

# ヒト炎症性大腸炎のMSイメージングとセグメンテーション分析

Simona Salivo<sup>1</sup>、山崎雄三  
<sup>1</sup>KRATOS ANALYTICAL LTD.

## ユーザーベネフィット

- ◆ MALDI-7090の高速かつ高空間分解能の画像解析により、細胞に近いレベルで結腸の構造を調べることができます。
- ◆ 直観的に使用できるIMAGEREVEAL™ MSを用いたセグメンテーション分析を用いて、顕微鏡所見で裏付けられる重要な組織内領域を同定することが可能です。

## ■はじめに

潰瘍性大腸炎（UC）やクローン病（CD）などの炎症性腸疾患（IBD）は、病因が不明な慢性の再発性炎症状態です。現在の治療法は普遍的に効果的ではなく、深刻な副作用をもたらす可能性があります。したがって、正しい治療法を適用するためには、病気の種類を早期に発見して正確に特定することが重要です。

結腸組織は複雑で、さまざまな種類の細胞が含まれているため、診断と予後を改善するには、細胞固有の分析ツールが必要です。脂質のMALDIイメージング質量分析は、組織の代謝段階を特定するのに役立つ分子署名とその分布を組織切片から直接取得できるため、このような分析を容易にする可能性があります。

光学顕微鏡と組み合わせたMALDIイメージング解析は、組織構造の病理学的変化に関与する分子種への価値ある洞察を提供することができますが、IBDを特徴付ける代謝変化のより良好で完全な理解のためには、コンピューターによるさらに高度なデータマイニングが必要と思われる。

セグメンテーション解析はMALDIイメージングデータと共に使用されることが多い一般的な計算法です。

本稿では、TOF-TOFタイプのMALDI-7090を用いて10 μmの空間分解能で実施した、IBD患者から得られた内視鏡生検のMSイメージングの結果と、IMAGEREVEAL MSイメージング用ソフトウェアによるデータおよびセグメンテーション分析を紹介します（図1）。MALDI-7090の高い空間分解能は主要な結腸組織構造(陰窩、粘膜固有層、粘膜筋板)を解明するための鍵となる性能であり、一方、セグメンテーション分析は炎症領域と顕微鏡分析に基づく結腸細胞の核成分の同定を可能にしました。

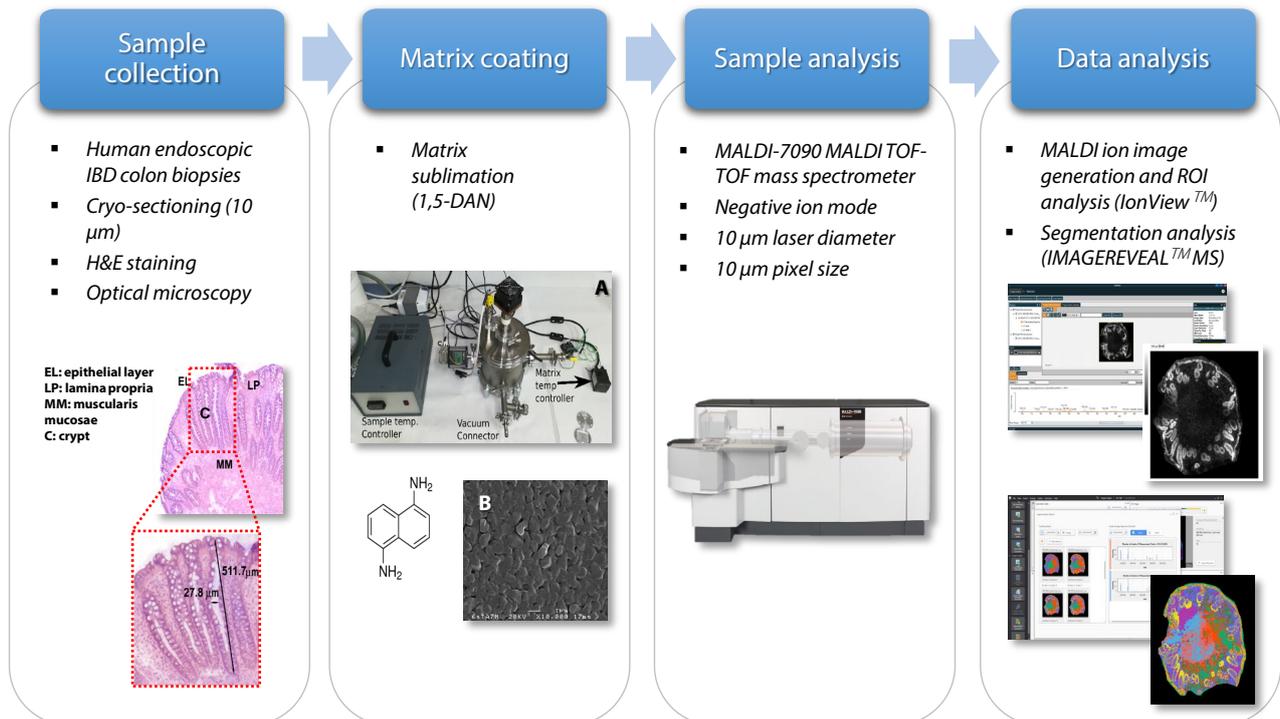


図1 ヒト内視鏡IBD結腸生検のMALDIイメージングとデータ解析のための分析ワークフローと参考文献1)で撮影したH&E画像。  
A:ステンレス製昇華装置、B:1,5-DAN結晶のSEM像(倍率×10,000、平均結晶サイズ約3μm)<sup>2)</sup>

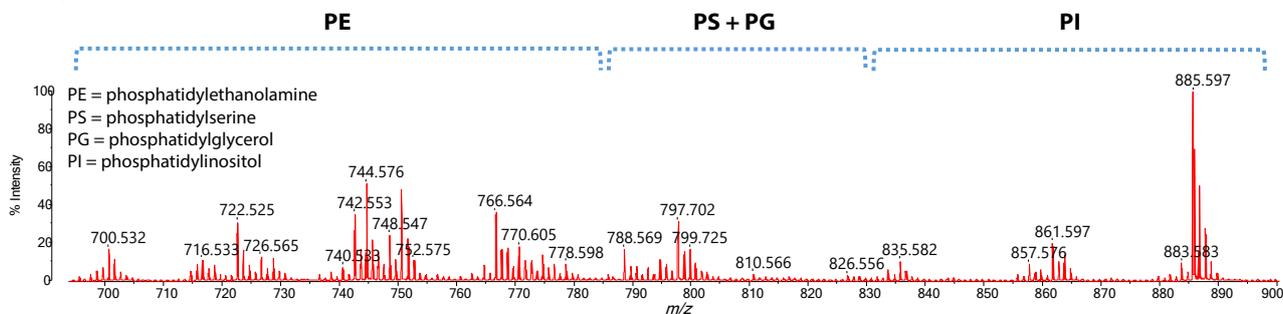
## ■ 試料調整と測定条件

切除されたヒト結腸組織のサンプルは、スペインのバレアレス諸島パルマにあるInstitut d'Investigació Sanitària Illes Balears (IdISBa) 研究所のご厚意により提供いただきました。本研究のための試料採取は、バレアレス諸島倫理調査委員会 (IB 2118/13 PI) によって特別に承認されました。組織試料を液体窒素中で瞬間凍結し、10  $\mu\text{m}$ の厚さで凍結切片を作製しました。ステンレス製蒸着装置を用いて負イオン検出用の1, 5 - ジアミノナフタレン (DAN) を切片に蒸着しました。装置は MALDI-7090を用い、レーザースポット径10  $\mu\text{m}$ およびステージ移動ステップ10  $\mu\text{m}$ でイメージング測定を行いました。データは、イメージングソフトウェアIonView™を用いて処理し、MALDIイオン画像を得て、関心領域 (ROI) 分析を行いました。セグメンテーション分析はIMAGEREVEAL MSを用いて行いました。

## ■ 結果：MALDIイメージングとROI分析

MALDI-7090の早い積算速度、10  $\mu\text{m}$ /ピクセルは切片全体への測定を短時間(1時間未満、約4万ピクセル)で可能にしました。図 2 -A)は、典型的なIBD試料の切片全体の負イオンマススペクトルを示しています。ここでは、アラキドン酸含有ホスファチジルイノシトール (PI (38:4)) ( $m/z$  885) は、予想通り、最も存在量の多い種の一つでした。アラキドン酸は、エイコサノイド (炎症代謝産物のファミリー) の生合成における前駆体としての役割のみならず、結腸細胞の分化ならびに潜在的な悪性化 (腫瘍形成) に密接に関与していることが知られています。図 2 -B)は潰瘍性大腸炎患者の健常組織 (上) および罹患組織 (下) からの $m/z$  861.550 (PI (36:2)) および885.550 (PI (38:4)) のMALDIイメージング、ならびにH&E染色切片を示しています。これら画像においては、粘膜固有層、上皮 (陰窩) および粘膜筋板組織は明確に区別することができます。陰窩の内層は単一細胞単層からなり、その構造はMALDI-7090の10 x 10  $\mu\text{m}$ /ピクセルサイズの画像化能力と最適化された試料調整のおかげで明瞭に可視化できました。 $m/z$  861.550と885.550 (図 2 -B)) の重ね合わせ画像は、これらイオン種が陰窩と固有層にそれぞれ特異的であることを示しています。

A)



B)

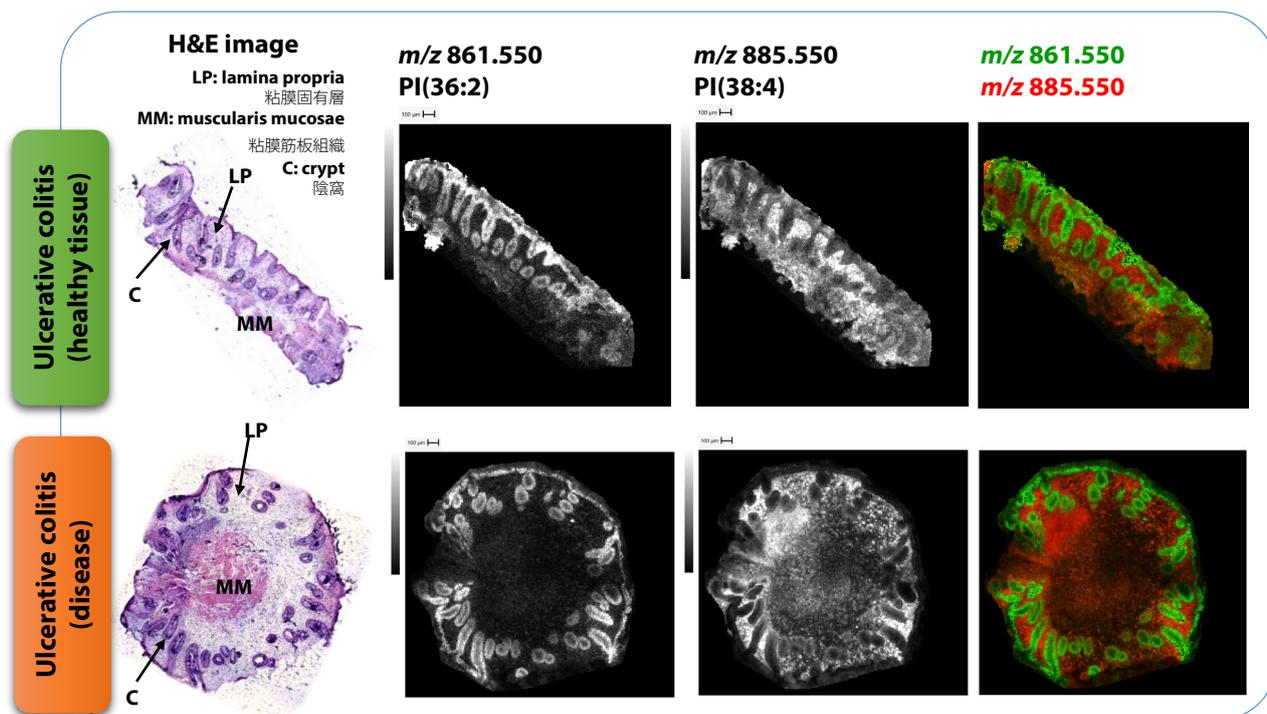


図 2 A) 典型的なIBDサンプル全体の負イオンMALDIスペクトル：主にリン脂質であるPE、PS、PGおよびPIが存在する。

B) H&E染色画像、及び陰窩と固有層に特異的な $m/z$  861.550及び885.550のイメージング画像。

$m/z$  861.550および885.550の化学構造は、組織上で得られたMALDI-MS/MS分析によって確認された (データは非表示)。

図3は、IonViewで得られたIBD罹患組織の陰窩（上）および固有層（下）のROIスペクトルです。2つのプロファイルがどのように異なって見え、組織タイプに特有であるかを比較観察することができます。

上皮組織のより詳細な分析は、複数のPIの陰窩に沿った強度勾配を明らかにしました。上皮細胞単層が粘膜固有層に陥入(すなわち、それ自体で折り重なる)して陰窩が形成されます<sup>3)</sup>。成体幹細胞は陰窩の基部に存在し、管腔に向かって上昇するにつれて徐々に分化して成熟結腸細胞になります(図4-A)）。この過程で、リピドームは分化過程を反映しながら変化します。

図4-B)は、ROI分析を通して得られた、陰窩に沿ったPI (38:4) およびPI (36:2) のシグナル強度勾配を示します。各種PIの発現における変化の挙動を評価するために、5つのピクセル・スペクトルを陰窩の長さに沿って調べました(図4-D)）。図4-C)は、ピクセル位置当たりの全PIに対する比(%) として表されるPI (38:4) およびPI (36:2) のプロットを示します。これはアラキドン酸含有種 (PI (38:4) ) の減少と二不飽和脂肪酸含有種 (PI (36:2) ) の増加を示し、参考文献<sup>3)</sup> で観察されたことと一致しました。これらの脂質の変動は高い相関係数 ( $R^2$ ) で線形回帰に適合しました。

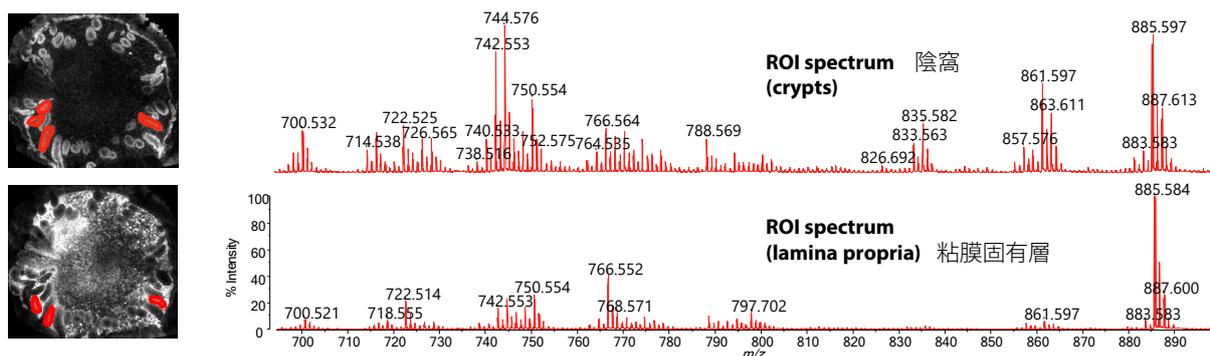


図3 IonViewソフトウェアを使用して得られたROI画像およびスペクトル  
左：陰窩(上)および粘膜固有層(下)に対応するROI領域(赤線で表示)、右：陰窩のROIスペクトル(上)粘膜固有層のROIスペクトル(下)

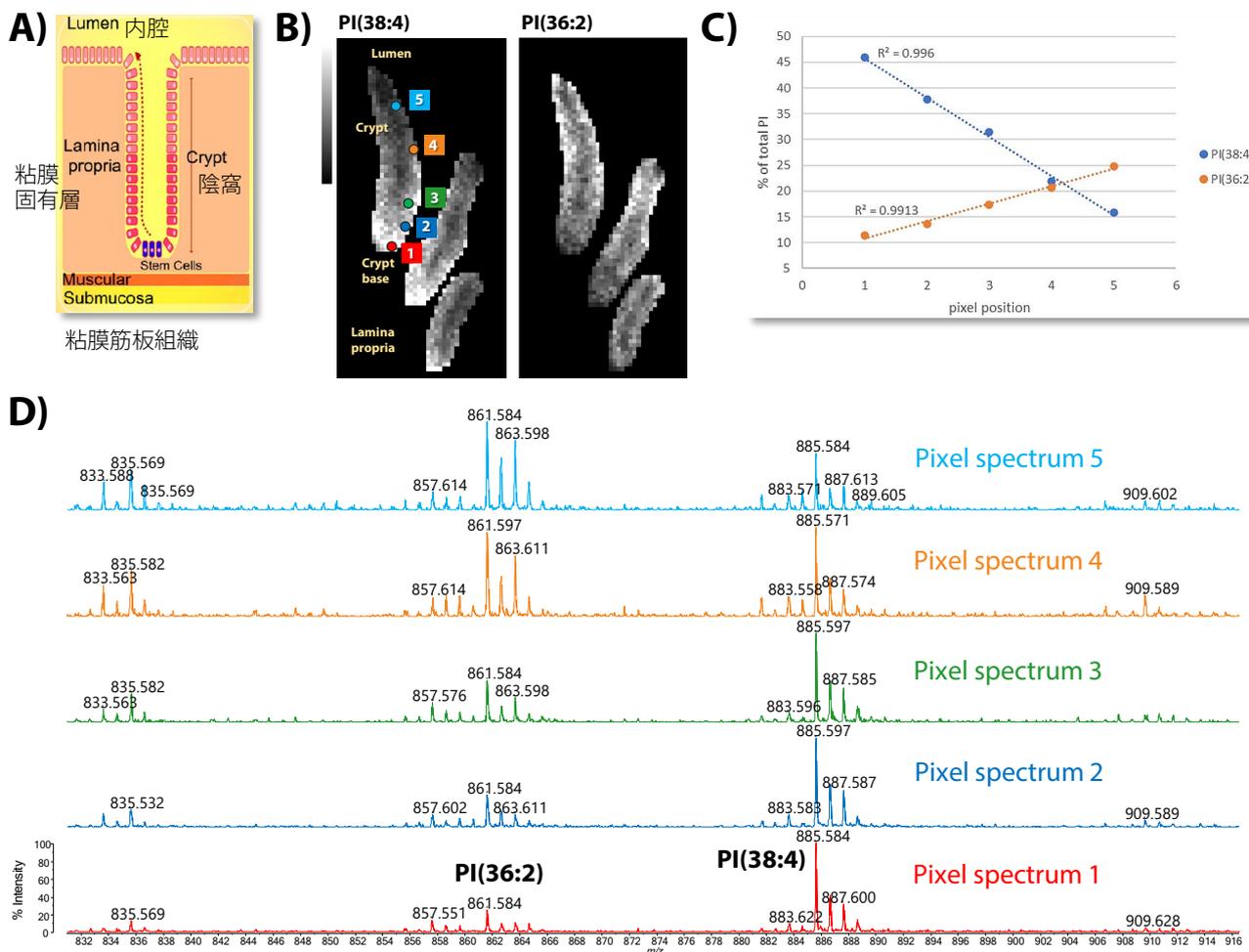


図4 A) 結腸陰窩と結腸細胞の分化過程の模式図<sup>2)</sup>、B)陰窩に沿ったPI (38:4) とPI (36:2) の分布(陰窩に対応するROIをMALDI画像に描き、勾配を明らかにした)。1から5のカラードットは強度比率の計算のために陰窩の長さに沿って調べた画素スペクトルの位置、C) PI (38:4) およびPI (36:2) の存在比。画素位置当たりの全PIのパーセンテージ(%) で表され、変動の線形性を示す。D) PIの種類を示す陰窩に沿って調べられた画素スペクトル。陰窩に沿ったリピドームの明らかな変化が基底部から内腔に向かって観察できる。

## ■結果：セグメンテーション分析

セグメンテーション分析は、city-blockアルゴリズムを使用して、ビニング、ノイズ除去、クラスター数設定慎重に最適化したのち、IMAGEREVEAL MSで実行されました。図5-A)は、病理学者によって実施された顕微鏡分析の結果を示しており、免疫細胞の一種であるリンパ球による浸潤領域を強調しています。この浸潤領域は慢性組織炎症の明らかな症状であるといえます。11のクラスターで得られたセグメンテーション画像は、主要な組織構造(陰窩、粘膜固有層、粘膜筋板)のグループ化だけでなく、浸潤物(図5-B))が見いだされる領域の同定も可能にしました。

さらに、セグメンテーション分析は、結腸細胞単層(図5-C)中の黄色のクラスター)の核成分と解剖学的に相関する上皮クラスターの存在を明らかにしました。ここで核の大きさが9~12 μmであることは注目に値します。MALDI-7090によって達成された10 μmという高い空間分解能は、核クラスターを陰窩の残りの部分から分離することに大きな役割を果たし、細胞を分離するレベルの空間分解能が達成されました<sup>4)</sup>。

## ■まとめ

この研究では、IBDを特徴づける脂質発現の変化が、次のパワフルな組み合わせにより同定できることを示しました：1) 最適化した試料調製、2) MALDI-7090質量分析計を用いた高速・高空間分解能(10 μm)でのMALDIイメージング解析、3) IonViewとIMAGEREVEAL MSを用いたイメージングデータとセグメンテーション解析。

MALDI - 7090で作成した高品質なイメージングデータは結腸の構造を正確に再現することを可能にしました。セグメンテーション分析は、分子署名を得る付加的な利点と共に、高密度の免疫浸潤物を含む領域を確認する顕微鏡分析を支持する強力なサポートになることが示されました。

## ■参考文献

- 1) Anal. Bioanal. Chem. (2015) 407: 4697–4708.
- 2) Anal. Chem. (2019) 91: 803–807.
- 3) Biochim Biophys Acta (2016) 1861: 1942–1950.
- 4) Anal. Bioanal. Chem. (2019) 411(30): 7935-7941.

## ■謝辞

本稿で使用したサンプルの準備・提供、および画像データの解析について、Gwendolyn Barceló-Coblijn (Institut d'Investigació Sanitària Illes Balears, スペイン) と Jose A. Fernandez教授 (バスク大学、スペイン) に、感謝いたします。

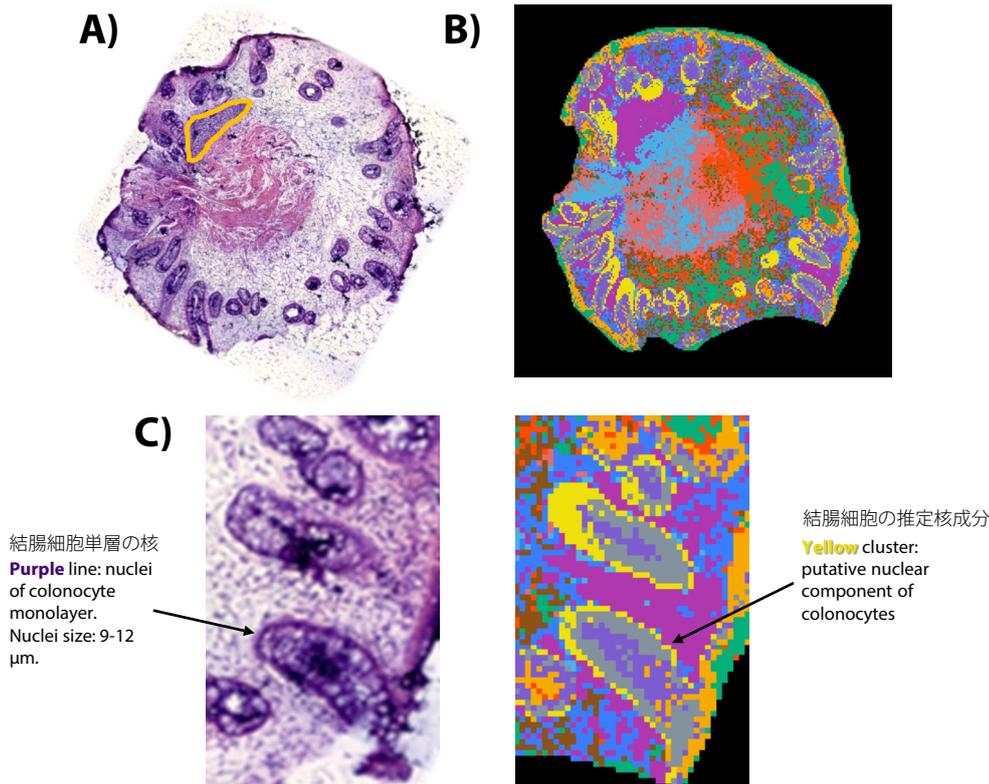


図5 A) IBD病変組織のH&E画像。病理医により決定されたリンパ球による浸潤領域が線で示されている。  
B) City-blockアルゴリズムと11クラスターで得られたセグメンテーション画像 (IMAGEREVEAL MS)。主な組織構造(陰窩、粘膜固有層、粘膜筋板)と浸潤物に対応する領域が明確に識別可能。  
C) 左:単細胞上皮単層の核を強調したH&E画像の拡大(核の大きさは9~12 μm)、右:セグメント化されたイメージの抽出。黄色のクラスターは、結腸細胞の核成分に対応している。

IMAGEREVEAL、IonView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。

株式会社 島津製作所

12-MO-487-JP 初版発行：2023年1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。  
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。