

平成 29 年 4 月 26 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2016

課題番号：25713024

研究課題名(和文) 質量顕微鏡を用いた病態検査法の開発

研究課題名(英文) Studies on development of examination of pathological condition using mass spectrometry imaging

研究代表者

財満 信宏 (ZAIMA, Nobuhiro)

近畿大学・農学部・准教授

研究者番号：40455572

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：質量顕微鏡法は組織切片中に存在する物質の分布を可視化することができる質量分析手法を応用した手法である。これまでの病理染色では観察できなかった分子の可視化観察を可能にする手法であり、病態検査への応用が期待されているが、検出感度や特異性が十分ではない、得られたデータの病理学的な裏付けが不足している、などの問題点があった。本研究では、これまでの研究で基礎的な知見を多く有していた血管疾患をモデルにして、これらの問題解決に取り組み、検出感度と特異性の向上させる手法を明らかにしたほか、検出されたデータの病理学的意味の解明などに成功した。

研究成果の概要(英文)：Mass microscopy (mass spectrometry imaging : MSI) is a method to visualize the spatial distribution of molecules in tissue section. This new method will provide important findings for the pathological examination. However, there is some limitations to apply this method to pathological examination. In this study, we establish a new method to enhance the sensitivity and specificity of MSI. In addition, we clarified the pathological meaning of data obtained from MSI analysis of biological samples.

研究分野：脂質生物学

キーワード：質量分析イメージング 病態検査

## 1. 研究開始当初の背景

質量顕微鏡法は、疾患組織切片中に存在する分子の検出を行い、その位置情報を明らかにする手法である。研究を開始した平成 25 年度の時点では、質量顕微鏡法による病態検査の基本的な手法は確立されており、新たな病態検査法としての利用が可能であると考えられるにいたっていた。しかしながら、観察対象が組織に多く含まれる分子に限られる、検出されたピークの同定が困難であるなど特異性、検出感度の点に問題があった。また、本手法を新たな病態検査法としての実用に耐えうるレベルにするためには、実際の疾患解析を行いながら、問題点を洗い出し、それを解決していく必要があった。

## 2. 研究の目的

研究の背景に記述したように、質量顕微鏡法によって、これまでの病態検査では行えなかった分子の位置情報を明らかにすることができるようになるなどの利点をもたらした一方で、特異性、検出感度の点に改善の余地があった。また、実際の病理検体の質量顕微鏡による解析事例が少なく、得られたデータの病理学的な解釈を行うことが困難であった。これまでの研究によって、質量顕微鏡法による血管疾患解析での課題が生じていたため、本研究では、血管疾患をモデル疾患として、病態検査としての質量顕微鏡法の課題を克服することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 感度・特異性の向上を目指した前処理法の検討

ポジティブイオンモードで組織切片を解析した場合、主に、H、Na、K が付加した付加イオンが観察される。付加イオンの不均一化は、感度や特異性の低下につながる。質量顕微鏡法に供する組織切片の前処理を行うことによって、付加イオンを統一できる可能性が考えられた。そのため、ホスファチジルコリンをモデル分子とし、組織切片は肝臓、膵臓、脳を用いて、切片の前処理法の検討を行った。

### (2) 粥状動脈硬化病巣におけるコレステロールエステルの検出

粥状動脈硬化病巣にはコレステロールエステルが蓄積している。一般的な質量顕微鏡法によってコレステロールエステルの検出は可能ではあるが、検出感度の面で問題があり、ホルマリン固定された組織切片のコレステロールエステル検出は極めて困難であった。我々はこれまでの研究により、中性脂肪が特徴的に動脈硬化病巣に蓄積する中性脂

肪蓄積心筋血管症を新規疾患単位として報告しているが、この病態検査のためには中性脂肪とコレステロールエステルを感度よく同時検出する必要があった。そこで粥状動脈硬化切片を用いて、コレステロールエステルを感度よく検出するための測定法を検討した。

### (3) 検出されたピークの病理学的意味の解明

質量顕微鏡法解析によって違いを見出したピークの病理学的な意味を明らかにすることは、今後幅広い疾患の病態検査へと応用する際の基礎的な知見として重要になる。これまでに腹部大動脈瘤血管壁において、中性脂肪とヘム B のピークが異常観察されることを見出していたが、その病理学的な意味が不明であったため、病理学的解析によって、中性脂肪及びヘム B の異常の原因を探索した。

## 4. 研究成果

### (1) 感度・特異性の向上を目指した前処理法の検討

組織解析前に酢酸カリウムで組織切片を洗浄することによって、検出される分子が主に K 付加体に統一されることを見出した。この成果は論文として *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2014 に報告した。

### (2) 粥状動脈硬化病巣におけるコレステロールエステルの検出

飛行時間型質量分析計を用いた検出方法の場合においては、測定条件を最適化することによってコレステロールエステル検出感度がある程度向上することは確認したが、検出されない切片も多く存在した。イオントラップ型質量分析計を用い、多段階質量分析を行うことにより、コレステロールエステルの検出感度が向上した。中性脂肪蓄積心筋血管症の診断及び基礎研究のためには、コレステロールエステルと中性脂肪の同時検出が必須であるが、イオントラップ型質量分析計を用いることにより、これも可能である事を確認した。ホルマリン固定サンプルなど、組織中のコレステロールエステルの検出が比較的困難な試料の解析に対してはイオントラップ型質量分析計を用いることが望ましいと考えられる。

### (3) 検出されたピークの病理学的意味の解明

質量顕微鏡解析によって観察される中性脂肪の異常の原因が血管壁の脂肪細胞の出現にあることを明らかにし、血管壁における脂肪細胞の異常出現は、腹部大動脈瘤破裂に

関与していることを証明した。ヒトの病理組織においては、血管壁の中性脂肪含有量が腹部大動脈瘤の瘤径と相関しており、血管壁の脂肪細胞が腹部大動脈瘤の進展速度もしくは破裂の危険性を予見する指標となる可能性が示された。血管壁の脂肪細胞を非侵襲的に評価するための新たな病態検査法の確立が望まれる。

また、血管壁におけるヘムBの以上に関しては、栄養血管の閉塞を起点とする血管壁循環不全を検出しているものであると明らかにした。さらに、この循環不全は腹部大動脈瘤発症の原因となりうるものであることもわかった。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計10件)

Kugo H, Zaima N, Tanaka H 他 11 名, Adipocyte in vascular wall can induce the rupture of abdominal aortic aneurysm. *Sci. Rep.* 8, 31268, 2016. (査読有) doi: 10.1038/srep31268.

Yoshimura Y, Goto-Inoue N, Moriyama, T, Zaima N, Significant advancement of mass spectrometry imaging for food chemistry. *Food Chem.* 210, 200-211, 2016. (査読有) doi: 10.1016/j.foodchem.2016.04.096.

Kugo, H., Zaima, N., Mouri, Y., Tanaka, H., Yanagimoto, K., Urano, T., Unno, N., Moriyama, T: The preventive effect of fish oil on abdominal aortic aneurysm development. *Biosci. Biotech. Biochem.* 80, 1186-1191, 2016. (査読有) doi: 10.1080/09168451.2016.1146073.

Tanaka, H., Zaima, N., Sasaki, T., Yamamoto, N., Inuzuka, K., Sano, M., Saito, T., Konno, H., Urano, T., Setou, M., Unno N: Characteristic Distribution Pattern of Lysophosphatidylcholine in Fibromuscular Dysplasia-Associated Visceral Artery Aneurysms Compared with Atherosclerotic Visceral Artery Aneurysms. *J. Athero. Thomb.* 23, 673-680, 2016. (査読有) doi: 10.5551/jat.32318.

Tanaka, H., Zaima, N., Sasaki, T., Yamamoto, N., Inuzuka, K., Sano, M., Saito, T., Hayasaka, T., Goto-Inoue, N., Sato, K., Kugo, H., Moriyama, T., Konno, H., Setou, M., Unno, N: Imaging mass spectrometry reveals a unique distribution of triglycerides in abdominal aortic aneurysmal wall. *J.*

*Vasc. Res.* 52,127-135, 2015 (査読有) doi: 10.1159/000439169.

Tanaka, H., Zaima, N., Sasaki, T., Sano, M., Yamamoto, N., Saito, T., Inuzuka, K., Hayasaka, T., Goto-Inoue, N., Sugiura, Y., Sato, K., Kugo, H., Moriyama, T., Konno, H., Setou, M., Unno, N: Hypoperfusion of the adventitial vasa vasorum develops an abdominal aortic aneurysm. *Plos One.* 26, 10, e0134386, 2015 (査読有) doi: 10.1371/journal.pone.0134386.

Zaima, N., Yoshioka, S., Sato, Y., Shinano, S., Ikeda, Y., Moriyama, T: Enhanced specificity for phosphatidylcholine analysis by positive ion mode MALDI-imaging mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 28, 1453-1458, 2014(査読有) doi: 10.1002/rcm.6917.

Zaima, N., Goto-Inoue, N., Moriyama, T: Matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry -New technology for vascular pathology -. *J. Vasc. Res.* 51(2): 144-148, 2014(査読有) doi: 10.1159/000362123.

[学会発表](計8件)

財満 信宏、イメージングマススペクトロメトリーの原理と分析事例、第45回中部化学関係者学協会支部連合秋季大会、2014年11月29日、中部大学(愛知県春日井市)

財満 信宏、イメージングマススペクトロメトリーによるスフィンゴ脂質の可視化、日本農芸化学会2014年度大会シンポジウム、2014年3月30日、明治大学(神奈川県川崎市)

財満 信宏、イメージングマススペクトロメトリー、第12回ホスファチジルセリン研究会、2013年11月8日、東京海洋大学(東京都港区)

財満 信宏、イメージングマススペクトロメトリー - 質量分析で脂質を見る -、日本油化学会第52回年会、2013年9月4日、東北大学(宮城県仙台市)

Zaima, N., Ikeda, Y., Ishibashi-Ueda, H., Setou, M., Hirano, K., Screening for triglyceride deposit cardiovascular pathology in type 2 diabetes mellitus patients, The 2<sup>nd</sup> international symposium on triglyceride deposit cardiomyovascular pathology, 2013年4月19日、大阪大学中之島センター(大阪府大阪市)

[図書](計1件)

Zaima, N., Goto-Inoue, N., Hayasaka,

T.: MALDI MS Imaging of Biological Structures. Encyclopedia of Analytical Chemistry. eds R.A. Meyers, John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. DOI: 10.1002/9780470027318.a9417. Published 15th September 2015.

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

財満 信宏 (ZAIMA, Nobuhiro)

近畿大学・農学部・准教授

研究者番号：40455572

##### (2) 研究分担者 なし

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者 なし

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者 なし

( )