

組織MALDI解析

-脳虚血モデルマウスのエネルギー代謝関連物質の解析-

-On-Tissue MALDI Analysis: Analysis of Spatiotemporal Changes In Energy Metabolism In A Murine Middle-Cerebral Artery Occlusion Model-

脳組織はその機能を維持するために、常に大量のグルコースと酸素を必要としています。例えば血栓による血管の閉塞が起これば、脳内への血流量が急速に低下して、ただちにグルコースの欠乏を招きます。これにより、血流が途絶えた虚血部位においてATP（アデノシン三リン酸）の枯渇が引き起こされます。このため、脳虚血が起きると短時間のうちに脳機能活動が重篤な損傷を受けることとなります。

そのため脳虚血を起こした脳内において、虚血部位そのものと、適切な処置により回復が見込まれる周辺部とを見分けることは、その後の治療において非常に重要となります。このためこのような微小領域における詳細な解析が今後ますます重要となることが予想されます。今回、CHIP-1000とAXIMA Performance[®]を組み合わせた島津MALDIイメージングシステムによって、エネルギー代謝関連物質の分布を描くことで、虚血部位とその周辺部 (ischemic penumbra) をはっきりと区別できた最新の研究成果が報告

されましたので、ここでご紹介いたします。

脳虚血モデルとして、10分および60分間にわたって中大脳動脈を閉塞したC57BL/6Jマウス（♂、22-26 g）から調製した脳組織の新鮮凍結切片を使用しました。閉塞によって脳内における血流量は閉塞前の約20%程度まで低下していたことが組織血流計によって確認されています。また脳虚血切片とは別に、閉塞措置を行っていないマウス脳組織切片をコントロールとして、それぞれの組織切片のMALDIイメージング解析を行いました。

Fig. 1に示したのはコントロール切片と脳虚血切片（10分と60分）それぞれをHE（Hematoxylin-Eosin）染色したものです。それぞれの脳虚血切片（10分と60分）では、点線で囲んだ部位に虚血部が存在していますが、HE染色画像では虚血部位を観察することはできませんでした。

T. Yamamoto

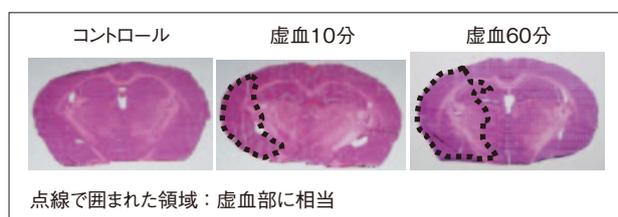


Fig. 1 コントロールおよび脳虚血切片のHE染色画像
HE Stained Images of Murine Normal and Ischemic Brain Tissue Sections with A Cerebral Artery Occlusion for 10 and 60 Minutes

Table 1 MALDIイメージング分析条件
Measuring Conditions of MALDI Imaging Mass Spectrometry

Condition for printing of matrix solution	
Matrix	: 4 mg/mL 9-aminoacridine in 70 % MeOH
Volume	: 300 pL × 20 cycles
Print Pitch	: 200 μm
Condition for on-tissue MS measurement	
Tuning Mode	: linear / negative mode
Laser Shots	: 200 shots / point
Random Movement	: 60 μm width

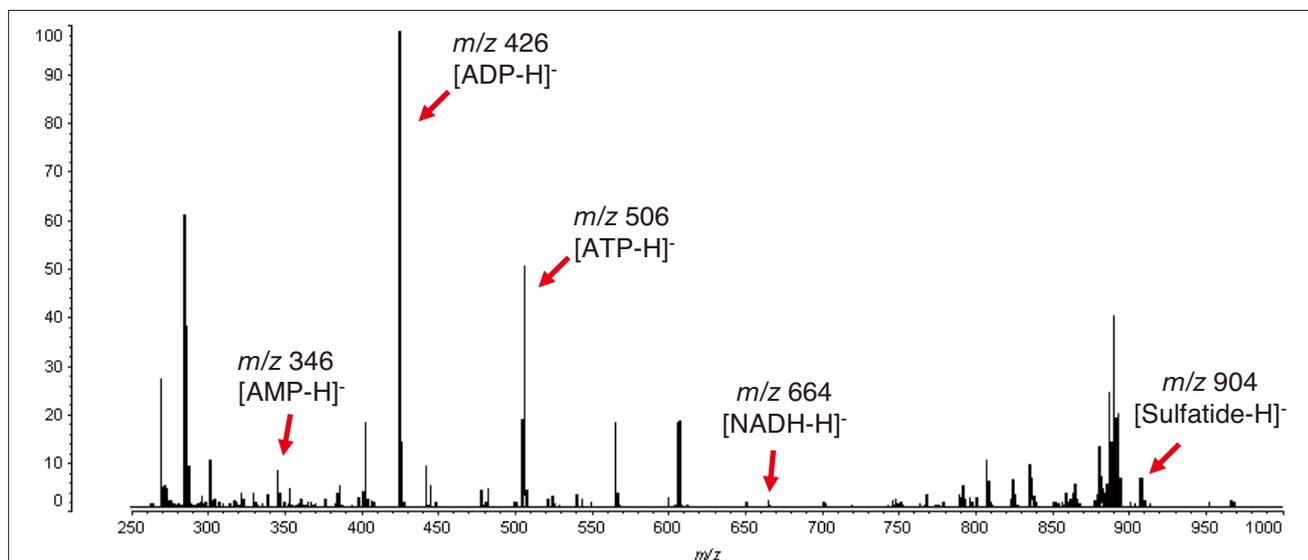


Fig. 2 コントロール切片のマススペクトル
A Mass Spectrum on A Normal Brain Tissue Section

次にCHIP-1000を用いて、それぞれの組織切片に対してマトリックス溶液 (9-aminoacridine, 70 % MeOH) の塗布を300 pLずつ繰り返して行いました (スポット間隔: 200 μ m)。マトリックスを塗布した後、組織切片を十分に乾燥させてから、AXIMA Performance[®]による質量分析を行いました。Fig. 2はコントロール切片における質量分析の結果得られたマススペクトルを示します。Fig. 2のマススペクトルからは、いくつかの代謝物に由来するピークが確認されます。これらの代謝物のピークには、生体内で重要な働きを担っているエネルギー代謝に関連する代謝物も含まれていました。

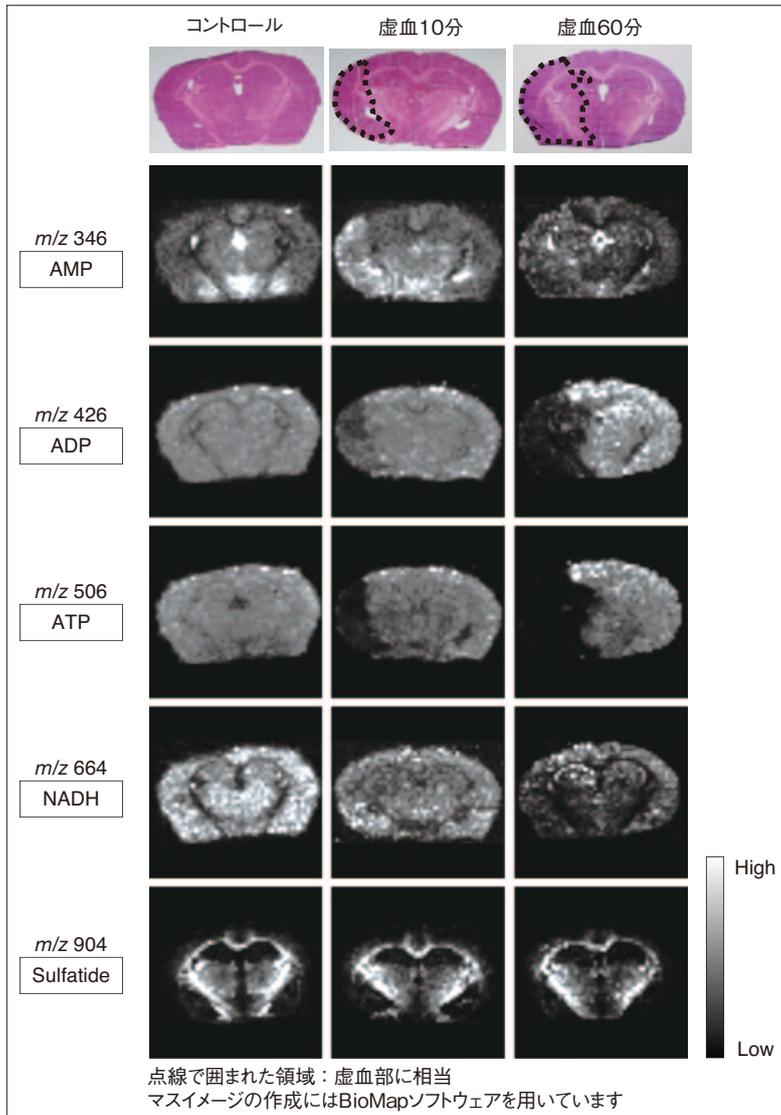


Fig. 3 さまざまな代謝物のマウス脳内における分布
Distribution of Various Metabolites in Murine Brain Tissue Sections

さらにこれらの代謝物のMALDIイメージングを行ったところ、代謝物ごとに脳内での分布が大きく異なっていることが確認されました (Fig. 3)。また虚血脳におけるMALDIイメージングの結果より、ADP (アデノシン二リン酸)、ATP (アデノシン三リン酸) といったエネルギー関連代謝物が虚血部位において大きく減少していることが確認できます。また閉塞を行った時間に応じて、10分処置したものよりも、60分虚血を維持した脳組織において、この傾向はより顕著に確認されました。これに対して、AMP (アデノシン一リン酸) やNADH (ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド) のマスマイメージからは、これらの代謝物が特に10分処置した虚血部位において上昇していることが示唆されました。

またエネルギー代謝に関連していない Sulfatide はいずれの切片においても同様の分布を示していることから、虚血部ではADPやATPといったエネルギー代謝関連物質が枯渇しており、そのエネルギー代謝も正常部とは大きく異なっていることが示唆されました。

今回脳虚血モデルマウスに対してMALDIイメージングを行うことで、虚血部位とその周辺部 (ischemic penumbra) をはっきりと区別することができました。また虚血部位およびその周辺部に特徴的なエネルギー代謝物の変動を、生体で機能している状態のまま、はじめて分布として視覚化することができました。

エネルギー代謝関連物質は生体内で重要な働きを担っており、この分布を調べることは複雑な生体機能を解明する上で非常に有用な情報となります。

MALDIイメージングはエネルギー関連物質に限らず、さまざまな代謝物変動を追跡する際にも有効であると考えられており、バイオマーカー探索や薬物動態研究への応用が期待されています。

[略語]

AMP	アデノシン一リン酸
ADP	アデノシン二リン酸
ATP	アデノシン三リン酸
NADH	ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド

[参考文献]

K. Hattori et al. Antioxidants & Redox Signaling 13 (8) 2010, 1157-1167

本アプリケーションニュースは慶応義塾大学医学部医化学教室 末松誠教授との共同研究により得られたデータです。

初版発行：2011年1月

島津製作所 分析計測事業部
応用技術部

島津分析コールセンター

☎0120-131691 (携帯電話不可)
●携帯電話専用番号 (075) 813-1691

※本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。改訂版は下記の会員制 Web Solutions Navigator で閲覧できます。
<https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm>

会員制情報サービス「Shim-Solutions Club」にご登録ください。
<https://solutions.shimadzu.co.jp/>
会員制 Web の閲覧だけでなく、いろいろな情報サービスが受けられます。