

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 10 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24591632

研究課題名(和文) イメージングマスペクトロメトリーを用いた皮膚内代謝物可視化法の確立

研究課題名(英文) Establishment for ceramide imaging method by mass spectrometry imaging

## 研究代表者

井上 菜穂子 (INOUE, Naoko)

日本大学・生物資源科学部・助教

研究者番号：00509515

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：表皮特異的な脂質であるセラミドは、皮膚のバリア機能や免疫に関与していると考えられている。セラミドには複数の分子種が存在しており、各々が異なる生理活性を持つと考えられているが、それらを個々に局在可視化する手法はこれまで存在しなかった。本研究はイメージングマスペクトロメトリーの手法を用いて、皮膚組織におけるセラミド及びその関連代謝物の空間的な分布を分子種レベルで明らかにする事である。マウスの足底皮膚を試料とし、各種分析条件の最適化を行ったところ、セラミド及びその前駆体であるグルコシルセラミドや代謝物であるセラミド1リン酸の脂肪酸鎖長による特徴的な局在変化を可視化することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Ceramide which have a wide variety of molecular species due to their fatty acid chain length possess an important role for skin barrier function. Mass spectrometry imaging which is able to detect and visualize molecules on tissues directly, would be available for detecting specific localization of ceramides. We used murine footpad sections for establishing an appropriate method for ceramide imaging. By optimizing several conditions for analyses, we have succeeded to detect and visualize ceramide, glucosylceramide, and ceramide-1-phosphate individually. This is the first attempt to demonstrate ceramide imaging on tissue sections by mass spectrometry imaging.

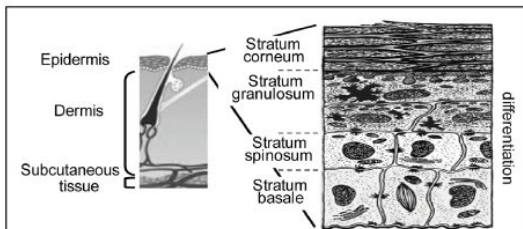
研究分野：分析化学

キーワード：脂質 イメージング セラミド

## 1. 研究開始当初の背景

イメージングマススペクトロメトリーは脂質の組織内・細胞内局在を明らかにすることができる手法である。イメージングマススペクトロメトリーの利点としては、(1)任意の標識または特異的なプローブを必要としない、(2)未知の代謝物の発見の可能性がある、(3)一度に多数の代謝物を検出できる、ということが挙げられる。これまでに肝臓、脳、腎臓等広く組織切片の分析に適用されており、主にグリセロ脂質であるリン脂質(ホスファチジルコリン、スフィンゴミエリン)や中性脂質(トリアシルグリセロール、コレステロールエステル)の可視化が報告されてきた。本法は脂肪酸鎖長の異なる分子種をそれぞれ個々に可視化することができる唯一の手法であり、これまで明らかとされなかった特定の分子種の細胞内局在を明らかにしてきた。一方、セラミド脂質についてはスフィンゴミエリンのような膜脂質の報告は数多くあったが、生理活性因子として働くセラミドの局在解析の報告はなかった。その理由としてはおそらくその相対量がグリセロ脂質と比べて少ない事、またイオン化効率が低いことなどが挙げられる。

セラミドは主に表皮に多く含まれている。表皮はケラチノサイトから構成されており、その性質から大きく4つに分かれる。まず、ケラチノサイトは一番下部の基底層(Stratum basale)で増殖し、有棘層(Stratum spinosum)、顆粒層(Stratum granulosum)と分化が進み、最終的に角層(Stratum corneum)へ分化する(下図)。角層は、皮膚の外層に局在し、表皮の過剰な水分蒸発を防ぐことから、皮膚のバリア機能に大きく関与することが知られている。そして角層内に含まれている脂質の中でもセラミドが、バリア機能に大変重要であることが示唆されている。しかし、これまでの報告では角層内にどのようなセラミドがどこに局在しているのかを明らかにした報告はなかった。またセラミドの前駆体であるグルコシルセラミドなどについてもその局在は不明のままであり、表皮内のセラミド代謝においてはその局在解析が急務であった。



## 2. 研究の目的

本研究の目的は皮膚組織におけるセラミド脂質代謝物の空間的な分布を明らかにする事である。表皮特異的な脂質であるセラミ

ドは、皮膚のバリア機能や免疫に関与していると考えられている。セラミドには複数の分子種が存在しているが、それらを個々に局在可視化する手法はこれまで存在せず、分子種ごとの性質・機能などの詳細な解析が困難であった。本研究では脂質の局在可視化法として注目されているイメージングマススペクトロメトリーの手法を用いて、皮膚組織内代謝物、特にセラミドの局在可視化法の確立を試みることを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 試料作製: マウス(足底及び背部)及びヒトから表皮を含む皮膚試料を採取し、凍結する。凍結の際には形態を維持するため、包埋材(カルボキシメチルセルロース)を使用し、粉末ドライアイスを用いて凍結を行った。凍結した試料は 10-12 μm に薄切し、凍結切片を作成した。

### (2) イメージング解析

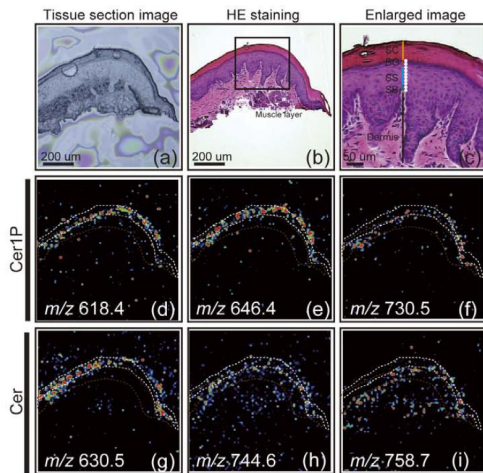
装置は島津製作所 iMScope 及び SCIEX QSTARElite を用いて分析を行った。マトリクスとしては DHB(2,5-dihydroxy benzoic acid)を用い、ポジティブイオンモードにおいて分析を行った。得られたデータは BioMap ソフトウェアを用いてそのイオンイメージを構築した。セラミドの構造はタンデム質量分析法によって確認した。

## 4. 研究成果

まず初年度はモデル動物としてマウスの背側皮膚、並びに足底皮膚をサンプリングし、それぞれの切片を作成した。皮膚の角層構造を維持して切片を作成するために、様々な包埋材を用いてサンプル作成を試みた。最終的に、4%カルボキシメチルセルロースを包埋材として用いて凍結切片を作成したところ、皮膚の各層構造を保持したままイメージング用の試料を作成することに成功した。

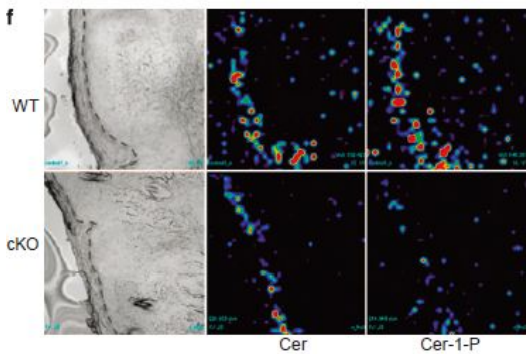
セラミドはその量がほかの脂質と比べると微量であることとイオン化効率が低いことが解析の難点として挙げられた。そこで、従来よく使用されている真空型の MALDI 装置だけでなく、大気圧でイオン化する装置を用いた検討を行った。その結果、大気圧イオン化の装置ではセラミドの分子関連イオンが脱水イオン  $[M-H_2O+H]^+$  に収束されることにより高感度に検出されることが分かった。そこで、それ以降は大気圧 MALDI の装置を用いて解析を行うこととした。

比較的簡単に試料採取が可能なヌードマウスの背側の皮膚を用いてまずは切片作成を試みた。背側の皮膚の角層は非常に薄く、25 ミクロンの空間分解能では角層のみのシグナルを得ることは難しかった。しかし、角層を含む表皮において中性脂質であるトリアシルグリセロールが豊富に含まれていることが分かった。



一方、足底皮膚は比較的角層が厚く、角層特異的な脂質局在を観察することができた。その結果、セラミド並びにその前駆体であるガラクトシルセラミド、代謝物であるセラミド1リン酸が脂肪酸鎖長に応じて特徴的に角層に局在していることを明らかにした(上図)。

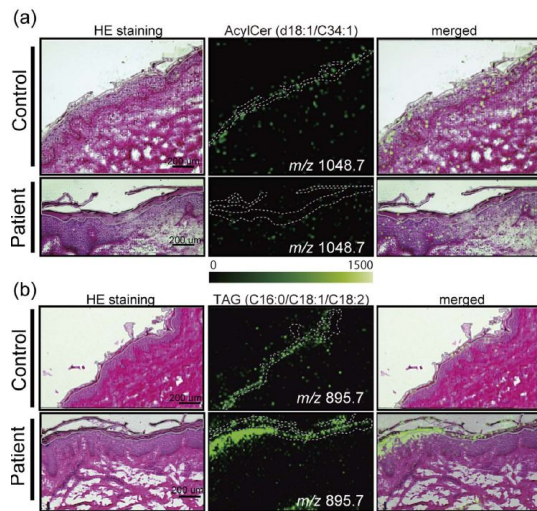
次に、確立したマウス表皮角層の測定手法を用いて、さまざまなモデルマウスへの応用を検討した。高知大学医学部との共同研究により、皮膚のバリア機能にかかわる脂肪酸合成酵素遺伝子改変マウスの表皮において、特徴的なセラミド及びその代謝物であるセラミド1リン酸が減少しているという表現型を得ることができた(J Invest Dermatol. 2012 Aug;132(8):2019-25. J Invest Dermatol. 2013 Nov;133 (11): 2555-65.)。(下図、論文より抜粋)



また、さらなる高解像度イメージングを試みるために、レーザー系を10ミクロンから5ミクロンに収束させた系での解析も行った。レーザー径を収束させると、一度にイオン化できる領域が狭まるため、感度がやや劣るものの、主要なセラミド分子種については詳細な角層内の局在を可視化することができた。

そして最終的な目標として、本法をヒト試料に応用することを試みた。我々は、魚鱗癬を伴う脂質ミオパチーの一つであるDorfman-Chanarin症候群に注目した。本疾患は長鎖脂肪酸を有する特徴的なセラミド、アシルセラミド合成酵素欠損によって発症することが知られており、そのアシルセラミド

の欠乏が、アトピーを含めた皮膚疾患を誘因していると考えられていた。しかしこれまでは患者の角層からアシルセラミドの欠乏を直接明らかにした研究結果はなかった。そこで本法を用いて角層内のアシルセラミド可視化を試み、その局在を明らかにしようとした。その結果、患者皮膚においてアシルセラミドが角層特異的に欠乏していること、さらにその代りとしてトリアシルグリセロールが異常に蓄積している様子を可視化することに成功した(下図)。



当初の予定では3年間の研究期間であったが、最終年度の11月より出産及び育児によって事業を1年間中断したため、一年間研究期間を延長することとした。復職後はこれまでの研究データをまとめ、さらにこれまでのマウスの実験では検出できなかったヒト型セラミドを可視化するためのモデル構築を行う条件検討を行った。豚の皮膚に、エマルジョン化したヒト型セラミドを塗布し、表皮内に浸透するかどうかをイメージングの手法を用いてあきらかにするための条件検討を現在進行形で挑戦している。この解析によって、外因的に投与されるセラミドの局在可視化法としてイメージングマスマスペクトロメトリーが応用可能であることも提示された。解像度やそのMSMSイメージングなど、本研究を遂行することで新しく見えてきた課題もある。よって今後も更なる研究開発が求められていると考える。

## 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6件)

Zaima N, Goto-Inoue N, Hayasaka T. MALDI Mass Spectrometry Imaging of Biological Structures. Encyclopedia of Analytical Chemistry. 2016 in press <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470027318.a9417/pdf> 査読あり

Goto-Inoue N, Tamura K, Motai F, Ito M, Miyata K, Manabe Y, Fujii NL. A fragmented form of annexin A1 is secreted from C2C12 myotubes by electric pulse-induced contraction. *Mol Cell Biochem.* 2016 Jan;411(1-2): 173-180. doi: 10.1007/s11010-015-2579-8. 査読あり

Goto-Inoue N, Yamada K, Inagaki A, Furuichi Y, Ogino S, Manabe Y, Setou M, Fujii NL. Lipidomics analysis revealed the phospholipid compositional changes in muscle by chronic exercise and high-fat diet. *Sci Rep.* 2013 Nov 20;3:3267. doi: 10.1038/srep03267. 査読あり

Goto-Inoue N, Hayasaka T, Zaima N, Nakajima K, Holleran WM, Sano S, Uchida Y, Setou M. Imaging mass spectrometry visualizes ceramides and the pathogenesis of Dorfman-Chanarin syndrome due to ceramide metabolic abnormality in the skin. *PLoS One.* 2012; 7(11):e49519. doi: 10.1371/journal.pone.0049519. 査読あり

Tarutani M, Nakajima K, Uchida Y, Takaishi M, Goto-Inoue N, Ikawa M, Setou M, Kinoshita T, Elias PM, Sano S, Maeda Y. GPCR-dependent functions of the Golgi apparatus are essential for the formation of lamellar granules and the skin barrier. *J Invest Dermatol.* 2012 Aug;132(8):2019-2025. doi: 10.1038/jid.2012.100. 査読あり

Goto-Inoue N, Manabe Y, Miyatake S, Ogino S, Morishita A, Hayasaka T, Masaki N, Setou M, Fujii NL. Visualization of dynamic change in contraction-induced lipid composition in mouse skeletal muscle by matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 2012 Jun;403(7): 1863-71. doi: 10.1007/s00216-012-5809-x. 査読あり

〔学会発表〕(計 1件)

井上菜穂子・新規イメージング手法を用いた皮膚内脂質及び外因性投与化合物の動態解析・COSME2013 化粧品開発展 アカデミックフォーラム(2013・6・28 幕張メッセ(千葉、幕張))

6. 研究組織  
(1)研究代表者

井上 菜穂子 (INOUE, Naoko)  
日本大学・生物資源科学部・助教  
研究者番号: 00509515