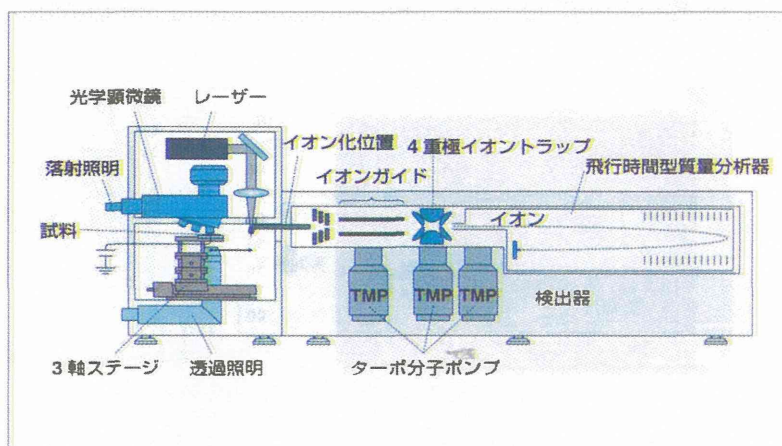


で難しかった分子の局在の可視化が可能になった。たとえば、脂質は抗体の作製や標識が難しく、これまで生体組織内での分布を可視化することが困難だった。マウス小脳のIMS解析例では、脳に均一に存在する $m/z = 798.5$ の信号と、白質に局在する $m/z = 826.7$ の信号に注目し、タンデム質量分析 (MS/MS) を行った。それにより、両者とも細胞膜を構築するリン脂質の一種であり、脂肪酸組成の異なるホスファチジルコリン (phosphatidylcholine, PC) であることが判明した(図2)⁴⁾。

脂肪酸と糖鎖からなる糖脂質も、細胞膜を構成する成分の1つである。これまで糖脂質の可視化に用いられてきた抗体は、糖脂質の糖鎖部分のみを認識していたため、分子種ごとの詳細な局在を見ることはできなかった。マウスの脳内には、糖鎖と脂質からなる細胞膜の構成成分である糖脂質の一種、ガングリオシド (ganglioside) が複数種存在する。質量顕微鏡では糖鎖部分と脂溶性基部分の構造差異を同時に見ることができると、2種のガングリオシド GD1・GM1 を解析したところ、それぞれ脂溶性基部分含有セラミドの炭素鎖長が異なる分子種の、脳内における特徴的な分布を明らかにすることができた。さらに、一方の分子種が加齢にともなって脳内に蓄積していく様子を観察できた(図3)⁵⁾。このように質量顕微鏡を用いることで、特定の脂肪酸組成をもつ脂質の局在を可視化することができる。

質量顕微鏡法はもともとタンパク質の解析手法として開発されており、さまざまな応用が検討されている。新規診断技術としての可能性の検討も、そ



〈図1〉質量顕微鏡の内部構造

大きく分けて、以下の5つの部分からなる。(1)組織切片にレーザー照射を行い脱離した分子を荷電させるイオン源部、(2)イオン分子を装置に導入するイオンガイド部、(3)質量電荷比 (m/z) によってイオン分子を分離する質量分析部、(4)イオン検出器、(5)全体の制御と検出器で得られたデータの処理を行うコンピューター(図では省略)。(文献3より引用。)

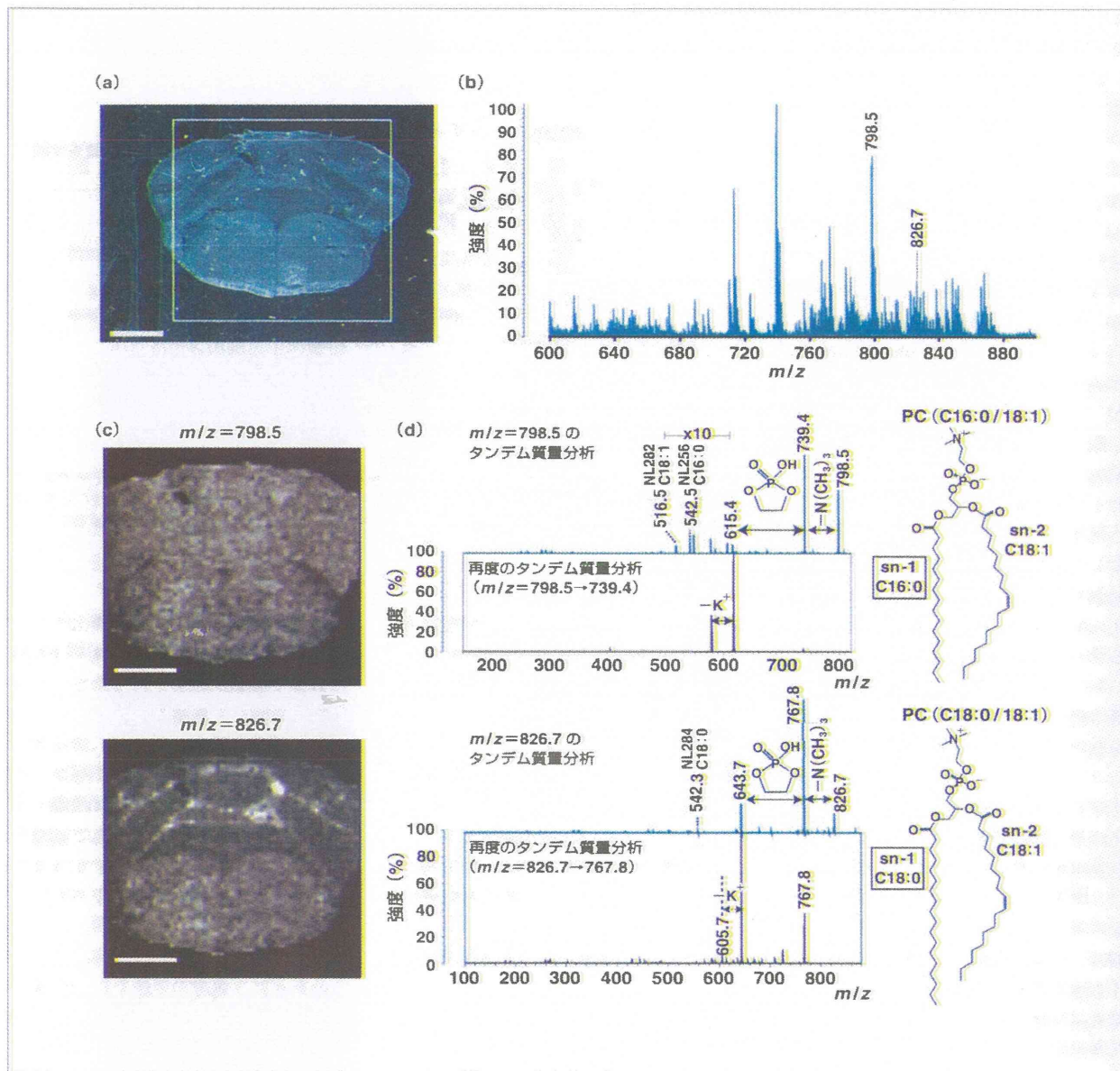
の1つである。医療機関では病理標本の多くをホルマリン固定し、場合によってはさらにパラフィンで包埋した状態で保存している。このような試料の質量分析を用いた解析は、一般に困難だと考えられているが、質量顕微鏡法が適用できれば、簡便で迅速な新たな診断法としての利用が期待できる。そこで筆者らは、ホルマリン固定後パラフィン包埋されたヒト胃がん組織について、IMSによる解析を行った。その結果、悪性度の高い未分化がんの特異的な信号を見出すことに成功した。続く構造解析から、それがヒストンH4であることを同定し、ホルマリン固定後の組織も質量顕微鏡で解析できることを実証した(図4)⁶⁾。

今後応用を検討すべき候補の1つとしては、翻訳後修飾を受けたタンパク質の、細胞内での分布の可視化があげ

られる。タンパク質はリン酸化やユビキチン化など、さまざまな翻訳後修飾によって機能が調節されており、その異常は病態とも関連している。タンパク質の翻訳後修飾の様相を、細胞内での分布の情報を維持したまま解析できるのは、いまのところ質量顕微鏡だけである。また、神経変性疾患で観察されるタンパク質封入体や、さまざまながんの構成物質の解明も期待される。

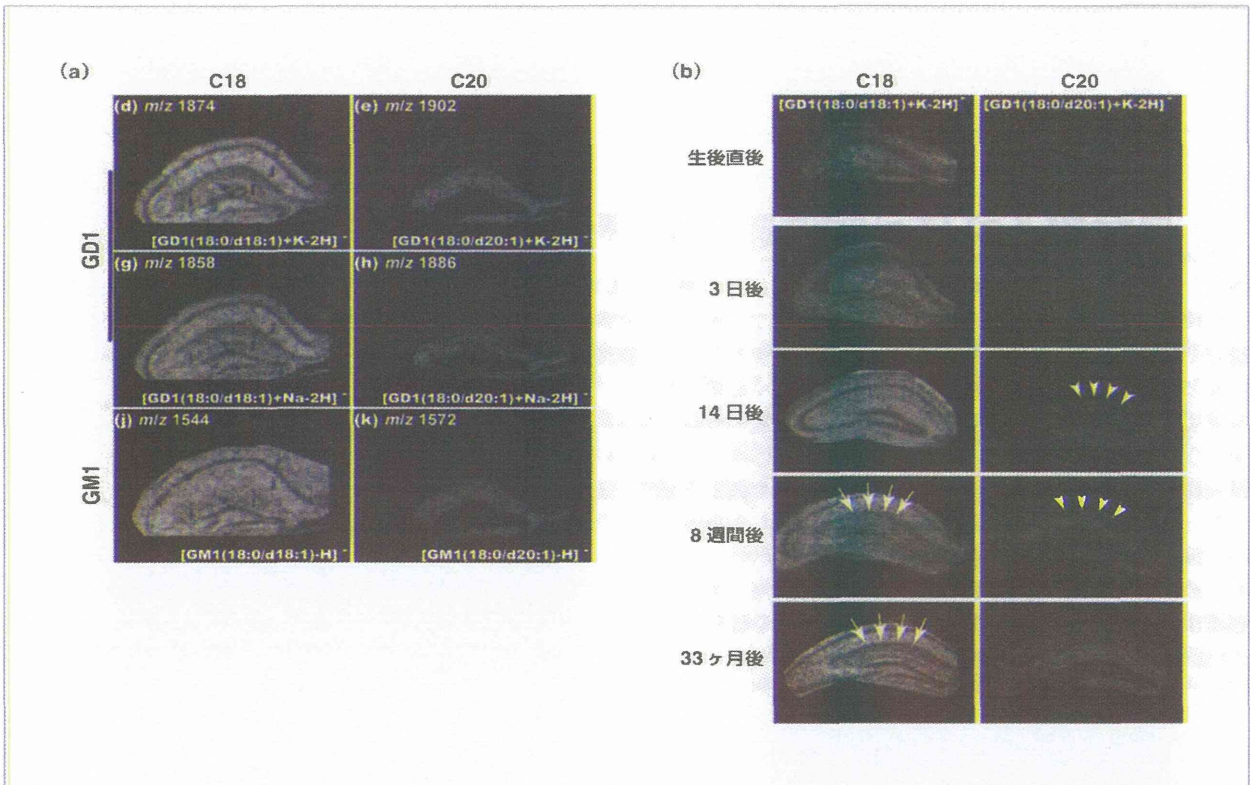
今後の課題と展望

このように、既存の手法を超えた多くの利点をもち、すでにさまざまに応用されている質量顕微鏡法であるが、新規技術ゆえに今後克服しなくてはならない課題もある。たとえば、分子には容易にイオン化されるものとそうでないものがあり、容易にイオン化されるものから優先的に検出されることに



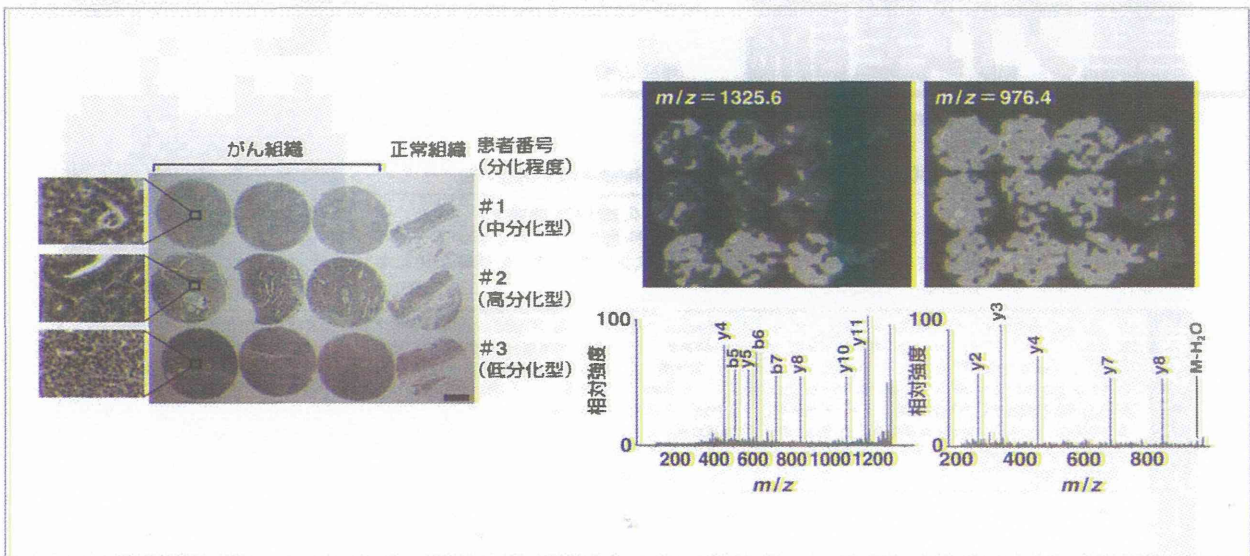
〈図2〉 マウス小脳の脂質の解析

(a)レーザーによるマウスの小脳の走査。(b)信号の多数のピーク。(c)2種類の信号のピーク($m/z=798.5$ と $m/z=826.7$)に対するイメージング。 $m/z=798.5$ は均一な分布を示すが、 $m/z=826.7$ は白質への局在が見られる。(d)質量分析による構造解析の結果、両者はリン脂質の一種ホスファチジルコリン(PC)であることが明らかとなった。両者は炭素鎖の長さが異なる以外は同じ構造をしているため、識別が困難だったが、質量顕微鏡法を用いて初めて分布の可視化が可能となった。スケールバーは1.5mmである。(文献4より引用。)



〈図3〉 マウス脳海馬領域のガングリオシドの分布

(a) 炭素鎖長の異なる2種類のガングリオシド(細胞膜に含まれる糖脂質の一種)が、異なる分布を示している。(b) マウス脳海馬における、加齢にともなうガングリオシドの局在変化。C18は加齢とともに歯状回分子層で減少しているのに対し(矢印)、C20は増加している(矢尻)。(文献5より引用。)



〈図4〉 ホルマリン固定後の胃がんパラフィン切片に対する質量顕微鏡法を用いたイメージング

$m/z=976.4$ の信号は組織型によらず検出されており、アクチンと同定された。一方、 $m/z=1325.6$ の信号は低分化型組織(悪性腫瘍)に特異的に検出され、ヒストンH4と同定された。(文献6より引用。)

なる。そのためイオン化されにくい分子を検出するためには、マトリクスの検討や特定物質のみを切片から洗い流すなどの工夫を要する。また、画像の解像度を上げるためには、レーザー径を小さく絞る必要があるが、レーザー径を絞るほどイオン化される分子が減少し、検出がより困難になる。そのため、両者のバランスを考慮した解析を行う必要があるとともに、検出器の高感度化も重要である。データ処理面での問題もある。組織切片上の数千点の部位で質量スペクトルを得るため、そ

の情報は膨大なものとなる。したがって、データを効率よく高速処理するソフトウェアの開発も、同時に進めていく必要がある。

質量顕微鏡法は現在、分野の壁を越えて応用され始めている。たとえば毒性学や農学の分野では、動物や植物に投与した薬剤の挙動や代謝の可視化が行われており、創薬においても非常に有用な手法である。今後、食品・環境科学や材料工学など、生物医学以外のさまざまな分野にも応用が広がることが期待される。

参考文献

- 1) 瀬藤光利編:『質量顕微鏡法』シュプリンガー・ジャパン(2008)。
- 2) M. Setou: *Imaging Mass Spectrometry*, シュプリンガー・ジャパン(2010)。
- 3) T. Harada, A. Yuba-Kubo, Y. Sugiura *et al.*: *Anal. Chem.* **81**, 9153(2009)。
- 4) S. Shimma *et al.*: *Anal. Chem.* **80**, 878(2008)。
- 5) Y. Sugiura, S. Shimma, Y. Konishi *et al.*: *PLoS One*, **3**e3232(2008)。
- 6) Y. Morita *et al.*: *Cancer Sci.* **101**, 1, 267(2010)。

世界中で読まれる通称“電話帳”待望の邦訳

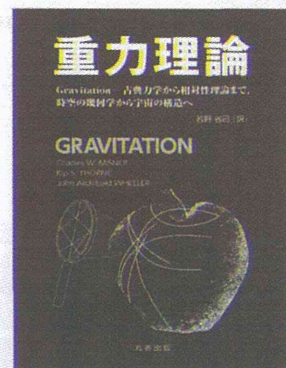
重力理論 GRAVITATION

—古典力学から相対性理論まで、
時空の幾何学から宇宙の構造へ

C. W. Misner, K. S. Thorne, J. A. Wheeler 著
若野省己(京都大学名誉教授 Ph.D.,理学博士) 訳

B5判・1354頁 定価15,750円(本体価格15,000円) ISBN978-4-621-08327-7

「重力」に関することは、ニュートン力学からアインシュタインの相対性理論まで、また、そのために必要な数学的基礎まで、すべてを網羅しており、教科書としてこれを用いて一から勉強することもでき、また座右において、調べたいことや深く知りたいことを学ぶためにも使える世界標準の本の翻訳書。



目次

パートI 時空の物理学 1章 幾何力学の要約 パートII 平坦な時空での物理学 2章 特殊相対性理論の基礎 / 3章 電磁場 / 4章 電磁気と微分形式 / 5章 ストレス-エネルギーテンソルおよび保存則 / 6章 加速された観測者 / 7章 重力と特殊相対性理論は共存できない パートIII 曲った時空の数学 8章 微分幾何学: 概観 / 9章 微分トポロジー / 10章 アフィン幾何学: 測地線, 平行移動, および共変微分 / 11章 測地線の流型と時空の曲率 / 12章 曲った時空の言葉での Newton 的力学 / 13章 Riemann 的幾何学: すべての基礎としての計量 / 14章 曲率の計算 / 15章 Bianchi 恒等式および境界の境界 パートIV Einstein の幾何学的な重力理論 16章 等価原理と“重力場”の測定 / 17章 質量-エネルギーはいかに曲率を生成するか / 18章 強い重力場 / 19章 重力を及ぼしている系の質量と角運動量 / 20章 4-運動量と角運動量に対する保存則 / 21章 変分原理と初期値データ / 22章 熱力学, 流体力学, 電気力学, 幾何光学, および運動論 パートV 相対論的な星 23章 球状の星 / 24章 パルサーと中性子星, クエーサーと超新星 / 25章 Schwarzschild 幾何学における運動の新たな中心的な特徴——“ポテンシャルにおけるくぼみ” / 26章 星の脈動 パートVI 宇宙 27章 理想化された宇宙論 / 28章 宇宙の現在の状態への進化 / 29章 宇宙の現在の状態と未来の展開 / 30章 非等方で不均質な宇宙論 パートVII 重力崩壊とブラックホール 31章 Schwarzschild 幾何学 / 32章 重力崩壊 / 33章 ブラックホール / 34章 大域的な技術, 地平線, および特異点定理 パートVIII 重力波 35章 重力波の伝播 / 36章 重力波の生成 / 37章 重力波の探知 パートIX 一般相対論の実験的検証 38章 相対論の基礎をテストする / 39章 重力の別な理論およびポスト Newton 近似 / 40章 太陽系の実験 パートX 未開拓の領域 41章 スピノール / 42章 Regge 計算法 / 43章 超空間: 幾何学の力学に対する競技場 / 44章 時間の終わりを越えて

丸善出版株式会社

〒101-0051 東京都千代田区神田神保町 2-17 神田神保町ビル6階 営業部 TEL(03)3512-3256 FAX(03)3512-3270
http://pub.maruzen.co.jp/

序 論

— 分子イメージングの最先端の特集にあたって —

瀬 藤 光 利*

はじめに

我々が医学に取り組むとき、大きく分けて2つのやり方がある。1つは我々がよく知っている古くからのやり方で、患者を「みる」(見る, 診る, 観る, 視る, 看る, …)方法で、さらにはX線写真や病理画像といったイメージングも含めて全体をとらえる方法。もう1つは比較的新しいやり方で、臓器, 細胞から分子, 原子といった部分に分けていく方法である。

分子イメージングはこの2つの方法, 分子(部分をとらえる方法)とイメージング(全体をとらえる方法)を統合した新しい方法である。全体を見渡す医学・生物学のセンスと, 部分に切り込む物理化学のセンスの両者を兼ね備えた俊英日本人が, 数多く世界をリードして活躍している。そうした諸先生方に今回ご執筆をお願いすることができた。

がんの分子イメージング

内科, 外科, マイナー, いずれにおいても, がんは最も重要な問題の1つである。このがんの分子イメージングについては世界のリーダー4名をお願いすることができた。

まずは米国における分子イメージングの現状について, 世界のがん研究のメッカである

NIHは米国国立がん研究所(分子イメージングプログラム)のNIH小林久隆先生に固形がんイメージングについて, また, 小林先生と共同で新しい蛍光物質を開発合成し, 消化器がん術中分子イメージング法の開発にも携わっておられる東京大学医学部の浦野泰照先生にご解説いただく。さらに, より基礎的な最先端の研究として2つを紹介したい。1つは, 私も開発にかかわらせていただいた質量顕微鏡によるがんの分子イメージングで, 慶應義塾大学医学部の涌井昌俊先生に肝臓がん観察応用についてご解説いただく。質量顕微鏡法は, 二次元的にスキャンした質量分析によってイメージングを行う新しい手法である。さらに, ハーバード大学医学部藤崎讓士先生には, ごくごく最近『Nature』誌に発表された生体共焦点顕微鏡による幹細胞のイメージングについてご解説いただく。

内科疾患の分子イメージング

筆者の東京大学第三内科時代の先輩である高橋倫子先生, 後輩である西村智先生にそれぞれ糖尿病内分泌疾患における分子イメージング, 循環器疾患研究における分子イメージングについてご説明いただく。高橋先生は, 2光子顕微鏡による生体深部の微細な分泌小胞の開口放出についての研究で世界的に有名である。西村先生と石井優先生は生体内の細胞動態の研究において, 美しい動画で従来

* 浜松医科大学医学部 解剖学講座 教授

の静的な組織像を一変しつつある。便宜上、それぞれのご所属で循環器と免疫に分けさせていただいたが、実際のところ先生方は血液循環、脂肪、骨、免疫とあらゆるプレーヤーの相互の関係を明らかにされつつある。

神経の分子イメージング

分子イメージングの最も成功した事例は、フルオロデオキシグルコース (FDG) をプローブとしたポジトロン断層撮影 (PET) であり、すでにかん診療などにおいて保険適応がなされ、臨床で応用されている。その PET を用いたがんの話はがんの分子イメージングの部分で小林先生からもお話しいただけると思うが、現在それ以上の新しいプローブの開発が理化学研究所を中心としたナショナルプロジェクトで進んでおり、神経系はその重要なターゲットの1つである。そのプローブ機能評価研究チームの尾上浩隆先生に、PET プローブの応用と開発についてお話しいただく。

また、この理研と並んで日本の分子イメージングの中心地である放射線医学総合研究所分子イメージング研究センターの季 斌先生にはアルツハイマー病の分子イメージングについて、筆者の同僚の浜松医科大学メディカ

ルフォトニクス研究センターの尾内康臣先生にはパーキンソン病の分子イメージングについてご説明いただく。

細胞の分子イメージング

分子イメージングはその解像度を高めると同時に、分子をイメージングするだけでなくその機能をイメージングする方向に進んでいる。生体分子の機能をイメージングする方法として、タンパク質の構造変化に伴う蛍光エネルギーの変化を検出する FRET と呼ばれる方法があり、京都大学の松田道行先生にご説明いただく。また近い未来の方向性として、生体内のタンパク質の1分子のイメージングや、電子顕微鏡による分子イメージングが研究されている。それぞれ、そうした観察法の開発に携わってこられた上田昌宏先生、村田和義先生に概況をご説明いただく。

おわりに

分子イメージングは方法論的進展が目覚ましく、その応用は始まったばかりである。

今回の特集で紹介されたエキスパートの成果を参照し、近い将来に読者の方々がご自身の専門領域にさらに取り入れて、研究を発展されることを期待したい。

3

IMAGING MASS SPECTROMETRY (IMS) FOR BIOLOGICAL APPLICATION

YUKI SUGIURA, IKUKO YAO, AND MITSUTOSHI SETOU

3.1 INTRODUCTION

3.1.1 Principle and the History of Imaging Mass Spectrometry

The development of mass spectrometry (MS) has recently entered into new paradigm. Classical matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) MS has been established as an analytical method for a wide range of molecules with varied physical and chemical characteristics, and now this continuous advancing technology has been utilized into molecular imaging technique (Figure 3.1). The innovation in MS has enabled the provision of additional two-dimensional (2D) axes of recognition on tissue sections as a new approach for the life science field.

Its unique advantages, which are summarized as follows, facilitate imaging mass spectrometry (IMS) as a versatile molecular imaging technique: (1) IMS does not require any specific chemical labels or probes; (2) IMS is a “nontargeted” imaging method; and (3) the simultaneous imaging of many types of molecular species is possible. With the unique and powerful detection principle facilitated by MS, the matrix-assisted laser desorption/ionization–imaging mass spectrometry (MALDI-IMS) can be used for the visualization of the distribution of large number of biomolecules in the cells and tissues, ranging from small metabolite molecules [1,2] to much larger proteins [3,4]. Figure 3.2 illustrates the general workflow of MALDI-IMS. Basically, re-

searchers take thin tissue slices mounted on conductive glass slides and apply a suitable MALDI matrix to the tissue section, and then the slide is inserted into a mass spectrometer. A focused laser beam is directed at predetermined positions in the tissue slice and the mass spectrometer records the spatial distribution of molecular species (typically with 10–200 μm scan pitch). Automated data collection takes 2–6 h, depending on the number of points assayed. Suitable image processing software can be used to import data from the mass spectrometer to allow visualization of ion distribution images and comparison with the histological images of the sample.

In the following sections, we will describe two major application areas; when using IMS as a technique for detection/visualization of various analytes, the application of IMS can fall roughly into two categories:

1. measurement of proteins and peptides, and
2. measurement of small organic compounds (mass-to-charge ratio $[m/z] < 1000$).

To date, most of the reports concerning MALDI-IMS are with regards to the detection and imaging of proteins or peptides. On the other hand, the amount of research regarding the detection/imaging of small organic molecules has been growing recently. Figure 3.3 shows the result of a PubMed search using “Imaging Mass Spectrometry” as key words (except reviews). Reports were subdivided into the two groups, according

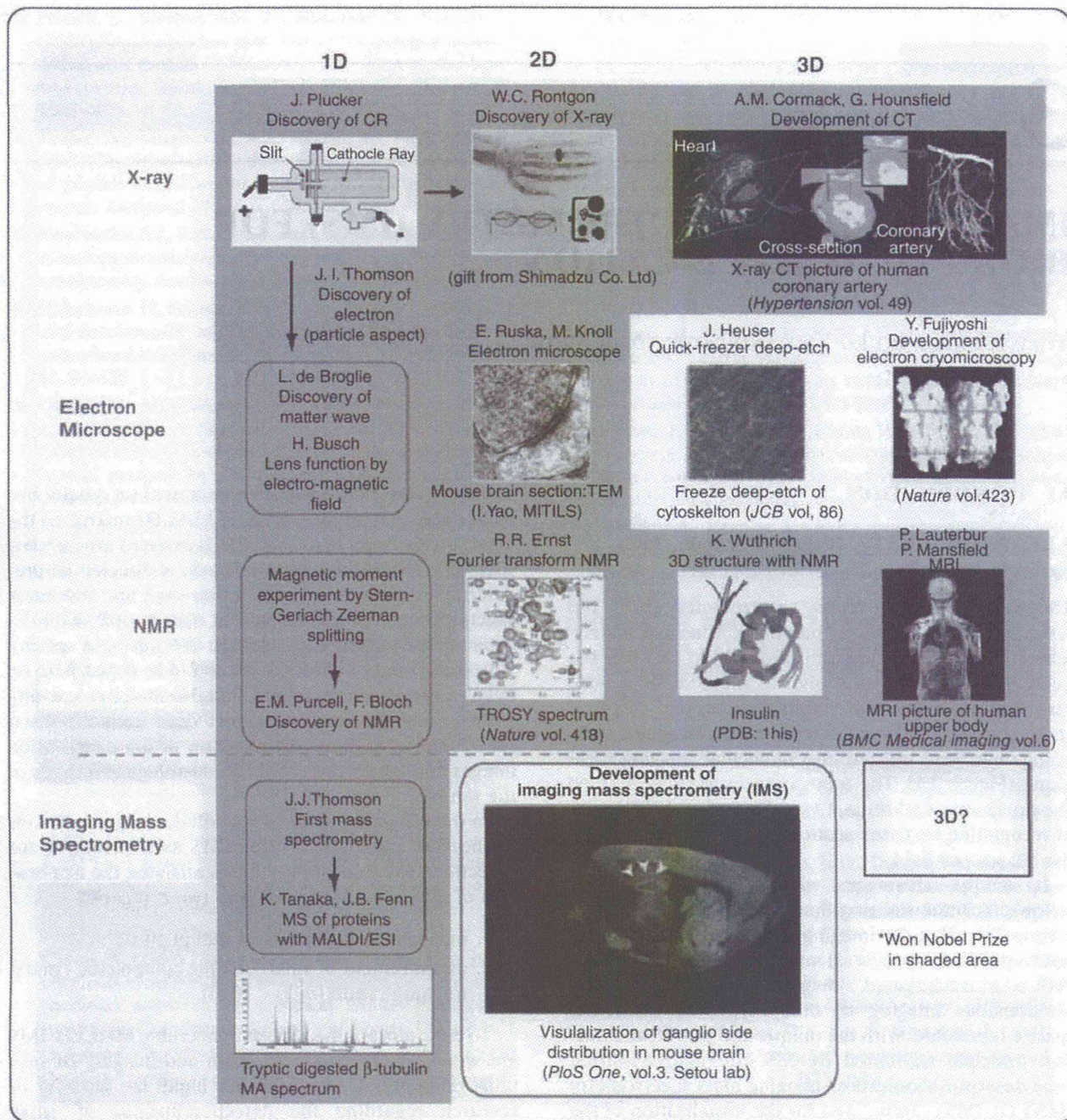


FIGURE 3.1 Historical view of the development of analytical instruments. The progress of imaging technology was categorized by its technology (longitudinal axis) and its analytical dimensions (horizontal axis). Shaded researches have received Nobel Prizes. CR, cathode ray; NMR, nuclear magnetic resonance; CT, computed tomography; TEM, transmission electron microscopy.

to the materials analyzed in the each study, and the number of reports in each group was indicated. Notably, the number of reports regarding the IMS of small compounds gradually increased and occupied half of the published work in 2007. In the following section, we

shall introduce representative sample preparation strategies for analyses of distinctly structured analytes: proteins and small organic compounds, interweaving some research applications. Further, statistical analysis methods of MALDI-IMS are also described.

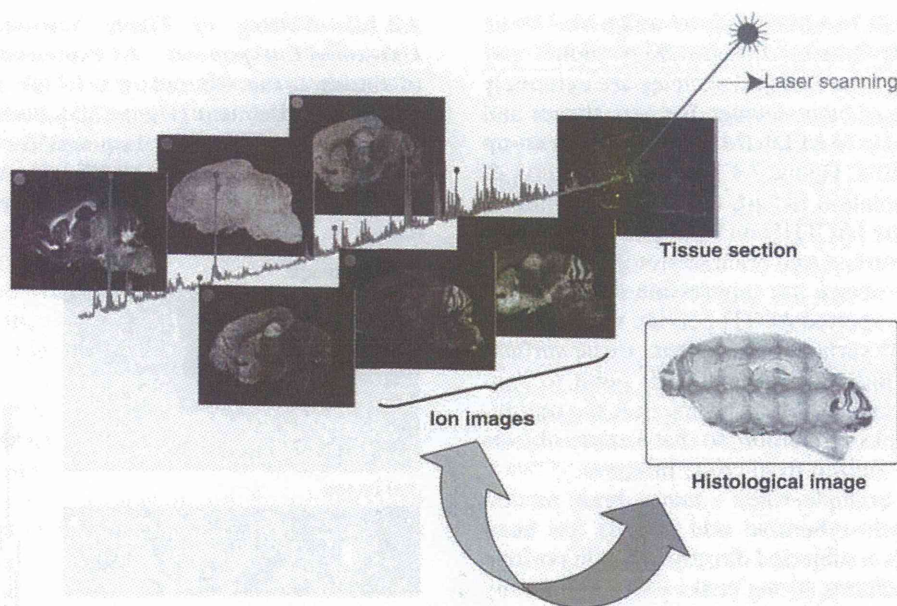


FIGURE 3.2 Schematic representations of MALDI-IMS procedures. Usually, the tissue section mounted on an indium thin oxide (ITO)-coated glass slide is covered with a specific MALDI matrix. Next, the ITO slide is inserted into a mass spectrometer. The MALDI laser scans through a set of preselected locations on the tissue (10–200 μm scan pitch) and the mass spectrometer records the spatial distribution of molecular species. Suitable image processing software can be used to import data from the mass spectrometer to allow visualization and comparison with the histological image of the sample.

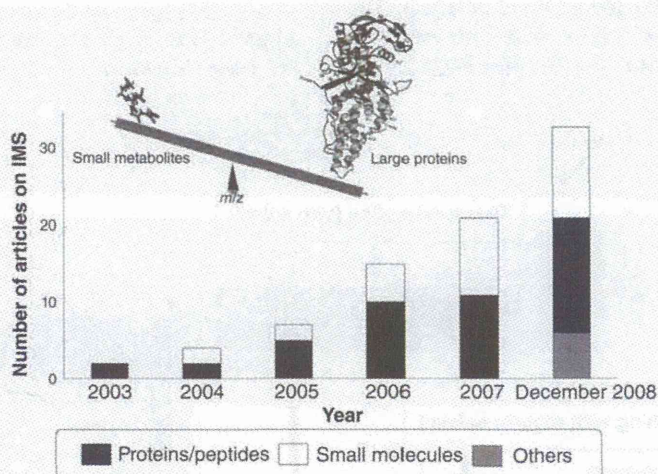


FIGURE 3.3 The result of the PubMed search using “Imaging Mass Spectrometry” as keywords.

3.2 APPLICATIONS OF MALDI-IMS

3.2.1 IMS for Proteins and Peptides

3.2.1.1 Sample Preparation Procedure for Protein Imaging In traditional MS research, analyte molecules are basically extracted and separated from crude biological samples by gas chromatography (GC) or high

performance liquid chromatography (HPLC), mainly to avoid “ion suppression effect” [5–7]; in cases where such crude samples are subjected to MS, numerous molecular species compete for ionization and eventually, molecules that are easily ionized preferentially can be detected while suppressing the ionization of other molecules.

Contrastingly, in MALDI-IMS, in which the tissue sample is directly measured, researchers should pay special attention to the fact that samples are extremely complex mixtures of biomolecules. Because tissues and cells are subjected to MALDI-IMS, the sample clean-up procedure is limited. Figure 3.4 shows IMS results of spotted peptide solution (0.5 μL of 100 nM adrenocorticotrophic hormone [ACTH]) on both indium tin oxide (ITO) glass slide surface and brain section, and it clearly demonstrates the severe ion suppression effect on the tissue surface; the spotted ACTH peptide was detected only from the ITO surface, but not from tissue surface. As this example indicates, an important point to consider when executing an IMS experiment is the optimization of the sample's condition, so that analyte objects can be efficiently ionized from crude mixtures.

As a practical example, when a mouse brain section to which 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) has been applied as a matrix is subjected directly to MS in positive ion-detection conditions, strong peaks which are mainly derived from phospholipids were observed in mass region of $700 < m/z < 900$ [8]; on the other hand, signals derived from proteins, meanwhile, are scarcely detected at $m/z > 3000$ [9]. This is because phospholipids ionize much more efficiently than proteins, and they, on the other hand, suppress protein/peptide ionization. Therefore, for detecting/imaging proteins and peptides, removal of such lipids improves the sensitivity for proteins analysis. To this end, tissue sections should be rinsed with organic solvent, to remove lipids from tissue samples [9–11].

3.2.1.2 Rinsing of Tissue Sections: Removal of Unwanted Components As explained, the procedures of rinsing tissue sections or cells are key steps of the sample pretreatment (Figure 3.5). Such rinsing process enhances the sensitivity required for protein/peptide detection by eliminating small molecules, particularly phospholipids, from the tissues [9]. Lemaire et al. have

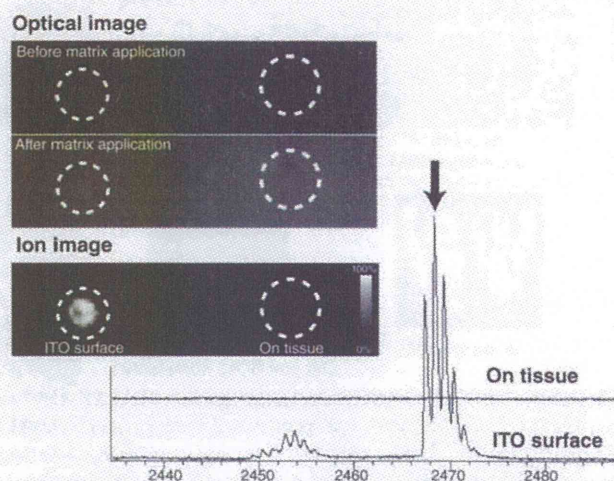


FIGURE 3.4 An example of the severe ion suppression effect on the tissue surface. A peptide solution (0.5 μL of 100 nM ACTH) was spotted on both ITO glass slide surface and brain-homogenate section. After the spraying of matrix solution (10 mg/mL α -cyano-4-hydroxycinnamic acid [α -CHCA] 50% acetonitrile, 0.1% TFA), the spotted peptide was visualized by IMS.

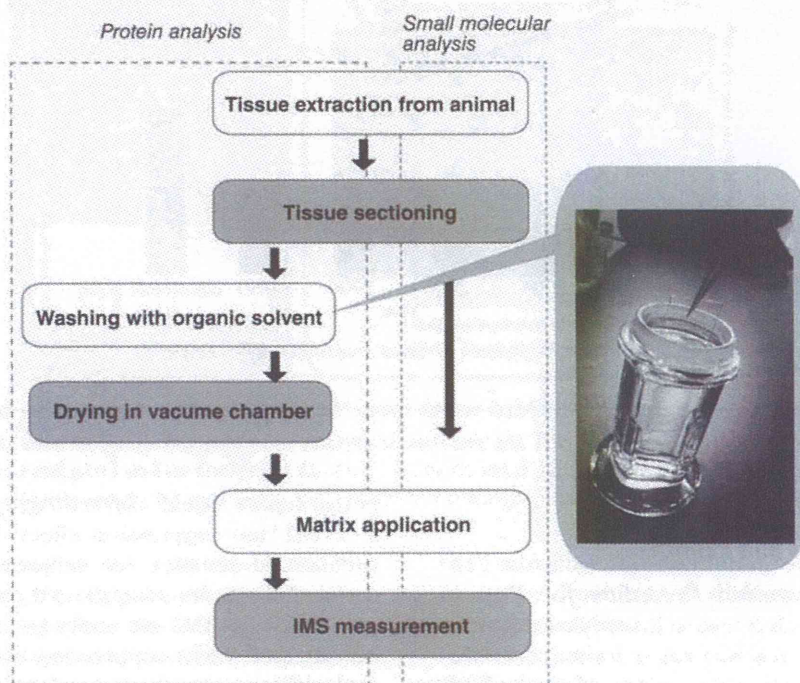


FIGURE 3.5 A scheme for protein and small molecular measurement.