

120 種類ものタンパク質を空間的に捉える画像解析技術「PathoPlex」を新開発 ～特殊な装置を使わず高精度な空間プロテオミクスを実現～

【研究の概要】

東京慈恵会医科大学 腎臓・高血圧内科学講座の岡林佑典助教は、同講座の横尾隆教授の指導のもと、同大学の学外研究員としてハンブルク・エッペンドルフ大学医療センター 第三内科 (III. Department of Medicine) に在籍し、Victor Puelles 教授に師事しながら、多国籍の国際共同研究チームと連携し、1枚の組織切片上から 120 種類以上のタンパク質を高解像度に可視化し、空間的に統合解析できる世界初の技術「PathoPlex (Pathology-oriented multiplexing)」を開発しました。

PathoPlex は高解像度のマルチプレックスイメージングと、オープンソースソフトウェアによる高度な情報解析を組み合わせた手法であり、1枚の組織切片上から 120 種類以上のタンパク質を可視化・解析することができます。これにより病気のごく初期の変化や薬剤の影響を細胞・分子レベルで空間的に捉えることが可能です。特別な専用装置を必要とせず、市販の抗体と一般的な蛍光顕微鏡で導入できるため、さまざまな研究施設で幅広く利用が期待されます。さらに、これまで保管されてきた病理標本 (FFPE 標本) にも適用でき、過去の検体を使った新たな病態解析や診断研究の展開にもつながる柔軟性の高い手法です。

研究成果は、2025 年 7 月 18 日発行の国際学術誌『Nature』に掲載されました。

【ポイント】

- ・ 従来の免疫染色では、1枚の組織切片から検出できるタンパク質は通常 3～4 種類が限界だったところ、PathoPlex では 120 種類以上のタンパク質を可視化できる
- ・ 新たに開発されたオープンソースソフトウェア「spatiomic」による高度な解析により、タンパク質の配置や発現パターンの変化を高解像度で空間的に捉えることができ、病気のごく初期の変化や薬の効果判定に活用可能
- ・ 専用の高価な装置が必要なく一般的な顕微鏡と市販の抗体で利用が可能のため、多くの研究施設や病院で導入が容易
- ・ 長期保存されていた病理標本 (FFPE) にも対応、過去の検体から新たな病態解析や診断研究が可能に

【主要メンバー】

- ・ 東京慈恵会医科大学 腎臓・高血圧内科学講座 助教 岡林 佑典
- ・ オーフス大学 臨床医学講座 Dr. Malte Kuehl
- ・ ハンブルク・エッペンドルフ大学医療センター 第三内科／オーフス大学 臨床医学講座
Prof. Victor Puelles

【本研究内容についてのお問い合わせ先】

東京慈恵会医科大学 腎臓・高血圧内科学講座 助教 岡林佑典
電話 03-3433-1111 (代)

【報道機関からのお問い合わせ窓口】

学校法人慈恵大学 経営企画部 広報課
電話 03-5400-1280
メール koho@jikei.ac.jp

研究の詳細

1. 背景

近年、空間生物学技術への関心が高まっています。これは、組織の構造をそのまま保った状態で、遺伝子の発現やタンパク質の働きを分子レベルで可視化する技術です。

なかでも「マルチプレックスイメージング」は、1つの組織切片で同時に観察できるタンパク質の数を、従来の限界（3〜4種類）から大幅に拡張する手法として注目されています。

マルチプレックスイメージングに用いられる装置には、性能やコストに応じてさまざまな種類があります。たとえば、質量分析に基づく方法では、金属と結合させた抗体を用いることで高精度かつ再現性の高い解析が可能です。一方、顕微鏡ベースの手法では、DNAと結合させた抗体や蛍光抗体を使用し、複数回にわたって撮影を繰り返すことで、比較的簡便に高精度な解析を行うことができます。これらの手法を用いた研究では、30〜60種類の抗体を同時に使った解析が実現しており、細胞の種類や機能状態を詳細に評価する解析技術が進展してきました。

2018年には、「4i (iterative indirect immunofluorescence imaging)」という、より柔軟性の高いマルチプレックスイメージング手法が登場しました。この方法では、41種類の抗体を用いて、細胞内の複雑な構造変化をピクセル単位で検出することが可能となり、大きな注目を集めました。しかし、この4iを多様な細胞から構成される組織に適用し、十分な情報量と解像度を両立した解析を行った研究は、現時点ではごく限られています。

こうした背景を踏まえ、私たちは4iの考え方を発展させ、「PathoPlex (Pathology-oriented multiplexing)」という新たな画像解析フレームワークを開発しました。PathoPlexは、サブセラー（細胞内）レベルの高解像度マルチプレックスイメージングと、オープンソースのソフトウェアによる高度な情報処理解析を組み合わせた手法であり、ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）標本に対する統合的な解析を可能にします。

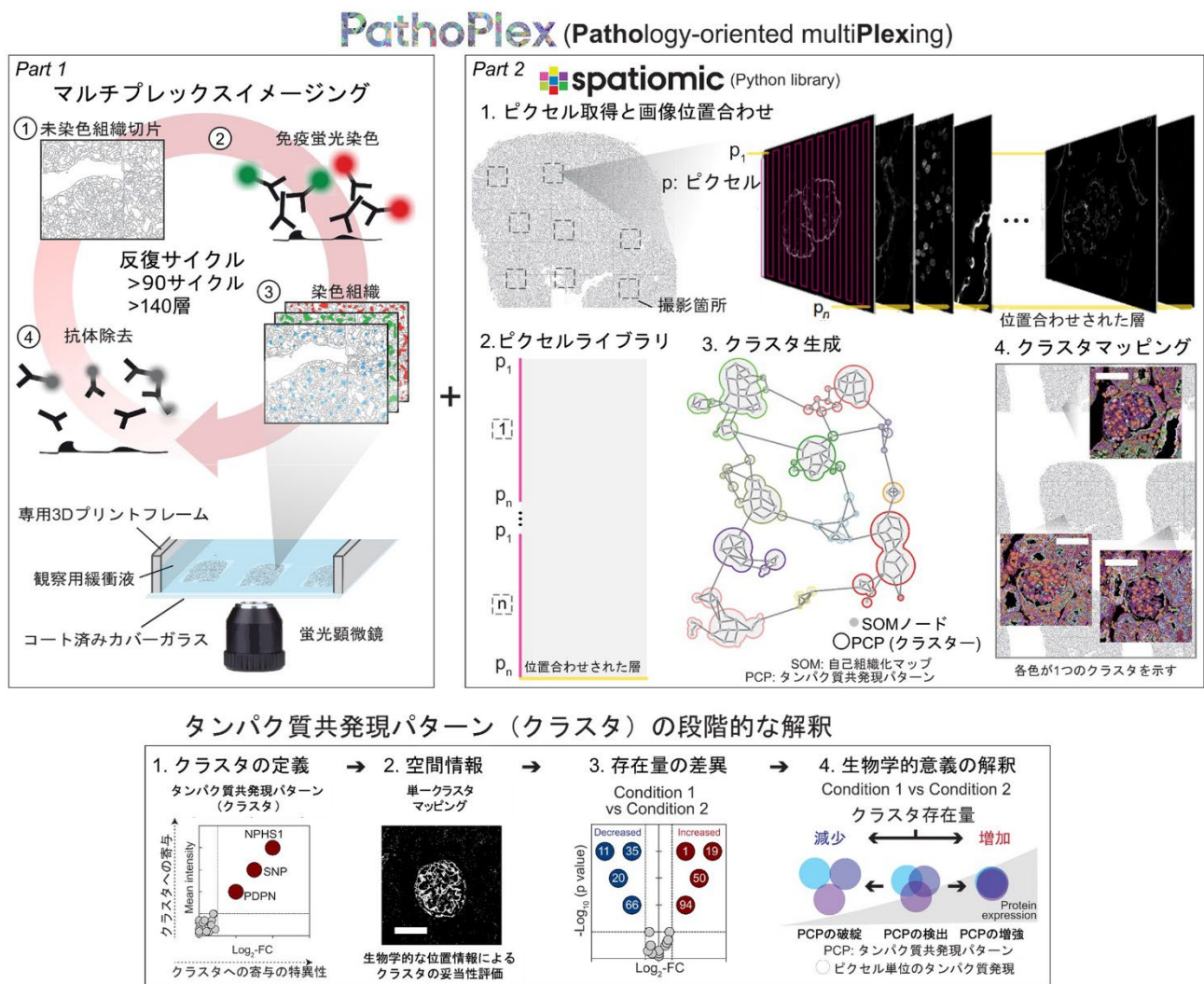
2. 手法と成果

PathoPlexでは、「免疫蛍光標識」「蛍光顕微鏡による撮影」「抗体の除去」の工程を繰り返すことで、1枚の組織切片上に多数のタンパク質を段階的に可視化することが可能です。実際の実験では、150種類のタンパク質に対する一次抗体と品質管理用の抗体を用い、最大95回の撮影サイクル（170層分の画像）を行いました。組織の損傷は極めて軽微であり、技術的な限界にはまだ十分な余地があると考えられます。

このような大規模データを効率的に解析するため、私たちは「spatiomic」という空間プロテオミクス用の高速計算ライブラリを開発しました。spatiomicは、GPUを活用したアルゴリズムに対応しており、汎用的なデータ形式にも適合したPythonパッケージとして無償で提供されています。このライブラリを用いることで、マーカーごとの画像を正確に位置合わせし、ピクセルレベルでのクラスタリング解析を行うことができ、タンパク質の共発現パターン（＝「クラスター」）を空間的に可視化することが可能となります。

得られた各クラスターは、細胞や組織における特定の機能的な状態を反映している可能性があり、それぞれのマーカーの寄与度や発現変化を統計的に解析することで、生物学的な意味づけを行いました（図1）。さらに、各クラスターの量的変化は、タンパク質の発現レベルの違いだけでなく、細胞内での局在の変化（たとえば、細胞質から核への移行）にも関係していることが示唆されました。

図1 (論文内より引用改変)

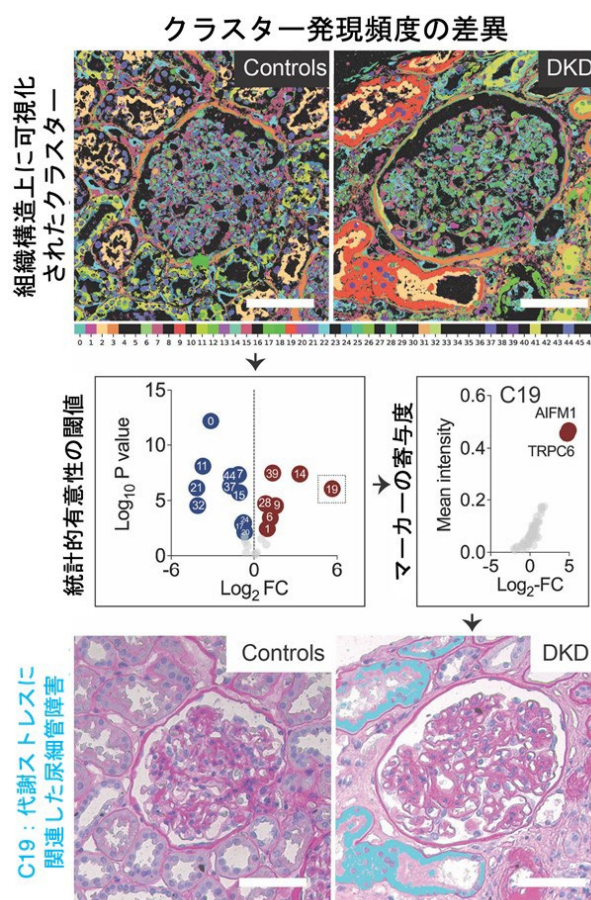


PathoPlex の有用性は、まず3つの異なる臓器を対象とした検証実験 (160nm の解像度、使用マーカー数は30未満) により確認されました。続いて行われた腎臓の詳細な解析により、その有用性がさらに裏付けられました。腎臓の解析には、以下の3種類の検体が用いられました:

- 半月体形成性糸球体腎炎モデルマウス (34 マーカー)
- 進行糖尿病性腎症患者の腎生検検体 (61 マーカー) (図2)
- 病理学的な異常が認められない若年発症2型糖尿病患者の研究用腎生検検体 (122 マーカー)

なお、最後のグループにはSGLT2阻害薬を使用していた症例も含まれており、SGLT2阻害薬の内服群および非内服群を健常コントロール群と比較することで、病態のごく初期段階や薬剤の影響によるタンパク質発現パターンの変化を捉える手法としての有用性も示されました。

図 2 (論文内より引用改変)



3. 今後の応用、展開

PathoPlex には、さまざまな利点があります。

- 専用の高価な商用装置に依存することなく使うことができ、
- 試料の準備や作業の自動化に必要な部品も、3D プリンタで自作できる柔軟な設計になっています。
- また、一般的に多くの研究室にある倒立型の蛍光顕微鏡（広視野から高精度な共焦点顕微鏡まで）で使用可能です。
- FFPE 切片に対応しており、臨床検体をそのまま高解像度で解析可能です。
- 使用できる抗体の数は 120 種類以上に拡張でき、画像の細かさ（解像度）は最大 80 ナノメートル／ピクセルという非常に高い水準に対応。大きな臨床組織の解析も可能です。
- 特別な加工を施した抗体ではなく、市販されている一次抗体・二次抗体が使えるため、汎用性が高く、広範な応用が期待されます。
- データの信頼性を高めるための厳密な品質管理（再染色や二次抗体のみでの検証など）も取り入れられており、
- 40 以上の臨床検体（合計で 4,000 mm² 相当の組織）を一度に処理できるため、データのばらつきも抑えることができます。
- オープンソースの専用解析ツール「spatiomic」を活用することで、大規模な画像データを迅速かつ高精度に空間解析でき、ピクセル単位でのクラスタリングにより、タンパク質の共発現パターンを空間的に可視化することが可能です。

このような特徴により、PathoPlex は多くの病理検体に対しても柔軟に適用でき、各施設の病理部などに長年保管されてきた FFPE 標本を、研究や診断に活用するための新しい選択肢として大きな可能性を示しています。

4. 論文情報

タイトル：Pathology-oriented multiplexing enables integrative disease mapping

著者：Malte Kuehl*‡, Yusuke Okabayashi*‡, Milagros N. Wong*, Lukas Gernhold*, Gabriele Gut*, Nico Kaiser, Maria Schwerk, Stefanie K. Gräfe, Frank Y. Ma, Jovan Tanevski, Philipp S. L. Schäfer, Sam Mezher, Jacobo Sarabia del Castillo, Thiago Goldbeck-Strieder, Olga Zolotareva, Michael Hartung, Fernando M. Delgado Chaves, Lukas Klinkert, Ann-Christin Gnirck, Marc Spehr, David Fleck, Mehdi Joodaki, Victor Parra, Mina Shaigan, Martin Diebold, Marco Prinz, Jennifer Kranz, Johan M. Kux, Fabian Braun, Oliver Kretz, Hui Wu, Florian Grahammer, Sven Heins, Marina Zimmermann, Fabian Haas, Dominik Kyllies, Nicola Wanner, Jan Czogalla, Bernhard Dumoulin, Nikolay Zolotarev, Maja Lindenmeyer, Pall Karlson, Jens R. Nyengaard, Marcial Sebode, Sören Weidemann, Thorsten Wiech, Hermann-Josef Groene, Nicola M. Tomas, Catherine Meyer-Schwesinger, Christoph Kuppe, Rafael Kramann, Alexandre Karras, Patrick Bruneval, Pierre-Louis Tharaux, Diego Pastene, Benito Yard, Jennifer A. Schaub, Phillip J. McCown, Laura Pyle, Ye Ji Choi, Takashi Yokoo, Jan Baumbach, Pablo J. Sáez, Ivan Costa, Jan-Eric Turner, Jeffrey B. Hodgins, Julio Saez-Rodriguez, Tobias B. Huber†, Petter Bjornstad†, Matthias Kretzler†, Olivia Lenoir†, David J. Nikolic-Paterson†, Lucas Pelkmans†, Stefan Bonn†, Victor G. Puelles†‡

アスタリスク (*) は共同第一著者を、ダガー (†) は共同研究指導著者を、ダブルダガー (‡) は責任著者を示しています。

掲載雑誌：Nature

DOI：10.1038/s41586-025-09225-2

5. 用語説明

- マルチプレックスイメージング：複数のタンパク質を、1枚の組織切片で同時に観察できる画像技術です。通常は1～3種類程度のタンパク質しか同時に調べられませんが、この技術では数十種類以上のタンパク質を一度に検出できます。
- 空間プロテオミクス：組織の中で「タンパク質がどこにあり、どう働いているか」を詳しく調べる技術です。単に何があるかを見るだけでなく、それが「どの場所にあるか」まで含めて解析します。
- サブセルラー解像度：細胞の中の細かい構造（核やミトコンドリアなど）を識別できるほどの高い画像の細かさを表します。
- FFPE 標本（ホルマリン固定パラフィン包埋標本）：病院などで採取された組織を、ホルマリンで固定し、パラフィンに包んで長期保存する検体です。がんなどの診断に広く使われており、多くの医療機関に数千～数万件分保存されています。
- 抗体：体内でウイルスや細菌などの異物を認識するタンパク質で、研究では特定のタンパク質を検出・可視化するために使用されます。抗体には「一次抗体（目的のタンパク質に直接結合）」と「二次抗体（一次抗体に結合し、蛍光などで可視化）」があります。
- GPU：もともと画像処理用に開発された高速計算用チップですが、現在では大規模なデータ解析（医療・AIなど）にも使われています。
- クラスタリング解析：大量のデータを、特徴の似たグループ（クラスター）に自動的に分類する解析手法です。
- SGLT2 阻害薬：糖尿病の治療に用いられる薬で、腎臓での糖の再吸収を抑えることで、尿に糖を排出し血糖値を下げます。近年では、腎保護作用や心不全への有用性も注目されています。

以上