

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15098

研究課題名(和文) 組織標本上の化学物質局在を可視化する新規病態解析法の確立

研究課題名(英文) Establishment of new analytical method for visualizing chemical agents and xenobiotics on pathology specimens

研究代表者

常山 幸一 (TSUNEYAMA, Koichi)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学系)・教授

研究者番号：10293341

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：化学物質の曝露が生体にどのような影響を与えるかは未だ完全にはわかっていない。自己免疫性胆管障害である原発性胆汁性胆管炎(PBC)の発症に、化粧品や食品添加物として用いられる2オクタノ酸(2OA)が関与している可能性が示されている。本研究では、2OAを皮膚に投与したマウスの肝臓の炎症部位に2OAが存在するのかどうかを、ナノ粒子をイオン化補助に用いる新しいイメージング質量分析法を用いて検討した。2OAは短期塗布群では6時間で肝臓に到達し、長期塗布群では炎症部に合致して胆管周囲に蓄積し、胆汁中に排泄されていた。化学物質は皮膚を介して全身諸臓器に到達し、持続する炎症の起点になる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：It is not well known how chemical agents and xenobiotics cause vital reaction. Recent several reports suggested that primary biliary cholangitis (PBC), which is characterized by immune mediated bile duct injury and autoantibody against mitochondria was induced by exposure to xenobiotics such as 2-octynoic acid(2-OA). In present study, we performed nano-particle assisted imaging mass spectrometry analysis using 2-OA skin painting mice model. 2-OA reached to the liver from the skin just after 6 hours. In long 2-OA painting analysis, portal inflammation was occurred in the liver and 2-OA was deposited around the bile duct. Because 2-OA was detected in the bile, 2-OA may be metabolized in the hepatocytes and secreted to the bile. Like 2-OA, other chemical agents may reach to various organs from the skin and may cause inflammation.

研究分野：病理学

キーワード：自己免疫疾患 化学物質 イメージング 質量分析 ナノ粒子 原発性胆汁性胆管炎

1. 研究開始当初の背景

我々は自己免疫疾患の発症要因の1つとして、化学物質への長期暴露に注目している。これまで、原発性胆汁性胆管炎 (PBC) に出現する自己抗体 (抗ミトコンドリア抗体) が、食品添加物に含まれる数種類の化学物質と反応する事を見出し、その1つである2オクチン酸 (2OA) の投与により、マウスに抗ミトコンドリア抗体の出現と特異的な胆管障害像といったヒトPBCに類似する病態が発症する事を報告した (Hepatology. 2008, 48(2):531-40.)。このモデルの胆管障害機序として、2OAの胆管への蓄積とそれを標的とする細胞性免疫の関与が推測されるが、低分子物質である2OAは免疫染色での局在解析が困難であり、全く異なる検出系が必要であった。今後、低分子化学物質の曝露と疾患との関連性を探索する必要性はさらに高まると予想され、モデル動物や患者組織中に蓄積した化学物質の局在を個細胞レベルで可視化し、周囲微小環境と併せて解析する新たな評価系の開発は世界的に重要な課題であると考えられた。

2. 研究の目的

18世紀の煙突掃除人の陰嚢癌の報告に始まり、アスベストによる中皮腫や印刷会社従業員の胆管癌の高率の発症、或いは薬剤の有害事象、など、化学物質や薬物の危険性に関する情報は巷間に溢れており国民周知の事実となっている。その一方で、私たちは「毒物」「薬」といった扱いをされていない、多くの化学物質に日々囲まれて生活している。個々の物質は厳密な安全性試験をクリアしているが、それらが体内で長期的に蓄積され種々の代謝を受けた場合、どのような危険性が出現するのか、については十分に分かっていないのが現状である。最近、2次元組織上で質量分析を行い、物質の局在をイメージングする新技術(イメージング質量分析)が開発さ

れた。しかしながら、マトリックスでイオン化を支援する従来の方法ではマトリックス自体の質量にマスクされ、低分子化合物の同定は困難であった。本研究ではマトリックスの代わりにナノ粒子をイオン化支援剤に使う、Nano-PALDI法に注目し、同法を用いて組織標本上の化学物質の局在を解析する新しい *in vivo* 解析法を確立し、化学物質を取り巻く周囲微小環境との相関解析を可能とする新たな評価系の確立を試みた。

3. 研究の方法

(1) 目標とする化合物に最適なナノ粒子の選択: 連携研究者: 横浜国立大・一柳、福井県立大・平の独自技術を応用して、2OAのイオン化に最適な支援材を選択した。コア成分として、Cr, Mn, Fe, Coの酸化物を用いた種々のナノ粒子を作製し、2OAの**イオン化に最適なナノ粒子を選定**した。

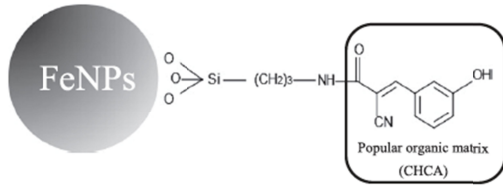
(2) 組織中の低分子化合物を Nano-PALDI イメージング質量分析で検出するための条件検討: 低分子化学物質の標品を凍結マウス肝薄切標本に滴下し、(1)で選択したナノ粒子を噴霧してコーティングし、Nano-PALDI イメージング質量分析による描出を行った。

(3) 2OAの生体肝臓中での極在解析(短期塗布、モデル): 2OAを皮膚に塗し、0.5時間、1時間、3時間、6時間、24時間で sacrifice して肝臓を直ちに摘出し、(1)(2)で確立した条件で Nano-PALDI イメージング質量分析を行った

(4) 2OAの生体肝臓中での極在解析(長期塗布、モデル): 2OAを皮膚に塗し、6ヶ月齢で sacrifice して肝臓を直ちに摘出し、(1)(2)で確立した条件で Nano-PALDI イメージング質量分析を行った。さらに、胆汁中の2OAの検出も試みた。

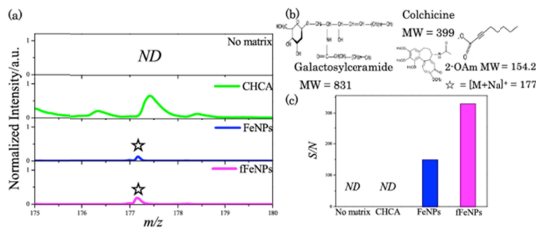
4. 研究成果

(1) Feをコアとするナノ粒子 ($\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanoparticles (FeNPs)) に種々の修飾を施し、functional FeNPsを作成した。



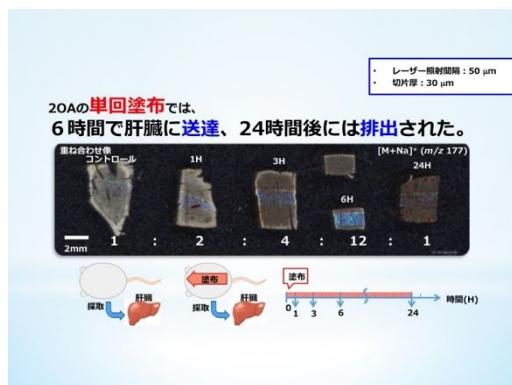
Scheme 1. Modification process of FeNP.

この functional feNPs を用いる事で、20A のイオン化効率が格段に上昇した。



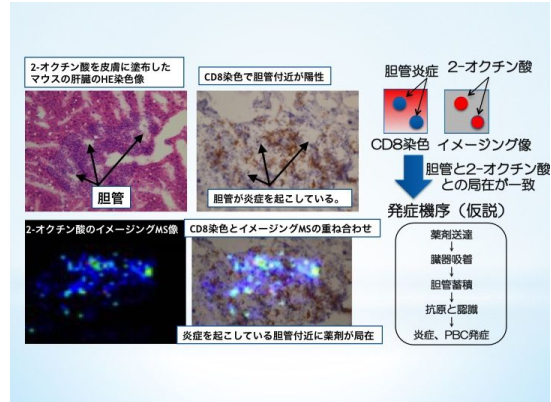
(2) マウス凍結肝に 20A を滴下し、functional feNPs を用いて Nano-PALDI イメージング質量分析を行った。20A 滴下群では陽性シグナルが描出されたが、非滴下肝臓ではシグナルが検出されなかった。

(3) 20A を皮膚に塗布すると、6時間で肝臓に到達し、24時間後には排出された。



(4) 20A を皮膚に長期間塗布すると、肝臓に炎症が惹起され、同部に CD8 陽性の細胞障害性 T 細胞の浸潤が認められた。20A が蓄積していた。同部位を Nano-PALDI イメージング質量分析で解析すると、炎症部位に一致し

て 20A の局在認められた。



胆汁中にも 20A が検出されたことから、皮膚から吸収された 20A が肝臓に至り、幹細胞で代謝され、胆汁中に排出されていると推測された。化学物質は皮膚を介して全身諸臓器に到達し、持続する炎症の起点になる可能性が示唆された。

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 20 件)

1) Shirai Y, Oda S, Makino S, Tsuneyama K, Yokoi T. Establishment of a mouse model of enalapril-induced liver injury and investigation of the pathogenesis. Lab Invest. 2017 in press 査読有

2) Ikutani M, Tsuneyama K, et al. (10 人中 2 番目) Prolonged activation of IL-5-producing ILC2 causes pulmonary arterial hypertrophy. JCI Insight. 2017 Apr 6;2(7):e90721. 査読有

3) Tsuneyama K, et al. (5 人中 1 番目) Primary Biliary Cholangitis: Its Pathological Characteristics and Immunopathological Mechanisms. J Med Invest. 2017;64(1.2):7-13. 査読有

- 4) Watanabe S, Takahashi T, Ogawa H, Uehara H, Tsunematsu T, Baba H, Morimoto Y, TsuneYama K. Daily Coffee Intake Inhibits Pancreatic Beta Cell Damage and Nonalcoholic Steatohepatitis in a Mouse Model of Spontaneous Metabolic Syndrome, Tsumura-Suzuki Obese Diabetic Mice. *Metab Syndr Relat Disord*. 2017 May;15(4):170-177. 査読有
- 5) Chang C, Lleo A, Kananurak A, Grizzi F, TsuneYama K, et al. (8人中5番目) Human -Defensin 2 in Primary Sclerosing Cholangitis. *Clin Transl Gastroenterol*. 2017 Mar 16;8(3):e80. 査読有
- 6) Ma HD, Ma WT, Liu QZ, Zhao ZB, Liu MZ, TsuneYama K, et al. (12人中6番目) Chemokine receptor CXCR3 deficiency exacerbates murine autoimmune cholangitis by promoting pathogenic CD8(+) T cell activation. *J Autoimmun*. 2017 Mar;78:19-28. 査読有
- 7) Ichimura M, Masuzumi M, Kawase M, Sakaki M, Tamaru S, Nagata Y, Tanaka K, Suruga K, TsuneYama K, Matsuda S, Omagari K. A diet-induced Sprague-Dawley rat model of nonalcoholic steatohepatitis-related cirrhosis. *J Nutr Biochem*. 2017 Feb;40:62-69. 査読有
- 8) Oda S, Shirai Y, Akai S, Nakajima A, TsuneYama K, Yokoi T. Toxicological role of an acyl glucuronide metabolite in diclofenac-induced acute liver injury in mice. *J Appl Toxicol*. 2017 May;37(5):545-553. 査読有
- 9) Taira S, Yamaguchi N, Tatsuta Y, Katano H, TsuneYama K, Kikuchi K. Liver disease of xenobiotics due to percutaneous absorption revealed by nano-PALDI imaging mass spectrometry. *Int J Recent Sci Res*, 2016; 7(7), 12589-12592. 査読有
- 10) Nishida T, TsuneYama K, et al. (10人中2番目) Aberrant iron metabolism might have an impact on progression of diseases in Tsumura Suzuki obese diabetes mice, a model of spontaneous metabolic syndrome. *Pathol Int*. 2016 Nov;66(11):622-628. 査読有
- 11) Takikawa A, Mahmood A, Nawaz A, Kado T, Okabe K, Yamamoto S, Aminuddin A, Senda S, TsuneYama K, et al. (24人中9番目) HIF-1 in Myeloid Cells Promotes Adipose Tissue Remodeling Toward Insulin Resistance. *Diabetes*. 2016 Dec;65(12):3649-3659. 査読有
- 12) Takahashi T, Nishida T, Baba H, Hatta H, Imura J, Sutoh M, Toyohara S, Hokao R, Watanabe S, Ogawa H, Uehara H, TsuneYama K. Histopathological characteristics of glutamine synthetase-positive hepatic tumor lesions in a mouse model of spontaneous metabolic syndrome (TSOD mouse). *Mol Clin Oncol*. 2016 Aug;5(2):267-270. 査読有
- 13) Bae HR, Leung PS, TsuneYama K, et al. (16人中3番目) Chronic expression of interferon-gamma leads to murine autoimmune cholangitis with a female predominance. *Hepatology*. 2016 Oct;64(4):1189-201. 査読有
- 14) Yang GX, Sun Y, TsuneYama K, et al. (10

人中 3 番目) Endogenous interleukin-22 protects against inflammatory bowel disease but not autoimmune cholangitis in dominant negative form of transforming growth factor beta receptor type II mice. Clin Exp Immunol. 2016 Aug;185(2):154-64. 査読有

15) Iwamura A, Watanabe K, Akai S, Nishinosono T, Tsuneyama K, et al. (8 人中 5 番目) Zomepirac Acyl Glucuronide Is Responsible for Zomepirac-Induced Acute Kidney Injury in Mice. Drug Metab Dispos. 2016 Jul;44(7):888-96. 査読有

16) Morimoto S, Ishikawa T, Hyodo K, Yamazaki T, Taira S, Tsuneyama K, Ichianagi Y. Preparation and characterization of newly developed matrix using functional α -Fe₂O₃ nanoparticles for mass spectrum in small molecules. Surf. Interface Anal. 2016;48:1127-1131. 査読有

17) Yang JB, Wang YH, Yang W, Lu FT, Ma HD, Zhao ZB, Jia YJ, Tang W, Tsuneyama K, Ridgway WM, Gershwin ME, Lian ZX. Successful treatment of murine autoimmune cholangitis by parabiosis: Implications for hematopoietic therapy. J Autoimmun. 2016 Jan;66:108-17. 査読有

18) Sasaki E, Iida A, Oda S, Tsuneyama K, et al. (7人中4番目) Pathogenetic analyses of carbamazepine-induced liver injury in F344 rats focused on immune- and inflammation-related factors. Exp Toxicol Pathol. 2016 Jan;68(1):27-38. 査読有

19) Akai S, Uematsu Y, Tsuneyama K, Oda S,

Yokoi T. Kupffer cell-mediated exacerbation of methimazole-induced acute liver injury in rats. J Appl Toxicol. 2016 May;36(5):702-15. 査読有

20) Tsunashima H, Tsuneyama K, Moritoki Y, Hara M, Kikuchi K. Accumulated myeloid-derived suppressor cells demonstrate distinct phenotypes and functions in two non-alcoholic steatohepatitis mouse models. Hepatobiliary Surg Nutr. 2015 Oct;4(5):313-9. 査読有

〔学会発表〕(計9件)

常山幸一、異なるメカニズムに起因する新しい肝細胞癌発症モデル動物の開発と病態解析、及び治療法解明への応用
日本病理学会秋季特別総会(招待講演)2016年11月11日 金沢市文化ホール(石川県・金沢市)

常山幸一、メタボリックシンドローム関連肝疾患に出現する autoimmune features の臨床病理学的特徴
日本肝臓学会総会 2016年5月20日 ホテルニューオータニ幕張 (千葉県・千葉市)

常山幸一、他、新生児期ストレプトゾトシン投与 4CS マウスは通常食飼育によって持続高血糖なしに肝腫瘍を発症する
日本病理学会総会 2016年5月14日 仙台国際センター(宮城県・仙台市)

Tsuneyama K. New animal models of metabolic syndrome-associated liver cancer. Kanazawa Univ. Chozen Project (招待講演) 2016年2月12日 金沢大学十全講堂(石川県・金沢市)

Bessho R, Miki M, Baba H, Tsuneyama K. Hyperinsulinemia, not hyperglycemia accelerates the progression of hepatocellular carcinoma in neonatal STZ induced mouse model. AASLD (国際学会) 2015年11月13日 Civic center (USA、Sanfrancisco)

Morimoto S, Ishikawa T, Hyodo K, Yamazaki T, Taira S, Tsuneyama K, Ichianagi Y. Mass spectrum imaging of mouse livers using functional α -Fe₂O₃ nanoparticles. Atomic Level Characterization' 2015 (国際学会)

2015 年 10 月 25 日 Kunibiki Messe,
Shimane, Japan

常山幸一、メタボリックシンドローム関連
肝疾患モデル動物の開発と応用 徳島医学
会総会(招待講演) 2015 年 8 月 2 日 徳
島大学医学部 (徳島県・徳島市)

山口菜月、菊池健太郎、常山幸一、他。
Nano-PALDI MS イメージングを用いた経皮
吸収の薬物動態解析 第 81 回北陸質量分
析談話会 2015 年 6 月 6 日 福井県立
大学 (福井県・永平寺町)

森本翔大、兵藤公美典、山崎貴大、石川
智也、平修、常山幸一、一柳優子、機能化し
たナノ粒子を用いたマウス肝臓質量分析イ
メージング
ナノ学会第 13 回大会 2015 年 5 月 11 日 東
北大学片平キャンパス・片平さくらホール
(宮城県・仙台市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

常山 幸一 (TSUNEYAMA, Koichi)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授
研究者番号：10293341