

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 18 日現在

機関番号：13802

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25870302

研究課題名(和文) 質量顕微鏡を用いた肝癌微小環境における脂質合成・代謝経路の解析

研究課題名(英文) Lipid analysis of microenvironment in hepatocellular carcinoma using imaging mass spectrometry

研究代表者

森田 剛文 (Morita, Yoshifumi)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：60464129

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：大腸癌手術摘出標本から作成したCancer tissue originated Spheroids (CTOS)を質量顕微鏡を用いて解析したところ、 m/z 888.5の物質がCTOSの辺縁部に豊富に存在することが判明した。 m/z 888.5の物質は、タンデム質量分析の結果からホスファチジルイノシトール(PI(18:0/20:4))であることが明らかとなった。更に、人の大腸癌組織切片を質量顕微鏡で解析したところ、やはり腫瘍の辺縁部には(PI(18:0/20:4))が豊富に存在した。腫瘍辺縁部に特定のリン脂質が存在することにより、癌周囲組織微小環境に何らかの影響を与えている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to seek out the cancer cell-autonomous acquisition of cancer outer edge-characterizing lipids in colorectal cancer by analysing phospholipids in CTOSs derived from colorectal cancer patients with matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI)-imaging mass spectrometry (IMS). A signal at m/z 885.5 in negative ion mode was detected specifically at the surface regions. The signal was identified as an arachidonic acid (AA)-containing phosphatidylinositol (PI), PI(18:0/20:4), by tandem mass spectrometry analysis. Quantitative analysis revealed that the amount of PI(18:0/20:4) in the surface region of CTOSs was two-fold higher than that in the medial region. Finally, PI(18:0/20:4) was enriched at the cancer cells/stromal interface in colorectal cancer patients. These data imply a possible importance of AA-containing PI for colorectal cancer progression, and suggest cells expressing AA-containing PI as potential targets for anti-cancer therapy.

研究分野：肝胆膵悪性腫瘍

キーワード：大腸癌 質量顕微鏡 CTOS 癌微小環境 ホスファチジルイノシトール

1. 研究開始当初の背景

肝臓癌は世界における癌死亡原因の第4位であり、近年における診断・治療技術の発展にも関わらず依然予後不良な疾患である。以前から、慢性肝炎や肝硬変の状態になると肝臓に脂肪蓄積が起きることが知られており、このメカニズムに関してC型肝炎ウイルスのコア蛋白やB型肝炎ウイルスのX蛋白が**脂質代謝を調節する受容体の発現を変化**させていることが報告された (Na TY et al. Hepatology. 2009)。一方、最近ではメタボリックシンドロームが一般にも広く認知され、特に肥満患者の多い欧米においては Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) と NASH からの発癌が増加しており、脂質代謝と発癌・癌の進展への影響に対して非常に大きな関心が寄せられている。

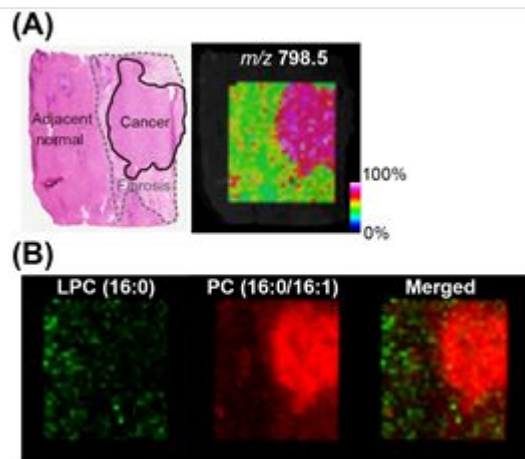
近年では固形癌において無限の自己副性を有し、増殖活性に富む細胞を生み出す**癌幹細胞 (Cancer stem cell)** の概念が広まりつつある (Craig T. New Engl J Med. 2006)。癌幹細胞は組織中における**特殊な微小環境**内で休眠状態として存在しており、増殖期の細胞を標的にする従来の抗がん剤や放射線に対する治療抵抗性に関与していると考えられている。肝細胞癌においても癌幹細胞の存在が指摘されているが (Suetsugu A. Biochem Biophys Res Commun. 2006)、癌幹細胞を直接標的にした治療薬は臨床応用に至っていない。

これまで癌研究において癌細胞の細胞株は非常に大きな役割を担ってきたが、本来の腫瘍とは性質が必ずしも一致せず、細胞株での実験結果をそのまま臨床に応用することは難しかった。一方、腫瘍の性質を引き継いでいる初代培養細胞に関しては、樹立・継代できる割合が低く、薬剤投与などの介入実験を行うことに困難を伴う。**Cancer tissue originated spheroid (CTOS)** は 100 個程度の癌細胞からなる細胞集団で、手術検体や生検検体から非常に高い確率で樹立、継代できる培養法として報告された (Inoue M. Proc Natl Acad Sci USA. 2011)。CTOS が非常に高い確率で樹立が可能であり、移植後の腫瘍形成能も高いことを考えると、癌細胞を単一の細胞に分離しないようにすることにより、**Cancer stem cell あるいは stem cell like の progenitor cell** を含んだ細胞集団から構成されている可能性が高いと思われる。興味深いことに、癌細胞は一見すると生存に不利な低酸素であるほど、悪性度や増殖能が高いことが知られている。低酸素条件で癌の悪性度が高くなる原因として注目されているのが、hypoxia inducible factor (HIF) である

(Semenza GL. Nat. Rev. Cancer. 2003)。HIF はさまざまなシグナル伝達に関する転写因子だが、細胞の代謝を酸化リン酸化から解糖系にシフトさせ、増殖に必要な核酸・アミノ酸・脂質などのバイオマス合成を促進させる役割も果たす (Kim JW. Cell Metab. 2006)。また cancer-associated fibroblast (CAF) などの癌細胞周囲の間質細胞は癌細胞に代謝物を輸送する (lactate shuttle) ことでさらに増殖を促進する (Whitaker-Menezes D. Cell cycle. 2011)。このように癌細胞の**生存・増殖に有利な環境 (癌微小環境)**を理解するうえで、脂質や代謝物の可視化することは非常に有用と考えられるが、それを可能にする解析方法は限られる。

本学解剖学講座 瀬藤光利教授が中心となって開発された**質量顕微鏡法**は生体分子の位置情報を失わずに形態を直接観察でき、また同時に蛋白質や脂質などの生化学的な情報を得る事ができる。

これまでに瀬藤教授らは大腸癌肝転移の組織標本を用いた解析を報告しており、正常組織と癌では脂質の分布が異なることを明らかにしている (Shimma S. J chromatogr B. 2007)。申請者もこの手法を用いて、これまで困難とされていたホルマリン固定標本からの分子イメージングを行い、低分化型の胃癌で高発現している物質を見出した (Morita Y. Cancer Sci. 2010)。その後、申請者は肝細胞癌の手術摘出標本を用いて、癌部と隣接非癌部でのリン脂質組成が異なることを明らかにし、その原因としてリン脂質のリモデリング酵素である Lysophosphatidylcholine acyltransferase (LPCAT) の過剰発現が関係していることを見出し、報告した。



肝細胞癌組織切片を質量顕微鏡で解析した結果。(A) 癌部と非癌部ではリン脂質の分布が異なる。(B) 癌部では PC(16:0/16:1)が多く、LPC(16:0)が少ない。(Morita Y et al. Journal of Hepatology. 2013)

2. 研究の目的

本研究は肝臓癌手術摘出標本由来の CTOS における内部微小環境の可視化とその維持に関係する生体分子を明らかにすることで、新たな治療標的を発見することを目的としている。目的達成のため、本研究期間内に以下の4課題を設定した。

(1) CTOS 内部に含まれる脂質・代謝物分子を画像化する。

CTOS 作成、質量顕微鏡解析の為の肝臓癌切除検体としては B 型・C 型肝炎ウイルス症例以外に、アルコール性肝障害や NASH 由来の肝臓癌も含まれる。肝炎ウイルス由来の肝臓癌と比較を行うことにより、肝臓癌発生や進展機序に関する生体分子が発見できる可能性も高まると思われる。

(2) 画像化された脂質・代謝物分子種の同定を行う。

質量顕微鏡法により非常に多数の生体分子の局在が明らかとなるが、それらの生体分子が実際にどのような物質であるのかをタンデム質量分析により同定する。

(3) CTOS 内部において、脂質・代謝物の局在に影響を与えられると思われる、脂質合成・代謝関連の酵素 (fatty acid synthase や elongase (ELOVL)、desaturase など) 発現や、HIF 発現部位との関連性などを調べる。

(4) CTOS を免疫不全マウスに移植し、生体内で増殖する過程の中で微小環境にどのような変化が生じるのか、質量顕微鏡法を用いて解析する。

3. 研究の方法

肝臓癌手術検体から作成した CTOS は培養や継代が困難だったため、文献で報告されている方法を踏襲し、大腸癌手術検体を用いて解析を進めることとした。

(1) 大腸癌切除検体 20 例から CTOS を作成するし、質量顕微鏡でリン脂質の分布を解析する。

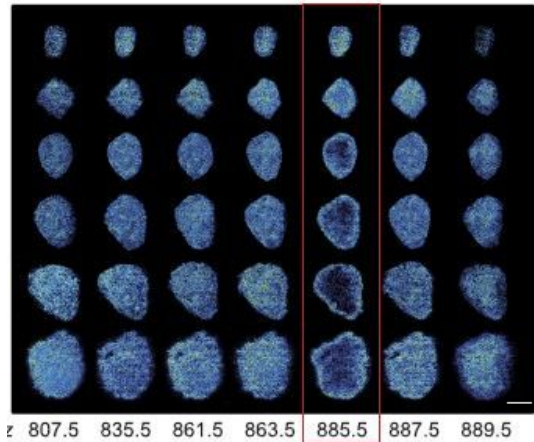
(2) 大腸癌細胞株 (HCT116、DLD-1) を 3 次元培養して multicellular tumour spheroids (MCTS) を作成し、質量顕微鏡でリン脂質の分布を解析する。

(3) CTOS と MCTS の切片を作成し、レーザーキャプチャーマイクロダイセクションを行って、スフェロイドの中心部と辺縁部を採取する。採取した検体を LC-MS で解析する。

(4) 大腸癌切除検体を用いて、質量顕微鏡や免疫組織染色を行う。

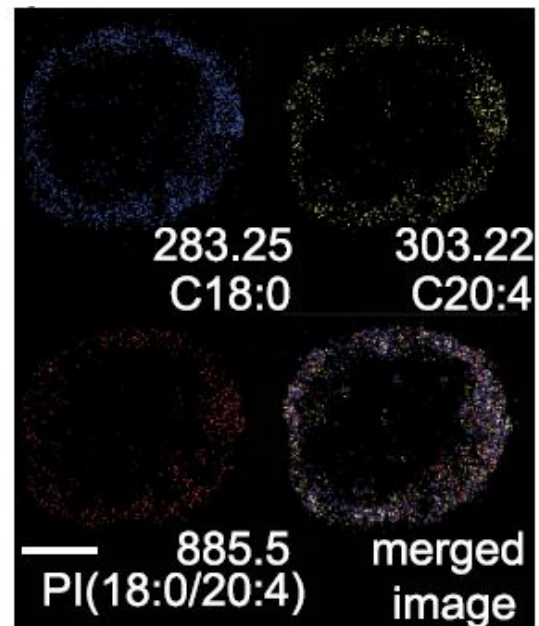
4. 研究成果

(1) 大腸癌手術摘出標本から作成した CTOS を質量顕微鏡を用いて解析したところ、m/z 888.5 の物質が CTOS の辺縁部に豊富に存在することが判明した。また、比較対象として用いた大腸癌細胞株由来の MCTS では、そのような局在の変化は認めなかった。

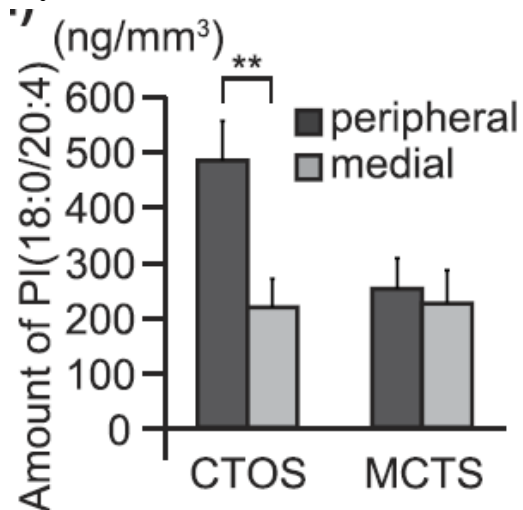


(2)

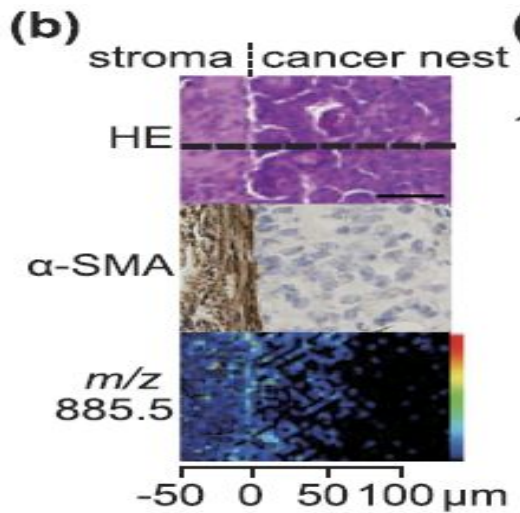
m/z 888.5 の物質は、タンデム質量分析の結果からホスファチジルイノシトール (PI(18:0/20:4)) であることが明らかとなった



(3) CTOS と MCTS から抽出した脂質を LC-MS で解析し、質量顕微鏡と同様の結果が得られた。



(4) 大腸癌組織切片を質量顕微鏡と免疫染色で解析したところ、PI(18:0/20:4)が腫瘍の辺縁部に豊富に存在していることが明らかになった。



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1件)

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. 査読有り

Sci Rep. 2016 Jul 20;6:29935. doi: 10.1038/srep29935.

〔学会発表〕(計3件)

平出貴乗、森田剛文ほか、大腸癌辺縁における多価不飽和脂肪酸含有ホスファチジルイノシトール集積の解明、第115回日本外科学会定期学術集会、2015年、名古屋

平出貴乗、森田剛文ほか、質量顕微鏡法はヒト大腸癌由来 Spheroid および癌細胞辺縁に多価不飽和脂肪酸含有ホスファチジルイノシトールの存在を証明した、第73回日本癌学会総会、2014年、横浜

平出貴乗、森田剛文ほか、質量顕微鏡法を用いたヒト大腸癌由来 Spheroid の分子組成の解析、第114回日本外科学会、京都

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：

種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

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 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森田 剛文 (Morita Yoshifumi)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：60464129