

主論文の要旨

**LC-MS/MS imaging
with thermal film-based laser microdissection**

〔ホットメルトフィルム-レーザーマイクロダイセクション技術を用いた LC-MS/MS imaging 法の確立〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
分子医薬学講座 薬物動態解析学分野

(指導：澤田 誠 教授)

大矢 倫子

【緒言】

近年、脳内での物質の分布を標識せずに可視化できる質量分析イメージング(MSI)技術が注目されており、神経科学や薬理学の分野においては、脳内の細胞間情報伝達や薬物の詳細な作用点を明らかにするために広く利用されている。MSIの中でマトリックス支援レーザー脱離イオン化(MALDI)法を用いた技術は、専用の装置が開発されたことやハイスループットな分析が可能であることから利用されることが多く、最近では神経伝達物質や種々の薬物の分布の可視化法も開発されつつある。しかし、この技術は定量の再現性が低いことや、組織内の存在量が少ない低分子物質は、目的物質のピークがノイズにより妨げられることから、正確なイメージングを行うためには前処理技術の開発が必須となっている。一方で液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析(LC-MS/MS)法は、微量定量が可能であるが、目的成分を抽出する際に位置情報が失われるためMSIには用いられてこなかった。

そこで本研究では、ホットメルトフィルム・レーザーマイクロダイセクション(LMD)を前処理技術として位置情報を保持することにより、LC-MS/MSを用いたMSI技術を開発した。本研究で用いたLMD装置は、顕微鏡下で組織切片から目的位置の組織を任意の大きさに切り出し、ホットメルトフィルム上に一定の間隔に並べることができるため、それぞれの組織小片から測定対象物質を抽出回収すれば、位置情報を保持したままLC-MS/MS分析を行うことができる。これにより各サンプルの測定結果を空間情報に基づき再構築することでイメージングが可能となる。本研究では、Pilocarpine誘発系痙攣モデルマウスを用いて、脳内での薬物と神経伝達物質の分布を可視化した。

【方法】

Pilocarpine誘発性痙攣モデルマウスの脳を試料として用いた。マウスにPilocarpine 400 mg/kgを腹腔内投与した1時間後、心臓穿刺により灌流脱血操作を行い、脳を摘出して凍結ブロックを作製した。クリオスタットにて凍結切片(10 µm厚)を作成し、20 Pa以下で速やかに凍結乾燥を行った。LMDにより目的の組織を40 µm径の大きさに組織切片から回収し、ホットメルトフィルム上に384プレートの間隔(4.5 mm)で並べた。組織を回収した後、抽出液40 µL(50%アセトニトリル)を各ウェルに加えたプレートにフィルムを貼付け、1時間抽出操作を行い、遠心分離後、上清20 µLをTable 1, 2のLC-MS/MS条件を用いて分析した。

LMD-LC-MS/MSシステムの再現性の検証にはC57BL/6マウスを、LMD-LC-MSIの再現性の検証とPilocarpine痙攣誘発性痙攣モデルの脳機能解析及び単一神経細胞の特性の解析には、神経活動履歴を蛍光タンパク質dVenusにより可視化できるArc-dVenus Tgマウスを用いた。

【結果】

本研究により確立したLMD-LC-MSIの概念図をFig. 1に示した。まずこのシステ

ムの再現性を確認するため、マウスの脳組織切片の海馬領域（600 μm \times 600 μm ）から LMD により組織小片を 10x10=100 個集めて回収することにより分析対象組織の細胞構成のばらつきを平均化し、LC-MS/MS で分析した。その結果、連続切片（n=3, 5）内での Glu、GABA、Pilocarpine の C.V.値が 10 %以下であった（Table 3）。次にマウスの脳組織切片の海馬領域から回収した単一組織小片（40 μm 径）について分析した結果、それぞれの測定対象物質（Pilocarpine、Glu、GABA、ACh、Cho）について分析する十分量が含まれていることがわかった（Fig. 2）。LMD-LC-MSI の再現性については、連続した 2 枚の脳組織切片の海馬内同一領域（200 μm \times 200 μm ）から LMD により組織小片を 25 個回収し、LC-MS/MS による分析後、イメージを再構築した。その結果、連続した切片に含まれる神経細胞の活動状態と Glu および GABA の量が一致していることがわかった（Fig. 3）。そこで、Pilocarpine 誘発性痙攣モデルマウスを LMD-LC-MSI を用いて分析した結果、Pilocarpine が多く分布している顆粒細胞では GABA の存在量が少ないことに対して神経活動が亢進していることがわかった（Fig. 4）。さらに同モデルマウスを単一細胞ごとに分析した結果、錐体細胞において Pilocarpine による Glu と GABA 応答が、性質が異なることが報告されている錐体細胞層の小領域ごとで異なることを明らかにした（Fig. 5）。

【考察】

本研究では、LMD 技術を前処理技術として用いることで、LC-MS Imaging を世界で初めて実現した。

MSI は、複数の物質を標識や分子マーカーを用いずに同時に直接可視化できるため、複雑な生体試料中の分子間相互作用を検出することができる。MALDI-MS は、試料表面上のレーザー走査により 2 次元の質量スペクトル情報を得ることができるため、MSI に広く利用されている。しかし、分析対象物質のイオン化に Matrix を用いるため、定量性や再現性が十分でなく、また測定感度が低いことなどの課題がある。一方、LC-MS/MS は、対象の物質をカラム内で分離することで精度よく高感度に複数の物質を同時に分析できるためより高精度な分析が可能となるが、試料調製の工程で位置情報が消失してしまう。そこで本研究では、位置情報が保持できる LMD と LC-MS/MS を組み合わせることにより、LC-MSI を可能にした。

本研究で用いた Pilocarpine は、大量投与することで発作およびてんかん重積を誘発するが、その発症メカニズムについては細胞レベルでは不明な点が多い。そこで、LMD-LC-MSI を用いて Pilocarpine 誘発性痙攣モデルマウスの Pilocarpine の分布と痙攣発症に関与する神経伝達物質の分布を可視化した（Fig. 4）。この結果は、薬物の標的や作用機序を明らかにするためには一細胞単位での薬物および神経伝達物質の量を測定することが必要であることを示唆している。また本技術を用いて海馬錐体細胞の領域ごとの性質の違い（Fig. 5）を示すことができたことから、単一細胞レベルでの神経伝達物質の変動の測定が、神経回路における細胞間情報伝達を計測する技術となりうることを示している。さらに薬物の受容体への結合解析や、細胞ごとの薬物応答

性や不活性化機構の違いの解析にも応用できる。

一方で、LMD を用いた組織極小領域の採取技術は、一般的な分析データに位置情報を加えることができるため、GC/MS 等の他の分析装置や PCR を用いた遺伝子分析などの結果に対してもイメージング化が可能となる。また高分解能で組織を回収できるため、細胞内小器官の解析への応用も期待できる。

【結語】

本研究では、LMD と LC-MS/MS を組み合わせることにより LC-MS Imaging を世界初めて実現した。さらに LMD-LC-MS 技術は、単一細胞解析や細胞内小器官の解析が可能であるため、生命科学、生物学、薬理学、病理学および神経科学分野などの様々な分野での応用が期待できる。