

第35回 日本神経学会大会
The 35th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society
エーエムアール株式会社 ランチョンセミナー

LS4-2

ホルマリン固定組織からのプロテオーム解析の実際
Proteomics of FFPE tissue samples from laser
microdissection to LC/MS analysis

株式会社バイオシス・テクノロジーズ

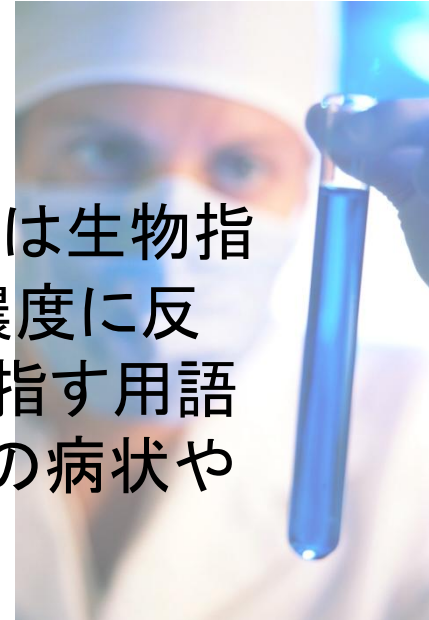
エーエムアール株式会社

福田 哲也

2012年9月19日

バイオマーカーとは？

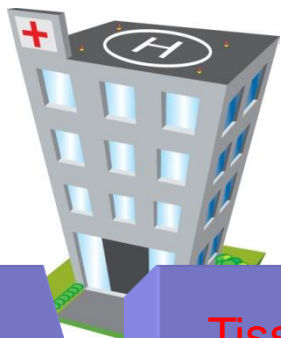
薬学においてバイオマーカー（Biomarker；あるいは生物指標化合物）は、ある疾病の存在や進行度をその濃度に反映し、血液中に測定されるタンパク質等の物質を指す用語である。さらに一般的にはバイオマーカーは特定の病状や生命体の状態の指標である。



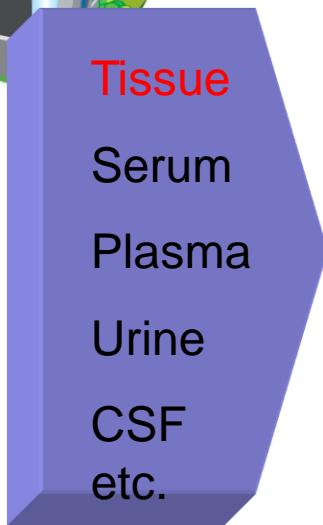
バイオマーカーは病気の進行状態や治療の効果を測るための、化学的、物理学的、または生物学的指標である。分子（生物）学用語ではバイオマーカーは「ゲノミクス、プロテオミクス技術、または画像技術を用いて発見されるマーカーの一部」とされる。バイオマーカーは医薬品生物学において重要な役割を担っており、早期診断、病気予防、医薬品ターゲット識別、医薬品に対する反応の確認、などの補助となりうる。



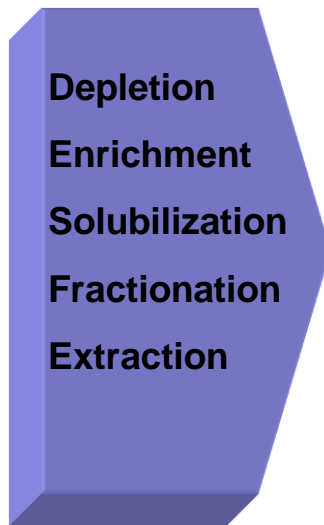
バイオマーカー発見の流れ



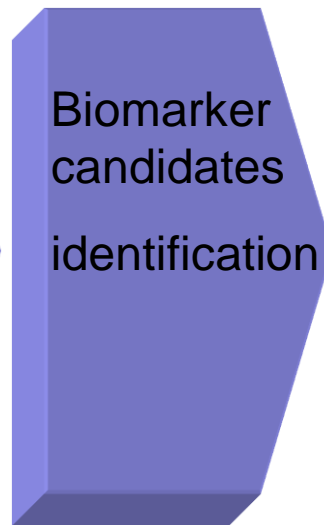
症例、対象
疾患の決定



サンプル
収集



サンプル
前処理



バイオ
マーカー
候補発見



検証



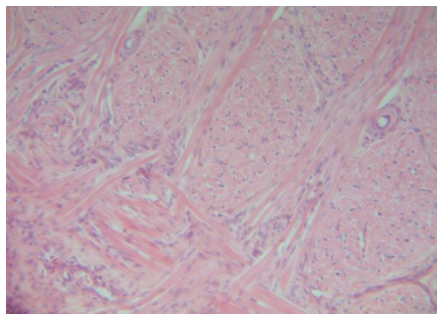
バイオマーカー探索の問題点



Tissue
Serum
Plasma
Urine
CSF
etc.

- 多量のサンプル収集が困難
- サンプルの形態がそれぞれ異なる。(性別、年齢、生活環境、など…)
- サンプル収集に長期間かかる。
- サンプル処理、保存方法などに人為的な相違が生じやすい、など…。

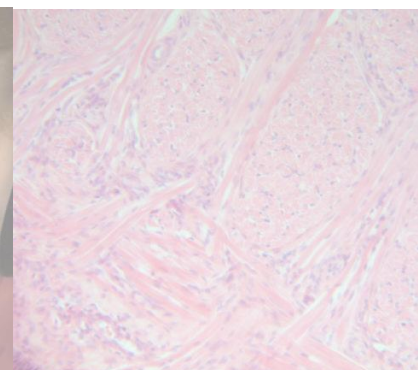
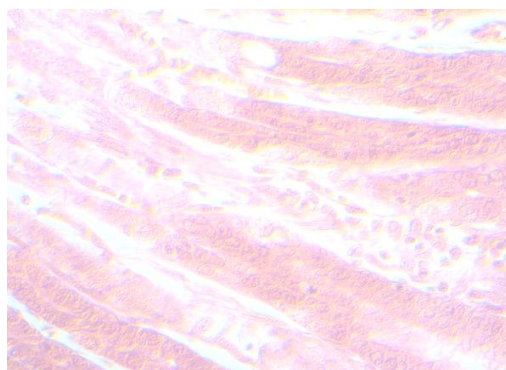
Sample
collection



サンプルの選択、処理は簡易であることが望ましい。

ホルマリン固定薄切組織サンプル(FFPE)からの蛋白質バイオマーカーの探索、および候補蛋白質に対するMSによる定量アッセイ

サンプル:	ホルマリン固定組織サンプル(FFPE)
対象:	組織侵襲的疾患部位
サンプル収集:	レーザーマイクロダイセクション(LMD)
測定機器:	nano ESI-質量分析計(定性型・定量型)



ホルマリン固定パラフィン包埋組織サンプル(FFPE)の優れた点

過去からの膨大なサンプルが良好な状態で保存されている。



臨床的情報が付随

- ・疾患の進行
- ・薬物反応性
- ・薬物毒性試験など



過去のサンプルの臨床プロテオーム解析が可能

Liquid Tissue[®] MS Prep Kit



- 開発者と共同研究者によってホルマリンサンプルからのタンパク抽出は実証済み。

– Molecular and Cellular Proteomics Nov 2005

- 対象となる組織

- 脳,
- 大腸, 腎臓, 前立腺, 乳房, 口腔, 肺, 卵巣...
- 正常部位, 腫瘍部位...

- 処理可能な期間

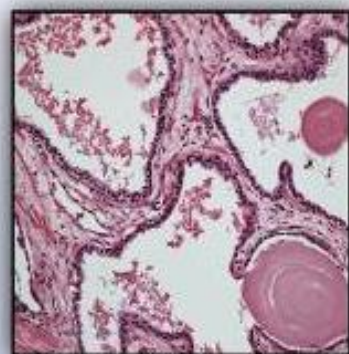
1か月から15年前までのサンプルで腫瘍マーカータンパク質の同定に成功

1) Proteomic Analysis of Formalin-fixed Prostate Cancer Tissue

Brian L. Hood *et al*

Mol Cell Proteomics. 2005 Nov;4(11):1741-53

ホルマリン固定組織サンプルまたは凍結サンプルの質量分析計によるプロテオーム解析



Liquid Tissue[®]



A unique alternative to current methods – the first practical means to profile protein expression levels in large sets of tissue samples.

- ◆ ***Compatible with mass spectrometry or reverse phase protein arrays***
- ◆ ***All types of diseased and normal tissue***
- ◆ ***Formalin fixed or fresh frozen tissue***
- ◆ ***Simple, automatable protocols***

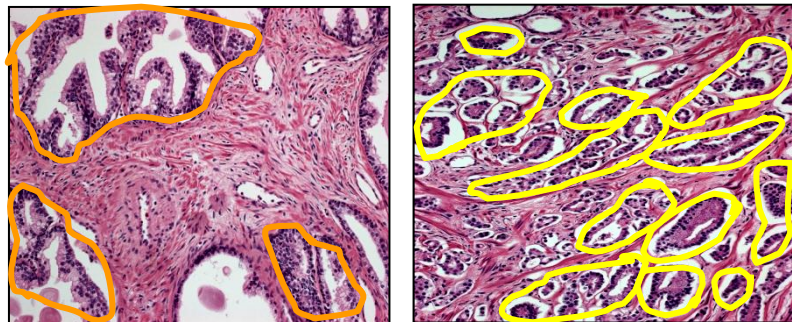
レーザーマイクロダイセクションシステム (LMD)



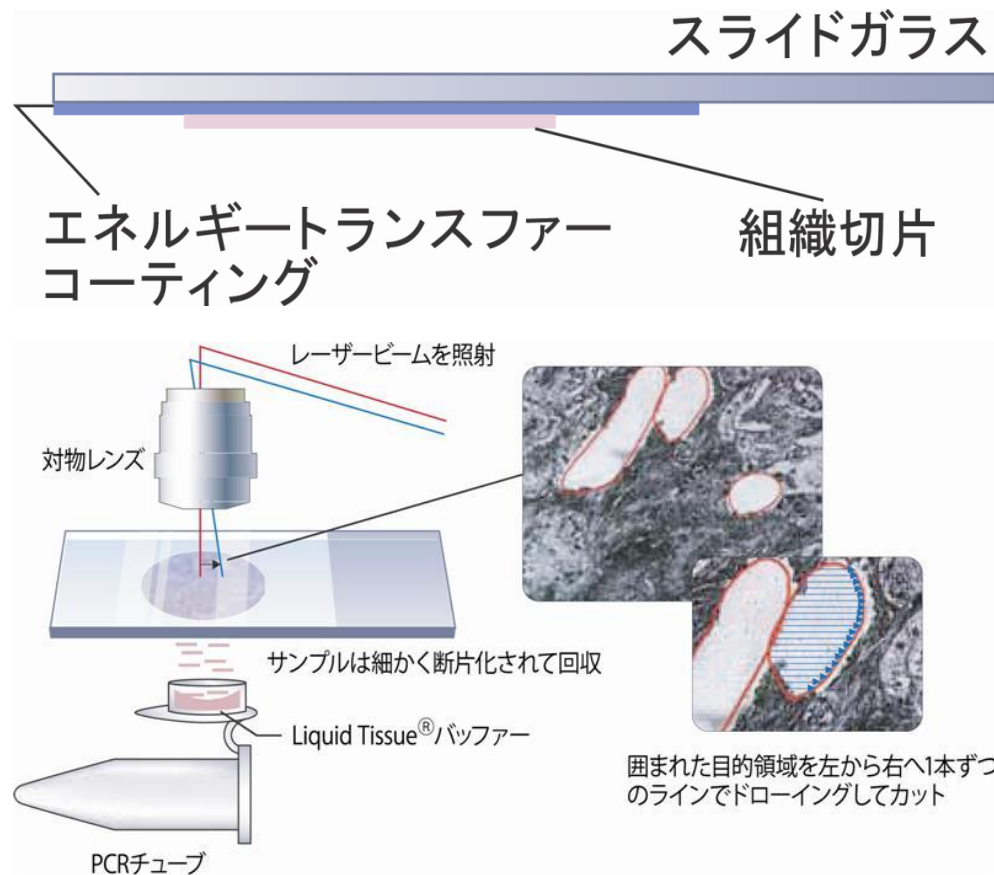
Leica LMD 6000 Laser Microdissection system

DIRECTOR Slide

Proteomics用特殊コーティングスライド

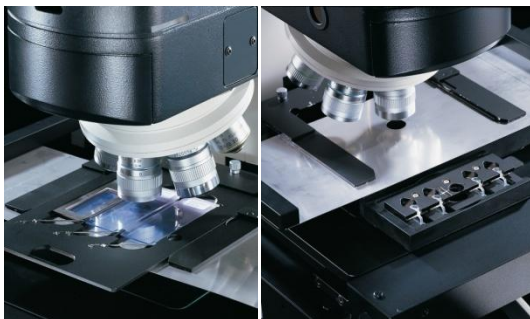
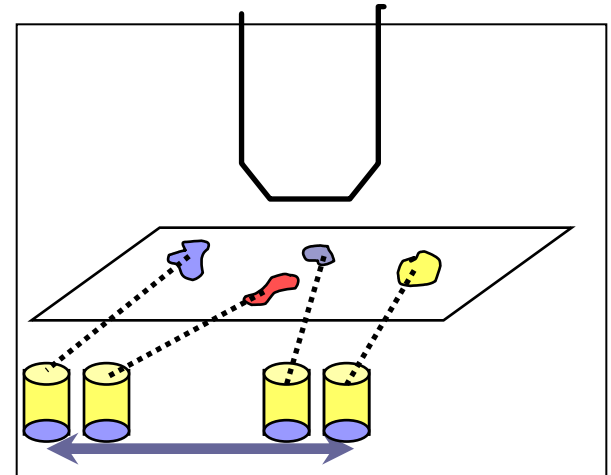
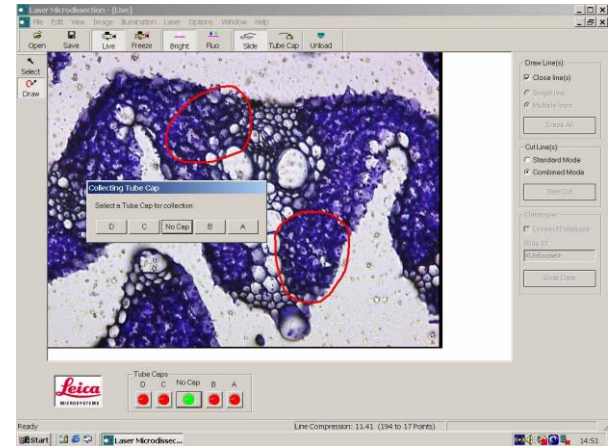


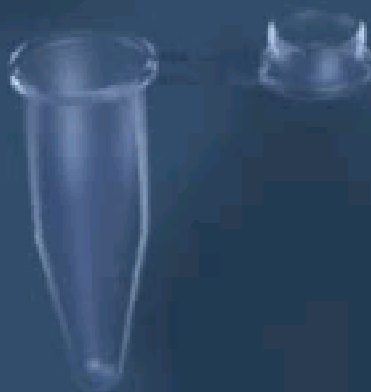
2umのエリアからマイクロダイセクションが可能!!

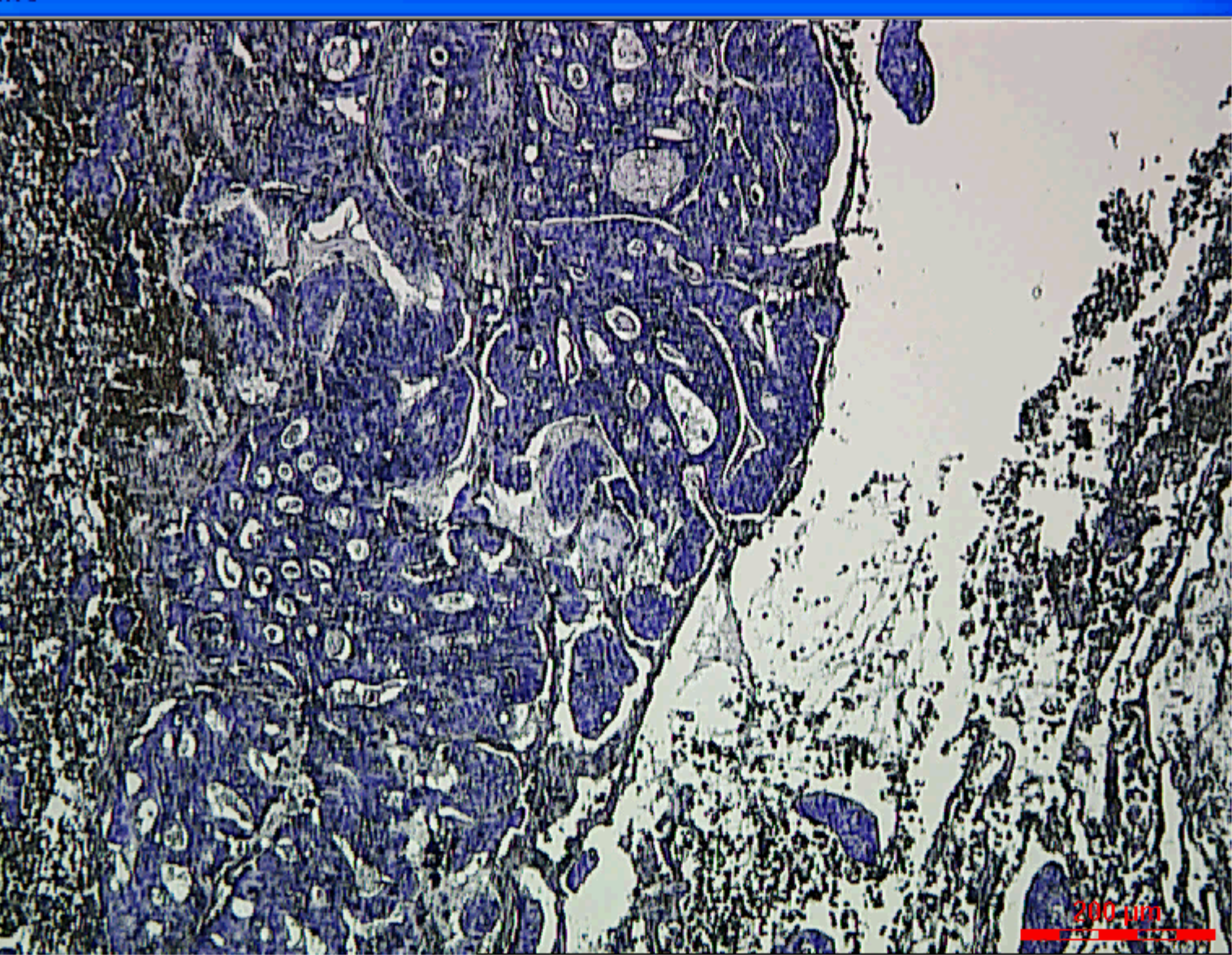


高い生産性

- ・複数の標本から同一チューブへの回収が無制限に可能。
- ・複数のPCRチューブへ分配回収も可能。
 - 連続切片の同じ部位を回収・同じスライドのいろいろな場所から回収する場合に1箇所のチューブに連続回収できることは抽出効率・作業効率・コスト面での圧倒的なメリットが出ます。







Close Line(s)

Single Shape

Multiple Shapes

Cut Shape(s):

Draw + Cut

Draw + Scan

Move + Cut

Start Cut

Stop

X-/Y-/Z- Precision

Fine

Coarse

Database:

Connect to Database

Specimen ID:

<Unknown>

Specimen Database

Shape List:

Nr.	Area (μm ²)

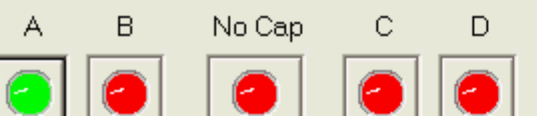
Total selected area

Erase

Erase

Summary

Collector Device: Tube Caps



Slide Holder

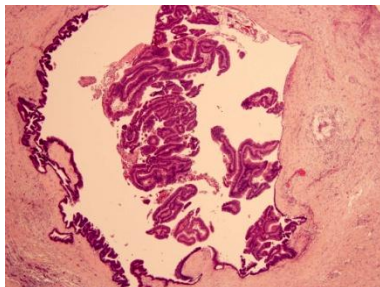


Stage Position Memory

1	2						
---	---	--	--	--	--	--	--

Erase Memory

膵臓癌前駆病変 質量分析-プロテオーム解析プロファイル



1,587 ペプチド → 425 タンパク質

Including:

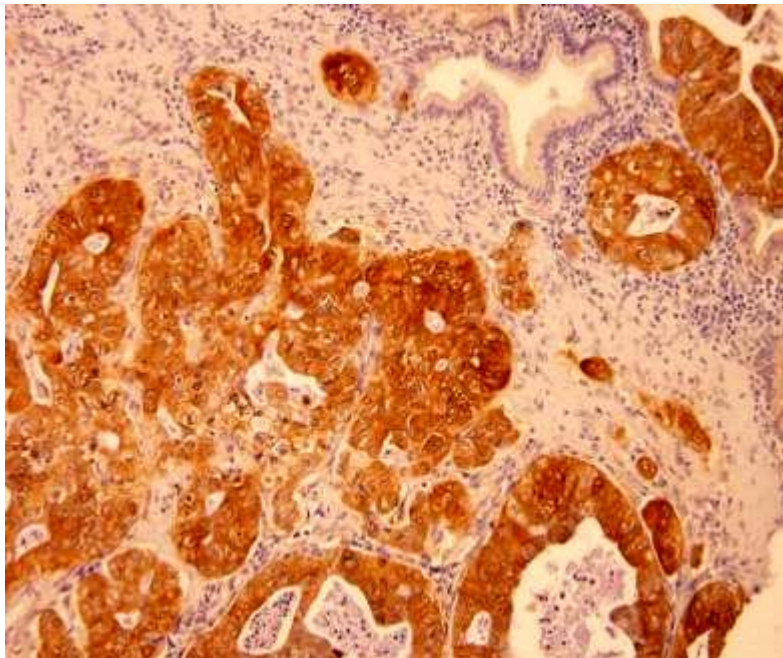
- Carboxypeptidase B precursor (Pancreas-specific protein) (PASP)
- Bile-salt-activated lipase precursor (Pancreatic lysophospholipase)
- Pancreatic alpha-amylase precursor (PA)
- Pancreatic triacylglycerol lipase precursor

- Breast cancer type 2 susceptibility protein
- Fructose-bisphosphate aldolase A (Lung cancer antigen NY-LU-1)
- Melanoma-associated antigen C1
- Nucleobindin 2 precursor (Gastric cancer antigen Zg4)
- Deleted in liver cancer
- GRIP and coiled-coil domain-containing protein 2 (CLL-associated antigen KW-11)
- Deleted in malignant brain tumors 1 – DMBT1
- Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2 (Tissue transglutaminase)

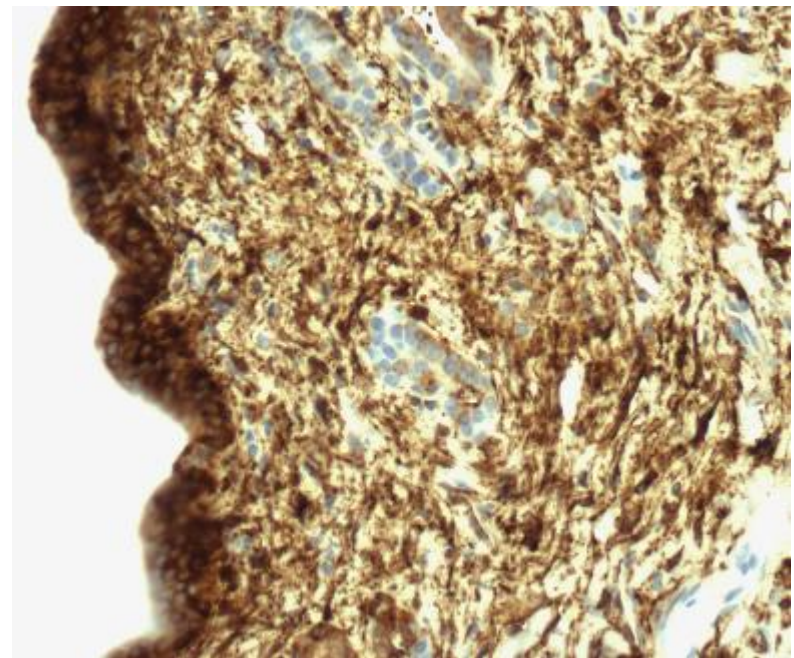
↓
LC/MS/MS
Analysis

膵臓癌前駆病変 IHC(免疫組織染色)による 検証

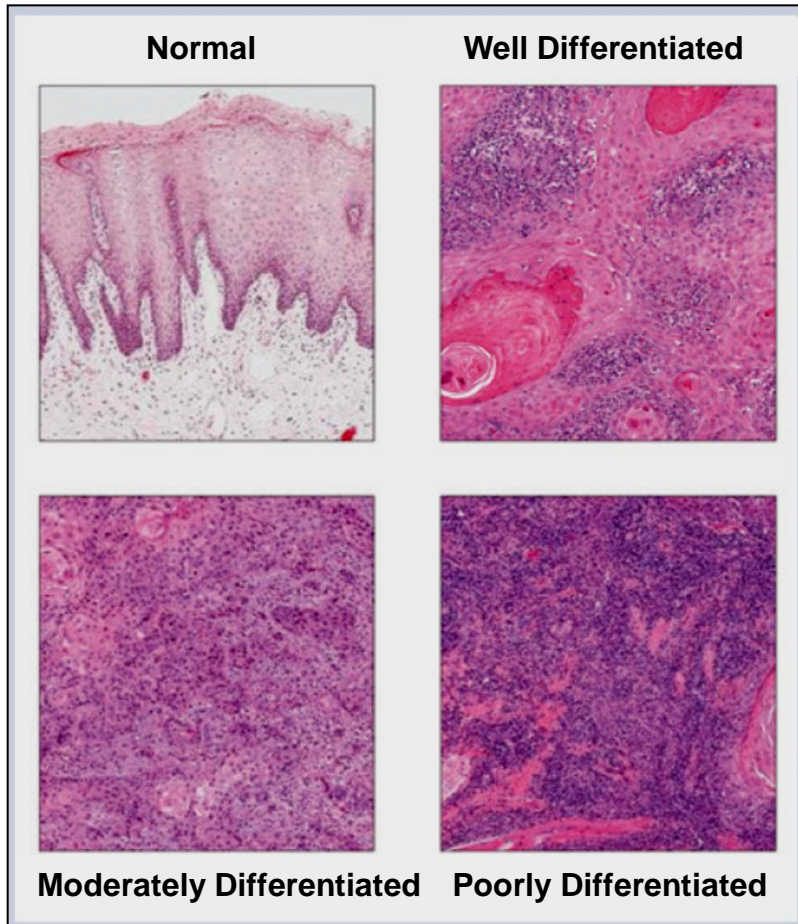
**Deleted in malignant brain
tumors 1 (DMBT1)**



**Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2
(Tissue transglutaminase)**



口腔癌



1. LMDサンプル回収
2. Liquid Tissue 処理
3. 質量分析
4. データ解析 – スペクトラルカウント
 - Normal
 - Well Differentiated
 - Moderately Differentiated
 - Poorly Differentiated

質量分析による半定量プロテオミクス

- **スペクトラルカウント解析– ノンラベル法**
 - 同定されたそれぞれのタンパク質のペプチドのMSMSフラグメントピークの本数をもとに算出し2群間の比較解析(例:正常vs癌)を行う
 - 同定された全てのタンパク質が対象



口腔癌

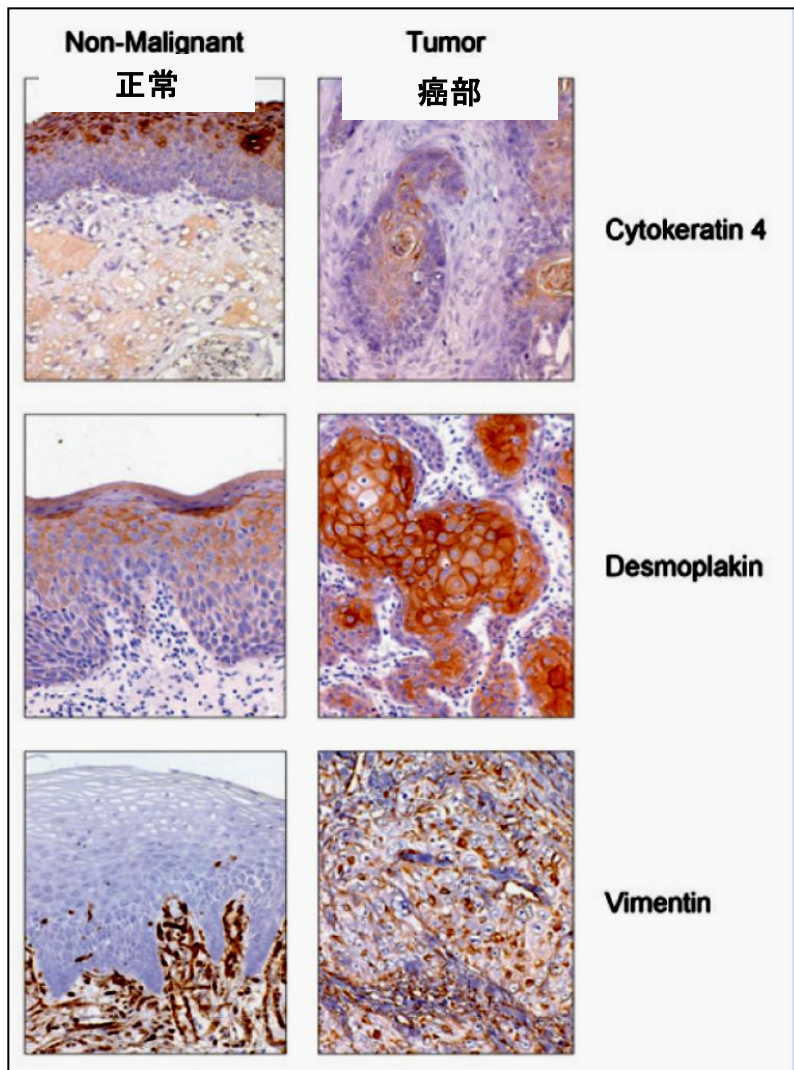
タンパク質発現比較- スペクトラルカウント

Protein	Sum T	Norm T	Well T	Mod T	Poor T
Keratin, type II cytoskeletal 5 (Cytokeratin 5)	681	21.73	31.42	23.64	23.20
Keratin, type I cytoskeletal 14 (Cytokeratin 14)	449	7.80	42.54	29.18	20.49
Keratin, type I cytoskeletal 16 (Cytokeratin 16)	387	8.27	41.09	30.23	20.41
Keratin, type II cytoskeletal 4 (Cytokeratin 4)	179	77.65	3.91	12.29	6.15
Keratin, type II cytoskeletal 1 (Cytokeratin 1)	146	18.49	22.60	28.77	30.14
Keratin, type I cytoskeletal 17 (Cytokeratin 17)	76	6.58	40.79	31.58	21.05
Keratin, type I cytoskeletal 18 (Cytokeratin 18)	13	0.00	23.08	15.38	61.54
Keratin, type II cytoskeletal 7 (Cytokeratin 7)	11	0.00	0.00	90.90	10.10
Desmoplakin (DP) (250/210 kDa paraneoplastic pemphigus antigen)	385	15.32	43.90	18.44	22.34
Plakophilin 1 (Band-6-protein) (B6P)	95	16.84	30.53	21.05	31.58
Desmoglein 3 precursor (130 kDa pemphigus vulgaris antigen) (PVA)	65	15.38	29.23	30.77	24.62
Plakophilin 3	35	28.57	28.57	31.43	11.43
Desmocollin 2A/2B precursor (Desmosomal glycoprotein II and III)	7	0.00	42.86	28.57	28.57
Epiplakin	1	0.00	0.00	100.00	0.00
Major vault protein (MVP) (Lung resistance-related protein)	18	5.56	33.33	38.89	22.22
Involucrin	57	8.77	56.14	26.32	8.77
Vimentin	79	0.00	36.71	44.30	18.99



口腔癌

タンパク質発現比較-IHC(免疫組織染色)



低発現-癌部



高発現-癌部

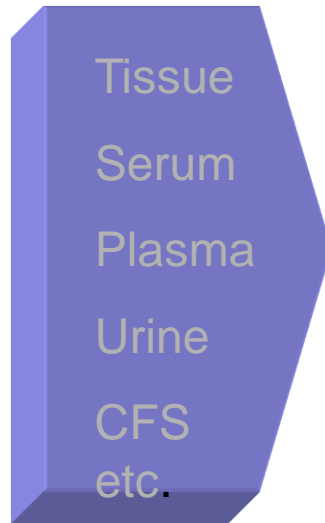


高発現-癌部

バイオマーカー候補-検証ステップ



症例、対象
疾患の決定



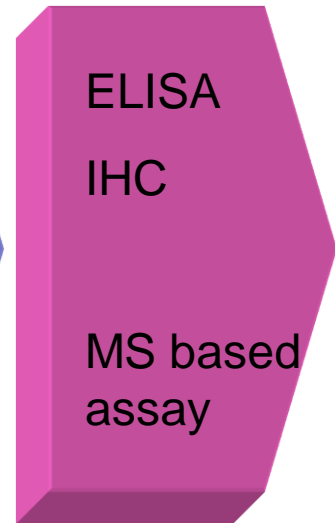
サンプル
収集



サンプル
前処理



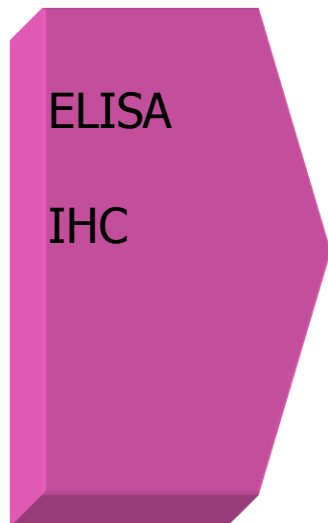
バイオ
マーカー
候補発見



検証

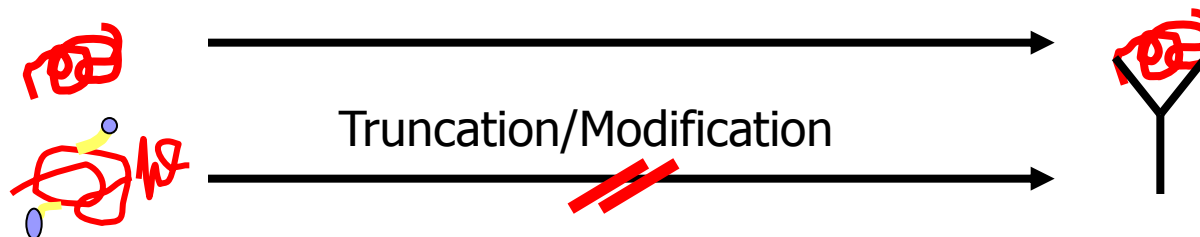
現在あるバイオマーカー探索の問題点

Among 1261 candidates, only 9 have been approved as “tumor associated antigens” by the FDA



ELISA

IHC



タンパク修飾や断片化による抗体アッセイの制限や抗体作成と同定に必要な時間が問題となる。

Validation



1つのアッセイに時間がかかるため、多数のマーカー候補の検証には膨大な期間がかかる

3連4重極型質量分析計によるSRM-MS based定量アッセイ



SRM

Selected Reaction Monitoring

- 3連4重極型質量分析計(Triple Q-MS)によるSRMの原理
- SRMのハイスループット性について
- SRMによる定量アッセイのポテンシャル



1 selecting the mass of the precursor ion

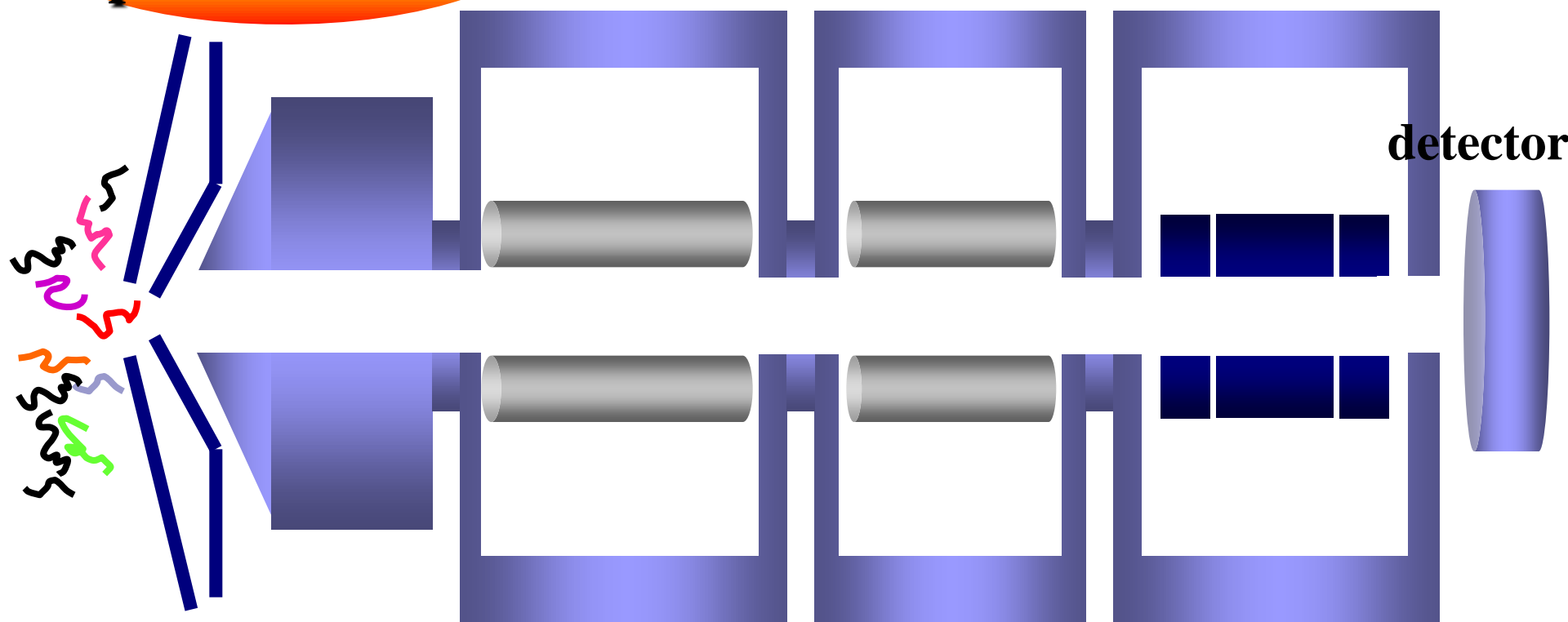
Selection of precursor ion

Q1

Q2

Q3

detector

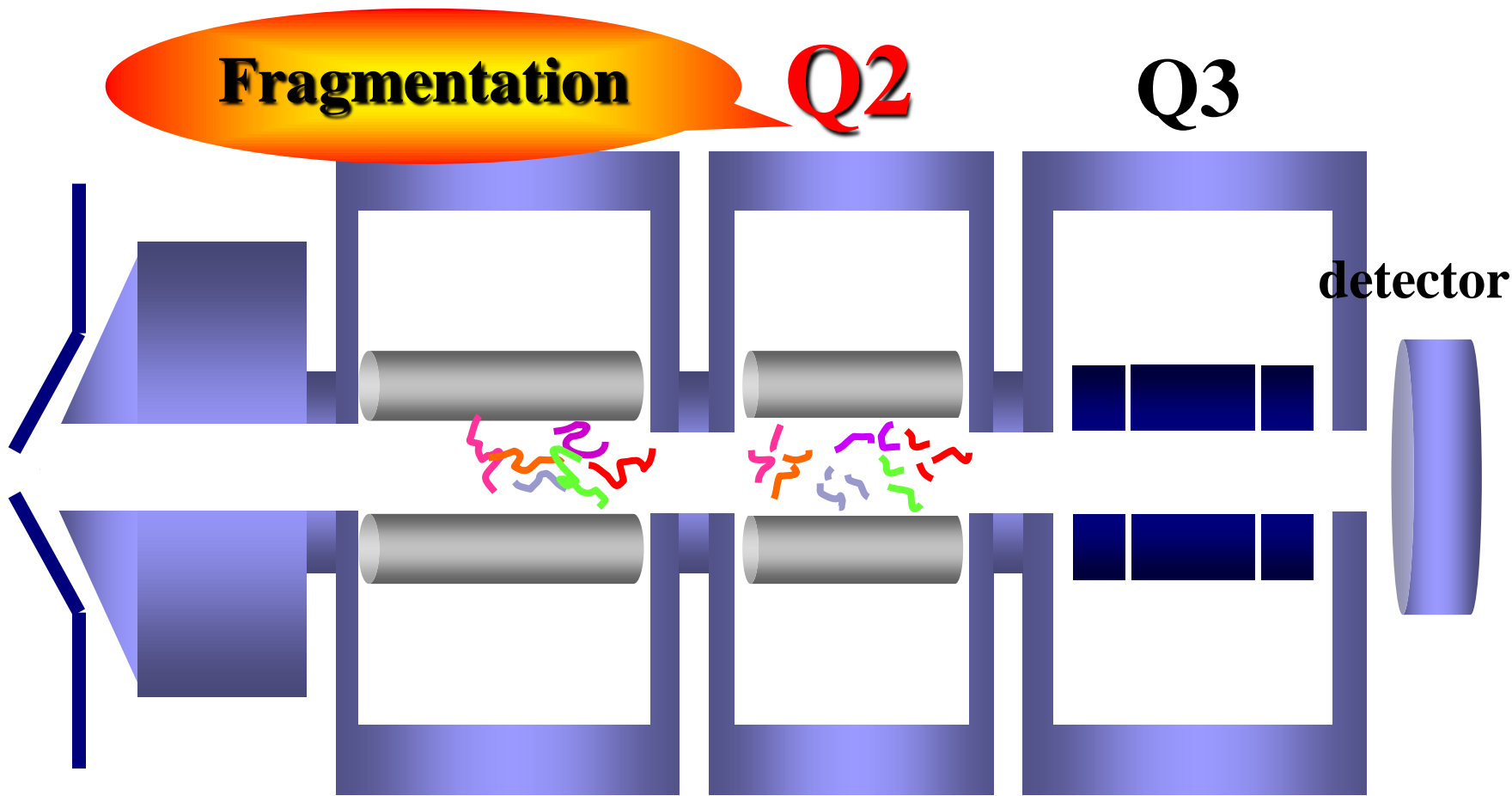


四重極

四重極

四重極

2 fragmentation of the parent ion by collision with gas atoms

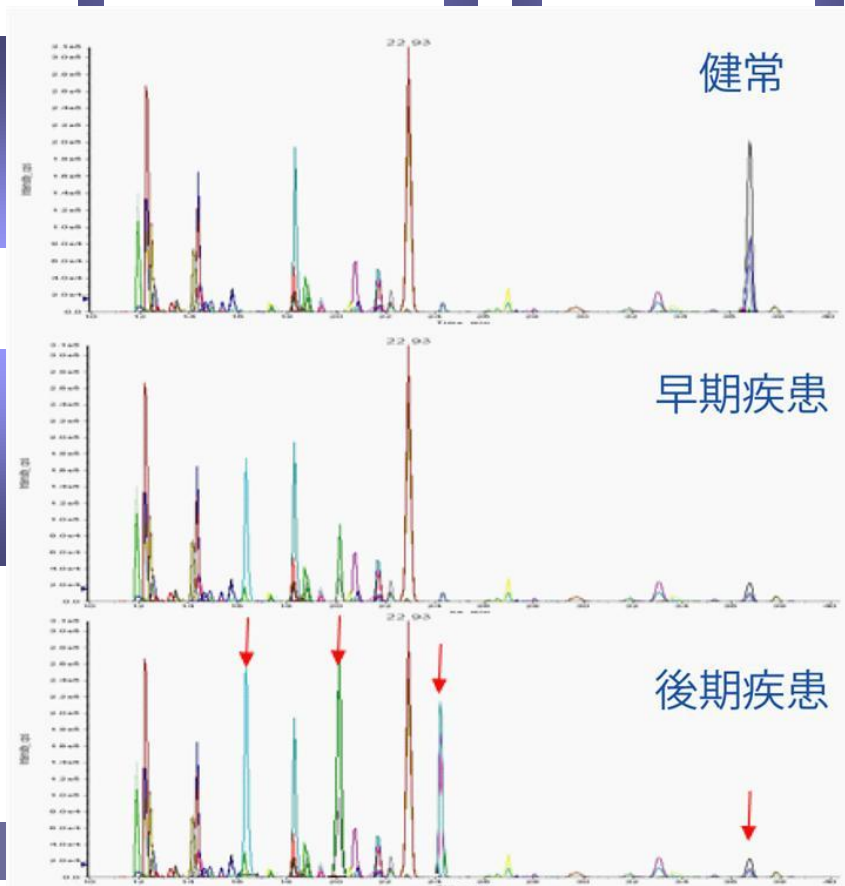
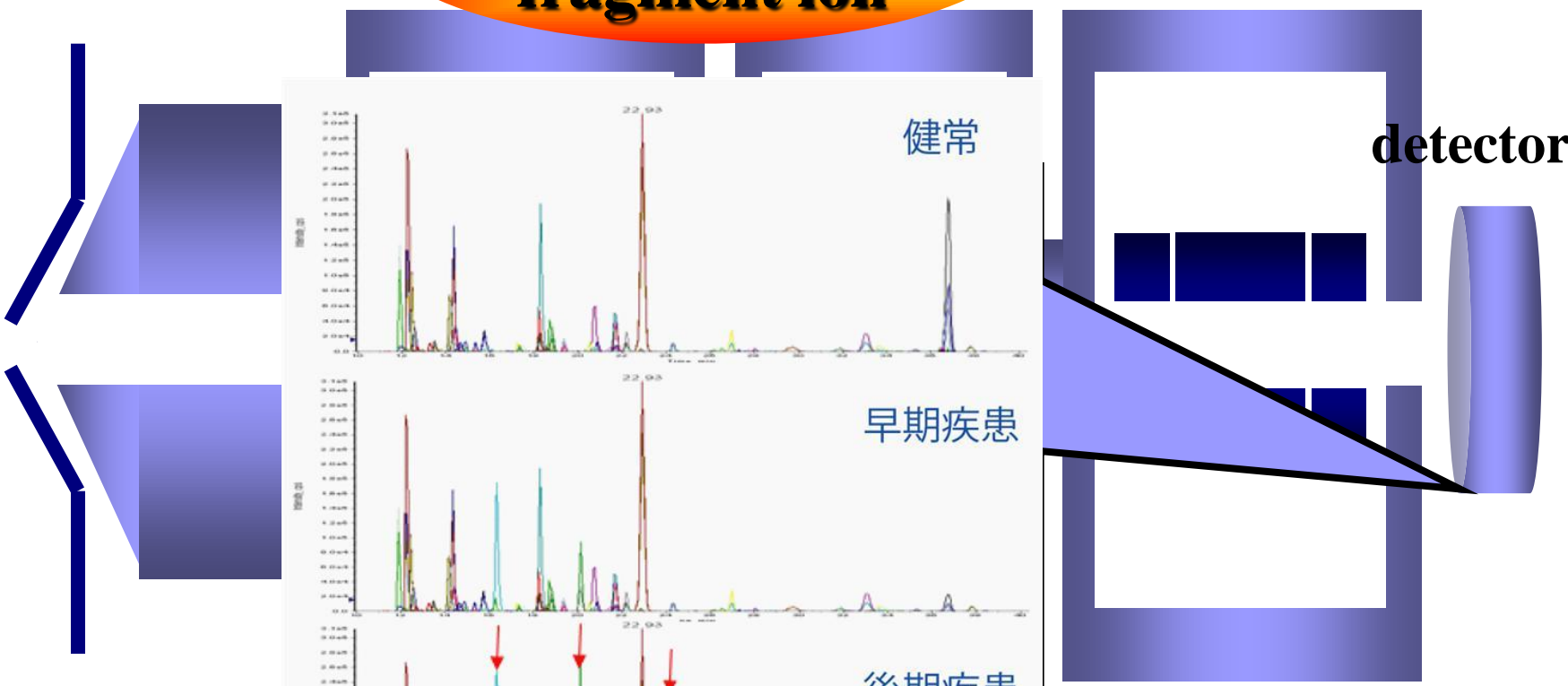


3

selecting a specific fragment of the parent

Selection of fragment ion

Q3



SRM のハイスループットの高さ

SRM

複数の蛋白質(100以上)
の定量が一度に測定可能

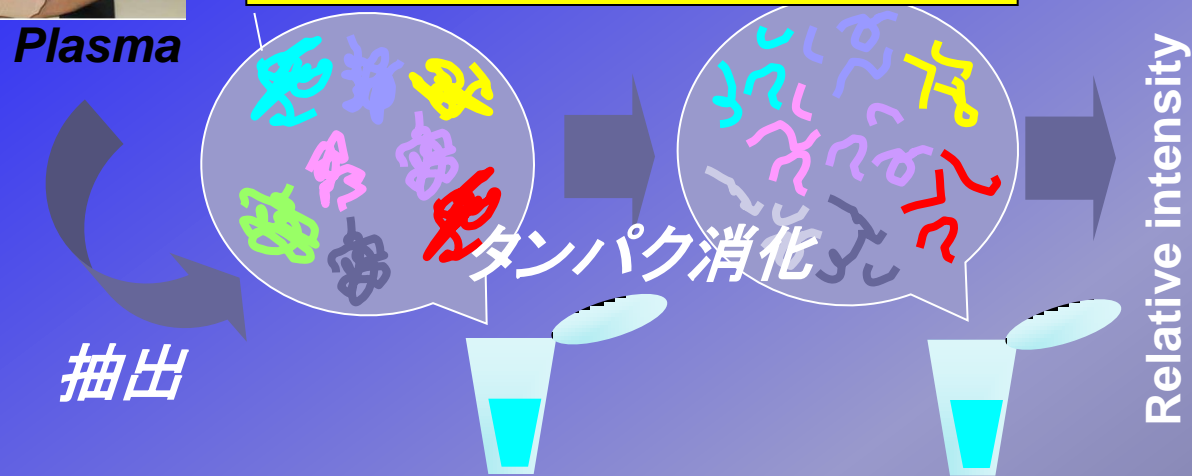
Apply to LC/MS/MS
all together!



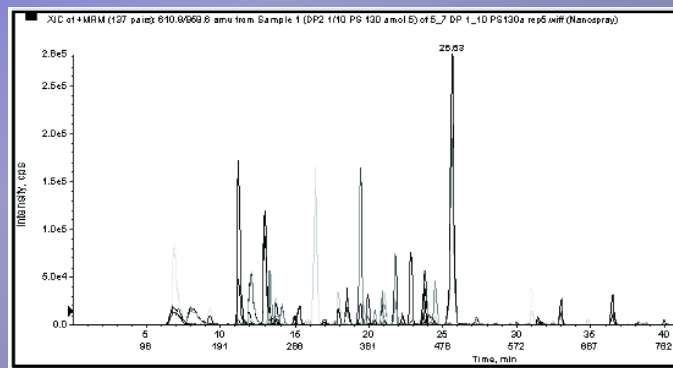
Tissue

Plasma

抽出

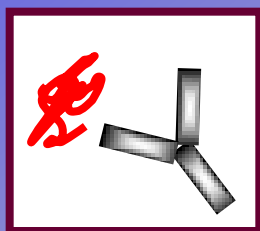


Relative intensity

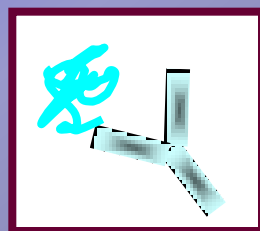


time

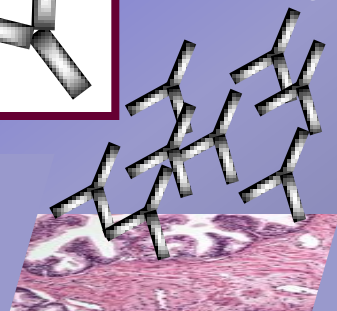
Immuno staining



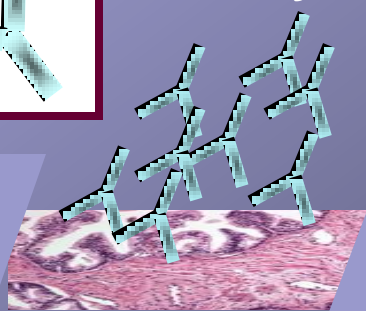
antibody1



antibody2



Tissue



Tissue

他検体のタンパクを染色するには膨大な染色作業が必要

バイオマーカー候補

候補タンパク配列

標的ペプチド
のIn silcoに
よる選択

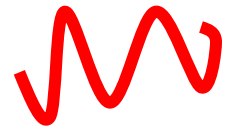
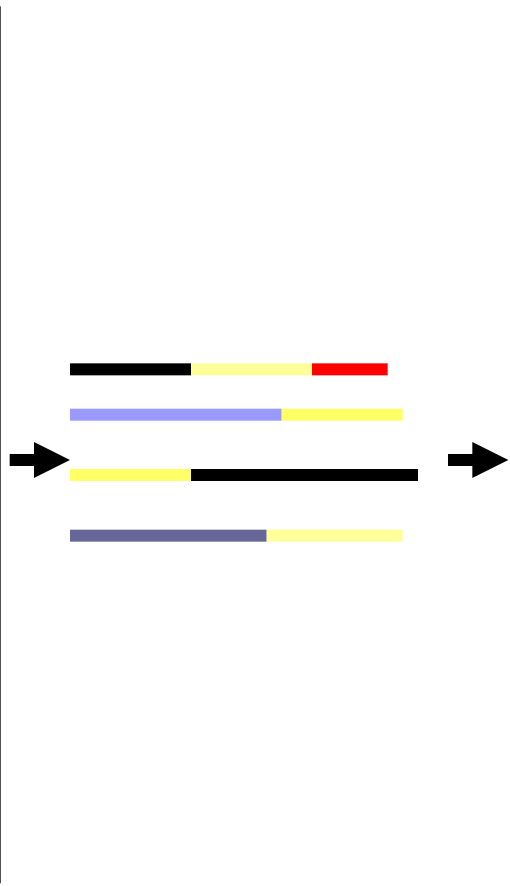
SRM定量アッセイ

Paper, Literature

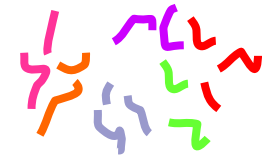
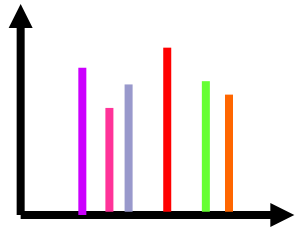
Discovery
Proteomics

Genomics

Other study



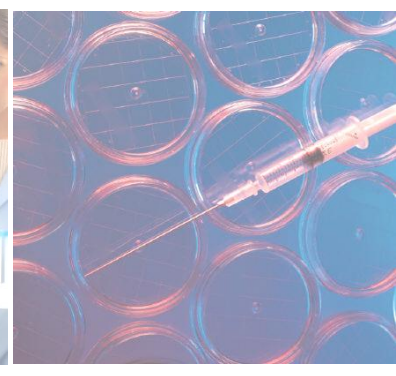
Multiple Assay



No Antibody
use



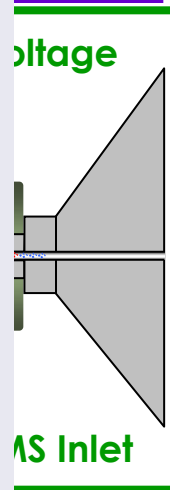
■ 超微量成分の定量アッセイを目指して



最新のLC/MSシステム



LC/イオンソース/MSがインテグレートシステムとして最適化されることにより超高感度分析が可能となる。高感度ハイスループット解析を可能にする最新のフロントエンドとは？



ZAPLOU

ADVANCE Nanoflow UHPLC system

10000psiまで対応する高圧仕様のナノHPLC

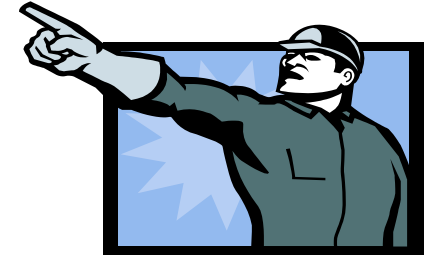
ダイレクトシリンジポンプによるスプリットレス送液

フローセンサーによる流量制御

デッドボリュームが少ないのでグラジエントディレイが少ない

さまざまなカラムスイッチングが高圧仕様でも可能

高圧でもキャリーオーバーの少ないオートサンプラー仕様



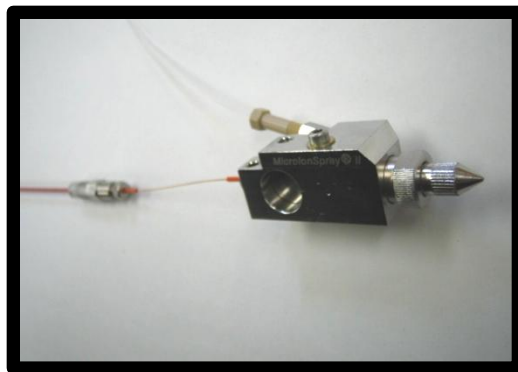
Nano ESIインターフェースの開発

-高感度・安定性の高いスプレーを目指して-

ESI-LC/MSによるバイオマーカー探索のためには低感度の対象に対する感度向上や、他検体を測定するために不休の長期連続測定が必要。



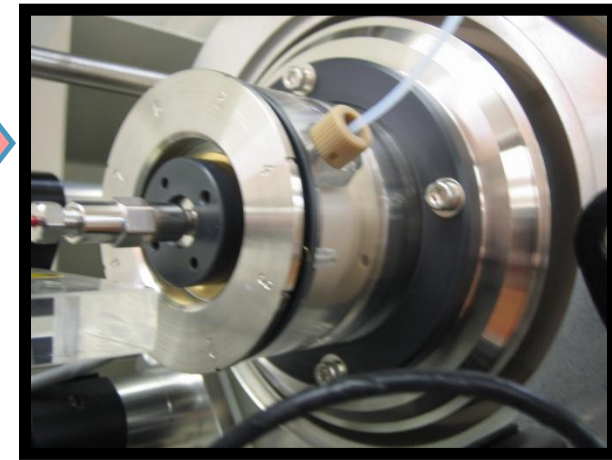
MRMによる定量プロテオーム解析を実現するためには、質量分析計の高感度化と同時に長期LC/MS測定に耐えるスプレーの安定化、スプレーエミッタの耐久性向上を図らなければならない。



Conventional-type

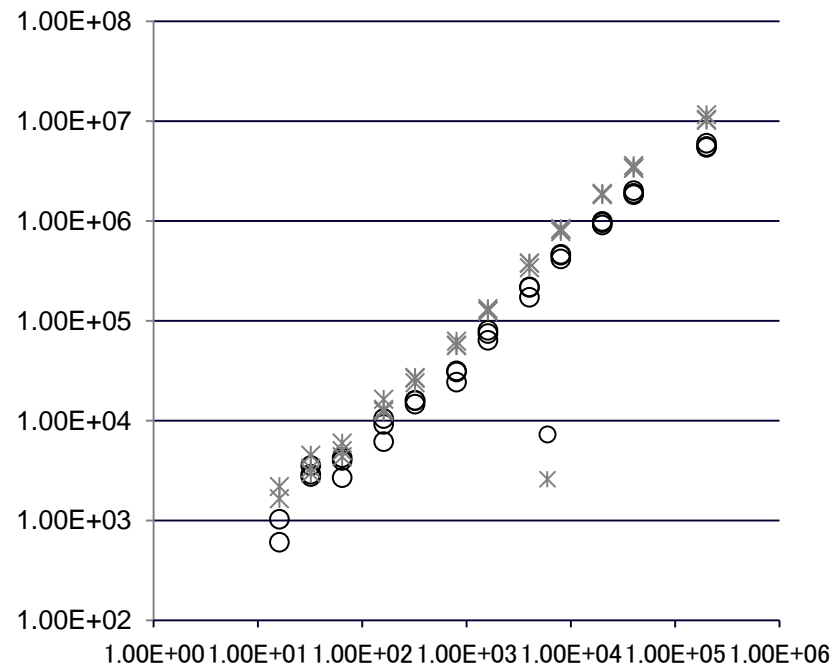
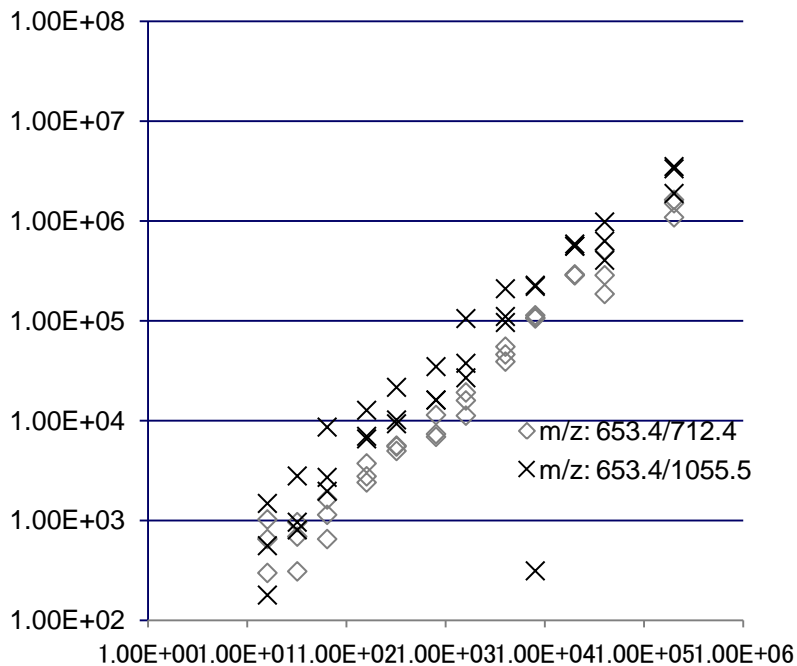


T-type



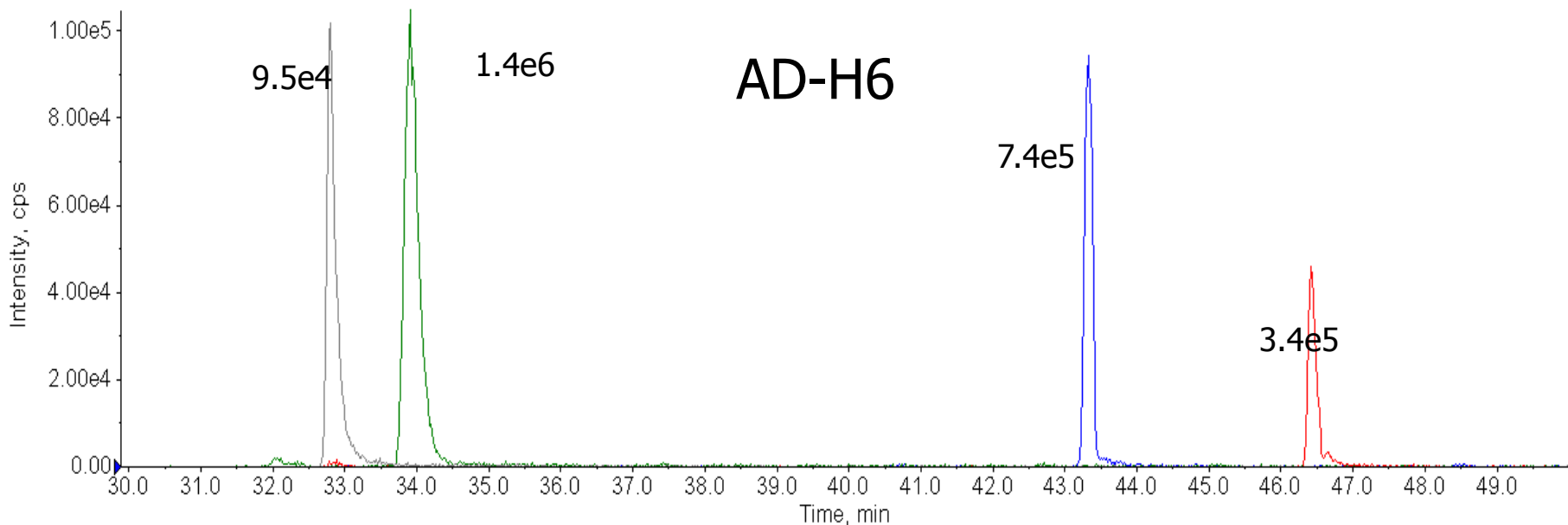
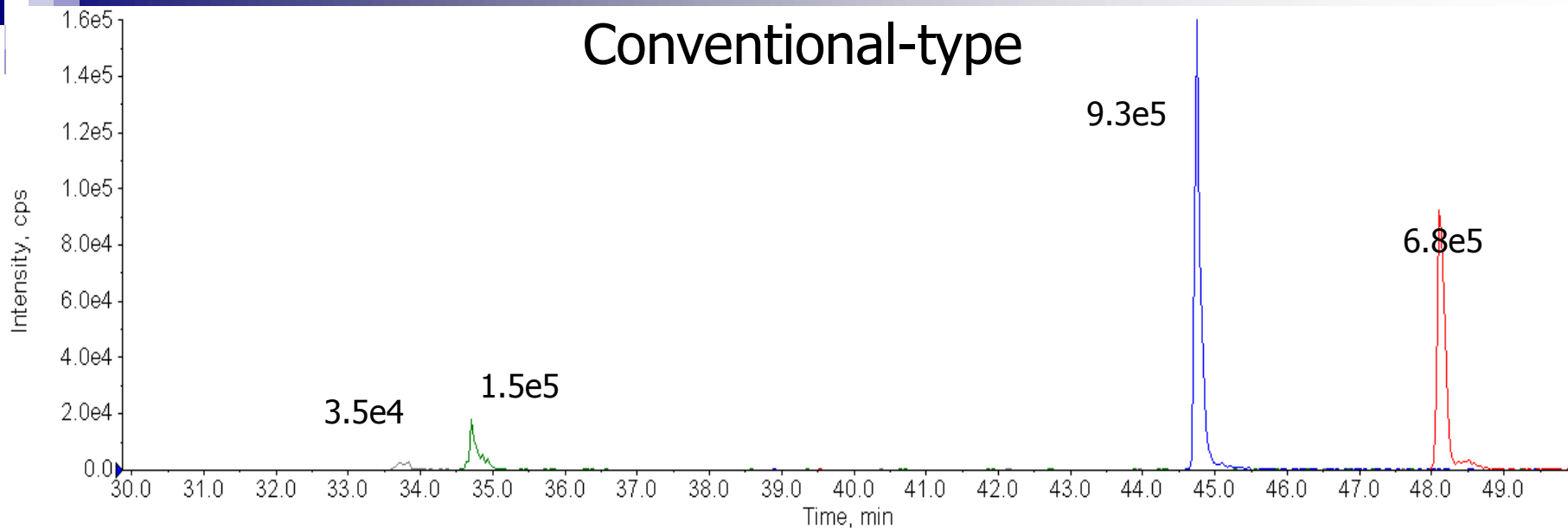
AD-H6

Fig. 1 ESI Interface: Conventional type, T-type, A



BSA concentration profile by MRM assay with a 4000QTRAP LC/MS/MS system.
 Left: T-type + Magic C18AQ 3 μ m 0.1 x 150 mm.
 Right: H type + L-column L-C18 3 μ m 0.075 x 150 mm.
 BSA concentration (16 amol, 32 amol, 64 amol, 160 amol, 320 amol, 800 amol, 1.6 fmol, 4 fmol, 8 fmol, 20 fmol, 40 fmol, 200 fmol)

Conventional-type



Comparizon of two type of interface by analysis of peptide standard 50fmol
Column: ESI-column C18 100 μ m, 3 μ m, 0.1x105 mm, Flow rate: 100 nl/min

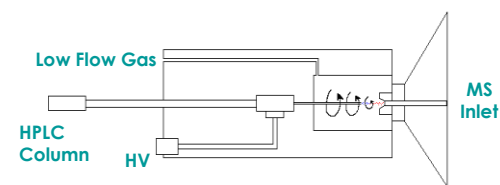
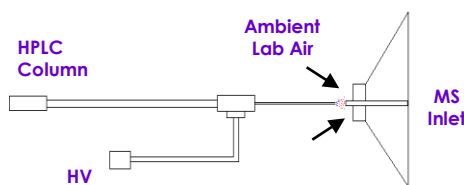
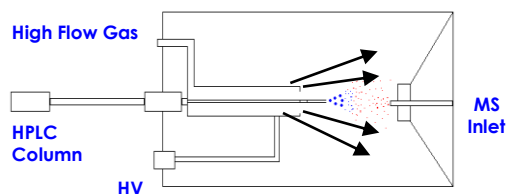


エレクトロスプレーイオン化の歴史

1985

1995

2005



Conventional ESI-MS

In the 80s, conventional ESI revolutionized biomolecule analysis using LC/ESI-MS (50-5000 $\mu\text{l}/\text{min}$). ESI utilizes a high sheath gas flow to desolvate ions but this excessive gas dilutes the sample ions such that only a small percentage of the sample gets into the MS.

Nanospray NSI-MS

In the 90s, Nanospray (NSI) made nLC/NSI-MS (10-1000 nl/min) the gold standard for proteomics research. Like conventional ESI, Nanospray is concentration dependant, so sensitivity improves as the LC flow rate decreases, but low flows limit capacity, throughput and robustness.

CaptiveSpray CSI-MS

The Advance source provides the next step in the evolution of LC/MS (0.1-100 $\mu\text{l}/\text{min}$), using the vacuum of the MS to pull in gas around the spraytip, desolvating and funneling all the sample ions into the MS. It's "Plug and Play" operation provides ESI robustness with NSI sensitivity.

Advance CaptiveSpray Source

イオンソース

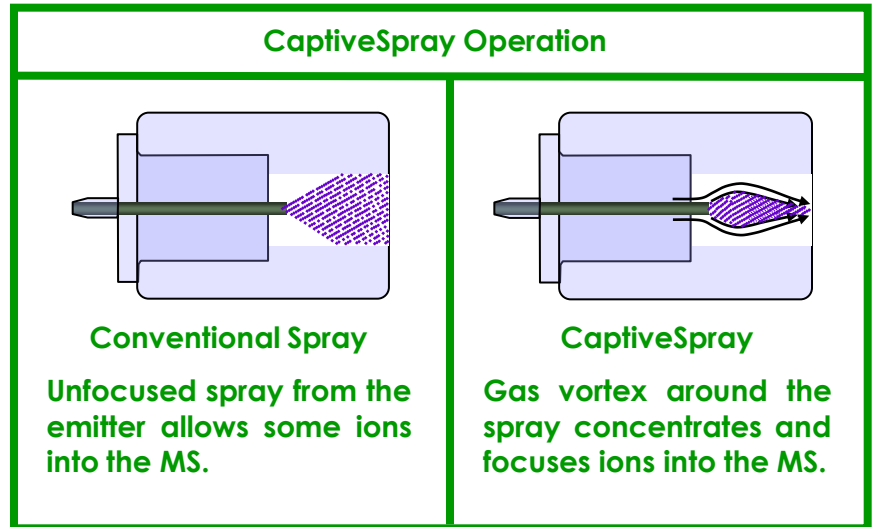
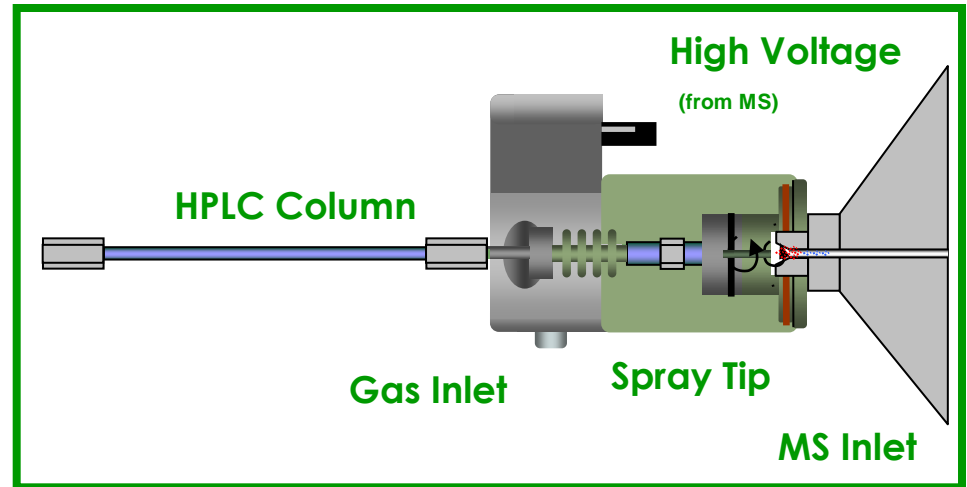
SCIEX




THERMO



BRUKER

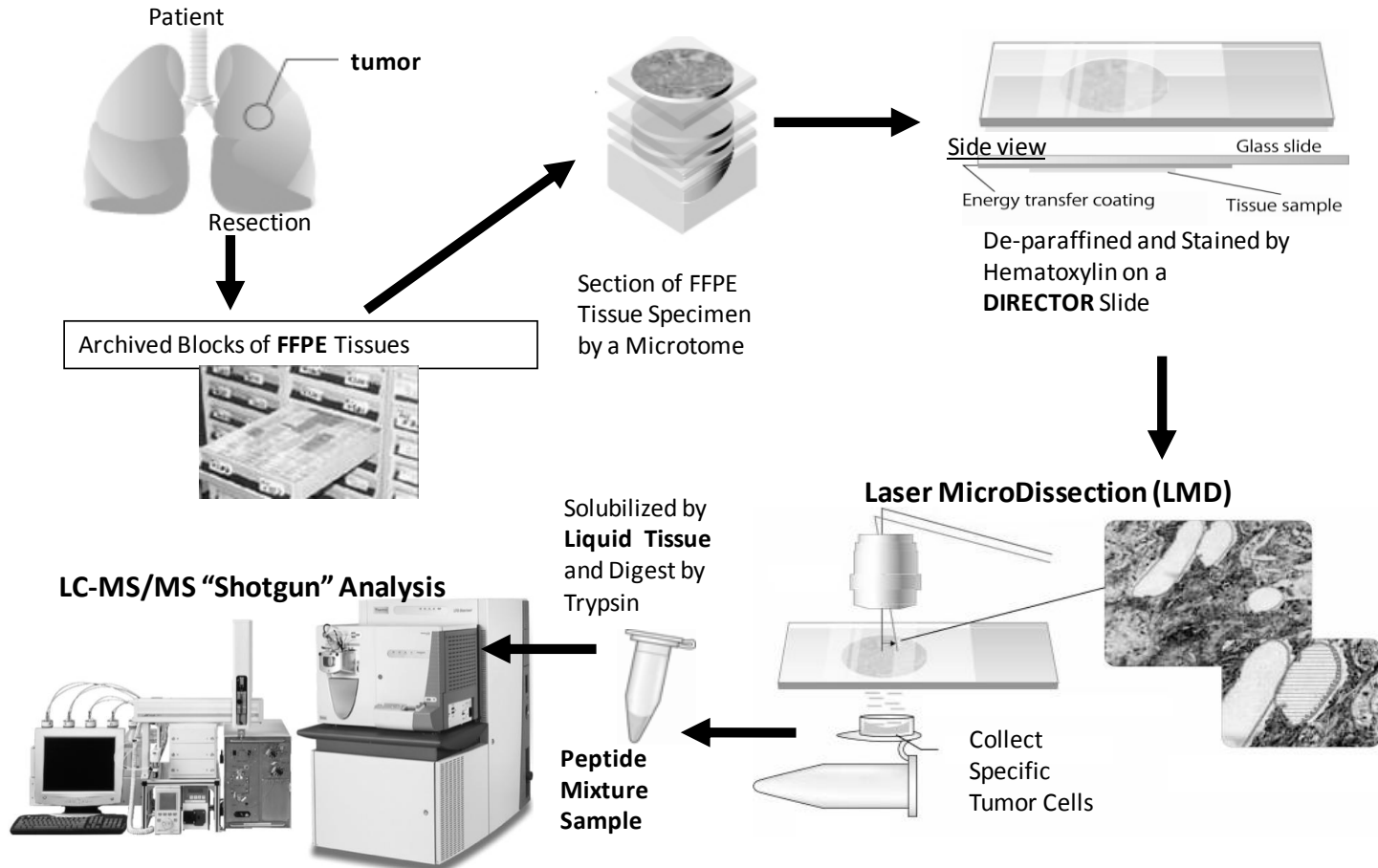




Improved MRM Assays Using a Novel ESI Closed Interface Applied to Biomarker Verification on Large-Cell Neuroendocrine Lung Cancer (LCNEC)

MRM定量質量分析のための新規エレクトロスプレー・インターフェースの開発：大細胞神経内分泌肺癌を区別できる新規マーカーの同定・検証を適応例として

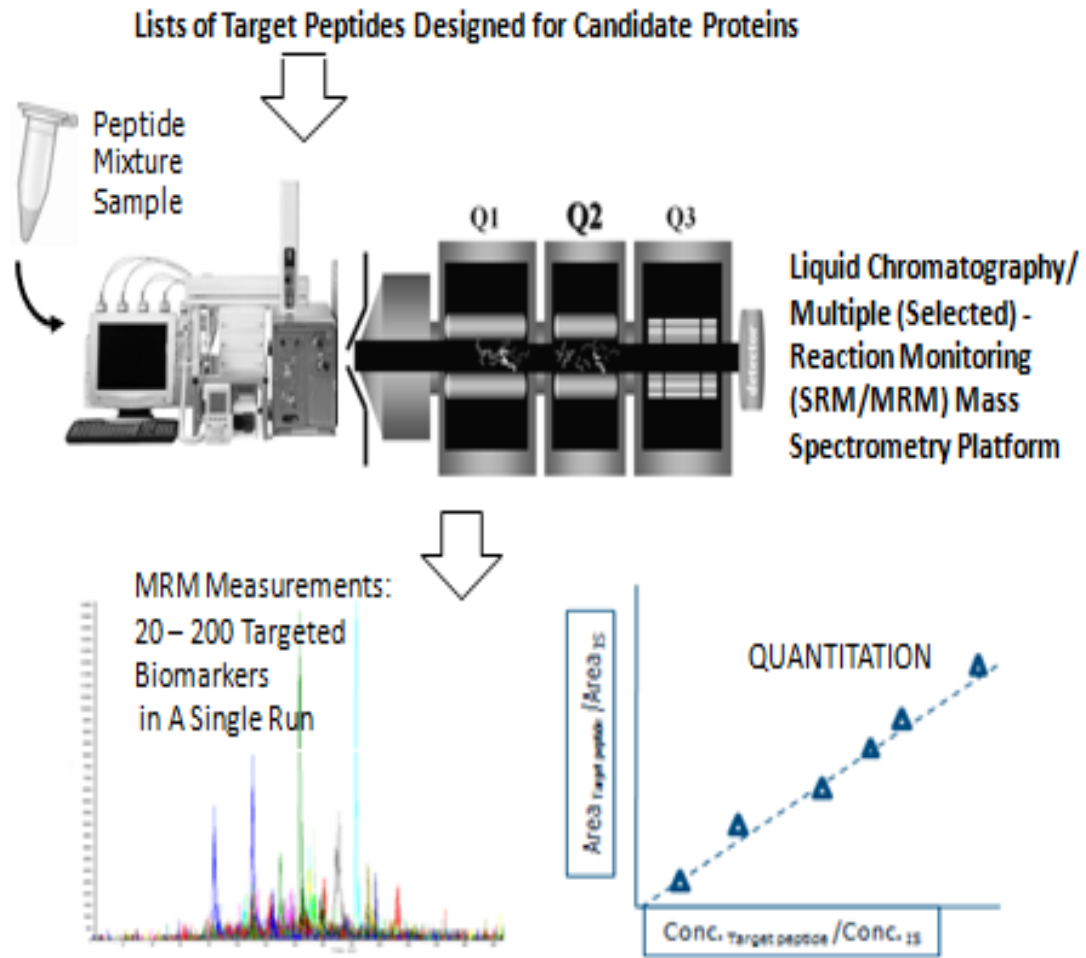
ホルマリン固定包埋(FFPE)ヒト病理標本からのバイオマーカー探索プラットフォーム



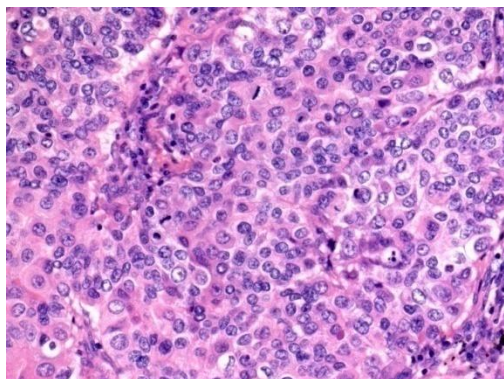
ホルマリン固定ヒト病理標本よりレーザーマイクロダイセクションによって目的部位を回収し、含有タンパク質を抽出する。抽出したタンパク質はペプチド断片化して質量分析装置によって同定する。

同定したタンパク質よりバイオマーカー候補を3連四重極型質量分析装置(Triple-Q)によって定量し、検証する。

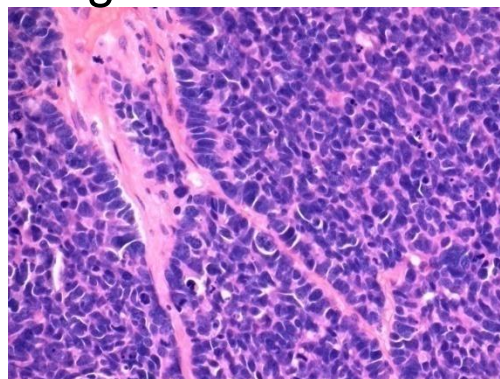
MRM Assay for Biomarker Candidates



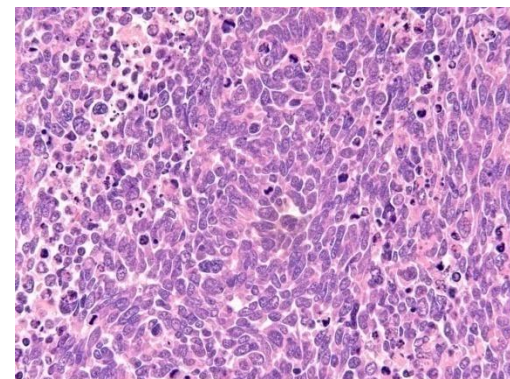
Biomarker discovery Specific to three different types of lung cancers by Using their FFPE tissues



Large cell lung carcinoma (LCC) : 5 cases



Small cell lung carcinoma (SCLC) : 5 cases



Large cell carcinoma Neuroendocrine (LCNEC) : 4 cases

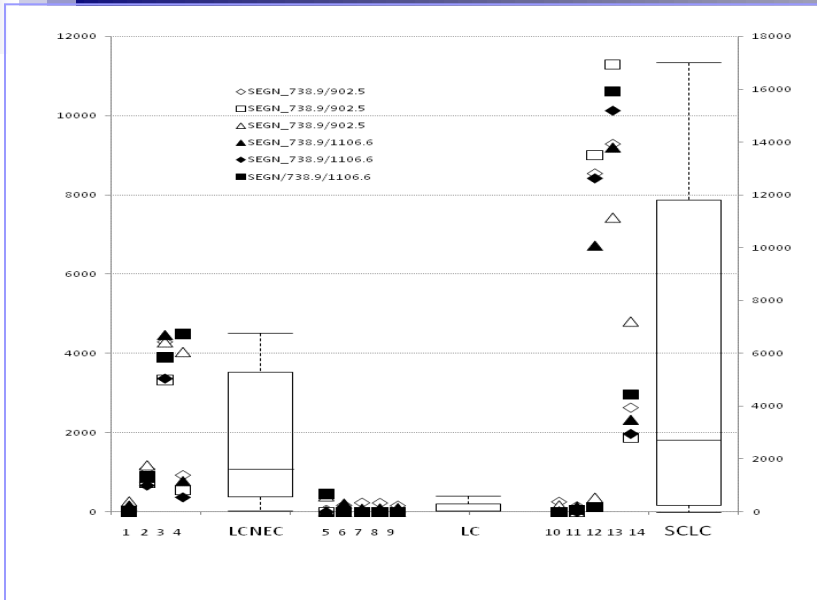
FFPE Proteome Analyses Using Laser Microdissection , Liquid Tissue® Solubilization Followed by High Resolution LC-MS (LTQ-Orbitrap® MS) (triplicate runs per sample)

8, 000, 000 um² collected → ≐ 4-8ug protein
LC/MS assay 1.5ul injection → ≐ 0.15-0.3ug protein

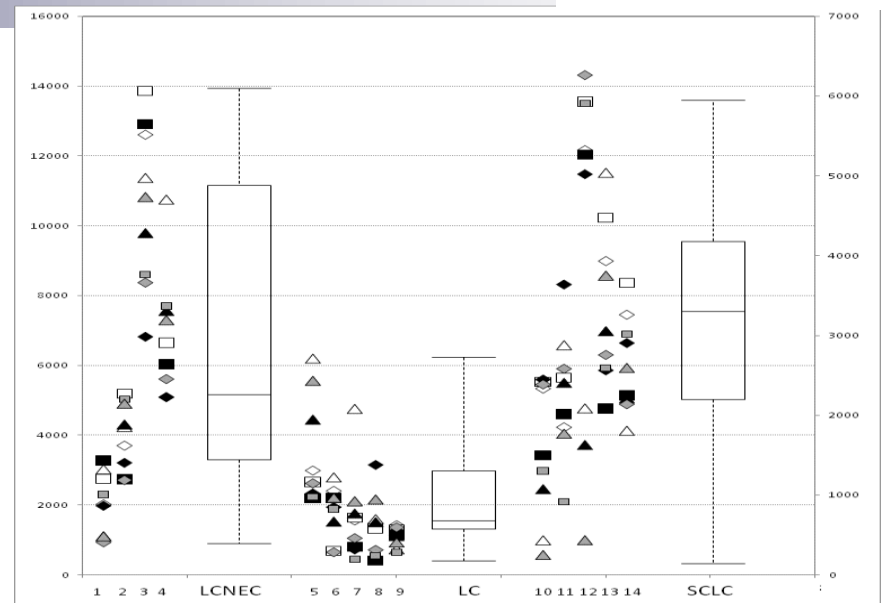
1096 Proteins
id. (p < 0.05)

1083 Proteins
id. (p < 0.05)

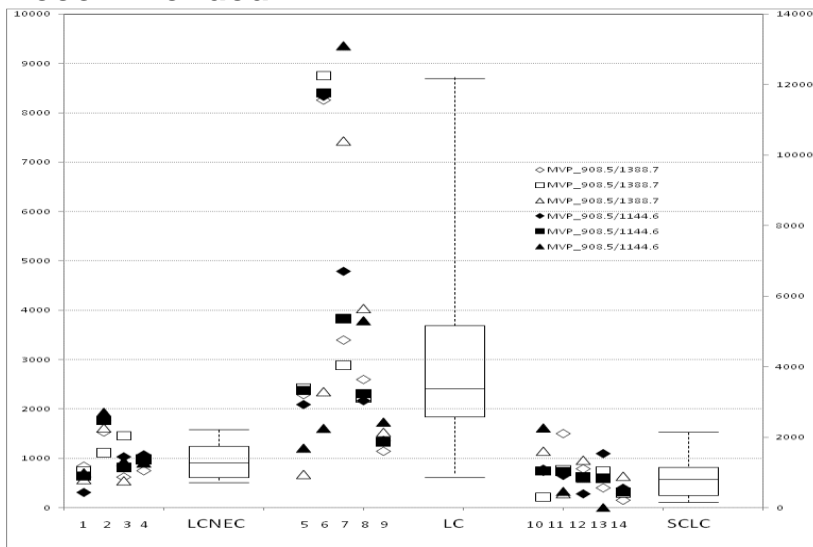
1124 Proteins
id. (p < 0.05)



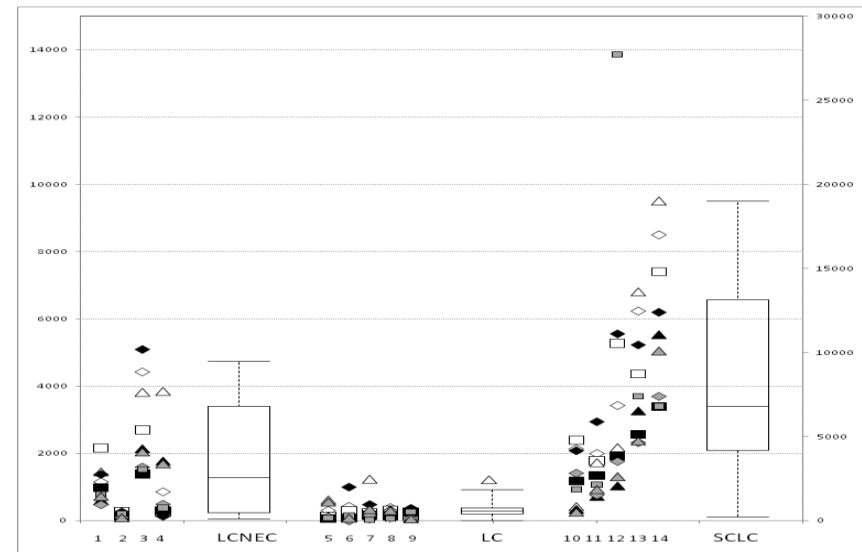
Secretagogin : one of NE-markers already recommended.



A Novel NE Marker: Stathmin



A Novel Marker for LCC: Major vault protein



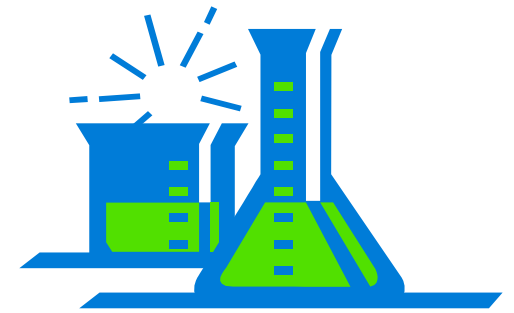
A Novel Marker for SCLC: Brain acid soluble protein

Differentiation of LCNEC from LCC and SCLC

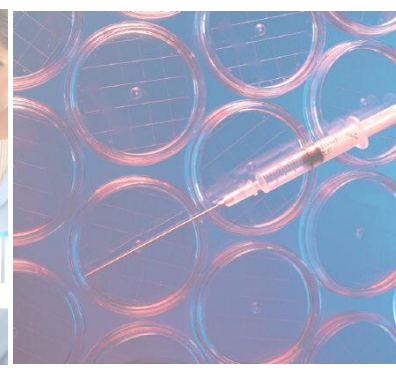
Marker Proteins (Swiss plot acc. No.)	LCNEC	LCC	SCLC
Major vault protein (Q14764)	—	+	—
Stathmin (P16949)	+	—	+
Brain acid soluble protein 1 (P80723)	—	—	+

*Differentiation on the basis of quantitative MRM assay results with threshold values.

US PATENT APPLIED



Nano-ESI-LC/MS/MS質量分析計を主幹としたプロテオーム解析 の実用・応用例



シグナル伝達研究

細胞膜上のチロシンキナーゼ受容体(例:EGF受容体)の活性化に伴う相互作用タンパク質複合体(Receptosome)の解析

細胞内シグナル伝達のタンパク質複合体(シグナルソーム)の解析

遺伝子のプロモーター領域に結合する転写因子複合体(トランスクリプトソーム)の解析

翻訳後修飾によるリン酸化タンパク質の解析

再生医学発生分化研究

ES細胞におけるProteomics解析

受精卵分化に関与する微量タンパク質(酵素、制御因子、転写因子)/脂質解析

膜タンパク質(Drug Target)解析

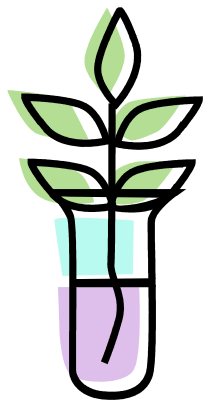
Non-Detergent膜タンパク質可溶化技術による膜タンパク質の網羅的解析

細胞間シグナル伝達解析

脂質ラフトにおけるタンパク質解析

臨床プロテオミクス

病態関連バイオマーカー探索



Signaling Pathways

Understanding signaling protein pathways upon treatment

VEGF binds to VEGFR-2



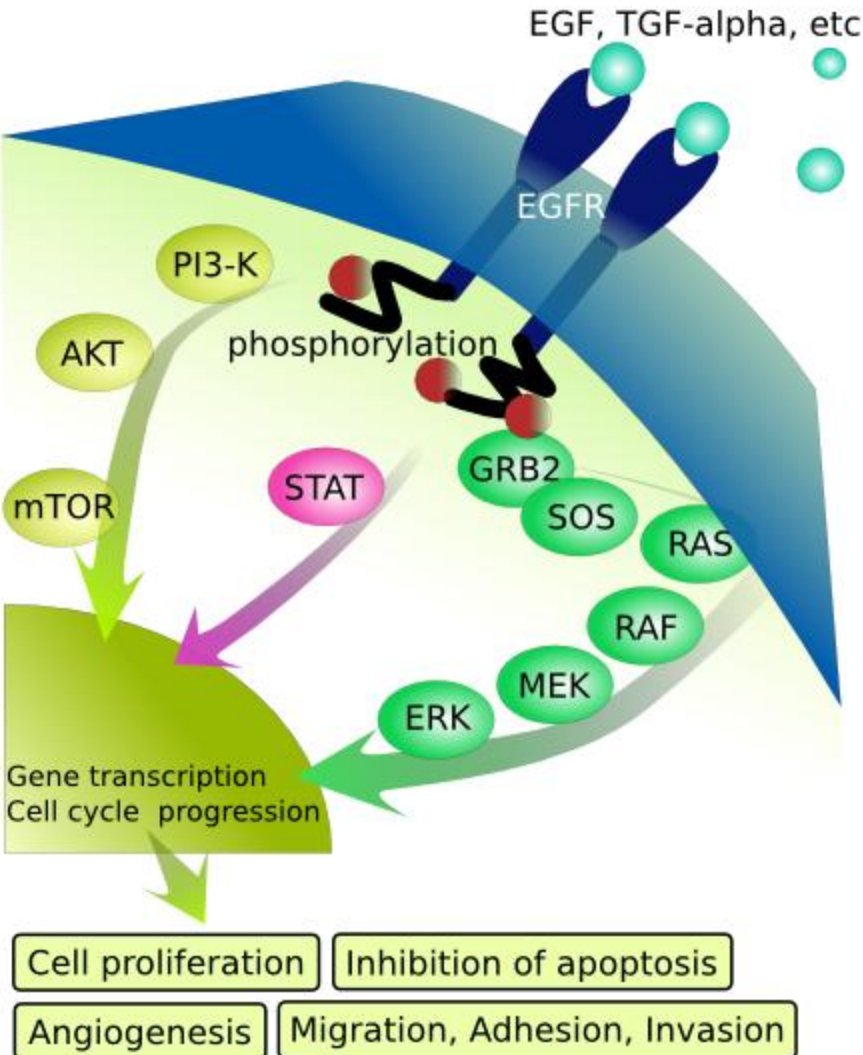
Endothelial cell

vascular permeability

protease production

migration

proliferation



蛋白質定量による抗がん剤感受性予測

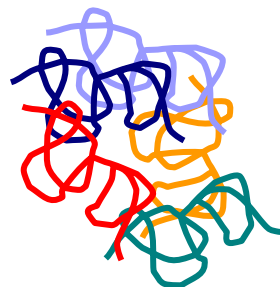
- Taxan系抗癌剤: CHCR
- アルキル化系抗癌剤: **MGMT**
- トラツズマブ(乳癌): Her2
- イマニチブ(GIST): c-kit
- ゲフィニチブ(肺非小細胞癌): EGFR
- 5FU系抗癌剤: TS, DPD, OPRT

抗癌剤の効果予測が可能になれば手術前/後の治療法の選択ができ、無駄な抗癌剤の投与や副作用の回避なども考えられる。

複合タンパク質解析



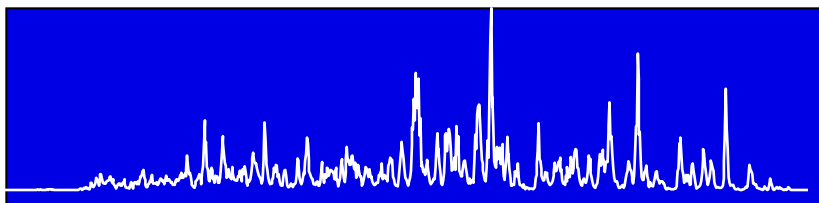
←
酵素消化



タンパク質混合物



ペプチド混合物



1 D RP μ LC/MS/MS



データベース検索によるタンパク質同定

臨床サンプル

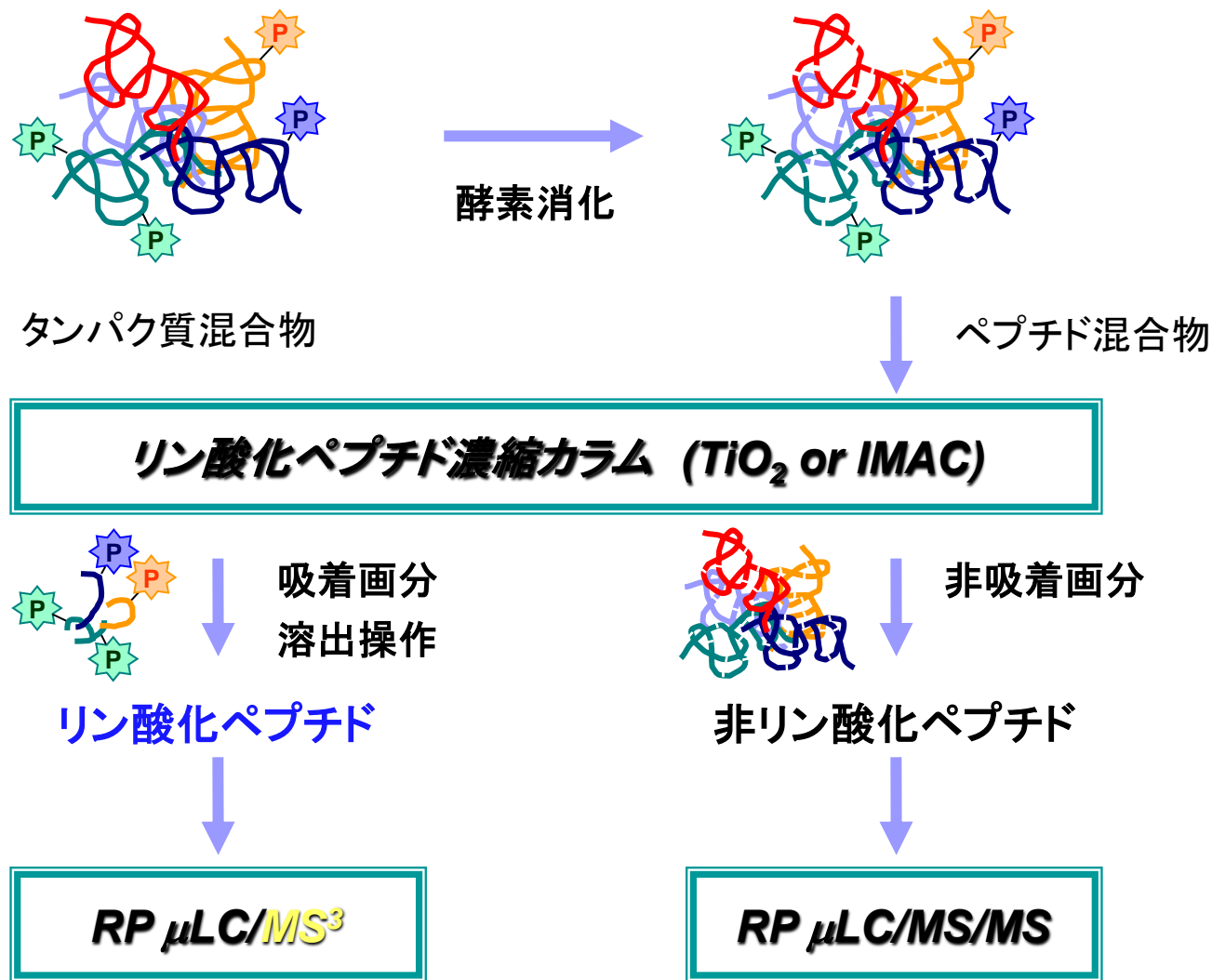
Subcellular lysate

FRAG/TAP Complex

免疫沈降 (IP) サンプル

核内転写/受容体因子
蛋白質群

リン酸化ペプチドの分離・濃縮法の概要



次世代シーケンサーの出現

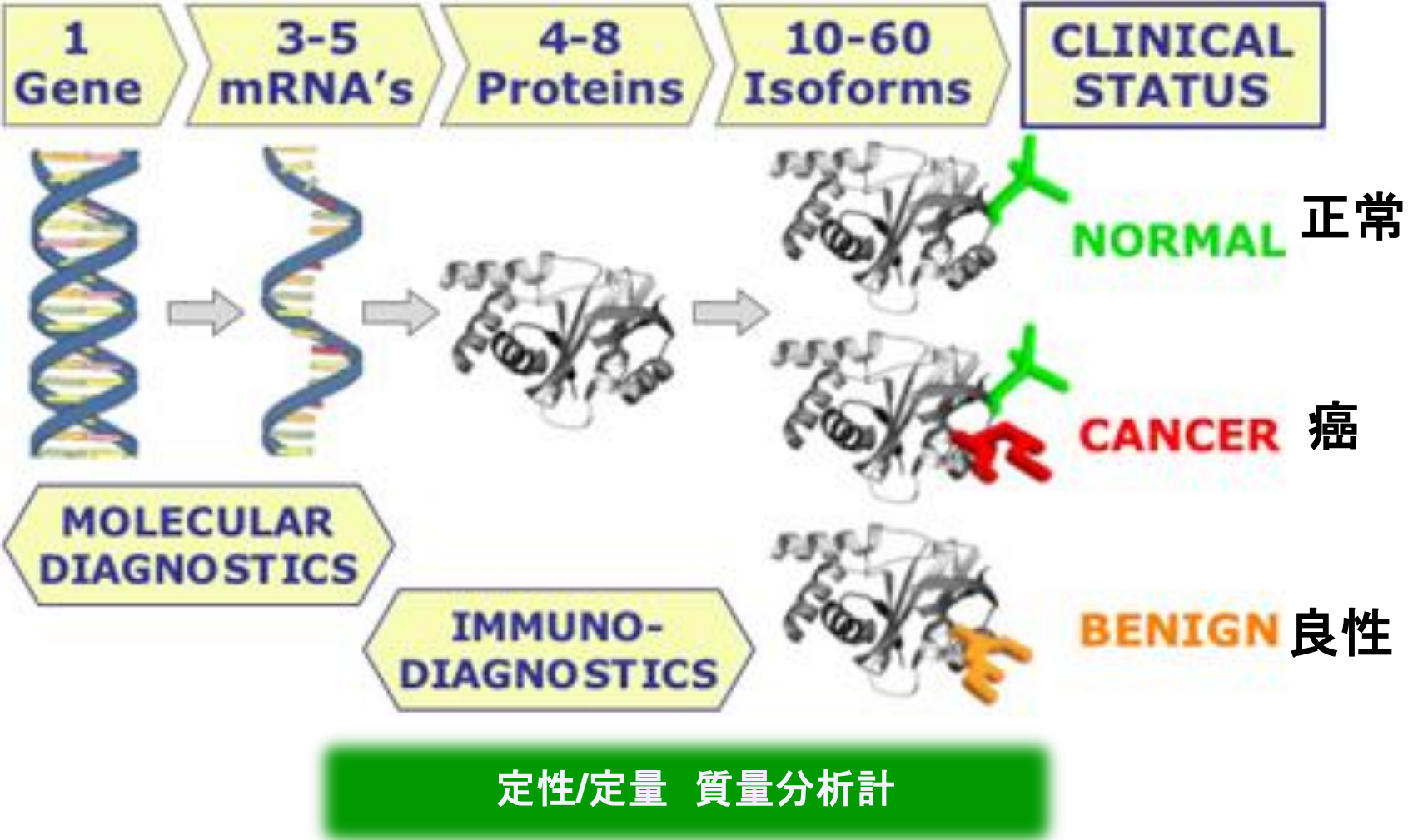
- 1000億の塩基をわずか4分で解析
- 難培養菌のゲノム情報
- メタゲノム — メタプロテオミクス

生態系における生産、循環、分解での機能や機能の担い手である生物群を迅速に評価する

機能の発現予測

活性の測定及び予測

タンパク質一部配列相異による表現系の違いも質量分析計によって定性的、定量的に検証することが可能になってきた。



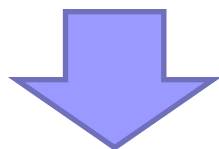
ISOFORMS: KEY TO PROTEIN FUNCTION AND DIAGNOSTIC UTILITY



ヒト病理標本によるバイオマーカー研究対象となった実例 (エーエムアール株式会社実績)

- ・疾患イメージング解析
- ・肺がん
- ・胆道がん
- ・膵臓がん
- ・前立腺がん

がんセンター
東京医科大学
東北大学
東北大学
慈恵医科大学



医療機関に保存されているホルマリン固定(FFPE)ヒト病理標本から抗体を用いることなくバイオマーカーを発見することが現実となってきた。

Point

- Nano-flow LC/MS/MSの登場により、近年のプロテオーム解析技術の向上は目覚ましく、定性だけでなく定量的検証も可能となってきた。
- SRMにより代謝物のような低分子の微量定量、目的のペプチドや蛋白質の微量定量が可能である。
- 最新のソフトウェアでは膨大なデータの処理能力が向上しており、短期間でのデータ解析が可能になってきた。
- タンパク質翻訳後修飾や複合タンパク質、シグナル伝達などこれまで質量分析では困難とされてきた分野も進出は目覚ましく、ニーズはますます広がっていくと予測される。

