

最新のトピックス

TOPICS

mRNA in situ hybridization の進化と免疫組織化学との融合

信州大学医学部附属病院臨床検査部

中嶋 智之 上原 剛

I はじめに

免疫組織化学 (immunohistochemistry: IHC) は、組織内における蛋白発現や細胞局在を可視化する手法として、病理診断および基礎研究の双方で広く利用されている。一方で、IHC の結果は抗体の特異性や抗原賦活化条件に強く依存し、特に低発現分子や分泌蛋白の解析では解釈が難しい場合がある。近年、mRNA in situ hybridization (mRNA ISH) は、組織中の転写産物を高感度かつ高特異的に可視化できる技術として急速に発展している。特に RNAscope の登場により、FFPE 標本を用いた高感度 RNA 検出が比較的容易となり、さらに in situ Hybridization chain reaction (in situ HCR) 法では、多重蛍光解析や免疫染色との統合解析が可能となってきた。本稿では、IHC と比較した mRNA ISH の利点を概説し、RNAscope および in situ HCR 法の特徴、さらに我々の研究への応用について紹介する。

II mRNA ISH の利点と RNAscope

IHC は蛋白を直接可視化できる優れた手法であるが、抗体依存性という本質的な課題を有する。特にサイトカインやケモカインなどの分泌蛋白では、蛋白が細胞外へ放出・拡散するため、染色陽性細胞が真の産生細胞を反映していない可能性がある。また、市販抗体の中には特異性検証が不十分なものも存在し、低発現分子では非特異反応や背景染色が問題となる。一方、mRNA ISH は転写産物そのものを検出するため、遺伝子を実際に発現している細胞を直接同定できる。特にサイトカイン解析では、「どの細胞が産生しているか」を空間的に評価できる点が大きな利点である。近年広く用いられている RNAscope は、double Z probe を用いた高感度 RNA ISH 技術である (図1)¹⁾。2本のプローブが隣接して標的 mRNA に結合した場合のみシグナル増幅が起こるため、高い特異性を有する。また、多段階のシグナル増幅により、低発現 mRNA でも punctate dot として可視化可能である。FFPE 標

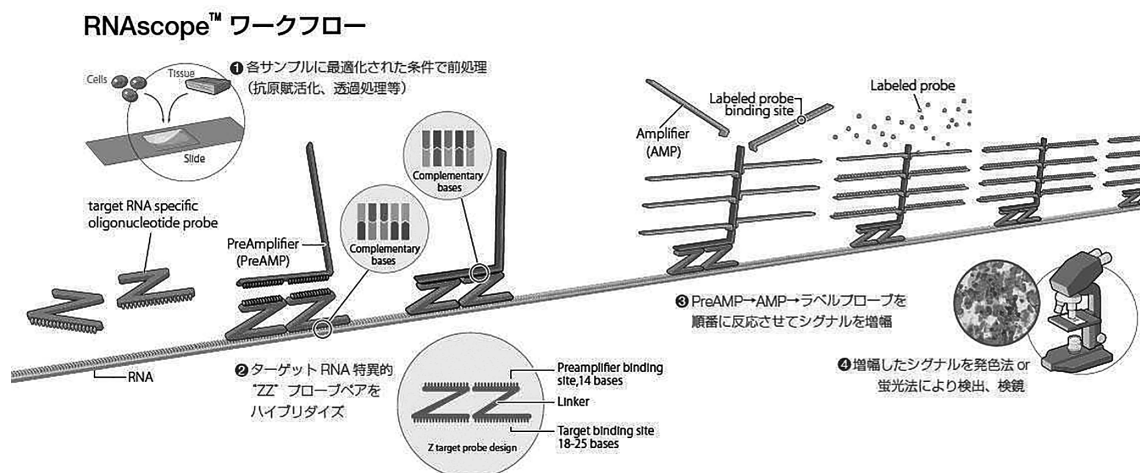


図1 RNAscope法の原理 (コスモバイオ HP より引用)

RNAscope 法では、隣接する 2 本のプローブ (double Z probe) が標的 mRNA に結合した場合のみシグナル増幅が生じる。これにより、高い特異性と感度を両立した RNA 検出が可能となる。

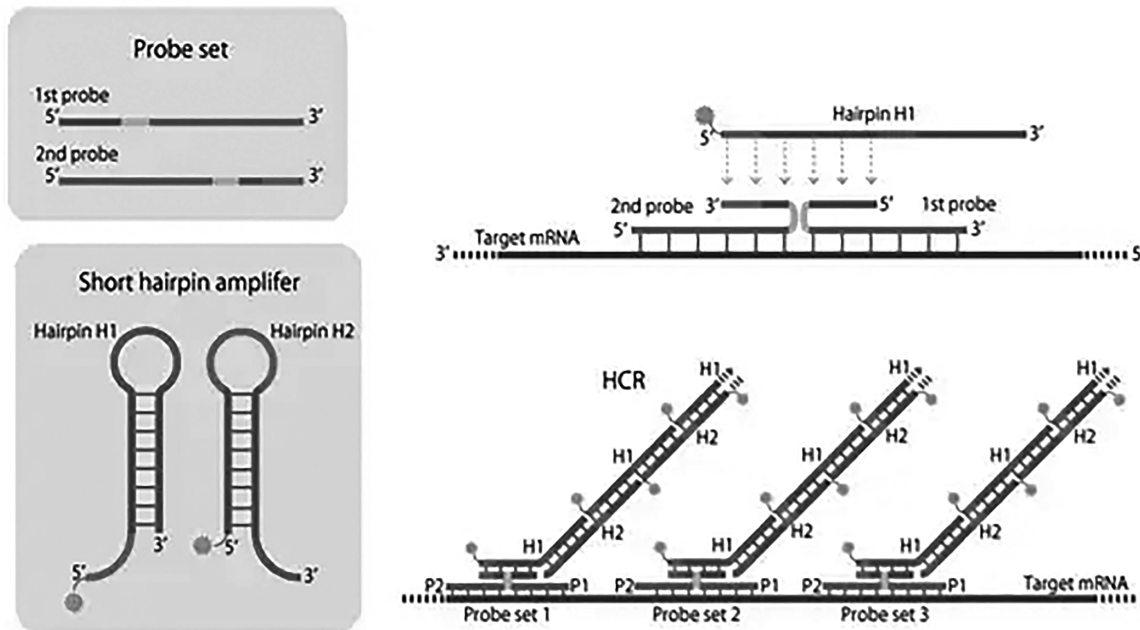


図2 in situ Hybridization chain reaction (in situ HCR) 法の原理 (ネッパジーン株式会社 HP より引用)
in situ HCR 法では、標的 mRNA に結合したプローブを起点として、蛍光標識 DNA ヘアピンの連鎖的自己集合反応が生じる。split initiator system により非特異的シグナルが抑制され、多重蛍光解析にも適している。

本にも適用しやすく、病理組織学的解析との親和性が高いことから、近年急速に普及している。

Ⅲ in situ HCR 法による多重解析

in situ HCR 法は、酵素を用いない等温核酸増幅法を利用した RNA ISH 技術である。特に第 3 世代 in situ HCR では split initiator system により、2 本のプローブが正確に標的 RNA へ結合した場合のみ増幅反応が生じるため、非特異的シグナルを抑制しつつ高感度検出が可能となった (図 2)。in situ HCR 法の特徴として、多重蛍光解析との相性が良い点が挙げられる。異なる initiator 配列と蛍光標識 hairpin を組み合わせることで、複数の RNA を同時に可視化できる。さらに、in situ HCR 法は比較的短鎖のプローブを用いるため²⁾、過度な protease 処理を必要とせず、蛋白抗原性が保持されやすい。このため、蛍光免疫染色 (immunofluorescence : IF) との併用に適しており、RNA 発現と蛋白発現を同一切片上で解析することが可能である。

近年の空間生物学研究では、単に「どの遺伝子が発現しているか」だけでなく、「どの細胞が、どこで、どの細胞と相互作用しているか」を理解することが重要視されている。in situ HCR 法は、このような空間的細胞間相互作用解析に有用な技術として注目されている。

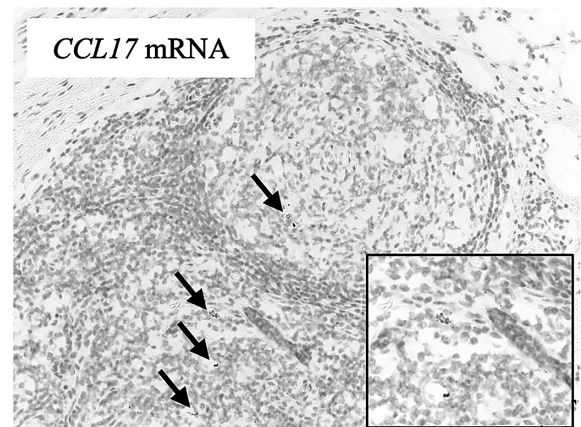


図3 RNAscope による CCL17 mRNA の検出
RNAscope 法を用いた CCL17 mRNA の組織学的解析。Tertiary lymphoid structure (TLS) 周囲に少数の CCL17 発現細胞を認める (矢印)。挿入図は高倍率像を示す。

Ⅳ 我々の研究への応用

我々は、腫瘍微小環境におけるサイトカイン・ケモカイン発現解析に mRNA ISH を活用している。特に、RNAscope を用いた CCL17 mRNA の解析では、tertiary lymphoid structure (TLS) 周囲に散在する少数の発現細胞を可視化することが可能であった (図 3)。CCL17 のような低発現ケモカインは、蛋白レベ

ルでの解析が難しい場合も多く、mRNA ISH の有用性が高い。さらに現在、我々は in situ HCR 法を用いた蛍光 mRNA ISH と蛍光 IHC の多重染色を実施している。これにより、サイトカイン産生細胞と免疫細胞マーカーを同時に可視化し、腫瘍微小環境における空間的細胞間相互作用の解析を進めている。RNA レベルでの機能情報と蛋白レベルでの細胞表現型情報を統合することで、従来の IHC 単独では困難であった詳細な組織学的解析が可能となりつつある。

V おわりに

mRNA ISH は IHC を代替する技術ではなく、相補的に融合することで、従来の組織学的解析をさらに発展させる技術と考えられる。近年の多重解析技術の進歩により、RNA と蛋白を統合した空間的解析は新たな段階へ進みつつあり、今後、病理学および腫瘍免疫研究において重要性を増していくと考えられる。

文 献

- 1) Wang F, Flanagan J, Su N, et al: RNAscope: a novel in situ RNA analysis platform for formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. J Mol Diagn 14: 22-29, 2012
 - 2) Tsuneoka Y, Funato H: Modified in situ Hybridization Chain Reaction Using Short Hairpin DNAs. Front Mol Neurosci 13: 75, 2020
-