

蛍光ナノ粒子を用いた免疫組織化学法による エストロゲン受容体の定量法開発

Development of a Quantitative Diagnostic Method of Estrogen Receptor Expression Levels by
Immunohistochemistry Using Fluorescent Nanoparticles

郷田 秀樹* 岡田 尚大* 中野 寧*
Hideki GODA Hisatake OKADA Yasushi NAKANO

要旨

3, 3'-diaminobenzidine (DAB) を用いた免疫組織化学法によるエストロゲン受容体 (ER) の検出は内分泌療法の適応判断に必要な診断項目である。その中で、DAB を用いた免疫組織化学法 (IHC) は、HRP の酵素反応によって色素沈着を検出するため、その反応時間、温度、基質濃度に染色性が依存する。そのため、定量性に乏しく定量精度について課題があった。一方、蛍光を用いた IHC は、蛍光強度が励起された蛍光体量に依存して比例的に変化するため、定量という観点で有用である。しかし従来の蛍光色素を用いた染色法は、組織由来の自家蛍光によるノイズがその定量性に影響を及ぼし、診断法としての発展を妨げていた。例えばもっとも代表的な蛍光ナノ粒子である量子ドットにおいても組織の自家蛍光はその蛍光強度に匹敵するため、十分なシグナル分離が難しかった。これに対し我々は IHC に最適化した蛍光有機色素を集合化したナノ粒子を開発したので報告する。我々の開発したナノ粒子は量子ドットの約 10 倍の蛍光強度を持ち、ポリエチレングリコールによる表面加工により組織への非特異吸着がコントロールされている。このような特性により、本ナノ粒子を用いた IHC は自家蛍光に影響されることなく、高い S/N 比を持つイメージングを可能とした。本染色法と DAB 法の定量性を比較するために隣接切片を用いて ER の染色性を比べた。その結果本蛍光ナノ粒子を用いた染色法は、DAB 法に比べ定量性のダイナミックレンジが極めて広い事が示された。本実験で示された ER の判定精度と感度の向上は、ER シグナルを対象とした治療の選択精度向上に寄与できると考える。

Abstract

The detection of estrogen receptors (ERs) by immunohistochemistry (IHC) using 3,3'-diaminobenzidine (DAB) is essential to the application of endocrine therapy, such as anti-estrogen tamoxifen-based therapy. IHC using DAB is a poor quantitative method because horseradish peroxidase (HRP) activity depends on reaction time, temperature and substrate concentration. On the other hand, fluorescent material provides an effective method to quantitative IHC because the signal intensity is proportional to the intensity of the photon excitation energy. However, the high level of autofluorescence has impeded the development of quantitative IHC using fluorescence. We developed organic fluorescent material (tetramethylrhodamine)-assembled nanoparticles for IHC. Tissue autofluorescence is comparable to the fluorescence intensity of quantum dots, which are the most representative fluorescent nanoparticles. The fluorescent intensity of our novel nanoparticles was 10.2-fold greater than quantum dots, and they did not bind non-specifically to cancer tissues due to the polyethylene glycol chain that coated their surfaces. Therefore, the fluorescent intensity of our nanoparticles significantly exceeded autofluorescence, which produced a significantly higher signal-to-noise ratio on IHC-imaged cancer tissues than previous methods.

Moreover, immunostaining data from our nanoparticle fluorescent IHC and IHC with DAB were compared in the same region of adjacent tissues sections to quantitatively examine the two methods. The results demonstrated that our nanoparticle staining analyzed a wide range of ER expression levels with higher accuracy and quantitative sensitivity than DAB staining. This enhancement in the diagnostic accuracy and sensitivity for ERs will improve the prediction of responses to therapies that target ER signal.

* 開発統括本部 第1技術開発センター

1 はじめに

estrogen receptor(ER), progesterone receptor(PgR), human epidermal growth factor 2(HER2) は乳癌診療において日常的に使用されているマーカーである。これらマーカーは投与する治療薬に応じて予後・予測マーカーとして利用されている。ERは核内ステロイドホルモン受容体の一つであり、エストロゲンによるERの活性化は複数の増殖シグナルを惹起する事が知られている。実際にかんの増殖においても重要な役割を担っており、乳癌患者の約70%で発現している^{1),2)}。

病理学的な診断はがん診療のゴールドスタンダードとなっていると同時に、癌の病因、病態、臨床病理学的相関、及び予後の解明に貢献している。3,3'-diaminobenzidine (DAB) を用いた免疫組織化学法 (IHC) によるエストロゲン受容体の検出は内分泌療法の適応判断に必須の診断項目である^{1),2)}。例えば、DAB染色陽性細胞の割合を1%、5%、および10%と閾値を設定し治療の判定に使用している³⁾。日本乳癌学会の研究班はDAB染色陽性細胞の割合10%以上をホルモン療法適応と位置付けている。その一方で陽性細胞判定における個々の細胞の染色強度については言及していない。また他の判定法であるALLredスコア法ではDAB染色強度を考慮に入れているものの、目視により4段階に分離されているのみである。そのため診断の定量的見地での精度は低く、診断の見解が異なる原因となる事が推察される。

DABを用いたIHCは最も普及したIHC法であり、酵素であるHRPによる色素沈着を検出する。そのため反応時間、温度、基質濃度に酵素活性が影響され、染色強度、判定結果のバラツキの原因となっている。蛍光を用いたIHCは、蛍光強度が励起された蛍光体量に依存して比例的に変化するため、定量という観点で有利である。

しかしながら従来の蛍光色素では組織由来の自家蛍光がノイズとしてその定量性に影響を及ぼし、診断法としての発展を妨げている。近年開発された量子ドット(QDs)はFITC, rhodamine, Alexa Fluors等の蛍光色素と比較して高い蛍光強度と安定性を保持しており、その蛍光は自家蛍光の低い培養細胞のイメージングには十分な性能を持っている。

一方で病理等の現場で用いる組織の自家蛍光はQDの蛍光強度に匹敵する輝度を持っている。それゆえ定量的な解析において組織の自家蛍光の影響を除外する事は困難な状態である。

自家蛍光の影響を受けないIHCに適した明るい蛍光物質の開発は、ER発現の定量的診断のために必要とされる技術であった。これに対し、我々はIHCに最適化した蛍光有機色素を集合化したナノ粒子を開発した。本ナノ粒子は量子ドットの約10倍の蛍光強度を持ち、DAB法と比較して高い定量精度を実現した。本方法は内分泌療法の適応判断に使用するER診断の精度向上に寄与できると考える。

2 材料と方法

2.1 蛍光ナノ粒子の調製

一般的なストーバー法を用いたシリカ粒子調整方法^{4),5)}に、以下に記載する改善を加え、蛍光有機色素を集合化したナノ粒子を開発した。粒子反応生成物を10000×gで15分間遠心し、沈殿物をエタノールと水で洗浄し、ナノ粒子を精製した。精製した粒子表面をpolyethylene glycol (PEG)、ストレプトアビジンで修飾した。

2.2 免疫染色

乳癌組織切片はUS Biomax, Inc. より入手した。入手した組織をキシレンとエタノールによる脱パラフィン処理後、内因性ペルオキシダーゼ活性を過酸化水素処理20分により行った。その後抗原賦活化処理としてオートクレーブ処理を121°Cで5分間行った。以上の前処理を終えた組織切片を1次抗体としてrabbit anti-ER primary antibody (Roche社製)を1時間反応させた。PBSによる洗浄後、2次抗体の反応としてbiotinylated goat anti-rabbit IgGを反応させた。2次抗体反応後の切片にstreptavidin-conjugated HRP (Vector Labs.)を30分間反応させ、その後DAB反応 (Roche)により発色を行った。DAB反応は温度、時間、基質濃度を一定にすることで反応の安定化を行った。細胞核の形態認識はがん診療において重要であるため、カウンター染色としてヘマトキシリン染色を実施した。蛍光ナノ粒子の染色はstreptavidin-conjugated HRPの代わりにTMR集合化ナノ粒子を用いて行った。

2.3 観察条件

本研究では2種類の顕微鏡システムを使用した。QD蛍光観察と蛍光ナノ粒子染色との比較に用いたシステムは落射蛍光顕微鏡(IX-71, Olympus)を基本に、Nipkowdisk-typeの共焦点ユニット(CSU10, Yokogawa)を接続、カメラシステムとしてEM-CCD (Ixon DV887, Andor Technology)を装備した。接眼レンズには60倍のレンズ(1.40 NA, Olympus)を用いた。DAB染色と蛍光ナノ粒子染色との比較に用いたシステムは、正立型顕微鏡(BX51, Olympus)にカメラとしてDP72 (Olympus)を接続した。後者の顕微鏡システムは汎用的な蛍光観察装置であるが、このシステムではQD粒子の観察はカメラ感度不足のためできなかった。

2.4 データ解析

以下の解析をDAB染色と蛍光ナノ粒子染色の定量性を比較するために行った。DAB染色画像はグレースケールのJPEG形式に変換後、DAB染色強度を256階調でグレースケールの階調を反転し、黒を0、白を255とした。細胞核領域をROIとして設定して、各細胞核のDAB染色強度をImage Jで計測し、ROIのピークセルあたり

のシグナルの平均値として算出した。蛍光ナノ粒子の染色画像はグレースケールのJPEG形式に変換し、画像中の最も高い蛍光強度が256階調中で最も高いレベルとなるよう調整した。調整後の画像はPhotoshop (Adobe) による階調レベル補正により自家蛍光の影響を排除した。その後DAB画像と同様にヘマトキシリン染色画像をもとに細胞核領域をROIとしImage Jで計測した。その後ROIのピークセルあたりのシグナル平均値として蛍光強度を算出した。

各データの値は、同一スケールでDABと蛍光ナノ粒子の染色強度を比較するために、各データセットの平均値を任意単位で100となるように調整した。画像の比較には隣接切片の同一部位に局在する100以上の細胞を供した。

3 結果と考察

有機色素であるTMRを含有し、表面をPEG, ストレプトアビジンで修飾したシリカ粒子を調整した (Fig. 1A)。次にTMR集合化ナノ粒子の発光特性を検証した。本粒子の532nm励起による蛍光発光スペクトルは580nm付近にピークを持っており (Fig. 1B) これはTMR蛍光色素単体とほぼ同じ値であった。

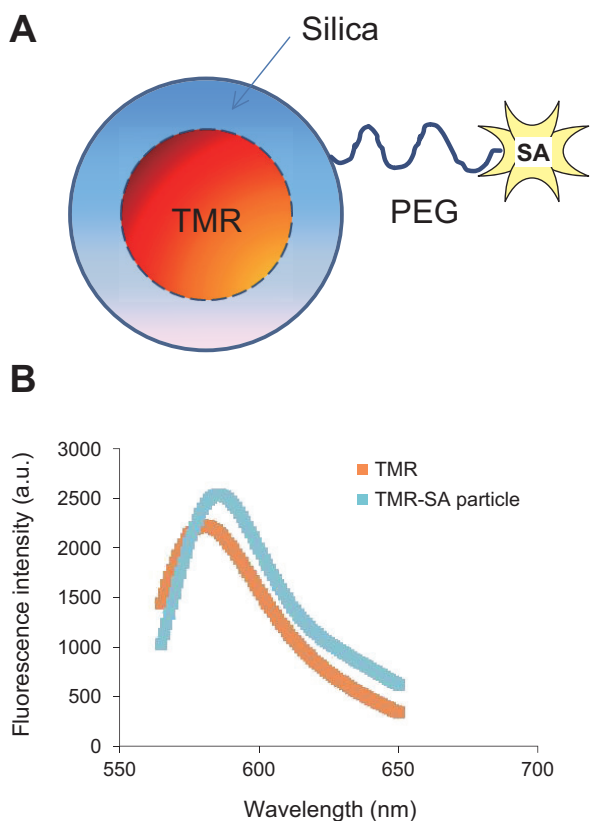


Fig. 1 TMR-SA particle preparation and characteristics evaluation. (A) Schematic for the TMR-SA particle preparation. Avi, streptavidin. PEG, polyethylene glycol chain. TMR, tetramethylrhodamine. Silica layer was made from tetraethylorthosilicate. (B) The 532 nm light-excited fluorescence spectra of TMR only and TMR-SA particles.

このことは蛍光色素の粒子化により蛍光色素の発光特性が変わらなかった事を示している。蛍光ナノ粒子の蛍光強度をQdot 655 (Life Technologies Co.) と比較した。Qdot 655はLife Technologiesの製品で532nm励起での発光が最も高い粒子であり、量子ドットとしての特性からより短い波長での発光強度が高くなる。そのため本実験ではQdot 655は365nm, 蛍光ナノ粒子は532nmで励起した発光ピーク強度を蛍光高度計を用いて比較した。その結果本粒子はQdot 655の10.2倍の発光強度を示した。本結果は共焦点顕微鏡による観察でも同様であった。このことにより蛍光ナノ粒子が組織の自家蛍光より高い発光を示すことが示唆された。

次に我々は、DAB法と本蛍光ナノ粒子を用いた定量感度の違いについて検討するために、ヒト乳癌組織を購入し、隣接切片を用いてERの発現レベルについて観察を行った。ERはステロイドホルモン受容体の一つで細胞の核に局在する事が知られている。ER高発現組織と低発現組織において、DAB法と本蛍光ナノ粒子を用いて行った染色結果のパターンをFig. 2に示す。Figs. 2A, Cに示すように、低発現組織ではDAB, 蛍光ナノ粒子ともに非常にシグナルが弱い。一方、高発現組織ではともに高い染色強度を示す (Figs. 2B, D)。この様に両染色法ともに乳癌組織においてER発現を特異的に検出していることが分かる。また、がん診療において重要な役割を果たす核の形態観察に必要なヘマトキシリン染色を蛍光ナノ粒子の染色に影響することなく同一切片上で行える事が観察された (Figs. 2C, D)。本実験においてDAB色素の沈着反応は、ER高発現レベルの組織が十分染まる発色時間に基づき一定条件に管理されている。この条件でER低発現組織での染色性の確認は困難であった (Fig. 2A)。

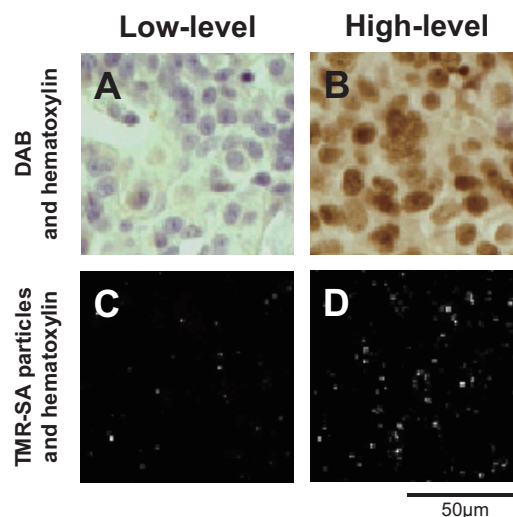


Fig. 2 Immunostaining of ER in breast cancer tissues with DAB or TMR-SA particles. Breast cancer tissues that expressed ER at low (A, C) or high levels (B, D) were immunostained. The tissues shown in (A) and (B) were immunostained with DAB and counterstained with hematoxylin. The tissues shown in (C, D) were immunostained with TMR-SA particles and counterstained with hematoxylin.

つまりER低発現組織での染色性の確認は、より長時間のDAB反応が必要な事が予想される。

多くの病理施設ではDABの発色時間や温度条件は個々の試料で異なっている現状があり、定量的な解析を困難にする要因となっている。一方、蛍光ナノ粒子を用いた染色では高発現、低発現組織ともに粒子由来のシグナルが観察され、その染色性の違いは輝点数の違いとして表現された (Figs. 2C, D)。蛍光ナノ粒子の組織への非特異的な吸着はPEGによる表面処理によりほぼ抑制されている。したがって、これらの結果は、蛍光ナノ粒子による染色法は、DAB法と比較してより広範囲なERの発現レベルを定量的に観察が可能であることを示唆している。

DABや蛍光ナノ粒子を用いた染色法の間で、ER発現レベルの定量感度の比較を行うために、隣接切片の同一部位を用いて免疫染色を行った (Figs. 3A, B)。がん組織は血管やリンパ管等を含む3次元的な細胞ネットワークシステムからなる。したがって、個々のがん細胞は多様な情報伝達を受けている^{6),7)}。そのためがん組織はヘテロな細胞集団からなり、そのタンパク質発現レベルも様々である。

一方、これまで、先行研究の免疫染色の解析は個々のがん細胞のER発現レベルを考慮してこなかった。そのため高精度にERレベルを診断し、ERをターゲットとする治療に供する病理学的な情報を得ることが困難であった。隣接切片の同一部位でのDAB法と蛍光ナノ粒子を用いた染色像をFig. 3に示す。

両方法の定量感度を比較するためにFigs. 3A, Bの各画像をグレースケールイメージにそれぞれ変換し、細胞核あたりの染色強度を測定した。Figs. 3A, C, の写真から分かるように細胞核の大きさは様々である。そのため核の大きさが測定値に影響しないよう染色強度はピークセルあたりの輝度に変換して検討を行った。各データセットの値はその平均が100となるよう一定係数を乗じることでDAB法と蛍光ナノ粒子を用いた染色を同一スケールで比較できるようにした (Fig. 3E)。解析は隣接切片の同一部位で100以上の細胞を計測することで行った。ER発現レベルは、組織中の細胞の不均一性に依りて広く変化することが予想される。そのため広いダイナミックレンジで染色強度を数値化する事が、精度の高い定量的なIHC法を実現するために求められる。本実験の結果、蛍光ナノ粒子を用いた染色の測定値の標準偏差は、DAB法と比較して広がった (Fig. 3E)。蛍光ナノ粒子の組織への非特異的な吸着はPEGによる表面処理によりほぼ抑制されているため、Fig. 3B, Dで観察される輝点は有効なシグナルと考えられる。

これらの結果は蛍光ナノ粒子を用いた染色がDAB法と比較して、精度や感度の観点で定量的に優れている事を示唆している。定量精度の向上はERシグナルに関わる治療感受性の予測向上に寄与すると考えられる。また、免疫染色法は基本的に同一の原理を使用しているため、今回実証した蛍光ナノ粒子を用いた染色による定量精度

向上は他の分子を標的とした治療効果の予測効率向上にも貢献できる可能性がある。すなわち、この新しい免疫染色法が種々の癌の診断に寄与することが今後期待できる。

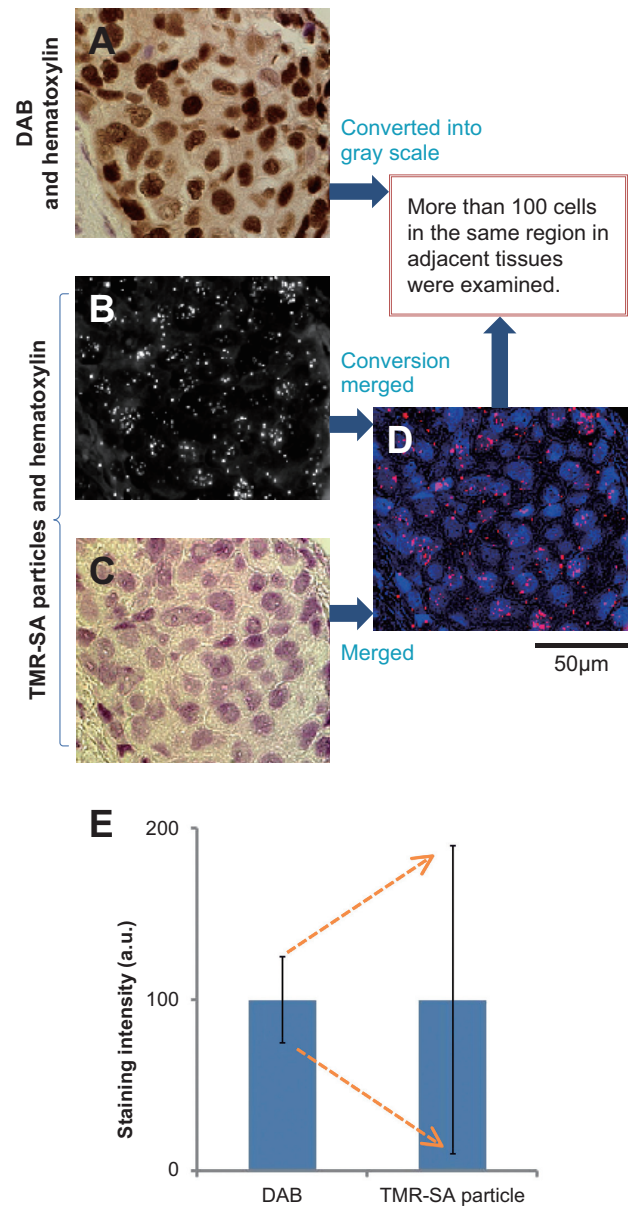


Fig. 3 Quantitative analysis of ER-immunostaining data with DAB or TMR-SA particles. Adjacent tissues expressing ER at high levels were immunostained with DAB and hematoxylin (A) or TMR-SA particles (B). The same regions in both tissues were observed. DAB staining image (A) was converted into a gray scale image, and the gray scale tone was inverted. As result of this, high DAB-staining intensity was visualized as a high gray value in the 256 gray level. TMR-SA particle staining images were converted into gray scale images, and the gray level correction of the image was performed to exclude the effect of autofluorescence. To measure the TMR-SA particles fluorescent signal in cell nuclei, the nuclear region was surrounded with an ROI that was determined using the hematoxylin staining image (C). An image merged with (B) and (C) is shown in (D). The mean values of DAB staining intensity or TMR-SA particle staining intensity were adjusted to 100 as an arbitrary unit (E). Error bars indicate standard deviations that showed the wide range of variations in staining intensity values.

4 謝辞

本研究で様々な技術的ご教示とご協力をいただいた東北大学の犬内憲明先生, 権田幸祐先生, 甘利正和先生, 多田寛先生, 宮下穰先生, および東北大学病院の渡邊みか先生, 高橋弥生先生に深く感謝いたします。

本研究は独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構プロジェクト「がん超早期診断・治療機器の総合研究開発」のサポートにより行ったものである。

●参考文献

- 1) S.v.d. Ven, V.T.H.B.M. Smit, T.J.A. Dekker, J.W.R. Nortier, J.R. Kroep. Discordances in ER, PR and HER2 receptors after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Cancer Treatment Reviews* 37 (2011) 422-430.
- 2) A.S.-Y. Leong, Z. Zhuang. The Changing Role of Pathology in Breast Cancer Diagnosis and Treatment. *Pathobiology* 78 (2011) 99-114
- 3) T. Moriya, N. Kanomata, Y. Kozuka, H. Hirakawa, I. Kimijima, M. Kimura, M. Watanabe, H. Sasano, T. Ishida, N. Ohuchi, J. Kurebayashi, H. Sonoo. Molecular morphological approach to the pathological study of development and advancement of human breast cancer. *Medical Molecular Morphology* 43 (2010) 67-73.
- 4) A.V. Blaaderen, A. Vrij, Synthesis and characterization of colloidal dispersions of fluorescent, monodisperse silica spheres, *Langmuir* 8 (1992) 2921-2931.
- 5) N.A.M Verhaegh, A.v. Blaaderen, Dispersions of rhodamine-labeled silica spheres: synthesis, characterization, and fluorescence confocal scanning laser microscopy, *Langmuir* 10 (1994) 1427-1438.
- 6) J. Stingl, C. Caldas. Molecular heterogeneity of breast carcinomas and the cancer stem cell hypothesis. *Nature Reviews Cancer* 7 (2007) 791-799.
- 7) A. Marusyk, V. Almendro, K. Polyak. Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer? *Nature Reviews Cancer* 12 (2012) 323-334.