

超感度ビデオマススコープ開発による一細胞オンタイム 分子動態・分子探索法の確立

Single-cell on-time molecular analysis
by hyper-sensitive video-mass scope

升島 努 (Masujima Tsutomu)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授



研究の概要

世界で初めて細胞を観察しながら、変化の瞬間、細胞成分を捕獲し直接高感度質量分析により分子検出できるビデオマススコープ法（造語）の開発に成功した。アレルギー細胞内で顆粒にアレルギー分子が濃縮されるメカニズム、細胞分化における分子変動、植物の葉と茎での分子局在の違い、1細胞での薬物代謝追跡、汗一滴での分析など、豊かな可能性が検証できた。

研究分野：生物系・医歯薬学I

科研費の分科・細目：物理系薬学

キーワード：1細胞分析、細胞リアルタイム分子探索、細胞内分子動態、質量分析

1. 研究開始当初の背景

「生命のユニット“細胞”の動く姿を見ながら、同時にその中で起こっている分子変化を即時に捉える」、それは、生命分析の夢であり、これにより生命科学は驚くスピードで進むに違いない。

1細胞MALDI/MS法などがあったが、細胞は生きておらず検出分子数も少なく、網羅的で高感度な質量分析法の開発が望まれていた。誰も成功しなかった生きた細胞1ケの細胞内成分の網羅的分子検出に、8年間失敗の末、ついに成功した。

2. 研究の目的

1) ビデオマススコープ法の確立

ビデオ顕微鏡下で細胞を観察しながら、必要な瞬間に1細胞を捕捉し、即座に超高感度に質量分析できるよう、試作質量分析計と市販最高性能機を駆使して、世界最高のシステム・手法として確立する。

2) ビデオマススコープ法の様々な応用展開とその有用性の検証：本手法を様々な応用し、ビデオマススコープ法の可能性と有用性を世界に先駆けて広く検証する。

3. 研究の方法

生きた細胞1ケを顕微鏡下、ナノスプレーチップで捕捉し、その髭の様な先端に捕捉された1pLにも満たない極微量の試料にイオン化溶媒を添加し、そのままナノスプレーイオン化により質量分析計に導入する。細胞状態間の差分スペクトルから変動分子ピークを抽出し、そのピークを示す分子を同定する。

4. これまでの成果

1) ビデオマススコープ法の確立

独自のナノスプレーチップを開発し、1細胞分析用として世界唯一（特にイオン化安定性と細胞サイズ・ターゲットに応じた先端口径の至滴化）のものにすることに成功した。

マーカー探索ソフトを改良し、細胞状態間や部位間の分子ピークの差分解析や多変量解析により、特異なあるいは変動したピークが抽出できることを証明した。

分子検出と分子同定は、それに必須な超感度質量分析計として本研究室での新質量分析計試作機と市販の世界最高分解能機および感度・網羅的検出能機の3機で比較しながら、最良選択と改良を重ねながら進めた。

その結果、1細胞どころか、細胞内小器官（顆粒など）や細胞内の脂肪滴までもが直接分子検出でき、ほぼ10分以内に成分捕捉から分子検出までできる手法となり、まさに、1細胞オンタイム分子動態・分子探索法の確立ができた。現在更に改良を加えている。

2) ビデオマススコープ法の様々な応用展開とその有用性の検証：

(1) アレルギー細胞への応用

アレルギー細胞モデルとしてRBL-2H3細胞を用い、まず細胞質とヒスタミンなどのアレルギー起因分子を蓄積していると言われる顆粒との分子分布の差分を捉えた。その結果ヒスタミンは顆粒特異的であるが、セロトニンは両者に存在し、生成過程の違いを反映し

ている事が初めて分かった。更に顆粒のような細胞内小器官1ケでも分子探索可能とわかったので、世界で初めての1顆粒内でのアミノ酸代謝過程の追跡に成功し、**Science** に投稿した。現在はお茶の成分カテキンの抗アレルギー作用の検証に本法が利用できるかを検証している。

(2) 細胞周期、細胞分化における分子探索

細胞の応答がバラバラであるのは、細胞周期の違いとも考えられ、分裂期以外は形態で区別のつかない細胞周期を、マーカー分子で決定できないかを本法で試み、いくつかの候補分子を発見した(特許申請準備中)。またレチノイン酸による神経分化誘導における変動分子追跡において、神経分化時に特異的な分子を抽出することに成功し、代謝マップに照らしてみると、神経伝達分子が増進していることも判明した。それ以外の変動分子に注目して、現在分子同定を進めている。

(3) 1細胞薬物代謝分析

医薬品開発において、開発医薬品の細胞内代謝(特に入手が困難なヒト肝臓での)の把握は非常に重要な課題であり、従来は組織を沢山使って評価していた。我々はヒト肝臓細胞モデルのHepG2を用いて、抗がん剤の一種タモキシフェンの細胞内代謝が細胞1ケでも追跡できることを示し、製薬企業の大きな関心を呼んでいる。更にこの細胞内にある液胞と細胞質での薬物代謝の違いも分かり、細胞内での代謝の局在性も分かるようになった。細胞質のみで薬物代謝は進んでいる。これらの知見は、本法が日本の製薬メーカーの世界戦略技法となる可能性を示し、産学での共同研究を開始する所である。

(4) 植物の1細胞分析

細胞は動物に限らず、植物にも適用できるか検討した。ゼラニウムでは葉と茎の1細胞分析が容易にできることが分かった。葉にしかない成分に除虫効果のある分子があることを発見し、植物の有用成分探索にも活用できると期待している。産学の共同研究もスタートした。また花の芳香成分の直接検出にも最近成功し、化粧品企業の関心を呼んでいる。

(5) ピコ滴体液捕捉による分子探索

1細胞の量が超微量(1pL)であることから、唾液、血液など一滴でも分子検出できるか検討した所、喫煙者のニコチン代謝物まで検出できた。更に、指先の指紋域の汗腺1ケから出る汗を捕捉し、直接分析したところ130ピークの分子検出に成功し、そのうちアミノ酸など23分子の同定に成功した。今後の無痛分子診断への道を拓くと感じている。

その他、カエルの卵での発生過程での分子変動、生薬成分の薬効成分、がん細胞の特異分子と変動、iPS細胞の分化分子変動、膜内分子の変動など、これら分子変動と分子探索を通し本法の豊かな可能性を検証している。

5. 今後の計画

1) ビデオマススコープ法の進化

細胞質、細胞内小器官に加え、細胞膜中分子解析法も確立し、分離能も持たせ、タンパク成分も含む更なる網羅性の向上と操作性の向上と高感度化を追求する。

2) ビデオマススコープ法の様々な応用展開とその有用性の検証: 今展開している様々な応用を確固としたものにしなが、製薬企業から言われている定量性の確保と、1細胞薬物代謝評価を患者さんのテーラーメイド医療に活用できる等、新しい医療分野への応用研究も進め、世界最先端技術を確立する。

6. これまでの発表論文等

受賞

2008年 日本分析化学会 学会賞

「ダイナミックイメージング

分子探索分析法の創成と展開」

1. Lorenzo T. M., Mizuno H., Tsuyama N., Harada T., Masujima T.. “Direct single-cell molecular analysis of plant tissues by video mass spectrometry” *Anal. Sci.* 2009;25:1053-1055.

2. Masujima T.

Live single-cell mass spectrometry. *Anal. Sci.* 2009;25:953-960.

3. Mizuno H., Tsuyama N., Date S., Harada T., Masujima T.. Live single-cell metabolomics of tryptophan and histidine metabolites in a rat basophil leukemia cell. *Anal. Sci.* 2008;24:1525-1527

4. Mizuno H., Tsuyama N., Harada T., Masujima T.. Live single-cell video-mass spectrometry for cellular and subcellular molecular detection and cell classification. *J. Mass Spectrom.* 2008;43:1692-1700 他4報

図書: 水野初, 津山尚宏, 升島努. 一細胞ダイレクトMS法によるメタボロミクス, メタボロミクス: その解析技術と臨床・創薬応用研究の最前線, pp146-151, メディカルドゥ, 2010 他1冊

産業財産権: 3件特許申請

招待講演: 升島努, Live Single-Cell Mass Spectrometry, 理研シンポジウム(埼玉・和光)第9回 分析・解析技術と化学の最先端, 2008年12月9日 他22講演
学会発表(海外): 8報

57th ASMS Conference on Mass Spectrometry, June 2, 2009にて

学会発表(国内): 77報

日本薬学会、日本質量分析学会、日本分析化学会など

新聞報道: 5件、NHKテレビ放映: 1件

ホームページ

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/analytic/>