

User interview 02

April 12th, 2018

東北大学
東北メディカル・メガバンク機構
三枝 大輔 講師

DIUTHAME という
新たな選択肢が生まれたことで、
今まであきらめていた分子を
検出できる可能性が出てきた。

質量分析計をはじめとする様々な分析機器を使いながら臨床検体に含まれるメタボロームの解析を行っている、三枝講師に研究における DIUTHAME のメリットや今後の展望をインタビューしました。

本日は貴重なお時間を割いていただき、ありがとうございます。
まずは、先生のご研究の内容を簡単にご説明いただけますか。

私は、臨床分析化学を専門としており、主に臨床検体に含まれるメタボロームの解析に、質量分析計をはじめとする様々な分析機器を使っています。特に、LCMSによる解析をメインで行っていますが、近年、組織切片上における代謝物の分布を可視化する新たな技術としてイメージング MS が開発されたこともあり、3 年ほど前から LCMS とイメージング MS を組み合わせた解析を実施しています。

分析対象は、分子量が 50~1000 程度の低分子メタボロームであり、研究目的によってターゲット分子をどのように検出するかという所から考え、LCMS による定量解析や組織切片の代謝物の分布解析方法を自分で構築したり、過去の手法を応用して解析しています。

質量分析においては、様々な質量分析計を使い分けて研究や解析をされているという事ですが、それらの解析における測定対象は具体的には何になるのでしょうか。

私が扱っている具体的な検体としては、動物の場合、液体成分では血液や尿、組織では脳、肝臓、腎臓、脾臓等多種に渡ります。ヒトの場合、血液、尿、脳脊髄液など液体成分に加え、肝組織などを扱っています。

これら検体測定において、私が現在取り組んでいる研究は 2 つあり、1 つはコホート研究で得られた血液や尿などの LCMS あるいは GCMS によるメタボローム解析です。もう 1 つは、癌をはじめとするさまざまな疾患検体に含まれるメタボローム解析であり、疾患予防バイオマーカーの開発や、リゾリン脂質を始めとする脂質メディエーター解析であり、こちらには LCMS やイメージング MS を使用して解析しています。

リゾリン脂質の解析に質量分析計を頻繁に使われているとの事ですが、それについてもう少し詳しく教えていただけますか。

リゾリン脂質は、脂質メディエーターとして生体内機能を有することから病気の発症に関連する可能性が示唆されている分子群で、分子種の数が多いことに加え、生体内濃度が微量の分子が多いことから、質量分析計による測定が好適と考えられています。我々は既に、LCMS による分析法を構築しており、疾患検体やモデル動物の解析に応用しています。

そんな中、最近もっとも注目していることは、癌患者さんから得られた組織検体の癌部と被癌部に含まれるリゾリン脂質の違いを解析することで、そのリゾリン脂質が癌を説明するバイオマーカーになるのか、あるいは癌治療の効果を説明するバイオマーカーになるのか、という疑問に対して答えを導き出すための解析です。

まだ少し先の話になりますが、これらの解析を突き詰めた先には、高い精度で「血液 1 滴から癌が分かるようになる」といった成果が見えてくると考えています。もちろん、リゾリン脂質の疾患マーカーとしての機能評価には、生物学的な解析が必要になりますが、質量分析計は様々な解析に応用可能な極めて重要な基盤技術であると考えています。



以前からイメージング質量分析をされていたとの事です、これまで苦労されていたことなどはありますか。

我々は、MALDI によるイメージング MS 解析を行ってまいりましたが、用いるマトリックス試薬由来のマススペクトルが多く検出されることから、標的にした分子由来のマススペクトルと重なることにより検出ができず、断念することがありました。

従って、イメージング MS 解析は、試料から得られたマススペクトルが、本当に測定対象に由来するものか、あるいはアーチファクトやマトリックス由来かを精査する必要がありますので、特に試料に含まれる未知の分子を対象とした測定を行った場合、解析が極めて煩雑になってしまう経験が多くあります。

DIUTHAME を知った時も、その様な苦勞をされていたのでしょうか。

はい、その通りです。試料から得られたマススペクトルがマトリックス由来のフラグメントイオンだったり、マトリックスと他の分子が結合した分子由来のマススペクトルだったり…。

そんなことを繰り返していた時に、参加した学会のポスター発表で、イメージング MS 解析においてマトリックス不要である新規技術として、「DIUTHAME」を知り、その場で急いで浜松ホトニクスを担当の方をご紹介頂き、声を掛けさせていただいたことを覚えています。やはり苦勞のもととなっていたマトリックスが要らない点が魅力的でした。

その後も継続的にご使用いただいている中で、今現在はどんな感触をお持ちでしょうか。

まずは DIUTHAME を用いた場合、MALDI のみによる測定で得られたマススペクトルと比較して、非常にバックグラウンドイオンが低く、今まで見えなかったイオン類がはっきり見えてきたという実感があります。

それに加えて私は MALDI の他に DESI (脱離エレクトロスプレーイオン化) をイオン化法に選択したイメージング MS 測定も行っているのですが、実際に測定していく中で、DESI に DIUTHAME が非常に向いていることが分かってきました。

三枝先生に「DESI でも試してみたい」とお声かけいただいた時のことはよく覚えています。当時の私達は、DIUTHAME の応用先を MALDI が用いられる分野だと決めつけていた所がありました。

そういった背景もあって先生には非常に新しい展開に気付かせてもらったという思いがあるのですが、改めて DESI に DIUTHAME を展開する利点や展望などをお聞かせいただけますか。

そもそも質量分析計を用いた場合の分析対象となる生体内代謝物は、室温条件下における分解あるいは分解産物の増加が懸念されています。その原因は酵素反応や分子の安定性の問題が示唆されていますが、これが起こってしまうと本来の生体内条件と異なった測定結果が得られていることになります。

MALDI の場合は、予め塗布したマトリックス中に代謝物を抽出してから分析しますので、一般的には DESI ほど測定中の温度条件の影響は考える必要がありません。

一方、DESI は室温条件下で測定するので、時間経過に応じて分解して分析対象化合物が無くなってしまふ点が欠点になっていました。この問題に対して、DIUTHAME はあらかじめ代謝物を抽出することになりますので、DESI 測定に向いていると考えられます。これは非常に画期的な技術で、今後 DESI を使うイメージング MS 解析では必須になるのではと思っています。

DESI においても作業面が簡便になるだけでなく、今まで見えなかったものが見えてくる可能性があるということです。

そうですね。DESI だけでなく、LDI においても時間的な制約や環境的な制約でこれまで分解して検出されなかったものが見えてくる可能性があります。

DIUTHAME を最初に見た時から、「DESI でも使えるぞ」という直観はあったのですか。

いいえ、DESI でも使えるかも知れないと感じたのは、浜松ホトニクス技術担当の方に実験の立ち会いをしてもらった際、MALDI 用の組織切片で DIUTHAME を接着した時です。DIUTHAME の毛細管現象を利用して「じゅわっ」とさせるのが重要だと、実際に自分の眼で確認して、「これは、DESI に使える！」と直感的に感じました。

また、私は組織切片に含まれる代謝物の分解に関する条件検討を行なった研究も行なっています。その成果を論文にした際、“ヒートスタビライザーによる加熱で酵素を失活させ、代謝物の分解を止める方法”を本文中で述べているのですが、動物から組織を採取し、さらに小さく切断してからヒートブロックに挟んで加熱し、その後に凍結切片を作成してイメージング MS 解析を行うという煩雑な実験操作になってしまうので、大変苦労していました。

DESI による解析の問題を常に考えて苦労していたからこそ、DIUTHAME のような革新的な技術にすごく敏感であり、「ピン」ときたっていうのはありますね。

MALDI イメージングと比較しても、DIUTHAME を使う意味はありそうですが、先生はどのようなお考えでしょうか。

MALDI と DIUTHAME は並列される技術だと感じています。すなわち、DIUTHAME は組織切片上の代謝物をイオン化する際に選択するマトリックスの一種といった感覚で捉えており、イメージング MS を用いる研究の前処理技術の選択肢のひとつになるのではないのでしょうか。

DIUTHAME という新たな選択肢が生まれたことで、今までイメージング MS による検出を諦めていた対象分子が検出できる可能性を検証できるようになったと思います。

さらに DIUTHAME は、MALDI の前処理に用いるマトリックスよりも扱いが簡単です。マトリックスを塗布する際は、スプレーで吹き付ける技術やスプレーと蒸着と組み合わせる技術を習得する必要があり、化合物の検出に最適なマトリックス条件を設定しなければならず、完全に習得するためには、2、3 年程度かかると思います。さらに、前処理に使用する器具由来の夾雑物の影響を除くため、器具を分解して丁寧に洗浄することやフッ素コーティングする場合もあり、MALDI イメージングには多くの経験が必要であると考えられます。

MALDI を補完するような役割も期待されますね。セッティングに関しても、ハードルはそれほど高くないという感触をお持ちですか。

はい、組織切片が滑らかに切れていれば、DIUTHAME を置くだけの簡単な作業ですし、組織に十分な厚みがあれば溶解させた時に、問題無く DIUTHAME と組織が吸着します。そして、そのままイメージング MS による解析が可能です。

もし組織切片の表面に凹凸のある検体に DIUTHAME を使用した場合でも、表面の段差が改善される可能性があるかもしれませんが、これは DIUTHAME の本質的な効果ではないですが、少し嬉しい副産物かもしれませんね。



※ 本インタビューには、同研究室学術研究員の齋藤様にもご同席いただきました。

今後、デバイスの機能面も絡めて期待する展開や応用はございますか。

イメージング MS 解析において重要な点は、空間分解能と検出感度です。DIUTHAME は、とても正確かつ小さな細孔を有しているため、空間分解能は問題ないので、検出感度を上げられる技術発展を期待しています。

私個人の研究対象分子としては、低分子領域の中でも、 m/z 500 以下で検出される代謝物や薬剤等を高感度に測定したいと考えています。恐らく測定条件の設定段階で工夫が必要になると思いますが、是非挑戦したいと思います。

今までのイメージング MS 解析で検出できなかった測定対象分子がまだ数多くありますので、その検出に再挑戦しつつ、先ずは幅広く観察し、何がどのくらいみえるのかを明らかにしていこうと思っています。

本日は、貴重なお時間をいただき、ありがとうございました。少しでも DIUTHAME をご期待に沿えるものにしていきたいと思っておりますので、今後ともよろしくお願いいたします。