

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 24 日現在

機関番号：13802

研究種目：若手研究（S）

研究期間：2008～2012

課題番号：20670004

研究課題名（和文） 多次元オミックス脳解剖

研究課題名（英文） Multidimensional omics analyses of brain anatomy

研究代表者

瀬藤 光利（SETOU MITSUTOSHI）

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：20302664

研究成果の概要（和文）：代表者自ら開発した質量顕微鏡システムを用いて、モデル動物の脳神経系、ヒト死後脳を解析し、脂質、ペプチド、低分子代謝物の部位・細胞特異的な局在を明らかにした。さらに、ヒト疾患脳を解析することで新しい疾患マーカーの候補を提示できた。また、動物モデルを用いて、脳神経系疾患の経時変化を解析し、脂質や低分子代謝物の時空間的な変動を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Using imaging mass spectrometry we developed, we analyzed nervous system in animal models and postmortem human brains. We revealed very unique region-specific or cell type-specific localization of lipids, peptides, and low-molecular metabolites. Furthermore, we offered some candidates for new disease markers by analyzing the human diseased brain. Using animal models, to analyze the time course of brain diseases, we identified spatiotemporal changes of low molecular weight metabolites and lipids. We achieved the multidimensional omics analyses of brain anatomy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	14,100,000	4,230,000	18,330,000
2009年度	16,000,000	4,800,000	20,800,000
2010年度	16,000,000	4,800,000	20,800,000
2011年度	16,000,000	4,800,000	20,800,000
2012年度	16,000,000	4,800,000	20,800,000
総計	78,100,000	23,430,000	101,530,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学、神経解剖学・神経病理学

キーワード：リポドーム、メタボローム、オミックス、質量顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

(1) 質量分析を用いたメタボロームやプロテオームのポストゲノム研究の一大潮流は世界の医学生物学の研究を大きく変えつつあり、その波は神経科学にも押し寄せてきていた。研究代表者は 2005 年には全米科学者協会（AAAS：サイエンス誌上部団体）から指名され Molecular Imaging 部会で招待講演を行ったように、研究開始当初より質量顕

微鏡法の第一人者であった。代表者の技術は、共同開発した島津製作所の吉田氏や田中氏のノーベル賞受賞成果を源流とし、日本発のオリジナリティで研究開始当初から世界をリードしていた。

(2) 急速な高齢化社会を迎えて医学の進展が社会から期待されているが、日本は米国に比べ基礎医学の予算も論文数も 10 分の 1 と

遅れていた。その中で、代表者は日本から神経科学、特にチュブリン上のモーター蛋白質に関して、*Science* 2000, *Nature* 2002 を筆頭著者で発表し、さらに、シナプスの翻訳後修飾による制御に関して *PNAS* 2007, *Cell* 2007 を責任著者として発表して世界に伍してきた。

2. 研究の目的

(1) 研究代表者が開発した質量顕微鏡システム (iMScope) を用いて、モデル動物の脳神経系における脂質や糖脂質、低分子代謝物といったメタボローム、さらに翻訳後修飾も考慮にいたれたプロテオームの分布と動態についての解析を完成発表する。

(2) 発達、加齢、記憶学習や飢餓、飽食、睡眠といった生理応答について、脂質、タンパク質、低分子代謝物の時空間動態を多次元オミックス解析する。

(3) 疾患モデルマウスとヒト病理標本の解析で、これまでに予想されていなかった新しい物質の局在や修飾の変化を発見できる可能性があり、病態の新たなバイオマーカーを発見する。

(4) 上記の目標について、随時原著論文とするとともに、研究終了時にとりまとめて教科書とする。

3. 研究の方法

(1) 研究代表者が開発し、システムを確立させた質量顕微鏡システムを用いて、マウスなどのモデル動物について正常の脳神経における脂質、ペプチド、タンパク質、低分子代謝物の解析系を確立し、組織領域特異的、細胞種特異的、さらには細胞内部位特異的な物質分布を解析する。さらに、ここでは実際のヒト死後脳を解析し、多次元メタボローム、プロテオームによるヒト脳マップを作成する。

(2) モデル動物を用いて発達段階、老化、性別、摂食、電気刺激、などの生理刺激に対する脳神経における脂質、ペプチド、タンパク質、低分子代謝物の応答の観察解析を行う。

(3) 物質変化が明らかでないヒト精神疾患病理の質量顕微鏡解析を行い、物質的病理像を探索する。

(4) 上記3項目に共通して、メタボロームマップングについては低分子の多段階質量分析を得意とする QIT-TOF を、リポドームからペプチドームの領域には大気圧多段階質量分析を得意とする AP-IT-TOF を、プロテオームマップングについては高分子領域を得意とする TOF-TOF を用いる。

4. 研究成果

(1) 質量顕微鏡法を用いてオミックス解析を行うための実験系の確立について、多くの成果を得た。

① MALDI-TOF を用いて脳内の脂質や糖脂質といったメタボローム解析を行い、その可視化に成功した (Ageta ら *Med Mol Morphol* 2009, Sugiura ら *PLoS ONE* 2008, Hosokawa ら *JMS* 2008)。

② 検出感度の向上、空間解像度の向上、さらには測定可能分子種数の向上を目指し新規マトリックスの検討を行い、イオン液体を用いたリポドーム (Shrivastava ら *Anal Chem* 2010)、金ナノ粒子を用いたグライコリポドーム (Goto-Inoue ら *JASMS* 2010) に成功した。また、オミックス脳解剖の新技术として、チタンベースのナノ微粒子を用いた質量顕微鏡法を確立することで低分子代謝物の空間分布の可視化に成功した (Shrivastava ら *Anal Chem* 2011)。これらにくわえ、TLC プロットと質量顕微鏡法を組み合わせ、ヒト脳を構成するガングリオシド分子種の分離・同定法の確立にも成功した (Valdes-Gonzalez ら *J Glycom Lipidom* 2011)。

③ 中分子領域の分子種について、同定と組織内分布に関する解釈に成功し、多次元リポドミックスを確立した (Sugiura ら *J Lipid Res* 2009, Hayasaka ら *Lipids* 2009)。

④ 中枢神経系におけるニューロペプチドの分布について、その可視化技術の確立に成功した (Chansela ら *Peptides* 2011)。

⑤ これら多くの新技术および新手法について、質量顕微鏡法をまとめた日本語プロコル本を編集・出版した。さらに、確立した多次元オミックス解剖法について、世界で最初の英文の教科書をチーフエディターとしてシュプリンガー社より出版した。



図 1. 質量顕微鏡法の教科書

(2) 脳神経系の組織領域特異的、さらには細胞内部位特異的な分子分布について解析し、非常に興味深い知見を得た。

① ヒト正常脳の質量顕微鏡解析により、大脳灰白質と白質におけるヒドロキシル化脂質

と非ヒドロキシル化脂質の分布に顕著な差違を見出した (Yuki ら Neuroscience 2011)。

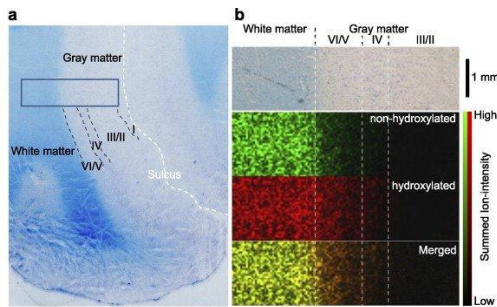


図 2. ヒト大脳における脂質の分布

② 培養神経細胞を用いてサブセラーレベルでの質量顕微鏡解析を行い、神経細胞の細胞体と神経突起における脂質代謝物の局在差異に関する新しい知見を得た (Yang ら Med Mol Morphol 2010)。さらに、神経軸索の基部と遠位部において脂質組成が大きく異なること、その差違を生み出すのにアクチンのダイナミクスが必要であることを発見した (Yang ら J Biol Chem 2012)。

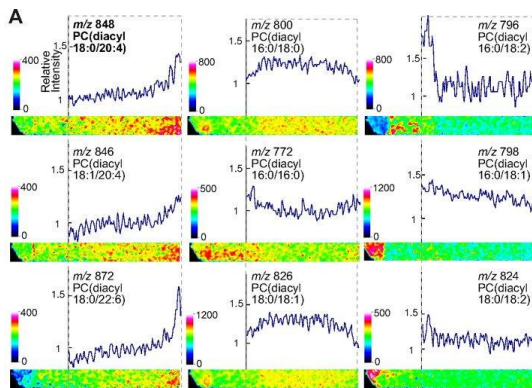


図 3. 軸索内の脂質勾配

③ チュブリンの脱チロシン化・チロシン化に着目し、神経細胞における分子モーターの偏在機構、軸索・樹状突起神経細胞の極性決定を明らかにした (Konishi ら Nat Neurosci 2009)。

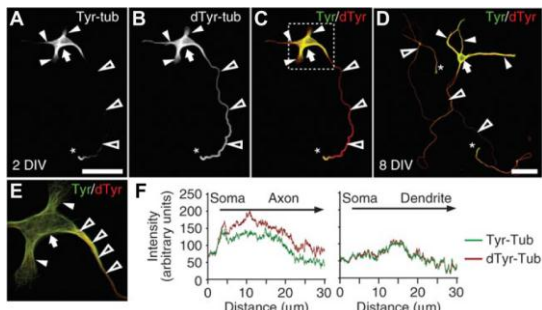


図 4. 軸索におけるチュブリン修飾の偏在

(3) 実際の神経変性疾患や精神神経疾患患者の死後脳を解析し、新しい知見を得た。また疾患モデルを解析し、疾患進行時経時変化

や治療行為に対する代謝応答を多次元的に捉えることに成功した。

① 統合失調症患者の死後脳を質量顕微鏡で解析し、前頭前皮質において特定のリン脂質分子種の分布が異常になっていることを見出した (Matsumoto ら Anal Bioanal Chem 2011)。

② 脳虚血モデルラットの定量的質量顕微鏡解析により、虚血部における特定の脂肪酸を含有するリゾ PC の増加を発見した (Koizumi ら Neuroscience 2010)。

③ カイニン酸投与てんかんモデルマウス脳の質量顕微鏡解析により、てんかん脳における ATP、ADP、AMP 量の海馬内微小領域特異的な変化を可視化し、てんかん時のエネルギー代謝の時空間的可視化に成功した (Sugiura ら PLoS One 2011)。

④ 術後脳浮腫モデルラットを用いた解析から、灌流溶液による脳浮腫の抑制効果の評価に成功した (Koizumi ら World Neurosurg 2011)。

⑤ 脊髄損傷モデルを質量顕微鏡で解析し、リン脂質と脂質代謝物であるプロスタグランジンの時空間的な分布変化を可視化することに成功した (Hanada ら Anal Bioanal Chem 2012)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 20 件)

① Hanada M, Sugiura Y, Shinjo R, Masaki N, Imagama S, Ishiguro N, Matsuyama Y, Setou M, Spatiotemporal alteration of phospholipids and prostaglandins in a rat model of spinal cord injury., Anal Bioanal Chem, 査読有、403 巻、2012、1873-1884

DOI: 10.1007/s00216-012-5900-3

② Yang H, Sugiura Y, Ikegami K, Konishi Y, Setou M, Axonal gradient of arachidonic acid-containing phosphatidylcholine and its dependence on actin dynamics., J Biol Chem, 査読有、287 巻、2012、5290-5300
DOI: 10.1074/jbc.M111.316877

③ Hameed S, Sugiura Y, Kimura Y, Shrivastava K, Setou M, Nanoparticle-assisted Laser Desorption/ionization [nano-PALDI]-based Imaging Mass Spectrometry [IMS] and its Application to Brain Science., Nanomedicine and the Nervous System, 査読有、2012 年、97-118

- [URL:http://www.crcnetbase.com/doi/abs/10.1201/b11835-8](http://www.crcnetbase.com/doi/abs/10.1201/b11835-8)
- ④ Matsumoto J, Sugiura Y, Yuki D, Hayasaka T, Goto-Inoue N, Zaima N, Kunii Y, Wada A, Yang Q, Nishiura K, Akatsu H, Hori A, Hashizume Y, Yamamoto T, Ikemoto K, Setou M, Niwa SI, Abnormal phospholipids distribution in the prefrontal cortex from a patient with schizophrenia revealed by matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry, *Anal Bioanal Chem*, 査読有、400 巻、2011、1933-43 DOI:10.1007/s00216-011-4909-3
- ⑤ Chansela P, Goto-Inoue N, Zaima N, Sroyraya M, Sobhon P, Setou M, Visualization of neuropeptides in paraffin-embedded tissue sections of the central nervous system in the decapod crustacean, *Penaeus monodon*, by imaging mass spectrometry, *Peptides*, 査読有、34 巻、2011、10-18 DOI:10.1016/j.peptides.2011.03.021
- ⑥ Koizumi S, Hayasaka T, Goto-Inoue N, Doi K, Setou M, Namba H, Imaging Mass Spectrometry Evaluation of the Effects of Various Irrigation Fluids in a Rat Model of Postoperative Cerebral Edema, *World Neurosurg*, 査読有、77 巻、2011、153-159 DOI: 10.1016/j.wneu.2011.03.039
- ⑦ Yuki D, Sugiura Y, Zaima N, Akatsu H, Hashizume Y, Yamamoto T, Fujiwara M, Sugiyama K, Setou M, Hydroxylated and non-hydroxylated sulfatide are distinctly distributed in the human cerebral cortex, *Neuroscience*, 査読有、193 巻、2011、44-53 DOI:10.1016/j.neuroscience.2011.07.045
- ⑧ Shrivas K, Hayasaka T, Sugiura Y, Setou M, Method for Simultaneous Imaging of Endogenous Low Molecular Weight Metabolites in Mouse Brain Using TiO₂ Nanoparticle in Nanoparticle-Assisted Laser Desorption/Ionization-Imaging Mass Spectrometry, *Anal Chem*, 査読有、83 巻、2011、7283-7289 DOI: 10.1021/ac201602s
- ⑨ Valdes-Gonzalez T, Goto-Inoue N, Hayasaka T, Ishiyama H, Setou M, Taki T, Imaging Technology of Complex Lipid Molecular Species by a Combination of TLC-Blot and MALDI-TOF ?Special Reference to Human Brain Ganglioside Molecular Species., *J Glycom Lipidom*, 査読有、1 巻、2011、1000104 (全 6 頁) DOI:10.4172/2153-0637.1000104
- ⑩ Sugiura Y, Taguchi R, Setou M, Visualization of Spatiotemporal Energy Dynamics of Hippocampal Neurons by Mass Spectrometry during a Kainate-Induced Seizure, *PLoS One*, 査読有、6 巻、2011、e17952 [URL:http://www.plosone.org/article/info:doi/10.1371/journal.pone.0017952](http://www.plosone.org/article/info:doi/10.1371/journal.pone.0017952)
- ⑪ Shrivas K, Hayasaka T, Goto-Inoue N, Zaima N, Setou M, Ionic matrix for enhanced MALDI imaging mass spectrometry for identification of phospholipids in mouse liver and cerebellum tissue sections, *Anal Chem*, 査読有、82 巻、2010、8800-8806 [URL:http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac102422b](http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac102422b)
- ⑫ Yang HJ, Ishizaki I, Sanada N, Zaima N, Sugiura Y, Yao I, Ikegami K, Setou M, Detection of characteristic distributions of phospholipid head groups and fatty acids on neurite surface by time of flight-secondary ion mass spectrometry, *Med Mol Morphol*, 査読有、43 巻、2010、158-164 [URL:http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00795-009-0487-2](http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00795-009-0487-2)
- ⑬ Koizumi S, Yamamoto S, Hayasaka T, Konishi Y, Yamaguchi-Okada M, Goto-Inoue N, Sugiura Y, Setou M, Namba H, Imaging mass spectrometry revealed the production of lyso-phosphatidylcholine in the injured ischemic rat brain, *Neuroscience*, 査読有、168 巻、2010、219-225 [URL:http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306452210004513](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306452210004513)
- ⑭ Goto-Inoue N, Hayasaka T, Zaima N, Kashiwagi Y, Yamamoto M, Nakamoto M, Setou M, The detection of glycosphingolipids in brain tissue sections by imaging mass spectrometry using gold nanoparticles, *J Am Soc Mass Spectrom*, 査読有、21 巻、2010、1940-1943 [URL:http://link.springer.com/article/10.1016%2Fj.jasms.2010.08.002](http://link.springer.com/article/10.1016%2Fj.jasms.2010.08.002)
- ⑮ Hayasaka T, Goto-Inoue N, Zaima N, Kimura Y and Setou M, Organ-specific distributions of

lysophosphatidylcholine and triacylglycerol in mouse embryo.、Lipids、査読有、44 巻、2009、837-848
[URL:http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11745-009-3331-5](http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11745-009-3331-5)

- ⑩ Sugiura Y, Konishi Y, Zaima N, Kajihara S, Nakanishi H, Taguchi R, Setou M、Visualization of the cell-selective distribution of PUFA-containing phosphatidylcholines in mouse brain by imaging mass spectrometry.、Journal of Lipid Research、査読有、50 巻、2009、1776-1788

[URL:http://www.jlr.org/content/50/9/1776.full.pdf](http://www.jlr.org/content/50/9/1776.full.pdf)

- ⑪ Ageta H, Asai S, Sugiura Y, Goto-Inoue N, Zaima N, Setou M、Layer-specific sulfatide localization in rat hippocampus middle molecular layer is revealed by nanoparticle-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry.、Medical Molecular Morphology、査読有、42 巻、2009、16-23

[URL:http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00795-008-0427-6](http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00795-008-0427-6)

- ⑫ Konishi Y, Setou M、Tubulin tyrosination navigates the kinesin-1 motor domain to axons, Nat Neurosci、査読有、12 巻、2009、559-567

<http://www.nature.com/neuro/journal/v12/n5/pdf/nn.2314.pdf>

- ⑬ Sugiura Y, Shimma S, Konishi Y, Yamada M, Setou M、Imaging Mass Spectrometry technology and the application on ganglioside study; Visualization of Age-dependent Accumulation of C20-Ganglioside Molecular Species in the Mouse Hippocampus.、PLoS ONE、査読有、3 巻、2008、E3232

[URL:http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0003232](http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0003232)

[学会発表] (計 6 件)

- ① 瀬藤光利、生体サンプルの MALDI イメージング質量分析に関する研究、日本質量分析学会総会 日本質量分析学会奨励賞受賞講演(特別講演)、2012 年 6 月 1 日、東京
- ② 瀬藤光利、オーム研究と解析技術/神経、第 84 回日本生化学会大会 (座長・一般講演)、2011 年 9 月 23 日、国立京都国際会館 (京都)

- ③ 瀬藤光利、質量顕微鏡による精神疾患研究、第 6 回日本統合失調症学会 (特別講演)、2011 年 7 月 19 日、札幌コンベンションセンター(札幌)

- ④ Setou M、Mass Microscopy revealed the polarized distribution of membrane lipids in axons, The 10th Biennial Meeting of the Asia-Pacific Society for Neurochemistry、2010 年 10 月 19 日、Phuket(タイ)

- ⑤ Setou M、Human Brain Pathology with Mass Spectrometry Imaging、Stanley Center Seminar、2008 年 12 月 10 日、Cambridge(イギリス)

- ⑥ Setou M、Mass Imaging of Dynamic Metabolomics in Kainate signaling、Gordon Research Conferences Molecular and Cellular Neurobiology、2008 年 6 月 8~13 日、Hong Kong(中国)

[図書] (計 2 件)

- ① 瀬藤光利、羊土社、実験医学 時間的・空間的な生命現象理解のための最新テクノロジー、2010、4

- ② Setou M、Springer、Imaging Mass Spectrometry; Protocols for Mass Microscopy、2010、262

- ③ 瀬藤光利、シュプリンガー・ジャパン株式会社、質量顕微鏡法: イメージングマスマスペクトロメトリー 実験プロトコール、2008、189

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://www.hama-med.ac.jp/university/ch>

air/setou/ja/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

瀬藤 光利 (SETOU MITSUTOSHI)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：20302664

(2) 研究分担者 なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 なし ()

研究者番号：