

呼吸器疾患患者尿中エイコサノイドの一斉測定

担当責任者 清水 孝 雄 国立国際医療研究センター研究所 所長・理事・プロジェクト長

研究要旨：

我々の役割はアスピリン喘息を中心に呼吸器疾患患者の尿中エイコサノイドの測定である。既に、150分子種程度のエイコサノイドを一斉に測定できる実験系を立ち上げた。抽出したエイコサノイド群を液体クロマトグラフィー・質量分析計で一斉に測定する。これで、予測範囲外のエイコサノイドも測定できるため、疾患解明や新規バイオマーカー探索から、新規治療方法開発の基礎データになるとと思われる。

A．研究目的

アスピリン喘息を中心に原因や治療方法未解決の呼吸器疾患解明、治療に向けてバイオマーカー探索を目的としている。尿中脂質(エイコサノイド)をターゲットとしている。

確立した測定系で、次年度への準備を行えた。実際に検体を測定し、進められる段階にきた。

B．研究方法

尿検体からエイコサノイドを抽出し、Shimadzu LCMS-8050で測定することを目標に、測定系を確立した。

F．健康危険情報
なし

(倫理面への配慮)

ヒト検体を扱うため、国立国際医療研究センター倫理委員会に申請予定である。

G．研究発表

1．論文発表

1) Sumida, H., Yanagida, K., Kita, Y., Abe, J., Matsushima, K., Nakamura, M., Ishii, S., Sato, S., and Shimizu, T. (2014) Interplay between CXCR2 and BLT1 facilitates neutrophil infiltration and resultant keratinocyte activation in a murine model of imiquimod-induced psoriasis J. Immunol. 192.4361-4369

C．研究結果

Shimadzu LCMS-8040 (8050の前機種)を用いて150種程度のエイコサノイドを一斉に測定できる系を立ち上げた。

2) Liu, M., Saeki, K., Matsunobu, T., Okuno, T., Koga, T., Sugimoto, Y., Yokoyama, C., Nakamizo, S., Kabashima, K., Narumiya, S., Shimizu, T., and Yokomizo, T. (2014). 12-Hydroxyhptadecatrienoic acid promotes epidermal wound healing by accelerating keratinocyte migration via BLT2 receptor. J. Exp. Med. 211.1063-78

D．考察

確立した測定系で短時間に150種程度測定できるようになった。コンピューター解析のスピードが課題となる。

E．結論

- 3) Morimoto, R., Shindou, H., Tarui, M., and Shimizu, T. (2014) Rapid Production of Platelet-activating Factor Is Induced by Protein Kinase C α -mediated phosphorylation of Lysophosphatidylcholine Acyltransferase 2 Protein. *J. Biol. Chem.* 289. 15566-15576
- 4) Harayama, T., Eto, M., Shindou, H., Kita, Y., Otsubo, E., Hishikawa, D., Ishii, S., Sakimura, K., Mishina, M., and Shimizu, T. (2014) Lysophospholipid acyltransferases mediate phosphatidylcholine diversification to achieve the physical properties required in vivo. *Cell metab.* 20. 295-305
- 5) Tarui, M., Shindou, H., Kumagai, K., Morimoto, R., Harayama, T., Hashidate, T., Kojima, H., Okabe, T., Nagano, T., Nagase, T., and Shimizu, T. (2014) Selective inhibitors of a PAF biosynthetic enzyme lysophosphatidylcholine acyltransferase 2. *J. Lipid Res.* 55. 1386-1396
- 6) Yoshioka, W., Kawaguchi, T., Fujisawa, N., Aida-Yasuoka, K., Shimizu, T., Matsumura, F., and Tohyama, C. (2014) Predominant role of cytosolic phospholipase A2 α in dioxin-induced neonatal hydronephrosis in mice. *Sci. Rep.* 4, 4042
- 7) Hishikawa, D., Hashidate, T., Shimizu, T., and Shindou, H. (2014) Diversity and function of membrane glycerophospholipids generated by the remodeling pathway in mammalian cells. *J. Lipid Res.* 55:799-807
- 8) Koeberle, A., Pergola, C., Shindou, H., Koeberle, SC., Shimizu, T., Laufer, SA., and Werz O. (2015) Role of p38 mitogen-activated protein kinase in linking stearoyl-CoA desaturase-1 activity with ER homeostasis. *FASEB J.* in press
- 9) Yasuda, D., Imura, Y., Ishii, S., Shimizu, T., and Nakamura, M. (2015) The atypical N-glycosylation motif, Asn-Cys-Cys, in human GPR109A is required for normal cell surface expression and intracellular signaling. *FASEB J.* in press
- 10) Yamaguchi, M., Matsui, M., Higa, R., Yamazaki, Y., Ikari, A., Miyake, M., Miwa, M., Ishii, S., Sugatani, J. and Shimizu, T. (2015) A platelet-activating factor (PAF) receptor deficiency exacerbates diet-induced obesity but PAF/PAF receptor signaling does not contribute to the development of obesity-induced chronic inflammation. *Biochem. Pharmacol.* 93, 482-495.

2 . 学会発表

1) ポスター

山田真希、北芳博、徳岡涼美、小平貴博、清水孝雄 : A comprehensive monitoring method for lipid mediators using a high-speed LC/MS with continuous ionization polarity switching. 62nd ASMS Conference. 2014.6.15-19, Baltimore, MD, USA

2) ポスター

山田真希、北芳博、小平貴博、徳岡涼美、清水孝雄: Development and evaluation of a comprehensive monitoring method for eicosanoid species using a high-speed LC/MS with continuous ionization polarity switching. *Metabolomics* 2014. 2014.6.23-26, 山形県鶴岡市

3) 口頭

Takao Shimizu: Sec14L3, a novel protein recognizing liposome curvature and packing defects. LIPID MAPS Annual Meeting 2014 Lipidomics Impact on Cell Biology, Inflammation and Metabolic Disease. May 13, 2014. Scripps Seaside Forum of the University of California San Diego's Scripps Institution of Oceanography, La Jolla, CA, USA

4) ポスター

Kenji Yoshida, Yoshihiro Kita, Suzumi Tokuoka, Kenji Sakimura, Masanobu Kano, Takao Shimizu : Deficiency of monoacylglycerol lipase attenuates diet-induced obesity in an endocannabinoid system-independent manner. LIPID MAPS Annual Meeting 2014. Lipidomics Impact on Cell Biology, Inflammation and Metabolic Disease. May 13-14, 2014. Scripps Seaside Forum of the University of California San Diego's Scripps Institution of Oceanography, La Jolla, CA, USA

5) ポスター

Yoshihiro Kita, Kenji Yoshida, Suzumi M. Tokuoka, Fumie Hamano, Kenji Sakimura, Masanobu Kano, Takao Shimizu : Monoacylglycerol lipase mediates fever via hypothalamic prostaglandin E2 production LIPID MAPS Annual Meeting 2014. Lipidomics Impact on Cell Biology, Inflammation and Metabolic Disease. May 13-14, 2014. Scripps Seaside Forum of the University of California San Diego's Scripps Institution of Oceanography, La Jolla, CA, USA

6) ポスター

Suzumi Tokuoka, Yoshihiro Kita, Masaki Yamada, Takao Shimizu: Development of glycerophospholipid profiling methods using ternary gradient liquid chromatography/high-speed triple quadrupole mass spectrometry. LIPID MAPS Annual Meeting 2014. Lipidomics Impact on Cell Biology, Inflammation and Metabolic Disease. May 13-14, 2014. Scripps Seaside Forum of the University of California San Diego's Scripps Institution of Oceanography, La Jolla, CA, USA

7) ポスター

Hideo Shindou, Ryo Morimoto, Megumi Tarui, Takao Shimizu : Rapid phosphorylation and activation of lysophosphatidylcholine acyltransferase 2 via protein kinase c FASEB Phospholipid Cell Signaling and Metabolism in Inflammation and Cancer. June 1-6, 2014. Niagara Falls, NY, USA

8) 口頭

衛藤 樹、進藤 英雄、清水 孝雄: 多価不飽和脂肪酸含有リン脂質合成に関わる新規リゾホスファチジン酸アシル転移酵素(LPAAT4)の同定. 第 56 回 日本脂質生化学会, 2014.6.6. 近畿大学東大阪キャンパス, 大阪府東大阪市

9) 口頭

吉田 憲司、北 芳博、徳岡 涼美、崎村 建司、狩野 方伸、清水 孝雄: モノアシルグリセロールリパーゼ欠損は高脂肪食負荷による肥満を抑制する. 第 56 回 日本脂質生化学会, 2014.6.6. 近畿大学東大阪キャンパス, 大阪府東大阪市

10) 口頭

森本 亮、進藤 英雄、垂井 愛、清水 孝雄: PKC を介した血小板活性化因子合成酵素 LPCAT2 のリン酸化. 第 56 回 日本脂質生化学会. 2014.6.7. 近畿大学東大阪キャンパス, 大阪府東大阪市

11) 口頭

垂井 愛、進藤 英雄、森本 亮、原山 武士、橋立 智美、熊谷 和夫、長野 哲雄、長瀬 隆英、清水 孝雄: High-throughput screening による PAF 生合成酵素 (LPCAT2) 阻害剤の同定. 第 56 回 日本脂質生化学会. 2014.6.7. 近畿大学東大阪キャンパス, 大阪府東大阪市

12) 口頭

山口 賢彦、比嘉 涼子、山崎 泰広、五十里 彰、石井 聡、三輪 匡男、清水 孝雄、菅谷 純子: 脂肪組織の慢性炎症化過程に関わる血小板活性化因子の機能解析. 第 56 回 日本脂質生化学会. 2014.6.7. 近畿大学東大阪キャンパス, 大阪府東大阪市

13) 口頭

菱川 大介: 新規肺胞腔内分泌タンパク質 Sec14-like 3 の生化学的機能解析. 第 13 回 肺サーファクタント分子病態研究会. 2014.6.21, 札幌医科大学 記念ホール, 北海道札幌市

14) 口頭

Takao Shimizu: Regulation of membrane phospholipids in health and disease. 55th International Conference on the Bioscience of Lipids: Lipids as Mediators of Health and Disease, June 27, 2014, University of Aberdeen, Aberdeen, Scotland

15) ポスター

Miki Eto, Hideo Shindou, Takao Shimizu: Identification of a novel lysophosphatidic

acid acyltransferase enzyme (LPAAT4) with preference for polyunsaturated fatty acyl-CoA. 55th International Conference on the Bioscience of Lipids: Lipids as Mediators of Health and Disease, June 23-27, 2014. University of Aberdeen, Aberdeen, Scotland

16) ポスター

Ryo Morimoto, Hideo Shindou, Megumi Tarui, Takao Shimizu: Phosphorylated lysophosphatidylcholine acyltransferase 2 (LPCAT2) mediates rapid platelet-activating factor (PAF) production following PAF- or ATP-stimulation in macrophages. 55th International Conference on the Bioscience of Lipids: Lipids as Mediators of Health and Disease, June 23-27, 2014, University of Aberdeen, Aberdeen, Scotland

17) ポスター

Daisuke Hishikawa, Hideo Shindou, Takeshi Harayama, Rie Ogasawara, Akira Suwabe, and Takao Shimizu: Identification of novel pulmonary surfactant lipid-related protein, Sec14-like 3. FASEB The Lung Epithelium in Health and Disease, July 27-August 1, 2014. Vermont Academy, Saxtons River, Vermont, USA

18) 口頭

Takao Shimizu: Characterization of lysophospholipid and acyltransferase in vitro and vivo Lipid Mediators in Health and Disease in Kalolinska Institute. 27-Aug-14, Sweeden Kalolinska Institute/ストックホルム スウェーデン

19) 口頭

進藤 英雄, 森本 亮, 垂井 愛, 衛藤 樹, 原山 武士, 清水 孝雄: 生体膜リン脂質多様性形成

メカニズム. 第 87 回日本生化学会大会. 2014. 10.15, 国立京都国際会館, 京都府京都市

20) 口頭およびポスター

菱川 大介, 進藤 英雄, 原山 武士, 小笠原 理恵, 諏訪部 章, 清水 孝雄: 新規肺胞腔内脂質結合タンパク質 Sec14-like 3 の生化学的機能解析. 第 87 回日本生化学会大会 2014.10.16, 国立京都国際会館, 京都府京都市

21) 口頭およびポスター

吉田 憲司, 北 芳博, 徳岡 涼美, 崎村 建司, 狩野 方伸, 清水 孝雄: モノアシルグリセロールリパーゼ欠損は高脂肪食負荷誘導性肥満を抑制する. 第 87 回日本生化学会大会, 2014.10.18, 国立京都国際会館, 京都府京都市

22) 口頭およびポスター

衛藤 樹, 橋本 唯史, 進藤 英雄, 岩坪 威, 清水 孝雄: ドコサヘキサエノイル-CoA (DHA-CoA) 特異的新規リゾホスファチジン酸アシル転移酵素 LPAAT4 の同定およびアルツハイマー病との関連についての解析. 第 87 回日本生化学会大会, 2014.10.17, 国立京都国際会館, 京都府京都市

23) ポスター

北芳博、吉田憲司、徳岡涼美、浜野文三江、山崎真弥、崎村建司、狩野方伸、清水孝雄: 発熱応答にはモノアシルグリセロールリパーゼ依存的なプロスタグランジン E2 産生が必要である. 第 87 回 日本生化学会大会, 2014.10.15 - 18, 京都府京都市

24) ポスター

徳岡涼美、北芳博、山田真希、清水孝雄: 3 液グラジエントクロマトグラフィーを用いた高速選択反応モニタリング (SRM) 質量分析法によるリン脂質プロファイリングメソッドの開発. 第 87 回 日本生化学会大会,

2014.10.15 - 18, 京都府京都市

25) 口頭

Hideo Shindou, Takao Shimizu: Membrane remodeling by lysophospholipid acyltransferases Conferences Jacques Monod November 15-19, 2014 Roscoff (Brittany), France

26) 口頭

Miki Eto, Hideo Shindou, Takao Shimizu: Identification of lysophosphatidic acid acyltransferase 4 (LPAAT4), a possible role for incorporating DHA into glycerolphospholipids Max Planck-The University of Tokyo Center Symposium 2014 December 17, 2014 Harnack House. The Conference Venue of the Max Planck Society Ihnestr. 16-20 - 14195 (Berlin)

27) 口頭

Ryo Morimoto: Calcium signaling triggers latelet-activating factor (PAF) biosynthesis Max Planck-The University of Tokyo Center Symposium 2014. December 18, 2014 Harnack House. The Conference Venue of the Max Planck Society Ihnestr. 16-20 - 14195 (Berlin)

28) 口頭

清水 孝雄 : LPA (lysophosphatidic acid) acts on non-Edg type receptors. 都医学研究所 10th 都医学研国際シンポジウム, 2015.2.9, 都医学研究所, 東京都世田谷区

29) 口頭

清水 孝雄 : Diversity of membrane phospholipids: biosynthetic mechanism and biological significance. 6th International Conference on Phospholipase A2 and Lipid

Mediators, 2014.2.10, 京王プラザホテル東京,
東京都新宿

H .知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1 . 特許取得

なし

30) ポスター

吉田 憲司、北 芳博、徳岡 涼美、崎村 建司、
狩野 方伸、清水 孝雄: Monoacylglycerol
lipase knockout mice are resistant to high
fat diet-induced obesity in an
endocannabinoid system-independent
manner. 6th international Conference on
Phospholipase A2 and Lipid Mediators
PLM2015, 東京都新宿区

2 . 実用新案登録

なし

3 . その他

なし

31) 口頭

Miki Eto, Hideo Shindou, Takao Shimizu:
Lysophosphatidic acid acyltransferase 4
(LPAAT4), a novel enzyme with activity
for incorporating DHA into
glycerophospholipids. 6th International
Conference on Phospholipase A2 and Lipid
Mediators, 2015.2.10-12, 東京都新宿区

32) 口頭

北 芳博、吉田 憲司、徳岡 涼美、浜野 文三江、
崎村 建司、狩野 方伸、清水 孝雄: Roles for
monoacylglycerol lipase in inflammation
and metabolic syndrome. 6th International
Conference on Phospholipase A2 and Lipid
Mediators PLM2015, 2015.2.10-12, 東京都
新宿区

33) ポスター

徳岡 涼美、北 芳博、山田 真希、清水 孝雄:
Development of glycerophospholipid
profiling method for biological samples
using ternary gradient liquid
chromatography/selected reaction
monitoring mass. 6th International
Conference on Phospholipase A2 and Lipid
Mediators PLM2015, 2015.2.10-12, 東京都