

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19048

研究課題名(和文) 脂質異常に着目した悪性リンパ腫の層別化と新規治療戦略開発のための基礎的研究

研究課題名(英文) Comprehensive lipid analysis in malignant lymphoma tissue

研究代表者

山本 浩平 (YAMAMOTO, Kohei)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：50451927

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：質量顕微鏡法を用いて古典的ホジキンリンパ腫(Hodgkin-Reed Sternberg(HRS)細胞)に分布する網羅的な脂質解析を試みた。14検体の検討により7つのm/zで有意差が認められた。このうち、m/z 885.5はホジキンHRS細胞にて反応性リンパ球に対し減少し、残り6つのm/zは相対的に増加していた。MS/MS解析により、HRS細胞で減少するm/z885.5は成熟型ホスファチジルイノシトール(PI)(18:0/20:4)であり、増加を示すm/zはPI(18:0/18:1)やPI(18:0/18:2)などの多価不飽和脂肪酸を含まないde novo PIであることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Comprehensive lipid analysis in Hodgkin-Reed Sternberg(HRS) cells was performed using imaging mass spectrometry. A total of seven m/z had significant differences between HRS cell and surrounding reactive lymphocytes. Among them, m/z 885.5 was decreased in HRS cells, whereas other m/z group were relatively increased. MS/MS analysis revealed that all the m/z were phosphatidyl inositol (PI). In detail, m/z885.5 was mature type of PI(18:0/20:4), on the other hand, other m/zs were de novo PI(e.g. PI(18:0/18:1), PI(18:0/18:2)).

研究分野：血液病理学

キーワード：悪性リンパ腫 ホジキンリンパ腫 脂質 Lipidomics

1. 研究開始当初の背景

昨今のゲノミクスの劇的な発展により、悪性リンパ腫をはじめとした悪性腫瘍に生じる遺伝子異常が一塩基のレベルで解読されている。一方で、従来の脂質の解析はその性質上 DNA に直接コードされている分子ではないため、核酸やタンパク質と比較すると分子生物学的手法の適用に限りがあった。そのため、脂質に関する十分な検索がなされないまま、遺伝子変異とそれによるタンパクの異常を中心として悪性腫瘍の病態やメカニズムについての解釈がなされてきた。しかしながら、現在までの医学的知見のみでは説明し得ない悪性腫瘍に生物学的疑問点は多く残されている。

2. 研究の目的

悪性リンパ腫における病態把握の一環として、mRNA やタンパクの発現異常に加え、脂質の代謝や分布異常が病態形成の一翼を担っているという仮説に基づき、悪性リンパ腫組織内の脂質を網羅的に同定することで、悪性リンパ腫の新たな病態把握と新規治療戦略に迫ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 検体の選択と実験準備

今回の検討では古典的ホジキンリンパ腫組織内のHodgkin-Reed Sternberg(HRS)細胞に分布する脂質をターゲットに解析を行った。コントロールとしてホジキンリンパ腫組織内の反応性リンパ球を比較対象として解析した。冷凍保存された古典的ホジキンリンパ腫組織 14 検体から導電性スライドガラスに対して冷凍切片を作製し、これを実験に用いた。

(2) 質量分析イメージング法

冷凍リンパ腫切片にマトリクスを塗布後、レーザーを照射することでイオン化し、生じた多数のイオンに対し質量分析を行うことで

脂質を同定した。レーザー照射は最少で5 μ mのレーザー径に設定でき、これにより細胞レベルでの脂質の局在の網羅的が可能となる。とくに、古典的ホジキンリンパ腫内のHRS細胞は極めて大型の細胞であるため、マイクロダイセクション法を用いることなくHRS細胞内に存在する脂質の同定が可能となる。

(3) データベース解析とイメージング

それぞれの切片から得られたイオン質量データを、脂質検索エンジンを用いて統合的に解析し、脂質の同定を行った。さらに同定された脂質の有無および量に応じて画像化した。連続切片における HE 染色との対比により、リンパ腫組織内での脂質の分布を確認した。さらに ROI 解析によりホジキン細胞領域の脂質と反応性リンパ球領域の脂質を網羅的に比較した。

4. 研究成果

まず、今回脂質解析を行った 14 例のうち HRS 細胞が比較的多数浸潤・増殖する領域と、ほとんど認められない領域が局在していた 1 例に着目し、古典的ホジキンリンパ腫組織内に分布する脂質を同定するため両者の領域のマスマスペクトルを作製した。両マスマスペクトルでは m/z 825-925 の範囲でピークのパターンに顕著な違いが見られ、 m/z 700-1000 の範囲では検出ピーク高さ 1.00% で 106 のピークが検出された。これら 106 ピークのうち強度の高い順に上から 50 個のピークに着目した。さらにこれら 50 ピークのうち、 m/z 825-925 の範囲に含まれるスペクトルの異なるピーク数は 25 個であった。この 25 ピークについて HRS 細胞が多数存在する領域と非腫瘍性リンパ球のみの領域で ROI 解析を行った結果、 m/z 835.5、861.5、863.5、885.5、889.5、909.5、911.5 の 7 つのピークで有意差が認められた ($p < 0.05$)。この 7 つのピークのうち m/z 885.5 のみ HRS 細胞が多数存在する領域において減少しており、他の 6 つは HRS 細胞が多数存在する領域で増加して

いた。HRS 細胞で増加していたピークのうち m/z 861.5 と m/z 863.5 の脂質については測定領域左上の HRS 細胞が多数存在する領域で強度が高くなっており、測定領域右下の HRS 細胞がほとんど認められない領域では強度が低くなっていることを二次元マッピングにて確認した。一方、HRS 細胞が多数存在する領域で減少していた m/z 885.5 では逆の傾向がみられた。質量分析後に HE 染色を行い、HRS 細胞 HRS 細胞および反応性リンパ球細胞を正確に同定するため、質量分析後に HE 染色を行った組織像上で両者を同定し、それぞれの細胞領域をそれぞれ 10 ヶ所ずつ選択し ROI 解析をおこなった。結果、 m/z 835.5、861.5、863.5、909.5、911.5 では HRS 細胞で増加傾向が、 m/z 885.5 では減少傾向が見られた。

全症例の ROI 解析の結果 HRS 細胞で増加・減少傾向のあった 6 つの脂質について MS/MS 解析により構造推定を行った。構造推定の結果、 m/z 835.5、861.5、863.5、885.5、889.5、909.5、911.5 の 6 つの脂質は全てホスファチジルイノシトール (PI) であることが判明した。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

[その他]

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

山本 浩平 (YAMAMOTO Kohei)

東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・助教

研究者番号 : 50451927

