

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 1 日現在

機関番号：13802

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659534

研究課題名（和文） 質量顕微鏡を用いたヒト胎盤絨毛における生体高分子発現の解析方法の開発

研究課題名（英文） An application of imaging mass spectrometry to human placentas

研究代表者

伊東 宏晃 (ITOHI HIROAKI)

浜松医科大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：70263085

研究成果の概要（和文）：

「質量顕微鏡」法は、生体組織切片においてこの質量分析(MS)を二次元で行い任意の生体高分子の分布を検出する画期的な新規解析技術である。本研究計画は「質量顕微鏡」を用いてヒト胎盤絨毛における生体高分子分布の解析方法の確立を世界で初めて試み、幹絨毛と終末絨毛では sphingomyelin (d18:1/16:0) と phosphatidylcholine (16:0/20:4) 分布が異なることを明らかとなった。さらに、妊娠末期の重症妊娠高血圧腎症の終末絨毛では四種類の生体高分子が特異的に発現亢進していること見だし、その疾患特異性、血中濃度の測定について基礎的な研究を行っている。

研究成果の概要（英文）：

A matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI)-based mass spectrometer provides clear two-dimensional molecular identification with highly sensitive mass spectrometry from mixtures of ions generated on tissue surfaces. We applied this technology to the molecular identification of phospholipids in the human term placenta and found that sphingomyelin (d18:1/16:0) and phosphatidylcholine (16:0/20:4) were distributed differently between stem and terminal villi. We further identified four phospholipids overexpressed in the terminal villi complicated with severe preeclampsia. Further study is ongoing.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医学薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学

キーワード：胎児医学・成人病胎児起源説

## 1. 研究開始当初の背景

近年、質量分析(mass spectrometry: MS)技術のめざましい発展、発達により、生体高分子は多彩な翻訳後あるいは合成語修飾を受け、生理活性が変化する可能性が注目されている。従来の質量分析では測定のために生体試料を分離・精製する必要があり、組織内局在といった二次元の位置情報は失われてしまう。「質量顕微鏡法」は、生体組織の切片上の数千点におよぶ質量分析の情報から特定

の分子情報のみ選択して処理し二次元画像化することが可能である (Proteomics, 2008;8:3692-701)。すなわち、通常の組織切片を用いて、任意の生体高分子の分布を特定することができる。

胎児発達と共に胎盤絨毛は分化、増殖をとげる。とりわけ絨毛は、母体血流と胎児血流の間で酸素や多様な栄養素の供給を行い急激に発育する胎児を維持する。重症の妊娠高血圧症候群など胎児発育不全あるいは胎児

低酸素症をきたす種々の疾患では絨毛構造が著しく変化し、その機能が低下していると考えられている。複雑な構造をなす絨毛における蛋白発現の検討は従来免疫染色法によって解析されてきた。従来のマイクロアレイ法やプロテノミクス法による網羅的な発現解析方法では胎盤組織を分離精製する課程により絨毛の構造特異的な情報は失われてしまい、微細な絨毛構造特異的な比較は不可能であった。

## 2. 研究の目的

「質量顕微鏡法」を末期正常分娩で得られヒト胎盤の組織切片に応用し、幹絨毛領域と終末絨毛領域における生体高分子分布の比較識別方法の確立を目指す。そして研究の後半では、妊娠高血圧症候群など特異的な絨毛細胞の形態的变化が報告されている疾患から得られた胎盤組織を用いて「質量顕微鏡法」による解析を行い、絨毛障害に特異的に発現する生体高分子の同定を目指す。

## 3. 研究の方法

倫理委員会の上承ならびに同意を得て正常分娩、妊娠高血圧症合併妊娠の分娩時に胎盤組織をサンプリングし、凍結切片を作成した。

マトリックス支援レーザー脱イオン化法(MALDI)を用いて、胎盤組織切片の特定の部位の多数のスポットにレーザーを照射することで生体高分子をイオン化し、このイオンを飛行時間質量分析計(TOF-MS)で分析し、切片上の数千点におよぶ質量分析の情報から特定の分子情報のみ選択して処理し二次元画像化する。同じ組織ブロックから得られた連続切片のHE染色を行い、「質量顕微鏡」から得られた画像イメージとデジタル画像どうしの比較検討を行った。

このようなイメージング比較解析から、絨毛構造特異的と判断された生体高分子のピークに対して、さらにMS/MS解析を行うことで当該生体高分子の最終的な同定を目指す。

## 4. 研究成果

(1) ヒト末期の正常分娩から得られた胎盤において、sphingomyelin (d18:1/16:0)は幹絨毛特異的に、phosphatidylcholine (36:4)は終末絨毛特異的に分布していることが明らかとなった。

解析例として凍結切片を用いたHE染色を図1に、近傍の連続線ペンを用いた質量顕微鏡による画像イメージを図2に示す。赤い矢印の部分が幹絨毛組織で有り、sphingomyelin (d18:1/16:0)がその周囲の終末絨毛に比べて発現亢進している。

図1: HE染色

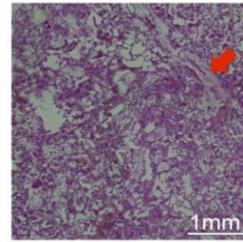
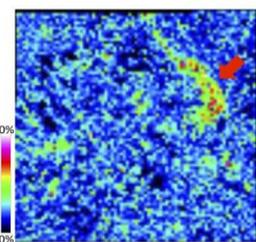
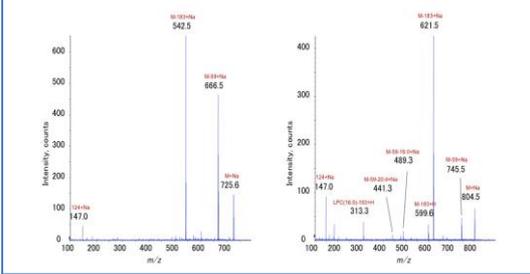


図2; 連続切片の質量顕微鏡像



MS/MS 解析による当該生体高分子の同定

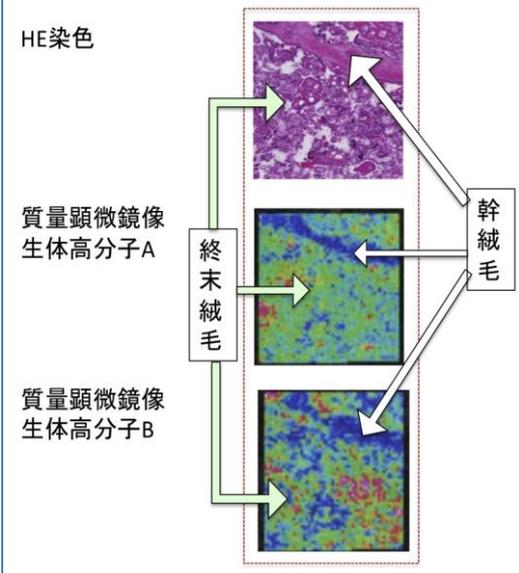
図3: 質量顕微鏡で特定した生体高分子のMS/MS解析による同定



(2) 妊娠末期の重症妊娠高血圧腎症の終末絨毛では四種類の生体高分子が特異的に発現亢進していること見だし、その疾患特異性、血中濃度の測定について基礎的な研究を行っている。

妊娠 37 週の重症妊娠高血圧腎症から得られた胎盤における、終末絨毛特異的に発現亢進する生体高分子の 2 例を図 5 に示す

図4: 重症妊娠高血圧症候群の終末絨毛特異的なに発現亢進する生体高分子の例



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 15 件)

1. **Itoh H**, Yura S, Sagawa N, Kanayama N, Konishi I and HBC Study Team. Neonatal exposure to leptin reduces glucose tolerance in adult mice. **Acta Physiologica**. 査読有り 202;159-164, 2011 doi: 10.1111/j.1748-1716.2011.02268.x.
2. Fuji T, Yura S, Tatsumi K, Mogami H, Fujita K, Kondoh E, Kakui K, Aoe S, **Itoh H**, Sagawa N, Fujii S, Konishi I. Branched-chain amino acid supplemented diet during maternal food restriction prevents developmental hypertension in adult rat offspring. **J Dev Orig Health Dis**. 査読有り 2; 176-183, 2011 doi: <http://dx.doi.org/10.1017/S204017441100002X>
3. Matsumoto K, Tsuchiya KJ, **Itoh H**, Kanayama N, Suda S, Matsuzaki H, Iwata Y, **Suzuki K**, Nakamura K, Mori N, Takei N; The HBC Study Team. Age-specific 3-month cumulative incidence of postpartum depression: The Hamamatsu Birth Cohort (HBC) Study. **J Affect Disord**. 査読有り 133;607-610, 2011 doi: 10.1016/j.jad.2011.04.024.
4. Hirai K, Sugimura M, Ohashi R, **Suzuki K**, **Itoh H**, Sugihara K, Kanayama N. A rapid activated protein C sensitivity test as a diagnostic marker for a suspected venous thromboembolism in pregnancy and puerperium. **Gynecol Obstet Invest**. 査読有り 72:55-62, 2011 doi: 10.1159/000322880
5. Nakaya Y, **Itoh H**, Muramatsu K, Otome M, Kobayashi Y, Hirai K, Uchida T, **Suzuki K**, Sugihara K, and Kanayama N. A case of spontaneous rupture of a uterine superficial varicose vein in midgestation. **J Obstet Gynaecol Res** 査読有り 37; 1149-1153, 2011 doi: 10.1111/j.1447-0756.2010.01489.x.
6. Minakami H, Hiramatsu Y, Koresawa M, Fujii T, Hamada H, Iitsuka Y, Ikeda T, Ishikawa H, Ishimoto H, **Itoh H**, Kanayama N, Kasuga Y, Kawabata M, Konishi I, Matsubara S, Matsuda H, Murakoshi T, Ohkuchi A, Okai T, Saito S, Sakai M, Satoh S, Sekizawa A, Suzuki M, Takahashi T, Tokunaga A, Tsukahara Y, Yoshikawa H; Japan Society of Obstetrics and Gynecology; Japan Association of Obstetricians and Gynecologists. Guidelines for obstetrical practice in Japan: Japan Society of Obstetrics and Gynecology (JSOG) and Japan Association of Obstetricians and Gynecologists (JAOG) 2011 edition. **J Obstet Gynaecol Res**. 査読有り 37(9):1174-1197, 2011 edition. **J Obstet Gynaecol Res**. 査読有り 37(9):1174-1197, 2011 doi: 10.1111/j.1447-0756.2011.01653.x.
7. Kato M, **Itoh H**, Nagahashi K, Izima M, Hirai K, Tamura M, Uchida T, Yaguchi C, **Suzuki K**, Sugihara K, Kanayama K. Reduction in Levels of Maternal Complement during Delivery by Cesarean Section. **J Obstet Gynaecol Res** 査読有り 38;165-171,2012 doi: 10.1111/j.1447-0756.2011.01661.x.
8. Furuta N, Yaguchi C, **Itoh H**, Morishima Y, Tamura N, Kato M, Uchida T, **Suzuki K**, Sugihara K, Kawabata Y, Suzuki N, Sasaki T, Horiuchi K, and Kanayama N. Immunohistochemical Detection of Meconium in the Fetal Membrane, Placenta and Umbilical Cord. 査読有り **Placenta**

- 33;24-30,2012  
doi: 10.1016/j.placenta.2011.10.007
9. Horikoshi Y, **Itoh H**, Kikuchi S, Uchida T, **Suzuki K**, Sugihara K, Kanayama N, Mori A, and Uemoto S. Successful living donor liver transplantation for fulminant hepatic failure that manifested immediately after cesarean delivery. 査読有り **ASIO J** 58; 174-176,2012 doi: 10.1097/MAT.0b013e3182444ed4
  10. Sekii K, Takamichi Ishikawa T, Ogata T, **Itoh H**, Iwashima S. Fetal myocardial tissue Doppler indices before birth physiologically change in proportion to body size adjusted for gestational age in low-risk term pregnancies. 査読有り **Early Hum Dev** 88;517-523,2012 doi: 10.1016/j.earlhumdev.2011.12.014.
  11. **Suzukin K**, **Itoh H**, Muramatsu K, Yamazaki K, Furuta N, Nagahashi K, Tamura N, Kato M, Uchida U, Sugihara K, Sumimoto K, Kanayama N. Feto-Umbilical blood flow obstruction increases placental tissue oxygenation. 査読有り **Clin Exp Obstet Gynecol** XXXIX(3);293-298, 2012
  12. Sekii K, **Itoh H**, Ogata T, Iwashima S. Deterioration of myocardial tissue Doppler indices in a case of fetal hydrothorax as a promising indication for clinical intervention before the development of nonimmune hydrops fetalis. 査読有り **Arch Gynecol Obstet** 256;1079-1080, 2012 doi: 10.1007/s00404-012-2375-6.
  13. Yamazaki K, **Suzuki K**, **Itoh H**, Muramatsu K, Nagahashi K, Tamura N, Uchida T, Sugihara K, Maeda H, Kanayama N. Cerebral oxygen saturation evaluated by near-infrared time-resolved spectroscopy (TRS) in pregnant women during cesarean section -A promising new method of maternal monitoring – 査読有り **Clinical Physiology and Functional Imaging** 33:109-116, 2013 doi: 10.1111/cpf.12001.
  14. Sato Y, Nakanishi T, Chiba T, Yokotani K, Ishinaga K, Takimoto H, **Itoh H**, Umegaki K. Prevalence of inappropriate dietary supplement use among pregnant women in Japan. 査読有り **Asia Pac J Clin Nutr** 22 (1):83-89, 2013 doi: 10.6133/apjcn.2013.22.1.08
  15. Sekii K, **Itoh H**, Ogata T, Iwashima S. Possible contribution of fetal size and gestational age to myocardial tissue Doppler velocities in preterm fetuses. 査読有り **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol** 167:121,2013 doi: 10.1016/j.ejogrb.2012.09.027
- [学会発表] (計 1 件)
1. Yamazaki K, Hayasaka T, Muramatsu K, Nagahashi K, Yaguchi C, **Itoh H**, Kanayama N. 60<sup>th</sup> Annual Meeting of Society for Gynecologic Investigation (SGI). March 20-23, 2013 at Orland, USA “Comparison of phospholipid molecular species of human placenta between preeclampsia and normal case by Imaging Mass Spectrometry“doi:
- [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]  
なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

伊東 宏晃 (ITOH HIROAKI)  
浜松医科大学・医学部附属病院・教授  
研究者番号：70263085

### (2) 研究分担者

鈴木 一有 (SUZUKI KAZUNAO)  
浜松医科大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：50456571

### (3) 連携研究者

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・助教  
研究者番号：90415927