

論 文 内 容 要 旨

Imaging mass spectrometry-based molecular histology -Analysis of kidney and bone in Klotho-deficient mice-

(イメージング質量分析を用いた分子組織学的解析

-Klotho 欠損マウスの腎および骨において-)

主指導教員：岡田 貢 教授

(口腔健康発育歯科 障害者歯科)

副指導教員：二川 浩樹教授

(統合健康科学部門 口腔生物学)

副指導教員：南崎 朋子助教

(基礎生命科学部門 硬組織代謝生物学)

藤野 陽子

(医歯薬保健学総合研究科 博士課程医歯薬学専攻)

論文内容要旨

論文題目

イメージング質量分析を用いた分子組織学的解析
-Klotho 欠損マウスの腎および骨において-

学位申請者 藤野 陽子

近年、生命活動や病態を包括的に解明、解析するためのオミックス解析が盛んに行われている。マトリックス支援レーザー脱離イオン化法イメージング質量分析 (Matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry: MALDI-IMS) は、凍結組織切片から得られたマススペクトルをイメージングすることで、組織・細胞の位置情報に基づくオミックス解析を行う技術であり、生体分子の局在を網羅的に直接検出することができる。これまでに、脳、腎臓などでその有用性が実証されているが、技術的に未成熟な一面もあり、歯科医学領域での実施例は極めて少ない。そこで、本研究は、比較的解析が容易なマウス腎臓を用い、リン代謝を担う鍵分子の1つである KLOTHO 欠損 ($KI^{-/-}$) に伴うタンパク質の変動を MALDI-IMS で探索した。次に、標本作製やイオン化が困難な硬組織に適した MALDI-IMS の条件を検討し、 $KI^{-/-}$ マウスの骨におけるメタボローム解析を試みた。

$KI^{-/-}$ マウスはリン代謝異常、腎障害、骨量減少など、ヒトの老化に類似した表現型を示す。しかし、KLOTHO と病態との関連はなお不明な点が多い。7週齢雄性野生型 (WT) および $KI^{-/-}$ マウスの未固定腎臓凍結切片を用い、タンパク質 (m/z 1,000-60,000) を標的として MALDI-IMS を行ったところ、両者の間で異なる分布を示すマススペクトルが得られた。そこで、隣接した凍結切片2枚をトリプシン消化し、一方は MALDI-IMS および MS-MS 解析、他方は液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析 (LC-MS-MS) を行い、LC-MS-MS の結果と一致する MALDI-IMS のピークをイメージングした。その結果、WT マウス固有の 61 種、 $KI^{-/-}$ マウスのみ 33 種、両マウス共通の 36 種のタンパク質が検出された。WT マウスに由来する High mobility group protein B1、Thymosin β 4 および RAD51-related protein 1、また $KI^{-/-}$ マウスのみから検出された Wnt 5a、Fructose-bisphosphate aldolase A、Chromogranin A および Chromogranin B は、いずれも KLOTHO との関連が報告されていない。Chromogranin B はグラニンタンパク質の一種であり、神経・内分泌細胞において分泌顆粒形成に関与することが知られている。抗 Chromogranin B 抗体を用いて腎臓の免疫染色を行ったところ、WT マウスと比較して $KI^{-/-}$ マウスの糸球体、尿細管および血管に強い陽性反応が認められた。

次に、骨組織を用い、低分子 (m/z 100-1,000) を標的とした MALDI-IMS を行った。8週齢雄性 WT マウスの大腿骨または脛骨を、①未固定-非脱灰、②未固定-ギ酸脱灰、③未固定

-EDTA 脱灰、④パラフォルムアルデヒド (PFA) 固定-ギ酸脱灰、⑤PFA 固定-EDTA 脱灰、⑥カルノア固定-ギ酸脱灰、⑦カルノア固定-EDTA 脱灰、⑧トリクロロ酢酸 (TCA) 固定/脱灰処理後、凍結切片を作製した。一般染色、組織学的評価により未固定-脱灰 (②および③) および固定-ギ酸脱灰 (④および⑥) を測定対象外とした。解析対象とした残りのサンプルのうち、固定-EDTA 脱灰 (⑤および⑦) あるいは⑧TCA 固定/脱灰標本において良好な S/N 比を持つイメージング画像が得られた。広範の m/z において S/N 比の良好なマススペクトルが検出され、最も良好なイメージング画像の得られた TCA 固定/脱灰標本を用い、WT マウスと $KI^{-/-}$ マウスを比較したところ、 $KI^{-/-}$ マウス固有のマススペクトルが複数検出された。これらをプレカーサーイオンとして MS-MS 解析を行い、得られたプロダクトイオンを検索したところ、Estradiol の代謝物である 2-hydroxyestradiol や Ceramide の代謝物である Sphingosine が含まれるものと推定された。

以上のように、本研究では、腎臓の MALDI-IMS により、KLOTHO 欠損に起因すると思われる新規タンパク質を可視化、同定することに成功した。さらに、骨組織においては、TCA 処理標本を用いることで良好なイメージング画像が得られ、病態関連のメタボローム解析が可能であると推測された。これらの結果から、MALDI-IMS の技術は今後の歯科医学領域の発展に寄与するものと期待される。