

令和元年6月26日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08685

研究課題名(和文) 免疫組織染色の定量評価のための陽性コントロールの開発

研究課題名(英文) Positive control for the immunohistochemical staining using polymer

研究代表者

南谷 佳弘 (MINAMIYA, Yoshihiro)

秋田大学・医学系研究科・教授

研究者番号：30239321

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：最近、ある種の抗がん剤の効果を予測することが、特定のたんぱく質などの発現状況を調べることにより可能になった。その判定に使われるのが免疫組織染色である。免疫組織染色された検体は、病理医が染色性の強弱を主観的に判定していた。そのため擬陽性や偽陰性が問題になっていた。この研究は特定のたんぱく質などの発現状況を客観的に判定するための陽性コントロールを作成することを目的とした。高分子ポリマーに染色の対象となるたんぱく質を濃度勾配をつけて付着させた粒子を作成することで目的の陽性コントロールが完成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫組織染色は分子標的薬などの抗がん剤投与を行うか否かの判断にも用いられている。もし結果に誤りがあれば本来効果が期待されて投与されるべき患者に投与されない、あるいは効果が期待できないのに投与されるといった不具合が生じる。しかしその判定は病理医が染色程度を主観で判定している。本研究により濃度勾配を有する陽性コントロールができればこれらの問題が解決する。

研究成果の概要(英文)：Recently, it has become possible to predict the effects of some anticancer agents by examining the expression status of specific proteins in cancer tissues. Immunohistochemical staining has been used for this purpose. The immunohistochemically stained pathological samples were judged subjectively by pathologists. Therefore, it has been pointed out that errors sometimes occur. In this study, we aimed to create a positive control to objectively determine the expression status of a specific protein. Positive controls were successfully created by attaching the proteins to the high molecular weight polymer particles.

研究分野：癌に対する外科治療

キーワード：免疫組織染色 分子標的薬 陽性コントロール 癌 ミクロゲル 高分子化合物

1. 研究開始当初の背景

近年、免疫組織染色（以下 IHC）の技術は格段に向上してきている。新たな抗体の開発、検出方法の進歩に伴い、IHC は組織におけるタンパク質発現を評価する方法として現在では必須の手法である。そして IHC は医学・生物学の研究ばかりでなく、分子標的薬などの抗がん剤投与を行うか否かの判断にも用いられている。特に乳癌では Her2 の過剰発現が見られる場合は trastuzumab などが投与される。しかし IHC の染色程度は組織標本の管理状態、抗体の種類、IHC 習熟度によって結果が安定しない。もし結果に誤りがあれば本来効果が期待されて投与されるべき患者に投与されない、あるいは効果が期待できないのに投与されるといった不具合が生じる。現在、Her2 発現の評価は病理医による IHC の定性評価に基づいたスコア化によって行われている。Bahreini らは、乳癌の Her2-IHC のメタアナリシスの結果、遺伝子発現を見る fluorescence in situ hybridization（以下 FISH）と IHC は、IHC スコア 0/1+と 3+では、それぞれ 4%と 9%の相違があったと報告している。また判定保留となる 2+が 64%と高率と報告している[1]。以上から現在のガイドラインに従った判定法には未だ問題があると言える。一方、FISH は優れた方法であるが、時間とコストに問題があり、IHC の正確な判定ができれば臨床上の問題が解決するかもしれない。また、新たな分子マーカーに関する研究でも IHC が多用されている。しかし IHC と RT-PCR の結果の不一致も多く経験する。さらに IHC の結果に基づく群分けは IHC の染色程度の定性評価に頼っているのが現状であり、正確性に欠ける。本研究の目的は IHC の評価を正確にするために、IHC の濃度コントロールを作成して「従来の定性評価から定量評価にすること」である。培養細胞を用いた陽性コントロールは市販されているが強染されるため、形態コントロールにはなるが、定量評価には不向きである。これらの問題を解決するために我々は IHC の陽性コントロールと定量評価のための濃度コントロールの開発を目指して研究を進めてきた。慶應義塾大学名誉教授の川口春馬氏との共同研究を平成 25 年より開始した。反応性マイクロハイドロゲルはその内部にアミノ酸と結合する反応性基を有している。この反応性基に既知濃度の目的タンパク質に濃度勾配を持たせて固定化する方法であり、現在特許出願中である[2]。当初 1 μ m 程度であった粒子径を 8 μ m まで大きくした。また高分子ゲルにサイトケラチン 19（以下 CK19）を既知の濃度で含有させて、抗 CK19 抗体で凍結切片を用いて IHC を行ったところ濃度勾配に合わせて染色勾配ができた。

2. 研究の目的

現在は CK19 を用いた高分子ゲルでの実験であるが、ほかのタンパク質を用いても同様の染色勾配が得られるか検討する。②現在は凍結切片での実験であるが、パラフィン切片でも同様の結果が得られるか検討する。③目的タンパク質を安定的に容易に固定化できるプロトコールを作成する。④乳癌の Her2-IHC における従来の判定法と本研究で提案する方法とを比較する。当初、粒子は完成していると考えていたが、定量化にはいくつかの問題があり、この研究では粒子を改良して定量化が可能なものを作成することとした。具体的には①コア粒子をマイクロゲルで被覆する方法を開発する。②実験経過中スライドガラスから粒子が剥離する現象がみられ

てため、これを改善する。③一部、非特異染色が生じたため、これを防ぐ方法を開発する。

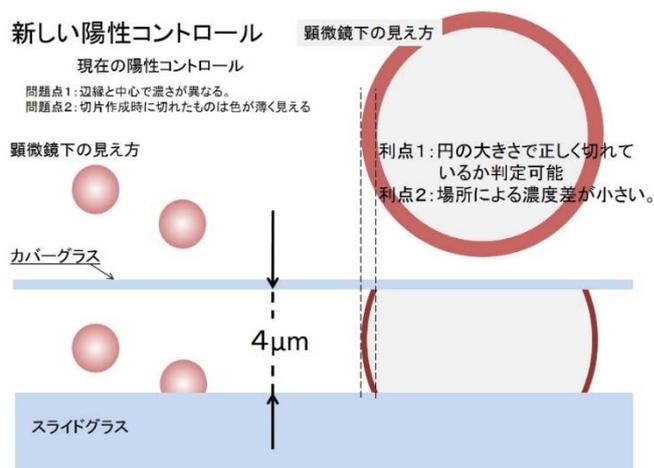
3. 研究の方法

上記の目的を達成するためにマイクロゲル粒子の完成を目指して以下の3つの実験を行った。

研究1：コア粒子を十分な量のマイクロゲルで被覆する

染色したマイクロゲルは辺縁と中心で染色濃度が若干異なること、切片を作成する位置で濃度が異なって見えてしまうことなどの問題が生じる。そこで、図1に示すようなコントロールを作成した。中心のコア粒子には、アミノ基修飾されたシリカを用いマイクロゲルの反応基を利用してコア粒子を被覆した。コア粒子はマイクロゲルで被覆された切片を染色した場合、円として観察され画像解析に適すると考えられる。しかし、現状では被覆状態に差が大きいため反応条件の検討を行った。

図1

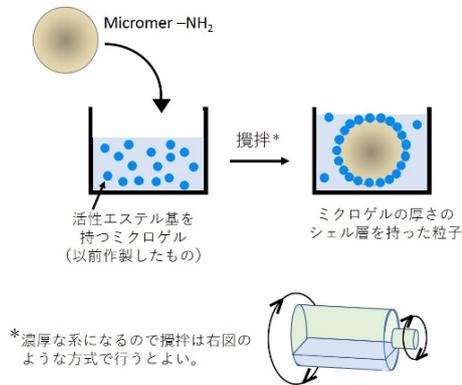


研究2：スライドガラスからコア粒子切片が剥離するのを防止する

マイクロゲルをコア粒子の表面に結合させる方法(図2)で作成したパラフィン切片を用いて検討を行った。その際、通常の組織切片とは異なるシリカでできたコア粒子切片をスライドガラスに載せると染色操作中に剥離が発生することが課題となっていた。そこでコア粒子切片をスライドガラス上から剥離させない方法を検討した。

図2

マイクロゲルの化学吸着を使用するコアシェル粒子の作製



研究3：マイクロゲルの非特異染色を防ぐ

これまで HER2 タンパクの濃度を変えることによりマイクロゲルの染色に濃度差がつけられることについては確認済みであったが、完全に非特異染色を防げないためにタンパクを添加しない場合のネガティブコントロールとしての用途あるいはタンパク濃度を変えた場合の染色性に問題があった。マイクロゲルは非常に多数の反応基を有し HER2 タンパクを結合させているが、染色する際に反応基が閉じられず残存していると、そこに抗 HER2 抗体あるいは2次抗体が直接結合し HER2 タンパク量に依存しない非特異染色が起こる。これまではグリシルグリシンを反応終了（クエンチング）剤として反応基を閉じていたが非特異染色を完全に防ぐことができなかった。そこでマイクロゲルの非特異染色を完全に防ぐ反応条件について検討を行った。

4. 研究成果

研究1：コア粒子を十分な量のマイクロゲルで被覆する

pH 等種々の反応条件を検討した結果、マイクロゲルの凝集性に違いが認められた。今後は実際に画像解析を行うことにより、どの程度の被覆状態が解析に要求されるのか検討を行う。

研究2：スライドガラスからコア粒子切片が剥離するのを防止する

まずは包埋法について改良を加えた。これまでは通常のパラフィン包埋の方法でコア粒子とマイクロゲルの包埋を行っていた。そこで、コア粒子とマイクロゲルをゼラチンで包埋した後、パラフィンブロックとする方法を検討した。さらに、これまでは切片が載ったスライドガラスを60°Cで一晩乾燥させていたが、37°Cで二晩乾燥を行った。以上の方法で作成したコア粒子切片は染色操作によるスライドガラスからの剥離が大幅に軽減された。

研究3：マイクロゲルの非特異染色を防ぐ

バッファー等の反応条件をグリシルグリシンの結合に最適化した結果、マイクロゲルの反応基に対するクエンチングが飛躍的に上昇し非特異染色を大幅に防ぐことに成功した。また、前述の

条件下で HER2 タンパク濃度を変えた場合、染色に濃度差がつけられることも併せて確認できた（図4）。

図4



<引用文献等>

[1] Bahreini F1, et al. A meta-analysis on concordance between immunohistochemistry (IHC) and fluorescence in situ hybridization (FISH) to detect HER2 gene overexpression in breast cancer. *Breast Cancer* 22:615-25, 2015.

[2] 出願人:国立大学法人秋田大学ほか1名、発明者:南谷佳弘ほか2名、特許出願2014-030808、細胞内生体分子の検出に用いる標準資料及び細胞内生体分子の検出方法。

[3] 出願人:国立大学法人秋田大学ほか1名、発明者:南谷佳弘ほか4名、特許出願2010-15169、特許公開2012-13598、免疫組織染色方法および免疫組織染色装置。

[4] Toda H, Minamiya Y, et al. A novel immunohistochemical staining method allows ultrarapid detection of lymph node micrometastases while conserving antibody. *Acta Histochem Cytochem.* 2011;44:133-9

5. 主な発表論文等

現時点でなし。特許出願を考慮しているため、発表は行っていない。

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：南條 博

ローマ字氏名：(NANJO, Hiroshi)

所属機関名：秋田大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号：70250892