

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26505005

研究課題名(和文) FFPE臨床試料のプロテオーム解析プラットフォームの構築

研究課題名(英文) Development of a platform for proteome analysis of clinical FFPE samples

研究代表者

若林 真樹 (Wakabayashi, Masaki)

京都大学・薬学研究科・助教

研究者番号：70552024

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題を通じてFFPE組織からの効率的なタンパク質抽出法と、高感度LC-MS解析に資するタンパク質試料の前処理手法を確立し、FFPE組織の解析プラットフォームの大きな枠組みを提供することが可能となった。HE染色FFPE組織に関しては、非特異的に多量のタンパク質が染色液中に溶出し、本来のタンパク質分布などが変化していることが示唆されたため、今後プロテオーム解析に耐えうる試料であるかどうか結論付けることが必要であることも明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：This study provided a novel protein-extraction method and highly sensitive LC-MS system suitable for proteome profiling of minuscule FFPE tissue slices. This system can be utilized as a standard platform for FFPE proteome analysis. It was suggested that hematoxylin and eosin staining caused loss of proteins from FFPE tissues. Therefore, more detailed analysis is required for evaluating whether HE-stained FFPE tissue slices are suitable for proteome profiling.

研究分野：プロテオミクス

キーワード：プロテオミクス FFPE LC-MS

1. 研究開始当初の背景

質量分析技術の急激な発展とともに革新を遂げ、成熟期へと向かいつつあるプロテオーム解析技術は、基礎・臨床を問わず様々な疾患関連研究分野において非常に有用な分析ツールとして汎用されるようになってきている。プロテオーム解析によって得られる大規模かつ高精度なタンパク質発現情報は、病態解明、バイオマーカー探索、創薬ターゲットの探索を推進する上で非常に実用的な情報となるため、臨床試料をターゲットとしてプロテオーム解析を行った論文は加速度的に増加し続けている。特に、FFPE 組織はほぼ全ての大型医療機関において長期間にわたって蓄積され、患者情報が付随する最も大きな臨床試料アーカイブを形成しているため、臨床プロテオーム研究の最も大きなターゲットとなっている。しかしながら、前処理の煩雑さやホルマリン固定による人工的な修飾によって、回収できるタンパク質の量や質が低下するため、再現性良く大規模データを取得するためには多量の試料が必要となることが大きな問題となっていた。さらに、ガンをはじめとする様々な疾患において、リン酸化、アセチル化、糖鎖修飾などの翻訳後修飾情報の網羅的解析が極めて重要であるにもかかわらず、FFPE 試料の翻訳後修飾解析を大規模に行った例はこれまで1例しか報告されておらず、これもひとえに解析に必要な試料量が通常のプロテオーム解析と比べて100～1000倍程度に跳ね上がることによるものである。実際に、1例の当該論文においてもFFPE 組織ブロックを大量に用いて(～5mg)解析を行ったにすぎない。これらの問題を解決し、タンパク質発現量のみならず、翻訳後修飾情報までを含めた統合的解析を可能にするためには、微量のFFPE 組織試料を高効率に解析可能なシステムを構築することが必須である。このような状況の中、代表者はこれまでに、独自の高効率タンパク質抽出法である相間移動溶解法(PTS法)を応用することで、FFPE 組織の効率的な可溶化と残留パラフィンの除去を両立する方法を開発し、既存のどの手法よりも高効率にタンパク質を回収することに成功した。本法は、ガラススライド上にマウントされた極微量のFFPE 切片においても有効で、6mm 四方、厚さ5μmのFFPE 切片1枚から30μg程度のタンパク質を回収可能であり、ガラススライド1/10枚以下のタンパク質量で通常のプロテオーム解析を行うことが十分可能であった。従来法で必須とされている煩雑な脱パラフィン処理を完全に省略できることも本法の大きな利点である。さらに代表者は、ミニチュア化することで高感度化した液体クロマトグラフィー-質量分析計(LC-MS)システムを組み合わせることで、ガラススライド1枚分のFFPE 試料からリン酸化プロテオーム情報を取得することに成功した。これらの手法により代表者らの研究室では

従来法よりも格段に効率よくタンパク質の抽出から翻訳後修飾解析までを行うことが可能となっている。

しかしながら、実際に有意義な生物学的知見を得るためにはさらなる感度向上が必須であることや、臨床試料に即して考えた場合、画像診断に最も汎用される染色法であるヘマトキシリン/エオジン(HE)染色後試料の解析などを進めることが必要であり、より確度の高い疾患解析法を構築するために、これらを達成できる新規手法の開発を進めることを本研究の目的とした。これにより、希少な臨床試料にも適応可能な普遍的な手法として新たな翻訳後修飾解析基盤を提供することが可能となる。

2. 研究の目的

ホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)組織は最も大きい臨床試料アーカイブを形成しており、そのプロテオーム解析結果があらゆる疾患関連研究分野で強く望まれるようになってきている。しかしながら、煩雑な前処理が大きな障壁となり画一的な解析手法はいまだ確立されていない。本研究では、希少疾患や翻訳後修飾の解析にも適用可能なFFPE 臨床試料の高感度プロテオーム解析プラットフォームを構築することを目的とし、FFPE 試料の効率的な前処理法、超高感度LC-MS 測定系の開発を通じて統合的な解析システムを構築する。多くの研究機関が保有している希少かつ貴重な試料から最大限のタンパク質情報を引き出すことができるツールとして多くの疾患関連研究分野で応用されることが期待される。

3. 研究の方法

FFPE 試料をより高深度かつ高精度に解析するため、簡便性の向上とタンパク質回収量の改善とを目的として、脱パラフィン操作を省略するための新規前処理手法の開発を行った。また、疾患細胞の採取に最適なHE染色に対応可能なタンパク質抽出法を構築すると同時に、各染色を施した試料のプロテオーム/リン酸化プロテオーム解析を行い、各染色が組織プロテオームに与える影響を精査した。さらに、抽出した極微量のタンパク質の前処理を、固定化トリプシンビーズを充填したキャピラリー内で完了することで試料ロスの極小化を試みた。また、極微量試料の検出を可能とするために、モノリスカラムの導入、カラムのミニチュア化を組み合わせることで、高感度測定システムを開発した。最後に実試料の測定を行い、測定システムの評価を行った。以上の研究により、FFPE 臨床試料の高感度プロテオーム解析プラットフォームを提案する。

(1)FFPE 試料からのタンパク質抽出法とHE染色後試料の前処理法の確立、(2)超高感度LC-MS システムの開発の各要素技術開発について以下に記述する。

(1)アルコールでの脱色や各種有機溶媒処理を施し、ヘマトキシリン・エオジンを除去す

ることタンパク質回収量が回復するどうか検証した。HE 除去に関しては、煩雑な前処理によるタンパク質のロスを防ぐため、タンパク質抽出用 PTS 溶液と各種有機溶媒の二相分配を利用することで、タンパク質抽出から脱色作業までを一度に行う方法を検討した。同時に、非染色、ヘマトキシリン染色、エオジン染色の 3 種の試料のプロテオーム/リン酸化プロテオーム情報をできる限り大規模に取得し、染色過程で失われる情報があるかどうか精査した。

(2)分析カラムにはメートル長モノリス型シリカカラムを用いた。モノリス型カラムは、その背圧の低さによってメートル長での使用が可能であり、長時間の非常に浅い有機溶媒グラジエントを用いることで非常に高度な分離が可能となるため、感度・タンパク質同定数が格段に向上する。また、測定システムをミニチュア化するため、内径 10 または 25 μm のキャピラリーを用いてモノリス型カラムを作成可能な条件の検討を行った。

(1)で確立した手法によりタンパク質を抽出後、固定化トリプシンビーズを詰めたキャピラリーに直接ロードしてキャピラリー内で酵素消化から脱塩までを行い、直接 LC-MS へ接続することで試料ロスの最小化を試みた。従来法で試料調製を行った結果と比較してタンパク質回収量が改善しているか、消化効率十分であるかなどを検証した。また、タンパク質回収量を改善するために、固定化トリプシンビーズの後段に逆相分離用粒子充填剤を追加したキャピラリーカラムを作成し、消化されたペプチドの取りこぼしを防ぐ手法を開発した。

4. 研究成果

(1)FFPE 試料からのタンパク質抽出法と HE 染色後試料の前処理法の確立

まず初めに FFPE 試料の回収方法に関して検討を行った。これまでに我々は、抗体染色などの手法で FFPE 試料を解析する際と同様に、脱パラフィン、エタノール/水系を用いた加水を行った後、相間移動可溶化剤 (PTS) によるタンパク質抽出を行うことで高効率にタンパク質を回収可能であることを示してきた。(Fig. 1)

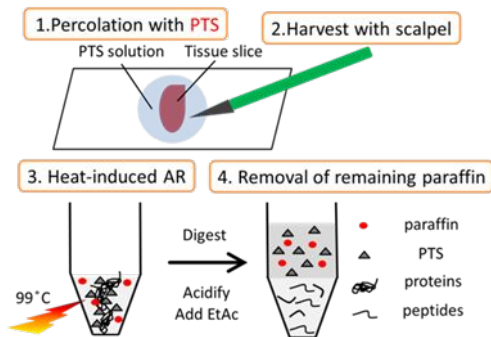


Fig. 1. Overview of a novel sample preparation method for FFPE proteome analysis.

しかしながら、プロテオーム解析に際して脱パラフィンや加水といった工程は必須ではないと考え、煩雑な作業工程による前処理時間の増加や試料のロスを省き、簡便かつ高効率な前処理手法を確立するために、各ステップの省略を試みた。キシレンによる脱パラフィン後、エタノール/水系での加水を行う代わりにタンパク質抽出液として PTS 溶液を直接添加することでタンパク質を回収し、プロテオーム解析を行った結果、従来法と同等もしくはそれ以上のタンパク質同定数を得ることが可能であった。さらに、脱パラフィン作業をも省略し、PTS 溶液を直接添加することで、タンパク質抽出と脱パラフィンを同時に完了することを目的として、PTS 溶液の 2 相分配時に用いる有機溶媒の検討を行った。キシレン、ベンゼン、ヘキサン、酢酸エチルを用いて 2 相分配を行ったところ、酢酸エチルを用いた場合にタンパク質回収量が最大となったため、従来通り酢酸エチルを用いて 2 相分配を行うことで、脱パラフィン過程を省略可能であることが明らかとなった。脱パラフィン操作の省略によるタンパク質抽出効率や消化効率への悪影響なども観察されず、タンパク質同定数も脱パラフィン後の試料と同等であったことから、2 相分配によりパラフィンを完全に除去できていると考えられる。従来法のタンパク質回収率が非常に高いため、脱パラフィン操作の省略によりタンパク質同定数に大きな改善は見られなかったが、ほぼすべての前処理過程を省略することで、スループットの改善を達成した。次に、HE (ヘマトキシリン・エオジン) 染色試料に関する検討を行った。HE 染色を行った組織からのタンパク質回収量は未処理の組織と比べて 50-80% 程度であった。これらの試料に対して上述した試料回収法を用いて脱色とタンパク質回収を同時に完了することで回収率の向上を試みたが、大きな改善は見られなかった。

また、HE 染色 FFPE 組織の効率的なプロテオーム解析手法の確立をめざし、HE 染色がタンパク質抽出や LC-MS 分析に与える影響をより詳細に解析した。ヘマトキシリン、エオジンそれぞれにより染色した FFPE 組織からタンパク質抽出を行った結果、ヘマトキシリン染色により約 20% 程度、エオジン染色により 40~60% 程度タンパク質をロスすることが明らかとなった。両染色手法により、どのような特徴を持つタンパク質群が消失しているのか明らかとするため、染色前と染色後の試料からタンパク質を抽出し、比較解析を行った。各試料から同定されたペプチド群に関して様々な物理化学的性質を指標に評価を行ったが、特徴的な変化を示すパラメータを抽出することはできなかった。さらに、リン酸化ペプチドを濃縮後、同様の解析も行ったが、同様に特徴的パラメータを抽出することは困難であった。本結果より、HE 染色時には、非特異的に多量のタンパク質が染色液中

に溶出し、本来のタンパク質分布などが変化してしまうことが予想される。

今後、染色液中に溶出したタンパク質群などに関しても同様の解析を行うことで、HE染色によるタンパク質のロスが一樣であるかどうか検討を進める予定である。さらに、その程度に関しても、再現性があるのかどうかを検証し、プロテオーム解析に耐えうる試料であるかどうか結論付けることが必須であると考えられる。

(2) 超高感度 LC-MS システムの開発

抽出した FFPE 極微量試料をより高感度に解析するために小内径モノリス型カラムの作成条件を確立した。また、新規前処理法の開発を行った。まず、試料を直接導入して全ての前処理を簡潔させるための前処理用キャピラリーカラムの開発を試みた。キャピラリー内に逆相系粒子充填剤とトリプシン固定化ビーズを充填し、タンパク質抽出から消化までの全ての前処理過程をキャピラリー内で完結させることで、試料ロスを最大限防ぎ、これを直接 LC-MS へと接続する手法を確立した。極微量の牛血清アルブミンを用いた評価より、MS におけるシグナルとして 5 倍程度感度が向上することが確認でき、極微量の HeLa 細胞試料を用いた実験においても同等の感度向上を確認した。また、前処理過程で必須となる還元アルキル化や酵素消化に関しても、キャピラリー内で十分に完了していることを確認した。(Fig.2) ペプチド同定数においても 2 ~ 3 倍以上の向上を確認した。

Missed cleavage	1	2	>3	total
Conventional	17 (1.1%)	151 (10.0%)	0	1501
In-capillary	10 (1.7%)	96 (16.3%)	0	586

method	Free Cys-containing peptide	Alkylated Cys-containing peptide
In-capillary	1	100

Fig. 2 Comparison of the efficiency of digestion and alkylation between conventional and In-capillary methods

これらのシステムを統合し、ヒト癌 FFPE 組織切片のリン酸化プロテオーム解析を行った。(Fig. 3) 各スライドから 500~1000 程度のリン酸化ペプチドの同定に成功し、これらのクラスター解析の結果から、各癌種に特異的なリン酸化の変動や、ある癌種間で共通して観察されるリン酸化の変動を追跡することが可能であった。これらの結果をより詳細に評価していく予定である。

今後は LC-MS システムのさらなる高感度化を試みるとともに、本技術を様々な臨床試料へと適用することで病態試料の高感度解析を進める予定である。

本研究課題を通じて、FFPE 組織からの効率的なタンパク質抽出法と、高感度 LC-MS 解析

Phosphopeptide IDs from each 1 slide

	Phosphopeptide ID	Phosphosite ID	Protein ID
breast 1 (b1)	559	530	297
cervix 1 (c1)	847	740	381
cervix 2 (c2)	718	570	293
stomach 1 (s1)	594	453	256
stomach 2 (s2)	783	625	300
stomach 3 (s3)	718	562	289
liver 1 (l1)	966	761	424
liver 2 (l2)	683	540	308
liver 3 (l3)	761	593	366
Total	2667	1823	769

up- or down-regulated* phosphopeptides in cancers

*H/L ratio > 2 : up-regulated, H/L ratio < 0.5 : down-regulated

	Total phosphopeptides	Up-regulated	Down-regulated
Breast unique	90	5	8
Cervix unique	293	51	81
Stomach unique	264	42	55
Liver unique	408	94	113
Total	1055	192	257

Identified phosphopeptides include ...

Breast: ERBB2(Receptor tyrosine-protein kinase erbB-2) :S1054 (↑)

Cervix: CDK12(Cyclin-dependent kinase 12) :S333, S334 (↑)

Liver: CDK13(Cyclin-dependent kinase 13) :S317, S325 (↑)

BRAF(Serine/threonine-protein kinase B-raf) :S365 (↑)

Fig.3 Results of human cancer FFPE phosphoproteome

に資するタンパク質試料の前処理手法を開発した。HE 染色組織に関しては上述の通り引き続き考察が必要であるが、FFPE 組織の解析プラットフォームの大きな枠組みを提供することが可能となった。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

Imamura H, Sugiyama N, Wakabayashi M, Ishihama Y. Large-scale identification of phosphorylation sites for profiling protein kinase selectivity. *J Proteome Res.* 2014, 13, 3410-3419, doi: 10.1021/pr500319y

Wakabayashi M, Kyono Y, Sugiyama N, Ishihama Y. Extended Coverage of Singly and Multiply Phosphorylated Peptides from a Single Titanium Dioxide Microcolumn. *Anal Chem.* 2015, 87, 10213-10221, doi: 10.1021/acs.analchem.5b01216

Miki T, Awa M, Nishikawa Y, Kiyonaka S, Wakabayashi M, Ishihama Y, Hamachi I. *Nat Methods* 2016, 13, 931-937, doi: 10.1038/nmeth.3998.

[学会発表](計 9 件)

Masaki Wakabayashi, Yasushi Ishihama, Single cell proteome profiling using highly sensitive LC-MS system and

In-capillary sample preparation method, AOHUP02016, 2016年9月23日, 台中(台湾)

Masaki Wakabayashi, Yasushi Ishihama, Single-cell proteome profiling: Innovations in sample preparation, HUP02016, 2016年9月20日, 台北(台湾)

若林 真樹、極微量試料のプロテオーム解析手法の開発～1細胞解析プラットフォームの構築を目指して～、日本プロテオーム学会2016年大会、2016年7月28日、北里大学(東京)

若林 真樹、極微量プロテオーム解析手法の開発～1細胞プロテオーム解析への挑戦～、第13回北里疾患プロテオーム研究会、2016年3月25日、北里大学(東京)

若林 真樹、Jordan T Aerts, Stanislav S Rubakhin, 石濱 泰, Jonathan V Sweedler、単一細胞プロテオーム解析技術の開発、第28回バイオメディカル分析科学シンポジウム、2015年8月21日、長崎大学(長崎)

若林 真樹、Aerts Jordan T, Rubakhin Stanislav S、石濱 泰、Sweedler Jonathan V、Single cell proteome profiling: Innovations in sample preparation、日本プロテオーム学会2015年大会、2015年7月27日、くまもと森都心プラザ(熊本)

Masaki Wakabayashi, Jordan Aerts, Stanislav Rubakhin, Yasushi Ishihama, Jonathan Sweedler, Single cell proteome profiling using highly sensitive LC-MS system and In-capillary sample preparation method, 63rd ASMS annual conference, 2015年6月2日、St. Louis (US)

若林 真樹、Aerts Jordan T, Rubakhin Stanislav S、石濱 泰、Sweedler Jonathan V、単一細胞プロテオーム解析への挑戦、第27回バイオメディカル分析科学シンポジウム、(2014)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

若林 真樹 (WAKABAYASHI, Masaki)
京都大学・大学院薬学研究科・助教
研究者番号：70552024

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

該当なし