

技術習得報告書

Laser capture microdissection と LC/MS の技術習得

場所：独立行政法人 物質・材料研究機構（NIMS）

期間：2009年1月22日から2月2日まで

はじめに

現在私は、「ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）組織を用いた胆道癌の新規バイオマーカー探索」をテーマに学位取得に向けて研究を行っている。本研究は未だに予後不良である胆道癌の新たな治療戦略構築のため、早期診断や予後、治療反応性に関わる因子をタンパクレベルで解析することを目的としている。

本研究を進めるには、細胞特異的なサンプル回収を可能とする laser capture microdissection、及びタンパクレベルでの網羅的な解析が可能な LC/MS の 2 機器が必要不可欠である。NIMS はタンパク発現解析に最適化された上記 2 機器を保有している。我々の研究グループでは NIMS 共同研究型支援の申請を行い、すでに正式な支援許可を受け、NIMS においての研究を開始している。

今回私は、GCOE プログラムの国内出張支援を受け、上記期間中に技術習得を主目的として研究を行ってきたので報告する。

NIMS とは (<http://www.nims.go.jp/jpn/index.html>)

物質・材料科学技術に関する基礎研究及び基盤的研究開発等の業務を総合的に行うことにより、物質・材料科学技術の水準の向上を図ることを目的として平成 13 年に設立された。国際的な物質・材料研究活動を牽引する中核的機関としての役割を果たしている。その中で、一般の機関では導入が難しい高度な施設及び設備を開発・整備し、外部研究者へ利用機会を提供すべく、施設及び設備の共用も進めている。

なお NIMS の論文被引用回数は、独法化前 5 年間と直近の 5 年間を比較すると 5 倍以上となっており、その世界ランキングは 31 位から 4 位と驚異的な上昇を見せている。

FFPE を用いたバイオマーカー探索のワークフロー

1. スライド作製

FFPE 組織を 10 μm に薄切し、DIRECTOR レーザーマイクロダイセクションスライド（AMR 社 <http://www.amr-inc.co.jp/>）に伸展させる。DIRECTOR スライドはレーザーマイクロダイセクションシステム用に開発され、ユニークなエネルギー転送コーティングがガラス表面に施されており、レーザーが当たった瞬間に蒸発（融解）すること

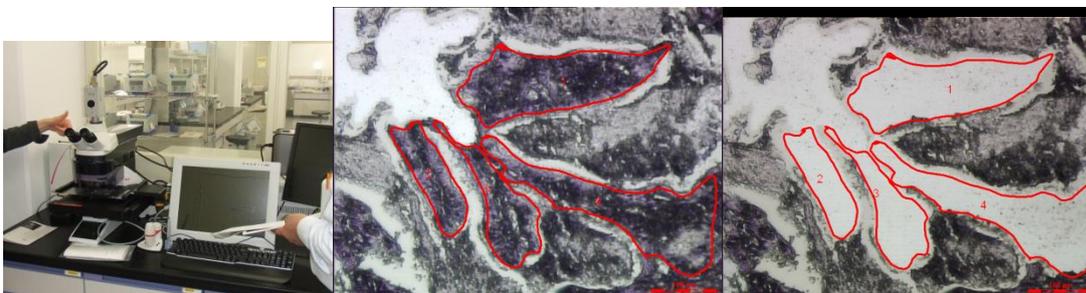
でその部分の組織を直接採取チューブに落とし込む。エネルギー転移層（コーティング）がすべてのレーザーエネルギーを吸収するため、サンプル内の生体分子に影響を及ぼすことはない。また、その際エネルギー転移層は完全に消滅するので、サンプルがコーティングによってコンタミネートされることもないとされる。

DIRECTOR スライドに組織を伸展させたのち、ヘマトキシリン単染色を行う。



2. Laser capture microdissection

NIMS ナノテクノロジー融合支援センター内 NIMS-Leica バイオイメージングラボの LMD6000（ライカマイクロシステムズ <http://www.leica-microsystems.co.jp/>）を用いて Laser capture microdissection を行う。LMD6000 は組織切片から分析したい目的の領域を UV レーザーで切り抜いて回収する。カットニングの速度と精度が飛躍的に向上し、短時間のハンドリングで、高い回収率を誇る。次の LC/MS 解析には、約 30000 細胞（厚さ 10 μm の場合、 $2 \times 4\text{mm}^2$ に相当）が必要とされる。



3. サンプルのペプチド化

従来、ホルマリン固定された組織では分子内及び分子同士のクロスリンクのため蛋白質などの巨大分子は抽出されにくく、プロテオーム解析を行うことは困難とされていた。しかし近年開発された Liquid Tissue® MS Protein Prep キット（AMR 社）によりホルマリン固定組織中の蛋白質を消化しペプチドの抽出が可能となった。新鮮凍結標本を用いた場合と比較して遜色のないプロテオーム解析を行えることが示されている。これにより、臨床情報・予後情報の付随した未開拓のプロテオーム情報源である FFPE 組織を用いた研究が可能となった。



4. LC/MS

ZOUPLUS Discovery LC/MS システム (AMR 社) は、多機能オートサンプラー、高性能ナノフローLC システム、安定したナノエレクトロスプレー技術、イオントラップ型質量分析計がインテグレートされた高感度 LC/MS システムである。前述の処理を施したサンプルをオートサンプラーにセットするだけで多数の臨床サンプル解析を自動的に行い、組織中に含まれるタンパク質群を高感度で網羅的に解析することが可能である。



成果

今回は 10 サンプルを解析した。それぞれから数百種類のタンパク質が同定され、安定した解析が行える方法であることを確認できた。NIMS や AMR 社スタッフによる指導を受け、技術を習得した。とはいえ、機器のトラブル (特に LC や MS) がないことが前提となる。

今後は、サンプル数を増やして癌部や正常部で発現に差異のあるタンパク質をリストアップしていく。