

イメージング質量分析法を用いた 新しい創薬戦略

同志社大学生命医科学研究科医生命システム専攻

池川 雅哉

Genomics, Proteomics and Biomedical Functions
Department of Life and Medical Systems
Graduate School of Life and Medical Sciences
Doshisha University, Kyoto, Japan

2020.11.25.

イメージング質量分析法を用いた 新しい創薬戦略

「新しい」創薬戦略とは

イメージング質量分析法について

プロテオフォームの創薬戦略

診療最前線との共同研究体制

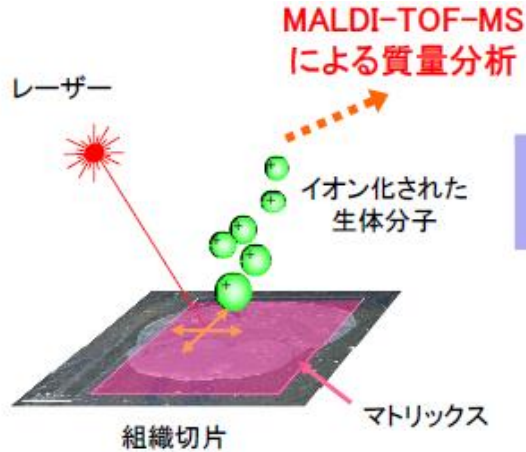
Image guided Therapy (IGT) : 術中質量分析法



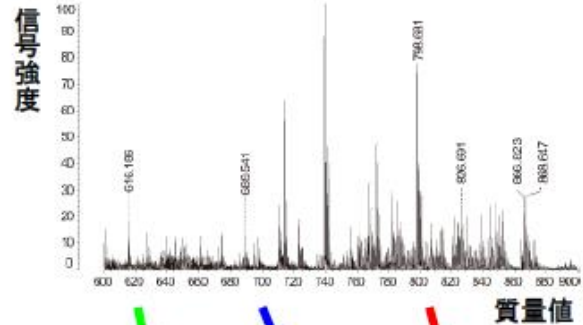
ブリガム・アンド・ウィメンズ病院

Advanced Multimodality Image Guided Operating Suite (AMIGO) システム

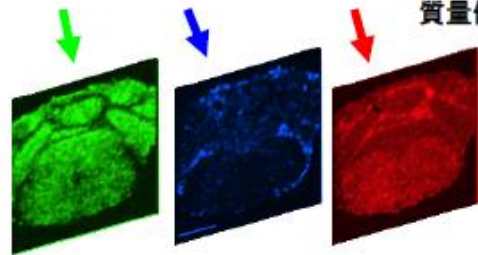
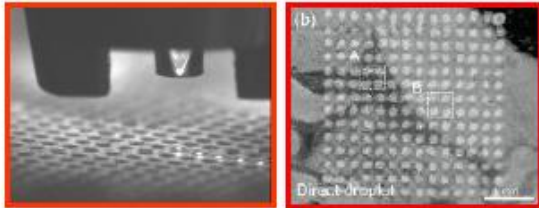
プロテオミクスの病理学への応用



質量分析における信号強度の強弱
⇒ 生体分子の存在量に変換



ケミカルプリンタによるマトリックスの分注



アルツハイマー病の関連物質

脳内分布、精密に画像化

同大教授ら成功 病態解明へ前進

アルツハイマー病の脳に蓄積するタンパク質「アミロイドベータ(Aβ)」の分布を精密に画像化することに、同志社大生命医学部の池川雅哉教授と



詳細に画像化された脳内のアミロイドベータ(赤色部分) 池川教授提供

角田伸人助教らが成功した。新たな種類のAβの存在も確認し、病態解明につながる。英医学誌にこのほど発表した。

多くの人で50歳ごろから脳内に蓄積するAβは、アルツハイマー病発症と関連すると考えられている。現状ではAβの一部にくっつく抗体を用いて解析しているため、分布などの正確な把握は難しかった。

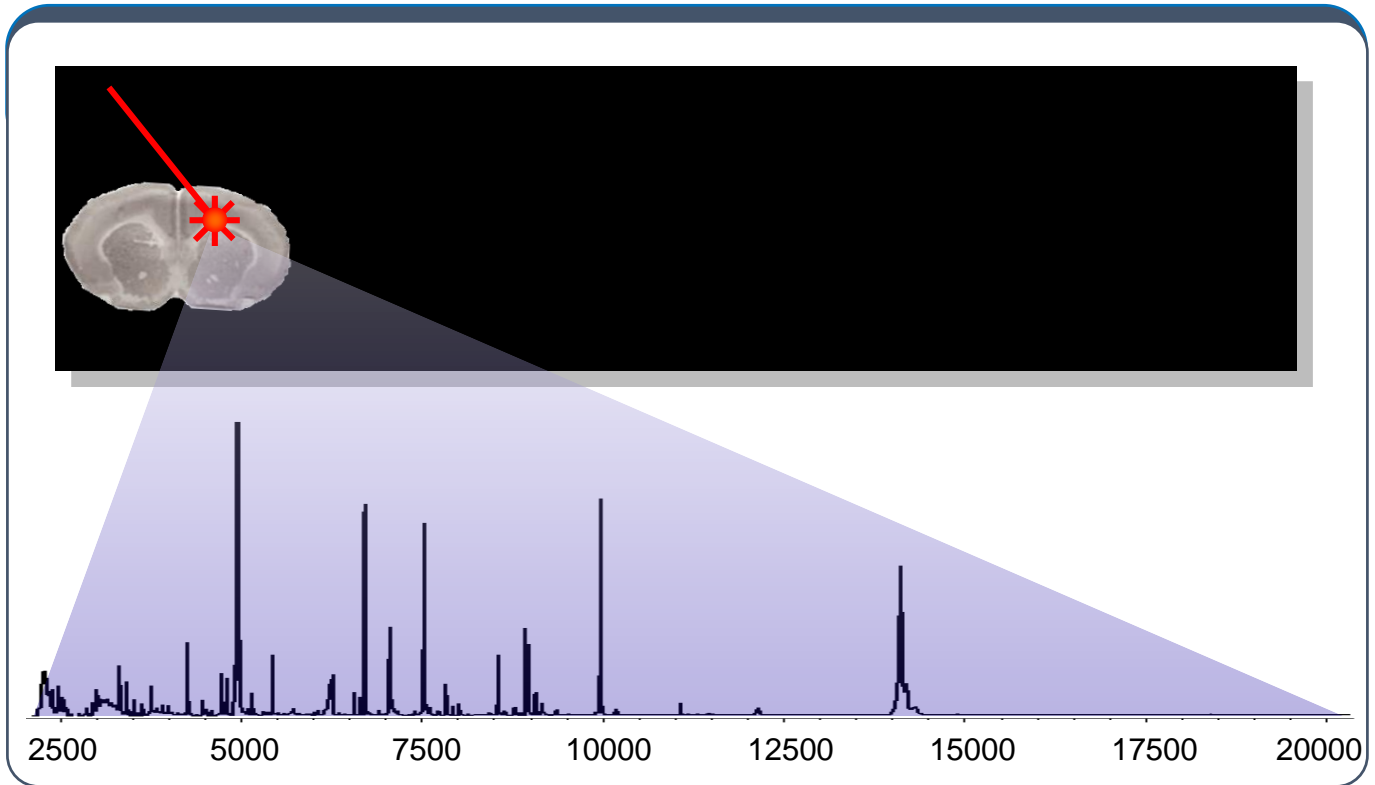
グループは、タンパク質を質量の違いで見分けて画像化する技術

「イメージングマススペクトロメトリー」を活用。いずれも70〜80代で亡くなったアルツハイマー病ではない高齢者5人とアルツハイマー病患者5人の脳組織を使って実験した。結果、Aβの種類ごとに脳や血管など分布場所が異なることを確認できた。新たな種類のAβも見つけられた。

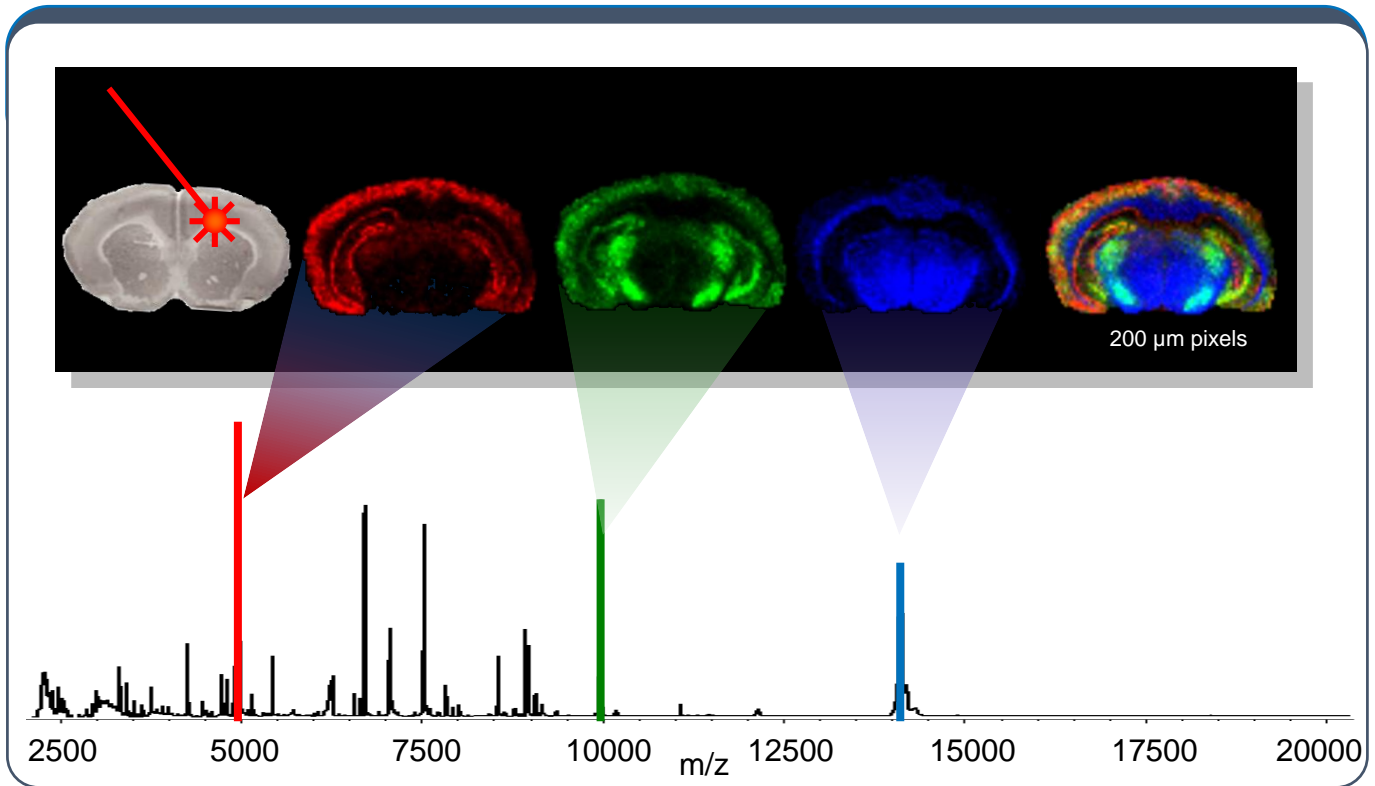
池川教授は「アルツハイマー病の原因と考えられるほかのタンパク質にも応用できれば」と話している。

(広瀬一隆)

MALDI-Imaging Mass Spectrometry



MALDI-Imaging Mass Spectrometry



多発性硬化症のバイオマーカーと治療戦略

アルツハイマー病脳のamyloid β 可視化に成功

拡張型心筋症のバイオマーカーと治療戦略

心・腎アミロイドーシスの診断支援と病態解析

食品の消化・分解・吸収機構の可視化

プロテオミクス+バイオインフォマティクス を用いた自己免疫性神経疾患の鑑別法の開発

脳脊髄液プロテオミクスパターン解析手法を用い多発性硬化症関連疾患の鑑別が可能になった

2011年10月11日

近藤 晋之 医学部臨床教授、小森美華 医学研究科研究生、池川雅哉 京都府立医科大学准教授らの研究グループは、脳脊髄液プロテオミクスパターン解析手法を用い、多発性硬化症関連疾患を鑑別することに成功しました。

神経難病の一つである多発性硬化症および類縁疾患は、臨床経過や現行の検査所見のみでは、診断、治療法の選択が困難な場合があります。研究グループは、質量分析計を用いて髄液中タンパク質・ペプチドを俯瞰するプロテオミクスパターン解析法を開発しました。この解析法によって、病態を反映した診断、疾患分類が可能になることが期待できます。

この研究成果は、「Annals of Neurology」に掲載されました。



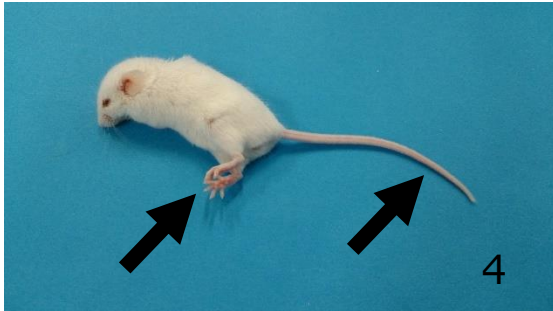
左から近藤臨床教授、小森氏、池川 京都府立医科大学准教授



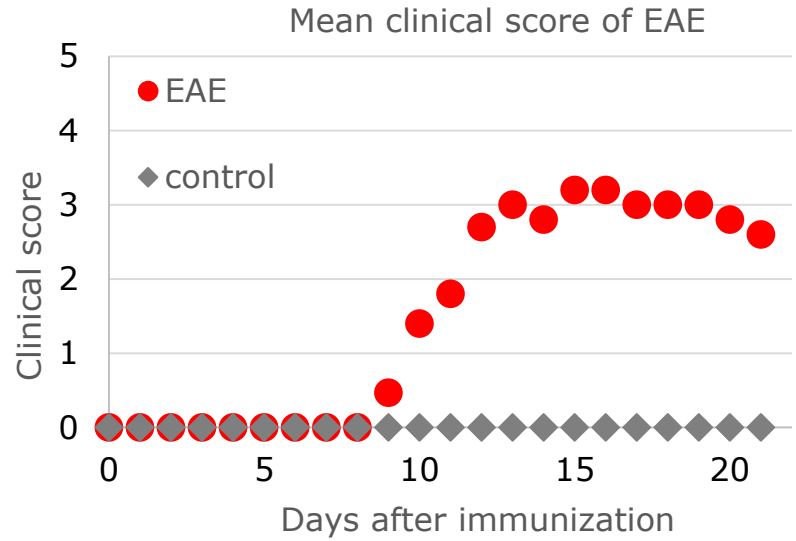
0



2



4

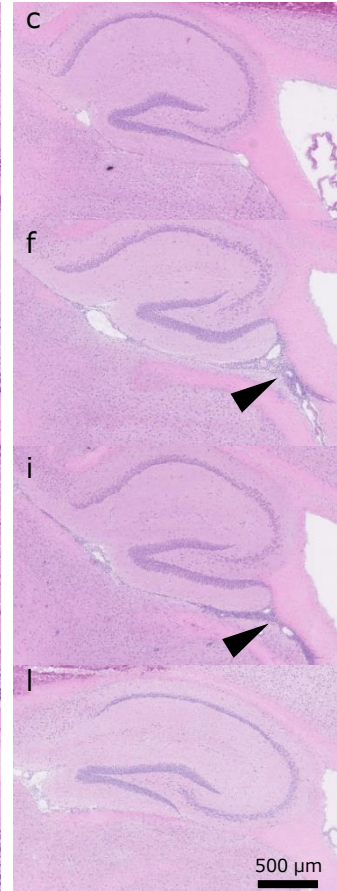
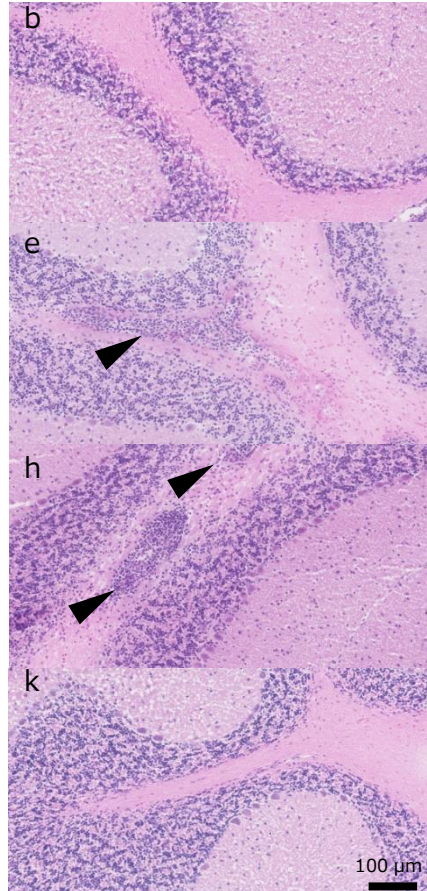
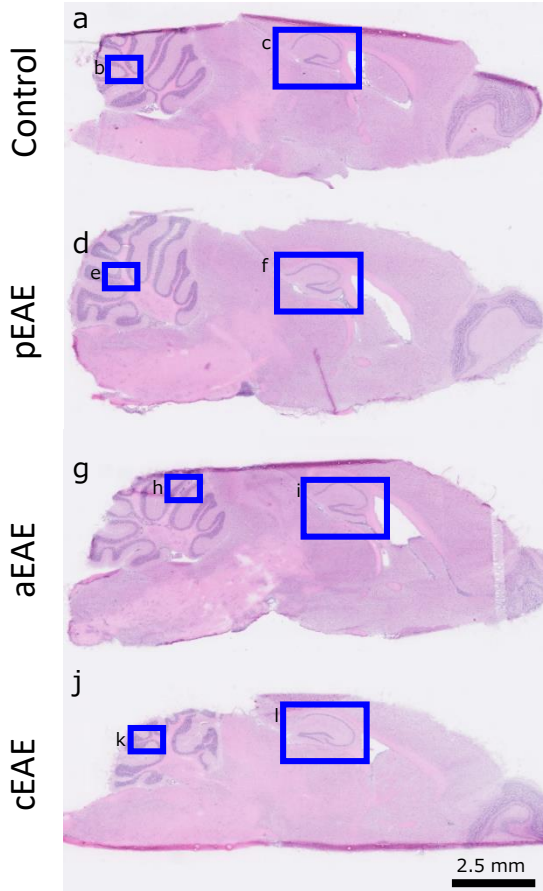


Score	Clinical Symptom
0	Normal
1	Limp tail
2	Limp tail and weakness of hind legs
3	Limp tail and complete paralysis of hind legs.
4	Limp tail, complete hind leg and partial front leg paralysis
5	Mouse is euthanized due to severe paralysis

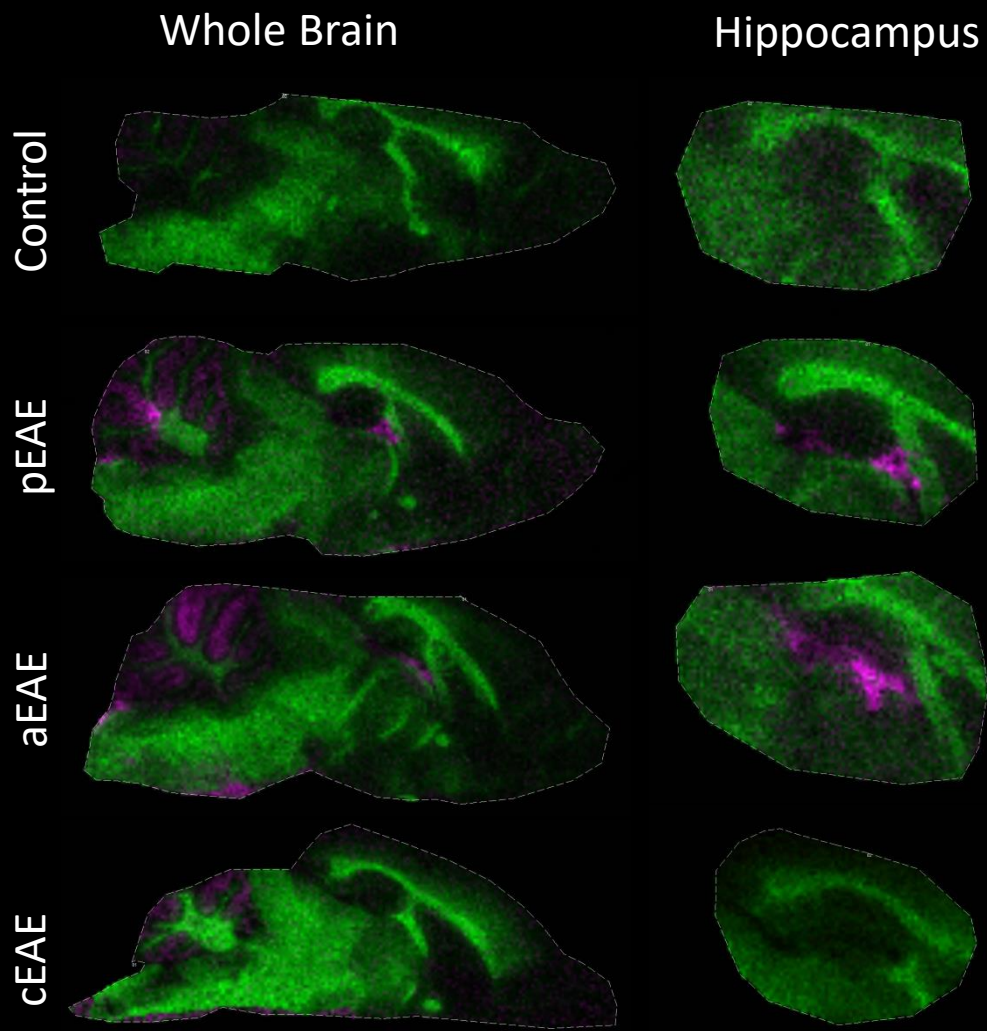
Whole Brain

Cerebellum

Hippocampus

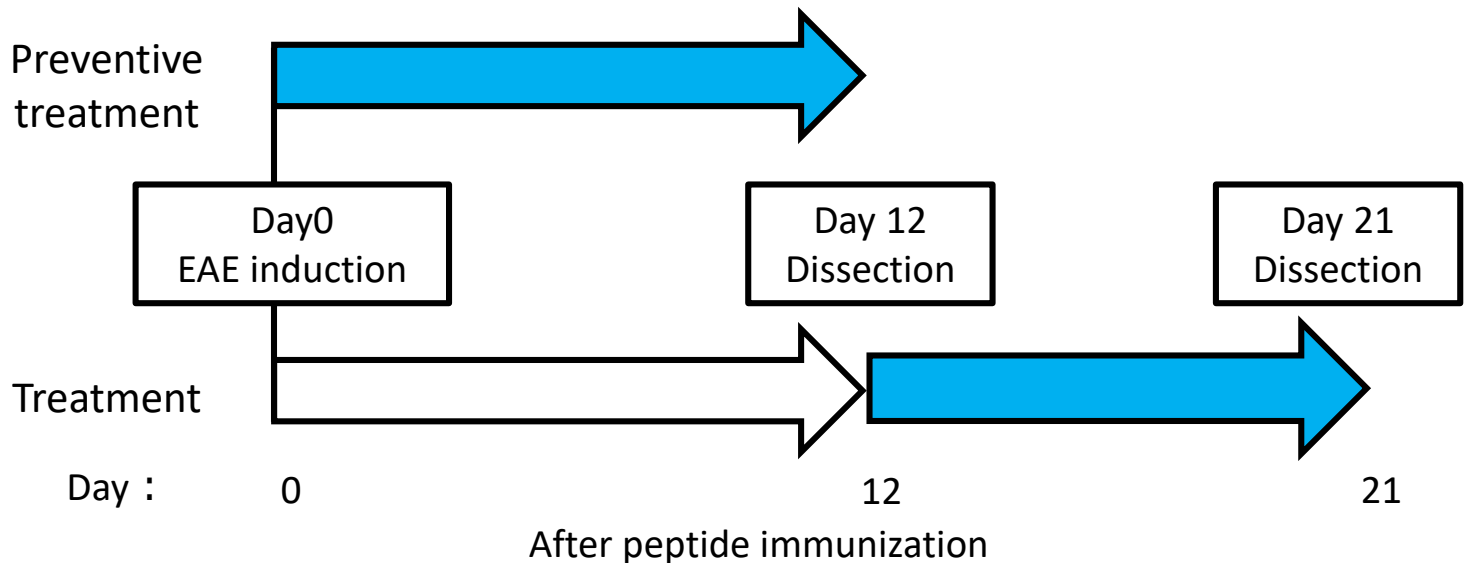
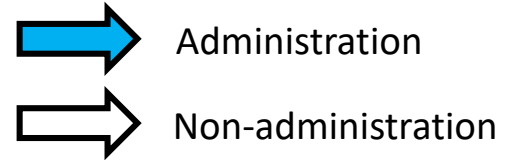


m/z 12,971, 18,400



Targeting S100A protein as a Therapeutic Strategy for MS

S100A inhibitor Tasquinimod (TasQ)
5 mg/kg, once in 2 days, Oral administration

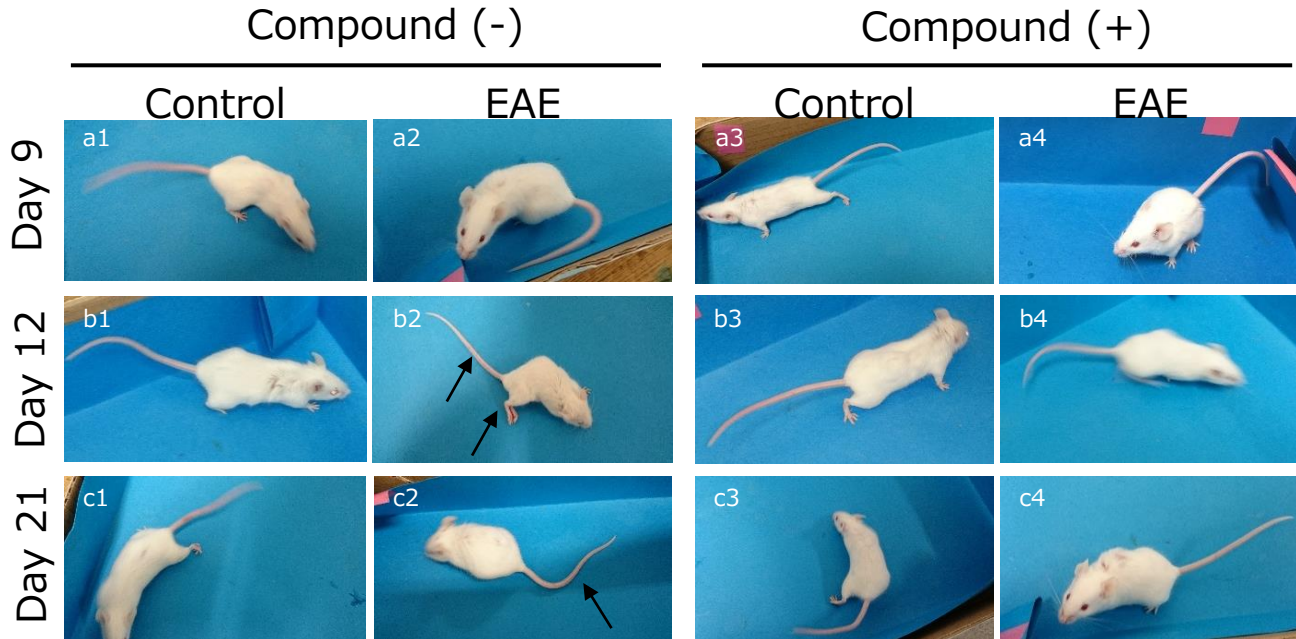


Yoshioka et al, *Blood advances* 1 (3) :184-192 (2016)

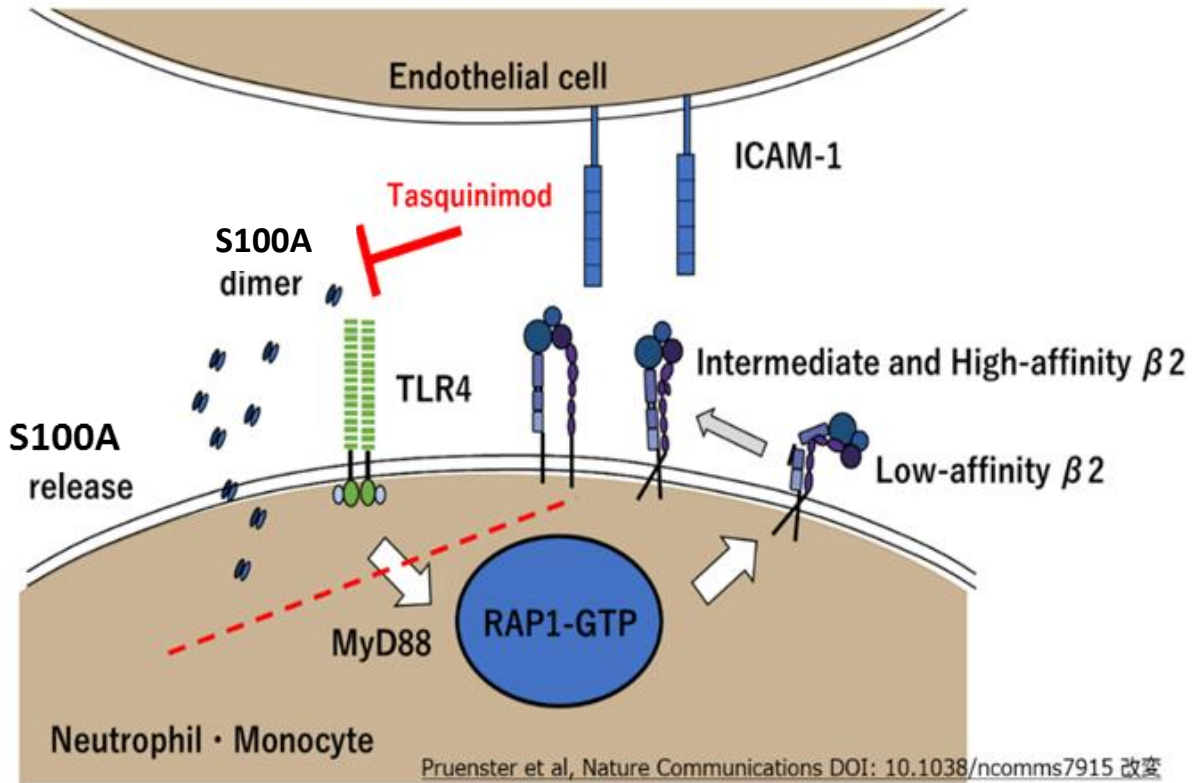
Isaacs et al, *The Prostate* 66:1768-1778 (2006)

Isaacs et al, *Oncotarget* 5 (18) :8093-8106 (2016)

Targeting S100A as a therapeutic strategy for MS



Targeting S100A protein as a Therapeutic Strategy for MS



ORIGINAL ARTICLE

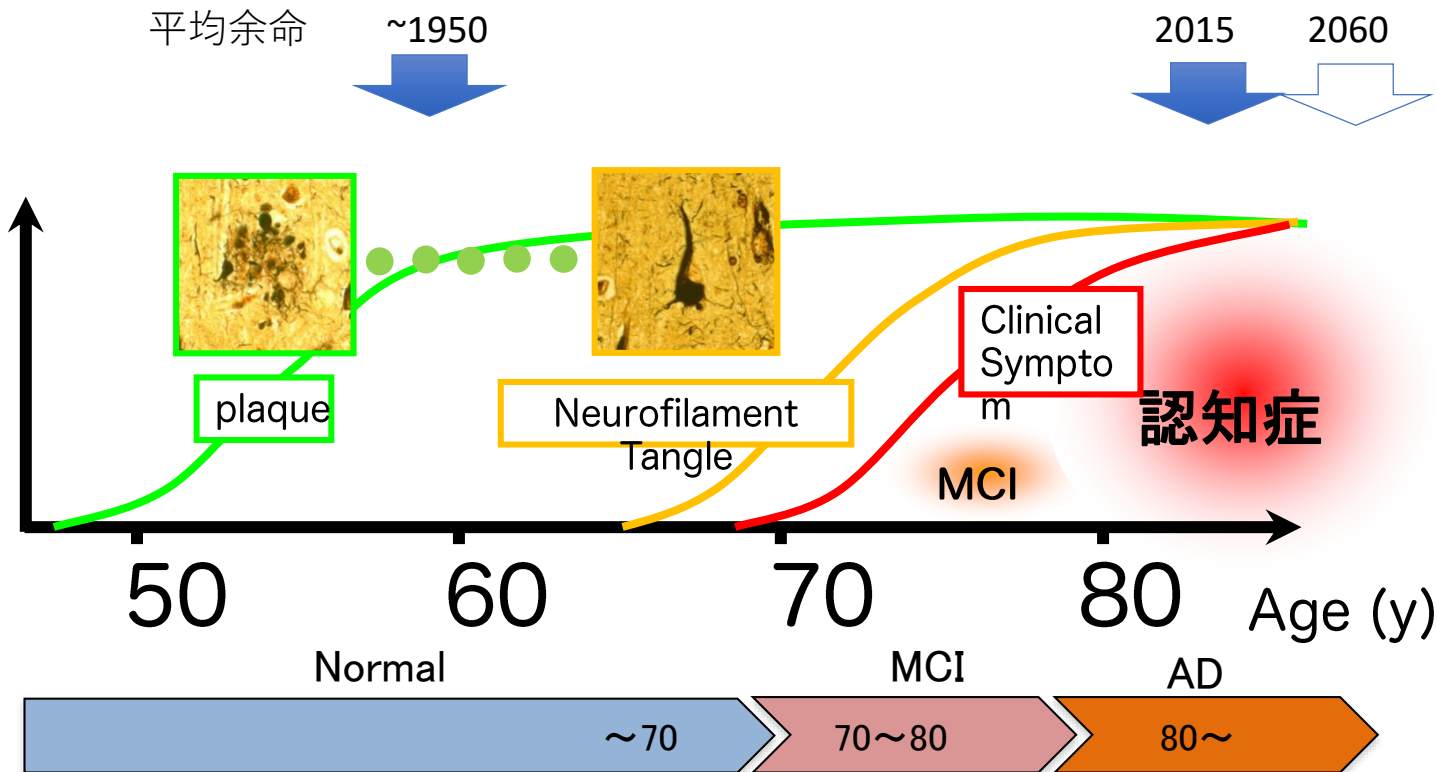
Placebo-Controlled Trial of Oral Laquinimod for Multiple Sclerosis

Giancarlo Comi, M.D., Douglas Jeffery, M.D., Ludwig Kappos, M.D.,
Xavier Montalban, M.D., Alexey Boyko, M.D., Maria A. Rocca, M.D.,
and Massimo Filippi, M.D., for the ALLEGRO Study Group*

In this phase 3 study, oral laquinimod administered once daily slowed the progression of disability and reduced the rate of relapse in patients with relapsing–remitting multiple sclerosis.

Supported by Teva Pharmaceutical Industries.

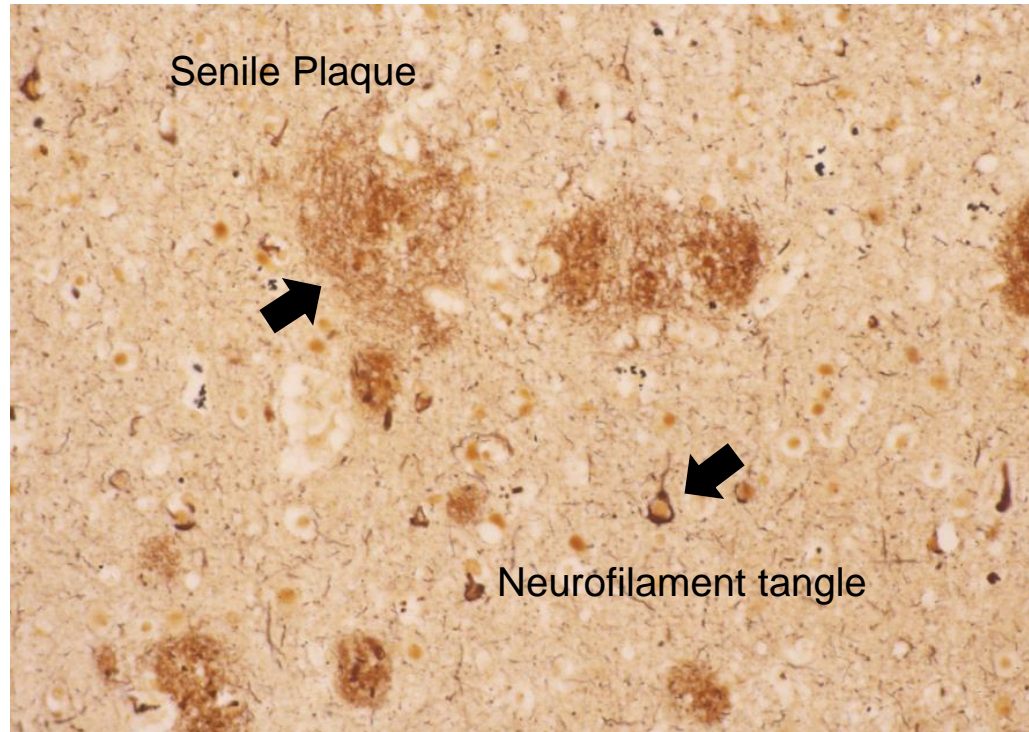
日本人の平均余命とアルツハイマー病発症への時間軸



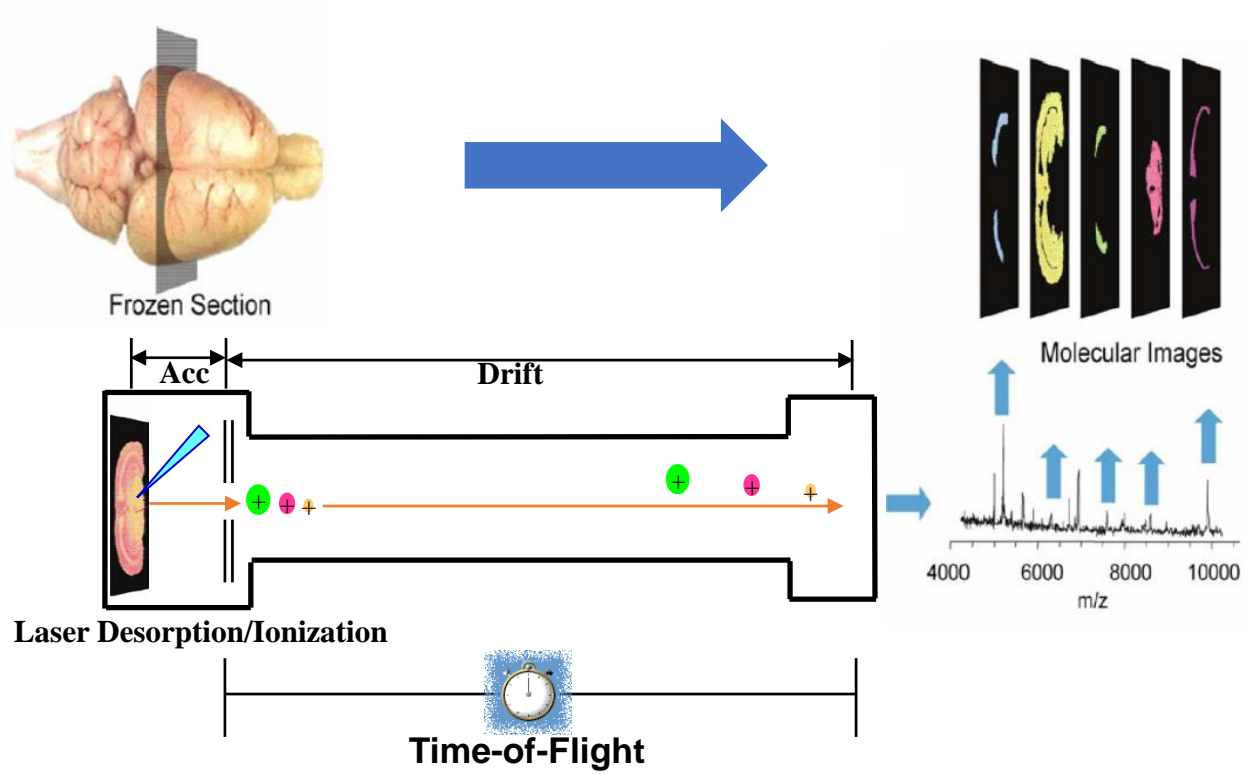
Plaque (A β) 50~

Courtesy from Drs Miyasaka and Ihara

Alzheimer's Disease (AD) pathology

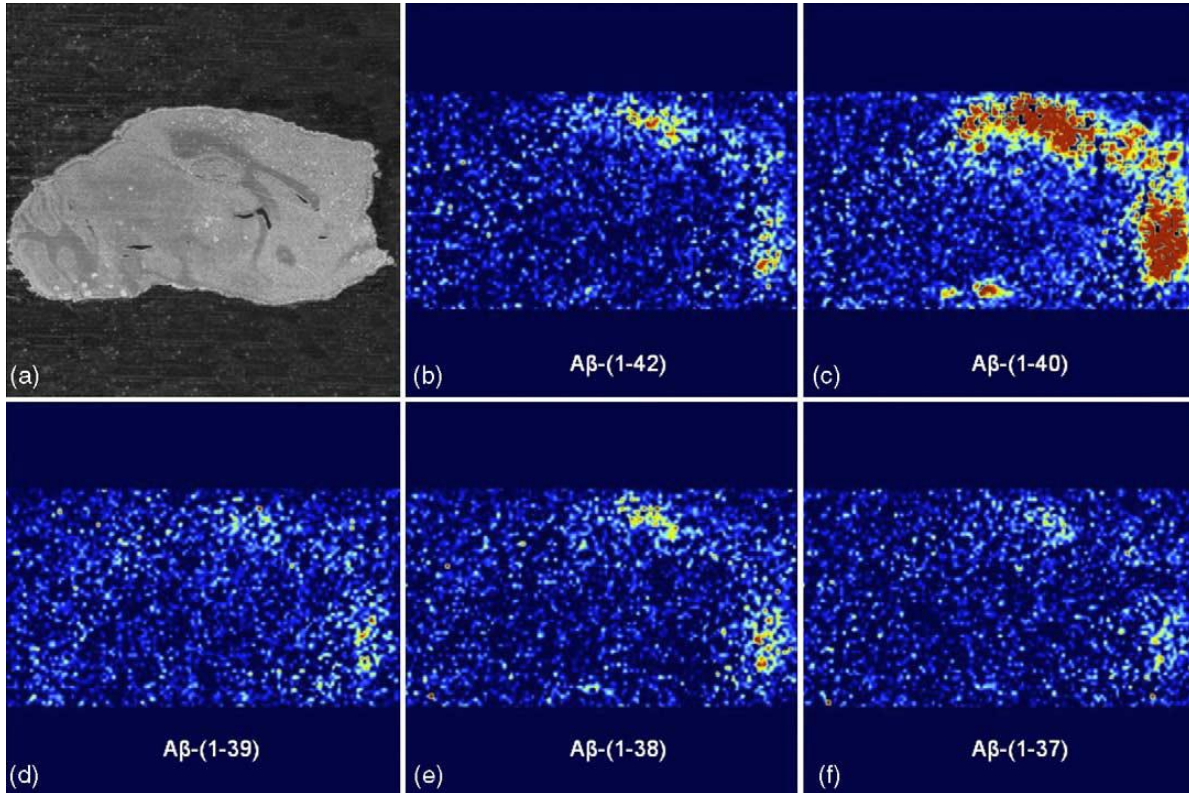


Pioneer work of amyloid imaging using MALDI-MS



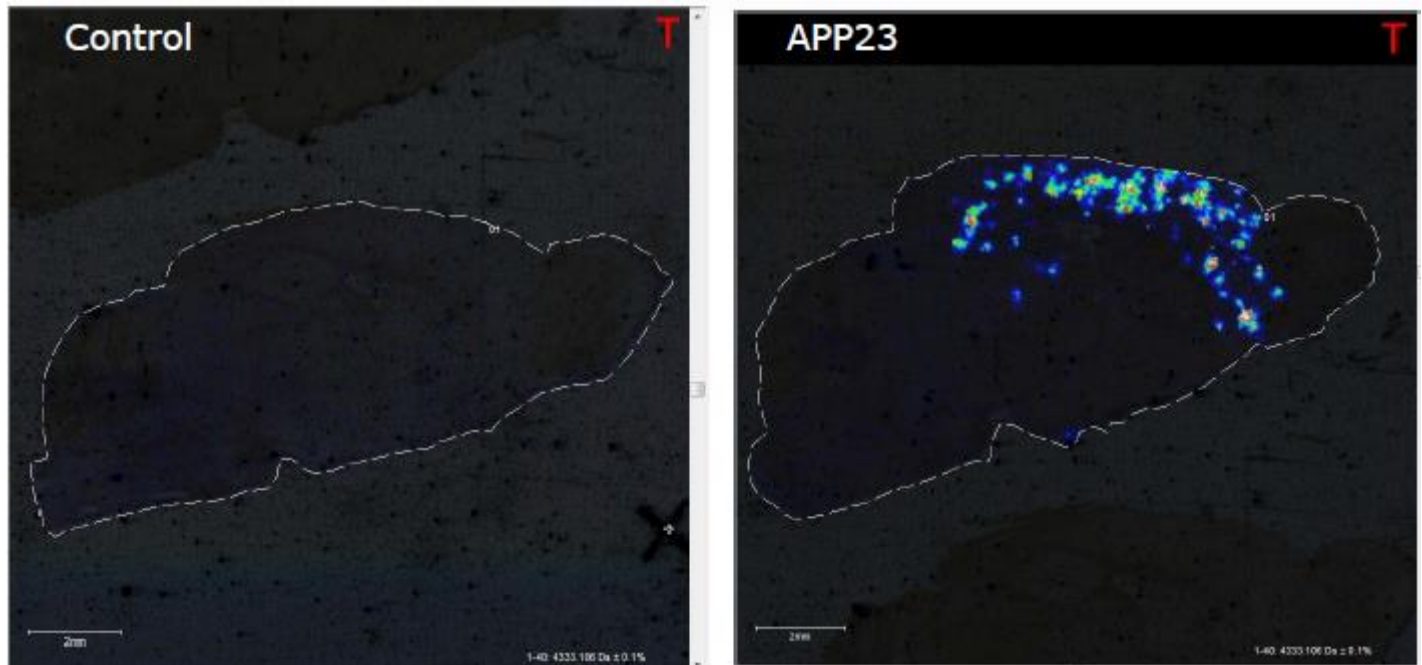
Modified from M.Stoeckli et al. Analytical BioChemistry 311 (2002)33-39

Imaging A β peptides with MALDI-IMS



(a) Optical image of the sagittal APP23 brain section; (b) Ab-(1-42) molecular image (m/z 4515.1); (c) Ab-(1-40) molecular image (m/z 4330.9); (d) Ab-(1-39) molecular image (m/z 4231.7); (e) Ab-(1-38) molecular image (m/z 4132.6); (f) Ab-(1-37) molecular image (m/z 4075.5).

Imaging A β 1-40 peptides of the brains from APP23 mice



Ikegawa et al., 2016

高齢者ブレインバンクプロジェクト

連続開頭剖検例による研究資源と、それを基盤とした前方視的臨床縦断研究、
(<http://www.mci.gr.jp/BrainBank>)

研究所

病院



ブレインバンク

1. パラフィンブロック、ガラススライド

連続開頭剖検例 (1972.5-) : 7,235例

臨床・画像・病理所見はデータベース化

>2. 部分凍結脳資源 (1995.1-) : 2,272例

DNA解析への資源

>3. 凍結半脳資源 (2001.7-) : 924例

神経科学全般への資源

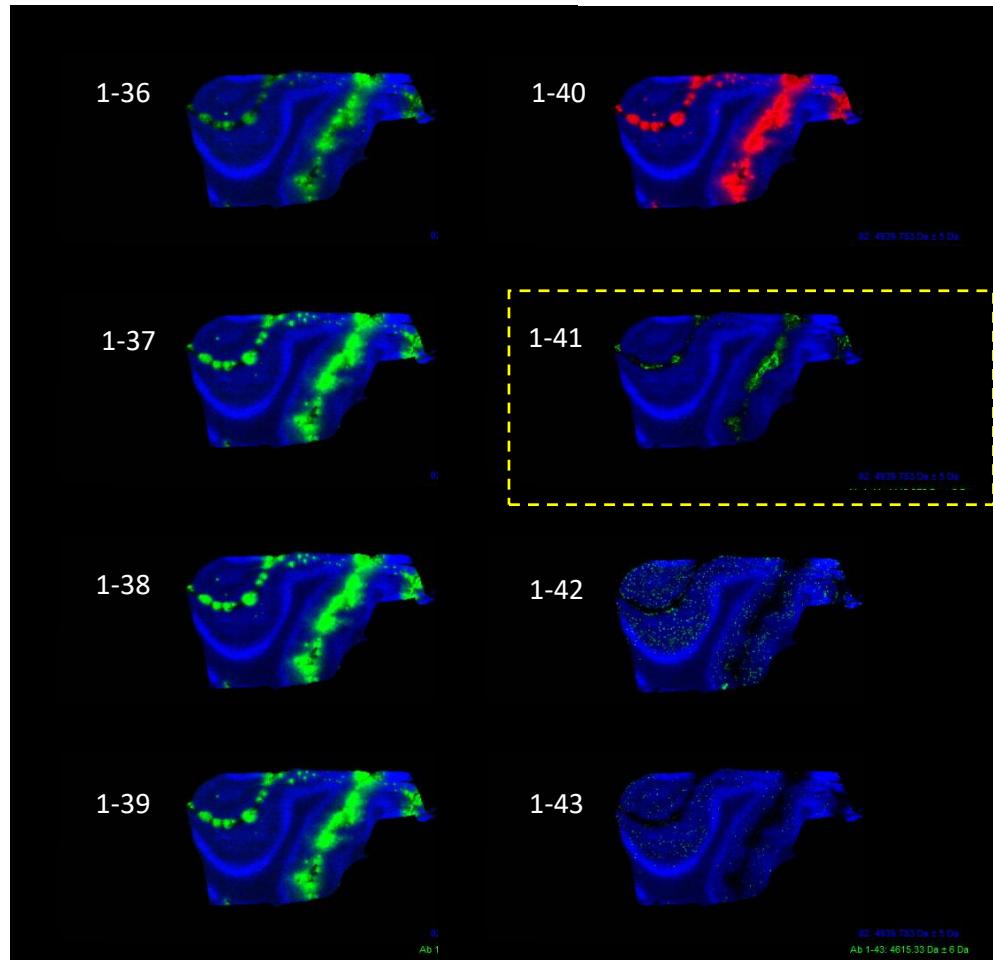
両者の結合

臨床縦断研究

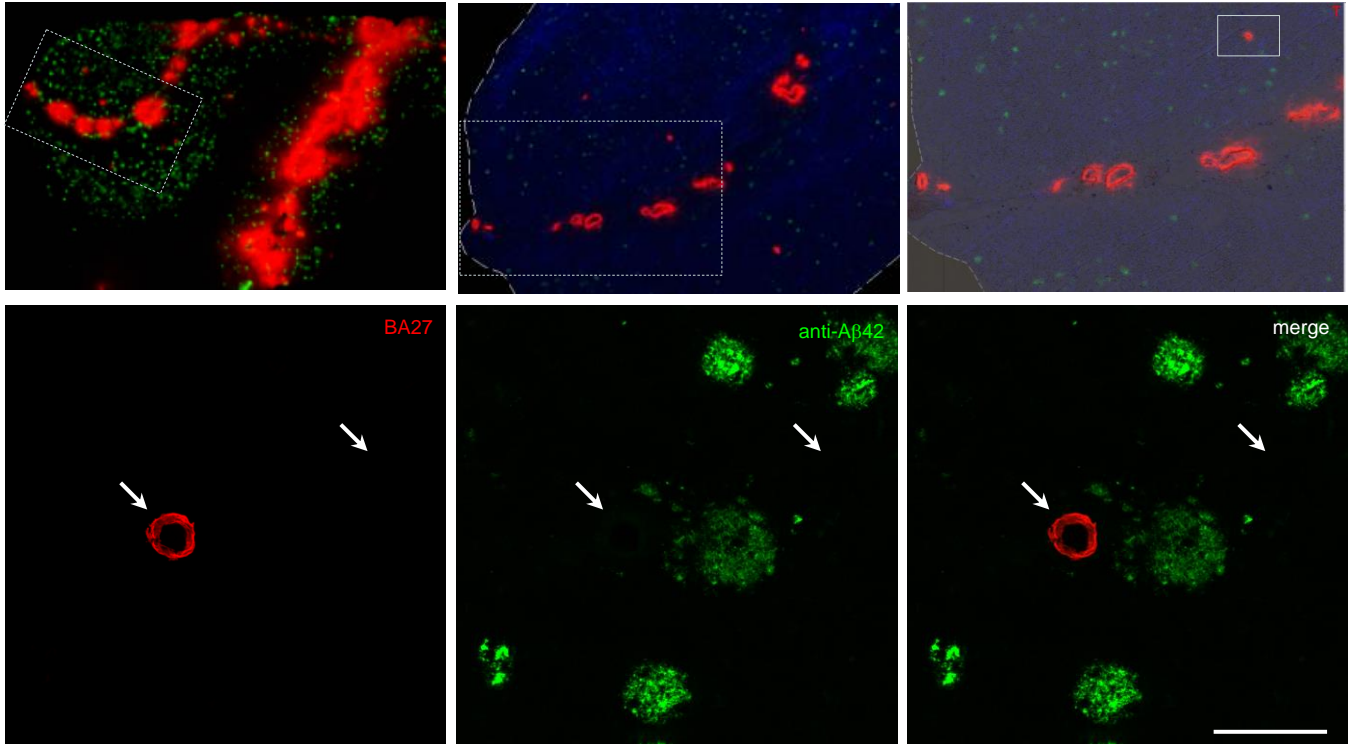
認知症パス

パーキンソン病パス

A β species in human AD/CAA brains



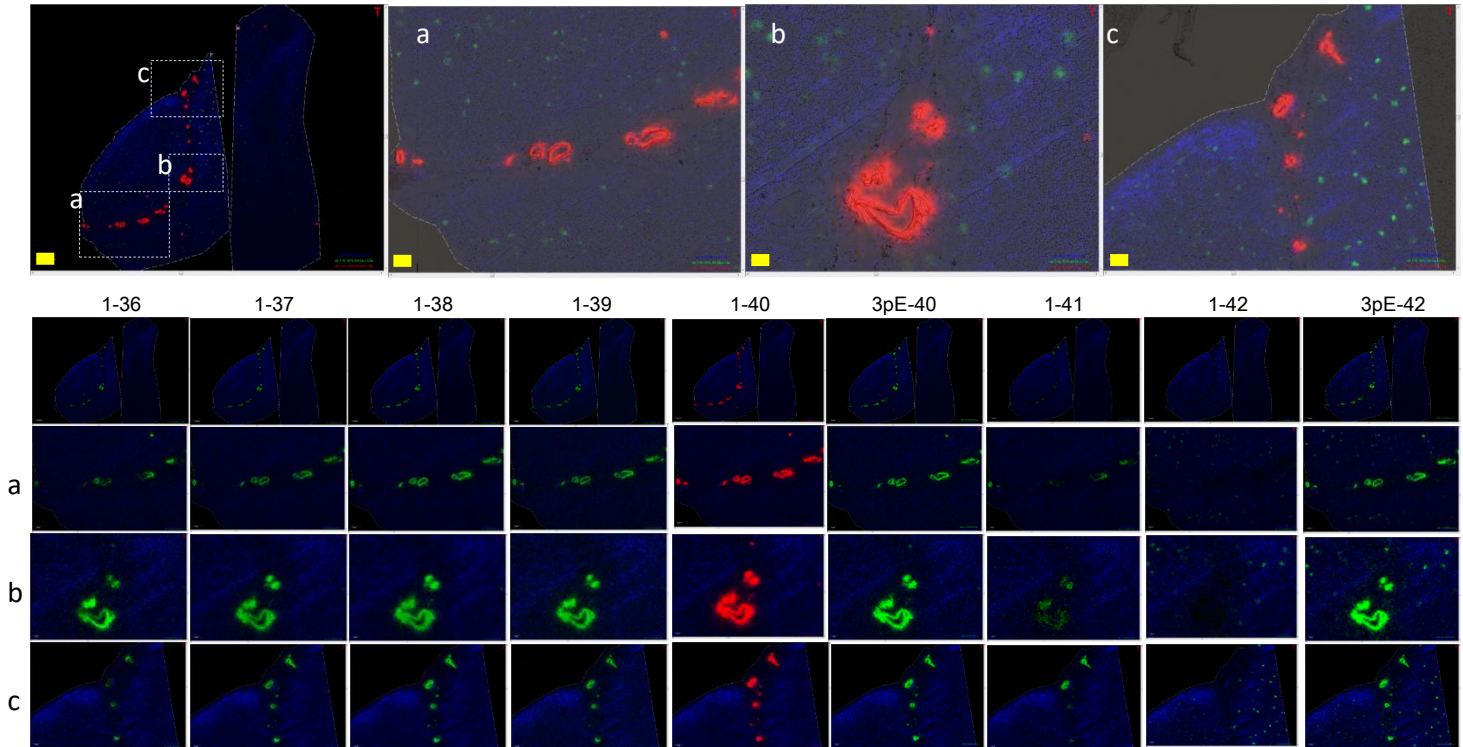
A β 1-40 and 1-42 in human AD/CAA brains



Kakuda and Miyasaka et al., Acta Neuropathologica Comm. 2017

Imaging Mass Spectrometry (IMS)

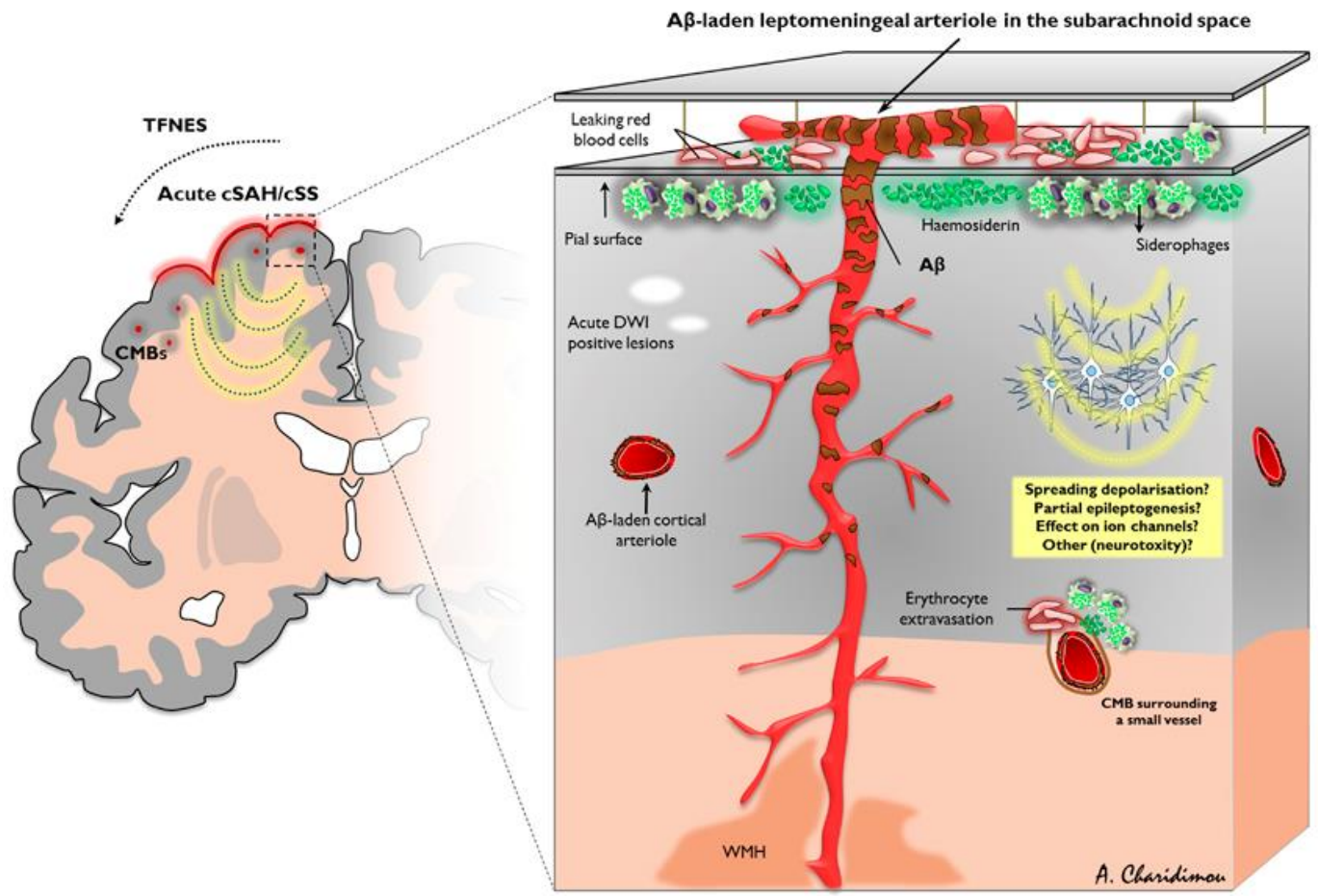
Applications for dissecting Alzheimer's Disease (AD) pathology



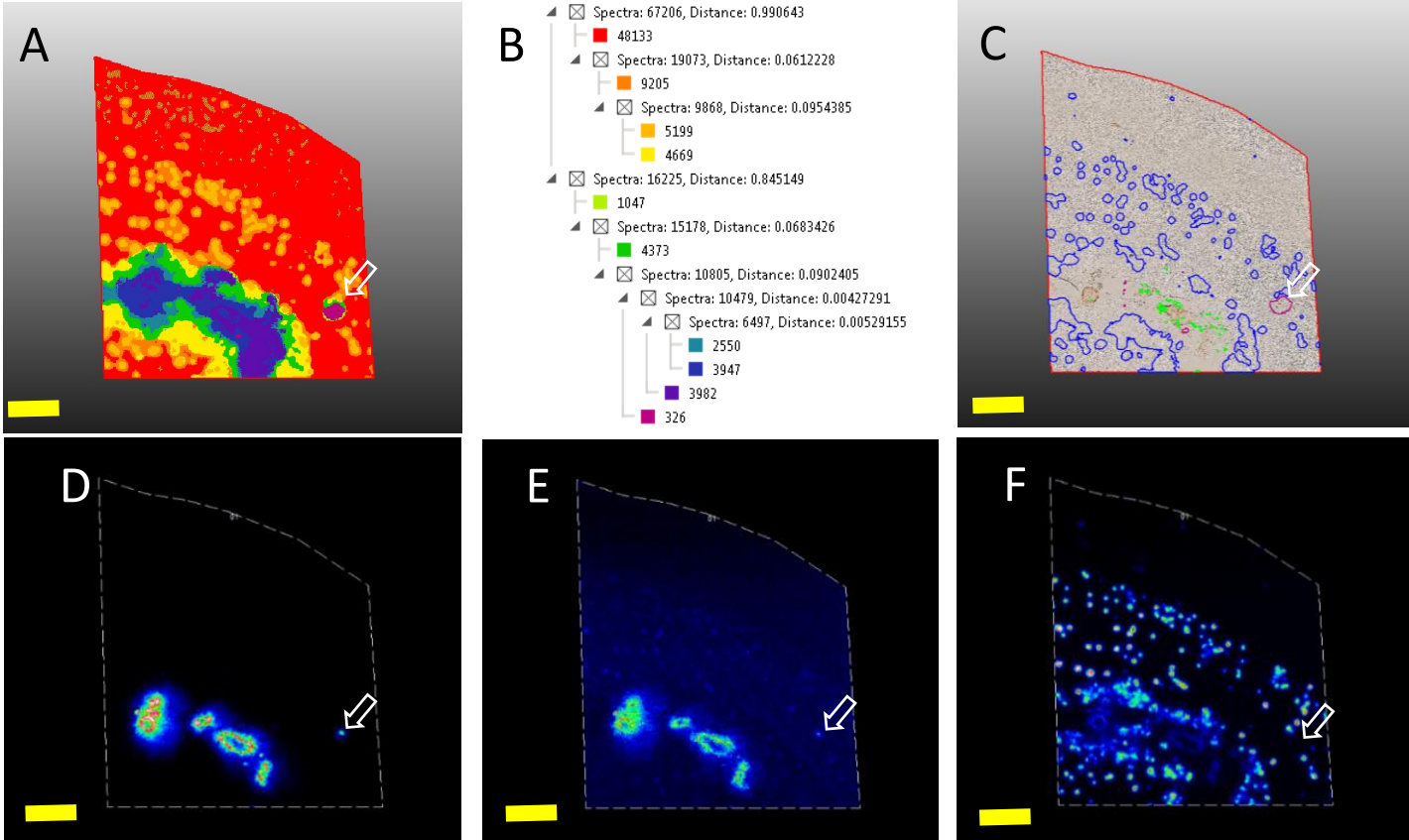
Ikegawa M, Nirasawa T, Kakuda N, et al., J. Vis. Exp. 145, e57645 (2019)

Cerebral amyloid angiopathy

A β deposited in cerebral parenchyma and in leptomeningeal and cerebral vessel walls

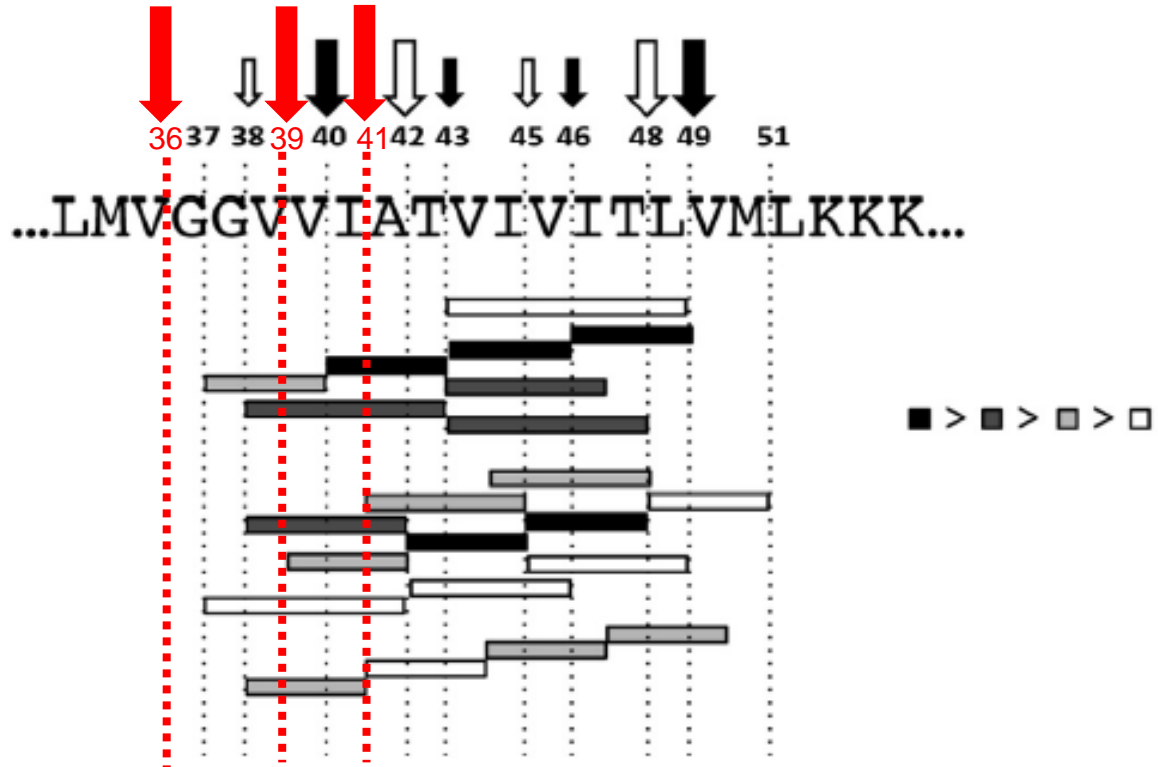


Visualization of Amyloid beta Deposits in Human Brain



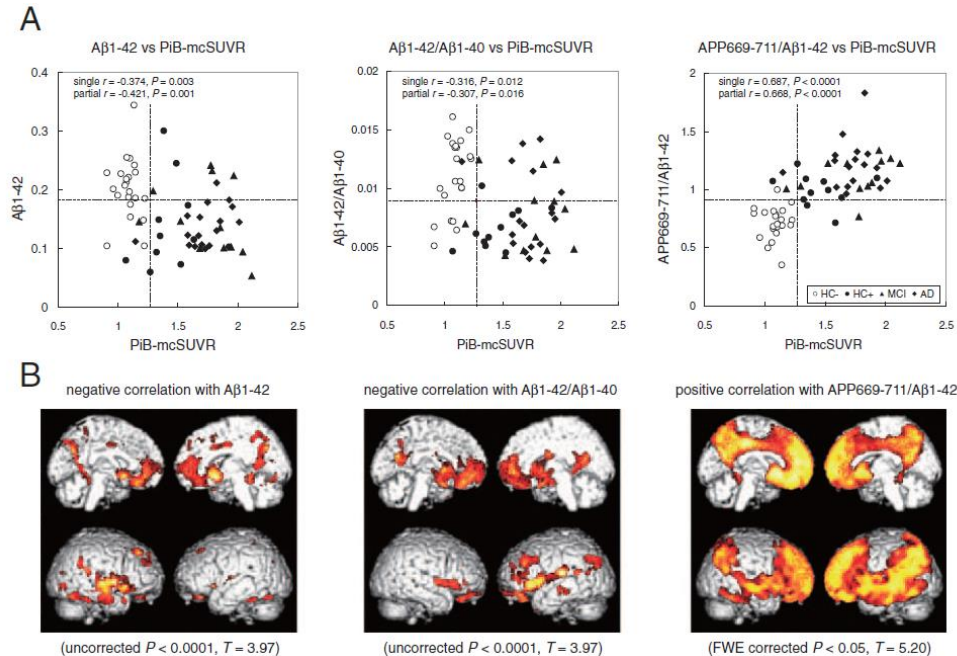
Ikegawa M, Nirasawa T, Kakuda N, et al., J. Vis. Exp. 145, e57645 (2019)

γ -Secretase: successive tripeptide and tetrapeptide release from the transmembrane domain of β -Carboxyl terminal fragment



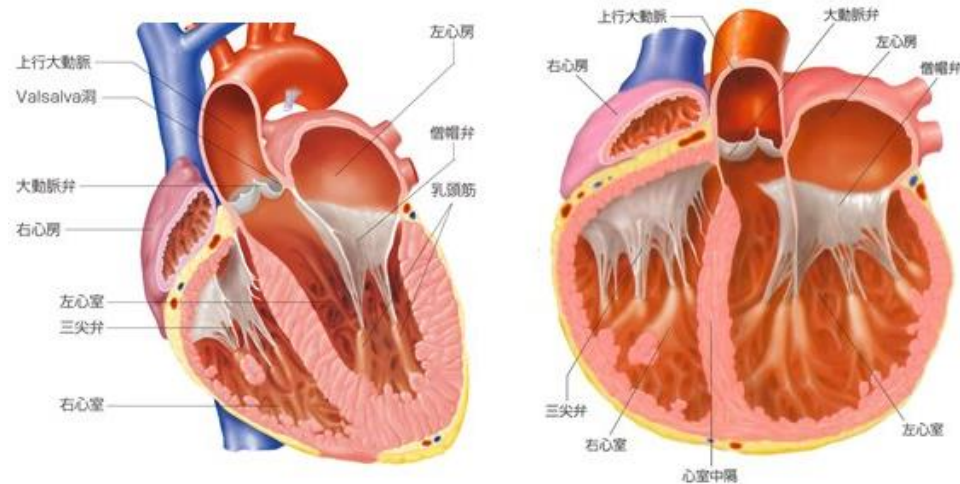
High performance plasma amyloid- β biomarkers for Alzheimer's disease

Akinori Nakamura¹, Naoki Kaneko², Victor L. Villemagne^{3,4}, Takashi Kato^{1,5}, James Doecke⁶, Vincent Doré^{3,6}, Chris Fowler⁴, Qiao-Xin Li⁴, Ralph Martins⁷, Christopher Rowe^{3,4}, Taisuke Tomita⁸, Katsumi Matsuzaki⁹, Kenji Ishii¹⁰, Kazunari Ishii¹¹, Yutaka Arahata⁵, Shinichi Iwamoto², Kengo Ito^{1,5}, Koichi Tanaka², Colin L. Masters⁴ & Katsuhiko Yanagisawa¹



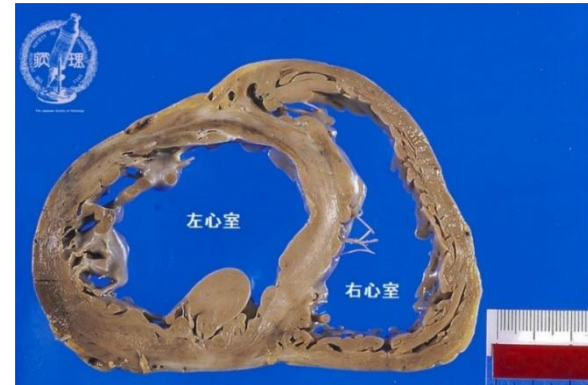
拡張型心筋症 (Dilated Cardiomyopathy; DCM)

- 左室拡大と心室の収縮機能障害を主体とする進行性の予後不良の疾患群。
- 遺伝的要因, ウイルス感染, 自己免疫異常などの関与が推測されているが, 詳細な成因は明らかになっていない。
- 診断にはDCMによって発症する心不全のバイオマーカーや心筋生検が用いられている。



正常心臓

拡張型心筋症

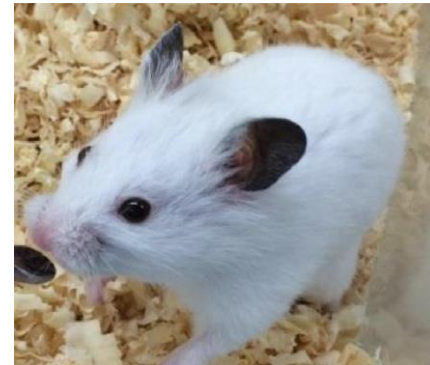
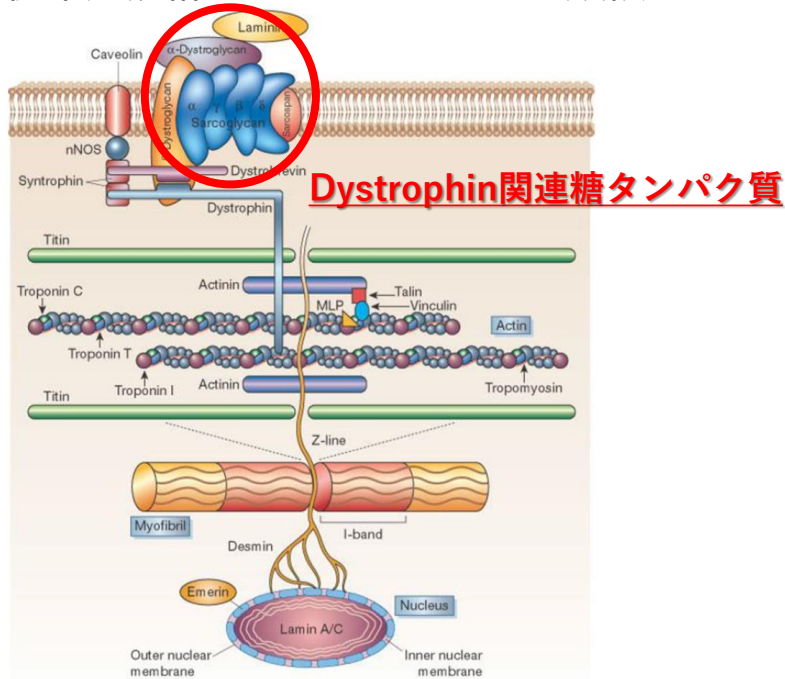


拡張型心筋症マクロ像

日本病理学会 病理コア画像より引用

拡張型心筋症動物モデル J2N-k hamster (J2N-k) (Japan SLC)

- δ - Sarcoglycan遺伝子欠損(常染色体劣性遺伝・自然発生).
- 20週齢前後でヒトDCMに類似した病態を示す.
- 死因の約90%が心不全.
- 健常対照群として遺伝的背景の類似したJ2N-n hamster (J2N-n) が存在す



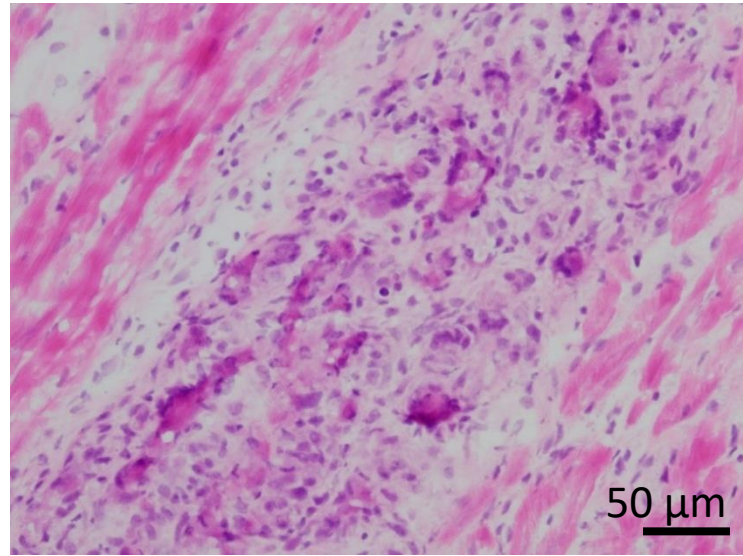
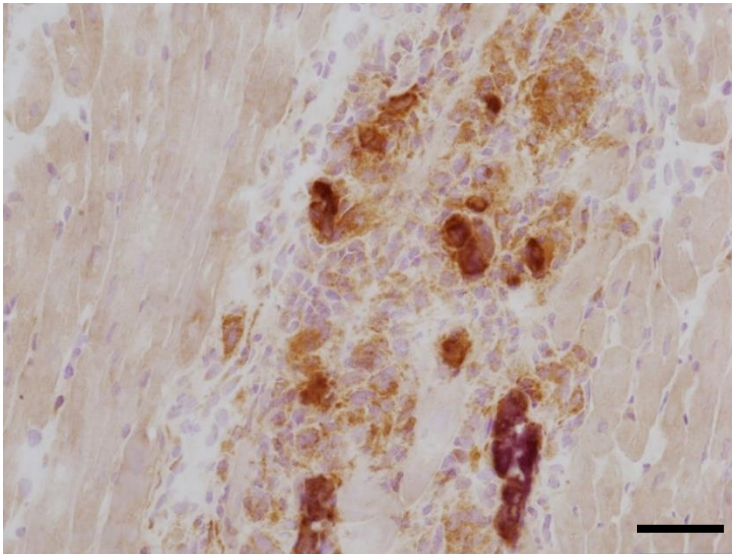
J2N-k hamster

筋細胞のタンパク質複合体ネットワーク

J.A. Towbin et al. *Nature* (2002)

Animal model of DCM on J2N-k hamster

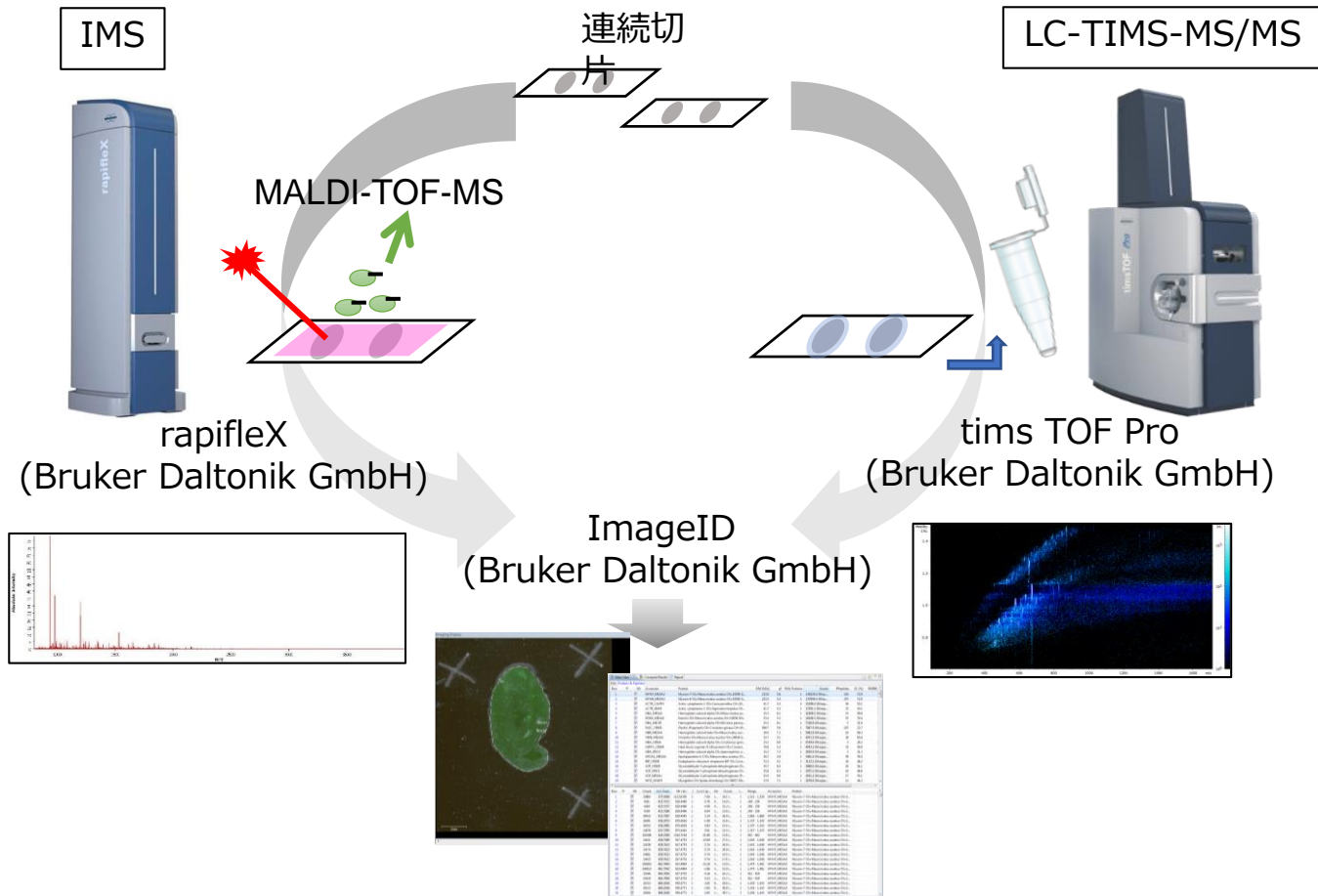
Giant Cells are positive for CD68



A, photomicrograph shows multinucleated giant cells in the heart at the age of 9 weeks of J2N-k hamster (Hematoxylin – Eosin staining; bar = 50μm). B, photomicrograph shows that multinucleated giant cells are CD68 positive (immunohistochemical staining; bar = 50μm).

Ishida and Tsuji, 2018

MALDI-IMSとショットガンプロテオミクスの統合



タンパク質・ペプチドのリストとその位置情報の取得

Segmentation model of DCM on J2N-k hamster

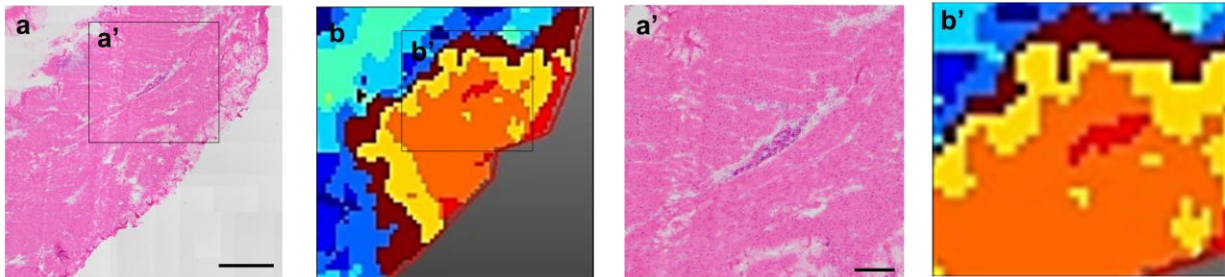
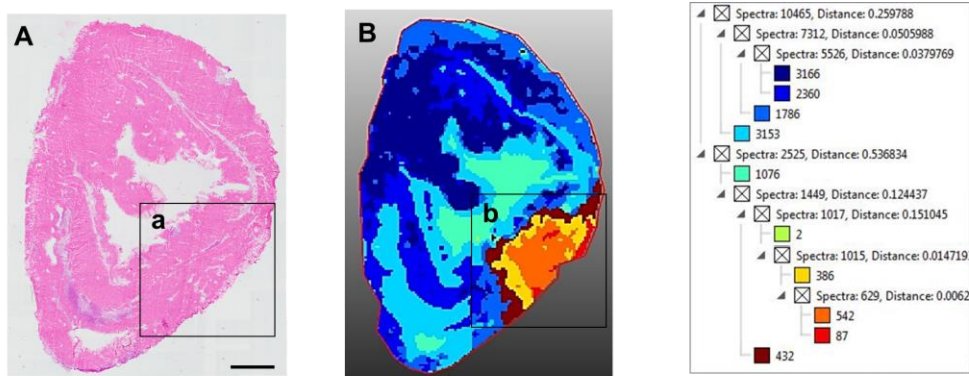
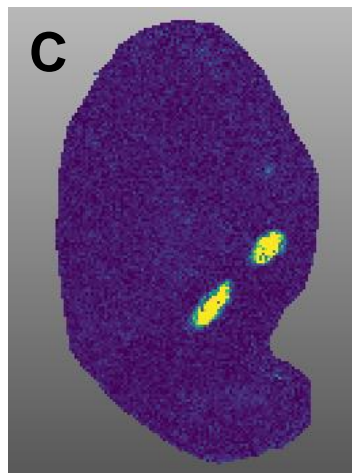
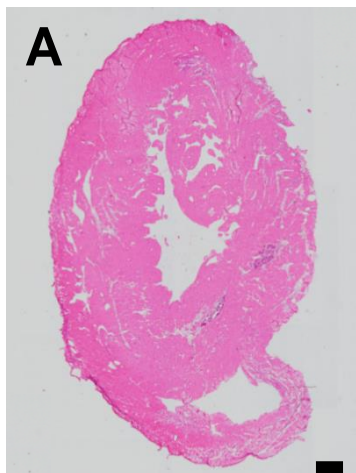
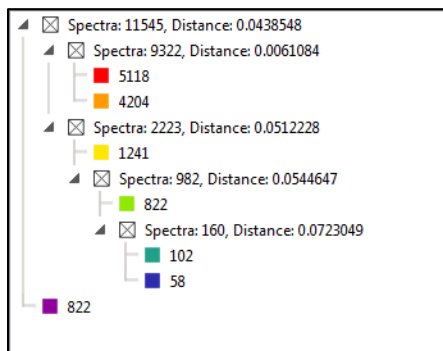
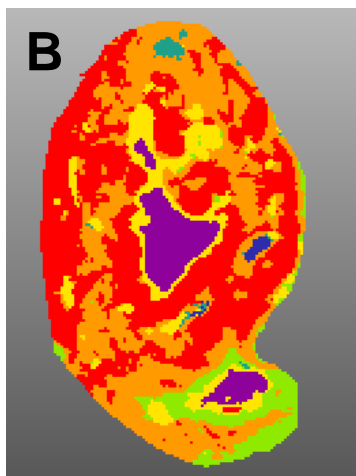


Fig. 6 A, a, a' ; HE stain of 8-weeks-old J2N-k heart after IMS (bars ; A = 1mm, a = 2mm, a' = 200µm)
 B, b, b' ; Segmentation map (SCiLS Lab 2018.)

J2N-k心臓組織における酵素消化処理を含むIMS測定の結果

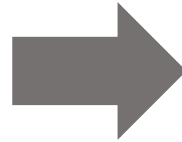
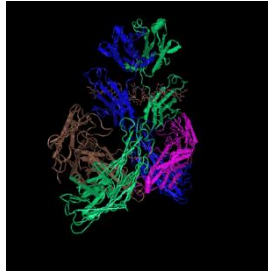


bar; 500 μ m

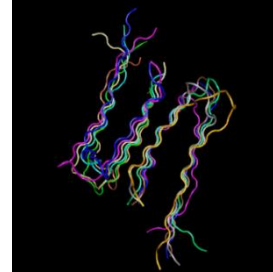


Amyloidosis

Amyloid precursor protein



amyloid



31 precursor proteins in humans

Systemic

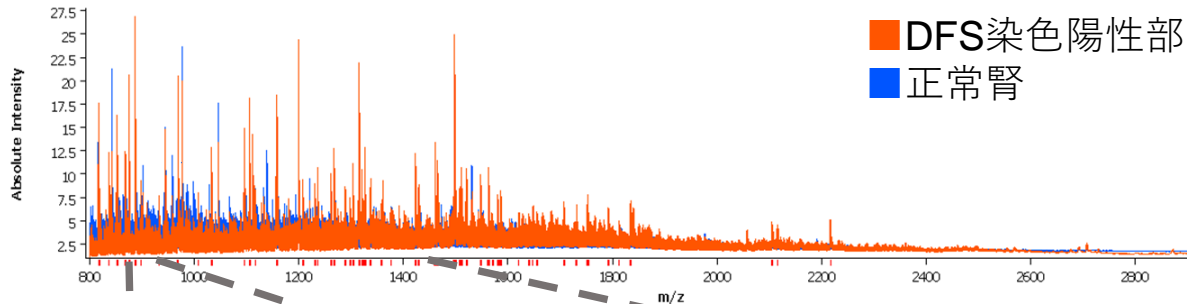
- immunoglobulin light chain (AL)
 - κ type
 - λ type
- serum amyloid A (SAA).

localized

- Brain amyloidosis
- Skin amyloidosis
- Focal nodular hyperplasia

.....

アミロイド共存タンパク質の シングルピーク画像

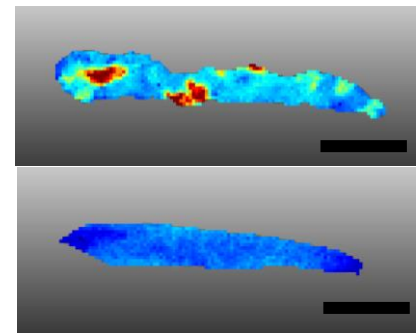
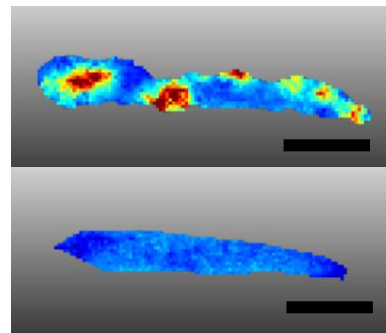
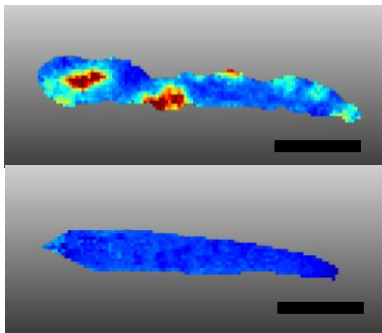


血清アミロイドP成分

アポリポタンパク質 E

カテプシンF

AL-k型



正常腎

m/z 887.46

m/z 968.55

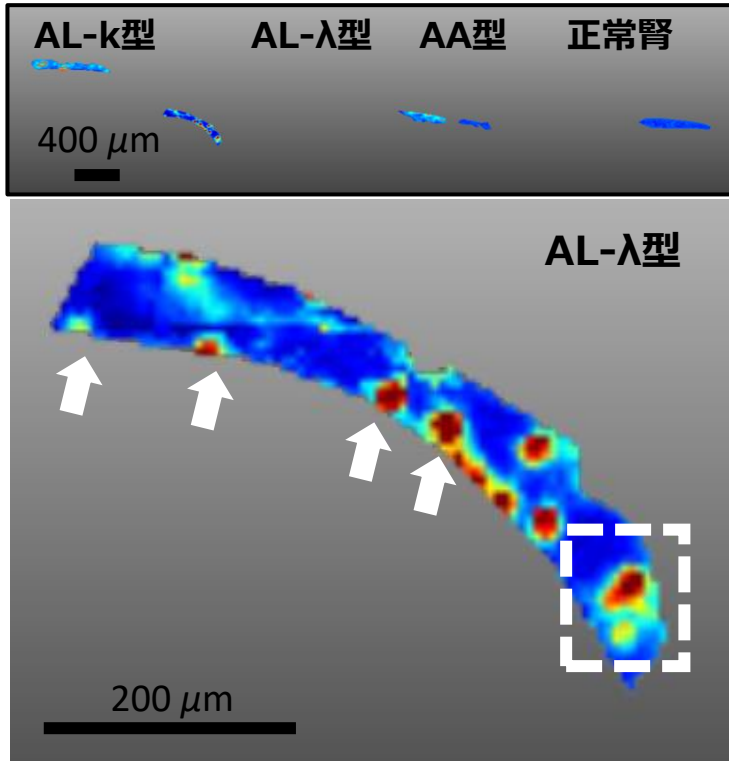
m/z 1422.67

intensity 0% 100%

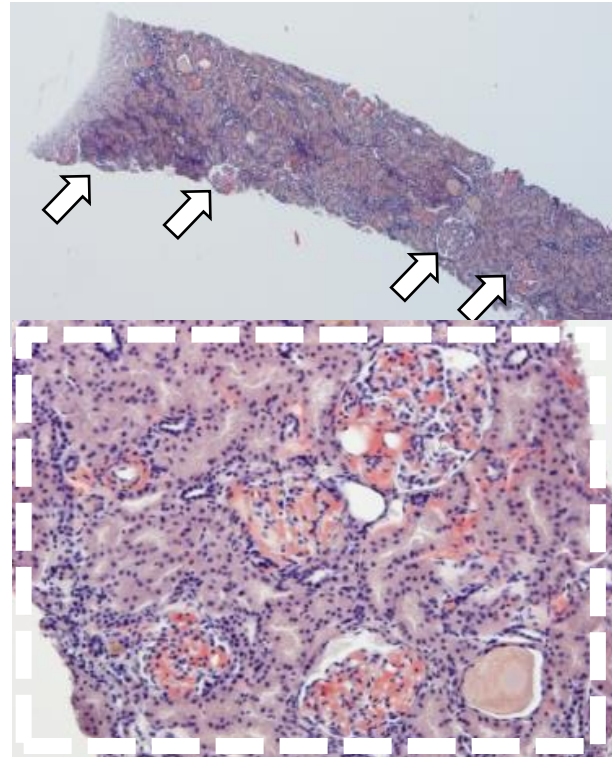
測定範囲: m/z 800-3000
空間分解能: 50 μm , Bar; 200 μm

1 糸球体レベルのタンパク質可視化

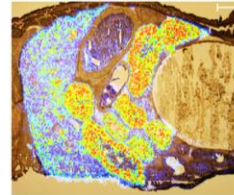
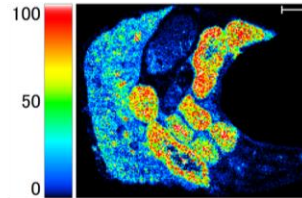
シングルピーク画像



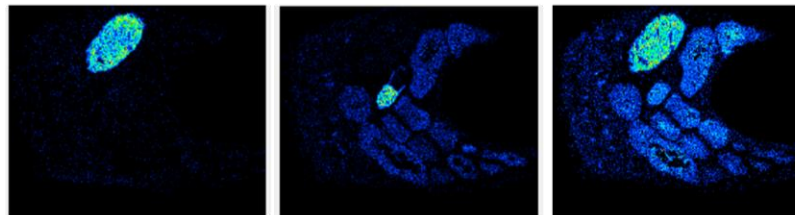
DFS染色陽性部



食品の消化・分解・吸収機構の可視化

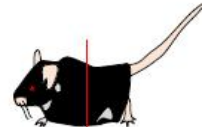
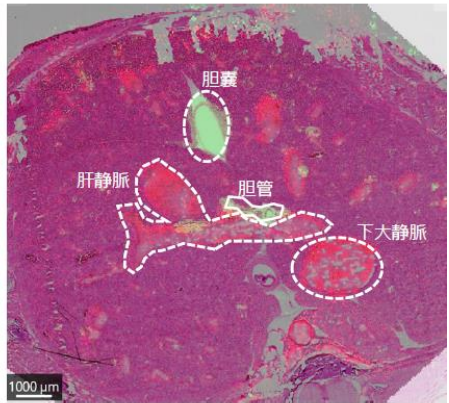
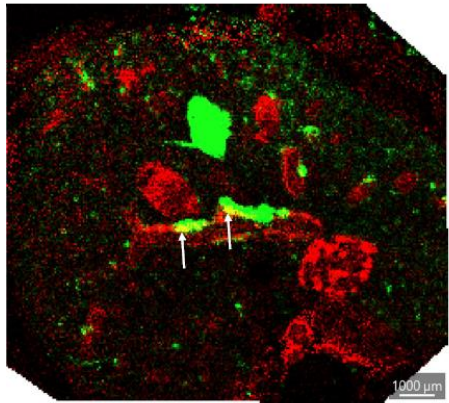
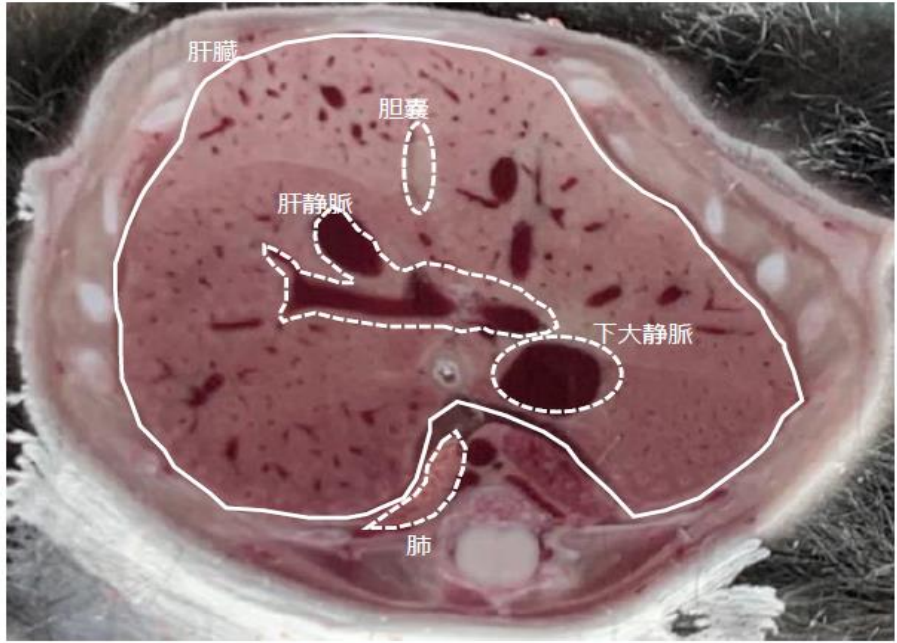


Whole body imaging
Bile acid distribution



P1 mouse, milk

胆汁酸分布の可視化



Whole body imaging
Bile acid distribution

イメージング質量分析法で橋渡す基礎研究と臨床のグローバル展開



国立循環器病研究センターHP <http://www.ncvc.go.jp/> より引用

病態メカニズム
の解明

創薬標的
の同定

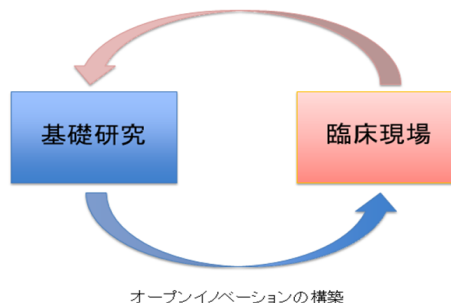
薬剤作用機序
の解明

バイオマーカー
の探索

食品機能成分
の分析

「循環型研究開発」の推進

基礎研究を強化して画期的なシーズが常に生み出される



京都大学医学部附属病院HP <http://www.ncvc.go.jp/> より引用



Hôpital européen Georges-Pompidou Facebook より引用

Collaborators

Doshisha University

Yuki Kuzuhara, Megumi Terada, Mizuki Ishida, Yume Mukasa, Inori Shintani, Nobuto Kakuda,
Tomohiro Miyasaka, Yasuo Ihara

Dept Cardiovascular Surgery, Kyoto University

Takashi Tsuji, Hidetoshi Masumoto, Kenji Minatoya

The Brain Bank for Aging Research, Tokyo Metropolitan Geriatric Hospital

Shigeo Murayama

Dept. Pathology, Bio Bank Center, National Cerebral and Cardiovascular Research Center

Hatsue-Ishibashi Ueda

Necker-Enfants malades Hospital, Paris, France

Marion Rabant, Jean-Paul Duong Van Huyen

Georges-Pompidou European Hospital, Anatomy-Pathology, Paris, France

Patrick Bruneval

Bruker Japan K. K.

Ryo Kajita, Noriyuki Iwasaki, Takashi Nirasawa