

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

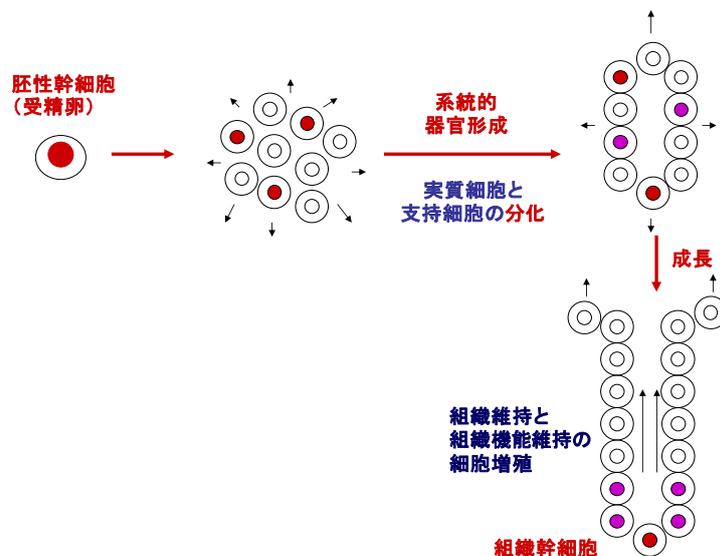
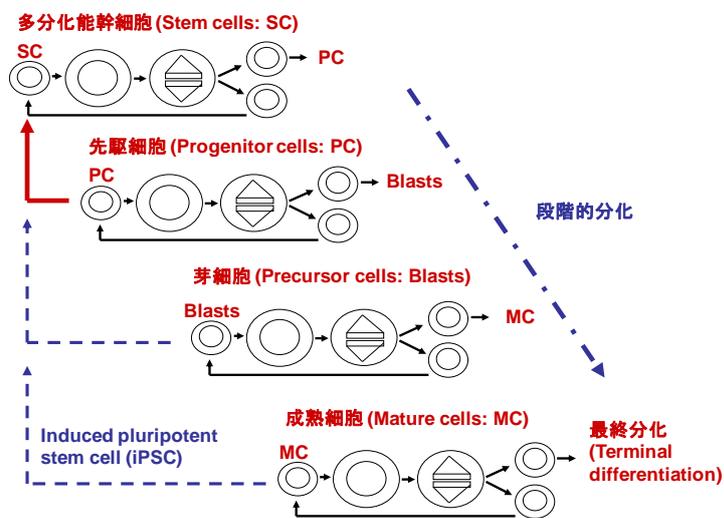
この講義は、2007 年から大学院専門基礎過程の選択科目として開講しているものである。教科書には、改訂四版 渡辺・中根の酵素抗体法（名倉宏、長村義之、堤寛 編集）学際企画を用いています。それに、最近のポリマー法の開発等と私の研究への応用等を基礎にしています。

XV. 組織幹細胞の免疫組織化学

1. 幹細胞と細胞増殖

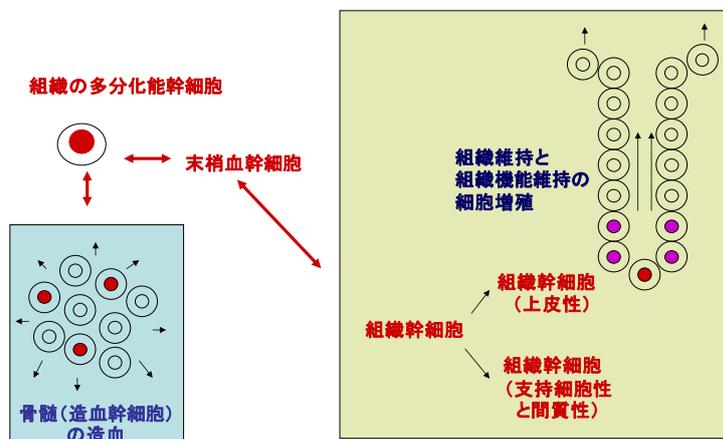
多分化能幹細胞(Stem cells: SC)は、自己複製的分裂し先駆細胞(Progenitor cells: PC)を生じ、PC は洞様に芽細胞 (Precursor cells: Blasts)を生じ、Blasts から成熟細胞 (mature cells: MC)から最終分化細胞が生じて来る。SC から MC へは段階的分化が生じ、PC からは環境等の条件下で SC に戻ることが知られている。induced pluripotent Stem cells (iPS 細胞)は、OCT3/4, SOX2, KLF4, C-MYC の4つの遺伝子を、ヒト皮膚細胞に導入して、樹立された SC 相当細胞である。

一方、胚性幹細胞 (ES 細胞、受精卵) は、指数的増殖し、系統的な器官形成を示し、最終的な成体の器官(右図では、腺)を形成し、個体を作る。この時に、腺の増殖細胞の中に、腺上皮幹細胞 (組織幹細胞) が以後腺上皮(最終分化細胞)を



生むことになる。この組織幹細胞は、MC、Blasts、PC のどのレベルにあるのかは不明であるが、脂肪組織等には SC の存在が示唆されていることから、組織幹細胞は MC>>Blasts>>PC といった割合での混在である可能性が高い。

一方、生体では、骨髄や脂肪組織に SC が存在し、骨髄では SC から造血幹細胞が生じ指数的増殖分化して血球が血中に放出される。末梢血中にも、末梢血幹細胞が存在する。器官でも、組織幹細胞（腺組織幹細胞、腺上皮幹細胞、腺間質幹細胞）が存在する。しかし、骨髄や脂肪組織の SC と末梢血幹細胞、器官の組織幹細胞の間には、組織幹細胞の枯渇した場合には、骨髄等の SC からの供給があることは、骨髄移植後の器官の最終分化細胞が移植骨髄幹細胞由来であること等から示唆されている。



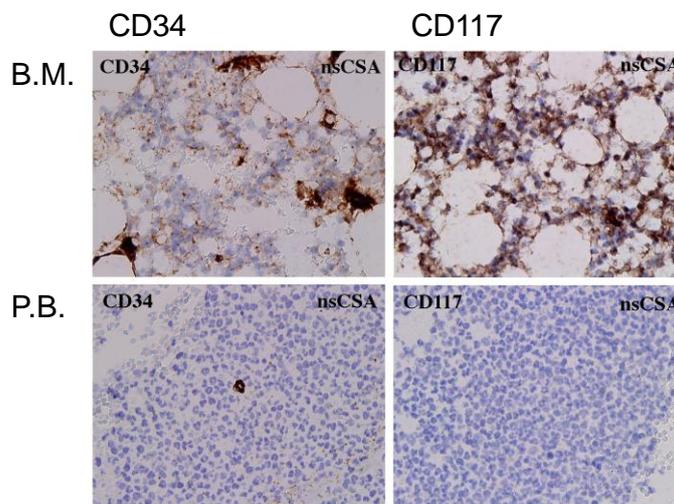
し、骨髄や脂肪組織の SC と末梢血幹細胞、器官の組織幹細胞の間には、組織幹細胞の枯渇した場合には、骨髄等の SC からの供給があることは、骨髄移植後の器官の最終分化細胞が移植骨髄幹細胞由来であること等から示唆されている。

2. CD34 と CD117 の免疫組織化学

人体病理学分野で、幹細胞のマーカーとしては、**CD34**、**CD117**、**CD133** が有名であるが、一般的に、CD34 は血管内皮の、CD117 は GIST 等、CD133 は神経幹細胞のマーカーとして用いられている。

a) 骨髄と末梢血の幹細胞

成体の骨髄には SC と造血幹細胞を含む造血細胞があり、末梢血中には末梢血幹細胞があることが知られている。右図は、骨髄(B.M.)の穿刺吸引凝結標本と末梢血(P.B.)の末梢血組織標本での CD34 と CD117 の 0.01M クエン酸緩衝液中での熱による抗原回復と超高感度法 (nsCSA 法) での染色である。骨髄では、



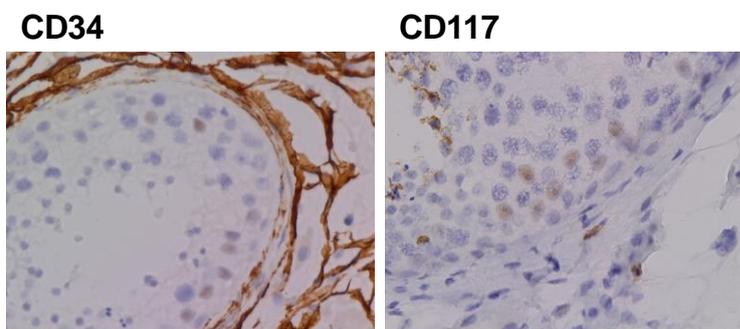
CD34 陽性細胞よりも CD117 陽性細胞（造血細胞）が多く、末梢血では CD34 陽性細胞のみを認めた、CD133 は両方で少数の陽性細胞を認めた。通常感度の検出（ポリマー法）では、骨髄では CD34 と CD117 陽性細胞を少数認めたが、末梢血では CD34 陽性細胞を認めた。このことは、末梢血幹細胞は造血幹細胞よりも未熟な幹細胞(SC)であることを示唆すると思われる。

○Kato K, Hasui K, Wang J, Kawano Y, Aikou T, Murata F. Homeostatic Mass Control in Gastric Non-Neoplastic Epithelia under Infection of *Helicobacter pylori*: An Immunohistochemical Analysis of Cell Growth, Stem Cells and Programmed Cell Death. *Acta Histochem Cytochem.* 41(3): 23-38, 2008

○特許 2005-319965 (平 17.11.2) 免疫染色法、及び当該免疫染色法を利用した細胞の評価方法

b) ヒト精巣の精細管の精上皮の CD34 と CD117 発現

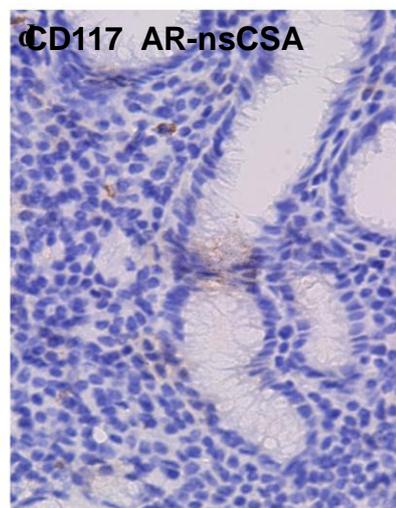
ヒト精巣の精細管の精上皮の 0.01M クエン酸緩衝液中での熱による抗原回復と超高感度法(nsCSA 法)で、右図に示す様に、精細管の精上皮の精母細胞の一部が CD34 と CD117 陽性であった。



これは、CD34 と CD117 がヒトの幹細胞のマーカーであることが再確認された。

c) ヒト成体胃底腺の腺上皮幹細胞（胃の組織幹細胞）の CD117 での標識

ヒト成体胃の胃底腺粘膜の腺上皮は、頸部に腺上皮幹細胞があり、上方へ増殖分化して胃被蓋上皮に、下方に増殖分化して胃底腺上皮となる。この胃底腺頸部での胃腺上皮幹細胞からの増殖分化を、CD117 の 0.01M クエン酸緩衝液中での熱による抗原回復と超高感度法 (nsCSA 法) で、右図の様に、標識出来た。しかしながら、CD34 では、h 上に多くの胃底腺上皮を標識して、CD34 は胃腺上皮幹細胞からの増殖分化の標識には適切ではないことが明らかになった。



○Kato K, Hasui K, Wang J, Kawano Y, Aikou T, Murata F. Homeostatic Mass Control in Gastric Non-Neoplastic Epithelia under Infection of *Helicobacter pylori*: An Immunohistochemical Analysis of Cell Growth, Stem Cells and Programmed Cell Death. *Acta Histochem Cytochem.* 41(3): 23-38, 2008

○特許 2005-319965 (平 17.11.2) 免疫染色法、及び当該免疫染色法を利用した細胞の評価方法

3. CD133 の免疫組織化学

CD133 は、神経幹細胞のマーカーとして、知られているが、分泌機能と関与することも報告されている。

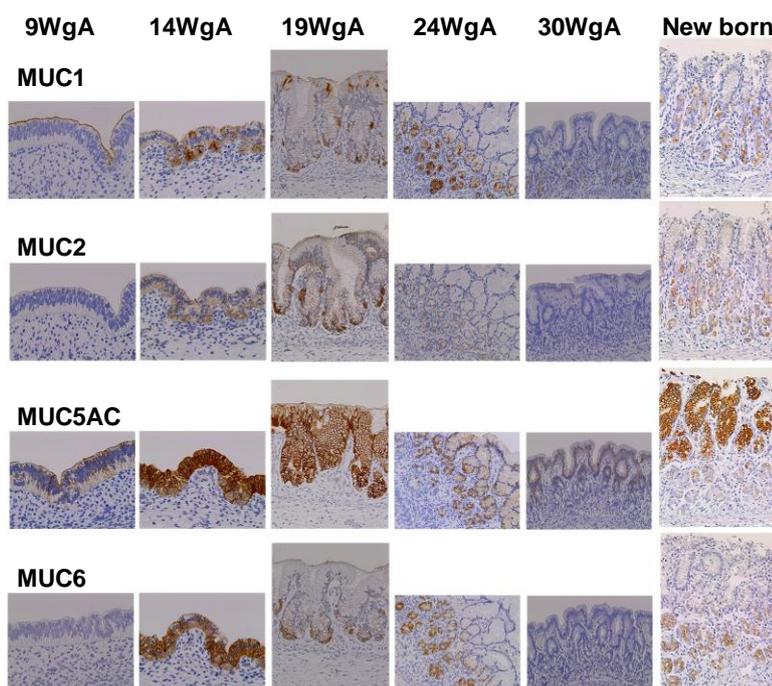
CD133 の熱による抗原回復と超高感度法(nsCSA 法)で、骨髄と末梢血組織標本で、骨髄の幹細胞と末梢血幹細胞が CD133 陽性であることは確認している。しかし、我々も、外科的切除胃の胃底腺粘膜の胃底腺上皮が熱による抗原開腹と超高感度法(nsCSA 法)で陽性であり、生検標本の胃腺上皮が同様の方法で陽性であることを確認した。

○Kato K, Hasui K, Wang J, Kawano Y, Aikou T, Murata F. Homeostatic Mass Control in Gastric Non-Neoplastic Epithelia under Infection of *Helicobacter pylori*: An Immunohistochemical Analysis of Cell Growth, Stem Cells and Programmed Cell Death. *Acta Histochem Cytochem.* 41(3): 23-38, 2008

4. 癌胎児形質

a) 胎芽・胎児期の胃腺上皮の分化と形質の変異 (ムチン)

腺上皮の形質の一つであるムチン (MUC1, MUC2, MUC5AC, MUC6) の発現をヒト胎芽・胎児の胃腺上皮の分化に従って観察した。



20 weeks of gestational age (WgA)が胃の器官形成が完成する時期であるので、それより前の胃腺上皮は **primitive gastric epithelial stem cells** であり、その腺は **rudimentary glands** である。胃の器官形成期には、一度胃液の分泌が始まるが、その後は胃液分泌の抑制があり、出生後に、母乳の哺乳開始にて、胃液の分泌

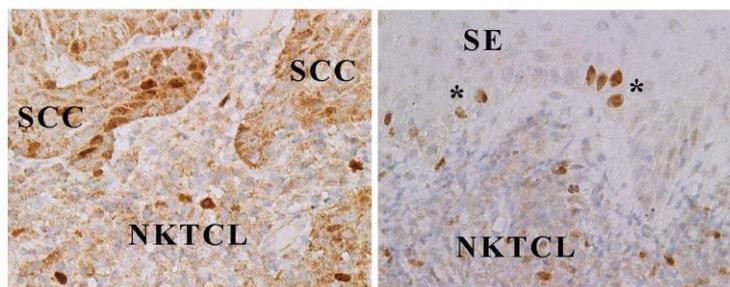
が再開してくる。前頁の図は、ヒト胎児期の胃底腺領域の器官形成とその後の発育と出生後(New Born)の MUC1/EMA (Epithelial membrane antigen), MUC2 (Secretory mucin), MUC5AC (Gastric foveolar epithelial mucin), MUC6 (Gastric pyloric gland type mucin)は、初期の primitive gastric epithelial stem cells には MUC1 と MUC5AC が細胞膜に発現し、その後、総てが細胞質に発現する。器官形成前後には、MUC5AC の発現が強く、その後は出生までムチンの発現は抑制され、出生後に器官形成期と同様の発現を示し、成人型の発現となる。

これらのムチンは、腺癌でも発現することが知られ、所謂、癌胎児抗原様の発現の性格を有するが、その発現パターンは、原始的胃上皮幹細胞、その後の発達でも、その時期特異的な発現の制御を受けているようだ。

○Su L, Hasui K, Sueyoshi K, Matsushita S, Tsuyama S, Kim BS, Kim JB, Higashi M, Yonezawa S, Murata F. Expression of Mucins in the Human Fetal and Neonatal Stomach. Acta Histochem Cytochem 2004; 37(3): 163-172, 2004

b) Survivin の免疫組織化学

Survivin (inhibitor of apoptosis-1: IAP-1)は、幹細胞、胎児組織細胞、悪性腫瘍(癌と悪性リンパ腫)に発現する癌胎児抗原に区分され、アポトーシスのキー分である caspase-3 の活性化を阻害する。右図の左は、鼻 NK/T 細胞リンパ腫 (NKTCL)と合併した微



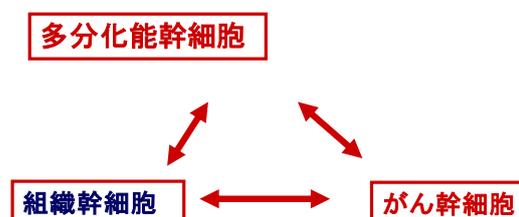
小高分化扁平上皮癌 (SCC) の、右は扁平上皮 (SE) の Survivin の pH 非依存の熱による抗原回復免疫染色 (ポリマー法) の染色像である。SE の少数の基底部の細胞の核が Survivin 陽性で、その他の SE の細胞は陰性であることから、Survivin は SE の組織幹細胞を標識し、NKTCL と SCC は核と細胞質が Survivin 陽性であった。

Survivin は、扁平上皮の組織幹細胞を標識すると共に扁平上皮癌や鼻 NKTCL 細胞を標識して、これらの病理診断に Survivin の免疫組織化学が利用できることは判明した。

5. 今後の幹細胞等の免疫組織化学

CD34、CD117、Survivin 等が幹細胞の免疫組織化学に使えることが判明したが、一般的な幹細胞のマーカーであるヒト **Breast Cancer Resistance Protein (BCRP)/ ABCG2**、**Oct3/4** や **Nanog** と云ったものが免疫組織化学に使えるかの検討が必要である。

近年、癌幹細胞が多くのヒト悪性腫瘍でも見い出されようとしている。ヒト組織の恒常性や病変の理解には、それぞれの組織幹細胞の理解が重要になって来ている。



この方面の今後の研究は、現在の iPS 細胞が OCT3/4, SOX2, KLF4, C-MYC の 4 つの遺伝子を挿入された遺伝子増幅の状態の細胞であることから、OCT3/4, SOX2, KLF4, C-MYC の蛋白添加での樹立された iPS 細胞の移植、自己骨髄や末梢血幹細胞の利用による再生医療研究には欠かせないものになると思われる。