

## 質量顕微鏡法を用いたマウス再生肝の解析

宮村 憲 央<sup>1</sup>, 瀬 藤 光 利<sup>2</sup>, 仁 科 博 史<sup>1</sup>

肝再生は紀元前の神話にも記載され臓器移植にも応用されている著名な現象であるが、そのメカニズムについてはいまだ不明な点が多い。本稿では、肝切除後の初期に誘導され肝再生に必須である脂肪肝について紹介する。脂肪肝を構成する脂質成分の解析を次世代イメージング法である「質量顕微鏡法」によって解析した結果を概説するとともに、肝臓-脂肪組織の代謝ネットワークおよび肝小葉構造内の代謝分布についても述べたい。

## 1. 肝再生と脂肪肝

肝再生の研究はげっ歯類を用いた部分肝切除モデルによって古くから行われており、80年前の1931年にはすでに現在の部分肝切除と同じ方法を用いたラットの肝再生の報告が Higgins と Anderson らによってなされている<sup>1)</sup>。マウスの部分肝切除手術には肝左葉および肝中葉を切除する3分の2肝切除が用いられ、体内に残された肝臓は肝細胞の肥大と2回程程度の細胞分裂によって約1週間で元の肝重量まで回復する(図1)<sup>2,3)</sup>。肝切除後の肝臓は急速に変化し切除1日後には一過的な脂肪肝を形成する<sup>3)</sup>。この脂肪肝は肝細胞の細胞増殖に必須の役割を担っていることが、肝臓への脂質蓄積を抑制する薬物やホルモン投与(クロフィブレート<sup>4)</sup>、レプチン<sup>5)</sup>、プロプラノロール<sup>6)</sup>、グルココルチコイド受容体のノックアウトマウス<sup>5)</sup>などによって示されてきた。しかしながら、脂質がどのように肝臓へ蓄

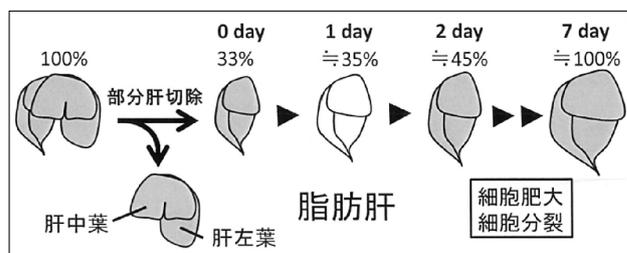


図1 マウス部分肝切除と肝再生

げっ歯類の肝臓は5葉で構成されている。部分肝切除は肝中葉と肝左葉を切除する手術であり、残された肝臓は細胞肥大と分裂によって約7日で再生する。1日後には脂肪肝が誘導される。

積するのか、また蓄積する脂質の詳しい分子種やそれらの肝臓内分布については明らかにされていない。原因の1つとして脂質分子を組織切片上で解析する適切な方法がなかったことがあげられる。

## 2. 脂質の代謝

トリグリセリド(トリアシルグリセロール, TG)はグリセロール骨格に脂肪酸が三つ結合した分子であり、ジアシルグリセロール(DAG)とアシルCoAがジアシルグリセロールO-アシルトランスフェラーゼ1(DGAT1)によって縮合反応することで生合成され、patatin-like phospholipase domain containing 2(PNPLA2)などのリパーゼによってグリセロールと脂肪酸(FA)に加水分解される(図2A)。また、ミクロソームトリグリセリド輸送タンパク質(MTP)によって超低密度リポタンパク質(VLDL)として血中へ放出され、VLDL受容体(VLDLR)を介して細胞内へ取り込まれる。ミトコンドリア内ではTGからβ酸

<sup>1</sup> 東京医科歯科大学難治疾患研究所 発生再生生物学分野 (〒113-8510 東京都文京区湯島 1-5-45)

<sup>2</sup> 浜松医科大学解剖学細胞生物学分野 (〒431-3192 静岡県浜松市東区半田山 1-20-1)

Analysis of the regenerating murine liver by imaging mass spectrometry

Norio Miyamura<sup>1</sup>, Mitsutoshi Setou<sup>2</sup> and Hiroshi Nishina<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Department of Developmental and Regenerative Biology, Medical Research Institute, Tokyo Medical and Dental University, 1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8510, Japan; <sup>2</sup>Department of Cell Biology and Anatomy, Hamamatsu University School of Medicine, 1-20-1, Handayama, Higashi-ku, Hamamatsu 431-3192, Japan)

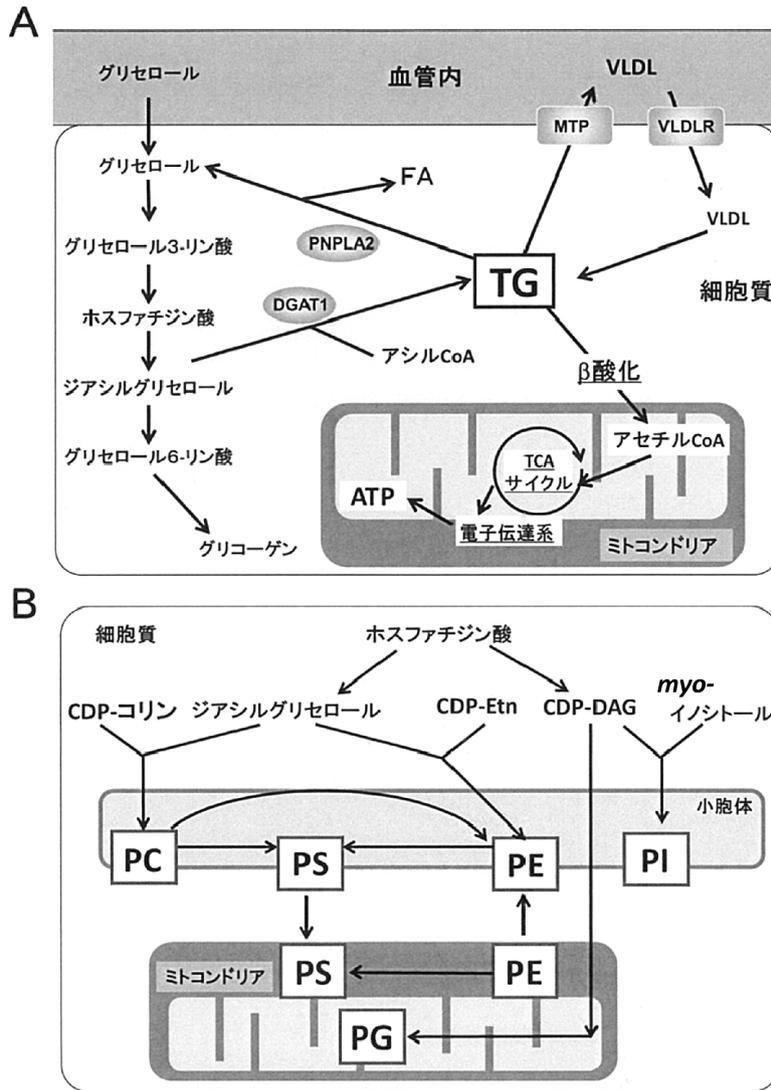


図2 脂質代謝の模式図

(A) DGAT1 はジアシルグリセロールとアシル CoA を縮合し TG を合成する。PNPLA2 は TG をグリセロールと FA に分解する。TG はミトコンドリア内でアセチル CoA に変換され、最終的に ATP が産生される。MTP は VLDL を血中へ放出し、VLDLR は細胞内へ VLDL を取り込む。(B) 小胞体中存在する酵素は、ジアシルグリセロールと CDP-コリンまたは CDP-エタノールアミン (Etn) を縮合することで PC および PE を合成する。PC は PE, PS へ、PE は PS へ変換される。CDP-DAG と myo-イノシトールが縮合し PI が合成される。ミトコンドリア内では、PE から PS への変換反応や CDP-DAG から PG の合成反応が行われる。PC: ホスファチジルコリン, PE: ホスファチジルエタノールアミン, PS: ホスファチジルセリン, PI: ホスファチジルイノシトール, PG: ホスファチジルグリセロール。

化によってアセチル CoA が産生され、TCA サイクルで代謝し電子伝達系によって ATP が産生される。このように、TG は主にエネルギーの貯蔵物質として機能する。

グリセロリン脂質はグリセロール骨格に脂肪酸二つとリン酸を含む極性基が結合した分子であり、極性基の種類によってホスファチジルコリン (PC) やホスファチジルイノシトール (PI)、ホスファチジルセリン (PS) などに分類される。主に小胞体、ミトコンドリア内で生合成され、

種々の酵素によってグリセロリン脂質間で相互変換される (図 2B)<sup>7)</sup>。グリセロリン脂質は両親媒性分子であり細胞膜などの生体膜の構成要素であるほか、シグナル分子としても機能する<sup>8)</sup>。

### 3. 質量顕微鏡法

一般的な質量分析法は網羅的に分子情報を得ることに秀でていますが、臓器や組織などを破碎した標品を用いるため

分子の位置情報は失われてしまう。一方、今回紹介する質量顕微鏡法 (imaging mass spectrometry) は組織切片に対して直接質量分析を行うことで位置情報をも分析可能にした新たなイメージング解析技術である (図3)<sup>9-11)</sup>。

質量顕微鏡法は、マトリックス支援レーザー脱イオン化法 (matrix-assisted laser desorption/ionization: MALDI) を用いて分子をイオン化している。試料組織切片上にマトリックスを塗布したのち 10  $\mu\text{m}$  以下の微小口径のレーザー光で切片上の指定した範囲をくまなく走査し、それら 1 点 1 点から得られたイオンの質量と電荷の比 ( $m/z$ ) を検出器で測定することで脂質などの分子量数百~数千の生体低分子量物質のイオンマススペクトルを得ることができる。最大の特徴はレーザーを走査させて得た 1 点 1 点の情報をソフトウェアを用いて統合することで二次元的に情報を再構築することが可能な点である。近年、質量顕微鏡法をマウス脳や網膜、植物の生姜に適応した結果が報告されている<sup>10,12-15)</sup>。マウス網膜ではホスファチジルコリン分子種が層構造依存的に分布している様子が可視化された。

#### 4. 肝再生時のトリグリセリド代謝

肝切除前後の肝臓を薄層クロマトグラフィー法 (TLC) で解析すると蓄積量の増加が観察される。しかしながら、多様な TG 分子種は分離されることなく 1 点に凝集される。筆者らは再生時の脂肪肝切片を質量顕微鏡法で解析し、22 種類の TG 分子種が増加していることを明らかとした (表1)<sup>16)</sup>。興味深いことに同定した TG の側鎖の脂肪

表1  $m/z$  から同定した TG の分子種とその変化

$m/z$	変化	分子種
877.7	増加	$[\text{PLL} + \text{Na}]^+$ , $[\text{POLn} + \text{Na}]^+$
879.8	増加	$[\text{POL} + \text{Na}]^+$
893.6	増加	$[\text{PLL} + \text{K}]^+$ , $[\text{POLn} + \text{K}]^+$ , $[\text{P}^1\text{LnE} + \text{Na}]^+$
895.7	増加	$[\text{POL} + \text{K}]^+$ , $[\text{P}^1\text{LnE} + \text{Na}]^+$
917.7	増加	$[\text{LLL} + \text{K}]^+$ , $[\text{OLLn} + \text{K}]^+$ , $[\text{M}^1\text{D}^6\text{E} + \text{Na}]^+$
919.7	増加	$[\text{OLL} + \text{K}]^+$ , $[\text{SLLn} + \text{K}]^+$ , $[\text{OLnO} + \text{K}]^+$ , $[\text{MD}^9\text{E} + \text{Na}]^+$
921.7	増加	$[\text{OLO} + \text{K}]^+$ , $[\text{P}^1\text{LnD}^6 + \text{Na}]^+$
925.6	増加	$[\text{SOO} + \text{K}]^+$ , $[\text{PLD}^6 + \text{Na}]^+$
941.7	増加	$[\text{SSE} + \text{Na}]^+$
943.7	増加	$[\text{SSA} + \text{Na}]^+$
963.5	増加	$[\text{OOD} + \text{Na}]^+$

P: パルミチン酸, L: リノール酸, O: オレイン酸, Ln: リノレイン酸, P<sup>1</sup>: パルミチン酸, M<sup>1</sup>: ミリスチン酸, D<sup>6</sup>: ドコサヘキサエン酸, E: エイコサペンタエン酸, S: ステアリン酸, A: アラキドン酸, D: ドコサン酸, Na: ナトリウム, K: カリウム。

酸に哺乳動物が合成できない n-3 系, n-6 系脂肪酸が観察された。これら脂肪酸は新たに摂食で取り入れたか、他の臓器で貯蓄されていたものが流入した可能性が考えられる。筆者らは肝臓での TG 合成に加えて、脂質の貯蓄を担う脂肪組織が TG の供給源であると考え、肝臓と脂肪組織における TG 代謝関連遺伝子の発現変化を解析した。その結果、肝臓での TG の合成遺伝子の発現が亢進するとともに脂肪組織において合成や分解および取り込み発現に関与する遺伝子の発現変化を見いだした。これらの結果は脂肪肝誘導の一因として、肝臓内での合成に加えて脂肪組織が血流を介して再生肝へ TG を供給している可能性を示唆する。

#### 5. 肝再生時のグリセロリン脂質代謝と zonation

再生肝のグリセロリン脂質を TLC で解析すると、PC や PI, PE などに分離されるが、肝切除前後でそれらの増減は観察されない。一方、質量顕微鏡法を用いてこれらを解析すると 14 種の PC 分子の増減を見いだした (表2)<sup>16)</sup>。すなわち、TLC ではわからなかった PC の多様な分子種の増減を質量顕微鏡法で明らかにすることが可能になった。これまでに Zaima らと van Ginneken らはげっ歯類の絶食時脂肪肝モデルに対して質量分析を行い、約 15 種類の PC 分子種の変化を同定している。なかでも PC(1-acyl 34:2) が最も増加していたことから、この PC 分子種が脂肪肝形成に重要な働きを担っているのではないかと推察している<sup>17,18)</sup>。また、PC(1-acyl 36:5), PC(1-acyl 38:6) は減少した分子種として報告している。筆者らの研究結果では

表2  $m/z$  から同定したリン脂質の分子種とその変化

$m/z$	変化	分子種
780.5	増加	PC(1-acyl 34:2) + Na
782.6	増加	PC(1-acyl 34:1) + Na
796.5	増加	PC(1-acyl 34:2) + K
798.5	増加	PC(1-acyl 34:1) + K
802.5	増加	PC(1-acyl 36:5)
808.5	増加	PC(1-acyl 36:2) + Na
820.6	変化なし	PC(1-acyl 36:4)
824.6	増加	PC(1-acyl 36:2) + K
828.5	増加	PC(1-acyl 36:0)
844.6	増加	PC(1-acyl 38:6)
848.6	変化なし	PC(1-acyl 38:4)
868.5	減少	PC(1-acyl 40:8)
870.6	変化なし	PC(1-acyl 40:7)
872.6	減少	PC(1-acyl 40:6)

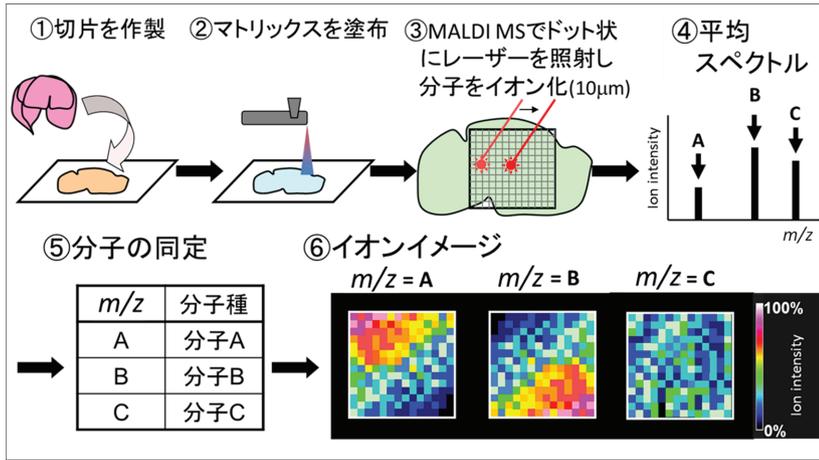


図3 質量顕微鏡法の原理

①試料組織切片を作製し、②マトリックスを塗布後、③10  $\mu$ m以下の微小口径のレーザー光で切片上の各画分を走査する。④各画分に存在する分子の質量と電荷の比 ( $m/z$ ) を検出器で測定し平均化する。⑤得られた  $m/z$  の値から分子種を同定し、⑥情報を専用のソフトウェアで統合し注目する分子の切片上のシグナル強度を色分布で表現する。

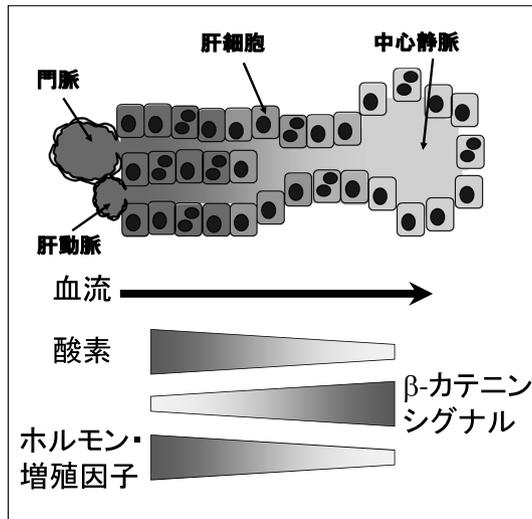


図4 肝臓の構造と zonation

(A) 小葉構造内では肝動脈・門脈から中心静脈に向かって血流が流れる。  
(B) 酸素やホルモン・増殖因子、 $\beta$ -カテニンシグナルに勾配が存在する。

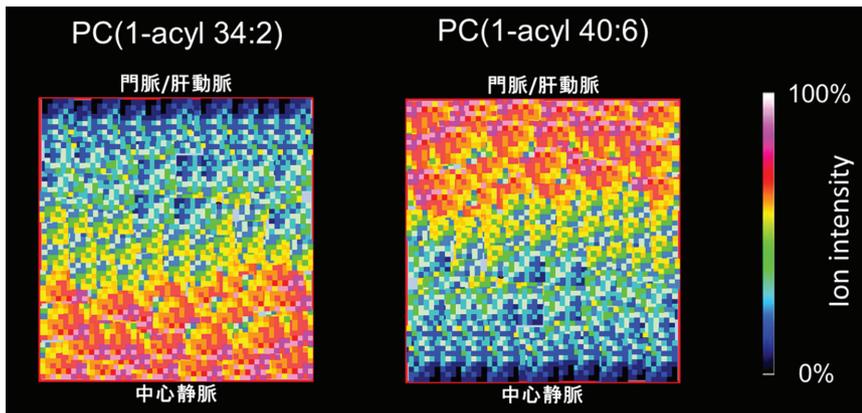


図5 リン脂質の zonation の模式図

PC(1-acyl 34:2) は門脈/肝動脈域よりも中心静脈域に存在量が多く、逆に PC(1-acyl 40:6) は中心静脈域よりも門脈/肝動脈域に存在量が多い。

PC(1-acyl 34:2) は同様に増加が見られるが、PC(1-acyl 36:5), PC(1-acyl 38:6) は逆に増加していた。これらの結果はPC分子の代謝は肝臓の状態に応じて選択的に制御されている可能性を示唆している。

肝臓は小葉構造という中心静脈を中心として肝細胞が板状に整列した六角柱の集合体であり、六角柱の頂点には小葉間門脈、小葉間肝動脈、小葉間胆管が存在している(図4)。興味深いことに小葉構造内には「zonation」と呼ばれる「門脈、肝動脈域から中心静脈域にかけて分子の分布勾配」が存在する<sup>19)</sup>。この分布勾配を生み出す一因は肝動脈・門脈から中心静脈に向かって流れる血流であり、酸素を例にとると、血流が流入してくる肝動脈域の方が中心静脈域より酸素濃度が高くなる。これまでインスリンなどのホルモン、Wnt/ $\beta$ -カテニンなどシグナル分子のzonationが報告されている。また慢性肝炎などの病態時には、門脈域付近でリンパ球浸潤を伴う肝細胞脱落(架橋壊死, bridging necrosis)や高度の線維化(架橋線維化, bridging fibrosis)が観察される<sup>20)</sup>。しかしながら、これまで脂質分子のzonationは報告されていなかった。筆者らは質量顕微鏡法を用いて肝切片上のリン脂質分布を可視化することでPC(1-acyl 34:2)が中心静脈域から門脈肝動脈に向かって減少していること、逆にPC(1-acyl 40:6)では中心静脈域から門脈肝動脈に向かって増加していることを明らかとした(図5)。二つのPC分子種の勾配の向きが逆になっていることは、PC分子種が領域によって異なる代謝調節を受けている可能性を示唆している。

## 6. おわりに

上記のように肝再生時の脂肪肝は再生に必須な善玉脂肪肝であるが、肥満などの病的因子で誘導される脂肪肝は再生不全を示す悪玉脂肪肝と考えられている<sup>21-24)</sup>。悪玉脂肪肝の肝再生不全の原因は不明であるが、蓄積する脂質分子の構成や分布の差異が影響している可能性が考えられる。質量顕微鏡法を用いてこれら脂肪肝を比較することで、その一因を明らかにすることが期待される。また病態の程度に相関して変動する脂質を同定することで新たなバイオマーカーとしての利用が期待される。

## 謝辞

本稿に紹介した質量顕微鏡法による研究は、島津製作所(基盤技術研究所)の小河潔氏の協力のもと行われました。この場をお借りして感謝申し上げます。

## 文 献

1) Higgins, G.M. & Anderson, R.M. (1931) *Arch. Pathol.*, **12**, 186-202.

2) Taub, R. (2004) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **5**, 836-847.  
 3) Newberry, E.P., Kennedy, S.M., Xie, Y., Luo, J., Stanley, S.E., Semenkovich, C.F., Crooke, R.M., Graham, M.J., & Davidson, N.O. (2008) *Hepatology*, **48**, 1097-1105.  
 4) Srinivasan, S.R., Chow, C.K., & Glauert, H.P. (1990) *Toxicology*, **62**, 321-332.  
 5) Shteyer, E., Liao, Y., Muglia, L.J., Hruz, P.W., & Rudnick, D. A. (2004) *Hepatology*, **40**, 1322-1332.  
 6) Walldorf, J., Hillebrand, C., Aurich, H., Stock, P., Hempel, M., Ebensing, S., Fleig, W.E., Seufferlein, T., Dollinger, M.M., & Christ, B. (2010) *Scand. J. Gastroenterol.*, **45**, 468-476.  
 7) 河野 望, 井上貴雄, 新井洋由 (2010) 生化学, **83**, 462-474.  
 8) van den Bout, I. & Divecha, N. (2009) *J. Cell Sci.*, **122**, 3837-3850.  
 9) Stoekli, M., Chaurand, P., Hallahan, D.E., & Caprioli, R.M. (2001) *Nat. Med.*, **7**, 493-496.  
 10) Harada, T., Yuba-Kubo, A., Sugiura, Y., Zaima, N., Hayasaka, T., Goto-Inoue, N., Wakui, M., Suematsu, M., Takeshita, K., Ogawa, K., Yoshida, Y., & Setou, M. (2009) *Anal. Chem.*, **81**, 9153-9157.  
 11) 倉部誠也, 杉浦悠毅, 瀬藤光利 (2010) 実験医学, **28**, 21-26.  
 12) Shimma, S., Sugiura, Y., Hayasaka, T., Zaima, N., Matsumoto, M., & Setou, M. (2008) *Anal. Chem.*, **80**, 878-885.  
 13) Goto-Inoue, N., Hayasaka, T., Sugiura, Y., Taki, T., Li, Y.T., Matsumoto, M., & Setou, M. (2008) *J. Chromatogr. B—Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **870**, 74-83.  
 14) Zaima, N., Hayasaka, T., Goto-Inoue, N., & Setou, M. (2009) *J. Oleo Sci.*, **58**, 415-419.  
 15) Hayasaka, T., Goto-Inoue, N., Sugiura, Y., Zaima, N., Nakanishi, H., Ohishi, K., Nakanishi, S., Naito, T., Taguchi, R., & Setou, M. (2008) *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **22**, 3415-3426.  
 16) Miyamura, N., Nakamura, T., Goto-Inoue, N., Zaima, N., Hayasaka, T., Yamasaki, T., Terai, S., Sakaida, I., Setou, M., & Nishina, H. (2011) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **408**, 120-125.  
 17) Zaima, N., Matsuyama, Y., & Setou, M. (2009) *J. Oleo Sci.*, **58**, 267-273.  
 18) van Ginneken, V., Verhey, E., Poelmann, R., Ramakers, R., van Dijk, K.W., Ham, L., Voshol, P., Havekes, L., Van Eck, M., & van der Greef, J. (2007) *Biochim. Biophys. Acta (BBA)—Mol. Cell Biol. Lipids*, **1771**, 1263-1270.  
 19) Torre, C., Perret, C., & Colnot, S. (2011) *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **43**, 271-278.  
 20) Reddy, S.K., Steel, J.L., Chen, H.-W., DeMateo, D.J., Cardinal, J., Behari, J., Humar, A., Marsh, J.W., Geller, D.A., & Tsung, A. (2012) *Hepatology*, **55**, 1809-1819.  
 21) Murata, H., Yagi, T., Iwagaki, H., Ogino, T., Sadamori, H., Matsukawa, H., Umeda, Y., Haga, S., Takaka, N., & Ozaki, M. (2007) *J. Gastroenterol. Hepatol.*, **22**, 2173-2180.  
 22) Yang, S.Q., Lin, H.Z., Mandal, A.K., Huang, J., & Diehl, A.M. (2001) *Hepatology*, **34**, 694-706.  
 23) Selzner, M. & Clavien, P.-A. (2000) *Hepatology*, **31**, 35-42.  
 24) Yamamoto, K., Takada, Y., Fujimoto, Y., Haga, H., Oike, F., Kobayashi, N., & Tanaka, K. (2007) *Transplantation*, **83**, 257-262.