

イメージング質量顕微鏡

ICP質量分析計

MSイメージングデータ解析ソフトウェア

3次元腫瘍細胞モデルにおける

腫瘍親和性光感受性物質のマルチモーダルイメージング

Jennifer-Christin Müller¹, Lousia Petersen², Dr. Dennis Mulac², Prof. Dr. Klaus Langer² and Prof. Dr. Uwe Karst¹
奥田 晃士³

ユーザーベネフィット

- ◆ MALDI-MSでの分子イメージングとLA-ICP-MSでの金属イメージングにより、新たな観点からの試料評価が可能です。
- ◆ ICP-MSの定量性を活かし、生体試料内での金属元素の濃度分布を可視化することが可能です。
- ◆ 両手法で取得されたデータはMSイメージングデータ解析ソフトウェアIMAGEREVEAL™ MSを使って解析可能です。

■はじめに

光線力学療法（Photodynamic Therapy：PDT）は革新的で新しい癌治療を提供します。PDTでは、腫瘍に集積性を示す光感受性物質（Photosensitizers：PS）を投与した後、特定の波長の光を患部に照射します。光によって励起されたPSは活性酸素種の形成を誘導し、活性酸素種が細胞にアポトーシスをもたらします。本研究ではPSとして、化合物5,10,15,20-テトラキス（3-ヒドロキシフェニル）-ポルフィリン（mTHPP）とそのパラジウム標識類似体mTHPP-Pdを検討しました（図1）。PSの開発における主要な課題の1つは、組織浸透を妨げる化合物の疎水性特性にあります。経口投与された化合物は、消化管の粘液層を通過する必要がありますため、これらの化合物の浸透深さを決定することは非常に重要です。

本稿では、レーザーアブレーション誘導結合プラズマ質量分析（LA-ICP-MS）による元素イメージングとマトリックス支援レーザー脱離/イオン化質量分析イメージング（MALDI-MSI）による分子イメージングの組み合わせを用いて、腫瘍スフェロイドにおけるmTHPP及びmTHPP-Pdの分布と濃度を調べました。

1. Institute of Inorganic and Analytical Chemistry, University of Münster
2. Germany Institute of Pharmaceutical Technology and Biopharmacy, University of Münster
3. 株式会社島津製作所グローバルアプリケーション開発センター

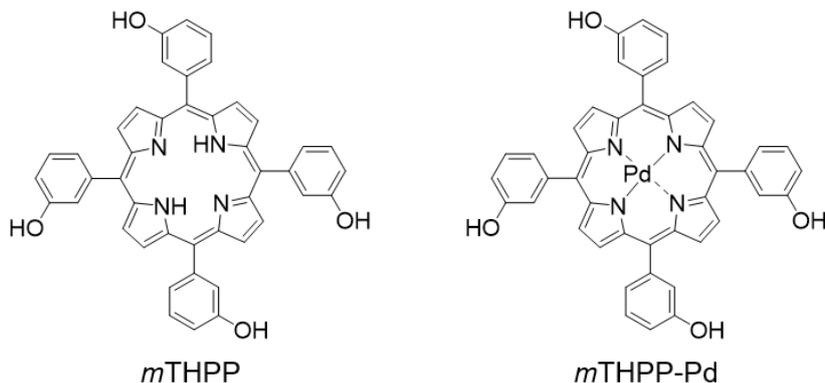


図1: PSとして使用したmTHPPと mTHPP-Pdの化学構造

■材料および方法

腫瘍スフェロイド

ヒト結腸癌細胞株HT29に基づく安定な腫瘍スフェロイドをリキッドオーバーレイ法を用いて得ました¹⁾。mTHPPとmTHPP-Pdを既知文献²⁾に従って合成し、PSの最終濃度が5 μMとなるように、腫瘍スフェロイドと溶解させたPSを共に24時間インキュベートしました。腫瘍スフェロイドを使用することで、2次元細胞培養より良好な腫瘍環境をシミュレートし、in vitroな薬剤スクリーニングをすることができ

試料前処理

MALDI-MSI

ティッシュ・テック® O.C.T.コンパウンドに埋め込まれたスフェロイドの14 μmの厚さの切片を、酸化インジウムスズでコーティングされたスライドガラス上に載せました。クリオ化合物を酢酸アンモニウム緩衝液を用いて除去した後、α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) をマトリックス蒸着装置iMLayer™を用いて、250 °Cで20分間、試料切片上に蒸着しました。

LA-ICP-MS

mTHPP-Pdで処理した厚さ5 μmのスフェロイド組織切片を顕微鏡用のスライドガラス上に載せました。検量線試料は、マトリックスマッチングしたゼラチン溶液（10% w/w）から調製し、ゼラチン溶液には、ICP用のパラジウム標準溶液を0.1から100 μg/gの濃度範囲で添加しました。ゼラチン溶液を加熱後、均質化させ、同様に厚さ5 μmの切片を作成し検量線試料としました。

■装置

分子イメージングにはiMScope™ *TRIO*を用いました。iMScope *TRIO*のMALDI源は355 nmのNd:YAGレーザーです。サンプル電圧を3.5 kV、検出器電圧を1.9 kV、レーザー繰り返し周波数を1000 Hz、各ピクセルあたりのレーザー照射回数を1000ショットに設定しました。5 μmのレーザー径で、レーザー照射間隔をxおよびy方向に10 μmに設定してレーザー照射し、*m/z* 600~900の質量範囲において正イオンモードで分析を行いました。分子同定のためのMS/MS分析には、コリジョンガスとしてアルゴンガスを用い、CID時間は20 msおよび30 msに設定しました。

元素バイオイメージングには、LA-ICP-MSを使用しました。本稿では、ICPMS-2030を213 nmのNd:YAGレーザーを備えたレーザーアブレーションシステムLSX-213 G2+ (Teledyne CETAC Technologies) に接続しました。レーザーアブレーションでは、繰り返し周波数20 Hz、レーザー径7 μm、走査速度21 μm/sの条件でレーザーを照射し、アブレーションセルには0.8 L/minのヘリウムを流しました。ICP-MSはニッケルサンプリングコーンとスキマーコーンを使用し、プラズマ条件は、高周波出力1.2 kW、トーチ深さ5 mm、プラズマガス流量9.0 L/minに設定しました。³¹Pの積分時間は85 ms、¹⁰⁵Pdと¹⁰⁶Pdの積分時間は100 msに設定し、コリジョンガスとしてヘリウム (6 mL/min) を用いてコリジョンモードで測定しました。

■結果

mTHPPで処理した腫瘍スフェロイドのMALDI-MSイメージを図2に示します。顕微鏡画像 (図2a) とmTHPPのMSイメージ (図2b) の重ね合わせ画像 (図2c) でも示されるように、mTHPPは、腫瘍スフェロイドの内部には存在せず、外層の内側に均一に分布していることから、腫瘍スフェロイドの外側細胞層に局在していると考えられます。同時に、試料調製中にPSが分解されることなく無傷の分子としてmTHPPを検出できることが明らかになりました。また、PC(32:1)、PC(34:1)およびPC(36:1)のホスファチジルコリンの分布 (図2d,e,f) から、これらの分子が腫瘍組織と非常に相関することが確認されました。

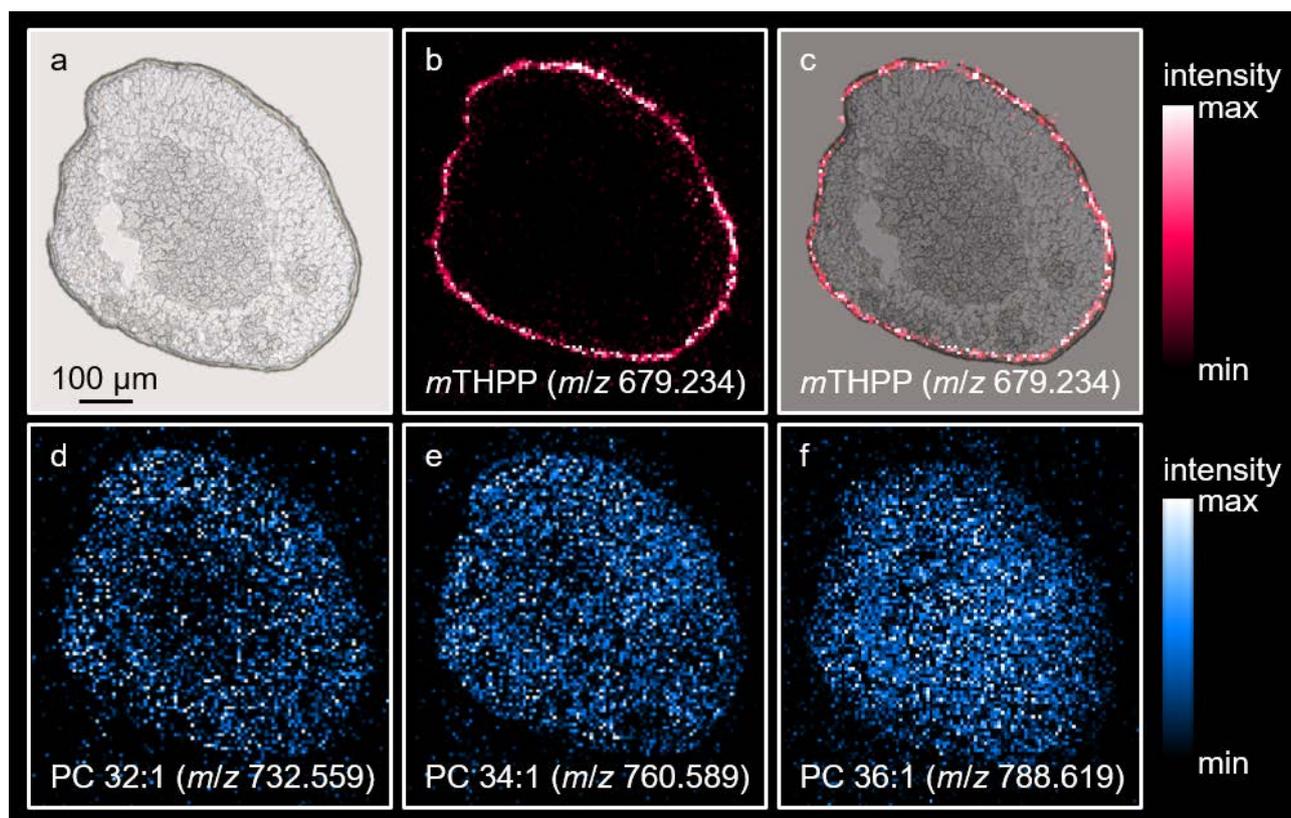


図2:溶解させたmTHPPで処理したスフェロイドのMALDI-MSイメージング結果
すべての分子は[M+H]⁺として検出され、TICノーマライズして、それぞれの*m/z*の±0.05の範囲におけるMSイメージを描いた。

- a. 顕微鏡画像
- b. mTHPPのMSイメージ
- c. a,cの重ね合わせ画像
- d. PC(32:1)のMSイメージ
- e. PC(34:1)のMSイメージ
- f. PC(36:1)のMSイメージ

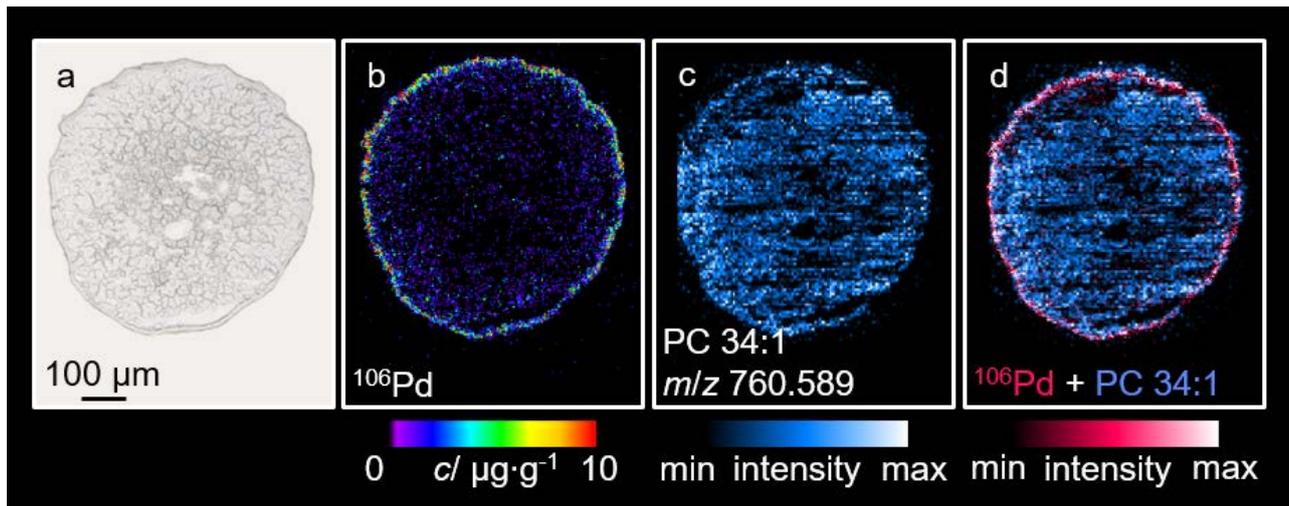


図3: mTHPP-Pdで処理したHT 29腫瘍スフェロイドの同一切片での元素および分子イメージング結果

- a. 顕微鏡画像
- b. ^{106}Pd のLA-ICP-MSイメージング結果
- c. PC(34:1)のMALDI-MSイメージング結果
- d. ^{106}Pd とPC(34:1)の重ね合わせ画像

MALDI-MSでは、mTHPPの分布情報が得られましたが、定量的な評価は困難です。本稿ではLA-ICP-MSでの定量評価を組み合わせるために、MALDI-MS、LA-ICP-MSの順に腫瘍スフェロイドの組織切片を分析しました。LA-ICP-MSでの分析には金属で標識したmTHPPが必要なので、mTHPP-Pdで処理したスフェロイドのみを調べました。

LA-ICP-MSでの分析の結果、パラジウム（図2b）が図2で示した結果と同様の局在を示したことから、mTHPP-PdもmTHPPと同様に外側細胞層に局在することが分かりました。マトリックスマッチングした検量線による定量の結果、パラジウムの濃度は最高で $10\mu\text{g/g}$ 、平均で $1.9\mu\text{g/g}$ であり、mTHPPとPdの量的関係よりmTHPPの濃度を計算することができます。

一方、パラジウムを修飾したmTHPPは、プロトン化しやすい部位をパラジウムで塞がれているため、MALDI-MSでは検出が難しく同一切片による比較ができません。そこで今回、腫瘍組織と非常に相関のあるホスファチジルコリンをMALDI-MSで同定し、その分布をパラジウムの分布と比較しました。例としてPC(34:1)の分布（図3c）を示します。mTHPP-Pdの場合でも、MALDI-MSを用いて得られたホスファチジルコリンの分布から組織構造を把握することが可能となり、MALDI-MSとLA-ICP-MS両手法のイメージング結果を重ね合わせて、リン脂質リッチな腫瘍スフェロイドモデルでのmTHPP-Pdの分布を可視化し、定量評価を行うことができました。

■ 結論

本稿で示した2つのイメージング技術によって、新たながん治療として期待されるPDTにおけるPSが、腫瘍スフェロイドへ浸透する深さと、その濃度を相補的に調べることができました。

LA-ICP-MSでは、マトリックスマッチングした検量線を用いることで対象元素の定量が可能であり、MALDI-MSでは、MS/MSによる関連物質の構造同定が可能です。LA-ICP-MSとMALDI-MSの双方の利点を組み合わせた元素および分子の両イメージングは、今後有用なツールとなることが期待できます。

参考文献

- 1) J. Friedrich, C. Seidel, R. Ebner, L.A. Kunz-Schughart, *Nat. Protoc.* 4 (2009) 309–24.
- 2) A.-C. Niehoff, A. Moosmann, J. Söbbing, et al., *Metallomics.* 6 (2014) 77–81.

IMAGEREVEAL、iMLayer、iMScopeは、株式会社島津製作所またはその関係会社の日本およびその他の国における商標です。ティシュー・テック® O.C.T.コンパウンドはサクラファインテックジャパン株式会社の登録商標です。

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

05-SCA-116-004-JP 初版発行：2022年3月

島津コールセンター ☎ 0120-131691

本文書に記載されている製品は、医薬品医療機器等法に基づく医療機器として承認・認証等を受けた機器ではありません。本文書に記載されている分析手法を診断目的で使用することはできません。

本文中に記載されている会社名および製品名は、各社の商標および登録商標です。本文中では「TM」、「®」を明記していない場合があります。

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。最新版は、島津製作所>分析計測機器の以下のサイトより閲覧できます。

<https://www.an.shimadzu.co.jp/apl/index.htm>

会員制情報サービス Shim-Solutions Club にご登録いただけますと、毎月の最新情報をメールでご案内します。新規登録は、<https://solutions.shimadzu.co.jp/> よりお願いします。

© Shimadzu Corporation, 2022