

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 14 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18842

研究課題名(和文) 質量分析計を基盤技術とした高感度スフィンゴ脂質分析法の開発と組織分布解析への応用

研究課題名(英文) Development of a method for distribution analysis of sphingolipids in tissue by mass spectrometry

研究代表者

三枝 大輔 (Saigusa, Daisuke)

東北大学・東北メディカル・メガバンク機構・講師

研究者番号：90545237

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、LC-MS/MS及びIMSを用い、微量組織切片中スフィンゴ脂質の含有量、細胞間濃度勾配及び分布局在を分子マッピングにて解析し、脂質メディエーターとしての作用を明らかにすることである。

初めに、LC-MS/MS測定及びIMS測定に用いる組織の前処理において、ヒートスタビライザーによる組織萎縮無しにスフィンゴ脂質を安定して測定する条件を最適化し、赤脾髄及び白脾髄に含有されるスフィンゴ脂質分布の違いを明らかにした。さらに、LC-MS/MSを用いる微量がん組織におけるスフィンゴ脂質解析から、がん部におけるスフィンゴ脂質定量値とSPHKあるいはSPL発現量の相関を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed a method for demonstrating tissue distribution of sphingolipids by means of LC-MS/MS and IMS.

We first optimized a time or temperature of heat stabilizer for sphingolipids analysis in tissue. Then, the distribution of sphingolipids in a part of white and red pulp of spleen was demonstrated by LC-MS/MS and IMS, and the concentration of sphingolipids was significantly higher in red pulp than white pulp ($P < 0.05$). In addition, we demonstrated that the concentration of sphingolipids related with the expression of SPHK or SPL by LC-MS/MS.

研究分野：分析化学

キーワード：スフィンゴ脂質 計 S1P レーザーマイクロダイセクション LC-MS/MS ヒートスタビライザー IMS 質量分析

1. 研究開始当初の背景

細胞膜を構成するスフィンゴ脂質は、スフィンゴシンキナーゼ (SPHK) による選択的リン酸化により、スフィンゴシンーリン酸 (S1P) に代謝される。S1P は、細胞膜における受容体及びトランスポーターの存在や、ApoM の発現量に依存した細胞外分泌機構が明らかにされており、脂質メディエーターとしてがん細胞の増殖や免疫細胞の応答性に関連することが、多くの先行研究から示されている^{1,2)}。従って、スフィンゴ脂質代謝系の変化を捉えることは、生体の恒常性や疾患発症メカニズムを理解するために極めて重要である。しかしながら、スフィンゴ脂質は細胞内含有量、細胞間濃度勾配、分布局在、さらには代謝関連分子群の発現量との相関性は解明されておらず、新たな分析基盤技術の開発が望まれていた。近年、スフィンゴ脂質は、液体クロマトグラフィー/三連四重極型質量分析計 (LC-MS/MS) の高感度化により、微量組織からの定量分析が可能になったことに加え、イメージング質量分析計 (IMS) を基盤技術に用いる組織分布解析による成果が散見されている³⁻⁵⁾。しかしながら、微量組織切片中のスフィンゴ脂質解析には、LC-MS/MS 測定における検出感度の向上に加え、IMS 測定における前処理や測定の再現性に多くの課題が残されていた。

<引用文献>

- 1) Nature Rev. Mol. Cell Biol. 9 (2008) 139
- 2) Nature. 510(7503) (2014) 58
- 3) Anal. Bioanal. Chem. 403 (2012) 1897
- 4) Anal. Chem. 86(16) (2014) 8303

5) Mass Spectrometry, 3, (2014) S0046

2. 研究の目的

このような背景から、我々は、微量組織切片中におけるスフィンゴ脂質の含有量、細胞間濃度勾配、分布局在を明らかにし、代謝関連分子の発現局在との相関性評価を可能とする、新たな分析基盤技術の開発を実施することにした。すなわち、現在までに開発した LC-MS/MS による精密定量分析法と IMS による相関分布解析法を組み合わせ、生体組織から得られた連続切片を用い、「微量組織中スフィンゴ脂質含有量」、「細胞間濃度勾配」及び「分布局在」を明らかにすることによるスフィンゴ脂質のメディエーター作用を解明することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

初めに、LC-MS/MS 測定及び IMS 測定に用いる組織の前処理において、ヒートスタビライザーによる組織萎縮無しにスフィンゴ脂質を安定して測定する条件を最適化し、赤脾髄及び白脾髄に含有されるスフィンゴ脂質分布の違いを明らかにした。さらに、LC-MS/MS を用いる微量がん組織におけるスフィンゴ脂質解析から、がん部におけるスフィンゴ脂質定量値と SPHK あるいは SPL 発現量の関連性を明らかにした。

4. 研究成果

(1) ヒートスタビライザーの最適化

組織切片に含まれるスフィンゴ脂質を、高い再現性にて安定して測定することを目的と

し、ヒートスタビライザーを用いた。ヒートスタビライザーは、通常 95°C、1 分間の加熱処理により酵素を失活させることで、代謝物の分解を抑制するが、高温で処理されるため、組織に萎縮がみられ、LMD による正確な定量や、イメージング MS による分布解析に適さない状態になる。そこで、我々は、初めに脾臓におけるヒートスタビライザーの温度及び時間の最適化を実施した結果、65°C で 30 秒間処理した時に、組織の萎縮なく且つスフィンゴ脂質の分解を抑制することが示された。(図 1)。

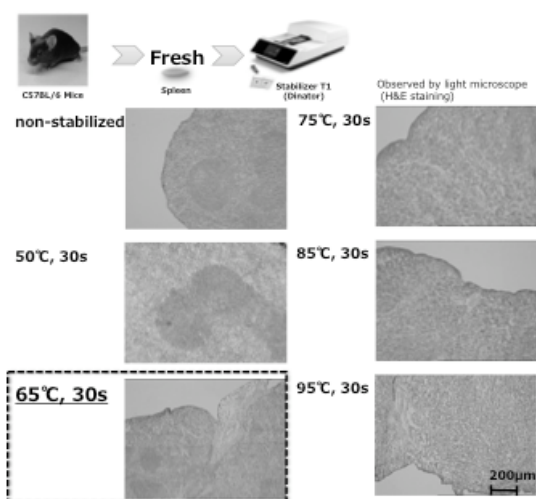


図 1) ヒートスタビライザーによるマウス脾臓組織処理の温度・時間の最適化

(2) スフィンゴ脂質の組織分布解析

次に、(1) で最適化した条件を用い、マウスの脾臓から組織切片を作成し、LC-MS/MS 及び IMS 解析を実施したところ、一部のスフィンゴ脂質 (S1P) は、赤脾髄及び白脾髄における定量値とイメージング画像の相関が観察された。(図 2)。

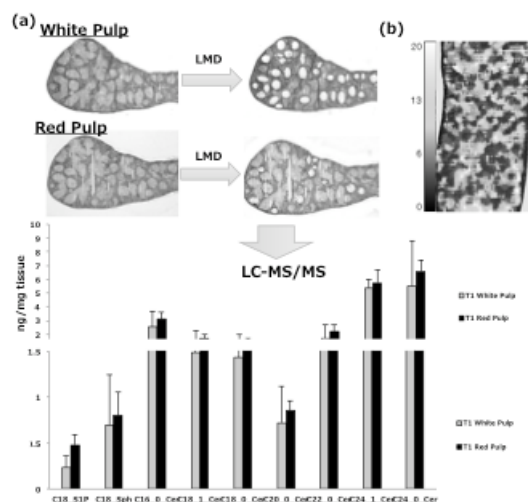


図 2) (a) LC-MS/MS によるマウス脾臓 (赤脾髄、白脾髄) 中スフィンゴ脂質の定量分布 (b) IMS によるマウス脾臓中の S1P の組織分布画像

(3) IMS によるスフィンゴ脂質測定感度の向上

スフィンゴ脂質の中でも S1P は、組織含有量が高いにも関わらず、IMS の前処理に用いるマトリックスの影響を受け、良好な感度が得られていなかった。そこで我々は、九州大学の三浦大典博士、大阪大学の新聞秀一博士に研究協力を依頼し、数種のマトリックスおよびその塗布方法を検証した。最終的に、9-アミノアクリジン (9-AA) をスプレー法にて塗布した際、最も良好な感度で脾臓から S1P を測定することに成功した。

(4) ヒト肝がん組織に含まれるスフィンゴ脂質の定量解析

当初、スフィンゴ脂質代謝関連分子のノックアウトマウスによるスフィンゴ脂質の組織分布解明を予定していたが、研究期間内での

マウスの入手が困難であることが判った。そこで我々は、先行研究からスフィンゴ脂質代謝関連分子の遺伝子発現量に差があることが判っている、ヒト肝がん組織を用いたスフィンゴ脂質の定量解析を実施し、がん部および非がん部におけるスフィンゴ脂質代謝関連分子の遺伝子発現量との相関解析を実施した。LC-MS/MS による、がん部および非がん部に含まれるスフィンゴ脂質の定量結果から、がん部における S1P の定量値と SPHK あるいは SPL の遺伝子発現量に相関あるいは関連性がみられた (図 3)。

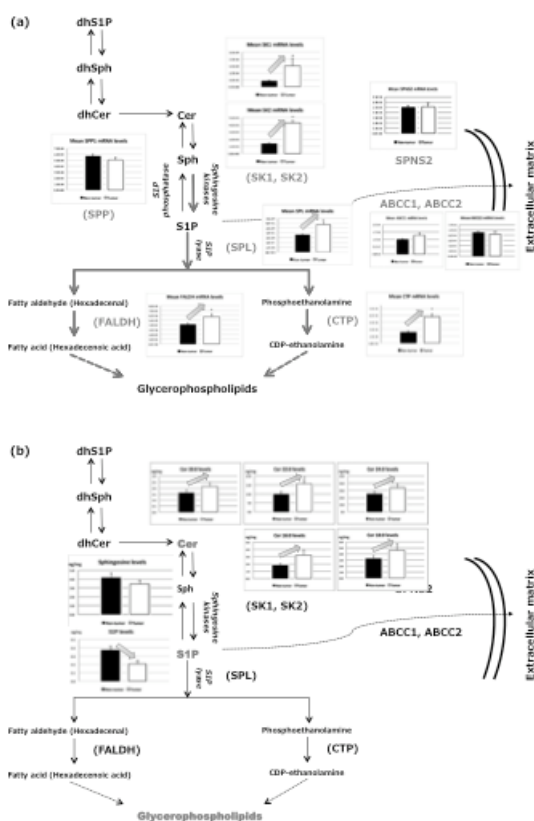


図 3) (a) ヒト肝組織におけるがん部および非がん部に含まれるスフィンゴ脂質代謝関連酵素遺伝子発現量の違い (b) ヒト肝組織におけるがん部および非がん部に含まれるスフィンゴ脂質代謝分子の定量値の違い

今後、がん部と非がん部を同一に含む組織をもちい、IMS による分布解析を実施する予定である。

本研究により開発した微量組織あるいは連続組織切片による LC-MS/MS および IMS を用いるスフィンゴ脂質定量分布解析手法は、今後のスフィンゴ脂質の機能解析に大きく貢献すると考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Iwamori S, Sato E, Saigusa D, Yoshinari K, Ito S, Sato H, and Takahashi N, A Novel and Sensitive Assay for Heme Oxygenase Activity, *Am J Physiol Renal Physiol*, 2015, 309(7), F667-71. (査読有り)
DOI: 10.1152/ajprenal.00210.2015
- ② Suzuki T, Yamaguchi H, Kikusato M, Matsuhashi T, Matsuo A, Sato T, Ohba Y, Watanabe S, Minaki D, Saigusa D, et. al. Mitochondric Acid 5 (MA-5), a Derivative of the Plant Hormone Indole-3-Acetic Acid, Improves Survival of Fibroblasts from Patients with Mitochondrial Diseases. *Tohoku J. Exp. Med.* 2015, 236(3), 225-32. (査読有り)
DOI: 10.1620/tjem.236.225.
- ③ Uranbileg B, Ikeda H, Kurano M, Enooku K, Sato M, Saigusa D, Aoki J, Ishizawa T, Hasegawa K, Kokudo N, Yatomi Y., Increased mRNA Levels of Sphingosine Kinases and S1P Lyase and Reduced Level of

S1P were Observed in Hepatocellular Carcinoma in Association with Poorer Differentiation and Earlier Recurrence., PLoS One, 2016, 11(2), e0149462. (査読有り)
DOI: 10.1371/journal.pone.0149462

④ Saigusa D, Okamura Y, Motoike IN, Katoh Y, Kurosawa Y, Saijyo R, Koshiha S, Yasuda J, Motohashi H, Sugawara J, Tanabe O, Kinoshita K, Yamamoto M., Establishment of Protocols for Global Metabolomics by LC-MS for Biomarker Discovery., PLoS One., 2016, 11(8), e0160555. (査読有り)
DOI: 10.1371/ journal.pone.0160555

⑤ Sato M, Ikeda H, Uranbileg B, Kurano M, Saigusa D, Aoki J, Maki H, Kudo H, Hasegawa K, Kokudo N, Yatomi Y., Sphingosine kinase-1, S1P transporter spinster homolog 2 and S1P2 mRNA expressions are increased in liver with advanced fibrosis in human., 2016, Sci Rep., 6, 32119. (査読有り)
DOI: 10.1038/ srep.32119

[学会発表] (計 9 件)

① Global Metabolomic Analysis by UPLC-TOF-MS for Identification of Predictive and Prognostic Biomarkers for Obstetric Complications, Daisuke Saigusa, Junichi Sugawara, Mitsuyo Matsumoto, Yasutake Katoh, Ryu Yamashita, Yasuhiro Kurosawa, Jun Yasuda, Osamu Tanabe, Masayuki Yamamoto, 8th International DIP Symposium on Diabetes, Hypertension, Metabolic Syndrome & Pregnancy, 15th-17th, April, 2015, (Oral and poster), Berlin,

Germany

② 臨床領域における質量分析計を基盤としたメタボローム解析の発展、三枝大輔、第 63 回質量分析総合討論会、つくば国際会議場、2015 年 6 月 17 日-19 日、つくば (基調講演)

③ Development of Protocol for Global Metabolomics in Clinical and Cohort Study by LC-MS, Daisuke Saigusa, Junichi Sugawara, Mitsuyo Matsumoto, Yasutake Katoh, Ryu Yamashita, Yasuhiro Kurosawa, Jun Yasuda, Masayuki Yamamoto, Osamu Tanabe, Metabolomics 2015, 28th, June-3rd, July, 2015 (Poster), San Diego, CA

④ 臨床メタボローム解析による疾患予防マーカー探索、三枝大輔、第 36 回グアニジン化合物研究会 東北大学大学院薬学研究科 仙台、2015 年 8 月 8 日 (口頭発表) (シンポジウム座長)

⑤ 大規模コホートオミクス解析による疾患予防マーカー探索、三枝大輔、第 40 回日本医用マススペクトル学会、アクトシティ浜松、浜松、2015 年 9 月 17 日-18 日 (口頭発表) (シンポジウム座長)

⑥ 質量分析計を用いる生体内スフィンゴ脂質の安定性評価と臨床領域への応用、三枝大輔、王嬌、可野邦行、B.Uranbileg、蔵野信、池田均、矢富裕、青木淳賢、第 64 回質量分析総合討論会、ホテル阪急エキスポパーク、大阪、2016 年 5 月 18 日-20 日 (口頭発表)

⑦ 大規模メタボロームデータの多層オミクス解析への応用、三枝大輔、元池育子、小

柴生造、第 10 回メタボロームシンポジウム、鶴岡メタボロームキャンパス、鶴岡、2016 年 10 月 19 日–21 日 (ポスター発表)

⑧ Transomics analysis in a large-scale cohort study、三枝大輔、日本プロテオーム学会 2016 年大会、北里大学薬学部白金キャンパス、東京、2016 年 7 月 28 日–29 日 (シンポジスト) (英語)

⑨ Omics Research in a Large-scale Cohort by MS、Daisuke Saigusa、BIT's 5th Annual Conference of AnalytiX 2017、Hilton Fukuoka Sea Hawk、Fukuoka、22nd-24th, 2017、invited speaker

[図書] (計 1 件)

① 鈴木健弘、三島英換、三枝大輔、阿部高明
「腎臓のバイオマーカーと創薬戦略」実験医学、P1262-1269 (2016)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三枝 大輔(SAIGUSA, Daisuke)

東北大学・東北メディカル・メガバンク機構・講師

研究者番号: 90545237