

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

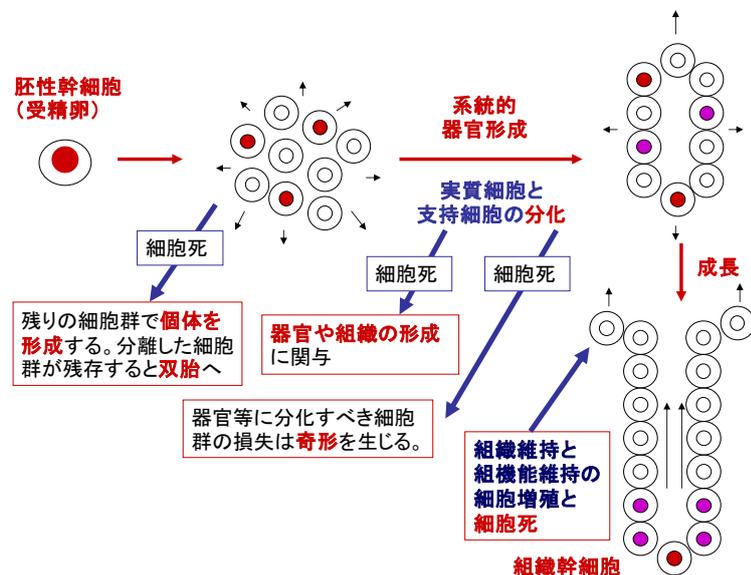
この講義は、2007年から大学院専門基礎過程の選択科目として開講しているものである。教科書には、改訂四版 渡辺・中根の酵素抗体法（名倉宏、長村義之、堤寛 編集）学際企画を用いています。それに、最近のポリマー法の開発等と私の研究への応用等を基礎にしています。

XVI. 細胞死の免疫組織化学

1, 細胞死の意義

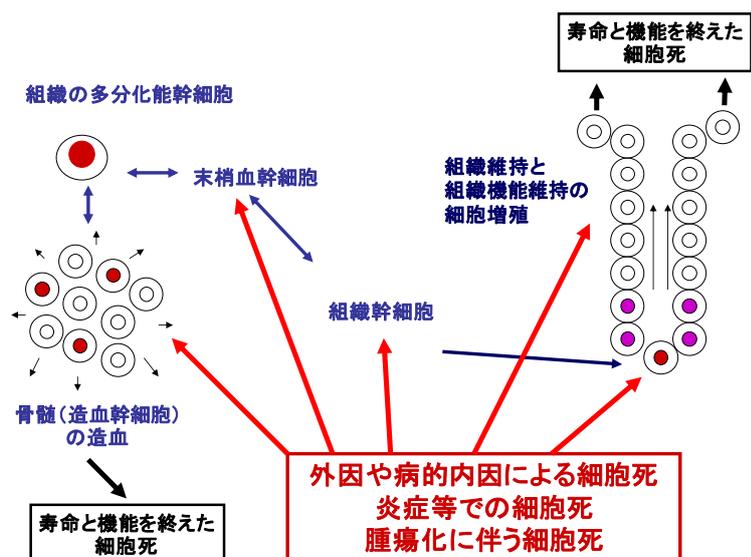
a) 細胞死と細胞増殖と器官・組織形成と組織維持（発生と成長）

成体への発生と成長の過程の細胞死は、受精卵から細胞塊の状態では双胎、器官形成期では器官の形等、分化発育段階では奇形を生じることが知られている。以前には、この細胞死もアポトーシスと呼称されていたが、近年は、自己貪食細胞死もあるとされている。



b) 細胞死と幹細胞と組織維持（成体）

成体においては、種々の微小環境下で、幹細胞は G0 期にあり、傷害等は受け難いと考えられるが、その失調や細胞死は組織維持に影響を与え、時に病因となる。



2. 細胞死とプログラム細胞死

細胞死は、組織の恒常性からは、増殖細胞とバランスがとれた現象である。この場合には、組織恒常性の維持の為にプログラムされた細胞死ということになる。

その一方で、組織の中の構造の中で、傷害を受けた細胞や異常が生じた細胞は、そう云った細胞自体のプログラム細胞死や、貪食細胞に貪食されることで、組織の恒常性は維持されている。貪食細胞に貪食される場合にも、細胞自身が eat-me signal (フォスファチジルセリン)を出すことで好中球等に速やかに貪食され一般には組織学的に検出さすことが難しい場合もあれば、ウイルス感染細胞の初期蛋白発現の免疫学的排除機序によるものもある。

また、上皮細胞等が基底膜から剥離されるも side to side で周囲の細胞と共に存在する状態を ANOIKIS (家なし) 状態と呼び、特殊な細胞死のプロセスとする場合もある。

個々の細胞死の現象は、その原因を考察して理解する必要があるようだ。

3. プログラム細胞死 (Programmed cell death: PCD)

多細胞生物における不要な細胞の計画的 (予定・プログラムされた) 自殺である。組織傷害で炎症を起こす壊死と異なり、PCD は生物の生命に (一般には) 利益をもたらす調節されたプロセスである。PCD は植物、多細胞動物、一部の原生生物で正常な組織形成や病原体などによる異常への対処として働く。

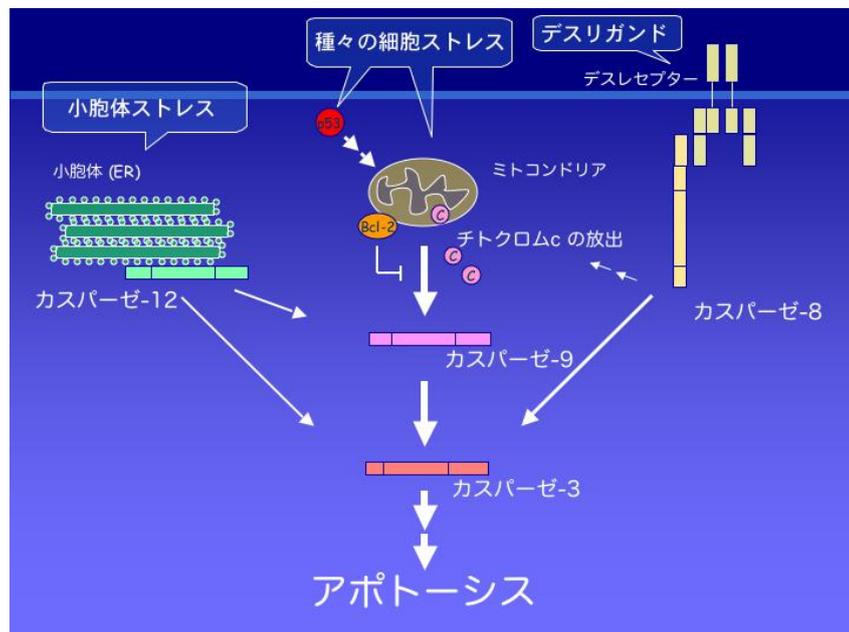
PCD は、細胞死を起こしたときの形態学上の違いから以下の表に示す 3 つのタイプに分類されている。

PCD	名称	形態学的特徴
タイプ 1 細胞死	アポトーシスによるもの	クロマチンが凝縮して細胞核が断片化するという形態上の特徴を示す。動物における PCD の重要な一形式である。
タイプ 2 細胞死	オートファジーを伴う細胞死	細胞質内にオートファゴソームと呼ばれる小胞が形成されるという形態上の特徴を示す。細胞核の萎縮が見られるが、断片化はあまり見られない。
タイプ 3 細胞死	ネクロシス型のプログラム細胞死	細胞内小器官や細胞質膜の膨化を形態上の特徴とする。タイプ 3 細胞死を、リソソームに依存するかどうかの違いによって 3A と 3B に分類することもある (Clarke による 1990 年の分類)

4. アポトーシス (Apoptosis: type 1 PCD)

多細胞生物の体を構成する細胞の死に方の一種で、個体をより良い状態に保つために積極的に引き起こされる、管理・調節された細胞の自殺のこと。Apoptosis の語源はギリシャ語の「apo- (離れて)」と「ptosis (下降)」に由来し、「(枯れ葉などが木から) 落ちる」という意味である。特徴としては、順番に、細胞が丸くなる、核が凝縮する、DNA が短い単位 (ヌクレオソームに相当) に切断される、細胞が小型の「アポトーシス小胞」とよぶ構造に分解するといった変化を見せる。

アポトーシスを開始させる細胞内のシグナル伝達経路は非常に複雑に調節されるネットワークであるが、カスパーゼと総称される一連のプロテアーゼが中心的な働きをし、下流のカスパーゼを順に開裂・活性化していくこと、またミトコンド



○**アポトーシスの主経路** TNF などのサイトカインや Fas リガンドなど (デスリガンドによる) 細胞外からのシグナル => 受容体 (デスレセプター) => **カスパーゼ-8,-10 => カスパーゼ-3**

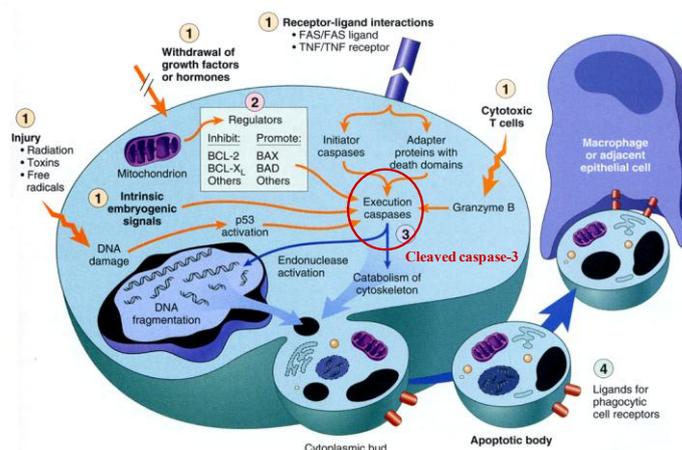
○**DNA 損傷** など => p53 => ミトコンドリア上の Bcl-2 などのタンパク質からなるシグナル系による制御 (またはミトコンドリア自体の異常) => ミトコンドリアからシトクロム c の漏出 => **カスパーゼ-9 => カスパーゼ-3**

○**小胞体ストレス** (小胞体で異常なタンパク質が生成するなど) => **カスパーゼ-12 => カスパーゼ-3**

カスパーゼ-3 がその他のタンパク質を分解するなどしてアポトーシスを決行させる。現在、このような経路による細胞死を特にアポトーシスと呼んでいる。

1) アポトーシスの細胞の内外での現象

アポトーシスには、右図に示す様に、細胞内でのアポトーシスシグナル伝達とカスパーゼ3の活性化型の cleaved caspase-3 が引き起こす、nuclear fragmentation factor (DNF, DNAase の一つ) による核の断片化、細胞質の異化反応によるアポトーシス小体の形成、そして、細胞外でのアポトーシス小体の貪食細胞による処理が見られる。



2) アポトーシスの抑制された細胞

炎症等の出現するマクロファージや滑膜線維芽細胞等では、**FAS-FAL 経路の caspase-8 等の拮抗分子である FLIP の発現、NF-κB と PI3K-AKT1 経路の活性化によるミトコンドリア不安定化の阻止、p53 の不活性化変異**にて、アポトーシスを生じる環境下でも、アポトーシスを生じない。このことは、細胞の特定分化に従って抗アポトーシスが獲得されることを意味すると思われる。

3) アポトーシスを検出する組織化学

アポトーシスを検出する方法には、形態学的に電子顕微鏡標本で核の断片化を検出する方法があるが特異性に乏しく、DNA の断片化を標

方法	標的	非特異反応
Cleaved caspase 3	Apoptosisシグナルを受けた caspase-3の分解にて出現する cleaved caspase-3	免疫組織化学的非特異反応
Single stranded DNA	DNA fragmentation factor (DNF)によるDNAの断片化にて生じた一本鎖DNA	炎症や腫瘍性病変における inducible nitric oxide synthase (iNOS) により産生されるNOによるDNA損傷
ISEL (in-situ end labeling using Klenow polymerase) 法	DNA fragmentation factor (DNF)によるDNAの断片化にて生じたDNA断端	
TUNEL (terminal deoxynucleotidyl-transferase-mediated dUTP nick-end labeling) 法		
電子顕微鏡観察	核の断片化の観察	非特異変性

識する TUNEL 法や ISEL 法はしばしば用いられて来たが、炎症病変中の DNA 損傷等が標識され、必ずしもアポトーシスのみを標識しないとされている

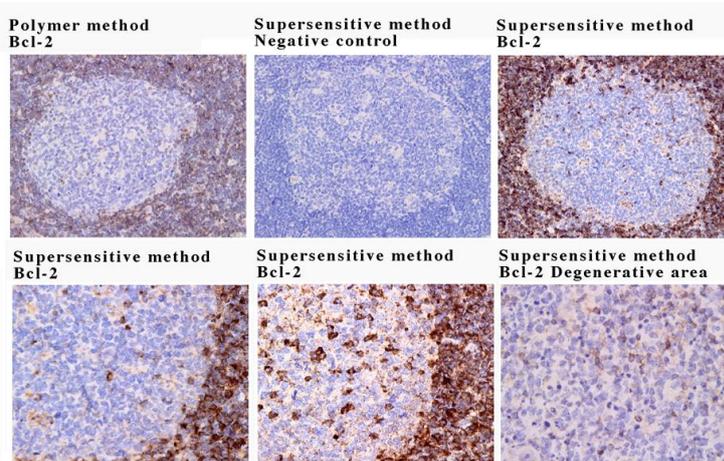
(Richard M. Pope. Apoptosis as a therapeutic tool in rheumatoid arthritis. Nature Review/Immunology 2002;2:1-9)。免疫組織化学的に、DNA 損傷部の一本鎖 DNA を検出する方法も、同様な問題がある。一方、**cleaved caspase-3 の免疫学的検出が、cleaved caspase-3 発現後に不可逆的にアポトーシスに陥ることから、現在最も信頼出来るアポトーシス細胞の検出である**と理解されている。

4) リンパ濾胞胚中心におけるリンパ球のアポトーシスの免疫組織化学

リンパ濾胞胚中心では、**B** リンパ球の抗原提示に対する **hyper somatic mutation** による高親和性抗体獲得細胞の生存とそれに失敗した **B** 細胞のアポトーシスが見られる。

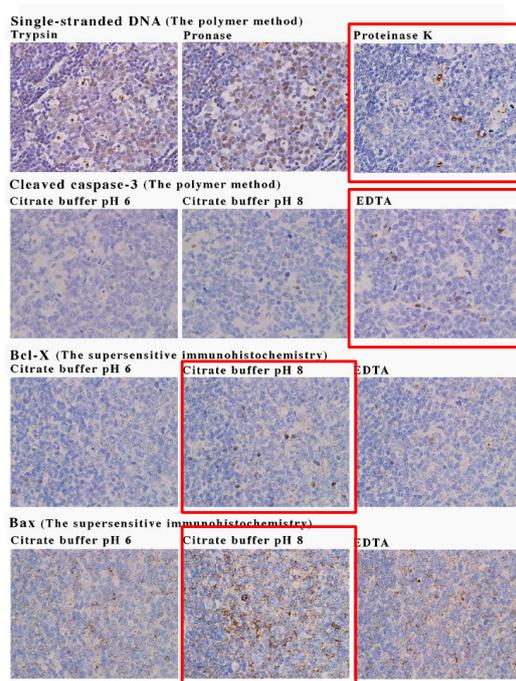
a) Bcl-2 (M0887, Dako,

1:100): Bcl-2 はミトコンドリの膜安定性に寄与する分子で、リンパ組織では濾胞周囲やマントル層のリンパ球が強く発現し、胚中心で発現がないことが知られている (右図、上段左: 抗原回復ポリマー法)。しかし、抗原回復



超高感度法(nsCSA 法)では、胚中心でも、Bcl-2 を発現している細胞としていない細胞を認める。壊死性リンパ節炎の壊死部でも、Bcl-2 の発現低下が見られる (上図、下段右)。

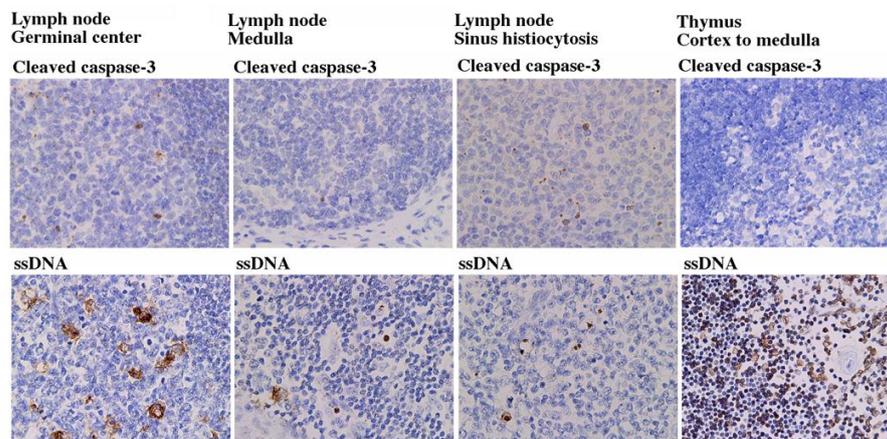
b) 一本鎖 DNA (ssDNA, 4B013A, Dako, 1:100)、Cleaved caspase-3 (Asp175, 5A1, Signaling Technology, 1:250)、Bax (A3535, Dako, 1:1000)、Bcl-X (A3533, Dako, 1:1000)の適切な抗原回復法と検出法: 右図に示す様に、ssDNA は proteinase K 酵素処理でポリマー法、cleaved caspase-3は EDTA (>pH 9、後に、非 pH 依存性)の熱処理とポリマー法、Bax と Bcl-X は 0.01Mクエン酸緩衝液



pH8 と超高感度法(nsCSA 法)が適切な抗原回復法と検出法であった。

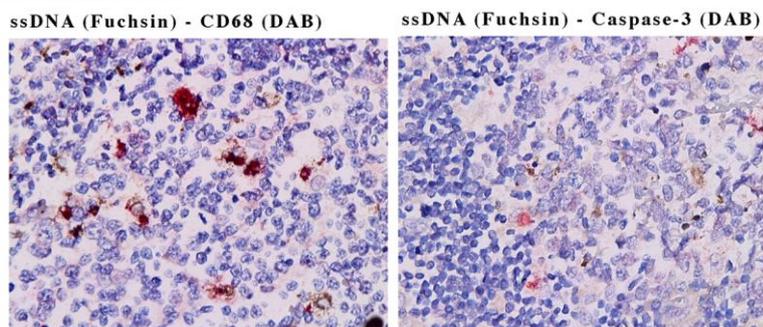
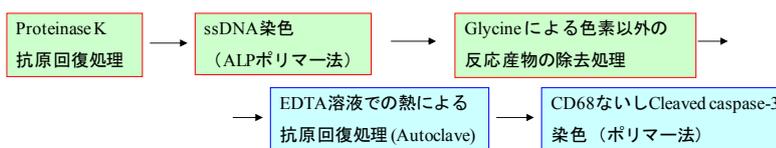
c) ssDNA 陽性細胞と cleaved caspase-3 陽性細胞の関係

右図に、リンパ節の皮質の濾胞、髄質、類洞と胸腺の染色像を比較している。一般に、ssDNAの方がより強くより多くの



細胞を標識した。しかし、胸腺では余りに多くの細胞を標識し、固定やパラフィン包埋標本の保存中の DNA 変性を標識している可能性が示唆された。

右図に示す elution 法の ssDNA と CD68 (マクロファージ) と ssDNA と cleaved caspase-3 の二重染色を行った。発色は、先に標識した ssDNA は AIP での New fuchsin (赤)で、後の抗体は DAB(茶)で検出している。ssDNA と CD68 の二重染色(右図の左)で



は、陽性像が重なり、ssDNA で標識されたアポトーシス小体はマクロファージに貪食されていることが示された。ssDNA (赤) と cleaved caspase-3 (茶) の二重染色 (右図の右) では、陽性像が重なっておらずに、Cleaved caspase-3 はアポトーシスの早期を標識していることが示された。

d) Bax と Bcl-X の抗原回復免疫組織化学

0.01M クエン酸緩衝液の pH は通常では pH6 であるが、pH7 ないし pH8 も用いられており、より抗原回復の程度が良いことが知られている。しかし、前記の様に、Bax と Bcl-X の検出は 0.01M クエン酸緩衝液の pH8 での熱による抗原回

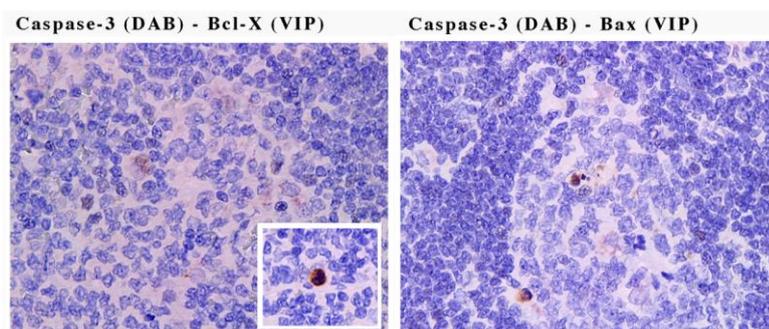
復と超高感度法(nsCSA 法)が適切な検出方法であった。

Bcl-X には、Bcl-XI と Bcl-Xs があり、Bcl-XL は Bcl-2 と同様に抗アポトーシスであるが、Bcl-Xs は Bax と同様に向アポトーシスであることが知られている。

cleaved caspase-3 と Bcl-X と Bax の右図の Elution 法の二重染色を行った。

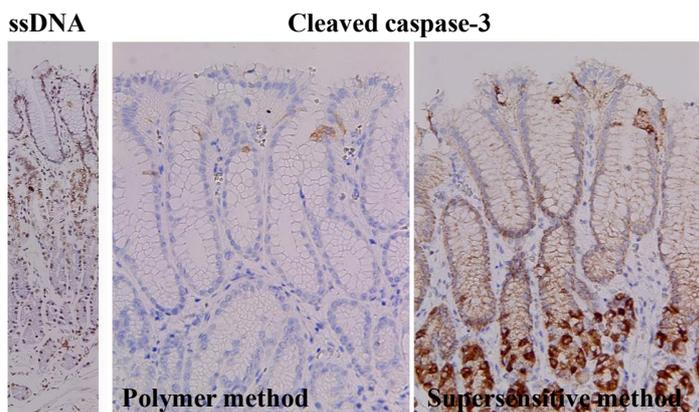
cleaved caspase-3 と Bcl-X (用いた抗体が、Bcl-XI と -Xs を共に標識するもの) の染色 (右図の左) は、陽性像が重なっているもの (Bcl-Xs) と重なっていないもの (Bcl-XI) があり、

Cleaved caspase-3 が発現している細胞には、Bcl-Xs が強く発現していた。一方、cleaved caspase-3 と Bax の二重染色 (上図の右) では、陽性像が重なって、Bax の向アポトーシス性が示された。



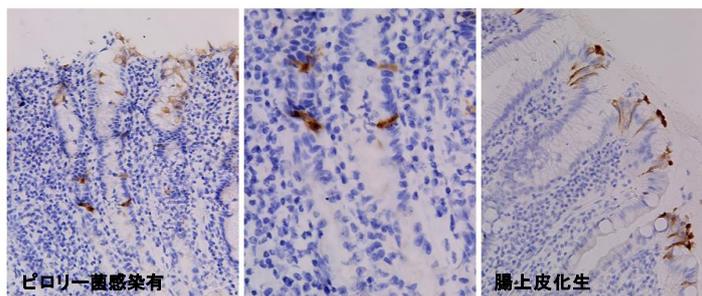
5) ヒト胃粘膜上皮での ssDNA と cleaved caspase-3 の免疫組織化学

ヒト胃底腺粘膜の腺上皮は、頸部で上方に分裂し分化して被蓋上皮になると共に、下方に分裂し分化して胃底腺上皮となる。右図に示す様に、ssDNA は、多くの腺上皮の核を標識して、パラフィン包埋標本の保存中の DNA の断片化が生じていることを示した。



一方、ポリマー法での cleaved caspase-3 は、表層直下で陽性細胞を示し、ピロリ菌による表層被蓋上皮でのアポトーシス抑制を反映した所見である。一方、超高感度法(nsCSA 法)では、被蓋上皮で弱く顆粒状に、胃底腺上皮では強く顆粒状に染まり、caspase-3 のユビキチン-プロテアソーム系での分解過程の抗 cleaved caspase-3 抗体で標識される分解産物を示した。

右図には、ピロリ菌感染のあるヒト胃粘膜での cleaved caspase-3 染色である。右図の左では、被蓋上皮の表層直下に cleaved caspase-3 陽性アポトーシス細胞を多数認めると共に、頸部にも、



cleaved caspase-3 陽性細胞を認める（上図の左と中）。このアポトーシスは、分裂し分化中の細胞で異常が生じて、アポトーシスによる排除されるものと理解されると共に、ピロリ菌感染による細胞の異常の誘導を示唆するものと考えられる。一方、腸上皮化生を起こした化生腸腺上皮は表層部で cleaved caspase-3 陽性アポトーシス細胞を示した。

○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

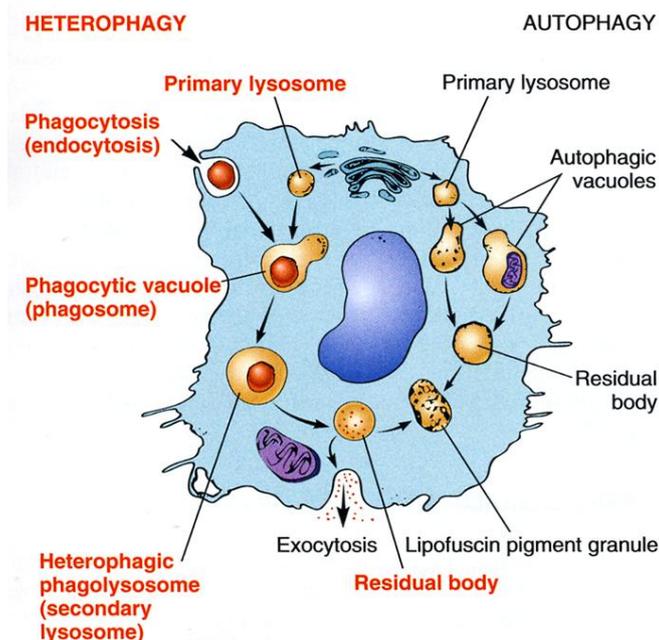
○特許 2005-319965 (平 17.11.2) 免疫染色法、及び当該免疫染色法を利用した細胞の評価方法

5 自己食食 (autophagy) と自己食食細胞死 (Autophagic cell death: type 2 PCD)

自己食食 (Autophagy) は、細胞内のタンパク質を分解する仕組みの一つであり、酵母からヒトにいたるまでの真核生物に見られる。

異常なタンパク質の蓄積を防ぎ、過剰なタンパク質合成や飢餓でのタンパク質のリサイクルを行い、細胞質内に侵入した病原微生物を排除して生体の恒常性維持に関与する。更に、個体発生の過程でのプログラム細胞死、ハンチントン病などの疾患の発生、細胞のがん化抑制にも関与する。

ある種ストレス (アミノ酸飢餓の状態や、異常タンパク質の蓄積) で、小胞体で autophagic vesicle nucleation が形成され、過剰に作



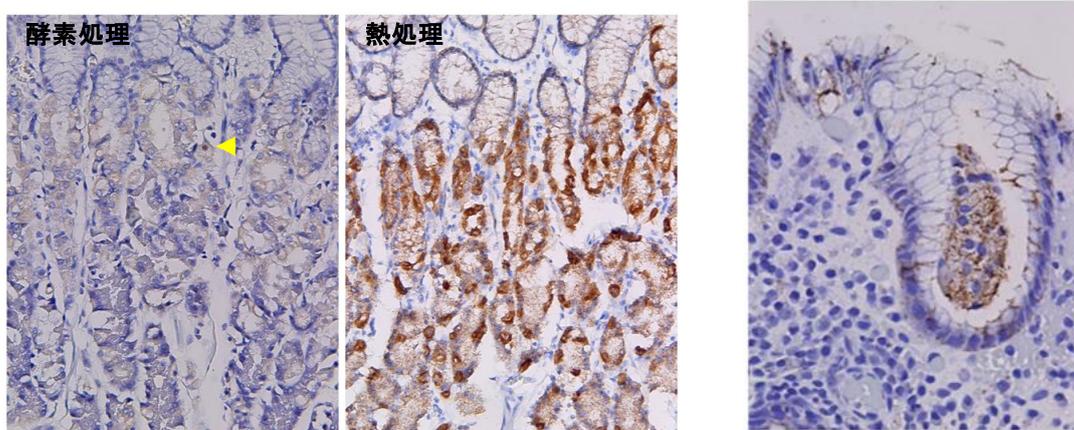
る種ストレス (アミノ酸飢餓の状態や、異常タンパク質の蓄積) で、小胞体で autophagic vesicle nucleation が形成され、過剰に作

られたタンパク質や異常タンパク質と共にリン脂質を二重膜の **autophagosome/autophagic vesicle** (従来、二重膜アポトーシス小体とも呼ばれたことがある) で取り囲み、次に **lysosome** と融合し **autolysosome** となり、取り込んだ内容物をアミノ酸やペプチドに分解する。その後は、**residual body** となり、**ミエリン様**や **lipofuscin pigments granule** (電子顕微鏡では、前記の autophagosome や autolysosome と同様に自己貪食の所見となる) となる。

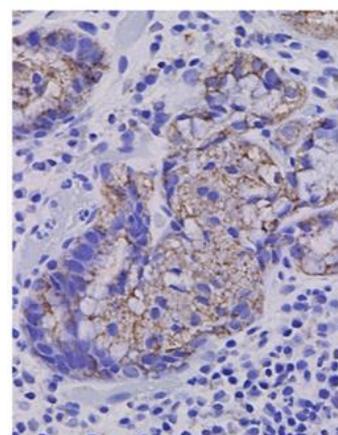
自己貪食は感染防御にも関与している。リステリア属の細菌は、細胞に感染すると、貪食されるが、内部からファゴソームを破壊して貪食の機構から逃れ、細胞質内に感染 (細胞内感染) する。しかし、自己貪食は細胞質内に逃れた細菌を細菌の住処と化したファゴソームを細胞質ごと貪食分解し、感染防御に関与している。

1) ヒト胃底腺粘膜の胃底腺上皮の細胞死 (Beclin-1 の免疫組織化学)

ヒトの胃腺粘膜の胃底腺上皮の細胞死は、従来、二重膜アポトーシス小体を示すアポトーシスであり、この二重膜アポトーシス小体は周囲の腺上皮や貪食細胞に貪食されるとされていた。しかし、cleaved caspase-3 で標識される細胞は認められなかった。

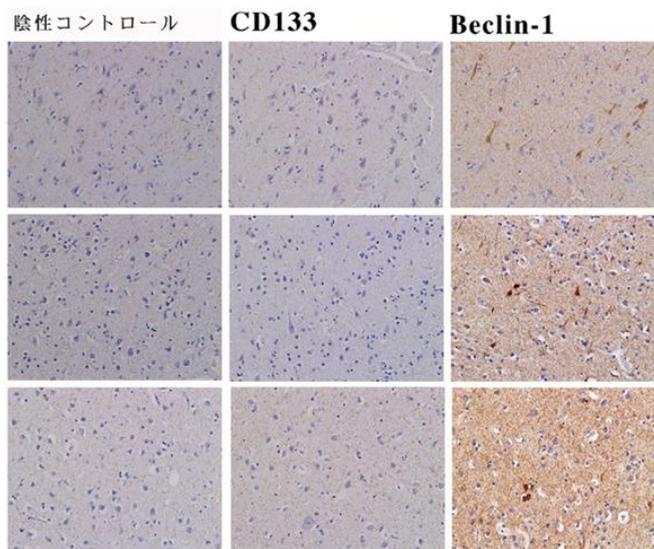


そこで、autophagic vesicle nucleation complex を形成する Beclin-1 の酵素処理超高感度法 (nsCSA 法) を開発した。上図は、熱処理に比べて酵素 (proteinase K) 処理と超高感度法で、極々少数の核陽性像と胃底腺上皮での極低レベルの発現を検出し、妥当な Beclin-1 の染色結果とした。右図は、胃生標本 (酷いピロリー菌感染胃炎) の Beclin-1 染色で、粘膜深部の胃底腺で Beclin-1 陽性の細胞



群を認め、粘膜表層部の導管内に剥離した **Beclin-1** 陽性細胞塊を認め、胃底腺上皮は自己貪食細胞死を示し、酷い炎症病変中では、細胞塊として基底膜から剥離し、導管を介して、胃内腔に排除されていることが明らかになった。

また、ヒト中枢神経系の変性疾患で、神経幹細胞マーカーである **CD133** の抗原回復超抗高感度 (nsCSA 法) と **Beclin-1** の酵素処理超高感度 (nsCSA 法) で検索すると、右図の様に、神経幹細胞を認めずに、変性神経細胞は **Beclin-1** の発現と濃染する細胞を示し、神経細胞の変性壊死は自己貪食の亢進と自己貪食細胞死である可能性が示唆された。



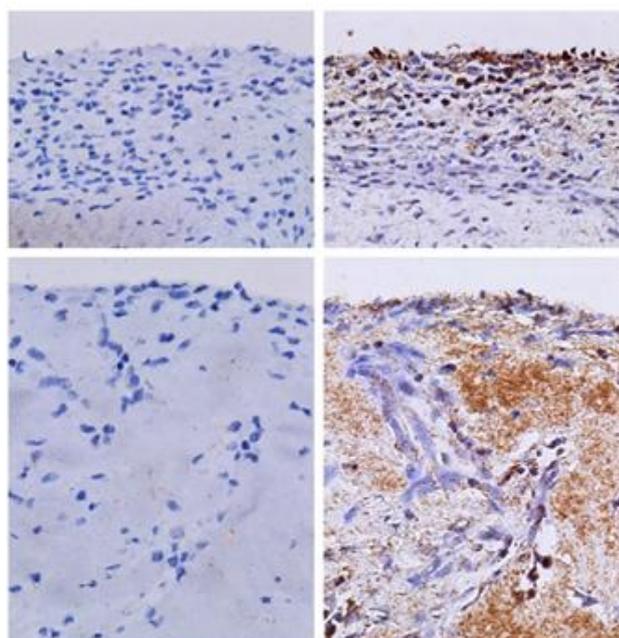
○Kato K, Hasui K, Wang J, Kawano Y, Aikou T, Murata F. Homeostatic Mass Control in Gastric Non-Neoplastic Epithelia under Infection of *Helicobacter pylori*: An Immunohistochemical Analysis of Cell Growth, Stem Cells and Programmed Cell Death. *Acta Histochem Cytochem.* 41(3): 23-38, 2008

○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

○Hasui K, Nagai T, Wang J, Jia XS, Aozasa K, Izumo S, Kawano Y, Kanekura T, Eizuru Y, Matsuyama T. Review; Immunohistochemistry of programmed cell death in archival human pathology specimens. *Cells* 2012, 1, 74-88

2) リウマチ様関節炎 (RA) の フィブリノイド壊死は自己貪食細胞死

RA の滑膜細胞の過形成とフィブリノイド壊死は、RA 特有の病変である。前記の cleaved caspase-3 と **Beclin-1** の染色を行うと、アポトーシスシグナル系の抑制が示唆されている滑膜細胞もフィブリノイド壊死も、cleaved caspase-3 陰性で **Beclin-1** 陽性であり、自



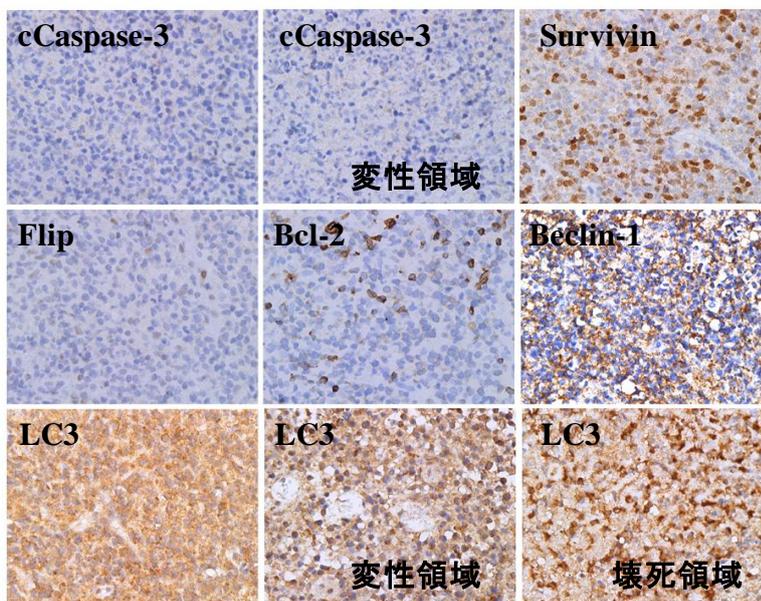
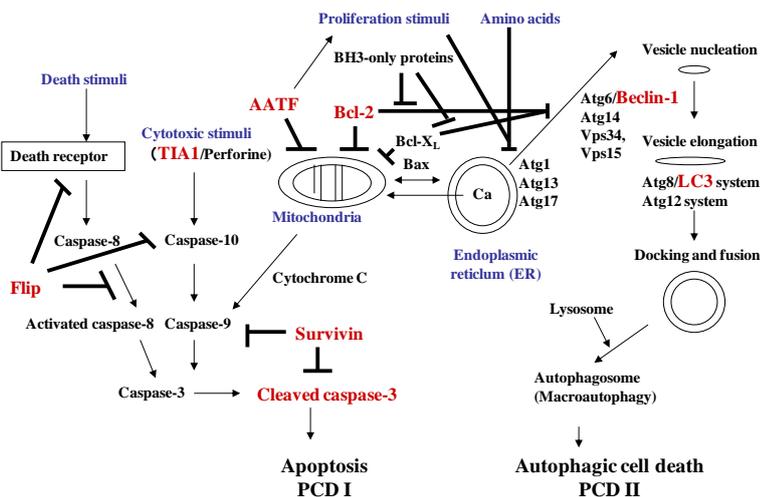
己貪食とその細胞死であった。

○Hasui K, Nagai T, Wang J, Jia XS, Aozasa K, Izumo S, Kawano Y, Kanekura T, Eizuru Y, Matsuyama T. Review; Immunohistochemistry of programmed cell death in archival human pathology specimens. Cells 2012, 1, 74-88

6 腫瘍細胞における細胞死

鼻 NK/T 細胞リンパ腫は、EBV 潜伏感染を示すと共に、特異な壊死病変を示す。この特異な壊死の性格を検索した。

右図は、アポトーシス (PCD I) と自己貪食細胞死 (PCD II) のシグナル伝達の略図である。赤字で示す分子をそれぞれの免疫組織化学で検索した。その結果、鼻 NK/T 細胞リンパ腫では、デスリセプターからのシグナルの拮抗分子である Flip の発現はなく、Bcl-2 の発現も低下していたが、caspase-9 と cleaved caspase-3 の抑制因子である survivin の腫瘍性発現を認め、cleaved



caspase-3 の発現は変性領域でも認められず、Beclin-1 発現し、LC3 も発現亢進があるアポトーシス抑制と自己貪食亢進の状態が見られ、その特異な壊死は LC3 の裸核様細胞残渣を LC3 が濃染し、それが集簇する領域的な自己貪食細胞死であった。

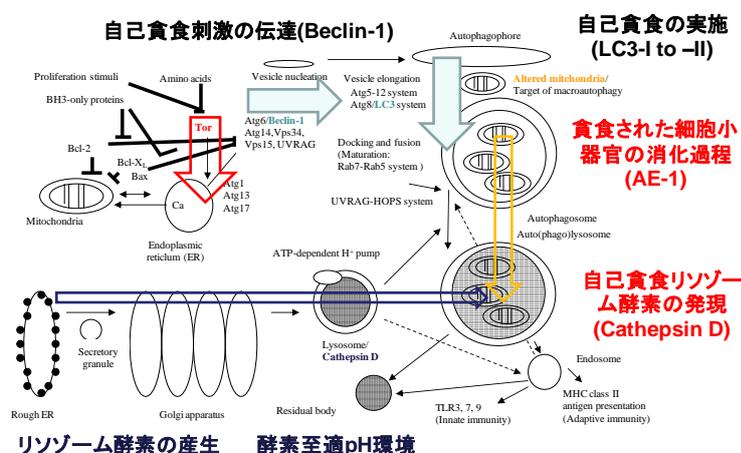
○Wang J, Hasui K, Jia X, Matsuyama T, Eizuru Y. Possible role for external environmental stimuli in nasopharyngeal NK/T-cell lymphomas in the northeast of China with EBV infection-related

autophagic cell death: a pathoepidemiological analysis. J Clin Exp Hematop. 2009;49(2):97-108.

○Hasui K, Wang J, Jia XS, Matsuyama T, Izumo S, Kawano Y, Kanekura T, Eizuru Y and Aozasa K. Pathoepidemiology of Epstein-Barr virus (EBV) infection and peculiar necrosis in nasal NK/T-cell lymphomas (NKTCL) in northeast China. Proceedings of The 10th Japanese-Korean Lymphoreticular Workshop 2009 and Symposium: Asian Hematopathology (2009.10.28-30, Fukushima View Hotel). Edited by Abe M, Kang CS. The Japanese Lymphoreticular Study Group, Fukushima, Japan. 2010 December pp. 40-42.

○Hasui K, Nagai T, Wang J, Jia XS, Aozasa K, Izumo S, Kawano Y, Kanekura T, Eizuru Y, Matsuyama T. Review; Immunohistochemistry of programmed cell death in archival human pathology specimens. Cells 2012, 1, 74-88

更に、右の図に示す様に、自己貪食の様相の解析が、Beclin-1、LC3、AE-1 (抗ミトコンドリア抗体)、cathepsin D (リソゾーム酵素)の免疫組織化学で、可能となり、更に、LC3の免疫組織化学的評価法は、腫瘍細胞の増殖の様相を示唆することが明らかになって来ています。



最近、以下の論文を出し、詳細を報告しています。
ご参照ください！

○Hasui K, Wang J, Jia X, Tanaka M, Nagai T, Matsuyama T, Eizuru Y. Enhanced autophagy and reduced expression of cathepsin D are related to autophagic cell death in Epstein-Barr virus-associated nasal natural killer/T-cell lymphomas: an immunohistochemical analysis of beclin-1, LC3, mitochondria (AE-1), and cathepsin D in nasopharyngeal lymphomas. Acta Histochem Cytochem. 2011;44(3):119-31.

○Hasui K, Nagai T, Wang J, Jia XS, Aozasa K, Izumo S, Kawano Y, Kanekura T, Eizuru Y, Matsuyama T. Review; Immunohistochemistry of programmed cell death in archival human pathology specimens. Cells 2012, 1, 74-88