

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 27 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590522

研究課題名（和文）質量顕微鏡を用いた新規疾患解析手法の実用性の検討

研究課題名（英文）Enhancement of utility of imaging mass spectrometry in pathophysiological examination.

研究代表者

財満 信宏（ZAIMA NOBUHIRO）

近畿大学・農学部・講師

研究者番号：40455572

研究成果の概要（和文）：

本研究は新たな疾患組織検査手法として、質量顕微鏡法の実用性を向上させることを目的とするものである。質量顕微鏡法は組織切片を二次元に質量分析することによって、組織切片に存在する生体分子の局在を可視化する手法である。疾患検査法として質量顕微鏡法の実用性を判断するためには、多くの疾患に適用が可能であることを示すことが重要である。本研究期間に ATGL 変異症、粥状動脈硬化病巣、腹部大動脈瘤（AAA）の解析法を検討し、疾患発症時の代謝変動などを可視化した。

研究成果の概要（英文）：

The aim of this study is to enhance utility of imaging mass spectrometry (IMS) as new pathophysiological examination. IMS is a two-dimensional MS technique used to visualize the spatial distribution of biomolecules without extraction, purification, separation, or labeling of biological samples. It is important to estimate general versatility of IMS. In this study, we try to visualize the metabolic variation of diseases, including ATGL mutant disease, atherosclerosis, and abdominal aortic aneurysm. We succeed to find some characteristic changes in disease tissues by using IMS.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：病態検査学

科研費の分科・細目：境界医学、病態検査学

キーワード：質量顕微鏡法、イメージング、イメージングマススペクトロメトリー、ATGL 変異症、動脈硬化、疾患検査、質量分析

## 1. 研究開始当初の背景

疾患のメタボローム解析には、ガスクロマトグラフィー（GC）や液体クロマトグラフィー（LC）などが用いられる。これらの手法は、臨床検査や基礎研究の場で広く用いられ、疾

患検査法には不可欠の手法となっている。しかしながら、これらの手法のみでは治療法につながる決定的な知見を発見できない疾患が存在することも事実である。申請者は新たなメタボローム解析手法を病態検査に導入

することがこの問題の解決につながると考え、疾患組織解析への質量顕微鏡の適用を開始した。

質量顕微鏡法は組織切片を二次元に質量分析することによって、切片中に存在する生体分子を可視化することが可能な手法である。タンパク質、糖、脂質を始めとした生体分子を可視化することが可能なツールとして現在非常に注目を集めている手法である。しかしながら、研究開発当初は、質量顕微鏡法による生体材料の解析法は完全には確立しておらず、切片を解析する手法検討の段階から研究を行う必要があった。申請者は平成20年度から病態検査への応用にむけた質量顕微鏡法の手法の検討を進めていたものの（若手研究(B)）、病態検査への応用を目的とした研究は少なく、新たな病態検査法として有効であることを示すために、手法の改善に加えて質量顕微鏡法の有効性・汎用性を実証することが重要な段階であった。

本研究は、以上のような研究開発当初の状況をもとに開始したものである。

## 2. 研究の目的

研究期間内に質量顕微鏡法による新規の疾患組織検査法の有効性を明らかにすることを目的とした。

目的達成のためには本研究が以下の2条件を満たすことが必須であると設定した。

① 本手法が、疾患の結果ではなく、原因を感知できる手法であることを示す

疾患においては、二次的、三次的に引き起こされる代謝異常が存在するが、疾患発症の分子メカニズムに迫るためには、より上流の代謝異常を発見することが必須である。下流の代謝異常と比較すると、上流の代謝異常は量的変動が少ない傾向にあるため、研究期間内に検出感度を向上させる必要がある。

② 幅広く使用できる手法であること

疾患検査法として応用するためには、多くの疾患に適用が可能であることを示すことが重要である。本研究で解析を予定した疾患は、ATGL変異症、粥状動脈硬化、腹部大動脈瘤などである。これらの疾患解析中に発生した分析上の問題をその都度解決することにより、汎用性の向上を目指した。

## 3. 研究の方法

質量顕微鏡法は、試料表面上でマトリックス支援レーザー脱離イオン化法(MALDI)-質量分析法(MS)を二次元に展開する手法である。MALDIは試料をマトリックスと混合して共結晶化させた後、レーザー光を照射することにより試料中の分子をイオン化させる方法であり、MALDIによる質量分析法の流れを図1に示す。

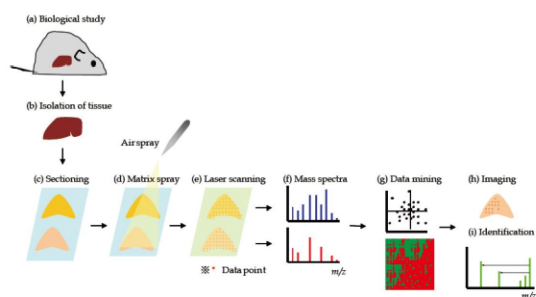


図1 質量顕微鏡法の流れ

最初に、ヒト及び動物から目的の臓器を摘出後、薄切片を作成する。その後、組織切片にマトリックスを噴霧して、試料切片上にマトリックスの微細結晶を均一に作る。この試料切片に微小径のレーザーを照射することにより、レーザーが照射された場所に存在する分子をイオン化することができる。このイオンを検出することにより、レーザー照射した点のマスペクトルを取得する。その後、切片中の解析対象領域でレーザーを二次元に順次照射することによって、一切片あたり数百~数万測定点分のマスペクトルを取得する。目的領域の測定を終了した後、専用のイメージングソフトウェアを使用することにより、任意のピークの組織切片における分布を、測定点ごとのシグナル強度に応じたイメージとして画像化する。未同定のピークは、切片上での多段階質量分析により同定する。生物学的に意味のあるデータの取得のためには、各工程を実験目的に合わせて最適化することが重要である。本研究においては、解析する疾患の種類、臓器の違いに応じて研究手法を最適化した。

## 4. 研究成果

研究の主な成果

### (1) ATGL変異症の解析

Adipose triglyceride lipase (ATGL)は中性脂肪を加水分解する酵素である。現在までにATGLの変異により、脂質蓄積型ミオパチー、中性脂肪蓄積心筋血管症などが引き起こされることが報告されている。組織レベルでは、中性脂肪の分解は制限されることにより、組織内に中性脂肪が異常蓄積する。中性脂肪の代謝異常以外の代謝変動については不明である。本研究において、質量顕微鏡法を用いて患者筋肉組織の解析を試み、患者群で有意に変動するピークを見出した。組織上でのMS/MS解析の結果、検出強度が増加するピークはホスファチジルコリンであることを同定した(図2)。その他、患者筋肉組織において検出強度が減少傾向にあるピークがヘムbであることを見出した。

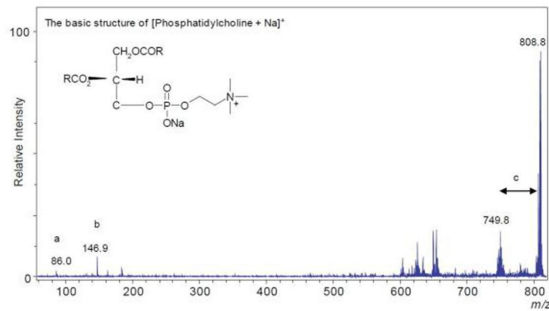


図2 組織上でのMS/MSスペクトル

現時点で ATGL 変異症に対する有効な治療法は存在しない。中性脂肪の代謝を調節することが最も有効な手段であることが推測されるが、本研究で見出したホスファチジルコリン増加、及びへム b 減少の病理学的意味を明らかにすることにより、ATGL 変異症治療における新たな標的が見出される可能性がある。

## (2) 粥状動脈硬化病巣の解析

動脈硬化症とは、動脈が肥厚し硬化した症状を呈する疾患である。粥状動脈硬化症は、動脈硬化症の中でも、コレステロールなどの沈着による粥状病巣を呈する動脈硬化症であり、アテローム性動脈硬化症とも呼ばれる。粥状動脈硬化症の進展は、脳梗塞、心筋梗塞の原因となるため、その発症と予防のための研究が非常に盛んに行われている。

動脈硬化の進展には、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、免疫細胞など多くの細胞が関与しており、それぞれの細胞の病理学的な役割が明らかにされている。しかしながら、これまでは解析法が存在しないため、動脈硬化の進展に伴う細胞内代謝変動を可視化した例は存在しなかった。代謝変動を可視化解析することにより、新たな治療法が確立できる可能性が期待される。

病理組織の代謝変動を可視化するにあたり、本研究では、膨大なデータの中から病理学的に意味があるピークを抽出するデータマイニングの手法を検討した。粥状動脈硬化モデル血管には 60 週齢のアポ E ノックアウトマウス冠動脈起始部を用いた。コントロールは粥状動脈硬化発症前の 12 週齢のアポ E ノックアウトマウス冠動脈起始部を用いた。両者を質量顕微鏡法によって解析し、アテローム巣、血管平滑筋層、石灰化領域から得られたデータを主成分分析した結果、ピークの分布はそれぞれの領域を反映する 3 パターンに分かれた。この結果を参考に、それぞれの領域に特徴的なピークを画像化した結果、粥状動脈硬化病巣モデル血管のアテローム巣では、 $m/z$  671.6、 $m/z$  673.6 が増加していた。血管平滑筋層においては  $m/z$  804.5、 $m/z$  832.5 が増加しており、石灰化領域では  $m/z$

566.9 が特徴的に検出されることを見出した。これにより、データマイニングの手法として主成分分析が有効であることが示された。しかしながら、主成分分析は解析するサンプルによってデータのばらつきも大きく、偽陽性を検出する確率も高く、効率的なデータマイニング手法とは言い難い。より効率的な手法を今後も検討していく必要があると考えられる。

$m/z$  671.6 がリノール酸結合コレステロールエステル、 $m/z$  673.6 がオレイン酸結合型コレステロールエステルと  $m/z$  値が一致し、アテローム巣にコレステロールエステルが蓄積することは過去に報告されているため、これらのピークがそれぞれコレステロールエステルの分子種であると同定した。

$m/z$  804.5、 $m/z$  832.5 については、組織上の MS/MS 解析により、 $m/z$  804.5 がバルミチン酸/アラキドン酸結合ホスファチジルコリン、 $m/z$  832.5 がステアリン酸/アラキドン酸結合ホスファチジルコリンであると同定した。アラキドン酸は炎症性リピッドメディエーターの前駆体であり、動脈硬化病巣の血管平滑筋にアラキドン酸結合ホスファチジルコリンが蓄積している可能性が示されたことは興味深い。粥状動脈硬化においては炎症反応が亢進していることが報告されており、血管平滑筋に存在するアラキドン酸結合ホスファチジルコリンが炎症の持続・亢進に何らかの役割を果たしている可能性が推測される。これらのピークはヒト閉塞性動脈硬化病巣においても観察された。しかしながら、本研究における組織上 MS/MS による同定は、血管平滑筋の代表的な測定点を抽出して解析した結果であり、アラキドン酸結合ホスファチジルコリン以外の分子を検出している可能性は否定できない。今後は、MS/MS イメージングによる解析を行うことが重要である。

石灰化領域で検出された  $m/z$  566.9 は未同定である。

## (3) 腹部大動脈瘤の解析

腹部大動脈瘤 (AAA) は腹部大動脈の進行的な拡張を主病変とする疾患である。疫学的には男性であること、喫煙などが AAA 発症のリスクファクターとして報告されている。また、AAA 血管壁では炎症反応が亢進していることも知られている。しかしながら、AAA における血管拡張の機構は完全には解明されていない。本研究では、質量顕微鏡法によって、AAA 血管壁の生体分子を可視化し、新たな病態を明らかにすることを試みた。

質量顕微鏡法によって AAA 患者血管壁を解析した結果、血管拡張部位でへム B の検出強度が有意に低下することを見出した。へム B の低下は血管壁における血液循環不全を示

唆するものであったため、血管壁に血液を供給する役割を担っている栄養血管を病理解析したところ、拡張部位外膜に存在する栄養血管は閉塞していることを見出した。閉塞した栄養血管を質量顕微鏡法によって解析した結果、コレステロールエステルは観察されず、栄養血管の閉塞はアテローム巣の形成ではないことが示された。病理解析により、栄養血管の閉塞は、血管平滑筋の増加による内膜肥厚であることがわかった。以上の解析の結果から、AAA 患者の血管壁では、血管平滑筋が原因で引き起こされる栄養血管の閉塞が生じており、それにより、AAA 血管壁に血液循環不全が生じている可能性が示された。AAA 血管壁の血液循環不全はこれまでに報告されていない病態であり、血管拡張との関係を明らかにする必要がある（研究代表者らの別プロジェクトによって研究中（すでに終了したプロジェクト含む））。

#### （4）病態検査法としての手法の改善

今後、病態検査手法として応用するために、データの再現性や検出感度を向上させることが重要であり、本研究ではこれらの改善にも取り組んだ。

測定の際の組織切片の状態は、生体分子の検出に影響を及ぼすため、測定前の試料調製状態の統一はデータの再現性を向上させるための重要な要素となる。本研究課題で検討した結果、特に、マトリックスの塗付が検出強度に大きく影響することが分かった。現在、マトリックスの塗付は市販のエアスプレーを用いて手作業で行っているため、実験者の習熟度によって再現性が左右される傾向にある。病態検査手法として幅広く普及させるためには、マトリックスの塗付に再現性を持たせることが重要な課題となる。また、研究代表者の他のプロジェクトにおいて、切片厚を最適化することによって、生体分子の検出感度が向上することを見出した。病態検査においても切片厚の最適化による、検出感度の向上は期待されるため、今後の検討課題とする。

#### 今後の展望

本研究により、疾患における未報告の代謝変動を見出し、質量顕微鏡法が新たな病態検査として有効であることを示した。今後は、見出された代謝変動の病理学的な意味を明らかにすることにより、発症機構の解明や、予防・治療法の確立などにつなげたい。

現時点で質量顕微鏡法は新たな病態検査法として利用できると考えられる。さらに洗練された本研究期間内に見出した克服すべき課題としては、「半定量解析法の確立」、「高感度化」、「免疫染色などの既存の病理検査との融合」、「細胞レベルでのイメージング」、

「手法の簡便化」などがある。これらの課題は今後の研究で解決を目指す。

#### 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3件）

1 Tanaka, H\*, Zaima, N\*, Sasaki, T., Hayasaka, T., Goto-Inoue, N., Onoue, K., Ikegami, K., Morita, Y., Yamamoto, N., Mano, Y., Sano, M., Saito, T., Sato, K., Konno, H., Setou, M.

\*equal contribution

Adventitiavasa vasorum arteriosclerosis in abdominal aortic aneurysm. *Plos One*, 査読有, 8, 2013, e57398. doi:10.1371/journal.pone.0057398

2 Zaima, N., Sasaki, T., Tanaka, H., Cheng, W. X., Onoue, K., Hayasaka, T., Goto-Inoue, N., Enomoto, H., Unno, N., Kuzuya, M., Setou, M. Imaging mass spectrometry-based histopathologic examination of atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis*, 査読有, 217, 2011, 427-432. <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2011.03.044>

3 Zaima, N., Hayasaka, T., Goto-Inoue, N., Setou, M. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Imaging Mass Spectrometry. *International Journal of molecular sciences*, 査読有, 11, 2010, 5040-5055. doi:10.3390/ijms11125040

〔学会発表〕（計2件）

1 財満 信宏、IMSによる組織内代謝変動の可視化—食品成分動態解析と病理解析への応用—、日本農芸化学会、2013年3月27日、東北大学（仙台）

2 財満 信宏、メタボローム可視化の生命科学への応用、生命医薬情報学連合大会、2012年10月16日、タワーホール船堀（東京）

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

財満 信宏 (ZAIMA NOBUHIRO)

近畿大学・農学部・講師

研究者番号：40455572

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし