

日本医療研究開発機構 官民による若手研究者発掘支援事業
事後評価報告書



I 基本情報

補助事業課題名：（日本語）医療機器開発に向けた生体組織内多次元化学分布情報計測の要素技術開発
（プログラム名）（英語）Development of elemental technologies for measuring multi-dimensional
chemical distribution information in biological tissues for the development of medical devices

実施期間：令和/平成2年4月1日～令和4年3月31日(予定)

補助事業担当者 氏名：（日本語）大塚 洋一
（英語）Yoichi Otsuka

補助事業担当者 所属機関・部署・役職：
（日本語）大阪大学大学院理学研究科 准教授
（英語）Graduate school of science, Osaka university, Associate professor

II 補助事業の概要

生体組織から多彩な化学情報を獲得するための、多次元化学分布情報計測（M²CDI: Measurement of Multidimensional Chemical Distribution Information）は、科学的根拠に基づく病気の究明・予知・予防の高度化の点で重要である。質量分析法を用いた M²CDI では、生体組織の微小領域に含まれる分子群の質量情報を計測することで、一度の計測で複数の化学成分の分布をイメージングできる。欧米を中心に M²CDI の研究開発が進められており、疾患に関連する生体成分が見いだされている。

本事業では、①代表者が発案した抽出-イオン化法「タッピングモード走査型プローブエレクトロスプレーイオン化法（t-SPESI: Tapping-mode scanning probe electrospray ionization）を医療機器へと展開するための要素技術開発と、②ヒト拡張型心筋症組織の M²CDI および特徴量抽出による疾患状態の把握を実施した。

補助事業参加者：坂田泰史（大阪大学医学系研究科・教授）、大谷朋仁（同・講師）は検体のデザインと医学的見地に基づいた検証を担当した。新聞秀一（大阪大学工学研究科・准教授）は試料作製とデータ解析への助言を担当した。

<令和二年度>

ニーズとシーズの明確化を目的として、拡張型心筋症組織の M²CDI と新型 t-SPESI 計測システムの開発を実施した。

代表者が開発してきた旧 t-SPESI 計測システムを用いて、拡張型心筋症組織（3 検体）の M²CDI を実施した。組織中に広く分布する脂質と局在する脂質の存在を見いだした。局在性脂質の分布は、中性脂質を赤く呈色するオイルレッド O 染色を施した組織イメージと類似すること、またマススペクトルの分析からトリアシルグリセロールであることを見いだした。補助事業参加者と連携し、令和三年度で検討する検体のデザインを決定した。

新型計測システムの開発に必要な要素技術として、t-SPESI のプローブの高速振動安定化技術、溶媒の安定供給技術、キャピラリプローブの作製技術を開発した。振動安定化のために、プローブの振動振幅の光学計測装置を開発した。本装置ではプローブの側面からレーザー光を照射し、プローブによって遮られたレーザー光の影の変位を計測する。プローブ変位の演算回路を新たに開発し、バックグラウンドノイズの軽減に成功した。溶媒の安定供給のために、溶媒の送液ラインにフィルターを組み込む方式を考案した。送液の安定化が実現し、数十ナノリットル/分の流速での M²CDI を実施できた。これらの要素技術を組み合わせた t-SPESI ユニットを試作した。本ユニットをタンデム型質量分析装置に接続するために、イオンを質量分析装置に導入するためのインターフェースユニットや、質量分析装置の計測とプローブ走査の同期機構を開発した。質量分析装置は、質量分解能が約 30000、24 時間の計測精度が 3ppm 以内であるため、高精度の M²CDI のための新型 t-SPESI 計測システムを構築することができた。

<令和三年度>

物理・化学的原理の解明に向けた検討と、拡張型心筋症組織 10 検体の M²CDI を実施した。

t-SPESI では、振動するプローブを用いてピコリットルの溶媒への成分抽出とイオン化を交互に行うため、抽出工程では溶媒の表面張力および粘性が、イオン化工程では表面張力及び誘電率が影響を及ぼすと考えられる。N,N-dimethylformamide (DMF)/メタノール混合溶媒（混合比率 1 : 1）、DMF、およびメタノールを用いて、その物理化学的性質と脂質イメージングの関係を調べた。DMF/メタノール混合溶媒の表面張力・粘性・誘電率は、DMF の添加量に対して全ての物性が線形的に増加し、1 : 1 混合溶媒は純溶媒の中間値を示した。

各溶媒を用いたマウス脳組織切片の M²CDI の結果、混合溶媒が最も多くのイオン種を生成すること、また多くのイオン種の信号強度が増加することが明らかとなった。DMF を用いた場合には、イオンピークのうち約 50% の信号強度が混合溶媒よりも大きくなったが、イメージングの空間分解能が低下することが分かった。一方で混合溶媒およびメタノールを用いたイメージングの結果、マウス脳組織切片の神経線維束の構造や海馬中の脂質分布などを明瞭に捉えることができた。

t-SPESI で高空間分解能のイメージングを実現するためには、ピコリットルの溶媒への抽出効率を向上させること、抽出液がエレクトロスプレーイオン化 (ESI) によって消費されることで、一定体積のピコリットルの溶媒で連続的に抽出とイオン化を継続することが重要となる。ESI の効率を向上するためには、低い表面張力と誘電率の溶媒を使用して、生成される帯電液滴のサイズを小さくすることが重要である。また、t-SPESI では、プローブが試料から離れている数ミリ秒程度の短時間で ESI を生成することも必要である。表面張力と誘電率が大きい DMF を用いた場合には、ESI のための帯電液滴の生成効率が低下し、組織切片上で溶媒の残留が生じることが考えられた。一方、メタノールは表面張力と誘電率が小さく、帯電液滴の生成効率が高い。しかし M²CDI の結果より、混合溶媒の方がメタノールよりも脂質イオンを高強度に計測することができた。この理由として、t-SPESI ではイオン化工程と抽出工程の両方に溶媒の物理化学的性質が影響することが考えられた。抽出工程では、プローブ先端から試料にピコリットルの溶媒を供給することで、プローブと試料の間に液架橋が形成され、試料成分が溶解する。その後、プローブ先端に抽出液が保持された状態で、プローブが試料表面から離れ、ESI が生じる。抽出された成分を効率的に ESI に導くためには、プローブ先端に保持される溶液量が大きいことが求められる。混合溶媒はメタノールよりも表面張力と粘性が高いため、多くの抽出液がプローブ先端に保持され、イオン化されたと考えられる。生体組織の脂質分布を高空間分解能で計測するためには、溶媒の物理化学的性質を考慮することが重要であり、DMF/メタノール混合溶媒が抽出工程とイオン化工程の両方を効率的に実施するために適することが見いだされた。

DMF/メタノール混合溶媒を用いて、拡張型心筋症を発症した患者から提供された心臓組織の M²CDI を実施した。全 5 名の患者は、補助人工心臓 (VAD: Ventricular Assisted Device) の埋め込み治療と、その後の心臓移植を受けた。それぞれの手術の際に摘出された心臓組織を計測対象とした。5 名中 3 名は VAD 装着に伴うリバーズリモデリングが生じず、2 名はリバーズリモデリングが生じたと判断された。

計測の結果、令和 2 年度に旧計測システムを用いて計測した結果と同様に、非局在性脂質・局在性脂質が全検体に共通して認められた。新計測システムでは、質量分解能が向上し、イオンピークの情報を高精度かつ高感度に計測することが可能になった。非局在性脂質・局在性脂質のモノアイソトピックマスの情報をデータベース検索し、非局在性脂質は主にリン脂質、局在性脂質は主にトリアシルグリセロールと推定された。非局在性脂質と局在性脂質が分布する領域をそれぞれ関心領域 (ROI) として設定し、ROI の平均マススペクトルから得られたイオンピーク強度の主成分解析 (PCA) を行った。局在性脂質のスコアプロットからは、特徴的な傾向が認められなかった。このことは、トリアシルグリセロールが疾患状態の変化を捉えるためのバイオマーカーとして有効でない可能性、もしくは、本研究で得られた局在性脂質の分布が不均一であり、心臓組織からのサンプリング位置の影響を受ける可能性が考えられた。一方、非局在性脂質のスコアプロットからは、検体の治療過程における変化を反映すると考えられる結果が見いだされた。リバーズリモデリングが生じなかった 3 名の検体は、VAD の導入から心臓移植までの間に、PC1 の減少と PC2 の増加を示したのに対して、リバーズ・リモデリングが生じた 2 名の検体は PC1 と PC2 の減少を示した。この結果は、非局在性リン脂質群の強度情報を多変量解析することにより、疾患状態の変化を追跡できる可能性を示唆した。また、非局在性脂質の強度情報は、局在性脂質で考察された心臓組織のサンプリング位置の問題を軽減できると考えられ、臨床で実施されている生検試料の M²CDI で疾病状態の把握に繋がることが期待出来る。

上記の研究開発に加えて、開発サポート機関からの教育プログラム (ブートキャンプ式座学講座、ケースメソッド、エキスパートメンタリング) を受講した。社会実装を実現するためには、ニーズの評価、市場理解、マーケティング戦略、薬事戦略、知財戦略、事業戦略等の総合的な検証が重要であることを理解した。ニーズ評価のために、医学系研究者へのヒアリングを実施し、新たな共同研究の開始に繋がった。本事業で開発した t-SPESI 計測システムを最大限に活用し、異なる臓器疾患に関与する多次元化学分布情報を獲得することによって、本計測技術の医用機器としての有効性の検証を継続する。

Measurement of multidimensional chemical distribution information (M²CDI) is important to obtain chemical information from biological tissues, which contain multimolecular crowding systems, for the advancement of science-based disease research, prediction, and prevention. M²CDI using mass spectrometry enables imaging of the distribution of multiple chemical components in a sample by measuring the mass information of molecules in a small area. In this project, we developed elemental technologies to expand the extraction-ionization method "tapping-mode scanning probe electrospray ionization (t-SPESI)" to medical analytical devices. We also conducted M²CDI of human dilated cardiomyopathy tissue and feature extraction to understand the disease status.

<2020> M²CDI of dilated cardiomyopathy tissues (3 patients) was performed using the conventional t-SPESI measurement system, and the existence of widely distributed lipids and localized lipids in the tissues was found. The distribution of localized lipids was correlated with the Oil Red O stained tissue, which were found to be triacylglycerols based on mass spectral analysis. In collaboration with the participants of the project, the design of the specimens to be examined in 2021 was determined. As the development of elemental technologies for the new measurement system, we developed high-speed vibration stabilization technology for t-SPESI probes, stable solvent supply technology, and fabrication technology for probes. The new measurement system has improved the mass resolution, which enables highly accurate and sensitive measurement of ion peaks.

<2021> In order to investigate the relationship between their physicochemical properties and lipid imaging, t-SPESI was performed using N,N-dimethylformamide (DMF)/methanol mixture, DMF and methanol, respectively. M²CDI of mouse brain tissue sections revealed that the mixed solvent produced the greatest number of ion species and increased the signal intensity of many ion species. With DMF, the signal intensity of about 50 % of the ion peaks was greater than that of the mixed solvent, but the spatial resolution of the imaging was found to be reduced. On the other hand, the mixed-solvent and methanol solvent imaging clearly captured the structure of nerve fiber bundles and lipid distribution in the hippocampus of mouse brain tissue sections. To achieve high spatial resolution imaging with t-SPESI, it is important to consider the physicochemical properties of the solvent, and the mixture was found to be suitable for efficiently performing both the extraction and ionization processes.

M²CDI of human dilated cardiomyopathy tissue was performed. All five patients underwent implantation of a ventricularly assisted device (VAD) and subsequent heart transplantation. Three of the five patients showed no reverse remodeling associated with VAD implantation, and two were determined to have reverse remodeling. The regions of interest were defined as the areas where nonlocalized and localized lipids were distributed, respectively, and a principal component analysis of the averaged mass spectra was performed. As a result, clear characteristic trend was not observed from the score plots of localized lipids. On the other hand, the score plots of the nonlocalized lipids revealed results that reflect changes during the treatment process of the patients. The results suggested that multivariate analysis of the nonlocalized phospholipids would be used to understand the changes of disease status.

The representative person participated in educational programs from development support organizations. The representative person understood the importance of comprehensive verifications (needs assessment, marketing strategy, IP strategy, business strategy) to realize social implementation. To assess needs, interviews with medical researchers were conducted, which led to starting new collaborative research projects. The t-SPESI measurement system developed in this project will be used to investigate M²CDI and

feature extraction of diseased tissues in different organs. The effectiveness of this measurement technology as a medical device will continue to be verified.