

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 2 日現在

機関番号：13802

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860260

研究課題名(和文) iMscopeを用いた癌特異的リン脂質の探索とその機能解析

研究課題名(英文) Screening and functional analysis of tumor specific phospholipids using iMscope

研究代表者

倉部 誠也 (Kurabe, Nobuya)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：60466737

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：今回、我々は質量顕微鏡装置 iMscope (島津製作所) を用いて胃癌および非癌部組織サンプルを対象とし、抗癌剤候補をスクリーニングした。その結果、2種の異なるアシル鎖構成を持つフォスファチジルコリン(PC-34:2とPC-36:4)が有意に胃癌で発現減少していた。同定したPC-34:2は5つの胃癌細胞株の増殖を抑制した。一方で、正常なNIH3T3細胞の増殖はPC-34:2により全く影響を受けなかった。さらに、上記のPCを産生することが知られているLPCAT3の過剰発現により胃癌細胞株MKN-28の増殖が抑制された。

研究成果の概要(英文)：Currently, there are anti-cancer drugs available for gastric cancer (GC) treatment, while various side effects are intractable limitations for some patients. Here, to identify the anti-cancer drug candidate(s) for GC with no side effects, we performed an imaging mass spectrometry screening using a panel of non-neoplastic and neoplastic gastric tissue. Two species of phosphatidylcholine (PC), PC-34:2 and PC-36:4, were highly downregulated in GC. PC-34:2 and PC-36:4 suppressed the transformation of NIH3T3 cells driven by K-rasV12 and growth of 5 cell lines, while the growth of non-transformed NIH3T3 was not affected by PC-34:2. overexpression of LPCAT3 leads to growth suppression of MKN-28 cells. Considering that PCs have no toxic effect for human, these data indicate the usefulness of identified PC as potential anti-cancer drugs of GC.

研究分野：実験病理学

キーワード：質量顕微鏡 胃癌 フォスファチジルコリン 抗がん剤

1. 研究開始当初の背景

細胞膜はフォスファチジルコリン (PC) やフォスファチジルエタノールアミン (PE) など多様なリン脂質から構成されている。また、各リン脂質、例えばPCだけについても、それを構成する脂肪酸によりいく種類にも分かれる。それらのリン脂質の合成は *de novo* の合成経路が担っているが (J Biol Chem. 2009)、その多様性は *de novo* の合成経路だけでは説明がつかない。そのため、一旦合成されたリン脂質を変換するリン脂質リモデリング回路が想定されていた。最近になりこの回路の酵素遺伝子が同定され、リン脂質の多様性はホスホオリパーゼ₂ (PLA₂) とリゾリン脂質アシル転移酵素 (LPCAT) により構成されるランズ回路によりもたらされることが明らかとなった (J Biol Chem. 2009)。また、リン脂質の中でも特にPCは細胞の増殖、生存そして癌の悪性化に関与していることが明らかとなっている (Mol Cell Biochem. 2005, J Cancer Res Ther. 2005)。しかし、どの脂肪酸種を持つPCが特に高発現をしているかを検証する研究はこれまでなかったが、Cancer Sci. 2013で我々は iMScope を用いて大腸癌特異的なリン脂質の検出に成功した。リン脂質の一つであるPC-32:1が大腸癌で特異的に高発現していることを明らかにし、またPC-32:1の発現上昇の原因として大腸癌におけるLPCAT4の高発現が原因である事を *in vivo* と *in vitro* で証明した。また、未発表データにおいてPC-32:1を癌化していない繊維芽細胞NIH3T3に添加すると容量依存的に細胞増殖が促進される事も見いだしている。特定のリン脂質が細胞増殖を促進するという報告はこれまでにないものであり、そのメカニズムをウェスタンブロットングによって解明する予定である。また、癌特異的なリン脂質の同定は胃癌においては報告例がない。そこで我々がCancer Sci. 2013で行った手法と同様に iMScope を使用しての胃癌特異的なリン脂質

の同定を試みる。

2. 研究の目的

癌特異的に発現する物質の同定は癌の治療法の開発において重要である。その探索は癌特異的なタンパク質において進んでいる。最近になり脂質の一種であるリン脂質が癌の悪性化に重要である事が示唆された (Mol Cell Biochem. 2005, J Cancer Res Ther. 2005)。しかし、数多くあるリン脂質のうちどれが癌で特異的に発現しているかを証明した報告はなかった。我々は Cancer Sci. 2013で iMScope を用いて大腸癌特異的なリン脂質を同定した。本研究ではその研究をさらに発展させるとともに胃癌において新たな癌特異的なリン脂質を発見し、そのリン脂質の癌特異的な高発現の原因をもたらず酵素遺伝子を同定してそれが癌の悪性化の原因となるか検証する。

3. 研究の方法

本研究では、はじめに大腸癌特異的なリン脂質の細胞内シグナリングに与える影響を解析し、また胃癌特異的なリン脂質を iMScope により同定した。iMScope は顕微鏡部と質量分析部からなる新規の分析装置であり、迅速、簡便そして低コストで大量の検体の解析がその位置情報を保持したまま可能であり、複雑な構造を持つ癌組織の解析が行える。その後リン脂質高発現の原因となる遺伝子の同定をリアルタイム PCR 法、iMScope そしてラジオアイソトープを使用した実験で行った。そして同定した遺伝子の癌の悪性化への関与を解析し、最終的に癌とリン脂質研究の学問的空白を埋めることを目指した。平成26年度

1. 大腸癌特異的なPC-32:1の細胞内シグナリングへの影響の解析
2. iMScopeによる胃癌特異的なリン脂質の同定
3. 胃癌特異的なリン脂質高発現の原因遺伝子

の同定

1. 大腸癌特異的PC-32:1の細胞内シグナリングへの影響の解析

ここではCancer Sci. 2013においてiMScopeで同定した大腸癌特異的PC-32:1の細胞内シグナルへの影響を解析した。同定したPC-32:1の添加により細胞増殖が促進されることが明らかとなっているので、PC-32:1によりいずれのシグナルカスケードが活性化しているかをシグナル伝達因子のリン酸化抗体や細胞周期制御因子の抗体を用いたウェスタンブロッティングにより判定した。使用した抗体は抗EGFR, Erk, Akt, p38, JNKのリン酸化抗体や抗Cyclin E, Cyclin B1抗体などであった。

2. iMScopeによる胃癌特異的リン脂質の同定

iMScope(島津製作所; 現有設備)で癌特異的なリン脂質を同定できるのでこれを利用した。申請者の研究室には大量の胃癌(癌と正常部位)がそろっているのでこれらを使用した。具体的には、凍結切片を作製後マトリックスと呼ばれる試料のイオン化を促進する試薬を蒸着し、iMScopeで計測した。iMScopeでの計測は顕微鏡部により切片上にレーザーを二次元走査させ、走査した各ポイント毎に発生したサンプル由来のイオンを質量分析部へ送ることで行われ、最終的に数万に及ぶスペクトルデータが得られる。その後得られたスペクトルデータをClinProTool2.2(BUKER DARUTNICS)という統計解析用ソフトを使用しノーマライズ処理後、癌部位と正常部位でのリン脂質の発現量を算出した。また、リン脂質のスペクトルデータはソフトウェアで画像化が可能であり、得られたリン脂質が癌部位特異的に高発現しているかを画像でも確認した。リン脂質分子の構造決定はタンデムマススペクトロメトリ-QSTAR Elite(Applied Biosystems;

現有設備)と脂質分子データベース LIPID MAPS (<http://www.lipidmaps.org>)を使用して行った。また、LPCAT 活性もしくはPLA₂活性の検討のためリン脂質に対するリゾリン脂質の比を算出した。

3. 胃癌特異的リン脂質高発現の原因遺伝子の同定

ここでは2.で上がった原因遺伝子候補の胃癌での発現を解析する。既に50ペアの正常部と胃癌部のcDNAが準備で来ている。そこでLPCATおよびPLA₂の発現をリアルタイムPCR法により測定した。

平成27年度

1. 同定した遺伝子の癌の悪性化への関与の解析

ここでは前年度に同定した遺伝子 LPCAT3 の癌の悪性化への影響を解析した。悪性化への影響を解析する方法として細胞増殖曲線の作成を行った。癌においてLPCATの発現が減少していたのでその遺伝子をAGS細胞に導入し遺伝子を過剰発現させ細胞の増殖をコントロールと比較した。また癌の悪性化との相関がみられる軟寒天中コロニー形成法を行った。上記の実験と同様にAGS細胞と過剰発現を利用した。上記のそれぞれの実験は他のもう1つの胃癌細胞株MKN-28でも行った。

4. 研究成果

今回、我々は質量顕微鏡装置 iMScope(島津製作所)を用いて胃癌および非癌部組織サンプルを対象とし、抗癌剤候補をスクリーニングした。その結果、2種の異なるアシル鎖構成を持つフォスファチジルコリン(PC-34:2とPC-36:4)が有意に胃癌で発現減少していた。同定したPC-34:2は5つの胃癌細胞株の増殖を抑制した。一方で、正常なNIH3T3細胞の増殖はPC-34:2により全く影響を受けなかった。さらに、上記のPCを産生

することが知られている LPCAT3 の過剰発現により胃癌細胞株 MKN-28 の増殖が抑制された。また、PC-32:1 に関しては、各種リン酸化抗体を用いたウェスタンブロットにより、Akt のリン酸化が特異的に上昇することが明らかとなった。

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)

World Journal of Gastrointestinal Physiology in press, Nobuya Kurabe, Hisaki Igarashi, Ippei Ohnishi, Shogo Tajima, Yusuke Inoue, Yoshihiko Takahashi, Mitsutoshi Setou and Haruhiko Sugimura, Visualization of sphingolipids and phospholipids in the fundic gland mucosa of human stomach using imaging mass spectrometry

[学会発表](計 2 件)

第 74 回日本癌学会学術総会、倉部誠也、Phosphatidylcholine-36:4 and -34:2 harbor tumor suppressive function for gastric cancer.、2015 年 10 月 9 日、名古屋国際会議場

AACR 2016, Nobuya Kurabe、Phosphatidylcholine-34:2 and -36:4 have tumor suppressive function for gastric cancer.、2016 年 4 月 17 日、ニューオーリンズ

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 1 件)

名称：抗がん剤

発明者：倉部誠也、梶村春彦

権利者：浜松医科大学

種類：特許

番号：特願 2015-085850

出願年月日：2015 年 4 月 20 日

国内外の別：国内

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

6. 研究組織

(1)研究代表者

倉部 誠也(KURABE, Nobuya)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：60466737