

# Application News

## No. B94

MALDI-TOF 質量分析法

### MALDI-7090 を用いた ラット肝臓組織切片の MS イメージング

疾病の原因や進行状況などを議論するためには、病変組織を明確にした上で、病変組織に存在する分子の定量的変化や分布を知ることが重要です。LC-MS または GC-MS による代謝分析は、代謝産物及び脂質の定量的変化を得るのに有効ですが、分析手法の性質上、どのような分子が病変組織のどこにあるかという位置情報は失われます。このため、病態の進行に伴った分子分布の変化を見ることは困難です。近年では、こうした問題点を解決する手法として、MS イメージングが活用されています。ここでは、非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) モデルラットの肝臓を対象とし、MS イメージングと LC-MS または GC-MS のデータを組み合わせて、疾病進行時の分子の動態について解析した例をご紹介します。

K. Waki

#### ■ イメージング MS 用サンプル調製

非アルコール性脂肪性肝炎 (NAFLD) は進行すると非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) へと変化し、肝硬変および肝細胞がんへと進行する場合があります。事前に LC-MS 及び GC-MS による肝臓の生化学物質の定量解析を実施し、代謝物の変動を調べました。本実験では病理所見と分子分布の関係を MALDI-7090 による MS イメージングを用いて観察しました (図 1)。

ラットに高脂肪食または正常食を摂取させ、4 週目、8 週目、および 16 週目のラットから取り出した肝臓で凍結乾燥切片を作成しました。作製した肝臓切片を病理学的染色 (アザン染色) を行い、病理学的所見観察用のサンプルとしました。イメージング MS 用サンプルは、染色切片と連続した高脂肪食群と正常食群の各切片を、同じ ITO 被覆スライドガラス上に載せることで切片間でシグナルの強度を比較できるようにしました。

作製したサンプルにはマトリックス蒸着装置 iMLayer™ を用いて、マトリックス (9AA) を蒸着し、再結晶化処理後、測定を行いました。

#### ■ 線維化組織における分子分布の可視化

作製したラット肝臓連続切片に対し、線維化した組織を特異的に青く染めるアザン染色を行いました。正常食を摂取したラット肝臓に比べ、高脂肪食を摂取したラット肝臓では投与開始から 8 週、16 週の肝臓で線維化した組織の増加が認められます (図 2 左; 青部分)。

次に、MALDI-7090 によるイメージングを行い、アザン染色切片と比較しました。イメージングする標的分子は、LC-MS または GC-MS による代謝物の定量解析データからピックアップされた脂質  $m/z$ 833.58 と  $m/z$ 788.54 とし、2 つのマスイメージを重ね合わせたものが図 2 右側の写真です。2 つの標的分子の分布を見ると、正常食を摂取したラット肝臓組織では  $m/z$ 833.58 のみが存在しています。これに対し、高脂肪食群では、NAFLD から NASH への進展により線維化した領域で  $m/z$ 788.54 が多く存在することがわかります。

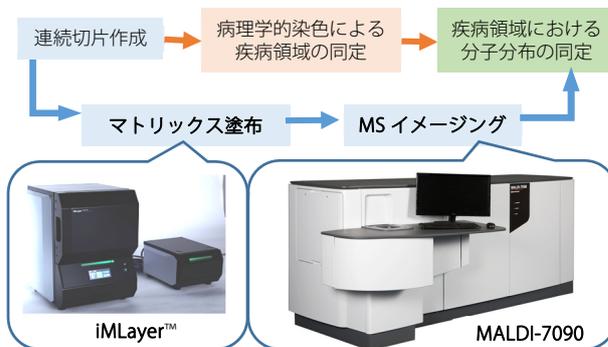


図 1 MALDI-7090 を用いた MS イメージングのワークフロー

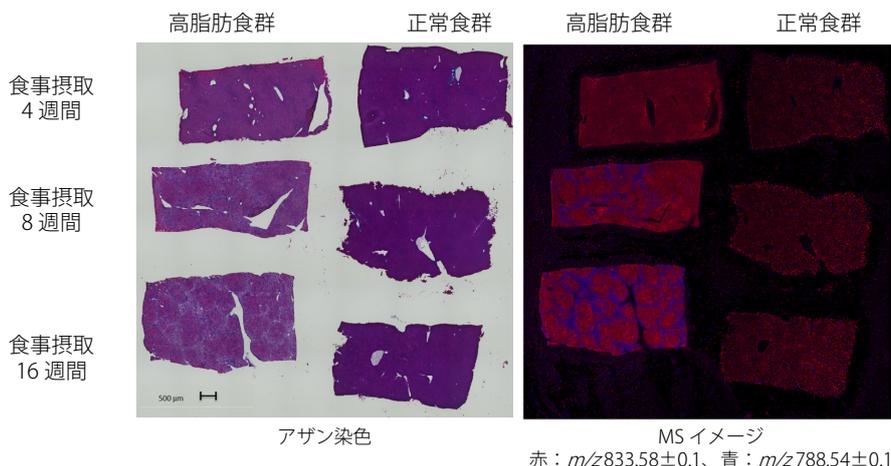


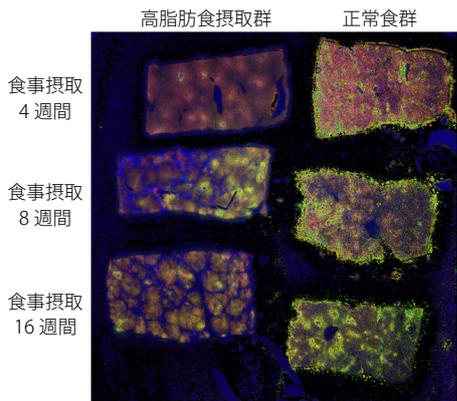
図 2 正常組織と病変組織における標的分子の分布の違い

## ■胆汁酸のイメージング

NAFLDが進行するとNASHになることはサンプル調製の項で述べましたが、これまでNAFLDとNASH二つの状態の区別は病理学的染色で行われていました。しかし、顕微鏡による光学イメージの観察のみでは病態の識別に不確かさが残り、医薬品開発における適切なモデルとしての確信が得られにくくなります。この問題を解決するために、今回はLC-MSまたはGC-MSの結果から変動が期待できる胆汁酸を標的としてMSイメージングを行いました(図3)。図3右側の正常食を摂取したラットの肝臓では一次胆汁酸である $m/z$ 498.24(赤)と、 $m/z$ 514.23(緑)が主に存在することがわかります。これに対し、高脂肪食を摂取したラットでは一次胆汁酸 $m/z$ 405.27(青)が線維化が進行した部分に存在しています。

## ■IMAGEREVEAL MSによる平均化での比較

また、図3において高脂肪食摂取群のデータを時系列で比較すると、高脂肪食摂取8週間の肝臓切片のほうが16週間の肝臓切片よりも $m/z$ 405.27が多く存在しているように見えます。しかし、切片の状態によって得られるマススペクトルのシグナルの強弱は変化するものです。そのため生データや総イオン量補正(Total Ion Current; TIC)を行ったデータでは比較が困難な場合があります。このような場合は別の物質を基準としてノーマライズを行い、シグナル強度を補正して比較することが有効です。



赤： $m/z$ 498.24±0.1、緑： $m/z$ 514.23±0.1、青： $m/z$ 405.27±0.1

図3 胆汁酸のMSイメージング

解析ソフトIMAGEREVEAL MSにより、 $m/z$ 405.27の代謝経路に含まれている $m/z$ 498.24と $m/z$ 514.23を利用して、図3で得たデータを補正したものが図4左です。TIC補正の画像(図4右)と比較すると、高脂肪食を摂取したNASHモデルラット肝臓の線維化した領域において、 $m/z$ 405.27の存在量は高脂肪食摂取8週間と16週間で大きな違いがないとわかりました。また、高脂肪食を16週間摂取したNASHラット肝臓組織の $m/z$ 405.27と、同一切片で行ったヘマトキシリン-エオシン(HE)染色、連続切片でのシリウスレッド染色を比較すると、 $m/z$ 405.27は線維化した組織に多く存在しています(図5)。これらの結果から、肝臓が線維化した領域に $m/z$ 405.27は多く存在していますが、NASHの進行に伴う存在量の変動は高脂肪食摂取8週間以降はあまり起こっていないとわかります。

このように、MSイメージングの1枚の切片で複数物質を同時に計測・観察できる利点を活用し、得たデータをIMAGEREVEAL MSで解析することで、分子の実態に即したMSイメージを得られ、より正確に病態の進行状況と標的分子の位置情報の関係性を理解できました。また、LC-MSやGC-MSのデータとMSイメージングを組み合わせることで、疾病の治療薬の標的分子の探索などで新規医薬品の開発に貢献することが期待されています。

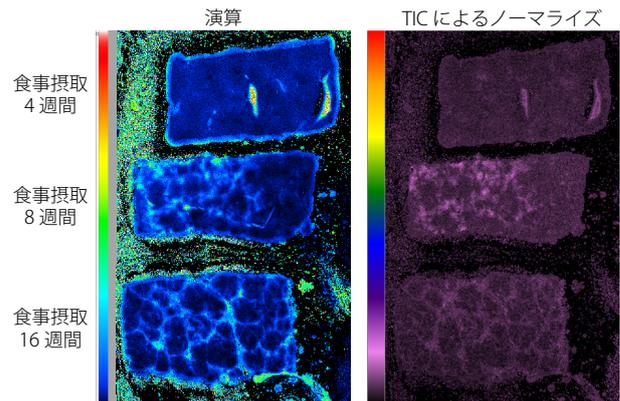


図4 IMAGEREVEAL MSによるデータ処理(演算)の効果( $m/z$ 405.27、高脂肪食摂取群)

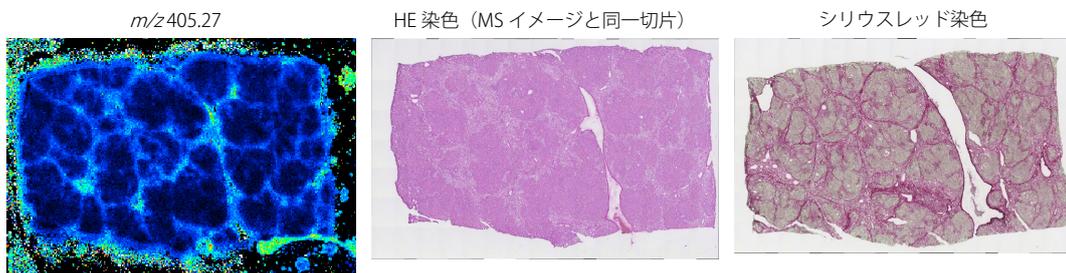


図5 高脂肪食摂取16週間のラット肝臓組織における $m/z$ 405.27の分布と病理組織学的染色結果との比較

### 謝辞

本報告は九州大学 先端融合医療レドックスナビ研究拠点における共同研究報告の一環として実施されました。また、サンプルの提供と共に貴重なご助言を戴いた田辺三菱製薬株式会社 山崎真様に感謝いたします。

本製品は研究用途にのみ使用可能です。医薬品医療機器等法に基づく医療機器として承認・認証を受けておりません。治療診断目的およびその手続き上での使用はできません。

iMLayerおよびIMAGEREVEAL MSは、株式会社 島津製作所の日本およびその他の国における商標です。

**株式会社 島津製作所**

分析計測事業部  
グローバルアプリケーション開発センター

初版発行：2019年5月

島津コールセンター ☎0120-131691  
(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。