

ピコリットルの液体で調べる生体組織の多次元化学分布情報



研究ノート

大塚 洋一*

Multidimensional chemical distribution information of biological tissues studied with picoliter liquids

Key Words : mass spectrometry imaging, tissue, lipids, sampling and ionization

1. はじめに

我々の体の基本単位である細胞では、細胞内小器官¹⁾や高密度の分子集合体²⁾が存在し、遺伝情報の複製、タンパク質合成、エネルギー産生などの生命活動に必要な化学反応が進行する。また生体は構造的・機能的階層構造を有する。細胞がネットワーク化することで組織となり、組織が組み合わさることで特定の機能を担う器官が形成される。細胞や組織に含まれている多彩な化学情報を計測し、健康状態を表現する特徴量を獲得する分析技術は、科学的根拠に基づく病気の予防や診断の高度化にとって重要となる。

細胞膜の構成要素でもある脂質は、エネルギーの蓄積や生理活性脂質など、生命活動において重要な役割を果たす³⁾が、ゲノム情報から直接的に合成することや、多彩な化学構造の違いを抗体を用いて識別することが困難であることから未解明な点が多い。リポミクス分野では、質量分析法を用いて代

謝経路の脂質の変化を網羅的に解析することで、疾患に関連する脂質群の解明やバイオマーカーの発見を目指す研究成果が報告されてきた^{4,5)}。

がんやアルツハイマーなど、高確率で我々が罹患する疾患においては、生体組織の細胞分布の不均一化により、器官の機能の低下あるいは喪失を生じる場合がある。したがって、生体組織の脂質をはじめとする多彩な成分分布を可視化する技術が、疾患の病態解明や診断のために重要である。しかし、脂質は分子特異的な染色法が少なく、従来の病理学的アプローチ（染色法を組み合わせた光学顕微鏡による観察）ではそれらの情報を十分に捉えることが出来ないという課題がある。

2. 質量分析イメージングとは

質量分析イメージング (MSI, mass spectrometry imaging) は、試料に含まれる化学成分群の分布を可視化する方法の一つである。計測では、生体組織

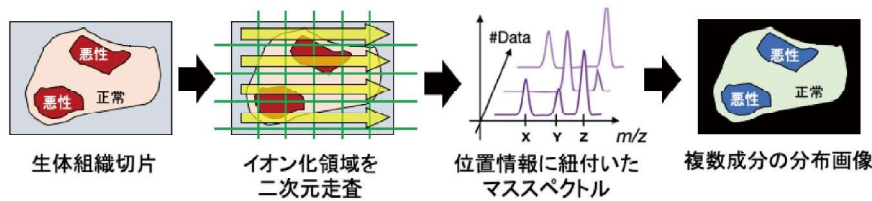


図1 生体組織の多次元化学分布情報を捉える質量分析イメージングの概要図。



* Yoichi OTSUKA

1978年6月生まれ
大阪大学理学研究科化学専攻 (2006年)
現在、大阪大学大学院 理学研究科
物理学専攻 准教授 博士(理学)
専門/質量分析、走査型プローブ顕微鏡
TEL : 06-6850-8236
E-mail : otsuka@phys.sci.osaka-u.ac.jp

の局所領域に含まれる成分をイオン化し、質量分析を行うことで、試料の位置情報に紐付いたマススペクトル (イオン化された分子の m/z と信号強度の関係を示す) を取得する。多数のマススペクトルを一つのデータに統合することで、イオンの強度分布を画像化することができる (図1)。一度の計測で、複数成分の分布情報 (多次元化学分布情報) が得られる特徴がある。生体組織の疾患特異的な成分群お

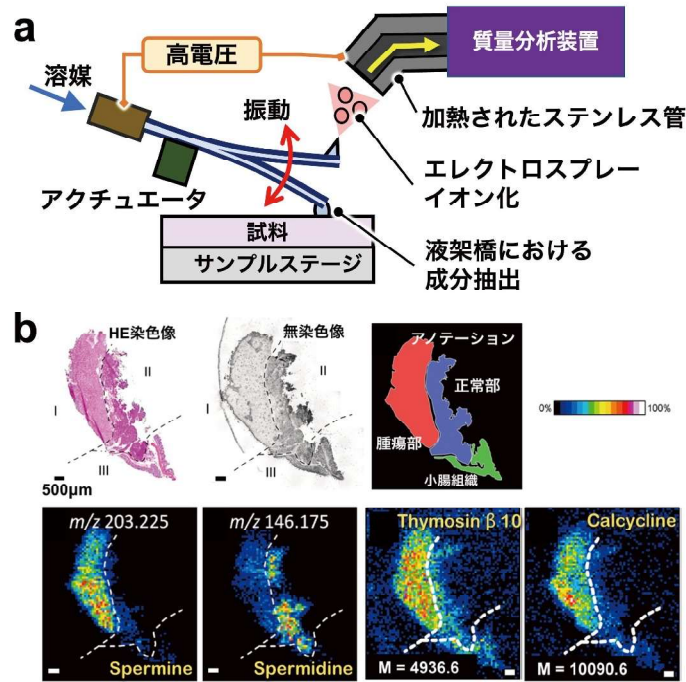


図2 (a) t-SPESIの模式図。(b) マウス膵臓がん組織に局在する代謝物とタンパク質の質量分析イメージングの結果。

よび特徴量を見いだすことで、創薬ターゲットや診断マーカーの発見に繋がることが期待される。試料成分をイオン化する方法として、イオンビームやレーザー光の照射により試料成分を脱離・イオン化する方法や、微量体積の溶媒を試料に付与することで試料成分を抽出・イオン化する方法が提案されてきた。興味がある方はレビュー⁶⁾をご参照いただきたい。

3. ピコリットルの溶媒を用いる抽出・イオン化法の開発

我々はこれまでに、タッピングモード走査型プローブエレクトロスプレーイオン化法「t-SPESI (Tapping-mode scanning probe electrospray ionization、ティースペシと呼ぶ)」を考案し、生体組織のMSIを実施してきた⁷⁾。t-SPESIの模式図を図2(a)に示す。

高電圧を印加した溶媒をキャピラリープローブ(プローブ)に流し、ピエゾアクチュエータを用いてプローブを共振周波数で上下に振動させる。試料とプローブ端が接触すると、プローブ端で溶媒の液架橋が形成され、試料成分が抽出される。プローブが上方に移動するとともに抽出液が持ち上げられ、

抽出成分がエレクトロスプレーイオン化(ESI, electrospray ionization)に供される。ESIは質量分析法で幅広く活用されている技術である。試料溶液に高電圧を印加することで帯電液滴が生じ、液滴が乾燥する過程で、溶液中の分子を断片化せずに気相イオンへと変換することができる。生成したイオンは、質量分析装置に導入され、マススペクトルが計測される。試料表面をプローブが二次元走査することで、MSIを実施できる。1回の抽出・イオン化で消費される溶媒量は数ピコリットル(振動周波数: 600-1000 Hz、送液速度: 100-300 nl/min)で、抽出領域の大きさはプローブの先端の溶媒の拡がりに依存する。これまでに、t-SPESIによる、マウスの脳組織⁸⁾や膵臓がん組織⁹⁾のイメージング(図2(b))を報告してきた。

t-SPESIでは振動するプローブを用いて抽出とイオン化を実施するため、プローブの振幅が一定に維持されることが望ましいが、クライオミクロトームによって薄切された生体組織切片は、 μm スケールの微小な凹凸が存在し、さらに切片が乗せられたガラス基板のサンプルステージ上での傾斜が存在する。従って、プローブが試料表面を走査する際には、プローブ先端と試料表面の距離は、試料の位置ごと

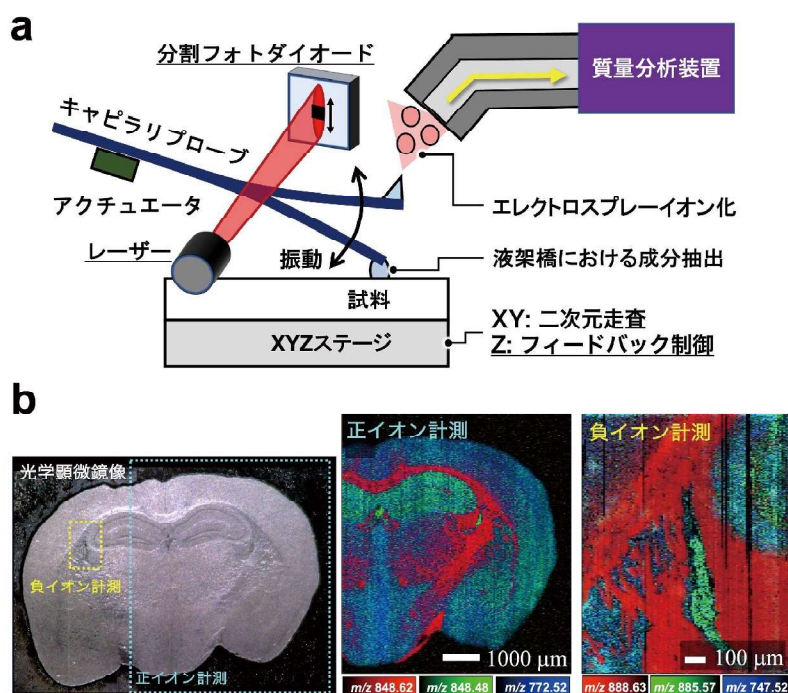


図3 (a) フィードバック制御機構が組み込まれた t-SPESI の模式図。(b) マウス脳組織切片に含まれる脂質成分の質量分析イメージングの結果。

に異なり、抽出—イオン化の時間が変化し、計測結果に影響を及ぼす可能性が考えられる。そこで我々は、プローブの振動状態を常時モニタリングし、振幅を一定に維持するための方法を開発した¹⁰⁾ (図3(a))。

まずは、非接触でプローブの振動状態を計測する方法を開発した。プローブの側面からレーザー光を照射すると、プローブの影ができる。この影はプローブの振動に伴って上下方向に変位する。レーザー光を分割型フォトダイオードに入射し、上下の受光部の出力の差を計測することで影の変位信号を得た。変位信号をロックインアンプに入力することで、振幅を計測した。次に、振幅が一定となるように、試料ステージの高さを動的に制御する方法を開発した。例えば、試料の一部の高さが大きい場合には、そこをプローブが走査すると、プローブ先端と試料の距離が小さくなり、振幅が減少する。この減少量をキャンセルするように試料裏面のピエゾステージの高さを下げることで、振幅の大きさが維持される。試料ステージへの制御信号は、試料の高さ情報と対応する。プローブの振動計測法とフィードバック制御機構が導入された t-SPESI によって、成分分布情

報と試料の凹凸情報を同時に計測することができる。

図3(b)に、マウス脳組織切片の質量分析イメージングの結果を示す。正イオンモード、負イオンモードのそれぞれの計測において、無染色の脳組織の領域ごとに脂質群の分布を可視化した。得られた成分分布イメージから、空間分解能が $6.5\mu\text{m}$ であると見積もられた。さらに、フィードバック制御により、試料の凹凸情報を同時に計測することが出来た¹⁰⁾。

4. 高精度質量分析イメージングの実現に向けて

t-SPESI を用いることで、生体組織中の脂質群をイオン化し、それらの分布を可視化することが出来る。脂質はアシル基や極性基の違いにより多種多様な分子構造を示すことから、脂質の同定精度を向上するための計測システムが必要となる。

著者は、AMED 官民による若手研究者発掘支援事業において、高空間分解能と高質量分解能を実現する、t-SPESI 計測システムの開発を進めた。高い質量分解能と質量精度を有する、四重極飛行時間型質量分析装置 (LCMS-9030、島津製作所) に、第二世代 t-SPESI ユニートを接続した計測システムを構築した (図4)。当該 t-SPESI ユニートにおい



図4 高質量分解能質量分析イメージングのために開発した第二世代 t-SPEESI 計測システムの概観。

では、プローブ振動計測部分の電子回路系の低ノイズ化や、フィードバック制御の高速化、質量分析装置との同期制御の仕組みを構築した。また、計測データの解析のためのワークフローも構築した。新たに開発した計測システムを用いて、大阪大学医学系研究科の坂田泰史教授グループ、大阪大学工学系研究科の新聞秀一准教授と共同で、拡張型心筋症を発症したヒト心臓組織の質量分析イメージングの研究を進めている。これまでの検討からは、組織全体にわたって広く分布する脂質種と、組織内に局在する脂質種が見いだされている。

また、さらなる高空間分解能質量分析イメージングの実現を目指して、JST さきがけにおいて、1細胞質量分析イメージングの研究を実施している。第三世代 t-SPEESI ユニットを四重極飛行時間型質量分析装置 (Xevo G2-XS, Waters) に接続し、1細胞の疾患に伴う多次元化学分布情報の変化を捉えることを目指している。

5. 結言

質量分析イメージングを用いると、多次元化学分布情報に基づいて生体試料を分析することができ、疾患組織の理解と解明、さらには診断技術への展開が期待される。t-SPEESI はピコリットルの溶媒を用いて、試料の局所抽出と ESI を高速に実施することができる。フィードバック制御機構や高質量分解能質量分析装置を導入したことにより、高精度の計測が可能となってきた。今後も、理学的知見に基づいた装置開発と、異分野融合型研究を両輪とした

研究活動を推進していきたい。

謝辞

本稿にて紹介した研究成果は、共同研究者の皆様との連携によるものであり、厚く御礼申し上げる。研究の一部は、自然科学研究機構新分野創成センターイメージングサイエンス研究分野プロジェクト (IS281003)、野口遵研究助成、旭硝子財団研究助成、MEI グラント、豊田理研スカラー、内藤記念科学振興財団研究助成、新学術領域研究「分子夾雑の生命化学」(JP18H04554, JP20H04710)、伊藤忠兵衛基金、AMED (JP20lm0203014, JP20he0322005)、JST さきがけ (JPMJPR20E4) の支援を受けた。

- 1) B. Alberts, D. Bray, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter. *Essential Cell Biology*, Garland Science, 2013. vol. 51.
- 2) 白木賢太郎. 相分離生物学, 東京化学同人, 2019.
- 3) M. P. Wymann, R. Schneider. Lipid signalling in disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9: 162–176, 2008.
- 4) H. Hinterwirth, C. Stegemann, M. Mayr. Lipidomics: Quest for molecular lipid biomarkers in cardiovascular disease. *Circ. Cardiovasc. Genet.* 7: 941–954, 2014.
- 5) C. Xiao, F. Rossignol, F. M. Vaz, C. R. Ferreira. Inherited disorders of complex lipid metabolism:

- A clinical review. *J. Inherit. Metab. Dis.* 44: 809–825, 2021.
- 6) Y. Otsuka. Direct liquid extraction and ionization techniques for understanding multimolecular environments in biological systems (Secondary publication). *Mass Spectrom.* **10** (2021). ,
doi:10.5702/mass spectrometry.A0095.
- 7) Y. Otsuka, S. Shide, J. Naito, M. Kyogaku, H. Hashimoto, R. Arakawa. Scanning probe electrospray ionization for ambient mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 26: 2725–2732, 2012.
- 8) Y. Otsuka, J. Naito, S. Satoh, M. Kyogaku, H. Hashimoto, R. Arakawa. Imaging mass spectrometry of a mouse brain by tapping-mode scanning probe electrospray ionization. *Analyst.* 139: 2336–2341, 2014.
- 9) Y. Otsuka, S. Satoh, J. Naito, M. Kyogaku, H. Hashimoto. Visualization of cancer-related chemical components in mouse pancreas tissue by tapping-mode scanning probe electrospray ionization mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 50: 1157–1162, 2015.
- 10) Y. Otsuka, B. Kamihoriuchi, A. Takeuchi, F. Iwata, S. Tortorella, T. Matsumoto. High-Spatial-Resolution Multimodal Imaging by Tapping-Mode Scanning Probe Electrospray Ionization with Feedback Control. *Anal. Chem.* 93: 2263–2272, 2021.

