

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：24601
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2014～2016
課題番号：26670461
研究課題名(和文)ステロイドホルモンの質量分析イメージングによる組織細胞上の直接可視化法の開発

研究課題名(英文)Development of direct visualization methods of steroid hormones on tissue sections by imaging mass spectrometry..

研究代表者
秦野 修 (Hatano, Osamu)
奈良県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：40164850
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はステロイドホルモン産生機構の解明を目的として、組織切片上で直接、ステロイドホルモンを検出する実験系の開発を行った。ステロイドホルモンのより効率的なイオン化法を探索するために、種々のSALDI法や誘導体化法を試み、Girard-T(GirT)試薬を用いた誘導体化によって組織切片上においても強いイオン化シグナルが得られた。そこで、ラット、ウサギ等の副腎組織切片上でGirTによる誘導体化の後、質量分析イメージング解析を行ない、Corticosterone, Progesterone, Cortisol, Aldosterone等の誘導体化ステロイドホルモンが、副腎皮質切片上で検出された。

研究成果の概要(英文)：In order to investigate the mechanism of steroid hormone production, we developed the direct visualization methods of steroid hormones on mammalian adrenal tissue sections by imaging mass spectrometry. Since the ionization efficiency of steroid hormones are low when common organic matrices such as CHCA or DHB are used, we explored various SALDI/Nano-PALDI ionization methods and various derivatization reagents to improve the ionization efficiency. Among these methods, Girard-T (GirT) efficiently derivatized steroid hormones. We used GirT as an on-tissue derivatization reagent on adrenal tissue sections and detected m/z peaks of major steroid hormones (corticosterone, progesterone, cortisol, aldosterone, etc.) on adrenal cortex. Using FT-ICR MS with ultrahigh mass resolution, precise m/z peak signals of steroid hormones within +/-0.001 were obtained.

研究分野：内分泌学

キーワード：ステロイドホルモン 質量分析イメージング 副腎皮質 On-Tissue 誘導体化 SALDI Nano-PALDI

1. 研究開始当初の背景

哺乳動物のステロイドホルモンは、主に副腎皮質、精巣、卵巣で、数種類の Cytochrome P450s や Hydroxysteroid Dehydrogenases の連携によって合成・分泌され、糖質/鉱質コルチコイドや、男性/女性ホルモンとして機能する。これらのステロイドホルモンは、組織切片上で従来の免疫組織化学法などで検出できないために、各々のステロイドホルモン産生部位（細胞）については、それらの最終合成酵素の発現/存在部位を検出することによって、間接的に推定されていた。しかし、酵素の存在は活性状態を意味しておらず、例えば、酵素特異的阻害剤などの投与下では、その酵素が大量に誘導、発現していても、反応生成物のステロイドホルモンは産生されていないなどの状況が存在する。

2. 研究の目的

本研究ではステロイドホルモン産生機構の解明を目的として、ステロイドホルモン産生部位の局在解析を、これまでのステロイド産生酵素の発現解析による間接的な推定でなく、ステロイドホルモンを組織切片上で直接、検出する実験系の開発を、質量分析イメージング法を用いて行った。

3. 研究の方法

ステロイドホルモンは、質量分析 MALDI 法で通常用いられる代表的有機化合物マトリックス (CHCA や DHB 等) では、イオン化効率が低くバックグラウンドノイズも高い (S/N 比が低い)。そこで、イオン化効率が高く、S/N 比の高い技法とし

て、有機化合物マトリックスを用いないでイオン化補助効果を有する、種々の SALDI 法/Nano-PALDI 法、および、イオン化効率をより一層高める技法として種々の誘導体化法を検討した。これらの技法の中で、主に Girard-T 試薬を用いて、組織切片を On-Tissue 誘導体化することにより、組織切片上においても強いイオン化シグナルが得られたため、この試薬による On-Tissue 誘導体化法を、ウサギ、ラット等の副腎切片に適用することによって、質量分析イメージング解析を行った。

質量分析、及び、イメージング解析には、主に FT-ICR MS 機 (Bruker 社 : Solarix) を用いた。

4. 研究成果

ステロイドホルモンは、質量分析 MALDI 法のイオン化補助マトリックスとして一般的な CHCA や DHB 等の有機化合物を用いると、イオン化効率が低く、 m/z ピーク強度が低い、① : 市販、及び、自作の種々の酸化金属ナノ粒子 (酸化鉄、酸化セリウム、酸化鉛、酸化コバルト、酸化マンガン、酸化スズ、等のナノ粒子)、および、ナノレベルの微細な凹凸構造をもつ平面構造体を、有機化合物マトリックスの代用として用いると (SALDI 法/Nano-PALDI 法)、代表的なステロイドホルモン 6 種の純試薬混合物において、バックグラウンドが低く S/N 比の高い、主に 1 価の Na^+ 付加体のステロイドホルモン群の m/z ピークが得られた。又、② : 種々の誘導体化試薬によるステロイドホルモンのイオン化効率の向上を試み、ステロイドの A 環のケトン基に反応する Girard-T (GirT) 試薬を用いて代表的なステロイドホルモン 5 種を誘導体化することにより、強いイオン化シグナルが得られた。(図 1)

そこで、ラット、ウサギ等の副腎の凍結組織切片を作成し、スライドガラス上に貼付した切片を、①：SALDI法/Nano-PALDI法によるイメージング検出、及び、②：GirT試薬を噴霧器でスプレーし（On-Tissue誘導体化）、引き続きCHCA等のマトリックスを噴霧した後、質量分析MALDI法によるレーザー स्क्यानの後、イメージング検出を行った。この際、あらかじめ切片上でMALDIレーザー試し打ちを行い、切片上で内在性のステロイドホルモン群のGirT標識化合物の m/z ピークが検出されることを確認した後に、MALDIイメージングस्क्यानを行った。その結果、①のSALDI法/Nano-PALDI法では、組織切片においては他の内在性物質によるバックグラウンドピークが高く、ステロイドホルモン群の m/z ピークは、明瞭に検出されなかったが、②の誘導体化法において、Cortisol-GirT, Corticosterone-GirT, Progesterone-GirT, Aldosterone-GirT等の誘導体化された代表的ステロイドホルモン群の m/z ピークが、副腎皮質の各層（前3者は束状層・網状層、Aldosterone-GirTは球状層）に、質量分析イメージング像として検出された。この際、超高質量分解能（質量分解能100万）のFT-ICR MS機（Bruker社：Solarix）を用いることによって、予想される m/z 値の ± 0.001 以内の正確さで、これらのイオン化ステロイドホルモンのイメージング検出が達成された。

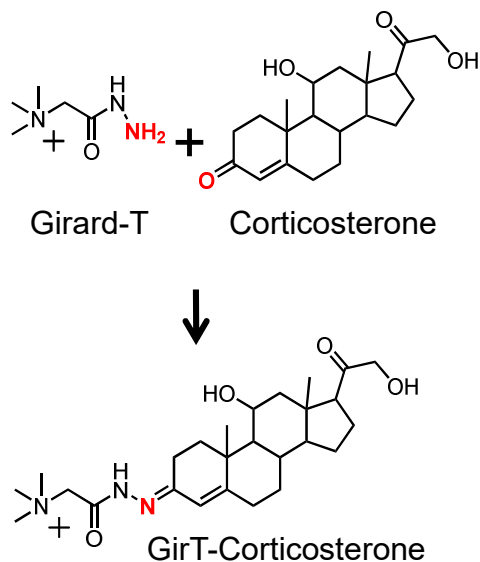


図1. 組織切片上のステロイドホルモン（Corticosterone等）は、Girard-T（GirT）によって誘導体化され（On-Tissue誘導体化）、1価のプラスチャージを帯び、レーザー照射によるMALDI検出強度が高まった。

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3件）

1. Potentiality of syringetin for preferential radiosensitization to cancer cells.

Shin-ichi Bando, Osamu Hatano, Hiroshi Takemori, Nobuo Kubota, Ken Ohnishi.

International Journal of Radiation Biology, 93, 286-294, 2017.

2. Plastic induction of CD133AC133-positive cells in the microenvironment of glioblastoma spheroid.

Ohnishi K, Tani T, Bando S, Kubota N, Fujii Y, Hatano O, Harada H.

International Journal of Oncology, 45, 581-586, 2014.

3. 新たに分離された成長遅延・運動失調マウスの遺伝子および病態解析

秦野 修、竹森 洋、松田潤一郎。

成長科学協会研究年報 37 巻 pp. 161-169, 2014.

〔学会発表〕（計7件）

1. SALDIと誘導体化によるステロイドホルモンのイオン化法の改良と質量分析イメージングへの応用

秦野 修、磯崎勝弘、竹森 洋、大西 健、岩崎哲史、片桐昌直、川崎英也、一柳優子、荒川隆一。

第68回イオン反応研究会/第157回質量

分析関西談話会/第6回イオン移動度研究会・
合同研究会

2017年4月23日(奈良)

2. Improvement of Ionization Methods of
Steroid Hormones and Application to Imaging
Mass Spectrometry.

Hatano O, Isozaki K, Takemori H, Ohnishi K, Katagiri M, Kawasaki H, Ichiyonagi Y,
Arakawa R, Kurumatani N.

International Symposium of Biological
Mass Spectrometry. Oct. 14-15th, 2016.
(Tokyo) (国際シンポジウム)

3. ステロイドホルモンのイオン化法の
改良と質量分析イメージングへの応用

秦野 修, 磯崎勝弘, 竹森 洋, 大西 健,
五百崎太輔, 森本翔大, 一柳優子, 川崎英
也, 片桐昌直, 荒川隆一, 車谷典男.

第64回質量分析総合討論会 2016年5月
(大阪)

4. CD133-positive cells emerging in hypoxic
microenvironment in glioblastoma spheroids
show resistance to X-rays and CDDP.

Ken Ohnishi, Toshiaki Tani, Shin-ichi Bando,
Yoshihiro Fujii, Osamu Hatano, Nobuo Kubota.

15th International Congress of Radiation
Research. May, 2015. (Kyoto) (国際学会)

5. グリオブラストーマスフェロイドの低
酸素微小環境に出現するCD133陽性細胞は
放射線及びCDDP抵抗性を示す。

大西 健, 谷 俊明, 坂東真一, 藤井義大,
窪田宜夫, 秦野 修
日本放射線影響学会第56回大会 2014年10
月(鹿児島)

6. 神経膠芽腫スフェロイドの低酸素領域
に出現するCD133陽性細胞は放射線/抗がん
剤抵抗性を示す。

大西 健, 谷 俊明, 坂東真一, 秦野 修, 藤
井義大, 窪田宜夫.

第73回日本癌学会学術総会 2014年9月
(横浜)

7. スフェロイドに出現するCD133陽性細
胞の放射線感受性。

大西 健, 谷 俊明, 坂東真一, 藤井義大,
窪田宜夫, 秦野 修.

第16回癌治療増感研究シンポジウム
2014年2月(奈良)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

秦野 修 (HATANO, Osamu)
奈良県立医科大学・医学部・講師
研究者番号：40164850

(2)研究分担者

竹森 洋 (TAKEMORI, Hiroshi)
医薬基盤健康栄養研究所・代謝疾患関
連タンパク探索プロジェクト・プロジ
ェクトリーダー → 企業転出

→ 岐阜大学・工学部・教授
研究者番号：90273672

大西 健 (OHNISHI, Ken)
茨城県立医療大学・保健医療学部・教授
研究者番号：50152195

矢尾育子 (YAO, Ikuko)
浜松医科大学・医学部・准教授
研究者番号：6039681

(3)連携研究者

片桐昌尚 (KATAGIRI, Masanao)
大阪教育大学・教育学部・教授
研究者番号：00185802

松尾二郎 (MATSUO, Jiro)
京都大学・工学系研究科・准教授
研究者番号：40263123

(4)研究協力者

磯崎勝弘 (ISOZAKI, Katsuhiko)
京都大学・化学研究所・助教
研究者番号：30455274

岩崎哲史 (IWASAKI, Tetsusi)
神戸大学・バイオシグナル総合研究センター・助教
研究者番号：40379483