

—特集 [形態学の逆襲：形態学教室の扉をたたいてみてください (4)]—



In situ hybridization 法の高感度化手法と その神経科学未解明領域への応用

肥後 心平¹ 金谷 萌子² 水野 友喜³
小澤 一史^{4,5} 坂本 篤裕³ 石井 寛高¹

¹ 日本医科大学大学院医学研究科解剖学・神経生物学分野

² 東京女子医科大学医学部生理学

³ 日本医科大学大学院医学研究科疼痛制御麻醉科学

⁴ 日本医科大学名誉教授

⁵ 佛教大学保健医療技術学部

1. 緒言

特定のタンパク質や遺伝子発現の組織内局在・細胞内局在を明らかにする組織学的手法は、生命科学・医学における生体機能解析の基幹手法である。代表的な組織学的手法の一つである in situ hybridization 法 (ISH) は、DNA・RNA 等核酸を標的にするという特性から、遺伝子改変動物を用いた機能解析、AAV ウイルスによる局所的機能調節など、近年大きく発展を続けている分子生物学的な手法との併用に強みをもつ手法である。特に神経系の研究分野では、近年の single-cell RNA シーケンス解析により、単一神経核/領域内で遺伝子発現プロファイルの異なる多数の細胞集団が混在していることが明らかになりつつあり¹²、細胞レベルの分解能で mRNA 局在解析を行うことができる ISH はより重要性を増している³。また、より短いプローブ長での高感度化や手法の簡便化などを目標に手法の改良が続いており、従来の感度では検出できなかった低発現量遺伝子の解析など、より応用の幅が広がっている。本稿では、タンパク質を検出標的とする免疫染色法と比較した ISH の特徴、近年の ISH 高感度化の試みに加え、神経科学分野の未解明領域への応用について概説する。

2. ISH の手法的特徴

主にタンパク質を標的とする免疫染色法は簡便に標的分子の細胞内局在まで解析可能であるという利点がある一方で、抗体ベースの検出手法であることから、手法の成否が使用する抗体の力価と特異性に大きく依存するという制限がある。抗体ベースの検出手法は病理診断に不可欠なツールであるため、ヒトタンパク質、

特に病理マーカーに対する抗体などでは力価・特異性が保証された抗体を容易に入手可能である一方で、実験動物を用いる基礎研究においては標的タンパク質に対する良い抗体がない場合も多い。また、抗原-抗体反応は認識部位の立体構造に依存するため、類似する立体構造に対する偽陽性反応も問題となる⁴。

ISH では、核酸配列データベースをもとに標的配列に相補的なプローブを設計・合成するため、核酸配列が既知であればどのような標的配列・標的遺伝子に対しても動物種にかかわらずプローブ作成が可能である⁵。また、mRNA を標的に遺伝子発現解析を目的とする組織 ISH では、検出系が同じであれば力価はプローブ長に比例し、偽陽性シグナルは相同性の高い別遺伝子へのミスハイブリダイゼーションで生じることが主である。そのため検出力は標的 mRNA 上でプローブ設計可能な配列長から、特異性は他遺伝子との相同性からプローブ設計時に予測可能であるという利点がある⁵。一方で、免疫染色法に比べ染色までに長時間かかり、手技も煩雑であるという欠点があり、臨床応用では主に染色体異常等の診断など、限られた領域に限定される一因となっている^{6,7}。

3. ISH の高感度化手法

mRNA 発現解析を目的とした組織 ISH は 50 年以上にわたり使用されてきた手法であるが⁸、その間に検出感度と解像度の上昇と手法の簡易化を目標とした試みがなされてきた。ここ 20 年間に限っては、Digoxigenin (DIG) 標識 RNA プローブを用いたものももっとも検出感度に優れる“古典的”ISH として頻用されている^{9,10}。この古典的 ISH でも、標的とする mRNA に対

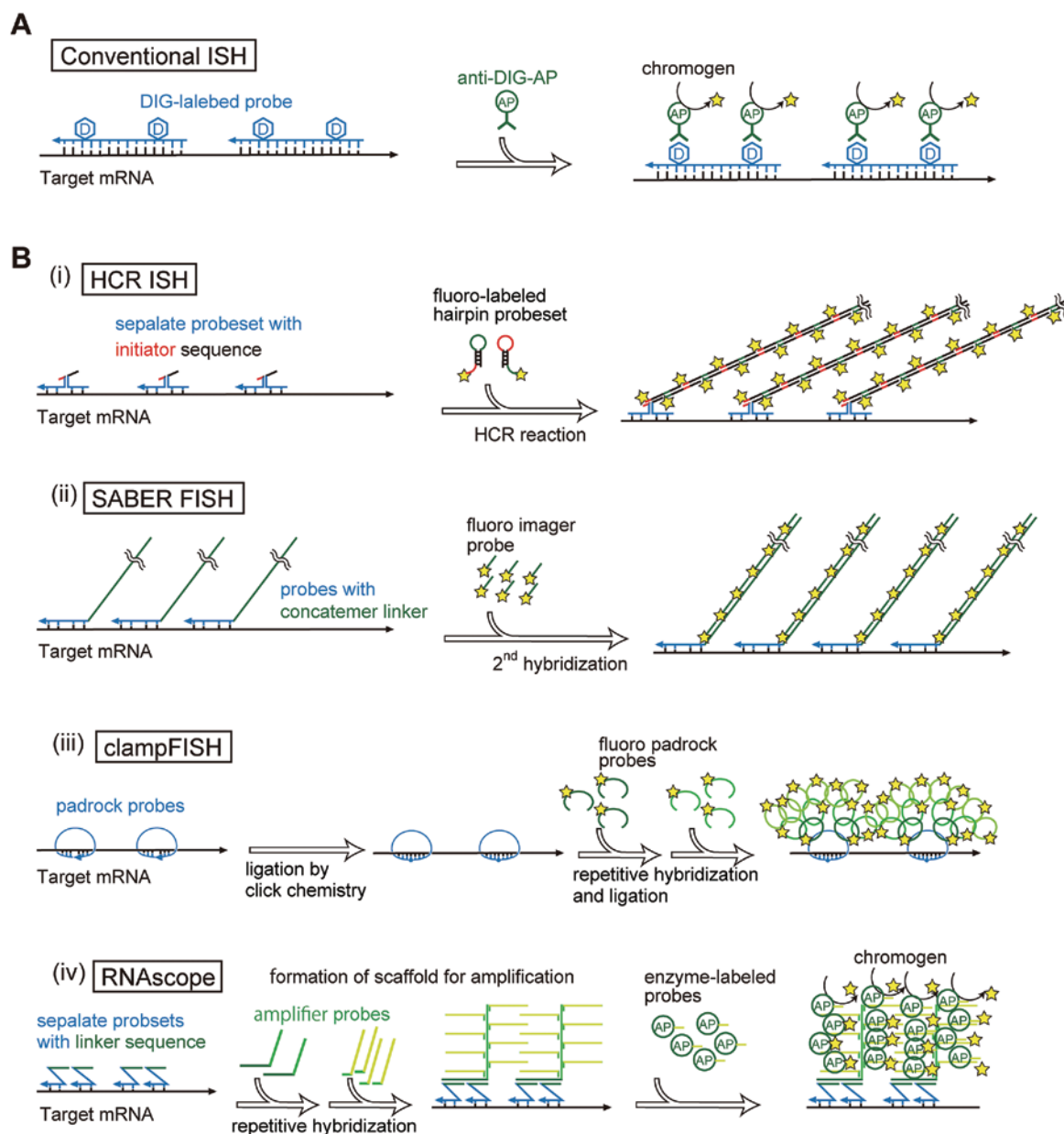


Fig. 1 Schematic diagrams of a conventional in situ hybridization and newly developed high-sensitivity ISHs. (A) Conventional digoxigenin (DIG) -labeled ISH. DIG-labeled RNA probes complementary to the target sequence are used. Alkaline phosphatase-labeled antibody against DIG is used for chromogenic reaction. (B) High-sensitivity ISHs. The common mechanism of these assays includes use of multiple short oligonucleotide probes for hybridization and the addition of numerous fluorescent labels to each probe by further hybridization to the first probe. (i) HCR ISH, (ii) SABER-FISH, (iii) clampFISH, (iv) RNAscope.

して複数プローブを作成し標的配列に対するカバー率を上げることで、低発現量遺伝子の解析も可能となる^{11,12}。近年では、より高感度化、簡易化および多重染色化を可能にする多くのISHの変法が開発されてきている。原理は手法間で異なるものの、これらの変法のうち論文採用数が多いものには、比較的短鎖の合成DNAプローブを用いる、そのプローブの一部配列をリンカーとしてさらに複数の核酸のハイブリダイズ

ロセスを行うことでシグナルを増強させるという共通点がある (Fig. 1)。高感度ISHの一つであるHybridization chain reaction (HCR) ISHは、ハイブリダイズさせたプローブに2種の蛍光標識ヘアピン状DNAを連鎖伸長させるHCRを試料上で行う^{13,14}。ClampFISHでは、ハイブリダイズにより環状化するプローブを化学的に標的配列上に固定し、そのプローブ配列に対する同様の環状化プローブと化学的安定化を

繰り返すことで高感度化を実現する^{15,16}。また、ハイブリダイズ前のプローブ末端に短鎖長の配列を繰返し付加してコンカテマー化し、その繰返し配列に短鎖蛍光プローブを多量にハイブリダイズさせる SABER-FISH が存在する¹⁷。上記の変法はすべて実験者によるプローブの設計と条件至適化が必須であるが、手法応用の柔軟性と試料あたりのコストに優れる。新しい高感度 ISH の中には、プローブから検出試薬までをキット化して商品化されているものも多い。これらの商品化高感度 ISH の中では、ドロップボトル式の簡便化と実験過程の時間短縮を両立している RNAscope 法が近年最も論文採用数が伸びており、自動化による病理診断への臨床応用にも用いられはじめ、高感度 ISH のスタンダードになりつつある^{18,19}。上記の高感度 ISH は、理想的条件では 1 分子の mRNA を 1 つの粒状蛍光シグナルとして可視化することができるため、single-molecule ISH (smFISH) とも呼称されている。高感度化方向への改良以外にも、ハイブリダイズ時に熱力学的により安定化する核酸アナログをプローブに用いて micro RNA 等の短鎖核酸検出を可能にする LNA ISH や^{20,21}、検出の短時間化のためにプローブ両端に付加した蛍光物質の蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を検出に用いる手法などが開発されており²²、より適用の幅が広がっている。

古典的 ISH は手技の煩雑さから組織学の中でも導入の敷居が高い手法であった。しかし、上記のような ISH の高感度化と手法の簡易化に伴い、比較的手軽にこれまで検出が難しかった低発現量遺伝子の局在解析を行うことができる状況になっている。

4. 神経科学領域への応用

神経科学は ISH が頻用される研究分野の一つである。特に中枢神経系ではその神経核/領域ごとに異なった役割を持つ神経細胞が存在すること、さらに最近の single-cell RNA シーケンス解析で単一神経核/領域内でも遺伝子発現プロファイルの異なる多数の神経細胞サブクラスが混在していることが明らかになってきたことから^{1,23}、ISH を用いた組織学解析がより重要視されている。また、脳の各領域が担う機能が多彩であることから、精力的に研究が進められていても未解明領域が多く残っている状態である。ISH の神経科学未解明領域への適用例を例示する。

4.1. 神経内分泌リガンド受容体の局在解析

神経内分泌系は、摂食・飲水・生殖・ストレス応答など多くの生理機能を担っているが、各生理機能は独

立しておらず、低栄養やストレス下で生殖機能が抑制されるなどの相互作用が存在する。ある神経内分泌機能を担う細胞に他の神経内分泌リガンド受容体が発現し、相互投射による神経ネットワークを作ることで相互作用を行う可能性が示唆されている^{24,25}。相互投射の解析には神経内分泌リガンドとそれに対応する受容体の組織学的解析が必要であるが、リガンドに比べ膜受容体は極めて低い発現を示し、免疫染色法に用いる抗体の作製も細胞質タンパク質に比べて困難であることから神経内分泌リガンド受容体の解析は進んでいなかった²⁶。受容体遺伝子プロモーター下でレポーターを発現させたトランスジェニック動物を用いて受容体発現細胞の解析を行った報告もあるが、低発現量遺伝子のプロモーター活性の低さや遺伝子改変のオフターゲット等の複数の問題がある²⁷。われわれは低発現を示す受容体に対して条件至適化を行った古典的 ISH、RNAscope 法、および免疫染色法を組み合わせることでこれまで解析されてこなかった神経内分泌の相互投射神経ネットワークをラットを用いて解析している (Fig. 2A)。生殖内分泌系の視床下部-下垂体-性腺軸の上位制御因子である Kisspeptin に対する受容体 *Kiss1r* は、GnRH ニューロンだけではなく、つがい形成や性行動、授乳などに関与する室傍核オキシトシンニューロン、摂食抑制に関与する弓状核 POMC ニューロン、プロラクチン放出を制御する背側弓状核ドパミンニューロンに発現しており、神経投射ネットワークを構成していることが判明した^{12,28}。さらに、Kisspeptin をはじめとする 5 種類の神経内分泌リガンドに対する広範な結合を示す NPFF 受容体の局在解析も行った。2 つの NPFF 受容体サブタイプのうち *Npffr1* が、ストレス応答に関与する室傍核 CRF ニューロン、背側弓状核ドパミンニューロン、およびメスの前腹側室周囲核 Kisspeptin ニューロンに発現していることが明らかとなった¹¹。これらの結果により神経内分泌の各機能間の相互作用の基盤となる神経ネットワークが組織学的に裏付けられた。

4.2. 全身麻酔薬の脳内作用部位特異的な遺伝子変動の解析

全身麻酔薬は外科手術に頻用されているが、その標的である脳で鎮静・鎮痛作用が発揮される際の詳細な機構についてはいまだ不明な領域が多い。全身麻酔は睡眠障害やそれに伴う術後せん妄、悪心・嘔吐などの術後有害事象の成因になりうる²⁹。これらの有害事象は、使用する麻酔薬によって発生確率が異なるが、その発生機序や発生確率が異なる分子機構もまた不明点

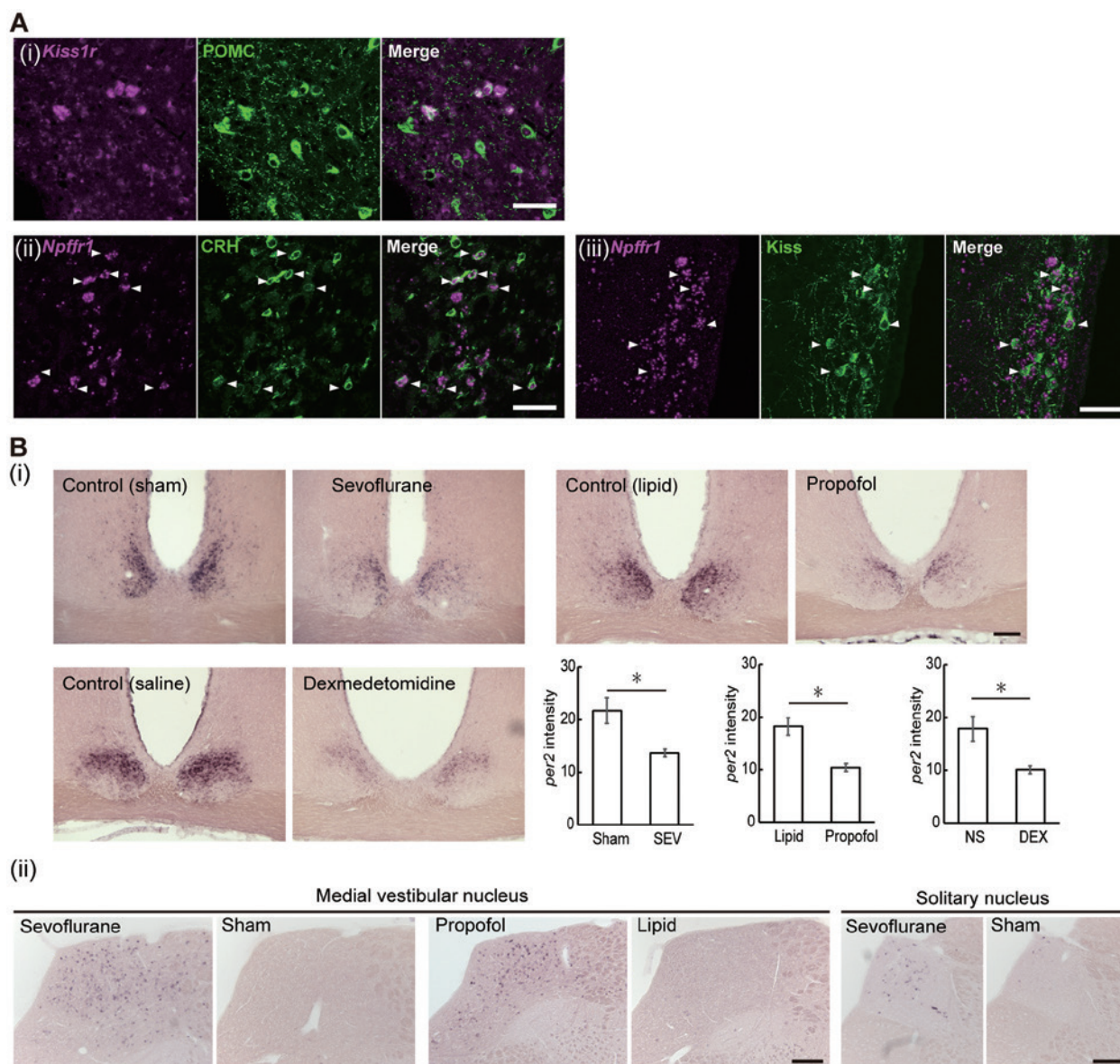


Fig. 2 Applications of high-sensitivity ISH in neuroscience

(A) Visualization of low-expression transcripts encoding neuroendocrine-related membrane receptors in rats. (i). Expression of *Kiss1r* in POMC neurons in the arch nucleus responsible for feeding regulation. *Npffr1* expression in CRF neurons of the paraventricular nucleus responsible for stress response (ii), and in kisspeptin neurons of the female anteroventral periventricular nucleus (iii). (B) Analysis of anesthesia-induced changes in gene expression. (i) Transient suppression of *Per2* expression observed after treatment when three types of anesthetics with different mechanisms of actions were used. (ii) Examples of propofol- and sevoflurane-activated brain regions revealed by ISH on *Fos* mRNA. The medial vestibular nucleus is commonly activated by the two anesthetics, and the solitary nucleus is activated only by sevoflurane. These activated brain regions were subsequently sampled by laser microdissection and subjected to DNA microarray analysis. For details of the array analysis, see ref 32. All photomicrographs in Fig. 2 are unpublished images obtained in parallel with the authors previously published studies (Refs. 11, 28, 31, and 32).

が多い³⁰。われわれは臨床で頻用されるプロポフォル、デクスメドミジン、セボフルランをラットに負荷し、ISH解析により、時計遺伝子 *Per2* が視床下部の概日リズム中枢である視交叉上核で短期的に抑制され、睡眠障害の原因となりうることを明らかにした

(Fig. 2B)³¹。この *Per2* 抑制は異なる作用機序を持つ3つの麻酔すべてで観察され、全身麻酔薬一般に共通する機構によると考えられる。有害事象発生確率の違いは、麻酔薬ごとの標的脳部位の違い、その部位での遺伝子発現に与える影響の違いに起因すると考えられた

ため、セボフルランとプロポフォールについて神経活性マーカー *Fos* を ISH で可視化して標的脳領域を同定し、その領域での遺伝子発現変化の網羅解析を行った³²。その結果、2つの麻酔薬に共通する活性化部位である内側前庭核では、シナプス可塑性に関与する遺伝子群が多く変動しており、麻酔の主作用である鎮静からの覚醒後にも長時間続く副作用の原因になる可能性が示唆された。また、気化麻酔薬セボフルランでは孤束核など嘔吐に関連する領域に *Fos* の活性化が観察され、遺伝子発現変化も嘔吐誘発モデルラットの結果と一致していることから、気化麻酔薬で有意に高い悪心・嘔吐の発生がこの脳領域活性化に起因する可能性が示唆される^{33,34}。これらの研究で得られた基礎的データは、適切な麻酔投与法の開発や、麻酔薬新規開発時の安全性評価などに応用されることが期待される。

5. 結語

組織学の代表的手法である ISH は、高感度化、手技の簡易化および迅速化を志向して手法改良の努力が続けられてきた。その改良によって ISH は今では神経科学をはじめとする生命科学・基礎医学分野で頻用されており、臨床医学分野でも、従来から行われてきた染色体異常の検出に加え、自動化 ISH による病理診断¹⁹、多重蛍光 ISH を用いた腫瘍内不均一性の解析など^{25,36}、病理学・腫瘍学での応用事例が徐々に増えつつある。ISH の手法的洗練は現在も精力的に行われており、同じく日々発展する分子生物学的手法とともに、手軽に導入できる基幹手法として今後研究の牽引役となることが確実である。

Conflict of Interest : 開示すべき利益相反なし。

文献

- Mickelsen LE, Bolisetty M, Chimileski BR, et al: Single-cell transcriptomic analysis of the lateral hypothalamic area reveals molecularly distinct populations of inhibitory and excitatory neurons. *Nat Neurosci*; 2019; 22: 642-656.
- Lein E, Borm LE, Linnarsson S: The promise of spatial transcriptomics for neuroscience in the era of molecular cell typing. *Science* 2017; 358: 64-69.
- Liao J, Lu X, Shao X, Zhu L, Fan X: Uncovering an Organ's Molecular Architecture at Single-Cell Resolution by Spatially Resolved Transcriptomics. *Trends in Biotechnology* 2021; 39: 43-58.
- Buchwalow I, Samoilova V, Boecker W, Tiemann M: Non-specific binding of antibodies in immunohistochemistry: fallacies and facts. *Sci Rep*; 2011; 1: 28.
- Gozzetti A, Le Beau MM: Fluorescence in situ hybridization: uses and limitations. *Semin Hematol* 2000; 37: 320-333.
- Massoth LR, Desai N, Szabolcs A, et al: Comparison of RNA In Situ Hybridization and Immunohistochemistry Techniques for the Detection and Localization of SARS-CoV-2 in Human Tissues. *The American Journal of Surgical Pathology* 2021; 45: 14-24.
- Cheng L, Zhang S, Wang L, MacLennan GT, Davidson DD: Fluorescence in situ hybridization in surgical pathology: principles and applications. *J Pathol Clin Res* 2017; 3: 73-99.
- Buongiorno-Nardelli M, Amaldi F: Autoradiographic detection of molecular hybrids between RNA and DNA in tissue sections. *Nature* 1970; 225: 946-948.
- Komminoth P: Digoxigenin as an alternative probe labeling for in situ hybridization. *Diagn Mol Pathol* 1992; 1: 142-150.
- Komminoth P, Merk FB, Leav I, Wolfe HJ, Roth J: Comparison of 35S- and digoxigenin-labeled RNA and oligonucleotide probes for in situ hybridization. Expression of mRNA of the seminal vesicle secretion protein II and androgen receptor genes in the rat prostate. *Histochemistry* 1992; 98: 217-228.
- Higo S, Kanaya M, Ozawa H: Expression analysis of neuropeptide FF receptors on neuroendocrine-related neurons in the rat brain using highly sensitive in situ hybridization. *Histochem Cell Biol* 2021; 155: 465-475.
- Higo S, Honda S, Iijima N, Ozawa H: Mapping of Kisspeptin Receptor mRNA in the Whole Rat Brain and its Co-Localisation with Oxytocin in the Paraventricular Nucleus. *J Neuroendocrinol* 2016; 28 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26709462>
- Tsuneoka Y, Funato H: Modified in situ Hybridization Chain Reaction Using Short Hairpin DNAs. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 2020; 13 <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnmol.2020.00075> Accessed Jan 15, 2023.
- Choi HMT, Schwarzkopf M, Fornace ME, et al: Third-generation in situ hybridization chain reaction: multiplexed, quantitative, sensitive, versatile, robust. *Development* 2018; 145: dev165753.
- Rouhanifard SH, Mellis IA, Dunagin M, et al: ClampFISH detects individual nucleic acid molecules using click chemistry-based amplification. *Nat Biotechnol* 2019; 37: 84-89.
- Dardani I, Emert BL, Goyal Y, et al: ClampFISH 2.0 enables rapid, scalable amplified RNA detection in situ. *Nat Methods* 2022; 19: 1403-1410.
- Kishi JY, Lapan SW, Beliveau BJ, et al: SABER amplifies FISH: enhanced multiplexed imaging of RNA and DNA in cells and tissues. *Nat Methods*; 2019; 16: 533-544.
- Wang F, Flanagan J, Su N, et al: RNAscope: a novel in situ RNA analysis platform for formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J Mol Diagn* 2012; 14: 22-29.
- Anderson CM, Zhang B, Miller M, et al: Fully Automated RNAscope In Situ Hybridization Assays for Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Cells and Tissues. *J Cell Biochem* 2016; 117: 2201-2208.
- Søe MJ, Møller T, Dufva M, Holmstrøm K: A Sensitive Alternative for MicroRNA In Situ Hybridizations Using Probes of 2'-O-Methyl RNA + LNA. *J Histochem Cytochem* 2011; 59: 661-672.

21. Paulsen IW, Bzorek M, Olsen J, Grum-Schwensen B, Troelsen JT, Pedersen OB: A novel approach for microRNA in situ hybridization using locked nucleic acid probes. *Sci Rep* 2021; 11: 4504.
22. Chojjookhuu N, Shibata Y, Ishizuka T, Xu Y, Koji T, Hishikawa Y: An Advanced Detection System for *In Situ* Hybridization Using a Fluorescence Resonance Energy Transfer-based Molecular Beacon Probe. *Acta Histochemica Et Cytochemica* 2022; advpub: 22-00075.
23. Zeisel A, Muñoz-Manchado AB, Codeluppi S, et al.: Cell types in the mouse cortex and hippocampus revealed by single-cell RNA-seq. *Science American Association for the Advancement of Science*; 2015; 347: 1138–1142.
24. Phumsatitpong C, Wagenmaker ER, Moenter SM: Neuroendocrine interactions of the stress and reproductive axes. *Front Neuroendocrinol* 2021; 63: 100928.
25. Andrews ZB, Abizaid A: Neuroendocrine mechanisms that connect feeding behavior and stress. *Frontiers in Neuroscience* 2014; 8 <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2014.00312> Accessed Jan 21, 2023.
26. Seddon AM, Curnow P, Booth PJ: Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1666: 105–117.
27. Herbison AE, de Tassigny X, Doran J, Colledge WH: Distribution and postnatal development of Gpr54 gene expression in mouse brain and gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology* 2010; 151: 312–321.
28. Higo S, Iijima N, Ozawa H: Characterisation of Kiss1r (Gpr54)-Expressing Neurones in the Arcuate Nucleus of the Female Rat Hypothalamus. *J Neuroendocrinol* 2017; 29 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27981646>
29. Luo M, Song B, Zhu J: Sleep Disturbances After General Anesthesia: Current Perspectives. *Front Neurol* 2020; 11: 629.
30. Xia Z-Q, Chen S-Q, Yao X, Xie C-B, Wen S-H, Liu K-X: Clinical benefits of dexmedetomidine versus propofol in adult intensive care unit patients: a meta-analysis of randomized clinical trials. *J Surg Res* 2013; 185: 833–843.
31. Mizuno T, Higo S, Kamei N, Mori K, Sakamoto A, Ozawa H: Effects of general anesthesia on behavioral circadian rhythms and clock-gene expression in the suprachiasmatic nucleus in rats. *Histochem Cell Biol* 2022; 158: 149–158.
32. Kamei N, Higo S, Mizuno T, Mori K, Sakamoto A, Ozawa H: Identification of Brain Regions Activated by Sevoflurane and Propofol and Regional Changes in Gene Expression. *Acta Histochemica Et Cytochemica* 2022; advpub: 21-00091.
33. Sugino S, Konno D, Abe J, et al.: Crucial involvement of catecholamine neurotransmission in postoperative nausea and vomiting: Whole-transcriptome profiling in the rat nucleus of the solitary tract. *Genes Brain Behav* 2021; e12759.
34. Gecaj-Gashi A, Hashimi M, Sada F, et al.: Propofol vs isoflurane anesthesia-incidence of PONV in patients at maxillofacial surgery. *Adv Med Sci* 2010; 55: 308–312.
35. Lei H, Gertz EM, Schäffer AA, et al.: Tumor heterogeneity assessed by sequencing and fluorescence in situ hybridization (FISH) data. *Bioinformatics* 2021; 37: 4704–4711.
36. Voith von Voithenberg L, Fomitcheva Khartchenko A, Huber D, Schraml P, Kaigala GV: Spatially multiplexed RNA in situ hybridization to reveal tumor heterogeneity. *Nucleic Acids Res* 2020; 48: e17.

(受付：2023年1月30日)

(受理：2023年3月24日)

日本医科大学医学会雑誌は、本論文に対して、クリエイティブ・コモンズ表示 4.0 国際 (CC BY NC ND) ライセンス (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>) を採用した。ライセンス採用後も、すべての論文の著作権については、日本医科大学医学会が保持するものとする。ライセンスが付与された論文については、非営利目的で、元の論文のクレジットを表示することを条件に、すべての者が、ダウンロード、二次使用、複製、再印刷、頒布を行うことができる。