

1 細胞質量分析イメージングによる疾患組織の可視化

大阪大学大学院理学研究科 准教授 大塚 洋一

1. 質量分析イメージングによる組織の可視化

我々の体の基本単位である細胞では、細胞内小器官や高密度の分子集合体が存在し、生命活動に必要な代謝反応が高効率に進行する。細胞がネットワーク化した組織に含まれる、多彩な化学情報の一斉分析技術は、生命科学分野の基礎理解と医用応用の両面で重要である。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が、分子種に特異的な染色が困難である。病理学的な染色法や振動分光法を用いる観察では組織中の脂質の種類と分布を十分に捉えることが出来ない課題があり、新たな計測技術への挑戦が求められている。

質量分析イメージング (mass spectrometry imaging, MSI) は、生体組織や細胞に含まれる分子群の分布を可視化することを可能にする (Fig. 1)。MSI では、生体組織の微小領域に含まれる成分を抽出し、イオン化する。イオン化された分子の質量分析を行うことでマススペクトルを取得する。マススペクトルには、複数のイオンの m/z と、それらの信号強度の情報が含まれる。イオン化を行う領域を、試料表面に対して二次元方向に走査しながら同様の計測を繰り返すことで、位置情報が紐付けられた多数のマススペクトルが得られる。特定の成分に由来するイオンの信号強度を、試料の座標情報と結びつけることで、成分分布をイオン像として可視化することができる。

MSI は、質量情報に基づいて分子を特定すると共に、それらの分布情報を取得することができるため、生体組織を構成する細胞ネットワークの変容を理解するための有力な手法として注目され

ている。

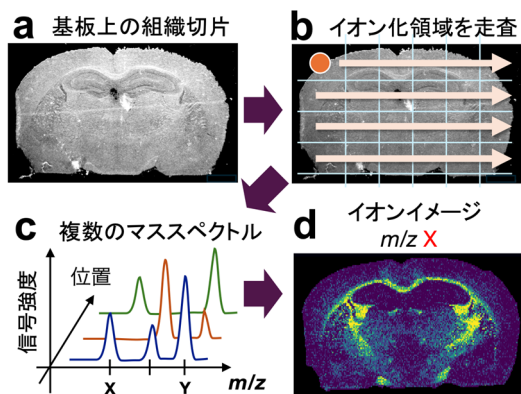


Fig. 1 質量分析イメージング (MSI) の概要図。

2. 抽出-イオン化法「t-SPESI」の開発

著者はこれまでに、独自技術である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 (tapping-mode scanning probe electrospray ionization, t-SPESI) の開発と、疾患組織や細胞の MSI への応用に取り組んできた^[1-6]。

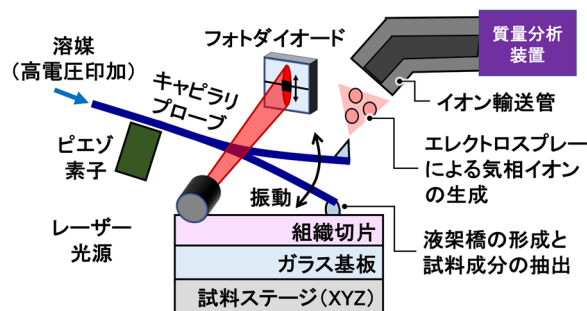


Fig. 2 タッピングモード走査型プローブエレクトロスプレーイオン化法 (t-SPESI) の模式図。

t-SPESI は、先端開口径がマイクロメートルスケールのキャピラリープローブを用いて、試料表面の微小領域に微量の溶媒を供給し、局所的な抽出と試料成分のイオン化を高速に行う技術である

(Fig. 2)。

キャピラリープローブを上下方向に振動させながら、プローブ内に一定の流量で溶媒を流す。試料表面にプローブ先端を断続的に接触させると、両者の間に溶媒の架橋（液架橋）が形成され、溶媒に試料成分が抽出される。その後、試料からプローブ先端が離れる過程で、エレクトロスプレーが生じる。

試料成分が溶解した溶液に高電圧を印加することで、直径がマイクロメートルスケールの帯電した液滴を生成する。大気圧環境において、帯電液滴の溶媒が蒸発するにつれて、液滴のサイズが微細化し、最終的に液滴中に溶解した分子に電荷が与えられ、気相イオンが生じる。

t-SPESI では、試料の微小領域に含まれる成分の抽出とイオン化を繰り返しながら、試料表面をプローブ先端が走査することにより、MSI を実施することができる。

MSI の条件として、10 nL/min の送液速度で、プローブの振動周波数が 600 Hz の条件では、1 回の抽出・イオン化において、約 280 fL の溶媒が消費されると見積もられる。このような極微量の溶媒を用いて、微小領域の成分抽出とイオン化を行うことは、他の方法では困難であり、t-SPESI の特徴の一つである。

3. 1細胞質量分析イメージングシステムの開発

本研究では、生体組織に含まれる細胞の成分分布を可視化する、1細胞 MSI 計測システムの開発と疾患組織への応用を目的とした。

1細胞 MSI に適した計測系を構築するために、小型の倒立型顕微鏡が組み込まれた t-SPESI-MSI システムを開発した (Fig. 3)。本システムでは、試料ステージを上下から挟むように、t-SPESI ユニットと倒立型顕微鏡が配置される。

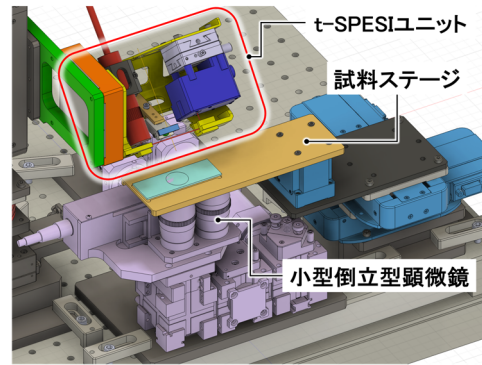


Fig. 3 新型 t-SPESI-MSI システムの模式図。

t-SPESI ユニットには、レーザー光源、ピエゾアクチュエータ、フォトダイオード、ミラーなどが搭載される。ピエゾアクチュエータに固定されたプローブの側方からレーザー光を照射し、プローブの影の位置の変化をフォトダイオードで検出する。プローブの変位情報をロックインアンプに入力し、振動振幅をリアルタイムに計測する。

さらに、振動振幅が設定値を満たすように、ユニット全体の高さをピエゾステージで自動的に制御する。このフィードバック制御によって、試料表面の高さのわずかな変化があっても、振動振幅が一定の範囲内に維持され、抽出・イオン化条件をできるだけ一定に保ちながらプローブ走査を行うことができるようになった。

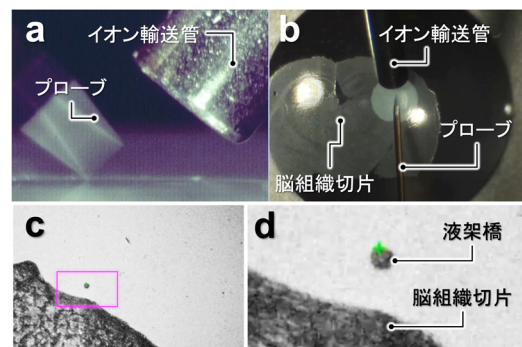


Fig. 4 (a)プローブの側方からの観察の様子。(b)プローブの上方からの観察の様子。(c)試料の裏面からの観察の様子。(d)液架橋と生体組織の拡大図。

新システムでは、プローブの側方と上方からのカメラによる観察に加えて、試料の裏面から、ガラス上の試料とプローブ先端に形成される液架橋を直接観察できるようになった (Fig. 4)。従来の計測システムでは困難であった、生体組織の位置を高精度に特定した上で、抽出領域を確認しながら MSI を実施することが可能になった。

4. 疾患組織の 1 細胞質量分析イメージング

新たに開発した計測システムを用いて、疾患モデルマウスの網膜組織や心臓組織の 1 細胞 MSI を実施した。これらの詳細は、論文執筆中^[7,8]のため概要を述べる。

第 1 に、網膜組織は、複数の細胞層が秩序だって配置された高度な層構造を持つ神経組織であり、各層の細胞が視機能を担う。視細胞外節や網膜色素上皮における脂質代謝の恒常性の破綻は、網膜変性や視機能障害と密接に関係する。網膜のそれぞれの層は数十～数百マイクロメートル程度と薄く、層ごとの成分分布を直接的に捉えるには、高精細 MSI が必要となる。

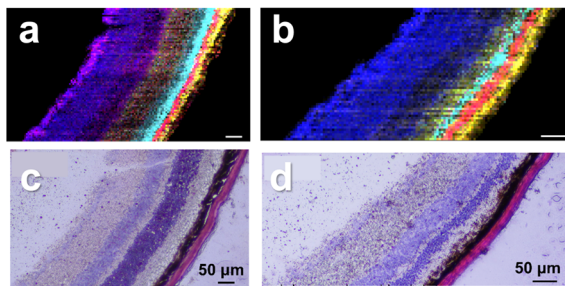


Fig. 5 (a)野生型マウスおよび (b)疾患モデルマウスの網膜組織のイオン像。5 種類のリン脂質のイオン像を重ね合わせた結果を示す。(c)野生型マウスおよび(d)疾患モデルマウスの H/E 染色組織像。

本研究では、脂質代謝酵素の一種である LPLAT8 を欠損した KO マウスと WT マウスを用いて、網膜を構成する細胞層の脂質分布を比較

した。Fig.5 (a,b)にイオン像の比較を示す。イオン像はピクセルサイズ 5 μm で取得した。ここでは 5 種類のリン脂質のイオン像を重ね合わせた結果を示す。また、MSI を実施した後に、同一の組織切片をヘマトキシリン・エオジン (H/E) 染色を施し、光学顕微鏡による観察を行った (Fig. 5(c,d))。

染色組織像において、網膜の層構造が明瞭に確認され、t-SPEI による MSI を実施した後も組織の極端な欠損が生じないことが確認された。イオン像においては、脂質の種類によって層ごとの信号強度が変化することが見いだされた。

複数のリン脂質のイオン像を比較した結果、KO マウスの各々の層の脂質分布が、WT マウスとは異なることを見いだした。LPLAT8 の欠損に伴う、層構造に特異的な脂質代謝異常を可視化できたことで、視機能障害の分子機序を理解するための新たな情報が得られた。

第 2 に、拡張型心筋症は、左室収縮機能の低下と左室内腔の拡張を特徴とする難治性心筋疾患である。その診断は主として除外診断に基づいて行われているが、背景にある分子病態は不均一であると考えられている。したがって、拡張型心筋症の病態をより詳細に理解し、個別化医療の開発へつなげるためには、心臓組織の空間分子情報を取得することが重要である。

ミトコンドリア心筋症モデルマウスの心臓組織の MSI をピクセルサイズ 10 μm で取得した (Fig. 6)。線維化領域に分布する脂質 (スフィンゴミエリン) や、心臓組織の全体に広く分布する脂質 (ジアシルグリセロール) に加えて、局在するアシルカルニチンを明瞭に可視化することに成功した。

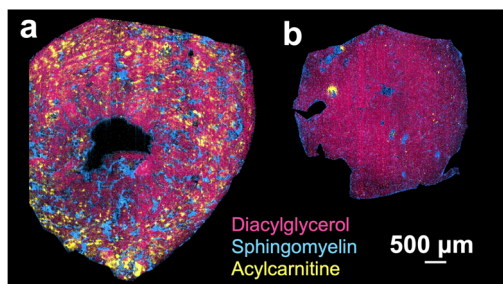


Fig. 6 (a)拡張型心筋症モデルマウスおよび(b)野生型マウスのイオン像の比較。ジアシルグリセロール、スフィンゴミエリン、アシルカルニチンのイオン像を重ね合わせた結果を示す。

心臓の収縮のためのエネルギーはアデノシン三リン酸 (ATP) であり、心筋細胞では、ミトコンドリアにおける脂肪酸 β 酸化によって ATP が産生される。このプロセスにおける中間代謝物としてアシルカルニチンが利用される。

本結果は、心筋症における細胞の代謝異常の空間的特徴を、t-SPESI による 1 細胞 MSI により詳細に捉えることで、病態解明や治療法の開発のための多次元化学分布情報が獲得できる可能性を提示した。

5. まとめと展望

本研究では、1 細胞質量分析イメージングシステムの開発と、疾患組織における脂質分布情報の可視化に取り組んだ。装置構成の改良により、高精細なイオン像を取得できるようになった。本研究で得られた成果は、国内外の学会発表と論文投稿を行った。今後は、ヒトやマウスの疾患組織における病態関連分子の探索や、疾患機構の解明への応用展開を目指す。

6. 参考文献

[1] Yoichi Otsuka, Sayuri Shide, Junpei Naito, Masafumi Kyogaku, Hiroyuki Hashimoto, Ryuichi Arakawa; Scanning probe electrospray ionization for ambient mass spectrometry,

Rapid Communications in Mass Spectrometry, 26, (2012), 2725-2732.

[2] Yoichi Otsuka, Junpei Naito, Shuya Satoh, Masafumi Kyogaku, Hiroyuki Hashimoto, Ryuichi Arakawa; Imaging mass spectrometry of a mouse brain by tapping-mode scanning probe electrospray ionization, Analyst, 139, (2014), 2336-2341.

[3] Yoichi Otsuka, Shuya Satoh, Junpei Naito, Masafumi Kyogaku, Hiroyuki Hashimoto; Visualization of cancer-related chemical components in mouse pancreas tissue by tapping-mode scanning probe electrospray ionization mass spectrometry, Journal of Mass Spectrometry, 50, (2015), 1157-1162.

[4] Yoichi Otsuka, Bui Kamihoriuchi, Aya Takeuchi, Futoshi Iwata, Sara Tortorella, Takuya Matsumoto; High-spatial-resolution multimodal imaging by tapping-mode scanning probe electrospray ionization with feedback control, Analytical Chemistry, 93, (2021), 2263-2272.

[5] Yoichi Otsuka, Kazuya Kabayama, Ayane Miura, Masatomo Takahashi, Kosuke Hata, Yoshihiro Izumi, Takeshi Bamba, Koichi Fukase, Michisato Toyoda; Single-Cell Mass Spectrometry Imaging of Lipids in HeLa Cells via Tapping-Mode Scanning Probe Electrospray Ionization, Communications Chemistry, 8, (2025), 147.

[6] Yoichi Otsuka; Advances in tapping-mode scanning probe electrospray ionization (t-SPESI): Instrumental development for high-spatial-resolution ambient mass spectrometry imaging, International Journal of Mass

Spectrometry, 521, (2026), 117569.

[7] M. Sun, Y. Otsuka, H. Shindou, K. Nagata and M. Toyoda, in preparation.

[8] Y. Otsuka, T. Yasuda, H. Kioka, S. Shimma, T. Ohtani and Y. Sakata, in preparation.

7. その他成果発表等

- ・ (招待講演) 大塚洋一, High-Spatial-Resolution Mass Spectrometry Imaging of Phospholipids in Biosynthesis-Impaired Mouse Tissues via Tapping-Mode Scanning Probe Electrospray Ionization, 2nd Annual Conference on Mass Spectrometry Imaging and Integrated Topics (IMSIS 2024), Münster university, 2024/9/12.
- ・ (招待講演) 大塚洋一, 迅速抽出ーイオン化法「t-SPESI」の開発と生体組織・細胞の質量分析イメージングへの展開, 第 18 回メタボロームシンポジウム, 鶴岡メタボロームキャンパス, 2024/10/23.
- ・ (招待講演) 大塚洋一, 直接抽出ーイオン化法「t-SPESI」の開発と疾患組織の脂質イメージングへの展開, 第 97 回日本生化学会大会, パシフィコ横浜ノース, 2024/11/8.
- ・ (招待講演) 大塚洋一, 技術融合による大気圧サンプリングイオン化法の開発と質量分析イメージングへの応用, 第 86 回イオン反応研究会, 大阪公立大学 杉本キャンパス, 2024/11/12.
- ・ (招待講演) 大塚洋一, Development of tapping-mode scanning probe electrospray ionization for mass spectrometry imaging of tissues and cells, Japanese-German Research Symposium, Advancement and Application of Methods for Proteoform-Centric Proteomics, Kyoto International Community House,

2024/11/17.

- ・ (受賞) 孫夢沢, 第 56 回応用物理学会講演奨励賞, 第 71 回応用物理学会春季学術講演会, Mass Spectrometry Imaging of Mouse Retina by Tapping-mode Scanning Probe Electrospray Ionization (t-SPESI), 2024/9/17. 関連発表者: 孫夢沢、大塚洋一、長田克之、岡田茉樹、進藤英雄、豊田岐聡.
- ・ Yoichi Otsuka, Maki Okada, Tomomi Hashidate-Yoshida, Katsuyuki Nagata, Makoto Yamada, Motohito Goto, Mengze Sun, Hideo Shindou, Michisato Toyoda, High-Spatial-Resolution Mass Spectrometry Imaging of Phospholipids in Biosynthesis-Impaired Mouse Testis via Tapping-Mode Scanning Probe Electrospray Ionization, 72nd ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, ポスター発表, Anaheim Convention Center, USA, 2024/6/4.
- ・ Mengze Sun, Yoichi Otsuka, Katsuyuki Nagata, Hideo Shindou, Akiyoshi Hirayama, Michisato Toyoda, Mass Spectrometry Imaging of LPLAT8 Knockout Mouse Retina by Tapping-mode Scanning Probe Electrospray Ionization, 第 72 回質量分析総合討論会, ポスター発表, つくば国際会議場, 2024/6/11.
- ・ 大塚洋一、新聞秀一、木岡秀隆、大谷朋仁、坂田泰史, 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によるヒト拡張型心筋症組織の質量分析イメージング, 第 72 回質量分析総合討論会, 口頭発表, つくば国際会議場, 2024/6/12.
- ・ Yoichi Otsuka, Kazuya Kabayama, Ayane Miura, Masatomo Takahashi, Kosuke Hata, Yoshihiro Izumi, Takeshi Bamba, Koichi Fukase,

Michisato Toyoda, Mass Spectrometry Imaging of a Single HeLa Cell by Tapping-mode Scanning Probe Electrospray Ionization, International Mass Spectrometry Conference 2024, 口頭発表, MELBOURNE CONVENTION AND EXHIBITION CENTRE, AUSTRALIA, 2024/8/20.

- ・ Mengze Sun, Yoichi Otsuka, Katsuyuki Nagata, Hideo Shindou, Akiyoshi Hirayama, Michisato Toyoda, Mass Spectrometry Imaging of LPLAT8 Knockout Mouse Retina by Tapping-mode Scanning Probe Electrospray Ionization, International Mass Spectrometry Conference 2024, 口頭発表, MELBOURNE CONVENTION AND EXHIBITION CENTRE, AUSTRALIA, 2024/8/22.

- ・ 大塚洋一、新聞秀一、木岡秀隆、大谷朋仁、坂田泰史, 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を用いたヒト心臓

疾患組織の質量分析イメージング, 第 85 回応用物理学会秋期学術講演会, 口頭発表, 朱鷺メッセ, 2024/9/18.

- ・ Mengze Sun, Yoichi Otsuka, Maki Okada, Katsuyuki Nagata, Hideo Shindou, Michisato Toyoda, High-Spatial-Resolution Mass Spectrometry Imaging of Mouse Retina by Improved Tapping-mode Scanning Probe Electrospray Ionization, 第 85 回応用物理学会秋期学術講演会, 口頭発表, 朱鷺メッセ, 2024/9/18.

8. 謝辞

本研究は、公益財団法人島津科学技術振興財団の助成金による支援を受けて実施された。ここに深く感謝申し上げます。あわせて、試料提供、装置開発、測定、解析にご協力いただいた共同研究者、研究室メンバー、関係各位に感謝申し上げます。