

研究終了報告書

「ピコ流体質量分析イメージングによる生細胞のがん化の理解」

研究期間:2020 年 12 月～2024年 3 月

研究者:大塚 洋一

1. 研究のねらい

生物の構造的・機能的な最小単位である細胞は、恒常性を維持するための多種多様な分子を含む。細胞内の化学環境は希釈溶液系とは大きく異なり、高密度の分子集合体において、代謝酵素反応など、生命活動に必要な化学反応が高効率で進行する。

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など、生命活動において重要な役割を果たす事が知られている。しかしながら、脂質はゲノム情報から直接的に合成することや、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、細胞脂質の局在性やその機能は未解明な点が多い。生細胞まるごとに含まれる脂質を多次元情報として計測し、そこから細胞の状態を精密に表現する特徴量を抽出し、それらの生化学的意義を理解するというアプローチが重要となる。

Robert Hooke が独自の複式顕微鏡で生物の微細な構造を見いだして以来、細胞を理解するために、イメージング技術が広く活用されてきた。染色・標識された細胞に対して、光学顕微鏡法を用いることで、特定の化学種や構造体を可視化することができる。このアプローチは、空間・時間分解能の点で優位であるが、多種多様な化学種の構造を計測・同定し、可視化するのが困難である。

質量分析イメージング (MSI) では、細胞中の成分を気相イオンに変換し、多次元化学情報であるマススペクトル (m/z (イオンの原子量をその電荷数の絶対値で割った無次元量) と強度情報の相関) を計測する。複数の分子の試料内分布を一度の計測で可視化することができる。これまでに、マトリックス支援レーザー脱離イオン化法 (MALDI) や二次イオン質量分析法 (SIMS) を用いて、細胞や組織の化学成分が可視化されてきたが、MALDI ではイオン化を促進するための薬剤を細胞と混合する必要があるため、SIMS では真空環境に細胞を導入する必要があることから、細胞を直接分析することが困難であった。

本研究では、大気圧環境下で、無染色の細胞のがん化に伴う生体成分群の変調を、多次元化学分布情報の観点から捉え、それらの生化学的意義を究明することを最終目的とした。1細胞レベルの分析を可能とする、革新的シングルセル MSI の計測システムを開発すると共に、細胞や組織中の分子環境の変化を可視化し、細胞の化学状態の識別と、疾患組織の細胞の不均一化に関わる化学成分群の獲得を目指した。

2. 研究成果

(1) 概要

【研究 1:ピコ流体制御による細胞の質量分析イメージングシステムの開発】

1-1:マルチモーダル・シングルセルイメージングシステムの開発

倒立型蛍光顕微鏡に搭載可能な、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) ユニットの開発、および同一細胞の光学像、イオン像、形状像を計測するためのマルチモーダルイメージングシステムの開発を実施した。

1-2: フェムトリットル溶媒の安定送液法の開発

マイクロメートルスケールに先鋭化したキャピラリープローブの先端から、微小体積の溶媒を試料に安定的に供給するための方法を開発した。

1-3: イオンの高感度計測法の開発

試料のマイクロ領域から直接抽出ーイオン化された分子を、高効率に質量分析装置に輸送するためのイオン輸送管を開発した。

【研究 2: 細胞の多次元化学分布情報計測によるがん化の識別と理解】

2-1: マルチモーダル・シングルセルイメージングの実証

HeLa 細胞の蛍光像、イオン像、形状像、および振幅像を一度に取得することに成功した。蛍光像とイオン像の比較から、細胞構造と脂質分布を相互に比較できるようになった。形状像と振幅像の解析から、細胞の高さは 1 μm までの範囲の分布を示すこと、また振幅の変動幅が約 1% に抑制され、フィードバック制御が適切に動作することを示した。

2-2: シングルセル質量分析イメージングによる細胞識別

HeLa mCAT 細胞 (mock 細胞) と、HeLa cGCS 細胞の MSI を実施した。細胞の蛍光像とイオン像の比較から、リン脂質である PC・PE・PS の局在性が認められ、ER やゴルジの領域に対応することが考えられた。シグナル伝達にも関与する SM は細胞全体に分布し、細胞ごとにイオンの信号強度が変化すること、また糖脂質である HexCer は、cGCS 細胞において信号強度が増大し、細胞全体に分布することが可視化された。

【研究 3: 疾患組織の細胞の不均一化に関わる化学成分群の獲得】

リズリン脂質アシルトランスフェラーゼ 3 (LPLAT3) のノックアウト (KO) マウスでは、DHA 含有膜リン脂質 (DHA-PLs) の産生が阻害され、精巣組織における精子頭部の形態異常と、雄性不妊が誘導される。本研究では、野生型 (WT) マウスおよび KO マウスの精巣組織のシングルセル MSI を実施し、細胞分化と脂質分布の関係を検証した。DHA-PLs の分布が、WT マウスよりも KO マウスで顕著に減少し、WT マウスの精細胞の分化過程の違いにより、精巣中の DHA-PLs の分布が変化することを見いだした。

(2) 詳細

論文投稿中、投稿予定のため割愛する。

3. 今後の展開

MSI の代表的な技術である、MALDI や SIMS では、試料のイオン化のための薬剤付与や分子イオンの断片化の課題があった。本研究では、薬剤が不要で、イオンの断片化を抑制できる、革新的シングルセル MSI 技術を世界に先駆けて開発し、細胞の化学状態の識別や、疾患組織の細胞の不均一化に関わる化学成分群の獲得を実証する事に成功した。

有効な治療法が確立されていない、あるいは既存治療では十分でない疾病に対する医療への

要望を意味するアンメットメディカルニーズは、がん、アルツハイマー症、希少疾病などに代表され、新たな治療法・治療薬の開発が求められている。生体組織を構成する細胞の状態を、分子の分布情報から捉える新規イメージング技術の開発は、治療法開発や診断技術の高度化など、医療技術の革新のための根幹的課題である。例えば、薬剤が投与された疾患組織に含まれる分子情報を1細胞スケールで可視化することができれば、細胞内分子エビデンスに基づいた、組織の正常・異常領域の細胞識別(不均一状態の可視化)や、薬物分布の可視化が実現すると期待される。さらに、優れたイメージング技術を、研究者に広く提供し、疾患の対象を拡充することで、疾患関連分子の情報獲得を推進することも重要である。

今後は、t-SPESI によるシングルセル MSI の強みを活かして、ライフサイエンス分野で真に意味のある新情報を獲得することを目指す。バイオマーカーの発見や、疾患機序の理解、さらには、新しい治療法・治療薬開発への応用を導出するために、医学・薬学、情報科学の異分野融合が重要であり、以下の3項目を中心に研究を展開する。

- ① 疾患組織の細胞情報を獲得する、高機能・可搬型 t-SPESI イメージングシステムの研究
- ② 疾患組織中の細胞ネットワークの変容を捉える多次元化学分布情報計測の研究
- ③ 細胞の多次元化学分布情報からの特徴量抽出法の研究

4. 自己評価

本研究課題「ピコ流体質量分析イメージングによる生細胞のがん化の理解」では、世界初のマルチモーダル・シングルセルイメージングシステムの開発と、それを用いたがん細胞の脂質分布の可視化に挑んだ。t-SPESI の特徴である、振動キャピラリープローブを用いる溶媒抽出とイオン化を、サブセルラースケールで実現するために、倒立型蛍光顕微鏡と組み合わせることが可能な t-SPESI ユニットの開発を計画した。しかしながら、装置開発を進める中で、想定外の課題が明らかとなり、それらを一つずつ解決するための要素技術開発を粘り強く進めた。試行錯誤の連続で時間を要したが、t-SPESI ユニットの開発と、溶媒送液の安定化技術開発は、1細胞質量分析イメージングの基盤技術となり、特許出願に繋がった。また、さきがけ研究を発端として、将来の社会実装に向けた議論を進めるとともに、ライフサイエンス分野の研究者との共同研究も推進した。

シングルセル MSI は、当該研究コミュニティにおける最先端研究の一つである。従来のレーザー光やイオンビームを用いたイメージングモダリティが先行する中、私は、溶媒による直接抽出・イオン化で、細胞中の脂質分布の可視化に成功した。t-SPESI によるシングルセル MSI は、生体組織の空間オミクス情報の質と量を大きく飛躍させると考えている。さきがけ研究で開発した技術と経験を活かし、近い将来に1マイクロメートルのピクセル間隔で細胞のイメージングを目指す。さらに計測システムの汎用化と共同研究者ネットワークの拡充を進め、様々な疾患組織や細胞を「観て、学び、活かす」研究を推進する。多次元分子情報に基づいて、疾患組織に内在する代謝物の不均一性を細胞スケールで可視化することによって、未だ知られていない細胞変容を発見し、医学・薬学領域のアンメットメディカルニーズを解決するための新たな情報を提示したい。

5. 主な研究成果リスト

- (1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数:7件

1. Y. Otsuka*, N. Ote, M. Sun, S. Shimma, O. Urakawa, S. Yamaguchi, T. Kudo, M. Toyoda, Solvent Effects of N,N-Dimethylformamide and Methanol on Mass Spectrometry Imaging by Tapping-Mode Scanning Probe Electrospray Ionization, *Analyst*, 148, 1275-1284 (2023).

生体成分を高精度に計測する t-SPESI イメージングシステムの開発と、脳組織の脂質イメージングにおける溶媒の物理化学パラメータの影響に関する論文。飛行時間型質量分析装置を用いることで、脂質種の高精度な推定を実現した。ピコリットル溶媒の選定において、脂質の抽出効率とイオン化効率の両面を考慮することが重要であり、DMF とメタノールの混合溶媒を用いることで、脂質の分布を高空間分解能で計測できることを明らかにした。

2. 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, *Analytical Chemistry*, 93, 2263-72 (2021).

t-SPESI の計測を安定化するための制御技術に関する論文。プローブの振動振幅をレーザー光で計測し、試料ステージの高さをリアルタイムに調整するフィードバック制御システムを開発した。凹凸がある生体組織切片の表面をプローブが走査する間、表面形状の影響を受けることなく、振幅の大きさを一定の値に維持しながら抽出ーイオン化を行うことを可能とした。また、試料の成分分布情報と凹凸情報を同時に計測出来る事も実証した。

3. Y. Otsuka*, Direct liquid extraction and ionization techniques for understanding multimolecular environments in biological systems, *Mass Spectrometry (Tokyo)*, A0095, 10 (2021).

質量分析イメージングに関する総説。これまでのレーザーイオン化法やエレクトロスプレーイオン化をベースとした直接抽出イオン化法の歴史と、それらを用いた生体組織の質量分析イメージングの事例を比較・考察し、将来展望を述べた。

(2)特許出願

研究期間全出願件数:2 件(特許公開前のものは件数にのみ含む)

1	発 明 者	大塚洋一
	発 明 の 名 称	振動装置、振動システム、抽出ーイオン化システム、質量分析システムおよび振動方法
	出 願 人	国立大学法人大阪大学
	出 願 日	2022/3/11
	出 願 番 号	特願 2022-038565
	概 要	1 細胞質量分析イメージング装置に関する技術

(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)

招待講演

1. Sampling and Ionization with Ultralow Volume Solvent for Multidimensional Chemical Distribution Information of Tissues and Cells, Yoichi Otsuka, MRM2023/IUMRS-ICA2023

Grand Meeting, Kyoto International Conference Center, Kyoto, Japan, 2023/12/15.

2. Control and Utilize Periodic Motions for the Development of Time-of-flight Mass Spectrometer and Ambient Sampling-Ionization Technique, Yoichi Otsuka, Asia-Oceania Mass Spectrometry Conference 2023 (AOMSC 2023), ICC JEJU, Seogwipo, Jeju Special Self-Governing Province, Korea, 2023/8/21.
3. Mass spectrometry imaging of biological tissues with picolitre charged solvents, Yoichi Otsuka, 14th International Symposium on Atomic Level, Characterizations for New Materials and Devices '22 (ALC '22) Bankoku Shinryokan, Okinawa, Japan, 2022/10/19.
4. 直接抽出ーイオン化法による生体組織・細胞の高精細質量分析イメージング、SIMS 研究会 16、成蹊大学、2023/8/31.

著作物

1. 質量分析イメージング法の原理と応用、医学のあゆみ、287 巻 9 号