

臨床サンプルを用いたバイオマーカー研究への取り組み

前処理から解析までのプラットフォーム

板東泰彦

Yasuhiko BANDO

エーエムアール株式会社

株式会社バイオシス・テクノロジーズ

〒152-0031 東京都目黒区中根 2-13-18

TEL: 03-5731-2281

e-mail: y-bando@amr-inc.co.jp

1. はじめに

質量分析装置を用いたプロテオミクス研究は基礎の生物学から臨床医学研究まで幅広く利用されている。LC/MS装置の前段に配備されたクロマトグラフィーは分離することによりその複雑性を少なくし且つナノ化することにより微量サンプルを濃縮し、検出器としての質量分析装置に送り込むことができる。質量分析装置の性能向上は微量に存在する蛋白質の同定や定量を可能にしたが、実際には血液（プラズマ）などのような多くの蛋白質が複合したサンプルを一度のLC/MSで解析して微量な蛋白質を同定、定量することはできない。それは質量分析装置のダイナミックレンジとサンプルのダイナミックレンジにはいまだに大きな差が存在するためである。扱うサンプルにより前処理技術が異なり、その処理技術は研究戦略において重要な役割を演ずる。本講演では蛋白質解析におけるさまざまな前処理技術および、高感度LC/MS解析における装置 Optimizaton、そしてそのプラットフォーム技術開発によるバイオマーカー研究への取り組みの実際を紹介する。

2. 蛋白質の翻訳後修飾を保存する新規処理法 Heat Stabilization

プロテオーム解析において蛋白質の動的な変化（量、質）の情報を得ることは大きな意義を持つ。臨床組織などを *in vivo* の状態を保ったまま網羅的に蛋白質解析を行うことが望ましい。またシグナル伝達において蛋白質のリン酸化は重要な役割を持ち、そのリン酸化部位の同定やストイキオメトリーを時系列的に知ることは病態解析にとって非常に重要である。しかし、サンプリングされた後の組織サンプルはプロテアーゼやその他の酵素などの影響で *in vivo* の状態の蛋白質総体をみることは非常に困難である。現在行われている組織サンプルの保存は液体窒素などを利用して瞬時に凍結させる方法やホルマリン固定パラフィン包埋法が用いられているが、凍結やホルマリン固定されるまでに要する時間は様々で、処理までの時間にプロテアーゼを含む様々な酵素群の活性により蛋白質の Degradation や脱リン酸化が進行する。また凍結された組織サンプルを解凍後も同様に蛋白質の状態は瞬時に変化していく。その結果、プロテオーム解析によって得られるものは

Ex vivo と in vivo のミックスした情報となる。現行ではサンプル採取後のこれらの変化を対処する方法としてインヒビターや変性バッファーが用いられている。けれども、これらの変化を抑えることは出来ない¹⁾。物理的にその変化を抑える方法としてマイクロウェーブを利用した方法が過去に報告されているがスタンダードプロトコルとしては確立されていない。

蛋白質の Degradation

組織中の蛋白質はサンプリング後、Calpain, Cathepsin などの酵素やプロテアソームコンプレックスなどにより、蛋白質分解はサンプル採取 3 分後には広範囲に起きる。マウスの脳の視床下部を用いてナノ LC/MS を用いて解析を行いペプチド数の変化を図 1 に示す。

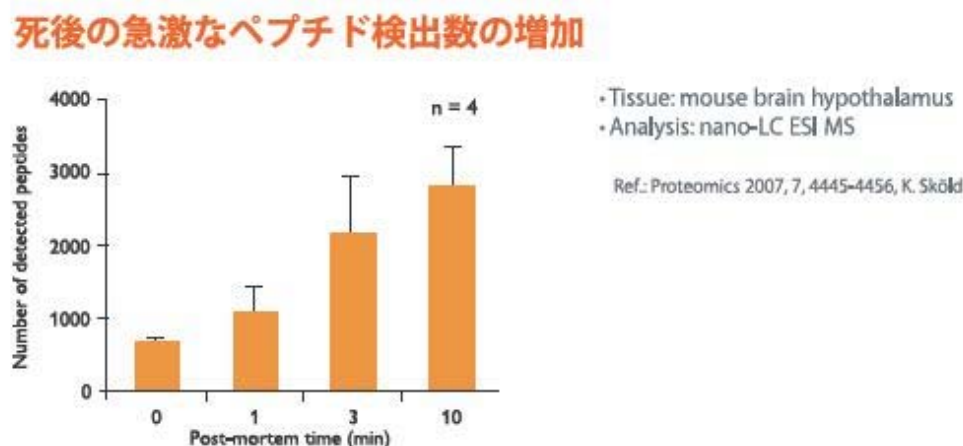
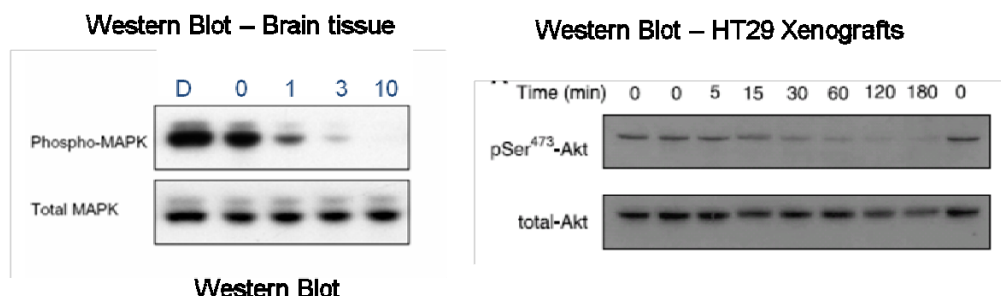


図 1 ペプチド数の変化

視床下部摘出後わずか 10 分の間に蛋白質の Degradation が進み、ペプチドは急増している。これは高存在量蛋白質由来の Degradation によるペプチドによるものである。これらのペプチドが増えることにより存在量の少ない内因性のペプチドなどの同定が困難になる。

翻訳後修飾の変化



Source:
Sköld, et al., Proteomics 2007, 7(24), pp 4445

Source:
Baker et al., Clin Cancer Res 2005, 11(12), pp 4339

図 2 リン酸化蛋白質の脱リン酸化変化のウェスタンブロット

蛋白質のリン酸化などを含む翻訳後修飾においても、サンプル採取後のその変化は迅速に起こる^{2,3)}。マウスの脳組織、又は H29Xenograft によるリン酸化蛋白質の脱リン酸化の変化をウェスタンブロットにて示した結果を図 2 に示す。フォスファターゼ活性の測定からそのリン酸化の変化をみると組織サンプルのホモジナイズ時にフォスファターゼインヒビターを加えてもその活性を止めることはできない。

Heat Stabilization 法の原理

組織サンプル中の蛋白質の **Degradation** を防ぐ方法として様々な方法が利用されており、さまざまな酵素の活性を阻害する低分子の阻害剤（インヒビター）がカクテル化されて試薬としても市販されている。しかしこれらの方法は後段に続くプロテオーム解析に適していない。臨床組織サンプルのように過去に保存された数多くの組織を利用するには凍結保存組織も処理できなければならない。**Heat Stabilization** 法は迅速に且つ均等に組織サンプルをバキューム状態で 95℃に加熱することによりプロテアーゼなどの酵素を失活させることが可能である。装置と組織サンプルのハンドリングを図 3 に示す。

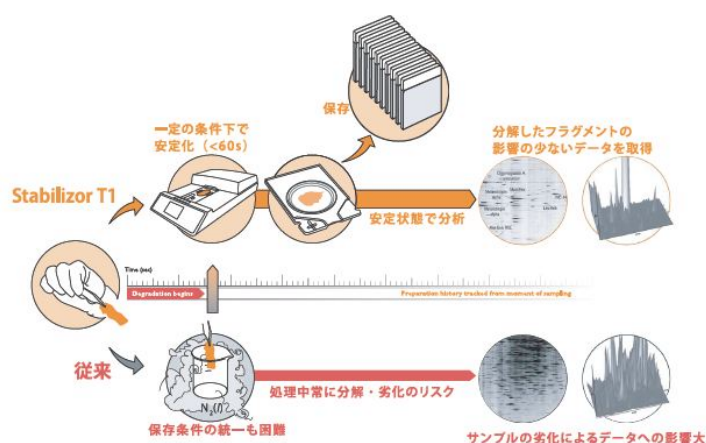


写真 1



写真 2

図 3 Heat Stabilization 法の装置と組織サンプルのハンドリング

専用のカートリッジ（写真 1）に組織サンプルを入れ、装置（Stabilizer T1）（写真 2）に装着して稼働させると装置は自動的に組織サンプルの厚みを計測して加熱を始める。加熱の仕組みはアルミニウム材質の加熱ブロックが上下からサンプルを挟むことによって行う。加熱ブロックが確実に組織サンプルに接触するようカートリッジ内の空気はバキュームさ

れる。加熱は迅速に効率よく組織サンプルに施され90℃以上に到達するが95℃を超えることはない。カートリッジの組織サンプルに接する部分の材質はPTFE(テフロン)で、迅速に熱を伝達し且つサンプルの吸着も少ない。採取された組織サンプルや凍結保存されたサンプルに合わせて最適な加熱条件を自動的に計算されて処理される。処理されたサンプルはすぐに可溶化処理を行うかまたはフリーザーにて-40℃~-80℃で再度、冷凍保存することができる。

翻訳後修飾解析での応用例

マウス脳における蛋白質のリン酸化を Heat Stabilization 処理/未処理で比較解析してみると 30 分室温に置かれたサンプルではフォスファターゼ活性により脱リン酸化が起こっているのに対し Heat Stabilization 処理されたサンプルには変化が見られなかった⁴⁾。

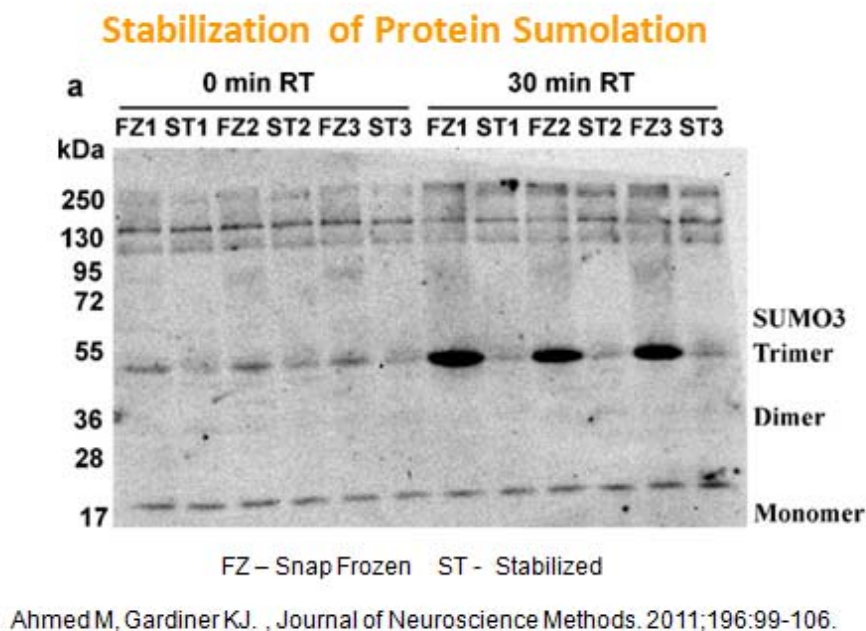


図4 Heat Stabilization 処理による SUMO 化の違い

また SUMO 化に関して、SUMO3 抗体によりウェスタンブロット法で Degradation の変化を調べると同じように 30 分室温に置かれたサンプルでは SUMO3 の三量体が増えていたが Heat Stabilization 処理されたサンプルは同様に、図4に示したように変化が見られなかった。マウスの脳、肺、肝臓の組織片をすぐに Heat Stabilization 処理によることにより通常の液体窒素での凍結との蛋白質の量、及び翻訳後修飾の変化を調べた結果、量、リン酸化に関して Heat Stabilization は有効であることが報告されている²⁾。さまざまな組織をプロテオーム解析していくと組織に関わらず同じ名前の蛋白質群が見受けられる。これらの蛋白質は疾患のステージによって異なる発現が報告されている。“共通の蛋白質”群をさらに調べてみると少なくとも1つのリン酸化部位をもっている蛋白質は80%を超え

ており約30%の蛋白質がキナーゼによってリン酸化されるということから考えると非常に大きな数字である。翻訳後修飾を含むアイソフォームが病態や薬効に大きく関与していることは近年明らかになっており、量的な変化だけではなく遺伝子レベルではわからない蛋白質の質的な変化を解析することは重要である。翻訳後修飾等の解析を行っていく上で、臨床現場で患者に対する治療（手術）中に臨床検体をどのように処理するかは今後の大きな課題である。

3. サンプル可溶化

目的にそって調整されたサンプルを可溶化するには様々な方法があるが膜蛋白質のような可溶化が難しい蛋白質は界面活性剤を使うことによって可溶化するが、しかしそのままではそのイオンサプレッション効果により質量分析装置に供することはできない。GPCRのような複数膜貫通型蛋白質などに対して酸性化でDegradationする界面活性剤や蛋白質の疎水領域に配位される特殊なポリマーなどがあり講演ではその機能を紹介する。

4. サンプルの分画

可溶化された蛋白質群をトリプシンなどの消化酵素でペプチド断片にしてもその複雑性ゆえ、一度のLC/MSで微量蛋白質を同定することは難しい。血液（プラズマ）であれ

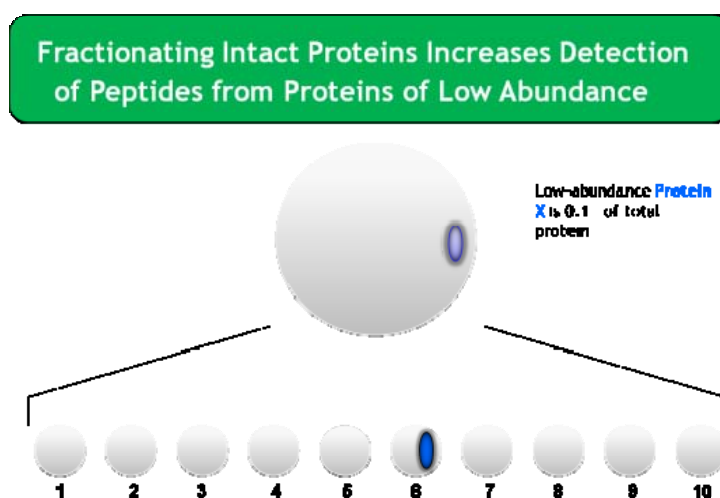


図5 分画された各分の目的蛋白質を濃縮された微量蛋白質の検出が可能性

ばアルブミンやIgGなどのアバンダントな蛋白質群を抗体カラムなどでDepleteすることによりそのダイナミックレンジを狭くすることが可能である。組織や培養細胞においても目的によってオルガネラ分画など利用し測定するサンプルの複雑性を下げる必要がある。分画された各分に目的の蛋白質が濃縮されれば微量蛋白質の検出も可能となる（図5）。講演では分子量に基づいて電気泳動により蛋白質を分画する方法を紹介する。

(5) LC/MSの最適化

LC/MSにおいて重要な要素はナノLC、ナノエレクトロスプレーソース、質量分析装置の最適化である。ナノLCにおいてカラム径を細くすることで感度を上げることはできるがレジンボリュームが少ないのでサンプルのローディングボリュームは低くなってしまふ。LC/MSに供するサンプル量が少ないと微量サンプルの検出は難しい。感度良く且つ多くのサンプルを分析するにはどうするか？理論的にはカラムの長さを長くすることで感度を落とさず、サンプル負荷量も上げることができる。しかし、現実的に圧力が長さに応じて上がってしまいスプリットタイプのナノLCでは対応することができない。本講演では高圧対応のスプリットレスナノLC及びそのカラムに対するカラムオープンを開発したので紹介する。

ナノエレクトロスプレー及びスプレーチップは自社でも開発して多くのユーザーに使っていただいているが四重極MSを使ったSRMモードによる定量ではその感度の高さゆえ、微量域に入ると大気にさらされたオープンソースでは再現性を得ることはできない。定量プロテオミクスプラットフォーム開発で壁にぶち当たったのがこのイオンソースの部分であった。この問題に対して完全にクローズドなイオンソースの開発に入り、1年半を要して実用化にたどり着いた。密閉型にし、条件を安定させることにより、非常に微量域でも再現性のよいデータが得られるようになった。このイオンソースでのデータを紹介する。

(6) 臨床サンプルを用いたバイオマーカー研究

プロテオミクスでの解析プラットフォームを開発していろいろな先生方に使っていただいている。初期はプロテオミクス技術開発の先生方、そして分子生物学、細胞生物学、シグナル伝達研究とバイオリジー研究の道具として幅広く利用していただいている。現在は機能が未知な脳の研究や分化・発生研究、核内受容体研究、染色体メカニズムなど目的が明確な研究に対しパワフルな蛋白質複合体、相互作用解析のツールとして利用されている。GSK（グラクソ・スミス・クライン）のプロテオミクス研究の時代から我々の開発をサポートしていただいている西村俊秀先生（現東京医科大学）と共同研究を続けており、バイオマーカー開発のサンプルとして臨床サンプルを扱うこととなった。2006年にアメリカのNCI(National Cancer Institute)からスピンオフした研究者がホルマリン固定サンプルから蛋白質を抽出する技術に基づき立ち上げた会社を見つけ、そのキットが臨床プロテオーム研究に応用できないか検証を行うことにした。ホルマリン固定の影響、蛋白質の同定効率などいろいろな面から検討し、この抽出技術を我々のバイオマーカー研究プラットフォームに導入した。ホルマリン固定サンプルからのバイマーカー研究に際していくつかの課題があった。ホルマリン固定された臨床サンプルをどのように入手するか？ホルマリン固定サンプルの切片を用意しレーザーマイクロダイセクションで目的部位を分取するノウハウは？臨床サンプルを入手するには臨床医とのかかわりが必要であったがほとんどの臨床医にはLC/MSでの蛋白質解析など全くなじみも無く、臨床とMSによる解析と

いう2つの島には全くかけ橋がなかった。GSKから東京医科大学に移られた西村先生はプロテオームセンターをすでに立ち上げ、血液からのプロテオーム研究では実際に臨床サンプルを用いて研究を進められていた。抽出キットの検証は終わり、実際の肺がんのサンプルを臨床医から入手してデータをだして、西村先生に検証していただいたところ、肺がん患者の血液とは異なる意義ある蛋白質群が見えており、すぐに東京医科大学の肺がんサンプルをいただいて分析することとなった。もう一つのハードルであったホルマリン固定サンプルの処理についてはライカ社のレーザーマイクロダイセクション装置のレーザーが唯一上から下に照射されることでライカ社と協議し協力を仰ぐことになった。すでにLC/MS用に特殊なコーティングを施したスライドは開発されていたのでそれに合わせたダイセクションができるようライカ社でソフトウェアの開発を迅速に行っていただいた。東京医科大学、第一外科講座の加藤教授のグループから西村先生を中心に、外科医、病理医のチームを編成していただき、クリニカル研究デザインされた肺がん患者のサンプルの解析がスタートした。この解析は大学の倫理委員会の承認、クリニカル研究デザイン、ホルマリン固定サンプルの入手、レーザーマイクロダイセクション、蛋白質抽出/消化、LC/MS解析、相対定量によるバイオマーカー候補の選択、候補蛋白質の四重極MSでのSRMモードによる定量解析、免疫染色によるバリデーションとホルマリン固定サンプルさえ入手すればすべてシームレスに解析できるプラットフォームである。このプラットフォーム技術は確立されてルーチンの解析できるまでに至り現在では複数のプロジェクトが進行している。本発表ではこれら研究例を紹介する。

(7) これからの取り組み

ドラッグターゲットの多くは蛋白質のアイソフォームやバリエーションを対象にしている。プロテオームの網羅的解析から絞られたパスウェイやそれに関連するターゲット蛋白質のアイソフォーム群、翻訳後修飾の動態を調べるのが重要になってきている。より詳細な蛋白質の動態情報を得るための技術開発を進めている。そこには Affinity クロマト技術や蛋白質をそのまま計測するトップダウンプロテオミクスなどがありそれらの技術を紹介する。

引用文献

- (1) Svensson M, Boren M, Skold K, Falth M, Sjogren B, Andersson M, et al. Heat stabilization of the tissue proteome: a new technology for improved proteomics. J Proteome Res 2009;8:974-81.
- (2) Rountree BC, Van Kirk CA, You H, Ding W, Dang H, Van Guilder HD, et al. Clinical application for the preservation of phosphor-protein through in-situ tissue stabilization. Proteome Sci 2010;8:61.
- (3) Schwartz JH. Neurotransmitters. In Kandel ER, Schwartz JH, Jessel

TM, editors. Principles

- (4) Ahmed M, Gardiner KJ. Preserving protein profiles in tissue sampling: differing outcomes with and without heat stabilization. *J Neurosci Methods* 2011;196:99-106.

参考文献

- (5) 1. T. Nishimura, M. Nomura, H. Tojo, H. Hamasaki, T. Fukuda, K. Fujii, S. Mikami, Y. Bando, H. Kato, Proteomic analysis of laser-microdissected paraffin-embedded tissues: (2) MRM assay for stage-related proteins upon non-metastatic lung adenocarcinoma. *Journal of Proteomics*, **73**, 1100-1110. (2010)
- (6) 2. T. Kawamura, M. Nomura, H. Tojo, K. Fujii, H. Hamasaki, S. Mikami, Y. Bando, H. Kato, T. Nishimura, Proteomic analysis of laser-microdissected paraffin-embedded tissues: (1) Stage-related protein candidates upon non-metastatic lung adenocarcinoma. *Journal of Proteomics*, **73**, 1089-1099. (2010)
- (7) 3. K. Fujii K, T. Nakano, T. Kawamura, F. Usui, Y. Bando, R. Wang, T. Nishimura, Multi-dimensional protein profiling technology and its application to human plasma proteome. *J. Proteome Res.* **3**, 712-718, (2004)
- (8) 4. K. Fujii, T. Nakano, H. Hike, F. Usui, Y. Bando, H. Tojo, T. Nishimura, Fully automated online multi-dimensional protein profiling system for complex mixtures. *J. Chromatogr. A* **1057** 107-113 (2004)