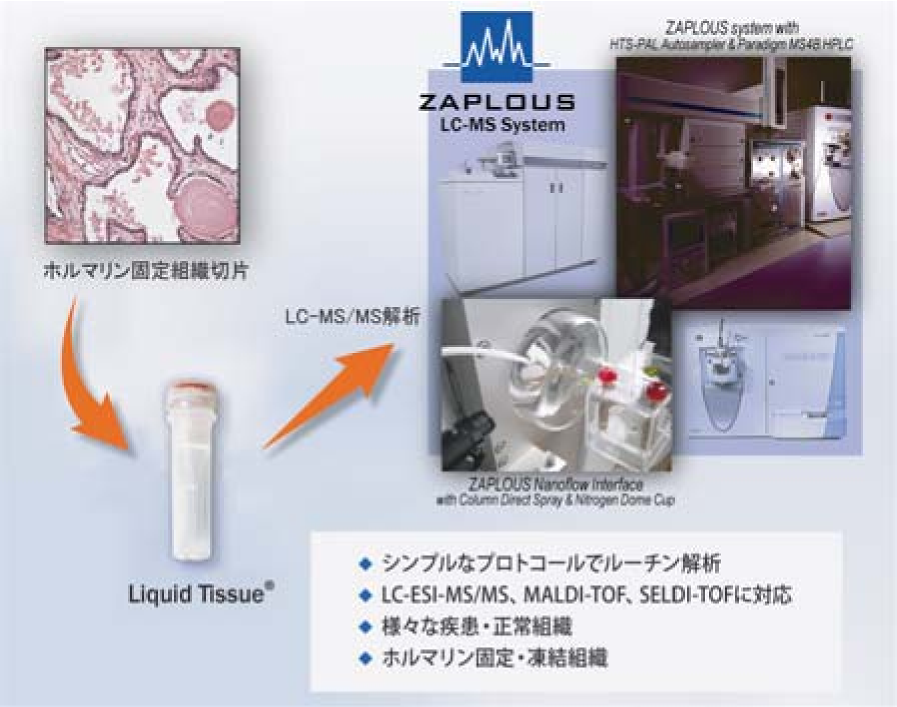
AMR INCORPORATED

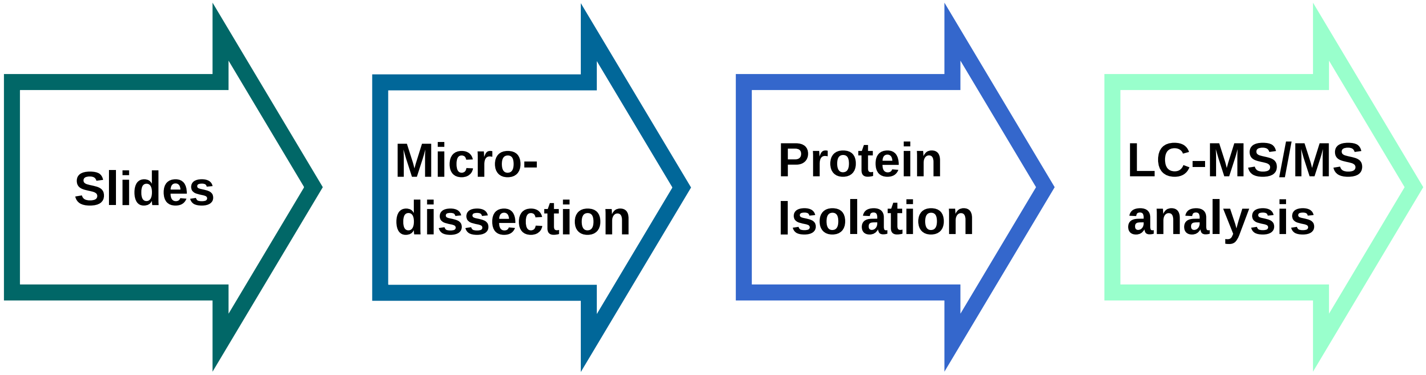
2006.5.16
The 55th Annual Conference on Mass Spectrometry, Hiroshima, Japan, 2007
Luncheon Seminar

ホルマリン固定薄切組織サンプルからのタンパク質バイオマーカーの探索



FFPE Tissue

- 過去にさかのぼり、膨大に保存されている。
- 臨床的情報が付随。
  - 疾患の進行
  - 薬物反応性
  - 薬物毒性試験
- レトロスペクティブな臨床プロテオーム解析が可能。

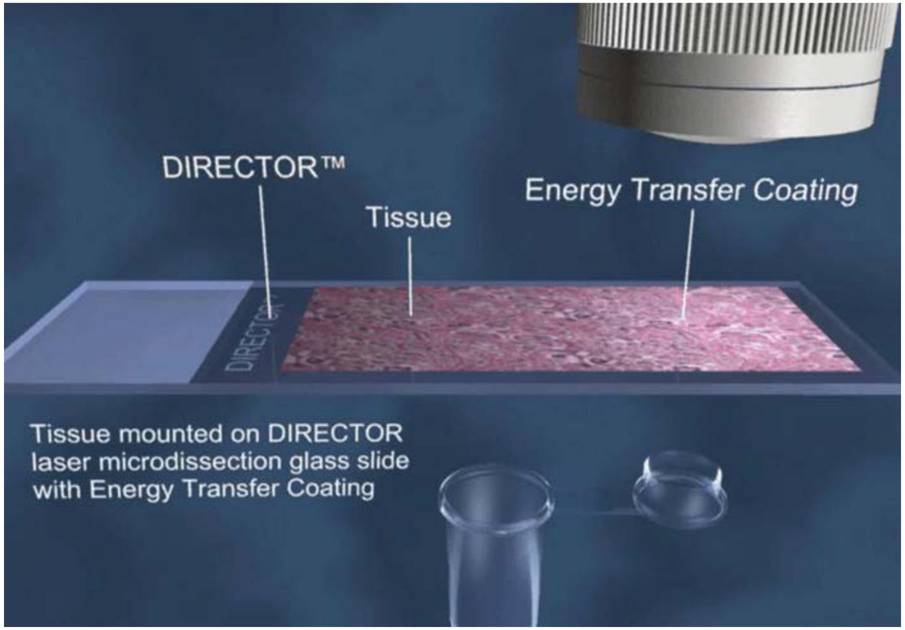


Laser Microdissection

DIRECTORTM

Leica LMD6000

MICROSYSTEMS



Liquid Tissue™ MS Protein Prep Kit

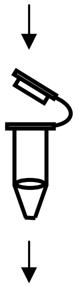
- 1ヶ月－15年間保存された組織試料に有効
- キットに含まれる各種試薬には界面活性剤やイオン化を阻害するものは含まれていないため、直接質量分析計による測定が可能
- 凍結組織と比べてもFFPE組織から、意味のある、そして同程度のプロテオミクス情報が得られる[1)]
- FFPE組織のLiquid Tissue® MS抽出物は各種質量分析計プラットホームでルーチンに解析可能

1) Proteomic Analysis of Formalin-fixed Prostate Cancer Tissue
Brian L. Hood *et al*
Mol Cell Proteomics. 2005 Nov;4(11):1741-53

ホルマリン固定化組織からのタンパク質抽出およびLC/MS解析

- **Basic Experiments using Bovine Serum Albumin**
  - Effect of Formalin Treatment on BSA
  - Effect of Liquid Tissue ® on Formalin Treated-BSA
- **Effects of Formalin Fixation on Proteomic Profiles**
- **Application to a Study of Gastric Cancer**

FFPE tissue (Needle Dissection or Laser Capture Microdissection)



Protein Extraction: 20 μL of Liquid Tissue Buffer (95 ^{o}C, 90 min)

Digestion: 1 μL of Trypsin (1 μg/μL) (37 ^{o}C, 18 hr)

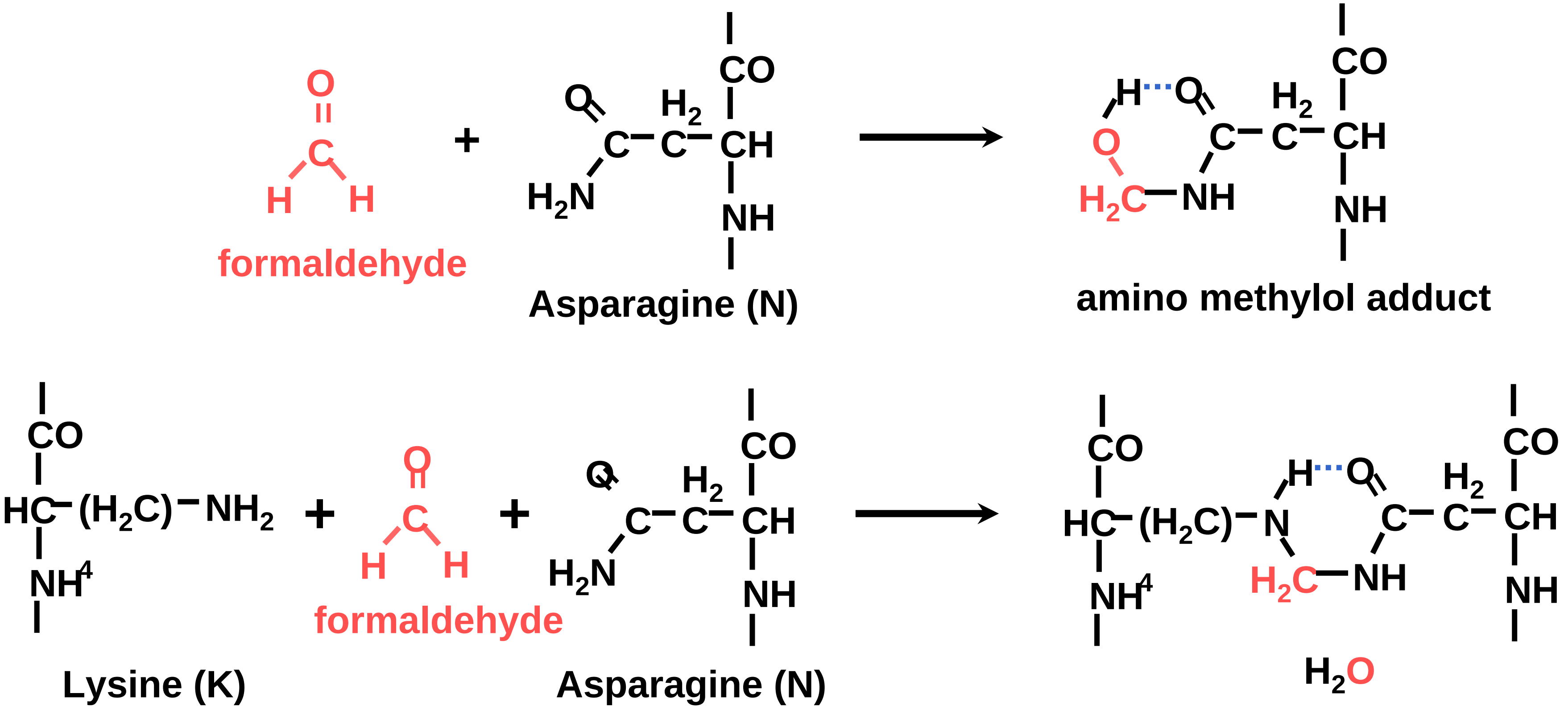
Reduction: 2 μL of 100 mM DTT (95^{o}C, 5 min)

LC/MS and LC/MS/MS analyses

Formalin Fixation and Protein Crosslinks

ホルマリンと下記 8 種アミノ酸により様々な分子内・分子間クロスリンク反応が起こる。

Lysin (K), Arginine (R), Histidine (H), Asparagine (N),
Glutamine (Q), Tyrosine (Y), Threonine (T), Serine (S)



AMR INCORPORATED

Basic Experiments using Bovine Serum Albumin

Formalin Treated-BSA

ammonium bicarbonate → + DTT, + Iodacetamide → + Trypsin →

Liquid Tissue ® → + Trypsin → + DTT →

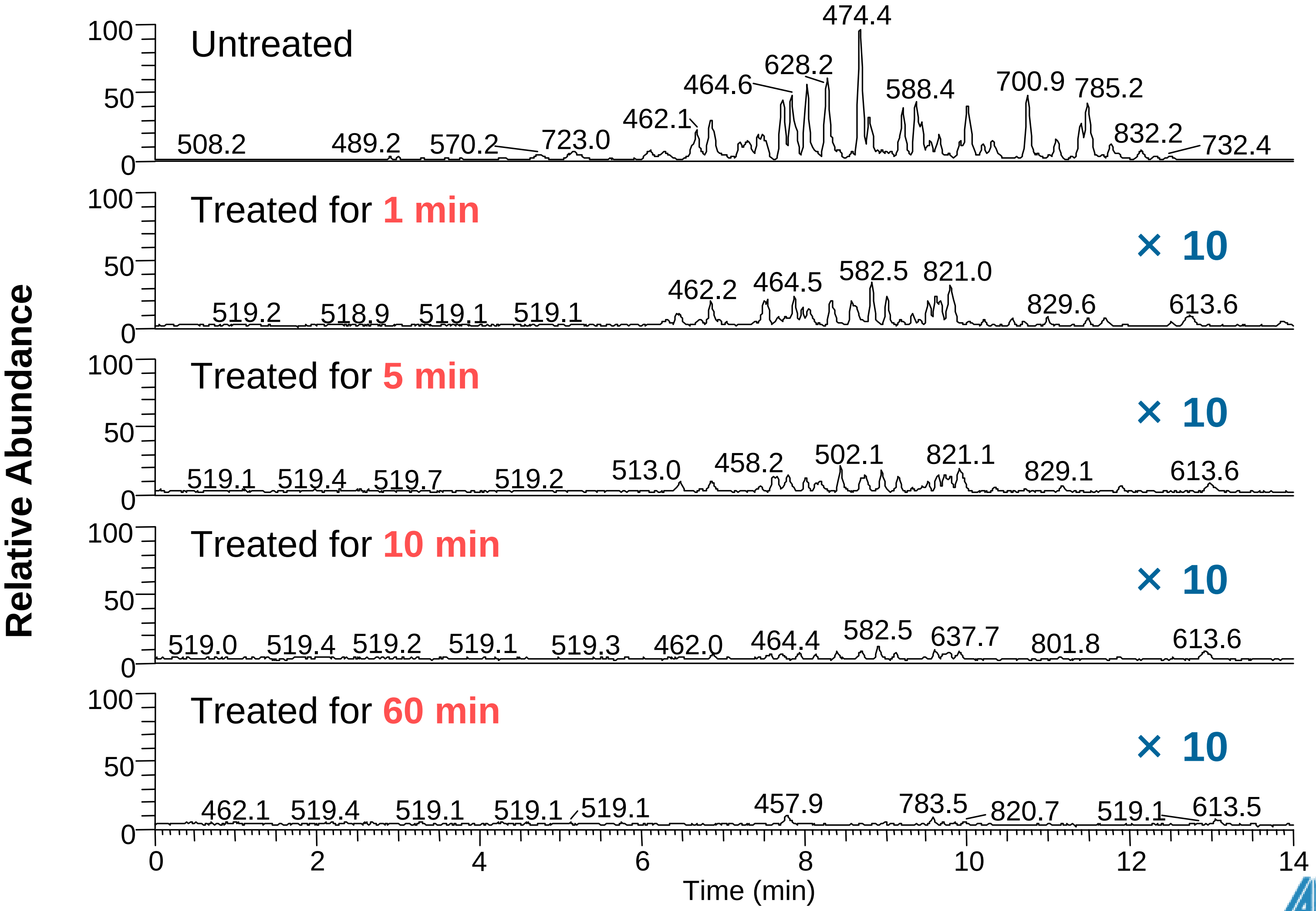
Untreated-BSA

ammonium bicarbonate → + DTT, + Iodacetamide → + Trypsin →

Liquid Tissue ® → + Trypsin → + DTT →

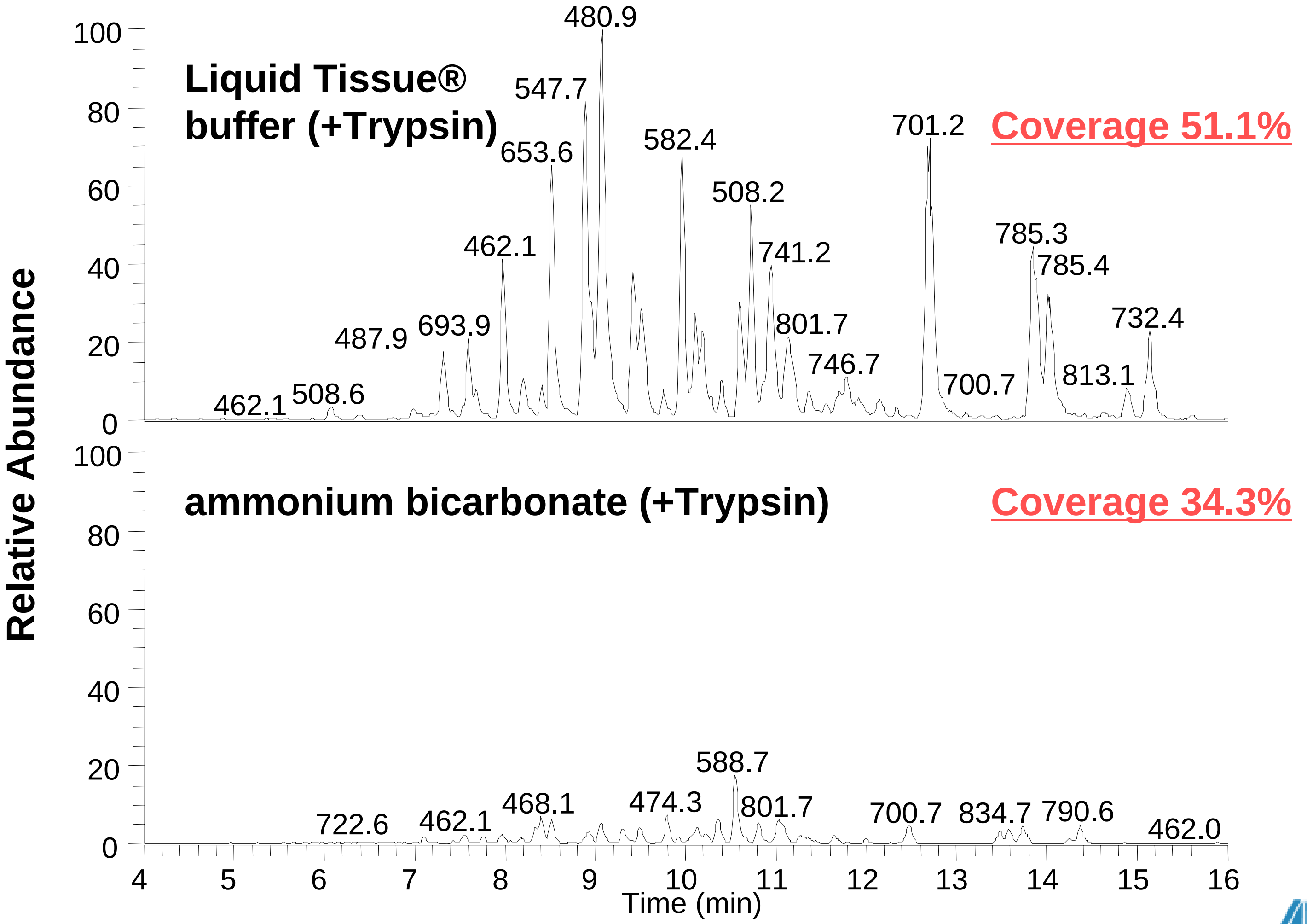
Effect of Formalin Treatment on BSA

Base peak chromatograms (injected 100 fmol)

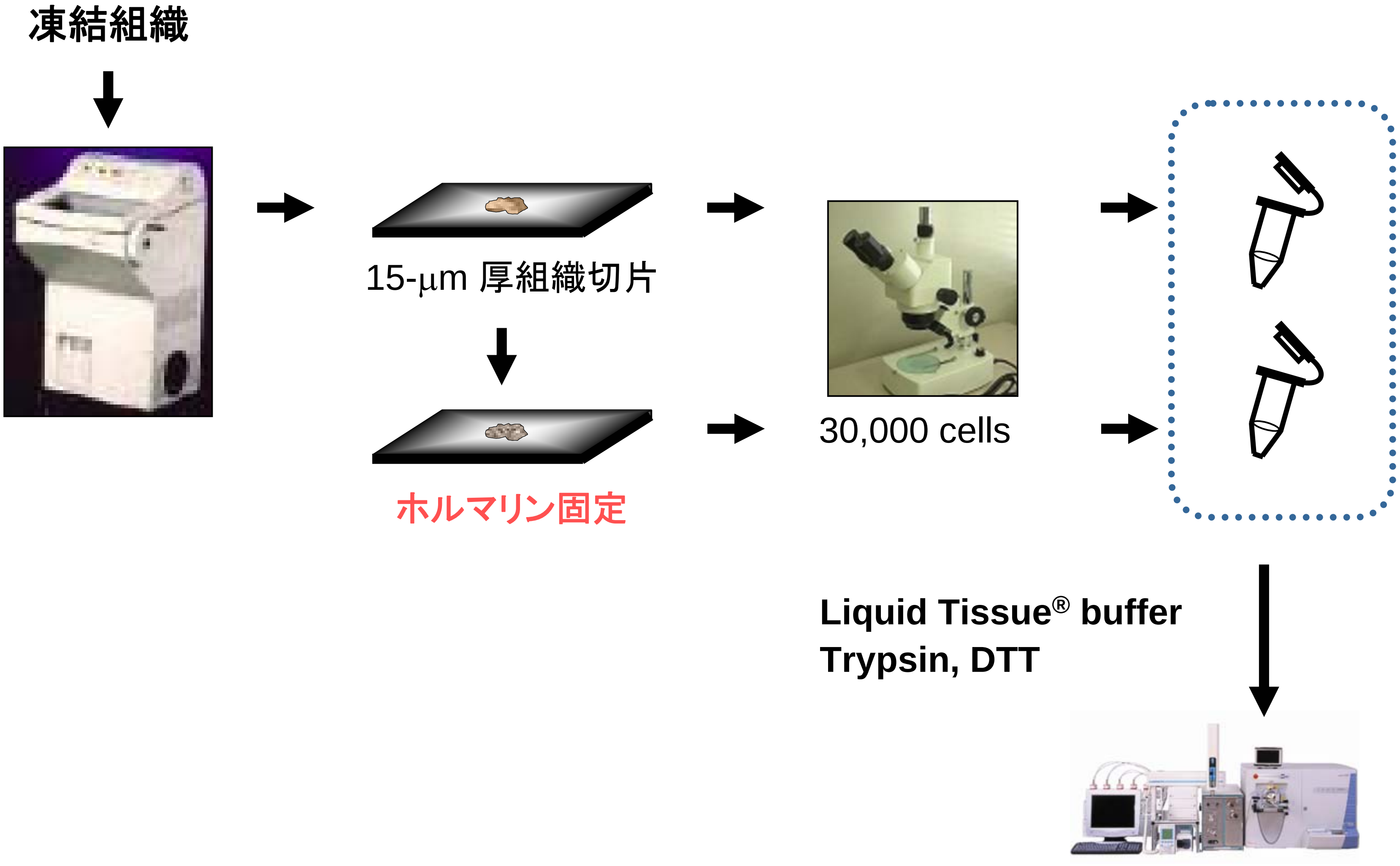


Effect of Liquid Tissue ® on Formalin Treated-BSA

Base peak chromatograms (injected 100 fmol)

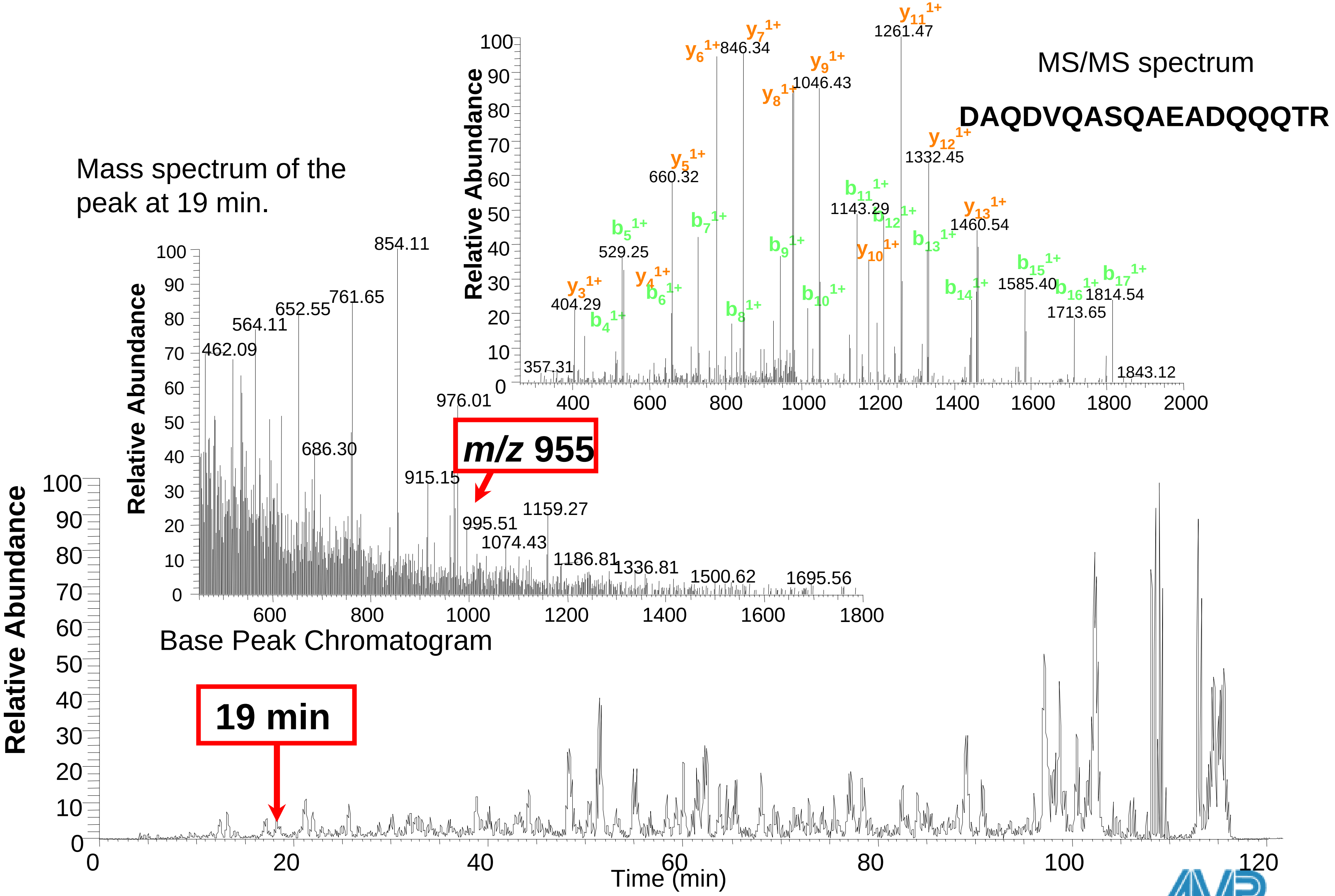


Effects of Formalin Fixation on Proteomic Profiles



AMR INCORPORATED

LC/MS/MS of FFPE Tissue of Gastric Cancer

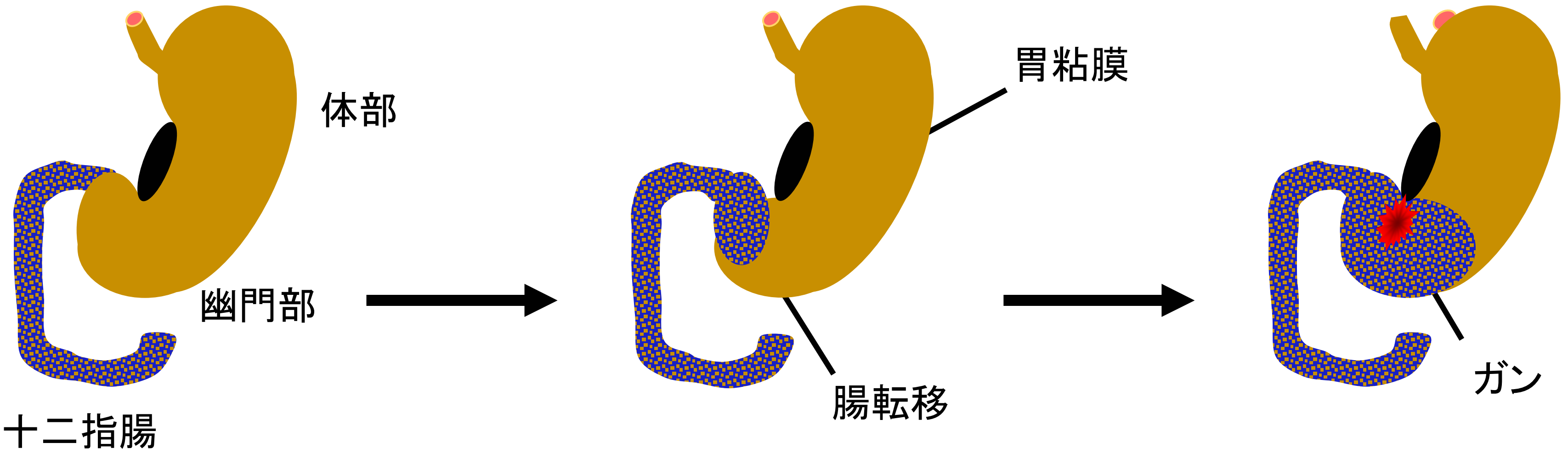


Comparison of the Number of Unique Peptides Identified for the Top 10 Proteins in a Gastric Cancer Tissue

Protein	No. of unique peptides	
	Formalin fixed	**Unfixed**
Myosin, heavy polypeptide 9	**5**	**15**
Collagen alpha-3(VI) chain precursor	**2**	**14**
Keratin 8	**16**	**11**
Smooth muscle myosin heavy chain 11 isoform SM1A	**6**	**10**
Filamin 1	**4**	**10**
A Chain A, The Yeast Actin Val 159 Asn Mutant Complex With Human Galsolin Segment 1	**4**	**8**
Plectin	**5**	**8**
Vimentin	**7**	**7**
Protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide	**1**	**7**
Histone H4/o	**3**	**7**

Origin of Cancer in Stomach

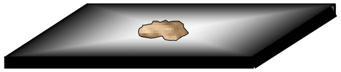
- 老化により、幽門部にて腸の転移が引き起こされる
- ヘリコバクターピロリ感染症や萎縮性胃炎は転移を刺激する



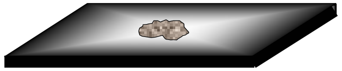
- 日本では、およそ90%の胃がんは腸の転移に起因するため、大部分の胃がんは腸腺癌タイプ

Experiment using FFPE of Gastric Tissues

凍結組織



15-μm 厚組織切片



ホルマリン固定

30,000 cells

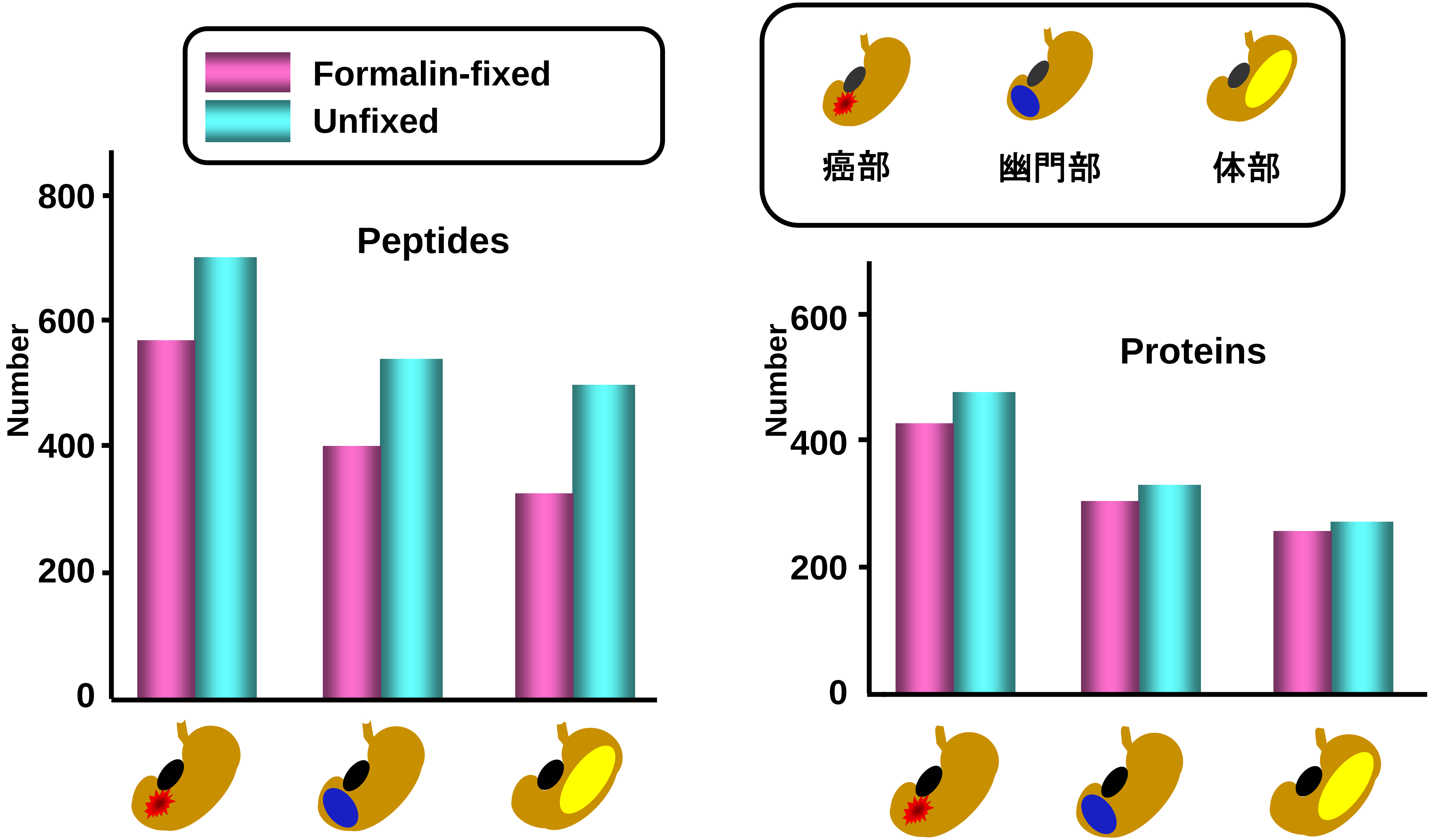
胃粘膜

胃幽門部

胃ガン

Liquid Tissue® buffer
Trypsin, DTT

Total Number of Unique Peptides and Proteins Identified form Tissues



Conclusion

- ホルマリン処理を行った標準タンパク質は、その処理時間に依存して、トリプシンにより消化されにくくなった。しかし、Liquid Tissue ® は、ホルマリン処理を行った標準タンパク質の消化を著しく改善した。このとこは、Liquid Tissue ® がホルマリンによるクロスリンクを外す、もしくは、その程度を低下させていることを示唆する。
- Liquid Tissue ® Bufferは、ホルマリン固定化組織において、多くのタンパク質を同定することが可能であった。
- ホルマリン固定化組織および凍結組織からのLiquid Tissue ® 抽出物を比較すると、ほぼ同程度のプロテオミクス情報をえることが可能であった。
- 質量分析計は、ホルマリン固定化組織のプロテオーム解析の強力な技術となる。
- ホルマリン固定化組織のプロテオーム解析は、バイオマーカーの同定、病気の進行、薬物応答や毒性などの臨床結果との関連性を可能にするであろう。

謝辞

本講演内容は下記の諸先生との共同研究に基づいています。

茨城県衛生研究所

本多　彰　先生
土井　幹雄　先生

東京医科大学

松崎　靖司　先生

ファーマックス研究所

宮崎　浩　先生

ライカ　マイクロシステムズ株式会社

西山　隆太郎　様
矢倉　久仁子　様

Expression Pathology, Inc.

C.E.Eitner
David B. Krizman 他