

平成 22 年 3 月 8 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20790419

研究課題名（和文）質量顕微鏡分析を用いた疾患組織検査方法の確立

研究課題名（英文）Establishment of new pathological analysis by imaging mass spectrometry

研究代表者

財満 信宏（ZAIMA NOBUHIRO）

浜松医科大学・分子イメージング先端研究センター・特任助教

研究者番号：40455572

研究成果の概要（和文）：現在の生検組織検査は染色などの生化学的手法によるものが一般的である。この生化学的手法は疾患の診断や病理解析には不可欠の技術であるが、ターゲット不明の疾患には不向きであるという欠点がある。原因不明疾患の解析ではノンターゲットな病理解析の方法が必須である。本研究は、近年開発された質量顕微鏡を用いて簡便で多くの情報を得ることができる病態検査方法を検討し、ノンターゲットで病理サンプル上の異常代謝物を同定する方法を確立した。

研究成果の概要（英文）：Biochemical approaches, such as staining, are widely used as pathological analysis. These methods are essential for pathological analysis. However, they have some disadvantages. For example, they cannot be applied to non-targeting analysis. Establishment of new pathological method is important to analyze idiopathic disease. In this study, new pathological analysis using imaging mass spectrometry for non-targeting analysis was established.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000円	480,000円	2,080,000円
2009年度	1,600,000円	480,000円	2,080,000円
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000円	960,000円	4,160,000円

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：質量顕微鏡法、病理解析、脂質代謝異常

1. 研究開始当初の背景

現在の生検組織の検査は染色などの生化学的手法によるものが一般的であり、様々な方法が臨床現場において用いられている。生化学

的手法は疾患の診断には不可欠の技術であるが、原因不明の疾患の検査には不向きであるという欠点がある。病理解析の現場では原因不明の疾患の解析を求められることが

多いため、ノンターゲットでの解析が可能な手法を確立する必要があった。

2. 研究の目的

疾患の確定診断がなされていない検体に対する組織検査法の確立を目的とした。疾患のモデルとしてまずは代謝異常症を設定し、組織上での代謝物の可視化、多変量解析による異常代謝物の検出、代謝物の同定ができるレベルの解析方法を確立することを目的とした。代謝物可視化のモデルには多臓器の同時観察が可能なメダカを用い、異常代謝物検出のモデルとしては、人工的に誘導したマウス脂肪肝と、脂質蓄積ミオパチーを用いた。

3. 研究の方法

組織を質量顕微鏡で測定し、多変量解析とイメージ解析で組織上の代謝状況を俯瞰する手法を検討した。

代謝物可視化のモデルには小型で多臓器を一度に検出することが可能なメダカを用いた。メダカを液体窒素で凍結した後、クライオスタットで $8\mu\text{m}$ の切片を作成し、ITO (Indium Thin Oxide) コートしたスライドガラス上に接着させ、DHB (2,5-Dihydroxy benzoic acid) 溶液を塗布し、質量顕微鏡分析に供した。質量顕微鏡分析には Nd:YAG レーザー (波長 355nm、周波数 200Hz) を搭載した Ultraflex II TOF/TOF (Bruker Daltonics) を使用した。

人工誘導脂肪肝及び、脂質蓄積ミオパチー解析における基本的な実験の流れは、①直接質量分析による組織内代謝物の網羅的検出、②主成分分析による異常ピークの発見、③組織上 MS/MS による異常ピークの同定、④異常物質の可視化である。

$8\mu\text{m}$ の生検筋新鮮凍結切片を ITO (Indium Thin Oxide) コートしたスライドガラス上に接着させ、DHB (2,5-Dihydroxy benzoic acid) 溶液を塗布し、直接質量分析を行った。

質量分析計は Nd:YAG レーザー (波長 355nm、周波数 200Hz) を搭載した Ultraflex II TOF/TOF (Bruker Daltonics) を使用した。

4. 研究成果

質量顕微鏡分析によりメダカの脳、目、肝臓に特徴的なマススペクトルが観察された。観察されたピークのうち、ホスファチジルコリン (PC) (1-acyl 34:2) ^{*}、PC(1-acyl34:1) ^{*}、PC(1-acyl36:4) ^{*} であると組織上 MS/MS によって同定したピークを画像化した結果 (図 1)、PC (1-acyl 34:2) は組織全体、PC(1-acyl34:1) は脳と目、PC(1-acyl36:4) は肝臓に多く存在することがわかった。

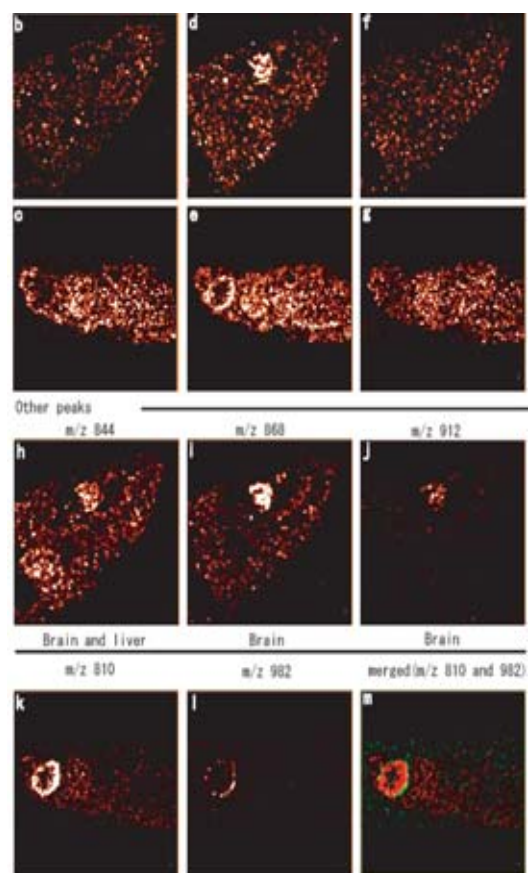


図 1 メダカ切片における代謝物可視化

人工誘導脂肪肝モデルにおいては、誘導脂肪肝と正常肝臓から直接質量分析によって、得たデータを主成分分析によって解析した。その結果、脂肪肝と正常肝は二次元主成分プロ

ットにより分類されることがわかった (図 2)。

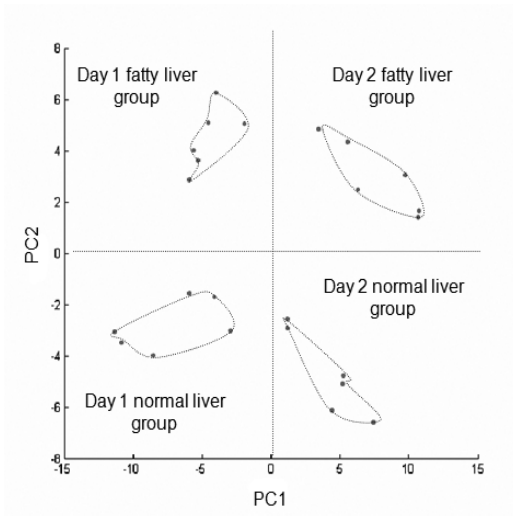


図 2 正常肝と脂肪肝の二次元主成分プロット

さらに分類に影響を及ぼしたピークを画像化し (図 3)、3 代謝物に関しては同定することに成功した。この結果、質量顕微鏡で得たデータに主成分分析を適用することによって、ノンターゲットな疾患組織解析ができることがわかった。

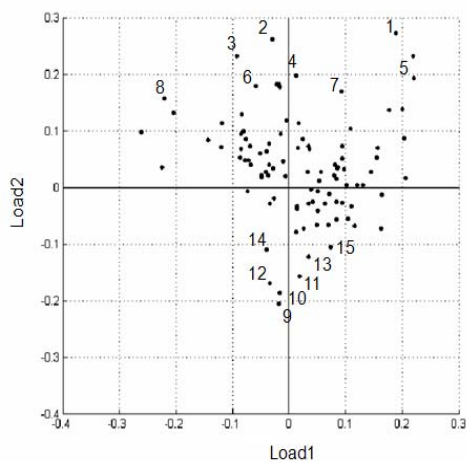


図 3 Loading Plot

脂質蓄積ミオパチーの解析に関しては、生検組織から得られたピークのうち、検出強度の高い上位 100 ピークに対して主成分分析を行

うことにより、疾患組織において有意に増加しているピークは $m/z=780, 782, 772, 596, 808$ であることが分かった。これらのピークのうち、 $m/z=780, 782, 808$ はそれぞれホスファチジルコリン (PC) (1-acyl 34:2)、PC(1-acyl34:1)、PC(1-acyl36:2) であると組織上 MS/MS によって同定され、さらにこれらの PC を可視化した結果、組織損傷の進んだ部位に PC が蓄積していることがわかった。PC の代謝物であるリゾ PC (LPC) は疾患組織において有意に増加しており、患者由来細胞に対して LPC が強い毒性を示すことがわかった。これらの結果により、組織損傷部位に PC が異常蓄積することがわかり、筋力低下が引き起こされるメカニズムの一つが、PC 代謝物の細胞に対する毒性であることが示唆された。IMS の特長である代謝物の可視化は、脂質生化学をはじめとして幅広い応用可能性があると考えられる。

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 2 件) すべて査読あり

- 1 Zaima N, Matsuyama Y, Setou M : Principal component analysis of direct matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric data related to metabolites of fatty liver. J Oleo Sci, 58: 267-273, 2009
- 2 Zaima N, Hayasaka T, Goto-Inoue N, Setou M : Imaging of metabolites by MALDI mass spectrometry. J Oleo Sci, 58: 415-419, 2009

[学会発表] (計 2 件)

- 1 Zaima, N., Sugiura, Y., Ohkuma, A., Okahashi, S., Noguchi, S., Nishino, I., Ibi, Tohru., Ozawa, F., Sahashi, K. and Setou M.: Analysis of Lipid Storage Myopathy (ETFDH mutant or PNPLA2 mutant) by Direct Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. Conference Proceedings, 56th ASMS Conference on Mass Spectrometry (USA), 2008年5月6日
- 2 Zaima, N., Sugiura, Y., Hirano, K., Ohkuma, A., Okahashi, S., Noguchi, S., Nishino, I., Ibi, T., Sahashi, K., Setou, M.: The abnormal accumulation of metabolites in neutral lipid storage myopathy caused by adipose triacylglycerol lipase mutation. The American Oil Chemists' Society (USA), 2009年5月4日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

財満 信宏 (ZAIMA NOBUHIRO)

浜松医科大学・分子イメージング先端研究センター・特任助教

研究者番号：40455572

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし