

ミラー切片を用いた細胞運動シグナルの可視化

1. 東京医科大学 茨城医療センター呼吸器内科 2. 防衛医科大学 病態病理学講座
仙波 征太郎¹⁾ 岩屋 啓一²⁾

<はじめに>

組織標本を用いた免疫染色の中で、二重染色はある二つの蛋白質の組織・細胞内の発現局在を観察することで、それらの蛋白質の生体内における相互関係を探る方法である。しかし、標的となる二つの蛋白質がある同一細胞上の同一部位に発現している場合、二重染色自体が困難である。このような場合には、ミラー（鏡映）切片を用いた染色・観察方法が有用である。

<ミラー（鏡映）切片を用いた染色法について>

ミラー（鏡映）切片とはパラフィン包埋組織から薄切して切片を作る際に生じる、同一切断面を共有する連続した一对の切片であり、互いの切片は一方を鏡に反射させた時に鏡面に映るような左右対称像を他方が示すことが特徴である。一对のミラー切片上には切断された同一細胞がそれぞれ存在し、左右対称に分布すると考えられる。

仮に、この一对のミラー切片の一方を 切片、他方を 切片と呼び、いずれも細胞質に存在する A 蛋白、B 蛋白を標的とする抗体をそれぞれ抗 A 抗体と抗 B 抗体と呼ぶこととする。切片に抗 A 抗体による免疫染色、対となる 切片に抗 B 抗体による免疫染色を行う。切片上の抗 A 抗体で染色された細胞と、 切片上の抗 B 抗体で染色された細胞の分布を比較した際、左右対称性をもって一致する時、A 蛋白と B 蛋白がある細胞内で機能的に関連すると推測できる。

<細胞運動関連蛋白について>

これまでの分子生物学では細胞増殖因子や細胞間接着因子およびそれらの細胞内シグナル伝達メカニズムについての研究が盛んに行われ、臨床医学の分野においても細胞増殖因子や接着因子と腫瘍性疾患の悪性度との関連について様々な検討がなされてきた。一方、細胞運動分野の研究は分子生物学において近年注目されつつあるも、臨床医学における検討が少なく未開拓の分野である。特に組織病理で扱うホルマリン固定標本は完全に動態を失い静止した状態であり、細胞運動という動態を直接評価することはできない。

そこで今回我々は細胞運動に関わる 2 つの蛋白質 Arp2、WAVE2 を標的とし、ミラー切片を用いてこれらの免疫染色を行い細胞運動シグナルの可視化を試みたので紹介する。

今回は細胞運動に関わる蛋白質として Arp2 (actin-related protein 2) 蛋白と WAVE2 (Wiskott-Aldrich Syndrome Family Verprolin-Homologous Protein 2) 蛋白を紹介する。

Arp2、WAVE2 が属する一群の蛋白質は細胞骨格蛋白であるアクチンの重合反応を誘導、促進することにより、細胞運動に必要な細胞質突起の形成を制御している。特に浸潤能の高い癌細胞では Arp、WAVE ファミリー蛋白の発現と一致して異常な細胞質突起の形成が盛んに行われており、WAVE ファミリー蛋白を抑制することで癌細胞の運動能力が低下するとされている。このことから Arp、WAVE ファミリー蛋白の過剰な発現は、細胞運動を制御する細胞質内シグナルの活性化を反映していると推測される。

< 染色方法・評価 >

まず先に説明した一对のミラー切片を用意し、下記手順の通り対となる切片それぞれに対し抗 Arp2 抗体、抗 WAVE2 抗体で染色する。

【切片の前処置】	EDTA-緩衝液に浸して オートクレーブ処理 (110 , 10 分)
【1 次抗体, 希釈倍率】	goat polyclonal IgG antibody anti - human Arp2 (k-15) antibody × 50 倍希釈 anti - human WAVE2 (c-14) antibody × 50 倍希釈
【1 次抗体反応温度, 時間】	室温で 一晚
【2 次抗体および染色法】	ヒストファイン シンプルステイン MAX-PO (G) (標識ポリマー法, ニチレイバイオサイエンス)

染色例を図 に示す。1 対のミラー切片はそれぞれが左右対称像を示すことからそのままでは評価が難しいため、画像を取り込む際に一方を左右反転した状態で並べて掲載する。

図 AB と図 CD が対になるミラー切片である。図 AB は大腸癌のリンパ節転移、図 CD は大腸癌の原発巣である。

抗 Arp2 抗体、抗 WAVE2 抗体は癌細胞の細胞質全体を比較的均一に茶褐色に染め上げている。癌組織内に陽性細胞が散在性に存在することが観察される。この染色法では残念ながら癌細胞の細胞質突起を認識することはできない。

次に抗 Arp2 抗体に対する陽性細胞、抗 WAVE2 抗体に対する陽性細胞の癌組織内における分布を比較する。陽性細胞の分布は抗 Arp2 抗体、抗 WAVE2 抗体においてその分布が一致することが確認できる。

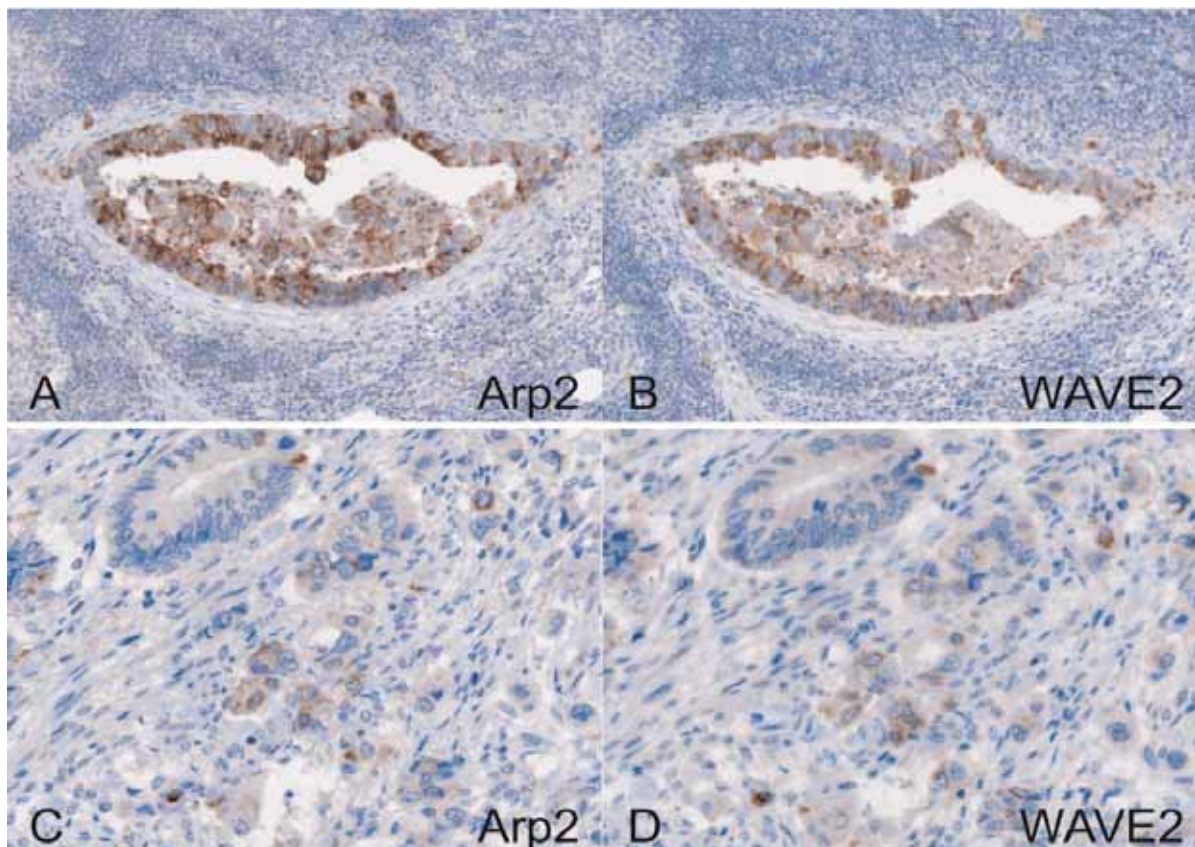


図 AB と図 CD はそれぞれ対となるミラー切片である。一方の画像を左右反転した状態で掲載している。

図 AB は大腸癌のリンパ節転移、図 CD は大腸癌の原発巣である。図 AC は抗 Arp2 抗体、図 BD は抗 WAVE2 抗体で染色している。抗 Arp2 抗体、抗 WAVE2 抗体は癌細胞の細胞質全体を比較的均一に茶褐色に染め上げている。図 AB を比較すると抗 Arp2 抗体に対する陽性細胞、抗 WAVE2 抗体に対する陽性細胞は癌組織内における分布が一致することが確認できる。図 CD の比較も同様である。

以上の観察より、Arp2、WAVE2は無数に存在する癌細胞のうち、一部の細胞において双方の蛋白が過剰に発現していることになる。我々はこの所見を癌細胞における Arp2 と WAVE2 の共発現と呼び、細胞内運動シグナルの過剰な活性化を反映していると考えている。

また、我々の検討では肺癌や乳癌患者において Arp2 と WAVE2 の共発現が患者予後と関連する結果を得ている。

ちなみに標識ポリマー法であるシンプルステイン（ニチレイバイオサイエンス）は、増幅反応が強いためか濃く染まる。組織において同一細胞内の発現をみる場合、我々が数社の2次抗体を検討した限りでは、標識ポリマー法が最も優れた染色性を示した。

<おわりに>

物質間の相互作用は、細胞内シグナルとなり細胞のさまざまな機能を規定している。そして、細胞内における物質の可視化は、分子生物学の強力なツールとして確立されている。これに対して物質間の結合からなる細胞内シグナルを組織レベルで可視化する試みはあまり一般的ではない。確かに同一細胞内で共発現しても物質が結合しているかは不明である。今回の物質はその分子生物学的性格が明瞭であったために検討を行うことが可能となった。組織内の細胞運動のシグナルの分布は、リンパ節転移を来している部分では共発現する腫瘍細胞数が多く、また大腸癌の原発部位では、先進部の腺管構造が不明瞭な部分に共発現する腫瘍細胞が高頻度にみられた。このような所見が組織レベルの検討で初めて明らかになっており、組織構築と細胞内シグナルの分布を検討するには、ミラー切片を用いた検索が役に立つと考える。