

—— 研究助成報告 ——

ヒト脳組織プロテオミクスによる小児てんかん患者の 血液脳関門の輸送分子機構の解明

内 田 康 雄

要旨：本研究では、ヒトの病理標本に適用可能な定量プロテオミクス技術を構築し、小児てんかん患者の焦点部位の血液脳関門における輸送分子機構を定量的に解明することを目的とした。ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織を用いたオミクス技術のボトルネックは、ホルマリン架橋を効果的に除去できない点である。我々は、大気圧の約3000倍の圧力と高温および強力な可溶化剤を組み合わせることによって、ほぼ完全に脱架橋・可溶化できる条件を確立し、プロテオミクス解析で定量される数千種類のタンパク質発現量について1.2倍の範囲内で非固定組織と一致するプロトコルを確立した。小児てんかん患者の脳血管における定量プロテオミクスの結果、正常コントロールに比べて、薬物排出トランスポーターであるMDR1、BCRPおよび密着結合タンパク質群のタンパク質発現量は有意に小さく、血液由来のタンパク質群の脳内濃度が上昇していた。

てんかん治療研究振興財団 研究年報 2025；36：23-28

Key Words：ホルマリン固定パラフィン包埋組織、定量プロテオミクス、小児てんかん、血液脳関門、Pressure Cycling Technology (PCT)

1. 序論

てんかんの薬物治療において、病態の進行に伴う薬剤感受性の低下は、治療成績を増悪させる深刻な問題である。その原因のひとつとして、血液脳関門に発現する薬剤排出ポンプによる積極的な脳外への抗てんかん薬の排出が考えられている。代表的な薬剤排出ポンプとしては、P-glycoprotein (P-gp/MDR1)、Breast Cancer Resistant Protein (BCRP) および Multidrug Resistant-associated Protein 1 (MRP1) が挙げられ、実際に、これらが、てんかんモデル動物で発現上昇しており、抗てんかん薬の脳内への侵入を制限している^{1, 2)}。薬剤耐性を克服するためには、これら薬剤排出ポンプの機能上昇を抑えることが重要な治療戦略と考えられている。しかし、患者の病態を十分に反映するてんかんモデルが乏しいことから、てんかん患者の血液

脳関門における輸送分子機構を定量的に解明することが必要である。

ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織は、凍結組織に比べて、医療施設等に膨大な数が保管されており、病理・臨床情報も伴うことから、利用価値が大きい。しかし、ホルマリン架橋が様々な生物学的な実験・解析の障壁となっており、依然として、プロテオミクス研究にほとんど利用されていない。Pressure Cycling Technology (PCT) は、大気圧の約3000倍の超高压と常圧を繰り返す技術であり、ホルマリン架橋を加水分解によって効果的に除去できることが期待される。そこで、本研究では、高温・強力な可溶化剤に加えてPCTを組み合わせた試料調製法をFFPE切片に適用することによって、切片中のタンパク質を効果的に脱架橋・可溶化できる方法を構築することを目的とした。さらに、小児てんかん患者の血液脳関門におけ

る輸送分子機構を定量プロテオミクスによって定量的に解明することを目的とした。

2. 方法

ホルマリン架橋の除去, 蛋白抽出, トリプシン消化を完全に進行させるため, 超高压と常圧を交互に与える (1) PCTを適用した。

FFPEプロテオミクスにおける再現性と網羅性の低さを解決するため, 約2万種の生体タンパク質のうちの数千~1万種類 (従来法の5~10倍) の蛋白質発現の一斉かつ高精度 (CV値<15%) 定量を可能にする (2) SWATH測定と (3) 高精度定量ペプチド選択法を適用した。

構築したFFPE-PCT-SWATH法をFFPEの病態組織に適用することで, 新鮮組織で起こっているタンパク質群の発現量変化をどれほど精度よく生体内のタンパク質発現量変化を追うことができるかを評価した。

小児てんかん患者 (7歳~19歳) の脳血管を単離し, 網羅的にタンパク質の発現量を測定した。

3. 結果

3-1. FFPE定量プロテオミクス技術の構築

FFPE切片に対して, 45000 psiの超高压と常圧を交互に与える (1) PCT条件と可溶化力に優れたPhase Transfer Surfactant (PTS), さらに95度の高温を組み合わせることによって, ホルマリン架橋の除去およびタンパク抽出を行い, 抽出されたタンパク質量を定量した。その結果, 非固定の凍結切片から抽出したときのタンパク質抽出量と同程度 (有意差なく) に抽出できることが示された³⁾。したがって, 上記の条件によって, FFPE切片からほぼ完全にタンパク質を抽出できると解釈した。

(1) の前処理法に加えて, 数千種類の蛋白質発現の一斉かつ高精度定量を可能にする (2) SWATH測定と (3) 高精度定量ペプチド選択法を用いた結果, 従来のShotgun測定やペプチド選択を行わない方法に比べて, 統計学的に有意に, 真度および精度が改善した。具体的には, FFPE切片から得られるタンパク質の網羅的な定量結果が, 新鮮組織のそれらと1.5倍の範囲内であり, かつ, 4回の独立したサンプル調製・

測定間のCV値が約7%であった³⁾。従って, (1), (2) および (3) を組み合わせたFFPE-PCT-SWATH法を用いることによって, FFPE切片であっても, 非固定の組織における数千種類のタンパク質の発現量をほぼ正確に反映した定量結果を得ることができることが示された。

次に, 本手法を用いて網羅的にタンパク質群の病態変動を正確に定量可能か否かを検証することとした。従来, FFPEを用いて網羅的に定量しようとしても, 生体内で起きている各タンパク質の発現量の変動を定量することは困難であった。FFPE利用の最大の利点は大勢の疾患患者のあらゆる病態組織を対象とできることであるが, 上述の課題がこのFFPEの利用価値を下げていた。我々が確立したFFPEプロテオミクス手法を用いてこの課題を克服できるか否かを検証するために, 胆汁うっ滞肝臓および正常肝臓に本手法を適用した結果, 従来のFFPEプロテオミクス手法では全く新鮮組織のタンパク質病態変動量を反映した定量結果を得ることができなかったが, 我々の手法では, 新鮮組織で得られたタンパク質群の病態変動量を網羅的かつ高精度に追うことができ, はじめてFFPE組織を用いて網羅的にタンパク質の病態変動を定量できる手法を確立できた (Fig. 1)³⁾。

3-2. 小児てんかん患者の血液脳関門における輸送分子機構の定量的な解明

小児てんかん患者から手術で採取された焦点部位の脳組織から, 脳血管を単離し, プロテオミクス解析によって, 数千種類のタンパク質の発現量を定量した。MDR1, BCRP, MCT8およびLAT1は, 血液脳関門における抗てんかん薬輸送に関与するトランスポーターである (Tab. 1)。排出輸送するMDR1およびBCRPは, 正常コントロールに比べて, てんかん患者において, 有意に発現量が小さいことが示された⁴⁾。MCT8とLAT1のタンパク質発現量は, 2群間で有意な違いは示されなかった (Fig. 2)。

抗てんかん薬代謝にかかわる16種類の代謝酵素が検出され, それらのうち, GSTP1, GSTO1, CYP2E1, ALDH1A1, ALDH6A1, ALDH7A1, ALDH9A1およびADH5のタンパク質発現量

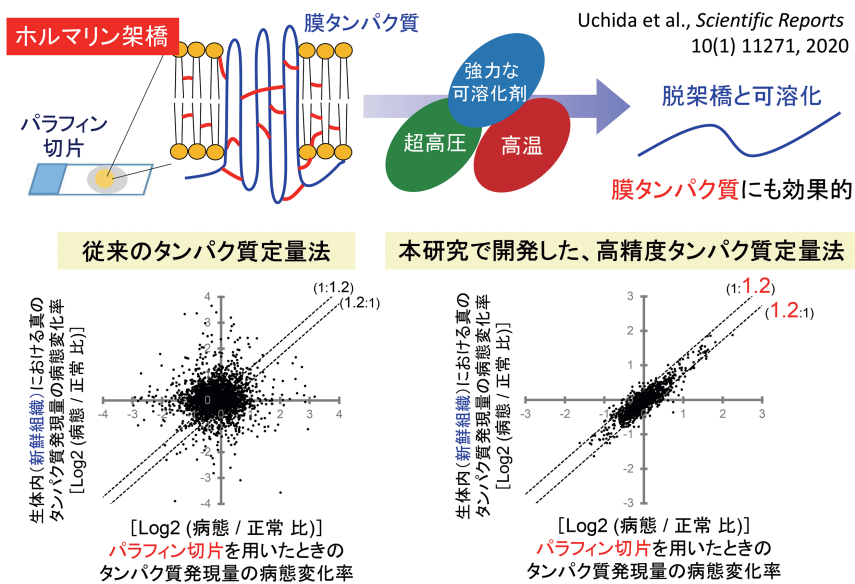


Fig. 1 本研究で確立したFFPE定量プロテオミクス技術
FFPE切片中のホルマリン架橋を効果的に除去し、タンパク質を効率よく抽出できる。数千種類のタンパク質の発現量について、病態時の変動率をほぼ正確に定量することが可能である。データは、文献³⁾より引用した。

Tab. 1 抗てんかん薬を輸送するトランスポーターおよび代謝する酵素
文献⁴⁾より引用・改変した。

Molecular names	Anti-epileptic drugs transported or metabolized
Transporters	
MDR1 (efflux)	felbamate, phenobarbital, carbamazepine, lamotrigine, phenytoin, topiramate, levetiracetam, oxcarbamazepine, acetazolamide, tiagabine
BCRP (efflux)	phenobarbital, clobazam, zonisamide, gabapentin, tiagabine, levetiracetam
MCT8 (efflux)	phenytoin
LAT1 (influx)	gabapentin, pregabalin
Metabolizing enzymes	
Cytochrome P450 (CYP2E1)	ethosuximide, felbamate, phenobarbital, carbamazepine, valproate
Epoxide hydrolase (EPHX1)	carbamazepine, phenobarbital, phenytoin
Carbonyl reductase (CBR1,3)	oxcarbamazepine (activated by CBR)
Aldehyde dehydrogenase (ALDH1A1, 2, 3A2, 6A1, 7A1, 9A1)	felbamate
Alcohol dehydrogenase (ADH5)	felbamate
Glutathione S-transferase (GSTP1, O1, M3, K1, MGST2)	phenytoin, valproate, carbamazepine

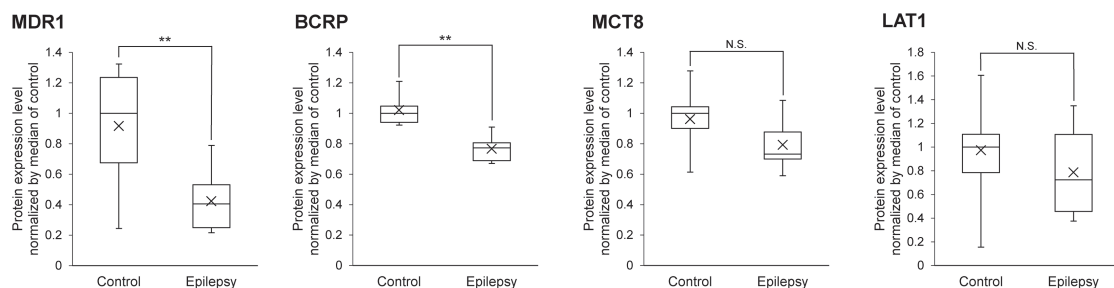


Fig. 2 小児てんかん患者の血液脳関門における抗てんかん薬トランスポーターのタンパク質発現量
×は平均値を表す。**Benjamini-Hochberg (BH)-adjusted p value < 0.01. N.S., not significantly different. 文献⁴⁾より引用・改変した。

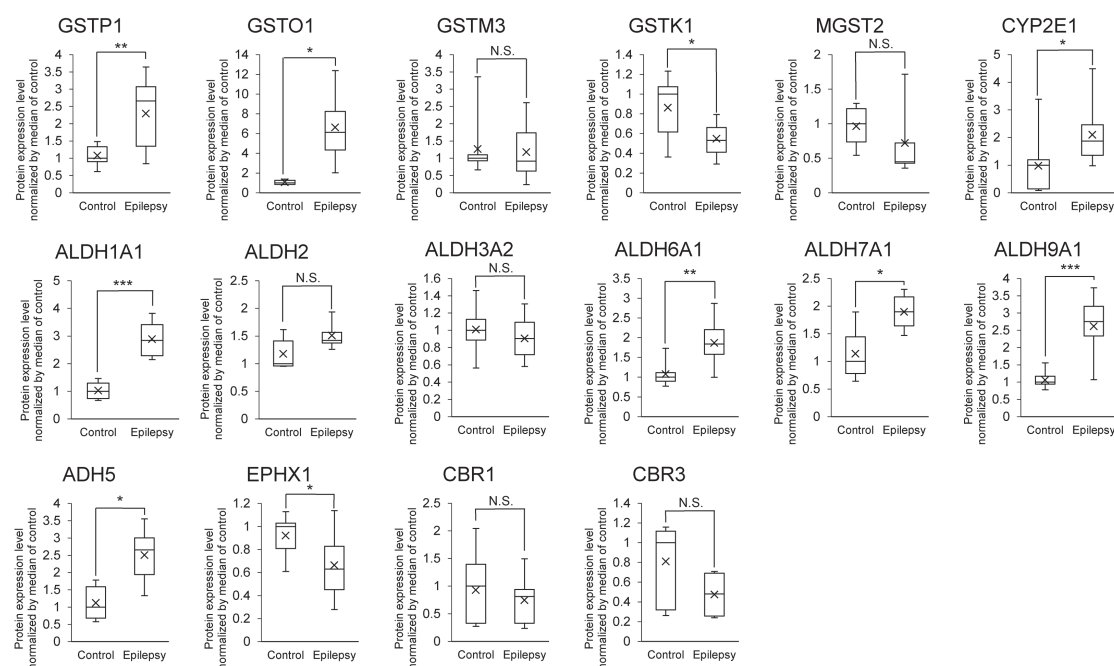


Fig. 3 小児てんかん患者の血液脳関門における抗てんかん薬代謝酵素のタンパク質発現量
×は平均値を表す。*BH-adjusted p value < 0.05. **BH-adjusted p value < 0.01. ***BH-adjusted p value < 0.001. N.S., not significantly different. 文献⁴⁾より引用・改変した。

は、正常コントロールに比べて、小児てんかん患者の血液脳関門で、それぞれ2.13, 6.23, 2.16, 2.80, 1.73, 1.67, 2.47および2.23倍ほど有意に大きかった (Fig. 3)⁴⁾。

輸送や代謝にかかわる分子群だけでなく、血液脳関門の密着結合がてんかん患者でどのように変化しているかを解明することが重要である。密着結合タンパク質である Claudin-5, ZO-1, Catenin alpha-1, beta-1およびdelta-1のタン

パク質発現量は、1.97, 2.51, 2.44, 1.90および1.63倍ほど、てんかん患者で有意に低いことが示された (Fig. 4)⁴⁾。

この結果として、ヘモグロビン、フィブリノーゲン、アルブミン、補体などの血液タンパク質の脳内濃度が、てんかん患者で増加していた (Fig. 5)⁴⁾。

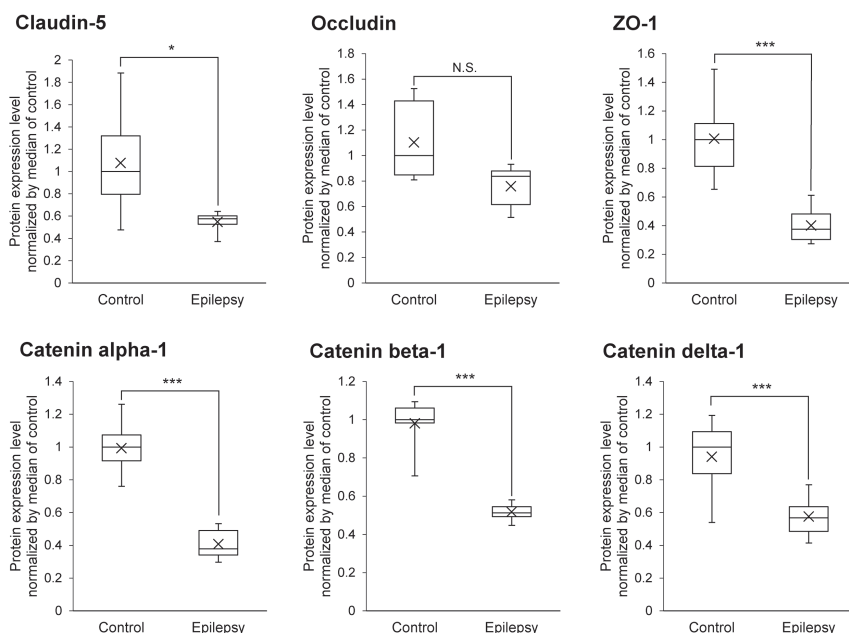


Fig. 4 小児てんかん患者の血液脳関門における密着結合分子のタンパク質発現量
×は平均値を表す。*BH-adjusted p value < 0.05. ***BH-adjusted p value < 0.001. N.S., not significantly different. 文献⁴⁾より引用・改変した。

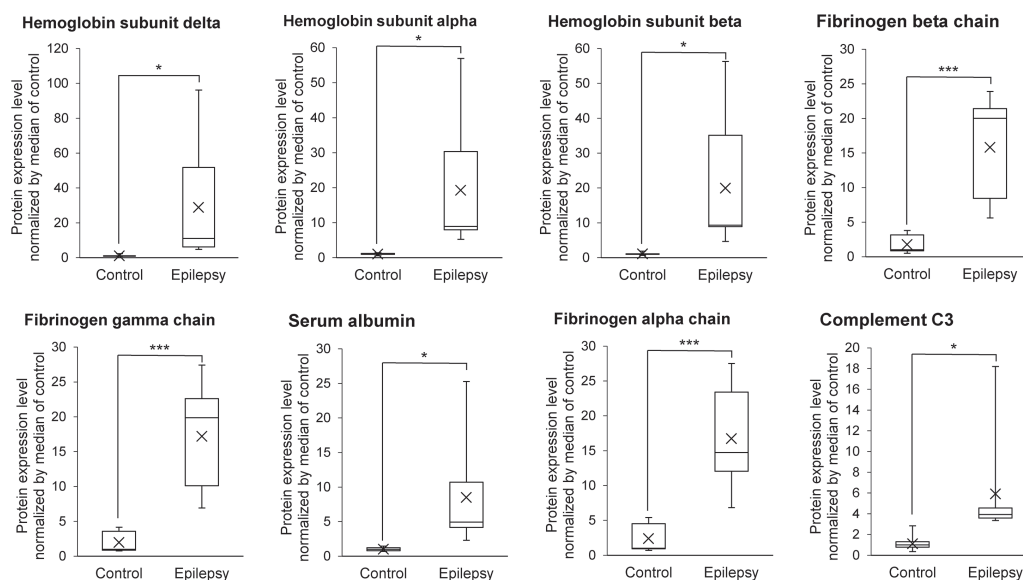


Fig. 5 小児てんかん患者の血液脳関門における血液タンパク質の存在量
×は平均値を表す。*BH-adjusted p value < 0.05. ***BH-adjusted p value < 0.001. 文献⁴⁾より引用・改変した。

4. 考察

てんかんモデル動物では、血液脳関門の排出輸送トランスポーターの発現量が増加し、薬剤耐性にかかわることが示唆されてきたが^{1, 2)}、本研究において、てんかん患者の焦点部位では、逆に、MDR1やBCRPなどの抗てんかん薬の排出輸送トランスポーターのタンパク質発現量は低下していることが示された。これは、抗てんかん薬に対する耐性に寄与するのではなく、むしろ抗てんかん薬が脳内に移行しやすい状態となっていることを示唆している。さらに、密着結合タンパク質群の発現低下及びそれに伴う血液タンパク質の流入が検出されたことから、密着結合が崩壊しており、血液中の薬物が脳内へ移行しやすい状態であることを示唆している。

密着結合が崩壊すると、血液成分が脳内に流入することによって、てんかんを誘発する。一方で、てんかん発作によって密着結合が障害を受けることも知られている。本研究は、1時点の脳検体のプロテオミクス結果であるため、原因と結果の関係は不明である。今後、てんかん治療の標的として、血液脳関門が有望であるか否かを知るうえで、てんかんの原因の一つとして血液脳関門の異常が該当するか否かを解明することは重要な課題である。

文献

- 1) Loscher W, Potschka H. Drug resistance in brain diseases and the role of drug efflux transporters. *Nat Rev Neurosci* 2005 ; **6** : 591-602.
- 2) Uchida Y, Ohtsuki S, Terasaki T. Pharmacoproteomics-based reconstruction of in vivo P-glycoprotein function at blood-brain barrier and brain distribution of substrate verapamil in pentylenetetrazole-kindled epilepsy, spontaneous epilepsy, and phenytoin treatment models. *Drug Metab Dispos* 2014 ; **42** : 1719-1726.
- 3) Uchida Y, Sasaki H, Terasaki T. Establishment and validation of highly accurate formalin-fixed paraffin-embedded quantitative proteomics by heat-compatible pressure cycling technology using phase-transfer surfactant and SWATH-MS. *Sci Rep* 2020 ; **10** : 11271.
- 4) Sato R, Ohmori K, Umetsu M, Takao M, Tano M, Grant G, et al. An Atlas of the Quantitative Protein Expression of Anti-Epileptic-Drug Transporters, Metabolizing Enzymes and Tight Junctions at the Blood-Brain Barrier in Epileptic Patients. *Pharmaceutics* 2021 ; **13** : 2122.