

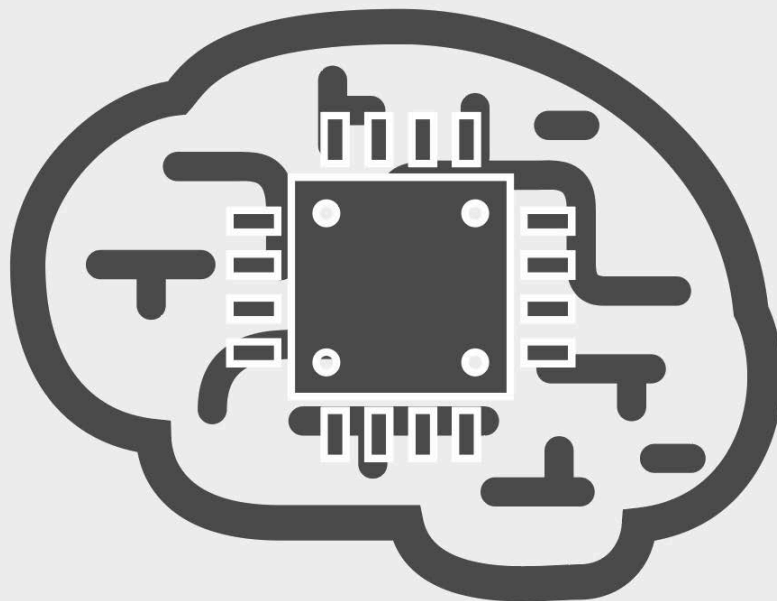
Application Note

No. 99

ライフサイエンス

IMAGEREVEAL™ MSにおける画像解析機能の マウス脳代謝物解析への応用

新聞 秀一^{1,2,3}、齋藤裕美¹、山本 卓志⁴、中川 薫⁴、山口 真一⁵



Life Science

■要旨

近年、マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析法（matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry；MALDI-MS）を用いたMALDI-MSイメージング（MALDI-MSI）では、装置性能が向上し一度に数多くのピークが得られるようになっていきます。MALDI-MSI が初めて報告された1997年から2000年代半ばまでは、得られたピークは手作業で解析されることが数多くありました。しかし、近年、統計解析手法を応用した様々な解析手法が提案されています。本アプリケーションノートでは四重極飛行時間型質量分析計を搭載したiMScope™ QTを用いてMALDI-MSIを行い、その解析にMSI専用ソフトウェアであるIMAGEREVEAL MSを用いました。iMScope QTは、高い質量分解能と高い質量精度で多数のシグナルを得ることが可能です。また、IMAGEREVEAL MSでは、得られたデータを経験の少ない方でも簡便かつ迅速に統計解析することが可能です。本アプリケーションノートでは、iMScope QTとIMAGEREVEAL MSを組み合わせ、マウス脳切片から得られたシグナルを効率的に解析する手法の一つを解説します。

1. はじめに

MALDI-MSIは、新しい分子可視化手法として様々な分野に応用されており、これまでのアプリケーションノートでも、その応用例について解説してきました¹⁻³⁾。近年、様々な装置が上市されており、島津製作所においても四重極飛行時間型質量分析計（Q-TOF）であるLCMS™-9050をベースとして、それに大気圧MALDIのイオン源と光学顕微鏡を搭載したiMScope QTがラインナップされています。iMScope QTの特長は、高速測定と高い質量分解能ならびにTOF部の温度コントロールによる、高い質量精度が挙げられます。このような特長を持つiMScope QTでは、ターゲットを決めた測定のみならず、ノンターゲット分析、すなわち幅広い m/z の範囲で多数のピークを検出し、様々な分子の可視化情報を一度に取得する事が可能です。

MALDI-MSIのデータは、レーザー照射を行った位置とそこで得られたマススペクトルに含まれるピークの m/z より構成される多次元情報になります。このようなデータを解析するにあたり、MALDI-MSIが報告された当初は、手作業での解析が主流でしたが、現在は様々な統計解析手法を実装したソフトウェアによって行うことができるようになっていきます。

1 大阪大学大学院工学研究科生物工学専攻

2 大阪大学・島津分析イノベーション協働研究所

3 大阪大学先進的学際研究機構

4 島津製作所 分析計測事業部 Solutions COE

5 島津製作所 分析計測事業部 ライフサイエンス事業統括部 MSBU

特に、ROI (region-of-interest ; 関心領域) など事前の情報がなく、得られたマススペクトルから切片サンプル全体で特徴的な分布を示すシグナルに、どのようなものがあるかを知り、さらなる解析の一助にしたい場合があります。その解析の流れを図1に示しました。

このような解析は、“画像解析”として分類される解析手法になります。画像解析には、階層的クラスター分析 (HCA ; hierarchical clustering analysis) のような色々な局在を提示し分類する手法の他にも、より特徴的な分布パターン (もしくは特定の分布パターン) を見つけるためのセグメンテーションや類似画像抽出が挙げられます。

本アプリケーションノートでは、このセグメンテーションと島津製作所独自の手法である類似画像抽出を組み合わせたマウス脳解析手法の一つを紹介します。

2. 実験

2-1 マウス脳切片作成とマトリックス供給

凍結マウス脳はフナコシ (東京、日本) より購入しました。購入した凍結マウス脳は、クライオミクロトーム (CM1950 ; Leica、ヌスロッホ、ドイツ) を用いて -20°C で $8\text{ }\mu\text{m}$ の厚さで切片を作製しました。作製した切片は、インジウム-スズ酸化物 (ITO) コートスライドガラス ($100\text{ }\Omega/\text{m}^2$ 剥離防止コートなし ; 松浪硝子、大阪、日本) に貼り付けました。本実験ではマトリックスとしてメルク (メリーランド、米国) より購入した α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) を用いました。また、質量校正試薬として2,5-ジヒドロキシ安息香酸 (DHB、メルク、メリーランド、米国) のクラスターピークを用いました。マトリックスは、図2Aのマトリックス蒸着装置iMLayer™ (島津製作所、京都、日本) を用いて、組織切片を載せたITOスライドガラスに蒸着しました。蒸着条件は蒸着温度を 250°C 、膜厚を $0.7\text{ }\mu\text{m}$ に設定しました。

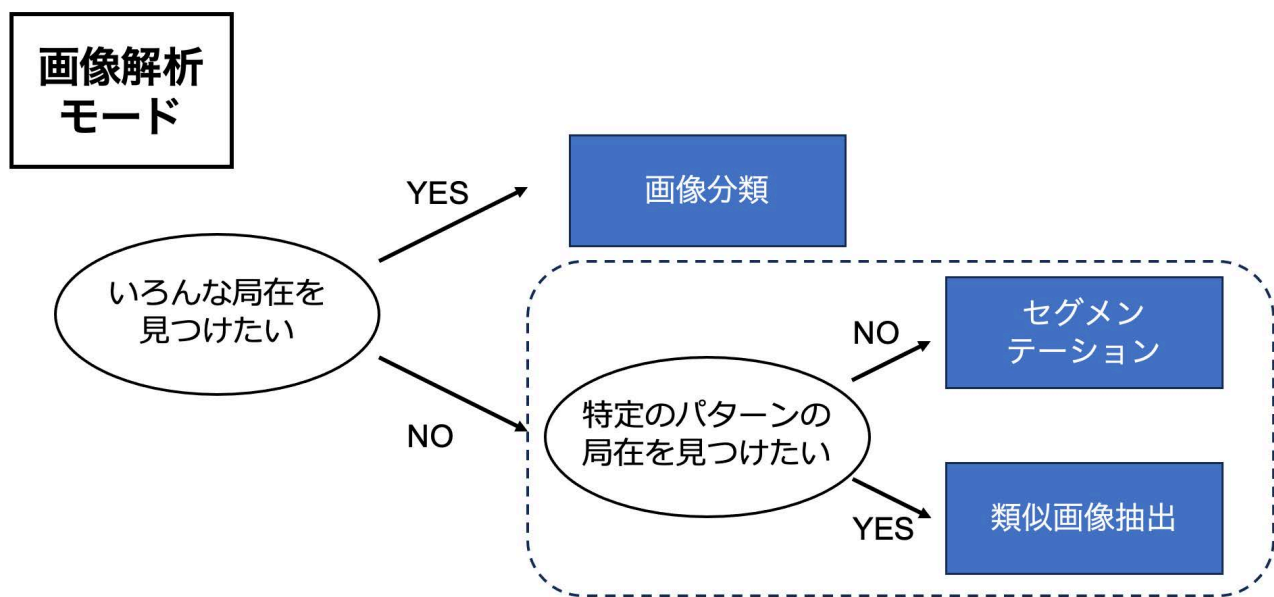


図1 IMAGEREVEAL MSにおける画像解析モード



(C)



IMAGEREVEAL MS のワークフロー

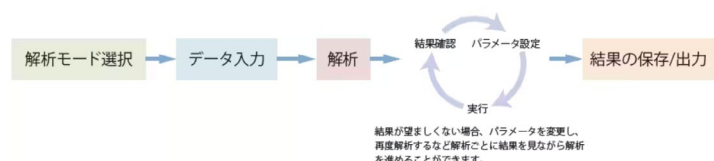


図2 iMLayer™、iMScope™ QTおよびIMAGEREVEAL™ MS

2-2 MALDI-MSI 分析

MALDI-MSI分析は大気圧マトリックス支援レーザー脱離イオン化四重極飛行時間型質量分析計を搭載したiMScope QT（島津製作所）を用いて行いました（図2B）。マススペクトルは全てポジティブイオンモードにて m/z 100-210の範囲で取得しました。測定時のレーザー強度は65.0、レーザー照射径設定値は2（いずれも任意単位）、検出器電圧は2.1 kVとしました。質量校正是 m/z 100-600の範囲で検出されるDHBのクラスターピークを用いて行いました。分析後のデータ解析にはIMAGEREVEAL MS（島津製作所、図2C）と、Pythonにより作製されたUMAPアプリを用いました⁴⁾。

3. 結果

3-1 次元縮約手法としてのt-SNEとUMAPについて

本アプリケーションノートではUMAP (Uniform Manifold Approximation and Projection) を用いましたが、同様の手法として t-SNE (t-distributed Stochastic Neighbor Embedding) が知られています⁵⁾。t-SNEとUMAPは、次元削減の手法であり、高次元データを低次元空間に埋め込むことを目的としています。言い換えれば、[多数のマススペクトルの位置情報×それぞれのマススペクトルに含まれるピーク数]という、多次元情報を2次元もしくは3次元まで落とし込み視覚的に取り扱うために用いられます。この次元縮約によって、データの可視化やクラスタリング（セグメンテーションとも呼ばれます）などのタスクが容易になると言えます。以下にそれぞれの手法について簡単に説明します。

1. t-SNE (t-distributed Stochastic Neighbor Embedding) :

t-SNEは、高次元データの類似性を保ちつつ、低次元空間に埋め込む手法と言えます。t-SNEは主にデータのクラスタリングや可視化に使用される次元縮約手法です。その特徴は、次の3つです。

- ・類似したデータポイントは低次元空間でも近くに配置される傾向があります。
- ・高次元データ内の近接性を保つため、クラスタの特徴がよく保存されます。
- ・ノイズや外れ値に対しては、他の手法よりも頑健です。

t-SNEは、主に2次元や3次元の低次元空間にデータを埋め込む際に効果的ですが、計算コストが高く、高次元データに対しては計算時間が増加する傾向がある手法として知られています。

2. UMAP (Uniform Manifold Approximation and Projection) :

UMAPもまた、高次元データを低次元空間に埋め込む次元縮約手法であり、t-SNEと同様の目的を持っています。しかし、いくつかの異なる特徴があります。その特徴は、次の3つです。

- ・t-SNEよりも高速に計算できるため、大規模なデータセットに対しても適用しやすいです。
- ・局所的な構造を保ちつつ、全体的な構造もよく保持することができます。
- ・高次元データの距離関係をより適切に保てます。

UMAPは、高次元データの解析や可視化、クラスタリングなどに広く使用されます。特に大規模なデータセットに対して効果的であり、t-SNEよりも計算効率が高いことが知られています。

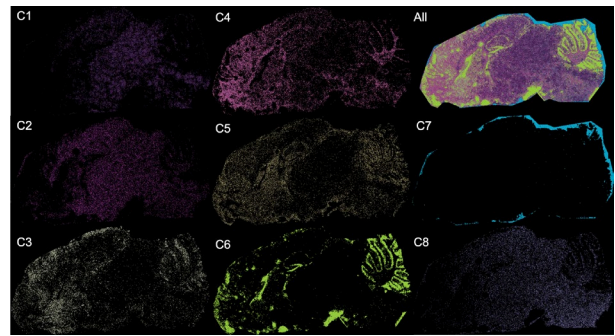


図3 本実験条件で得たイメージングデータをUMAPで8つのセグメントに分離した結果

以上より、いずれの手法も、データの特性や目的によって選択されることがありますが、高次元データの可視化やセグメンテーションにおいて、計算コストの低いUMAPが近年では好まれる傾向にあるという背景から、本アプリケーションノートではUMAPを採用しました。

3-2 UMAPによるセグメンテーション結果

図3にUMAPを用いて m/z 100から210までの間に得られたイメージングデータを8つのセグメントに分離した結果を示します。全てのセグメントを重ね合わせた画像は、“All”として表示しています。C1-C8までのセグメントはそれぞれ特徴的な分布を示しています。例えばC1は中脳の領域、C3は線条体の領域などを描出しています。また、この中でC7は組織外に分布するイオンを検出していることから、マトリックスであるCHCA由来のシグナルによって主に構成されたものであると考えられます。これらセグメントの中で最も明瞭な分布を表すのはC6であり、海馬や小脳顆粒層が明瞭に描出されています。今回の解析では8つのセグメントに分離しましたが、このようなセグメンテーションでは分離するセグメントの数は任意に設定されます。いくつのセグメントに分離するのが最適かということについては様々な議論があり、自動的に最適クラスター数を計算する試みも行われています。

3-3 セグメンテーション結果から特徴的な m/z を検索する類似画像抽出

詳細は省きますが、UMAPは（t-SNEも）次元削減の過程で質量(m)の情報が失われることがわかっています。

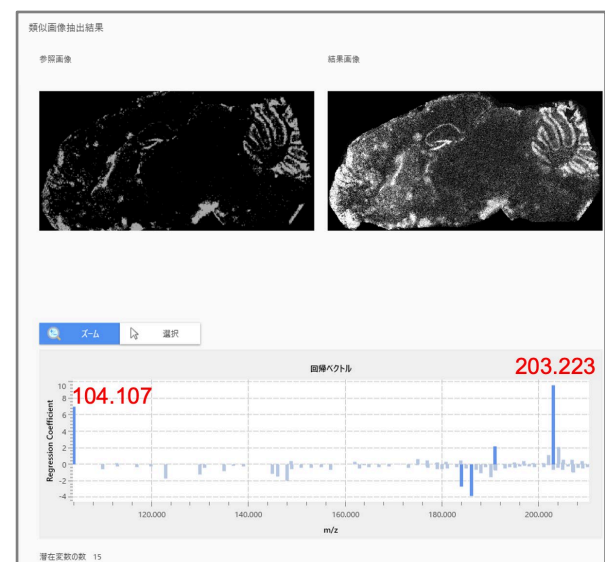


図4 類似画像抽出実行後の結果

つまり、計算後には明瞭な特徴を示す分布を構成するイオンの質量情報が失われるため、UMAPやt-SNEは、得られたマススペクトルがどのような特徴を持つ分布を有するかは示せますが、その分布を構成するイオンの分子種を特定するための情報を失うという欠点があります。

この状況を解決するために、IMAGEREVEAL MSでは類似画像抽出という機能が備わっています。この類似画像抽出とは、予め与えた分布と似た分布を示すピークの m/z を自動で提示してくれる機能です。実際に、類似画像抽出を行った結果を図4と図5に示します。図4は計算直後の画面になります。C6の分布を参照画像として、それと似た分布を示すピークの m/z が、横軸が m/z で縦軸がRegression coefficientというスコアがつけられた形で返ってきます。このRegression coefficientが正の値であるピークは、C6の分布と似た分布であることを示しており、その数値が大きいくほどより類似していることを意味しています。一方、Regression coefficientが負の値の場合は、C6と逆の分布をする m/z を意味しています。今回の実験では、 m/z 104.107と203.223のピークのRegression coefficientが正であり、かつ値が大きくなりました。

続いてこのピークを同定するにあたり、HMDB (<https://hmdb.ca/>) として知られるデータベースで検索を行いました。検索条件はLC-MS searchを用いて、正イオンにおいて、イオン種をプロトン付加体、 m/z の許容範囲はiMScope QTの高い質量精度を活かして ± 0.005 としました。その結果、 m/z 104.107はコリンであり m/z 203.223はスペルミンであることがわかりました(図5)。実際に、図5をみると、スペルミンはほぼC6と同様の分布を示すことがわかります。一方、コリンについてはC6の分布の一部の特徴(斑点状の局在と矢頭部位の局在)を表現しているものと思われる。

【まとめ】

本アプリケーションノートでは、iMScope QTで得られたMSIデータをIMAGEREVEAL MSで解析する手法の中でも特に、セグメンテーションと類似画像抽出を組み合わせた解析手法をマウス脳代謝物解析に応用しました。セグメンテーションは、特徴的な分布を抽出するのに強力なツールである一方、マススペクトル中の質量情報は失われるため、分子同定ができないという欠点がありました。しかし、その欠点を類似画像抽出機能により補うことで、セグメンテーションで得られた海馬や小脳顆粒層を表す特徴的な分布と類似の分布を示すピークの質量情報から、これらのピークはスペルミンやコリンであることを同定できました。この一連の手法は、今後、大量のマススペクトルのピークから特徴的な分布を示すピークを抽出するという場面で大いに役に立つと考えられます。

<参考文献>

- 1) 生田 宗一郎, 篠原 菜穂, 中川 薫, 山本 卓志, 福崎 英一郎, 新聞 秀一. iMScopeTM QTによるマメ科発芽種子におけるグルタミン酸脱炭酸酵素活性局在の可視化, 島津製作所アプリケーションノートNo. 80.
- 2) 新聞 秀一, 玉田 佳大, Adinda Putri Wismam, 広畑 修二, 五味 勝也, 福崎英一郎. 質量分析イメージングによる米麹中のリン脂質およびグルコースの可視化, 島津製作所アプリケーションノートNo. 64.
- 3) 新聞 秀一, 竹尾 映美, 中川 薫, 山本 卓志, 福崎 英一郎. 質量分析イメージングを用いた酵素組織化学, 島津製作所アプリケーションノートNo. 68.
- 4) Tsuji, Y., Yamaguchi, S., Nakamura, T., and Ikegawa, M. Mass Spectrometry Imaging (MSI) Delineates Thymus-Centric Metabolism In Vivo as an Effect of Systemic Administration of Dexamethasone, Appl. Sci., 11, 10038 (2021).
- 5) Smets, T., Verbeeck, N., Claesen, M., et al. Evaluation of Distance Metrics and Spatial Autocorrelation in Uniform Manifold Approximation and Projection Applied to Mass Spectrometry Imaging Data, Anal. Chem., 91, 5716-5714 (2019).

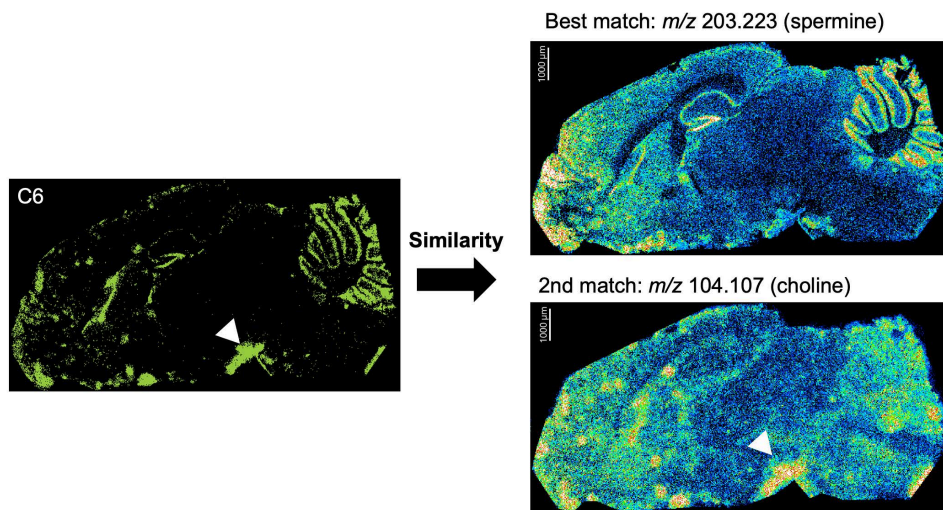


図5 C6の分布と類似した分布を示す m/z に由来する分布

iMLayer、iMScope、IMAGEREVEALおよびLCMS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 分析計測事業部
<https://www.an.shimadzu.co.jp/>

初版発行：2024年3月

本文書に記載されている製品は、医薬品医療機器法に基づく医療機器、体外診断用医薬品として承認・認証を受けておりません。本文書に記載されている分析手法を治療診断目的およびその手続き上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、製品名、サービスマークおよびロゴは、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。

本資料の掲載情報に関する著作権は当社または原著者に帰属しており、権利者の事前の書面による許可なく、本資料を複製、転用、改ざん、販売等することはできません。掲載情報については十分検討を行っていますが、当社はその正確性や完全性を保証するものではありません。また、本資料の使用により生じたいかなる損害に対しても当社は一切責任を負いません。