

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07030

研究課題名(和文) 酵素抗原法のパラフィン切片への応用：病変で作られる抗体の疾患網羅的解析をめざして

研究課題名(英文) Application of enzyme-labeled antigen method for formalin-fixed paraffin-embedded tissue section

研究代表者

水谷 泰嘉 (Mizutani, Yasuyoshi)

藤田医科大学・医学部・助教

研究者番号：10546229

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、酵素抗原法のホルマリン固定パラフィン包埋(FEPE)切片への応用を試みた。FEPE切片上の抗体の賦活化法について検討した。その結果、蛋白分解酵素処理が有効であることを確認した。高濃度のプロテイナーゼK処理によって、FEPE切片では50%程度の活性の回復にとどまったが、PFA固定パラフィン包埋切片では抗体活性が凍結切片の80%程度まで回復することを確認した。各種固定法についてパラフィン切片で抗体活性を維持できるか検討した。一部の固定法では、標的抗原の種類に関係なくパラフィン切片でも、抗体活性が維持可能であることが明らかとなった。シグナル増感法についても検証して、その有効性を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

複数種の固定法について検討を行い、パラフィン切片で抗体活性を維持可能な固定法が明らかとなった。これは、今後の検体の保管管理の簡便化につながる知見であり、酵素抗原法の応用性を高める知見である。また、FEPE切片における抗原の賦活化法や抗原抗体反応のシグナル増感法、あるいは抗原の標識分子に関する有用性を明らかにすることができた。これらの手法を改良して組み合わせることで、酵素抗原法のFEPE切片への応用が可能となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we attempted to apply the enzyme-labeled antigen method to formalin-fixed paraffin-embedded (FEPE) tissue sections. We evaluated retrieval methods for the activity of antibodies on FEPE sections. High-concentration proteinase K treatment resulted in only around 50% retrieval of activity in FEPE sections compared to PFA-fixed frozen sections, but around 80% in PFA-fixed paraffin-embedded sections. We also evaluated whether various fixation methods can maintain antibody activity in paraffin sections. It was found that some fixation methods could maintain antibody activity on paraffin sections regardless of the type of target antigens. Signal amplification methods were also tested and their effectiveness was confirmed.

研究分野：病理学

キーワード：酵素抗原法 形質細胞 抗体 抗原

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 感染症、自己免疫疾患、アレルギー性疾患や一部の悪性腫瘍などの慢性炎症を伴う病変部では、形質細胞(抗体産生細胞)の浸潤が顕著である。しかし、これら病変部の形質細胞が産生する抗体の標的抗原は、ほとんど明らかにされていない。病変部に浸潤することから、病態を理解するうえで重要な抗体が産生されることが推測される。たとえば、正常小腸などの消化管粘膜では、IgA産生形質細胞の浸潤が目立つ。これらIgAは、宿主免疫と腸内細菌叢との均衡の維持に寄与すると考えられているが、標的抗原が腸内細菌成分であることは示されていない。一方、血中の自然抗体は抗原刺激のない条件でも産生され、核酸、リン脂質、細菌リポ多糖やABO血液型抗原に対する抗体が報告されており、抗原特異性の低いパターン認識受容体として機能することで、広範な病原体に対する感染防御に寄与すると考えられている。しかし、これら自然抗体がいつ・どこで産生されるか明らかでない。このように、組織内に局在する形質細胞の浸潤意義は、ほとんどわかっていない。

(2) 酵素抗原法によって、これらの疑問を解決できる可能性がある。酵素抗原法は、酵素などで標識した抗原プローブを用いて、組織切片上の特異抗体産生細胞を可視化する免疫組織化学法である。本技法により、組織内の特異抗体産生細胞の局在観察という視点で病態を解析できる。われわれは、コムギ無細胞系によりビオチン化タンパクライブラリを作製して、病変組織抽出物や血清中の抗体が反応する抗原を分子間相互作用検出法であるAlphaScreen法で検索したのち、その抗原をプローブとする酵素抗原法によって組織内の特異抗体産生細胞を証明する方法を開発した(引用文献)。本技法をヒト病変に応用して、関節リウマチ滑膜における自己抗体産生細胞、歯周病歯肉における抗歯周病菌抗体産生細胞、扁桃炎におけるA群溶血性連鎖球菌の糖鎖抗原に対する抗体産生細胞の局在を明らかにした(引用文献)。このように、病変部の形質細胞が疾患関連抗原に対する抗体を産生することを組織切片上で示すとともに、新たな病態解析手法として酵素抗原法が多様な病態へ応用できることを示した。しかし、酵素抗原法パラホルムアルデヒド(PFA)固定後凍結切片に応用できるが、ホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)切片では適用が難しい。

### 2. 研究の目的

(1) 特異抗体産生細胞を可視化する酵素抗原法をFFPE切片へ応用するための技術を確立することが、本研究の目的である。組織内で産生される抗体の分布を明らかにして病態との関連を解析することで、その抗体を病理マーカーとする診断法の開発や、病変部で産生される抗体の制御を目的とした創薬や治療法の開発に結びつく可能性がある。これまでに、病変組織で産生されるが血中では検出されない抗体を見いだしている。将来、病変組織でのみ検出される抗体のうち、診断マーカーとして利用できる抗体を発見できれば、酵素抗体法のように酵素抗原法を病理診断に活用できる。これら研究を加速させるために、FFPE切片へ酵素抗原法を応用するための技術が必要である。

(2) パラフィン切片でも抗体活性を保持できる固定法の検索も本研究の目的である。パラフィン切片に応用できれば、新たに入手した検体を凍結切片にする必要性がなくなる。検体の保存において凍結管理の必要がなくなり、薄切も室温で可能となることから、酵素抗原法の応用性が高まることが期待される。

### 3. 研究の方法

#### (1) FFPE切片を対象とした酵素抗原法における抗原賦活化法の検証

西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP)を四肢足底部へ皮下免疫したラットから腋窩、膝窩および鼠蹊部のリンパ節を採取した。採取したリンパ節を半割して、片方の組織片からFFPE切片を作製した。もう一方の組織片は、PFA固定後凍結切片とした。全形質細胞に対する抗HRP抗体産生細胞の割合は、リンパ節によって異なる可能性があるため、単純にその値を賦活化による改善の指標とするのは適切ではない。そこで、賦活化処理したFFPE切片における抗HRP抗体産生細胞の陽性率を、対応するPFA固定後凍結切片における抗HRP抗体産生細胞の陽性率でノーマライズすることで、抗HRP抗体の検出率を算出して各処理間で比較した。具体的には、両切片に対して、免疫グロブリン軽鎖と重鎖に対するカクテル抗体による免疫染色を行って、領域を決めて形質細胞数を計測した。PFA固定後凍結切片に対して、HRPによる酵素抗原法を行って、形質細胞数を計測した同一領域について、抗HRP抗体産生細胞数を計測した。これらの値から、PFA固定後凍結切片における全形質細胞数に対する抗HRP抗体産生細胞の割合を算出した。この値をFFPE切片に対するベンチマークとした。そして、FFPE切片を対象として、抗原の賦活化を試みた。FFPE切片においても抗HRP抗体産生細胞数を計測して、全形質細胞に対する割合を算出した。FFPE切片の抗HRP抗体産生細胞の割合をPFA固定後凍結切片の抗HRP抗体産生細胞の割合で割ることで、抗HRP抗体産生細胞の検出率を算出した。賦活化法として、プロテイナーゼK、加熱処理、過ヨウ素酸処理を検証した。

## (2) FFPE 切片を対象としたビオチン標識抗原プローブを用いた酵素抗原法における増感法の検証

スカシガイヘモシアニン (keyhole limpet hemocyanin, KLH)、卵白アルブミン (ovalbumin, OA)、ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA) の混合抗原をラットに皮下免疫して、腋窩、膝窩および鼠蹊部のリンパ節を採取した。このリンパ節を FFPE 切片に加工して、免疫した各抗原をビオチン標識プローブとして各種増感法による染色性の違いを検証した。増感法として Streptavidin-HRP、avidin biotin peroxidase complex (ABC) 法、アミノ酸ポリマー法、catalyzed signal amplification (CSA) II 法を検証した。次世代免疫検出技術 Duolink proximity ligation assay (PLA) の酵素抗原法への応用も試みた。

## (3) 新規ペプチドタグを用いた検証

N 末端にビオチンリガーゼ認識部位、6×His タグ、AGIA ペプチドタグ (引用文献) を付加したリコンビナント抗原を作製して、検出対象とする標識の違いによる染色性の変化を凍結切片で検証した。抗原調製用に過去にクローニング済みであるヒト蛋白質の MAP1LC3B、FKBP4 および FBXO2、*Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) の抗原蛋白質である Ag53、Arg-gingipain および Lys-gingipain のドメイン構造である Arg-hgp、Lys-hgp、Arg-pro、Lys-pro を抗原として検証した。組織切片として、各抗原を免疫したラットもしくは、*P. gingivalis* を免疫したラットのリンパ節を用いた。染色性は、streptavidin-HRP、アミノ酸ポリマー法および CSA II 法と比較した。

## (4) 抗体活性を保持する固定法の検索

これまでに、HRP を免疫したラットのリンパ節を用いて、ホルマリン以外の固定法について抗体活性を保持できる方法を見出している。HRP 以外の抗原に対する抗体でも同様に抗体活性が保持されるかどうかを検証した。KLH、OA および BSA の混合抗原を四肢足底部へ皮下免疫したラットから腋窩、膝窩、鼠蹊部のリンパ節を採取して、各固定法により処理した。そして、凍結切片およびパラフィン切片を作製して、各種抗原をプローブとする酵素抗原法を行って、染色性を PFA 固定後凍結切片と比較した。固定法としてカルノア液、アセトン、エタノール、カルボジイミド、periodate lysine paraformaldehyde (PLP)、PLP-AMeX、ザンボニ液、中性緩衝ホルマリンを用いた。AMeX (Acetone, Methyl-benzoate, Xylene) 法も実施した。一部固定法について、低融点パラフィン包埋切片も検証した。

## 4. 研究成果

### (1) FFPE 切片を対象とした酵素抗原法における抗原賦活化法の検証

HRP 免疫ラットリンパ節の FFPE 切片について、1、20、80 および 320  $\mu\text{g/ml}$  のプロテイナーゼ K で処理して、HRP による染色性を比較検証した。PFA 固定後凍結切片の陽性率に対する抗 HRP 抗体産生細胞の検出率は、1  $\mu\text{g/ml}$  では 0.66%、20  $\mu\text{g/ml}$  では 21.78%、80  $\mu\text{g/ml}$  では 77.69%、320  $\mu\text{g/ml}$  では 42.97%を示し、高濃度のプロテイナーゼ K 処理によって、検出率が上昇した。PFA 固定および中性緩衝ホルマリン固定リンパ節のパラフィン包埋切片も検証した。PFA 固定後パラフィン包埋切片では、1  $\mu\text{g/ml}$  では 6.74%、20  $\mu\text{g/ml}$  で 68.28%、80  $\mu\text{g/ml}$  では 77.69%、320  $\mu\text{g/ml}$  では 83.21%の検出率を示した。中性緩衝ホルマリン固定リンパ節のパラフィン包埋切片では、1  $\mu\text{g/ml}$  では 1.55%、20  $\mu\text{g/ml}$  で 26.70%、80  $\mu\text{g/ml}$  では 52.70%、320  $\mu\text{g/ml}$  では 55.40%の検出率を示した (図 1)。

過ヨウ素酸処理およびクエン酸緩衝液または EDTA 緩衝液を用いた加熱処理を検討したが、良好な結果は得られなかった。

PFA 固定後パラフィン包埋切片では、プロテイナーゼ K 処理によって、凍結切片に近いレベルで特異抗体産生細胞を検出できることが示された。また FFPE 切片でも 50%近い検出率が確認され、増感法などの他の染色手法と組み合わせることで、染色性のさらなる改善が期待される。

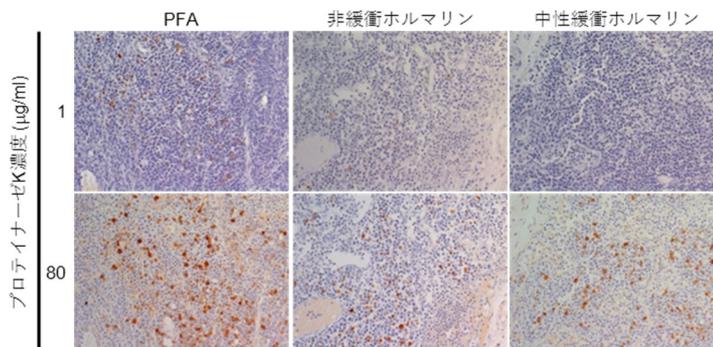


図 1. FFPE 切片のプロテイナーゼ K 処理による抗体賦活化  
高濃度のプロテイナーゼ K 処理により、抗 HRP 抗体産生細胞のシグナルが増大している。また賦活効果は、3 種類の固定のうち PFA でもっとも強くみられる。

## (2) FFPE 切片を対象としたビオチン標識抗原プローブを用いた酵素抗原法における増感法の検証

KLH、OA、BSA の混合抗原を免疫したラットリンパ節 FFPE 切片に対して、免疫した各抗原をビオチン標識プローブとして各種増感法による染色性の違いを検証した。増感法として

Streptavidin-HRP、avidin biotin peroxidase complex(ABC)法、アミノ酸ポリマー法、catalyzed signal amplification(CSA)II法を検証した。KLHおよびOAにおいて、HRP標識ストレプトアビジンによる検出と比較して、各増感法において、明らかなシグナルの増幅が認められた。ABC法およびCSAII法ではアミノ酸ポリマー法よりも強いシグナルを検出できたが、背景染色も増強されたため、偽陽性を検出してしまう可能性が高い(図2)。そこで、2次抗体の希釈倍率の検討など染色条件を変更して背景染色の低減を試みたが、改善しなかった。背景染色低減のためのさらなる工夫が必要である。また、BSAについては、いずれの増感法でも抗BSA抗体産生細胞を検出することができなかった。抗原によって増感法の効果が異なるため、各抗原間で安定してシグナル増幅できる手法を見出す必要があると思われる。またビオチン標識KLHをプローブとして、Duolink proximity ligation assay(PLA)の酵素抗原法への応用も試みたが、良好な結果は得られなかった。

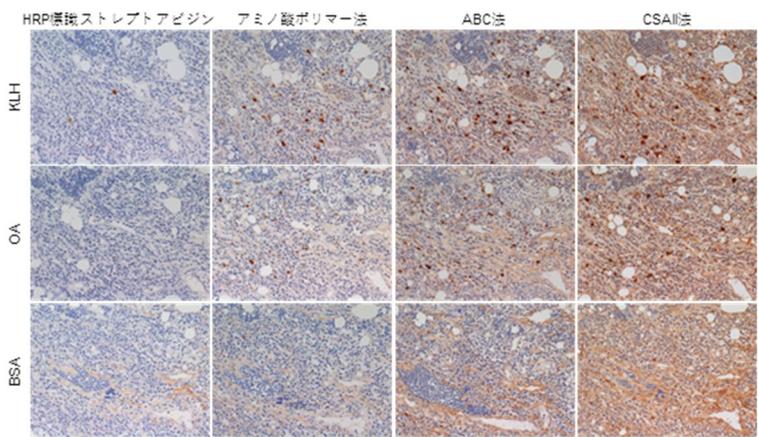


図2. 酵素抗原法におけるFFPE切片への増感法の適用  
増感法により抗体産生細胞のシグナルが増幅するが、ABC法やCSAII法では背景染色が目立つ。BSAでは陽性細胞が認められない。

以上のように、FFPE切片へ増感法を適用することで、HRP標識ストレプトアビジンを用いた検出法よりも高感度にシグナルを検出できることが示された。しかし、抗原により増感法の有効性が異なっていたり、背景染色が増大したりするため、改善が必要である。現在のところ、FFPE切片へ適用できる増感法として、アミノ酸ポリマー法が有用と思われる。

### (3) 新規ペプチドタグを用いた検証

免疫した抗原に対応するリコンビナント抗原のN末端に一分子のビオチン、6xHis tag、およびAGIAペプチドを標識した。これをプローブとして、対応する抗原を免疫したラットリンパ節のPFA固定後凍結切片に対する酵素抗原法を行った。HRP標識ストレプトアビジンを用いてビオチン標識を検出する方法とアミノ酸ポリマー法によりAGIA標識を検出する方法と比較すると、AGIAの法がビオチンよりも抗体産生細胞を検出可能な抗原の限界希釈倍率が高かった(図3)。AGIA標識を標的としてCSAII法を適用すると、アミノ酸ポリマー法よりもシグナルが増強された。一方、6xHis-tagを標的としてアミノ酸ポリマー法を適用しても、AGIAのようなシグナルは検出されなかった。リコンビナント抗原を酵素抗原法のプローブとして用いる際の標識として、AGIAが有用であることが示された。この結果はPFA固定後凍結切片で検証されたものであり、FFPE切片への応用は今後の課題である。

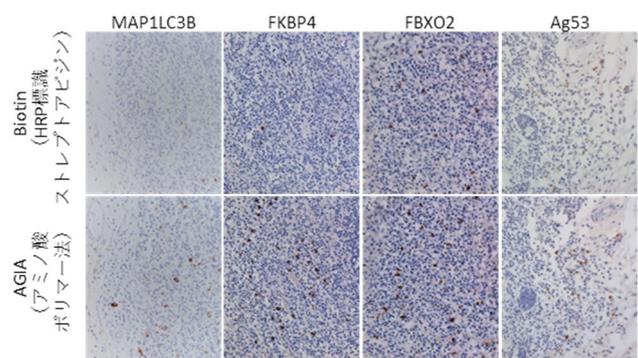


図3. 検出標識および検出法による染色性の違い  
ビオチン標識抗原をHRP標識ストレプトアビジンで検出する方法と比較して、AGIA標識をアミノ酸ポリマー法で検出する方法が感度よく検出できる。

### (4) 抗体活性を保持する固定法の検索

これまでにHRP免疫ラットリンパ節における抗HRP抗体産生細胞を対象に、パラフィン包埋切片でも抗体の抗原結合活性を保持できる固定法を見出している。そこで、HRP以外の抗原に対する抗体でも、同様に抗体活性が保持されるかを検証した。

各種固定液で処理された凍結切片およびパラフィン包埋切片に対して、ビオチン標識KLH、0およびBSAにより酵素抗原法を行うと、凍結切片において、エタノール、アセトン、PLPおよびザンボニ液による固定が良好な染色性を示した。パラフィン切片ではAMeX法、エタノールおよびアセトンによる固定が良好だった(図4)。低融点パラフィン切片では、PLPとザンボニ固定において良好な染色性が確認された。これらの結果はKLH、OAおよびBSAの各抗原で共通しており、抗HRP抗体産生細胞を検出対象とした場合とも類似していた。したがってこれらの固定法は、抗体の標的抗原にかかわらず、抗原結合活性を維持できるものと期待される。

パラフィン切片においては、ホルマリンをはじめとする架橋反応による固定液では、抗体活性の保持が難しいことが明らかとなった。エタノールやアセトンのような凝固系の固定液が抗体活性保持に有用であることが明らかとなった。また凝固系の固定液としてカルノア液を検討し

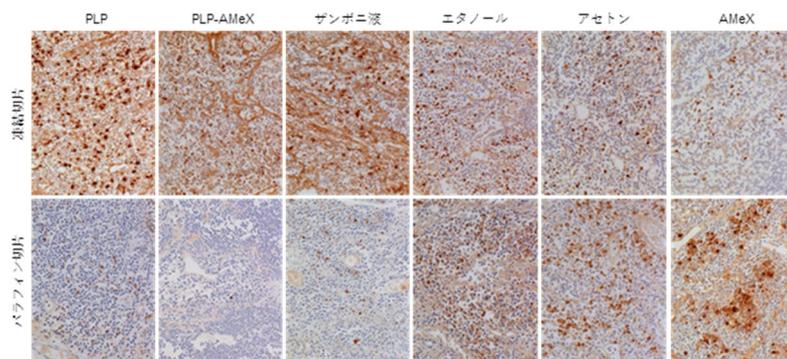


図 4. 各種固定法によって調製された凍結切片とパラフィン切片における抗 KLH 抗体の染色性の違い。凍結切片では、とくに PLP、ザンボニ液、エタノール、アセトン固定で良好なシグナルが観察される。一方、パラフィン切片ではエタノール、アセトンおよび AMeX 法で良好なシグナルが観察される。

たが、凍結切片、パラフィン切片、低融点パラフィン包埋切片のいずれも抗体産生細胞が検出できなかった。この原因として固定液の pH の低さが疑われる。非緩衝ホルマリンも酸性の固定液であり、酸性であることが抗体失活の一因となっている可能性が示唆された。

以上の結果から、固定液によって、パラフィン切片でも抗体活性を保持できることが明らかとなった。

#### (5) 総括と展望：

本研究により酵素抗原法に関する有用な知見を得ることができた。残念ながら現在のところ、FFPE 切片で安定して抗体産生細胞を検出する条件を確立できていない。しかし、これまでの検討により、パラフィン切片で抗体活性を維持できる固定法が明らかとなった。抗 HRP 抗体を検出対象とした場合に、PFA 固定パラフィン包埋切片では高濃度のプロテイナーゼ K 処理によって、抗体活性が凍結切片と同程度まで回復することから、検体の凍結保存から室温保管への移行が可能となることが期待される。他の抗原に対する抗体でも同様に抗体活性が保持できるかを検証する必要があるが、今後の検体の保管管理について有用な情報であり、酵素抗原法の応用性を向上させる知見である。また、FFPE 切片における抗原の賦活化法や抗原抗体反応のシグナル増感法、あるいは抗原標識分子に関する有用性を明らかにすることができた。これらの手法を改良して組み合わせることで、酵素抗原法の FFPE 切片への応用が可能となることが期待される。

#### 引用文献

- Mizutani Y, Matsuoka K, Takeda H, Shiogama K, Inada K, Hayakawa K, Yamada H, Miyazaki T, Sawasaki T, Endo Y, Tsutsumi Y. Novel approach to identifying autoantibodies in rheumatoid synovitis with a biotinylated human autoantigen library and the enzyme-labeled antigen method. *J Immunol Methods*. 387(1-2):57-70, 2013. doi: 10.1016/j.jim.2012.09.011.
- Mizutani Y, Shiogama K, Onouchi T, Sakurai K, Inada K, Tsutsumi Y. Enzyme-labeled Antigen Method: Development and Application of the Novel Approach for Identifying Plasma Cells Locally Producing Disease-specific Antibodies in Inflammatory Lesions. *Acta Histochem Cytochem*. 49(1):7-19, 2016. doi: 10.1267/ahc.15030.
- Yano T, Takeda H, Uematsu A, Yamanaka S, Nomura S, Nemoto K, Iwasaki T, Takahashi H, Sawasaki T. AGIA Tag System Based on a High Affinity Rabbit Monoclonal Antibody against Human Dopamine Receptor D1 for Protein Analysis. *PLoS One*. 11(6):e0156716, 2016. doi: 10.1371/journal.pone.0156716. eCollection 2016.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hanxiao Sh, Atsuko Niimi, Toshiyuki Takeuchi, Kazuya Shiogama, Yasuyoshi Mizutani, Taisuke Kajino, Kenichi Inada, Tetsunari Hase, Takahiro Hatta, Hirofumi Shibata, Takayuki Fukui, Toyofumi Fengshi Chen-Yoshikawa, Kazuki Nagano, Takashi Murate, Yoshiyuki Kawamoto, Shuta Tomida, Takashi Takahashi, Motoshi Suzuki	4. 巻 112
2. 論文標題 CEBP facilitates lamellipodia formation and cancer cell migration through CERS6 upregulation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2770-2780
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14928	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 水谷泰嘉
2. 発表標題 AGIAタグ蛋白抗原プローブを用いた酵素抗原法の応用
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 水谷泰嘉、塩竈和也、竹内俊幸、新美敦子、石 含笑、稲田健一、鈴木 元
2. 発表標題 病変組織内の特異的抗体産生細胞を可視化する「酵素抗原法」の技術開発
3. 学会等名 第60回日本組織細胞化学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水谷泰嘉、塩竈和也、竹内俊幸、新美敦子、石 含笑、稲田健一、鈴木 元
2. 発表標題 酵素抗原法によるピロリ菌感染スナネズミにおける抗ピロリ菌抗体産生細胞の局在証明
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水谷泰嘉、塩竈和也、竹内俊幸、新美敦子、稲田健一、鈴木元
2. 発表標題 酵素抗原法の技術開発：標本作製過程が抗体活性におよぼす影響
3. 学会等名 第59回日本組織細胞化学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 水谷泰嘉、塩竈和也、尾之内高慶、櫻井浩平、稲田健一、堤 寛
2. 発表標題 酵素抗原法の技術開発：パラフィン包埋切片において各種固定法が抗体活性におよぼす影響
3. 学会等名 第107回日本病理学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 水谷泰嘉、塩竈和也、竹内俊幸、新美敦子、稲田健一、鈴木元
2. 発表標題 酵素抗原法の技術開発：固定条件が抗体活性におよぼす影響
3. 学会等名 第50回藤田学園医学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	塩竈 和也  (Shiogama Kazuya)  (10387699)	藤田医科大学・医療科学部・講師    (33916)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	稲田 健一  (Inada Ken-ichi)  (70246081)	藤田医科大学・医学部・教授    (33916)	
研究分担者	鈴木 元  (Suzuki Motoshi)  (80236017)	藤田医科大学・医学部・教授    (33916)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関