

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K08485

研究課題名（和文）心内膜心筋生検試料のプロテオーム解析手法の確立と応用

研究課題名（英文）Establishment and application of proteome analysis methods for endomyocardial biopsy samples

研究代表者

若林 真樹（Wakabayashi, Masaki）

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・オープンイノベーションセンター・室長

研究者番号：70552024

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、心内膜心筋生検試料の解析を指向したプロテオーム解析・翻訳後修飾解析手法を確立した。FFPEまたはOCT包埋されたヒト心筋組織について、薄切片1枚で十分に分析可能な高感度手法を構築し、ヒト組織への応用を試みた。FFPE切片19例、OCT包埋組織19例の合計38例のヒト心筋生検組織について解析を実施したが、試料の経年劣化、個人差、摘出部位由来の発現差などを考慮した上で病態解析が可能なデータの取得には至らなかった。サンプル数の確保や試料回収プロトコル統一などが課題だが、本研究で確立した心筋生検組織の解析手法は、心疾患全般の解析へと応用可能なプラットフォームになることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトの診断・治療への応用を鑑みれば、ヒト試料の解析は研究者にとって最重要課題である。しかしながら、心疾患を対象とした研究においては、利用できるヒト組織試料が、剖検心や移植に伴う摘出心に制限されるため、病態の進行や回復を反映した時系列情報の取得は難しい。この障壁を乗り越えて様々な心疾患研究を推進可能な方法として、診療のために取得した心内膜心筋生検試料の残余検体の利用が挙げられる。本研究はこの残余検体を対象として分子レベルでの詳細な解析を可能とする手法を確立・提案するものであり、心疾患の研究領域において非常に意義深い研究と言える。

研究成果の概要（英文）：In this study, we established a proteomic and post-translational modification analysis method for the analysis of endomyocardial biopsy samples, and attempted to apply the method to human tissues. However, we were unable to obtain data that would allow us to analyze pathological conditions, taking into account sample aging, individual differences, and differences in expression derived from the site of removal. Although securing the number of samples and standardization of sample collection protocols are issues to be addressed, it is expected that the analysis method for myocardial biopsy tissue established in this study will serve as a platform that can be applied to the analysis of cardiac diseases in general.

研究分野：プロテオミクス

キーワード：心内膜心筋生検 プロテオミクス

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

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や翻訳後修飾情報は、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。

心疾患を対象としたプロテオーム解析例も多数報告がなされてはいるが、ヒト試料を用いた研究の推進には大きな障壁が存在する。まず、研究に利用できるヒト組織試料が剖検心や移植に伴う摘出心に制限されるため、病態の進行や回復を反映した時系列情報の取得は難しい。また、剖検例や移植例においては、摘出からホルマリン固定などを行うまでの間にタンパク質や核酸の激しい分解が起こることも知られている。このようにヒト試料には不確定要素が多く、モデル動物を用いた解析が主となってはいるが、ヒトの診断・治療への応用を鑑みれば、ヒト試料の解析が最重要課題である。上記障壁を乗り越えて様々な心疾患研究を推進可能な方法として、診療のために取得した心内膜心筋生検試料の残余検体の利用が考えられる。複数回の心内膜生検を伴う疾患の生検試料を用いた解析が実現すれば、病態の変化を追跡可能な時系列情報を取得できるため、例えば、心筋症病態の詳細な評価、移植後の拒絶反応や炎症反応評価、左室補助人工心臓装着時に起こるリバーシリモデリング現象の分子機序解明といった様々な研究を大きく推進することが期待される。また、生検試料であれば採取後すぐにホルマリンによる固定処理が可能であるため、組織の分解も最小限に抑えた状態で解析可能となる。生検試料を対象とする際の課題は、組織が 1mm² 角程度と非常に小さいうえに、遡及的な診断・検討に使用することも多いため、薄切片 1 枚程度の極めて微量な組織のみを用いて解析を完結する必要があること。また、ホルマリン固定によって起こる人工的な修飾に起因するタンパク質の量や質の低下を前提として、再現性良く大規模データを解析する必要があることが挙げられる。従って、高感度なプロテオーム解析手法と再現性の高い高効率なデータ解析手法を構築できるかどうかが本研究の最も重要な要素である。

2. 研究の目的

本研究の最大の目的は、心内膜心筋生検試料を用いたプロテオーム解析手法を構築し、ヒト組織を用いて各種心疾患の病態変化を時系列情報とともに詳細に評価する手法を確立することである。これを実現するにあたっては、極微量の生検試料を解析可能な高感度プロテオーム解析技術の確立とホルマリン固定試料の翻訳後修飾解析基盤の確立が必要である。

3. 研究の方法

本研究では以下の項目について研究を実施した。

- ホルマリン固定組織の翻訳後修飾解析に向けた、試料前処理手法の開発
- 心内膜心筋生検試料（ホルマリン固定）のクオリティチェック指標の創出
- プロテオーム、リン酸化プロテオームの網羅的解析手法の確立
- 実試料への応用

4. 研究成果

極微量ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）組織の翻訳後修飾解析に向けた試料前処理手法の開発に関して研究を実施した。まず、ホルマリン固定までに要する時間と試料劣化（タンパク質分解）の関係を明らかにするため、マウス心臓組織を摘出後、室温または 4℃ にて 0-24h 静置し、ホルマリン固定を行ったサンプルに関して、比較定量プロテオーム解析を行った。4℃ 保管した試料に関しては、6 時間静置しても顕著な分解は確認されなかった。しかしながら、室温保管では、静置時間 3 時間であっても明らかに分解し始めるタンパク質が 80 種以上存在し、24 時間後には 200 以上のタンパク質の分解が顕著となった。以上の結果をもとに、実試料への応用に先立つクオリティチェック指標を構築した。

次に、極微量 FFPE 試料の翻訳後解析に向けて、チューブやチップを用いた操作を全て省略することで試料ロスを最小化し、分析感度を最大化する手法の開発をすすめた。ガラスキャピラリー内に、リン酸化タンパク質（ペプチド）濃縮用ビーズと疎水性ビーズを連続的に充填し、このキャピラリーに 1000 細胞相当の HEK 細胞のライセートを導入することでリン酸化ペプチドの濃縮を行ったところ、6000 種程度のリン酸化サイトの同定に成功した。本手法は以前より構築してきたキャピラリー内でのタンパク質抽出・消化法と容易に組み合わせることが可能で、

さらなる感度向上が期待できる。以上の結果より、心内膜生検試料に対しても適用可能な十分な感度を達成できたと考えている。

実際にマウスから摘出したホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）心筋組織に対して、開発した極微量試料の前処理手法を適用し、網羅的翻訳後修飾解析を試みたところ、組織切片一枚で十分に分析可能であることが分かった。ただし、脱パラフィンの行程で試料のロスを避けることができず、感度は30-50%程度に低下してしまうため、引き続き改善手法を検討する必要があると考えている。その他、翻訳後修飾の網羅的解析についても、PEAKSソフトウェアによるPEAKS PTMサーチやオープンサーチにより、数十種類の修飾を同定することは可能であったが、同定精度や感度は低く、何らかの形で試料の濃縮や分離の向上が必要であると考えられる。例えば、ヒストンについては前処理として抗体による濃縮を行うことで、既知修飾のみならず、新規な修飾を複数同定することが可能であり、定量評価を行うことも可能であった。今後はさらに、多段階のキャピラリーカラム内分離を活用することで網羅性の向上などが期待できる。また、基礎研究に利用可能なヒト心筋生検組織は非常に稀少で、入手は非常に困難であるため、解析手法を確立したFFPE組織に加えて、OCT包埋組織に対してもプロテオーム解析手法を適用可能とすることで、解析可能な心筋生検組織の入手可能性が高くなることを期待し、OCT包埋心筋組織を用いた高効率なプロテオーム解析の確立を試みた。まず、OCT包埋マウス心筋組織から切り出した薄切切片に対して尿素・グアニジン・PTS法などを用いた通常の前処理手法を適用したところ、新鮮凍結組織の場合と比較してタンパク質の抽出・還元アルキル化・消化の効率が低下することが分かった。OCTコンパウンドは親水性で容易に除去可能と推測していたが、実際にはサイズ排除や逆相カラム等の手法を用いて除去する必要があることが明らかとなった。しかしながら、薄切切片のような極微量の試料の場合にはキャピラリー内の固相カラム上でそのまま前処理を完了することで、新鮮凍結組織と同様のデータを取得可能であったため、OCT包埋組織についても超高感度解析への適用が可能であることが示された。

ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）切片19例、OCT包埋組織19例の合計38例の心筋生検組織について解析を実施した。いずれもグローバルプロテオミクスを行うには十分なタンパク質量を回収可能であった。前年度までに確立した解析手法を適用することで、取得可能な情報の最大化できるよう解析を行った。結果としては、試料の経年劣化によるタンパク質発現量の変動（分解）や、疾患ではなく個人差に由来するタンパク質発現変動、摘出した心筋の部位によるタンパク質の発現差、などのファクターを考慮した上で病態の解析が可能なくオリティのデータを創出するには至らなかった。課題点は、第一にサンプル数の確保であると考えられる。また、対象疾患を定めただうえで、できる限り同等の心臓部位の解析を可能とする前向き研究を前提とした試料回収プロトコルの立案も非常に重要であると考えられる。本研究で確立した心筋生検組織の解析手法は、心疾患全般の解析へと応用可能なプラットフォームになることが期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Rabaglino Maria Belen, Wakabayashi Masaki, Pearson James Todd, Jensen Lars J?rn	4. 巻 200
2. 論文標題 Effect of age on the vascular proteome in middle cerebral arteries and mesenteric resistance arteries in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mechanisms of Ageing and Development	6. 最初と最後の頁 111594 ~ 111594
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mad.2021.111594	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 Yuizumi Naoya, Harada Yujin, Kuniya Takaaki, Sunabori Takehiko, Koike Masato, Wakabayashi Masaki, Ishihama Yasushi, Suzuki Yutaka, Kawaguchi Daichi, Gotoh Yukiko	4. 巻 39
2. 論文標題 Maintenance of Neural Stem-Progenitor Cells by the Lysosomal Biosynthesis Regulators TFEB and TFE3 in the Embryonic Mouse Telencephalon	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stem Cells	6. 最初と最後の頁 929 ~ 944
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/stem.3359	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 Kitagori Koji, Oku Takuma, Wakabayashi Masaki, Nakajima Tomoya, Nakashima Ran, Murakami Kosaku, Hirayama Yoshitaka, Ishihama Yasushi, Ohmura Koichiro, Morinobu Akio, Mimori Tsuneyo, Yoshifuji Hajime	4. 巻 25
2. 論文標題 Expression of S100A8 protein on B cells is associated with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Arthritis Research & Therapy	6. 最初と最後の頁 76 ~ 87
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13075-023-03057-z	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 Murakami Yusuke, Nishigori Mitsuhiro, Yagi Hiroaki, Osaki Tsukasa, Wakabayashi Masaki, Shirai Manabu, Son Cheol, Iba Yutaka, Minatoya Kenji, Kusano Kengo, Tomita Tsutomu, Ishibashi-Ueda Hatsue, Matsuda Hitoshi, Minamino Naoto	4. 巻 21
2. 論文標題 Serum proteomic identification and validation of two novel atherosclerotic aortic aneurysm biomarkers, profilin 1 and complement factor D	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Proteome Science	6. 最初と最後の頁 11 ~ 23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12953-023-00212-x	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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 細胞外小胞新規大動脈瘤マーカー	発明者 若林真樹	権利者 国立研究開発法人国立循環器病研究センター
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-058302	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------