

機関番号：13802

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790315

研究課題名 (和文) 質量分析イメージングを用いたヒト加齢黄斑変性症バイオマーカー探索

研究課題名 (英文) Biomarker Analysis from Human Age-Related Macular Degeneration using Imaging Mass Spectrometry

研究代表者

早坂 孝宏 (HAYASAKA TAKAHIRO)

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：90415927

研究成果の概要 (和文)：

本研究では質量分析イメージングを用いたヒト加齢黄斑変性症バイオマーカーの探索を目的とした。組織切片上から生体分子を直接イオン化するためのマトリクス塗布方法の最適化や金属ナノ粒子を用いたイオン化法を見出し、各種脂質および脂肪酸の検出・可視化に成功した。これらをヒト加齢黄斑変性症由来の組織切片へ適用することにより、健常者との比較を行い、疾患特異的に発現するバイオマーカー候補分子を明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：

In this study we tried to detect biomarkers of human age-related macular degeneration (ARMD) using imaging mass spectrometry (IMS). The optimization of conventional matrices onto the surface of biological section and the application of metal core nanoparticles as a matrix enabled us to detect several lipids and fatty acids by IMS analysis. We revealed the specific biomarker from ARMD compared with normal tissue section.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：質量分析

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：網膜、加齢黄斑変性症、質量分析、イメージング、バイオマーカー

## 1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会を迎えた日本において加齢に伴う各疾患の発症メカニズムを解明することは火急の課題となっている。その中で眼の疾患に関しては、欧米に比べて遅れを取っているのが現状である。この理由としては、日本においてはヒトの死後に眼球を摘出し、基礎研究に使用される体制がほとんど存在しないことにある。加齢黄斑変性症は網膜の

中心に存在する黄斑に異常が生じ、見ている対象物が歪み、中心が暗く、部分的に欠けるなどの症状を招き失明の危険に曝される。この発症因子としては加齢、日光、喫煙、過剰な脂質量の摂取があり、高血圧症や動脈硬化症など循環器障害によって生じるとも言われている。日本における超高齢化に比例し、その罹患者は10年の間に倍増し、現在3万人とも言われる罹患者が存在する。

研究代表者は大学在学時に活性酸素が及ぼす老化への影響について研究するため、生化学的手法を用いて脂質および過酸化脂質量の変動を調べてきた(Onodera et. al., Free Radic. Res., 2003, Fukui et. al., Ann. NY Acad. Sci., 2002)。しかし脂質を検出するためには、組織から抽出・精製する必要があったことから、局所的な分布との相関性を明らかにすることはできなかつた。現在、申請者の所属する研究室で開発が進められている質量分析イメージングは、数  $10\mu\text{m}$  オーダーの解像度において組織切片から直接質量分析及びイメージングが可能な分子イメージングの方法として、注目を浴びている(Shimma et. al., Anal Chem, 2008)。一般的に組織切片をそのまま質量分析イメージングに応用することにより、細胞表面に豊富に含まれる脂質を主要な成分として検出することができる。従来手法とは異なり、抽出・精製を必要とせず、脂肪酸組成など詳細な構造の違いを明らかにし、組織上における生体分子の局在を明らかにすることが可能である。そのため生体分子の構造解析と局在の可視化を可能にする質量分析イメージングに対する期待は大きく、医学的応用が期待されている。

## 2. 研究の目的

研究代表者は、JST 先端計測分析技術のプロジェクトメンバーとして顕微質量分析装置の開発に携わってきた。その顕微質量分析装置を用いた質量分析イメージングをマウス眼球由来網膜へ応用し、マウス網膜を直接測定することにより多数のシグナルを検出した。また、それらのシグナルについて多段階質量分析を行うことによってホスファチジルコリン(PC)として同定し、脂肪酸組成の違いまで明らかにした。さらにPCの網膜上における分布を可視化したところ、 $150\mu\text{m}$  幅の網膜を3層の構造として識別することに成功した(Hayasaka et. al., Rapid Commun Mas s Spectrom. 2008)。加齢黄斑変性症は日光や脂質摂取が発症因子として挙げられており、それに関連した過酸化脂質量の増加が報告されている。そのため疾患患者の網膜上において、PCなど正常な脂質の減少が予想される。質量分析イメージングによってその現象を可視化することにより、網膜のどの層において、どのような脂質が変性することが原因となって発症するかを明らかにすることができる。さらには脂質によっては、その分布さえも変化することが考えられる。

## 3. 研究の方法

まず主に生体分子のイオン化を促進するマトリックスに主眼を置き、組織切片上への塗布条件を最適化することにより、質量分析

イメージングによって検出される脂質種のさらなる拡大を図る。最適化したマトリックス塗布条件をヒト試料へ適用し、ヒト加齢黄斑変性症および健常者由来の網膜組織切片上における質量分析イメージングを行う。この測定により脂質の同定および分布解析を行い、加齢黄斑変性症におけるバイオマーカーを探索し、発症メカニズムの解明を試みる。

## ①マウス網膜を用いた脂質の網羅的検出技術の開発

質量分析イメージングを用いたマウス由来網膜の組織切片上からの脂質の検出について報告されているのは研究代表者の研究からのみである。この研究ではリン脂質の一種であるPCを対象とした脂質の検出を行っており、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、スフィンゴミエリンなど比較的体内に多く存在する脂質群についての検出を行っていない。マウス網膜上からこれら未検出の脂質群の網羅的検出を行い、多段階質量分析により構造解析を行う。この問題にはマトリックスの種類や塗布条件が大きく影響する。マトリックスの溶解にはメタノールなどの有機溶媒および水の混合溶媒を用いるが、この比率変化によっても検出される生体分子にも影響を与えることから、様々な混合比を試す。組織切片上へのマトリックス塗布に関しては、我々の研究室ではハンディースプレーを用いてきた。ハンディースプレーでは湿度などの実験環境が影響する。この組織切片上へのマトリックス塗布条件を一定にするため、Bruker Daltonics社のマトリックススプレー機ImagePrepを用いて行う。ImagePrepは内部に搭載されているコンピュータを操作することによって、塗布量から乾燥時間まで塗布条件を細かく設定することができる。

## ②質量分析イメージングによるヒト加齢黄斑変性症の解析

質量分析イメージングでは凍結組織切片を用いる。研究代表者が報告した研究ではマウス眼球を使用していた。マウスに比べて今回使用するヒトの眼球はサイズが大きいことから、凍結切片の作成は容易ではない。この問題はすでにウサギ眼球からの切片作成で経験しており、クライオスタット内の温度条件を振ることで解決する。また切片の厚さは切片作成に影響を及ぼすだけでなく、薄くすることでイオン化効率を向上させることが明らかになっている。そのため本研究では出来るだけ薄い凍結切片を作成する条件を検討する。マトリックスは先に行う最適化条件を用いて、加齢黄斑変性症および健常者由来の網膜切片を質量分析イメージングにより解析する。検出された脂質については多段

階質量分析により詳細な構造解析を行い、その分布を比較する。組織切片を対象とする質量分析イメージングでは、加齢黄斑変性症と健常者から検出されるシグナルに差が見られたとしても構造解析による同定まで至らないことが考えられる。その場合は、我々の研究室で所有しているレーザーマイクロダイセクションおよびLC-IT-TOFを用いて解析することで、疾患特異的な変動を示す脂質を明らかにする。以上の解析により加齢黄斑変性症に影響するバイオマーカーを探索し、その発症メカニズムの解明を試みる。

#### 4. 研究成果

本研究はヒト加齢黄斑変性症の発症メカニズムの解明を目的としたバイオマーカーの探索を目指している。解析手法として採用する質量分析イメージングは、組織切片上に予めマトリックスと呼ばれるイオン化促進の働きを持つ有機試薬を均一に塗布し、レーザー照射によるラスタースキャンを行う。これによって得られた各点のスペクトルから任意のシグナルを抽出し、各点でのシグナル強度に応じた二次元分布として生体分子を可視化する手法である。この手法では、様々な分子が混在して構成される組織切片に対して直接質量分析を行うことから、検出可能な分子が制限されてきた。動物およびヒト由来の組織切片を用意し、切片上へのマトリッ

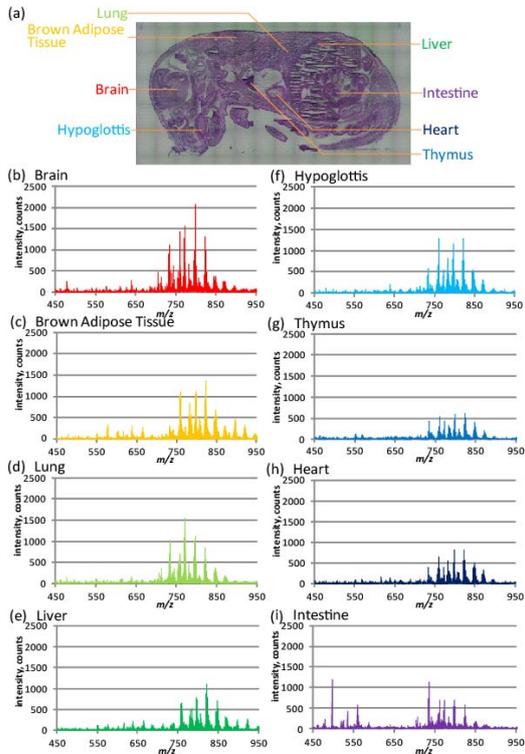


図 1. マウス胎児を用いた生体分子の網羅的検出の結果

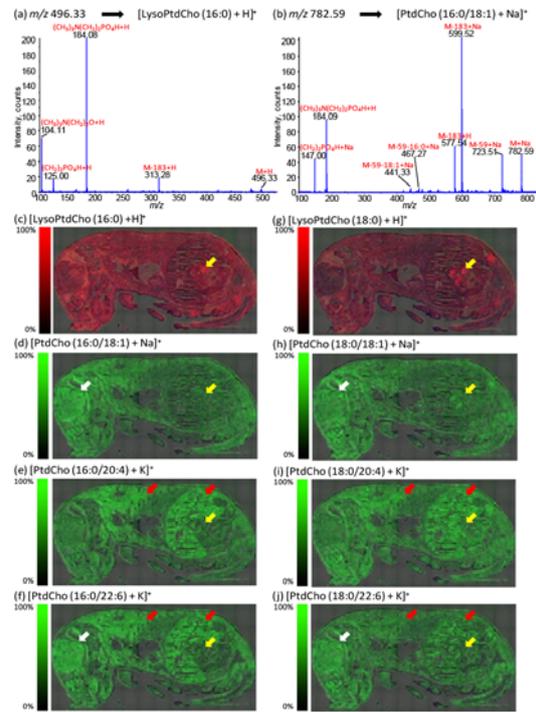


図 2. マウス胎児から可視化された生体分子群と同定結果

クス塗布方法の最適化を行うことによって多くのシグナルを検出し (図 1)、各分子の分布を可視化することに成功した (図 2)。さらに組織切片上において多段階質量分析を行うことによって、これまで質量分析イメージングで報告されてきたホスファチジルホリンやスフィンゴミエリン (PC) だけでなく、そのリゾ体とトリアシルグリセロールの分子同定を脂肪酸組成を含めて解明することに成功した。リン脂質のリゾ体は様々な疾患に影響を及ぼすことが報告されている。次に計画しているヒト加齢黄斑変性症の試料を解析し、バイオマーカーを探索する上でリン脂質のリゾ体は非常に重要な解析対象となる可能性がある。以上の成果を *Lipids* (2009) に報告した。

また我々が開発している質量顕微鏡は市販の装置に比べてレーザー径を  $10\ \mu\text{m}$  まで絞り込み、検出感度を向上させた装置である。この装置を用いることにより、状況に応じた局所解析が可能になる。本研究ではヒト試料への質量顕微鏡法の応用を行うと共に、非常に微小な構造を有する胎盤中の幹絨毛および週末絨毛の可視化を試みた。その結果、PC とスフィンゴミエリンの可視化に成功した。本研究により検出された PC は炎症作用に重要な役割を果たすアラキドン酸を有するものであることから、質量分析イメージングがヒト病理組織解析に対する重要なツールとなり得ることが示唆された。以上の成果を *Placenta* (2010) に報告した。

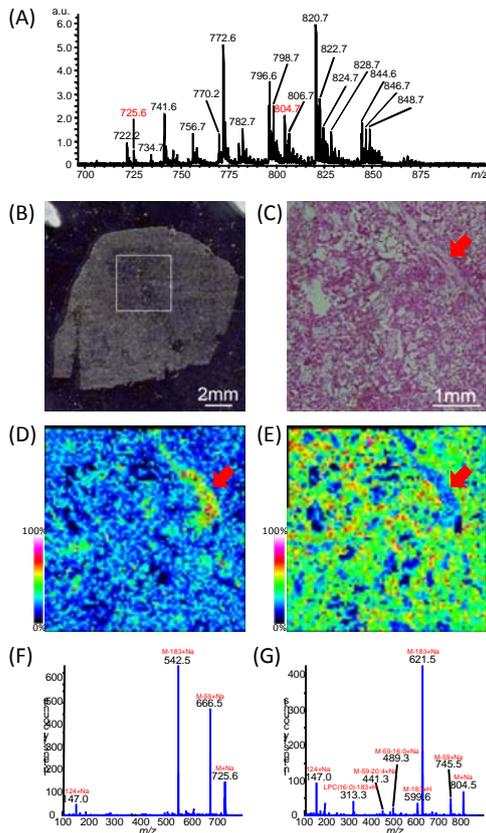


図 3. ヒト胎盤組織切片から検出および可視化された生体分子と同定結果

ここまでに既存のマトリックスを塗布し、生体分子を検出するための条件を最適化した。さらに多くの生体分子を検出することを目的として、銀を核としたナノ粒子をマトリックスとして代用することによるイオン化を試みた。その結果、これまでの手法では検出することができなかった各種脂肪酸の検出および可視化に成功した (図 4, *J Am Soc Mass Spectrom*, 2010)。既存のマトリックスでは生体分子との巨大な共結晶を形成することから、質量分析イメージングの解像度を低下させる要因となっていた。ナノ粒子は微小な結晶を形成することから、微小な構造領域を有する網膜へも有用であることが明らかになった。

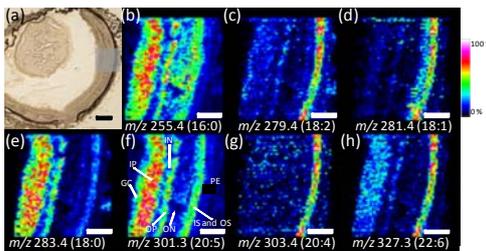


図 4. 銀ナノ粒子を用いたマウス網膜における脂肪酸の可視化

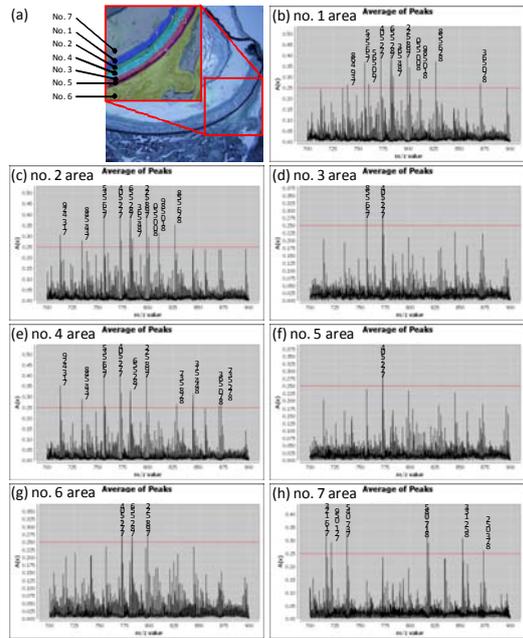


図 5. 新規ソフトウェアにより自動抽出されたシグナル群

質量分析イメージングによって取得されるデータセットは膨大であり、その解析には長時間を有し、特異的な分布を有する生体分子の探索を遅らせる要因になっていた。そこでデータセットから自動的に有意義な生体分子のシグナルを検索するソフトウェアを開発した (*Anal Bioanal Chem*, in press)。そのソフトウェアをマウス網膜から取得されたデータセットへ適用したところ、網膜の各構造別に発現する脂質種を自動的に抽出するに成功した。これらの手法をヒト加齢黄斑変性組織へ応用し、様々な種類のシグナルを検出している。この解析により、病理特異的に発現する分子種を特定することが期待される。

## 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 4 件)

① Hayasaka T, Goto-Inoue N, Ushijima M, Yao I, Yuba-Kubo A, Wakui M, Kajihara S, Matsuura M, Setou M. “Development of imaging mass spectrometry (IMS) dataset extractor software, IMS Convolution” *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 査読有り, in press

② Hayasaka T\*, Goto-Inoue N, Zaima N, Shrivastava K, Kashiwagi Y, Yamamoto M, Nakamoto M, Setou M. “Imaging Mass Spectrometry with Silver Nanoparticles Reveals the Distribution of Fatty Acids in Mouse Retinal Sections” 査読有り, 21(8),

2010, 1446-1454. \*Corresponding author.  
③Kobayashi Y\*, Hayasaka T\*, Setou M, Itoh H, Kanayama N. "Comparison of Phospholipid Molecular Species between Terminal and Stem Villi of Human Term Placenta, 査読有り, 31(3), 2010, 245-248. \* First two authors equally contributed.  
④ Hayasaka T, Goto-Inoue N, Zaima N, Kimura Y, Setou M. "Organ-Specific Distributions of Lysophosphatidylcholine and Triacylglycerol in Mouse Embryo" Lipids, 査読有り, 44(9), 2009, 837-848.

[学会発表] (計 9 件)

- ①早坂孝宏「質量顕微鏡法を用いた分子イメージング」第 125 回質量分析学会関西談話会, 2010 年 9 月 25 日 (神戸薬科大学)
- ②早坂孝宏、井上菜穂子、財満信宏、Kamlesh Shrivastava、柏木行康、山本真理、中許昌美、瀬藤光利「質量顕微鏡法へのナノ粒子の応用」第 48 回日本生物物理学会年会, 2010 年 9 月 22 日 (東北大学)
- ③早坂孝宏、井上菜穂子、財満信宏、Kamlesh Shrivastava、柏木行康、山本真理、中許昌美、瀬藤光利「銀ナノ粒子を用いた質量分析イメージングによる脂肪酸の可視化」日本油化学会第 49 回年会, 2010 年 9 月 17 日 (北海道大学)
- ④早坂孝宏、瀬藤光利「MALDI-TOF MSを用いた質量顕微鏡法」マイクロビームアナリシス第 141 委員会第 141 回研究会, 2010 年 8 月 30 日 (名古屋大学)
- ⑤早坂孝宏、瀬藤光利「金属ナノ粒子を用いた生体試料の質量分析イメージング」第 2 回ナノインク懇話会, 2010 年 8 月 27 日 (大阪市立工業研究所)
- ⑥早坂孝宏、井上菜穂子、財満信宏、Kamlesh Shrivastava、柏木行康、山本真理、中許昌美、瀬藤光利「銀ナノ微粒子を用いたマウス網膜の質量分析イメージング」第 58 回質量分析総合討論会, 第 1 回アジア・オセアニア質量分析会議, 2010 年 6 月 16 日 (つくば)
- ⑦早坂孝宏、財満信宏、池上浩司、小西慶幸、瀬藤光利「分子イメージングによる形態学」第 115 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2010 年 3 月 28 日 (岩手医科大学)
- ⑧ Takahiro Hayasaka, Naoko Goto-Inoue, Nobuhiro Zaima, Mitsutoshi Setou "Imaging mass spectrometry revealed the tissue-specific distributions of lysophosphatidylcholine and triacylglycerol in mouse embryonic sections" 第 61 回日本細胞生物学会大会, 2009 年 6 月 4 日 (名古屋)
- ⑨早坂孝宏、井上菜穂子、財満信宏、瀬藤光

利「MSイメージングを用いたマウス胎児におけるLPC及びTAGの解析」第 57 回質量分析総合討論会, 2009 年 5 月 13 日 (つくば)

[図書] (計 1 件)

①Takahiro Hayasaka "Chapter 8: Method of Operating AXIMA-QIT as Imaging Instrument", Imaging Mass Spectrometry: Protocols for Mass Microscopy, 2010, 15.

[その他]

ホームページ等

<http://www.hama-med.ac.jp/mt/setou/ja/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

早坂 孝宏 (HAYASAKA TAKAHIRO)  
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：90415927

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

該当なし