

MALDI-TOF/MS による 1 細胞のリン脂質解析

榎	本	愛	子*1
伊集	院	智	$ + ^{*1}$
谷	本	典	之*1

Single-Cell Analysis of Phospholipids by Matrix Asisted Laser Desorption Ionization / Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF/MS)

Aiko ENOMOTO Tomoko IJUIN Noriyuki TANIMOTO

It is thought that cancer cells have composition and material property characteristics different from those of normal cells. However, since each cancer cell has different properties, characteristic analysis of single cells is an effective method of assessing malignancy of cancer cells.

By capturing cells using Dielectrophoresis microwell array technology developed by Tosoh and adding a matrix agent to the plate, we detected the phospholipid of a single cell in a micropore by MALDI-TOF/MS analysis. Measuring phospholipids of model cancer cells with different malignancies by this method suggests that the composition ratio of phosphatidylinositol, which is a kind of phospholipid, varies depending on malignancy.

1. はじめに

がん細胞は成分組成、物性などにおいて正常細胞と 異なる特徴を有すると考えられている。しかし、がん 細胞は1細胞ごとに性質が異なる為、細胞単位での特 性解析が、がん細胞の悪性度(転移能)評価を行う上 で有効である。

細胞の成分を測定、同定する技術として、質量分析 が挙げられる。MALDI-TOF/MS(Matrix Assisted Laser Desorption-Time of Flight / Mass Spectrometry) は、マトリックスと呼ばれるイオン化促進試薬と試料 を混合し、レーザーを照射することでイオン化を行う 質量分析法の一種である。試料分子を壊さないソフト なイオン化と高感度な検出が可能であり、生体分子な どの測定に広く用いられる。

Kawashima らは、MALDI-IMS により 10 μ m 直径 のレーザーで組織切片を測定することで、がん細胞の リン脂質測定を行った¹⁾。レーザー径を細胞のサイズ より小さくすることで、1 細胞のみのリン脂質 MS ス ペクトルを得ることは可能だが、細胞が多数連なった 組織を測定する以上、複数の細胞にまたがってレー ザーが照射されてしまう可能性がある。単一細胞のス ペクトルを確実に得るためには、個々に分離した細胞 の質量分析を行う必要がある。

2. がんとリン脂質

がんは遺伝子の病気である。正常な体細胞の遺伝子 が外部因子によって突然変異を起こして細胞自体の形 態や性質を変え、無制限に増殖した結果が「がん」で ある。がん細胞の形質変化は細胞同士の接合や細胞骨 格、細胞膜の構造など細胞表面に表れることが知られ ている。がん細胞の細胞膜は正常の細胞と同様にリン 脂質を主な成分としているが、その構成比は正常細胞 と異なり、さらにがんの悪性度によっても異なること がヒトの肝細胞がん組織²⁾ や乳がん組織¹⁾で報告さ

^{*1 (㈱}東ソー分析センター 解析グループ

れている。

リン脂質は、グリセリンやセラミドにリン酸と脂肪 酸が結合し、さらにリン酸にアルコールがエステル結 合した構造を持つ。親水性頭部の種類によっていくつ かのクラスに分別され、疎水性尾部の2本の脂肪酸の 炭素数および二重結合数の違いにより、分子種は数千 種になる。細胞膜は細胞と外環境を隔てるために両親 媒性のリン脂質を主要成分として構成されており、細 胞における数々の調節反応に関与していることが知ら れている。リン脂質の機能として、細胞形態変化の誘 導や細胞増殖シグナルの促進、アクチン細胞骨格系を 再構築するセカンドメッセンジャーの役割などが挙げ られる。

がんとリン脂質の関係については多くの報告がある。 リン脂質の一種であるホスファチジルセリン(Fig. 1 a) はがん細胞の増殖に関わるシグナル経路を制御す ることや、ホスファチジルイノシトール(Fig. 1b) のリン酸化は細胞増殖を促進する遺伝子の活性化に関 与することが知られている。リン脂質の解析はがんの メカニズムを知るうえで非常に重要であり、がん細胞 の増殖を抑制する新規創薬ターゲットの探索において 細胞のリン脂質解析手法の確立は大きな意義がある。

3. 平面プレートを用いた細胞リン脂質測定

MALDI-TOF/MSによる測定では、通常、マトリッ クスと呼ばれるイオン化促進剤と試料を溶媒に溶解 し、混液を滴下後、室温風乾により結晶を作製する手 法(Dried-Droplet法)によって、測定試料の前処理 を行う。測定用プレートには導電性材料が用いられ、 通常は金属製または導電性ポリマー製の平面プレート 上に、Dried-Droplet法によりマトリックスー試料結



Fig. 1 Structure of Phospholipids, (a) Phosphatidylserine, (b) Phosphatidylinositol

晶を作製する。導電性ポリマー製の平面ディスポーザ ブルプレート(FlexiMass-DS Targets:島津製作所製) 上に、モデルがん細胞とマトリックスの混合結晶を作 製し、リン脂質の測定を試みた。

[1] 前処理

細胞表面のリン脂質を検出するためには、MALDI -TOF/MS 測定用サンプルプレート(FlexiMass-DS Targets:島津製作所製)に対象となる細胞とマトリッ クスの混合物を載せる必要がある。細胞の調製には一 般的にリン酸緩衝生理食塩水(PBS)等の等張液を使 用することが多いが、PBSで懸濁した細胞をサンプル プレート上に滴下し、乾燥させると塩が析出するため、 良好なスペクトルが得られない可能性が高い。多量の 塩はしばしば目的成分のイオン化を妨げるため、サン プルの脱塩が必須となる。そこで、細胞懸濁液をマト リックスで洗浄後にサンプルプレート上に載せる方 法³⁾を検討した。

サンプルとして肺がん細胞株である PC-9(非小細 胞肺がん)、マトリックスは 9-アミノアクリジン(9 -AA)を用いて試料作製を行った。サンプルプレート にエタノールで溶解した 9-AA を滴下、乾燥後に 9-AA 水溶液で洗浄及び懸濁した細胞サンプルを 10 細胞 / spot となるように滴下し、乾燥した。測定直前にエ タノールを滴下し、再結晶化後に測定を行った。

[2] MALDI-TOF/MS 測定

MALDI-TOF/MSの測定方法の検討を行った。 MALDI-TOF/MSはMALDI-7090(島津製作所製) を使用し、固体UVレーザー(355nm)で測定を実施 した。測定モードは negative モード(陰イオン検出モー ド)、レーザー径は100 μ m、レーザー強度は70~90 とした。直径1mm以上あるマトリックス結晶中から、 直径10~20 μ m 程度の1細胞を見つけるのは、装 置付属のCCD カメラの倍率、分解能では困難である (Fig. 2)。そこで、レーザーを少しずつ走査しながら



Fig. 2 (A) Digital microscope image of Matrix- cells cocrystal on flat plate (×50), (B) CCD camera image of Cocrystal

スペクトルを確認し、リン脂質由来と推定されるピー クを検出次第、照射を停止する手法を取った。

Fig. 3 に PC-9 細胞の MALDI-TOF/MS スペクト ルを示す。m/z = 835、861、885 周辺に検出されたイ オンは、質量からホスファチジルイノシトール (PI) 由来と推定された。いずれのイオンも検出量が小さく、 S/N(シグナルノイズ比)は1~6 程度と低感度であっ た。原因として、結晶中の細胞位置が分からないため、 レーザーが細胞の一部分にしか当たらず、イオン化量 の減少、すなわち感度の低下を招いていたことが推測 される。

4. 微細孔基板を用いたリン脂質測定

平面プレート上の結晶中の細胞探索は困難である と考え、東ソー(㈱が開発した CTC (Circulate Tumor Cells) 捕捉用の微細孔アレイ基板⁴⁾ を使用し、捕捉 したがん細胞を MALDI-TOF/MS により測定する手 法を検討した。

[1] 前処理

細胞を一つずつ測定するために、ライフサイエンス 研究所で開発した微細孔アレイ基板を用いた試料作製 を検討した。微細孔アレイ基板上にマンニトール水溶 液で懸濁した細胞を導入し、自然に微細孔内に細胞が 沈殿したのを確認した後、マンニトール水溶液を除去 してマトリックスを導入後に乾燥させた。しかし、デ ジタルマイクロスコープ(キーエンス製、VHX-900) で撮影を行ったところ、沈殿していた細胞がマトリッ クスの結晶化とともに微細孔外に出てしまっており、 測定が難しいことが分かった。

そこで、微細孔アレイ基板上にマンニトール水溶液 で懸濁した細胞を導入後、誘電泳動により微細孔内に 細胞を捕捉した⁴⁾。ポリ-L-リジンによって細胞を基 板に固定した後、マトリックス溶液で洗浄し、さらに



Fig. 3 MALDI-TOF/MS spectra of single malignant cell on flat plate

マトリックスを加えて室温風乾した。デジタルマイク ロスコープで確認したところ、いくつかの細孔内に細 胞が捕捉されていることが確認できた。

[2] MALDI-TOF/MS 測定

MALDI-TOF/MS 付属の CCD カメラ画像で、基 板の各微細孔が視認出来た(Fig. 4)。各微細孔の直 径が 30 μ m、微細孔の間隔が 20 μ m であることから、 微細孔内全体をレーザー照射でき、かつ隣接する微細 孔が照射範囲内に入らないよう、レーザー径を 50 μ mに設定した。レーザーの照射位置を細孔に合わせ て調整し、スペクトルを取得した。Fig. 5 に MALDI -TOF/MS スペクトルを示す。m/z = 835 (16:0/ 18:1)、861 (18:0/18:2)、885 (18:0/20:4) に PI 由来イオンが観測された。

平面プレートを用いた測定時と比較して、微細孔基 板で測定したスペクトルの方が、S/N = 7~55と改 善しており、感度が高くなる傾向が見られた。原因と して、微細孔を CCD カメラで視認できるようになっ たことで、細胞全体をレーザー照射範囲内に収められ るようになったことが考えられる。その他に、レーザー 径が小さくなったことによるノイズの低減なども考え られる。平面プレートで測定した際には、結晶中の細 胞にレーザーが照射される確率を少しでも大きくする ために、レーザー径を 100 μmとして測定を行ってい



Fig. 4 images of micropores, (A) Digital microscope , (B) CCD camera equipped in MALDI-TOF/MS



Fig. 5 MALDI-TOF/MS spectrum of single cancer cell in micropore

た。微細孔を用いた測定では、CCD カメラで細孔が 確認できるため、おおよその細胞位置が推定できる。 そのため、レーザー径を 50 μ m に絞ることが可能と なり、細胞以外の夾雑物のイオン化が抑えられた可能 性がある。

5. 悪性度の異なる細胞のリン脂質組成比較

4. で確立した1細胞測定技術を用いて、悪性度の異 なるがん細胞のリン脂質組成比較を行った。

悪性度の異なるがん細胞(非小細胞肺がん PC-9:悪性度中、非小細胞肺がん PC-14:悪性度高)について、4. [1]の手法で試料調製した。



Fig. 6 MALDI-TOF/MS spectra of malignant cell, PC-9(low-grade) and PC-14(high-grade)

MALDI-TOF/MS スペクトルを Fig. 6 に示す。PC -9、PC-14 それぞれについて、複数の微細孔で測定 を行った。PC-9 では m/z = 885 (18:0/20:4)の PI が高い強度で検出されているのに対し、PC-14 では m/z = 863 (18:0/18:1)、835 (16:0/18:1)の PI が高 強度で検出されている。悪性度の異なるがん細胞間で、 PI 組成比の有意な差が見られた。

6. まとめ

1細胞のリン脂質組成を確認するため、モデルがん 細胞の MALDI-TOF/MS 測定を行った。

Dried-Droplet 法による測定では細胞探索が困難で あった。CTC 検出装置用の微細孔アレイ基板を用い、 1 細胞の MALDI-TOF/MS 測定を実施した。その結 果、PC、PI由来イオンの検出に成功した。従来のプレー トを用いた手法と比較し、細胞探索が容易となり、感 度も上昇する傾向が見られた。

本手法は、CTC1細胞の悪性度評価の手法として利 用できる可能性がある。

7. 謝辞

本研究は東ソー(㈱ライフサイエンス研究所細胞診断 グループおよび調査・企画 グループの技術的指導、 微細孔基板の提供を受けて実施致しました。ご協力項 いた方々に、感謝を申し上げます。

参考文献

- M. Kawashima, N. Iwamoto, N. Kawaguchi-Sakita, M. Sugimoto, T. Ueno, Y. Mikami, K. Terasawa, TA. Sato, K. Tanaka, K. Shimizu, M. Toi, Cancer Sci. 2013 Oct;104(10):1372-9.
- Y. Morita, T. Sakaguchi, K. Ikegami, N. Goto

 Inoue, T. Hayasaka, VT. Hang, H. Tanaka, T.
 Harada, Y. Shibasaki, A. Suzuki, K. Fukumoto,
 K. Inaba, M. Murakami, M. Setou, H. Konno, J
 Hepatol. 2013 Aug;59(2):292-9
- 3) X. Zhang, M. Scalf, TW. Berggren, MS. Westphall, LM.Smith, J Am Soc Mass Spectrom.Apr;17(4):490 -499,(2006).
- 4)最上聡史、森本篤史、飯嶋和樹、秋山泰之、片山 晃治、二見達、東ソー研究・技術報告、58(2014)