

令和 3 年 5 月 30 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22590

研究課題名(和文)高精度病理標本プロテオミクスに基づく次世代型臨床診断の基盤構築

研究課題名(英文) Method establishment of next generation clinical diagnosis based on highly precise pathological specimen proteomics

研究代表者

内田 康雄(Uchida, Yasuo)

東北大学・薬学研究科・講師

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)：ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE)切片は、多くの医療機関で病理標本として保存されており、汎用性の高い臨床検体であるが、ホルマリン架橋に伴う大きな技術的障壁によって病態分子機構の解明研究にほとんど利用されていない。本研究では、Pressure Cycling Technology、高温、強力な可溶化剤、高精度な定量プロテオミクス「Advanced SWATH法」を組み合わせることによって、病態組織におけるタンパク質群の発現量変動を高精度かつ網羅的に定量できる方法をはじめて開発した。病態分子機構プロファイルに基づいて最適な薬剤を選択できることも実証し、臨床診断を行う上での基盤を構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

臨床診断において、病変組織におけるタンパク質の“定量”は欠かせない技術である。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、極めて挑戦的な課題とされてきた。本研究では、FFPE検体で利用可能な、高精度かつ網羅的なタンパク質定量技術を開発し、世界で初めてFFPE組織を使って病態分子機構を定量的に解析できることを実証した。従って、本研究は、FFPE組織の利用価値を飛躍的に高めた点で、学術面だけでなく、臨床的・社会的に重要な意義をもつものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to establish quantitative proteomic method able to accurately quantify pathological changes in the protein expression levels using FFPE samples. After Pressure Cycling Technology (PCT)-assisted processing of FFPE liver samples followed by SWATH-MS-based comprehensive quantification, the peak areas of 88.4% of peptides agreed with those from matched fresh samples within a 1.5-fold range. The present method using phase-transfer surfactant (PTS) buffer at 95C showed better agreement of peptide peak areas between FFPE and fresh samples. When our method using PCT and PTS buffer at 95C was applied to a bile duct ligation (BDL) disease model, the BDL/control expression ratios for 80.0% of peptides agreed within 1.2-fold range between FFPE and fresh samples. This heat-compatible FFPE-PCT-SWATH proteomics technology using PTS is suitable for quantitative studies of pathological molecular mechanisms and biomarker discovery utilizing widely available FFPE samples.

研究分野：臨床診断学

キーワード：臨床診断 病理学 ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) Advanced SWATH法 プロテオミクス PCT 熱 PTS

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

ホルマリン固定パラフィン包埋 (**FFPE: Formalin-Fixed Paraffin-Embedded**)切片は、多くの医療機関で病理標本として保存されており、室温で低コストで保存できることから凍結組織よりも汎用性の高い検体である。ゆえに、アルツハイマー病をはじめとした神経変性疾患の病態メカニズム解明やがんのバイオマーカー探索などの研究において、膨大な検体数の確保というボトルネックを解消できる **FFPE** 検体は有用である。**FFPE** 切片の従来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、これまでは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。

## 2. 研究の目的

そこで、**FFPE** サンプルの可溶化剤として、脱架橋の際に不可欠な熱安定性と膜タンパク質を含めた強力な可溶化能を兼ね揃えた **Phase Transfer Surfactant (PTS)**、さらに大気圧の **3000** 倍以上の超高压と静水圧を交互にシフトさせる技術であり、**FFPE** 切片からのタンパク質抽出効率を改善させた報告がある **Pressure Cycling Technology (PCT)** をサンプル調製に導入することで、効率的な脱架橋を促進し、この課題を解消できると考えた。さらに、従来法よりも定量精度に優れた網羅的定量プロテオミクスの測定モードとして **SWATH** 法を組み合わせ、新鮮組織における病態時のタンパク質発現量変化を精度よくかつ網羅的に反映した定量結果を与えることができる定量系 (**FFPE-PCT-SWATH** 法)の確立を目的とした。

この目的の達成によって、従来不可能であった「汎用性の高い **FFPE** 組織を用いたタンパク質発現の網羅的かつ高精度な定量」を実現させ、臨床診断を行う上での基盤を構築することを目標とした。

## 3. 研究の方法

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(1)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(2)SWATH 測定と(3)高精度定量ペプチド選択法を適用した。

構築した **FFPE-PCT-SWATH** 法を **FFPE** の病態組織に適用することで、新鮮組織で起こっているタンパク質群の発現量変化をどれほど精度よく生体内のタンパク質発現量変化を追うことができるかを評価した。

さらに、**FFPE** 切片から得られる分子メカニズムのプロファイルから最適な抗がん剤を選択することができることを実証することによって、臨床診断の基盤の構築を行った。

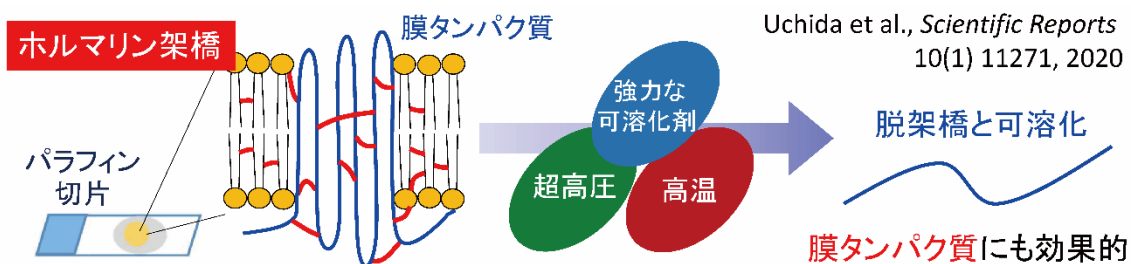
## 4. 研究成果

**FFPE** プロテオミクス技術の最大の課題であった「試料調製の再現性の低さ」と「**LC-MS/MS** 測定の再現性と網羅性の低さ」を、次の 3 つの新技术の融合によって解決し、**FFPE** プロテオミクスの概念を定性解析から「定量解析」へと塗り替えることをひとつの目的とした。ホルマリン架橋の除去と切片からのタンパク質抽出が最大の課題であることは世界的認識であり、高温・高压・可溶化力に優れた可溶化剤の使用が有効と考えられてきたが、従来法では達成不可能であった。我々は、超高压と常圧を交互に与える(1)Pressure Cycling Technology(PCT)と可溶化力に優れた **Phase Transfer Surfactant(PTS)**、さらに 95 度の高温 (PTS を使用したことで初めて加熱が可能になった)を組み合わせることによって、ホルマリン架橋の除去および蛋白抽出をほぼ完全に進行できることをはじめて証明した (マウス肝臓の **FFPE** 切片と凍結切片を用いた比較実験)。上記の調製法に加えて、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た結果、従来の Shotgun 測定やペプチド選択を行わない方法に比べて、統計学的に有意に、飛躍的に、真度および精度が改善した。具体的には、**FFPE** 切片から得られるタンパク質の網羅的な定量結果が、新鮮組織のそれらと 1.5 倍の範囲内であり、かつ、4 回の独立したサンプル調製・測定間の CV 値が約 7%であった。以上の結果から、**FFPE** 組織を用いた網羅的なプロテオミクスにおいて、はじめて定量に値する手法を構築できた。さらにその精度・再現性の度合いは、きわめて高く、新鮮組織を反映する定量結果を得るに十分なものであった。

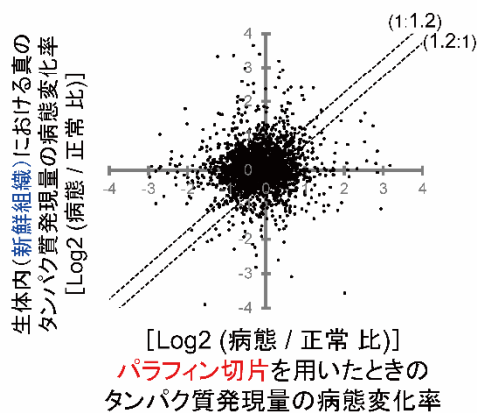
次に、本手法を用いて網羅的にタンパク質群の病態変動を正確に定量可能か否かを検証することとした。従来、**FFPE** を用いて網羅的に定量しようとしても、生体内で起きている各タンパク質の発現量の変動を定量することは困難であった。**FFPE** 利用の最大の利点は大量の疾患患者のあらゆる病態組織を対象とできることであるが、上述の課題がこの **FFPE** の利用価値を下げていた。我々が確立した **FFPE** プロテオミクス手法を用いてこの課題を克服できるか否かを検証す

るために、胆汁うっ滞肝臓および正常肝臓に本手法を適用した結果、従来の FFPE プロテオミクス手法では全く新鮮組織のタンパク質病態変動量を反映した定量結果を得ることができなかったが、我々の手法では、新鮮組織で得られたタンパク質群の病態変動量を網羅的かつ高精度に追うことができ、はじめて FFPE 組織を用いて網羅的にタンパク質の病態変動を定量できる手法を確立でき、論文発表できた(図; Uchida et al., Scientific Reports 10(1) 11271 Dec, 2020)。さらに、本研究で構築した手法を FFPE 検体に適用して、最適と予測される薬剤が実際に有効であることを示すことによって、個別化治療の診断基盤として本法が有用であることを実証した。前立腺癌をモデルとして、最新の治療薬 Enzalutamide に耐性を示す 3 種の前立腺癌細胞の細胞塊を用いて FFPE 試料を作製し、測定される網羅的な蛋白質発現量データからパスウェイ解析で活性化パスウェイを絞り込んだ。それに対する阻害薬を、生きた該当細胞に暴露し、増殖阻害濃度(GI50)を測定し、Enzalutamide よりも効果的であることを示した。

以上、本研究では、病態組織における分子機構を網羅的かつ高精度に定量可能な FFPE プロテオミクスを開発し、臨床診断を行う上での基盤を構築することができた(図)。



従来のタンパク質定量法



本研究で開発した、高精度タンパク質定量法

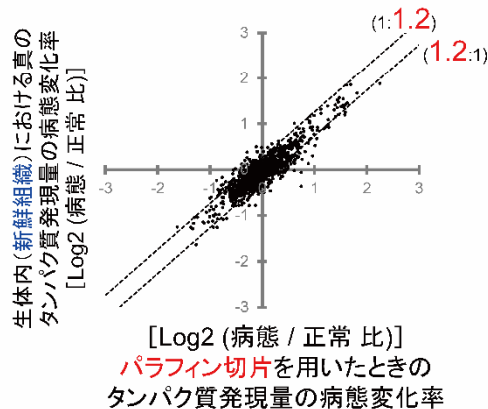


図 パラフィン(FFPE)切片を使って、高精度かつ網羅的にタンパク質の病態変化を定量できる方法を開発。従来の方法に比べて、定量精度が飛躍的に高い。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 10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 Hellinen L, Sato K, Reinisalo M, Kidron H, Rilla K, Tachikawa M, Uchida Y, Terasaki T, Urtti A.	4. 巻 60(15)
2. 論文標題 Quantitative Protein Expression in the Human Retinal Pigment Epithelium: Comparison Between Apical and Basolateral Plasma Membranes With Emphasis on Transporters.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Invest Ophthalmol Vis Sci	6. 最初と最後の頁 5022-5034
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1167/iovs.19-27328	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 Prasad B, Achour B, Artursson P, Hop CECA, Lai Y, Smith PC, Barber J, Wisniewski JR, Spellman D, Uchida Y, Zientek MA, Unadkat JD, Rostami-Hodjegan A.	4. 巻 106(3)
2. 論文標題 Toward a Consensus on Applying Quantitative Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Proteomics in Translational Pharmacology Research: A White Paper.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clin Pharmacol Ther.	6. 最初と最後の頁 525-543
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cpt.1537	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 Ochiai Y, Uchida Y, Tachikawa M, Couraud PO, Terasaki T.	4. 巻 150(4)
2. 論文標題 Amyloid beta(25-35) impairs docosahexaenoic acid efflux by down-regulating fatty acid transport protein 1 (FATP1/SLC27A1) protein expression in human brain capillary endothelial cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Neurochem.	6. 最初と最後の頁 385-401
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jnc.14722	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 内田康雄	4. 巻 55
2. 論文標題 Uniprotデータベース	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ファルマシア	6. 最初と最後の頁 335_3
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 Uchida Y, Sasaki H, Terasaki T.	4. 巻 10(1)
2. 論文標題 Establishment and validation of highly accurate formalin-fixed paraffin-embedded quantitative proteomics by heat-compatible pressure cycling technology using phase-transfer surfactant and SWATH-MS.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 11271
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-68245-2	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 -

〔学会発表〕 計11件(うち招待講演 5件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 内田康雄(日本薬学会奨励賞受賞講演)
2. 発表標題 定量プロテオミクスに基づく血液脳関門の輸送機能および病態変動機構の解明
3. 学会等名 日本薬学会 第140年会(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 半田拓巳、内田康雄、佐々木颯、臼井拓也、寺崎哲也
2. 発表標題 Laser Microdissectionを用いたホルマリン固定パラフィン包埋切片の病変部位特異的なプロテオミクス定量系の確立:胆管結紮マウス肝臓のタンパク質発現量変動解析
3. 学会等名 日本薬学会 第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Y Uchida
2. 発表標題 Key Issues and Our Solutions in Transporter Proteomics
3. 学会等名 The Seminar of University of Eastern Finland, School of Pharmacy(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 S Kawarada, Y Uchida, S Tamai, M Nakada, T Terasaki
2. 発表標題 Discovery of up- or down-regulated proteins in recurrent glioblastoma by SWATH-MS analysis
3. 学会等名 34th JSSX annual conference (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 H Takeuchi, Y Uchida, R Goto, M Luczak, T Usui and T Terasaki
2. 発表標題 (英語口頭発表部門で優秀口頭発表賞を受賞(47演題中4演題)学部4年生が受賞するのは快挙) OCT2 protein is expressed in CSF side of the porcine blood-arachnoid barrier, while MATE1 is in blood side: Application of qTAP to transporter localization
3. 学会等名 34th JSSX annual conference
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 内田康雄
2. 発表標題 Next generation quantitative proteomics “SWATH-MS法”
3. 学会等名 東京大学大学院薬学系研究科セミナー(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 半田拓巳、佐々木颯、田野光敏、高尾昌樹、寺崎哲也、内田康雄
2. 発表標題 パラフィン切片プロテオタイピングによるアミロイド血管症の脳血管における病態分子機構の解明
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Y Uchida
2. 発表標題 Next generation quantitative proteomics opens up the new fields of CNS barrier studies
3. 学会等名 Cerebral Vascular Biology Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究室ホームページ (内田康雄) <a href="http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~soutatsu/dds/profile/uchida.htm">http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~soutatsu/dds/profile/uchida.htm</a>
---

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	寺崎 哲也  (Terasaki Tetsuya)		
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)		

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			
スイス	スイス連邦工科大学			
フィンランド	ヘルシンキ大学	東フィンランド大学		
フランス	パリ第五大学	コシャン研究所		
米国	スタンフォード大学			
ポーランド	Polish Academy of Sciences			