

平成 30 年 4 月 13 日

## 世界初！生きているマウスの脳から、直接、内因性代謝物（メタボライト）をリアルタイムに計測する手法の開発に成功！ —恒常性を”可視化する”新技術—

名古屋大学大学院医学系研究科（研究科長：門松健治）・高等研究院（院長：篠原久典）の財津 桂准教授、林 由美 講師および株式会社島津製作所らの研究グループは、超微細針（鍼灸針）を用いて、化合物を「イオン」に変化させるための新たな手法である「探針エレクトロスプレーイオン化法（PESI）<sup>※1</sup>」と「タンデム質量分析（MS/MS）<sup>※2</sup>」を組み合わせた新規質量分析法「PESI/MS/MS<sup>※3</sup>」を用いて、生きているマウスの脳内から、直接、内因性代謝物（メタボライト<sup>※4</sup>）をリアルタイムに計測する手法の開発に成功しました。

近年、アミノ酸や有機酸、脂肪酸、糖類などの内因性代謝物（メタボライト）を網羅的に解析する手法である「メタボローム解析<sup>※5</sup>」は、生命科学分野において広く活用されています。これまでに研究チームは、2016年にPESI/MS/MSによる肝臓内メタボライトの直接分析法を開発し、さらに2017年には、解剖で採取したマウスの脳試料から、メタボライトを直接検出する手法へ拡張することにも成功しています。

このたび研究チームは、本手法を「生きているマウスの脳」へ拡張し、生きているマウスの脳内から、直接、メタボライトをリアルタイムで計測する手法の開発を試みました。PESI/MS/MSで用いる探針は、先端直径が約700nmの超微細針であり、身体への負担が極めて低い状態で（低侵襲的に）サンプリングを行うことが可能です。そこで、研究チームは、マウスの固定・保持と脳内のサンプリング部位を精密にコントロールすることが可能な「3次元的に可動するマウスの固定台」を島津製作所と新たに開発し、生きているマウスの脳からメタボライトの変動を、最大で3時間、リアルタイムで計測することに成功しました。さらに、本手法を用いて、エネルギー代謝を抑制する薬剤を投与したマウスの脳内を計測した結果、本手法の有効性を実証しました。

本手法の確立は、近年、高い注目を浴びている「リアルタイム・メタボローム解析」の一翼を担う新たな手法として期待されるだけでなく、アルツハイマー病などの脳疾患や認知症等の病態解析、また、恒常性を”可視化”するための新たな手法として、幅広い分野に応用されることが強く期待されます。

なお、本研究成果は、名古屋大学研究大学強化促進事業若手新分野創成研究ユニット（「in vivoリアルタイム・オミクス研究室」代表研究者：財津 桂）と島津製作所との共同研究に基づくものであり、2018年3月19日付で米国科学雑誌「Analytical Chemistry」オンライン版に掲載されました。

# 世界初！生きているマウスの脳から、直接、内因性代謝物（メタボライト）をリアルタイムに計測する手法の開発に成功！ —恒常性を”可視化する”新技術—

## ポイント

- 超微細針（鍼灸針）を用いた「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）」を応用し、生きているマウスの脳から、直接、内因性代謝物（メタボライト）のリアルタイム計測に世界で初めて成功した。
- マウスの固定と脳内のサンプリング部位をコントロールすることが可能な「可動型ステージ」を新たに開発したことで、生きているマウスの脳内メタボライトの変化を、最大3時間、リアルタイム・モニタリングすることに成功した。
- エネルギー代謝抑制マウスを用いて本手法を検証した結果、エネルギーの産生に関連するメタボライトが、お互いに連動して変化する現象を捉えることにも成功し、今後、恒常性維持機能を評価するための新たな手法として、また、アルツハイマー病などの脳疾患等の病態解析への応用が期待される。

## 1. 背景

近年、アミノ酸や有機酸、脂肪酸、糖類などの内因性代謝物（メタボライト）を網羅的に解析する手法である「メタボローム解析」は、生命科学分野において広く活用されています。特に、近年、アルツハイマー病などの疾患や認知症など、脳の病態解明にメタボローム解析を応用する研究例が多数報告されています。一般的に、病態モデルマウス等の脳内メタボローム解析を行う際には、解剖によって採取した脳試料について分析を行います（図1）、メタボライトは「恒常性」によって常に変動しているため、生体内でのメタボライトの動きを正確に捉えようとすると、経時的に解剖を行い、かつ、観測点（サンプリング・ポイント）を多くする必要があります。しかし、実際には、解剖によってサンプリング・ポイントを多くすること、つまり、解剖の時間間隔を短くすることには物理的な限界があることや、多数の動物を解剖しなければならないといった問題点が生じます。それ以上に、解剖には生体の「死」を伴うことから、解剖で採取した脳試料のメタボローム解析の結果は、生きている時のメタボライトの変動とは、かけ離れたものである可能性も指摘されています。そこで、本研究では、生きているマウスの脳から、直接、メタボライトの変動を観察することができる「リアルタイム計測手法」の開発を試みました。

## 2. 研究成果

本研究では、超微細針（鍼灸針）を用いた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（PESI）」と「タンデム質量分析（MS/MS）」を組み合わせた新規質量分析法「PESI/MS/MS」を用いて、生きているマウスの脳内メタボライトをリアルタイムで計測する手法の開発を試みました。PESI/MS/MSは、先端直径が約700nmの鍼灸針を用いることで、身体への負担が極めて低い状態で（低侵襲的に）サンプリングを行うことが可能な手法であり、これまでに研究チームでは、麻酔下で、生きているマウスの肝臓内メタボライトをリアルタイムで計測することに成功していません。しかし、この時には、マウスを固定・保持する仕組みや、サンプリング部位をコントロールする仕組みがなかったため、リアルタイムでモニタリングできる時間が数分程度であり、より長時間のリアルタイム・モニタリング達成するためには、マウスの固定と保持が可能で、かつ、サンプリ

ング部位をコントロールできる仕組みの開発が不可欠でした。そこで研究チームは、新たに図 2 に示すような、マウスの固定・保持が可能となり、かつ、サンプリング部位をコントロールできる「可動型ステージ」と PESI/MS/MS を組み合わせた「リアルタイム計測システム」を開発しました。

特に、新たに開発した「可動型ステージ」(図 3) には、マウスを固定・保持する仕組みが搭載されており、かつ、ステージを X、Y、Z 軸方向に、3  $\mu\text{m}$  程度の精度で可動コントロールすることが出来るため、サンプリング部位を精密にコントロールすることが可能となりました。また、PESI/MS/MS による分析では、対象成分がイオンに変化するのを促進するため、探針の先端に有機溶媒水溶液 (50%エタノール) を供給する必要がありますが、エタノールがマウスの脳表面に接触すると、脳に損傷等を来す恐れがあります。そこで、研究チームが開発した「50%エタノールを針先に供給するための特殊な小型容器 (特許出願中)」をマウスの頭部に設置することで、エタノールを脳に接触させることなく、探針の先端にエタノールを供給することが可能となりました。今回開発した可動型ステージには、この特殊カップを固定する仕組みも搭載されており、リアルタイム計測を達成するための一つの要因となっています。さらに、ステージ上には、ゴム製ヒーターが設置されており、麻酔によるマウスの低体温を防ぐことも可能です。最終的に、この可動型ステージを PESI/MS/MS のフロント部に結合することで、「脳内メタボライトのリアルタイム計測システム」を構築しました (図 1)。

本システムを用いて、生きているマウスの脳内メタボライトのリアルタイム計測を行ったところ、8 種類のメタボライト (グルタミン酸、グルコース、クエン酸・イソクエン酸、 $\alpha$ -ケトグルタル酸、コハク酸、フマル酸、リンゴ酸、ADP) を、最大で 3 時間、リアルタイムで計測することに成功しました (図 4)。また、計測後にマウスの脳表面を観察したところ、特に目立った損傷等は見られなかったことから、本手法が低侵襲的に、かつ、安定的に、同一部位からのサンプリングを達成していることが示されました。

また、ここでは、大脳において TCA 回路<sup>※6</sup>を抑制することが知られている薬剤を、測定開始 3 分後にマウスに投与し、エネルギー代謝関連成分の変動を観察しました。その結果、図 4 に示すように、解糖系<sup>※6</sup>の反応が活発に進み、それに連動して、TCA 回路の構成成分が変動する様子が観察されました (図 3 の黄色部分)。一方、対照溶媒を投与したマウスでは、このようなメタボライトの変動が認められなかったことから、本手法がエネルギー産生に関連するメタボライトが、お互いに連動して変化する現象を捉えることに成功したものと考えられます。

以上の結果、新たに開発した本手法は、生きているマウスの脳内メタボライトのダイナミクスを、リアルタイムに捉えることが可能であることが示されました。

### 3. 今後の展開

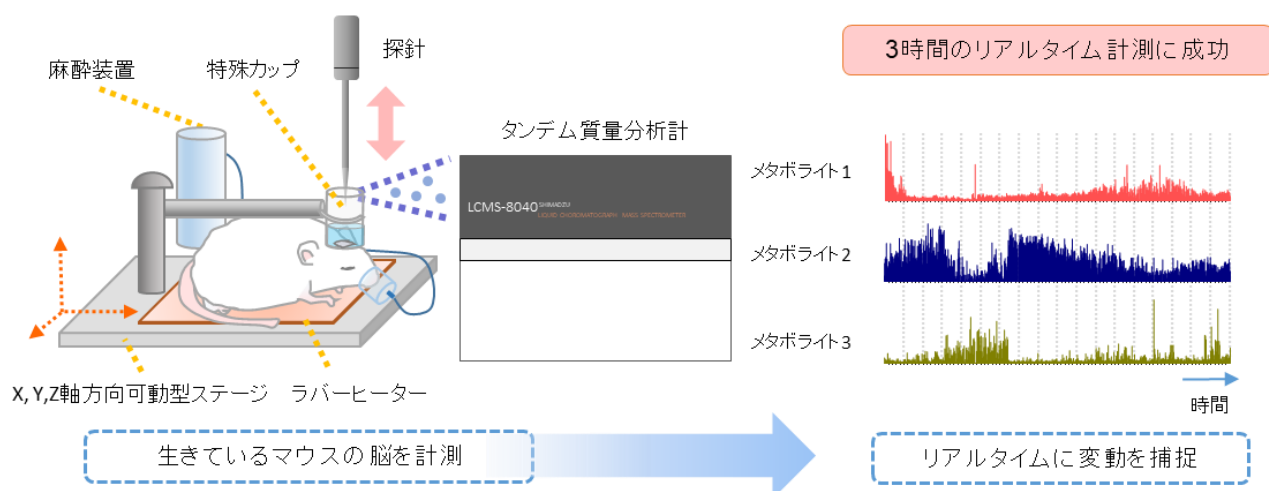
本手法は、生きているマウスの脳から、直接、メタボライトをリアルタイムで計測することを可能にした手法であり、近年、高い注目を浴びている「リアルタイム・メタボローム解析」の一翼を担う新たな手法として、応用展開が期待されます。特に本手法は、アルツハイマー病などの脳疾患や、認知症などの病態解析に応用展開されることが強く期待されます。さらに、メタボライトの動的変化、すなわち、恒常性を”可視化”する技術としても応用展開が可能です。特に、恒常性維持機能の破綻によって生じると考えられる「疲労」や、疾病に至る前段階の「未病」といった生体の状態を質的に評価することや、恒常性機能そのものの「品質」を評価することで、新たな健康リスク評価法の構築へ展開することを今後の目標としています。

## 解剖で採取した脳試料のメタボローム解析の流れと特徴



- 解剖に伴う「死」の影響を回避できない
- 解剖の時間間隔を短くするには物理的な限界があり、生体内のダイナミクスを把握することは不可能
- 恒常性の影響を加味した上で、結果を解釈する必要がある

## 新たに開発した脳内メタボライトのリアルタイム計測手法の流れと特徴



- 生きているマウスの脳内メタボライトのリアルタイムな変動を観察することが可能
- 「死」を伴わないので、生体内におけるメタボライトの真の挙動を把握できる
- 恒常性を「可視化」する手法として、健康リスク評価や脳疾患の病態解析へ応用が期待

図1 従来のメタボローム解析法と新たに開発したメタボライトのリアルタイム計測手法の流れと特徴

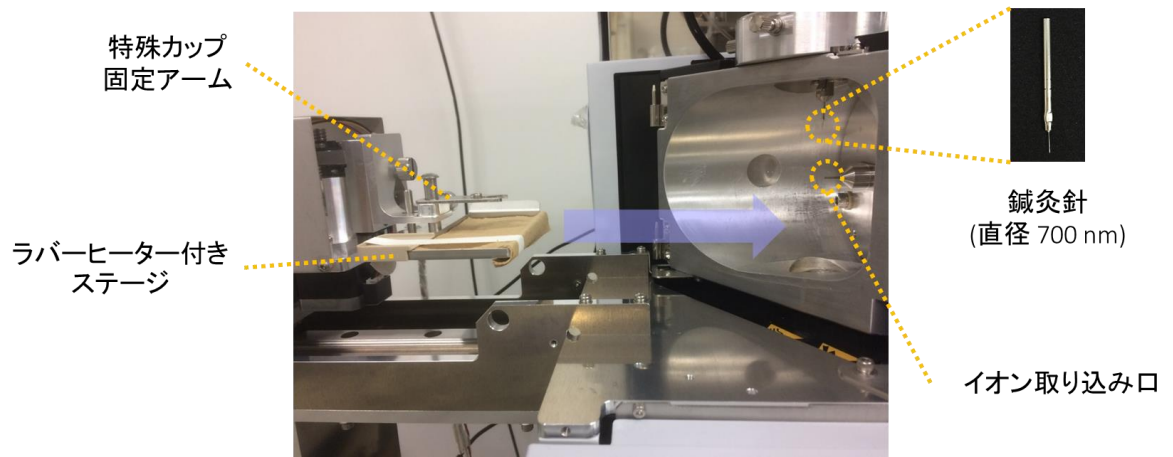


図 2 新しく開発したリアルタイム計測システムの概略図

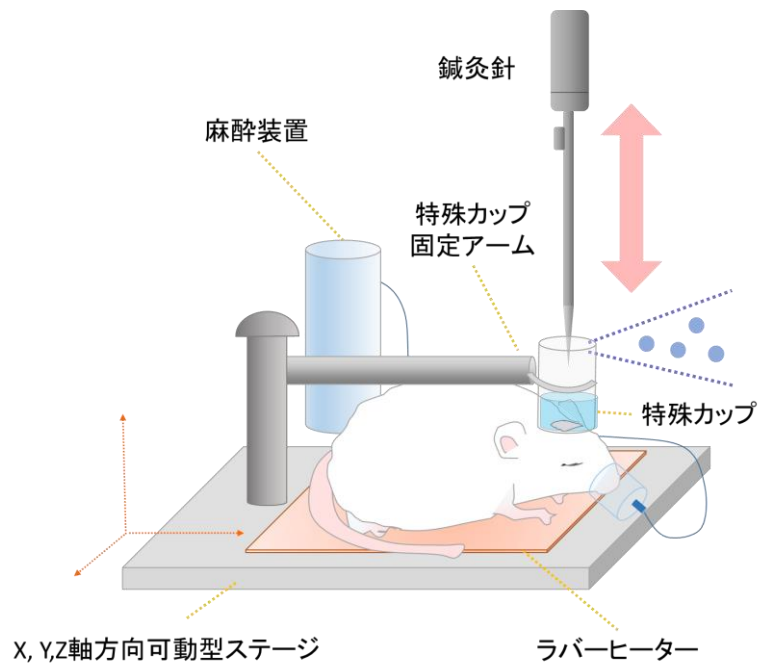


図 3 可動型ステージの概略図

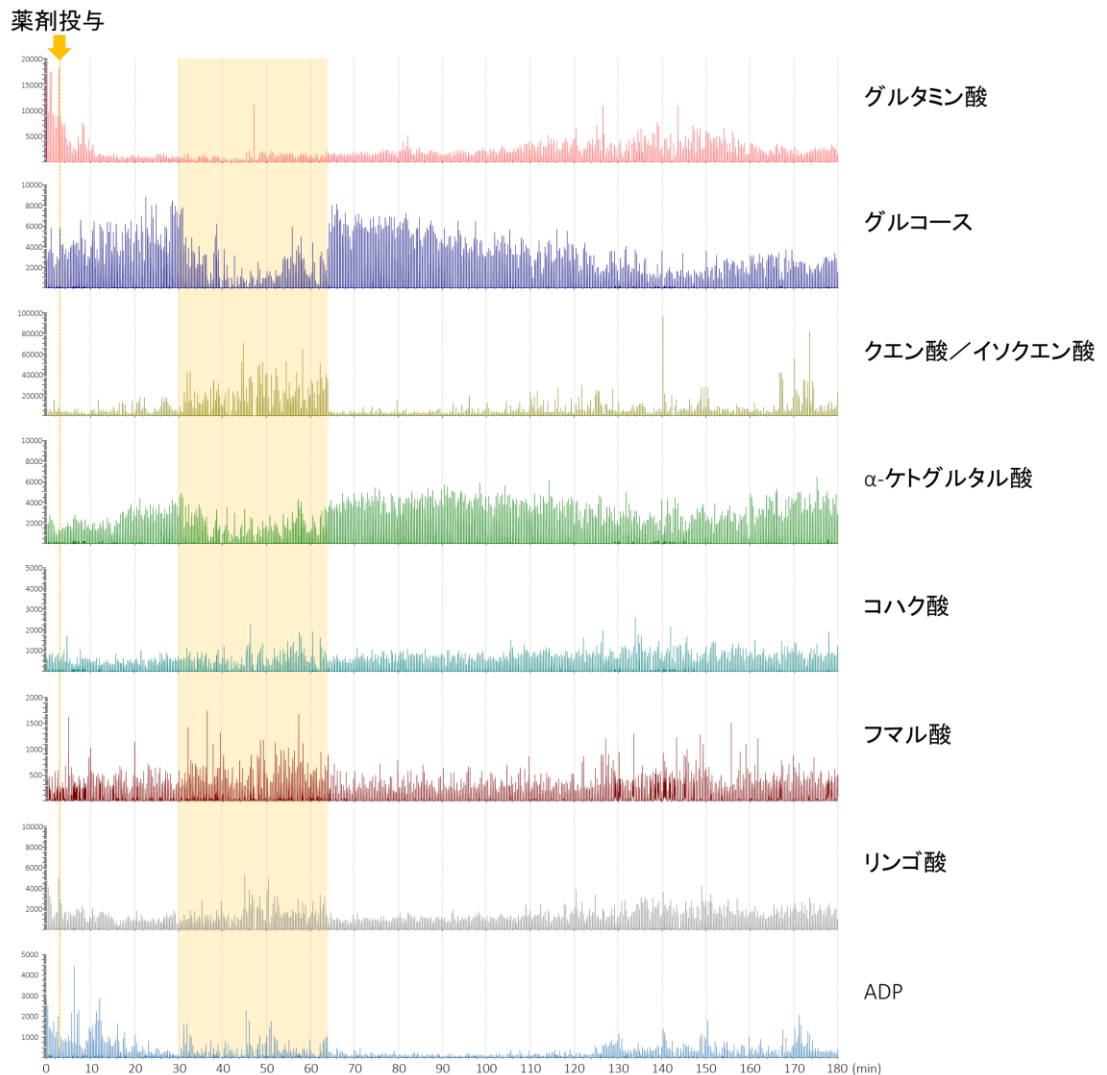


図 4 エネルギー代謝抑制マウスにおける脳内メタボライトのリアルタイム計測結果（測定時間：3時間）

#### 4. 用語説明

1. PESI：探針エレクトロスプレーイオン化法（Probe Electrospray Ionization）は、2007年に山梨大学の平岡賢三教授が開発した新規イオン化法であり、鍼灸針（先端直径 700 nm）を用いて試料の採取とイオン化を行うことが可能である。超微細針（鍼灸針）を使用することから、高い空間分解能を達成することが出来るため、本研究結果が示したように局所解析への応用が可能である。
2. タンデム質量分析（MS/MS）：対象成分をイオン化し、電場等と利用して対象成分を質量依存的に分離する分析法のうち、質量分離部に四重極型と呼ばれる質量分離装置を3つ直列に接続したものを指す。MS/MSにより二段階の質量分離が可能となるため、イオン化した対象成分の特異的な検出が可能である。
3. PESI/MS/MS：新規イオン化法である PESI と化合物の同定能力の高いタンデム質量分析（MS/MS）を組み合わせることで、前処理操作が不要かつ対象成分をそのままの状態（インタクト）で分析することが可能である。2016年に当研究グループが PESI/MS/MS を用いたメタボラ

イトの直接分析法を世界で初めて報告し、さらに生きたマウスの肝臓中メタボライトのリアルタイム・モニタリングにも成功している。

4. メタボライト：アミノ酸や有機酸、脂肪酸、糖類等の内因性代謝物を指す。各メタボライトは、機能的なネットワークを形成して相互作用することから、メタボライトを網羅的に解析する手法（メタボローム解析）の進展が著しく、バイオマーカーの探索や生体の機能解明に関わる研究等に応用されている。
5. メタボローム解析：多数のメタボライトの生体内での増減等を、網羅的に解析する手法を指す。生体試料からメタボライトの抽出や濃縮等の前処理を行った後、ガスクロマトグラフィー質量分析やガスクロマトグラフィータンデム質量分析、液体クロマトグラフィータンデム質量分析等を用いて解析を行うのが一般的である。
6. 解糖系・TCA 回路：エネルギーの産生に重要な役割を果たしている生化学反応経路である。エネルギーの元となるグルコースは、解糖系という経路で分解（代謝）されて最終的にピルビン酸となり、ピルビン酸はその後、TCA 回路で代謝されながらエネルギーが作られる。

## 5. 論文情報

雑誌名：Analytical Chemistry（2018年3月19日付の電子版）

論文名：“In vivo real-time monitoring system using probe electrospray ionization/tandem mass spectrometry (PESI/MS/MS) for metabolites in mouse brain”

著者：Kei Zaitu<sup>\*1, 2, †</sup>, Yumi Hayashi<sup>1, 3, †</sup>, Tasuku Murata<sup>4</sup>, Kazumi Yokota<sup>4</sup>, Tomomi Ohara<sup>1, 2</sup>, Maiko Kusano<sup>2</sup>, Hitoshi Tsuchihashi<sup>2</sup>, Tetsuya Ishikawa<sup>3</sup>, Akira Ishii<sup>2</sup>, Koretsugu Ogata<sup>4</sup>, Hiroshi Tanihata<sup>4</sup>

<sup>1</sup> In Vivo Real-time Omics Laboratory, Institute for Advanced Research, Nagoya University

<sup>2</sup> Department of Legal Medicine & Bioethics, Nagoya University Graduate School of Medicine

<sup>3</sup> Department of Radiological and Medical Laboratory Sciences, Nagoya University Graduate School of Medicine

<sup>4</sup> Shimadzu Corporation

DOI：[10.1021/acs.analchem.7b05291](https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b05291)

**English ver.**

[https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical\\_E/research/pdf/Alytical\\_C\\_20180413en.pdf](https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical_E/research/pdf/Alytical_C_20180413en.pdf)