

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 29 日現在

機関番号：84305

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861553

研究課題名(和文) イメージングマスペクトロメトリー法による新たな声帯粘膜構成成分の検索

研究課題名(英文) Search of a new vocal cord mucosa components by imaging mass spectrometry

研究代表者

嘉田 真平 (Kada, Shinpei)

独立行政法人国立病院機構(京都医療センター臨床研究センター)・臨床研究企画運営部・研究員

研究者番号：70543263

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,300,000円

研究成果の概要(和文)：質量顕微鏡を用いて、ヒト喉頭の脂質分布の測定を行った。これまでの研究では声帯粘膜下組織にはコラーゲン、エラスチンなどの数個の構成物質しか報告されていなかったが、 m/z 583.0や m/z 605.0、 m/z 621.1などのスペクトルに代表される物質が主に粘膜下組織に多く含まれていることが明らかとなった。これらの物質が何であるか更に質量顕微鏡で物質同定を行ったが、十分なスペクトルを得ることはできず、物質同定まではいたらなかった。原因としては実験条件の不適當の他に構成物質の存在量が少なすぎるといった可能性が考えられる。今後、これらの部分のみ集積を行い、質量分析での解明を目指している。

研究成果の概要(英文)：Using mass microscope, we measured the lipid distribution of the human larynx. Previous studies revealed few constituents of such collagen and elastin in the submucosal tissue of the vocal cord. Now we revealed that the submucosal substance represents m/z 583.0, m/z 605.0, and m/z 621.1 in the spectrum. The substance identified by further mass microscope or these materials is what was done, it is not possible to obtain sufficient spectrum, until material identified did not reach. The cause is considered possible that the presence of the constituent materials is too small, in addition to the inadequate experimental conditions. In the future, only those portions make an integrated, we aim to elucidate the mass analysis.

研究分野：喉頭基礎

キーワード：喉頭 声門下粘膜 質量顕微鏡 コラーゲン エラスチン

1. 研究開始当初の背景

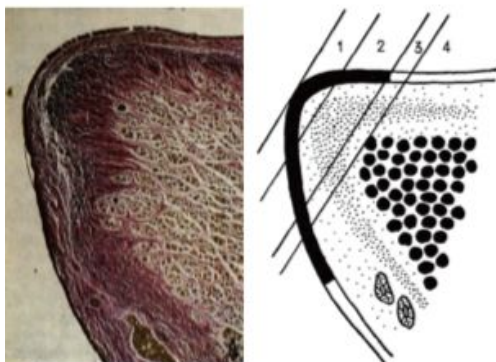
声帯について

声帯は声の唯一の発生源であり、声帯が障害を受けると声によるコミュニケーションが困難となり、社会的には大きなハンディを背負うことになる。声の質に最も影響を与える声帯粘膜は主に上皮、粘膜固有層、筋層の3つに分けられる(図1)。その中でも粘膜固有層は声帯の粘弾性を決定する重要な要素と考えられている。

現在までに明らかになっている声帯の粘膜固有層の構成分子は、エラスチンとコラーゲンが主であり、その分布は粘膜固有層の中でも3層に分かれている。1973年に平野らがこのことを報告し、その後の喉頭研究に大きな影響を与えた。(平野 実, 日本耳鼻咽喉科学会会報, 1973)

粘膜固有層をいかに再生させるかということに対して、我々のグループは研究を行っており、現在まで多くの成果をあげてきた。粘膜固有層の減少により起こる声帯溝症に対しては、既にコラーゲンの粘膜固有層への注入が臨床で広く行われており、良好な臨床成績を得ている。しかし、長期成績では、再度のコラーゲンの注入が必要であったり、ま

図1 声帯の構造



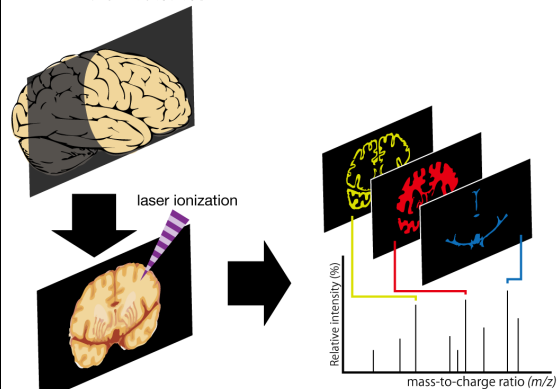
左: VanGieson-Verhoeff 染色 (コラーゲンが赤染)
右: 声帯組織模式図
1. 上皮、粘膜固有層浅層
2. 粘膜固有層中間層
3. 粘膜固有層深層 4. 筋層

だまだ十分な治療方法とはいえないのが現状である。前述のとおり、1973年に平野らが報告した粘膜固有層の構成分子はコラーゲンなどが主とされているが、それ以降の研究で、他の成分は明らかになっていない。新たな物質が同定できれば、それに伴い声帯粘膜固有層の減少に伴う様々な疾患の治療法に広くつながると考えられる。

質量顕微鏡について

ノーベル賞受賞者の田中耕一氏が開発したMALDI法による質量分析計は、数千の既知/未知の分子の解析・同定を可能にするものであり、ポストゲノム時代におけるプロテオーム解析の中心的手法として広く用いられている。今回の顕微鏡で用いる質量顕微鏡は、顕微鏡下にレーザーのスポットを2次元的に走査することで組織切片上の任意の分子の位置情報を同定するものであり、次世代の解析器機としてここ数年国内外で開発が進められている(図2)。この方法により数十 μm の解像度で数千から数万の既知あるいは未知の分子(タンパク、糖鎖、脂質)の発現分布を一度に得ることが可能となった。

図2 質量顕微鏡について



スライドガラス上で任意の分子の発現分布が得られる

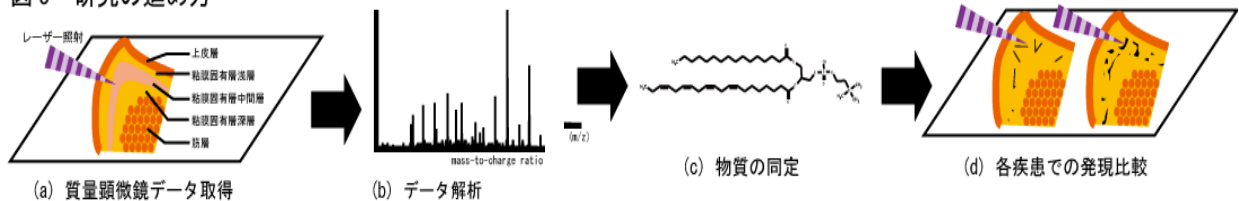
2. 研究の目的

質量顕微鏡は脂質に結合している脂肪酸を区別して検出することができる唯一の手段である。我々は既に甲状腺癌を用いた質量顕微鏡での解析を行っており、正常甲状腺と比較して、甲状腺乳頭癌に特徴的な脂質が発現していることを明らかにした。

今回の研究ではこれまで明らかになっていない声帯の構成成分を脂質に着目して質量顕微鏡を用いて解析を行った。

3. 研究の方法

図5 研究の進め方



- (a) 質量顕微鏡でヒト喉頭からのデータを取得
(c) 物質の同定

- (b) 得られたスペクトルから喉頭に特徴的なものを検出
(d) 同定された物質の各疾患での発現頻度を比較する

1. 摘出喉頭の切片作成

摘出ヒト喉頭の冠状断および前額断の切片作成を行った。作成切片はHEおよび質量顕微鏡用に導電性を持ったITO (indium tin oxide)スライドガラスへマウントした。

2. 質量顕微鏡の条件設定およびデータ取得

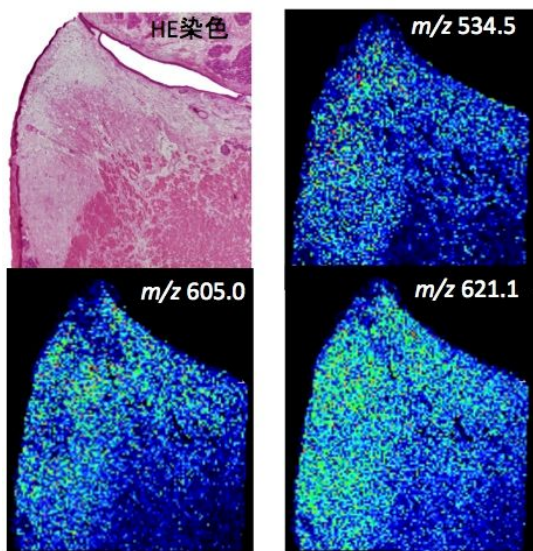
検出範囲は、脂質に着目したため質量電荷比 (m/z) 400-900 に設定し、レーザーの強さなどは適宜シグナルの検出を確認しながら調整した。

3. 質量顕微鏡データ解析

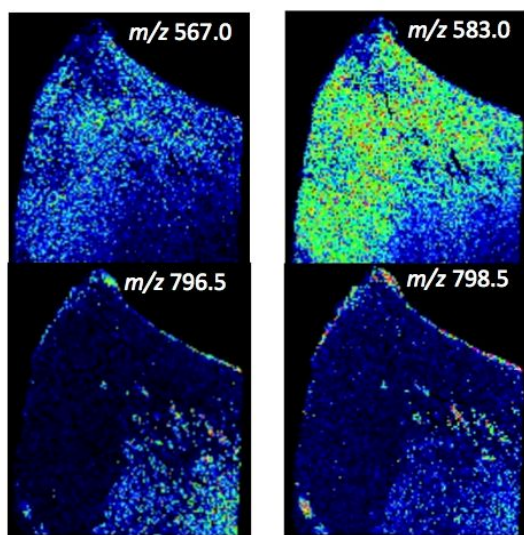
HE染色での結果を参照し、測定スペクトルから解析ソフトであるSIMtool (Shimadzu corp., Japan)を用いて、声帯上皮、粘膜固有層を比較し、声帯粘膜固有層に特徴的な構成分子と考えられるスペクトルを検出した。

4. 研究成果

マトリックスの調整およびスペクトルの最適化を行い、予備実験と比較し、より良好なスペクトルが得られるようになった。これまでの研究では声帯粘膜下組織にはコラーゲン、エラスチンなどの数個の構成物質しか報告されていなかったが、今回の実験の結果として、 m/z 583.0 や m/z 605.0、 m/z 621.1 などのスペクトルに代表される物質が主に粘膜下組織に多く含まれていることが明らかとなった。



次に、これらの物質が何であるか更に質量顕微鏡で物質同定を行ったが、十分なスペクトルを得ることはできなかったため、物質同定まではいたらなかった。その原因として、実験条件が適切でなかった可能性、また、構成物資の存在量が少なすぎるという可能性が考えられる。



今後は、これらの部分についてのデータの集積を行い、質量分析での物質同定・解明を目指している。また、更に、他のヒト喉頭での同解析を行い、実験結果の再現性を確認する予定である。

5. 主な発表論文等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

嘉田 真平 (KADA, Shinpei)

国立病院機構京都医療センター 臨床研究センター 研究員

研究者番号：70543263

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし