

# 研究報告書

## 「質量分析イメージングによる炎症メディエーター分子の局在産生の可視化」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成23年4月～平成26年3月

研究者: 杉浦 悠毅

### 1. 研究のねらい

本さがけ研究では、新しい分子イメージングの手法、“質量分析イメージング”を発展させ応用することで、これまでに局在可視化の手段がなかった低分子炎症メディエーターのイメージング法として確立した。さらに、その慢性炎症疾患研究への応用を行った。

健全な炎症では、浸潤した免疫細胞(間質細胞)と臓器実質細胞が相互作用をし、炎症の惹起-維持-収束が限局された組織領域でのみ生じる。この様な局所における細胞間の相互作用を担う「低分子炎症メディエーター」は強力な生理活性ゆえに、時空間的に高度に偏在制御された産生/分泌/分解機構を有するオータコイドである(例えばプロスタグランジン)。それゆえ、正常な炎症プロセスが破綻した慢性炎症の病態進行において、このような炎症メディエーターの産生制御の破綻に端を発し慢性化が進行することは想像に難くない。従ってメディエーター分子の時空間的な偏在情報(when? where? How much?)は、可逆的炎症から慢性炎症への病態進行機序の解明と、また進行度評価に重要なものとなり得る。

ところが、既存の実験手法ではこれらの産生責任細胞や作用範囲を *in situ* で明確にイメージングすることは出来ない。すなわち、タンパク質因子(サイトカイン、ケモカイン)については、特異的な抗体を用いた免疫染色や転写物 *in situ* ハイブリダイゼーション等が分子イメージング法として存在する。反面、生理活性脂質を中心とする低分子には、現在に至るまで汎用的かつ有効な分子イメージング手法は存在しない(表1)。

炎症メディエーターの定量、定性-研究ツール

メディエーター分子	定量法	分子イメージング法
サイトカイン	ELISA	免疫染色法
ケモカイン	ELISA	免疫染色法
タンパク質分解酵素	ELISA	免疫染色法
生理活性脂質	ELISA/ 質量分析	<u>質量分析イメージングへ</u>

(表1) 低分子炎症メディエーター可視化法として質量分析イメージングの必要性

本研究では、この“技術のギャップ”を質量分析イメージングを発展させ埋めることを狙いとした。研究の結果、質量分析イメージングの汎用性、微量分析、多種分子の一斉検出という特性を利用することで、生理活性を持つ脂質、アミノ酸、アミンなど多岐に渡るシグナル分子群の局在イメージングを実現した。さらに、未達成であったナノM からピコM の低濃度メディエーター分子の局在情報の取得にも成功した。最適化した質量分析イメージングを駆使することで、炎症急性期-慢性期における生理活性脂質の産生機序の差異の知見を得るに至った。

## 2. 研究成果

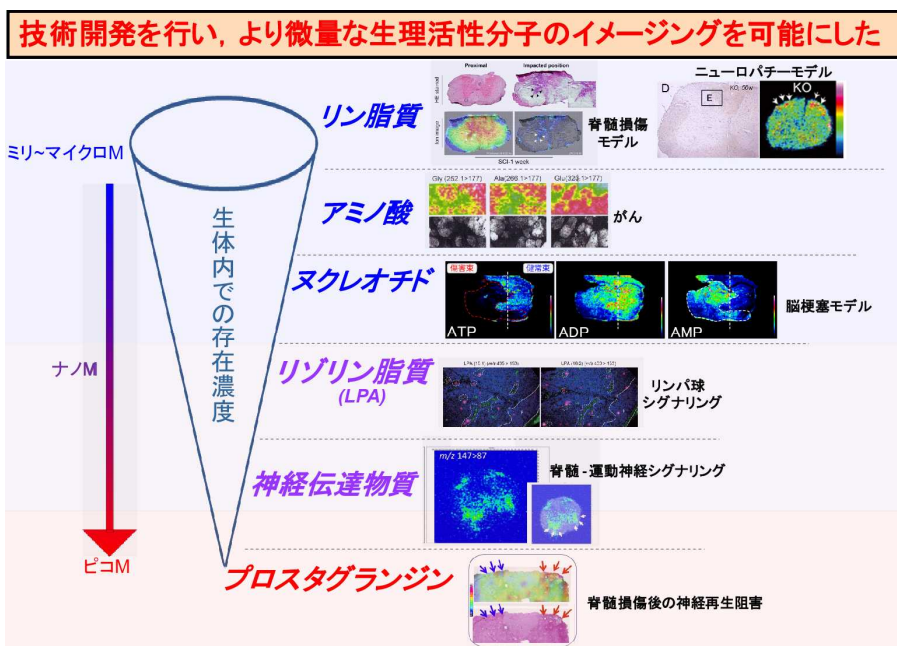
### (1) 概要

#### ① 高感度化を目的とした技術開発

本さがけ研究において、まず私は既存質量分析イメージングからの大幅な検出感度向上を目指した。何故なら、従来法では生体内濃度がミリ～マイクロ M の分子イメージングの報告に留まっており、私が目指す最も微量のメディエーター分子のイメージング達成には実に  $10^6$  オーダー以上の高感度化が必要であったからである。この困難な課題解決のために、メソロジーの包括的再構築を行なった。具体的にはメディエーター分子が動物組織中で保持されるサンプル調整法確立(I)にまで立ち返り、その後の各ステップごとに組織切片上での化合物誘導体化法の開発(II)、シグナル特異性を向上させる多段階質量分析法の適用(III)等の技術開発を行い、従来は検出することが出来なかった生理活性化合物群を、新たに数十種類イメージングする事に成功した(図1)。これらの中には、神経伝達物質や生理活性脂質など、低濃度(ナノ～サブナノ M)で受容体を介した生理活性を示すメディエーター分子群が含まれる。

#### ② 炎症慢性化過程の分子イメージング

新たに開発したイメージング法を適用することで、従来実現できなかった『*in situ* で細胞間のメディエーター分子を介したシグナル伝達をイメージング』する事が可能となった。まず、正常なリンパ節組織において、特定の血管内皮細胞がリンパ球ホーミングに關与する生理活性脂質を特異的に産生することを実証した。次に様々な疾患モデルに本法を適用し、『*in situ* での細胞領域が炎症メディエーター分子を産生しているか』を検証した。その結果、特に脊髄損傷モデルでは、免疫細胞浸潤が見られる炎症急性期から、それらの消失を伴う慢性期へかけて産生される生理活性脂質の分子種が変化し、この内疼痛を惹起するリゾフォスファチジン酸(LPA)の産生細胞種が変化する(浸潤免疫細胞からリモデリングされた実質細胞へ)現象が観察された。



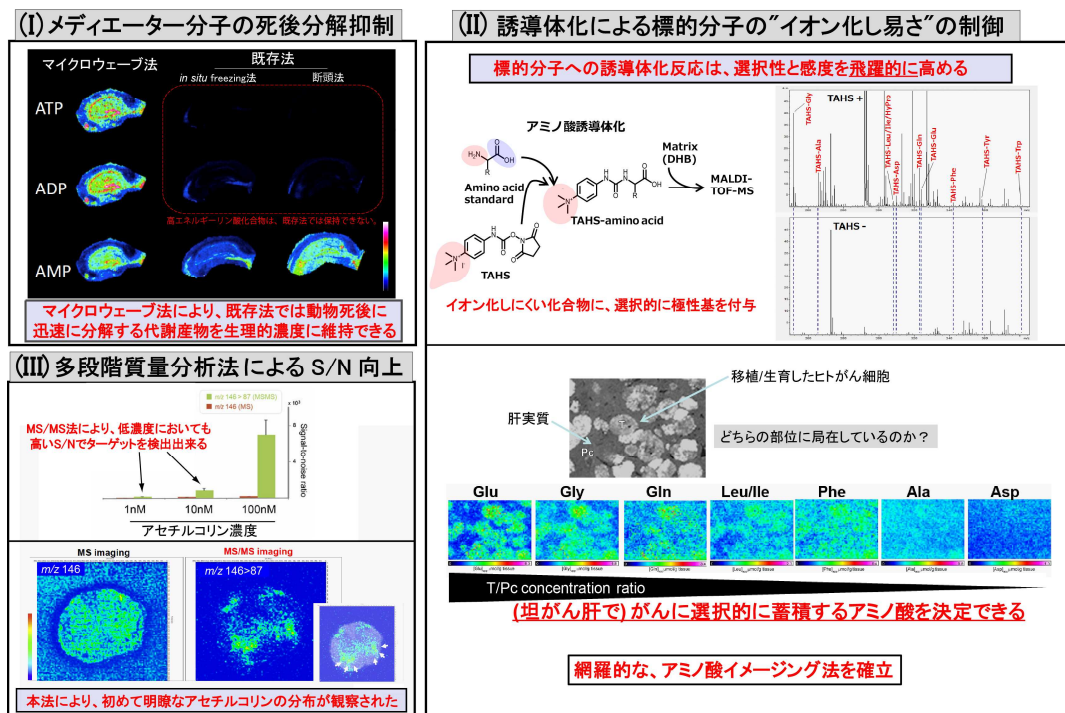
(図1) 技術開発を行い、従来は検出することが出来なかった生理活性化合物群を新たに数十種類イメージングする事に成功した

### ③ *in situ* での細胞エネルギー代謝の可視化

さらに上記の過程で、偶然に安定同位体標識化合物を用いた『*in situ*で細胞がどのようなエネルギー代謝経路を用いているか』をイメージングする技術を開発した。これにより当初想定していなかった、「炎症により活性化した免疫細胞の特異的なエネルギー代謝経路亢進」を定量する事が可能となり、また細胞(領域)の代謝経路変化を組織内でイメージングに成功した。

## (2) 詳細

① 質量分析イメージングの高感度化に際しては、具体的には以下 3 点を主要技術課題として設定し、それぞれについて異なるアプローチで課題を達成した。



(図 2) 高感度化を達成するために、掲げた 3 つの技術課題を異なるアプローチで達成した。

(I) **メディエーター分子の死後分解抑制** : 蛋白質と異なり、低分子化合物は動物臓器内において死後に非常に迅速に分解され(秒オーダー)、感度低減の一因となる。この分解抑制の為に、生体の酵素を一秒以内に不活性化する Microwave fixation 法を導入した。その結果、代謝産物死後分解をほぼ完全に抑制することができた。この成果により、動物個体の臓器採取から分析に至るまで、アーチファクトを排除した最適な試料調整法を確立した。

(II) **誘導体化による標的分子の“イオン化し易さ”の制御** : 質量分析イメージングでは対象分子をイオン化させる必要がある為、“標的分子のイオン化し易さ(イオン化効率)”が感度に大きく関わる。この効率を制御するため、生体分子を組織上で誘導体化し、高効率にイオン化及び高感度に検出する事に成功した。これは微量分子の検出感度を飛躍的に高める化学反応を生体組織上で促進させ、ナノ mol/cm<sup>3</sup> 程度の微量分子のイメージングを可能とする技術である。図 2 ではアミノ酸の選択的誘導体化により、腫瘍に蓄積するアミノ酸を網羅

的にイメージングした例を示している。

(III) 多段階質量分析法の導入による S/N 向上 : 一般に微量分子のイメージングを行う際には、シグナルに混入する非特異的な“ノイズ”低減の工夫が必須である。この課題を達成するために多段階質量分析法を導入した。具体的には、対象分子の質量電荷比のみでなく、対象分子固有の“フラグメント(断片)”イオンの質量電荷比の“二重のフィルター”を設定することで、非特異的なノイズ低減による大幅なシグナル S/N の向上を達成した。この結果、これまでは不可能であったアセチルコリンの局在イメージングに成功した。

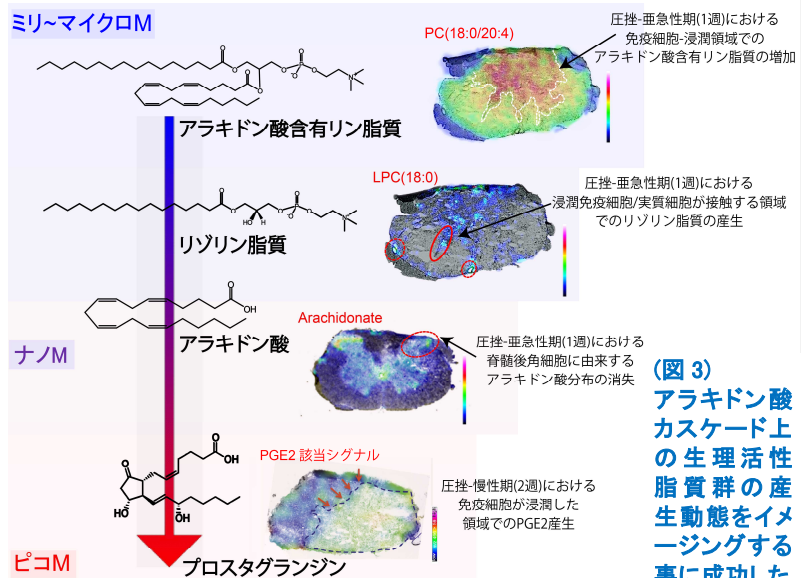
② 新たに開発したイメージング法を、急性障害後に慢性炎症を伴って病態が持続-悪化する疾病モデル(脊髄損傷、脳梗塞、心筋梗塞)と、炎症とともに病態が慢性的に悪化する疾病モデル(ニューロパチー、がん)に適用した。紙面の都合でここでは代表的な例として、脊髄損傷モデルの例について報告する。

### 【脊髄損傷モデルラットにおける急性/慢性期で異なる炎症メディエーター分子産生実態】

圧挫による脊髄損傷モデルラットの脊髄では、位置と時期によって大きく異なる免疫細胞浸潤と実質細胞構成の変化が見られる。まず損傷中心部でニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトは直達外力により挫滅損傷を受ける(一次損傷)。次に、炎症性細胞の浸潤により血液脊髄関門(BBB)が破壊された徹小血管から白血球やマクロファージが浸潤し、炎症メディエーターの放出や貧食作用などにより周囲の細胞までが壊死やアポトーシスに陥る(炎症の周囲への波及=二次損傷)。このような脊髄損傷モデルラットにおいて、質量分析イメージングによりアラキドン酸カスケード最上流のアラキドン酸含有リン脂質から、最下流の生成物プロスタグランジンに至るまで、多様な生理活性脂質の産生動態をイメージングする事に成功し、それぞれの時空間的に特徴的な産生プロファイルを明らかにした(図 3)。

顕著な一例としては、急性期から慢性期における微量生理活性脂質-リゾフォスファチジン酸(LPA)分子種群のイメージングが挙げられる。イメージングの結果から、脊髄損傷組織における LPA 分子種の局在は、急性期には局所的な出血/免疫細胞浸潤領域で見られるのに対し、慢性期ではリモデリングが進んだ実質細胞の部位に収束することが分かった。LPA は脊髄損傷後の慢性疼痛に関与する事が知られているが、炎症が沈静化、血球細胞が消失した後、空洞化した損傷中心部および炎症の波及した範囲を取り囲むように、増殖した反応性アストロサイトが慢性期においては異常な量の LPA を産生していることが示唆された。本研究では、この例が示すように、可視化することで初めて

分かる、急性/慢性期で異なる炎症メディエーター分子産生実態を明ら



かにした。

### 3. 今後の展開

第一に、本さがけ研究を通して、これまでには存在しなかった低分子炎症メディエーターのイメージング法を創出する事が出来た。低分子炎症メディエーター産生動態は、動物臓器における炎症の有用な「分子フェノタイプ」である。健常な炎症プロセスが慢性炎症に移行していく疾病モデル研究において、そのような生理活性分子の時空間的な偏在を検証できる本分子イメージングツールは基礎研究における広い浸透と運用が期待できる。既に、本技術を有効に用いた多くの慢性炎症の共同研究が展開している。

第二に、質量分析イメージングが提供する局在情報は、強力な生理活性を持つ炎症メディエーター分子が「炎症惹起組織のどの細胞(領域)が産生しているか」、という問いに対して重要な示唆を与える。上述の脊髄損傷モデルにおいては、実際に同一のメディエーター分子であっても、急性期/慢性期で産生細胞が変遷している知見が得られた。このように、すり潰した試料の解析のみでは得られない知見に拘り、中でも脊髄損傷モデルにおいて、浸潤免疫細胞ではなくリモデリングされた実質細胞によるメディエータ産生を介した炎症遷延化のスキームのを明らかにしたい。

第三に、紙面の都合で詳述できなかったが、本さがけ研究を行う過程で、当初想定していなかった『in situで細胞がどのようなエネルギー代謝経路を用いているか』をイメージングする技術を開発するに至った。これは、「外因性の安定同位体で標識した化合物」をトレーサーとして用いた細胞/臓器の代謝経路フラックスの定量/イメージング法である。具体的には、 $^{13}\text{C}$  で標識したグルコースから代謝-生成された化合物は、 $^{13}\text{C}$  を含むため、質量分析では内因性化合物と区別して定量/イメージングすることができる。この為、例えば  $^{13}\text{C}$  標識グルコースを投与し、 $^{13}\text{C}$  含有乳酸を定量/イメージングすれば、特定の細胞で『好氣的-解糖がどの程度亢進したか?』『嫌氣的-解糖系はどの程度用いられたか?』といった問いに確定的な解を与える事が出来る。

一般に活性化した免疫細胞は、各々の免疫機能発現(例えば、急速な分化増殖、抗体産生、貪食能亢進 etc.)のために resting-state ととは明らかに異なるエネルギー代謝を行う。しかし、この事の *in vivo (in situ)* での実証はない為、今回開発した代謝フラックスイメージング法は、実際の炎症組織における、そのような特異的エネルギー代謝を理解するために必須のツールであると考え。プレリナリーなデータでは、脊髄損傷モデル-亜急性期の免疫細胞浸潤領域では、明らかに低酸素応答に類した細胞エネルギー代謝が亢進していた。一部の炎症が遷延化した組織領域の細胞は低酸素状態に置かれていることが知られているが、今後、このような低酸素症が単なる付随的事象ではなく、炎症遷延化に影響を及ぼす直接原因となり得ることを検証したい。すなわち、血管閉塞のような直接的な原因、または他の要因による組織のリモデリングのような間接的原因により、炎症部位の実質/間質細胞が低酸素に曝され、このストレスによる代謝改変がさらに自身/周囲の細胞にフィードバックをかけることで炎症を持続、遷延化させるという仮説の検証を行いたい。

#### 4. 評価

##### (1) 自己評価

新しい分子イメージングの手法、“質量分析イメージング”を発展させ応用することで、これまでに局在可視化の手段がなかった低分子炎症メディエーターのイメージング法として創出すること、さらに、その慢性炎症疾患研究への応用を行うことが私のさきがけ研究のテーマである。

「技術開発」の側面において、研究の結果、質量分析イメージングの汎用性、微量分析、多種分子の一斉検出という特性を利用することで、生理活性を持つ脂質、アミノ酸、アミンなど多岐に渡るシグナル分子群の局在イメージングを実現し、さらに、未達成であったナノMからピコMの低濃度メディエーター分子の局在情報の取得にも成功した。

また、さきがけ研究のスタート以降、私達自身が行った質量分析イメージングによる知見は免疫学(*J. Immunology.*, 2013)、生化学(*J. BioChem.*, 2011)、神経科学(*Neuroscience*, 2011)等の幅広い生物学の各分野でも認知され、技術の浸透は着実に進んでいる。

さらに研究開始当初は予定していなかったが、「外因性の安定同位体で標識した化合物」をレーザーとして用いた細胞/臓器の代謝経路フラックスの定量/イメージング法は、*in situ*で免疫細胞のエネルギー代謝を測定する新しい可能性を提供し、例えば、「炎症を惹起した生体局所における、免疫細胞活性化“維持”に必要な特異的なエネルギー代謝機構の解明」等が期待出来る、ユニークかつ発展性のある見込めるツールとなった。以上の技術開発の成果と、その浸透の早さは、私が研究開始当初考えていた予想を超えるものであり、一定の自己評価を与えて良いと考えている。

一方で、「炎症の慢性化機構の解明と制御」に直接貢献する「個別の疾患研究テーマ」に関しては、今後もさらに進展させていく必要がある。

最後に、3年間の研究実施期間において、申請時に掲げた、医学—分析化学—工学と一体になった取り組みを全力で行なう事が出来たと考えるが、それらの成果は、本さきがけ領域のアドバイザーの先生方、さきがけ研究者仲間との数多くの共同研究、議論によるところが大きく、このような研究機会を与えていただいた高津総括をはじめとするアドバイザーの先生方に深く感謝いたします。

##### (2) 研究総括評価(公開項目)

質量分析イメージングの手法を発展させ、これまで局在可視化の手段がなかった低濃度(ナノ～サブナノM)で存在する低分子炎症メディエーターなどの時空間的なイメージング法を確立した。それを達成するため、本研究ではメディエーター分子の死後分解を抑制する組織サンプル調製法の確立、飛躍的な検出感度向上のための切片上での化合物誘導体化(イオン化効率向上)法の開発、非特異的なノイズ低減のための多段階質量分析法の適用などの技術開発を行い、アセチルコリン、アラキドン酸カスケードやエネルギー代謝経路の一連の化合物、リゾリン脂質類、アミノ酸類などの複数分子を同時に組織切片上において質量分析イメージングすることを達成した。これまでに、脊髄損傷、脳梗塞、心筋梗塞、ニューロパチー、がんなどのモデルに本手法を適用して成果を上げており、今後より広範な研究領域で汎用されることが期待できる画期的な技術であると評価できる。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Toue S\*, **Sugiura Y\***, Kubo A, Ohmura M, Karakawa S, Mizukoshi T, Yoneda J, Miyano H, Noguchi Y, Kobayshi T, Kabe Y, and Suematsu M, "Microscopic imaging mass spectrometry assisted by on-tissue chemical derivatization for visualizing multiple amino acids in human colon cancer xenografts", **Proteomics**, in press, (2013) \*; **equally contribution**
2. **Sugiura Y**, Honda K, Kajimura M and Suematsu M, Visualization and quantification of cerebral metabolic fluxes of glucose in the awake mice, **Proteomics**, in press, (2013)
3. **Sugiura Y**, Zaima N, Setou M, Ito S, Yao I. "Visualization of acetylcholine distribution in central nervous system tissue sections by tandem imaging mass spectrometry", **Anal Bioanal Chem** 403, 1851-61 (2012)
4. Hanada M\*, **Sugiura Y\***, Shinjo R, Imagama S, Ishiguro N, Matsuyama Y, Setou M. "Spatiotemporal alteration of phospholipids and prostaglandins in a rat model of spinal cord injury", **Anal Bioanal Chem** 403, 1873-84 (2012) \*; **equally contribution**
5. Bai Z, Cai L, Umemoto E, Takeda A, Tohya K, Komai Y, Veeraveedu PT, Hata E, **Sugiura Y**, Kubo A, Suematsu M, Hayasaka H, Okudaira S, Aoki J, Tanaka T, Albers HM, Ovaa H, Miyasaka M. "Constitutive lymphocyte transmigration across the basal lamina of high endothelial venules is regulated by the autotaxin/lysophosphatidic acid axis." **J Immunol.** 190, 2036-48 (2013)

### (2) 特許出願

なし

### (3) その他の成果(主要な学会発表, 受賞, 著作物, プレスリリース等)

#### 著作物

\* 杉浦 悠毅、末松誠 編、質量分析実験ガイド、実験医学別冊(羊土社)



質量分析は、生物学研究において重要な技術の核を成すものである。しかし技術革新のスピードは速く、これらを貪欲に取りこむことが今後はますます重要になるかと考え、そのような一助となるべく書籍『質量分析実験ガイド-見つける、量る、可視化する』という本を企画、編集、執筆した。

#### 主要な招待講演

杉浦 悠毅 質量分析で代謝を視る(招待講演)

質量分析学会春季シンポジウム、発表日:2011-05-09

杉浦 悠毅

イメージングマスペクトロメリーによる脳の代謝の視覚化(招待講演)

第36回日本医用マスペクトル学会年会、大阪、発表日:2011-09-16

Yuki Sugiura

An optimized organ fixation technique for imaging and quantitative mass spectrometry for high energy phosphate-metabolites,

60th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 発表日:2012-05-24

Sugiura Y.

Visualization and quantification of brain metabolic fluxes of glucose in the awake mice by mass spectrometry.

4th AOMSC & 10th TSMS Annual Conference, 発表日:2013-07-12

杉浦 悠毅

グルコース代謝を可視化する -代謝”フラックス”の質量分析イメージング-

島津製作所セミナー『メタボロミクスを拓く』,東京, 発表日:2013-07-23,24

#### 企画したシンポジウム

アウトリーチ活動の一環として、「質量分析技術のライフサイエンスへの応用」をテーマとし、以下2つのシンポジウムを自らが企画し、さらに講演を行なった。

シンポジウム名	シンポジウム「質量分析で何か出来るか? -生命科学研究での有用性-
日時	2012年9月26日
場所	医学部総合医科学研究棟ラウンジ
参加人数	100名



<p><b>概要</b></p>	<p>質量分析のアプリケーションを「見つける」「量る」「可視化する」と題し、各応用研究を紹介した。</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;">   </div>
------------------	---

<p><b>シンポジウム名</b></p>	<p>シンポジウム「先端メタボロミクスを駆使して展開する新しい代謝生物学」</p>
<p><b>日時</b></p>	<p>2013年9月18日</p>
<p><b>場所</b></p>	<p>医学部総合医科学研究棟ラウンジ</p>
<p><b>参加人数</b></p>	<p>80名</p>

概要

昨年のシンポジウム「質量分析で何か出来るか？-生命科学研究での有用性-」の続編として、質量分析技術を用いた代謝生物学に焦点を当てた講演会を開催した。

