

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16561

研究課題名（和文）FFPE組織を用いたイメージング質量分析によるアミロイド原因蛋白質の解析

研究課題名（英文）Analysis of amyloid-associated proteins by imaging mass spectrometry using FFPE tissue

研究代表者

青山 智志（Aoyama, Tomoyuki）

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：50737781

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：FFPE組織を用いたイメージング質量分析(IMS)でアミロイドーシス原因タンパク質の同定を目指した。まず、心臓を用い、アミロイドーシス症例、対象症例で、比較プロテオーム解析を実施した。全部で2324個のタンパク質が同定された。アミロイドーシス症例で有意に増加していた678種類のタンパク質を用いた多変量解析では、アミロイドーシス症例と対照症例は明瞭に群分けされることが確認された。更に、アミロイド症例にユニークな発現を示す12種類のタンパク質について、Tissue Microarrayスライドを作成し、特異的なMSスペクトルをターゲットしたIMSを行ったところ、有望なピークを同定することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、近年増加傾向にあり、新規治療薬が登場しているアミロイドーシス患者の早期診断、適切な治療法選択に大いに寄与し、有望かつ有効な治療戦略創出のための重要な知見となりうる。本研究により得られる知見の蓄積と発信は、IMSによる *in situ* proteome analysis とでも言うべき、全く新しい次元の病態理解、診断技術開発への嚆矢となる。また、研究を進める中で、原因物質不明のアミロイドーシス症例をプロテオーム解析することで、最近になり報告された全身性APOA4アミロイドーシスであることが判明し、論文として報告している。アミロイドーシスにおけるプロテオーム解析の有用性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We aimed to identify amyloidosis-causing proteins by imaging mass spectrometry (IMS) using FFPE tissue. First, a comparative proteomic analysis was performed in hearts, in amyloidosis cases, and in target cases. A total of 2324 proteins were identified. Multivariate analysis using 678 proteins, which were significantly increased in amyloidosis cases, showed that amyloidosis and control cases were clearly divided into groups. Furthermore, Tissue Microarray slides were prepared for 12 proteins uniquely expressed in amyloidosis cases, and IMS targeting specific MS spectra identified promising peaks.

研究分野：臨床検査

キーワード：アミロイド プロテオミクス FFPE

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

質量分析法は、近年の技術革新に伴い医療分野での実用化が急速に進んでいる。中でも、臨床検査領域の現場では、先天代謝異常症等の高精度・先進的検査法の推進に広く貢献してきた。イメージング MS (IMS) は、組織切片上で質量分析を行い、生体分子(低分子代謝産物、脂質、ペプチドや蛋白質など)や投薬剤に由来するマスペクトルを直接検出し、組織上における目的物質の分布を二次元的に可視化する技術である。これにより、抗体や染色剤などの標識なしに、一度の測定で複数の標的物質の局在情報を半定量的に取得できる。

アミロイドーシスとは、可溶性の前駆蛋白質が難溶性のアミロイド線維を形成し、組織に沈着することで重度の臓器障害を起こす難治性疾患である。対応する原因蛋白質 (Immunoglobulin Light Chain (AL)、Amyloid A (AA)、異型 transthyretin (ATTR)、2 microglobulin (A<sub>2</sub>M) など) により、AL アミロイドーシス、AA アミロイドーシス、遺伝性 / 野生型 ATTR アミロイドーシスおよび透析関連アミロイドーシスなどの病型に分類される。アミロイドが複数臓器に沈着する全身性アミロイドーシスは、進行性の経過をたどり、治療抵抗性で予後不良である。原因蛋白質によってアミロイドの形成・沈着機序は異なり、近年では抗体療法や安定化剤など原因に応じた治療方法が開発されてきており、適切な治療法決定のため、病早期での正確な診断が求められている。

アミロイドーシスの確定診断には、アミロイド沈着を病理組織学的に証明する必要がある。一般医療施設では、組織標本を Congo red 染色でアミロイド沈着を確認し、原因蛋白質に対する抗体を用いた免疫染色で間接的に原因蛋白質の同定を行っている。アミロイド原因蛋白質の同定は免疫染色に強く依存しているが、抗体の種類や蛋白質との反応性に限界があり、多彩な原因蛋白質 (30 種類以上) アミロイド線維の複雑な束状構造、新規病型の存在から、日本ではアミロイドーシス患者の 1/4 で原因蛋白質が同定されていない。

以上のように、アミロイドーシスの病型診断精度はいまだに低く、発症機序の理解や適切な治療法選択の妨げになっている。病因・病態に則した適切な治療選択、病型に応じた新たな治療法の開発のためには、アミロイドーシス原因蛋白質の同定を含む正確な病型診断と新規病型の発見は極めて重要であり、これまでに確立された古典的な手法とは独立し、かつ補完しうる新たな診断技術が求められる。

### 2. 研究の目的

以上の背景より、本研究ではアミロイドーシス原因蛋白質の直接的な同定が可能となる新規技術開発を目指す。これにより、近年増加傾向にあるアミロイドーシス患者の早期診断、適切な治療法の選択、新たな治療戦略創出に寄与することを目的とする。

### 3. 研究の方法

これまでの背景と申請者らの研究成果を踏まえ、本研究では以下の方法で研究を進めた。

#### (1) アミロイドーシスの FFPE 組織を用いた比較プロテオミクス

アミロイドーシス症例と対照症例の FFPE 組織から、LC-MS/MS による比較プロテオミクスを行う。アミロイドーシス症例では、DFS 染色陽性領域をレーザーマイクロダ イセクションで切り出して解析する。

アミロイドーシスの症例ごとに異常蓄積蛋白質を同定する。アミロイドーシスの病型ごとに、得られたペプチドのマスペクトルをデータベース化する。

異常蓄積蛋白質候補の抗体を用いた免疫染色にて、プロテオミクスの結果を検証する。

#### (2) アミロイドーシスの FFPE 組織を用いた IMS

FFPE 組織を用いて、トリプシン処理条件、マトリックスの選定、IMS 測定条件など、IMS の基礎的な条件検討を行う。

アミロイドーシス症例と対照症例の Tissue Microarray( TMA )ブロックを作成する。

TMA スライドで IMS を行い、検出されたピーク分布を比較する。

(3) 比較プロテオミクスを元にした IMS による蓄積蛋白質の同定

比較プロテオミクスで同定された原因蛋白質由来ペプチドのマスペクトルデータと IMS で得られたマスペクトルデータを統合解析する。

(4) IMS データの蓄積とパターン分類によるアミロイドーシス病型診断の試み

多くの症例で LC-MS/MS による比較プロテオミクス、IMS 解析およびデータの蓄積を行う。

蓄積されたデータをもとに、IMS のみでアミロイドーシスにおける異常蓄積蛋白質の同定と病型診断を可能とするシステムの構築を目指す。

#### 4 . 研究成果

(1) アミロイドーシスの FFPE 組織を用いた比較プロテオミクス

アミロイド症 11 例、対照 10 例の FFPE 組織を用いた比較プロテオミクスにより、2324 個のタンパク質を同定した。次に、2324 個のタンパク質の中から、今回検出された既存のアミロイド関連タンパク質と正の相関を示し、筋肉組織と関連したタンパク質と正の相関を示さないタンパク質 670 個を抽出した。これら中からさらに、質量分析における半定量法の指標である Abundances の値を用い、候補タンパク質の選別を行った。つまり、Abundances について「対照症例の平均値」をカットオフ値とし、それ以上で検出された対照症例がなく、複数のアミロイド症例からカットオフ値以上で検出されたタンパク質 12 個を最終的な候補タンパク質として選別した。これらのタンパク質を用い、クラスター解析、主成分分析を行ったところ、アミロイド症例と対照症例が明瞭に異なる分布となり、両者を区別することができた。

(2) 全身性 APOA-IV アミロイドーシスの同定

病理診断で原因物質の同定に難渋した（免疫染色で chain, chain, Amyloid A, 2-microglobulin, transthyretin の全てが陰性）全身性アミロイドーシスの剖検症例の FFPE 組織を用いたプロテオーム解析を行ったところ、Apolipoprotein A4 (APOA-IV) が本症例の組織中に高度に沈着していた。また、抗 APOA-IV 抗体を用いた免疫組織化学では、対象症例組織と比較して本症例で APOA-IV のびまん性陽性像が確認された。以上より、本症例は APOA-IV アミロイドーシスであることが確認された（図 1、発表論文 4）。

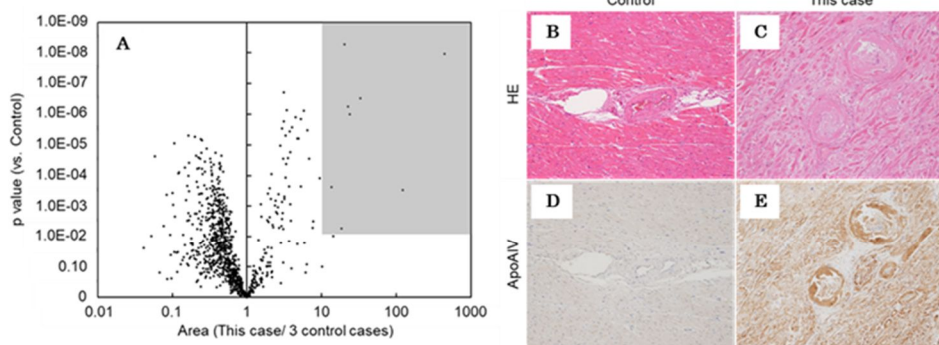


図1. A 比較プロテオーム解析で同定されたタンパク質のVolcano plot。灰色で示した領域は、有意に増加していたタンパク質 (ratio > 10 , P < 0.01) 。B-E APOA-IVのIHC。APOA-IVはアミロイド沈着部位で強陽性、対照症例では陰性。

(3) 比較プロテオミクスの結果を元にした IMS

研究成果 1 で得られた、アミロイドーシスで特異的に蓄積していることが示唆されたタンパク質群のペプチドの MS ピークを標的とした IMS を実施した。まずは、同一切片上の組織で比較解析する必要があると考え、アミロイドーシス症例、非アミロイドーシス症例の同一組織由来の Tissue Microarray ( TMA ) ブロックを作成した。TMA より作成したスライド標本を用いて、複数の条件で IMS の測定を行った結果、IMS でアミロイドーシス

を判別しうる有望なペプチドピークが同定された(図2)。今後、これらのタンパク質、特に検出されたペプチド由来抗体を作製し、それらを用いた免疫組織化学、質量分析で得られた  $m/z$  をターゲットとした IMS の検討をさらに行い、FFPE 組織切片を用いた IMS によるアミロイドの検出技術の確立を目指す。

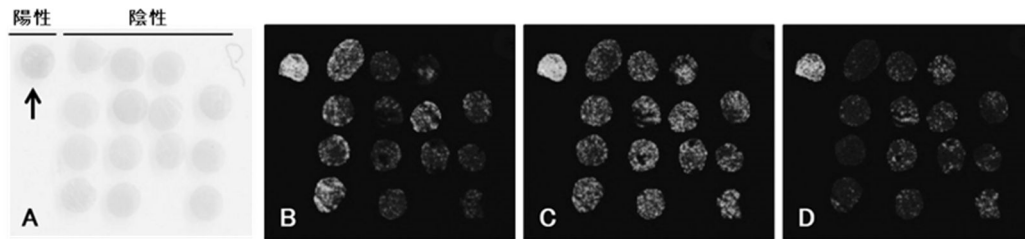


図2. 心臓のFFPE組織マイクロアレイ(アミロイドーシス1例、非アミロイドーシス14例)における、DFS染色とMALDI-IMSとの比較解析。(A) DFS染色(←, アミロイドーシス症例)。(B-D) IMSによるペプチドのイメージ、アミロイドーシスにユニークなタンパク質のペプチドを標的としたIMS。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kato Koichi, Fukai Moto, Hatanaka Kanako C, Takasawa Akira, Aoyama Tomoyuki, Hayasaka Takahiro, Matsuno Yoshihiro, Kamiyama Toshiya, Hatanaka Yutaka, Taketomi Akinobu	4. 巻 -
2. 論文標題 Versican Secreted by Cancer-Associated Fibroblasts is a Poor Prognostic Factor in Hepatocellular Carcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Annals of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1245/s10434-022-11862-0	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 Yui Ito, Akira Takasawa, Kumi Takasawa, Taro Murakami, Taishi Akimoto, Daisuke Kyuno, Yuka Kawata, Kodai Shano, Kurara Kirisawa, Misaki Ota, Tomoyuki Aoyama, Masaki Murata, Kotaro Sugimoto, Hideki Chiba, Tsuyoshi Saito, Makoto Osanai	4. 巻 113
2. 論文標題 Aberrant expression of claudin 6 contributes to malignant potentials and drug resistance of cervical adenocarcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1519 ~ 1530
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15284	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 Kyuno Daisuke, Takasawa Akira, Takasawa Kumi, Ono Yusuke, Aoyama Tomoyuki, Magara Kazufumi, Nakamori Yuna, Takemasa Ichiro, Osanai Makoto	4. 巻 10
2. 論文標題 Claudin-18.2 as a therapeutic target in cancers: cumulative findings from basic research and clinical trials	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Tissue Barriers	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/21688370.2021.1967080	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 Taro Murakami, Akira Takasawa, Asako Moriki, Yusuke Igaki, Hiroshi Ikeda, Kazuyuki Murase, Kohichi Takada, Kazufumi Magara, Tomoyuki Aoyama, Yusuke Ono, Daisuke Kyuno, Kumi Takasawa, Masaki Murata, Makoto Osanai	4. 巻 479
2. 論文標題 A systemic apolipoprotein A-IV-associated amyloidosis confirmed by proteome analysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Virchows Archiv	6. 最初と最後の頁 1041 ~ 1046
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00428-021-03073-x	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 Kumi Takasawa, Akira Takasawa, Taishi Akimoto, Kazufumi Magara, Tomoyuki Aoyama, Hiroshi Kitajima, Taro Murakami, Yusuke Ono, Daisuke Kyuno, Hiromu Suzuki, Makoto Osanai	4. 巻 565
2. 論文標題 Regulatory roles of claudin-1 in cell adhesion and microvilli formation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 36 ~ 42
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.05.070	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 Daisuke Kyuno, Akira Takasawa, Shin Kikuchi, Ichiro Takemasa, Makoto Osanai	4. 巻 1863
2. 論文標題 Role of tight junctions in the epithelial-to-mesenchymal transition of cancer cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbamem.2020.183503	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 Hime Suzuki, Nobuhiro Mikuni, Shintaro Sugita, Tomoyuki Aoyama, Rintaro Yokoyama, Yuto Suzuki, Rei Enatsu, Yukinori Akiyama, Takeshi Mikami, Masahiko Wanibuchi, Tadashi Hasegawa	4. 巻 60
2. 論文標題 Molecular Aberrations Associated with Seizure Control in Diffuse Astrocytic and Oligodendroglial Tumors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neurologia medico-chirurgica	6. 最初と最後の頁 147 ~ 155
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2176/nmc.oa.2019-0218	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 Taro Murakami, Akira Takasawa, Kumi Takasawa, Taishi Akimoto, Tomoyuki Aoyama, Kazufumi Magara, Yuki Saito, Misaki Ota, Daisuke Kyuno, Soh Yamamoto, Tadashi Hasegawa, Tsuyoshi Saito, Makoto Osanai	4. 巻 112
2. 論文標題 Aberrant expression of junctional adhesion molecule A contributes to the malignancy of cervical adenocarcinoma by interaction with poliovirus receptor/CD155	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 906 ~ 917
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14734	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 Yuki Saito, Akira Takasawa, Kumi Takasawa, Tomoyuki Aoyama, Taishi Akimoto, Misaki Ota, Kazufumi Magara, Masaki Murata, Yoshihiko Hirohashi, Tadashi Hasegawa, Norimasa Sawada, Tsuyoshi Saito, Makoto Osanai.	4. 巻 111
2. 論文標題 Aldolase A promotes epithelial mesenchymal transition to increase malignant potentials of cervical adenocarcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3071 ~ 3081
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14524	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 Yoshihiko Ino, Taishi Akimoto, Akira Takasawa, Kumi Takasawa, Tomoyuki Aoyama, Asako Ueda, Misaki Ota, Kazufumi Magara, Yohei Tagami, Masaki Murata, Tadashi Hasegawa, Tsuyoshi Saito, Norimasa Sawada and Makoto Osanai	4. 巻 35
2. 論文標題 Elevated expression of G protein-coupled receptor 30 (GPR30) is associated with poor prognosis in patients with uterine cervical adenocarcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Histology and histopathology	6. 最初と最後の頁 351-359
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14670/HH-18-157	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 Tomoyuki Aoyama, Akira Takasawa, Kumi Takasawa, Yusuke Ono, Makoto Emori, Masaki Murata, Takahiro Hayasaka, Naoki Fujitani, Makoto Osanai, Toshihiko Yamashita, Tadashi Hasegawa, Norimasa Sawada	4. 巻 189
2. 論文標題 Identification of Coiled-Coil Domain?Containing Protein 180 and Leucine-Rich Repeat?Containing Protein 4 as Potential Immunohistochemical Markers for Liposarcoma Based on Proteomic Analysis Using Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissue	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The American Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 1015 ~ 1028
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajpath.2019.01.013	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 青山 智志、高澤 啓、小野 祐輔、長谷川 匡、小山内 誠
2. 発表標題 FFPE 組織を用いたプロテオミクスによる脂肪肉腫診断マーカーの探索
3. 学会等名 第 44 回 日本医用マススペクトル学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤祐依、高澤啓、桐澤くらら、車野晃大、青山智志、小野祐輔、小山内誠
2. 発表標題 子宮頸部腺癌における claudin-6 発現とその意義
3. 学会等名 第67回日本病理学会秋期特別総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Akira takasawa, Yuki saito, Kumi Takasawa, Taishi Akimoto, Kazufumi Magara, Tomoyuki Aoyama, Yusuke Ono, Daisuke Kyuno, Yoshihiko Hirohashi, Tsuyoshi Saito, Makoto Osanai
2. 発表標題 Aberrant high expression of ALDOA contributes to the malignant transformation of uterine cervical adenocarcinoma
3. 学会等名 The 39 Sapporo International Cancer Symposium ( 国際学会 )
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kumi Takasawa, Akira Takasawa, Taishi Akimoto, Kazufumi Magara, Tomoyuki Aoyama, Yusuke Ono, Daisuke Kyuno, Makoto Osanai
2. 発表標題 Roles of claudin-1 in cell adhesion and microvilli of cervical adenocarcinoma cells
3. 学会等名 The 39 Sapporo International Cancer Symposium ( 国際学会 )
4. 発表年 2021年



1. 発表者名 真柄和史、高澤啓、高澤久美、青山智志、小野祐輔、及能大輔、小山内誠
2. 発表標題 乳がんにおいてJAM-Aの異常高発現が悪性化に関与する
3. 学会等名 第111回日本病理学会総会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------