

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 17 日現在

機関番号：72609

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2016

課題番号：24590457

研究課題名(和文) 脂質の可視化と病理診断への応用

研究課題名(英文) Visualization of lipid metabolism and its application to molecular pathology

研究代表者

岩屋 啓一 (Iwaya, Keiichi)

公益財団法人佐々木研究所・附属研究所・研究員(移行)

研究者番号：50312012

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：脂質は、生命を維持するうえで重要な役割を担っている。体内で最も豊富にみられる脂質のひとつにtriacylglycerol (TG)がある。TGは、Hematoxylin eosin 染色で観察する場合、経験的に存在していたと推定される空隙として観察するに留まる。そこで、MS(質量分析 mass spectrometry)イメージングを用いてマウス脂肪肝モデルを解析した。画像は、従来の染色法に比べて定性、定量性に優れていた。さらに、脂肪滴内のTGは、食餌内(ブタ)のTGにおけるパルミチン酸の位置(J2)が外側(G1 or G3)に変化したマウスTGとして肝臓内に蓄積していることが証明された。

研究成果の概要(英文)：Lipids are important biological substances that are involved in signaling roles and energy storages. Among them triacylglycerol (TG) is a major component of food and animal fats. Excess amount of TG storages induce metabolic diseases such as type 2 diabetes and coronary heart disease. Because visceral TG significantly affects human health, we analyzed TG in fatty liver.

TG species in fatty liver can be detected by imaging mass spectrometry (IMS) and the results provided a reliable distribution map of the TG peaks. Compared with histological analyses, IMS provided better semi-quantitative visualisation of preferred TG peaks in liver specimens and would thus serve as a useful tool for clinical and other estimations of fatty liver. Analysis using MS/MS showed a structural change between liver TG and dietary TG. These findings suggest that MALDI-SpiralTOF is a powerful tool for clinical screening and estimating fatty liver, and that resveratrol improves fatty liver.

研究分野：病理診断

キーワード：質量分析 レスベラトロール 脂質 脂肪肝 マクロファージ 中性脂肪 脂肪酸

1. 研究開始当初の背景

個々の癌細胞で亢進している運動を反映する異常なシグナルを捉えてその意義を明らかにしてきた。そして、膜を構成する脂質のシグナルが重要な役割を果たしている可能性に行き着いた。

2. 研究の目的

細胞膜を構成する代表的な脂質として人癌組織における PI(3,4,5)P3 を可視化することを目指した。その前段階として、マウス脂肪肝モデルを用いて triacylglycerol (TG)の可視化を行い、実験系を確立することを研究の目標とした。

3. 研究の方法

MALDI TOF-TOF tandem MS (質量分析 mass spectrometry) を用いて脂質の発現と構造解析を行う。脂質が有する様々な構造変化を直接捉えて、微細な構造変化を反映したシグナルを正確に感知してスキャンする。そして、多彩な構造変化に対応した脂質発現の空間的な情報を構築する。

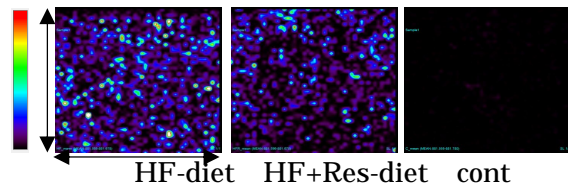
4. 研究成果

脂質は体の代謝に dynamic に関わっている。脂質は、特にエネルギー代謝に直接関与し、生命を維持するうえで重要な役割を担っている。体内で最も豊富にみられる脂質のひとつに triacylglycerol (TG)がある。TG は肉食物内にも多く含まれ、糖尿病や冠動脈疾患などの最も代表的な生活習慣病に関与している。Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)もそのひとつで、内臓に蓄積する脂肪は健康に密接に関連している。

極めて重要な役割を担う脂質であるにもかかわらず、その発現を組織レベルで観察することは難しい。最も豊富にみられる TG でさえも、通常の Hematoxylin and eosin (HE) 染色で観察する場合、標本作成過程において脂溶性の溶媒に溶解込み、経験的に存在していたと推定される空隙として観察するに留まる。従って、実際の TG の発

現量や、その構造自体を検索することは不可能である。そこで、脂肪肝マウス動物モデルを用いて、TG の可視化を試みた。

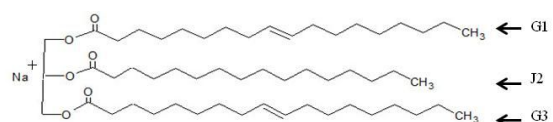
マウスに豚脂肪が豊富に含まれる high-fat diet を与え、脂肪肝モデルを作成した。脂肪組織内には、HE 染色にて、肝細胞内に蓄積したと思われる大小空隙が観察され、いわゆる組織学的な脂肪肝を形成することが確認された。このマウスモデルに high-fat diet に加えてレスベラトロールを与えると、体重や肝臓自体の重量は high-fat diet のマウスとほぼ同様の増加を認めるが、肝細胞内に蓄積したと思われる大小空隙は明らかに減少した。通常食のマウス肝を陰性コントロールとして、これらの肝臓を対象に MS イメージングを用いてマウス脂肪肝モデルを解析した。



画像は、従来の H & E 染色が、標本の空隙を評価して間接的に TG を評価したのに比べて定性、定量性に優れる。図を参照するとレスベラトロール (天然抗酸化剤、HF+Res-diet) を添加することにより、高脂肪食に比べて脂肪滴の大きささと数が減少した。MS イメージは、TG の発現を可視化し、その発現を客観的に評価しえた。

MALDI-Spiral TOF-TOF (MS/MS)モードを用いることにより、脂肪滴内の TG は、食餌内 (ブタ) の TG におけるパルミチン酸の位置 (J2) が外側 (G1 or G3) に変化したマウス TG であることが証明された。

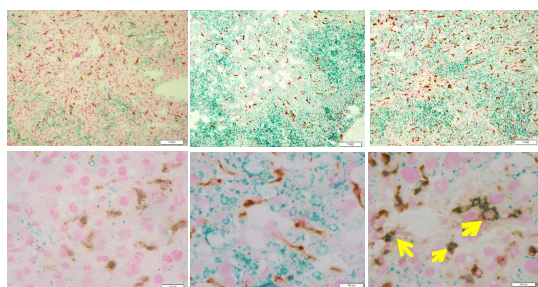
(下図)



質量分析器により、TG の詳細な構造解析とその発現がマウス脂肪肝モデルにて可能

となった。

レスベラトロールはブドウやベリー、あるいはピーナッツなどに豊富に含まれる天然ポリフェノールである。レスベラトロールが脂肪肝を改善することは良く知られるが、その機序については不明であった。そこで、レスベラトロールの投与の有無による脂肪肝の蛋白質プロファイルの変化を質量分析器による網羅的プロテオーム解析を行った。33種類の物質において有意な発現量の変化がみられた。このうち15物質では、レスベラトロールの投与により up regulate され、18物質では down regulate された。Down regulate された物質のなかで、アディポフィリンの変化が顕著であった。アディポフィリンは脂肪滴を被包する膜を構成するひとつの物質である。一方、肝臓組織におけるセルソーターを用いた検討では、肝臓マクロファージが増加した。そこで、脂肪肝モデルにおける組織内で、アディポフィリンとマクロファージの局在を調べた。下図に、アディポフィリン:緑、マクロファージ:茶色、肝細胞:ピンクの組織分布を示す。



コントロールに比べて、脂肪肝では緑のアディポフィリンが増加している。レスベラトロールの添加により茶色のマクロファージが増加して緑のアディポフィリンを取り込んでいる。(黄色の矢印)このことから、免疫細胞であるマクロファージが、レスベラトロールの作用により活性化され、TGの肝臓内蓄積を防ぐ脂肪代謝に関与する可能性が示唆された。そして、免疫機構が脂肪代謝に関与するひとつの査証となった。

(Mol Nutr Food Res. 2015 Feb 12. doi: 10.1002/mnfr.201400564)

今回の検討では、古くより言い伝えられたフレンチパラドクス(ワインと一緒に摂食すると健康になる)の機序の一端が明らかになった。MS イメージは脂質の存在を空間的に解析し、かつその詳細な構造を決定することができる。いままで、疎水性の物質は臨床病理学的なマーカーとしては不向きであったが、この手法を用いて従来の方法と重ね合わせて解析することにより、解明が難しかった脂質代謝の機序が明らかになっていくことが期待された。

当初の目標であった、PI(3,4,5)P3の可視化については、他施設から詳細な報告がなされ問題は解決された。そこで、過剰な脂質の摂取が体内に与える影響について、細胞内センサープロテインに興味の対象が移っていった。その候補であるDJ-1は、体内にユビキタスに分布し、特に脳神経に高濃度に存在する。過剰な脂肪を経口摂取すると、DJ-1は細胞外に分泌される。実際に高脂血症では血中DJ-1濃度が高く、さらに糖尿病や慢性関節リウマチ、あるいはアレルギーにおいても、DJ-1の血中濃度は高かった。申請者は、乳癌患者においても高濃度にDJ-1を検出し、腫瘍マーカーとしても意義があることを明らかにした。(Cancer Sci 2015 106:938-43)

#### 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5件)

1) Nishikawa K, Hashimoto M, Itoh M, Hiroi S, Kusai A, Hirata F, Sakamoto T, Iwaya K. Detection of changes in the structure and distribution map of triacylglycerol in fatty liver model by MALDI-Spiral TOF. FEBS Open Bio 2014;19;4:179-84.

2) Nishikawa K, Iwaya K, Kinoshita M, Fujiwara Y, Akao M, Sonoda M,

Thiruppathi S, Suzuki T, Hiroi S, Seki S, Sakamoto T. Resveratrol increases CD68<sup>+</sup> Kupffer cells colocalized with adipose differentiation-related protein and ameliorates high-fat-diet-induced fatty liver in mice. *Mol Nutr Food Res* 2015;59(6):1155-70.

3) Kawate T, Iwaya K, Koshikawa K, Moriya T, Yamasaki T, Hasegawa S, Kaise H, Fujita T, Matsuo H, Nakamura T, Ishikawa T, Hiroi S, Iguchi-Arigo SM, Ariga H, Murota K, Fujimori M, Yamamoto J, Matsubara O, Kohno N. High levels of DJ-1 protein and isoelectric point 6.3 isoform in sera of breast cancer patients. *Cancer Sci* 2015 ;106(7):938-43.

4) Koike E, Iwaya K, Watanabe A, Miyake S, Sato E, Ishikawa T. Association between breast cancer recurrence and cellular dissociation assessed using fine-needle aspiration. *Acta Cytol* 2016;60(5):413-20.

5) Domoto H, Iwaya K, Ikomi F, Matsuo H, Tadano Y, Fujii S, Tachi K, Itoh Y, Sato M, Inoue K, Shinomiya N. Up-regulation of Antioxidant Proteins in the Plasma Proteome during Saturation Diving: Unique Coincidence under Hypobaric Hypoxia. *PLoS One* 2016;11(10):e0163804.

doi:10.1371/journal.pone.0163804.  
eCollection 2016.

〔学会発表〕(計4件)

1) Nishikawa K, Kinoshita M, Iwaya K, Sakamoto T, Seki S. Resveratrol increases CD68 positive Kupffer cells with phagocytic activity to lipid droplets and ameliorates high-fat diet induced fatty liver in mice. 第42回日本免疫学会総会 学術集会記録 2013e-0717

2) Nishikawa K, Kinoshita M, Iwaya K, Fujiwara Y, Sakamoto T, Seki S. Resveratrol ameliorates high fat diet-induced fatty liver with alteration of Kupffer cell subset in mice. *Immunology* 2013 P1106 (Honolulu)

3) Nishikawa K, Hashimoto M, Itoh Y, Hiroi S, Sakamoto T, Iwaya K.

Resveratrol ameliorates fatty liver by reducing the size of lipid droplet without changing liver fat species. *FEBS Journal* 2014 281, Suppl. 1, p597

4) Iwaya K. Clinical significance of DJ-1 expression in the breast cancer. International Symposium of Common Molecular Basis of Cancer and Neurodegenerative Diseases, Two Major Hurdles to Overcome for Good Quality of Longevity. 2014 (<http://www.agr.hokudai.ac.jp/emolb/>)

〔図書〕(計0件)

〔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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岩屋 啓一

(Iwaya Keiichi)

所属機関名・部局名: 公益財団法人佐々木研究所・附属研究所

職名: 研究員(移行)

研究者番号: 50312012

### (2) 研究分担者

石川 孝

(Ishikawa Takashi)

所属機関名・部局名: 東京医科大学・医学部

職名: 主任教授

研究者番号: 80275049