

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：34417

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790567

研究課題名(和文) 質量顕微鏡を用いた中枢神経系での内因性ジギタリスの産生分泌機構の解明

研究課題名(英文) Study on the mechanism of production and secretion in central nervous system by imaging mass spectrometry

研究代表者

吉賀 正亨 (YOSHIKA, Masamichi)

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：70434834

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：内因性ジギタリス(EDLF)の定性的解析は免疫組織染色や液体クロマトグラフィー/質量分析(LC/MS)を用い行われきた。LC/MSは液体サンプルの解析のため、細胞、組織内のEDLFの解析を直接行うことは困難である。しかし質量顕微鏡は細胞、組織を直接サンプルにして質量分析することが可能となった。今回、質量顕微鏡を用いて、EDLFの候補物質であるマリノブフォトキシンとマリノブファゲニンにおいてピコグラム濃度までLC/MSと同じマススペクトルを確認することができた。

質量顕微鏡で標品のEDLFのマススペクトルパターンが得られたことはEDLFの研究に質量顕微鏡が有用な手法となることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The qualitative analysis of Endogenous digitalis-like factor (EDLF) is used immunohistochemistry and Liquid Chromatography mass spectrometry (LC/MS). LC/MS is applied for the liquid sample; therefore it is difficult to analyze for cell and tissue. Imaging mass spectrometry can directly analyze for cell and tissue. We confirmed the mass spectrum pattern of marinobufotoxin and marinobufagin as well as the result of LC/MS in the concentration of pictogram.

Imaging mass spectrometry should be useful analytic tool to study for EDLF.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学 病態検査学

キーワード：内因性ジギタリス 質量分析 質量顕微鏡 高血圧 生理活性物質 副腎 視床下部

1. 研究開始当初の背景

内因性ジギタリス様物質(EDLF)はナトリウムポンプ活性を抑制することで腎でのナトリウム代謝と関係し、血管平滑筋や心筋細胞では細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させ血管平滑筋や心筋の収縮をもたらす血圧上昇をもたらすと考えられている。EDLFの産生・分泌機構については、主な分泌組織と考えられている副腎でもいまだ十分解明されていない。その原因としてEDLFはステロイド骨格を持つ低分子物質でありその解析手法が限られているため、その生体内での生理作用の解明を中心に研究がすすめてきたため産生分泌機構の解明を行っている施設は少ない。しかし、生体内でのEDLFの生理作用の解明のためには産生分泌機構の解明は重要と考えられる。

従来我々の研究で用いていたLC/MSは液体サンプルの解析のため、細胞、組織内のEDLFの解析を直接行うことは困難である。しかし近年、質量顕微鏡が発達してきており、細胞、組織を直接サンプルにして従来解析が難しかった低分子化合物や脂質成分の存在を質量分析することが可能となってきている。

1. 研究の目的

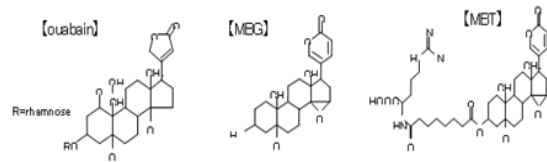
- (1) 質量顕微鏡を用いて、EDLFの候補物質であるマリノプフォトキシン(MBT)とマリノプファゲニン(MBG)の標品と同じ質量分析結果を得られるかを検討する。
- (2) ラットの視床下部、N1細胞を用い、ウアバイン(OUA)の存在、局在分布、分泌増強因子の検討、さらに分泌に伴う細胞膜の変化を従来我々が行ってきた抗OUA抗体を用いたELISAやLC/MSだけでなく質量顕微鏡を用い検討し視床下部におけるOUAの産生・分泌メカニズムを解明する。

3. 研究の方法

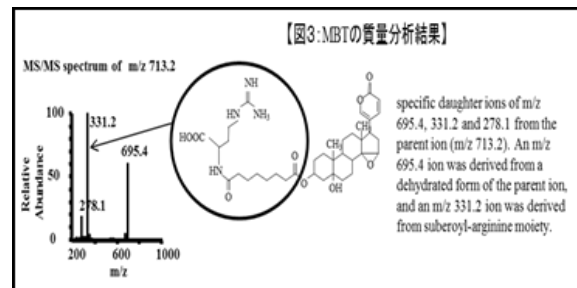
- (1) MBT、MBGの標品を用いてLC/MSと同じ質量分析結果を得られるかを保持剤として用いるマトリックスの調節と標品の濃度を検討する。
- (2) 質量顕微鏡を用いラットの視床下部組織に標品のOUAと同様のMS/MSパターンが見られるかを確認し、視床下部における局在を検討する。次に視床下部不死化細胞株であるN1細胞を用い、同様にN1細胞内のOUAの存在を質量顕微鏡で確認する。

4. 研究成果

- (1) MBT、MBG、OUAはステロイド骨格を有し図に示すように非常に類似した構造式を有している。



LC/MSを用いて、それぞれの標品に特異的なMS/MSパターンを得ている。我々は今までELISA法とLC/MSを用いて、副腎皮質のモデル細胞であるY-1細胞上清にMBT、MBGが存在することを確認しているが、細胞中の存在量については、十分な検討は行われていないため、質量顕微鏡を用いた検討ではごく少量の標品の質量分析が必要となる。そのため今まで実績のあるMBT、MBGの標品の検討を行った。その結果、各種の保持剤として用いるマトリックスを検討し最終的に、MBG、MBTともにピコグラムレベルの標品濃度までMS/MSパターンの検出を行うことができた。



標品での基礎検討を踏まえて、質量顕微鏡を用いてY-1細胞での検討を行ったが、特異的なMS/MSパターンを得ることはできなかった。この結果から標品のフェントグラム濃度でのマススペクトルの検出を目標として検討する必要があると思われる。EDLFの産生分泌機構の解明に質量顕微鏡は有用と思われる。

- (2) OUAについても同様に、質量顕微鏡を用いて標品での検出限界の検討を行ったが、十分な結果が得られなかった。マトリックスの検討も含めさらなる調節が必要と思われる。N1細胞を用いたOUAの分泌増強因子の検討では、アンジオテンシンがN1細胞からのOUAの分泌を増強し、アンジオテンシン阻害剤がその分泌を抑制する結果を示唆するデータが得られた。

EDLFの産生分泌機構の解明に質量顕微鏡は有用と思われる。

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5件)

1. 大倉ひろ枝, 鈴木玲子, 東良子, 吉賀正亨, 高橋伯夫 高感度トロポニン測

定法の基礎検討と慢性心不全診断における性能評価 臨床病理 61: 375-381. 2013 (査読有)

2. 2. Takahashi H, Yoshika M, Yokoi T. Validation of Omron RS8, RS6, and RS3 home blood pressure monitoring devices, in accordance with the European Society of Hypertension International Protocol revision 2010. Vascular health and risk management . 9: 265-272. 2013 doi: 10.2147/VHRM.S44569 (査読有)
3. Kamimura D, Ohtani T, Sakata Y, Mano T, Takeda Y, Tamaki S, Omori Y, Tsukamoto Y, Furutani K, Komiyama Y, Yoshika M, Takahashi H, Matsuda T, Baba A, Umemura S, Miwa T, Komuro I, Yamamoto K. Ca²⁺ entry mode of Na⁺/Ca²⁺ exchanger as a new therapeutic target for heart failure with preserved ejection fraction. Eur Heart J. 33: 1408-16. 2012 doi: 10.1093/eurheartj/ehr106. (査読有)
4. Yokoi T, Azuma J, Nakade Y, Sanada F, Iekushi K, Yoshika M, Masuda M, Komiyama Y, Taniyama Y, Masaki H, Morishita R, Takahashi H. Comparison between Two Calcium Antagonists: Blood Pressure Reduction and Renal Effects in Hypertensive Patients with Type 2 Diabetes. Immunology, endocrine & metabolic agents in medicinal chemistry. 12: 152-159. 2012 (査読有)
5. 大倉ひろ枝, 鈴木玲子, 杉林幸代, 吉賀正亨, 高橋伯夫 高感度トロポニンT測定法の性能と臨床的有用性について 臨床病理 60: 407-413. 2012 (査読有)

〔学会発表〕(計 9 件)

1. 吉賀正亨, 小宮山豊, 松本宙士, 今田崇裕, 高橋伯夫 院内と検査センターでのHIT抗体の測定結果に乖離を生じたヘパリン起因性血小板減少症の1例 第60回日本臨床検査医学会総会 2013年12月2日 神戸
2. 吉賀正亨, 小宮山豊, 正木浩哉, 高橋伯夫 HIT抗体価遷延症例の心臓外科手術に伴う抗体検査法について 第56回日本臨床検査医学会近畿支部総会 2013年10月19日 福井
3. 鈴木玲子, 大倉ひろ枝, 角坂芳彦, 吉賀正亨, 高橋伯夫 ISO 15189 認定取得への取り組み～サポートチームの支援を受けて～ 第56回日本臨床検査医学会近畿支部総会 2013年10月19日 福井
4. 吉賀正亨, 小宮山豊, 河崎裕英, 野村明代, 平井雅美, 野村昌作, 高橋

伯夫 2度の非典型溶血性尿毒症症候群の発症が疑われた1症例 第14回日本検査血液学会学術集会 2013年7月28日 東京

5. 小宮山豊, 原克子, 正木浩哉, 吉賀正亨, 高橋伯夫 抗凝固薬が原因の中毒の一つであるヘパリン起因性血小板減少症の経験と考察 第35回日本中毒学会総会 2013年7月19日 大阪
6. 吉賀正亨, 小宮山豊, 正木浩哉, 高橋伯夫 ヘパリン投与中止後も長期間にわたりHIT抗体の陽性を認めたヘパリン起因性血小板減少症の透析患者の1例 2012年 第59回日本臨床検査医学会総会 2012年11月22日 京都
7. 横井豊彦, 小宮山豊, 榊田緑, 吉賀正亨, 正木浩哉, 高橋伯夫 若年者の脈波伝播速度検査結果の評価に関する一考察 2012年 第59回日本臨床検査医学会総会 2012年11月22日 京都
8. 大倉ひろ枝, 鈴木玲子, 東良子, 吉賀正亨, 高橋伯夫 新たに開発されたARCHITECT STATを用いた高感度トロポニン測定法の性能評価と既存高感度法との比較検討 2012年 第59回日本臨床検査医学会総会 2012年11月22日 京都
9. 吉賀正亨, 小宮山豊, 高橋伯夫 下垂体における内因性ジギタリス様物質である ouabain 分泌に関する検討 第52回日本臨床化学学会学術集会 2012年9月8日 岩手

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等
<http://research.kmu.ac.jp/kmuhp/KgApp?k>

yoinId=ygdgbe

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉賀 正亨 (YOSHIKA, Masamichi)

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：70434834

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：