

対象とするためであり、特に MALDI 法を用いる場合マトリックスと試料分子が緊密に存在する必要があるため解析対象となる領域へのマトリックス塗布が可能となるよう切片で切り出しておくためである。切片の厚さは  $2\mu\text{m}$  のような薄いものほどイオン化した生体分子の S/N 比が向上することが明らかになっている<sup>9)</sup>が、安定して切片を作製することを考慮すると  $8\text{--}12\mu\text{m}$  程度の厚さが一般的である。

多くの分子では、生体から抽出した試料を速やかに凍結させた試料で最もイオン化が高い。ホルマリン固定などの固定法を用いた試料でも解析は可能であるものの、固定した試料を用いた解析では多くの分子で検出感度の低下がみられる。臨床試料を解析に用いるに当たっては病理組織検査との兼ね合いから、試料が固定されることが現実的であるため、質量顕微鏡法に則した固定法も研究されている。塩化リチウムを用いた固定法を用いることによって、一般的な病理組織染色が可能でありながら脂質の脂肪酸鎖を同定しやすくすることが報告されている<sup>10)</sup>。

MALDI ではレーザー、SIMS ではイオンビームを組織切片上の 1 点 1 点に走査状に行い、それぞれ点で発生したイオンを分析して各点におけるシグナル強度の相対比から二次元イオンマップを構築することによりイメージングを行う。このため空間分解能はレーザーおよびイオンビームの直径に依存する。MALDI では空間分解能は  $5\mu\text{m}$  となっており、SIMS では  $35\text{nm}$  が可能とされている<sup>11)</sup>。MALDI では投影型も研究されている。投影型 MALDI では試料前面に均一な強度でレーザーを照射してイオン化させ、イオン像拡大用静電イオンレンズによって拡大した後、拡大したイオンを検出器に投影し、位置情報と飛行時間の両方を測定する方法である。開発段階ではあるが約  $3\mu\text{m}$  の空間分解能を示しており、1 回のレーザー照射で広い領域を同時に解析できる高速性と合わせて今後の実用化が期待される<sup>12)</sup>。

質量顕微鏡で得られるデータは  $m/z$  とそのシグナル強度、そして位置情報である。これらの情報だけでは分子構造が推定できず、多段階質量分析 (MS<sup>n</sup>) 解析が必要となることがある。多段階質

量分析とは注目する分子の質量電荷比を選択的に取り出し、希ガスと衝突させることにより、化学構造に特徴的なイオンの断片化を起し、これらの断片を再度質量分析し、元の分子がどのような構造を有しているのかを検証する方法である。MALDI 質量顕微鏡にはイオンの分解・断片化を行う機能を備えたものもある。断片化前の化合物の質量数や断片化したイオンの質量数を用いて、データと MassBank (<http://www.massbank.jp>) をはじめとした既存のデータベースを参照することにより化合物の同定を行う。さらに、既知の分子であれば試薬メーカーから購入するか、東京大学創薬オープンイノベーションセンター (<http://www.ocdd.u-tokyo.ac.jp>) のような化合物ライブラリーから取り寄せるなどをして“標準試料”を取得し、MS<sup>n</sup> 解析を行って組織から得られたマススペクトルと比較することにより分子推定の信頼性を向上させることも可能である。

### MALDI 質量顕微鏡を用いた生体組織解析

生体組織解析においては MALDI 質量顕微鏡解析が最も盛んに行われている。その解析対象としては薬物、代謝物、脂質、ペプチド、タンパク質と幅広い分子種が解析対象とされており、低分子から高分子までの幅広い質量と様々な性質を持つ分子が対象となる。ここでは MALDI 質量顕微鏡開発を行ってきた筆者らが発表してきた生体組織解析を中心に、異なる分子種の解析を紹介する。

質量顕微鏡により急速に開拓されてきているのは脂質イメージングである。脂質は細胞二重膜を構成する主要成分であり、生体中における存在量は非常に豊富である。このため、MALDI 質量顕微鏡では検出が容易であり、脂肪酸の組成の違いによる分布まで識別できる。一方、他の方法では脂質を検出することも難しい。脂質は構造の違いからホスファチジルコリン (phosphatidylcholine: PC)、スフィンゴミエリン (sphingomyelin: SM)、ホスファチジルエタノールアミン (phosphatidylethanolamine: PE)、ホスファチジルセリン (phosphatidylserine: PS)、ホスファチジルイノシトール (phosphatidylinositol: PI) などに分類

$m/z$  798.5 のマ  
(文献 13 より)

される。

近年、シク告されており知られている微鏡解析を行  
レイン酸を 2  
布しているこ  
乳癌におい  
PI が痛部で  
いる<sup>14,15)</sup>。正  
になっている  
より、大脳、  
が多く分布す

脂質を解析  
脂質が分解さ  
れることがあ  
るが、生体中  
しているもの  
えられる。そ  
しやすいマト  
ことで脂肪酸  
ノ粒子の側鎖  
適な脂肪酸が  
マウス網膜切  
たところ、幅  
の膜構造を有  
酸によって 3  
3)。特に 10  
膜における光  
ンパク質であ

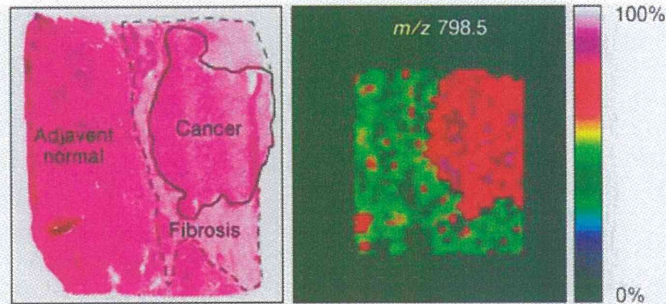


図 2 ヒト肝癌組織切片の質量イメージング像

$m/z$  798.5 のオレイン酸を構成要素に持つホスファチジルコリン(PC) (16:0/18:1) が癌部に分布することが示された。(文献 13 より改変して転載)

される。

近年、シグナル伝達に関与することが盛んに報告されており、癌では癌組織特異的な脂質代謝が知られている。実際にヒト肝癌組織切片の質量顕微鏡解析を行うと、癌部にパルミトレイン酸やオレイン酸を 2 番目のアシル基に持つ PC が強く分布していることが示された<sup>13)</sup>(図 2)。また、ヒト乳癌においても不飽和脂肪酸鎖を持った PC や PI が癌部で有意に上昇していることが示されている<sup>14,15)</sup>。正常組織においても脂質分布が明らかになっている。マウス脳切片の質量顕微鏡解析により、大脳、小脳、海馬領域、線条体、視床に PC が多く分布することが示された<sup>16)</sup>。

脂質を解析する際に、イオン化条件によっては脂質が分解されて構成成分である脂肪酸が検出されることがある。もともと遊離しているものもあるが、生体中の存在比から、主にリン脂質に結合しているものが断片化され、検出されていると考えられる。そのことを逆手に取り、断片化を起こしやすいマトリックスとして銀ナノ粒子を用いることで脂肪酸のイメージングが可能である。銀ナノ粒子の側鎖には溶解性や安定性維持のために最適な脂肪酸が配位合成される。この銀ナノ粒子をマウス網膜切片へと塗布し質量顕微鏡解析を行ったところ、幅 200-300  $\mu\text{m}$  の微小領域内に 9 層もの膜構造を有しているマウスの網膜において脂肪酸によって分布が異なることが示された<sup>17)</sup>(図 3)。特に 10  $\mu\text{m}$  の間隔で測定することにより、網膜における光神経伝達に重要な役割を果たす膜タンパク質であるロドプシンとのかかわりが強く、

過去に報告されているドコサヘキサエン酸(docosahexaenoic acid; DHA,  $m/z$  327.3)が、ロドプシンの分布と重なる形で示された。

脂質とは反対にタンパク質は検出することが難しい場合が多い。これはタンパク質のような高分子はイオン化効率が悪いためである。また、生体中に豊富に含まれる脂質はタンパク質を含む他分子のイオン化効率を抑制するためである。そこで組織切片を有機溶媒に浸漬させて脂質を除去する方法、およびケミカルインクジェットプリンターCHIP-1000(島津製作所)を用いて 100  $\mu\text{l}$  のタンパク質分解酵素微量液滴を滴下し、位置情報を維持しつつ高分子をペプチド断片化する方法が有用である。こうした処理を行い分化度の異なる胃癌組織を比較解析すると、低分化型胃癌の特異的シグナルとして  $m/z$  1325.6、すべての型の胃癌特異的シグナルとして  $m/z$  976.4 をそれぞれ同定し MS2 解析を行ったところ、それぞれ Histone H4 および actin であることが判明し、胃癌の分化度を分けるマーカーが特定された<sup>18)</sup>(図 4)。

代謝物の網羅的解析(メタボロミクス)は質量分析による代表的な解析である。質量顕微鏡解析においては、臓器摘出に注意を払うことによってイメージングが可能となる。代謝物の多くは死後分解による影響を大きく受けるものの、質量顕微鏡解析では位置情報を保つために、通常メタボロミクス解析のように酵素を失活させるような溶液を加えることは避けたほうがよいためである。カイニン酸を投与することによりてんかん発作を誘導させたマウス脳の切片を質量顕微鏡解析では、

比を選択的に  
により、化学  
こし、これら  
がどのような  
方法である。  
解・断片化を  
化前の化合物  
数を用いて、  
massbank.jp)  
を参照するこ  
に、既知の分  
るか、東京大  
ター(http://  
化合物ライブ  
標準試料”を  
得られたマス  
子推定の信頼

### 生体組織解析

I 質量顕微鏡  
の解析対象と  
下、タンパク  
ており、低分  
々な性質を持  
ALDI 質量顕  
してきた生体  
解析を紹介す  
てきているの  
細胞二重膜を  
おける存在量  
ALDI 質量顕  
の組成の違い  
他の方法では  
は構造の違い  
phatidylcho  
hngomyelin ;  
アミン(phos  
ファチジルセリ  
ファチジルイ  
Y)などに分類

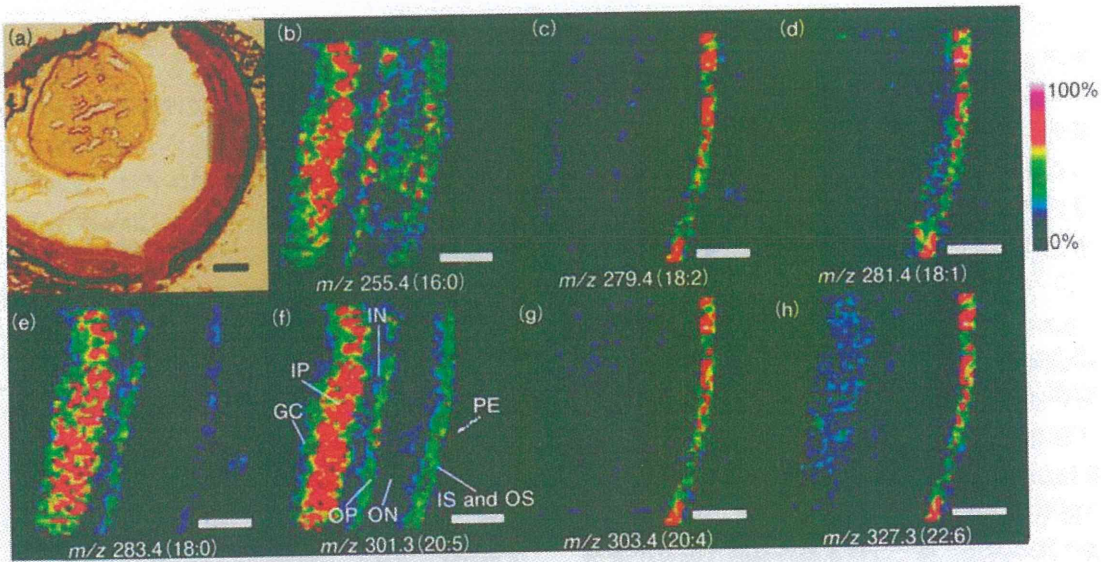


図 3 マウス網膜切片の質量イメージング像

網膜の各層における脂肪酸分布が異なることが示された。パルミチン酸(16:0,  $m/z$  255.4), リン酸(18:2,  $m/z$  279.4), オレイン酸(18:1,  $m/z$  281.4), ステアリン酸(18:0,  $m/z$  283.4), eicosapentaenoic acid(20:5,  $m/z$  301.3), アラキドン酸(20:4,  $m/z$  303.4), ドコサヘキサエン酸(22:6,  $m/z$  327.3)。(文献 17 より改変して転載)

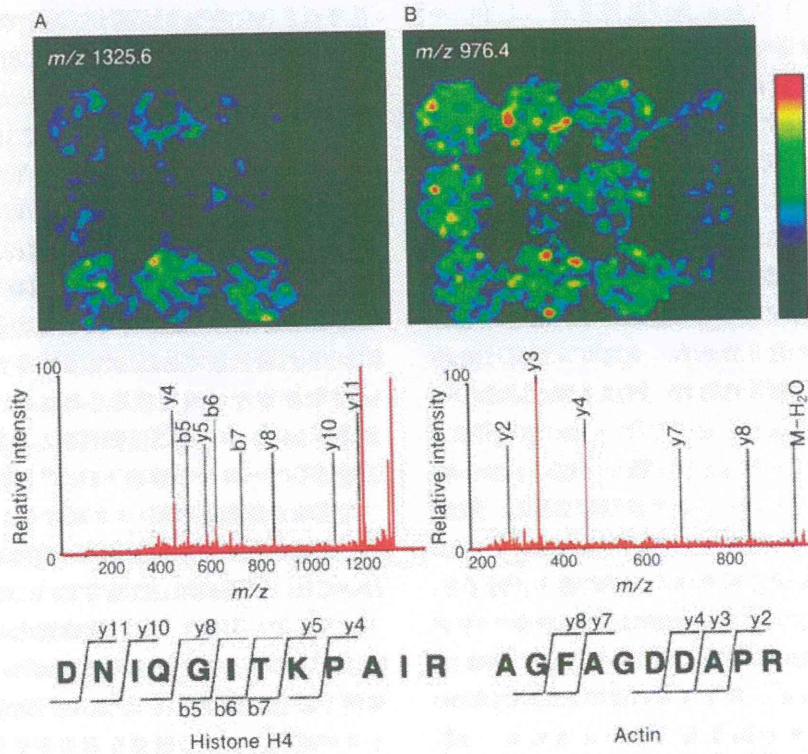


図 4 パラフィン包埋済み病理試料から作製した胃癌切片の質量イメージング像

$m/z$  1325.6(A)と  $m/z$  976.4(B)のシグナル画像。3段に置かれた円形の試料の上から中分化型癌組織、高分化型癌組織、低分化型癌組織。中段スペクトルはMS解析の結果。下段はデータベースによる Histone H4と Actin の C 末端側領域のイオン断片化情報。(文献 18 より改変して転載)

control  
seizure (30 min.)  
上段はコント  
ことが示され

A S  
B F  
C

マウス全身薄  
グナル( $m/z$ ;  
変して転載)

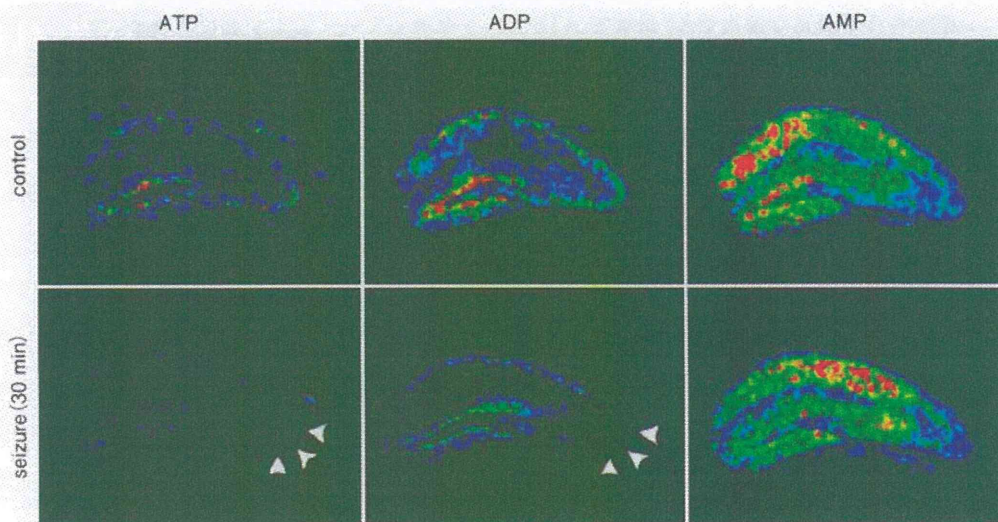


図 5 マウス脳切片の質量イメージング像

上段はコントロール、下段はてんかん発作を誘導した脳。ATPとADPが海馬のCA3領域(矢印)で顕著に減少していることが示された。(文献19より改変して転載)

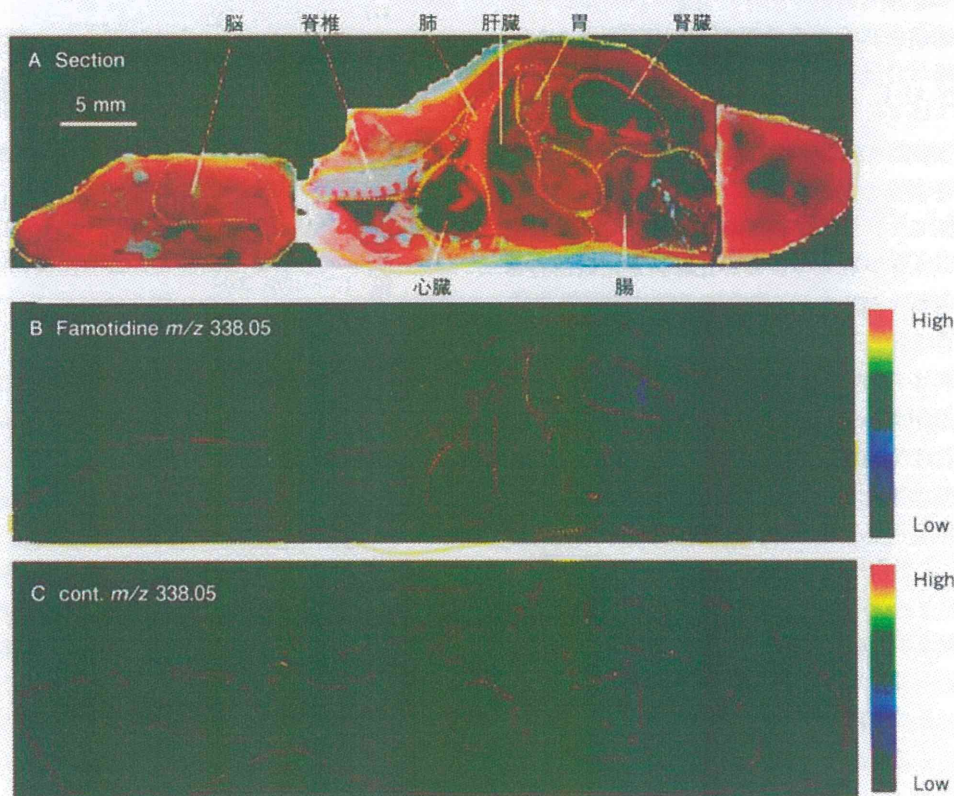


図 6 マウス全身切片の質量イメージング像

マウス全身薄切切片の光学画像(A)と質量イメージング像(B, C)。ファモチジン投与個体(B)ではファモチジン由来のシグナル( $m/z$  338.05)が腎臓の領域において検出された。未投与個体(C)では同シグナルは検出されない。(文献20より改変して転載)

18:2,  $m/z$   
 $m/z$  301.3).

化型癌組織、  
末端領域の

カイニン酸受容体が豊富な海馬CA3領域でATPとADPが顕著に減少していることが見いだされた<sup>19)</sup>(図5)。この結果により、てんかん発作による興奮毒性にさらされたCA3領域で選択的エネルギー代謝の存在が示唆された。

薬物動態解析においても質量顕微鏡を用いることができる。通常の薬物動態解析では対象ごとのプローブを作製する必要があるため大幅な低予算化および短縮化が可能である。また、薬物投与による生体反応を網羅的に解析することが可能である。これらの利点から、すでに製薬メーカーでは広く使用されている。ヒスタミンH<sub>2</sub>受容体拮抗薬であるファモチジンを投与したマウスの全身切片を作製し、質量顕微鏡解析を行うと、ファモチジンのシグナルが全身臓器のうち腎臓に一致する領域に相対的に高く分布した<sup>20)</sup>(図6)。ファモチジンの腎臓への分布は、全身オートラジオグラフィの結果と同様であり、質量イメージングが薬物動態解析にも有効であることが示された。

## おわりに

質量顕微鏡法は特異的なプローブや抗体を作製するのが困難な代謝産物を検出することが可能な方法である。一方、網羅的解析を行うため存在量が多く、イオン化効率が高い化合物が比較的容易に解析され、微量な化合物の検出が困難であるという欠点も持っている。今後は固定法や前処理法の検討により特徴を持った微量な化合物群ごとの検出促進が進められていくことが考えられる。また、これまで進められてきた工学的技術の開発による高解像度化や高感度化がさらに進み、1細胞単位や細胞内小器官を標的とした質量顕微鏡解析

が発展していくことが期待される。

## ●文献

- 1) Gross JH: *Mass Spectrometry*. Springer, Heidelberg, Heidelberg, 2004
- 2) Tanaka K, Waki H, Ido Y et al: *Rapid Commun Mass Spectrom* 2: 151-153, 1988
- 3) Strupat K, Karas M, Hillenkamp F: *Int J Mass Spectrom Ion Processes* 111: 89-102, 1991
- 4) Liebl H: *J Appl Phys* 38: 5277-5283, 1967
- 5) Harada T, Yuba-Kubo A, Sugiura Y et al: *Anal Chem* 81: 9153-9157, 2009
- 6) Kawasaki H, Sugitani T, Watanabe T et al: *Anal Chem* 80: 7524-7533, 2008
- 7) Campbell DI, Ferreira CR, Eberlin LS et al: *Anal Bioanal Chem* 404: 389-398, 2012
- 8) Goto-Inoue N, Hayasaka T, Zaima N et al: *PLoS One* 7: e49519, 2012
- 9) Sugiura Y, Shimma S, Setou M: *J Mass Spectrom Soc Jpn* 54: 45-48, 2006
- 10) Griffiths RL, Sarsby J, Guggenheim EJ et al: *Anal Chem* 85: 7146-7153, 2013
- 11) Lechene CP, Luyten Y, McMahon G et al: *Science* 317: 1563-1566, 2007
- 12) Hazama H, Yoshimura H, Aoki J et al: *J Biomed Opt* 16: 046007, 2011
- 13) Morita Y, Sakaguchi T, Ikegami K et al: *J Hepatol* 59: 292-299, 2013
- 14) Ide Y, Waki M, Hayasaka T et al: *PLoS One* 8: e61204, 2013
- 15) Kawashima M, Iwamoto N, Kawaguchi-Sakita N et al: *Cancer Sci* 2013. doi: 10.1111/cas.12229
- 16) Sugiura Y, Konishi Y, Zaima N et al: *J Lipid Res* 50: 1776-1788, 2009
- 17) Hayasaka T, Goto-Inoue N, Zaima N et al: *J Am Soc Mass Spectrom* 21: 1446-1454, 2010
- 18) Morita Y, Ikegami K, Goto-Inoue N et al: *Cancer Sci* 101: 267-273, 2010
- 19) Sugiura Y, Taguchi R, Setou M: *PLoS One* 6: e17952, 2011
- 20) Satio Y, Hayasaka T, Onoue K et al: *J Mass Spectrom Soc Jpn* 59: 79-84, 2011

## 連載講

哺乳類の胎動、記憶とニューロンは正しく発揮する生期において産生され、糸路を構築する

## I

哺乳類の脳に進んでいる初期において、神経細胞はまず対称性を生み出し、未分化な幹細胞により細胞膜の突起を脳神経上皮細胞で機能するものが集積し<sup>1)</sup>、底膜側末端)中期には神経し、産生されていく足場

# ファルマシア

*Farumashia*

12  
DECEMBER  
2013

くすりの科学



日本発薬学写真館 (No.12)

「安全性と迅速性を兼ね備えたこれは何？」



公益社団法人 日本薬学会  
The Pharmaceutical Society of Japan

松下祥子 Shoko MATSUSHITA 浜松医科大学解剖学講座細胞生物学分野大学院生  
 瀬藤光利 Mitsutoshi SETOU 浜松医科大学解剖学講座細胞生物学分野教授

## 1 はじめに

質量顕微鏡法<sup>\*)</sup>は、質量分析法と顕微鏡法を組み合わせた手法である。質量分析法は試料中の分子を同定することが可能であるが、分布情報を得ることができない。一方、顕微鏡法は組織構造を明らかにすることはできるが、未知分子の同定はできない。質量分析イメージング(imaging mass spectrometry: IMS)はこの両手法の長所を生かし、生体内分子の分布・局在情報を質量電荷比およびそのシグナル強度に基づいて画像化する方法であり、近年高解像度化と顕微鏡技術との融合が進み質量顕微鏡法と呼ばれる分野に育っている。<sup>1-4)</sup>

この手法は、検出対象物質を限定することなく網羅的な解析を行うことができるため、未知の構成成分や予想し得なかった代謝物の検出も可能である。本法は、疾患特異的な創薬標的の探索や薬剤による副作用の発見を目指す創薬研究においても注目を集めている。本稿では本法の概要に加え、医薬研究への応用例と可能性について述べたい。

## 2 質量顕微鏡法の概要

質量顕微鏡法は質量分析法に基づく解析手法であるため、はじめに質量分析法について概説する。

質量分析法とは分子・原子などをイオン化し、それらを質量と電荷の比に従って分離・検出する方法である。この技術は生体試料、食品、環境分野などにおいて安全性確認などを目的として広く用いられている。質量分析においては、いかに試料をイオン

化するか、という点が重要となる。様々なイオン化法が存在するが、高分子では断片化が起こりやすく、かつてはその質量を保持したままイオン化を行うことが困難であった。その中で、2002年に島津製作所の田中耕一氏がノーベル化学賞を受賞したマトリクス支援レーザー脱離イオン化法(matrix-assisted laser desorption/ionization: MALDI)は、レーザー光のエネルギーを吸収し試料のイオン化を促進する化合物をマトリクスとして試料と混合することで、断片化を防ぎ効率的なイオン化を実現した。この手法により、分子量が数十万にも及ぶタンパク質やDNAなどの高分子量物質まで測定することが可能となった。ガスクロマトグラフィーや液体クロマトグラフィーにおいて行われている分離・精製過程を必要としないため、測定対象の空間構造を保持しなければならない質量顕微鏡法に適したイオン化手法である。

イオン化された試料は質量分析計によって質量電荷比に従い分離され、検出器においてそれぞれの質量数を示す分子量が記録される。得られた情報から横軸に質量電荷比、縦軸に検出強度をプロットしたものを質量スペクトルと呼ぶ。様々な質量分析計が考案されているが、より広範な質量範囲に利用可能であり、質量精度が高いことから主に飛行時間型質量分析計(time of flight mass spectrometer: TOF-MS)が使用されている。TOF-MSでは分子を一定距離飛行させ、それぞれの分子の飛行時間の差から質量電荷比を算出する。多くの場合、質量顕微鏡法ではこのMALDIとTOF-MSを組み合わせられている。本法では、マトリクスを塗布した組織切片上でレーザーを走査しながら試料をイオン化し、得られた質量スペクトルの中から任意の分子情報を選択的に抽出し、測定点ごとのシグナル強度に従い、

\*) 質量顕微鏡法についての用語解説は、1188頁参照。

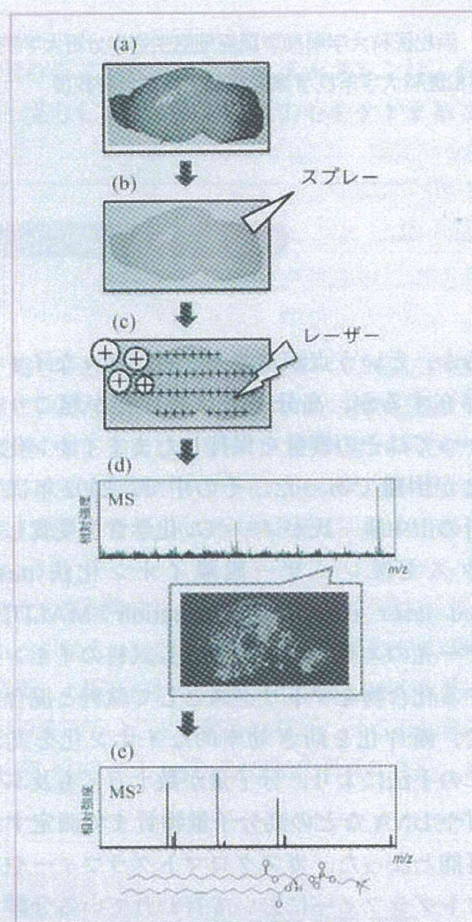


図1 質量顕微鏡法の流れ

- (a)凍結切片を作製し、導電性スライドガラスに乗せる。  
 (b)マトリクスを塗布する。  
 (c)レーザーを照射する。  
 (d)イオン化した分子情報が位置情報と併せて保存され、質量スペクトルとして表示される。  
 (e)分子同定には多段階質量分析を用いる。

組織切片における対象分子を可視化する。

図1に質量顕微鏡法の一連の流れを示す。一般的に対象となるものは組織切片であることが多いが、最近ではレーザー径の収束技術が進み、また装置制御能の向上により $5\mu\text{m}$ 以下の間隔で測定点を設定することもできるようになり、1細胞を解析対象とする例も報告されてきている。まず、凍結させた生体組織を薄切し、導電性素材で表面をコーティングしたスライドガラスに切片を接着させる。目的の分子種に適したマトリクスを選択し、試料表面に塗布する。マトリクス塗布にあたっては、均一に塗布することと、きめ細かい結晶を作らせることが良質なデータの取得に重要である。スプレー法、蒸着法と

いった塗布方法の中から、これらの条件を達成することができる方法を選んで用いる。塗布した生体組織上の測定領域を選択し、微小径のレーザーで二次元走査することにより、各点でイオン化を行う。このようにして注目するシグナルを選択し、そのシグナルに対応する分子の分布を可視化する。

質量分析において観測されるのは質量電荷比であり、ある質量電荷比として計測されたシグナルが何の分子に相当するかについては更なる解析を必要とする場合も多い。そのため多段階質量分析という手法が多く行われている。多段階質量分析とは、注目している質量電荷比を選択的に取り出し、希ガスと衝突させることにより、元の分子の構造を反映した特徴的なイオンの断片化を起こし、これらの断片を再度質量分析計によって検出することで、元の分子がどのような構造を有するかを検証する方法である。このような断片化と質量分析の繰り返しによって、複雑な分子の構造を推定することが可能である。

### 3 マウス正常組織の解析

質量顕微鏡法は、特異的なプローブや抗体を作成するのが困難な代謝産物を検出することも可能な手法である。ただし存在量が多く、イオン化効率の高い化合物を比較的容易に解析することができる一方で、微量な化合物の検出は一般的に困難である。ここでは本法の代表的な解析対象であるリン脂質と、適切な条件設定により解析が可能となった神経伝達物質であるアセチルコリンの解析例を紹介する。

#### 1. リン脂質

リン脂質はリン酸エステル部位を持ち、骨格にグリセリンを持つグリセロリン脂質やスフィンゴシンを持つスフィンゴリン脂質が含まれる。細胞の二重膜を構成する主要成分であり、脳、肝臓、消化器など大きな臓器から微細な構造を持つ網膜<sup>①</sup>まで生体内に多く含まれる。またイノシトールリン脂質のように、シグナル伝達にかかわるものも知られている。

マウス脳切片のリン脂質を本法により解析したところ、大脳、小脳、海馬領域、線条体、視床にホスファチジルコリン(phosphatidylcholine: PC)が多



く分布することが分かった。<sup>6)</sup> さらに多段階分析を行い、PCの脂肪酸側鎖の違いを明らかにし、それぞれのPCの分布が異なることも判明した。リン脂質は脂肪酸側鎖を持ち、この側鎖組成の違いが生体機能に多くの影響を与えると考えられている。位置情報を保持したまま、このリン脂質の脂肪酸側鎖の違いを詳細に解析することが可能な手法は、現時点で質量顕微鏡法のみである。

## 2. 神経伝達物質

アセチルコリン(acetylcholine: ACh)は、生体内に存在する微量の低分子である。副交感神経や運動神経の末端から放出され、神経刺激を伝える生命活動に欠かせない物質である。このAChを質量顕微鏡法により検出するため、標準品であるAChをイオン化し、このシグナルパターンを対象物質の検出指標として用いることとした。また、検出感度向上のために、レーザー強度を変更した結果、シグナルとノイズの比が高い質量分析スペクトルを得ることができた(図2a)。この条件を利用してマウスの脊髄を測定すると、コリン作動性運動ニューロンのあ

る脊髄前角に強いシグナルを得ることができた(図2b, 2c)。<sup>7)</sup>

この結果から、質量顕微鏡法を用いた微量の生体分子や低分子の測定が可能であることが示された。

## 4 がん組織の代謝産物解析

病変組織に対し質量顕微鏡法を応用することによる疾患メカニズムの解明と創薬標的の探索は、本手法の開発以来盛んに行われてきた。中でもがん組織は主要な応用対象の1つである。がんにおける糖代謝経路の異常が旧来から知られていた一方で、代謝物全体を解析対象とするようになったのはごく最近のことであり、代謝産物の網羅的な可視化を得意とする質量顕微鏡法の長所が生かされる。ここでは、質量顕微鏡法により解析されてきたがんのうち肝臓がんおよび乳がんの解析例を示すことで、代謝物組成の変化に基づいたがんの病態解明のための取り組みを紹介する。

### 1. 肝臓がん

肝臓がん組織中のがん部位と非がん部位のリン脂質の検出強度を比較した結果、PC(16:0/16:1)(注:括弧内の数字は、PCに含まれる2つのアシル基の総炭素数および不飽和結合数を意味する)ががん領域において増加していることが分かった。<sup>8)</sup> さらに、生合成基質であるリゾPC(16:0)の検出強度に対する、PC(16:0/16:1)の相対強度もまたがん領域で上昇していた。リゾPCに不飽和脂肪酸を転移することにより、PCを生成する脂質代謝酵素であるリゾホスファチジルコリンアシル転移酵素(lysophosphatidylcholine acyltransferase: LPCAT)1~4の発現量をウエスタンブロット法にて測定したところ、LPCAT1の発現ががん部において亢進していた。肝臓がん細胞株HuH7とHepG2中のLPCAT1をsiRNAによりノックダウンしたところ細胞の遊走・浸潤能が低下したことから、LPCAT1が司るPC合成が肝臓がんの進展を促進していることが示唆された。

このように本法を用いることにより、肝臓がんにおいて特徴的なリン脂質代謝異常を発見した。この代謝異常は肝臓がんの悪性度に関与しており、新た

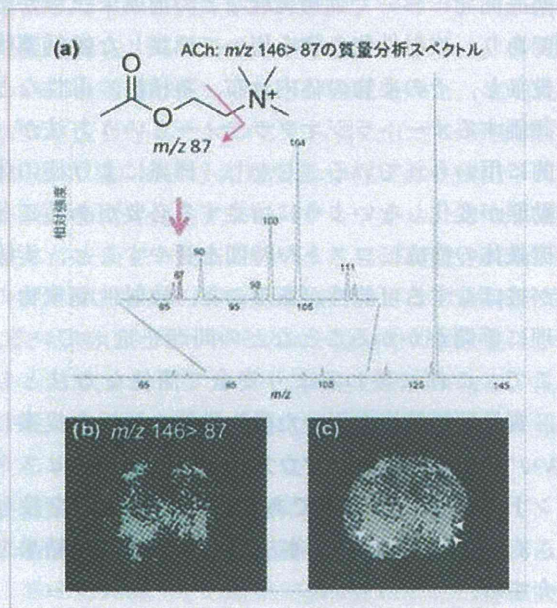


図2 本法によるマウス脊髄内AChの可視化

- (a) AChの構造と多段階分析によるフラグメントイオンピーク  $m/z$  87 を検出した質量スペクトル。  
 (b) マウス脊髄におけるAChのイオン分布像: AChの分子イオンピーク  $m/z$  146 を選択し、断片化した  $m/z$  87 を検出した。  
 (c) 図2(b)と可視光像の重ね合わせ: AChが運動ニューロン前角に集積している様子が確認できる(白矢頭)。

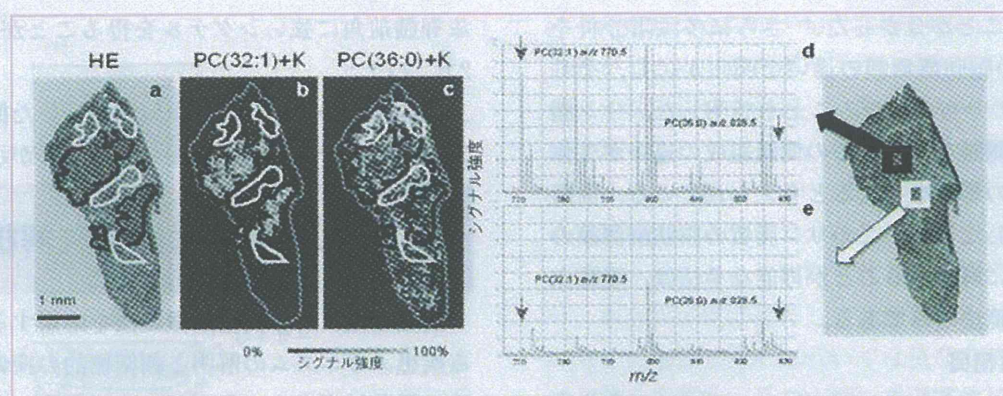


図3 本法による乳がん組織の解析

a: HE 染色像, b, c: IMS による PC(32:1) および PC(36:0) の分布像, d, e: がん部 (d) および 非がん部 (e) で得られた質量スペクトル。

な創薬のターゲットであると考えられる。

## 2. 乳がん

乳がん組織切片に対し本法による解析を行ったところ、ヘマトキシリン・エオジン (hematoxylin and eosin stain: HE) 染色像 (図 3 a) 中に黒線で示したがん部領域と白線で示した非がん部領域に相当する領域から得られた質量スペクトルのパターンは異なっていた (図 3 d, 3 e)。分子イオンの分布像から、乳がん HE 像でのがん部と相同する局在を示す PC とがん部に集積していない PC が存在することが分かった (図 3 b, 3 c)。これらの PC の検出強度をがん部と非がん部で比較したところ、PC(36:0) に対する PC(36:1) の相対的検出強度はがん部で有意に高い傾向であった。飽和脂肪酸の不飽和化を行う酵素であるステアリン酸 CoA 脱飽和酵素 (stearoyl-CoA desaturase-1: SCD1) の免疫染色を行ったところ、PC(36:1) の相対値と SCD1 染色強度との間には正の相関関係が見られ、PC(36:1) の集積に SCD1 が関与している可能性が示された。

エストロゲン受容体 (estrogen receptor: ER) の発現別に 1 価不飽和脂肪酸を含む PC の相対値を調べたところ、PC(34:0) に比べ PC(34:1) を高度に有する乳がんは、ER 陽性群に有意に多いことが示された。つまり、1 価不飽和脂肪酸を含む PC を高度に有する乳がんの亜集団が存在することが判明した。

脂肪酸不飽和化を標的とする抗がん剤が開発された場合に、ER 陽性群でより高い効果が期待できると予想される。このように質量顕微鏡法の利用によ

り、新たな効果予測因子の発見と患者群の新しい層別化に成功した。

## 5 薬物動態解析

特定部位で機能することが期待されている医薬品を評価する際には、薬物が生体内でどのように分布しているかという情報を調べる必要がある。医薬品開発において動物実験などの前臨床試験が必須であり、放射性化合物を用いて標識した候補薬物を投与し、その薬物の体内分布、蓄積性、毒性などを評価するオートラジオグラフィという方法が一般的に用いられている。しかし、標識により薬の体内動態が変化しないように留意する必要があることや標識体の作成にコストや時間を費やすこと、実験者が被ばくする可能性があること、放射性廃棄物の処理に手間がかかることなどの問題を抱えている。そこで、これに替わるより安全で簡便な方法として、質量顕微鏡法を用いた薬物動態の解析を提案したい。その 1 例としてマウスに尾静脈内からヒスタミン H<sub>2</sub> 受容体拮抗薬であるファモチジンを投与し、3 分後の体内分布を本法により解析した結果を紹介する。

図 4 a) にはマウスの断面図を示している。<sup>16,17)</sup> 全身の輪郭と主要な臓器 (脳、脊椎、肺、肝臓、胃、腎臓、心臓、腸) を点線で囲んだ。この断面図と質量顕微鏡法データにおけるファモチジンの分子量に相当するシグナルを用いて作成したイオン分布像を