

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6220405号
(P6220405)

(45) 発行日 平成29年10月25日(2017.10.25)

(24) 登録日 平成29年10月6日(2017.10.6)

(51) Int.Cl.

F 1

GO 1 N	33/48	(2006.01)	GO 1 N	33/48	P
GO 1 N	33/53	(2006.01)	GO 1 N	33/53	Y
GO 1 N	33/543	(2006.01)	GO 1 N	33/48	A
GO 1 N	1/30	(2006.01)	GO 1 N	33/543	5 2 5 U
C 12 Q	1/68	(2006.01)	GO 1 N	33/543	5 2 5 W

請求項の数 15 (全 16 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-554129 (P2015-554129)
 (86) (22) 出願日 平成26年1月22日 (2014.1.22)
 (65) 公表番号 特表2016-509674 (P2016-509674A)
 (43) 公表日 平成28年3月31日 (2016.3.31)
 (86) 國際出願番号 PCT/EP2014/051157
 (87) 國際公開番号 WO2014/114650
 (87) 國際公開日 平成26年7月31日 (2014.7.31)
 審査請求日 平成28年8月16日 (2016.8.16)
 (31) 優先権主張番号 13152579.2
 (32) 優先日 平成25年1月24日 (2013.1.24)
 (33) 優先権主張国 歐州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 591003013
 エフ・ホフマン-ラ・ロシュ・アーゲー
 F. HOFFMANN-LA ROCHE
 E AKTIENGESELLSCHAFT
 スイス・シーエイチ-4070バーゼル・
 グレンツアーヘルストラツセ124
 (74) 代理人 100140109
 弁理士 小野 新次郎
 (74) 代理人 100075270
 弁理士 小林 泰
 (74) 代理人 100101373
 弁理士 竹内 茂雄
 (74) 代理人 100118902
 弁理士 山本 修

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】染色されたFFPET切片からマイクロダイセクションした材料のRT-qPCR分析

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ホルマリン固定され、パラフィン包埋された組織切片の免疫組織化学染色のための方法であって、

- a) 固体支持体を用意する工程、
- b) ホルマリン固定され、パラフィン包埋された組織切片を、固体支持体に固定する工程、
- c) ホルマリン固定され、パラフィン包埋された組織切片から、パラフィンを除去する工程、
- d) エピトープを賦活化するために、固体支持体に固定された組織切片を50~70度12~24時間加熱する工程、および、
- e) 固体支持体に固定された組織切片を染色する工程、

を含み、

その際、少なくとも工程e)を0.5~3.0M塩化ナトリウムの存在下で実施する、前記方法。

【請求項2】

さらに、

- f) 固体支持体に固定された染色組織切片から、目的領域をダイセクションし、
- g) 目的領域からRNAを単離する工程、
- h) 単離されたRNAをcDNAに逆転写する工程、

i) cDNAを増幅および定量する工程、
を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

固体支持体がポリ-L-リジンでコートされている、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】

塩化ナトリウムが1.5～2.5Mの濃度で存在する、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項5】

塩化ナトリウムが1.9～2.1Mの濃度で存在する、請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。 10

【請求項6】

パラフィンの除去が、固体支持体に固定された組織切片をキシロール中でインキュベートすることにより実施される、請求項1～5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項7】

固体支持体に固定された組織切片の加熱が55～65で14～18時間実施される、請求項1～6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項8】

固体支持体に固定された組織切片の加熱が57～63で15.2～16.8時間実施される、請求項1～6のいずれか1項に記載の方法。 20

【請求項9】

染色が標識抗体の使用を含む、請求項1～8のいずれか1項に記載の方法。

【請求項10】

固体支持体がメンブレンスライドである、請求項1～9のいずれか1項に記載の方法。

【請求項11】

工程f)が、目的領域をマイクロダイセクションまたはマクロダイセクションすることを含む、請求項2～10のいずれか1項に記載の方法。

【請求項12】

目的領域が1～2mm²のサイズを有する、請求項2～11のいずれか1項に記載の方法。 30

【請求項13】

cDNAを増幅および定量する工程がリアルタイムPCRにより実施される、請求項2～12のいずれか1項に記載の方法。

【請求項14】

請求項1～13のいずれか1項に記載の方法を実施するためのキットであって、

a) ポリ-リジンでコートされた固体支持体、

b) エピトープ賦活化のための溶液、および、

c) 0.5～3.0Mの濃度の塩化ナトリウムを含む免疫組織化学染色のための溶液、を含む、前記キット。

【請求項15】

さらに、RNAからcDNAへの逆転写、cDNAの増幅および定量を実施するのに必要なすべての試薬を含む、請求項14に記載のキット。 40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ホルマリン固定され、パラフィン包埋された組織切片の免疫組織化学染色のための方法であって、a) 固体支持体を用意する工程、b) ホルマリン固定され、パラフィン包埋された組織切片を、固体支持体に固定(mounting)する工程、c) ホルマリン固定され、パラフィン包埋された組織切片から、パラフィンを除去する工程、d) エピトープを賦活化するために、固体支持体に固定された組織切片を50～70で12～24時間加熱する工程、および、e) 固体支持体に固定された組織切片を染色する工程、を含み 50

、その際、少なくとも工程e)を0.5~3.0M塩化ナトリウムの存在下で実施する、前記方法に関する。本発明はさらに、この方法を実施するためのキットに関する。

【背景技術】

【0002】

ホルマリン固定およびパラフィン包埋(formalin fixation and paraffin embedding)(FFPE)は、臨床ルーチンにおいて組織診および長期保存のために組織を固定する周知の操作である。FFPE組織(FFPE tissue)(FFPET)試料の多量の記録が、バイオマークー検出試験および初期臨床試験に用いられる。さらに、FFPET試料はRNAを単離するために使用でき、それをさらに遺伝子発現分析に利用できる。FFPET試料からのRNAは高い分解度を示すが、十分な量の材料をRNA単離に用いれば、RT-qPCR分析にはなお十分である。そのような分析は、最初のバイオマークー仮説を作成し、そして仮説を簡単に試験するために使用できる(Lohmann et al., Methods. 2013 Jan; 59(1))。

【0003】

FFPE組織切片から血管および腫瘍細胞巣を分離してRT-qPCR分析を実施することができるよう、本発明者らは下記の手法、すなわち免疫組織化学染色後のFFPETからのレーザーキャプチャーマイクロダイセクション(laser capture micro-dissection)(LCM)とcDNAのプレアンプリフィケーション(pre-amplification)後のRT-qPCR分析とを組み合わせた。

【0004】

IHC染色されたFFPET切片からのLCM後にRT-qPCR分析を組み合わせた際に当業者が直面する問題は、LCM後の材料の量がきわめて限られること、試料組織の固定後のRNA分解、およびさらに免疫組織化学染色操作中のRNA分解である。古典的な染色操作には、エピトープ賦活化(epitope retrieval)(たとえば、98%でのHIE Rプロトコル)、およびRNaseを含まない条件下で調製することができない緩衝液(抗体溶液、洗浄用緩衝液、色素)とのインキュベーション時間が含まれる。RNAをRT-qPCR分析に用いる予定であれば、上記のRNA分解はLCM後の材料の量がきわめて限られることと併せてこのワークフローにおける重大な問題である。RNA分解は、LCM後の遺伝子発現分析、たとえば目的バイオマークーと基準遺伝子の比において、信頼できない結果をもたらす。mRNAの安定性は遺伝子特異的であり、したがって、それらは異なる程度に分解して、遺伝子発現分析のための相対定量に誤った結果をもたらす。

【0005】

このRNA分解の問題を克服するために、分解を最小限に留める種々の方法が確立された。大部分の刊行物はたとえば新鮮凍結(Fresh Frozen)(FF)組織を用い、それはRT-qPCR分析に用いた場合に分解プロセスがより少ないという利点をもつ。しかし、重大な欠点は、FF組織がFFPETと比較して大幅に限られた供給源であるという事実である(Buckanovich et al., Cancer Biol Ther. 2006 Jun; 5(6):635-42; Gjerdrum et al., Diagn Mol Pathol 2004 (13), p. 224-233)。統計的に有意な結果をもたらす試験を実施するのに十分な量のFF組織を得るのはしばしば困難である。さらに、遡及試験のため入手できる臨床試料材料は一般にFFPETである。

【0006】

したがって、この分野の主な目標は、RNA分解を最小限に抑えつつFFPETをLCMおよびRT-qPCR分析と併せて用いる手法の開発であった。染色に際してのRNA分解を最小限に抑えるために、FFPET切片の超堅ろう(ultra-fast)染色法が開発された。しかし、そのようなマイクロダイセクションされた超堅ろう染色FFPET切片からのRNAの分析は、きわめて短いインキュベーション期間(2×5分)での抗体インキュベーション後でもなお、単純な組織染色(ヘマトキシリン)と比較して約90%のRNAが分解したことを示した(Gjerdrum et al., Diagn Mol Pathol 2004 (13))。さらに、あるものは数時間ないし一夜のインキュベーションを必要とするので、超堅ろう染色プロトコルは必ずしもすべての抗体に適用できるわけではない(Brown et al., RNA Journal 200

9 (15), p. 2364-2374)。そのような長時間のインキュベーション操作は著しいRNA分解をもたらし、したがって遺伝子発現分析は事実上不可能である。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Lohmann et al., Methods. 2013 Jan; 59(1)

【非特許文献2】Buckanovich et al., Cancer Biol Ther. 2006 Jun; 5(6):635-42

【非特許文献3】Gjerdrum et al., Diagn Mol Pathol 2004 (13), p. 224-233

【非特許文献4】Brown et al., RNA Journal 2009 (15), p. 2364-2374

【発明の概要】

10

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

したがって、本発明の目的は、その後にRNA単離に用いるFFPET切片のための改良された染色法を提供し、その改良された染色法がFFPET切片から単離されたRNAのRNA分析、たとえば遺伝子発現分析に十分な収率および品質をもたらすことである。

【課題を解決するための手段】

【0009】

固体支持体に固定された組織切片に適用される本明細書に記載する染色法における0.5~3.0M塩化ナトリウムの高い塩濃度が、その後に組織切片から単離されるRNAの分解を阻止することが見出された。本発明による方法は、染色後にRNAを単離する、たとえば遺伝子発現分析のために高品質のRNAが必要とされる染色操作に適切である。

20

【0010】

したがって本発明は、ホルマリン固定され、パラフィン包埋された組織切片の免疫組織化学染色のための方法であって、a) 固体支持体を用意する工程、b) ホルマリン固定され、パラフィン包埋された組織切片を、固体支持体に固定する工程、c) ホルマリン固定され、パラフィン包埋された組織切片から、パラフィンを除去する工程、d) エピトープを賦活化するために、固体支持体に固定された組織切片を50~70℃で12~24時間加熱する工程、および、e) 固体支持体に固定された組織切片を染色する工程、を含み、その際、少なくとも工程e)を0.5~3.0M塩化ナトリウムの存在下で実施する、前記方法に関する。

30

【0011】

さらに、本発明は、本明細書に記載する方法を実施するためのキットであって、下記のものを含むキットに関する：a) ポリ-リジンでコートされた固体支持体、b) エピトープ賦活化のための溶液、および、c) 0.5~3.0Mの濃度の塩化ナトリウムを含む免疫組織化学染色のための溶液。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】図1：この図は、単離されたRNAの分光光度濃度分析の結果を示す。図示したのは、抽出物からのRNA濃度の中央値±標準偏差であり、当該抽出物は非染色FFPET切片から単離したもの（非染色）、塩化ナトリウムの非存在下でCD31で染色したFFPET切片から単離したもの（NaCl無し）、および、塩化ナトリウムの存在下でCD31で染色したFFPET切片から単離したもの（NaCl有り）である。データは3つの独立した反復試験それぞれから得られた。

40

【図2】図2：この図は、基準遺伝子Hprt（ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ）のRT-qPCR分析のCp値を示す。図示したのは、RT-qPCR実験からのCp値の中央値±標準偏差である。RNAは、非染色FFPET切片から単離されたもの（非染色）、塩化ナトリウムの非存在下でCD31で染色したFFPET切片から単離されたもの（NaCl無し）、および、塩化ナトリウムの存在下でCD31で染色したFFPET切片から単離されたもの（NaCl有り）である。データは3つの独立した反復試験それぞれから得られた。

50

【図3】図3：この図は、基準遺伝子A L A S 1（デルタ-アミノレブリネートシンターゼ1）(delta-aminolevulinate synthase 1)のR T - q P C R分析のC p値を示す。図示したのは、R T - q P C R実験からのC p値の中央値±標準偏差である。RNAは、非染色F F P E T切片から単離されたもの（非染色）、塩化ナトリウムの非存在下でC D 3 1で染色したF F P E T切片から単離されたもの（N a C 1無し）、および、塩化ナトリウムの存在下でC D 3 1で染色したF F P E T切片から単離されたもの（N a C 1有り）である。データは3つの独立した反復試験それぞれから得られた。

【図4】図4：この図は、それぞれ基準遺伝子H P R Tに対して正規化したマーカー1およびマーカー2の発現を示す。図示したのは、それぞれマイクロダイセクションした腫瘍細胞および血管細胞からのマーカー1およびマーカー2の相対遺伝子発現である。実験は二重に実施された。

10

【発明を実施するための形態】

【0013】

以下の定義は、本明細書中で用いる種々の用語の意味および範囲を説明および定義するために示される。

【0014】

用語“a”、“an”および“the”は、状況からそうでないことが示されない限り、一般に複数の指示物を含む。

【0015】

本明細書中で数値と併せて用いる用語“約”は、境界をそれらの数値の上方および下方へ拡張することによりその数値を修飾する。一般に、用語“約”は、明記した数値の上方および下方へ5%高いかまたは低い分散により数値を修飾する。たとえば、“約100”の数値は“95～105”的範囲を意味する。

20

【0016】

用語“增幅”は、一般に、ターゲット核酸からの複数の核酸分子の生成を表わし、その際、ポリメラーゼによる延長の開始部位を提供するためにプライマーをターゲット核酸分子上の特定の部位にハイブリダイズさせる。增幅は当技術分野で一般に知られているいずれかの方法、たとえば下記により実施できるが、それらに限定されない：標準P C R、ロングP C R(long PCR)、ホットスタートP C R(hot start PCR)、q P C R、R T - P C Rおよび等温增幅。

30

【0017】

本明細書中で用いる用語“抗体”は、完全な免疫グロブリン、たとえばI g A、I g D、I g E、I g GもしくはI g M、または抗体のフラグメント、たとえばF a b、F vもしくはF c、または融合抗体、融合抗体フラグメント、または抗体の他の誘導体を表わす。用語“標識抗体”は、酵素、蛍光色素、化学発光物質、ビオチン、アビジン、または放射性同位体で標識された抗体を表わす。

【0018】

用語“エピトープ”は、タンパク質、糖質または脂質などの化合物の抗原性領域を表わす。抗原性領域は、一般に5～8個のアミノ酸からなる。エピトープは、各抗体の抗原結合部位によって特異的に認識される。

40

【0019】

用語“固定された組織または細胞”は、本明細書中で、当業者に知られているものに従って用いられ、化学固定法により崩壊から保護された生体組織または細胞を表わす。そのような方法は、そのような生体組織または細胞内での自己溶解または腐敗を阻止する。固定は生化学反応を終止させ、処理された組織の機械的安定性を高める。

【0020】

用語“免疫組織化学”および“免疫組織化学的”は、ある抗原の存在を組織試料中においてその抗原に特異的に結合できる抗体で検出するための手法を表わす。抗体-抗原複合体の検出は、通常は酵素標識抗体との色素形成反応により、または蛍光標識抗体により行なわれる。

50

【0021】

本明細書中で用いる用語“マクロダイセクション(macrodissection)”は、顕微鏡スライドなどの固体支持体に固定された組織切片からメスまたはスパーテルなどの道具を用いて目的領域を掻き取る方法を表わす。

【0022】

本明細書中で用いる用語“メンブレンスライド(membrane slide)”は、レーザーキャプチャーマイクロダイセクション(LCM)に用いるための固体支持体または顕微鏡スライドを表わす。マイクロダイセクションには、メンブレンで被覆されたガラススライド、または各種メンブレンで被覆することができる金属フレームからなるフレームスライドを使用できる。メンブレンの材料は、ポリフェニレンスルフィド(PPS)、ポリエチレンナフタレート(PEN)、ポリエステル(POL)およびフルオロカーボン(FLUO)からなる群から選択できる。10

【0023】

本明細書中で用いる用語“マイクロダイセクション(microdissection)”は、組織試料から1個以上の特定の細胞または目的領域を切断および分離する方法を表わす。マイクロダイセクションは、たとえばレーザーキャプチャーマイクロダイセクション(LCM)を用いて関連領域をレーザーで切断することにより実施できる。

【0024】

用語“核酸”は、一般にDNAまたはRNAを表わし、それは増幅の生成物、合成により作成されたもの、RNAの逆転写の生成物、または天然物のいずれであってもよい。一般に、核酸は一本鎖または二本鎖の分子であり、天然ヌクレオチドから構成される。二本鎖核酸分子は3'または5'オーバーハングをもつ可能性があり、したがって、それらの全長にわたって完全に二本鎖であることは要求または想定されない。さらに、用語核酸は、非天然ヌクレオチド、および/または天然ヌクレオチドに対する修飾体から構成されてもよい。例をここに列記するが、それらに限定されない：それぞれ、ライゲーションを可能にし、またはエキソヌクレアーゼ分解/ポリメラーゼ延長の阻止を可能にする、5'または3'ヌクレオチドのリン酸化；共有結合または共有結合に近似する結合(near covalent attachment)のためのアミノ、チオール、アルキンまたはビオチニル修飾；蛍光体およびクエンチャー；分解を阻止するためのヌクレオチド間のホスホロチオエート、メチルホスホネート、ホスホロアミデートおよびホスホロチエステル結合；ならびに修飾塩基、たとえばデオキシイノシン、5'-プロモdU、デオキシリジン、2'-アミノプリン、ジデオキシシチジン、5'-メチルdC、ロックされた核酸(locked nucleic acid)(LNA)、イソ-dCおよび-dG塩基、2'-O-メチルRNA塩基、およびフッ素修飾塩基。2030

【0025】

用語“ポリ-リジン”は、数百に及ぶ反復単位を含み、組織切片などの試料と試料を固定するメンブレンスライドとの親和性を高めるのに適した分子を表わす。本発明によるポリ-リジンはポリ-L-リジンである。本発明によるポリ-L-リジンは、70から300kDaまでの分子量をもつ。ポリ-L-リジンはプロテアーゼにより消化できる。本発明における他のポリ-リジンは、たとえば、ポリ-D-リジンである。本発明におけるポリ-D-リジンは、70から300kDaまでの分子量をもつ。ポリ-D-リジンはプロテアーゼ消化に対して抵抗性である。40

【0026】

用語“qPCR”は、一般にリアルタイム定量ポリメラーゼ連鎖反応、定量ポリメラーゼ連鎖反応、またはキネティックポリメラーゼ連鎖反応として知られるPCR法を表わす。この手法は、PCRを用いてターゲット核酸を同時に増幅および定量し、その際、定量はインターラーニング性の蛍光色素、またはターゲット核酸にハイブリダイズした場合にのみ検出できる蛍光レポーター分子を含む配列特異的プローブによる。

【0027】

用語“RNA”は、当業者に知られているように本明細書中で用いられ、pre-mRNA、pre-mRNA転写物、mRNA、転写プロセシング中間体、成熟mRNA(翻50

訳に使われるもの)、および遺伝子(単数または複数)からの転写物、またはそれに由来する核酸を表わす。転写プロセシングには、スプライシング、編集(editing)、修飾、および分解などのプロセスが含まれる。mRNAを含有する試料には下記のものが含まれるが、これらに限定されない:mRNA、遺伝子(単数または複数)のmRNA転写物、mRNAから逆転写により得られるcDNA、増幅DNAから転写されたRNA、cDNAから転写されたcRNA、遺伝子から増幅されたDNAなど。

【0028】

用語“固体支持体”は、当業者に知られているように本明細書中で用いられ、組織切片を固定または付着できる表面領域をもついずれかの固体材料を表わす。支持体は、材料の組合せ、たとえばガラス上プラスチック、ガラス上カーボンなどであってもよい。特定の態様において、固体支持体は前記に定義した“メンブレンスライド”であってもよい。10

【0029】

本発明は、ホルマリン固定され、パラフィン包埋された組織切片の免疫組織化学染色のための方法であって、a) 固体支持体を用意する工程、b) ホルマリン固定され、パラフィン包埋された組織切片を、固体支持体に固定する工程、c) ホルマリン固定され、パラフィン包埋された組織切片から、パラフィンを除去する工程、d) エピトープを賦活化するために、固体支持体に固定された組織切片を50~70℃で12~24時間加熱する工程、および、e) 固体支持体に固定された組織切片を染色する工程、を含み、その際、少なくとも工程e)を0.5~3.0M塩化ナトリウムの存在下で実施する、前記方法に関する。当業者に知られているように、用語“塩化ナトリウム”と実験式“NaCl”は本明細書中で互換性をもって使用できる。1態様において、塩化ナトリウムは1.5~2.5Mの濃度で存在する。より特定の態様において、塩化ナトリウムは約1.8~2.2Mの濃度で存在する。よりさらに特定の態様において、塩化ナトリウムは約2Mの濃度で存在する。20

【0030】

実施例からも分かるように、少なくとも固体支持体に固定された組織切片を染色する工程で0.5~3.0M塩化ナトリウムの高い塩濃度を用いることにより、その後にFFPETから単離されるRNAは分解を阻止されることが見出された。したがって、本発明による0.5~3.0M塩化ナトリウムの高い塩濃度を用いる方法は、染色後にRNAを単離し、高品質のRNAを必要とする染色操作、たとえばRT-qPCR実験に適している。30

【0031】

1態様において、本方法はさらに、f) 固体支持体に固定された染色組織切片から、目的領域をダイセクションする工程、g) 目的領域からRNAを単離する工程、h) 単離されたRNAを分析する工程、を含む。1態様において、単離されたRNAの分析は、当技術分野で知られているいずれかの方法、たとえばRNAプロファイリング、RNA配列決定および遺伝子発現分析を含む。こうして、本発明による方法を用いてFFPET切片から高品質のRNAを単離することができ、その結果、基本的にいかなる後続方法も本明細書に記載するようにFFPET切片にRNA安定化法を適用することによって顕著に改良できる。40

【0032】

他の態様において、本方法はさらに、f) 固体支持体に固定された染色組織切片から、目的領域をダイセクションする工程、g) 目的領域からRNAを単離する工程、h) 単離されたRNAをcDNAに逆転写する工程、i) cDNAを増幅および定量する工程、を含む。1態様において、工程h)およびi)はワンステップ(one-step)PCRとして実施される。他の態様において、工程h)およびi)はツーステップ(two-step)PCRとして実施される。特定の態様において、cDNAを増幅および定量する工程はリアルタイムPCRにより実施される。

【0033】

1態様において、固体支持体はポリ-L-リジンでコートされる。他の態様において、

50

固体支持体はポリ - D - リジンでコートされる。特定の態様において、固体支持体は、ポリ - L - リジンまたはポリ - D - リジンの溶液を固体支持体に付与することによりポリ - L - リジンまたはポリ - D - リジンでコートされる。1 態様において、ポリ - L - リジンまたはポリ - D - リジンの溶液を付与した後に固体支持体を 15 ~ 45 分間インキュベートする。特定の態様において、ポリ - L - リジンまたはポリ - D - リジンの溶液を付与した後に固体支持体を 30 分間インキュベートする。特定の態様において、溶液は 0.05 ~ 2 % のポリ - L - リジンまたはポリ - D - リジン濃度をもつ。より特定の態様において、溶液は 0.1 % のポリ - L - リジンまたはポリ - D - リジン濃度をもつ。他の特定の態様において、ポリ - L - リジンまたはポリ - D - リジンは 70 から 300 kDa の分子量をもつ。他の特定の態様において、固体支持体はメンブレンスライドである。

10

【 0034 】

1 態様において、固体支持体は 3 - アミノプロピルトリエトキシラン (APEX) で処理される。そのようなシラン処理を実施して固体支持体の表面をアルコキシラン分子で官能化し、その結果、固体支持体上における組織切片の付着を増大させることができる。

【 0035 】

1 態様において、固体支持体に固定された、ホルマリン固定され、パラフィン包埋された組織切片は、2 ~ 10 μm の厚さをもつ。特定の態様において、固体支持体に固定された、ホルマリン固定され、パラフィン包埋された組織切片は、4 ~ 6 μm の厚さをもつ。より特定の態様において、固体支持体に固定された、ホルマリン固定され、パラフィン包埋された組織切片は、約 5 μm の厚さをもつ。

20

【 0036 】

1 態様において、パラフィンの除去は、固体支持体に固定された組織切片をキシロール中でインキュベートすることにより実施される。その後、固体支持体に固定された組織切片を一連の漸減濃度のエタノール、たとえばそれぞれ 100 %、96 % および 70 % のエタノールで数秒間、続いて水中で 2 × 1 分間、再水和する。

【 0037 】

RNA が分解するのを最大限に阻止するために、低温加熱誘導エピトープ賦活化 (low-temperature heat induced epitope retrieval) (LTHIER) プロトコルが確立された。エピトープ賦活化は、固体支持体に固定された組織切片を 60 °C で 16 時間、pH 8 において加熱した場合に最良の結果をもたらすことが見出された。1 態様において、エピトープ賦活化のための溶液中に塩化ナトリウムが 2 M の濃度で存在してもよい。

30

【 0038 】

したがって、1 態様において、固体支持体に固定された組織切片の加熱は 0.5 ~ 3.0 M 塩化ナトリウムの存在下で実施される。特定の態様において、固体支持体に固定された組織切片の加熱は 1.5 ~ 2.5 M 塩化ナトリウムの存在下で実施される。他の特定の態様において、固体支持体に固定された組織切片の加熱は 1.8 ~ 2.2 M 塩化ナトリウムの存在下で実施される。よりさらに特定の態様において、固体支持体に固定された組織切片の加熱は約 2.0 M 塩化ナトリウムの存在下で実施される。

【 0039 】

40

1 態様において、固体支持体に固定された組織切片の加熱は 50 ~ 70 °C で実施される。特定の態様において、固体支持体に固定された組織切片の加熱は 55 ~ 65 °C で実施される。他の特定の態様において、固体支持体に固定された組織切片の加熱は 58 ~ 62 °C で実施される。よりさらに特定の態様において、固体支持体に封入された組織切片の加熱は約 60 °C で実施される。

【 0040 】

1 態様において、固体支持体に固定された組織切片の加熱は 12 ~ 24 時間実施される。特定の態様において、固体支持体に固定された組織切片の加熱は 14 ~ 18 時間実施される。より特定の態様において、固体支持体に固定された組織切片の加熱は 15 ~ 17 時間実施される。よりさらに特定の態様において、固体支持体に固定された組織切片の加熱

50

は約 16 時間実施される。

【0041】

1 態様において、固体支持体に固定された組織切片の加熱は pH 5 ~ 9 で実施される。特定の態様において、固体支持体に固定された組織切片の加熱は pH 7 . 5 ~ 8 . 5 で実施される。より特定の態様において、固体支持体に固定された組織切片の加熱は pH 7 . 8 ~ 8 . 2 で実施される。特定の態様において、固体支持体に固定された組織切片の加熱は約 8 の pH 値で実施される。

【0042】

特定の態様において、固体支持体に固定された組織切片の加熱は、約 60 で約 16 時間、約 8 の pH 値において実施される。1 慎様において、塩化ナトリウムはエピトープ賦活化のための溶液中に 2 M の濃度で存在することができる。10

【0043】

加熱工程の後、固体支持体に固定された組織切片を、0 . 5 ~ 3 . 0 M の濃度の塩化ナトリウムを含む緩衝液中で冷却する。特定の態様において、緩衝液は TBS - T である。他の特定の態様において、塩化ナトリウムは約 2 M の濃度で存在する。

【0044】

1 慎様において、固体支持体に固定された組織切片の染色は抗体ベースの染色を含む。特定の態様において、抗体ベースの染色は一次抗体および二次抗体の使用を含む。より特定の態様において、一次抗体は CD31 結合抗体である。よりさらに特定の態様において、一次抗体は CD31 モノクローナル抗体 (mAb) クローン JC70 である。特定の態様において、二次抗体は抗マウス抗体である。より特定の態様において、二次抗体は基質を 1 種類以上の生成物に変換できる酵素に共有結合している。よりさらに特定の態様において、二次抗体は西洋わさびペルオキシダーゼ (HRP) に共有結合している。20

【0045】

固体支持体に固定された組織切片を一次抗体と共に 37 で 1 時間インキュベートし、その際、塩化ナトリウムが 2 M の濃度で存在する場合に、抗体ベースの染色は最良の結果をもたらすことが見出された。1 慎様において、固体支持体に固定された組織切片と一次抗体とのインキュベーションは、34 ~ 40 で実施される。1 慎様において、固体支持体に固定された組織切片と一次抗体とのインキュベーションは、0 . 5 ~ 1 . 5 時間実施される。1 慎様において、固体支持体に固定された組織切片と一次抗体とのインキュベーションは、0 . 5 ~ 3 . 0 M 塩化ナトリウムの存在下で実施される。特定の態様において、固体支持体に固定された組織切片と一次抗体とのインキュベーションは、約 37 で実施される。他の特定の態様において、固体支持体に固定された組織切片と一次抗体とのインキュベーションは、約 1 時間実施される。さらに他の特定の態様において、固体支持体に固定された組織切片と一次抗体とのインキュベーションは、約 2 . 0 M 塩化ナトリウムの存在下で実施される。より特定の態様において、固体支持体に固定された組織切片と一次抗体とのインキュベーションは、約 37 で約 1 時間実施され、その際、塩化ナトリウムが約 2 M の濃度で存在する。30

【0046】

二次抗体とのインキュベーションは、室温で 2 時間、恒湿チャンバー (humidity chamber) 内で実施され、その際、塩化ナトリウムは 2 M の濃度で存在した。1 慎様において、固体支持体に固定された組織切片と二次抗体とのインキュベーションは、16 ~ 24 で実施される。1 慎様において、固体支持体に固定された組織切片と二次抗体とのインキュベーションは、1 . 5 ~ 2 . 5 時間実施される。1 慎様において、固体支持体に固定された組織切片と二次抗体とのインキュベーションは、0 . 5 ~ 3 . 0 M 塩化ナトリウムの存在下で実施される。特定の態様において、固体支持体に固定された組織切片と二次抗体とのインキュベーションは、約 20 で実施される。他の特定の態様において、固体支持体に固定された組織切片と二次抗体とのインキュベーションは、約 2 時間実施される。さらに他の特定の態様において、固体支持体に固定された組織切片と二次抗体とのインキュベーションは、約 2 . 0 M 塩化ナトリウムの存在下で実施される。より特定の態様において、40

固体支持体に固定された組織切片と二次抗体とのインキュベーションは、約 20 分で約 2 時間実施され、その際、塩化ナトリウムが約 2 M の濃度で存在する。

【 0 0 4 7 】

1 態様において、固体支持体に固定された組織切片の染色は、さらに二次抗体に共有結合した酵素により触媒される酵素・基質反応を含む。したがって、特定の態様において、染色は標識抗体の使用を含む。酵素は、ペルオキシダーゼおよびアルカリホスファターゼからなる群から選択できる。ペルオキシダーゼ、たとえば H R P は、3 , 3' - ジアミノベンジジン (D A B) 、3 - アミノ - 9 - エチルカルバゾール (A E C) 、4 - クロル - 1 - ナフトール (C N) および p - フェニレンジアミン二塩酸塩からなる群から選択される基質を変換できる。アルカリホスファターゼは、リン酸ナフトール a s - m x 、ヘキサゾ化 (hexazotizing) トリアミノ - トリトリル - メタンクロリド、リン酸ナフトール A S - B I 、リン酸ナフトール A S - T R 、5 - ブロモ - 4 - クロル - 3 - インドキシリホスフェート (B C I P) 、ニトロブルー - テトラゾリウム (N B T) 、ヨードニトロテトラゾリウム - バイオレット (I N T) 、ファストレッド (Fast Red) T R 、ファストレッド L B 、ファストブルー (Fast Blue) B B およびファストガーネット (Fast Garnet) G B C からなる群から選択される基質を変換できる。
10

【 0 0 4 8 】

特定の態様において、基質を変換できる酵素は H R P である。特定の態様において、 H R P により変換される基質は D A B である。1 態様において、 D A B 染色は 0 . 5 ~ 3 . 0 M 塩化ナトリウムの存在下で実施される。特定の態様において、塩化ナトリウムは約 2 M の濃度で存在する。1 態様において、 D A B 染色は 5 ~ 20 分間、室温で実施された。
20 特定の態様において、 D A B 染色は約 10 分間、室温で実施された。

【 0 0 4 9 】

1 態様において、固体支持体はメンブレンスライドである。特定の態様において、固体支持体は L C M に適したメンブレンスライドである。特定の態様において、メンブレンスライドはポリエチレンナフタレートメンブレンスライドである。市販のメンブレンスライド、たとえばポリエチレンナフタレートメンブレンスライドは本発明による方法に適さないことが示された。市販のメンブレンスライドは、コートされたメンブレンスライドに固定された組織切片をエピトープ賦活化のために加熱する工程に際して、 F F P E T 切片に対する十分な付着が得られない。加熱工程中のメンブレンスライドと F F P E T 切片の付着を改善するために、メンブレンスライドをポリ - L - リジンでコートした；これにより、 F F P E T 切片がメンブレンスライドに安定に付着するほどにメンブレンスライドと F F P E T 切片の付着が増大した。
30

【 0 0 5 0 】

1 態様において、固体支持体に固定された染色組織切片から目的領域をダイセクションする工程は、目的領域をマイクロダイセクションまたはマクロダイセクションすることを含む。特定の態様において、マイクロダイセクションする工程は、組織試料から 1 個以上の特定の細胞または目的領域を切断および分離するプロセスを含む。マイクロダイセクションは、たとえばレーザーキャプチャーマイクロダイセクション (L C M) を用いて関連領域をレーザーで切断することにより実施できる。特定の態様において、マクロダイセクションする工程は、顕微鏡スライドなどの固体支持体に固定された組織切片からメスまたはスパーテルなどの道具を用いて目的領域を掻き取るプロセスを含む。
40

【 0 0 5 1 】

本発明による方法において、メンブレンスライドに付着した染色 F F P E T 切片に L C M を用いて、目的領域を組織切片から切断した。目的領域をその後に R N A 単離に用いた。1 態様において、目的領域は 0 . 5 ~ 5 mm² のサイズをもつ。特定の態様において、目的領域は 1 ~ 2 mm² のサイズをもつ。R N A は、当技術分野で周知の方法を用いて、たとえば High Pure F F P E T R N A I s o l a t i o n K i t (登録商標) (Roche Diagnostics GmbH) を用いて、目的領域から単離された。単離された R N A はその後、 c D N A を得るために逆転写された。c D N A の量
50

が限られているので、qPCR実験に十分な核酸を得るために、qPCRによる増幅の前にcDNAについてプレアンプリフィケーション工程を実施することができる。したがって、1態様において、本発明による方法はさらに、f)コートされたメンブレンスライドに固定された染色組織切片から、目的領域をマイクロダイセクションする工程、g)目的領域からRNAを単離する工程、h)単離されたRNAをcDNAに逆転写する工程、i)cDNAをプレアンプリフィケーションする工程、および、j)プレアンプリフィケーションされたcDNAを増幅および定量する工程、を含む。特定の態様において、cDNAを増幅および定量する工程はリアルタイムPCRにより実施される。

【0052】

特定の態様において、本発明は、ホルマリン固定され、パラフィン包埋された組織切片の免疫組織化学染色のための方法であって、a)ポリ-L-リジンでコートされたメンブレンスライドを用意する工程、b)ホルマリン固定され、パラフィン包埋された組織切片を、メンブレンスライドに固定する工程、c)固体支持体に固定された組織切片をキシロール中でインキュベートすることにより、ホルマリン固定され、パラフィン包埋された組織切片から、パラフィンを除去する工程、d)エピトープを賦活化するために、メンブレンスライドに固定された組織切片を約60度約16時間加熱する工程、および、e)メンブレンスライドに固定された染色組織切片から、1~2mm²のサイズをもつ目的領域をマイクロダイセクションする工程、g)目的領域からRNAを単離する工程、h)単離されたRNAをcDNAに逆転写する工程、i)cDNAを増幅および定量する工程、を含み、その際、少なくとも工程e)を約2M塩化ナトリウムの存在下で実施し、cDNAを増幅および定量する工程をリアルタイムPCRにより実施する、前記方法に関する。 10

【0053】

本発明は、さらに前記方法を実施するためのキットに関する。したがって、本発明はさらに、ホルマリン固定され、パラフィン包埋された組織切片の免疫組織化学染色のための下記の工程を含む方法を実施するためのキットに関する：a)固体支持体を用意する工程、b)ホルマリン固定され、パラフィン包埋された組織切片を、固体支持体に固定する工程、c)ホルマリン固定され、パラフィン包埋された組織切片から、パラフィンを除去する工程、d)エピトープを賦活化するために、固体支持体に固定された組織切片を50~70度12~24時間加熱する工程、および、e)固体支持体に固定された組織切片を染色する工程、を含み、その際、少なくとも工程e)を0.5~3.0M塩化ナトリウムの存在下で実施する。1態様において、塩化ナトリウムは1.5~2.5Mの濃度で存在する。より特定の態様において、塩化ナトリウムは約1.8~2.2Mの濃度で存在する。よりさらに特定の態様において、塩化ナトリウムは約2Mの濃度で存在する。 30

【0054】

1態様において、上記のキットにより実施される方法はさらに下記の工程を含む：f)固体支持体に固定された染色組織切片から、目的領域をダイセクションする工程、g)目的領域からRNAを単離する工程、h)単離されたRNAをcDNAに逆転写する工程、i)cDNAを増幅および定量する工程。1態様において、工程h)およびi)は1工程PCRとして実施される。他の態様において、工程h)およびi)は2工程PCRとして実施される。特定の態様において、cDNAを増幅および定量する工程はリアルタイムPCRにより実施される。 40

【0055】

1態様において、本発明による方法を実施するためのキットは下記のものを含む：a)固体支持体、b)エピトープ賦活化のための溶液、およびc)0.5~3.0Mの濃度の塩化ナトリウムを含む免疫組織化学染色のための溶液。他の態様において、本発明による方法を実施するためのキットは下記のものを含む：a)ポリ-L-リジンでコートされたメンブレンスライド、b)エピトープ賦活化のための溶液、およびc)0.5~3.0Mの濃度の塩化ナトリウムを含む免疫組織化学染色のための溶液。特定の態様において、キットはさらに、RNAからcDNAへの逆転写ならびにcDNAの増幅および定量を実施する 50

のに必要なすべての試薬を含む。他の特定の態様において、キットは、RNAからcDNAへの逆転写を実施し、cDNAをプレアンプリフィケーションし、プレアンプリフィケーションされたcDNAを増幅および定量するのに必要な、すべての試薬を含む。

【0056】

以下の実施例1～3は本発明の理解を補助するために提示され、本発明の真の範囲は特許請求の範囲に記載されている。記載した操作を本発明の精神から逸脱することなく改変できることは理解される。

【実施例】

【0057】

実施例1

10

ポリ-L-リジンによるメンブレンスライドのコーティング

PENメンブレンスライド(MicroDisssect GmbH)を約1mlのポリ-L-リジン溶液(0.1% w/v, Sigma-Aldrich Chemie GmbH)で被覆し、恒温チャンバー内で室温において30分間インキュベートした。強力な振とうによりポリ-L-リジン溶液を除去した。その後、PENメンブレンスライドをUV光下で一夜乾燥させた。

【0058】

観察結果(図示していない)：

ポリ-L-リジンによるPENメンブレンスライドのコーティングにより、低温加熱誘導エピトープ賦活化(LT-HIER, 60, 16時間, pH8)に適用した際のメンブレンスライドへの組織切片の付着が増大した。ポリ-L-リジンでコートされたメンブレンスライド：3つの組織切片のうちスライドから離脱したのは0であった。ポリ-L-リジン無しのメンブレンスライド：3つの組織切片のうち3つがスライドから離脱した。

20

【0059】

実施例2

2M塩化ナトリウム有り/無しCD31染色

腫瘍試料のFFPET切片を、抗体ベースの染色およびその後のRNA単離に用いた。以下の記載はFFPET切片を染色するために2M塩化ナトリウムの存在下で実施した操作のみを述べる。塩化ナトリウム無しの実験については、下記の点が異なる全く同じ操作を実施した：1)染色操作に塩化ナトリウムを用いなかった、2)二次抗体とのインキュベーションを30分間実施した(2M塩化ナトリウムを用いた場合の2時間の代わりに)。高い塩濃度は、二次抗体の結合効率が低いためインキュベーション時間の延長を必要とした。

30

【0060】

5μmのFFPET切片をポリ-L-リジンコートされたPENメンブレンスライドに付着させ、ダストフリー環境で一夜乾燥させた。その後、FFPET切片を3%H₂O₂(ApplicChem GmbH)中で5分間インキュベートした。次いでFFPET切片をPCRグレードH₂O中で2分間洗浄した。切片のインキュベーションを60で16時間、エピトープ賦活化溶液(Leica Microsystems GmbH)中で実施した。その後、EnVision(商標)抗マウス抗体(DAKO GmbH)を含むCD31染色を実施した。塩化ナトリウム(分子生物学グレード, Sigma-Aldrich Chemie GmbH)を、すべての染色試薬に溶解した(Protein Block無血清(DAKO GmbH)、一次および二次抗体、DAB色原体(Thermo Fisher Scientific GmbH)、ならびにTris緩衝化生理食塩水およびTween 20(TBS-T)洗浄用緩衝液)。塩化ナトリウムの最終濃度は約2Mであった。切片をTBS-T/塩化ナトリウム中で室温に5分間冷却した。切片を恒温チャンバー内で5分間、100μlのprotein block/塩化ナトリウムと共にインキュベートした。その後、切片から液体を振り落とし、100μlの一次抗体/塩化ナトリウムを添加し、パラフィルムで覆い、37で1時間インキュベートした。切片をTBS-T/塩化ナトリウムで2×2分間洗浄した後、100μl

40

50

の二次抗体 / 塩化ナトリウムを添加し、恒温チャンバー内で室温において2時間インキュベートした。TBS-T / 塩化ナトリウムで2×2分間洗浄した後、100μlのDAB色原体 / 塩化ナトリウムを添加し、恒温チャンバー内で室温において5~10分間インキュベートした。切片をTBS-T / 塩化ナトリウムで2分間洗浄した。その後、切片をH₂O (PCRグレード)で2分間洗浄した。染色された切片をダイセクションし、全RNAを単離した(High Pure Paraffin RNA Kit, Roche Diagnostics GmbH)。RNA濃度を分光光度分析(NanoDrop ND 1000分光光度計)により測定した。当技術分野で周知の方法によりRNAをcDNAに転写した。cDNAをプレアンプリフィケーションした。その後、リアルタイムPCR(LightCycler(登録商標)Platform)により増幅を実施した。

。

【0061】**観察結果 :**

塩化ナトリウム無しのCD31染色切片のRNA濃度は、非染色切片と比較して有意に低い。塩化ナトリウム有りのCD31染色FFPET切片のRNA濃度は、非染色切片のものと有意差がない(図1を参照)。

【0062】

塩化ナトリウム無しのCD31染色切片のCp値(基準遺伝子Hprt)は、非染色切片と比較して有意に高い。塩化ナトリウム有りのCD31染色FFPET切片のCp値は、非染色切片のものと有意差がない(図2を参照)。

20

【0063】

塩化ナトリウム無しのCD31染色切片のCp値(基準遺伝子Alas1)は、非染色切片と比較して有意に高い。塩化ナトリウム有りのCD31染色FFPET切片のCp値は、非染色切片のものと有意差がない(図3を参照)。

【0064】**実施例3****CD31染色されたFFPET切片からの2種類のマーカーの遺伝子発現分析**

この例は、CD31染色されたFFPET切片から単離されたRNAの、遺伝子発現実験についての記載に従った方法との適性を示す。実施例2に記載した方法を、3つの独立した腫瘍試料からのFFPET切片に適用した。試料をメンブレンスライドに固定した。目的領域(腫瘍および血管)を連続レーザーキャプチャーマイクロダイセクションによりマイクロダイセクションした。それぞれ腫瘍ダイセクション物および血管ダイセクション物における2種類の異なるマーカー(マーカー1およびマーカー2)の発現に関するデータを、単離されたRNAの分析によって得た。実験を二重に実施した。当技術分野で周知の方法を用いてRNAをcDNAに転写した。十分な出発物質を得るために、また感度を高めるために、cDNAをプレアンプリフィケーションした。プレアンプリフィケーションしたcDNAを、最後にリアルタイムPCRを用いて二重に分析した。マーカー1およびマーカー2の発現をそれぞれ基準遺伝子Hprtに対して正規化することにより、マーカー1およびマーカー2の相対発現を求めた。

30

【0065】**観察結果 :**

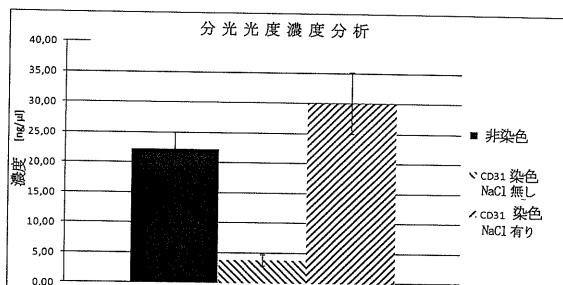
図4は、非染色腫瘍試料について実施した先の実験(データを示していない)と一致した、3つの独立したCD31染色腫瘍試料から得られたマーカー1およびマーカー2の相対発現のパターンに関するデータを示す。図4A)は、マーカー1が血管細胞と比較して腫瘍細胞においてより高度に発現することを示す。さらに、図4B)は、マーカー2が腫瘍細胞と比較して血管細胞においてより高度に発現することを示す。この場合、腫瘍細胞における発現は血管細胞と比較して発現を検出できないほどきわめて低い(検出されず=n.d.)。非染色腫瘍試料の分析(データを示していない)は再現できたので、本発明による染色方法は、結果に影響を及ぼすほどRNAの品質に有意に影響することはない結論できる。結果的に、本発明による方法を用いるとRNA分解を最小限に抑えることが

40

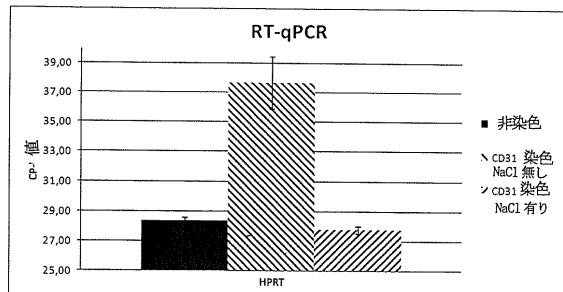
50

でき、したがって F F P E T 試料からの R N A の品質は遺伝子発現分析または R N A 分析のための他のいずれの方法にも十分である。

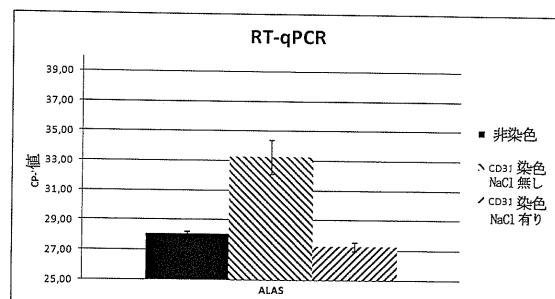
【図 1】



【図 2】

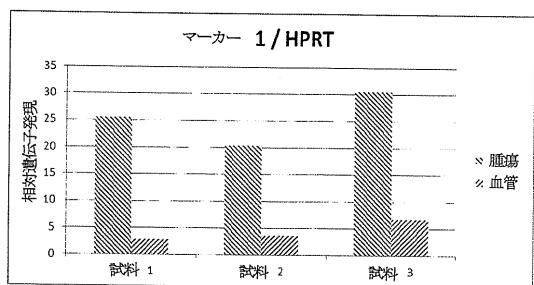


【図 3】

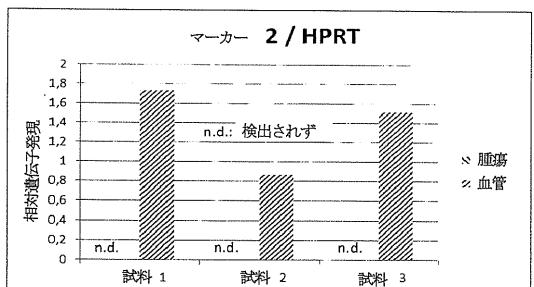


【図4】

A)



B)



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		
C 12 M	1/34	(2006.01)	G 01 N	1/30
C 12 M	1/26	(2006.01)	C 12 Q	1/68
			C 12 M	1/34
			C 12 M	1/34
			C 12 M	1/26

- (72)発明者 バーレ , ベアトリクス
ドイツ国 8 2 3 8 6 オーバーハウゼン , ヴァルトシュトラーセ 5 3
- (72)発明者 ヘロルト , アンドレア
ドイツ国 8 2 4 1 8 ムルナウ , アム・オック 1
- (72)発明者 ローマン , サビーネ
ドイツ国 8 2 3 7 7 ペンツベルク , プリメルシュトラーセ 1
- (72)発明者 モースマン , サビーネ
ドイツ国 8 3 6 7 1 ベネディクトボイアーン , コッヘラー・シュトラーセ 1 6
- (72)発明者 シュスター , ユリアン
ドイツ国 8 2 3 7 7 ペンツベルク , パーンホーフシュトラーセ 8
- (72)発明者 ジンガー , モニカ
ドイツ国 8 2 3 1 9 シュタルンベルク , アイベンヴェーク 7

審査官 草川 貴史

- (56)参考文献 特開2002-350430 (JP, A)
特表2006-519376 (JP, A)
国際公開第2009/078386 (WO, A1)
特表2014-518625 (JP, A)
特開2004-201525 (JP, A)
特表2006-511462 (JP, A)
Ramos-Vara JA, Technical aspects of immunohistochemistry., Vet Pathol., 2005年 7月, Vol.42, No.4, Page.405-426
Theophile Katharina et.al., Amplification of mRNA From Laser-microdissected Single or Clusterd Cells in Formalin-fixed and Paraffin-embedded Tissues for Application in Quantitative Real-time PCR , Diagnostic Molecular Pathology , 2008年, Vol.17, No.2, Page .101-106
SUZUKI, Y. et al., "RNA isolation from siliques, dry seeds, and other tissues of Arabidopsis thaliana.", BIOTECHNIQUES , 2004年10月, Vol.37, No.4, P.542,544
加藤良一、外3名, 「生物教育教材としてのDNAの抽出」, 山形大学教養・教育実践研究 , 2006年 , Vol.1 , P.39-42

- (58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)
G 01 N 33 / 48 - 33 / 98