118　リアルタイム質量分析を用いたADの新規マーカー探索	林　由美

【目的】糖類やアミノ酸、有機酸等の内因性代謝物（メタボライト）の網羅的解析手法であるメタボローム解析は、疾患のバイオマーカー探索等、生命科学分野において広く応用されている。しかし、解剖によるサンプリングは必然的に「死」を伴うことから、メタボローム・プロファイルに影響を与える事が問題となっている。また、メタボロームは動的に変化しているため、解剖による定点観測で捉えたプロファイルが、どの程度、病態と真に相関しているのかは定かではない。さらに、前処理操作中に化学的な分解等が生じ、結果に「バイアス」が生じる可能性も示唆されている。

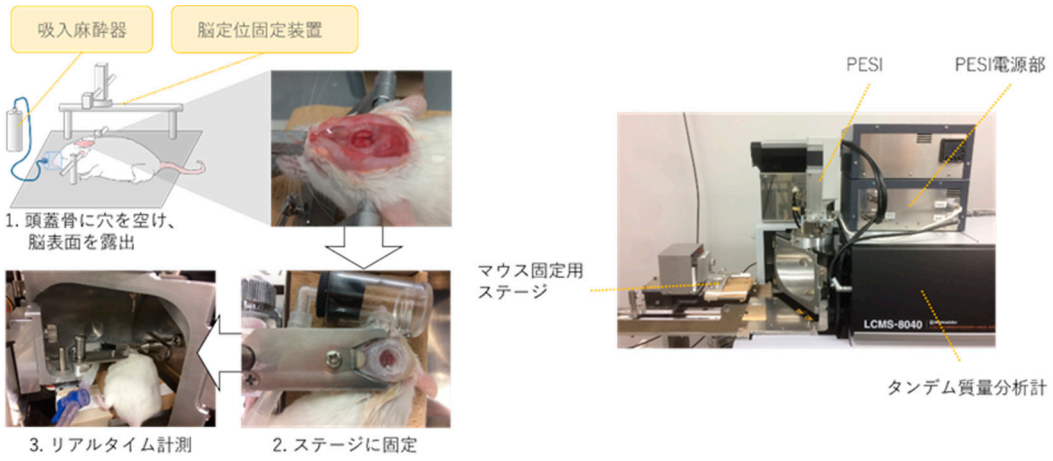
一方、近年、脳疾患や認知症へのメタボローム解析の応用は著しく、特定のメタボライトをバイオマーカーとした病態レベルや病態進行程度の予測が模索されている。しかし、アルツハイマー病において、有効な「病態進行の予測法」が確立されていないのが現状である。

そこで、本研究では、新規イオン化法である探針エレクトロスプレーイオン化法／タンデム質量分析（PESI／MS／MS）を用いて、マウス脳内のリアルタイム・メタボローム解析法の構築を試みる。さらに、アルツハイマー病モデルマウスのメタボローム・プロファイルをリアルタイムで観測し、病態進展が予測可能な新たなバイオマーカーを探索する事を目的とする。

【方法】PESI では、イオン化促進のため有機溶媒の供給が必要となるが、有機溶媒交換の有無におけるイオン化の影響について検討するため、解剖により採取した臓器を用いて 30 分間分析を行い、メタボライトの検出強度を比較した。また、本手法を生きたマウスの脳に適用することを試みた。麻酔下のマウスの脳を露出させ、有機溶媒供給用の特殊サンプルカップを固定した後、PESI 用ステージに固定した。ヘパリンを添加した 50%エタノール溶液を特殊サンプルカップに添加し、PESI／MS／MS にてリアルタイム・メタボローム解析を行った。対象化合物は、エネルギー代謝関連物質を中心とした。さらに、構築したメタボローム解析法を用いて、アルツハイマー病モデルマウスへの適用を試みた。

【結果】解剖により採取した臓器を用いて 30 分間の分析を行ったところ、有機溶媒を交換しない場合は、メタボライトの検出強度に大きな変動が認められたのに対し、有機溶媒の交換を行った場合では、30 分間で大きな変動は認められなかった。従って、有機溶媒を交換することで、長時間でも安定的に分析を行うことが可能であると考えられた。また、本手法を用いることで、生きているマウスの脳内リアルタイム・メタボローム解析を最大で 3 時間行うことに成功した。さらに、各メタボライトの微細な変動を捕捉することも可能であり、生きているマウスの脳内メタボロームのリアルタイムな変動を観察することが可能であることが示された。そこで、現在、本手法をアルツハイマー病モデルマウスに適用し、各月齢におけるメタボロームをモニタリングすることで、病態進展が予測可能な新たなバイオマーカーの探索を行っている。

脳内メタボロームのリアルタイム分析のフローとシステム概略図



118. リアルタイム質量分析を用いたADの新規マーカー探索

林　由美

名古屋大学 大学院医学系研究科 医療技術学専攻 病態解析学講座

Key words：質量分析，リアルタイム分析，アルツハイマー，メタボローム解析

緒　言

糖類やアミノ酸、有機酸等の内因性代謝物（メタボライト）の網羅的解析手法であるメタボローム解析は、疾患のバイオマーカー探索等、生命科学分野において広く応用されている。一般に、メタボローム解析をモデルマウス等に適用する場合、解剖により採取した生体試料から、メタボライトの抽出等の前処理操作を行った後、質量分析計を用いて解析を行う。しかし、解剖によるサンプリングは必然的に「死」を伴うことから、死がメタボローム・プロファイルに強く影響を与える事が問題となってきている。また、メタボロームは動的に変化しているため、解剖による定点観測で捉えたプロファイルが、どの程度、病態と真に相関しているのかは定かではない。さらに、分析に必要な前処理操作中に化学的な分解等が生じ、結果に「バイアス」が生じる可能性も示唆されている。

したがって、生体内でのメタボロームの変動をより正確に把握するためには、前処理操作が不要で、かつ、生きたままモニタリングを行う手法の構築が不可欠である。そこで我々は、新たなメタボローム解析のアプローチとして、新規分析法である「探針エレクトロスプレーイオン化タンデム質量分析（PESI／MS／MS）」を用いたメタボライトの直接分析法の開発に成功した。本手法は、極微細針を用いてサンプリングとイオン化を同時に行い、前処理を行うことなく、メタボローム解析を可能とする画期的な手法である。これまでに我々は、PESI／MS／MS を用いる事で、肝臓内のメタボライトを直接分析する事に世界で初めて成功している。さらに本手法を生きたマウスの肝臓に適用し、TCA 回路構成成分のリアルタイム・モニタリングにも成功し、Analytical Chemistry に成果を公表した［1］。また、一般的に、脳試料は脂質成分が豊富に含まれており、これらが分析時の妨害物質となることから、前処理操作が不可欠であると考えられている。そこで、我々は本手法を脳試料に適用したところ、脳内のメタボローム・プロファイルを直接観察することに成功し、本研究成果を Analytica Chimica Acta に公表している［2］。

一方、近年、脳疾患や認知症へのメタボローム解析の応用は著しく、特定のメタボライトをバイオマーカーとした病態レベルや病態進行程度の予測が模索されている。その中でも特に、アルツハイマー病は日本や米国における患者数が 1600 万人を超えるといわれているが、現状では有効な「病態進行の予測法」が確立されていない。近年アルツハイマー病の良好なモデルマウスの入手が可能となり、それらを用いた脳試料のメタボローム解析が進展しているが、前述の通り、解剖によるサンプリングでは、「死」の影響が極めて大きく、さらに、前処理操作による結果のバイアスを排除することは不可能である。

そこで、本研究では、PESI／MS／MS を適用し、脳におけるリアルタイム・メタボローム解析法の構築を試みる。さらに、アルツハイマー病モデルマウスの脳内メタボローム・プロファイルをリアルタイムで観測し、アルツハイマー病の病態進展が予測可能な新たなバイオマーカーを探索する事を目的とする。

方法および結果

1. 探針エレクトロスプレーイオン化タンデム質量分析（PESI／MS／MS）を用いたマウス脳内のリアルタイム・メタボローム解析法の構築

新規イオン化法である PESI とタンデム質量分析（MS／MS）を組み合わせた PESI／MS／MS を用いて、マウス脳内のリアルタイム・メタボローム解析法の開発を行った。PESI は超微細針（先端直径約 700 nm）が上下に駆動することで、サンプリングとイオン化を同時に行う。そのため、低侵襲的にかつ連続的なサンプリングが可能となることから、我々は、これまでに PESI／MS／MS を用いたマウス肝臓および脳内のメタボローム解析手法の構築を行った［1，2］。

PESI では、イオン化促進のため有機溶媒の供給が必要となる。しかし、有機溶媒が臓器に直接接触することで、臓器が損傷する恐れがあるため、二重構造の特殊サンプルカップを作製した。これを生体用接着剤で固定することで、臓器に接触することなく、有機溶媒の供給が可能となる。一方で、長時間の分析では、有機溶媒が蒸発することによりイオン化に影響を与える可能性が考えられる。そこで、有機溶媒蒸発による影響について検討した。解剖により採取した試料に、上述の特殊サンプルカップを固定し、30 分間分析を行った。10 分間毎の平均検出強度を図 1 に示した。一部の化合物において、分析開始 20 分でわずかな変動が認められ、30 分ではさらに大きな変動が確認された（図 1 左）。そこで、2 分毎に有機溶媒の交換を行ったところ、大きな変動は認められなかった（図 1 右）。従って、長時間の分析を実施する際は、有機溶媒は 2 分毎に交換することで、安定的に分析が可能であることが示された。

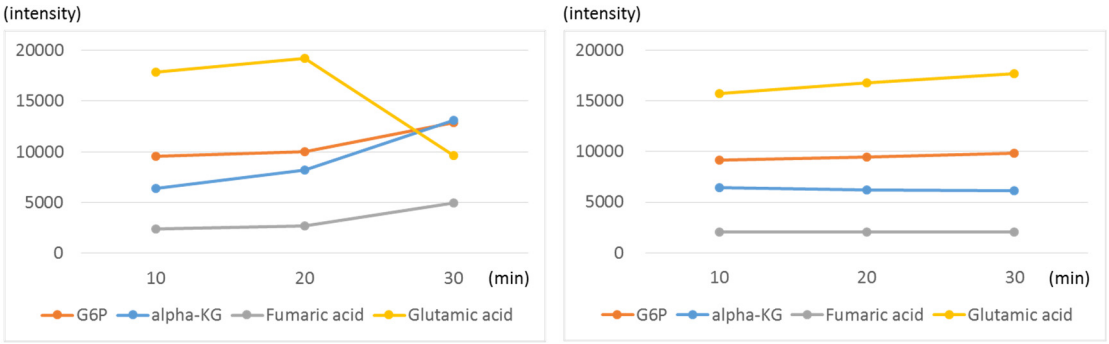


図 1. 有機溶媒交換による検出強度の比較

（左）有機溶媒交換なし、（右）有機溶媒 2 分毎に交換

2. 生きているマウスの脳内リアルタイム・メタボローム解析

図 2 に示すように、麻酔下のマウスを脳定位固定装置に固定し、頭部の皮膚を切開した。歯科用ドリルを用いて頭蓋骨に直径約 4 mm の穴を開け、27 G の針で髄膜を剥離した。有機溶媒供給用の特殊サンプルカップを頭蓋骨に固定した後、PESI 用ステージに固定した。血液凝固を抑制するため、ヘパリンを添加した 50%エタノール溶液を特殊サンプルカップに添加した。

針の駆動周期は 0.05 Hz に設定し、20 秒毎にデータ採取を行った。その結果、マウス脳内のメタボロームをリアルタイムでモニタリングすることが可能であり、最大で 3 時間のモニタリングを達成した。分析終了後のマウスの脳を確認したところ、浮腫等も見られず、低侵襲的なサンプリングが可能であることが示された［3］。

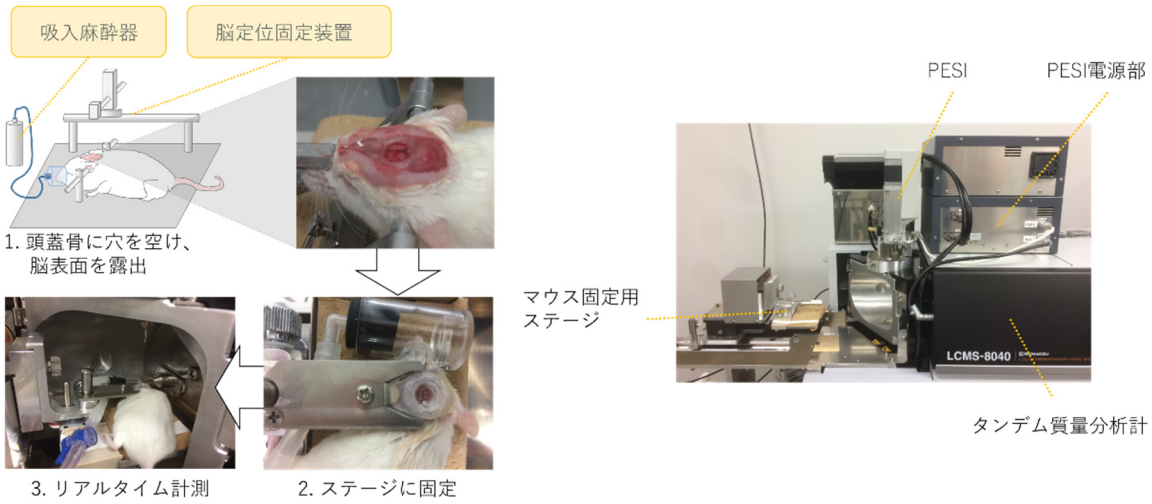


図 2. 脳内メタボロームのリアルタイム分析のフロー（左図）とシステム概略図（右図）

実際に、生きているマウスの脳内メタボロームのリアルタイム分析を行った例を図 3 に示す。ここではエネルギー代謝関連物質を中心にリアルタイム分析を行ったが、各メタボライトの微細な変動を捕捉することが可能であった。よって、本システムを用いることで、生きているマウスの脳内メタボロームのリアルタイムな変動を観察することが可能であることが示された。

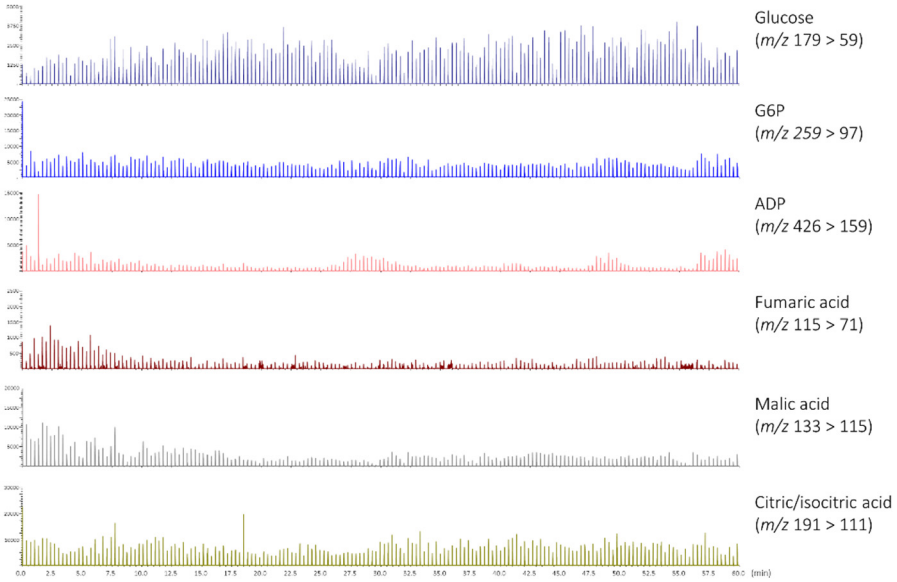


図 3. 生きているマウスの脳内メタボローム解析結果

3. アルツハイマー病モデルマウスへの適用

これまでにいくつかのアルツハイマー病モデルマウスが作製されているが、主に使用されているマウスは、アミロイド前駆体タンパク質（APP）を過剰発現させる手法が用いられている。しかし、これらのモデルマウスでは、脳内アミロイドの蓄積状態がアルツハイマー病患者と大きく異なることから、ヒトのアルツハイマー病のモデルとしては改良の余地があると考えられていた。理化学研究所は、この問題点を解決し、よりヒト患者に近い病理を再現したモデルマウスの作製に成功した。そこで、本研究では、理化学研究所よりモデルマウスを入手した。このモデルマウスでは、6 ヶ月齢からアミロイド斑の形成が認められる。現在、これらのモデルマウスの各月齢において、脳内のリアルタイム・メタボローム解析を進めている。対象成分は、これまでに PESI／MS／MS で分析を行ったメタボライト（表 1）に加え、アルツハイマー病モデルラットの脳内において変動が報告されている神経伝達物質［4］の解析を進めている（表 2）。

表 1. 対象化合物の SRM transition および CE

	transition			CE
2-aminobutyric acid	104	>	58	35
3-hydroxybutyric acid	103	>	59	35
ADP	426	>	159	30
aspartic acid	132	>	88	20
citric acid/isocitric acid	191	>	111	20
fumaric acid	115	>	71	15
GABA	104	>	45	20
glucose	179	>	59	20
glucose-6-phosphate	259	>	97	20
glutamic acid	146	>	102	20
glutamine	147	>	84	20
glutaric acid	131	>	87	20
glycine	74	>	74	20
histidine	154	>	93	20

	transition			CE
lactic acid	89	>	43	20
leucine/isoleucine	132	>	86	20
maric acid	133	>	115	20
methionine	148	>	47	20
N-acetyl-L-aspartate	174	>	88	20
phenylalanine	164	>	147	20
pyrvic acid	87	>	43	20
serine	104	>	74	20
succinic acid	117	>	73	20
threonine	118	>	74	20
tryptophan	203	>	116	20
uracil	111	>	42	20
α-ketoglutaric acid	145	>	101	10

表 2. アルツハイマー病で変動が予測される化合物

acetylcholine	GABA	serotonin	5-hydroxyindolacetic acid
dopamine	norepinephirine	tyrosine	

考　察

PESI／MS／MS は、低侵襲的、かつ連続的なサンプリングが可能であることから、生きたままのマウス脳内のリアルタイム・メタボローム解析に有用な手法である事が示された。これまでの脳内メタボローム解析では、解剖による「死」の影響を除外することが困難であったが、本手法を適用することで、様々な疾患の新たなバイオマーカーを探索することが期待される。本研究では、ヒト患者により近い病理を再現した次世代型アルツハイマー病モデルマウスを入手したことから、今後、これらのマウスの各月齢のメタボローム分析を行うことで、アルツハイマー病の病態進展が予測可能なバイオマーカーを探索する。

共同研究者・謝辞

本研究の遂行に際し、ご支援賜りました上原記念生命科学財団に感謝申し上げます。

文　献

1） Zaitsu K, Hayashi Y, Murata T, Ohara T, Nakagiri K, Kusano M, Nakajima H, Nakajima T, Ishikawa T, Tsuchihashi H, Ishii A. Intact Endogenous Metabolite Analysis of Mice Liver by Probe Electrospray Ionization/Triple Quadrupole Tandem Mass Spectrometry and Its Preliminary Application to in Vivo Real-Time Analysis. Anal Chem. 2016 Apr 5;88(7):3556-61. doi: 10.1021/acs.analchem.5b04046.

2） Hayashi Y, Zaitsu K, Murata T, Ohara T, Moreau S5, Kusano M, Tanihata H, Tsuchihashi H, Ishii A, Ishikawa T. Intact metabolite profiling of mouse brain by probe electrospray ionization/triple quadrupole tandem mass spectrometry (PESI／MS／MS) and its potential use for local distribution analysis of the brain. Anal Chim Acta. 2017 Aug 29;983:160-165. doi: 10.1016/j.aca.2017.06.047.

3） Zaitsu K, Hayashi Y, Murata T, Yokota K, Ohara T, Kusano M, Tsuchihashi H, Ishikawa T, Ishii A, Ogata K, Tanihata H. In Vivo Real-Time Monitoring System Using Probe Electrospray Ionization/Tandem Mass Spectrometry for Metabolites in Mouse Brain. Anal Chem. 2018 Apr 3;90(7):4695-4701. doi: 10.1021/acs.analchem.7b05291.

4) Xu H, Wang Z, Zhu L, Sui Z, Bi W, Liu R, Bi K, Li Q. Targeted Neurotransmitters Profiling Identifies Metabolic Signatures in Rat Brain by LC-MS/MS: Application in Insomnia, Depression and Alzheimer's Disease. Molecules. 2018 Sep 17;23(9). pii: E2375. doi: 10.3390/molecules23092375.