

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：33910

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24619007

研究課題名(和文) 組織切片局所からの脂質表面抽出質量分析法による病態解析

研究課題名(英文) Liquid extraction surface analysis of lipids from local tissue areas by mass spectrometry for pathological analysis

研究代表者

田口 良 (TAGUCHI, Ryo)

中部大学・応用生物学部・客員教授

研究者番号：20080210

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：質量分析による溶媒抽出表面分析法は、サンプル表面から直接代謝分子を抽出してナノエレクトロスプレーイオン化測定を行うため、サンプルの抽出、濃縮、再溶解等の過程におけるロスが無く、組織局所のような微量サンプルにおいても十分な感度で測定が可能であることが判った。特に、リン脂質やトリアシルグリセロール等の脂質分子種分析には非常に有効であった。今後、病態サンプルと正常サンプルの脂質分子種の局所変化の簡便解析法として有効と思われる。

研究成果の概要(英文)：We applied a liquid extraction surface analysis (LESA) combination with NanoMate as a new approach for localization analysis of lipid molecular species in mammalian tissue slices and body fluid on segmented membrane. As results mass profiles of phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine in different areas of several tissue slices were effectively obtained by direct extraction. The profiles in molecular species of glycosphingolipids (gangliosides and sulfatides) and triglycerides were also effectively obtained by this method.

研究分野：脂質生化学

キーワード：メタボロミクス リピドミクス 質量分析

1. 研究開始当初の背景

(1) リピドミクスにおいて質量分析の局所化と微量化が、溶媒抽出表面分析(LESA)により可能であることが判ってきている。この手法は脂質の直接抽出とナノ測定を自動化することにより実現され、臨床、病態サンプルへの利用が可能であることを確認している。ナノフロー-ESI装置NanoMateによる微量解析と新たに開発された溶媒抽出表面直接分析(LESA)を組み合わせ、病態臓器切片局所及び臨床体液サンプルの脂質メタロミクスに適用することを目指し、肥満その他の酸化ストレスに起因する種々の病態モデルへの適用を試みることを計画した。そこで種々の疾患モデルや臨床サンプルにこの手法を応用し、マーカー群検出における構造同定やプロファイリング解析の有効性を確認する。4000Qtrapによる部分構造特異的な包括的解析とOrbitrapによる高分解能、精密質量による解析を、平行して行うことにより、高度不飽和脂肪酸の変動解析や新規酸化脂質の解析を組織局所レベルで同時におこなう。この表面分析法を各種病態モデル動物の病態組織局所や炎症性疾患患者の血しょう等の体液における酸化脂質のメタローム解析に応用し、その有効性を確認する。

(2) 肥満、動脈硬化、アルツハイマー発症モデル動物と、それに対する遺伝的又は科学的処置により酸化ストレスの促進又は抑制処理などを施した場合の脂質変動や脂質酸化の状態を従来法と直接抽出測定法により包括的に分析する必要性が高まっている。また、実際にこの手法を個別の病態モデルや臨床サンプルに適用して得られた包括的データをもとに、我々がすでに独自に開発したLipid Searchという自動脂質同定検索ソフトが脂質メタロミクス解析に有効であることを確認している。さらに、Simuca P+等の多変量解析ソフトを用いて、サンプル間や代謝物間の差異や類似性等の関係性を明らかにし、病態に

関わる主要な代謝因子の検出について検討する。これにより病態局所や体液分析等の臨床サンプルについて基本的な手法を確定することが可能になるとと思われる。

2. 研究の目的

リピドミクスによる包括的解析は脂質の生理機能解明や、病態解析、創薬開発等にとって非常に重要になってきている。この研究では、組織切片1mm径の局在部位から直接脂質成分を抽出し分析する手法により病態局所における酸化を中心とする脂質代謝変化を解析することや、血しょう、唾液、脊髄液等の体液から μL レベルで脂質分子を抽出し、100-200ナノLの流速で直接自動分析し、生理機能や病態を解析することを目指す。得られた結果から独自に開発した脂質同定ソフトLipid Searchと多変量解析を用いて解析し、炎症の生理的現象や病理的变化における脂質酸化を中心とした代謝変化の関与を明らかにする目的でこの高感度直接測定法の有効性を確認する。肥満その他の酸化ストレスに起因する種々の病態モデルへの適用を試み、炎症疾患の病態解析データから、効果的な臨床マーカーの検出や病態発症に關与する因子の検出を目指す。

3. 研究の方法

(1) 約 $15\mu\text{m}$ の厚さで作製した、マウスやラットの、脳、腎臓、心臓等の組織切片を直径約1-2mm径の領域から $1.5\text{-}2\mu\text{L}$ のクロロホルム/メタノール(1:2)の溶媒で各1秒間3度の抽出を繰り返したサンプルから、各種リン脂質、トリグリセリド、ガングリオシド、サルファチド等数百の脂質分子種の検出を試みた。また、区画されたポリエーテルスルホン酸の薄膜上に体液をしみこませたサンプルの測定も試みた。測定には4000QTRAPによる脂質部分構造特異的検出法とOrbitrapによる精密質量による検出法を用いた。

(2) メタボリックサージェリーについての研究ではZucker糖尿病肥満ラット(fat/fat)をモデル動物として使用した。Zucker糖尿病

肥満ラットはレプチン受容体の遺伝子に異常があり、糖尿病を自然発症する系統のラットである。これらにルーワイ胃バイパス術 (RYGB)、胃バンディング術 (DJB)、疑似手術 (sham) を施し、手術経過日数ごとに臓器、血しょう中の脂質代謝物を測定した。得られた試料を LCMS/MS に供して、脂肪酸、トリグリセリド、リン脂質やその代謝物等の分子種組成を質量分析により決定した。

4. 研究成果

(1) ナノフロー ESI 装置 NanoMate による微量解析と、新たに開発された溶媒抽出表面直接分析 (LESA) を組み合わせて、病態臓器切片局所及び臨床体液サンプルの脂質メタボロミクスへの応用の可能性を試みた。組織切片からの直接解析を 2 通りの質量分析システムにより検討した。まず、4000Qtrap による部分構造特異的な包括的解析ではリン脂質の各クラス毎の選択的同定や酸性糖脂質のシアル酸や硫酸基による特異的な同定が可能であった。また、Orbitrap による高分解能、精密質量による解析では、その質量精度の高さから、微妙な元素組成の違いを区別することが可能であった。これらの手法を同時に組み合わせる事により、高度不飽和脂肪酸の変動解析や新規酸化脂質の解析を組織局所レベルでおこなえる可能性が開けてきた。この表面分析法は各種病態モデル動物の病態組織局所や炎症性疾患患者の血しょう等の体液における酸化脂質のメタボローム解析に有効であることが確認できた。具体的にはマウスやラットの脳、腎臓、心臓等の臓器局所についてそのリン脂質分子種の局在特異性を解析した。また、肥満や高血圧発症モデルラットにおいて多価不飽和脂肪酸含有リン脂質の有意な変動を観察できた。また、ヒトの血しょうや唾液の直接解析についても、ほぼ 10 μ L の液量で可能であることが確認出来た。

(2) fat-1 マウス (fat-1+) と野生株マウス (fat-1-) について脂肪酸の含有量の異なる 2 種類の餌を切り替えて飼育したサンプルをオクラホマ大学松本らとの共同研究によ

り提供して貰い、各条件下におけるマウス肝臓組織切片の脂質分子種を解析し、n-6 系および n-3 系脂肪酸含有リン脂質の食餌による影響を検討した。その結果、食餌や fat-1 遺伝子の導入が体内における脂質合成に大きく影響を与えることが示された。次に、脂肪酸鎖 C16 から C18 への伸長酵素 Elovl 6 の遺伝子欠損マウスについて、野生型マウスとのリン脂質分子種の比較解析を筑波大学島野らとの共同研究により行った。この実験では脳組織の局在部位の解析に LESA を用いた。LESA による解析の結果、16:0 を sn-1 に持つリン脂質分子種の割合が増えて、18:0 を sn-1 に持つ分子種が減少することが判った。また、中部大学野田らとの高血圧発症モデルラットの共同研究において、食塩水の濃度の違いによる高血圧の発症時におけるリン脂質分子種の変化を観察した。この実験では高血圧の発症する 12 週令からその心臓のホスファチジルコリン (PC) においてリノール酸を含む分子種の減少とアラキドン酸を含む分子種の増加が観察された。

(3) 高度肥満に由来する糖尿病等の生活習慣病は、食事に対する嗜好性や選択制等が影響するため、最近、肥満の強制的な抑制法の一つとして、消化器官に対して直接外科手術を施すメタボリックサージェリーが注目され始めている。術後 2 10 日という予想以上の短期間でインシュリン抵抗性の有意な改善が見られることが判ってきており、その生理的なメカニズムの解明が肥満、糖尿病などの予防、治療に有効であることが予想される。この研究はメタボリックサージェリーの術式により異なる効果が、どのように生ずるかを、手術経過日数ごとに臓器、血しょう中の脂質代謝物を測定することにより、その生理的メカニズムを明らかにし、肥満や糖尿病等の治療や病態マーカーとして利用可能な脂質代謝分子を発見することを目的として行われた。結果として肥満・糖尿病の発症に連動して増加する特定の高度不飽和脂肪酸分子種が肥満手術後のインスリン抵抗性の改善に連動して変化することを見出し、この分

子が非常に有効なマーカーである可能性を明らかにした。

(4)LESAは、サンプル表面から直接抽出してナノESI測定を行うため、サンプルの抽出、濃縮、再溶解等の過程におけるロスが無く、組織局所のような微量サンプルにおいても十分な感度で測定が可能であった。リン脂質、トリアシルグリセロール等の中性脂質、酸性糖脂質等の脂質についてはレーザーマイクロダイセクションを用いた手法と変わらない程度の感度が得られた。特に、脳、腎臓、心臓等の組織切片からの局所解析の感度は非常に高かった。4000Qtrap及びOrbitrapのいずれにおいても、陽イオンモードでの測定がより効率的であった。今後、病態サンプルと正常サンプルの脂質分子種の局所変化の簡便解析法として有効と思われる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計10件)

Sato H, Taketomi Y, Ushida A, Isogai Y, Kojima T, Hirabayashi T, Miki Y, Yamamoto K, Nishito Y, Kobayashi T, Ikeda K, Taguchi R, Hara S, Ida S, Miyamoto Y, Watanabe M, Baba H, Miyata K, Oike Y, Gelb MH, Murakami M. The adipocyte-inducible secreted phospholipases PLA2G5 and PLA2G2E play distinct roles in obesity. *Cell Metab.* 査読あり, Vol.20, No.1, 2014, pp.119-132. doi: 10.1016/j.cmet.2014.05.002.

Abe Y, Honsho M, Nakanishi H, Taguchi R, Fujiki Y. Very-long-chain polyunsaturated fatty acids accumulate in phosphatidylcholine of fibroblasts from patients with Zellweger syndrome and acyl-CoA oxidase1 deficiency. *Biochim Biophys Acta.* 査読あり, Vol.1841, No.4, 2014, pp.610-619. doi: 10.1016/j.bbalip.2014.01.001.

Maekawa K, Hirayama A, Iwata Y, Tajima Y, Nishimaki-Mogami T, Sugawara S, Ueno N, Abe H, Ishikawa M, Murayama M, Matsuzawa Y, Nakanishi H, Ikeda K, Arita M, Taguchi R, Minamino N, Wakabayashi S, Soga T, Saito Y. Global metabolomic analysis of heart tissue in a hamster model for dilated cardiomyopathy. 査読あり, *J Mol Cell Cardiol.* Vol.59, 2012, pp76-85. doi: 10.1016/j.yjmcc.2013.02.008.

Hama K, Nagai T, Nishizawa C, Ikeda K, Morita M, Satoh N, Nakanishi H, Imanaka T, Shimozawa N, Taguchi R, Inoue K, Yokoyama K. Molecular Species of Phospholipids with Very Long Chain Fatty Acids in Skin Fibroblasts of Zellweger Syndrome. *Lipids.* 査読あり, Vol. 48, No.12, 2013, pp.1253-1267. PMID:24122089

Sassa T, Ohno Y, Suzuki S, Nomura T, Nishioka C, Kashiwagi T, Hirayama T, Akiyama M, Taguchi R, Shimizu H, Itohara S, Kihara A. Impaired epidermal permeability barrier in mice lacking elov11, the gene responsible for very-long-chain fatty acid production. *Mol Cell Biol.* 査読あり, Vol.33, No.14, 2013, pp.2787-2796. doi: 10.1128/MCB.00192-13.

Tajima Y, Ishikawa M, Maekawa K, Murayama M, Senoo Y, Nishimaki-Mogami T, Nakanishi H, Ikeda K, Arita M, Taguchi R, Okuno A, Mikawa R, Niida S, Takikawa O, Saito Y. Lipidomic analysis of brain tissues and plasma in a mouse model

expressing mutated human amyloid precursor protein/tau for Alzheimer's disease. *Lipids Health Dis.* 査読あり, Vol.12, 2013, p.68. doi: 10.1186/1476-511X-12-68.

Taketomi Y, Ueno N, Kojima T, Sato H, Murase R, Yamamoto K, Tanaka S, Sakanaka M, Nakamura M, Nishito Y, Kawana M, Kambe N, Ikeda K, Taguchi R, Nakamizo S, Kabashima K, Gelb MH, Arita M, Yokomizo T, Nakamura M, Watanabe K, Hirai H, Nakamura M, Okayama Y, Ra C, Aritake K, Urade Y, Morimoto K, Sugimoto Y, Shimizu T, Narumiya S, Hara S, Murakami M. Mast cell maturation is driven via a group III phospholipase A2-prostaglandin D2-DP1 receptor paracrine axis. *Nat Immunol.* 査読あり, Vol.14, No.6, 2013, pp.554-563. doi: 10.1038/ni.2586.

Yano M, Yamamoto T, Nishimura N, Gotoh T, Watanabe K, Ikeda K, Garan Y, Taguchi R, Node K, Okazaki T, Oike Y. Increased oxidative stress impairs adipose tissue function in sphingomyelin synthase 1 null mice. *PLoS One.* 査読あり, Vol.8, No.4, 2013, e61380. doi: 10.1371/journal.pone.0061380.

Oikawa N, Goto M, Ikeda K, Taguchi R, Yanagisawa K. The β -secretase inhibitor DAPT increases the levels of gangliosides at neuritic terminals of differentiating PC12 cells. *Neurosci Lett*, 査読あり, Vol.525, No.1, 2012, pp.49-53, doi: 10.1016/j.neulet.2012.07.027.

Hirata Y, Ikeda K, Sudoh M, Tokunaga Y, Suzuki A, Weng L, Ohta M, Tobita

Y, Okano K, Ozeki K, Kawasaki K, Tsukuda T, Katsume A, Aoki Y, Umehara T, Sekiguchi S, Toyoda T, Shimotohno K, Soga T, Nishijima M, Taguchi R, Kohara M. Self-enhancement of hepatitis C virus replication by promotion of specific sphingolipid biosynthesis. *PLoS Pathog.* 査読あり, Vol.8, No. 8, 2012, e1002860, doi: 10.1371/journal.ppat.1002860.

[学会発表] (計6件)

前川京子, 上番増喬, 石川将己, 田島陽子, 妹尾勇弥, 村山真由子, 最上(西巻)知子, 中西広樹, 池田和貴, 田口良, 藤井庄人, 柴崎友一朗, 米山博之, 南茂隆生, 安田和基, 斎藤嘉朗: 非アルコール性脂肪性肝炎モデルマウス (STAM マウス) の肝臓における脂質メタボローム解析, 日本薬学会 133 回年会, 横浜, 2013 年 3 月 28 日 - 30 日

田島陽子, 前川京子, 石川将己, 村山真由子, 妹尾勇弥, 最上(西巻)知子, 中西広樹, 池田和貴, 有田 誠, 田口良, キョウ建生, 奥野海良人, 新飯田俊平, 滝川修, 斎藤嘉朗: アルツハイマー病モデルマウスの脳組織および血漿における脂質メタボローム解析, 第 85 回日本生化学会大会 (2012 年 12 月 14 日(金)~16 日(日))・福岡

前川京子、田島陽子、上野紀子、石川将己、村山真由子、最上知子、中西広樹、池田和貴、有田誠、田口良、岩田裕子、南野直人、若林繁夫、斎藤嘉朗: 拡張型心筋症モデルハムスターの心筋における脂質代謝物のメタボローム解析、第 35 回日本分子生物学会年会福岡, 2012 年 12 月 11 日~14 日

田口良、水野顕智、水野良基、山口真奈、池田和貴: 溶媒抽出方面分析法によ

る組織切片又は薄膜からの脂質分子種の直接局在解析、第37回日本医用マススペクトル学会（名古屋）（2012年10月25-26日）。

前川京子，田島陽子，石川将己，村山真由子，妹尾勇弥，最上（西巻）知子，中西広樹，池田和貴，有田誠，田口良，キョウ建生，奥野海良人，新飯田俊平，斎藤嘉朗，滝川修：アルツハイマー病モデルマウスの脳及び血漿における脂肪酸代謝物のメタボローム解析，第7回メタボロームシンポジウム、鶴岡、2012年10月10日 - 12日

田口良：リポミクスの基盤的技術と生命科学研究への適用、日本医用マススペクトル学会中部支部講演会（招待講演）2012年7月21日 名古屋大学医学部

[図書]（計3件）

Ryo Taguchi, Kazutaka Ikeda, Hiroki Nakanish, Lipidomics for elucidation of Metabolic Syndrome and related Lipid Metabolic Disorder, Wiley-VCH 2012, September, pp.233-250, Lipidomics: Technologies and Application (Ed. by Kim Ekroos) 総ページ 336

田口良：リポミクス、2012年、10月、pp.317-328、現代質量分析学（高山光男、瀧浪欣彦、早川滋雄、和田芳直 編）化学同人、総ページ 514
ISBN978-4-1413-2

田口良：マススペクトロメトリーによる脂質の包括的分析とその適用、ファルマシア、48巻、No.10、2012、pp.941-945、ISSN 0014-8601

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田口良 (TAGUCHI, Ryo)
中部大学・応用生物学部・客員教授
研究者番号：20080210