SHIMADZU
Excellence in Science

Application News

イメージング質量顕微鏡、マトリックス蒸着装置、イメージング質量分析用自動スプレー装置、MSイメージングデータ解析ソフトウェア

肺オルガノイドのMSイメージング

Naatasha Isahak[1], Zaimie Teng[1], Edwin Ting[1], 海野結実[2], 松尾英一[2], 尾島典行[2], Su Su Htwe[3], and Yen Choo[3]
1 Shimadzu Asia Pacific Pte Ltd, 2 島津製作所
3 Lee Kong Chian School of Medicine, Nanyang Technological University

ユーザーベネフィット

- ◆ オルガノイドをMSイメージングすることで、三次元構造中の細胞差を分子レベルで評価できます。
- ◆ MSイメージング・トータルソリューションにより、試料前処理からデータ解析までを容易に行えます。
- ◆ 専用解析ソフトウェアIMAGEREVEAL™ MSを用いることで、スムーズなデータ解析が可能です。

■はじめに

質量分析イメージング（MSI）は、分子の種類だけでなく組織内での分布も可視化できる技術として研究者の関心を集めています。オルガノイドは幹細胞から作製される三次元細胞モデルで、臓器構造や機能を模倣できるため、疾患解明、創薬、個別化医療への応用が期待されます。

本研究ではMSI・トータルソリューション（図１）を用いてヒト肺オルガノイドの脂質分布解析を実施しました。iMLayer™やiMLayer AEROを用いたマトリックス均一塗布、iMScope™ QTを用いた高感度・高空間分解能測定、IMAGEREVEAL MSを用いた効率的解析を統合することで、高解像度の分子マッピングを実現しました。これにより、オルガノイドのような異質性をもつ複雑な組織内での生化学的変化を詳細に可視化でき、個別化医療における患者特異的治療戦略の設計への応用が期待されます。

図１ A: iMLayer™、B: iMLayer™ AERO、C: iMScope™ QT、D: IMAGEREVEAL MSを用いた、MSI・トータルソリューション

<オルガノイド>

オルガノイドとは、人や動物の幹細胞から作られる小さな三次元細胞構造体で、ミニチュアの臓器のようなモデルです。実際の臓器に近い構造や機能を持ち、例えば腸のオルガノイドなら腸の吸収や分泌の機能を再現します。これにより、病気の仕組みを詳しく調べたり、新しい薬の効果や安全性を試したりすることができます。また、患者自身の細胞から作れば、その人に合った治療法を探す「個別化医療」にも役立ちます。

従来の平面的な細胞培養や動物実験に比べ、より人の体に近い情報が得られるため、医学研究や創薬の分野で大きな注目を集めています。

■前処理および分析条件

ヒト肺オルガノイドは、ヒト人工多能性幹細胞（iPSCs）を分化誘導することで作製しました。得られたオルガノイドは、2%パラホルムアルデヒド（PFA）および1%グルタルアルデヒド（GA）を含むリン酸緩衝生理食塩水（DPBS）溶液で化学固定を行いました。固定後、試料を100 x *g*で4分間遠心し、得られたオルガノイドペレットを10%ゼラチンに包埋しました。その後、凍結切片を作製し、ITOコートスライドガラス上に融解接着しました。

マトリックスは二段階蒸着法を用いて塗布しました。最初にiMLayerを用いて2,5-ジヒドロキシ安息香酸（DHB）を5分間蒸着し、微細かつ均一な結晶層を形成しました。その後、iMLayer AEROを用いた自動スプレー塗布により、結晶の均一な成長を促進しました。この二段階プロセスにより、MSIに必要な高品質かつ均一なマトリックスコーティングを実現することができました（図2）。

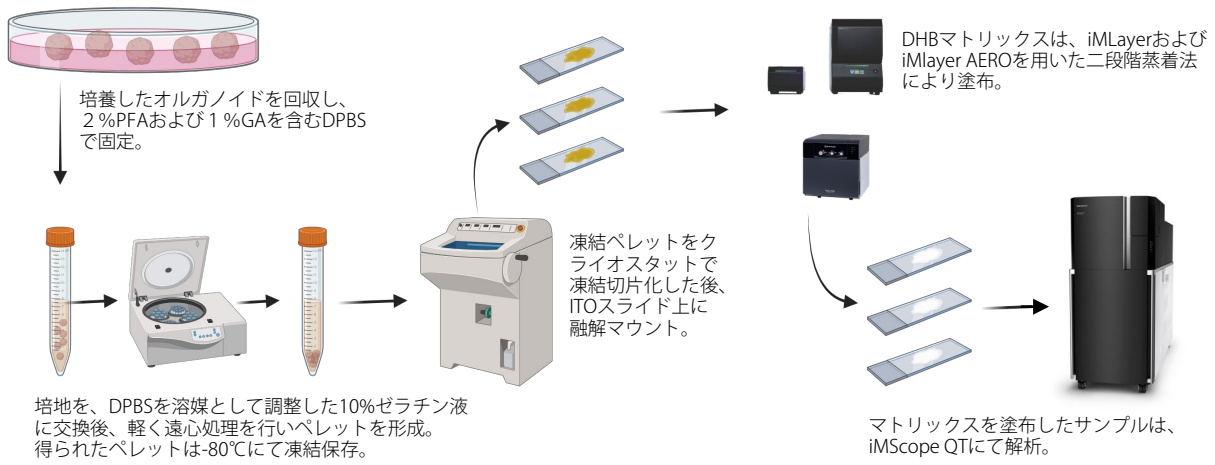

図２ 前処理方法

MSI解析は、iMScope QTを用い、ポジティブイオンモードで実施しました。また、質量較正のために、40 mg/mL DHB 70% アセトニトリル溶液をスライド上にスポットし、外部標準として使用しました。MSIの詳細な取得条件については、表1に記載しました。

表１　MSIの分析条件

マトリックス塗布（2段階蒸着法）

一段階目：蒸着

装置名	: iMLayer
マトリックス	: DHB
塗布方法	: 蒸着時間5分

２段階目：スプレー

装置名	: iMLayer AERO
マトリックス	: DHB
マトリックス溶液	: 30 mg/mL DHB 70% MeOH, 0.1% TFA
塗布回数	: 1
ステージスピード	: 10 mm/s
ノズル距離	: 5

質量分析

装置名	: iMScope QT
DL温度	: 250 ℃
ヒートブロック温度	: 450 ℃
検出器電圧*	: 2.48 + 0.02 kV
測定ピッチ	: 20 µm
極性	: ポジティブイオンモード
*m/z*測定範囲	: *m/z*500-1000
レーザー照射回数	: 50回
レーザー繰り返し周波数	: 2 [kHz]
レーザー照射径設定値	: 2
レーザー強度	: 65.0

*：参考値
最適な検出器電圧は、検出器の劣化具合とサンプルのイオン化のしやすさにより異なります。検出器電圧の設定によっては検出器の劣化を早める可能性があります。
詳しくは取扱説明書をご参照ください。

■ IMAGEREVEAL MSを用いたデータ解析

光学画像から形態学的特徴に基づいて、解析対象となる関心領域（ROI）を選定しました。円形の細胞塊を含む領域に４か所、円形でない細胞塊を含む領域に２か所、細胞塊を含まない領域に２か所、合計で８か所のROIを設定しました。

MSIデータ解析には、IMAGEREVEAL MSに搭載されている差異解析機能を使用し、主成分分析（PCA）、部分最小二乗法（PLS）、およびANOVAによる検定を行いました。

その結果、ROIは3つの異なるグループに分類されました。具体的には、図3の顕微鏡画像上にて赤色で示されるROI001～002、青色のROI003～004、緑色のROI005～007で構成されており、それぞれがオルガノイド内の異なる微小環境を反映していると考えられました（図3）。赤色と青色の領域はゼラチンマトリックスに相当し、緑色の領域はオルガノイド構造と推定されます。

IMAGEREVEAL MSでの自動解析モードを使うことで、オルガノイドにおける脂質組成を短時間で解析できました。

また、それぞれのピークから作成したMSイメージは、光学顕微鏡下で観察されたオルガノイドの形態と一致する生化学的な特徴を示しました（データ未掲載）。直径約500 µmの大きさをもつこれらのオルガノイドは、ヒト肺組織に特徴的な分子パターンを示し、上皮様の層構造や肺胞腔を思わせる内腔を備えていました。光学顕微鏡では形態的な違いしか観察できませんが、質量分析イメージングでは脂質種ごとの局在を直接可視化できます。その結果、肺の生理機能に重要な分子分布を明らかにすることができました。

さらに、IMAGEREVEAL MSに含まれるデータベースを用いることで、複数のピークについて候補化合物名が示されました（表2）。一例として脂肪酸カルニチン、ジアシルグリセロール（DAG）、ホスファチジルコリン（PC）、ホスファチジルエタノールアミン（PE）などの主要脂質種の*m/z*値を示しています（図4）。

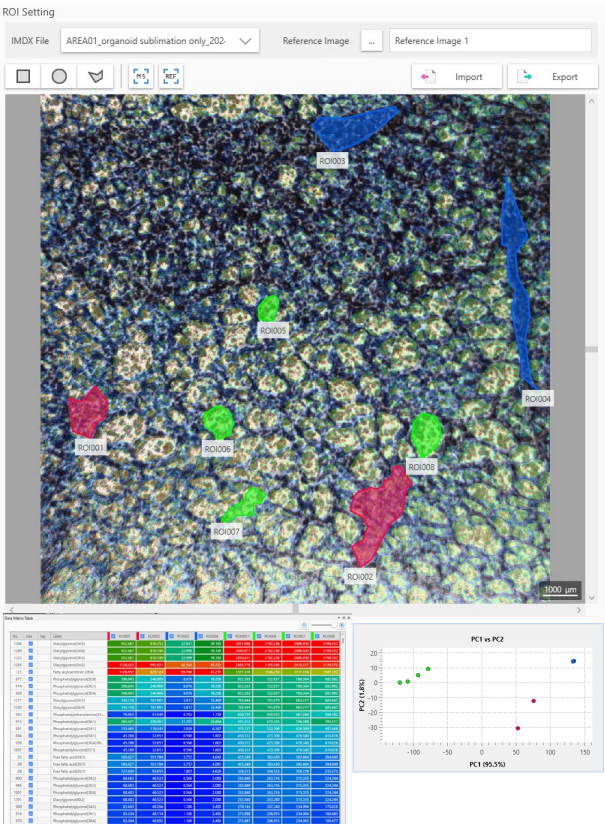

図３　IMAGEREVEAL MSを用いたMSI解析

表２　IMAGEREVEAL MSによって生成された化合物リスト

化合物	*m/z*
Fatty acylcarnitine(26:4)	552.285
Diacylglycerol(34:2)	653.452
Diacylglycerol(34:1)	655.467
Diacylglycerol(36:4)	655.470
Diacylglycerol(34:3)	657.444
Diacylglycerol(34:0)	657.486
Diacylglycerol(36:3)	657.486
Phosphatidylethanolamine(34:1)	718.538
Phosphatidylethanolamine(30:0)	740.403
Phosphatidylcholine(30:2)	740.463
Phosphatidylethanolamine(36:4)	740.522
Phosphatidylglycerol(32:0)	799.428
Phosphatidylglycerol(36:1)	799.546
Phosphatidylglycerol(38:4)	799.548
Phosphatidylglycerol(34:1)	809.471
Phosphatidylglycerol(36:4)	809.474

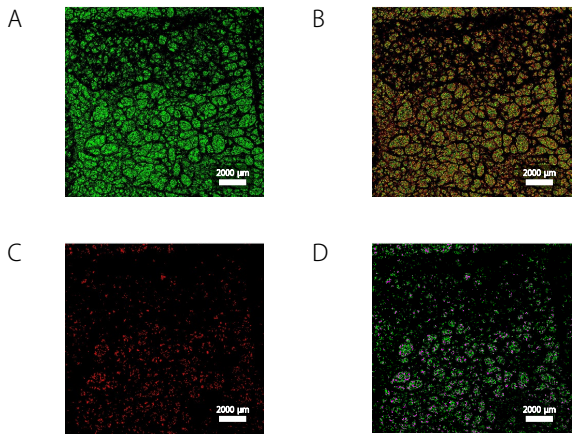

図4　ヒト肺組織に存在するとされる脂質クラス[1)]のMSイメージ
A：脂肪酸アシルカルニチン、B：ジアシルグリセロール、
C：ホスファチジルコリン、D：ホスファチジルエタノールアミン

オルガノイド内の脂質分布を詳細に解析した結果、細胞の代謝状態や膜の構成に関する理解が深まりました。さらに、肺胞の表面張力を下げて呼吸を支える重要な生体物質であるサーファクタントの産生に関しても、新たな可能性が示されました。

脂肪酸カルニチンは脂肪酸代謝が盛んな領域を示し、ジアシルグリセロールはリン脂質の代謝や細胞内シグナルが活発な部位を示していました。さらに、ホスファチジルコリンやホスファチジルエタノールアミンといった、肺サーファクタントや肺胞膜を構成する主要成分も明瞭に検出されています。これらの分布結果は、オルガノイドが構造面だけでなく分子レベルにおいても、ヒト肺組織に強く類似していることを示しています。

脂質種ごとにみると、

- 脂肪酸アシルカルニチン（図4A）：ミトコンドリアのβ酸化経路における中間代謝産物として知られており、代謝活性の高い領域、すなわち肺胞様構造に相当する部位に主に局在していました。
- ジアシルグリセロール（DAG, 図4B）：リン脂質の代謝および細胞内シグナル伝達に関与する脂質であり、アシルカルニチンと同様の領域に多く分布していました。
- ホスファチジルコリン（PC, 図4C）：肺サーファクタントの主要構成成分であり、肺胞II型細胞のマーカーとしても知られています。
- ホスファチジルエタノールアミン（PE, 図4D）：肺胞上皮細胞の膜に豊富に存在する脂質で、PCとともに、オルガノイド全体に広く分布していることが確認されました。

これらの結果は、MSIによって得られる空間的な分子情報が、オルガノイドの機能的な成熟度や組織類似性の評価に有効であることを示しています。

さらに、イオン化効率と空間分解能を高めることでMSI条件を最適化し、細胞レベルでの脂質分布を取得しました。具体的には、iMLayer AEROを用いたDHBマトリックスの塗布量を増やし、結晶化の均一性とシグナルの安定性を改善しました。また、取得パラメータ（表3）を調整し、レーザー照射回数と繰り返し周波数を増やすことでイオン生成量を向上させました。さらにレーザー径を小さくすることで、細胞境界をより鮮明に描出することが可能となりました。これらの工夫により、従来のオルガノイド全体のマッピングから、三次元構造内での細胞レベルの解析を行うことができました。

表３　高解像度MSIの分析条件

質量分析	
装置名	: iMScope QT
DL温度	: 250 ℃
ヒートブロック温度	: 450 ℃
検出器電圧*	: 2.68 + 0.02 kV
測定ピッチ	: 10 µm
極性	: Positive
質量範囲	: *m/z*500-900
レーザー照射回数	: 500回
レーザー繰り返し周波数	: 2 [kHz]
レーザー照射径設定値	: 1
レーザー強度	: 71

*：参考値
最適な検出器電圧は、検出器の劣化具合とサンプルのイオン化のしやすさにより異なります。検出器電圧の設定によっては検出器の劣化を早める可能性があります。
詳しくは取扱説明書をご参照ください。

一例として、脂肪酸カルニチン(26:4)とジアシルグリセロール(34:2)のオルガノイド断上でのMSイメージを示します（図5）。

脂肪酸カルニチン(26:4)（図5A）は、個々の肺胞様細胞を思わせる丸みを帯びた分布を示し、ミトコンドリアやペルオキシソームでの脂質代謝に関わる役割と一致していました。一方、ジアシルグリセロール(34:2)（図5B）は、細胞構造を取り囲む網目状の連続パターンを示し、膜リモデリングの中間体としての役割やシグナル伝達のセカンドメッセンジャーとしての機能を反映していました。

これらの相補的な分布パターンは、脂肪酸カルニチンが代謝の活発な細胞を可視化する一方で、ジアシルグリセロールは肺を模倣したオルガノイド内の膜関連プロセスや細胞間相互作用を広く示していることを示唆しています。

A

B

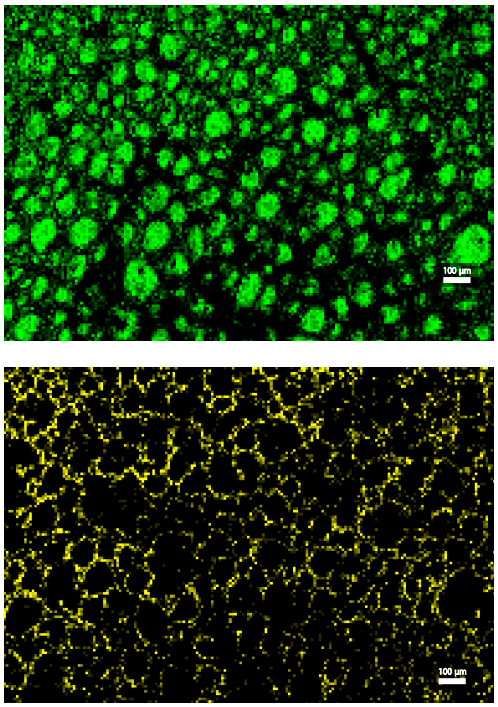

図５　オルガノイド内の細胞におけるMSイメージ
A：脂肪酸カルニチン(26:4)、B：ジアシルグリセロール(34:2)

■まとめ

本研究では、試料前処理から画像取得、データ解析までを一貫して行えるMSI・トータルソリューションを、ヒト人口多能性幹細胞由来肺オルガノイドの分子プロファイリングに活用できることを示しました。

従来のような組織染色を行わなくても、 MSI・トータルソリューションを用いることで、生体内分子の空間分布をありのままの状態で高解像度・三次元的に可視化することが可能となります。特に本手法は、脂質の空間的分布を解析することで、オルガノイド内の分化状態や代謝活性を把握する強力なツールとして機能します。

さらに、患者由来組織に対する詳細な分子イメージングを通じて、今後の個別化医療への応用に向けた重要な基盤となることが期待されます。

＜謝辞＞
本研究に用いられたオルガノイド試料は、Nangynag工大学Lee Kong Chian医学院のYen Choo教授のグループにご提供いただきました。また、ゼラチン包埋および凍結切片作製は、シンガポール国立大学の組織学コア施設の協力のもと行われました。

＜参考文献＞

1)　A systematic survey of lipids across mouse tissues
Mohit Jain, Soeun Ngoy, Sunil A. Sheth, Raymond A. Swanson, Eugene P. Rhee, Ronglih Liao, Clary B. Clish, Vamsi K. Mootha, and Roland Nilsson
American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism 2014 306:8, E854-E868

iMLayer、iMScope QT、およびIMAGEREVEAL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/　04-EC-2519-JP　初版発行：2025年 9月

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・体外診断用医薬品ではありません。本文書に記載されている分析手法を、疾病の診断、治療、予防の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。

© Shimadzu Corporation, 2025

アンケート

関連製品 一部の製品は新しいモデルにアップデートされている場合があります。

iMScope™ QT

iMLayer
マトリックス蒸着装置

IMAGEREVEAL™ MS
MSイメージングデータ解析ソフトウェア

関連分野

ライフサイエンス

in vitro イメージング（組織などの標本)

価格お問い合わせ

製品お問い合わせ

技術お問い合わせ

その他お問い合わせ