

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670173

研究課題名(和文) 質量分析による急性心筋梗塞組織の解析

研究課題名(英文) Mass spectrometry analysis of cardiac tissue with acute infarction

研究代表者

鶴山 竜昭 (Tsuruyama, Tatsuaki)

京都大学・医学部・特定教授

研究者番号：00303842

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：急性心筋梗塞(AMI)の組織学的変化は初期にはほとんど見られないため、その診断を早期段階で行うことは困難である。我々は、梗塞組織前処理法を開発し、イメージング質量分析(IMS)を使用して、広い質量電荷比範囲でタンパク質の同定を可能にすることに成功した。IMSデータは、ミトコンドリアのアデノシン三リン酸合成酵素アルファサブユニットや心筋関連タンパク質などのシグナルが、梗塞部位で有意に変化することを示していた。結論として、心臓組織上において局所的な分子変化を直接同定することに成功した。IMSは、AMIおよび他の病理学的研究のためのバイオマーカーの同定のための有望な技術であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：It had remained difficult to make a pathologic diagnosis of acute myocardial infarction (AMI) at the very early phase, because histological alterations are rarely observed. We developed a novel pre-treatment method of the cardiac tissue and used an imaging mass spectrometry (IMS) system to obtain multiple mass spectra for specific cardiac peptides at a wide m/z range. IMS data demonstrated alteration of signals of the mitochondrial adenosine triphosphate synthase alpha subunit and other cardiac proteins in the infarcted cardiac tissue. In conclusion, we were successful in the direct identification of molecular changes in the cardiac tissue. IMS is a promising technique for the identification of biomarkers for AMI and other pathological studies.

研究分野：病理学

キーワード：急性心筋梗塞 質量分析 病理組織

1. 研究開始当初の背景

急性心筋梗塞の早期診断および発症後の確定診断に必要な診断マーカーには特異的かつ、感度の高いものが少なく、これらの欠点を克服する新たな有用なマーカーの探索が臨床上強く望まれてきた。また病理学的にも、急性心筋梗塞は組織学的変化に乏しく、その病態を病理学的に分析することは困難とされてきた。

2. 研究の目的

急性心筋梗塞の診断・分析に必要なバイオマーカーとして、特異的なタンパク質を検出するために病理組織標本を使った質量分析発現タンパク質の次元分布を知ること、これらの画像解析を可能にするシグナルノイズ比の評価系に関する分析手法の確立を目的とした。

3. 研究の方法

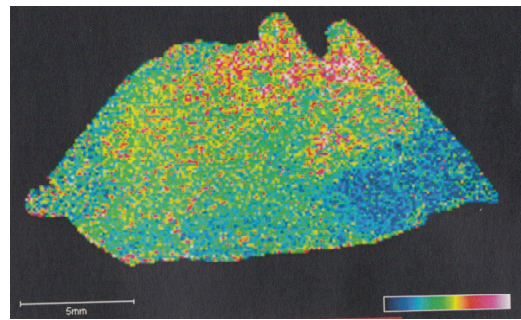
導電体特殊ガラス上に、薄切した心臓組織切片を搭載した顕微鏡標本を用いて、アセトニトリル溶液中で高温煮沸処理による化学的前処理の最適化を行いイオン化効率の増加のためのプロトコルの確立を行った。これと並行して、液相クロマトグラム質量分析によるタンパク質分析のプロトコルの確立を行った。ホルマリン固定標本からのタンパク質抽出効率を改善するため、加圧、加熱処理などの物理的な前処理法の最適化を実施した。

4. 研究成果

その結果、質量分析(MAODI-TOF)用のイオン化支援物質(マトリックス)として2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB)を用いることが最も適切であることをつきとめた。次に、前処理後のタンパク質とDHBの均一な混合結晶を切片上に形成することを高

効率化し、かつ画像解像度の改善に成功した。

実際に、質量分析イメージングを行い、7種類の心筋のタンパク質(アクチン、ミオシンを含む)の分布を標本上に2次元描像として得ることに成功した。特に、左室壁の心筋切片を用いることで、心筋梗塞において、冠状動脈など血流、および心筋の機能評価に関わるミトコンドリア代謝に重要なATP合成酵素の分布についてデータを得ることに成功し、梗塞による心筋傷害の程度を画像的に評価する基盤技術を確立できた。これとの関連技術としてホルマリン固定標本からのタンパク質抽出技術の確立を試み、同定タンパク質のバイオインフォマティクスの応用による有意なバイオマーカー探索の基盤を形成した(論文報告)。その結果、梗塞部位とATP合成酵素の低下についての相関が得られることができ、将来の急性心筋梗塞の病態を分析できる基盤に関わるデータを取得できた(下図、下掲病理学会など国内学会 - および国際学会で報告した。)



説明: 心臓左室におけるミトコンドリアATP合成酵素の活性分布をヒートマップにて表現した。左室の梗塞部位に一致して同酵素のシグナルの低下(青シグナル)が認められた。

現在、データの解像度の改善を行うための専用の画像解析ソフトのプログラミングを行っており、加えて病理組織像との照合による心筋の傷害の程度についての比較分析を行

い、近日中に論文報告を行う予定である。

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3件)

Tsuruyama T, Inoue H. Ethical Issues around the Use of Forensic Samples in Research in Japan. *Int J Forensic Sci Pathol*. 2016; 240-242. (査読あり)

Inoue H, Tsuruyama T. Issues Concerning Clinical Research Using Human Pathologic Bioresources in the Biobank Era. *Int. J. Forensic and Pathology*. *Int J Forensic Sci Pathol*. 3(10), 176-178, 2015. (査読あり)

Salah A, Yoshifuji H, Ito S, Kitagori K, Kiso K, Yamada N, Nakajima T, Haga H, Tsuruyama T, Miyagawa-Hayashino A. High Expression of Galectin-3 in Patients with IgG4-Related Disease: A Proteomic Approach. *Patholog Res Int*. 2017;2017:9312142. (査読あり)

[学会発表](計3件)

(国内)

鶴山竜昭、羽賀博典 病理組織を用いた質量分析プロテオーム解析による超急性期心筋梗塞のバイオマーカーSORBS2の同定 (日本病理学総会 2014年4月24日～26日 広島国際会議)

鶴山竜昭、羽賀博典 病理組織を用いた質量分析プロテオーム解析による超急性期心筋梗塞のバイオマーカーSORBS2の同定. 日本臨床検査医学会 2014年11月22～25日 福岡国際会議場)

鶴山竜昭、羽賀博典 心筋梗塞の質量分析イメージングによるタンパク質分析(日

本病理学総会：2015年4月30日～5月2日
名古屋国際会議場)

(国外)(計4件)

Tsuruyama T. Application of Biophysical Approach for Pathological Diagnosis: Mass Spectrometry-Imaging. The 8th IUPAP International Conference on Biological Physics (ICBP2014). Institute of Physics, Chinese Academy of Sciences on June 18-22, 2014. (招待講演)

Tsuruyama T. Sorbin and SH3 Domain-Containing Protein 2 Is Released from Infarcted Heart in the Very Early Phase: Proteomic Analysis of Cardiac Tissues from Patients. International Society for Biological and Environmental Repositories (ISBER) Annual meeting 2015. 2015 May 8 Arizona, US.

Tsuruyama T. Mass Spectrometry Imaging of Cardiac Tissues in Human Bioresource Repository of Kyoto University. International Society for Biological and Environmental Repositories (ISBER) Annual Meeting and Exhibits, 2016, April 8, Berlin, Germany.

Inoue H, Tsuruyama T. Human Specimen Usage Policies at Kyoto University: How to Utilize Human Specimens in Collaborative Research. International Society for Biological and Environmental Repositories (ISBER) Annual Meeting and Exhibits, 2016, April 8, Berlin, Germany.

[図書](計1件)

鶴山竜昭, 矢島由佳 「質量顕微鏡による単一細胞解析」～イメージング質量分析の試み～*生体の科学*, 第65巻第2号

〔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〕

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

京都大学・医学研究科
鶴山竜昭 (TSURUYAMA, Tatsuaki)
京都大学・大学院医学研究科・特定教授
研究者番号：00303842

(2) 研究分担者

羽賀博典 (HAGA, Hironori)
京都大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：10252462

宮川文 (IMIYAGAWA, Aya)
京都大学・大学院医学研究科・特定准教授
研究者番号：90432385