

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19365

研究課題名（和文）分子病理学の新領域を拓くパラフィン切片プロテオタイピングによる病理診断

研究課題名（英文）Pathological diagnosis by paraffin section proteotyping that opens up a new field of molecular pathology

研究代表者

内田 康雄（Uchida, Yasuo）

東北大学・薬学研究科・准教授

研究者番号：70583590

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：パラフィン切片内の病変部位をレーザーマイクロダイセクションによって採取し、PCT法によってタンパク質抽出とトリプシン消化を促進し、SWATH法による高精度かつ網羅的な質量分析測定およびデータ解析における *in silico* ペプチド選択を組み合わせることによって、パラフィン切片内の目的の部位・細胞における病態分子機構を定量的に解明できる手法を構築した。脳アミロイド血管症の組織切片にこの方法「プロテオタイピング」を適用することによって、ヒトの脳疾患において新規の分子機構をタンパク質レベルで探索・解明するうえで有効な方法であることが実証された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質の“定量”は診断などの様々な臨床的な目的に欠かせない手法である。しかし、日常的な病理診断に利用されているFFPE組織に対して有用な定量法は確立されておらず、挑戦的な課題とされてきた。本研究によって、FFPE検体で利用可能な、高精度かつ網羅的なタンパク質量定技術が開発された。細胞内分子ネットワークでのあらゆる分子・カスケードの活性化状態を定量的に評価する診断基盤が確立し、最も活性化している責任分子・カスケードの同定が可能になり、患者毎に最適化された治療が実現できる。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to realize a new pathological diagnosis called 'proteotyping' with high accuracy using paraffin tissue. We successfully developed a new method to quantitatively elucidate the pathological molecular mechanisms in the tissue regions or cells of interest in paraffin sections, by combining the laser microdissection, facilitated protein extraction and trypsin digestion by the PCT method, accurate and comprehensive mass spectrometry measurements by the SWATH method, and *in silico* peptide selection in data analysis. The application of this method to tissue sections of cerebral amyloid angiopathy has demonstrated that it is an effective method for exploring and elucidating novel molecular mechanisms in human brain diseases at the protein level.

研究分野：臨床プロテオミクス

キーワード：プロテオタイピング パラフィン切片 病理診断 分子病理学 レーザーマイクロダイセクション

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

生体組織における病態分子機構の解明やバイオマーカー開発において、標的定量プロテオミクスが有用な技術であるという認識が定着しつつある。しかし、十分な例数の凍結組織を用いた研究は未だ難しい。また少数の標的タンパク質に限定した解析であることから、得られる情報量に限界であった。これを解決するためには、パラフィン組織（ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE: Formalin-Fixed Paraffin-Embedded) 切片）を用いたタンパク質発現の網羅的定量法が必要であるが、従来法は再現性が極めて悪かった。

FFPE 切片の従来からの主要な用途である免疫組織化学は、特定の数分子のみの発現や局在などの定性的情報しか得られないが、LC-MS/MS を用いた網羅的定量プロテオミクスにこれを応用できれば、数百から数千種類のタンパク質の病態時のタンパク質発現量変化を網羅的に定量できる。しかし、ホルマリン固定によって FFPE 切片中のタンパク質間に形成されるメチレン架橋によって、タンパク質抽出及び酵素消化の効率が低下することが知られている。ゆえに、これまでこれを効率的に解消できずボトルネックとなり、高精度な FFPE プロテオミクス定量系は確立されなかったと考えられる。

病理診断において、切片上で染色された特定の部位・細胞においてどのような病態分子機構が生じているかを定量的かつ網羅的に診断できることは、分子病理学の新領域を拓くことが期待される。

## 2. 研究の目的

本研究では、パラフィン組織を用いた高精度な「プロテオタイピング」という新たな病理診断を実現することを目標とした。パラフィン切片で染色される病変部位においてどのような分子機構が起きているかを定量的に解明することが重要であることから、レーザーマイクロダイセクションを併用し、病変部位における分子機構を定量的に解明できる手法を開発し、ヒト組織検体を用いてこの手法の有用性を実証することを目的とした。

## 3. 研究の方法

レーザーマイクロダイセクション (LMD) によって、切片上から、目的部位のみを回収した。ホルマリン架橋の除去、蛋白抽出、トリプシン消化を完全に進行させるため、超高压と常圧を交互に与える Pressure Cycling Technology (PCT) を適用した。

FFPE プロテオミクスにおける再現性と網羅性の低さを解決するため、約 2 万種の生体タンパク質のうち数千~1 万種類(従来法の 5~10 倍)の蛋白質発現の一斉かつ高精度 (CV 値 < 15%) 定量を可能にする SWATH 測定と高精度定量ペプチド選択法を適用した。

構築した LMD-FFPE-PCT-SWATH 法をヒト組織検体に適用し、病態分子機構解明に有用であることを実証した。

## 4. 研究成果

これまでの検討によって、パラフィン切片を用いた網羅的定量プロテオミクスの手法を開発してきた。超高压と常圧を交互に与える(1)Pressure Cycling Technology (PCT)によってホルマリン架橋の除去、蛋白抽出、トリプシン消化を完全に進行させることができ、数千種類の蛋白質発現の一斉かつ高精度定量を可能にする(2)SWATH 測定と(3)高精度定量ペプチド選択法を用い、再現性と網羅性の低さを解決してきた。

本計画では、まず、レーザーマイクロダイセクションを用いて、パラフィン切片から、病変部位とそうでない部位を区別して採取し、開発したプロテオミクス手法を適用することによって、病態分子機構を解明できると及びレーザーマイクロダイセクションを組み合わせた技術の有用性を実証した。具体的には、肝障害マウスの肝臓のパラフィン切片を用いて、障害部位をレーザーマイクロダイセクションで採取し、従来の抗体を用いたタンパク質発現と独自のプロテオミクス法に基づく発現の定量結果を比較した結果、良好かつ網羅的に病変部位の分子機構をとらえることができることが実証された。

ヒト組織に適用して、ヒトの病態分子機構に有効であるか否かを検証した (Handa et al., Fluids Barriers CNS. 2022;19(1):56)。脳アミロイド血管症 (CAA) は、脳内の血管壁にアミロイドベータ (A $\beta$ ) が蓄積する病変であり、アルツハイマー病 (AD) の 80~90% の患者で認められる。脳出血を招くため、致死のリスクが高い。軽度の脳梗塞や小出血は頻発し、これによって認知症を加速させる。予防的に降圧薬が臨床使用されているが、根本的な治療薬は存在しない。CAA と診断されていない AD 患者においても、血管炎・出血・梗塞などの脳血管病変がしばしば合併するが、この合併によって認知症の症状が 20 倍以上に増悪する。CAA・AD 治療において脳血管の分子機構を正常化する戦略は、認知症疾患の新たな創薬フィールドを創出できる点で意義がある。

CAA に特異的な分子機構について、皮質 A $\beta$  血管沈着を伴う AD 患者 (ADNC+/CAA+) と、A $\beta$  血管沈着を伴わない AD 患者 (ADNC+/CAA-) からホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 切片を作成した。大脳皮質血管を、Laser Microdissection (LMD) を用いて、FFPE 切片から採取し、Pressure cycling Technology (PCT) で処理し、SWATH (sequential window acquisition of all theoretical fragment ion spectra) プロテオミクスを適用した。ADNC+/CAA+/H ドナー (毛細血管に A $\beta$  が高濃度に存在する ADNC+/CAA+ ドナー) の 17 タンパク質の発現量は、ADNC+/CAA- および ADNC-/CAA- ドナーのそれと比較して有意に異なっていた。さらに、ADNC+/CAA+ と ADNC-/CAA- のドナー間で平均発現量に 1.5 倍以上の差を示し、A $\beta$  または Collagen alpha-2(VI) chain (COL6A2) のレベル (CAA マーカー) と有意に相関する 56 個のタンパク質を 11 人のドナー (ADNC+/CAA+ 6 人と ADNC-/CAA- 5 人) で特定した。56 種類のタンパク質のうち 70% 以上が ADNC+/CAA+ に特異的なタンパク質発現の変化を示した。脳実質との比較解析では、56 個のタンパク質のうち 90% 以上が血管に特異的な病的変化であることが示された。文献に基づくパスウェイ解析では、42 個のタンパク質が線維化、酸化ストレス、アポトーシスに関連していることが示された (図 1)。また、HSP 90- $\alpha$ 、CD44、Carbonic anhydrase 1 の発現が増加しており、これらは CAA に対する薬剤の標的であった (図 1)。LMD を用いた FFPE 切片からの血管の分離、PCT を用いたサンプル処理、SWATH 解析の組み合わせ (FFPE-LMD-PCT-SWATH 法) によって、ADNC+/CAA+ (CAA 患者) の血管における線維化、ROS 生成、細胞死に關与する多くのタンパク質の発現変化が初めて明らかとなった (図 1)。これまでに CAA 治療に有効と報告されてきた薬剤がなぜ CAA に有効であったかについては詳細は不明であったが、本研究によって、それら薬剤の標的タンパク質が顕著に発現上昇していたことから、それら薬剤が CAA に有効である理由が説明できた (図 1) (Handa et al., Fluids Barriers CNS. 2022;19(1):56)。

以上のことから、構築した LMD-FFPE-PCT-SWATH 法は、パラフィン切片内の分子機構を定量的に解明するうえで有用であり、ヒトの脳疾患において新規の分子機構をタンパク質レベルで探索・解明するうえで有効な方法であることが実証された (Handa et al., Fluids Barriers CNS. 2022;19(1):56)。

## CAA患者の脳血管の定量的パスウェイマップ

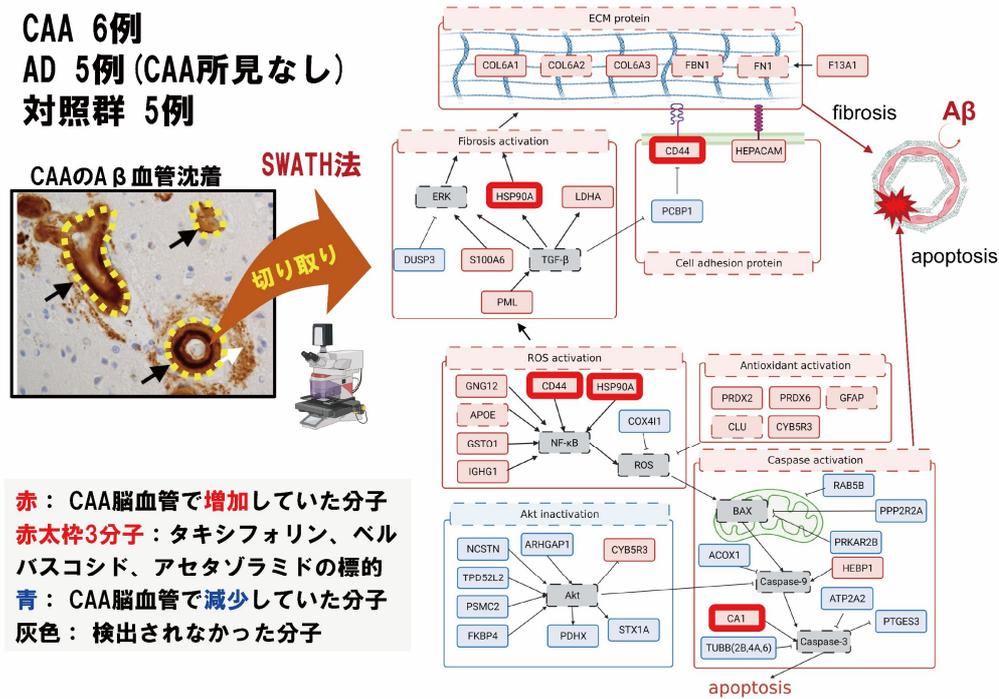


図 1 本研究で明らかにした、CAA の脳血管における病態分子機構 (Handa et al., Fluids Barriers CNS. 2022;19(1):56)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Tezuka K, Suzuki M, Sato R, Kawarada S, Terasaki T, Uchida Y	4. 巻 160(6)
2. 論文標題 Activation of Annexin A2 signaling at the blood-brain barrier in a mouse model of multiple sclerosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Neurochem	6. 最初と最後の頁 662-674
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jnc.15578	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sato R, Ohmori K, Umetsu M, Takao M, Tano M, Grant G, Porter B, Bet A, Terasaki T, Uchida Y	4. 巻 13(12)
2. 論文標題 An Atlas of the Quantitative Protein Expression of Anti- Epileptic-Drug Transporters, Metabolizing Enzymes and Tight Junctions at the Blood-Brain Barrier in Epileptic Patients	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 2122
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pharmaceutics13122122	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Huttunen Kristiina M., Terasaki Tetsuya, Urtti Arto, Montaser Ahmed B., Uchida Yasuo	4. 巻 39
2. 論文標題 Pharmacoproteomics of Brain Barrier Transporters and Substrate Design for the Brain Targeted Drug Delivery	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pharmaceutical Research	6. 最初と最後の頁 1363 ~ 1392
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11095-022-03193-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Hirano S, Goto R, Uchida Y	4. 巻 10(2)
2. 論文標題 SWATH-Based Comprehensive Determination of the Localization of Apical and Basolateral Membrane Proteins Using Mouse Liver as a Model Tissue	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 383
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biomedicines10020383	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Uchida Yasuo, Takeuchi Hina, Goto Ryohei, Braun Clemens, Fuchs Holger, Ishiguro Naoki, Takao Masaki, Tano Mitsutoshi, Terasaki Tetsuya	4. 巻 161
2. 論文標題 A human blood-arachnoid barrier atlas of transporters, receptors, enzymes, and tight junction and marker proteins: Comparison with dog and pig in absolute abundance	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Neurochemistry	6. 最初と最後の頁 187 ~ 208
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jnc.15599	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Takeuchi Hina, Suzuki Masayoshi, Goto Ryohei, Tezuka Kenta, Fuchs Holger, Ishiguro Naoki, Terasaki Tetsuya, Braun Clemens, Uchida Yasuo	4. 巻 39
2. 論文標題 Regional Differences in the Absolute Abundance of Transporters, Receptors and Tight Junction Molecules at the Blood-Arachnoid Barrier and Blood-Spinal Cord Barrier among Cervical, Thoracic and Lumbar Spines in Dogs	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pharmaceutical Research	6. 最初と最後の頁 1393 ~ 1413
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11095-022-03275-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Suzuki Masayoshi, Tezuka Kenta, Handa Takumi, Sato Risa, Takeuchi Hina, Takao Masaki, Tano Mitsutoshi, Uchida Yasuo	4. 巻 42
2. 論文標題 Upregulation of ribosome complexes at the blood-brain barrier in Alzheimer's disease patients	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism	6. 最初と最後の頁 2134 ~ 2150
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0271678X221111602	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Handa Takumi, Sasaki Hayate, Takao Masaki, Tano Mitsutoshi, Uchida Yasuo	4. 巻 19
2. 論文標題 Proteomics-based investigation of cerebrovascular molecular mechanisms in cerebral amyloid angiopathy by the FFPE-LMD-PCT-SWATH method	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Fluids and Barriers of the CNS	6. 最初と最後の頁 56
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12987-022-00351-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Dehouck Marie-Pierre, Tachikawa Masanori, Hoshi Yutaro, Omori Kotaro, Maurage Claude-Alain, Strecker Guillaume, Dehouck Lucie, Boucau Marie-Christine, Uchida Yasuo, Gosselet Fabien, Terasaki Tetsuya, Karamanos Yannis	4. 巻 11
2. 論文標題 Quantitative Targeted Absolute Proteomics for Better Characterization of an In Vitro Human Blood Brain Barrier Model Derived from Hematopoietic Stem Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 3963 ~ 3963
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells11243963	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 内田 康雄, 平野 誠巳, 寺崎 哲也
2. 発表標題 亜鉛輸送をはじめとする肝臓トランスポーター群のタンパク質絶対発現量と局在の網羅的解明
3. 学会等名 生命金属科学 夏の合宿
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平良怜雅、平野誠巳、池田千絵美、田野光敏、高尾昌樹、寺崎哲也、内田康雄
2. 発表標題 quantitative Global Absolute Proteomics (qGAP) 法を用いたヒト脳毛細血管内皮細胞株 (hCMEC/D3細胞) のヒト血液脳関門モデルとしての特性評価
3. 学会等名 日本薬学会第36年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木諒良、田野光敏、高尾昌樹、内田康雄
2. 発表標題 アルツハイマー病患者の血液脳関門におけるグルコース・アミノ酸トランスポーターのタンパク質発現上昇
3. 学会等名 日本薬学会第36年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 手塚健太、内田康雄
2. 発表標題 中枢関門における創薬標的を探索するための方法論の構築
3. 学会等名 日本薬剤学会第36年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kenta Tezuka, Masayoshi Suzuki, Risa Sato, Shohei Kawarada, Tetsuya Terasaki and Yasuo Uchida
2. 発表標題 Central nervous system (CNS) barrier-targeting drug discovery as a new strategy for CNS disorder treatment: An example of multiple sclerosis
3. 学会等名 36th JSSX Annual meeting (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 内田康雄
2. 発表標題 新技術で拓かれる新たな中枢関門の正体
3. 学会等名 日本薬剤学会第37年会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 内田康雄
2. 発表標題 Next generation quantitative proteomics and its application to metal transport study
3. 学会等名 第22回日本蛋白質科学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 内田康雄
2. 発表標題 次世代型プロテオミクスで拓かれる新たな中枢関門の正体
3. 学会等名 第21 回医療薬学若手研究者セミナー（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 内田康雄
2. 発表標題 次世代型定量プロテオミクスによって拓かれる中枢関門研究の新地平
3. 学会等名 学術変革領域「脳分子探査」セミナー（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 内田康雄
2. 発表標題 次世代型定量プロテオミクスが拓く中枢関門研究の新地平
3. 学会等名 第6回日本質量分析学会東北談話会（招待講演）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Y Uchida, R Goto, T Usui, M Tachikawa and T Terasaki	4. 発行年 2022年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 812
3. 書名 Drug Delivery to the Brain - Physiological Concepts, Methodologies and Approaches - The second edition	

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究代表者ホームページ（内田康雄）  
[https://www.hiroshima-u.ac.jp/pharm/research/lab/Pharmaceutics\\_and\\_Therapeutics](https://www.hiroshima-u.ac.jp/pharm/research/lab/Pharmaceutics_and_Therapeutics)

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	高尾 昌樹  (Takao Masaki)		
研究協力者	A e b e r s o l d R u e d i  (Aebersold Ruedi)		
研究協力者	寺崎 哲也  (Terasaki Tetsuya)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
フィンランド	東フィンランド大学	ヘルシンキ大学		
米国	スタンフォード大学			
スイス	スイス連邦工科大学			