

免疫組織化学の基礎と応用

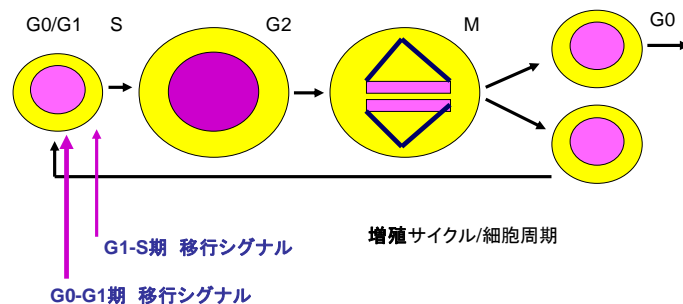
蓮井 和久 鹿児島大学 大学院医歯学総合研究科・講師

この講義は、2007 年から大学院専門基礎過程の選択科目として開講しているものである。教科書には、改訂四版 渡辺・中根の酵素抗体法（名倉宏、長村義之、堤寛 編集）学際企画を用いています。それに、最近のポリマー法の開発等と私の研究への応用等を基礎にしています。

XIV. 細胞増殖の免疫組織化学

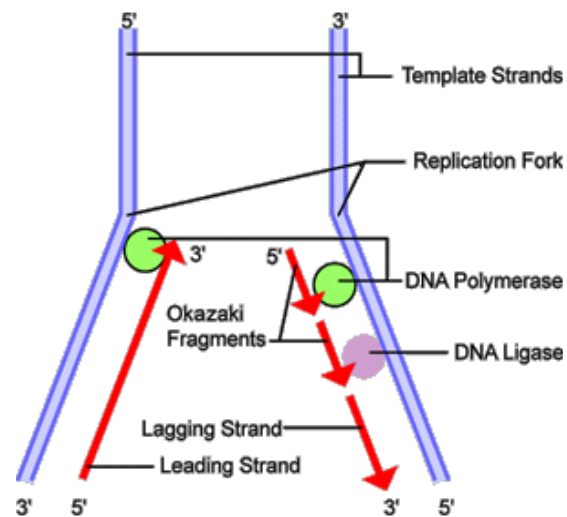
1. 細胞増殖と細胞周期

幹細胞は **G0 期**にあることが知られている。**G0-G1 移行シグナル**により、細胞は細胞分裂（細胞周期）の準備を始める。そこに、**G1-S 移行シグナル**が入り、細胞は2個分の DNA や蛋白等の合成は始め、**S 期**に



その2個分の細胞成分の合成が終了すると **G2 期**となる。G2 期には、細胞分裂に、正常な細胞2個分の DNA 合成等が行われたかをチェック (**G2 チェックポイント**) し、**M 期**が始まる。2個の G0 期細胞は、幹細胞の場合は、**不均衡分裂**が生じ、**自己複製能力のある幹細胞**と**終末分化を示す細胞**へと分かれる。

S 期の DNA 複製は、右図に示す様に、空色で示した二本鎖 DNA のテンプレート鎖 (Template Strands) が複製時の鋳型となる。**DNA 複製分岐点 (Replication Fork)**において DNA がほどける。分岐点は次第に上方に移動していく。左側のリーディング鎖においては分岐点の移動に伴って緑色の **DNA ポリメラーゼ**が連続的に相補鎖を (C, G, A, T で) 複製していく (DNA の標識は、**[3H]-チミン**、**5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)**、**標識 d-UTP**を用いる)。赤い矢印は酵素の移動方向を示す。



右側のラギング鎖においても DNA ポリメラーゼが働くが、DNA 合成は不連続となり**岡崎フラグメント**と呼ばれる断片になってしまう。この断片を **DNA リガーゼ**がつなぎ合わせていく。DNA の複製と共に、二本鎖 DNA が周囲を取り囲む形で安定して存在する**ヒストン蛋白**も、**S 期**に合成される。

2. 細胞増殖と細胞周期の組織化学

細胞増殖と細胞周期を検出する方法には、下表に示す様に、1) DNA 合成に取り込まれる標識核酸や類似物を検出する。2) 細胞の核 DNA 量を測定する。3) DNA 合成酵素を標識する。4) DNA 合成に関与する他の分子、ヒストン蛋白の mRNA を標識する。5) 増殖（細胞周期移行）シグナルを検出する。6) 細胞分裂を観察するものがある。

方法	原理	前処理	検出方法
標識核酸や類似物の検出	DNA 鋳型に沿った DNA 鎖合成の標識 ([³ H]-チミジン、5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)、標識 d-UTP)	生きた細胞や組織への標識核酸ないし類似物の添加 (ヒトには用いられない。)	Autoradiography、加水分解 (例、10HCl で 37°C 30 分間の処理) 後に、免疫染色
DNA 量測定	dDNA をフォイルゲン反応や蛍光色素により標識して定量	フォイルゲン反応や蛍光色素により標識	測定顕微鏡での測定 (Flowcytometry)
DNA 合成酵素の標識	DNA ポリメラーゼや DNA トポイソメラーゼ	-	免疫染色
DNA 合成に関与する他の分子	Ki67 抗原、PCNA (Proliferating cell nuclear antigen)	-	免疫染色
ヒストン蛋白の mRNA の標識	dDNA は、ヒストン蛋白に螺旋状に付着して存在するので、dDNA が複製される時に、ヒストンも産生されるので、ヒストン mRNA も産生される。	-	In-situ hybridization
増殖 (細胞周期移行) シグナルの検出	恐らく、G0-G1 移行期シグナル (Cyclin E)、G1-S 移行期シグナル (E2F)	-	超高感度免疫染色
細胞分裂の観察	-	-	顕微鏡下での細胞分裂細胞の検出

1) DNA 合成に取り込まれる標識核酸や類似物の検出

実験動物や細胞株に、[³H]-チミジン、5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)、標識 d-UTP を注射や培養液に加え、DNA 鋳型に沿った DNA 鎖合成で取り込ませる。

[³H]-チミジン はオートラジオグラフィで検出する (その放射線の飛ぶ距離はカバーガラスでの封入の厚さ以内であり、多くの実験に用いられた。

BrdU は、二本鎖 DNA を加水分解し、抗 BrdU 抗体で標識して検出する。

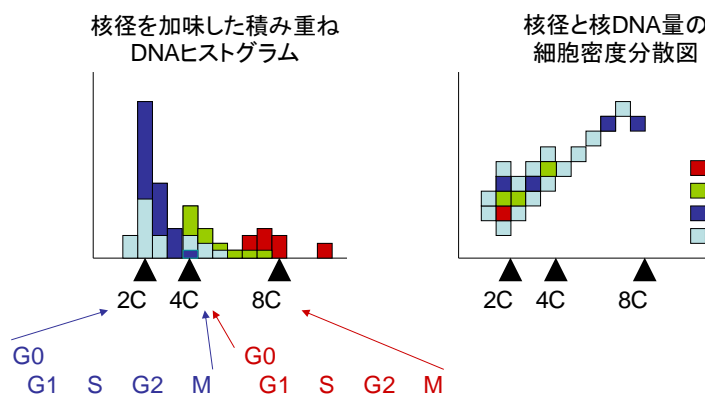
ビオチン標識ないしジゴキシゲニン標識 d-UTP も、二本鎖 DNA を加水分解し、ストレプトアビチンや抗ジゴキシゲニン抗体で標識して、検出する。

2) 細胞の核 DNA 量の測定

二本鎖 DNA をフォイルゲン反応や蛍光色素により標識して定量する。測定顕微鏡で測定が行われる。また、一般に、核染色に用いられるヘマトキシリン染色でも、核酸量のオフピーク定量が可能とされる。この方法は、スポット測光顕微鏡を要するが、最近のデジタル顕微鏡画像での RGB 分解にて、フォウイル

ゲン染色では G 画像、ヘマトキシリン染色であれば R 画像で、核面積をピクセル数として平均濃度の積を任意単位の DNA 量とすることも可能であるようだ。

右図に、核径を加味した DNA 量の測定結果を、ヒトグラムと細胞数(密度)散布図を示す。顕微測光法の結果は、正常細胞(通常はリンパ球)の核 DNA 量を 2C とし、diploid (2C-4C)を基本に、ステムラインの測定量が測定対象の DNA



量となり、2C からのずれを腫瘍性の評価に用いる。核径と DNA 量の細胞数(密度)散布図はフローサイトメトリーの Cell kinetics の解析と同様の評価となる。

この顕微測光法の利点は、組織学的細胞学的細胞増殖の理解が可能であり、リンパ球やリンパ腫の増殖と形態の関係の解析は細胞学的理解に有用である。しかし、G0/G1 を判別できずに、S 期の過小評価と複数の細胞系列の重なりによるパターンの複雑化といった問題がある。

○蓮井和久. 末梢性 T 細胞性悪性リンパ腫乃至白血病の核 DNA の Cytophotometry による Cell Kinetics 的検討. 日本網内系学会誌 20(3):189-201, 1980

○Tokunaga M, Hasui K, Sato E, Ultrastructure and DNA cytophotometry of adult T-cell leukemia-lymphoma, GANN Monograph on Cancer Research 28: Adult T-cell leukemia and related disease, Japan. Hanaoka M, Takatsuki K, Shimoyama M eds., p:65-75, Scientific Press, Tokyo, 1982

○Sato E, Tokudome T, Hasui K, Shimizu T, Tashiro M. The distinction of skin lesions in adult T-cell leukemia and in mycosis fungoides, Recent Advances in RES Research 25, p.145-155, 1985

○Hasui K, Sato E. Microphotometric analysis of Hodgkin's disease in comparison with adult T-cell lymphoma. Acta Pathol Jpn 36(2): 185-198, 1986

○蓮井和久、佐藤栄一、若松いなみ、中尾実、中村敬夫、清水健：成人型 T 細胞性白血病ないしリンパ腫の末梢血中リンパ球の蛍光顕微測光法による検討. 癌の臨床 32(12): 1573-1581, 1986

○Hasui K, Sato E, Hansmann ML, Tokudome T, Tokunaga M. Comparative microcytophotometric analysis of European peripheral T-cell malignant lymphomas (EPTL) and adult T-cell leukemia/lymphomas (ATLL) in Japan. Acta Pathol Jpn 37(2): 179-192, 1987

○Hasui K, Sato E, Tokudome T, Tokunaga M, Setoyama M, Tashiro M. A comparative microphotometric analysis of adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL) in the skin and mycosis fungoides (MF). Acta Pathol Jpn 37(9): 1405-1414, 1987

○蓮井和久、佐藤栄一、中尾実、伊藤博史、清水健、清水誠一郎、中村敬夫、田中貞夫. 胃生検標本における癌ならびに異型上皮の核径別核 DNA 量顕微測光法による検討. 病理と臨床 6(9): 1085-1093, 1988

3) DNA 合成酵素、DNA 合成の関連分子、ヒストン蛋白の mRNA

a. Proliferation Cell Nuclear Antigen (PCNA)

PCNA は、この関連分子の中で最初に免疫組織化学的染色が行われた。PCNA は核内増殖抗原とも呼ばれた分子量 36kDa の増殖関連抗原で、正常細胞と形質転換した細胞の両方にみられる細胞内ポリペプチド抗原です。

PCNA 合成レベルは、細胞周期中の細胞増殖及び DNA 合成の程度に相関する。DNA 合成が開始される直前の G1 末期から核内で E2F 転写因子を含む複合体の制御下に PCNA のレベルが上昇し、S 期で最大となり、G2 及び M 期で低下します。

PCNA は、DNA ポリメラーゼ δ の補助タンパクで、DNA の複製部位に AAA+ class of ATPases である replication factor C (RFC) の作用で強く結合する。DNA ポリメラーゼ δ は、損傷 DNA の修復にも関係することから、**PCNA は、DNA の複製と修復の両方に関与**している。

b. Ki-67 抗原

Ki-67 抗原は、細胞周期の G1, S, G2, M 期の細胞増殖中の細胞のマーカーです。Ki-67 抗原は核内にあり、分裂中には染色体表面に見られる。従って、Ki-67 抗原は増殖細胞成分の指標として用いられる。この抗 Ki-67 抗原抗体の抗原回復免疫染色により、パラフィン切片でも増殖成分の検出が可能であるが、古いパラフィン切片では、検出率 (Labeling index) の低下が知られている。

○**Ki67 antigen (MIB-5)** とヒストン **H3 mRNA** : Sakamoto R, Nitta T, Kamikawa Y, Sugihara K, Hasui K, Tsuyama S, Murata F. The assessment of cell proliferation during 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene-induced hamster tongue carcinogenesis by means of histone H3 mRNA in situ hybridization. Med Electron Microsc. 37(1):52-61, 2004

○**Ki67 antigen, PCNA, DNA topoisomerase II α** : Hirayama T, Hamada T, Hasui K, Semba I, Murata F, Sugihara K. Immunohistochemical analysis of cell proliferation and suppression of ameloblastoma with special reference to plexiform and follicular ameloblastoma. Acta Histochem Cytochem 37(6): 391-398, 2004

4) 増殖 (細胞周期移行) シグナルの検出

i. Cyclin E (G0-G1 移行期シグナル) と E2F(G1-S 移行期シグナル) の検出

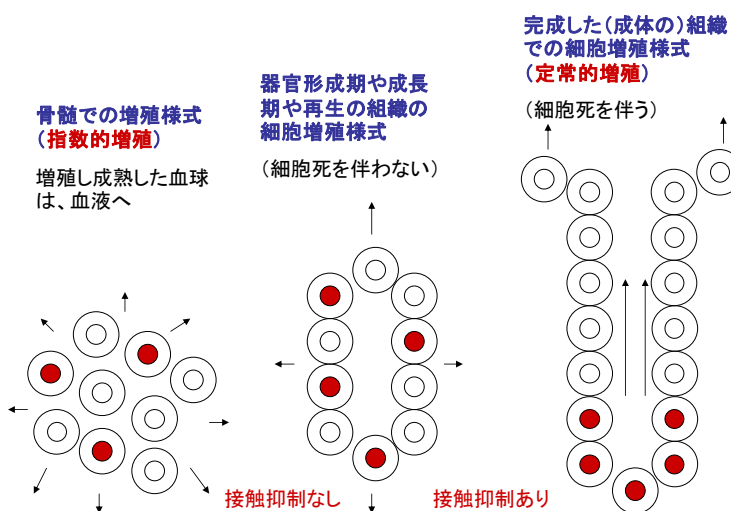
○以下を参照: XIII. HTLV-1 関連蛋白の免疫組織化学 4. HTLV-1 関連蛋白 (Tax, Rex) の病原性解析の免疫組織化学 d) Tax と Rex の細胞周期への病原性の免疫組織化学的解析

ii. mKO2 蛍光タンパク融合 Cdt1(Cdc10 dependent transcript 1) と mAG 蛍光蛋白融合 Geminin (DNA 複製のライセンス化阻害因子) の生細胞ライブイメージング

○<http://www.riken.jp/r-world/info/release/press/2008/080208/detail.html>

3. 細胞増殖と組織形成と組織維持

細胞増殖と組織形成と維持には、深い関係がある。右図に示す様に、骨髄での造血細胞の増殖は、所謂培養細胞と同様に、**指数的増殖**で、成熟した血球は循環系に排出される。一方、器官形成期の腺上皮は、細胞数を増しながら、原始的腺腔を形成して行く。成体の



腺では、腺上皮は、増殖帯で増殖し、一定の腺管を維持しつつ、開口部へ上昇し、粘膜表面で、プログラム細胞死 (アポトーシス) に陥る**定常的増殖**を示す。前二者では、所謂、接触抑制のない増殖であり、後者では一定の接触抑制があると考えられる。

成体の腺上皮の定常的増殖とヒト癌の非常にゆっくりした成長速度を ΔT (時間) での成長を 0 と見做し得るとすると、

$$N(\text{cycle})/T(\text{cycle})=N(\text{g1})/T(\text{g1})=N(\text{s})/T(\text{s}) =N(\text{m})/T(\text{m})$$

$N(\text{m})$:顕微鏡下での分裂細胞数のカウント

$T(\text{m})$:一般に一定とされている。

○Ki67 抗原の標識が、G1-M までの細胞周期を標識するので、

$N(\text{cycle})$ に当てはめることが可能である。

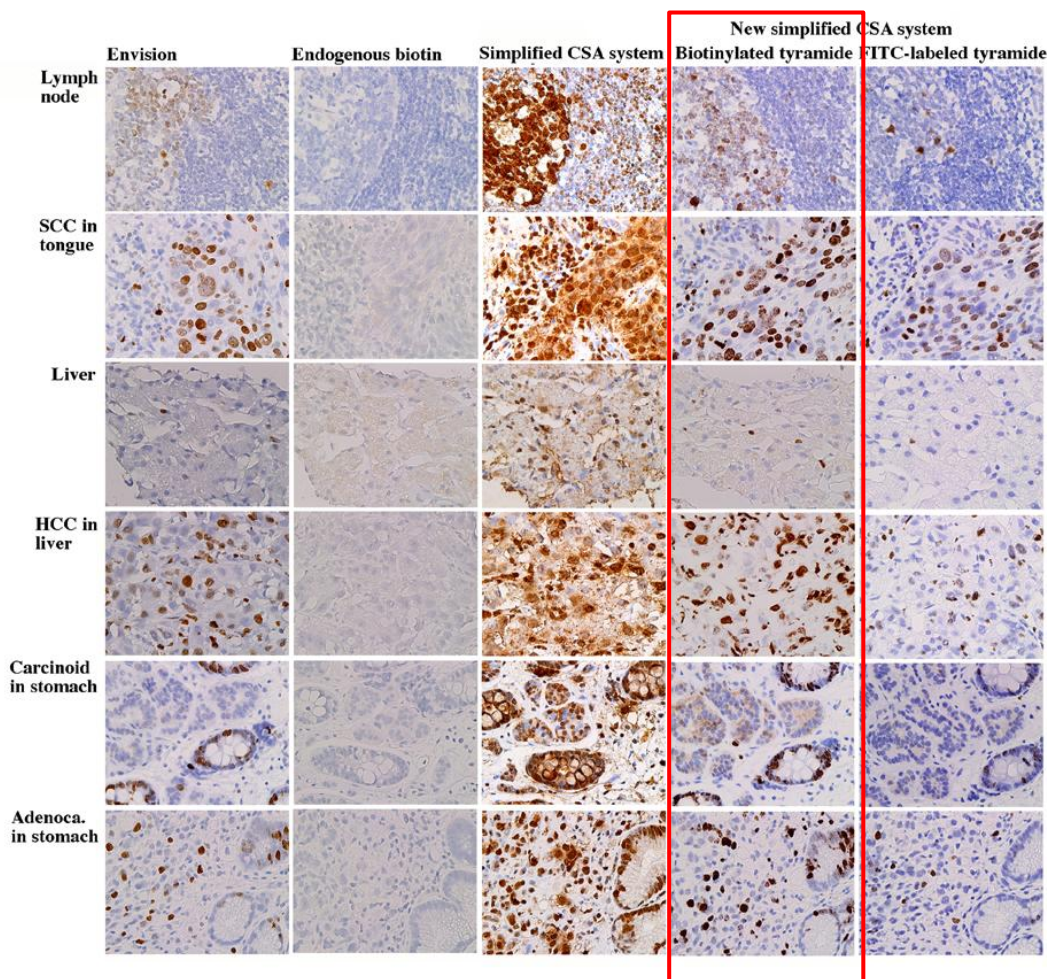
従って、 **$T(\text{cycle}) = N(\text{Ki67 抗原+}) / N(\text{m}) (T(\text{m})\text{任意時間単位})$** と表現できる。

以下の論文に、この公式で、解析した例があります (参照)

○Li A, Hasui K, Yonezawa S, Shirahama H, Kitajima S, Sato E. Immunohistochemical estimation of in-situ cell cycle time in neoplastic epithelial cells in human large intestine: A new cell proliferation index. Human Cell 13(3):117-125, 2001

4. Ki-67 抗原の超高感度免疫組織化学

抗 Ki-67 抗原抗体の抗原回復免疫染色により、パラフィン切片でも増殖成分の検出が可能であるが、古いパラフィン切片では、検出率 (Labeling index)の低下が知られている。検出感度を上げることで、古いパラフィン切片でも、一定の Ki-67 抗原の評価が可能となった。



上図は、下記の論文の図である。赤線で囲ったものが、Ki-67 抗原の 0.01M クエン酸緩衝液 pH6 でのオートクレーブでの熱による抗原回復と simplified new CAS 法による検出である。リンパ節胚中心の増殖 B 細胞リンパ球、舌の扁平上皮癌、肝臓の肝細胞癌、胃のカルチノイド腫瘍と胃癌の増殖細胞が標識されている。胃のカルチノイド腫瘍では、Ki-67 抗原の染色像が他の癌等と異なるようだ。

○Hasui K, Murata F. A new simplified catalyzed signal amplification system for minimizing non-specific staining in tissues with supersensitive immunohistochemistry. Arch. Histol. Cytol. 68(1):1-17, 2005

5. 増殖細胞の免疫組織化学の次の課題

○PCNA は、DNA 損傷における修復にも関係している。従って、PCNA と Ki-67 抗原の二重染色で、DNA 損傷後の修復が生じている細胞核の標識が可能なのかな？

やってみなけりゃ、解らない！