

平成 30 年 5 月 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08608

研究課題名(和文) 質量分析イメージングを用いた慢性腎臓病の脂質定量解析

研究課題名(英文) Quantitative Analysis of Lipid Species in Chronic Kidney Disease using Imaging Mass Spectrometry

研究代表者

早坂 孝宏 (Hayasaka, Takahiro)

北海道大学・医学研究院・特任助教

研究者番号：90415927

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)はメタボリックシンドロームを起因として発症し、それと同時に慢性腎臓病を併発する危険性が高いという興味深い報告がある。本研究では、申請者らが開発した新規手法である質量分析イメージング(IMS)と一般的な手法である高速液体クロマトグラフィー質量分析計(LC-MS)を用いてNASHモデルマウスの腎臓組織を解析した。その結果、NASHモデル群において脂肪酸組成の異なるカルジオリピンが皮質領域で減少することが明らかになった。このような分子マーカーに関してヒト病理組織と照合することによって治療法及び薬剤の開発につながることを期待できる。

研究成果の概要(英文)：Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) is driven from metabolic syndrome and simultaneously have a risk to complicate chronic kidney disease. In this study, imaging mass spectrometry (IMS) and conventional liquid-chromatography mass spectrometry (LC/MS) were used for analysis of lipid species on the kidney in NASH model mice. In the results, IMS revealed the specific distribution of molecular species at m/z 1,400-1,500 on the cortex of kidney section in NASH model mice and LC/MS identified these molecular species as cardiolipin with different fatty acids. Cardiolipin is known as a target by oxidative stress because of having four polyunsaturated fatty acids. The comparison with human pathologic specimen about cardiolipin as a molecular marker would be useful for a novel development of treatment and drug.

研究分野：分析化学

キーワード：非アルコール性脂肪性肝炎 慢性腎臓病 イメージング質量分析 カルジオリピン

1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会を迎え、我が国では加齢に伴い発症する疾患の治療法や薬剤の開発が火急の課題となっている。その中でもメタボリックシンドロームを起因とした NASH (non-alcoholic steatohepatitis) や慢性腎臓病等の疾患は、年々増加する一方である。特に慢性腎臓病は透析療法を受ける必要性を生じることや癌への進展などの問題から、我が国の医療費を今後さらに増大させる大きな要因になると考えられている。

我々のグループでは NASH の病態解析を目的として、高脂肪食及び酸化ストレスを動物モデルへ与えた NASH モデルマウスを作製し、肝臓中においてヒト NASH 患者に特徴的な脂肪滴形成や線維化などの病態を再現することに成功している (Yimin et al., Lab Invest, 2012)。また NASH 患者 92 例中 19 例に慢性腎臓病が発症するという、非常に興味深い臨床データが Yasui らによって報告されている (Metabolism, 2011)。これまでに慢性腎臓病についてはタンパク質や遺伝子解析が中心となって進められてきたが、脂質については国内外を問わずほとんど研究が進められていないのが現状である。

研究代表者は浜松医大在籍時に質量分析イメージング (imaging mass spectrometry: IMS) の手法及び装置開発に携わってきた。この新規手法は、2002 年に田中耕一氏がノーベル賞を受賞したソフトイオン化法を用いて組織上の生体分子をイオン化し、ソフトウェアにより量と分布を可視化することが可能である。イオン化されるすべての生体分子が解析対象となることから、一度の実験で核酸、脂質、ペプチド、タンパク質、投与薬剤など多くの分子の分布情報を得ることが可能である。申請者は本手法を用いて当時の最高解像度である 50 μ m を達成し、同定解析により Phosphatidylcholine の脂肪酸組成まで詳細に同定することに成功した。さらにはマウス胎児の褐色脂肪細胞及び腸内における Triacylglycerol (TAG) の局在、網膜中における各脂肪酸の分布を明らかにしてきた。このように質量分析イメージングを用いることにより生体中に存在する脂質類を一度に解析することが可能である。特に脂質は既存のイメージング手法では、脂肪酸組成まで明らかにすることはできない。近年の研究において脂質と病態が非常に密接な関係にあることが分かってきており、炎症に関与するアラキドン酸カスケードのように脂肪酸を無視することはできない。特に質量分析イメージング以外に分布解析が不可能である。よって本研究では脂質解析に最適な質量分析イメージングを用いて NASH モデルマウス腎臓組織を解析し、慢性腎臓病において特異的に増減する脂質分子種の分布を明らかにし、さらには NASH モデルマウスに投与する抗酸化物質による防御効果を評価するという発想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、研究代表者らが開発した新規手法である IMS と一般的な手法である高速液体クロマトグラフィー質量分析計 (LC-MS) を用いて NASH モデルマウスの腎臓組織を解析することにより NASH 特異的に発現もしくは抑制される分子群を特定する。さらに抗酸化物質投与によりこれらの分子群の発現に対する効果を顕著することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) NASH モデルマウスの作製

C57BL/6J マウス (5 週齢、雄性) を日本エスエルシー (静岡県浜松市) より購入した。搬入後 1 週間は飼育環境へ馴化させるため全てのマウスに普通食を与えた。その後、無作為にマウスを次の 6 群に分類した。コントロール、NASH、NASH+抗酸化物質 A、NASH+抗酸化物質 B、NASH+抗酸化物質 C、NASH+抗酸化物質 D。コントロール群に対しては普通食、NASH 群には特別食を 6 週間与え続けた。各抗酸化物質の投与群については NASH 群作製の特別食へ混入させた。飼育中は餌の摂取量と体重変動をモニタリングした。6 週間の飼育後、各マウスをイソフルラン麻酔下において回復し、肝臓および腎臓を摘出した。肝臓については重量を計測し、体重当たりの肝重量の変化についても検証した。摘出した組織はドライアイス上で凍結させ、実験に使用するまで -80 に保管した。

(2) 凍結切片の作製

-80 にて保管していた肝臓および腎臓組織を凍結ミクロトーム (CM1850, Leica) へ移動させた。庫内温度の -20 へ馴化させたのち、10 μ m の厚さで薄切した凍結切片を IMS 専用スライドガラスへ載せた。スライドガラスは密閉容器へ入れ、IMS に使用するまで -80 に保管した。また同時に組織染色用の切片をスライドガラス上に貼り付け、hematoxylin and eosin (HE) 染色およびオイルレッド O 染色を行った。

(3) IMS 解析

スライドガラス上の切片に対して、エアブラシを用いてマトリックス溶液 1ml を均一に塗布した。マトリックスはポジティブイオンモード用に 2,5-dihydroxybenzoic acid (50mg/ml, 70%メタノール)、ネガティブイオンモード用に 9-aminoacridine (10mg/ml, 70%エタノール) を使用した。マトリックス溶液が乾燥した後、スライドガラスを質量分析計 (ultrafleXtreme, Bruker Daltonics) へ導入した。両イオンモードとも測定範囲を m/z 200-2,000 とし、測定間隔は 200 μ m に設定した。取得したイメージングデータを flexImaging (Bruker Daltonics) で展開し、そのソフトウェア上に表示される平均マススペクトル中から任意のピークを選択することにより各分子の分布画像を構築した。解析

を進める中で得的な変動を示すことが明らかになった一部の分子群については、組織上において多段階質量分析を行い、その分子同定を試みた。

(4) 組織からの脂質抽出

凍結組織に対して Bligh and Dyer 法を適用した。凍結組織をホモジナイズ後、BCA 法によりタンパク質量を行った。各サンプルから 10mg タンパク質量の組織懸濁液を分取し、脂質成分の抽出を行った。脂質成分を含む溶液は濃縮遠視装置により乾固させ、後述する LC-MS の溶媒 A 200 μ l で溶解した。

(5) LC-MS による脂質分析

UltiMate 3000 (Thermo Fisher Scientific) と TSQ Quantum Access MAX (Thermo Fisher Scientific) で構成された LC-MS システムを用いて測定した。Bligh and Dyer 法によって抽出した 10 μ l の脂質溶液を供し、LC 内に接続された Accucore Polar Premium LC Column (100 x 2.1mm, 2.6mm, Thermo Fisher Scientific) で脂質成分を分離し、MS によって測定されたシグナル強度が高い上位 3 種のシグナルをさらに MS/MS 分析することにより脂質の網羅的解析を行った。用いた溶液は A: アセトニトリル/メタノール/水 (18:18:2)、B: イソプロパノール、A および B の溶液に対して 0.1%ギ酸と 0.0028%アンモニアを混合させた。脂質成分の分離において溶媒 B のパーセンテージ変動は次のように設定した。0-5 分: 0-15%、5-20 分: 15-80%、20.1 分: 85%、20.1-25 分: 85%、25.1 分: 0%、25.1-32 分: 0%。流速は 0.2ml/分で一定にした。electrospray ionization 法にてイオン化した脂質分子についてポジティブおよびネガティブイオンモード共に m/z 200-2,000 の範囲で測定した。データ解析には BatMass (<http://batmass.org/>) および SeeMS (Proteo Wizard Tools, <http://proteowizard.sourceforge.net/tools.shtml>) を用いた。BatMass では検出された脂質群についてカラム溶出時間、 m/z 、シグナル強度の三次元データとしてマッピングすることが可能であった。またそれらの分子群を同定するため同時に取得していた MS/MS 分析のデータを表示させ、プリカーサイオンに対するプロダクトイオンまでの距離、いわゆるニュートラルロスを計測することにより、個々の断片化パターンを明らかにするとともに分子同定を行った。

4. 研究成果

各モデルから肝臓を摘出し、凍結組織切片を作製した。HE 染色を行った結果、NASH モデル及び抗酸化物質投与群において各所に円形の組織脱落がみられた。さらにオイルレッド O 染色を行ったところ、それらの組織脱落に近似する箇所が赤色に染められ、脂肪滴の存在が示された。この組織脱落の直径は数十 μ m に及んでいた。オイルレッド O 染色

による染色像を光学顕微鏡で観察した際に画像データを撮影し、ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/index.html>) によって赤色の輝度を数値化した。その結果、コントロール群では全く脂肪滴が存在しないのに対して、NASH モデルでは顕著な増加があることを示した。よって今回作製したモデルでは十分な脂肪肝の状態にあることが分かった。また抗酸化投与群から得られた数値は NASH モデル群と比較して有意な減少を示しておらず、その効果が十分ではないことが明らかになった。しかしながら肝臓とは異なり慢性腎臓病の症状を緩和することも考えられることから、引き続き IMS および LC-MS による解析を行った。

腎臓組織に対する IMS 解析の結果、 m/z 200-2,000 の範囲で様々なシグナルが検出された。これらのシグナルを LC-MS による網羅的解析の結果と照合したところ、すべての群からポジティブイオンモードによって phosphatidylcholine、sphingomyelin、triacylglycerol、ネガティブイオンモードによって phosphatidylethanolamine、phosphatidylserine、phosphatidylinositol、cardiolipin、脂肪酸各種の脂質群に関するシグナルが検出されていることが分かった。それら分子の一つ一つについて flexImaging を用いて腎臓組織中の分子分布を調べることによって、各分子が腎臓組織中によってダイナミックに分布が異なることが明らかになった。特に脂質分子については現時点で IMS 以外にイメージング解析の対象とすることができない。脂質の多くは複数の脂肪酸を有しており、その脂肪酸組成まで明らかにするには IMS と多段階質量分析を融合させた本研究手法以外には不可能であった。IMS による結果では、コントロール群と比較して NASH 群で明らかに違いを持つ分子群が特定された。その中でも特に NASH モデル群において m/z 1,400-1,500 の分子群が皮質領域において減少することが明らかになった。これらの分子群について組織上での多段階質量分析を実施し、同定を試みた。その結果、それらは脂肪酸組成の異なるカルジオリピンであることが分かった。カルジオリピンは脂質の一つであり、4 本の脂肪酸を有する。その脂肪酸種としては、多くがオレイン酸である。オレイン酸は高級不飽和脂肪酸の一つであり、酸化ストレスの影響を大きく受けやすい。よってカルジオリピンは酸化ストレスマーカーとしても注目される脂質である。細胞中のミトコンドリア内に含まれるカルジオリピンが酸化されると、カルジオリピンに結合していたシトクロム c が遊離し、ミトコンドリア外へと放出される。これがトリガーとなりアポトーシスが起ることが分かっている。本研究ではいくつかの抗酸化物質を動物モデルへ投与し、NASH に伴うカルジオリピンの減少を抑制する効果について検討した。その結果、ある抗酸化物質の投与によ

り脂質代謝異常を改善する傾向が示された。しかしながらカルジオリピンの減少を有意に抑制させるまでの効果を確認することはできなかった。この現象としてカルジオリピンが酸化ストレスに対して非常に鋭敏な挙動を示す分子であることが挙げられる。本研究で採用した NASH モデルの作製方法が過剰な病態をもたらすことも一つの要因となっていることが考えられた。この問題を解決するためには、1 つは NASH モデルの作製方法を変更すべきであると考えている。もう 1 つは、IMS および LC-MS によって取得された膨大なデータからカルジオリピン以外にも NASH 特異的な変動を示す分子マーカーをさらに探索することが必要となる。そのような分子マーカーに関してヒト病理組織と照合し、その合成経路に関連する分子群をさらに調べることが必要となる。現在の技術では遺伝子編集が可能となっており、特定の遺伝子について欠損、発現低下、過剰発現させることが可能であり、それらの遺伝子制御を施したマウスを作製することが可能である。現に研究代表者が所属する教室においても分子マーカーの探索後に特定の遺伝子を発現低下させたマウスモデルを作製し、その遺伝子の機能を解明した例がある。このような複合的な研究を推し進めることによって一つの研究が完結する時代が到来している。よって本研究において得られたデータをさらに精査することにより新たな分子マーカーを特定し、機能解析することによって既存の抗酸化物質以上に効果のある治療法及び薬剤の開発につながることを期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. Ishikawa S, Tateya I, Hayasaka T, Shinriki S, Masaki N, Hirano S, Kitamura M, Muto M, Morita S, Setou M, Ito J. "The Distribution of Phosphatidylcholine Species in Superficial-Type Pharyngeal Carcinoma" *Biomed Res Int*. 2017;2017:5387913. (査読有)
2. Shintani-Domoto Y, Hayasaka T, Maeda D, Masaki N, Ito TK, Sakuma K, Tanaka M, Kabashima K, Takei S, Setou M, Fukayama M. "Different desmin peptides are distinctly deposited in cytoplasmic aggregations and cytoplasm of desmin-related cardiomyopathy patients" *Biochim Biophys Acta*. 2017 Jul;1865(7):828-836. (査読有)
3. Matsumoto J, Nakanishi H, Kunii Y, Sugiura Y, Yuki D, Wada A, Hino M, Niwa SI, Kondo T, Waki M, Hayasaka T, Masaki N, Akatsu H, Hashizume Y, Yamamoto S, Sato S, Sasaki T, Setou M, Yabe H. "Decreased

16:0/20:4-phosphatidylinositol level in the post-mortem prefrontal cortex of elderly patients with schizophrenia" *Sci Rep*. 2017 Mar 23;7:45050. (査読有)

4. Hayasaka T, Fuda H, Hui S-P, Chiba H. "Imaging mass spectrometry reveals a decrease of cardiolipin in the kidney of NASH model mice" *Anal Sci*. 2016;32(4):473-476. (査読有)

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 早坂孝宏「質量分析イメージングの機能性食品成分研究への展開」北海道バイオ産業クラスター・フォーラム、2015.11.18 (北海道札幌市)
2. 早坂孝宏、布田博敏、恵淑萍、千葉仁志「NASH モデルマウス腎組織の質量分析イメージング解析」第 22 回日本未病システム学会学術総会、2015.10.11 (北海道札幌市)
3. 早坂孝宏、布田博敏、恵淑萍、千葉仁志「NASH モデルマウス腎組織における代謝変動の質量分析イメージングによる可視化」遺伝子栄養学研究会、2015.9.4、(北海道北広島市)
4. Hayasaka T, Fuda H, Hui S-P, Chiba H. "Imaging Mass Spectrometry Reveals the Decrease of Cardiolipin in Kidney of NASH Model Mouse" 63rd Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 2015.5.31-6.4, St. Louis (USA).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.surg1-hokudai.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

早坂孝宏 (HAYASAKA Takahiro)

北海道大学・医学研究院・特任助教

研究者番号：90415927