

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07194

研究課題名(和文) LC-MS/MSを用いた大腸癌特異的新規リン脂質性メディエーターの探索と機能解明

研究課題名(英文) Search and functional elucidation of novel colorectal cancer-specific phospholipid mediators using LC-MS / MS

研究代表者

園田 洋史 (SONODA, HIROFUMI)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80770205

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)：本研究では、タンデム型質量分析法(LC-MS/MS)によるリン脂質解析法を大腸癌手術検体に応用した。その結果、進行大腸癌において、1-acyl LPI (18:0)、2-acyl LPG (18:1)、1-acyl LPS (18:0)が著明に増加していることが明らかになった。

また、これらの中で最も変化の大きかったLPIに注目し、LPIの受容体であるGPR55とLPIに特異的な産生酵素であるDDHD1の発現と、大腸癌の臨床病理学的因子の解析を行った。その結果、GPR55は多くの大腸癌検体で高発現することが明らかとなった。またDDHD1の発現が大腸癌の深達度と相関することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、細胞間シグナル伝達に關与するリゾリン脂質に注目し、大腸癌で変化するリゾリン脂質を明らかにすることを目的とし、タンデム型質量分析法により大腸癌手術検体を解析し、大腸癌で増加するリゾリン脂質分子種を明らかにした。さらに、大腸癌で変化したリゾリン脂質の産生酵素としてシグナル伝達に關与する分子DDHD1が腫瘍の深達度に關与することが示され、治療のターゲットとなる可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)： In this study, the phospholipid analysis by tandem mass spectrometry (LC-MS / MS) was applied to colorectal cancer surgical specimens. As a result, it was revealed that 1-acyl LPI (18: 0), 2-acyl LPG (18: 1), and 1-acyl LPS (18: 0) were significantly increased in advanced colorectal cancer.

In addition, focusing on LPI, which had the largest change among colorectal cancer, we analyzed the expression of GPR55, which is a receptor for LPI, and DDHD1, which is a production enzyme specific to LPI, and the clinicopathological factors of colorectal cancer. As a result, it was clarified that GPR55 is highly expressed in many colorectal cancer specimens. It was also clarified that the expression of DDHD1 correlates with the invasion depth of colorectal cancer.

研究分野：消化器外科学

キーワード：大腸癌 リゾリン脂質 リゾホスファチジルイノシトール GPR55 DDHD1

### 1. 研究開始当初の背景

リン脂質は、細胞隔壁である脂質二重膜を構成し、バリアとして機能するのみならず、リン脂質性メディエーターに変換され、7回膜貫通型受容体のリガンドとして機能することが明らかとなり、その産生酵素・分解酵素、受容体の機能研究が進んでいる (J. Biochem. 2015;157:81-89)。また、癌微小環境におけるリン脂質性メディエーターの機能についても注目されてきている (Cancer Microenvironment 2011; 4: 393-403)。これまで我々は、リゾホスファチジン酸(LPA)やスフィンゴシン 1 リン酸(S1P)が、大腸癌において重要なシグナル伝達物質として作用することを報告してきた (Cancer Research. 2003; 63:1706-1711)。しかし、その分子機構については不明な点が多く、LPA や S1P 以外のリズリン脂質性メディエーターの大腸癌における役割については不明である。

リン脂質は構造的に極性が高く、特殊な抽出・分離操作が必要であり、またリン脂質の検出感度も低かったため、これまでのリン脂質研究は、リン脂質代謝に関わるタンパク質や遺伝子をターゲットとした実験手法を中心に研究が進められてきた。しかし近年、タンデム型質量分析法

(Liquid Chromatography - tandem Mass Spectrometry, LC-MS/MS) が開発され、リン脂質の検出感度が飛躍的に向上した。具体的には 10mg (体積として約 10 $\mu$ l) と極少量の生体組織から全リン脂質組成を解析することが可能となった (J.Lipid Res 2014; 55: 2178-2192) が、この手法を用いて癌におけるリン脂質の機能解析をした報告は未だない。また、LC-MS/MS によるリン脂質の質量分析法によりリン脂質の検出感度が約 100 倍向上したことで、リン脂質を構成する、多様な脂肪酸分子種の解析も含め、これまで知り得なかった未知のリン脂質分子を同定することが可能となった。

### 2. 研究の目的

本研究は、これまでの分子生物学的研究手法のみならず、LC-MS/MS 技術という新たなリン脂質解析手法を駆使することにより、臨床大腸癌組織と正常組織を構成するリン脂質分子を脂肪酸分子種も含め比較・評価し、大腸癌で特異的に変化するリン脂質性メディエーターを同定し、その癌組織におけるシグナル伝達機構とその役割を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

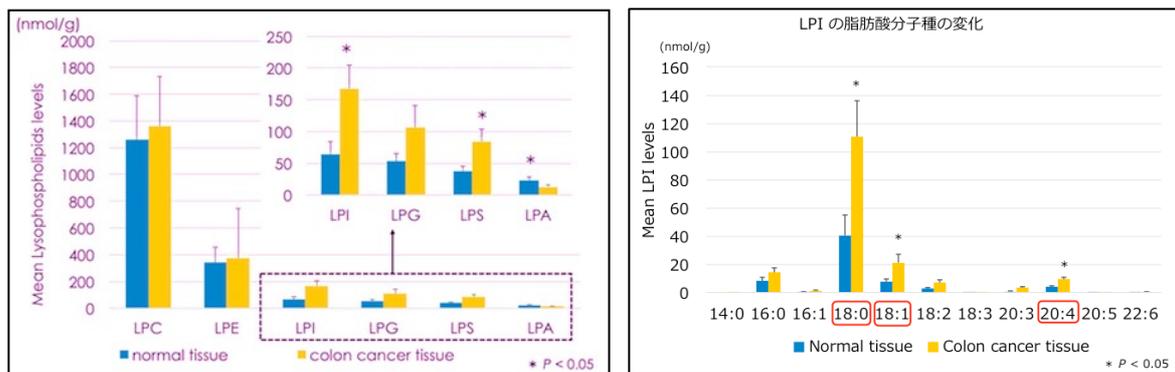
(1) 当施設では施行した大腸癌患者の手術切除検体から速やかに組織を採取する。切除検体の正常粘膜、潰瘍周堤、潰瘍底、浸潤部からそれぞれ 10 mg 以上の組織を採取し、液体窒素で急速凍結の後、凍結保存する。後日切除検体からのリン脂質抽出操作を施行し、タンデム型質量分析器(LC-MS/MS)による測定を行い、リン脂質組成の網羅的なスクリーニングを行った。

(2) 大腸癌選択的に増加したリゾホスファチジルイノシトールの産生酵素、および受容体の発現を大腸癌手術検体の免疫組織化学染色により評価し、これらの発現と臨床病理学的因子の関連を解析した。

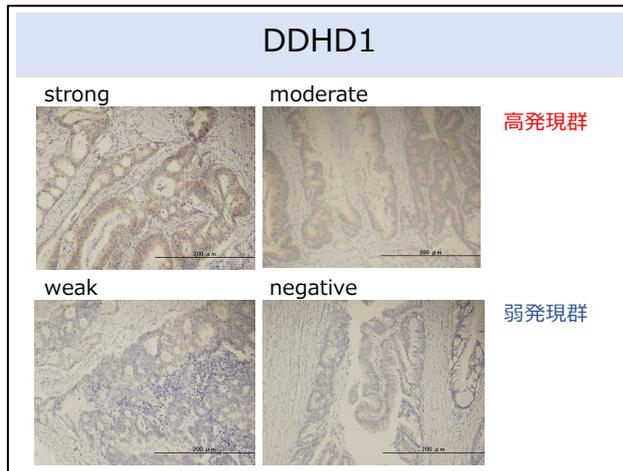
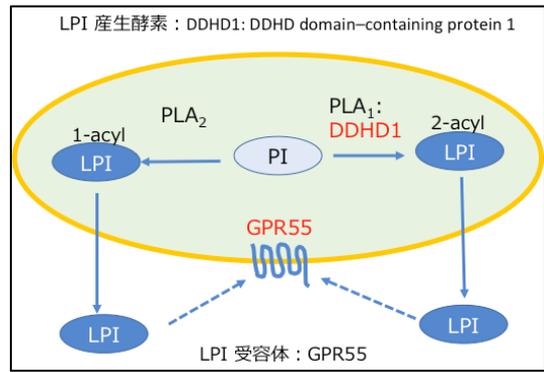
### 4. 研究成果

(1) 大腸癌患者の手術切除検体に対する LC-MS/MS を用いた解析を行った結果、進行大腸癌において、リゾホスファチジルイノシトール(LPI)、リゾホスファチジルセリン (LPS)、リゾホスファチジルグリセロール(LPG)が増加することが明らかとなった。

さらに、脂肪酸分子種の解析を行った結果、1-acyl LPI (18:0)、2-acyl LPG (18:1)、1-acyl LPS(18:0)が有意に増加していることが明らかとなった。



(2) LPI の受容体である G protein-coupled receptor 55 (GPR55)と LPI に特異的な産生酵素である DDHD domain containing 1 (DDHD1)の発現と、大腸癌の臨床病理学的因子の解析を行った。大腸癌切除検体に対する免疫組織化学染色により、これらの分子の発現を評価し、臨床病理学的因子との関連について検討を行った。その結果、GPR55 は多くの大腸癌検体で高発現することが明らかとなった。また DDHD1 の発現が大腸癌の深達度と相関することが明らかになった。



### DDHD1と臨床病理学的因子の検討

		強発現 n = 69	弱発現 n = 23	p 値
性別	M / F (%)	38 / 31 (55 / 45)	8 / 15 (35 / 65)	0.57
年齢 (歳) (中央値)		68 (44-89)	64 (45-90)	0.27
部位	Proximal (%)	27 (39)	11 (48)	0.6
	Distal (%)	42 (61)	12 (52)	
組織型	Well/ mod (%)	56 (82)	19 (83)	0.74
	Muc/ por /pap(%)	13 (18)	4 (17)	
深達度	T1-2 (%)	11 (16)	9 (39)	0.03
	T3-4 (%)	58 (84)	14 (61)	
腫瘍径 (mm) 平均値 ± SD		47 ± 24.2	41.4 ± 24.8	0.45
ly	Negative (%)	46 (67)	16 (70)	0.93
	Positive (%)	23 (33)	7 (30)	
v	Negative (%)	20 (29)	7 (30)	0.98
	Positive (%)	49 (71)	16 (70)	
リンパ節転移	Negative (%)	42 (61)	15 (65)	0.94
	Positive (%)	27 (39)	8 (35)	

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Chieko Kitamura, Hirofumi Sonoda, Hiroaki Nozawa, Kuniyuki Kano, Shigenobu Emoto, Koji Murono, Manabu Kaneko, Masaya Hiyoshi, Kazuhito Sasaki, Takeshi Nishikawa, Yasutaka Shuno, Toshiaki Tanaka, Keisuke Hata, Kazushige Kawai, Junken Aoki and Soichiro Ishihara	4. 巻 41 (5)
2. 論文標題 The component changes of lysophospholipid mediators in colorectal cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Tumor Biology	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/1010428319848616.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 CHIEKO KITAMURA, HIROFUMI SONODA, HIROYUKI ANZAI, YUZO NAGAI, SHINYA ABE, YUICHIRO YOKOYAMA, HIROAKI ISHII, JUNKO KISHIKAWA, SHIGENOBU EMOTO, KOJI MURONO, KAZUHITO SASAKI, KAZUSHIGE KAWAI, HIROAKI NOZAWA and SOICHIRO ISHIHARA	4. 巻 41(5)
2. 論文標題 Expression of Lysophosphatidylinositol Signaling-relevant Molecules in Colorectal Cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 2349-2355
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticanres.15009.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 北村 智恵子, 園田 洋史, 可野 邦行, 江本 成伸, 室野 浩司, 金子 学, 日吉 雅也, 佐々木 和人, 秀野 泰隆, 西川 武司, 田中 敏明, 畑 啓介, 川合 一茂, 青木 淳賢, 野澤 宏彰
2. 発表標題 大腸癌におけるリゾリン脂質性メディエーターの組成変化に関する検討
3. 学会等名 日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北村 智恵子, 園田 洋史, 可野 邦行, 田中 敏明, 畑 啓介, 川合 一茂, 野澤 宏彰, 青木 淳賢, 石原 聡一郎
2. 発表標題 大腸癌におけるリゾホスファチジルイノシトールの局在の質量顕微鏡を用いた解析
3. 学会等名 日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北村智恵子, 園田洋史, 室野浩司, 江本成伸, 日吉雅也, 金子学, 佐々木和人, 西川武司, 秀野泰隆, 田中敏明, 畑啓介, 川合一茂, 野澤宏彰, 石原聡一郎
2. 発表標題 大腸癌におけるリゾリン脂性メディエーターの組成変化に関する検討
3. 学会等名 日本消化器病学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北村智恵子, 園田洋史, 可野邦行, 江本成伸, 室野浩司, 金子学, 日吉雅也, 佐々木和人, 秀野泰隆, 西川武司, 田中敏明, 畑啓介, 川合一茂, 青木淳賢, 野澤宏彰
2. 発表標題 大腸癌におけるリゾリン脂質性メディエーターの組成変化に関する検討
3. 学会等名 日本癌治療学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

#### 6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	田中 敏明  (TANAKA TOSHIAKI)  (30647540)	東京大学・医学部附属病院・講師   (12601)	
研究分担者	畑 啓介  (HATA KEISUKE)  (60526755)	東京大学・医学部附属病院・特任講師   (12601)	
研究分担者	野澤 宏彰  (NOZAWA HIROAKI)  (80529173)	東京大学・医学部附属病院・准教授   (12601)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	川合 一茂  (KAWAI KAZUSHIGE)  (80571942)	東京大学・医学部附属病院・講師    (12601)	
研究分担者	石原 聡一郎  (ISHIHARA SOICHIRO)  (00376443)	東京大学・医学部附属病院・教授    (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関