

論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 (歯 学)	氏名	藤 野 陽 子
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1・2 項該当		
<p>論 文 題 目</p> <p>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-)</p>			
<p>論文審査担当者</p> <p>主 査 教 授 吉 子 裕 二 印</p> <p>審査委員 教 授 高 田 隆</p> <p>審査委員 教 授 谷 本 幸 太 郎</p>			
<p>[論文審査の要旨]</p> <p>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。本論文では、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。</p> <p>$KI^{-/-}$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</p>			

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、 $KI^{-/-}$ マウスのみの 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。

以上の結果から、本論文は、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。よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士 (歯学) の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。