

令和 4 年 5 月 29 日現在

機関番号：23803

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15972

研究課題名(和文)慢性疾患の早期病態解明を指向したキラルバイオマーカーイメージング法の開発

研究課題名(英文)Development of a Imaging Method for Chiral Biomarkers Towards Elucidation of Early Stages of Chronic Diseases

研究代表者

杉山 栄二(SUGIYAMA, Eiji)

静岡県立大学・薬学部・助教

研究者番号：90806332

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文):近年、疾患に関連するキラル分子の存在が明らかとなり、その病理組織学的解析が急務となっている。しかし、免疫組織化学等で組織中の各エナンチオマーを選択的にイメージングすることは、通常極めて困難である。そこで本研究では、ジアステレオマー誘導体化とイオンモビリティスペクトロメトリーを質量分析イメージングに組み合わせる、新たなイメージング法の開発に取り組んだ。まず分離に適した化学構造を調査し、その結果に基づき新規誘導体化試薬を設計した。続いてこの試薬を用い、マウス組織に含まれるキラルな有機酸(D-, L-2-ヒドロキシグルタル酸)の各エナンチオマーが異なる分布を示す様子を可視化することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本報告時点において質量分析イメージングによるエナンチオ選択的イメージングの実現を報告した例は他に見当たらない。本研究の成果は、種々の疾患に関連する光学異性体を対象とした、新たな病理組織学的解析法の開発に資すると考えられる。

研究成果の概要(英文):Recent evidences gain the importance of histopathological analysis of the chiral molecules associated with various diseases. However, selective imaging of an enantiomer in biological tissues is generally challenging. In this study, we developed a new imaging method that combines diastereomer derivatization and ion mobility spectrometry with mass spectrometry imaging. We designed a new derivatization reagent based on chemical structures suitable for the separation. By using the reagent for on-tissue diastereomeric derivatization, we succeeded in visualizing the different distribution of each enantiomer of chiral organic acids (D-, L-2-hydroxyglutaric acid) in mouse tissues.

研究分野：質量分析

キーワード：質量分析 キラル イメージング イオンモビリティスペクトロメトリー 誘導体化 ジアステレオマー

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

がん、慢性腎臓病、糖尿病は大きな社会的損失をもたらす代表的な疾患である。近年、これら疾患の早期診断マーカーとして、キラルな有機酸やアミノ酸が重要視されている。これらマーカーの実用化が進む一方、その代謝調節機構の解明や、新しい創薬標的の同定にも大きな期待が寄せられている。実際、疾患関連分子を豊富に含む組織種や特徴的な代謝経路が徐々に明らかとされている。しかし、特定の光学異性体が組織のどこに集積し、どのような変化をもたらすかの解明は遅れている。この事態の原因として、分子量の小さいキラル分子を直接かつ選択的にイメージングすることが困難という、技術的課題が挙げられる。組織学的解析に広く用いられる免疫組織化学やオートラジオグラフィーは、還流固定等の操作で容易に流出する内在性代謝物の解析に不向きであり、特にマイナーなエナンチオマーの分布を正確にイメージングすることは困難である。

質量分析イメージングは、組織試料の各位置から得たマススペクトルを基に、様々な分子の分布を描画する手法である。この方法は還流固定等の操作を必要としないため、低分子化合物の動態解析に適している。また、イオンモビリティスペクトロメトリー (IMS) の利用により、質量電荷比が等しい分子の異なる分布を調べることが可能である。研究開始当初、IMS の技術的進展に伴い、鏡像異性体をジアステレオマーとして IMS で分離した例が少数報告されていた。しかし、それらジアステレオマーのイオン化効率や分離度は不十分であり、質量分析イメージングに直接適用することは難しかった。

研究代表者は本研究以前に質量分析イメージングに有用な誘導体化法の開発経験を有しており、適切な誘導体化試薬の構造推定や誘導体化反応条件最適化を速やかに行う準備が整っていることから、本研究内容が申請された。

2. 研究の目的

IMS によるジアステレオマー誘導体の分離法に関する知見が極めて少ない状況を鑑み、下記 2 点を目的とした。

- (1) IMS によるエナンチオマーの分離に適した誘導体化法の開発
- (2) 組織中のキラル分子を対象とするエナンチオ選択的イメージングの実現

3. 研究の方法

- (1) IMS によるエナンチオマーの分離に適した誘導体化法の開発

キラルなアミノ酸、有機酸の各エナンチオマーを約 10 種のキラル誘導体化試薬と反応させ、得られる誘導体から生じる 4 または 5 種のイオンを IMS-質量分析により測定した。イオン移動度とジアステレオマー間の分離度を解析し、多様なエナンチオマー分離に有効な誘導体化試薬を探索した。また、IMS による様々な低分子化合物の測定データを用いて開発されたイオン移動度 (衝突断面積) 予測ソフトウェアを用い、それらがジアステレオマー間の分離度予測に利用可能かを評価した。

- (2) 組織中のキラル分子を対象とするエナンチオ選択的イメージングの実現

(1) で有望と判断された誘導体化試薬を用い、平面試料中キラル分子のエナンチオ選択的イメージングを試みた。また、試薬構造を改変した化合物を合成し、この試薬を用いてマウス精巢に含まれる D-, L-2-ヒドロキシグルタル酸を対象とする誘導体化条件の最適化とイメージングを行った。

4. 研究成果

(1) で試されたキラル誘導体化試薬の内、比較的広範な化合物のエナンチオマー分離に適するものとして 2 種、それらで分離できない分子の分離に適するものを 1 種見出した。また、2-ヒドロキシグルタル酸の D 体と L 体を分離可能な誘導体化法を初めて見出し、論文として発表した。また、IMS で用いるバッファーガスの組成を比較的分極率の高いものに置換することで、一部のジアステレオマーの分離度が改善されることを見出し、学会にて発表した。さらに、既存の主たるイオン移動度予測ソフトウェアが各ジアステレオマーの分離度を予測するには有効でないことを初めて明らかとし、上記発表論文にその内容を掲載した。

(2) ではまず、(1) で有望と判断された誘導体化試薬を用いてイメージングを行った。その結果、ジアステレオマーの分離度とシグナル強度がいずれも不十分であることが明らかとなった。そこで、この試薬を基に安定なカチオン構造を有する新規誘導体化試薬を合成し比較した。新規試薬を用いて得られるジアステレオマー由来のシグナル強度は従来の試薬を用いて得られるものの 10 倍以上高かった。また、IMS において新規試薬で得られる D-, L-2-ヒドロキシグルタル酸誘導体は完全分離した。さらに、組織上での誘導体化反応条件を調整してイメージングを行った

結果、マウス精巢に含まれる各エナンチオマーの異なる組織内分布を可視化することに成功した。この成果の一部は学会にて発表された。

国内外で IMS によりエナンチオマーを分離する試みが行われているが、それらの多くは非共有結合を介した複合体イオンまたは複数の金属イオンが付加したイオンを対象としており、生体試料中のキラル分子を標的とするイメージングには不向きである。本研究の成果として発表した D-, L-2-ヒドロキシグルタル酸の分離法では、比較的高感度に検出可能なプロトン付加イオンが分離するという点で先進的である。実際、論文発表後に研究代表者らへの問い合わせが来ている。また、新たな誘導体化試薬で得られるジアステレオマーは、高効率に生成する分子イオンが良好に分離するため、マウス精巢に含まれる各エナンチオマーの分布可視化に大きく寄与した。本研究の成果は、種々の疾患に関連する光学異性体を対象とした、新たな病理組織学的解析法の開発に資すると考えられる。

本研究を進める過程で、アミノ酪酸異性体(全8種)を液体クロマトグラフィーで良好に分離可能な誘導体化試薬を見出した。この意外な知見を基に生体試料中の各異性体を一斉に定量する分析系を構築し、シロイヌナズナに含まれる異性体種やマウスにおける各種異性体の体内動態を明らかとした。これら成果は学会にて発表された。この分析系は市販の試薬と汎用的逆相カラムを用いるものであり、各種アミノ酪酸を対象とする幅広い分野での利用が期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Fukui Serina*, Sugiyama Eiji*, Mizuno Hajime, Sakane Iwao, Asakawa Daiki, Saikusa Kazumi, Nishiya Yuki, Amano Yuri, Takahara Kentaro, Higo Daisuke, Toyo'oka Toshimasa, Todoroki Kenichiro (*: equal contribution)	4. 巻 44
2. 論文標題 Rapid chiral discrimination of oncometabolite DL 2 hydroxyglutaric acid using derivatization and field asymmetric waveform ion mobility spectrometry/mass spectrometry	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Separation Science	6. 最初と最後の頁 3489 ~ 3496
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jssc.202100350	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sugiyama Eiji, Mizuno Hajime, Todoroki Kenichiro	4. 巻 70
2. 論文標題 Enantio-Separation by Ion-Mobility Spectrometry	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of the Mass Spectrometry Society of Japan	6. 最初と最後の頁 74 ~ 76
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5702/massspec.S22-14	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計19件（うち招待講演 3件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西家侑生、杉山栄二、杉山右京、山下賢二、水野 初、濱島義隆、轟木堅一郎
2. 発表標題 高感度キラル分離分析を指向した新規カチオン性誘導体化試薬の開発
3. 学会等名 第31回クロマトグラフィー科学会議
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 東 徹、杉山栄二、水野 初、豊岡利正、轟木堅一郎
2. 発表標題 キラル誘導体化 LC-MS/MS を用いたD/L-Cysteineの光学異性体分離分析及び生体内硫化水素産生系に関する研究
3. 学会等名 第31回クロマトグラフィー科学会議
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西家侑生、福井芹菜、杉山栄二、水野 初、坂根 巖、豊岡利正、轟木堅一郎
2. 発表標題 誘導体化とイオンモビリティスペクトロメトリーを組み合わせたLC分離を用いない12-ヒドロキシグルタル酸のキラル分離分析
3. 学会等名 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 天野由梨、杉山栄二、水野 初、轟木堅一郎
2. 発表標題 イオンモビリティスペクトロメトリーによるアミノ酸光学異性体の分離に適した誘導体化法の探索
3. 学会等名 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 東 徹、杉山栄二、水野 初、豊岡利正、轟木堅一郎
2. 発表標題 キラル誘導体化 LC-MS/MS を用いたD/L-Cysteineの光学異性体分離分析及び生体内硫化水素産生系に関する研究
3. 学会等名 新アミノ酸分析研究会第10回学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 天野由梨、杉山栄二、飯沼賢輝、水野 初、轟木堅一郎
2. 発表標題 イオンモビリティスペクトロメトリーによるアミノ酸光学異性体の分離
3. 学会等名 新アミノ酸分析研究会第10回学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 杉山栄二、水野初、轟木堅一郎
2. 発表標題 質量顕微鏡法によるキラル分子のエナンチオ選択的イメージング
3. 学会等名 日本顕微鏡学会第78回学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 杉山栄二、福井芹菜、西家侑生、天野由梨、水野初、坂根巖、浅川大樹、七種和美、高原健太郎、肥後大輔、豊岡利正、轟木堅一郎
2. 発表標題 イオンモビリティースペクトロメトリー質量分析によるDL-2-ヒドロキシグルタル酸の分離分析とイメージング
3. 学会等名 第69回質量分析総合討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杉山栄二
2. 発表標題 質量分析イメージングによる生理活性分子の可視化
3. 学会等名 第18回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杉山栄二
2. 発表標題 質量分析イメージングによる生理活性分子の可視化
3. 学会等名 日本薬学会第141年会（広島）（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 天野由梨、杉山栄二、飯沼賢輝、水野初、轟木堅一郎
2. 発表標題 イオンモビリティースペクトロメトリーによるアミノ酸光学異性体の分離
3. 学会等名 第69回質量分析総合討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 仲村茉緒、杉山栄二、水野初、轟木堅一郎
2. 発表標題 誘導体化LC-MS/MS法によるアミノ酸異性体全種の一斉分離分析
3. 学会等名 第69回質量分析総合討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 仲村茉緒、杉山栄二、水野初、轟木堅一郎
2. 発表標題 アミノ酸異性体全種の一斉分離分析法の開発と応用
3. 学会等名 第85回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 青山洋平、天野由梨、杉山栄二、飯沼賢輝、唐川幸聖、原田真志、水野初、中山 聡、轟木堅一郎
2. 発表標題 イオンモビリティースペクトロメトリーによるアミノ酸光学異性体の一斉分離を目指したキラル誘導体化試薬の合成と評価
3. 学会等名 第33回バイオメディカル分析化学シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 仲村茉緒、杉山栄二、水野 初、轟木堅一郎
2. 発表標題 誘導体化LC-MS/MS法によるアミノ酪酸異性体全種の一斉定量分析
3. 学会等名 第33回バイオメディカル分析化学シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西家侑生、杉山栄二、杉山右京、山下賢二、水野 初、濱島義隆、轟木堅一郎
2. 発表標題 新規カチオン性誘導体化試薬を用いたキラルながんバイオマーカーの高選択的質量分析イメージング
3. 学会等名 第33回バイオメディカル分析化学シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 仲村茉緒、杉山栄二、水野 初、轟木堅一郎
2. 発表標題 誘導体化LC-MS/MS法によるアミノ酪酸異性体全種の一斉定量分析
3. 学会等名 第33回バイオメディカル分析化学シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 仲村茉緒、杉山栄二、水野初、轟木堅一郎
2. 発表標題 誘導体化LC/MS/MS法によるアミノ酪酸異性体全種の一斉分離分析法の開発と応用
3. 学会等名 日本分析化学会第70年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 仲村茉緒、杉山栄二、水野 初、轟木堅一郎
2. 発表標題 誘導体化LC/MS/MS法によるマウス組織中アミノ酪酸異性体全種の一斉定量分析
3. 学会等名 第52回 中部化学関係学協会支部連合秋季大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関