

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293044

研究課題名(和文) 一細胞質量顕微鏡法による血液細胞のメタボローム解析

研究課題名(英文) Metabolomic analysis of blood cells by single-cell imaging mass spectrometry.

## 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：フローサイトメトリーにより分離した血液細胞のスライドガラスへの接着条件、固定条件を最適化することにより、マトリックス支援レーザー脱離イオン化-質量分析イメージング法および飛行時間型二次イオン質量分析法を用いて、脂質の一細胞質量顕微鏡解析に成功した。一細胞質量顕微鏡解析により、リンパ球のサブセットにおける脂質組成の違い、乳癌培養細胞、乳癌由来癌幹細胞、多発性骨髄腫(MM)細胞の脂質代謝変化を見出すことができた。更にMM細胞において減少したパルミチン酸は、多発性骨髄腫特異的な治療薬である可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Using matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry and time-of-flight secondary ion mass spectrometry, we succeeded in single-cell imaging mass spectrometry of lipid by optimizing slide preparation for FACS-isolated blood cells and sample fixation. By single-cell imaging mass spectrometry we revealed different lipid composition in lymphocyte subsets and lipid metabolic change in breast cancer cell line, breast cancer stem cells and multiple myeloma (MM) cells. In addition we showed that palmitic acid, which was decreased in MM cells, is a potential multiple myeloma-specific drug.

研究分野：解剖学一般(含組織学・発生学)

キーワード：血液 質量顕微鏡 一細胞 分子イメージング 代謝物 血液細胞 一細胞解析

### 1. 研究開始当初の背景

研究代表者は JST 先端計測分析技術機器開発プログラムのご支援のもと、顕微鏡レベルでの高解像度でマトリックス支援レーザー脱離イオン化-質量分析イメージング (MALDI-IMS) 法を可能とする、質量顕微鏡システム (iMScope) の開発に成功した。JST からの S 評価と文部科学省若手研究者賞を頂くことができた。研究代表者はこれまでに同装置を用い、特異的な可視化の困難であったリゾPC、トリグリセリド、コレステロール、ガングリオシド、セラミド、プロスタグランジン、ATP、ADP 等の脂質・代謝物の可視化に成功してきた。質量顕微鏡は光学顕微鏡を装置内に内蔵し光顕像と質量顕微鏡像を対応させることができる装置として開発された。研究代表者らはさらにレーザー照射径の低減、位置合わせ機能の改良、マトリックスの改良を行い、その結果として、平成 23 年度終了時点で 5 μm を切る解像度での解析を可能とした。しかし個々の細胞を弁別して脂質・代謝物を解析するための研究手法は未開拓であり、血液細胞を初めとするヒト生体内細胞の一細胞メタボロミクス・リポドミクス研究は未解明の課題として残されてきた。

### 2. 研究の目的

本研究は一細胞レベルでのメタボローム解析を可能とする一細胞質量顕微鏡法を構築する。構築したシステムを血液中腫瘍細胞の解析に応用し、正常・病態の比較を行うことで分子マーカー探索を行う。特徴的な分子が見出された場合には、細胞マーカー分子としての利用可能性を提唱する。

(1) 一細胞質量顕微鏡法を構築する。培養細胞系を用いて、一細胞質量顕微鏡法に適した標本作製条件と、iMScope を用いた MALDI-IMS 法および PHI TRIFT V nanoTOF (ULVAC-PHI) を用いた飛行時間型二次イオン質量分析 (TOF-SIMS) 法を可能とする標本作製条件を探索する。

(2) ヒト血液細胞を用い、一細胞質量顕微鏡解析を行う。血液腫瘍細胞と正常細胞における脂質代謝分子機構の変化を明らかにする。その脂質代謝異常をターゲットとする化合物を用い、血液腫瘍への治療効果を検討する。

### 3. 研究の方法

(1) 一細胞質量顕微鏡法のためのヒト血液試料調製方法の確立

培養細胞系を用い、一細胞レベルでの形態保持、専用スライドガラスへの接着、質量顕微鏡解析における生体内分子の検出を可能とする標本作製方法の確立を行う。

(2) 血液細胞を用いた一細胞質量顕微鏡解析

(1) により最適化された条件で、ヒト血液細胞を用いた一細胞質量顕微鏡解析を行う。血液細胞は浜松医科大学附属病院より得られた血液検体を用い、各血液細胞のマーカー抗体を用いたフローサイトサイトメトリー法により単一細胞集団として単離する。質量顕微鏡解析は、iMScope を用いた MALDI-IMS 法による脂質分子の解析のほか、PHI TRIFT V nanoTOF を用いた TOF-SIMS 法による脂肪酸フラグメントの解析を行う。必要に応じ検出された分子の多段階マス解析を行い、血液腫瘍の発症に際したマーカー分子の探索を行う。

(3) 血液腫瘍細胞の脂質代謝への介入実験

(2)、(3) により血液腫瘍細胞と正常細胞の脂質代謝の変化を捉えることができた場合、血液腫瘍細胞へ変化した脂質を添加することにより、その効果を検討する。

### 4. 研究成果

(1) 一細胞質量顕微鏡法のための血液試料調製方法の確立

一細胞レベルでの質量顕微鏡解析を可能とするスライド標本の作製法を開発した (雑誌論文)。インジウム酸化スズ皮膜スライドガラス表面にポリ-L-リシンを一晩インキュベートし、蒸留水で洗浄後乾燥した。スライドガラス上にフレキシパームを接着し、ヒト多発性骨髄腫由来培養細胞株 U266 をフレキシパームのチャンバーへ入れ、サイトスピンにより U266 細胞をスライドガラス表面に接着させることに成功した。接着させたスライド標本を用い、0.25% グルタルアルデヒドによる室温 15 分の固定および固定後の 150 mM 酢酸アンモニウム洗浄により細胞の形態は保持された (図 1)。この方法によって作製された標本は、TOF-SIMS 法 (図 2) および MALDI-IMS 法による質量顕微鏡解析において、一細胞レベルでの脂質分子の検出に有用であった。

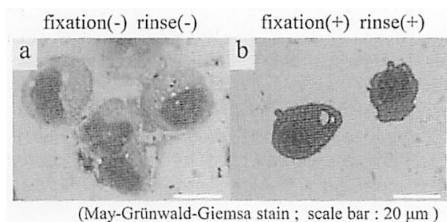


図 1. 固定・洗浄後の U266 細胞

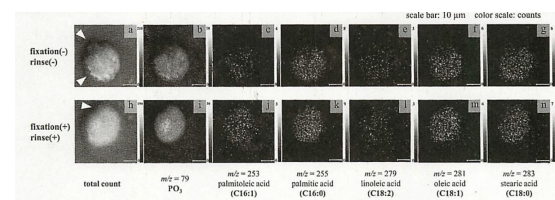


図 2. TOF-SIMS 法による脂肪酸基の検出

高解像度での MALDI-IMS 解析を可能とするマトリックス塗布法として、2,5-dihydroxyacetophenone (DHAP) を用いた新規蒸着法を開発した(雑誌論文)。DHAP は両極性のマトリックスとして機能したほか、既知のマトリックス (DHB および 9AA) よりも高感度で脂質分子を検出する事ができた。さらには蒸着法による塗布は高解像度での脂質分子の検出を可能とした。

(2) 血液細胞を用いた一細胞質量顕微鏡解析  
 フローサイトメトリーにより分離した健康人血液中の T 細胞を用い、MALDI-IMS 法による一細胞質量顕微鏡解析を行った。その結果、フォスファチジルコリン (PC) (32:0) が CD4 陽性 T 細胞において CD8 陽性 T 細胞より低いシグナル強度で検出されたのに対し、PC(34:0) は高い値で検出された。リンパ球の種類により PC 組成が異なることが明らかとなった。

乳癌細胞の培養細胞系である SKBR-3 細胞を用い、TOF-SIMS 法による一細胞質量顕微鏡解析を行った(雑誌論文)。その結果、SKBR-3 細胞においてパルミチン酸やステアリン酸といった飽和脂肪酸のほか、パルミトレン酸やオレイン酸といった一価不飽和脂肪酸が可視化できた(図 3)。これらは乳癌発症に関わる stearoyl-coa desaturase 1 の代謝に関連する脂肪酸であるため、TOF-SIMS 法による一細胞質量顕微鏡解析は乳癌の機能解明に有用であることが示唆された。

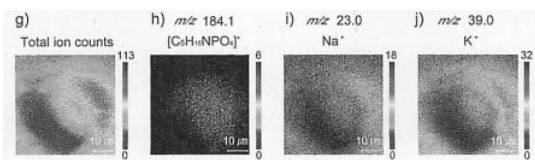


図 3. SKBR-3 細胞を用いた TOF-SIMS 解析。

フローサイトメトリーにより分離した乳癌由来の癌幹細胞 (CSC) と非癌幹細胞 (NSCC) を用い、TOF-SIMS 法による脂肪酸組成の比較を行った(雑誌論文)。その結果、CSC におけるパルミトレン酸の発現が NSCC よりも統計学的に有意に減少していることが明らかになった(図 4)。さらには単離した細胞を用いた LC-MS 解析から、PC(16:0/16:1) が CSC で有意に少なく、PC(16:0/16:0) が有意に多いことが明らかとなった。以上の結果から、これらの脂肪酸とリン脂質が乳癌における癌幹細胞のマーカーとなり得ることが推察された。

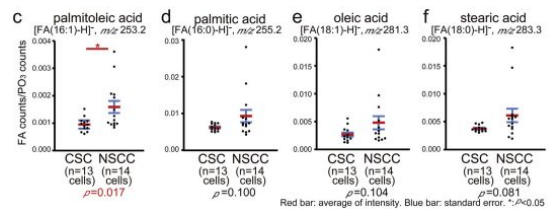
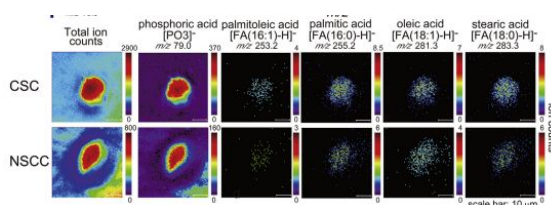


図 4. CSC と NSCC を用いた TOF-SIMS 解析 (上) と脂肪酸発現の定量解析 (下)。

フローサイトメトリーにより分離した多発性骨髄腫 (MM) 細胞と正常形質細胞 (NPC) を用い、TOF-SIMS 法による脂肪酸組成の比較を行った(雑誌論文)。その結果、MM 細胞においてパルミチン酸の発現が統計学的に有意に減少していることが明らかになった(図 5)。次に、*in vitro* において、MM 細胞へパルミチン酸を投与したところ、著しいアポトーシス効果が誘導された。しかし、人末梢血由来単核細胞には同様の処理で細胞死の誘導は認められなかった(図 5)。この結果から、パルミチン酸は MM 細胞特異的な新規治療薬として有用である可能性が示された。

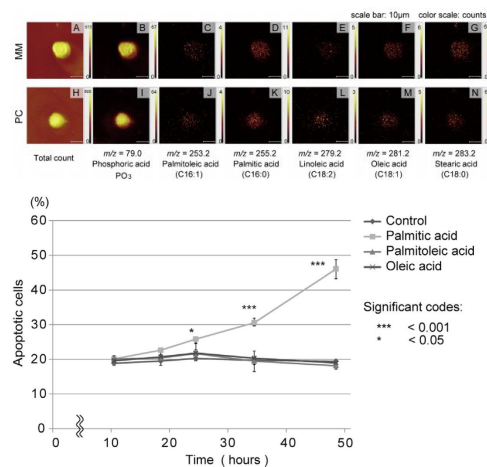


図 5. MM 細胞と NPC を用いた TOF-SIMS 解析 (上) と U266 細胞における脂肪酸投与後のアポトーシスの影響 (下)。

多発性骨髄腫発症に関わるリン脂質を探索するため、MM 細胞と NPC を用いた MALDI-IMS 法による一細胞質量顕微鏡解析を行った(雑誌論文)。その結果、MM 細胞における  $m/z$  782.5 の分子が NPC と比較して統計学的に有意に低かった(図 6)。Dried droplet 法による定量的測定においても、 $m/z$  782.5 の濃度は NPC で  $11.7 \mu\text{g/ml}$  であったのに対し、MM 細胞では  $3.02 \mu\text{g/ml}$  と低いことが確認できた。この分子に対する多段階マス解析を行った結果、この分子は  $[\text{PC}(16:0/20:4) + \text{H}]^+$  であると同定でき、パルミチン酸を含有する PC(16:0/20:4) は多発性骨髄腫の発症に関与するリン脂質分子種であると推察された。

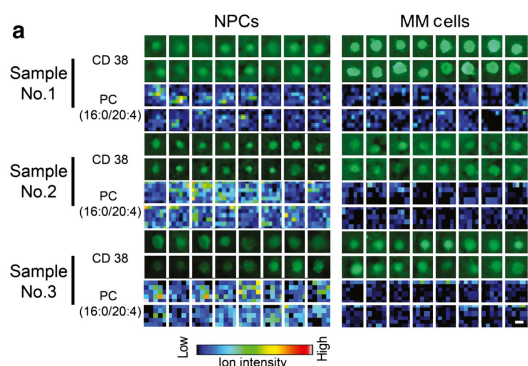


図 6.  $m/z$  782.5 の分子に対する MALDI-IMS 法による一細胞質量顕微鏡解析

## 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 6 件)

Hossen MA, Nagata Y, Waki M, Ide Y, Takei S, Fukano H, Romero-Perez GA, Tajima S, Yao I, Ohnishi K, Setou M. Decreased level of phosphatidylcholine (16:0/20:4) in multiple myeloma cells compared to plasma cells: A single-cell MALDI-IMS approach. *Anal Bioanal Chem.* 査読有. 407(18):5273-80. 2015.

Waki M, Ide Y, Ishizaki I, Nagata Y, Masaki N, Sugiyama E, Kurabe N, Nicolaescu D, Yamazaki F, Hayasaka T, Ikegami K, Kondo T, Shibata K, Hiraide T, Taki Y, Ogura H, Shiiya N, Sanada N, Setou M. Single-cell time-of-flight secondary ion mass spectrometry reveals that human breast cancer stem cells have significantly lower content of palmitoleic acid compared to their counterpart non-stem cancer cells. *Biochimie.* 査読有. 107 Pt A:73-7. 2014.

Hayasaka T, Goto-Inoue N, Masaki N, Ikegami K, Setou M. Application of 2,5-dihydroxyacetophenone with sublimation provides more efficient ionization of lipid species by atmospheric pressure matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Surf Interface Anal.* 査読有. 46(12-13):1219-22. 2014.

Nagata Y, Ishizaki I, Waki M, Ide Y, Hossen MA, Ohnishi K, Miyayama T, Setou M. Palmitic acid, verified by lipid profiling using secondary ion mass spectrometry, demonstrates antimultiple myeloma activity.

*Leukemia Research.* 査読有. 46(S1):185-8. 2014.

Ide Y, Waki M, Ishizaki I, Nagata Y, Yamazaki F, Hayasaka T, Masaki N, Ikegami K, Kondo T, Shibata K, Ogura H, Sanada N, Setou M. Single Cell Lipidomics of SKBR-3 Breast Cancer Cells by Using Time-of-Flight Secondary-Ion Mass Spectrometry. *Surf Interface Anal.* 査読有. 46(S1):181-4. 2014.

Nagata Y, Ishizaki I, Waki M, Ide Y, Hossen A, Ohnishi K, Sanada N, Setou M. Glutaraldehyde Fixation Method for Single-Cell Lipid Analysis by Time-of-Flight Secondary Ion-Mass Spectrometry. *Surf Interface Anal.* 2014 Apr 30;46(S1):185-8.

[学会発表](計 20 件)

瀬藤 光利、マスマスイメージングが明らかにする脂質の分布とその意義、日本化学会第 96 春季年会、2016 年 3 月 24 日、同志社大学 京田辺キャンパス(京都府・京田辺市)

瀬藤 光利、Platform of functional metabolic imaging、日独国際ワークショップ、2016 年 3 月 21 日、Tubingen (Germany)

瀬藤 光利、Development and application of imaging mass spectrometry、第 8 回 NAGOYA グローバルリトリート、2016 年 2 月 12 日、あいち健康プラザ(愛知県・名古屋市)

瀬藤 光利、Single cell lipidomics approach for diseases、*Biochemistry and Molecular Biology 2015*、2015 年 12 月 4 日、神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

瀬藤 光利、リポクオリティの可視化、第 9 回メタボロームシンポジウム、2015 年 9 月 30 日、三島市民文化会館(静岡県・三島市)

正木 紀隆、石崎逸子、早坂孝宏、Gregory L. Fisher、眞田則明、横田秀夫、瀬藤光利、Three-Dimensional Image of Cleavage Bodies in Nuclei Is Configured Using Gas Cluster Ion Beam with Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry、*SISS-17*、2015 年 6 月 26 日、成蹊大学(東京都・武蔵野市)

正木 紀隆、ガスクラスターイオンビームと飛行時間型二次イオン質量分析を組み合わせた核内三次元構造解析、医学生物学電子顕微鏡技術学会第 31 回学術講演会、2015 年 6 月 21 日、名古屋市立大学(愛知県・名古屋市)

瀬藤 光利、質量顕微鏡の開発と応用、日本顕微鏡学会平成 27 年総会(瀬藤賞受賞記念講演)、2015 年 5 月 14 日、京都国

際会館(京都府・京都市)  
Mitsutoshi Setou,、 Three-Dimensional Image of Cleavage Bodies in Nuclei Is Configured with Gas Cluster Ion Beam/Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry、 9th Asian Biophysics Association、 05/10/2015、 Shaoxing(China)  
Hossen Md Amir, Yasuyuki Nagata, Michihiko Waki, Yoshimi Ide, Kazunori Ohnishi, Mitsutoshi Setou, Single cell MALDI-IMS outlines that PC(34:1) is downregulated in multiple myeloma cell compared to normal plasma cells、 第 73 回日本癌学会学術総会、 2014 年 9 月 26 日、 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)  
瀬藤 光利、 質量顕微鏡の開発と応用、 第 32 回日本ヒト細胞学会学術集会、 2014 年 8 月 30 日、 東京慈恵会医科大学(東京都港区)

Mitsutoshi Setou、 Cellular imaging mass spectrometry of lipids、 EMBO WORK SHOP、 06/03/2014、 Vico Equense(Italy)  
Takahiro Hayasaka、 Application of Imaging Mass Spectrometry for Biological Samples、 9th International Symposium on Atomic Level Characterizations for New Materials and Devices ' 13、 12/02/2013、 Hawaii、 (USA)

Mitsutoshi Setou、 Lipid imaging with mass spectrometry、 16th GEM - 10th GERLI meeting - GEM/GERLI lipidomics meeting、 11/12/2013、 Saint-Jean-Cap-Ferrat(France)

Mitsutoshi Setou、 Subcellular analysis using TOF-SIMS successfully depicts organelles in nuclei、 19th international conference on secondary ion mass spectrometry、 09/30/2013、 Jeju(Korea)

瀬藤光利、創薬における質量顕微鏡法の可能性、創薬薬理フォーラム 第 21 回シンポジウム、2013 年 9 月 19 日、日本薬学会 長井記念館(東京都渋谷区)

Mitsutoshi Setou、 IMAGING MASS SPECTROMETRY WITH ION MOBILITY、 Translating Omics Science to Clinical Applications 2013、 08/15/2013、 Kowloon Tong(Hong Kong)

Mitsutoshi Setou、 Imaging mass spectrometry of lipids、 Federation of American Societies for Experimental Biology Science Research Conferences、 2013 年 8 月 9 日、ニセコヒルトンホテル(ニセコ・北海道)

瀬藤光利、質量顕微鏡研究とトランスレーショナルリサーチ、第 21 回日本乳癌学会学術総会、2013 年 6 月 28 日、アクトシティ浜松(静岡県・浜松市)

Mitsutoshi Setou、 Development and Application of Imaging Mass Spectrometry、 RJG-Ph.D. Congress XIV、 04/06/2013、 Pattaya (Thai)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 1 件)

名称: 骨髄腫細胞死誘導剤及びこれを含む骨髄腫治療用医薬組成物  
発明者: 瀬藤光利、永田泰之  
権利者: 浜松医科大学  
種類: 特許  
番号: 特願 2014-087394  
出願年月日: 2014 年 4 月 21 日  
国内外の別: 国内

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/mt/setou/ja/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

瀬藤 光利(Mitsutoshi, Setou)  
浜松医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 20302664

### (2) 研究分担者

武井 史郎(Shiro, Takei)  
浜松医科大学・医学部・特任助教  
研究者番号: 60398576  
(平成 27 年度のみ研究分担者)

中嶋 裕子(Yuko, Nakashima)  
浜松医科大学・医学部・特任研究員  
研究者番号: 20634760  
(平成 27 年度のみ研究分担者)

木村 芳滋(Yoshishige Kimura)  
浜松医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 90274703  
(平成 25.26 年度 研究分担者)

神力 悟(Satoru Shinriki)  
浜松医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 00583048  
(平成 26 年度のみ研究分担者)

早坂 孝宏 (Takahiro Hayasaka)  
浜松医科大学・医学部・助教  
研究者番号：90415927  
(平成 25 年度のみ研究分担者)