

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 8 月 28 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659185

研究課題名（和文）肺癌組織マイクロアレイを用いた質量分析

研究課題名（英文）Mass spectrometry using tissue microarray of the lung cancer

研究代表

鶴山 竜昭 (TSURUYAMA TATSUAKI)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：00303842

研究成果の概要（和文）：ヒト癌患者のホルマリン固定パラフィン包埋された病理組織標本を、アセトニトリルを含む反応液中で膨化処理し、気密下環境下で加圧、加熱による処理を、ペプチドのイオン化を増強することに成功した。その成果としてマトリックス支援レーザーイオン化飛行時間型質量分析（MALDI-TOF）法による感度を 100 倍程度増強できた。この方法を用いて、正常組織との比較において癌組織において腫瘍マーカー H2A を同定することに成功した。

研究成果の概要（英文）：A novel chemical treatment technique for mass spectrometry using formaldehyde fixed paraffin embedded specimen of human cancer tissue was developed. By this technique including swelling process and heating under high pressure in a reaction solution containing acetonitrile, peptide ionization was significantly enhanced. As a result, detection sensitivity for Matrix-assisted laser ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) was augmented more than 100-fold. We were successful in identification of a tumor marker H2A protein in cancer tissue in comparison with the normal tissue.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|-------|-----------|---------|-----------|
| 交付決定額 | 2,900,000 | 870,000 | 3,770,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：肺癌、質量分析、組織マイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

医学部附属病院内に多数保管されている患者ホルマリン固定パラフィン包埋病理組織標本 (formaldehyde fixed paraffin embedded specimen、以下頭文字をとって FFPE) は、固定によるタンパク質の変化により研究用試料としての用途は、限られてきた。これまで FFPE は、古典的な染色方法による形態観察、

DNA の抽出によるゲノム解析、免疫組織化学など形態学的な研究に利用されるにとどまり、病変部の原因となる新規のタンパク質を抽出し、同定することは困難であった。

一方で、FFPE は、基礎実験に用いられる試料と異なり、病変部構成細胞、およびその位置情報などにもとづく組織形態に固有な、本来の病態を理解するのに必須な診断情報を含

んでいる。

このため、病理組織形態とタンパク質発現情報を統合的に研究する基盤技術を開発することは、より病態の本質への理解と、実用的な治療、分子標的薬の開発に重要なデータを与えることが期待される。

2. 研究の目的

① FFPE を用いてのタンパク質分析を行い、発癌に関わる診断マーカーを同定することが目的であった。末梢血中の濃度測定など生化学的検査診断マーカーの開発につなげる。

②同時に、これまで難しいとされてきた FFPE からのタンパク質の抽出、質量分析技術の開発を行うことを目的とした。以下詳細を記載する。

3. 研究の方法

①FFPE に、2, 5-dihydroxybenzoic acid (DHBA) などの低分子有機化合物マトリックスを負荷することで、レーザー照射によるペプチドイオン化過程での断片化を抑制し、質量分析を行うマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法 (MALDI-TOF/MS) を採用する。

② 標本組織のタンパク質分解酵素、加熱処理などによる抗原賦活化の方法を組み合わせることにより、組織標本を用いた質量分析の前処理方法をあわせて実施する。

③ 研究試料としては病理診断科にある試料を用いて多数の患者の標本が一枚に搭載された組織マイクロアレイを作成する。肺癌ほか消化器癌のものも作成した。

4. 研究成果

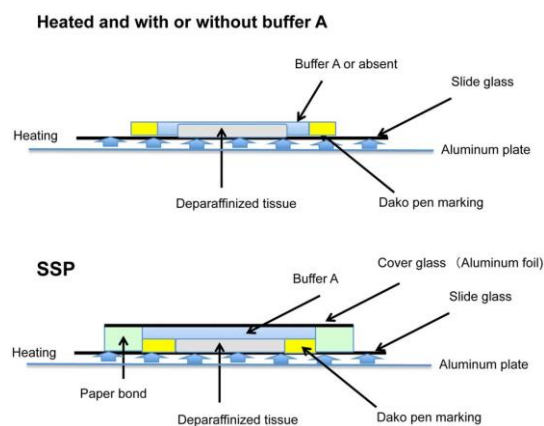
以下、実際に論文報告、学会報告した成果に従って報告する。肺癌のほか消化器癌もあわせて検討した。

①**成果 1：質量分析スペクトラムのシグナル増感について下記の方法を確立した。**

処理液 A (アセトニトリル 10% (v/v) および

2.5mM 炭酸水素アンモニウム混合液) を FFPE に載せ、まず 37 度で保温を 1 時間行い、疎水性の高い FFPE を翌処理液になじませる。この過程により組織は、処理液を吸収した膨化 (swelling) する。これを膨化過程と以下呼ぶ。

その後、次図にあるように、顕微鏡スライド硝子に組織を載せたあと、周りを特殊樹脂で囲み上にカバー硝子をおいて、気密化状態におき、処理液 (アセトニトリル 10% (v/v) および 2.5mM 炭酸水素アンモニウム混合液) 水溶液の飽和蒸気圧下で加熱処理を行う。



(垣本、鶴山、羽賀ら PLoS One, 2012)

その後、200 μ l の濃度 0.05 μ g/ μ L のトリプシン溶液と処理液 A の混合液にて 24 時間 37 度で保温する。タンパク質消化によるイオン化後の飛行を容易にする。

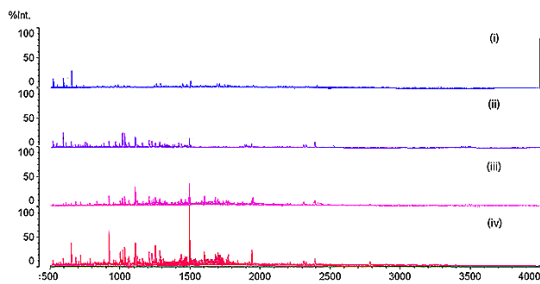
さらにペプチドのイオン化を支援するマトリックスは、2, 5-dihydroxybenzoic acid (DHB) 50% methanol を用いて、これと 0.1% トリフルオロ酢酸の混合液を支援マトリックスとして用いて標本の表面に島津製作所のケミカルプリンタ (CHIP-1000) を使って滴下する。乾燥させ結晶化させる。滴下量は一スポットあたり 15nL である。

質量分析スペクトラムはマトリックス支援型飛行時間測定型タンデム質量分析 (以下 MALDI-TOF MS/MS) 方で解析した。窒素 レーザーは 337nm パルス (周波数 10Hz) で照射した。得られたスペクトラムは質量電荷比

m/z で 500-4000 の領域で解析を行った。キャリアブレーションのため副腎皮質刺激ホルモン ATCH 断片をコントロールにおいた。

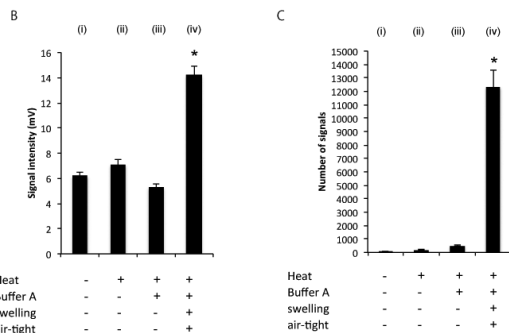
②成果 2；従来の方法に比べシグナル強度の有意な増強およびシグナルノイズ比の増強が得られた。

前処理方法の詳細な条件検討のため、さらに条件を変え、検討した。



(垣本、鶴山、羽賀ら PLoS One, 2012)

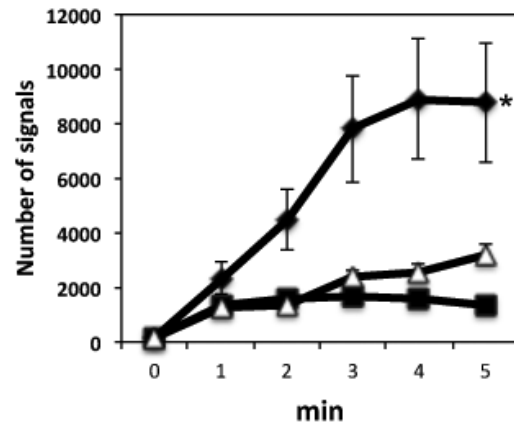
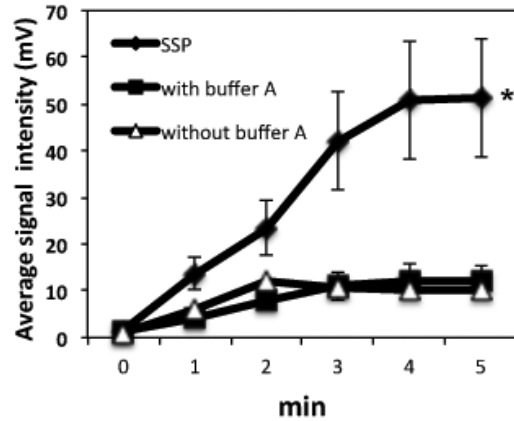
上記の A 図で (i) は陰性対象 FFPE で、未処理のもの、(ii) は処理液を用いないで非気密化条件で加熱のみしたもの、(iii) は処理液を用いて気密加熱のみしたもの、(iv) は事前に膨化過程を経て、気密加熱したものを示す。m/z=850, 1500 付近の大きなピークに注目すると (iv) で有意に高くなっていることがわかる。1500 付近はヘモグロビンβであった。



(垣本、鶴山、羽賀ら PLoS One, 2012)

上グラフは加熱、処理液 A (Buffer A)、膨化過程、気密条件下においたかどうかで比較し

た、シグナルの強さ (mV) と検出できたシグナルの数を示している。膨化および気密化加熱状態においたものが有意に両者の値が増加したことが示された。前者は 500-4000 の領域で積分値をとり、シグナルの数で割って平均を出している。加熱処理時間経過による変化は次のとおりである。



(垣本、鶴山、羽賀ら PLoS One, 2012)

シグナルの強さ (mV) と検出できたシグナルの数ともほぼ 3-4 分で飽和に達しており、FFPE の挫滅のおそれもあることを考えると、3 分程度でよいと考えられた。

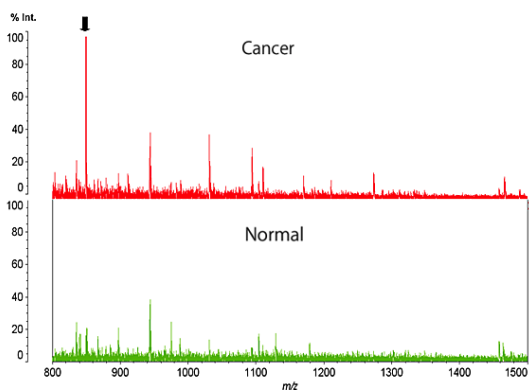
なお上で示した方法は肺癌、大腸癌組織で有効であった。

③成果 3：実際に肺癌、大腸癌組織でヒストン H2A が得られた。このうち大腸癌組織ではこのタンパク質は有意に癌組織で高かった (垣本、鶴山、羽賀ら PLoS One, 2012)。肺

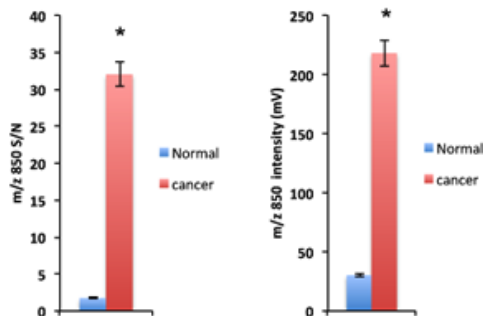
癌組織については個体差が大きく、現在さらに組織マイクロアレイによる検討を続けている(吉澤、鶴山、羽賀ら 2013 J Thorac Oncol)。

②で示した方法で、正常組織と癌組織の分析を行い両者のデータを比較することでマーカーとなるタンパク質のペプチド断片を得ることにつとめた。

癌と正常組織ではm/z 値 80 付近で 100 mV オーダーの強いシグナルが肺癌、大腸癌組織で得られた。



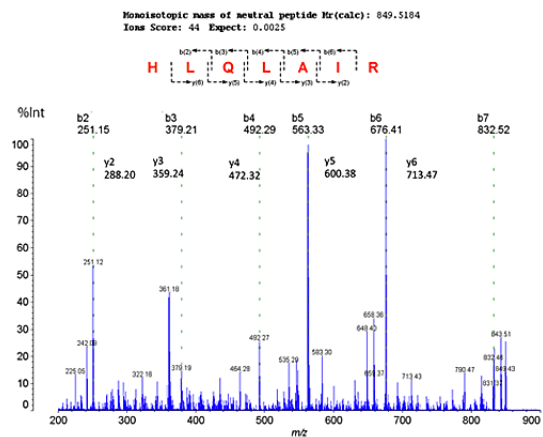
(垣本、鶴山、羽賀ら PLoS One, 2012)
下向きの一がm/z値850付近のシグナルを示す。



(垣本、鶴山、羽賀ら PLoS One, 2012)
シグナルの強さの絶対値 (mV) および、バックグラウンドノイズの平均値に対するシグナル強度比 (S/N) の値を示す。いずれも有意に検討した患者6名および正常組織コントロールからなる組織アレイでの結果を示す (*P<0.001)。

⑤/z 値 850 付近のシグナルはさらに質量分析による同定が行われヒストン H2A タンパク質

の断片であることが判明した。スペクトラムを下に示す。



(垣本、鶴山、羽賀ら PLoS One, 2012)

まとめ

本研究での成果

成果 1 : 質量分析スペクトラムのシグナル増感について下記の方法を確立した。

成果 2 ; 従来の方法に比べ質量分析の感度、特異性が顕著に増した。

成果 3 : 新しい癌マーカーの一つヒストン H2A が同定された。

今後の検討課題

肺癌組織マイクロアレイを用いた更に組織型との相関解析による新規の癌マーカーの同定

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 4 件)

1. Kakimoto Y, Tsuruyama T (Corresponding author), Yamamoto T, Furuta M, Ozeki M, Yoshizawa A, Haga H, Keiji Tamaki. Novel in situ Pretreatment Method for Significantly Enhancing the Signal In MALDI-TOF MS of Formalin-fixed Paraffin-embedded Tissue Sections. PLoS One. 2012;7(8):e41607. Epub 2012 Aug 10.

2. Hori M, Nakamachi T, Rakwal R, Shibato J, Ogawa T, Aiuchi T, **Tsuruyama T**, Tamaki K and Shioda S. Transcriptomics and proteomics analyses of the PACAP38 influenced ischemic brain in permanent middle cerebral artery occlusion model mice. J Neuroinflammation. 2012 Nov 23;9(1):256.
3. Yoshizawa A, Sumiyoshi S, Sonobe M, Kobayashi M, Fujimoto M, Kawakami F, **Tsuruyama T**, Travis WD, Date H, **Haga H**. Validation of the IASLC/ATS/ERS Lung Adenocarcinoma Classification for Prognosis and Association with EGFR and KRAS Gene Mutations: Analysis of 440 Japanese Patients. J Thorac Oncol. 2013 Jan;8(1):52-61.
4. Fujimoto M, Yoshizawa A, Sumiyoshi S, Sonobe M, Kobayashi M, Koyanagi I, Aini W, **Tsuruyama T**, Date H, **Haga H**. Stromal plasma cells expressing immunoglobulin G4 subclass in non-small cell lung cancer. Hum Pathol. 2013 Mar 1.

〔学会発表〕（計 2 件）

鶴山 竜昭, 吉澤明彦, 羽賀博典 Novel Pretreatment to Significantly Enhance the Signal In Mass Spectrometry Imaging of FFPE 日本病理学会会誌(0300-9181)101 巻 1 号 Page275 (2012. 03)

鶴山 竜昭, 吉澤明彦, 羽賀博典 質量分析イメージング法による消化器癌腫瘍マーカーの同定と転移の診断 日本病理学会会誌(0300-9181)100 巻 1 号 Page358 (2011. 03)

〔図書〕（計 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 件）

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

○取得状況（計 件）

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年月日：
 国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

京都大学医学研究科附属総合解剖センター
 ホームページ (http://www.cas.med.kyoto-u.ac.jp/research_introduction)

朝日新聞全国版掲載(2012年8月12日)
 「見えないかがんの気配キャッチ 京大と島津製作所が新技術」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鶴山 竜昭 (TSURUYAMA TATSUAKI)
 京都大学・医学研究科・准教授
 研究者番号：00303842

(2) 研究分担者

羽賀 博典 (HAGA HIRONORI)
 京都大学・医学研究科・教授
 研究者番号：10252462

(3) 連携研究者

()

研究者番号：