

HSTT (High Sensitive Tissue Testing) 技術の紹介

HSTT (High Sensitive Tissue Testing) Technology

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

要旨

写真化学技術を活用した、新たな高輝度蛍光体ナノ粒子とデジタル画像処理技術を組み合わせてなる、デジタル病理技術 (HSTT: High Sensitive Tissue Testing) を開発したので報告する。本技術は、既存技術である酵素と着色基質を用いたDAB法などの免疫組織化学法では検出できなかった発現量のタンパク質を検出可能である等、既存法に対する優位性を示す実証データが蓄積されつつある。

今回開発した技術は、免疫組織化学をベースに抗原の定量検出と、抗原の位置検出(画像化)を可能にする革新的な方法である。免疫組織化学は標識として酵素を用いる方法と蛍光色素を用いる方法が知られている。組織標本上のタンパク質量を定量するために、多くの研究者が定量計測の可能性を持つ、蛍光法の適応を試みてきたが、蛍光強度や耐光性の課題があり実現は難しかった。本研究では組織標本の自家蛍光ノイズを大きく上回り、病理染色プロセスにおける溶剤耐久に優れた、革新的なナノ蛍光体を開発した。さらに、このナノ蛍光体を用いた組織の染色後には、画像認識技術とデジタル画像処理によりその粒子数を計測する事によりタンパク質発現量を定量計測できる技術を確立した。技術的な特徴としては、①高感度、②定量性・広いダイナミックレンジ、③検出タンパク質の細胞や組織内での位置解析が可能、④複数のタンパク質(マーカー)検出等、が挙げられる。本技術は粒子の表面修飾技術により、原理的にはあらゆる抗体に結合でき、既に数十種類の抗体による染色が可能が検証されている。またタンパク質のみならず、mRNA、miRNA、DNAの検出や細胞診断、血液診断へも活用可能であり、検討を進めている。

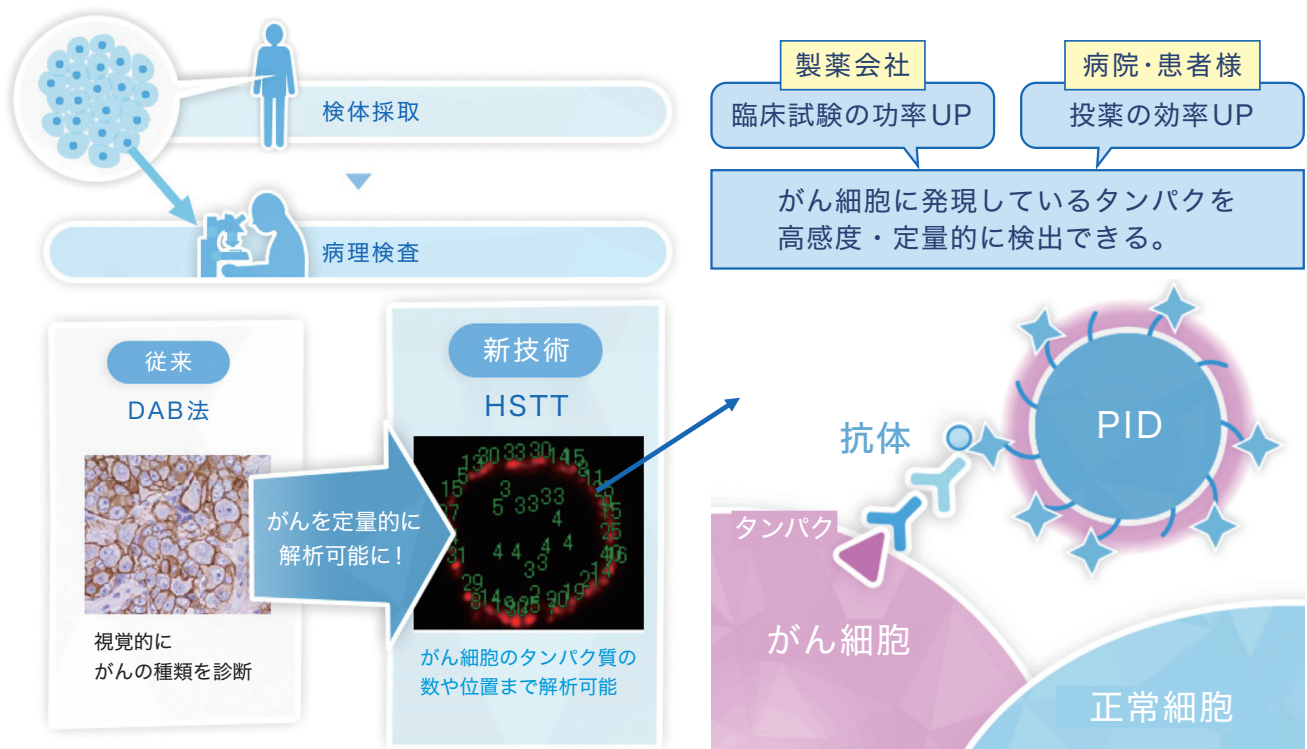
Abstract

Konica Minolta succeeded in developing a digital pathology technology HSTT at molecular imaging levels. The HSTT technology is based on Konica Minolta's heritage of photographic chemistry. We are accumulating data which indicate that the HSTT technology can detect antibodies which cannot be detected by an immunohistochemistry (IHC) such as the DAB method.

The HSTT is a breakthrough in digital pathology which uses immunohistochemistry to enable both antigen quantitation and localization (visualization). Many researchers have attempted to apply immunofluorescence to protein quantitation, but they have faced difficulties in attaining sufficient brightness and stability. Konica Minolta successfully developed innovative nanoparticles whose brightness exceeds the auto-fluorescent noise level in tissue samples and which have excellent solvent durability during the pathology staining process. Furthermore, with our image recognition and digital processing technologies, we have achieved nanometer-level resolution in quantifying the number of particles (protein expressions).

The HSTT technology is characterized by (1) a high sensitivity, (2) a quantitative and wide dynamic range, (3) a simultaneous detection of multiple types of proteins, and (4) an analysis of locations of detected proteins in cells and tissues. In principle, since the nanoparticles can bind to any antibodies through surface modification, we succeeded in staining dozens of antibodies. The HSTT technology can also be applied to detection of mRNA, miRNA, and DNA, cytology, and blood testing, and we are developing research collaborations in these areas as well.

* 開発統括本部 バイオヘルスケア開発室



1 背景

日本では社会の高齢化に伴い、がんの罹患者数は年々増加している。また世界的に見ても、がん発症数と死亡数は増加が予測され、大きな社会課題の一つとなっている。これに対し近年、特定のタイプのがんにフォーカスして治療効果を高めるように設計された「分子標的薬」の開発が進んでいる。この薬はがん細胞をピンポイントで攻撃することで高い治療効果を発揮する特性を持っている一方で、その使用においては、がんの正確な病理診断により標的となる分子が患者にどのような量で存在するか判定する技術が鍵となる。正確な診断を行うことにより薬が効く患者のみに投薬を行うことで、薬が効かないのに副作用を受けてしまう患者の低減、医療費の抑制等の効果が見込まれる。本研究では上記課題に対し、蛍光ナノ粒子 (PID) を用いてがん細胞に発現するタンパク質を定量的に検出する技術を開発したので報告する。

2 蛍光ナノ粒子 (PID) の基本特性

Fig. 1a はPID (Phosphor Integrated Dots) 蛍光ナノ粒子の走査型電子顕微鏡の写真である。ナノ粒子製造技術分野でも特段に優良な均一形状が観察される。本技術ではPIDの粒子径を50から500 nmまで粒径制御が可能である。この精密性は本技術の1分子レベルのタンパク質検出の能力を支えている。材料の構造は、蛍光材料を高密度に集積し、その外層をハードなシェルで被覆し、表面には生体親和性の高いPEG (polyethylene glycol) や抗体が適切な量で結合されている。そのため免疫組織化学反応における非特異的反応が減少し、高い検出感度

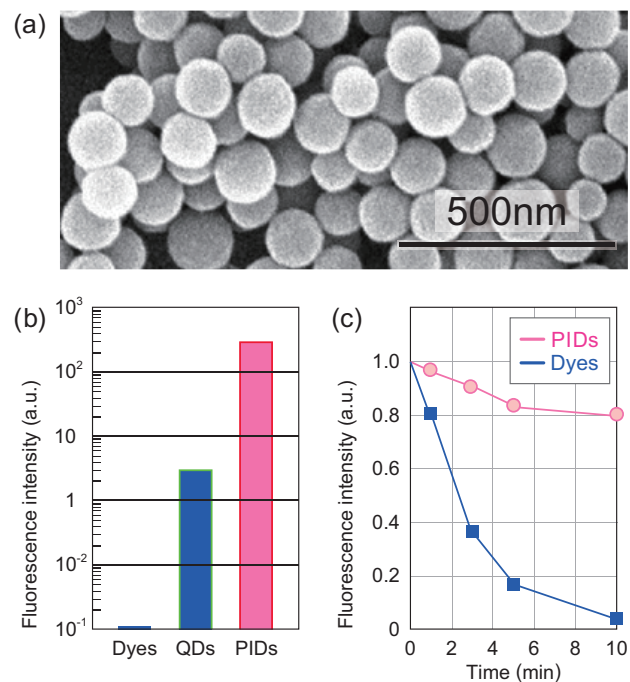


Fig. 1 Basic properties of PIDs (phosphor integrated dots). (Fig. 1a) A scanning electron microscopy image of PID nanoparticles. (Fig. 1b) Comparison of 580 nm light-excited fluorescence intensities among Dyes (sulforhodamine 101), QDs (quantum dots: Qdot 625), and PIDs. Each fluorescence intensity is shown on a logarithmic scale on the vertical axis. (Fig. 1c) Comparison of photostabilities of Dyes and PIDs. The Dyes or PIDs on a glass slide were irradiated with 580 nm light, and the fluorescence intensity of both fluorescent materials was measured over time. The fluorescence intensity of Dyes rapidly decreased to 2% of the initial value in 10 min, whereas that of PIDs remained over 80% of the initial value under the same irradiation condition.

を持つことに成功している。PIDは従来の有機蛍光色素に対して約3万倍、半導体であるCdSe量子ドットの約100倍の発光強度を持つ (Fig. 1b)。この発光強度は細胞や組織の自家蛍光を十分に上回っており、細胞や組織上において1粒子単位で発光信号を捕らえることが可能となる。その結果としてより高精度なタンパク発現量の測定と組織上の位置を表示することができる。またPIDは従来蛍光観察に使用されてきた蛍光色素と比較して高い耐光性能を保有しており、顕微鏡観察など強い励起光照射下においても安定して定量性能を発揮する事を可能としている (Fig. 1c)。

3 既存法とのダイナミックレンジ比較

Fig. 2は異なる濃度のビオチンを組織基板上に模擬的に配置し、アビジンを結合した様々な標識剤の結合性能を評価したものである。現在一般に病理検査で用いられているDAB法ではほぼ2段階程度の半定量性能を有していた (Fig. 2a)。この結果はDAB法が酵素を用いた増幅反応であるために、一度シグナルが検出されると急激にそのシグナルが増加した結果と想定される。また主に創薬などの研究用途で用いられている蛍光色素 (Dye) や量子ドット (QD) はその蛍光強度が弱いため定量可能と想定される領域が高発現領域で観察されたものの、低発現領域の立ち上がりが悪い結果となった。一方でPIDは1粒子の輝度が大きいので、ビオチン濃度で 10^{-5} ~ 10^{-3} mMまでと低発現領域から幅広い測定ダイナミックレンジを有することがわかった。PID粒子は1粒子レベルから粒子の数をカウントすることができるので、高感度特性と線形性のよい幅広いダイナミックレンジ特性が得られたと想定される。

4 標本上のタンパク質定量性能の検証

PIDの実際の標本上での定量性能を検証するために、がんの培養細胞系を用いた検証を行なった。様々なレベルでHER2タンパク質を発現しているがんの培養細胞を準備し、一部の細胞をすりつぶし、既存のタンパク質定量法であるELISA法によりHER2タンパク質の発現量を測定した。残りの細胞を用いてセルブロックを作製後、切片を切り出すことで病理標本を作製し、PIDを用いた免疫組織化学染色を実施し同様にHER2タンパク質の発現量を測定した。Fig. 3に示したように、PIDスコア値は既存のタンパク質測定法であるELISA法に対して相関係数で0.93と高い相関関係を示した。ELISA法はタンパク質の定量技術として確立されている技術であるが、組織や細胞をすりつぶし溶出したタンパク質の量を測定する技術であるため、がん組織等複数種類の細胞が入り混じった検体を測定する場合には定量を行ったタンパク質がどの組織や細胞に由来しているか判別できない状態となる。また病理という観点では組織や細胞の形態を観察

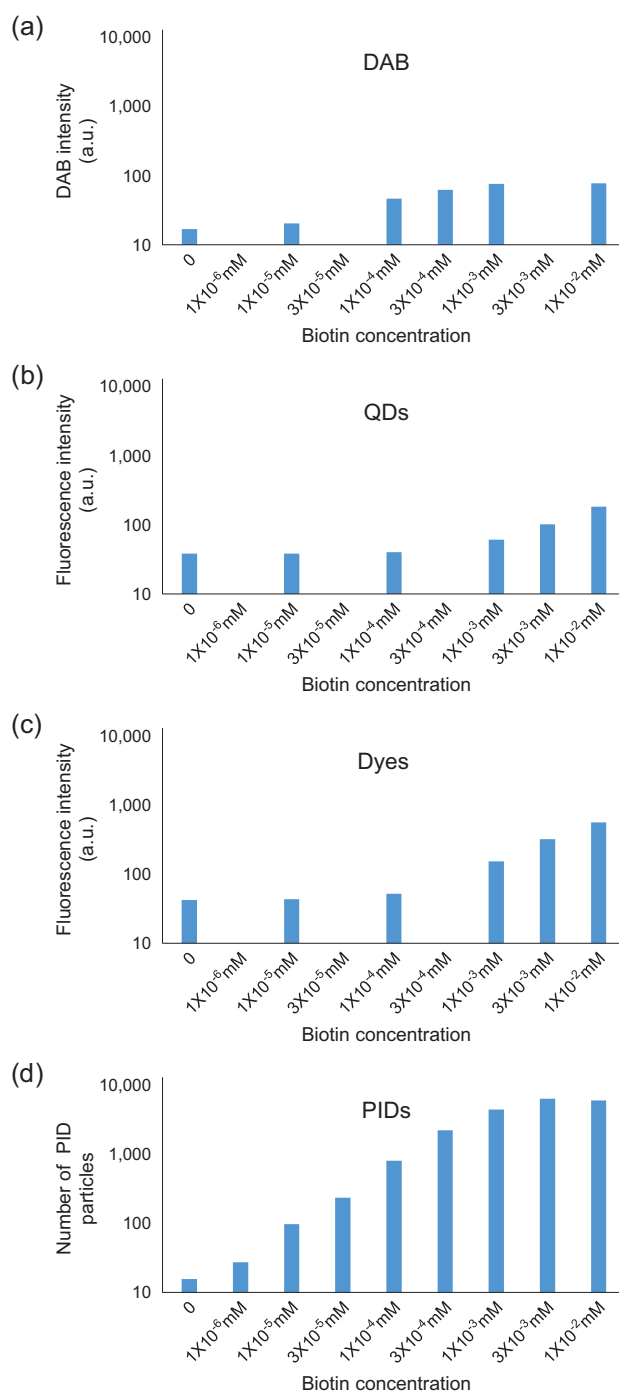


Fig. 2 Dynamic range of PIDs imaging. Sensitivity of imaging of PIDs (Fig. 1d) was compared with that of DAB (Fig. 1a), QDs (Fig. 1b) and Dyes (Texas Red) (Fig. 1c). Biotin solutions of various concentrations were incubated with deparaffinized paraffin sections of human breast cancer tissues to prepare mimic slide samples. After washing them, streptavidin-conjugated HRP visualized by DAB, streptavidin-conjugated Dyes (Texas Red), streptavidin-conjugated QDs, streptavidin-conjugated PIDs were reacted with the biotins which were bonded on each slide glass. Streptavidin-conjugated DAB was analyzed using Aperio image analysis system (Leica) to quantify the degree of brown color of IHC-DAB. DAB showed insufficient quantitative capability. Each of QDs and Dyes showed a narrow dynamic range due to weak fluorescent intensity, whereas PIDs showed a high sensitivity and a linear wide dynamic range between 10^{-5} to 10^{-3} mM of biotin concentration because of strong brightness of each particle. (HRPs: horseradish peroxidases)

できなくなるという大きな問題が存在する。これに対して今回の検証でPIDを用いた免疫組織化学法はそのスコア値により組織標本上のタンパク質の量を細胞形態を維持したまま定量計測できることを確認できた。

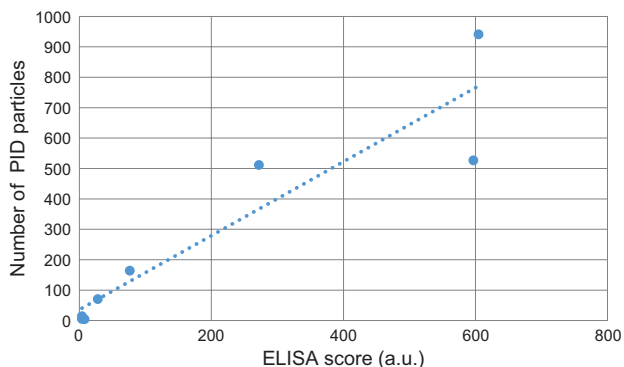


Fig. 3 Quantitative performance of PID imaging.

Cultured cells of eight types of breast cancer which expressed HER2 protein at various levels were selected to investigate whether PIDs can accurately measure the protein expression level in cultured cancer cells. These cells were immunostained with monoclonal anti-HER2 antibody, biotinylated monoclonal secondary antibody, and PIDs. The HER2 expression levels of these cells were also examined using ELISA which is a conventional method of quantifying protein. The figure shows a very high correlation.

5 HSTT 技術の展開

近年のがん治療薬の開発ではがん細胞上に存在する標的だけでなく、免疫系の細胞などのマーカーを用いてがん周囲の環境も合わせた複数マーカーを評価するニーズが高まっている。本技術は蛍光ナノ粒子に内包させる蛍光体の種類を変更することで複数の蛍光色を持った粒子を合成可能である。このPID粒子を用いて行う複数マーカーの評価についても本技術の展開として準備を進めている。Fig. 4 に培養細胞におけるHER2タンパク質（赤）とki67タンパク質（緑）の2重染色像を示す。このようにPID技術は蛍光色を変更することで同一組織上の複数のマーカーを検出可能な技術である。

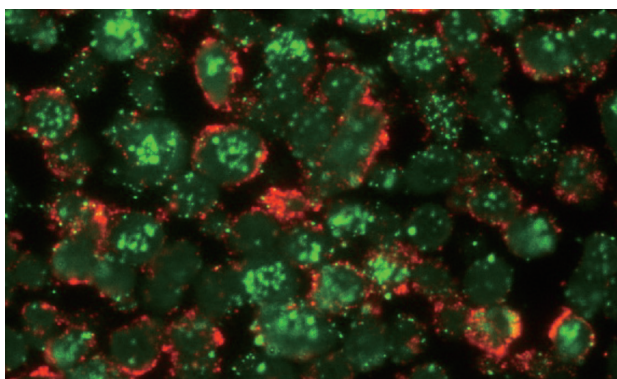


Fig. 4 A double stained image of ki67 protein (green) and HER2 protein (red) in cultured cells.

As shown in this photo, the technology using the PID nanoparticles can detect multiple markers on an identical tissue by altering fluorescent colors.

6 まとめ

HSTT 技術の特徴は病理検査において分子標的薬の標的となるタンパク質の存在位置と量を正確に測定できる点にある。この測定結果は薬が効く患者の層別化に活用可能であり、治療の現場では、効率的な投薬を行うことで副作用を受ける患者の減少や無駄な投薬の削減に貢献できると想定される。また本層別化技術を医薬品の開発段階に適用することで、臨床試験のときに新薬が「効く」被験者と「効かない」被験者をあらかじめ厳密に分けることで、臨床試験期間やその規模の縮小という形で医療費の増大を食い止め、新薬開発のスピードを加速させる技術として発展が期待される。

7 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内憲明先生、権田幸祐先生、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、青山弥生先生に感謝いたします。

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。