 察

$\alpha 2$ -HS は 1960 年に Heremans¹⁰⁾が、1961 年には Schmid & Bürgi¹¹⁾が血漿 Cohn 分画 VI より見出した糖蛋白である。1962 年に彼らの名前にちなんで $\alpha 2$ -HS glycoprotein と

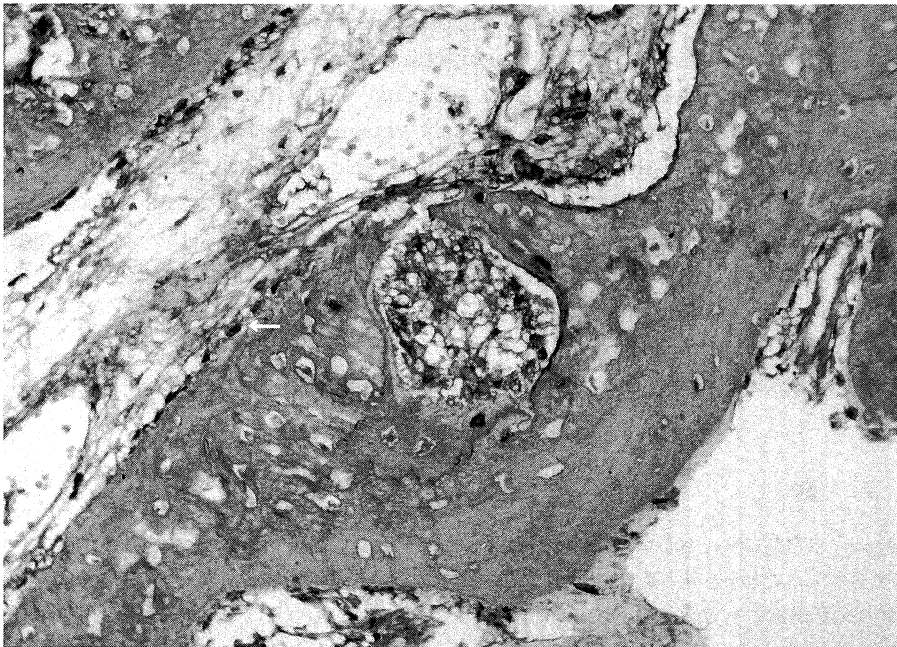


Fig. 1. This figure was a specimen of vertebra. The dark granules (arrow) indicated of $\alpha 2$ -HS antigens, which were seen around the perimedullary lesion.

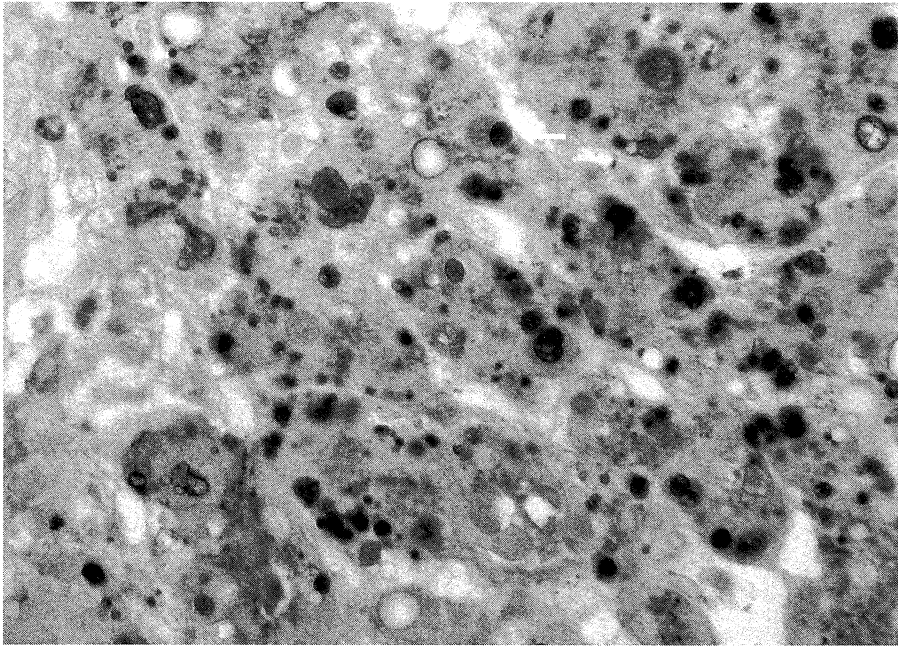


Fig. 2. This figure was a specimen of liver. The dark granules (arrow) indicated of $\alpha 2$ -HS antigens, which were seen in hepatocytes.

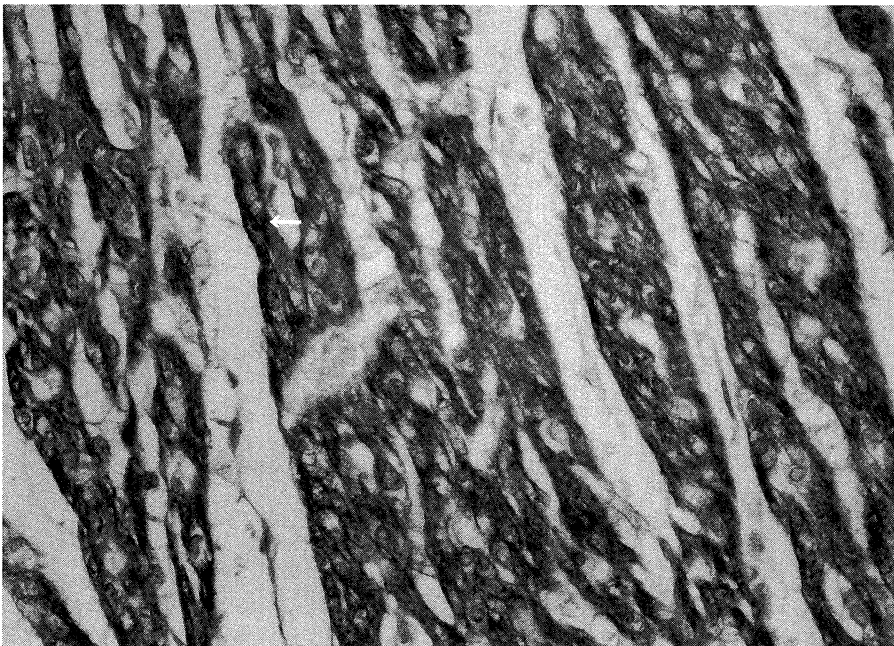


Fig. 3. This figure was a specimen of heart. The dark granules (arrow) indicated of $\alpha 2$ -HS antigens, which were seen in perimycardial fibers.

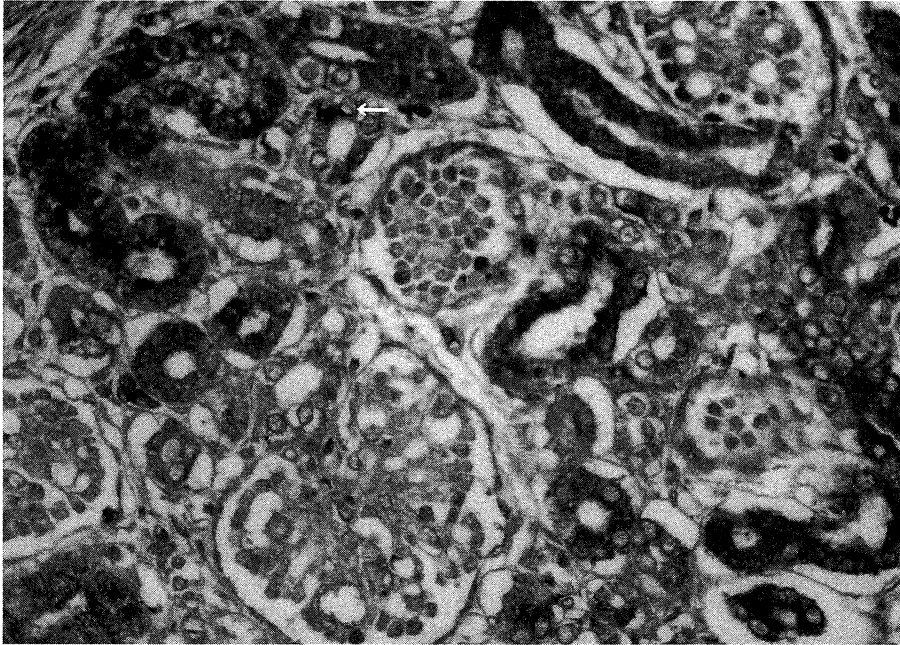


Fig. 4. This figure was a specimen of kidney. The dark granules (arrow) indicated of $\alpha 2$ -HS antigens, which were seen in the renal tubules, but not in the glomeruli.

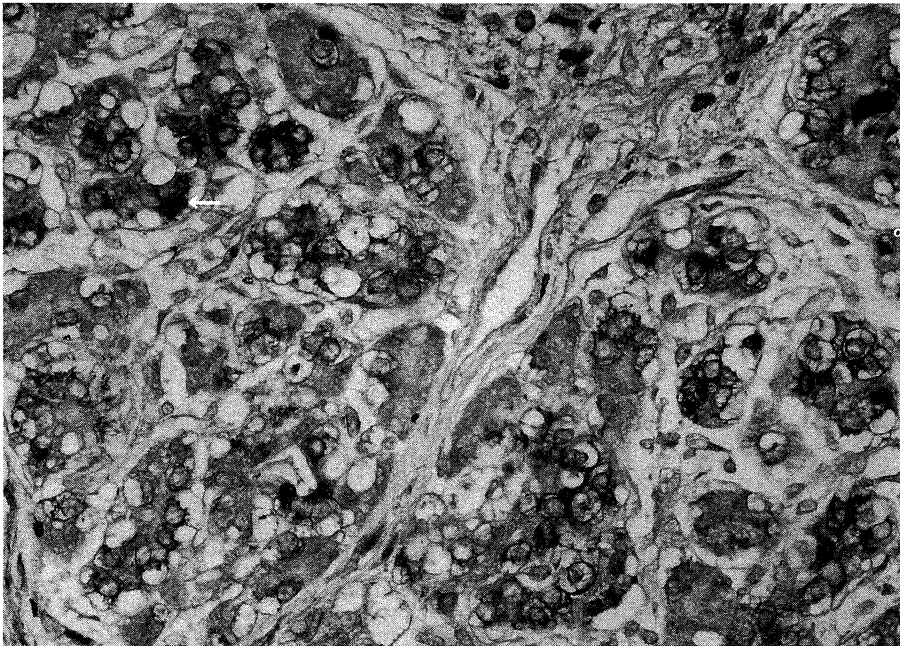


Fig. 5. This figure was a specimen of pancreas. The dark granules (arrow) indicated of $\alpha 2$ -HS antigens, which were seen in acinar cells.

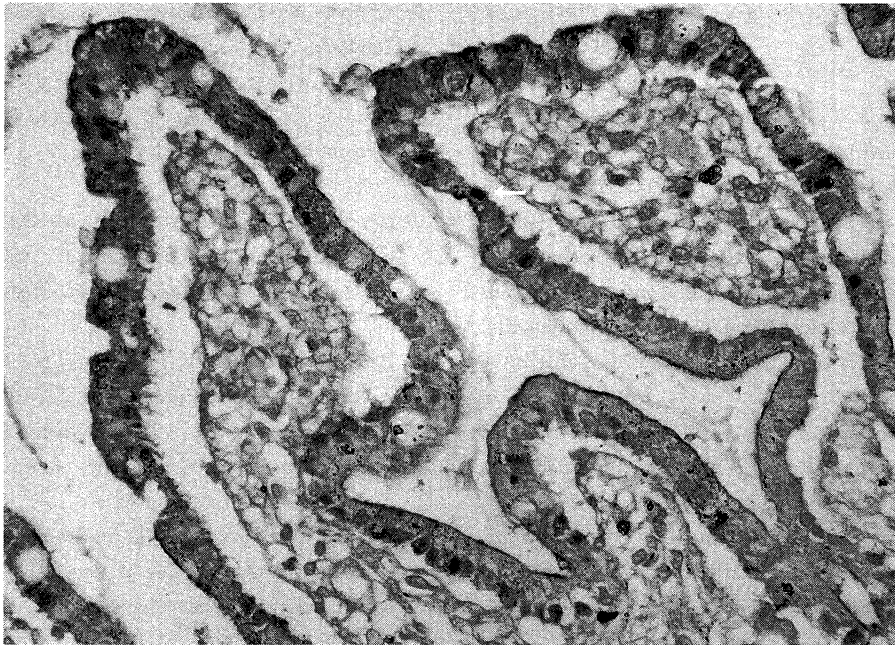


Fig. 6. This figure was a specimen of jejunum. The dark granules (arrow) indicated of $\alpha 2$ -HS antigens, which were seen in the epithelial cells of villi.

呼称されるようになった。その主な生物学的働きは未だよく解明されていない。しかしこれまでの研究からこの糖蛋白は主に肝臓で合成され^{1,2)}、肝臓や骨やに多く含まれていることが明らかにされている^{3,4)}。さらに Schinke らは、マウスを使った実験で $\alpha 2$ -HS は骨に多く含まれ、その他、肝臓、腎臓、小腸、筋肉にも少量ながら含まれていると報告した²⁾。しかし今までヒトでの報告はなされていない。今回のわれわれの成績からも $\alpha 2$ -HS が骨および肝臓に多量に認められたが、さらに心臓、膵臓、小腸、腎臓および大脳など広く多くの臓器においても少量ながら認められることが判明した。一方、肺臓、脾臓、副腎には $\alpha 2$ -HS の存在はなかった。この、われわれの免疫組織染色を用いた結果は、Schinke らの *in situ* hybridization を用いた報告とほぼ同様の結果であった²⁾。 $\alpha 2$ -HS については、既にウシ胎児血清中に多量に存在する fetuin と相同性があることが判明しており、ヒトにおける fetuin 蛋白の一種と考えられている¹¹⁾。 $\alpha 2$ -HS と骨代謝との関係では Schinke らが *in vitro* の系で $\alpha 2$ -HS が骨の apatite 形成を阻害することを報告している²⁾。われわれも、同じく *in vitro* の骨形成モデルを用い $\alpha 2$ -HS は骨の蛋白合成には関与しないが濃度依存性に石灰化の抑制をすることを観察した⁷⁾。また骨形成過程は、コラー

ゲンを中心とした骨組織の有機基質が形成された後、無機成分であるリン酸とカルシウムが沈着すると考えられているが、これらのことを考え合わせると、 $\alpha 2$ -HS はこのリン酸とカルシウムの沈着の制御に関係していると考えられる。このことは臨床的にも、骨中の $\alpha 2$ -HS 量が成人に比べ7倍となっている新生児特に早産児では¹²⁾、骨のカルシウムやリンの含有量が成人骨に比し少ない^{13, 14)}ことに関連していることが想定される。

一方でその他の臓器における $\alpha 2$ -HS の働きについては何ら解明されていない。今回のわれわれの成績から膵臓では腺房細胞内に、小腸では腸管上皮の粘膜細胞に、腎臓では尿細管の細胞と、ある特定の組織に $\alpha 2$ -HS の分布が認められることがわかった。それぞれの組織における分布から $\alpha 2$ -HS の働きを推定することは困難であるが、骨代謝に関与するばかりでなく、多機能性を有することが推定される。既に $\alpha 2$ -HS がオプソニン作用を有していたり⁶⁾インスリンレセプターの阻害作用などを有していたりする⁷⁾ことなどが報告されているが、このことも $\alpha 2$ -HS の多機能性を示している。それ以外にも負の炎症マーカーとなること¹⁵⁾、またある種の固形腫瘍や多発性骨髄腫で血中 $\alpha 2$ -HS 量が減少することが知られてきている。これらの働きと、組織での分布がどの様に関係

しているかは今後さらに検討していく必要がある。

文 献

- 1) Triffitt, J. T., Gebauer, U., and Ashton, B. A. : Origin of plasma α 2-HS-glycoprotein and its accumulation in bone. *Nature* **262** : 226-227, 1976.
- 2) Schinke, T., Amendt, C., Trindl, A., Pöschke, O., Müller-Esterl, W. and Jahnen-Dechen, W. : The serum protein α 2-HS glycoprotein/Fetuin inhibits apatite formation in vitro and in mineralizing calvaria cells. *J. Biol. Chem.* **271** : 20789-20796, 1996.
- 3) Dickson, I. R., Poole, A. R., and Veis, A. : Localization of plasma α 2HS glycoprotein in mineralizing human bone. *Nature* **256** : 430-432, 1975.
- 4) Ashton, B. A. and Höhling, H. J. : Plasma proteins present in human cortical bone : Enrich of the α 2HS-glycoprotein. *Calcif. Tiss. Res.* **22** : 27-33, 1976.
- 5) Schmid, K. and Bürgi, W. : Preparation and properties of the human plasma Ba- α 2-glycoproteins. *Biochim. Biophys. Acta.* **47** : 440-453, 1961.
- 6) 吉田裕慈・高橋幸博・田中一郎・川口千晴・堀江安永子・吉岡章 : 新生児における血漿 α 2-HS 糖蛋白の動態. *日児誌.* **103** : 1232-1238, 1999.
- 7) Yoshida, Y. (投稿中)
- 8) van Oss, C. J., Gillman, C. F., Bronson, P. M. and Border, J. R. : Opsonic properties of human serum alpha-2 HS glycoprotein. *Immunol. Commun.* **3** : 329-335, 1974.
- 9) Srinivas, P. R., Wagner, A. S., Reddy, L. V., Deusch, D. D., Leon, M. A., Goustein, A. S., and Grunberger, G. : Serum α 2-HS-glycoprotein is an inhibitor of the human insulin receptor at the tyrosin kinase level. *Mol. Endo.* **7** : 1445-1455, 1993.
- 10) Heremans, J. F. : Les Globulines Seriques du System Gamma. In : Hermans JF, eds. *Arschia.* Paris : Brus sels and Masson Press, 1960 : 103-105
- 11) Dziegielewska, K. M., Brown, W. M., Casey, S. J., Christie, D. L., Foreman, R. C., Hill, R. M., and Saunders, N. R. : The complete cDNA and amino acid sequence of bovine fetuin. *J. Biol. Chem.* **265** : 4353-4357, 1990.
- 12) Queich, K. J., Cole, W. G., and Melick, R. A. : Noncollagenous proteins in normal and pathological human bone. *Calcif. Tissue Int.* **36** : 545-549. 1984.
- 13) Minton, S. D., Steichen, J. J., and Tsang, R. C. : Bone mineral content in term and preterm appropriate-for-gestational-age infants. *J. Pediatr.* **95** : 1037-1042, 1979.
- 14) Steichen, J. J. Gratton, T. L., and Tsang, R. C. : Osteopenia of pematuity : The cause and possible treatment. *J. Pediatr.* **96** : 528-534, 1980.
- 15) Abiodun, P. O., and Olomu, I. N. : Serum alpha2-HS-glycoprotein levels in neonatal infections. *Biol. Neonate.* **60** : 114-117, 1991.