

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 27 日現在

機関番号：13802

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670490

研究課題名(和文) 質量顕微鏡法によるヒト胎盤絨毛解析 - 病態特異的生体高分子マーカー同定を目指して -

研究課題名(英文) An application of imaging mass spectrometry to the analysis of human placental villous structure &#8211; In search of etiology-specific biopolymer-

研究代表者

伊東 宏晃 (HIROAKI, ITOH)

浜松医科大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：70263085

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

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HE染色による胎盤病理所見と「質量顕微鏡法」による絨毛構造における生体高分子分布の比較検討を世界で始めて試みた。胎児発育不全や妊娠高血圧症候群を合併した胎盤において、胎盤病理所見の種類や所見の数と、幹絨毛と終末絨毛ではsphingomyelin (d18:1/16:0)とphosphatidylcholine (16:0/20:4)分布異常が相関すること見だし、これらの生体高分子が胎盤絨毛の病的変化に重要な役割を果たす可能性を初めて明らかにした。

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 placental some of pathological findings were associated with the distribution pattern of sphingomyelin (d18:1/16:0) and phosphatidylcholine (16:0/20:4) in stem and terminal villi. The findings suggested that these biopolymers may be involved in the maintenance and/or pathological changes placental villus structures.

研究分野：周産期医学, DOHaD

キーワード：胎盤 質量顕微鏡法 妊娠 胎児発育不全 妊娠高血圧症候群 絨毛 病理

1. 研究開始当初の背景

生体高分子ソフトイオン化法の開発により 2002 年、田中耕一氏はノーベル化学賞を受賞した。以後、質量分析(MS)法技術はめざましい発達を遂げてきた。しかし、従来の質量分析法(MS)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。浜松医科大学解剖学講座の瀬藤光利教授、本研究計画の連携研究者の早坂孝宏助 教らは、マトリックス支援レーザー脱イオン化法(MALDI)を適用し、生体組織切片の任意の部位の多数のスポットにレーザーを直接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)で分析することに成功した。さらに本技術を用いて質量顕微鏡法の技術を開発し、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となった(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が可能となった。近年、胎盤由来物質は胎児発育不全など胎児の病態ならびに妊娠高血圧症候群などの母体の病態形成に重要な役割を果たす可能性が注目されている。研究代表者の伊東宏晃らは既に質量顕微鏡法をヒト胎盤の解析に用いる方法を確立し、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にした(Placenta 31; 245-248, 2010)。

2. 研究の目的

胎児発育不全ならびに妊娠高血圧症候群合併症妊婦の胎盤病理所見と、幹絨毛と終末絨毛では sphingomyelin (d18:1/16:0)と phosphatidylcholine (16:0/20:4)分布パターンが関連するか否か検討することを本研究計画の目的とした。

3. 研究の方法

倫理委員会の上の了承のもと、浜松医科大学附属病院周産母子センターにて、正常妊娠、胎児発育不全合併妊婦、妊娠高血圧症候群合併妊婦の胎盤を研究に供した。胎盤病理は HE 染色を用いて臨床情報を知らない 2 人の研究者が診断した。図 1 に示す Villitis of unknown etiology (VUE)、Thrombus、Atherosclerosis、Chorioamnionitis (CAM)、Immature terminal villi、Multiple branched

terminal villi 項目の胎盤病理所見を検討した。

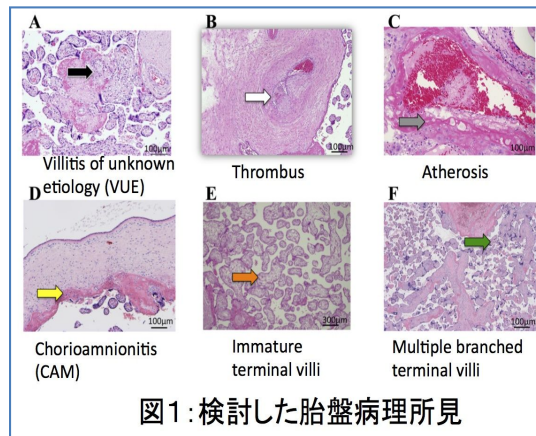


図1: 検討した胎盤病理所見

質量顕微鏡法では、YAG レーザーの照射によって発生したイオンを飛行時間質量分析計(TOF-MS)にて分析し、ピークを同定した(図2)。

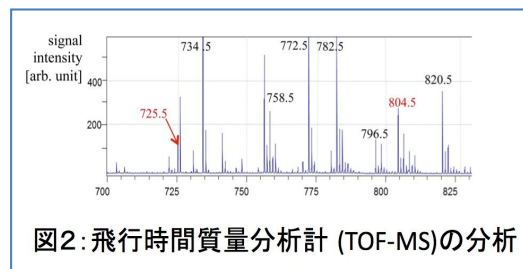


図2: 飛行時間質量分析計 (TOF-MS) の分析

次に、検出されたピークの中から先行研究(Placenta 31; 245, 2010)で明らかにした幹絨毛特異的に発現している m/z 804.7 ピークに相当する phosphatidylcholine (16:0/20:4)、ならびに終末絨毛特異的に発現している m/z 725.6 ピークに相当する sphingomyelin (d18:1/16:0) のデータについて、TOF-MS のデータを flexImaging 2.1 (Bruker Daltonics) を用いて二次元画像イメージに再構築した。さらに、近傍の連続切片を HE 染色し両者を比較した。

4. 研究成果

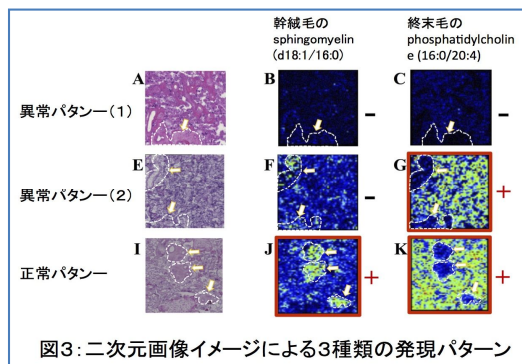
1) 胎児発育不全あるいは妊娠高血圧症候群を合併する胎盤絨毛における質量顕微鏡法の解析によって、幹絨毛特異的に発現する sphingomyelin (d18:1/16:0) ならびに終末絨毛特異的に発現する phosphatidylcholine (16:0/20:4) の発現

パターンに2種類の異常パターンがあることが明らかとなった。異常パターン1では両者の特異的発現が共に減弱していた。一方、以上パターン2では、幹絨毛特異的な sphingomyelin (d18:1/16:0)の発現は減弱していたが、終末絨毛特異的に発現する phosphatidylcholine (16:0/20:4)の発現は保たれていた。

- 2) 検討した6種類の胎盤病理所見の陽性所見の合計数と「質量顕微鏡法」による異常パターン検出に相関を認めた
- 3) 絨毛間腔への血流障害と関連する脱落膜の Atherosclerosis の所見は、「質量顕微鏡法」による異常パターン1と特異的な相関を認めた。

以上の検討より、幹絨毛における sphingomyelin (d18:1/16:0)の特異的な発現、ならびに終末絨毛における phosphatidylcholine (16:0/20:4)の特異的な発現は胎盤絨毛の構造維持や病的变化に重要な役割を果たす可能性が初めて明らかとなった。「質量顕微鏡法」によるヒト胎盤絨毛の解析は、従来の胎盤病理所見の病態生理的な意義を解明する新たな研究手法として有用である可能性が明らかとなった。

この研究成果は [PLoS One 誌 \(10\(11\):e0142609, 2015\)](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142609) に投稿し掲載された。



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 1件)

1. Yamazaki K, Masaki N, Kohmura-Kobayashi Y, Yaguchi C, Hayasaka T, Itoh H, Setou M, Kanayama N. Decrease in sphingomyelin (d18:1/16:0) in stem villi and phosphatidylcholine (16:0/20:4) in terminal villi of human term placentas with pathohistological maternal malperfusion. **PLoS One.** 10(11):e0142609. doi: 10.1371/journal.pone.0142609. 2015

〔学会発表〕(計 5件)

1. 山崎香織、幸村有季子、古田直美、谷口千津子、杉原一廣、伊東宏晃、金山尚裕 質量顕微鏡法によるヒト胎盤におけるリン脂質発現パターンと胎盤病理所見との相関 第68回日本産科婦人科学会 2016年4月23日 東京国際フォーラム
2. 山崎香織、村松慧子、長崎ことみ、幸村有季子、古田直美、谷口千津子、杉原一廣、伊東宏晃、金山尚裕 質量顕微鏡法によるPIH、FGRを合併した胎盤のリン脂質発現の解析、第67回日本産科婦人科学会 2015年4月10日 パシフィコ横浜
3. 山崎香織、村松慧子、長崎ことみ、幸村有季子、古田直美、谷口千津子、杉原一廣、伊東宏晃、金山尚裕 質量顕微鏡法によるFGR合併妊娠の胎盤におけるリン脂質発現の解析、第66回日本産科婦人科学会 2014年4月20日 東京国際フォーラム
4. 山崎香織、早坂孝宏、村松慧子、長崎ことみ、幸村有季子、古田直美、谷口千津子、杉原一廣、伊東宏晃、金山尚裕、瀬藤光利 質量顕微鏡法によるヒト胎盤におけるリン脂質発現の解析、第49回日本周産期新生児学会 2013年7月14日 パシフィコ横浜
5. 山崎香織、早坂孝宏、村松慧子、長崎ことみ、幸村有季子、古田直美、谷口千津子、杉原一廣、伊東宏晃、金山尚裕、瀬藤光利 質量顕微鏡法によるヒト胎盤におけるリン脂質発現の解析、第65回日本産科婦人科学会 2013年5月10日 札幌

〔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（ITOHI, 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(HAYASAKA, Takahiro)

早坂孝宏

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：90415927