

課題番号 : 24指001  
研究課題名 : 生体膜脂質生合成メカニズム解明と脂質バイオマーカーの探索  
主任研究者名 : 清水孝雄  
分担研究者名 :

キーワード : 生体膜リン脂質、リゾリン脂質アシル転移酵素、生理活性脂質、脂質バイオマーカー  
研究成果 :

平成28年度には合計6報の英文原著論文を発表した。  
代表的な論文の要約を以下に示す。

#### 細胞内脂質可視化技術

Shimura\*, Shindou\*, (\*, equal) et al. (2016) FASEB J. 30. 4149-4158.

現在、細胞内脂肪酸の空間情報を得ることは非常に難しい。今回、細胞内脂肪酸可視化技術を発表した。Br ラベルパルミチン酸と Br ラベルステアリン酸を CHO 細胞培養液に添加し、Spring 8 の Scanning X-ray fluorescence microscopy を用いて Br シグナルを検出した。X 線顕微鏡は元素固有の特性 X 線を検出できる。細胞内の核膜、小胞体、ゴルジ体周辺で Br シグナルを検出できた。同時に脂質解析を行い、ほとんどがリン脂質由来である事、また多様なリン脂質に組み込まれている事も確認した。新しい細胞内脂質の可視化技術として、今後発展させたい。

#### 神経因性疼痛と血小板活性化因子 (PAF)

Shindou et al. (2017) FASEB J. in press

神経因性疼痛は NSAID やオピオイドでも鎮痛効果は弱く、未解決な疼痛である。近年、リン脂質メディエーターである血小板活性化因子 (PAF) が神経因性疼痛に影響する事が報告されているが詳細はわかっていない。今回、血小板活性化因子生合成酵素であるリゾホスファチジルコリンアシル転移酵素 (LPCAT2) 欠損マウス (LPCAT2-KO) を作製し、神経因性疼痛モデルとして PSL (partial sciatic ligation) モデル解析を行った。LPCAT2-KO マウスは疼痛行動を起こさなかった。また、もう一方の PAF 生合成酵素である LPCAT1 の欠損マウスは野生型マウスと同様に疼痛を示した。脊髄中 PAF は LPCAT2-KO マウスで検出できず、また PSL モデルによって増加したミクログリアに LPCAT2 も発現していた。細胞を PAF で刺激すると LPCAT2 のリン酸化 (活性化) により、PAF が産生される。マウス腹腔マクロファージを PAF 受容体アンタゴニストである ABT-491 や WEB2086 で処理したのちに、ATP で PAF 産生を誘発すると、PAF 量は減少した。これは一度産生された PAF が再び PAF 産生を誘導するフィードバックループを示唆している。このループが PAF pain loop となり疼痛を維持又は悪化させている可能性を推測している。神経因性疼痛に対する鎮痛薬開発へ発展できる可能性がある。

なお、本プロジェクトの更新決定 (平成28年1月) に伴い、平成28年4月より小野薬品工業との企業連携講座を設置し、脂質創薬に向けた共同研究を開始した。連携講座には小野薬品工業からの出向職員が研究に従事している。

Subject No. : 24-001  
Title : Analysis of cellular membrane phospholipid biosynthesis and screening of lipid biomarkers  
Researchers : Takao Shimizu  
Key word : Cellular membrane phospholipid, Eicosanoid, Lipid biomarker  
Abstract :

Totally, 5 original articles and 1 review article were published in 2016/4-2017/3.

Among them, representative articles are shown here.

Shimura\*, Shindou\*,(\*, equal) et al. (2016) FASEB J. 30. 4149-4158.

Intracellular imaging of fatty acids and glycerophospholipids has not been successful due to insufficient resolution using conventional methods. Here, we established a new method to visualize fatty acid fate in cells. Br-labeled palmitic acid and Br-labeled stearic acid were added to culture medium of CHO cells. Br signals were detected using a scanning X-ray fluorescence microscopy in Spring 8 (RIKEN). Br-labeled phospholipids and fatty acids were confirmed using our LC-MS and GC, respectively. We could observe Br signal around ER and Golgi. Although further studies are needed, this technique will contribute to visualize fatty acid in cells.

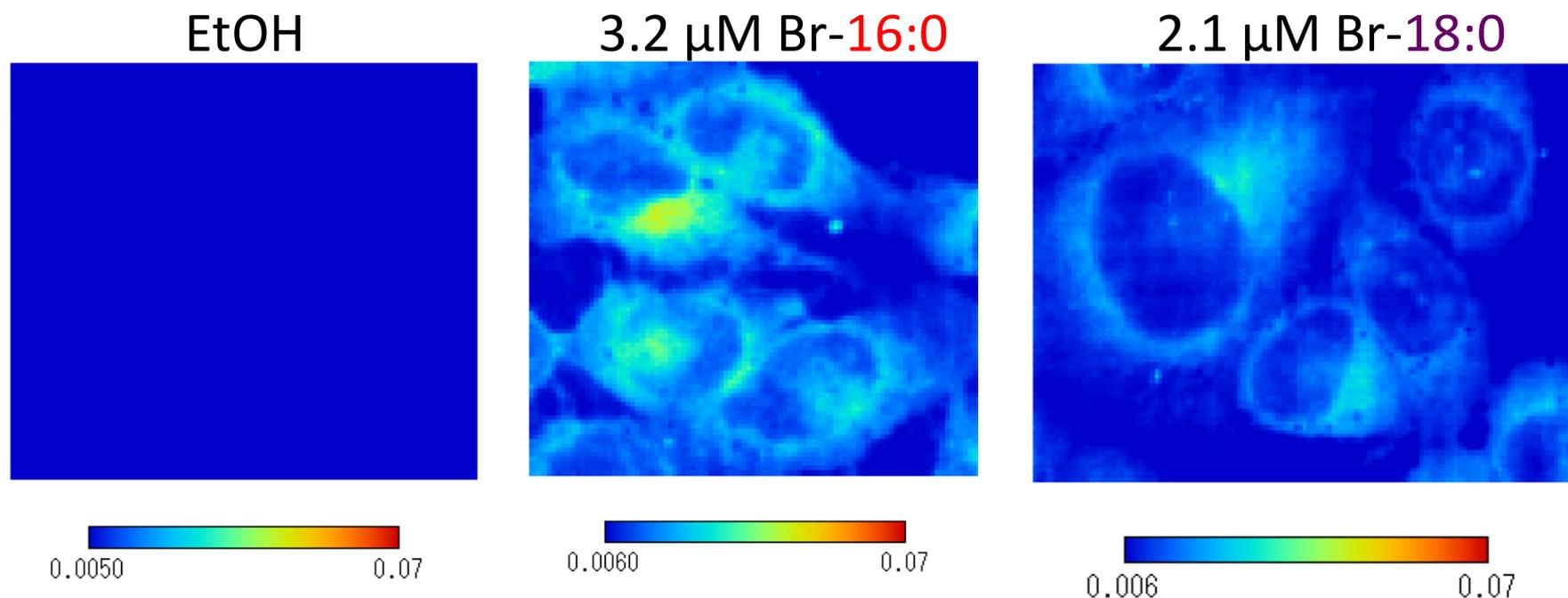
Shindou et al. (2017) FASEB J. in press

Neuropathic pain resultant from peripheral neuronal damage is largely resistant to treatment with currently available analgesic drugs. Recently, ATP and platelet-activating factor (PAF) were reported to play important inductive roles in neuropathic pain. Platelet-activating factor (PAF) is biosynthesized by lysophosphatidylcholine acyltransferase 2 (LPCAT2) and LPCAT1. In this study, we constructed LPCAT2 knock-out (KO) mice and analyzed partial sciatic ligation (PSL) model to examine the relationship between PAF and neuropathic pain. Neuropathic pain was attenuated in LPCAT2-KO mice, but not in LPCAT1-KO mice. By PSL operation, microglia in spinal cord were increased and LPCAT2 was detected in the microglia. PAF was not detected in spinal cord of LPCAT2-KO mice. Pretreatment with PAFR receptor antagonist, ABT-491 and WEB2086 enhanced ATP-stimulated PAF biosynthesis indicating existence of PAF feedback loop. We hypothesized that this loop exacerbated neuropathic pain as a PAF pain loop

Based on the long-term collaboration with ONO Pharmaceutical Co., NCGM and Ono have agreed to establish a “Ono collaboration laboratory” within the Lipid Signaling Project and started a more intimate collaboration by inviting researchers from the company.

# Detection of Br-fatty acids in CHO cells

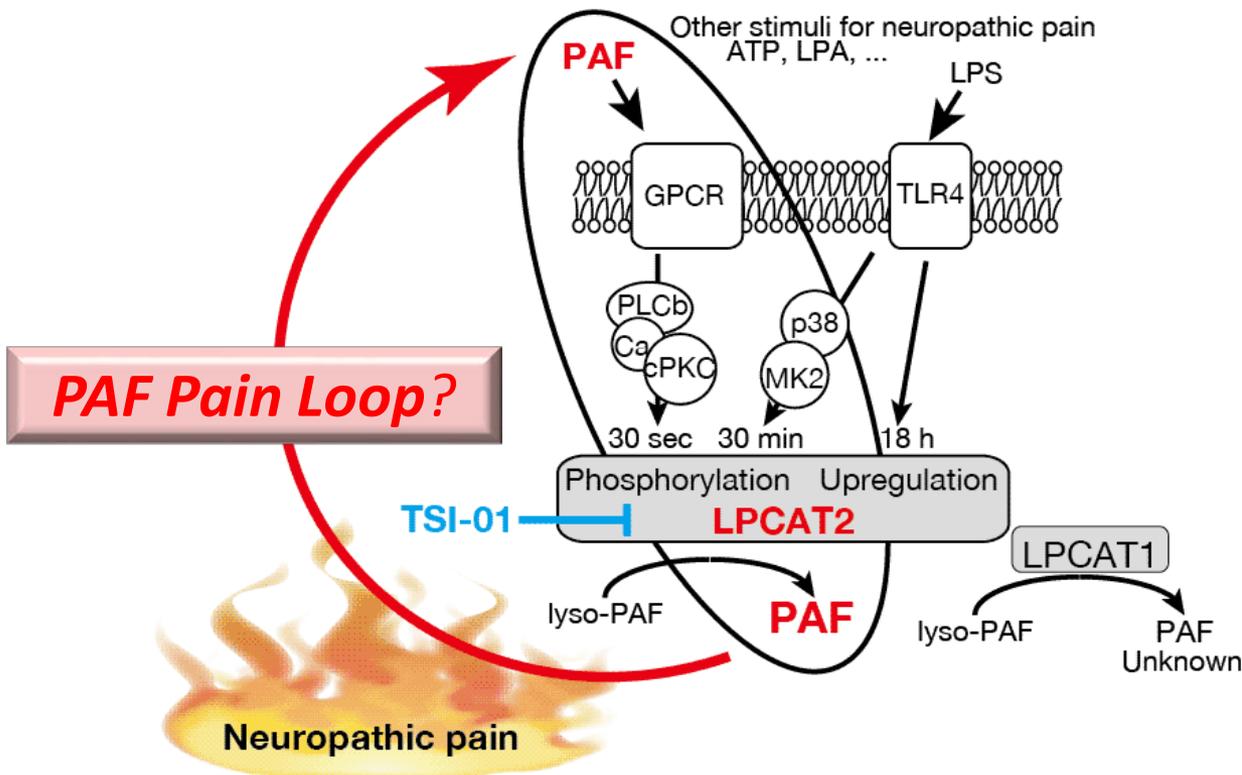
Cells were treatment with both *Br-16:0* than *Br-18:0*.



**細胞内脂肪酸可視化に成功**

# A novel therapeutic target of newly categorized analgesic drugs

2017年4月4日日経新聞



海外の神経因性疼痛患者からも感謝のメールを頂いた。

血小板活性化因子 (PAF) 生合成酵素 (LPCAT2) 欠損マウスは **神経因性疼痛** を示さなかった。NASIDs やオピオイドに続く **新規鎮痛薬開発** のターゲットを見つけた。

国立がん研究センター、東京大学、理研との共同研究

H. Shindou et al. *FASEB J.* 2017 in press

研究発表及び特許取得報告について

課題番号：24指001

研究課題名：生体膜脂質生合成メカニズム解明と脂質バイオマーカーの探索

主任研究者名：清水 孝雄

論文発表

論文タイトル	著者	掲載誌	掲載号	年
BLT1 signalling protects the liver against acetaminophen hepatotoxicity by preventing excessive accumulation of hepatic neutrophils.	Kojo, K., Ito, Y., Eshima, K., Nishizawa, N., Ohkubo, H., Yokomizo, T., Shimizu, T., Watanabe, M., Majima, M.	Sci. Rep.	6:29650	2016
Imaging of Intracellular Fatty Acids by Scanning X-ray Fluorescence Microscopy.	Shimura, M.*,#, Shindou, H.*,#, Szyrwiel, L.*, Tokuoka, M.S., Hamano, F., Matsuyama, S., Okamoto, M., Matsunaga, A., Kita, Y., Ishizaka, Y., Yamauchi, K., Komura, Y., Lobinski, R., Shimizu, I., Shimizu, T. *, equal contribution #, equal corresponding author	FASEB J.	30. 4149-4158	2016
Blood-brain barrier permeability of ginkgolide: Comparison of the behavior of PET probes 7a-[18F]fluoro- and 10-0-p-[11C]methylbenzyl ginkgolide B in monkey and rat brains.	Doi, H., Sato, K., Shindou, H., Sumi, K., Koyama, H., Hosoya, T., Watanabe, Y., Ishii, S., Tsukada, H., Nakanishi, K., and Suzuki, M.	Bioorganic & Medicinal Chemistry	24 5148-5157.	2016
Leukotriene B4 receptor type 2 protects against pneumolysin-dependent acute lung injury.	.Shigematsu, M., Koga, T., Ishimori, A., Saeki, K., Ishii, Y., Taketomi, Y., Ohba, M., Jo-Watanabe, A., Okuno, T., Harada, N., Harayama, T., Shindou, H., Li JD, Murakami, M., Hoka, S., Yokomizo, T.	Sci Rep.	6:34560	2016

研究発表及び特許取得報告について

Relief from neuropathic pain by blocking of platelet-activating factor-pain loop.	Shindou, H.*, Shiraishi, S.*, Tokuoka, M. S., Takahashi, Y., Harayama, T., Abe, T., Bando, K., Miyano, K., Kita, Y., Uezono, Y., Shimizu, T. *, equal contribution	FASEB J.	in press	2017
Mediator lipidomics by liquid chromatography-tandem mass spectrometry.	.Kita, Y., Tokuoka- M., S., and Shimizu, T.	BBA-Molecular and Cell Biology of Lipids.	in press	2017

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
Roles of PUFA-containing phospholipids in biology and pathology	Takao Shimizu	LIPID MAPS Annual Meeting 2016:Lipidomics Impact on Metabolic, Cancer, Cardiovascular and Inflammatory	Scripps Seaside Forum UCSD	May 17-18, 2016
PNPLA7-mediated catabolic pathway for phosphatidylcholine has a crucial role in hepatic choline metabolism and systemic energy homeostasis	Tetsuya Hirabayashi, Misa Mouri, Suzumi M. Tokuoka, Yoshihiro Kita, Rieko Nakata, Kazutaka Ikeda, Makoto Murakami	7th International Conference on Phospholipase A2 and Lipid Mediators: From Bench To Translational Medicine	Scripps Seaside Forum UCSD	May 19-20, 2016
Mechanism of glycerophospholipid diversity and its biological consequence	Takao Shimizu	7th International Conference on Phospholipase A2 and Lipid Mediators: From Bench To Translational	Scripps Seaside Forum UCSD	May 20, 2016
細胞内脂肪酸運命の可視化	進藤英雄、志村まり、 Lukasz Szyrwiel, 岡 本真由美、浜野文三 江、徳岡涼美、北芳 博、清水功雄、清水孝 雄	第58回 日本脂質 生化学会	にぎわい交流館 AU、秋田	2016年6月9、10 日
膜結合型プロスタグランジンE合成酵素ノックダウン細胞における統合オミクス解析	花香博美、進藤英雄、 北芳博、徳岡涼美、今 城純子、清水孝雄	第58回 日本脂質 生化学会	にぎわい交流館 AU、秋田	2016年6月9、10 日
高度不飽和脂肪酸負荷に対する細胞応答とその生理的意義の解析	赤木聡介、河野望、有 山博之、進藤英雄、清 水孝雄、新井洋由	第58回 日本脂質 生化学会	にぎわい交流館 AU、秋田	2016年6月9、10 日
エイコサノイド高感度一斉定量による血小板機能評価の基礎検討	安本篤史、徳岡涼美、 北芳博、清水孝雄、 矢富裕	第38回日本血栓止 血学会学術集会	奈良春日野国際 フォーラム	2016年6月18日

研究発表及び特許取得報告について

アラキドン酸含有リン脂質制御による中性脂肪の輸送調節	吉田(橋立)智美	第17回 Atherosclerosis and Biolipid Conference	ヒルトン東京お 台場、東京	2016年8月6日
エイコサノイド高感度一斉定量法の血漿・血清臨床検体への応用に向けた基礎検討	安本篤史、徳岡涼美、 北 芳博、清水孝雄、 矢富裕	第63回日臨床検査 医学会学術集会	神戸国際会議場	2016年9月2日
Critical roles of extracellular phospholipids in sexual differentiation of Plasmodium falciparum	Takeshi Q Tanaka, Suzumi M. Tokuoka, Daichi Nakatani, Fumie Hamano, Thomas E. Wellems, Shin- ichiro Kawazu, Kiyoshi Kita, Takao Shimizu, Fuyuki Tokumasu	第15回あわじしま 感染症・免疫 フォーラム	淡路夢舞台国際 会議場	2016年9月7日
熱帯熱マラリア原虫による細胞外Glycerolのリン脂質生成への取り込み	徳舛富由樹、徳岡涼 美、田中 健Q、稲岡健 ダニエル、浜野文三 江、河津信一郎、北 潔、清水孝雄	第89回日本生化学 会大会	仙台国際セン ター／東北大学 川内北キャンパ ス	2016年9月25-27 日
リン脂質研究の最新の進歩	清水孝雄	第90回日本生化学 会大会	仙台国際セン ター／東北大学 川内北キャンパ ス	2016年9月25-27 日
肝臓における新規ホスファチジルコリン分解経路の代謝恒常性における役割	平林哲也、毛利美紗、 徳岡涼美、北芳博、池 田和貴、中田理恵子、 村上誠	第90回日本生化学 会大会	仙台国際セン ター／東北大学 川内北キャンパ ス	2016年9月25-27 日
一元素ラベルによる細胞内脂肪酸運命の可視化	進藤英雄	第15回ホスファ チジルセリン研究	早稲田大学 日 本橋	2016年11月18日
Biological Roles of DHA-containing Phospholipids in vivo	清水孝雄	国際プラズマロー ゲンシンポジウム	九州大学医学部 百年講堂	2016年11月28日
2種の機能性リン脂質解析：血小板活性化因子と神経因性疼痛・DHAリン脂質と視覚機能	進藤英雄	第5回 生体情報 研究シンポジウム	秋田大学 本道 会館	2017年2月17日
膜リン脂質研究への誘いー脂質多様性の意味を考える	清水孝雄	第90回日本薬理 学会年会	長崎ブリック ホール	2017年3月16日

その他発表(雑誌、テレビ、ラジオ等)

タイトル	発表者	発表先	場所	年月日

特許取得状況について ※出願申請中のものは( )記載のこと。

発明名称	登録番号	特許権者(申請者) (共願は全記載)	登録日(申請日)	出願国

※該当がない項目の欄には「該当なし」と記載のこと。

※主任研究者が班全員分の内容を記載のこと