

ライカマイクロシステムズ社・AMR社

プロテオーム技術セミナー

【セミナー資料】

2010年6月21日(月)

- 資料の学内限定公開についてはLeica Microsystems 株式会社の許可を得ておりますが、資料および音声データの二次配布については固く禁止させていただきます
- 問題が発生した場合、全てのセミナーデータを削除し、以降の公開ができなくなりますので、くれぐれもご注意ください

LMD6000

レーザーマイクロダイセクションのご紹介

ライカマイクロシステムズ 株式会社

渡辺 健一 博士(理学)



1. レーザーマイクロダイセクションとは？
2. ライカLMDシステムの原理と利点
3. サンプルについて
4. アプリケーション例の紹介

2

1. レーザーマイクロダイセクションとは？

2. ライカLMDシステムの原理と利点

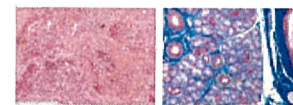
3. サンプルについて

4. アプリケーション例の紹介

3

基礎医学・生物学研究で用いられる主な実験手法

・組織標本を作製し、病変部の形態異常を観察する



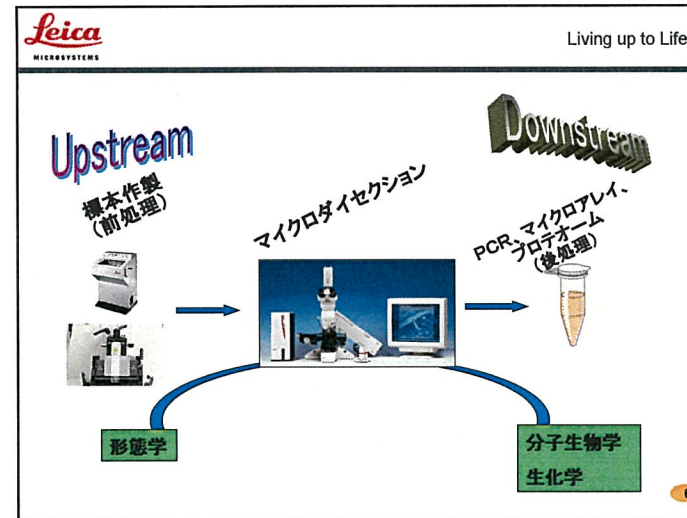
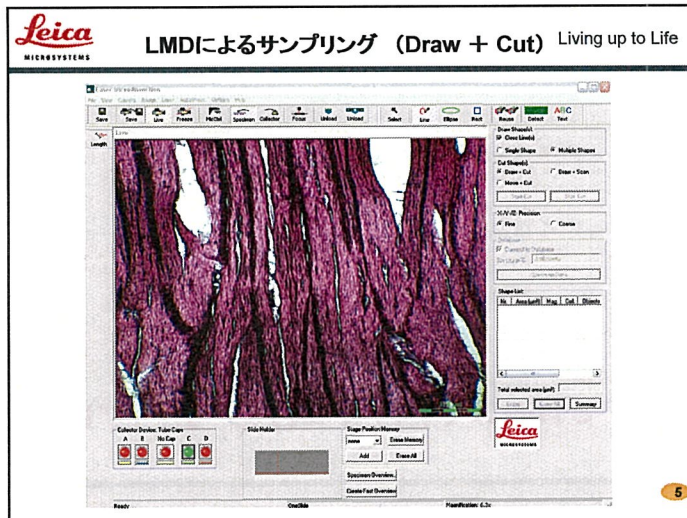
病変内部でどのような分子が働いているか解析が難しい。

・病変組織をそのまますりつぶし、核酸・タンパク・代謝物質を抽出・解析



血管や血液、複数種細胞が混在。情報にノイズが入り、発現量の少ない分子のシグナル検出が難しい。

4



- Leica MICROSYSTEMS Living up to Life
1. レーザーマイクロダイセクションとは？
 2. ライカLMDシステムの原理と利点
 7. サンプルについて
 8. アプリケーション例の紹介
- 7

Leica MICROSYSTEMS Living up to Life

ライカLMDの利点

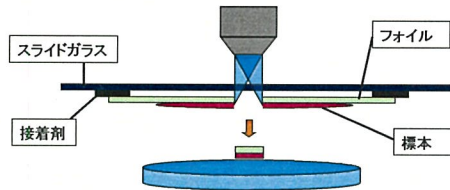
- 高品質核酸・タンパク質の回収
- 高い生産性
- 快適な作業

The image shows the Leica LMD system setup. It includes the main microscope unit with a camera, and two computer monitors displaying images of the tissue section. A keyboard and mouse are also visible. The Leica logo and 'MICROSYSTEMS' are in the top left, and 'Living up to Life' is in the top right.

8

Leica LMDの基本原理: UVレーザーによるカッティングと重力による回収

- 専用フィルムを貼ったスライドガラスに標本を作ります。
- 必要な部分の周囲をレーザーで切除します。
- 切除されたサンプルはPCRチューブに直接回収されます。



フィルムとガラスは接着していないのでレーザーでカットされた標本はフィルムごと落下し、PCRチューブに回収されます。

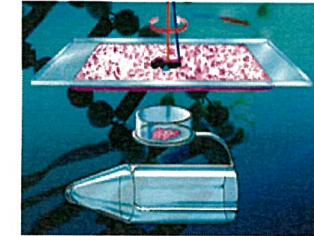
9

高品質核酸・タンパク質の回収

非接触落下で緩衝液へ直接回収。高品質のRNA、タンパク質を抽出できます。

周囲をUVレーザーでカット
→サンプルへのレーザー照射・物理的接触はなし。

緩衝液中に直接サンプル回収
→RNA、タンパク質の分解を最小限に抑えることが可能。



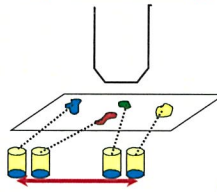
10

高い生産性

非接触落下回収が生産性を高めます。

複数のPCRチューブへ分配回収が可能

複数の標本から同一チューブへの回収が無制限
→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。

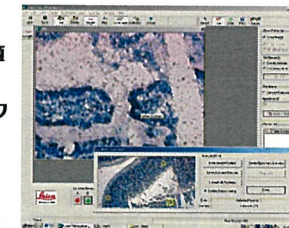


11

快適な作業

直感的な操作画面とライカ、スマートムーブで快適な作業を実現します。

- フル電動正立型顕微鏡を採用
→顕微鏡操作をコントローラーで快適に
- ほとんどの作業がアイコン化され、ワンクリックで完了



12

Leica MICROSYSTEMS Living up to Life

1. レーザーマイクロダイセクションとは？
2. ライカLMDシステムの原理と利点
7. サンプルについて
8. アプリケーション例の紹介

13

Leica MICROSYSTEMS サンプル条件：概説 Living up to Life

ダイセクション可能なサンプル - パラフィン標本・凍結標本・細胞診・培養細胞・染色体等フォイルつきスライドにサンプリングできればダイセクション可能

染色も特に種類は問わない。(HE染色、トルイジンブルー染色、免疫染色等)

→ただし、回収後RNA・タンパク質を分析する場合は凍結標本からのサンプリングを推奨(染色はトルイジンブルー染色・HE染色等)

Upstream

DNA
RNA
Protein

DNA mRNA 転写 核

mRNA 翻訳 リボソーム Protein

パラフィン固定標本からもマイクロダイセクションは可能だが、RNAのクオリティは著しく低下しており、RNAの分析が難しい。

14

Leica MICROSYSTEMS サンプル条件①：厚さ Living up to Life

マイクロダイセクションにおける切片の厚さ

標本の厚さは実験の目的とサンプルの状態に応じて柔軟に考慮する必要があります。

標本を厚くするメリット
—一度のカットで大量のサンプルが回収できる

標本を厚くするデメリット
—染色が濃くなり観察が難しい。
—細胞が重なり合い正確なカットが難しい。
—強いレーザー出力が必要となりカットラインが太くなってしまふ。

Effective Aperture

Focus level

通常、病理標本では5~10 μm厚が一般的

快適なカットには、サンプルを染色しておくことも重要です。

15

Leica MICROSYSTEMS Living up to Life

1. レーザーマイクロダイセクションとは？
2. ライカLMDシステムの原理と利点
7. サンプルについて
8. アプリケーション例の紹介

16

Leica MICROSYSTEMS Living up to Life

回収後はDNA, RNA, タンパク質を抽出し、分析を行います。

DNA → (PCR) → シーケンス
電気泳動

RNA → (RT-PCR) → マイクロアレイ
リアルタイムPCR

タンパク質 → 質量分析
2D-電気泳動

ライカLMDの用途

ライカLMDでの研究内容(文献ベース)

DNA 37%

RNA 54%

Protein 9%

17

Leica MICROSYSTEMS Living up to Life

実験例①:凍結標本からのRNA抽出とRT-PCR

ラット腎臓の凍結サンプルを5 μm厚に薄切し、トリイズンブルーで染色。
糸球体を回収し、RT-PCRで遺伝子の発現を確認。

Before After Bar=100 μm

308bp Left GAPDH 308bp Left GAPDH 311bp 239bp Right VEGF(311bp and 239bp)

Right: no RT/PLATINUM Taq Mix Right: VEGF(311bp and 239bp)

Inoue, K., Sakurada, Y., Murakami, M., Shiota, M. and Shiota, K.,
Detection of gene expression of vascular endothelial growth factor and flk-1 in the renal glomeruli of the normal rat kidney using the laser microdissection system,
Virchows Arch, 442, 159-62, (2003)

18

Leica MICROSYSTEMS Living up to Life

実験例②:リアルタイムPCRへの応用

マウス脊髄凍結サンプルを30 μm厚に薄切。運動神経細胞をLMDで回収し、定量PCRを行なった。
マウス脊髄から神経細胞を回収。10細胞相当量のmiRNAから増幅。
トランスジェニックマウスで導入遺伝子の発現増加を定量PCRにより確認できた。

Glut2 expression level in motor neurons of GluR2 transgenic mice

Mouse	GluR2	GluR3	GluR4	CHAT	SOD1
C57BL/6J (n=3)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
GluR2-transgenic mice (n=3)	4.78 ± 0.85	1.02 ± 0.54	1.21 ± 0.26	1.17 ± 0.38	1.09 ± 0.31

Tateno, M., Sadakata, H., Tanaka, M., Itohara, S., Shin, R. M., Miura, M., Masuda, M., Aasaki, T., Urushitani, M., Misawa, H. and Takahashi, R.,
Calcium-permeable AMPA receptors promote misfolding of mutant SOD1 protein and development of amyotrophic lateral sclerosis in a transgenic mouse model,
Hum Mol Genet, 13, 2183-96, (2004)

19

Leica MICROSYSTEMS Living up to Life

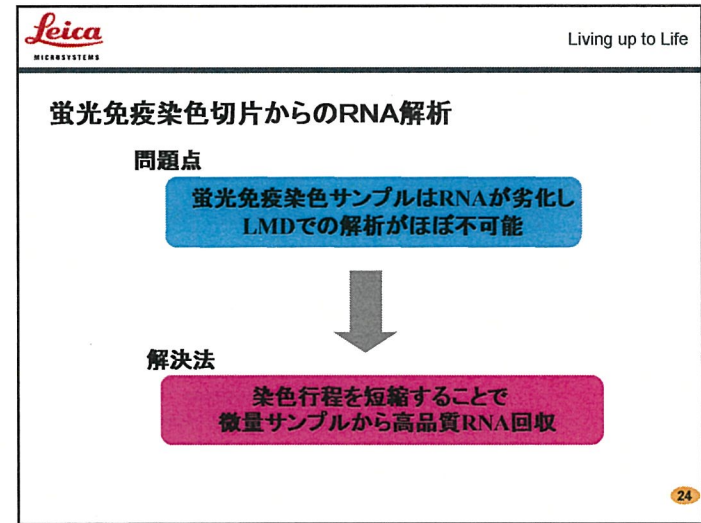
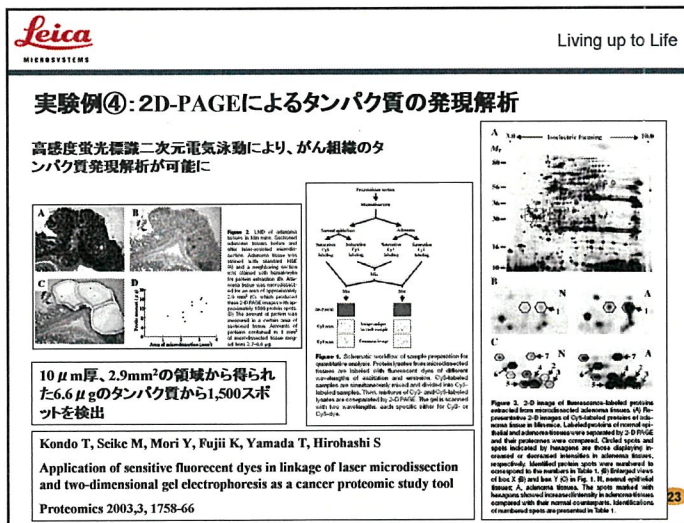
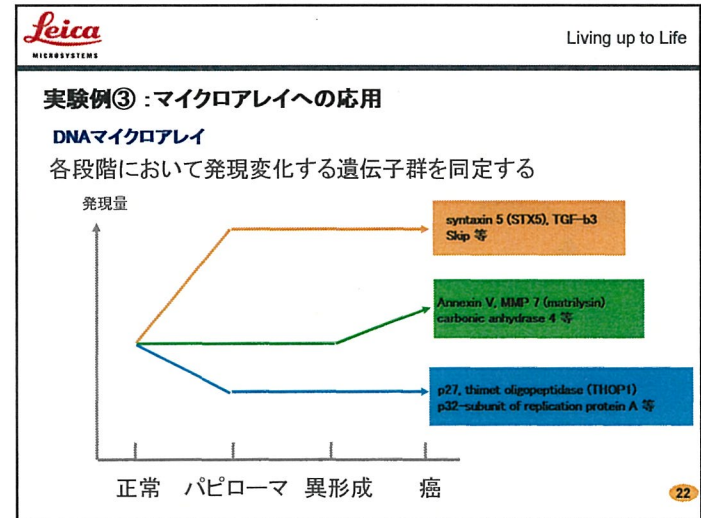
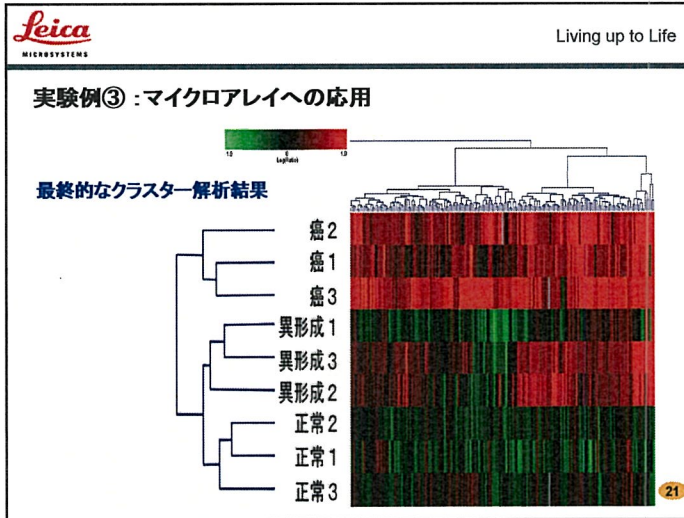
実験例③:マイクロアレイへの応用

ラット食道癌・各段階の発癌過程において、発現量が変化する癌遺伝子を同定

Normal Dysplasia Papilloma Cancer

Mori, M., Mimori, K., Yoshikawa, Y., Shibuta, K., Utsunomiya, T., Sadanaga, N., Tanaka, F., Matsuyama, A., Inoue, H. and Sugimachi, K.,
Analysis of the gene-expression profile regarding the progression of human gastric carcinoma,
Surgery, 131, S39-47, (2002)

20



Leica MICROSYSTEMS Living up to Life

蛍光免疫染色切片からのRNA回収

実験例⑤: 薬剤処理を行ったラット脳凍結サンプルからの定量的RT-PCR

直接蛍光抗体法...染色行程25分 間接蛍光抗体法...染色行程40分

ごく微量の細胞からでも
遺伝子発現量の違いを確認できた。

25

Leica MICROSYSTEMS Living up to Life

実験例⑥: バクテリア

バクテリア回収 (You Tube画像)

http://www.youtube.com/watch?v=c_hMygEEmBQ

26

Leica MICROSYSTEMS Living up to Life

実験例⑦: 硬組織

-マウスの歯、未脱灰・未染色凍結標本 •Eucalyptus

歯・骨植物などの硬組織のダイセクションも可能。

27

Leica MICROSYSTEMS Living up to Life **NEW**

Lab on a chip

シングルセルをchipに回収

Chip上でPCR反応

AmpliSpeed slide cycler

28

Leica MICROSYSTEMS Living up to Life

ホルマリン固定/パラフィン包埋組織からのプロテオミクス

レーザーマイクロダイセクションを用いて解析可能な実験

標本	分析対象	DNA	RNA	Protein
凍結標本		○	○	○
パラフィン包埋標本		○	▲ → 一部可能	× → ○

ホルマリン固定/パラフィン包埋標本からのプロテオミクス研究が画期的な新技術の登場で可能に!

29

Leica MICROSYSTEMS Living up to Life

新技術の登場-1

スペシャルスライドの開発

→ DIRECTOR Slideで非接触回収を維持しながら不純物を回収しない手法が実現

DIRECTORスライドに標本を作ります。

UVレーザーの照射で、エネルギー転送ファクターが昇華します。

標本は回収チューブに落下回収

スライドガラス

エネルギー転送ファクターコーティング

標本

30

Leica MICROSYSTEMS Living up to Life

LMDによるサンプリング (Draw + Scan)

31

Leica MICROSYSTEMS Living up to Life

新技術の登場-2

高速、大量サンプル回収

質量分析には多量のサンプルが必要
→ 非接触、集中回収、高速回収が可能な LMD6500で効率よく回収

Leica LMD7000

32

Leica MICROSYSTEMS Living up to Life

新技術の登場—3

試薬の開発と解析

新試薬 (Liquid Tissue) でホルマリン固定標本からのタンパク質処理が可能になり、高感度のLC/MS分析機器で質量分析が可能になった

Expression Pathology



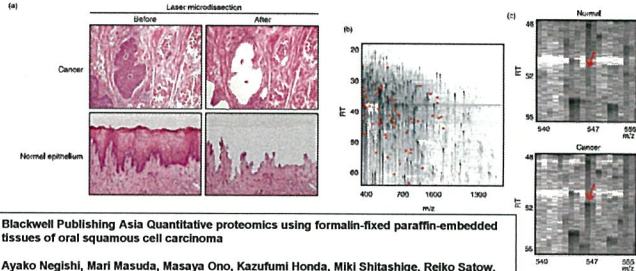

ZAPLOUS

33

Leica MICROSYSTEMS Living up to Life

実験例⑩:ホルマリン固定サンプルからのプロテオーム解析

パラフィン標本からプロテオーム解析でバイオマーカーを探索



Blackwell Publishing Asia Quantitative proteomics using formalin-fixed paraffin-embedded tissues of oral squamous cell carcinoma

Ayako Negishi, Mari Masuda, Masaya Ono, Kazufumi Honda, Miki Shtashige, Reiko Satow, Tomohiro Sakuma, Hideya Kuwabara, Yukihiko Nakanishi, Yae Kanai, Ken Omura, Setsuo Hirohashi and Tesshi Yamada

(Cancer Sci | 2009 Received April 2, 2009/Revised May 12, 2009/Accepted May 13, 2009)80

34

Leica MICROSYSTEMS Living up to Life

Clinical Biomarker Initiative Global Alliance




CLINICAL BIOMARKER INITIATIVE

35

Leica MICROSYSTEMS Living up to Life

豊富なアプリケーションノート

→各研究の成果をフィードバックし、LMDで成果を出すための実質的なサポートを実現



LMD実験は、“個体”、“組織”、“分子”という関連性の薄い分野の実験系を一つにする作業のため、“装置パフォーマンス”と“プロトコルの充実”の両方必要!

36