

質量分析による生体分子イメージング

—医学における分析技術の波及について—

杉浦 悠毅

1 ライフサイエンスにおけるイメージング分析の役割

生物を構成する生体分子を明らかにする「生化学」、それらの設計図であるゲノムを制御する「遺伝子工学」の時代を経て今日に至るまで、ライフサイエンスでは、未知の生命現象をそれまでにない技術により見いだしてきた。この技術ニーズを満たすべく、多くの分析法が開発されてきたが、生体から真に有用な情報を抽出することに成功し、さらに医療応用まで至るものは僅かである。その一方で、病院の日常診療においてはX線写真（レントゲン）を応用したX線CT（X線 computed tomography）、MRI（magnetic resonance imaging）、さらにサイクロトロンを必要とするPET（positron emission tomography）に至るまで非常に高度な分析法がルーチンに診断法として応用されている。筆者の専門とする質量分析、特に液体クロマトグラフィー質量分析法（LC-MS）の医療応用が十分であるとは言い難い現状から考えると、ライフサイエンスにおける分析技術の波及程度には、何らかのバイアスがあると言わざるを得ない（検査機器としてLC-MSがルーチン化されている施設はごく僅かである）。

この文脈において「イメージング」は重要なキーワードである。レントゲン博士がX線を発見した後、これを用いた画像化技術は骨や肺の病変を描き出す画像診断として積極的に利用され、その名前が示すとおり透過画像診断法の代名詞となった。X線CTはもちろん、MRI、PET検査を扱う核医学は、イメージングを前提とした学問として顕著な発展を遂げたと言ってよい。

本稿では、質量分析を分子イメージング技術として拡張したイメージング質量分析（imaging mass spectrometry、以降イメージングMS）が、その黎明期たる直近の15年程度で、如何にライフサイエンスにおいて応用されていったかを概説したい。核医学の先例が示すように、X線、NMRといった物理学における原理の発見は、

イメージングに拡張されると迅速に医療応用が始まった（図1）。同様に、それまで「専門性の高い技術」であった質量分析も、イメージング技術となったことでユニークな特性が改めて見いだされ、応用展開は今まさに進行の最中である。本稿では、特に生命現象を制御するシグナル伝達分子について、どのように生体内における産生プロセスを可視化するに至ったか、筆者の取り組んだ炎症研究での応用を説明したい。

2 炎症研究におけるイメージングMS

唐突であるが、炎症とは、急性期には発赤（REDNESS）、発熱（HEAT）、疼痛（PAIN）、腫脹（SWELLING）を伴った、生体防御を担う生理反応の連鎖である。一方で慢性化した炎症は、組織の機能不全（LOSS OF FUNCTION）を伴う病態プロセスとしても捉えられる（図2）¹⁾。これらの炎症反応は、組織を構成する実質細胞、免疫細胞、そして外来微生物の化学物質を介したクロストークを介して進行する。細胞間クロストークを介するメディエーター分子としては大きく二つのタイプが存在する。すなわち、

- (1) 「遠隔臓器」に情報伝達し、全身免疫系の協調を担うサイトカイン/ケモカイン、
- (2) これとは対照的に「局所」で空間的に限定した作用範囲を持つ、低分子性のメディエーター（Local mediator）である。

後者(2)の代表例として、プロスタグランジン、リゾリン脂質を含む生理活性脂質が挙げられる。これらは、炎症惹起から収束に至るまでの各過程において、局所の細胞群を同期的に制御するシグナル・メディエーターとして作用する。

実際の炎症組織（例えば、切り傷で腫れた指先を想像して欲しい）においては、ホスト由来の多彩な細胞種のみならず、外因性微生物までもが入り乱れて生存競争が行われている。この“戦場”の様相を呈す組織中において、ホストの細胞群はメディエーター分子を介した情報伝達を行い、協調的に生体防御を行っている。多くの研究からメディエーター分子が同定され、その細胞内作用メカニズムも証明されてきたが、これらを“組織中で見

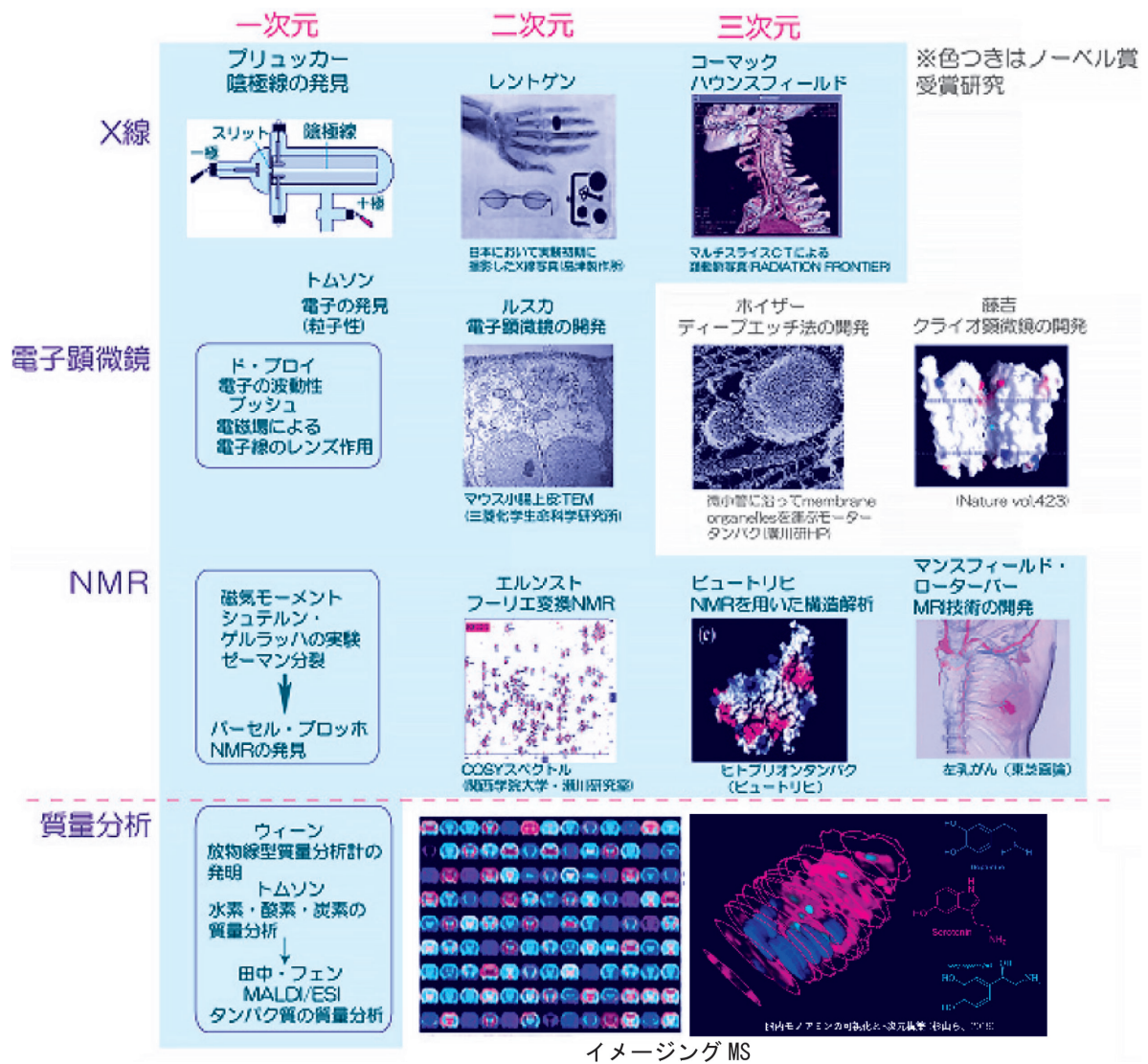


図1 分析技術の多次元化とそれに伴うライフサイエンスにおける波及

る”ことは困難であった。もし Local mediator 分布の二次元的な可視化像ができれば、炎症の組織病理像にとどまらない、細胞間コミュニケーション（と慢性炎症におけるその破綻）をイメージとして解釈できる。

当然のことながら、すり潰した組織試料ではこれらの分布情報は失われ、メディエーター産生細胞種の同定や、組織における作用（分布）範囲を特定することは困難である。さらに Local mediator は極めて微量で産生/作用する、いわゆる“オータコイド”であり、分布可視化には高感度な検出系が必要である。私たちは、炎症メディエーターを直接分布可視化するツールとして、イメージング MS の応用を進めてきた（表1）。質量分析は脂質のようなプローブ作製が困難な低分子の検出ができる点、高感度な分子検出系である点、さらに一度の測定で多種の分子群を一斉測定できる利点を備え²⁾³⁾、生理活性脂質のイメージングに最適である（図3）。

3 イメージング MS でできること

ここで改めてイメージング MS の特徴を整理してみ

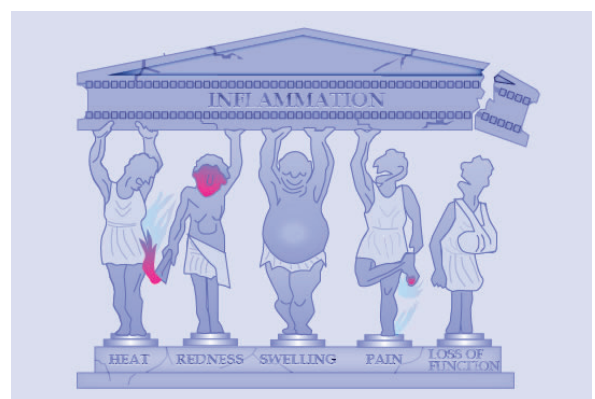


図2 炎症性変化を示した古典的なイラスト
(<https://www.jst.go.jp/crest/inflam/illustr/index.html> より引用)

よう。顕微鏡を用いた分子イメージング法と比較すると分かり易い。最大の違いは、イメージングする対象分子を“直接”検出器に導入している点にある。蛍光免疫染色法では対象分子の存在を『プローブで認識し』、この情報を『蛍光でレポート』する。これに対して、イメージング MS では『プローブなし』に『対象分子そのも

表 1 炎症メディエーター分子の主な定量 / 定性解析手法

| 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 | 質量分析イメージングへ |

低分子量の炎症メディエーター分子は、抗体のようなプローブ作製が困難であり、分子本体を捉える技術に限られている。すなわち、*in vivo* 組織でのサイトカイン、ケモカインまたは分解タンパク酵素はそれぞれに特異的な抗体を用いた免疫染色や、*in situ* ハイブリダイゼーション等が細胞特異的な産生動態に回答を与えてくれる。その反面、生理活性脂質には、現在に至るまで、これに該当する確立された分子イメージング手法は存在しない。イメージング MS は、微量分析、多種分子の一斉検出という観点から脂質性メディエーターの局在情報の取得に適している。

の』をイオンとして検出するため、プローブ作製の必要がない。このような原理が可能とするイメージング MS のユニークな利点として、以下の二点が挙げられる。

- (A) プローブ作成が困難な分子種をイメージングできる利点 (図 4)。
- (B) 多成分を一斉に可視化できる利点 (図 5)。

具体例を挙げて考えてみよう。多くの代謝分子は“プローブ作成が困難である”ために、質量分析でのみ検出できるケースが多く、このような分子群にイメージング MS は特に有効である。代表的な例として脂質、アミノ

酸、ヌクレオチドが挙げられる。これらの低分子量化合物は抗原性が低いために、抗体作製は困難である。特定の代謝物を検出できる化学プローブもあるが、その数は多くはなく、また同時に多数のプローブを用いることは難しい。このようなプローブ作成が困難な代謝産物を、一斉にイメージングする手法としてイメージング MS の応用は着実に進んでいる。

4 イメージング MS のプロトコル

プロトコルの特徴的な点についても触れておこう。凍結組織切片を用いて分子局在情報を画像化するというスキーム自体は、一般的な免疫組織化学染色法と同様である。最大の違いは、レーザー照射によって組織切片上の生体分子をイオン化すること、それらを検出器に直接導入することである。したがって、最も汎用されているマトリックス支援レーザー脱離イオン化法 (matrix assisted laser desorption/ionization) を用いたイメージング MS では、生体分子のイオン化を補助するマトリックス塗布の工程が必要である (図 6)。具体的な注意点は参考文献に譲るが、一連の工程において組織切片は高感度分析機器のサンプルとして調製されていることに留意してほしい。すなわち、免疫染色で行うような組織包埋、ブロック、洗浄により供給される外来分子は、汚染分子としてノイズとなるため、そのような工程はすべて廃されて

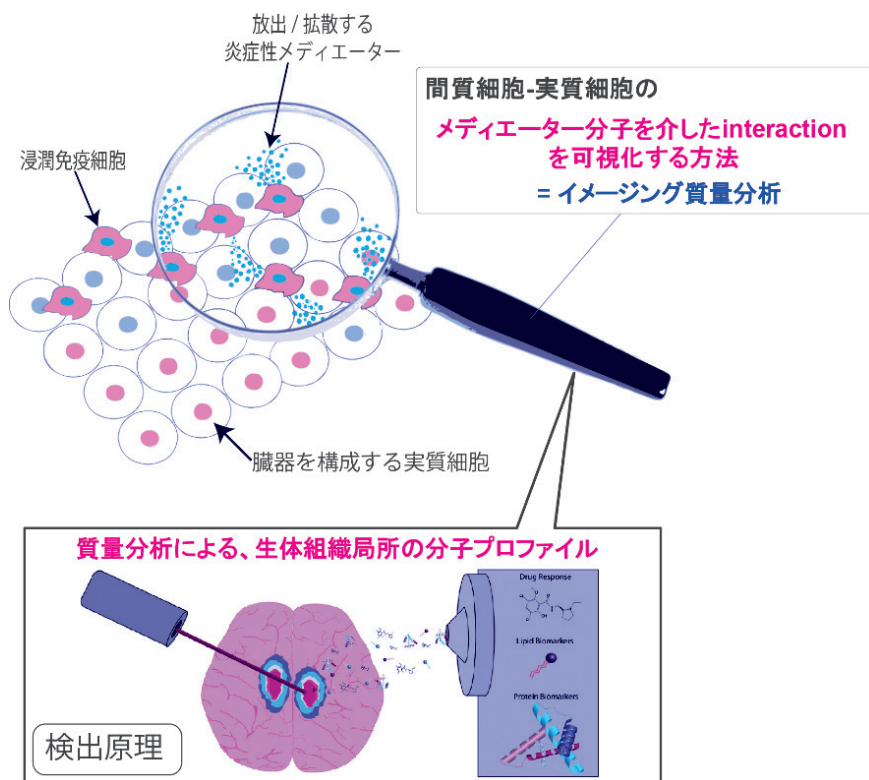


図 3 イメージング MS による炎症メディエーター可視化の概念図

炎症組織に浸潤した免疫細胞は、多彩な炎症メディエーター分子を産生、分泌することで、周囲の細胞にシグナルを伝達する。イメージング MS はこれらのケミカルシグナルを、炎症病理像に重層することで、*in vivo* での炎症の分子病理を明らかにする有用なツールと成り得る。文献 4 より一部引用。

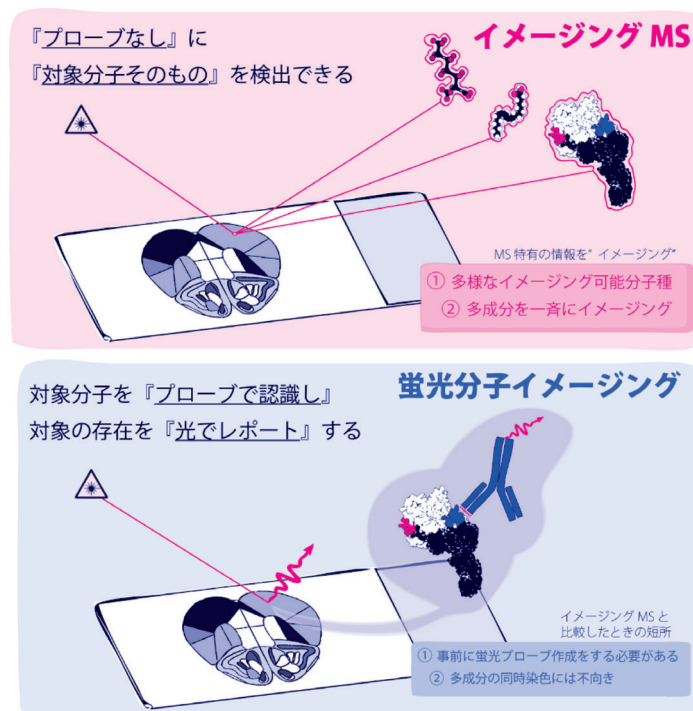


図4 イメージング MS のユニークな分子検出の原理

他の分子イメージング法では対象分子を、『プローブを介して』『光（蛍光や広義の電磁波も含め）』で検出するのに対し、イメージング MS では『プローブなしに』『対象分子そのもの』を検出する。文献2より転載（一部改変）。

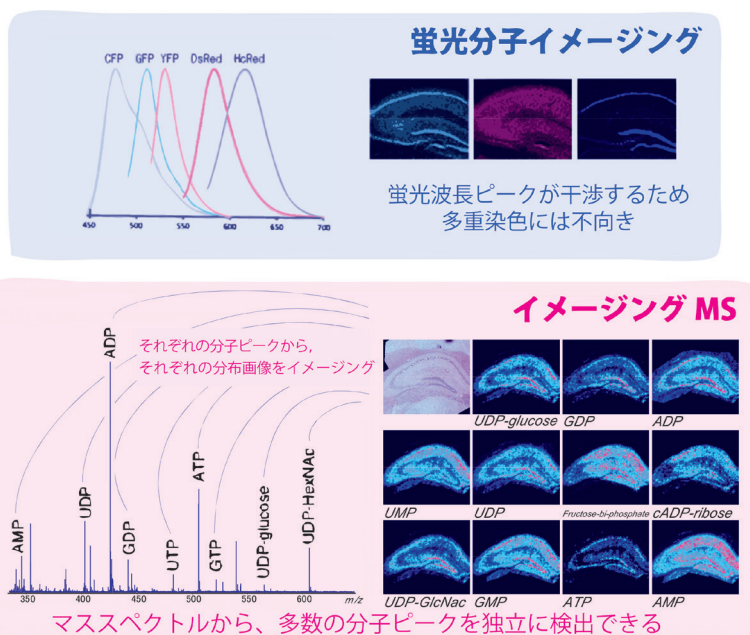


図5 イメージング MS による多数分子の同時検出

一般に蛍光分子イメージングでは使用する蛍光プローブの波長が干渉することで、同時使用できるプローブの数が制限される。一方でイメージング MS では質量スペクトル中に多数の代謝産物シグナルが独立して検出される。したがって一つの切片から多チャンネルの分子イメージングが可能である。文献2より転載（一部改変）。

いる。抗体などのプローブを用いた生体イメージング法と異なり、飽くまでも質量分析の拡張法として認識し、実験に取り組む必要がある。

5 炎症組織での、ケミカルメディエーターの可視化の例

【脊髄損傷モデルラットにおける例】

実際に得られる測定データの例を見てみよう。先に述べたように、イメージング MS は *in vivo* で不均一に起

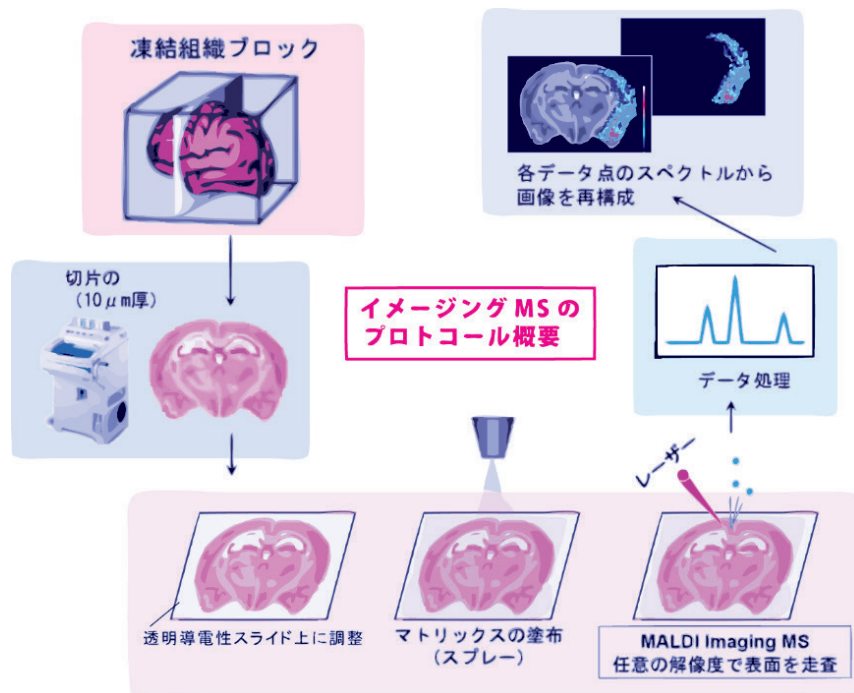


図6 イメージングMSのプロトコル概要

イメージングMSでは、まず凍結組織切片を作成し、その後、マトリックスと呼ばれるイオン化支援剤をスプレー等で塗布する。作成した試料は、対応する質量分析計へ導入された後、走査状に位置情報を記録したマススペクトルを取得する。その後、興味がある分子のピーク強度を各データ点 (=ピクセル) 上で数値として算出し、これを画像として再構成する。文献2より転載 (一部改変)。

このメディエーター産生を可視化し、化学情報と組織形態情報を統合できる。この手法で炎症組織の微小領域を仔細に観察すると、炎症メディエーターを介して外傷や感染に反応し、炎症惹起から収束まで、協調的/同期的に反応する細胞局在領域が観察される。

ここでは、一例として脊髄損傷モデルラットの解析例を示す。ヒト、モデル動物を問わず圧挫による損傷脊髄では、免疫細胞浸潤と細胞構成の変化が見られ、さらにこれらは、部位と経過時間によって変遷していく。具体的には、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。ここでは、血液脊髄関門 (BBB) が破壊された微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、一時損傷組織の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)。さらに慢性期においては、炎症は沈静化し、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グリア瘢痕を形成する (図7)⁵⁾。

この脊髄損傷モデルラットにおいて、イメージングMSによって損傷部位かつ亜急性期に特異的な脂質産生動態を示した例を示す。図8では圧挫による損傷処置の後、12時間 (急性期) から8週間 (慢性期) にわたって、損傷部とその周辺脊髄部のイメージングを行っ

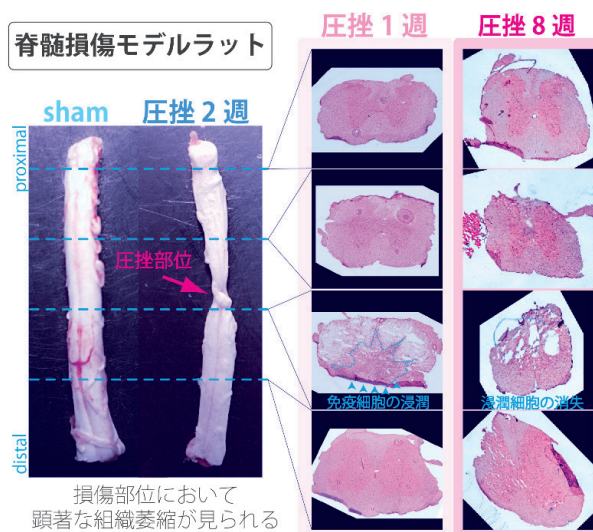


図7 脊髄損傷モデルラットにおける、部位/時期特異的な組織変成

圧挫を施した部位での炎症と、これに引き続く組織リモデリングが起きる。HE染色切片の観察像からは、無数の血球細胞の浸潤 (圧挫2週) と、圧挫部の空洞化及び周囲の組織リモデリング (8週目) が進行しているのが分かる。文献2より転載 (一部改変)。

た⁶⁾。その結果、損傷部においてのみ、亜急性期に一過的上昇を示す脂質分子種を見だし、これが炎症メディエーターの前駆体であるアラキドン酸含有リン脂質*であることを示した (図8中-赤スクエア)。さらに詳細な解析の結果、切片上における上昇が見られる部位は免

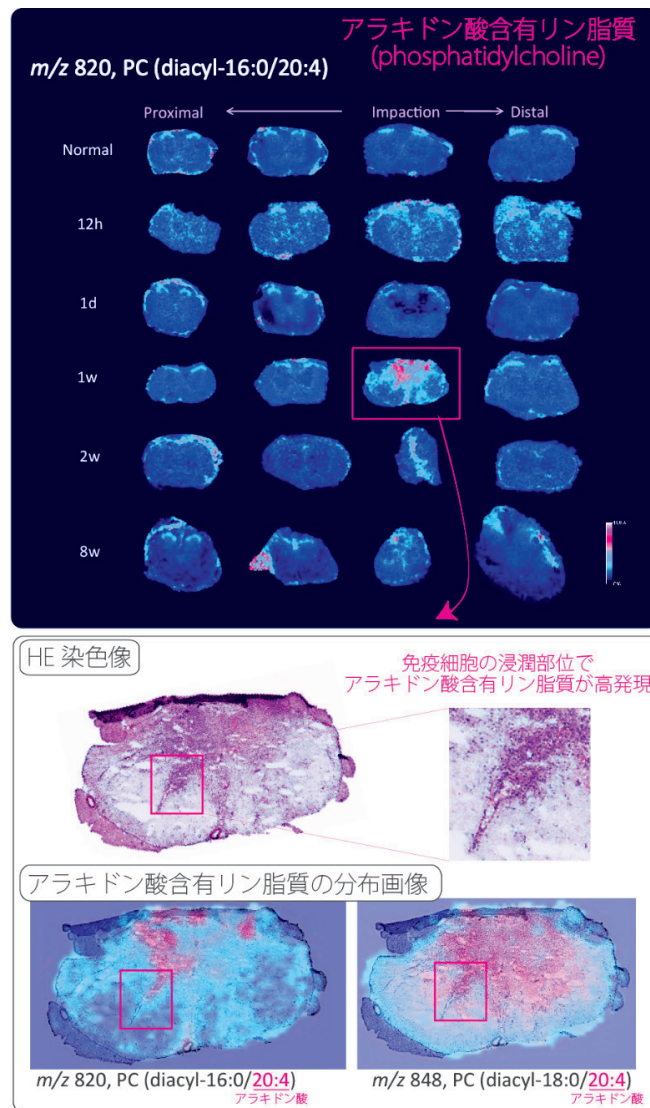


図 8 脊髄損傷亜急性期において、アラキドン酸含有リン脂質は免疫細胞浸潤部位で一過的に上昇する。脊髄損傷後の急性期（損傷 12 時間後）から慢性期（8 週間後）に渡って、損傷脊髄の各断面のイメージング MS を行い変動脂質を探索した。その結果、亜急性期（1 週間後）特異的にアラキドン酸含有リン脂質が上昇し、さらにこの変動は一過的なものであった（上）。さらに詳細な解析の結果、損傷部からの免疫細胞浸潤部位において、複数のアラキドン酸含有リン脂質の上昇が見られた（下）。文献 6 より転載（一部改変）。

免疫細胞の浸潤部位と一致することから、これらの免疫細胞が炎症メディエーター前駆体脂質を多く産生/保持しながら実質組織に浸潤していることが分かる。

6 微量の Local mediator 分子イメージングの難しさ

実際には、このようなリン脂質は生体組織中の存在濃度が高く、これらを対象としたイメージング MS は容易である。何より、上記例はあくまで Local mediator の「前駆体」イメージングであり、はるかに低濃度で存在するメディエーター分子そのものを可視化している訳ではない。一方で、組織切片を直接分析するイメージング MS では、対象分子の生体濃度が低くなればなる程にシグナル検出の難易度が増大する。ここにイメージング MS の微量分子への応用の難しさがある。

微量分子検出が難しい理由は以下のように説明でき

る。通常の質量分析では生体から分子を抽出し、精製した後に分析を行う {例えば、LC（液体クロマトグラフィー）+MS（質量分析）、GC（ガスクロマトグラフィー）+MS を考えてほしい}。生体試料は複雑な混合成分であり、標的分子を夾雑物から分離精製することはライフサイエンスにおける機器分析で必須である。ところが、イメージング MS では組織上での位置情報を得ることのトレードオフとして抽出/分離/精製の操作を省略している。その結果、測定対象となる生体組織切片は、複雑な生体分子の混合物のままである。このような未精製の試料では、存在量（=濃度）が小さい分子ほど検出の難易度が高くなる。

この問題に対して、私たちは、多分野のアイデアを結集することにより、従来は検出することができ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ことに成功した（図 9）。技術的な詳細はここでは割

高感度化を目的とした技術開発

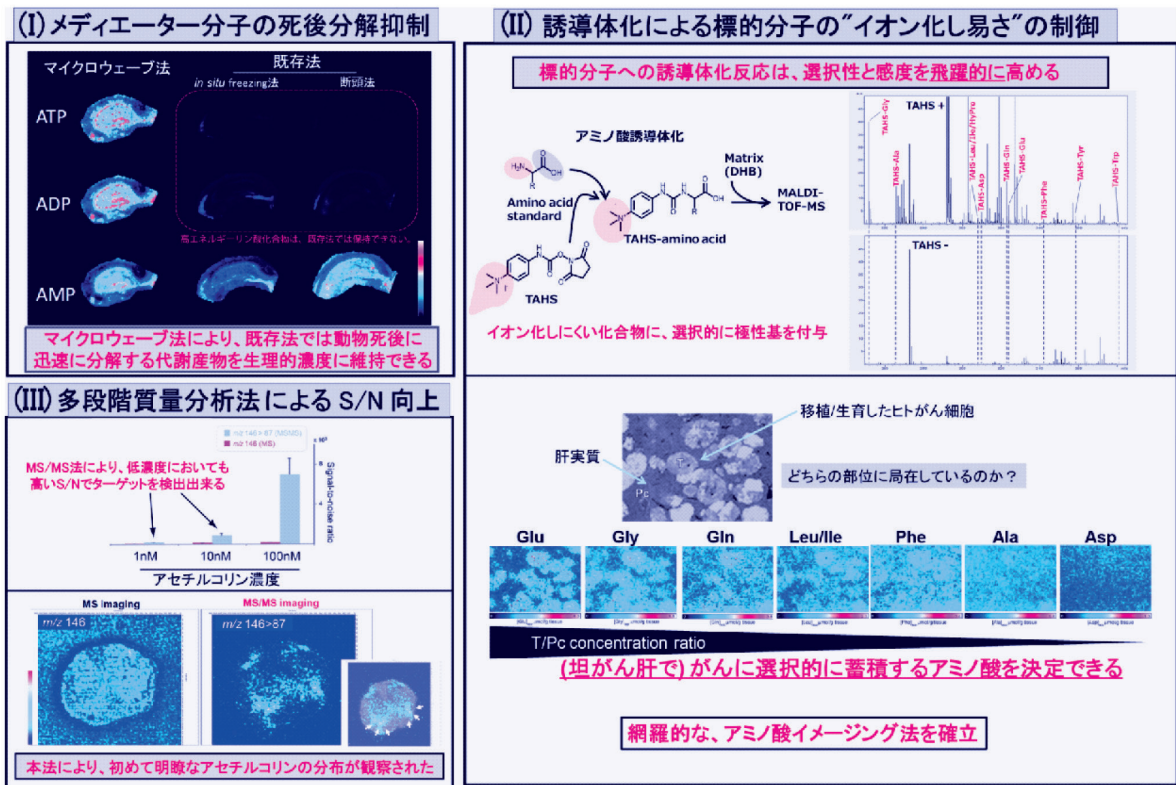


図 9 イメージング MS の高感度化を実現した三つの工夫

(I) メディエーター分子の動物死後の分解を抑制する方法論, (II) 標的化合物の誘導体化, (III) さらに多段階質量分析法の適用の三つのストラテジーにより, 従来に比べ遥かに高感度なイメージング MS を行うことができるようになった。

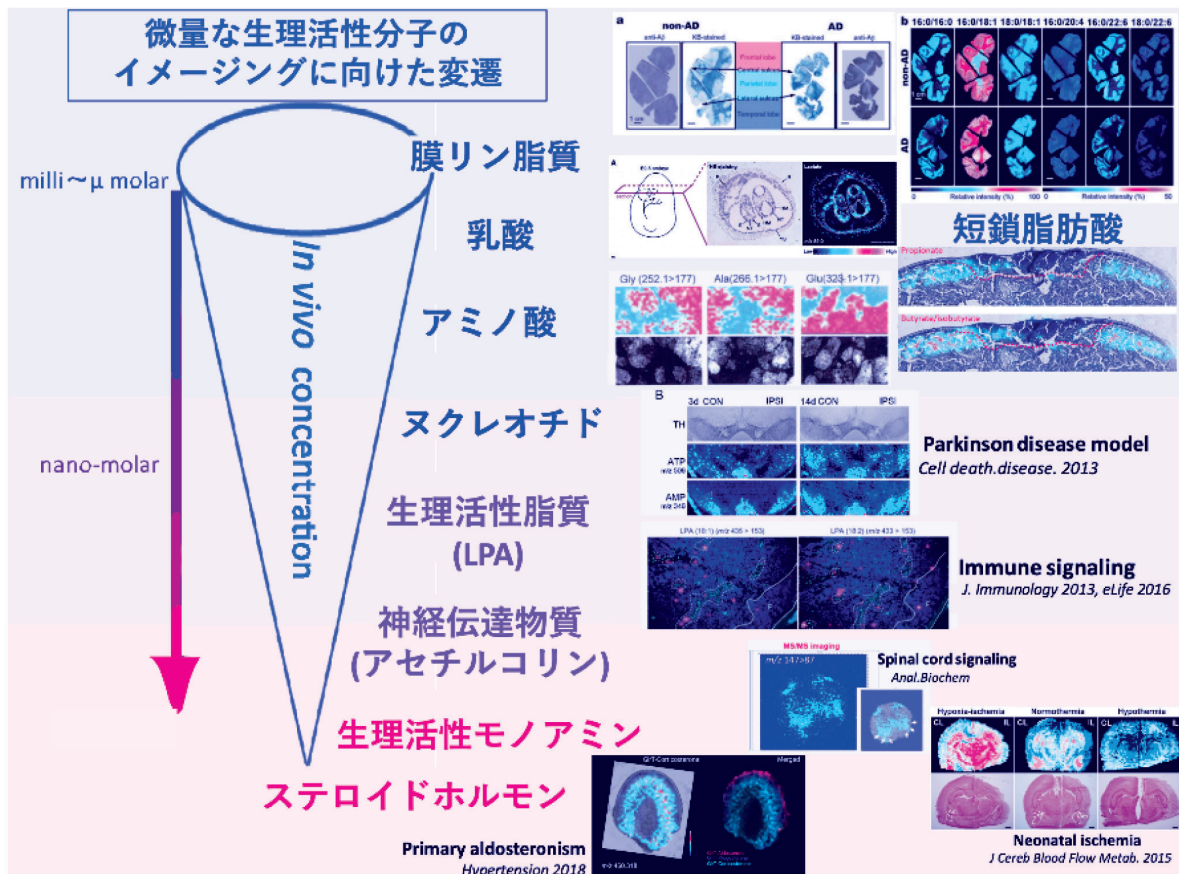


図 10 微量生理活性のイメージング MS が拓く, より実用的なライフサイエンスにおける応用

愛するが、大きく

- (I) メディエーター分子の動物死後の分解を抑制する方法⁷⁾,
- (II) 標的化合物の誘導体化⁸⁾,
- (III) さらに多段階質量分析法の適用⁹⁾,

などにより、現在では、神経伝達物質や生理活性脂質、ステロイドホルモンなど、低濃度で強力な生理活性を持つメディエーター分子群のイメージング MS も比較的容易になってきた。

8 終わりに

これまで生理活性脂質は分子本体の挙動を捉えることが困難であった。今日の質量分析の技術革新と、また長年培われた生化学の知識（特に動物試料の試料調整のノウハウ）の統合により、個体動物中の生理活性脂質動態をイメージングできる時代が到来している（図 10）。

さらにイメージング MS のような新しい分析技術の応用に、生物学の研究者が参入することを期待したい。精密な分析を厳密に行うことはもちろん重要である。本稿で示したように、イメージング MS にはいまだ分析化学として未熟な面が残されていることは否めないが、その分研究者の工夫で新たなブレークスルーがもたらされる余地がある。さらに、自身のライフサイエンス研究の文脈で、適切なポジティブ/ネガティブコントロールを用いた実験を組み立てることにより、生物学のクエッションに対する回答としては十分なクライテリアを満たすデータを得ることが出来る（免疫染色やウエスタンブロットという、必ずしも定量的でもなく、シグナル特異性も高くはない技術を巧妙に利用するのがライフサイエンスの原動力である）。分析化学としての技術的完成も重要であるが、限られた技術リソースを巧妙に利用する

生物学実験には是非イメージング MS を組み入れてほしいと思う。

文 献

- 1) The 5 Cardinal Signs of Inflammation, CREST/ さきがけ「慢性炎症」研究領域, <https://www.jst.go.jp/crest/inflam/illust/index.html> (2021年8月2日, 最終確認).
- 2) 杉浦悠毅, 末松 誠 編: “見つける, 量る, 可視化する! 質量分析実験ガイド~ライフサイエンス・医学研究で役立つ機器選択, サンプル調製, 分析プロトコルのポイント”, (2013), (羊土社).
- 3) 瀬藤光利編: “質量顕微鏡法—イメージングマスマスペクトロメトリー実験プロトコール”, (2008), (Springer Japan).
- 4) H. Ye, E. Gemperline, L. Li: *Clin. Chim. Acta*, **420**, 11 (2013).
- 5) J. W. McDonald, C. Sadowsky: *Lancet*, **359**, 417 (2002).
- 6) M. Hanada, Y. Sugiura, R. Shinjo, N. Masaki, S. Imagama, N. Ishiguro, Y. Matsuyama, M. Setou: *Anal. Bioanal. Chem.*, **403**, 1873 (2012).
- 7) Y. Sugiura, K. Honda, M. Kajimura, M. Suematsu: *Proteomics*, **14**, 829 (2014).
- 8) S. Toue, Y. Sugiura, A. Kubo, M. Ohmura, S. Karakawa, T. Mizukoshi, J. Yoneda, H. Miyano, Y. Noguchi, T. Kobayashi, Y. Kabe, M. Suematsu: *Proteomics*, **14**, 810 (2014).
- 9) Y. Sugiura, N. Zaima, M. Setou, S. Ito, I. Yao: *Anal. Bioanal. Chem.*, **403**, 1851 (2012).



杉浦悠毅 (Yuki SUGIURA)

慶應義塾大学医学部医化学教室 (〒160-8582 東京都新宿区信濃町 35).
E-mail: yuki.sgi@gmail.com

原 稿 募 集

「技術紹介」の原稿を募集しています

対象: 以下のような分析機器, 分析手法に関する紹介・解説記事

- 1) 分析機器の特徴や性能および機器開発に関わる技術, 2) 分析手法の特徴および手法開発に関わる技術, 3) 分析機器および分析手法の応用例, 4) 分析に必要な試薬や水および雰囲気などに関する情報・解説, 5) 前処理や試料の取扱い等に関する情報・解説・注意事項, 6) その他, 分析機器の性能を十分に引き出すために有用な情

報など

新規性: 本記事の内容に関しては, 新規性は一切問いません。新規の装置や技術である必要はなく, 既存の装置や技術に関わるもので構いません。また, 社会的要求が高いテーマや関連技術については, データや知見の追加などにより繰り返し紹介していただいても構いません。

お問い合わせ先:

日本分析化学会『ぶんせき』編集委員会

[E-mail: bunseki@jsac.or.jp]