

臨床医のために

組織標本上での messenger RNA 発現細胞検出

Digoxigenin labeled probe を用いた in situ hybridization (ISH) 法の技術と留意点

石渡 俊行 西海けい子 川原 清子 浅野 伍朗

日本医科大学病理学第 2 教室

Detection of messenger RNA expression cells in tissue specimens
Technical note for in situ hybridization using digoxigenin labeled probe

Toshiyuki Ishiwata, Keiko Nishigai, Kiyoko Kawahara and Goro Asano

Department of Pathology, Nippon Medical School

Key words: in situ hybridization, digoxigenin, messenger RNA

はじめに

In situ hybridization (ISH) 法は目的とする DNA や RNA を直接、組織標本上において検出する方法である。現在、ISH 法は、主に各種病態で増加した messenger RNA (mRNA) の発現細胞を同定する目的で行われている。今後は遺伝子治療などで生体内に導入したベクターの情報を発現する細胞の同定や、周囲の細胞が反応性に産生する物質の mRNA の検出などにさらに広く用いられるものと考えられる。しかし、ISH 法を行うためには組織標本の準備、probe の作成と hybridization、さらに組織標本の評価という、病理組織学と分子生物学の双方の技術が必要である¹⁻³。

著者らは、細胞増殖因子、cytokine と細胞外基質の発現細胞を、steroid hapten の digoxigenin (DIG) で標識した probe を用いて組織標本上で検討してきた⁴⁻⁹。現在までに得られた DIG labeled probe を用いた、ISH 法における技術的な知見と留意すべき点につき報告する。

1 標本の作成法

ISH 法には、paraffin 包埋か凍結包埋した組織標本が用いられる(表 1)。凍結包埋標本には、直ちに OCT compound に包埋し薄切後に 4% Paraformaldehyde (PFA) 液で固定する方法と(表 1 固定法 2)、予め数時間固定した後に包埋する方法とがある(表 1 固定法 3)⁹。Paraffin 包埋は組織の形態保持が良く mRNA 発現細胞の同定が容易であるが、mRNA の保存状態は凍

結組織よりも劣る。一方採取後直ちに凍結包埋する方法は、mRNA の保存は良いが、薄切時に組織に裂隙が生じやすく形態観察が困難なことがある。また、薄切後に RNA 分解酵素 (RNase) の作用で mRNA の分解が起こる可能性があり、速やかに組織切片を乾燥させる必要がある。固定した後に凍結包埋する方法は、組織の形態保持、mRNA の保存と共に前の 2 つの固定法の間位置すると考えられる。このような特徴をふまえ標本の作成法を選択する必要がある。

2. プローブの作成法

ISH 法に使用する probe 作成では sense probe を作ることと長さの短い probe を作ることが特に重要である(表 2)。ISH 法では同じ条件下で行った sense probe による ISH 法で、陽性 signal が認められないことを示す必要がある(陰性対照)。このため容易に sense probe を作ることのできる oligonucleotide (oligo) probe と cRNA probe が頻用されている。Probe の長さについては組織への probe の浸透性という点から、短い probe が推奨されている。組織への浸透性には、probe に標識された分子量の大きな DIG も影響を与えたと考えられる。さらに probe が長いと Tm 値が上昇し高温での hybridize と洗浄が必要となるが、組織標本では 55 以上の洗浄を行うと組織形態の破壊が著明になる。cRNA probe では 400 bp 以下の方が再現性のある結果が得られやすく、oligo probe の場合は 25 ~ 50 mer が一般的に用いられている。次に probe の DIG 標識法は oligo probe の場合 5 または 3 の End labeling 法と 3 tailing 法がある。End labeling 法が 1

表 1 ISH 法に用いられる固定包埋法¹⁰

新鮮組織材料			
	(固定法 1)	(固定法 2)	(固定法 3)
固定	中性緩衝ホルマリン固定 4% Paraformaldehyde 固定 Bouin 固定	↓	4% Paraformaldehyde 固定 ↓
包埋	70 100% アルコール クロロホルム パラフィン パラフィン包埋	↓ OCT compound 凍結包埋	10 20% sucrose/PBS ↓ OCT compound 凍結包埋
薄切	薄切	薄切 4% Paraformaldehyde 固定	薄切
mRNA 保存	可	最良	良
形態保持	最良	可	良

表 2 ISH 法に用いる Probe の特徴

	Sense probe	長さ	標識法
cRNA probe	必要	150 400bp	in vitro transcription 法
oligonucleotide probe	必要	25 50mer	3 tailing 法

表 3 Digoxigenin 標識 Probe を用いた ISH 法の概略

I 組織の前処置
① 塩酸処理 0.2N HCl, 20min, RT
② タンパク分解酵素処理 Proteinase K
③ 組織の再固定 4% paraformaldehyde ,5min ,RK
④ 残存アルデヒドの中和, 不活化, glycine , 15min , 2 回
⑤ Prehybridization , 60min
II Hybridization
37 55 overnight
III 陽性シグナルの検出
① Probe の洗浄, 37 55
② 抗 DIG 抗体の非特異的結合の阻害 ,60min ,RT
③ 抗 DIG 抗体による incubation , 60min , RT
④ 抗 DIG 抗体の非特異的結合を洗浄 ,15min ,RT , 2 回
⑤ NBT/BCIP による発色
⑥ 核染色と封入

後 , in vitro transcription を行い DIG を標識する . ISH 法は結果が出るまでのステップが多く , 最終的に陽性 signal が得られなかった場合に , 原因を追求するのは容易ではない . そのため , ISH 法を行う前に oligo probe , cRNA probe とともに anti-sense と sense probe の 10 倍毎の希釈系列を作り , nylon 膜上で probe が確実に発色することを確認しておくことが重要である .

3 . ISH 法の実際

DIG labeled probe を用いた ISH 法の手技は大きく 3 段階に分けることができる¹ . ① mRNA を組織の表面に露出する前処置 . ② Probe と組織表面の mRNA との hybridization . ③ 抗 DIG 抗体による陽性 signal の検出である (表 3) . ①の前処置で , 特に陽性 signal の検出感度に重要な影響を与えるのがタンパク分解酵素処理である . Proteinase K (Pro K) を用い周囲のタンパク質を分解し , mRNA を組織の表面に露出する . この処理が強すぎると (特に凍結切片では) , 組織が破壊され観察に耐えない標本となる . 組織の破壊とシグナルの検出感度のバランスが重要である . 至適なタンパク分解酵素処理が組織の固定法 , 固定時間や , 各臓

本の oligonucleotide に 1 分子の DIG を標識するのに対し , tailing 法は 5 ~ 10 分子の DIG を標識することができる . このため oligo probe は 3 tailing 法で標識されることが多い . cRNA probe では , 目的とする物質の cDNA の一部を , insert した vector を linearize した

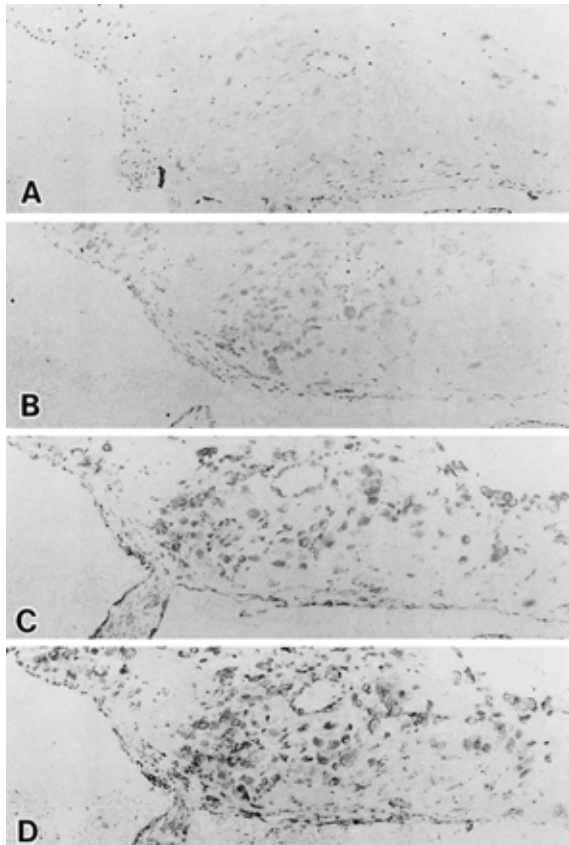


図1 Digoxigenin 標識 Lumican cRNA anti-sense probe による in situ hybridization 法
ヒト胎盤組織において, proteoglycan family の Lumican mRNA を発現している細胞 (trophoblast) の検出率が Proteinase K の濃度により異なっている .
A: Proteinase K 20 ,B: 40 ,C : 80 ,D: 150 µg/ml , × 100

器によっても異なっているため基礎実験として positive control probe (28 S rRNA や beta-actin , oligo dT など) を使用し異なった Pro K の濃度で ISH を行い, 至適濃度を決定することが重要である (図 1) . ②の hybridization は通常 incubator 内や専用の heat block 上で行う . Hybridization の温度が, 組織標本の形態保持の上で重要であり, 通常 37 ~ 55 の間で行う . Probe 量の節約と組織切片の乾燥を防止する目的のため cover glass で組織標本を覆うことがあるが, 現在では専用の cover slip も用意されている . Probe の洗浄は, 塩濃度, 温度と時間, formamide の濃度を調節することで行うが, 高温 (55 以上) , 長時間 (3 hr 以上) の洗浄は組織形態の破壊につながることが多い . RI を用いた Northern blot 法のように, GM survey meter を使って hybridize の状態を確認しながら, 洗浄の条件を決めることは DIG 標識 probe を用いた hybridization では不可能である . そのため sense probe の発

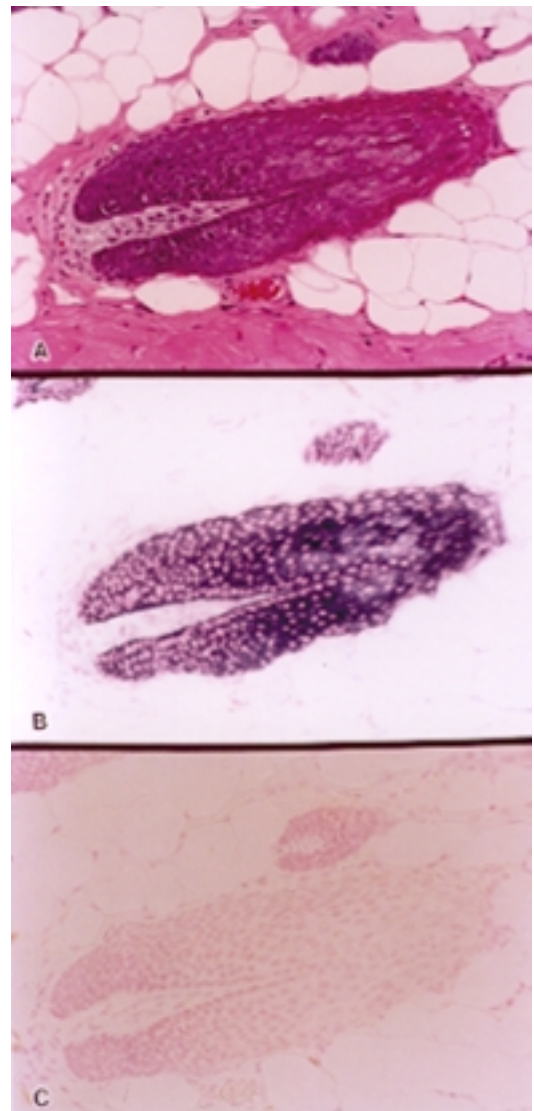


図2 c-Met (HGF receptor) に対する Digoxigenin 標識 cRNA probe による in situ hybridization 法
c-Met anti-sense probe による ISH でラット皮膚組織の毛包細胞に c-Met mRNA の強い発現が認められる (B) . A: H&E , C: c-Met sense probe . × 200

色状態を参考に hybridize と洗浄温度を 2~3 ずつ, 変化をさせて ISH を繰り返し行い, 至適な hybridize の条件を決定する . その後が③の陽性シグナルの検出であり, 抗 DIG 抗体が非特異的に組織に付着するのを防ぐため, 専用の blocking solution で組織標本を 30 分~2 時間位 incubate する . 次に抗 DIG 抗体にて incubate した後, probe 内の DIG と結合しなかった余分な抗体を洗浄する . この段階で抗 DIG 抗体が, 組織に非特異的に結合していないことを確認する必要がある . そのため probe を入れずに ISH を行い陽性 signal がみられないことを確認する . もし signal が認められれば抗体を軽く遠心し, その上清を使うか,

表4 Digoxigenin 標識 Probe を用いた ISH 法の結果の評価と対策

	Anti	Sense	原因	対策
染色結果①	陽性	陽性	mRNA 露出が不充分 probe の過剰 Hybridize と洗浄が mild 過ぎる 抗体の洗浄が不充分	1. Postive control probe で至適 proteinase K 濃度決定 2. Probe 抜きで signal がでないことを確認 3. Hybridize と洗浄を徐々に stringent にする
染色結果②	陰性	陰性	標本中の mRNA が既に破壊 mRNA 露出が不充分 Hybridize と洗浄が stringent 過ぎる	1. Postive control probe で組織の mRNA の確認 2. Postive control probe で至適 proteinase K 濃度決定 3. Hybridize と洗浄を徐々に mild にする

Tween 20 を抗体や抗体洗浄液に 0.2% (V/V) 加えることが抗体の非特異的結合を抑えるうえで有効である。その後、抗 DIG 抗体に結合した alkaline phosphatase の作用で、nitroblue tetrazolium chloride (NBT) /5 bromo 4 chloro 3 indolyphosphate (BCIP) を暗箱内で発色させる。Anti-sense probe では 2~3 時間以内に、陽性シグナルの暗紫色の発色が見られる。Over-night の発色では細顆粒状の非特異的 signal を認めることが多い。

4 評価と対策

Anti-sense probe による標本で細胞の胞体内に陽性 signal を認め、collagen fiber などの細胞外成分に発色がなく、さらに sense probe で signal が見られなければ ISH 法の条件は適当であると考えられる (図 2)。Anti-sense と sense probe の両方に陽性 signal が認められる場合は、表 4 に示すような原因が考えられる。対策としてはまず positive control probe による ISH でその組織標本における至適な Pro K 濃度の決定を行う。次に probe を抜いた ISH で陽性 signal が検出されないことを確認する。その条件下で hybridize と洗浄の条件を徐々に stringent にする。Anti-sense と sense probe のどちらも陽性 signal が検出されない場合は positive control probe の ISH で標本中の mRNA が保持されていることをまず確認する。次に至適な Pro K 濃度の決定を行ったうえで、hybridize と洗浄の条件を徐々に mild にする。シグナルの検出感度上昇を図るためには、oligo probe を cRNA probe に変えたり、目的とする mRNA に対し、複数の部位に hybridize する数種類の oligo probe を作成し、混合して使うなどの方法もある。

5 今後の展望

DIG 標識 probe を用いた ISH 法の実施にあたり重要な点をまとめると、①ISH 法施行前の probe の発色確認。②Positive control probe による mRNA 検出の

至適条件の決定。③温度による hybridize と洗浄の条件の調節、であると考えられる。ISH 法の標本と隣接する連続切片で酵素抗体法を行うことで、細胞に局在するタンパクが、その細胞で産生されたかを検討することができる⁴⁻⁷。今後は同一組織標本上での mRNA とタンパクの検出法や、さらに微量な mRNA 検出のための RT in situ PCR 法が DIG 標識により、広く利用されることが期待される¹¹。

文 献

1. 浅野伍朗：診断・研究のための病理技術詳解 5 第 1 版，1994；pp 1 22 藤田企画，青森。
2. 中根一穂：改訂版 In situ ハイブリダイゼーション手法。1992；pp 88 121 学際企画，東京。
3. 野村慎太郎，稲澤謙治：脱アイソトープ実験プロトコール。1994；pp 72 85 秀潤社，東京。
4. Kleeff J, Ishiwata T, Kumbasar A, Friess H, Buchler MW, Lander AD, Korc M: The cell-surface heparan sulfate proteoglycan glypican-1 regulates growth factor action in pancreatic carcinoma cells and is overexpressed in human pancreatic cancer. J Clin Invest 1998; 102: 1662 1673.
5. Ishiwata T, Friess H, Buchler MW, Lopez ME, Korc M: Characterization of keratinocyte growth factor and receptor expression in human pancreatic cancer. Am J Pathol 1998; 153: 213 222.
6. Ishiwata T, Kornmann M, Beger HG, Korc M: Enhanced fibroblast growth factor-5 expression in stromal and exocrine elements of the pancreas in chronic pancreatitis. Gut 1998; 43: 134 139.
7. Kornmann M, Ishiwata T, Beger HG, Korc M: Fibroblast growth factor-5 stimulates mitogenic signaling and is overexpressed in human pancreatic cancer: Evidence for autocrine and paracrine actions. Oncogene 1997; 15: 1417 1424.
8. Ezure T, Ishiwata T, Asano G, Tanaka S, Yokomuro K: Production of macrophage colony-stimulating factor by murine liver in vivo. Cytokine 1997; 9: 53 58.
9. Nagashima M, Yoshino S, Ishiwata T, Asano G: Role of vascular endothelial growth factor in angiogenesis of rheumatoid arthritis. J Rheumatol 1995; 22: 1624 1630.
10. 浅野伍朗：診断・研究のための病理技術詳解 1 第 1 版，1994；pp 1 49 藤田企画，青森。
11. Nuovo GJ: PCR in situ Hybridization. Third ed, 1997; pp 271 333, Lippincott-Raven, New York.

(受付 : 1999 年 10 月 5 日)
(受理 : 1999 年 10 月 27 日)