

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的先端研究開発支援事業ユニットタイプ「画期的医薬品等の創出をめざす脂質の生理活性と機能の解明」研究開発領域  
(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation, Studies on Specific Activities and Functions of Lipid Molecules to Develop Innovative Medical Technologies

研究開発課題名： (日本語) 光による脂質の同定制御観察技術すなわちオプトリポドミクスの創生  
(英語) Creation of a novel technology “Optolipidomics” to identify, control and observe functional lipids using light

研究開発担当者 (日本語) 浜松医科大学 細胞分子解剖学講座 教授 瀬藤光利  
所属 役職 氏名： (英語) Mitsutoshi Setou, Professor, Department of Cellular and Molecular Anatomy, Hamamatsu University School of Medicine

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) 光で脂質を同定する技術の開発  
開発課題名： (英語) Development of the technology to identify functional lipids using light

研究開発分担者 (日本語) 浜松医科大学 細胞分子解剖学講座 教授 瀬藤光利  
所属 役職 氏名： (英語) Hamamatsu University School of Medicine, Department of Cellular and Molecular Anatomy, Professor, Mitsutoshi Setou

## II. 成果の概要（総括研究報告）

### ・ 研究開発代表者による報告の場合

#### 和文

本研究開発では、光で脂質を同定、制御、観察する新たな技術「オプトリピドミクス」の創出を目指している。すなわち質量顕微鏡法の測定質量の精密化と高感度化の技術を開発し、ヒト疾患サンプルのイメージングリピドミクス解析を通じて、病態において重要な機能性脂質を探索同定する。同定された脂質の機能を明らかにするために、厳密な脂質操作を可能にする光制御モジュールと操作結果を確認するための観察プローブを開発する。この脂質の同定、制御、観察の一連のシームレスなシステムは将来のリピドーム編集技術の基盤となり、脂質を標的にする創薬構想につながることを期待される。

精密質量顕微鏡の開発については、前年度の調査に基づきイメージングリピドミクスに適した精密質量分析計を導入し、マウス正常組織や脂質標品を用いた解析を通じて、質量精度の検証とイメージングに応用するための整備を進めた。一方で脂質検出の高感度化技術の開発を進め、MALDI-IMS に用いるマトリクス化合物の光吸収特性の検討ならびにポストイオン化試験用機器の構築を開始した。さらにプロスタグランジン類の誘導体化処理を検討し、標準試料から非誘導体化時に比べて 50,000 倍程度強いシグナル強度を得た。

疾患のイメージングリピドミクス解析については、ヒト直腸がん組織における特徴的なアラキドン酸含有脂質分布（発表論文 3）、統合失調症患者死後脳におけるアラキドン酸含有脂質の低下（発表論文 7）、脂肪細胞が腹部大動脈瘤破裂に与える影響（発表論文 4）、マウス脊髄損傷モデルにおけるアラキドン酸含有脂質の変化（発表論文 2）に関する研究を論文発表した。一方で脂質を人為操作してその機能を明らかにする研究を進め、脂質組成の変化による繊毛制御機構（発表論文 5）、テイ・サックス病モデルマウスを用いた新規酵素補充療法の開発（発表論文 1）を報告した。

脂質の光制御モジュール開発については、細胞内の膜リン脂質のアラキドン酸含量を制御するモジュールとして、ホスホリパーゼ A2 の触媒ドメインと小胞体局在タンパク質を光依存的会合タンパク質と連結し、培養細胞にて光照射時にのみ小胞体に移行する性質を確認した。さらに生じたアラキドン酸により活性化する下流シグナルを評価することで、実際に酵素として機能することを確認した。一方で制御観察共存技術として、光制御モジュールの *in vitro* 励起-脱励起システムの光学系を構築した。

脂質の光観察プローブの開発については、前年度に構築した FRET 用の蛍光タンパク質変異体ライブラリの性質評価を行ない、統合失調症で異常を見出した脂質を観察するためのプローブ開発に着手した。一方で観察同定共存技術の確立に向けて、脂質への影響が少ないことが期待出来る組織透明化技術を新たに開発し、実際にマウス脳組織中の脂質に与える影響を質量顕微鏡法で検証した。

各要素技術の綿密な連携のため、プロジェクト関係者が一同に会する班会議を 2016 年 6 月に理研 BSI で開催した。

## 英文

This project aims to create a novel technology “Optolipidomics” to identify, control and observe functional lipids using light; Development of the mass microscope in mass resolution and sensitivity would allow us to identify important lipids in human diseases by imaging mass spectrometry. To clarify the function of the identified lipids, the optically controllable modules and fluorescent probes are required to regulate the candidate lipids spatiotemporally and to observe the results of control, respectively. This seamless system to study the functions of lipids will be a basis of the lipidome editing technology in the future, leading to a new concept of drug discovery by targeting lipids.

To improve the mass resolution of the mass microscope, we installed a FT-ICR mass spectrometer based on the assessment last year. Then we confirmed the mass accuracy of the detected ions and established the methods of lipid imaging using authentic lipid samples and tissues derived from mice. On the other hands, to improve the sensitivity of mass microscope, we investigated the optic properties of matrices for MALDI-IMS and assembled the instruments for post ionization. Furthermore, we tried to derivatize prostanoids and obtained increased intensities of detected ions by 50,000-fold compared with normal samples.

By using the imaging mass spectrometry, we clarified an accumulation of arachidonic acid-containing phosphatidylinositol at the outer edge of colorectal cancer (Ref.3), a decreased arachidonic acid-containing phosphatidylinositol level in the post-mortem brains with schizophrenia (Ref.7), the roles of adipocytes in the rupture of abdominal aortic aneurysm (Ref.4), and an increased arachidonic acid-containing phosphatidylcholine in the spinal cord after peripheral nerve injury (Ref.2). We further studied on the functions of lipids by artificial regulation and reported a dynamic remodeling of membrane composition for primary cilia excision (Ref.5) and a new therapeutic method for Tay-Sachs disease by enzyme supplementation (Ref.1).

As a prototype of optically controllable modules, we generated a series of fusion genes using the catalytic domain of phospholipase A2 or an endoplasmic reticulum-resident protein with the iLID-SSPB system. We confirmed the module could be recruited to ER only under blue light illumination and an activation of the signal pathway stimulated by increased arachidonic acid. Meanwhile, we also assembled an optical instrument for exciting-damping the optic modules to perform simultaneous analysis.

To construct fluorescent probes for functional lipids, we evaluated the mutant library of fluorescent proteins for FRET and generated candidate probes to detect the phospholipids altered in schizophrenia. As a technology for affiliation of observation and detection, we developed a novel optical clearing method to keep lipids and evaluated the effects on lipids in mouse brain tissue using imaging mass spectrometry.

To promote the collaboration, a group conference was held at Riken BSI on June 2016.

### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌0件、国際誌8件）

1. Kitakaze K, Mizutani Y, Sugiyama E, Tasaki C, Tsuji D, Maita N, Hirokawa T, Asanuma D, Kamiya M, Sato K, Setou M, Urano Y, Togawa T, Otaka A, Sakuraba H, Itoh K. Protease-resistant modified human  $\beta$ -hexosaminidase B ameliorates symptoms in GM2 gangliosidosis model. *J Clin Invest*. 2016, 126(5):1691-703. doi:10.1172/JCI85300.
2. Xu D, Omura T, Masaki N, Arima H, Banno T, Okamoto A, Hanada M, Takei S, Matsushita S, Sugiyama E, \*Setou M, Matsuyama Y. Increased arachidonic acid-containing phosphatidylcholine is associated with reactive microglia and astrocytes in the spinal cord after peripheral nerve injury. *Sci Rep*. 2016, 6:26427. doi:10.1038/srep26427. \*Corresponding author
3. Hiraide T, Ikegami K, Sakaguchi T, Morita Y, Hayasaka T, Masaki N, Waki M, Sugiyama E, Shinriki S, Takeda M, Shibasaki Y, Miyazaki S, Kikuchi H, Okuyama H, Inoue M, \*Setou M, Konno H. Accumulation of arachidonic acid-containing phosphatidylinositol at the outer edge of colorectal cancer. *Sci Rep*. 2016, 6:29935. doi: 10.1038/srep29935. \*Corresponding author
4. Kugo H, Zaima N, Tanaka H, Mouri Y, Yanagimoto K, Hayamizu K, Hashimoto K, Sasaki T, Sano M, Yata T, Urano T, Setou M, Unno N, Moriyama T. Adipocyte in vascular wall can induce the rupture of abdominal aortic aneurysm. *Sci Rep*. 2016, 6:31268. doi: 10.1038/srep31268.
5. Phua SC, Chiba S, Suzuki M, Su E, Elle RC, Ganesh PV, Setou M, Rohatgi R, Jeremy RF, Ikegami K, Inoue T. Dynamic Remodeling of Membrane Composition Drives Cell Cycle through Primary Cilia Excision. *Cell*. 2017, 168:1-2:264-279.  
AMED プレスリリース「細胞に生えている「毛」の先端が千切れる現象を発見」  
[http://www.amed.go.jp/news/release\\_20170113-01.html](http://www.amed.go.jp/news/release_20170113-01.html)
6. Koga K, Yao I, Setou M, Zhuo M. SCRAPPER selectively contributes to spontaneous release and presynaptic long-term potentiation in the anterior cingulate cortex. *J Neurosci*. 2017, pii: 0023-16. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0023-16.2017.
7. Matsumoto J, Nakanishi H, Kunii Y, Sugiura Y, Yuki D, Wada A, Hino M, Niwa SI, Kondo T, Waki M, Hayasaka T, Masaki N, Akatsu H, Hashizume Y, Yamamoto S, Sato S, Sasaki T, \*Setou M, Yabe H. Decreased 16:0/20:4-phosphatidylinositol level in the post-mortem prefrontal cortex of elderly patients with schizophrenia. *Sci Rep*. 2017, 7:45050. doi: 10.1038/srep45050. \*Corresponding author
8. Shintani-Domoto Y, Hayasaka T, Maeda D, Masaki N, Ito TK, Sakuma K, Tanaka M, Kabashima K, Takei S, \*Setou M, \*Fukayama M. Different desmin peptides are distinctly deposited in cytoplasmic aggregations and cytoplasm of desmin-related cardiomyopathy patients. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics in press*. \*Corresponding author

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

該当無し

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

該当無し

(4) 特許出願

平成 28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名 : (日本語) 革新的先端研究開発支援事業ユニットタイプ「画期的医薬品等の創出をめざす脂質の生理活性と機能の解明」研究開発領域  
(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation, Studies on Specific Activities and Functions of Lipid Molecules to Develop Innovative Medical Technologies
- 研究開発課題名 : (日本語) 光による脂質の同定制御観察技術すなわちオプトリポドミクスの創生  
(英語) Creation of a novel technology “Optolipidomics” to identify, control and observe functional lipids using light
- 研究開発担当者 (日本語) 浜松医科大学 細胞分子解剖学講座 教授 瀬藤光利  
所属 役職 氏名 : (英語) Mitsutoshi Setou, Professor, Department of Cellular and Molecular Anatomy, Hamamatsu University School of Medicine
- 実施期間 : 平成 28年 4月 1日 ~ 平成 29年 3月 31日
- 分担研究 (日本語) 光で脂質を操作する技術の開発  
開発課題名 : (英語) Development of the technology to control functional lipids using light
- 研究開発分担者 (日本語) 東京大学大学院理学系研究科 教授 小澤岳昌  
所属 役職 氏名 : (英語) Takeaki Ozawa, Professor, Graduate School of Science, The University of Tokyo

## II. 成果の概要（総括研究報告）

- ・ 研究開発分担者による報告の場合  
研究開発代表者：瀬藤 光利 総括研究報告を参照。

## III. 成果の外部への発表

- (1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0件、国際誌 0件）  
該当無し
- (2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表  
該当無し
- (3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み  
該当無し
- (4) 特許出願

平成 28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的先端研究開発支援事業ユニットタイプ「画期的医薬品等の創出をめざす脂質の生理活性と機能の解明」研究開発領域  
(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation, Studies on Specific Activities and Functions of Lipid Molecules to Develop Innovative Medical Technologies

研究開発課題名： (日本語) 光による脂質の同定制御観察技術すなわちオプトリポドミクスの創生  
(英語) Creation of a novel technology “Optolipidomics” to identify, control and observe functional lipids using light

研究開発担当者 (日本語) 浜松医科大学 細胞分子解剖学講座 教授 瀬藤光利

所属 役職 氏名： (英語) Mitsutoshi Setou, Professor, Department of Cellular and Molecular Anatomy, Hamamatsu University School of Medicine

実施期間： 平成 28年 4月 1日 ～ 平成 29年 3月 31日

分担研究 (日本語) 光で脂質を観察する技術の開発

開発課題名： (英語) Development of the technology to observe functional lipids using light

研究開発分担者 (日本語) 国立研究開発法人理化学研究所 脳科学総合研究センター  
シニアチームリーダー 宮脇敦史

所属 役職 氏名： (英語) Atsushi Miyawaki, M.D. Ph.D., Senior Team Leader  
RIKEN Brain Science Institute

II. 成果の概要 (総括研究報告)

- ・ 研究開発分担者による報告の場合  
研究開発代表者： 瀬藤光利 総括研究報告を参照。

### III. 成果の外部への発表

#### (1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 3件、国際誌 3件）

1. 濱裕、日置寛之、並木香奈、星田哲志、黒川裕、宮脇敦史、組織の透明化技術、『生体の科学』、2017, 68(1): 85-93. (2月号, 2/15)
2. 日置寛之、濱裕、孫在隣、黄晶媛、並木香奈、星田哲志、黒川裕、宮脇敦史 (2017) 脳透明化技術の現状と今後の発展 —ScaleS法に焦点を当てて—. 日本薬理学雑誌, 147 (4): 173-179.
3. Hama H, Hioki H, Namiki K, Hoshida T, Kurokawa H, Ishidate F, Kaneko T, Akagi T, Saito T, Saido T, Miyawaki A. (2016) Deep Imaging of Cleared Brain by Confocal Laser-Scanning Microscopy. **Protocol Exchange**, doi:10.1038/protex.2016.019.
4. Hamazaki K, Maekawa M, Toyota T, Iwayama Y, Dean B, Hamazaki T, Yoshikawa T: Fatty acid composition and fatty acid binding protein expression in the postmortem frontal cortex of patients with schizophrenia: a case-control study. **Schizophrenia Research** 171: 226-232, 2016
5. Hamazaki K, Maekawa M, Toyota T, Dean B, Hamazaki T, Yoshikawa T: Fatty acid composition of the postmortem corpus callosum of patients with schizophrenia, bipolar disorder, or major depressive disorder. **European Psychiatry** 39: 51-56, 2017.
6. 吉川武男、島本知英、和田唯奈：統合失調症はどこまで理解できているか。こころの科学、HUMAN MIND SPECIAL ISSUE (7 Suppl), 110-116、2016.

#### (2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 「透明化技術の理論と実践」口頭、星田哲志、濱裕、並木香奈、黒川裕、日置寛之、宮脇敦史、第32回日本DDS学会学術集会シンポジウム、2016/7/1、国内
2. 「蛍光蛋白質を用いたバイオイメーキング技術について」、口頭、宮脇敦史、第3回京都大学—稲盛財団合同京都賞シンポジウム、2016.7.9、国内
3. 「蛍光蛋白質を用いたバイオイメーキング技術について」口頭、宮脇敦史、QBIC Symposium 2016 on Decoding Organisms by Quantitative Cell Profiling, 2016.9.7、国内
4. 「Fluorescent protein applications in research, medicine, and bioengineering」宮脇敦史、International conference on Labeling & Nanoscopy, 2016.10.31、海外 (Germany)
5. 「Exploration of schizophrenia related lipid molecules using imaging mass spectrometry」ポスター発表、Shimamoto C., Ohnishi T., Esaki K., Maekawa M., Watanabe A., Toyoshima M., Sugiyama E., Owada Y., Setou M., Yoshikawa T., 第39回日本分子生物学会年会, 2016/12/1, 国内
6. 「蛍光蛋白質を用いたバイオイメーキング技術について」口頭、宮脇敦史、2017 CMBE Conference 2017.1.5、海外 (USA)
7. 「蛍光蛋白質を用いたバイオイメーキング技術について」口頭、宮脇敦史、第5回生命理工国際シンポジウム、2017.1.11、国内。

8. 「質量分析法を用いた統合失調症関連脂質の探索」口頭、島本知英、大西哲生、江崎加代子、前川素子、渡辺明子、豊島学、杉山栄二、大和田祐二、瀬藤光利、吉川武男、第12回日本統合失調症学会、2017/3/24-25、国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 「蛍光蛋白質を用いた技術の紹介」宮脇敦史、「秋（とき）を掴む」写真展&Talk、2016/8/24、国内

(4) 特許出願

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的先端研究開発支援事業ユニットタイプ「画期的医薬品等の創出をめざす脂質の生理活性と機能の解明」研究開発領域  
(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation, Studies on Specific Activities and Functions of Lipid Molecules to Develop Innovative Medical Technologies

研究開発課題名： (日本語) 光による脂質の同定制御観察技術すなわちオプトリポドミクスの創生  
(英語) Creation of a novel technology “Optolipidomics” to identify, control and observe functional lipids using light

研究開発担当者 (日本語) 浜松医科大学 細胞分子解剖学講座 教授 瀬藤光利

所属 役職 氏名： (英語) Mitsutoshi Setou, Professor, Department of Cellular and Molecular Anatomy, Hamamatsu University School of Medicine

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) ポストイオン化および誘導体化による脂質イオン化向上技術の開発  
開発課題名： (英語) Development of the lipid ionization efficiency by a post-ionization and the derivatization

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人浜松医科大学光先端医学教育研究センター  
特任教授 岡崎茂俊

所属 役職 氏名： (英語) Hamamatsu University School of Medicine, Preeminent Medical Photonics Education and Research Center, Professor, Shigetoshi Okazaki

II. 成果の概要 (総括研究報告)

- ・ 研究開発分担者による報告の場合  
研究開発代表者： 瀬藤光利 総括研究報告を参照。

### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 0 件）

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表  
該当無し

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み  
該当無し

(4) 特許出願  
該当無し