

( 続紙 1 )

京都大学	博士 (人間健康科学)	氏名	平田勝啓
論文題目	Galactosidase-catalyzed fluorescence amplification method (GAFAM): sensitive fluorescent immunohistochemistry using novel fluorogenic $\beta$ -galactosidase substrates and its application in multiplex immunostaining (ガラクトシダーゼ触媒蛍光増幅法 (GAFAM) : 新規の蛍光発生ベータガラクトシダーゼ基質を利用した高感度蛍光免疫組織化学とそのマルチプレックス免疫染色法への応用)		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>マルチプレックス免疫染色法(multiplex immunohistochemistry: mIHC)は、組織・細胞内に存在する物質を同一の組織切片上で異なる色で可視化する技術である。現在 mIHC で高感度検出法として採用されているのは horseradish peroxidase (HRP)を標識酵素とする tyramide signal amplification (TSA)であるが、頻回の熱処理による組織へのダメージや、HRP に特有の解決すべき課題がある。<math>\beta</math>-ガラクトシダーゼ(<math>\beta</math>-gal)は遺伝子導入(LacZ)や細胞老化のマーカー(senescence-associated <math>\beta</math>-gal: SA-<math>\beta</math>-gal)に利用される。近年 LacZ の検出試薬として開発された蛍光発生 <math>\beta</math>-gal 基質 SPiDER-<math>\beta</math>Gal, MUGF, MUGF3 は、加水分解により生成するキノンメチドを介して反応局所近傍に共有結合性に集積し、蛍光シグナルが増幅される特長をもち、高感度蛍光免疫染色に利用できる可能性がある。本研究では蛍光発生 <math>\beta</math>-gal 基質を利用した新規の高感度蛍光免疫染色法であるガラクトシダーゼ触媒蛍光増幅法(galactosidase-catalyzed fluorescence amplification method: GAFAM)を開発し、mIHC への応用について検討した。</p> <p>1. 染色条件 : ホルマリン固定パラフィン包埋ヒト組織切片を使用し、抗ヒト Ki-67 抗体、<math>\beta</math>-gal 標識二次抗体、基質 SPiDER-<math>\beta</math>Gal の順に反応させ、蛍光免疫染色が可能であることを確認した。反応条件を基質濃度 20 <math>\mu</math>M・室温 30 分間と決定し、この条件では数時間以内に染色工程が完了した。2. 蛍光の安定性 : SPiDER-<math>\beta</math>Gal, MUGF, MUGF3 は、クエン酸緩衝液中 95<math>^{\circ}</math>C・20 分間の熱処理を 6 回繰り返した後も実用上十分な蛍光強度とシグナル局在性を維持していた。3. 染色感度 : GAFAM は TSA と同等以上、蛍光抗体間接法の数十倍の高感度をもつことが示された。4. mIHC : GAFAM と TSA を併用し、平滑筋アクチン(<math>\alpha</math>-SMA)とサイトケラチン(CK)の同時二重染色法に成功した。同時二重染色と熱処理を併用した <math>\alpha</math>-SMA, CK, CD45, CD31 の 4 重染色法では、蛍光波長が近接する SPiDER-<math>\beta</math>Gal と Cy3 の分離が従来の蛍光顕微鏡では困難であったが、マルチスペクトラルイメージング法により分離可能となった。本研究により GAFAMはTSAと同様のプロトコールでmIHCにも適用可能な高感度蛍光免疫染色法であることが示された。使用した<math>\beta</math>-gal基質は従来の蛍光色素と類似の波長特性を示すので、通常の蛍光顕微鏡で観察可能である。GAFAMはTSAと異なり組</p>			

(続紙 2)

織内在性peroxidase活性の影響を受けないので、TSAの適用が困難な一次抗体にも使用できる。またTSAと併用することによりmIHCにおける熱変性の回数を削減できるので、組織や抗原性へのダメージ軽減や染色所要時間の短縮が可能となる。GAFAMは高感度蛍光免疫染色法の選択肢として、医学研究や病理診断における有用なツールとなりうる。

(論文審査の結果の要旨)

リンパ腫、軟部腫瘍をはじめとする悪性腫瘍の病理診断には、分化・増殖マーカーなど多数の免疫染色が必須となるので、マルチプレックス免疫染色法(multiplex immunohistochemistry; mIHC)は病理診断において有用な技術と考えられる。一方で現在普及しているtyramide signal amplification (TSA)を利用したmIHCは頻回の熱処理を要するため、線維化や壊死を含むことが多い腫瘍組織や微少なサンプルはスライドガラスから切片が剥離脱落しやすい、染色工程が龐大で長時間かかるので臨床応用しにくいなどの課題があり、病理診断には適用が困難であった。

本研究はこれらの課題を解決するため、TSAに匹敵する高感度と耐熱性を有し、mIHCの熱処理と工程の削減を実現する新しい蛍光免疫染色法GAFAMの確立を目的とした。

結果として、1) GAFAMはTSAと同等の高感度と耐熱性を有することが示され、TSAと併用してmIHCに適用できることが示唆された。2) TSAと熱処理を併用した4重蛍光免疫染色を検討し、従来のTSAによるmIHCでは3回の熱処理が必要なところ、1回の熱処理で4重染色に成功した。この結果は従来のmIHCの熱処理と染色工程を半減できることを示唆していた。

以上の研究はこれまで臨床応用が困難であったmIHCを病理診断に活用することを可能とし、多数の免疫染色が必要で脆弱あるいは微少なサンプルしか採取できない症例の確定診断や治療方針の決定に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士(人間健康科学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、令和5年3月8日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。