

循環腫瘍細胞観察可能なナノ粒子質量顕微鏡開発に関する研究

研究代表者 浜松医科大学・解剖学講座・細胞生物学分野 教授 瀬藤光利

研究要旨

がんが進展するごく早期から血中に存在する循環腫瘍細胞の質的評価は診断・治療に重要である。本研究は、ナノ粒子等を補助剤として活用し、循環腫瘍細胞の質的評価を可能とするための質量顕微鏡を開発することを目的とする。大腸がん及び乳がん細胞株を用いた循環腫瘍細胞精製・回収のための手法最適化を行い、一細胞レベルでのナノ粒子質量顕微鏡法解析を行った。大腸がんと乳がんの患者末梢血から循環腫瘍細胞を精製し質量顕微鏡解析することにより、循環腫瘍細胞の質的評価系を確立した。その過程で、ナノ粒子付与基盤の評価を行い、検討結果を基に一細胞質量顕微鏡のための新規素材の開発・普及に成功した。医薬品医療機器総合機構・医療機器戦略相談を利用し、機器開発のためには臨床的有用性を持つことが重要であるとの助言を得たことから、乳がん患者末梢血から得られた循環腫瘍細胞の質量顕微鏡解析と網羅的データ解析を行い、病態評価因子との関連性を示す代謝物を質量顕微鏡の循環腫瘍細胞観察によって評価できることを示した。この結果、ナノ粒子等を補助剤として活用した循環腫瘍細胞観察可能な質量顕微鏡が開発された

研究分担者氏名・所属研究機関名及び所属研究機関における職名

瀬藤光利 浜松医科大学・解剖学講座・細胞生物学分野 教授

池上浩司 浜松医科大学・解剖学講座・細胞生物学分野 准教授

早坂孝宏 浜松医科大学・解剖学講座・細胞生物学分野 特任助教

木村芳滋 浜松医科大学・解剖学講座・細胞生物学分野 特任助教

A．研究目的

厚生労働行政においてがん対策及びがん研究の推進は重要な位置を占める。がんの早期診断、予後判定、治療効果判定はいずれも重要な課題であり、その方法が種々議論され開発されてきた。転移に関する分子メカニズムの解明は、これらいずれの課題にも極めて重要な解決の糸口となりうるテーマである。転移に関しては、従来考えられてきたよりもごく早い病期のうちから、がん細胞が血液中に流れ出し、やがて多臓器に生着し転移巣を形成するというモデルが新規に提唱され注目を集めている。この血液中に存在する腫瘍細胞は循環腫瘍細胞と呼ばれ、検出個数と予後の悪さには正の相関関係があることが報告されている。一方で循環腫瘍細胞の質的な評価に関しては細胞表面マーカーや遺伝子発現に着目した報告が行われているのみであり、評価方法は未だ十分に確立されていない。本研究はこの評価方法を確立し病理診断に応用するために、ナノ粒子等を補助剤として活用した一細胞レベルの超高解像度解析能を備えた循環腫瘍細胞観察可能な質量顕微鏡の開発を目

的とする。

質量顕微鏡は研究代表者らが開発してきた質量分析手法であり、生体試料を直接的に二次元質量分析することにより、試料組織上生体物質の種類、位置、相対量を解析する手法である。循環腫瘍細胞観察可能な質量顕微鏡が医療分析機器ジャンルとして成立すれば、国内医療機器産業の振興につながり国内経済にも好影響を及ぼすことが期待できる。

本研究では、循環腫瘍細胞の新規な質的評価方法として用いることのできる一細胞質量顕微鏡法を開発する。質量顕微鏡法ではナノ粒子等を補助剤として用いることにより多くの分子種が観察できることを、研究代表者らは証明してきた。本研究では、新たな循環腫瘍細胞解析機器の確立を目指すために、担がん患者検体から循環腫瘍細胞を回収し統合的解析を行う。末梢血および比較試料である原発巣組織の主な採取対象として乳がんを設定する。乳がんは女性特有のがんであり、中年齢層における発症が少なくないことから、本研究は厚生労働行政の目指す「女性特有のがん対策の推進」及び「働く世代のがん対策」に貢献すると考えられる。

B．研究方法

臨床検体からの循環腫瘍細胞回収と質量顕微鏡観察を段階的に行った。途中、医薬品医療機器総合機構（PMDA）の薬事戦略相談において助言を受けて、研究方法の修正を行いつつ事業を進めた。循環腫瘍細胞を観察可能なナノ粒子等を補助剤として用いた一細胞質量顕微鏡法を確立するため、質量顕微鏡の臨床的有用性を調べるために以下の

方法を用いた。1) 担がん患者検体の収集、2) 担がん患者より採取した末梢血から循環腫瘍細胞を回収する手法の最適化、3) 一細胞ナノ粒子質量顕微鏡解析法の最適化、4) 臨床検体の質量顕微鏡解析 5) 病態評価因子と質量顕微鏡解析データ間での関連性の分析。初年度に 1)、2)を次年度に 1)~4) を最終年度に 1)、4)、5)を行った。

1) 担がん患者検体の収集

臨床検体の取得にあたっては、浜松医科大学および浜松医療センターで、診断もしくは治療を目的として組織採取を行うがん患者を対象とした。脂質解析に関する結果の比較対象として、骨髄腫検体測定による得られるデータも活用した。十分なインフォームドコンセントの後、同意の得られた患者から、生検組織採取とともに循環腫瘍細胞採取のため末梢血の採血を行った。収集検体の背景情報は、研究協力者の所属施設において連結可能匿名化の上管理した。

2) 担がん患者より採取した末梢血から循環腫瘍細胞を回収する手法の最適化

循環腫瘍細胞の選択の基本手法としては、全体計画の通り磁気細胞分離法とフローサイトメトリー法を利用した。正常人血液に細胞株を添加し作製するモデル血液での実験には、大腸がん細胞株 HCT116 及び乳がん細胞株 SKBR-3 を培養し用いた。蛍光標識化合物、バッファ、遠心管、遠沈管による処理、及び細胞選別のための抗体クローンにつき最適化を行った。

3) 一細胞ナノ粒子質量顕微鏡解析法の最適化

フローサイトメトリー法により精製された細胞の回収及び接着条件を、接着・洗浄後の細胞回収率に基づき比較検討した。スライドガラスのコート剤の比較も行った。検討結果をもとに ITO ナノ粒子成膜スライドガラスへの接着性検討を行った。銀、金、インジウム酸化スズ粒子を付与したスライドガラスそれぞれの接着状態と質量顕微鏡解析におけるシグナル強度に基づき比較検討し、インジウム酸化スズ-MAS コーティングスライドガラス (ITO-MAS コートスライドガラス) を用いることとした。質量顕微鏡解析の条件としてマトリクス、レーザーエネルギー、空間解像度、測定領域範囲、測定質量範囲等を最適化した。

4) 臨床検体の質量顕微鏡解析

循環腫瘍細胞の選択の基本手法としては、2)において最適化された方法を採用した。循環腫瘍細胞の選択の基本手法としては、全体計画の通り磁気細胞分離法とフローサイトメトリー法を利用した。測定対照として乳がん細胞株 SKBR-3 および

ヒト骨髄腫細胞を使用した。原発巣の単一細胞化には、研究全体計画時に考案した通り、検体組織をメスで小断片化した後に酵素処理する方法を用いた。フローサイトメトリー法により細胞を単離および回収した後、一細胞質量顕微鏡解析した。

5) 病態評価因子と質量顕微鏡解析データ間での関連性の分析

データ解析には専用ソフトウェアである MS Imaging Solution 解析を用いた。各測定領域のデータセットを陰性対照領域のデータセットと統合し、リン脂質のシグナル強度に関して統計有意差を示す測定領域を抽出し、一細胞由来のシグナルを検出した測定領域であると定義した。末梢血からのソーティング数より少ない検出領域数を示した検体のみを最終的な解析に使用した。抽出された測定領域を統合し、原発巣群 循環腫瘍細胞群間での群間検定、および患者予後で区分した循環腫瘍細胞群の群間検定に用いた。

(倫理面への配慮)

本研究は浜松医科大学の医の倫理審査委員会による承認の下に遂行された。該当する患者に当研究に関して患者用説明文書を用い、研究への協力の可否が治療の質に影響しないこと、研究への協力が危険を伴わないこと、研究協力者及び家族の意思を第一に尊重することを十分に説明し、インフォームドコンセントを得られた場合、文書による同意書を得て、疫学研究に関する倫理指針 (平成 16 年文部科学省・厚生労働省告示第 2 号) および臨床研究に関する倫理指針 (平成 16 年厚生労働省告示第 4 5 9 号) に厳正に則り研究を施行した。試料は連結可能匿名化を行い情報管理者が適切に管理した。

C. 研究結果

1) 担がん患者検体の収集

初年度から検体の収集を行うとした全体研究計画の通り、大腸がん・乳がん臨床検体につき末梢血の収集と循環腫瘍細胞の精製・解析を行った。平成 23 年度に回収した血液や原発巣は 10 例であった。引き続き平成 24 年度においても検体の回収を行い、検体番号 20 から 50 までの 31 回の測定において、患者末梢血 12.5 ml 中に循環腫瘍細胞が 1 個検出される事例を 5 例得た。最終年度に当たる平成 25 年度には、本予算継続審査の際に評価委員より提示されたコメントに従い、対象疾患として乳がんを優先した。取得検体数は末梢血 32 検体、原発巣 15 検体であった。また、脂質解析に関する結果の比較対象として、骨髄腫患者から末梢血及び骨髄検体を採取し、同様の解析を行った。検体数は末梢血 1 検体、骨髄 3 検体であった。

2) 担がん患者より採取した末梢血から循環腫瘍細胞を回収する手法の最適化

平成 23 年度に大腸がん及び乳がん細胞株を用い循環腫瘍細胞の精製条件を最適化した。抗体、バッファ、遠心管の最適化により高いコントラストで循環腫瘍細胞を分離することができるようになった。平成 24 年度にはチクソトロピー性を有する細胞分離剤を用いた遠沈管を導入し、処理時間を短縮することができた。

3) 一細胞ナノ粒子質量顕微鏡解析法の最適化

平成 23 年度に、精製された循環腫瘍細胞の回収・接着方法を比較検討することで、細胞回収率を向上することができた。最適な細胞接着をもたらすコーティング条件を用いたナノ粒子成膜処理したスライドガラスへの循環腫瘍細胞の接着・回収に成功した。一細胞質量顕微鏡法の解析条件を検討し、細胞が接着した領域に高いシグナル強度で検出される分子を見出すことができた。

平成 24 年度には、銀、金、インジウム酸化スズ粒子の付与によりシグナル強度上昇が見られるかどうかを、一細胞質量顕微鏡解析により調べた。金薄膜付与基盤あるいはインジウム酸化スズ付与スライドガラスを比較対照とした実験において、有意差を持ってシグナル強度の向上を示す分子は見いだされなかった。一方、インジウム酸化スズ付与スライドガラスに特殊コーティングを施すことにより、シグナル強度を保持したまま試料接着性を向上できることを見出し、松浪硝子工業株式会社との共同研究のもと、製品化を進めた。結果、新たに開発された ITO-MAS コートスライドガラスを製品としての普及を進めた。平成 26 年 3 月現在、これらの製品は松浪硝子工業株式会社より販売品目 SI0020M 及び SI0100M として販売されている。更にイオン化補助にあたって従来用いていたデヒドロキシ安息香酸よりも高い脂質シグナル強度をもたらす化合物を見出すことができた。

4) 臨床検体の質量顕微鏡解析

平成 23 年度において、原発巣検体試料に由来する細胞の質量顕微鏡法解析により、細胞接着部位に検出される分子が見出された。平成 24 年度以降には、大腸がん・乳がん患者から採取した末梢血検体から CD326 陽性、CD45 陰性循環腫瘍細胞の質量顕微鏡解析を行った。

5) 病態評価因子と質量顕微鏡解析データ間での関連性の分析

新規解析ソフトウェアを導入し、原発巣検体試料に由来する細胞の質量顕微鏡法解析結果との比較を行ったところ、循環腫瘍細胞相当の細胞集団が

原発巣由来の細胞集団に比べ低いシグナル強度を示す分子を複数見出すことができた。また、測定領域内でのシグナル強度のばらつきを標準偏差で評価することにも成功した。希少な細胞集団である循環腫瘍細胞の収集とその質量顕微鏡解析に一定の成功を収めたので、平成 25 年度には、循環腫瘍細胞の定義領域を、バックグラウンドノイズのより少ないものへと変更し、これらの細胞集団で質量顕微鏡による脂質解析を行った。その結果、ホスファチジルコリン (PC) (32:4) ナトリウム付加体に相当する質量電荷比 (m/z) 748.5 が CD326 陽性、CD45 陰性循環腫瘍細胞において原発巣の 2.0 倍の平均シグナル強度を示すことを明らかにした。さらに患者予後を代表する因子として採血時点で病態コントロール可能な状態であったかどうかを指標として患者を予後良好群・予後不良の 2 群に分類したときに、PC (34:3) に相当する m/z 794.5 が予後良好群において予後不良群の 1.7 倍の平均シグナル強度を示すことを明らかにした。これらのことから、PC (32:4) 及び PC(34:3) を病態や患者予後と関連する循環腫瘍細胞の新たな質的評価軸を質量顕微鏡によって示すことが可能となった。また、比較対象として実施した骨髄腫患者検体を用いた一細胞解析においては、末梢血中骨髄腫細胞対骨髄腔内骨髄腫細胞間の比較を行い、骨髄腔内細胞に比べ末梢血中細胞ではパルミチン酸の検出量が大きい傾向にあることを見出した。骨髄腫細胞の由来の違いを質量顕微鏡によって示すことが可能となった。

D. 考察

1) 担がん患者検体の収集

症例の収集に際し臨床医と連携することで、予定通りのペースで検体の回収が達成できた。平成 24 年度には他施設との連携も実現し平成 25 年度までこれを継続できたため、目標検体数である 80 検体を上回る合計 108 検体の収集を達成することができた。収集された検体から循環腫瘍細胞及び原発巣の分子プロファイルを取得し、臨床情報と質量顕微鏡解析結果の統合的解析に結び付けることができた。

2) 担がん患者より採取した末梢血から循環腫瘍細胞を回収する手法の最適化

循環腫瘍細胞は極めて少数であり、本研究開始当初は精製の過程で失われることが多かった。循環腫瘍細胞選択手法の条件最適化を行った結果、安定して循環腫瘍細胞を検出し回収することが可能となり、平成 24 年度に導入したチクソトロピー性を有する細胞分離剤を用いた遠沈管の使用により収集時間の短縮も実現できた。度重なる最適化を継続して行い、最終的には安定した回収条件が確

立された。モデル血液を用いた複数回の実験において、約 40%の収率での回収が可能であることを確認した。

3) 一細胞ナノ粒子質量顕微鏡解析法の最適化

細胞回収・接手法の最適化により、一細胞質量顕微鏡法解析に適した条件が確立された。研究代表者らは、ステージコントローラーとレーザー照射装置を改良することにより可視光顕微鏡像とレーザー照射位置を高い精度で対応づけ高解像度で分子分布を解析することを可能としてきた。更に、ナノ粒子等のイオン化補助剤に関する検討も行い、最適な化合物を発見し使用した。一細胞を対象とした超微小領域での質量顕微鏡法解析に成功することができたのはこれらの改良によるところが大きいと考える。

4) 臨床検体の質量顕微鏡解析

ITO-MAS コートスライドガラスは、一細胞質量顕微鏡法解析に適した新たな素材として本研究課題から創出され、循環腫瘍細胞の高効率での回収と高感度測定に有用に機能した。本事業期間中に一般販売まで漕ぎ付けることができた。今後も一細胞解析を始めとする微量サンプルの質量顕微鏡解析に広く用いられることが期待される。

5) 病態評価因子と質量顕微鏡解析データ間での関連性の分析

乳がん循環腫瘍細胞の質量顕微鏡解析によって、循環腫瘍細胞を質的に評価するための分子として、PC (32:4)、PC (34:3) が発見された。中でも PC (34:3) は患者病態と関連する新規分子マーカーであることから、循環腫瘍細胞の質量顕微鏡を用いた解析の臨床的有用性が示された。また、骨髄腔中の骨髄腫細胞細胞膜において、末梢血に比べてパルミチン酸含有量が少ない傾向を示すことが、質量顕微鏡を用いることによって可能となった。このことは質量顕微鏡が種類の異なる複数のがんの観察が可能であることを示している。

E . 結論

循環腫瘍細胞の回収手法の効率化、ナノ粒子等を補助剤として用いた解析用素材の開発、質量顕微鏡の改良によって測定装置、システムの開発が達成された。また、乳がん患者の原発巣と末梢血から採取された細胞を材料として質量顕微鏡解析を行い、原発巣と循環腫瘍細胞において異なるシグナル強度を示す代謝物を明らかにすることができたことによって、これまで個数のみで評価されていた循環腫瘍細胞を質的に評価することが質量顕微鏡によって可能となったことは、質量顕微鏡の臨床的有用性が示されたこととなる。この結果、

ナノ粒子等を補助剤として活用した循環腫瘍細胞観察可能な質量顕微鏡が開発された。

F . 健康危険情報

本事業中に特に健康危険情報は報告すべきものはなかった。

G . 研究発表

1. 論文発表

【原著論文】

- (1) 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.* in press.
- (2) 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.* in press.
- (3) Uchiyama Y, Hayasaka T, Masaki N, Watanabe Y, Masumoto K, Nagata T, Katou F, Setou M. Imaging mass spectrometry distinguished the cancer and stromal regions of oral squamous cell carcinoma by visualizing phosphatidylcholine (16:0/16:1) and phosphatide ylcholine (18:1/20:4). *Anal Bioanal Chem.* 2014 Feb;406(5):1307-16. doi: 10.1007/s00216-013-7062-3. Epub 2013 Jun 1.
- (4) Ide Y, Waki M, Hayasaka T, Nishio T, Morita Y, Tanaka H, Sasaki T, Koizumi K, Matsunuma R, Hosokawa Y, Ogura H, Shiiya N, Setou M. Human Breast Cancer Tissues Contain Abundant Phosphatidylcholine(36:1) with High Stearoyl-CoA Desaturase-1 Expression. *PLoS One.* 2013 Apr 16;8(4):e61204. doi:10.1371/journal.pone.0061204. Print 2013.
- (5) Morita Y, Sakaguchi T, Ikegami K, Goto-Inoue N, Hayasaka T, Hang VT, Tanaka H, Harada T, Shibasaki Y, Suzuki A, Inaba K, Murakami M, Setou M, Konno H. Lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 altered phospholipid composition and regulated hepatoma progression. *J Hepatol.* 2013 Aug;59(2):292-9. doi: 10.1016/j.jvs. 2013.01.030. Epub 2013 Apr 6.
- (6) Ishikawa S, Tateya I, Hayasaka T, Masaki N, Takizawa Y, Ohno S, Kojima T, Kitani Y, Kitamura M, Hirano S, Setou M, Ito J. Increased expression of phosphatidylcholine (16:0/18:1) and (16:0/18:2) in thyroid papillary cancer. *PloS One* 2012;7(11):e48873.
- (7) Yamada M, Yao I, Hayasaka T, Ushijima M, Matsuura M, Takada H, Shikata N, Setou M, Kwon KH, Ito S. Identification of oligosaccharides from histopathological sections by MALDI imaging mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 2012 Feb;402(5):1921-30.

- (8) Tanaka H, Zaima N, Sasaki T, Yamamoto N, Sano M, Konno H, Setou M, Unno N. Loss of lymphatic vessels and regional lipid accumulation is associated with incompetent great saphenous vein incompetence. *J Vasc Surg.* 2012 May;55(5):1440-8.
- (9) Shrivas K, Hayasaka T, Sugiura Y, Setou M. Method for Simultaneous Imaging of Endogenous Low Molecular Weight Metabolites in mouse brain using TiO₂ nanoparticle in nanoparticle-assisted laser desorption/ionization-imaging mass spectrometry. *Anal Chem.* 2011 Oct 1;83(19):7283-9.
- (10) Kaneko Y, Obata Y, Nishino T, Kakeya H, Miyazaki Y, Hayasaka T, Setou M, Furusu A, Kohno S. Imaging mass spectrometry analysis reveals an altered lipid distribution pattern in the tubular areas of hyper-IgA murine kidneys. *Exp Mol Pathol.* 2011 Oct;91(2):614-21.
- (11) Kubo A, Ohmura M, Wakui M, Harada T, Kajihara S, Ogawa K, Suemizu H, Nakamura M, Setou M, Suematsu M. Semi-quantitative analyses of metabolic systems of human colon cancer metastatic xenografts in livers of superimmunodeficient NOG mice. *Anal Bioanal Chem.* 2011 Jun;400(7):1895-904.
- (12) Zaima N, Sasaki T, Tanaka T, Cheng XW, Onoue K, Hayasaka T, Goto-Inoue N, Enomoto H, Unno N, Kuzuya M, Setou M. Imaging mass spectrometry-based histopathologic examination of atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis.* 2011 Aug;217(2):427-32.

【英文総説】

- (1) Nakanishi T, Setou M, Kuhara T. Biomedical mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 2012 Jun;403(7):1775-6. doi: 10.1007/s00216-012-5922-x.
- (2) Saito Y, Waki M, Hammed S, Hayasaka T, Setou M. Development of Imaging Mass Spectrometry. *Biol Pharm Bull.* 2012 Sep;35(9):1417-24.
- (3) Goto K, Waki M, Takahashi T, Kadowaki M, Setou M. High-Resolution Multi-isotope Imaging Mass Spectrometry Enables Visualisation of Stem Cell Division and Metabolism. *ChemBioChem.* 2012 May 29;13(8):1103-6. Epub 2012 Apr 19.
- (4) Goto-Inoue N, Hayasaka T, Zaima N, Setou M. Imaging mass spectrometry for lipidomics. *Biochim Biophys Acta.* 2011 Nov;1811(11):961-9.

【和文総説】

- (1) 佐野圭吾、瀬藤光利、質量顕微鏡法を用いた生体組織解析、医学書院「生体の科学」、2013年12月64巻6号 p614-620
- (2) 松下祥子、瀬藤光利、質量顕微鏡を用いた医薬研究の発展、ファルマシア、2013年12月49巻12号 p1159-1163
- (3) 佐野圭吾、瀬藤光利、走査型レーザーイオン

化による生体組織の質量イメージング、日本光学会(応用物理学会)、2013年11月42巻11号 p555-561

- (4) 稲見勝朗、瀬藤光利、顕微鏡と画像データ処理：質量顕微鏡、ぶんせき、2013年第8号 p470-471
- (5) 早坂孝宏、瀬藤光利、質量顕微鏡を用いたホメオスタシス破綻の可視化、*The Lipid*、2013年7月24巻3号 p4-11
- (6) 門脇慎、稲見勝朗、脇紀彦、高橋司、後藤健介、瀬藤光利 医学・薬学分野における質量顕微鏡法の利用 *医薬ジャーナル* 8月号、2012年48巻8号 p2011-2014
- (7) 後藤健介、高橋司、脇紀彦、瀬藤光利(展望) 質量顕微鏡法の展望 *ぶんせき*、2012年9号 p495-498
- (8) 瀬藤光利 質量顕微鏡：電子顕微鏡との接点 *医学生物学電子顕微鏡技術学会誌*、2012年26巻1号 p39-40
- (9) 瀬藤光利 質量顕微鏡法 *YAKUGAKU ZASSI*、2012年4月132巻4号 p499-506
- (10) 稲見勝朗、瀬藤光利、Imaging Mass Spectrometry (質量顕微鏡法) *Medical Science Digest*、2012年1月38巻1号 p5-6
- (11) 瀬藤光利、生物物理の最前線 質量顕微鏡法の新展開、*パリティ*、2011年12月26巻12号 p56-60
- (12) 瀬藤光利、序論 - 分子イメージングの最先端の特集にあたって -、*最新医学*、2011年66巻10号 p2289-2291

【英文著書】

- (1) Waki M, Sugiyama E, Kondo T, Sano K, Setou M. Nanoparticle-Assisted Laser Desorption/Ionization for Metabolite Imaging. *Methods Mol Biol.* in press.
- (2) Sugiura Y, Yao I, Setou M. Imaging mass spectrometry (IMS) for biological application. *MASS SPECTROMETRY HANDBOOK* 2012;41-83.
- (3) Shrivas K, Setou M. Imaging Mass Spectrometry: Sample Preparation, Instrumentation, and Applications. *Advances in IMAGING and ELECTRON PHYSICS.* 2012;171:145-193.
- (4) Hameed S, Sugiura Y, Kimura Y, Shrivas K, Setou M. Nanoparticle-assisted Laser Desorption/ionization [nano-PALDI]-based Imaging Mass Spectrometry [IMS] and its Application to Brain Science. *Nanomedicine and the Nervous System.* 2012;97-118.

【和文著書】

- (1) 永田泰之、井手佳美、瀬藤光利、最新生理活性脂質研究-実験手法、基礎的知識とその応用-(第1章)技術編 質量顕微鏡 遺伝子医学

MOOK、2013年、24号 p71-76.

- (2) 近藤豪、瀬藤光利、医用質量分析ガイドブック 疾患のイメージング質量分析、診断と治療社、2013年12月25日 p121-126
- (3) 早坂孝宏、瀬藤光利 現代質量分析学 基礎原理から応用研究まで、イメージング、化学同人、2013年1月15日 p345-357

2. 学会発表

- (1) 井手佳美、脇紀彦、小倉廣之、瀬藤光利、1価不飽和脂肪酸を含むホスファチジルコリンが乳癌癌部に高集積する 質量顕微鏡法による乳癌脂質解析、第72回日本癌学会、横浜、2013年10月
- (2) Yoshimi Ide, Michihiko Waki, Itsuko Ishizaki, Yasuyuki Nagata, Hiroyuki Ogura, Noriaki Sanada and Mitsutoshi Setou, Single-Cell Analysis of Human Breast Cancer Cells by Secondary-Ion Mass Spectrometry, 19th International Conference on Secondary Ion Mass Spectrometry, 韓国、2013年9月
- (3) Yasuyuki Nagata, Itsuko Ishizaki, Yoshimi Ide, Michihiko Waki, Kazunori Ohnishi, Noriaki Sanada and Mitsutoshi Setou, Single Cell Analysis of Multiple Myeloma With Secondary Ion Mass Spectrometry, 19th International Conference on Secondary Ion Mass Spectrometry, 韓国、2013年9月
- (4) 永田 泰之、石崎 逸子、井手 佳美、脇 紀彦、大西 一功、眞田 則明、瀬藤 光利、多発性骨髄腫細胞における脂肪酸組成の変化、日本医用マススペクトル学会、神戸、2013年9月
- (5) 瀬藤光利、細胞・組織の2D質量分析イメージング、日本学会会議公開シンポジウム「医学・生命科学の革新的発展に資する統合バイオイメージングの展望」、東京、2013年9月
- (6) 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、東京、2013年9月
- (7) Mitsutoshi Setou, Advanced Applications of Imaging Mass Spectrometry in Clinical Research, Imaging Mass Spectrometry Workshop, 韓国、2013年7月
- (8) 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、浜松、2013年6月
- (9) 瀬藤光利、Imaging mass spectrometry of Sphingolipids, EMBO Workshop on Molecular Medicine of Sphingolipids, イスラエル、2012年10月
- (10) 脇紀彦、井手佳美、高橋司、後藤健介、古川省悟、高橋郁太、佐藤哲朗、白井祐輔、門脇

慎、稲見勝朗、大畑健次、椎谷紀彦、瀬藤光利、乳癌循環腫瘍細胞のフローサイトメトリー法による精製と質量顕微鏡法による解析、第22回日本サイトメトリー学会学術集会、大阪、2012年6月

- (11) 佐藤哲郎、白井祐輔、高橋郁太、古川省吾、脇紀彦、瀬藤光利、乳癌循環腫瘍細胞の質量顕微鏡法を用いた解析、第6回浜松医科学シンポジウム、浜松、2012年2月
- (12) 瀬藤光利、質量分析計を用いた最新のバイオマーカー、第32回日本臨床薬理学会年会、浜松、2011年12月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

- (1) 出願番号：2013-177105 出願日：2013/8/28
タイトル：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、発明人：永田泰之、瀬藤光利
- (2) 出願番号：2012-102636 出願日：2012/4/27
タイトル：質量分析データ処理方法及び装置、発明人：松浦正明、牛嶋大、涌井昌俊、瀬藤光利、梶原茂樹、小河潔
- (3) 出願番号：2013-018659、出願日：2013/2/1
タイトル：乳癌治療剤の有効性評価方法及び被験者選択方法、発明人：瀬藤光利、井手佳美、脇紀彦
- (4) 出願番号：2006-043237 登録日 2011/11/18
特許番号：4866098
タイトル：質量分析装置 発明人：竹内貞夫、小河潔、吉田佳一、瀬藤光利、新聞秀一

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌【原著論文】

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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.	in press.	in press.	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.	in press.	in press.	2014
Uchiyama Y, Hayasaka T, Masaki N, Watanabe Y, Masumoto K, Nagata T, Katou F, Setou M.	Imaging mass spectrometry distinguished the cancer and stromal regions of oral squamous cell carcinoma by visualizing phosphatidylcholine (16:0/16:1) and phosphatidylcholine (18:1/20:4).	Anal Bioanal Chem.	406(5)	1307-16	2014
Ide Y, Waki M, Hayasaka T, Nishio T, Morita Y, Tanaka H, Sasaki T, Koizumi K, Matsunuma R, Hosokawa Y, Ogura H, Shiiya N, Setou M.	Human Breast Cancer Tissues Contain Abundant Phosphatidylcholine(36:1) with High Stearoyl-CoA Desaturase-1 Expression.	PLoS One.	8(4)	e61204.	2013
Morita Y, Sakaguchi T, Ikegami K, Goto-Inoue N, Hayasaka T, Hang VT, Tanaka H, Harada T, Shibasaki Y, Suzuki A, Inaba K, Murakami M, Setou M, Konno H.	Lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 altered phospholipid composition and regulated hepatoma progression.	J Hepatol.	59(2)	292-9	2013

Ishikawa S, Tateyama I, Hayasaka T, Masaki N, Takizawa Y, Ohno S, Kojima T, Kitani Y, Kitamura M, Hirano S, Setou M, Ito J.	Increased Expression of Phosphatidylcholine (16:0/18:1) and (16:0/18:2) in Thyroid Papillary Cancer	PloS One	7(11)	e48873	2012
Yamada M, Yao I, Hayasaka T, Urushijima M, Matsuyama M, Takada H, Shikata N, Setou M, Kwon KH, Ito S.	Identification of oligosaccharides from histopathological sections by MALDI imaging mass spectrometry.	Anal Bioanal Chem.	402(5)	1921-30	2012
Tanaka H, Zaima N, Sasaki T, Yamamoto N, Sano M, Konno H, Setou M, Unno N.	Loss of lymphatic vessels and regional lipid accumulation is associated with incompetent great saphenous vein in incompetence.	J Vasc Surg.	55(5)	1440-8	2012
Shrivastava K, Hayasaka T, Sugiura Y, Setou M.	Method for Simultaneous Imaging of Endogenous Low Molecular Weight Metabolites in mouse brain using TiO ₂ nanoparticle in nanoparticle-assisted laser desorption/ionization-imaging mass spectrometry.	Anal Chem.	83(19)	7283-9	2011
Kaneko Y, Obata Y, Nishino T, Kakeya H, Miyazaki Y, Hayasaka T, Setou M, Furusawa A, Kohno S.	Imaging mass spectrometry analysis reveals an altered lipid distribution pattern in the tubular areas of hyper-IgA murine kidneys.	Exp Mol Pathol	91(2)	614-21	2011
Kubo A, Ohmura M, Wakui M, Harada T, Kajihara S, Ogawa K, Sumizawa H, Nakamura M, Setou M, Suematsu M.	Semi-quantitative analyses of metabolic systems of human colon cancer metastatic xenografts in livers of superimmunodeficient NOG mice.	Anal Bioanal Chem.	400(7)	1895-904	2011

Zaima N, Sasaki T, Tanaka T, Cheng XW, Onoue K, Hayasaka T, Goto-Inoue N, Enomoto H, Unno N, Kuzuya M, Setou M.	Imaging mass spectrometry-based histopathologic examination of atherosclerotic lesions.	Atherosclerosis.	217(2)	427-32	2011
---	---	------------------	--------	--------	------

雑誌【英文総説】

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nakanishi T, Setou M, Kuhara T.	Biomedical mass spectrometry.	Anal Bioanal Chem.	403(7)	1775-6	2012
Saito Y, Waki M, Hammed S, Hayasaka T, Setou M.	Development of Imaging Mass Spectrometry.	Biol Pharm Bull.	35(9)	1417-24	2012
Goto K, Waki M, Takahashi T, Kawakami M, Setou M.	High-Resolution Multi-isotope Imaging Mass Spectrometry Enables Visualisation of Stem Cell Division and Metabolism.	ChemBioChem.	13(8)	1103-6	2012
Goto-Inoue N, Hayasaka T, Zaima N, Setou M.	Imaging mass spectrometry for lipidomics.	Biochim Biophys Acta.	1811(11)	961-9.	2011

雑誌【和文総説】

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
佐野圭吾、瀬藤光利	質量顕微鏡法を用いた生体組織解析	医学書院「生体の科学」	64巻6号	p614-620	2013
松下祥子、瀬藤光利	質量顕微鏡を用いた医薬研究の発展	ファルマシア	49巻12号	p1159-1163	2013
佐野圭吾、瀬藤光利	走査型レーザーイオン化による生体組織の質量イメージング	日本光学会(応用物理学会)	42巻11号	p555-561	2013
稲見勝朗、瀬藤光利	顕微鏡と画像データ処理：質量顕微鏡	ぶんせき	第8号	p470-471	2013
早坂孝宏、瀬藤光利	質量顕微鏡を用いたホメオスタシス破綻の可視化	The Lipid	24巻3号	p4-11	2013
門脇慎、稲見勝朗、脇紀彦、高橋司、後藤健介、瀬藤光利	医学・薬学分野における質量顕微鏡法の利用	医薬ジャーナル	48巻8号	p2011-2014	2012
後藤健介、高橋司、脇紀彦、瀬藤光利	展望) 質量顕微鏡法の展望	ぶんせき	9号	p495-498	2012
瀬藤光利	質量顕微鏡：電子顕微鏡との接点	医学生物学電子顕微鏡技術学会誌	26巻1号	p39-40	2012
瀬藤光利	質量顕微鏡法	YAKUGAKU ZASSHI	132巻4号	p499-506	2012
稲見勝朗、瀬藤光利	Imaging Mass Spectrometry (質量顕微鏡法)	Medical Science Digest	38巻1号	5-6	2012
瀬藤光利	生物物理の最前線 質量顕微鏡法の新展開	パリティ	26巻12号	56-60	2011
瀬藤光利	序論 - 分子イメージングの最先端の特集にあたって -	最新医学	66巻10号	2289-2291	2011

書籍【英文著書】

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	ページ	出版年
Waki M, Sugiya E, Kondo T, Sano K, Setou M.	Nanoparticle-Assisted Laser Desorption/Ionization for Metabolite Imaging.	Walker, John M.	Methods Mol Biol.	Springer	Germany	in press.	2014
Sugiura Y, Yao I, Setou M.	Imaging mass spectrometry (IMS) for biological application.	MIKE S. LEWIS	MASS SPECTROMETRY HANDBOOK	WILEY	USA	41-83	2012
Shrivastava K, Setou M.	Imaging Mass Spectrometry: Sample Preparation, Instrumentation, and Applications.	PETER W. HAWKES	Advances in Imaging and Electron Physics.	ACADEMIC PRESS	USA	145-193	2012
Hameed S, Sugiura Y, Kimura Y, Shrivastava K, Setou M.	Nanoparticle-assisted Laser Desorption/Ionization [nano-PALDI]-based Imaging Mass Spectrometry [IMS] and its Application to Brain Science.	Colin R. Martin, Victor R. Preedy, Ross J. Hunter	Nanomedicine and the Nervous System.	CRC Press	London	97-118	2012

書籍【和文著書】

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	ページ	出版年
永田泰之、井手佳美、瀬藤光利	最新生理活性脂質研究-実験手法、基礎的知識とその応用- (第1章) 技術編 質量顕微鏡	青木淳賢、杉本幸彦、村上誠	遺伝子医学MOOK	株式会社メディカルドゥ	日本	p71-76	2013
近藤豪、瀬藤光利	疾患のイメージング質量分析	丹羽利充、野村文夫	医用質量分析ガイドブック	診断と治療社	日本	p121-126	2013
早坂孝宏、瀬藤光利	イメージング	高山光男、早川滋雄、瀧浪欣彦、和田芳直	現代質量分析学 基礎原理から応用研究まで	化学同人	日本	p345-357	2013