

腫瘍関連マクロファージの免疫組織化学的解析における抗原賦活化至適条件の検討

中川 雄伸、林田 唯、菰原 義弘、大西 紘二、清田 恵美、竹屋 元裕

熊本大学大学院生命科学研究部・細胞病理学分野

1. 背景と目的

免疫担当細胞の一種であるマクロファージ (Mφ) は、異物や病原菌を貪食して処理するだけでなく、多数の生理活性物質を産生し、種々の疾患に関与することが知られている。近年、腫瘍組織に存在する腫瘍関連 Mφ (TAM: Tumor-Associated Macrophage) が腫瘍細胞の増殖、血管新生など腫瘍の進展を促進する働きを持つことが明らかにされた。免疫染色における抗原賦活化法の技術的進歩により、多種の抗 Mφ 抗体がホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE: Formalin Fixed Paraffin Embedded) 標本に利用可能となり、免疫組織化学的側面からの TAM の解析も頻繁に行われるようになってきた。

今回、当研究室で行っている FFPE 切片を用いた Mφ の免疫染色の抗原賦活化至適条件を紹介することで、TAM を主体とした Mφ の研究における免疫組織化学技術の精度向上に貢献できると考えられる。

2. 材料と方法

1) 検体

研究での使用についてご遺族の同意が得られた剖検例の脾臓および腫瘍組織の FFPE 切片を用いた。

2) 抗原賦活化処理

10 枚の FFPE 切片を準備し、以下に示す処理を行った。

- a) 無処理...抗原賦活化なし、1 枚。
 - b) 酵素処理...Proteinase K (PK) (Dako, S3020) を室温 5 分間、1 枚。
 - c) 熱処理...家庭用電子レンジの沸騰下で 700W、5 分間、マイクロウェーブ (MW) 1 回照射。
10mM クエン酸緩衝液 (CB), pH6 (三菱化学メディエンス, RM102-C) 1 枚。
Target Retrieval Solution (TRS) (Dako, S1699) 1 枚。
1mM Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), pH8 (自家製) 1 枚。
抗原賦活化液 pH9 (ニチレイバイオサイエンス, 415211) 1 枚。
 - d) 加圧熱処理...抗原賦活処理用プレッシャーチャンバー Pascal (PCP) (Dako, S2800) にて 125 、
30 秒間。緩衝液は上記と同じ 4 種類、4 枚。
- c) d) の熱処理後は、室温にもどるまで冷却した。

3) 免疫染色

1 次抗体には、汎 Mφ マーカーである CD68 (Clone: PG-M1) 、ヘモグロピンスカベンジャー受容体である CD163 (Clone: AM-3K および Clone: 10D6) 、クラス A-スカベンジャー受容体である CD204 (Clone: SRA-E5) 、マンノース受容体である CD206 (Clone: 5C11) 、抗マイクログリアマーカーである Iba1 を使用した。2 次抗体には、ヒストファイン シンプルステイン MAX-PO (ニチレイバイオサイエンス) を使用し、DAB 基質キット (ニチレイバイオサイエンス) で発色した。その後、マイヤーのヘマトキシリン液で核染色を行った。

3. 結果

脾臓の FFPE 切片に対して、前述の 1 次抗体を用いた免疫染色を行った (写真 1) 。CD68 は PK での酵素処理または緩衝液として EDTA, pH8 を用いた PCP による加圧熱処理が抗原賦活化法として適していた。CD163 (AM-3K) は緩衝液に TRS を使用し、MW または PCP での熱処理が良好な染色性を示した。CD163 (10D6) と CD204 は EDTA, pH8 または抗原賦活化液 pH9 を緩衝液に使用した PCP での熱処理が良好な染色性を示した。CD206 と Iba1 に関しては MW または PCP での熱処理で良好な染色性を示し、緩衝液の種類の違いではほとんど差がみられなかったが、EDTA, pH8 または抗原賦活化液 pH9 を緩衝液とした PCP 熱処理での抗原賦活化により、若干染色性が改善する印象であった。

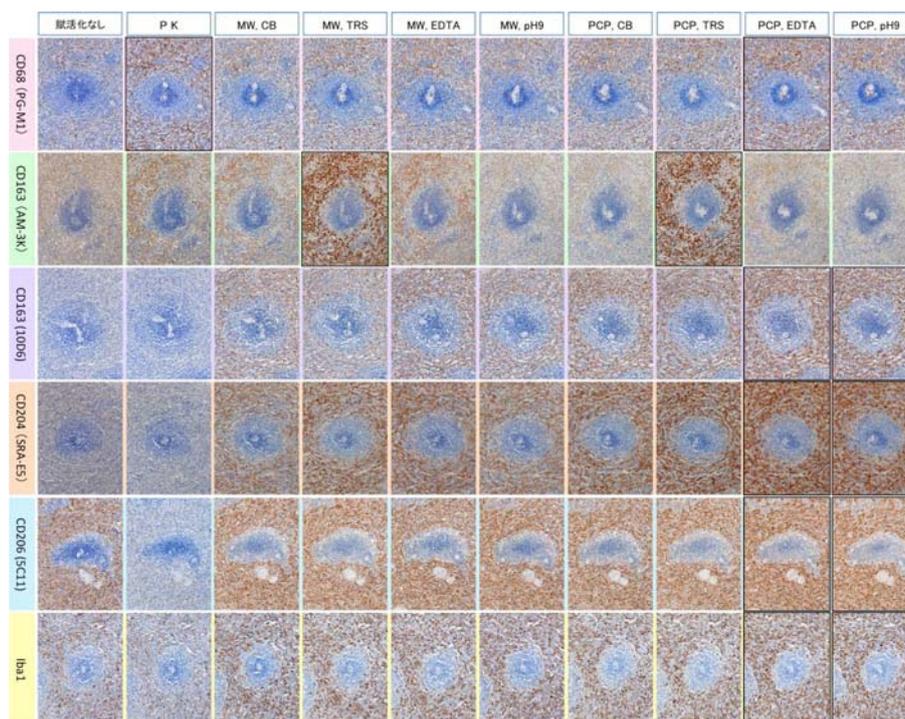


写真1 抗原賦活化至適条件検定 (脾)

PK: Proteinase K (室温 5min) MW: マイクロウェーブ (沸騰 5min) PCP: Pascal (125 30sec) CB: クエン酸緩衝液, pH6、TRS: Target retrieval solution、EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid, pH8、pH9: 抗原賦活化液 pH9

次に TAM を対象とした各抗体の詳細な抗原賦活化の条件を検定するために悪性腫瘍組織の FFPE 切片を用いて免疫染色を行った (写真 2)。CD68 は PK 酵素処理よりも EDTA, pH8 を緩衝液に用いた PCP による熱処理、CD163 (AM-3K) は MW よりも TRS を緩衝液に用いた PCP による抗原賦活化法により安定した染色性が得られた。CD163 (10D6) CD204、CD206、Iba1 は症例間での多少の差はみられたものの、EDTA, pH8、あるいは抗原賦活化液 pH9 を緩衝液に用いた PCP による熱処理により最も安定した染色性が得られた。

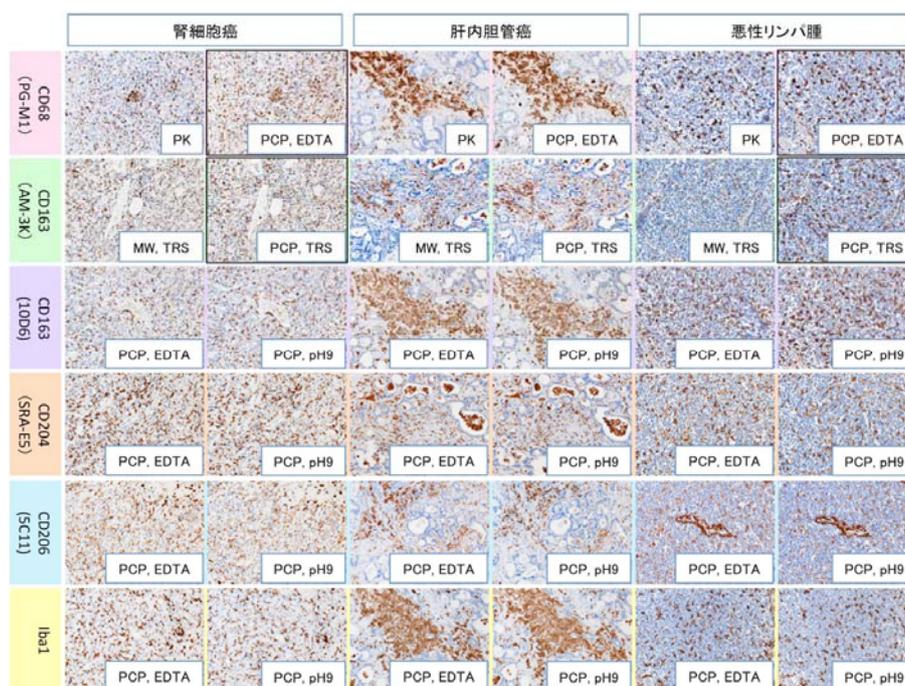


写真2 抗原賦活化至適条件検定 (悪性腫瘍)

今回の抗原賦活化の至適条件検定で得られた最良の条件は表 1 および写真 3 のとおりである。

抗体名	Clone	免疫動物	メーカー	抗原賦活化
CD68	PG-M1	Mouse	DAKO	PCP, EDTA, pH8
CD163	AM-3K	Mouse	Trans Genic	PCP, TRS
CD163	10D6	Mouse	Leica Biosystems	PCP, EDTA, pH8 または抗原賦活性化液 pH9
CD204	SRA-E5	Mouse	Trans Genic	PCP, EDTA, pH8 または抗原賦活性化液 pH9
CD206	5C11	Mouse	Acris	PCP, EDTA, pH8 または抗原賦活性化液 pH9 (MW と PCP の差、緩衝液の差はほとんどない)
Iba1	-	Rabbit	Wako	PCP, EDTA, pH8 または抗原賦活性化液 pH9 (MW と PCP の差、緩衝液の差はほとんどない)

表 1 抗原賦活化至適条件

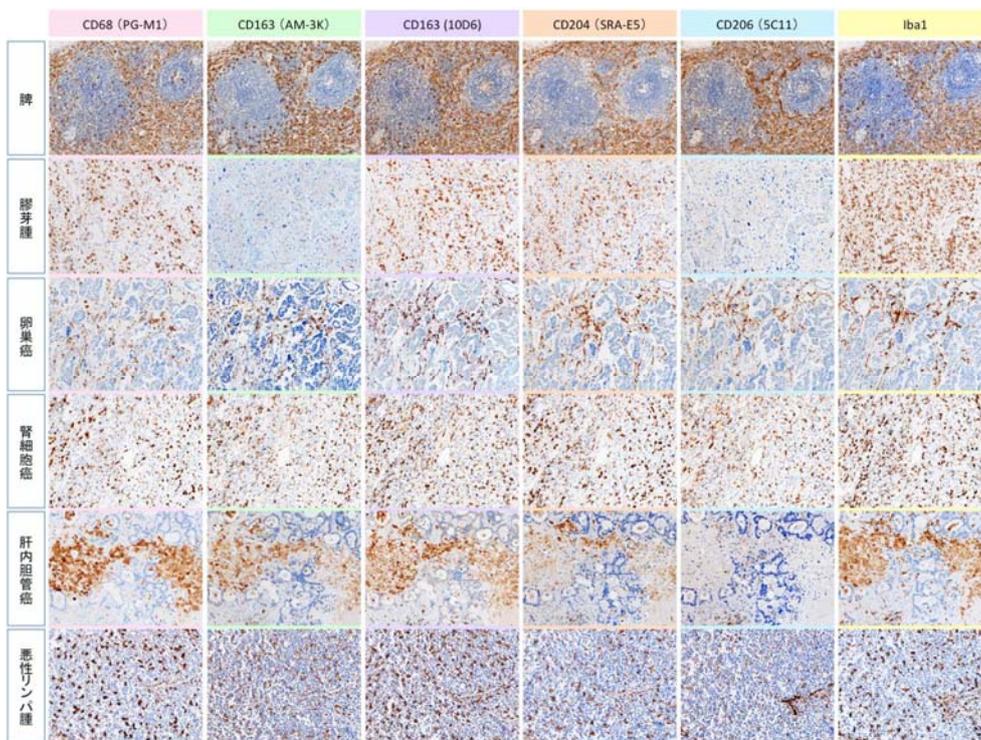


写真 3 抗原賦活化至適条件での染色

4. 考察

Mφ の活性化経路には古典的活性化 (M1) とオルタナティブ活性化 (M2) があり、それぞれ相反する機能を有する (図 1)。様々な腫瘍組織において、ほとんどの TAM は抗炎症作用を有する M2Mφ であることが知られており、膠芽腫、卵巣癌、肝内胆管癌、腎細胞癌、一部の悪性リンパ腫などでは、腫瘍組織内の M2Mφ の数が多いほど腫瘍の進行が早く、悪性度が高いことが明らかにされた。

TAM の解析には、CD68 や M2Mφ マーカーである CD163、CD204、CD206 が頻繁に用いられる。抗 CD68 抗体には Clone: PG-M1 と Clone: KP-1 が知られているが、より特異性の高い PG-M1 が用いられることが多い。CD163 の Clone: AM-3K は凍結切片の染色でしばしば用いられるが、FFPE 切片では Clone:

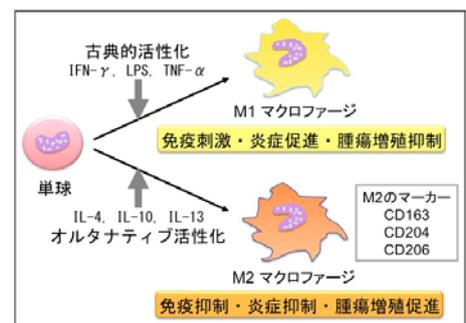


図1 マクロファージの活性化機構

10D6 と同等の染色性を示す検体や陽性数が 10D6 の半数以下の場合など症例により染色性にばらつきがみられ、固定条件の影響を受けやすい可能性がある(写真3)。したがって、FFPE 切片では AM-3K よりも染色性が安定している 10D6 が適していると考えられる。CD206 は CD163(10D6) や CD204 と比較すると M ϕ の陽性数が少なく(写真3)、M2 M ϕ の特殊な亜型を認識している可能性が考えられる。さらに CD206 は血管内皮細胞でも陽性となることがあるため(写真2)、FFPE 切片での M2M ϕ の解析には CD163(10D6) と CD204 が適していると考えられる。Iba1 はヒト以外にも、マウス、ラットの M ϕ /ミクログリアに特異的に反応するため、実験動物の汎 M ϕ マーカーとしても有用である。また、免疫動物が rabbit であるため、免疫動物が mouse である他の抗体との多重免疫染色が行いやすい利点がある(写真4)。

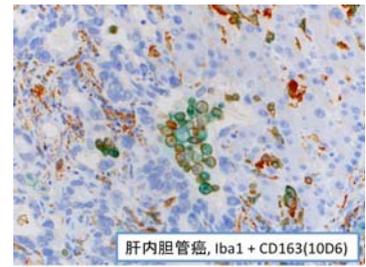


写真4 Iba1 と CD163 の多重染色
Iba1: DAB (茶)、CD163: HistoGreen (緑)

抗原賦活化の至適条件検定の方法は各研究室により様々と推測されるが、高価な試薬を複数用いるためラベリングコストがかかる。当研究室ではコスト削減のために抗原賦活化の熱処理に用いる高価な緩衝液は、メーカー推奨濃度を蒸留水にて 10 倍程度希釈しても染色性に問題がないことを確認して使用しているものもある。2 次抗体についても滅菌した 0.05M トリス緩衝生理食塩水, pH7.6 にて 2~3 倍希釈して使用するなどの工夫を行っている。

5. 結語

当研究室での CD68、CD163、CD204、CD206、Iba1 の免疫染色における抗原賦活化至適条件について紹介した。TAM の解析には特異性が高く FFPE 切片で染色性が安定している CD68(PG-M1)、CD163(10D6)、CD204(SRA-E5)、Iba1 が有用と考えられた。FFPE 切片を用いた M ϕ の免疫組織化学的解析を行う際のご参考になれば幸甚である。

6. 参考資料

- 1) 菰原義弘、竹屋元裕. がんマクロファージ: TAM について. 細胞工学 31: 1242-1247, 2012.
- 2) 元島崇信、菰原義弘、西東洋一、大西紘二、竹屋元裕. 腎細胞癌の腫瘍随伴マクロファージにおける CD206 発現の意義. 日本病理学会会誌 102 巻 第 1 号: pp438, 2013.
- 3) 中川雄伸、林田唯、清田恵美. 当研究室での免疫染色抗原賦活化における至適条件検定法. 熊本大学総合技術研究会, 2011. 熊本大学学術リポジトリ <http://hdl.handle.net/2298/23753>