

HiPLEX-IHCプローブを用いたヒト扁桃腺タンパク質の卓上MALDI MSイメージング

Caroline J. Jones¹、海野 結実²

¹ KRATOS GROUP PLC. KRATOS ANALYTICAL LTD.、² 島津製作所

ユーザーベネフィット

- ◆ 卓上MALDI-TOFシステムで、簡便にタンパク質MSイメージング (MSI) が可能です。
- ◆ 免疫組織化学法とMALDI MSIを統合したワークフロー (MALDI-IHC) により、標的解析が可能です。
- ◆ 1回のMSIで20種類のタンパク質のイメージング解析ができます。

■はじめに

本アプリケーションでは、抗体反応を用いた試料調製法により、これまでMSイメージングでは検出が難しかった組織切片上のタンパク質の正確な位置情報を得る方法を紹介いたします。MiralyS MALDI HiPLEX-IHC組織イメージング用抗体プローブ (AmberGen, MA, USA) は、抗体とUV照射で切り出される光開裂性質量タグ (PC-MT) が結合したプローブです。このプローブを使って、組織切片に抗体反応を行い、その後PC-MTを光切断します。PC-MTのMALDI MSイメージを取得することで、間接的に抗体と標的タンパク質の位置情報を得ることができます。この技術はMALDI-IHC (MALDI-免疫組織化学法) と呼ばれ、新しい治療法の開発に不可欠な細胞間相互作用の理解に役立ちます。今回、卓上MALDI-TOF装置MALDI-8020/MALDI-8030 EasyCare (図1) を用いて、30 μmの空間分解能でホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) ヒト扁桃腺切片を測定し、タンパク質の局在を確認しました。6種類および20種類のプローブパネルを使用することで、低コストの装置でも一度の分析で複数のタンパク質の空間分布を取得できます。



図1 卓上リニアMALDI-TOF型質量分析計
MALDI-8020/MALDI-8030 EasyCare

■正常ヒト扁桃腺に対する6-plex抗体プローブミックスでの実験条件最適化

FFPEヒト扁桃腺切片 (AMSBIO, Oxford, UK) をポリリジンコートされたFlexiVision-mini ITOスライドに貼り付けました。6種類の抗体プローブミックス (表1) を使って実験手順に問題がなく、期待する結果を得られるか確認しました。具体的には、まず切片をキシレンで脱パラフィン処理し、エタノール水溶液の濃度を変えた一連の洗浄液に浸した後、アルカリ性緩衝液で抗原を活性化しました。その後、MiralyS MALDI HiPLEX-IHCキット (AmberGen, MA, USA) に従って、試料を光切断可能な抗体プローブミックスで染色しました。

表1 ヒト扁桃腺 6-plex抗体プローブミックス (AmberGen)

Target Antigen	Tissue Expression	Target MW	Mass Tag [M+H] ⁺
CD3 ε	T-Cells	23 kDa	1,161.65
CD68	Macrophage Cells	75-110 kDa	1,216.75
VIM	Lymphoid Cells	57 kDa	1,230.84
Col-1A1	Collagen (extracellular matrix)	138 kDa	1,234.87
PanCK	Epithelial Cells	40-68 kDa	1,288.72
Ki67	Germinal Centres	319-359 kDa	1,320.76

次に、組織サンプルにUV光を照射して質量タグを切断し、マトリックス蒸着装置iMLayer™を使って2,5-ジヒドロキシア安息香酸 (DHB) を蒸着しました (図2)。

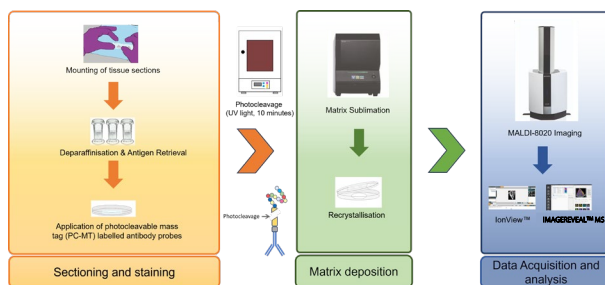


図2 MALDI-IHC MSIのワークフロー
組織切片に対して抗体反応を行った後にPC-MTを光切断します。さらにマトリックスを塗布して質量分析に供し、タグの分布を可視化します。

データ解析(6-plex抗体プローブミックス)

MSIにはMALDI-8020を使用しました (図1)。分析条件は表2に示しています。60,201ピクセルの分析を4時間8分で完了しました。

表2 MALDI-8020の分析条件

System	: MALDI-8020
Polarity	: Positive
Mass Range	: m/z 950-1,500
Acquisition	: 50 shots @ 200 Hz
Blanking	: 950
Pulsed Extraction	: 1,500
Stage Step Size	: 30 μm

画像データの解析には、IonView™ およびIMAGEREVEAL™ MS ソフトウェアパッケージを用いました。

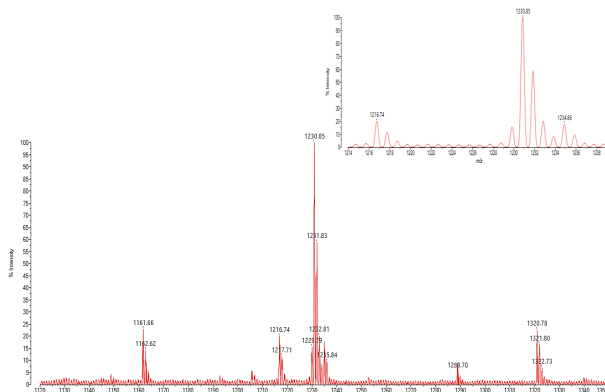


図3 6-plex抗体プローブミックスで染色したヒト扁桃腺のMSIで得られたマススペクトル挿入図は、 m/z 1,200-1,250の範囲のスペクトルの拡大図。 m/z 1,216 (CD68)、1,230 (VIM)、1,234 (Col-1A1) のピークの同位体を分離して検出できました。

マトリックス蒸着条件の最適化

プローブの塗布と光切断の後、DHBマトリックスの蒸着時間および有機溶媒雰囲気下での再結晶化時間と温度を検討しました。これらのパラメータは感度と分解能に大きな影響を与えることがわかりました。

マトリックスの蒸着時間は4分（約0.22 mg/cm²を塗布）、再結晶化の時間は3分（5% IPA、55°C）が最適でした。図3に示すように、バックグラウンドノイズを低く抑え、同位体の分離も容易でした。代表的なMSイメージと複数のMSイメージの重ね合わせを図4と図5に示しました。

■ 正常ヒト扁桃腺に対する20-plex抗体プローブミックスでの解析

MSIには、MALDI-8020を使用しました。分析条件は表3に示しています。27,300ピクセルの分析を1時間52分で完了しました。使用したプローブの詳細は表4に示しています。図6に示すように、使用した20個のプローブすべてを検出することができました。代表的なMSイメージと複数のMSイメージの重ね合わせを図7と図8に示しました。

表3 MALDI-8020の分析条件

System	: MALDI-8020
Polarity	: Positive
Mass Range	: m/z 700-2,000
Acquisition	: 50 shots @ 200 Hz
Blanking	: 700
Pulsed Extraction	: 1,900
Stage Step Size	: 30 μ m

表4 ヒト扁桃腺 20-plex 抗体プローブミックス (AmberGen)

Target	Tissue Expression	Mass Tag (M+H) ⁺
CD11b	Myeloid lineage cells Expressed in various cancers	1,467.81
CD20	Normal and malignant B cells	997.52
CD3 ϵ	T-cells	1,161.64
CD4	Helper T cell, some monocytes & germinal centre macrophages	1,293.74
CD44	Many cell types, common biomarker of cancer stem cells	1,102.58
CD45RO	Memory T cells	1,420.70
CD45RA	Naive T cells	1,276.64
CD68	Macrophages, some myeloid elements, dendritic cells.	1,216.74
CD8 α	Cytotoxic T cells	1,350.76
ECAD	cell-cell adhesion glycoprotein	930.55
GZMB	Cytotoxic T cells and NK cells	938.52
HER2	Transmembrane glycoprotein with tyrosine kinase activity.	1,210.73
Histone H3	involved in the structure of chromatin in eukaryotic cells	1,782.92
Ki67	Germinal centre, strongly associated with cell proliferation	1,320.75
NCAM1 (CD56)	hematopoietic system, mostly natural killer cells but also other lymphoid cells	970.51
PD1	Activated T cells, natural killer cells, B cells, macrophages, dendritic cells and monocytes	1,524.8281
PDGFR-B	Cell surface tyrosine kinase receptor	1,125.6163
PDPN	mucin-type transmembrane glycoprotein specific to the lymphatic system.	954.5519
PR-A/B	Isoforms of human progesterone receptor	1,244.9306
PTEN	Tumour suppressor gene	1,132.5898

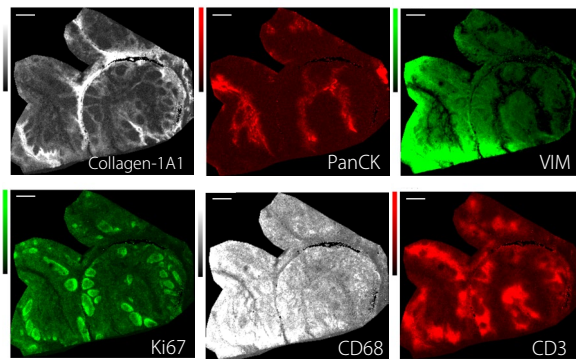


図4 最適な条件で6-plex抗体プローブミックスを用いて染色したヒト扁桃腺の各MSイメージ スケールバー：1 mm

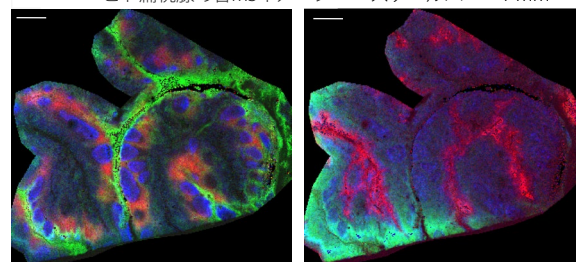


図5 6-plexにて染色後したヒト扁桃腺のMSイメージの重ね合わせ スケールバー：1 mm

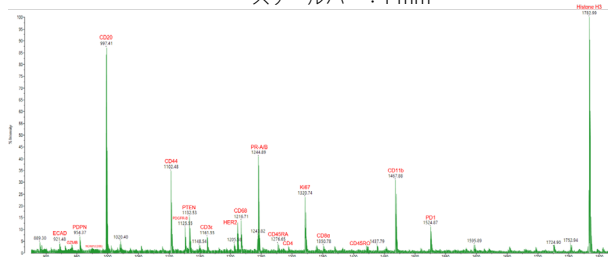


図6 20-plexにて染色したヒト扁桃腺のMALDIマスペクトル

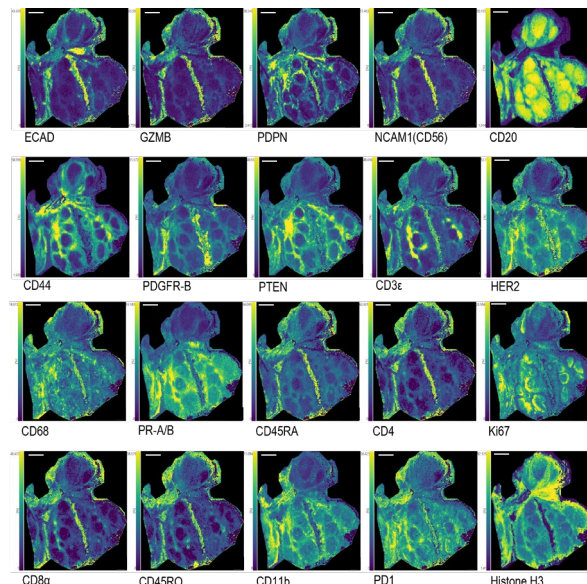


図7 IMAGEREVEAL™ MSを用いて作成した20-plex染色ヒト扁桃腺のMSイメージ スケールバー：1 mm

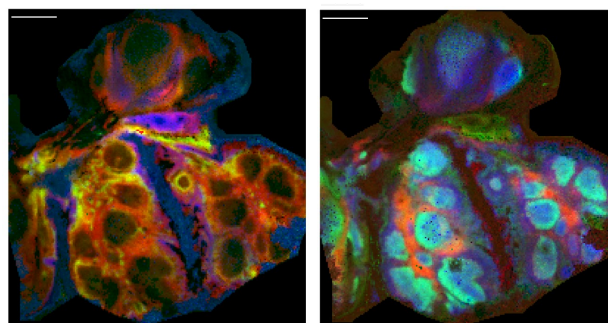


図8 20-plex染色後のヒト正常扁桃腺のMSイメージの重ね合わせ スケールバー：1 mm

■ 正常および濾胞過形成ヒト扁桃腺に対する6-plex抗体プローブミックスでの比較

濾胞過形成は良性疾患で、特徴としては様々な大きさのマントル帯を持つ胚中心が増加します¹⁾。Ki67は、濾胞過形成の免疫組織化学における有用な診断マーカーであり、細胞増殖を検出することができます²⁾。

ヒト扁桃腺切片を6-plex抗体プローブミックスで処理した後、MSIをMALDI-8030 EasyCareを用いて取得しました。分析条件は表5に示しています。27,300ピクセルの分析を1時間52分で完了しました。代表的なMSイメージの重ね合わせ画像を図9に示しましたが、正常組織と濾胞過形成組織では、細胞分化とT細胞活性の主要マーカーの発現パターンに違いが見られました。

表5 MALDI-8030 EasyCareの分析条件

System	: MALDI-8030 EasyCare
Polarity	: Positive
Mass Range	: m/z 950-1,500
Acquisition	: 50 shots @ 200Hz
Blanking	: 950
Pulsed Extraction	: 1,500
Stage Step Size	: 30 μ m

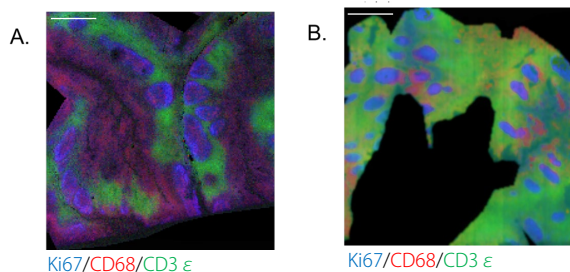


図9 IonViewで作成した6-plex抗体プローブの重ね合わせMSイメージ
(A) 正常ヒト扁桃腺のMSイメージ
(B) 濾胞過形成を伴うヒト扁桃腺のMSイメージ
スケールバー：1 mm

■ HE (Hematoxylin-Eosin) 染色

MSI取得後、アセトンでマトリックスを除去し、組織切片をHE染色しました。HE染色像と6-plexプローブによるMSイメージの重ね合わせ画像を比較すると、両者の構造は非常に似ていることがわかりました (図10)。

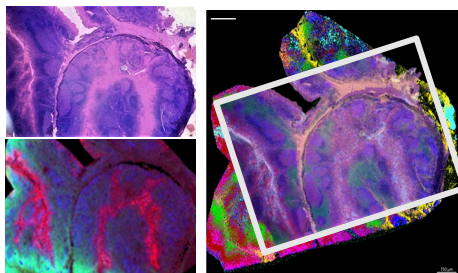


図10 HE染色像と6-plexプローブによるMSイメージの重ね合わせ画像の比較
HE染色像はMALDI-IHCと同等の結果を示しました。
スケールバー：1 mm

■ まとめ

今回、低コストのMALDI-TOF装置を用いたMALDI-MSIで、6種類および20種類のペプチド質量タグの多重マッピングに成功しました。また、扁桃腺の濾胞過形成のMSイメージングを行ったところ、主要な増殖タンパク質マーカーの細胞分布パターンが異なることがわかりました。MALDI-MSIは、多種多様な試料に含まれる生化学的に重要な化合物の分布を明らかにすることができる、非常に汎用性の高い技術です。MSIをMALDI-IHCプローブと組み合わせることで、様々な分子の分布を簡単にイメージングできるようになりました。同一サンプルで多面的な解析を可能にするMALDI-MSIは、研究のための貴重なツールであることが証明されつつあり、新しい治療法の開発に必要な細胞間相互作用の解析にも有用です。

MALDI-8020とMALDI-8030は、様々なアプリケーションに対応できる高感度で堅牢なシステムです。卓上MALDIイメージングキットを導入することで、ハイエンドシステムに資金を投入することなく、費用対効果の高い方法でMALDIイメージングを活用できるようになりました。さらに、MALDI-IHCプローブキットを導入することで、簡単なサンプル前処理プロトコルを使用してイメージングできる分子の範囲をさらに広げることができます。

FFPE組織切片を使用することで、施設間での輸送が容易になります。また、脱パラフィン処理についても、信頼できるワークフローが確立されています。卓上MALDI-TOF装置で得られたMSスペクトルは分解能が高く (図3の挿入図参照)、明瞭で有用な画像を作成することができました。また、卓上型システムを、すでにMSイメージングを行っている研究室に導入しメソッドの最適化に活用することで、既設の高分解能・高性能のシステムを、より詳細なイメージング解析が必要な研究に利用することもできます。

IonViewは、MALDI Solution™の一部として提供される使いやすいソフトウェアで、装置から直接データを読み取ることができます。複数の画像を赤・緑・青 (RGB) の3原色を使って生成することができます。IonViewには、対象サンプルの基本的な解析に必要なツールがすべて揃っており、MSI分析の成否確認や初期解析に優れた解決策を提供します。

IMAGEREVEAL MSで解析するために、MSIデータを.imzml形式に変換しました。この解析では、描画対象質量タグの m/z 値リストから約±0.5Daの幅で自動的に画像を生成する、ターゲット解析機能を使用しました。各抗体の発現パターンは、ヒト蛋白質アトラスで観察されているパターンと明確に一致していました。IMAGEREVEAL MSは、複数の解析モードと統計解析ツールを備えた、ターゲット解析が可能な先進的なソフトウェアプラットフォームです。

<参考文献>

- 1) Gars *et al*, Ann Diagn Pathol 2020;44:151421
- 2) Bryant *et al*, Histopathology 2006 Apr;48(5):505-15

<関連アプリケーション>

[01-00392-JP 卓上型 MALDI-8020 を用いた動物組織および指紋のMSイメージング](#)

[12-MO-492-JP 卓上型MALDI-TOFMSを用いたタンパク質およびペプチドのMSイメージング](#)

[01-00389-JP 食品と安全の分野における卓上型MALDI-TOF MSを用いたMSイメージングの応用](#)

iMLayer、IonView、MALDI Solution、および IMAGEREVEALは、株式会社島津製作所またはその関係会社の日本およびその他の国における商標です。

株式会社 島津製作所 分析計測事業部
<https://www.an.shimadzu.co.jp/>

12-MO-524-JP 初版発行：2025年3月

島津コールセンター ☎ 0120-131691

本文書に記載されている製品は、医薬品医療機器法に基づく医療機器、体外診断用医薬品として承認・認証を受けておりません。本文書に記載されている分析手法を治療診断目的およびその手続き上で使用することはできません。

本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。本文中に記載されている会社名、製品名、サービスマークおよびロゴは、各社の商標および登録商標です。本文中では「TM」、「®」を明記していない場合があります。

関連製品

一部の製品は新しいモデルにアップデートされている場合があります。



▶ MALDI EasyCare
MALDI-8000シリーズ用オプション

関連分野

▶ ライフサイエンス

▶ プロテオミクス

▶ in vitro イメージング（組織などの標本）

▶ 価格お問い合わせ

▶ 製品お問い合わせ

▶ 技術お問い合わせ

▶ その他お問い合わせ