

令和元年6月25日現在

機関番号：11601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K04890

研究課題名(和文) イメージング技術が切り拓く、化学物質と自己免疫性疾患との関連性の解明

研究課題名(英文) Imaging MS reveals the relationship between xenobiotics and autoimmune diseases

研究代表者

平修(TAIRA, Shu)

福島大学・食農学類・准教授

研究者番号：30416672

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：生体異物(本研究では化粧品などに極微量含有する香料2-オクチン酸メチル:2-OAm)は年配の女性が罹患する肝臓自己免疫疾患の原因物質として疑われている。これは経皮吸収により体内に侵入し、肝疾患を引き起こすことが予想される。マウスの皮膚に2-OAmを塗布後、肝臓のNano-PALDIイメージングMSを行った。肝臓に2-OAmが蓄積していることが視覚的に示された。詳細な解析の結果胆管に2-OAmの異常蓄積が認められた。このことから、2-OAmの胆管への異常蓄積がミトコンドリア抗体の出現と胆管の選択的破壊の双方に関与している可能性がある。化粧品などの含有物質が肝臓疾患の原因であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではこれまで予測されていた肝疾患の原因を視覚的に明らかにしたことと、ナノ微粒子支援型質量分析(Nano-PALDI)法を応用したことが社会的・学術的意義を持つ。

社会的意義：肝疾患と生体異物の関係解明：2-OAm皮膚塗布 経皮吸収による肝臓への薬剤送達 長期塗布による肝臓(胆管)への蓄積 抗原と認識 アポトーシス 炎症。生体異物が臓器炎症のトリガーとなることを視覚的に示す事に成功した。

学術的意義：2-OAmは分子量が154と非常に小さな物質でありイメージングMSで使用するMALDI法では測定しにくい。Nano-PALDI法は低分子側をノイズなく測定できることから今回の成功に至った。

研究成果の概要(英文)：We analyzed localization of methyl 2-octynate (2-OAm) in sections of liver by nano particle assisted laser desorption/ionization (nano-PALDI) imaging mass spectrometry (IMS). 2-OAm was applied to mice skin and it permeated through the skin and accumulated in the liver. In livers of single dose mice, 2-OAm was delivered to the liver for 6 hours and excreted from the liver for 24 hours. On the other hand, in livers of long apply mice, 2-OAm was retained in the liver. Furthermore, we could be revealed that 2-OAm was accumulated in bile ducts by analyzing at a high resolution. In addition, CD8 staining indicated that an inflamed bile duct was observed. 2-OAm triggered the inflammation due to a coincident localization of 2-OAm and bile duct. This imaging approach is a promising technique for rapid quality evaluation of xenobiotics.

研究分野：分析化学

キーワード：イメージング 質量分析 生体異物 ナノ微粒子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々は、日常より様々な化学物質に暴露されて生活している。勿論、病気になった際の治療に必要な薬剤もあるが、意図せずに体内に取り込まれる場合がある。その殆どは、代謝され体外に排出されているが、万に一つでも例外がある場合、健康に異常を来す、生体異物 (Xenobiotics) がある。

通常、こういった分析は生検材料、外科手術で摘出された種々の臓器を用いて、ヘマトキシリン&エオジン (HE) 染色などによる形態診断が基本である。しかし、

1. 標的物質の侵入経路および体内動態を視覚的に表すのは困難。

2. 標的物質と疾病との直接の因果関係を科学的に見るのは困難。検査に3日以上要する。

つまり、新しい技術や手法の導入が求められていた。

本研究は、経口や、肌に直接塗布した場合に化学物質が、体内へ取り込まれるのか、経皮吸収するのか、吸収したならば「どこ」の「どのような」形で移動し生体に影響を及ぼすのか「ナノ微粒子イメージング質量分析」を駆使して視覚的に表し、安全性の知見を与える事が主目的である。

近年、食品添加物や化粧品などに含まれる成分の中に自己免疫疾患に関与している事が報告され、Xenobiotics として注目されている。我々は、中年女性に好発する原発性胆汁性肝硬変 (PBC) という肝臓疾患では、ミトコンドリアに対する自己抗体が出現し、その対応抗原*と極めて類似する物質が、2-オクチン酸 (2-OA) であることを報告している。2-OA は化粧品や食品添加物に含有されており、2-OA の皮膚から肝臓への移行、蓄積と、それを標的にした免疫異常が起きている可能性が示唆されるが、2-OA などの低分子 Xenobiotics は、特異抗体が存在しないため、その体内での局在についてはこれまでまったく解析がなされていないのが現状である。

2. 研究の目的

現在、数多くの化学物質が開発されている。それらの殆どは、我々にとって生体異物 (Xenobiotics) であり生体への影響が懸念される。個々の物質は厳密な安全性試験をクリアしているが、それらが体内のどこに蓄積され、種々の代謝を受けた場合、どのような影響を受けるのかについては十分に分かっていない。意図せずに生体異物に接触、摂取し、それが原因で内臓疾患を引き起こす恐れがある。こういった生体異物暴露後の侵入経路・体内動態を「ナノ微粒子イメージング質量分析」という新しい手法で「見る」ことによって、疾病機構解明、化学物質の安全性評価に貢献することが目的である。

3. 研究の方法

(1). 2-OA 塗布マウスの作製

マウスの皮膚に 0.1%, 2-OA を塗布する。

塗布後、1, 3, 6, 24 時間後に血液、肝臓、膵臓、皮膚を採取する。また、長期塗布モデルとして、週一回 17 週塗布マウスも作成する。

(2). 2-OA 経口投与モデルマウス作製

マウスに 0.1%, 2-OA を 100 μ L 経口ゾンデ投与する。1, 3, 6, 24 時間後に血液、肝臓、膵臓、皮膚を採取する。長期投与と群も同じく作成する。

(3). 肝臓病理切片とイメージング MS 像との比較・解析

肝臓の連続切片 (10 μ m 厚) を作製し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色、CD8 (炎症マーカー) 染色像とイメージング MS で得られた 2-OA の局在を比較する。

(4). CD8 (炎症マーカー) 染色と 2-OA の局在解析

原発性胆汁性肝硬変 (PBC) では胆管の炎症 (CD8(+)) が見られている。マウスサンプル切片を CD8 染色し、炎症の有無、その局在を調べる。2-OA の局在が肝臓内の血管、胆管で一致するか、イメージング MS を用いて明らかにする。

4. 研究成果

生体異物 (本研究では化粧品などに極微量含有する香料 2-オクチン酸メチル: 2-OAm) は年配の女性が罹患する肝臓自己免疫疾患の原因物質として疑われている。これは経皮吸収により体内に侵入し、肝疾患を引き起こすことが予想される。マウスの皮膚に 2-OAm を塗布後、肝臓の Nano-PALDI イメージング MS を行った。肝臓に 2-OAm が蓄積していることが視覚的に示された。詳細な解析の結果胆管に 2-OAm の異常蓄積が認められた。このことから、2-OAm の胆管への異常蓄積がミトコンドリア抗体の出現と胆管の選択的破壊の双方に関与している可能性がある。化粧品などの含有物質が肝臓疾患の原因であることを示した。

本研究ではこれまで予測されていた肝疾患の原因を視覚的に明らかにしたことと、ナノ微粒子支援型質量分析 (Nano-PALDI) 法を応用したことが社会的・学術的意義を持つ。

社会的意義: 肝疾患と生体異物の関係解明: 2-OAm 皮膚塗布 経皮吸収による肝臓への薬剤送達 長期塗布による肝臓 (胆管) への蓄積 抗原と認識 アポトーシス 炎症。生体異物が臓器炎症のトリガーとなることを視覚的に示す事に成功した。

学術的意義: 2-OAm は分子量が 154 と非常に小さな物質でありイメージング MS で使用する MALDI 法では測定しにくい。Nano-PALDI 法は低分子側をノイズなく測定できることから今回の成功に至った。

5. 主な発表論文等 (全て査読有り)

[雑誌論文](計14件)

1. Y. Tanaka, A. Ikeda, S. Matsukawa, Y. Imase, M. Saikyo, C. Maruyama, S. Taira (責任著者) "Concurrent mass spectrometric analysis of multiple samples using Py-Tag reagents"

International Journal of Mass Spectrometry 434, 158-163 (2018)

2 Yasuyuki Fujii, Kenta Suzuki, Yahiro Hasegawa, Fumio Nanba, Toshiya Toda, Takahiro Adachi, Shu Taira, Naomi Osakabe "Single oral administration of flavan 3-ols induces stress responses monitored with stress hormone elevations in the plasma and paraventricular nucleus" *Neuroscience Letters* **682**, 106-111 (2018)

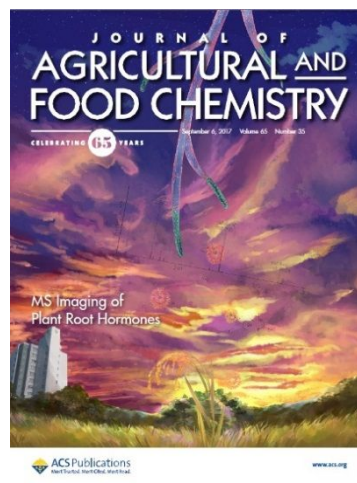
3. Tetsuyuki Takahashi, Ulrich Deuschle, Shu Taira, Takeshi Nishida, Makoto Fujimoto, Takao Hijikata, Koichi Tsuneyama "Hepatocellular carcinomas in metabolism-related genes expression and bile acid accumulation" *Hematology International* 12, 254-261 (2018)

4. M. Shiota, Y. Shimomura, Mariko Kotera and S. Taira "Mass Spectrometric Imaging of Localization of Fat Molecules in Water-in-Oil Emulsions Containing Semi-Solid Fat" *Food Chemistry* **245**, 1218-1233 (2018)

5. K. Kawabata, N. Baba, T. Sakano, Y. Hamano, S. Taira, A. Tamura, S. Baba, M. Natsume, T. Ishii, S. Murakami and H. Ohigashi "Functional properties of anti-inflammatory substances from quercetin-treated *Bifidobacterium adolescentis*" *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **22**, 1-9 (2017)

6. Y. Tatsuta, K. Kasai, C. Maruyama, Y. Hamano, K. Matsuo, H. Katano, S. Taira (責任著者) "Imaging mass spectrometry analysis of ubiquinol localization in the mouse brain following short-term administration" *Scientific Reports* **7**, Article number: 12990 (2017)

7. K. Shiono, R. Hashizaki, T. Nakanishi, T. Sakai, T. Yamamoto, K. Ogata, K. Harada, H. Ohtani, H. Katano, S. Taira (責任著者) "Multi-imaging of cytokinin and abscisic acid on the roots of rice (*Oryza sativa*) using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **65**, 7624-7628 (2017)
DOI: 10.1021/acs.jafc.7b02255 (表紙として掲載)



8. K. Kawabata, K. Kitamura, et al S. Taira (7th), H. Ohigashi, S. Murakami, B. Kawakami "Triterpenoids isolated from *Ziziphus jujuba* enhance glucose uptake activity in skeletal muscle cells Increased muscle glucose uptake by jujube triterpenoids" *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* **63**, 193-199 (2017)

9. K. Kawabata, Y. Tatsuta, S. Nakada, S. Naruse, S. Murakami, H. Katano and S. Taira (責任著者) "Visualization of triterpenoids in mice fed by mass spectrometry imaging" *Agricultural Research & Technology: Open Access Journal* **10**, (2017)

10. Y. Tatsuta, Y. Tanaka, A. Ikeda, S. Matsukawa, H. Katano, S. Taira (責任著者) "Nanoparticle-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry (Nano-PALDI MS) with Py-Tag for the analysis of small molecules" *Mass Spectrometry* S0069 (2017)

11. H. Katano, Y. Kuroda, S. Taira, C. Maruyama, Y. Hamano "Colorimetric microtiter plate assay of polycationic aminoglycoside antibiotics in culture broth using amaranth" *Analytical Sciences* **33**, 499-504 (2017)

12. S. Taira, N. Yamaguchi., S. Morimoto., Y. Tatsuta., H. Katano., Y. Ichianagi., K. Tsuneyama and K. Kikuchi "Liver disease risk of xenobiotics due to percutaneous absorption revealed by nano-paldi imaging mass spectrometry" *International Journal of Recent Scientific Research* **7**, 12589-12592 (2016)

13. S. Morimoto, T. Ishikawa, K Hyodo, T. Yamazaki, S. Taira, K. Tsuneyama and Y. Ichianagi "Preparation and characterization of newly developed matrix using functional -Fe2O3 nanoparticles for mass spectrometry in small molecules" *Surface and Interface Analysis* **48**, 1127-1131 (2016)

14. R. Hashizaki, H. Komori, K. Kazuma, K. Konno, K. Kawabata, D. Kaneko, H. Katano, S. Taira (責任著者) "Localization analysis of natural toxin of *Solanum tuberosum* L. via mass spectrometric imaging" *International Journal of Biotechnology for Wellness Industries* **5**, 1-5 (2016)

〔学会発表〕(計 16 件)

1. Concurrent mass spectrometric analysis of multiple samples using Py-Tag reagents, Shu TAIRA Euro Analysis 2017 (Sweden) (Oral)
2. Nano-PALDI MS for bioanalysis, Shu TAIRA BMS Symposium 2016, Nov. 2016, Tokyo (Japan) (Invited, Oral)
3. Shu TAIRA “Hybrid nanoparticle-assisted laser desorption/ionization (Nano-PALDI) MS for bioanalysis”, 21st International Mass Spectrometry Conference (IMSC 2016), Aug. 2016 (Canada) (Poster)
4. 受賞講演 「ナノ微粒子支援型レーザー脱離/イオン化(Nano-PALDI)法の開発」平修 第 64 回質量分析化学討論会 2016 年 5 月, 大阪
5. “Localization analysis of pesticide residue in cucumber sample by Imaging mass spectrometry”, Shu TAIRA 21st International Mass Spectrometry Conference (IMSC 2016), Aug. 2016 (Canada) (Poster)
6. イメージング MS による化学物質を原因とする肝疾患の解析 平修, 片野肇, 日本分析化学会第 66 回年会(口頭) 2017 年 9 月, 東京
7. Nano-PALDI MS イメージング法による残留農薬の可視化 平修, 片野肇, 第 65 回質量分析総合討論会 2016 (口頭) 2017 年 5 月, つくば
8. Mix Nano-PALDI 法によるトリテルペン類のイオン化効率の向上と考察, 平修, 片野肇, 第 65 回質量分析総合討論会(ポスター) 2017 年 5 月, つくば
9. Py-Tag 試薬を用いたタンパク質群の高精度同時解析, 平修, 池田明夏里, 片野肇, 第 77 回分析化学討論会(口頭) 2016 年 5 月, 京都
10. イメージング質量分析による筋肉部位のタウリンの局在解析, 平修, 片野肇, 村上茂る, 第 3 回国際タウリン研究会日本部会(口頭) 2016 年 3 月, つくば
11. ハイブリッド Nano-PALDI 質量分析による低~高分子の検出, 平修, 片野肇, 第 21 回高分子分析討論会, (口頭) 2016 年 9 月, 名古屋
12. ナノ微粒子質量分析による生体分子解析, 平修, 片野肇, 第 10 回バイオ関連化学シンポジウム(ポスター) 2016 年 9 月, 金沢
13. ナノ微粒子支援型レーザー脱離/イオン化法の開発とその応用, 平修 第 76 回分析化学討論会(口頭) 2016 年 5 月, 岐阜
14. ハイブリッド-ナノ微粒子支援型質量分析法による低~高分子の一斉検出, 片野肇, 平修 第 76 回分析化学討論会(ポスター) 2016 年 5 月, 岐阜
15. イメージング質量分析によるタウリンの体内動態解析, 平修, 第 2 回国際タウリン研究会日本部会(口頭) 2016 年 3 月, 福井
16. MS イメージングによるジャガイモ天然毒局在解析, 平修 第 63 回質量分析総合討論会, (口頭) 2015 年 6 月, つくば市.

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: 質量分析用イオン化支援剤及びこれを使用した質量分析法

発明者: 平修

権利者: 福井県立大学

種類: 特許

番号: 特願 2015-238621

出願年: 2015

国内外の別: 国内

〔その他〕

受賞

2016 年 5 月 日本質量分析学会 奨励賞

「親和性ナノ微粒子による選択的レーザー脱離イオン化研究とイメージング質量分析への展開」