

令和 6 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H01962

研究課題名（和文）薬剤と細胞の相互作用解析に向けたシングルセル質量分析イメージング技術の開発

研究課題名（英文）Development of single-cell mass spectrometry imaging techniques to analyze drug-cell interactions

研究代表者

間 久直（HAZAMA, Hisanao）

大阪大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：70437375

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：レーザーイオン化を用いた質量分析イメージングは様々な分子の分布を非染色で同時に測定でき、創薬などへの応用が期待されているが、空間分解能が10～100 μmであることから細胞スケールでの観察は困難であった。本研究課題では細胞スケールでの観察を目指して、大気圧下でのレーザー照射で気化させた試料にエレクトロスプレーで電荷を付与する手法を開発し、薬剤であるカフェイン、ベラパミルのイオンを安定して検出することに成功した。ピクセルサイズ50 μmでカフェインの質量分析イメージングに成功した。検出感度を改善してピクセルサイズ20 μmでカフェインの検出に成功し、細胞スケールでの観察の実現可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

質量分析イメージングでは蛍光プローブや放射性同位体による標識を行わなくても特定の分子の分布を測定できるだけでなく、予め存在が予期できない分子でも質量から分子を同定し、その分子の分布を知ることができ、極微量の分子でも検出できる。従来は、標識で検出された分子の周りでその分子と相互作用している分子が何であるかを知るには様々な制限があったが、質量分析イメージングではこのような相互作用を網羅的に解析できる可能性がある。本研究の成果を用いると薬剤分子やその代謝物の分布を高速かつ高空間分解能で測定することができるため、新規医薬品開発や薬剤投与デバイスの開発におけるブレークスルーが期待できる。

研究成果の概要（英文）：Mass spectrometry imaging using laser ionization can simultaneously measure the distribution of various molecules without staining, and is expected to be applied to drug discovery, but observation at the cellular scale has been difficult due to the spatial resolution of 10 to 100 μm. In this research project, aiming at observation at the cellular scale, we developed a method to apply a charge by electrospray to a sample vaporized by laser irradiation at atmospheric pressure, and succeeded in stably detecting ions of the drugs caffeine and verapamil. We succeeded in mass spectrometry imaging of caffeine with a pixel size of 50 μm. By improving the detection sensitivity, we succeeded in detecting caffeine with a pixel size of 20 μm, demonstrating the feasibility of observation at the cellular scale.

研究分野：レーザー医工学、レーザーイオン化質量分析

キーワード：単一細胞解析 薬剤 質量分析イメージング レーザー脱離エレクトロスプレーイオン化 ナノ粒子

1. 研究開始当初の背景

医学や生物学などにおいて、従来の手法では生体組織内の多数の細胞に対して平均化された情報しか得られないことが多く、個々の細胞の性質の違いを知ることができなかつたため、新薬の治験において十分な効果を得られないことも多かつた。そこで、個々の細胞の性質を知った上で個々の細胞の挙動を調べる手法として単一細胞解析 (single-cell analysis) の重要性が示されている (J. R. Heath *et al.*: *Nature Rev. Drug Discovery* **15**, 204 (2016))。

一方、質量分析を用いて質量毎に分離した様々な分子の分布画像を同時に測定する質量分析イメージング (mass spectrometry imaging; MSI) がバイオ・医療分野、医薬品業界、工業分野など様々な分野で注目を集めている。MSI では蛍光プローブや放射性同位体による標識を行わなくても特定の分子の分布を測定できるだけでなく、予め存在が予期できない分子でも質量から分子を同定し、その分子の分布を知ることができ、極微量の分子でも検出できるという利点がある。従来は、標識で検出された分子の周りでその分子と相互作用している分子が何であるかを知るには様々な制限があつたが、MSI ではこのような相互作用を網羅的に解析できる可能性がある。

分子量が数 100 を超えるような分子を対象とした MSI には、分子を解離させずに気相イオンを得ることができるマトリックス支援レーザー脱離イオン化 (matrix-assisted laser desorption/ionization; MALDI)、およびイオンの損失が少なく高感度であり、原理上は測定可能な質量に上限が無い飛行時間型質量分析計 (time-of-flight mass spectrometer; TOFMS) が主として用いられている。MALDI-TOFMS を用いた一般的な MSI では、集光したレーザーを試料上で走査しながら各点における質量スペクトルを順次測定し、それらの質量スペクトルを統合して各質量のイオンに対する信号強度の空間分布を画像化する。TOFMS ではサンプルプレート付近にイオン加速用の電極を設置する必要があるため、レーザー集光用のレンズとサンプルプレートを近付けることができず、空間分解能がレーザーの集光径により 10~100 μm 程度に制限されている。このため、MALDI-TOFMS では細胞スケールでのイメージングは困難であり、ほとんど全てが組織スケールでのイメージングである。また、通常の MALDI は高真空中で行われるが、水分を多く含む生体試料を高真空中へ導入すると乾燥してしまうため、生きた状態により近い試料の分析を行うためには大気中におけるイオン化が望ましい。これらの課題を解決するため、研究代表者は大気中で導電性コーティングを施したスライドガラスの裏側から紫外線レーザーを照射する透過照射型光学系を用いたイオン源を構築し、がん細胞内における色素の分布を得ることに成功したが、実用のためには検出感度が不十分であることが課題であつた。そこで、本研究課題ではレーザーによる気化とエレクトロスプレーによる電荷の付与を組み合わせた大気圧イオン化によって単一細胞の MSI を短時間でを行うことを可能とする技術の開発を行った。従来の単一細胞解析や、従来の MSI では分析が困難であつたタンパク質や薬剤分子の分析を高速かつ高空間分解能で行う手法を確立できれば、プロテオミクスや新規医薬品開発におけるブレークスルーが期待できる。

2. 研究の目的

紫外レーザーを用いると 1 μm 以下の焦点を得ることも容易なため、サブミクロンの空間分解能を得ることも可能と考えられるが、MALDI ではイオン化に必要な有機マトリックスの結晶が数 μm 以上になることが空間分解能を制限している。このため、本研究課題では、紫外レーザーによる気化とエレクトロスプレーによる電荷の付与を組み合わせることでマトリックスを用いずに、高分子も高感度、高空間分解能で測定可能な MSI 技術の開発を行った。

3. 研究の方法

(1) レーザーとエレクトロスプレーを併用した MSI システムの構築

レーザーで気化させた試料にエレクトロスプレーで電荷を付与することによる検出感度の向上を利用した MSI システムを構築した。アブレーションセル内に設置された試料に対して紫外線レーザー加工用の対物レンズでレーザーを集光した。レーザー照射によって気化、または微粒子化した試料は窒素ガスによって輸送され、加熱チューブを通過することで気化が促進される。加熱チューブから放出された試料にエレクトロスプレーで電荷を付与することによって試料をイオン化させた。質量分析計には、タンデム質量分析 (MS/MS) を行うこともできる、四重極飛行時間型質量分析計 (英国 Micromass 社製 Q-ToF Ultima API) を使用した。大気中で発生したイオンを質量分析計の低真空部に導入し、差動排気によって高真空内の TOFMS まで移動したイオンを検出した。

試料を設置するアブレーションセルの内部で滞留が生じると試料の損失による検出感度の低下につながるため、Open FOAM (Open CFD, UK) を用いてガスの流れのシミュレーションを行い、独自にアブレーションセルを設計、製作した。セル内のガスの流れが層流となり、滞留が生じないようにセル内の流路を設計し、3D プリンター (Sonic Mini 4K, Phrozen, 台湾) を用いてセルを製作した。試料を輸送する窒素ガスの流量、加熱チューブの温度等を変化させてイオン信号強度が高くなる条件を検討した。

(2) がんの診断・治療用薬剤の光反応過程の測定

本研究課題で構築した MSI システムによるイメージングの候補物質の一つとして、光線力学診断 (photodynamic diagnosis; PDD)、および光線力学療法 (photodynamic therapy) と呼ばれる、がんの低侵襲な診断・治療法で用いられている protoporphyrin IX に着目した。光感受性物質である protoporphyrin IX は光照射によって活性酸素種を発生させ、その酸化作用でがん細胞を死滅させるが、活性酸素種との化学反応によって protoporphyrin IX 自体も変化し、複数の光生成物が生じる。これらの空間分布を MSI で同時に明らかにすることができれば、PDD、PDT の効率を改善する上で有用な情報を得られると考えられるため、MSI の前段階として protoporphyrin IX への光照射に伴う反応過程を、エレクトロスプレーイオン化を用いた質量分析により調べた。

(3) ナノ粒子を使用したイオン化の検討

MALDI で用いられる有機マトリックスの結晶による空間分解能の低下を避けるため、有機マトリックスを用いず検出感度を更に高めるためにナノ粒子を用いたイオン化についても検討を行った。対象は protoporphyrin IX とし、TiO₂、ZnO、Fe₃O₄ の 3 種類のナノ粒子を用いて試料を作製し、比較した。飛行時間型質量分析計 (Voyager-DE PRO, Applied Biosystems, USA) を使用して測定した。

4. 研究成果

(1) レーザーとエレクトロスプレーを併用した MSI システムの構築

レーザーで気化させた試料にエレクトロスプレーで電荷を付与することができる MSI システムを設計・製作した結果を図 1、および図 2 に示す。試料をアブレーションセル内に設置することによって高倍率の対物レンズを使用でき、レーザーの集光径を約 1 μm まで小さくできることを確認した。アブレーションセルから流れてくるガスを加熱することが重要であり、加熱チューブからガスへ供給する熱量の増加に伴ってイオン信号強度が高くなることを明らかにした。この MSI システムによって、薬剤として用いられているカフェイン、およびベラパミルのイオンを安定して検出することに成功した。さらに、カフェイン溶液を滴下、乾燥させて作製した試料の MSI を試みた結果、図 3 のように光学顕微鏡象と正確に一致したカフェインイオンの分布を得ることができた。この測定ではレーザー集光径を約 30 μm、ピクセルサイズ (試料の移動間隔) を 50 μm としたが、イオン化条件の検討によってイオン信号強度を更に高めることに成功し、ピクセルサイズを 20 μm としてもカフェインのイオンを検出することができ、細胞スケールでの MSI の実現可能性を示すことができた。

(2) がんの診断・治療用薬剤の光反応過程の測定

がんの診断・治療用薬剤の一つである protoporphyrin IX に対して、PDD、PDT で用いられている波長 405、および 635 nm、パワー密度 10、および 100 W/cm² でレーザー照射し、光反応に伴

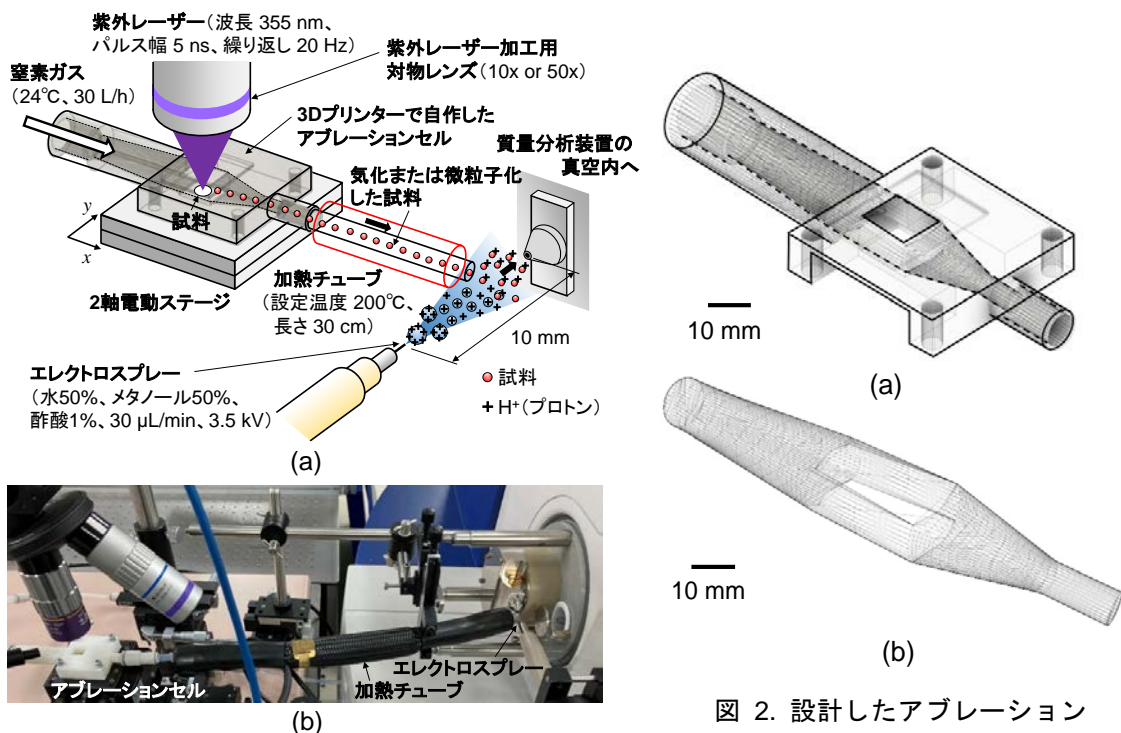


図 2. 設計したアブレーションセルの (a) 外観、および (b) 内部の流路

図 1. レーザーとエレクトロスプレーを組み合わせたイオン源の (a) 概略図、および (b) 写真

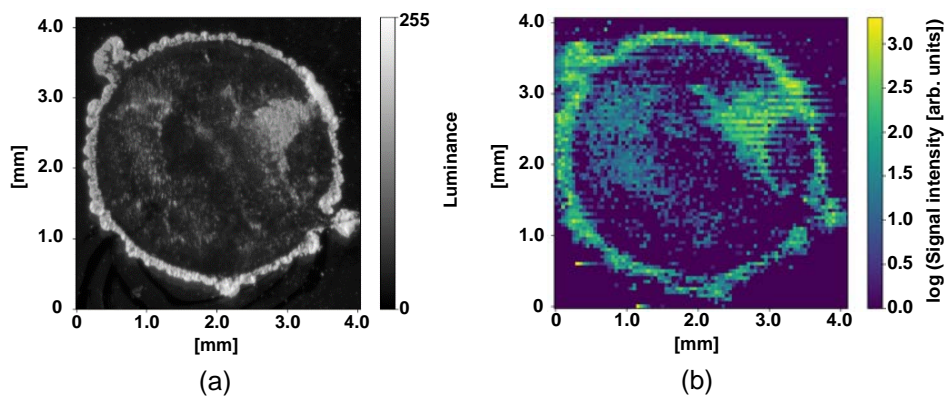


図 3. カフェイン溶液を滴下、乾燥させて作製した試料の光学顕微鏡象、および同試料を図 1 のイオン源を用いた MSI で得られたカフェインのプロトン付加イオン(m/z 194 ~ 196) の分布画像

う protoporphyrin IX の濃度の変化と、反応によって生成される分子の分析を行った。その結果、照射する光の波長が異なると protoporphyrin IX の濃度が低下する速度や、反応過程が異なることがわかった。また、PDD において反応生成物から発生する蛍光を利用すると、protoporphyrin IX のみの蛍光を使用した場合と比べて長い時間 PDD を行うことができることを明らかにした。今後は、このような過程を MSI で観察することで PDD、PDT の効率を更に高める手法について検討する。

(3) ナノ粒子を使用したイオン化の検討

空間分解能を低下させず検出感度を更に高めるためにナノ粒子を用いたイオン化についても検討を行った。ナノ粒子を混合した試料に紫外レーザーを照射し、発生したイオンを飛行時間型質量分析計 (Voyager-DE PRO, Applied Biosystems, USA) を使用して分析した。TiO₂、ZnO、Fe₃O₄ の 3 種類のナノ粒子を用いた場合について比較した結果、TiO₂ ナノ粒子を用いた場合に最も protoporphyrin IX のイオン信号強度が高くなった。様々な粒径の TiO₂ ナノ粒子を様々な濃度で混合し、紫外レーザーを照射してイオン化させた結果、粒径 5~15 nm の TiO₂ ナノ粒子を用いることで、protoporphyrin IX のイオン信号強度を、ナノ粒子を用いなかった場合の 9 倍に高められることを明らかにした。今後はナノ粒子を MSI に適用することによる検出感度の改善を試みる。

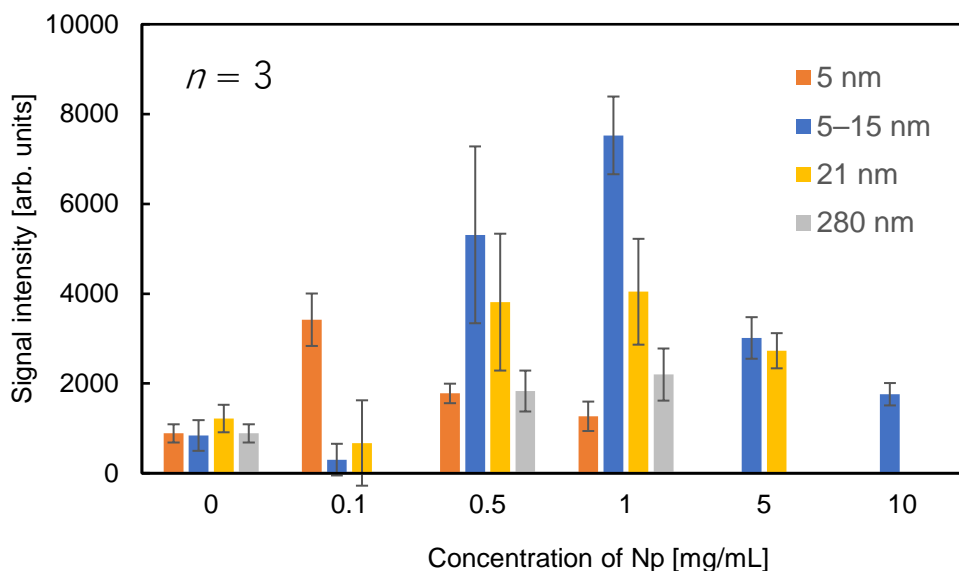


図 4. 粒径が異なる酸化チタン (TiO₂) のナノ粒子 (Np) を様々な濃度で混合して protoporphyrin IX をイオン化させた際のイオン信号強度の比較。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 OGBONNA Sochi J., YORK William Y., NISHIMURA Takahiro, HAZAMA Hisanao, FUKUHARA Hideo, INOUE Keiji, and AWAZU Kunio	4. 巻 28
2. 論文標題 Increased fluorescence observation intensity during the photodynamic diagnosis of deeply located tumors by fluorescence photoswitching of protoporphyrin IX	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Biomedical Optics	6. 最初と最後の頁 055001, 1~15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1117/1.JBO.28.5.055001	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 該当する
1. 著者名 OGBONNA Sochi J., YORK William Y., NISHIMURA Takahiro, HAZAMA Hisanao, and AWAZU Kunio	4. 巻 12627
2. 論文標題 Analyses of protoporphyrin IX fluorescence photoswitching for prolonging the photodynamic diagnosis time of deeply located tumours	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Proceedings of SPIE	6. 最初と最後の頁 1262716, 1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1117/12.2670880	査読の有無 無
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 該当する
1. 著者名 KANNEN Hiroki, MIYOSHI Yuto, HAZAMA Hisanao, and AWAZU Kunio	4. 巻 10
2. 論文標題 Improvement in Ionization Efficiency Using Metal Oxide Nanoparticles in Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of a Cancer Drug	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mass Spectrometry	6. 最初と最後の頁 A0099-1 ~ A0099-5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5702/massspectrometry.A0099	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 -
1. 著者名 OGBONNA Sochi J., HAZAMA Hisanao, and AWAZU Kunio	4. 巻 97
2. 論文標題 Mass Spectrometric Analysis of the Photobleaching of Protoporphyrin IX Used in Photodynamic Diagnosis and Therapy of Cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Photochemistry and Photobiology	6. 最初と最後の頁 1089 ~ 1096
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/php.13411	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 和田周士, 三好悠斗, 間久直, 粟津邦男	4. 巻 OQD-22-001 ~ 006
2. 論文標題 細胞の質量分析イメージングに向けた高繰り返しパルスレーザーイオン源の開発	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 電気学会 光・量子デバイス研究会資料	6. 最初と最後の頁 1 ~ 5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 廣谷陸, 三好悠斗, Sendilraj Varun, 間久直
2. 発表標題 ガス輸送式レーザーアブレーションエレクトロスプレーイオン化を用いた大気圧質量分析イメージングにおけるヒーティングチューブの熱影響評価
3. 学会等名 第72回質量分析総合討論会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 廣谷陸, 間久直, 粟津邦男
2. 発表標題 ヒーティングチューブを用いたガス輸送式レーザーアブレーションエレクトロスプレーイオン化法による質量分析イメージングの開発
3. 学会等名 第71回質量分析総合討論会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 OGBONNA Sochi J., HAZAMA Hisanao, MASUDA Katsuyoshi, and AWAZU Kunio
2. 発表標題 Analysis of the Photoproducts of the Photosensitizer, Protoporphyrin IX, used in Photodynamic Therapy of Cancers
3. 学会等名 第71回質量分析総合討論会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 HIROTANI Riku, HAZAMA Hisanao, and AWAZU Kunio
2. 発表標題 Development of ambient mass spectrometry imaging using laser ablation electrospray ionization separated by gas transportation for analyses of intracellular molecules
3. 学会等名 71st ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 OGBONNA Sochi J., HAZAMA Hisanao, MASUDA Katsuyoshi, and AWAZU Kunio
2. 発表標題 Photobleaching and photoproducts analyses of the photosensitizers, protoporphyrin IX and protoporphyrin IX dimethyl ester, for photodynamic diagnosis/therapy of cancers
3. 学会等名 71st ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 OGBONNA Sochi J., YORK William Y., NISHIMURA Takahiro, HAZAMA Hisanao, and AWAZU Kunio
2. 発表標題 Analyses of protoporphyrin IX fluorescence photoswitching for prolonging the photodynamic diagnosis time of deeply located tumours
3. 学会等名 European Conferences on Biomedical Optics 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 和田周士, 三好悠斗, 間久直, 粟津邦男
2. 発表標題 細胞の質量分析イメージングに向けた高繰り返しパルスレーザーイオン源の開発
3. 学会等名 電気学会 光・量子デバイス研究会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

大阪大学 大学院工学研究科 間研究室ホームページ
<http://www.see.eng.osaka-u.ac.jp/seemb/seemb/>

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
研究協力者	閑念 弘樹 (KANNEN Hiroki)		
研究協力者	オボンナ ソチ (OGBONNA Sochi)		
研究協力者	三好 悠斗 (MIYOSHI Yuto)		
研究協力者	和田 周士 (WADA Chikashi)		
研究協力者	廣谷 陸 (HIROTANI Riku)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	ヨーク ウィリアム (YORK William)		
研究協力者	センドイルラーヂ バルン (SENDILRAJ Varun)		
研究協力者	ダームズ カサンドラ (DAHMS Kassandra)		
研究協力者	益田 勝吉 (MASUDA Katsuyoshi)		

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		
	米国	National Institute on Aging	W. H. Coulter Department of Biomed. Eng.
ドイツ	Karlsruhe Institute of Technology		