

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25513010

研究課題名(和文) 質量イメージングによるアミロイド病変局在性異常修飾蛋白の同定とフィブリル形成機序

研究課題名(英文) Identifications of abnormal modified proteins localized in amyloid tissues by MALDI-imaging and clarification of formation of amyloid fibril

研究代表者

中西 豊文 (Nakanishi, Toyofumi)

大阪医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10247843

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：アミロイド原性を有する分子の中で免疫グロブリン軽鎖並びにトランスサイレチンを焦点に当て、解析を実施した。アミロイド組織標本として、心筋/肺組織/皮膚/直腸組織切片を作成し、賦活化/on-tissue酵素消化/IMS解析及びQ1TMSMS解析/データベース検索にてアミロイド症起因タンパク質分子を明らかにした。一方、今回新たに乳癌患者の術中迅速病理診断標本から診断指標をなり得る数種のタンパク質分子を同定し組織免疫染色等病理検査結果と比較した。乳癌の悪性度との関与を示すと考えられるタンパク質分子を4種類COL1A2、PPIA、H2A1A、H4)同定することができた。

研究成果の概要(英文)：MALDI-imaging MS (IMS) with MSMS analysis is a new powerful tool for the identifications of not only disease-related proteins in formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue section but also protein/peptides/drug/ medicine in fresh frozen tissues. This IMS used to reveal the mass profiles and spatial distribution of proteins in tissue sections and/or the digested peptides derived from the deposited protein in pathologic organs and then the MSMS analysis is identified the amino acid sequence of the detected proteins in the tissue section. Moreover, the on-tissue digestion combined with MALDI-IM-TOF-IMS approach allows a proteomics "bottom-up" strategy with clinical samples, especially perioperative isolated tissues and FFPE tissues conserved for a long time in clinical samples bank.

研究分野：検査診断学

キーワード：質量イメージング アミロイドーシス 沈着分子 コンゴレッド染色性 補助的病理診断

## 1. 研究開始当初の背景

従来のプロテオーム手法による組織内沈着タンパク質の解析は、FFPE 病理標本より標的タンパク質を高濃度尿素 / 塩酸グアニジン溶液等により可溶化・抽出操作等が必須であり、同定した標的タンパク質の組織内局在性に関する情報は得られないが、本研究は、IMS 法を用いた組織切片上での直接、標的タンパク質の詳細構造解析並びに組織内局在性の同定であり、アミロイド原性タンパク質のような組織内沈着分子の解析には適している。IMS 法を用いた組織内バイオマーカー検索は盛んに行われているが、組織内アミロイド原性タンパク質解析へ応用した報告例は、国内外共に少ない。

今回、IMS 法による FFPE 病理標本を用いたアミロイド原性タンパク質の異常修飾構造の同定およびアミロイド症診断と平行して、我々が提唱している「アミロイド原性獲得機序仮説」を FFPE 標本解析により立証し、チオール基の修飾異常と SSA をはじめとする変性タンパク質沈殿症の発症機序解明に繋げて行く。

## 2. 研究の目的

マトリックス支援レーザー脱離飛行時間型質量分析イメージング (IMS) 法によるホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 病理組織内の疾患関連マーカーの検出・同定とその組織内局在性に関する応用研究が行われている。今回、FFPE 組織内に沈着するアミロイド原性タンパク質を IMS 法にて同定し、その診断に寄与する。特に、トランスサイレチン (TTR) 起因アミロイド症に注目し、アミロイド斑を形成する TTR 修飾構造変化とそのアミロイド原性獲得との関連性を検証する。FFPE 試料ではタンパク質は強固に重合し、完全分子の直接検出は不可能であるが、組織切片上で酵素消化し、得られた断片化ペプチド群を IMS / MSMS にて分子内異常修飾構造を同定し、アミロイド症などの変性タ

ンパク質沈殿症の発症機序解明の糸口を掴む。

## 3. 研究の方法

アミロイド原性を有する分子の中でインスリン、免疫グロブリン軽鎖、2 ミクログロブリン並びにトランスサイレチンを焦点に当て、解析を実施した。アミロイド組織標本として、心筋 / 肺組織 / 皮膚 / 直腸組織切片を作成し、賦活化 / on-tissue 酵素消化 / IMS 解析及び QITMSMS 解析 / データベース検索にてアミロイド症起因タンパク質分子を明らかにした。一方、今回新たに乳癌患者の術中迅速病理診断標本から診断指標をなり得る数種のタンパク質分子を同定し組織免疫染色等病理検査結果と比較した。乳癌の悪性度との関与を示すと考えられるタンパク質分子を 4 種類 (COLIA2、PPIA、H2A1A、H4) 同定することができた。

病院病理部に依頼された FFPE 病理組織切片を加熱処理にて賦活化し、on-tissue 酵素消化後、IMS (MSMS) 解析 / データベース検索にてアミロイド原性タンパク質並びにその異常修飾構造を同定する。同時に、断片化ペプチドの局在性を可視化し、従来の病理組織学的検索結果と比較する。更に、同定したアミロイド原性タンパク質分子内の特定アミノ酸 (Cys / Ser / Thr) のチオール (SH) / 水酸 (OH) 基を含む断片化ペプチドの修飾構造情報を詳細解析し、*in vitro* 実験結果より提唱した「アミロイド原性獲得反応」にて生成する高反応性アクリルアミノ酸 (デヒドロアラニン等) の存在を立証し、我々の仮説を立証する。また、*in vivo* アミロイド誘導化組織切片を用いて同様に詳細構造解析し、アミロイド原性獲得との関連性を検証する。

## 4. 研究成果

アミロイド原性を有する分子の中でインスリン、免疫グロブリン軽鎖、2 ミクログロブリン並びにトランスサイレチンを焦点に当て、解析を実施した。アミロイド組織標本として、心筋 / 肺組織 / 皮膚 / 直腸組織切

片を作成し、賦活化 / *on-tissue* 酵素消化 / IMS 解析及び QITMSMS 解析 / データベース検索にてアミロイド症起因タンパク質分子を明らかにした。一方、今回新たに乳癌患者の術中迅速病理診断標本から診断指標をなり得る数種のタンパク質分子を同定し組織免疫染色等病理検査結果と比較した。乳癌の悪性度との関与を示すと考えられるタンパク質分子を 4 種類 COL1A2、PPIA、H2A1A、H4) 同定することができた。

#### 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 12 件)

1. Kamata T, Shima N, Sasaki K, Matsuta S, Takei S, Katagi M, Miki A, Zaitzu K, Nakanishi T, Sato T, Suzuki K, Tsuchihashi H. Time-course mass spectrometry imaging for depicting drug incorporation into hair. *Anal. Chem.* 87:5476-81, 2015.
2. Shima N, Sasaki K, Kamata T, Matsuta S, Katagi M, Miki A, Zaitzu K, Sato T, Nakanishi T, Tsuchihashi H, Suzuki K. Single-hair analysis of zolpidem on the supposition of its single administration in drug-facilitated crimes. *Forensic Toxicol.* 33:122-130, 2015.
3. Sato N, Nakanishi T, Nirasawa T, Uchiyama K, Takubo T, Caprioli RM. Clustering and topology of proteins expressed in a single sliced human retina tissue section by MALDI-MS imaging and MS/MS analysis. *Bulletin of the Osaka Medical College* 60(1):35-39, 2014.
4. Y.Ooi, H.Shiba, K.Naga, T.Higashiyama, T.Nakanishi, T.Nakano, A.Ukimura and T.Gonoi. Lung *Nocardia elegans* Infection Diagnosed on Matrix-assisted Laser Desorption Ionization-time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS). *Internal Medicine* 53:2111-3, 2014.
5. Nakanishi T, Nirasawa T, Takubo T. Quantitative mass barcode-like image of nicotine on single longitudinally sliced hair sections of long-term smokers by matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry imaging. *J. Anal. Toxicolog.* 38:349-353, 2014.
6. Takai S, Jin D, Sakonjo H, Takubo T, Nakanishi T. Significance of the vascular concentration of angiotensin II receptor blockers on the mechanism of lowering blood pressure in spontaneously

hypertensive rats.

7. Nakanishi T, Takai S, Jin D, Takubo T. Quantification of candesartan in mouse plasma by MALDI-TOFMS and in tissue sections by MALDI-imaging using the stable-isotope dilution technique. *Mass Spectrom(Tokyo)* 2(1):A0021, 2013.
8. Nakanishi T, Ito M, Nirasawa T, Tsuji M, Takubo T. Topologies of amyloidogenic proteins in Congo red-positive sliced sections of formalin-fixed paraffin embedded tissues by MALDI-MS imaging coupled with *on-tissue* tryptic digestion. *Clin. Biochem.* 46:1595-1600, 2013.

#### 9. 中西豊文 安定同位元素標識体を用いた規格化と定量イメージング

- 質量分析 64(1): 25-29, 2016.
10. 中西豊文 MALDI-TOFMS による微生物由来 r16S 関連因子解析と感染症迅速診断 *外来小児科* 18(2):171-77, 2015.
11. 佐藤七夕子、中西豊文 質量分析法による医学応用研究 *大阪医科大学雑誌* 72(3):103-112, 2014.
12. 高井真司、金徳男、田窪孝行、中西豊文 組織学的薬物動態解析の重要性 *臨床化学* 42(4):317-23, 2013.

[学会発表](計 5 件)

1. 東山智宣、池本敏行、大井幸昌、中西豊文、岡田仁克. 凍結融解前処理を用いた MALDI-TOF MS による酵母様真菌同定法の検討. 第 58 回日本臨床検査医学会近畿支部総会 Oct.17-18, 2015 .大阪
2. 中西豊文、五十嵐一雄. 毛髪縦断面 MALDI-MS -SRM イメージングによる薬物 / 嗜好品の定量的動態解析. 日本法中毒学会第 33 年会 Jul.4-5, 2014.名古屋
3. 中西豊文. 質量イメージング法による病理組織診断の可能性とその将来像 第 60 回日本臨床検査医学会学術集会 Oct.31, 2013. 神戸
4. 東山智宣、池本敏行、松山由美子、中西豊文、田窪孝行. MALDI-TOF MS 法による 2 菌種混在試料の迅速同定に関する基礎的検討 (第 2 報) 第 60 回日本臨床検査医学会学術集会 Oct.31, 2013.神戸
5. 七里元督、石田規子、萩原義久、吉田康一、中西豊文. 質量分析を利用した酸化生成物の解析 第 38 回日本医用マススペクトル学会年会 Sep.25-26, 2013. 神戸

[図書](計 1 件)

#### 中西豊文

医用質量分析ガイドブック (丹羽利允、野村文夫編集) 医用質量分析ガイドブック (丹羽利允、野村文夫編集) 分担: 『臨床検査にお

けるイメージング質量分析』  
2013年、190ページ(pp50-55)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中西豊文 (Toyofumi Nakanishi)

大阪医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10247843

### (2) 研究分担者

辻 求 (Motomu Tsuji)

大阪医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60144466

### (3) 連携研究者

田窪考行 (Takayuki Takubo)

大阪医科大学・医学部・教授

研究者番号：6016335

(平成26年度まで研究分担者)