

平成 31 年 4 月 23 日現在

機関番号：34419

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15332

研究課題名（和文）分光イメージング法による脂質分子の選択的可視化

研究課題名（英文）Visualization of lipids by spectral 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） 2,300,000 円

研究成果の概要（和文）：日本人の死因の上位を占める疾患の原因となる動脈硬化症は、動脈壁内にコレステロールが蓄積することを特徴とする。我々は新たなタイプの動脈硬化病巣として、コレステロールエステルではなく、中性脂肪が蓄積するタイプの動脈硬化巣（中性脂肪蓄積心筋血管症）を発見した。中性脂肪蓄積心筋血管症は不明な点の多い病態であり、多くの知見の収集を必要とする段階であるが、現時点では、一般的な病態検査機関で中性脂肪蓄積心筋血管症と通常の動脈硬化病巣を区別するのは極めて困難である。本研究は、両者を区別するための手法の確立のために重要な技術基盤となる脂質の選択的な可視化に取り組み、これが可能な可能性を求めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

中性脂肪蓄積心筋血管症は、4-5万人の患者がいると推測されている病態であるが、不明な点が多く、多くの基礎的な知見を必要とする状況にある。これまでに大規模な病態検査で中性脂肪蓄積心筋血管症を区別する手法が確立されていないことが、病態理解の障壁になっていた。本研究では、一般的な病態検査機関においても中性脂肪蓄積心筋血管症を検出することが可能であることを示した。これは病態理解を進めるための研究の基礎的な基盤となるものである。

研究成果の概要（英文）：Atherosclerosis is a basic predisposition to several major diseases. Deposition of cholesterol ester is one of pathological features of atherosclerosis. We previously found a new atherosclerotic lesion with deposition of triglyceride, not but cholesterol ester. We named the abnormal disease condition as triglyceride deposit cardiomyovasculopathy (TGCV). At present, it is difficult to distinguish between atherosclerosis and TGCV. In this study, we aimed to establish new method to distinguish atherosclerosis and TGCV by using spectral imaging.

研究分野：脂質生物学

キーワード：分子イメージング

1. 研究開始当初の背景

日本人の死因の上位に位置する疾患の原因となる動脈硬化症は、コレステロールエステルの動脈内の蓄積が特徴的な病変であり、コレステロールの管理が動脈硬化の予防と治療に重要であると認識されている。2008年にコレステロールエステルの蓄積を伴わず、中性脂肪が蓄積する特徴的な動脈硬化病巣を発見し、*New England Journal of Medicine*に報告した。この特徴的な動脈硬化病巣は Adipose Triglyceride Lipase (ATGL) の変異によって発症することが明らかになり、大阪大学の平野賢一氏によって、中性脂肪蓄積心筋血管症 (Triglyceride deposit cardiomyovasculopathy, TGCV) と命名された。発見当初、TGCV は先天性な遺伝子異常による極めて特殊な病態であると考えられていたが、その後の解析により、ATGL の変異を有しない患者においても中性脂肪を蓄積する患者群が存在することが明らかになった (特発性 TGCV)。研究開始当初の状況では特発性 TGCV に関する知見はほとんどなく、特発性 TGCV の病態の理解や中性脂肪の蓄積と疾患の進展の関係を明らかにするためには、特発性 TGCV 患者検体を広く収集することが重要であった。しかしながら、特発性 TGCV の肉眼的な所見は一般的な粥状動脈硬化病巣に似ており、病理検査によって区別することができない。中性脂肪の蓄積を特徴とするため、中性脂肪を特異的に検出することによって特発性 TGCV のピックアップが可能になるが、コレステロールエステルと中性脂肪を区別して検出することが可能な質量分析イメージングは、特殊な装置や経験を要する手法であり、一般的な検査機関での実施は現実的ではなかった。

2. 研究の目的

質量分析イメージングによる解析によって、疾患組織における脂質分子の特徴的な分布変動がしばしば観察される。脂質分子の特徴的な分布の変動は、組織代謝の変動や組織を構成する細胞の種類もしくは機能変化などを反映するものであると考えられる。脂質分子の可視化は、脂質生物学の観点から生命活動もしくは疾患を理解するために重要な要素であり、特発性 TGCV における中性脂肪の蓄積も、病態の進展と関連があると考えられるが、詳細は不明である。これを理解するためには、多くの検体を集積して病理学的な知見を得ることが必要であるが、一般的な病理検査では、粥状動脈硬化と特発性 TGCV を見分けることができない。脂質分子の選択的な可視化が可能な質量分析イメージングを用いることで、両者を見分けることは可能であるが、質量分析イメージングは特殊な装置や技術、経験を必要とするものであり、一般的な検査機関でも使用できるような汎用的な手法ではなく、多くの検体を集めるための技術という観点で問題がある。

そこで、本研究で着目したのが分光イメージングである。分光イメージングであれば、比較的簡易な方法で、切片上に存在するコレステロールエステルと中性脂肪を区別して可視化することができる可能性がある。本研究では、特発性 TGCV をモデル疾患として、分光イメージング法を用いてコレステロールエステルと中性脂肪を選択的に可視化することのできる手法を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

分子には特有の重さがあるため、これを測定することによって、分子を特異的に検出することが可能となる。組織上でイオン化した分子の質量を測定し、検出されたイオンの強度に応じて色付けすることによって、興味ある分子の切片上での分布を可視化する手法が質量分析イメージングの手法であるが、この手法は大型装置や特殊な技術、経験を必要とするものであり、簡易な操作でハイスループットな測定を必要とされる一般的な検査機関に導入することは現実的ではない。

本研究で用いた分光イメージング法とは、写真撮影時に、数 nm 間隔で分光されたスペクトルの情報を 1 ピクセルごとに取得し、それぞれのスペクトルを区別して画像化することができる手法である。切片上に異なる分子がある場合、分子が吸収・反射する光の特性が異なるため、それぞれから得られる波長パターンを測定し、画像化することにより、異なる構造の分子を選択的に可視化することが可能になる。本研究では、質量分析イメージング法で得られたデータと分光イメージング法で得られたデータの統合的解析により、コレステロールエステルと中性脂肪を選択的に可視化するための基礎知見を得た。

4. 研究成果

一般的な粥状動脈硬化病巣で観察されるのはコレステロールエステルの蓄積であり、中性脂肪が顕著に蓄積した病巣は一般的ではない。分光イメージング測定の検討サンプルとしては、同じ病理組織内に中性脂肪とコレステロールが存在するサンプルが望ましいと考えられた。そ

こでまず、粥状動脈硬化患者の凍結組織切片を質量分析イメージングによって解析し、組織に中性脂肪とコレステロールの両方が観察される検体をスクリーニングした。その後、モデルとして適していると考えられる組織切片を分光イメージング法によってデータ取得し、コレステロールと中性脂肪の区別が可能な条件の検討を行った（下図）。

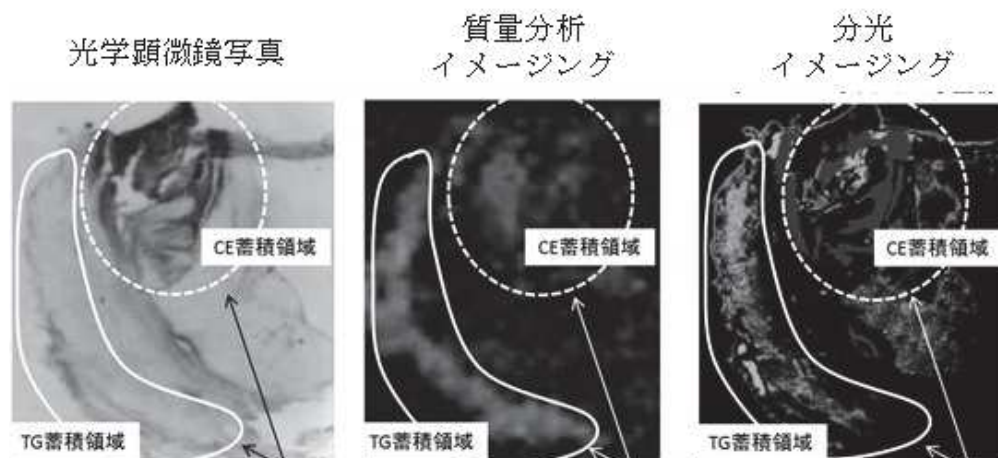


図 光学顕微鏡写真（左）、質量分析イメージング像（中）、分光イメージング像の比較（右）
ヒト冠動脈の粥状動脈病巣の写真。破線の白丸で囲った部分が、質量分析イメージングによって、コレステロールエステルが蓄積していることを確認した領域であり、実線の白丸で囲った領域が中性脂肪が蓄積していることを確認した領域である。

質量分析イメージングの結果、比較的病態の進んだ切片では、コレステロールエステルがアテローム巣で検出される一方で、中性脂肪はその周辺、特に血管平滑筋に一致して観察される切片が多かった。初期病変の冠動脈では、コレステロールエステルと中性脂肪の分布の違いが不明瞭であり、共局在しているようにも見える切片が多かった。分光イメージングの検討には、コレステロールエステルと中性脂肪の局在が明瞭に異なる切片のほうが適しているため、本研究では、病態が進展したものをを用いた。

上の図に示すように、分光イメージングの複数のスペクトルパターンの選択により、質量分析イメージング像と一致する画像が作成されることが示された。このことから、夾雑物の非常に多い生体組織切片において、コレステロールエステルと中性脂肪の選択的な可視化は可能である可能性が示された。特発性 TGCV は、大阪大学の平野賢一氏らによって、わが国で発見された疾患であり、現在は治療法の開発なども進められている。本研究で得られた知見は、特発性 TGCV の大規模な探索を可能にするための基礎的な技術基盤を提供しうるものであり、不明な点の多い、特発性 TGCV の進展や発症機構を明らかにすることに貢献できると考えられる。

しかしながら、大規模な病態検査を可能とするためには、病態の進展度、前処理の状況など様々に異なる状態の切片を等しく可能にしないといけない。特にこの研究においては、質量分析イメージングデータとの統合的な解釈を必要としたため、新鮮凍結切片のみを解析対象とし、固定されたサンプルの解析には取り組んでいない。実際の病理解析を行う現場においては、免疫組織化学染色などを行うために、ホルマリン固定処理などを施されていることが多い。ホルマリンが存在することによって、測定されるスペクトルのパターンが変わる可能性が考えられるため、固定された組織においても、中性脂肪とコレステロールエステルの選択的な可視化を行えることを実証したい。

実用化に必要な基礎的なデータを取得するためには、多くの異なる条件でデータを取得することが重要であるが、個体差の大きなヒト病理組織ではこれが困難である。中性脂肪とコレステロールを同時に蓄積する粥状動脈硬化モデル（特発性 TGCV）モデル動物の作出は、これを解決するものであるが、本研究期間内ではこのモデル動物を作出することができなかった。これらに関しては、今後の研究の課題としたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 0 件）

なし

〔学会発表〕（計 6 件）

prevention

Kyoto Biomolecular Mass Spectrometry Society 2019 年

2 財満信宏、森山達哉：代謝物分布の可視化を可能にする質量分析イメージング法の原理と応用 ―食品・動物・ヒト組織解析を例として―
バイオチップコンソーシアム 第 113 回定例会 2018 年

3 財満信宏：質量分析イメージングによって発見した、動脈硬化・腹部大動脈瘤における新規病態とそれらを標的とした予防・治療の可能性
第 43 回日本医用マススペクトル学会年会 2018 年

4 財満信宏：中性脂肪代謝を中心に見た動脈硬化と腹部大動脈瘤
第 50 回日本動脈硬化学会 2018 年

5 財満信宏：MALDI-MSI による代謝物イメージングによって発見した動脈硬化・腹部大動脈瘤における新規病態と予防法の検討
第 8 回機能性油脂懇話会（招待講演）2017 年

6 財満信宏：動脈硬化・腹部大動脈瘤における新規病態の発見と機能性成分による予防の可能性
2017 年度健康食品管理士近畿支部 第 1 回講演会（招待講演）2017 年

〔図書〕（計 0 件）

なし

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

なし

○取得状況（計 0 件）

なし

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者 なし

(2) 研究協力者 なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。