

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 4月 15日現在

機関番号：13802

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22791271

研究課題名（和文） 質量顕微鏡法を用いた肝細胞癌における脂質代謝異常の解明

研究課題名（英文） Lipid analysis of 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・診療助教

研究者番号：60464129

研究成果の概要（和文）：

肝細胞癌 37 例を対象に質量顕微鏡法を用いて脂質解析を行った。肝細胞癌と隣接非癌部においてリン脂質の分布が異なっていた。リン脂質の分布が異なる原因として、リン脂質のリモデリング酵素（LPCAT）の発現を確認したところ LPCAT1 の発現が癌部において増加していた。2 種類の肝細胞癌細胞株に対して LPCAT1 の遺伝子発現を抑制したところ、コントロールの細胞と比較してリン脂質の組成に変化が生じ、増殖が抑制され、浸潤・遊走供に抑制された。次に LPCAT1 を過剰発現させたところ、細胞増殖や浸潤能が増加することが確認された。

研究成果の概要（英文）：

Molecular lipidomic screening was performed by imaging mass spectrometry (IMS) in 37 resected HCC specimens. IMS revealed the increase of PC phosphatidylcholine (PC) species with palmitoleic acid or oleic acid at the sn-2-position and the reduction of lysophosphatidylcholine (LPC) with palmitic acid at the sn-1-position in HCC tissues. Next, we analyzed mRNA and protein of lysophosphatidylcholine acyltransferase (LPCAT1) which catalyzed LPC into PC and had substrate specificity for some kind of fatty acids. LPCAT1 was more abundant in HCCs than in surrounding parenchyma. We examined the effect of LPCAT1 overexpression or knockdown LPCAT1 on cell proliferation, migration, and invasion in HCC cell lines. LPCAT1 overexpression enriched PCs observed in IMS and promoted cell proliferation, migration, and invasion. LPCAT1 knockdown did vice versa.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：肝細胞癌、質量顕微鏡、リン脂質、リモデリング酵素、LPCAT1

## 1. 研究開始当初の背景

肝臓癌は世界で 5 番目に多い癌であり、また癌死亡原因の 3 番目となっている。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。肝臓癌の発生に関しては、肝炎ウイルスやアルコール、アフラトキシンなどのリスクファクターが存在し、種々の研究により発癌や進展の関わる遺伝

子異常や細胞内シグナル伝達経路が明らかになりつつあるが未だ不明な部分も多い (Aravalli RN. Hepatology. 2008 Dec;48(6):2047-63)。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 Apr;49(4):1122-31. Moriishi K et al. PNAS. 2007 Jan 30;104(5):1661-6)。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、脂質代謝と様々な疾患の関連性が注目されている。特に肥満患者の多い欧米においては Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) と NASH からの発癌に対して大きな関心が寄せられている。

これまでの脂質異常と癌に関する報告としては、脂肪酸合成に関与する Fatty acid synthase (FASN) の発現が乳癌や前立腺癌の予後と関係する (Kuhajda FP. Cancer Res. 2006 Jun 15;66(12):5977-80)、コレステロール合成に関与する Sterol regulatory element binding protein (SREBP) の発現が肝臓癌の予後と関係する (Yamashita et al. J Hepatol. 2009 Jan;50(1):100-10) などの報告がなされている。しかし、脂質の分子種まで解析した詳細な検討はこれまでにない。

近年、リン脂質に脂肪酸を付加する acyltransferase が次々に同定され、長年にわたりブラックボックスとなっていたリン脂質の remodeling 経路 (Land' s cycle) のメカニズムが明らかとなりつつあり、非常に注目されている (Shindou H. J Biol Chem. 2009 Jan 2;284(1):1-5)。また、それらの acyltransferase には複数の subtype が存在し、それぞれが特異的な脂肪酸に対して選択性を持っていることが報告されている。例えば、炎症細胞で高発現している lysophosphatidylcholine

acyltransferase2 (LPCAT2) は、アラキドン酸 (20:4) に対して選択性を持っていることが報告されている (Shindou H. J Biol Chem. 2007 Mar 2;282(9):6532-9.)。このように、脂質解析においてはその分子種を明らかにしていくことが非常に重要と思われる。

本学分子解剖学教室 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。具体的には標本を急速凍結させ、厚さ 10  $\mu$ m 程度の薄切片とした後、組織上で質量分析に必要なプロテアーゼ処理 (on tissue digestion) やマトリックスなどの前処置を行った後に、解析を行う。

標本から得られた結果から任意の分子情報を選択的に抽出して、当該分子の組織切片における分布を画像化する技術である。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 (Shimma S et al. J chromatogr B 855:98-103, 2007)、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。海外では Caprioli らが腎細胞癌の標本を用いた解析などを報告している (Herring KD et al. Semin Nephrol 27:597-608, 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発見した。また、本学分子解剖学教室と島津製作所で共同開発され、2009年に本学に導入された大気圧下顕微質量分析装置 (Mass microscope) により、細胞レベルでの分子イメージングが可能となった。これにより、癌の微小環境における生体分子の状態がより明らかとなることが期待されている。

## 2. 研究の目的

本研究は肝臓癌における未知の脂質代謝異常の分子メカニズムを解明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) 肝臓組織中の脂質分子を画像化する。画像化の為の肝臓切除検体としては 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。比較コントロール群として、質量顕微鏡法により隣接非癌部も同時に画像化する。
- 2) 画像化された脂質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) 癌部と隣接非癌部において脂肪酸付加に関係する acyltransferase、脂肪酸遊離に関係する phospholipase の発現を調べる。
- 4) 発現に差のあった acyltransferase を対象として肝臓癌細胞株に siRNA を行い、腫瘍細胞の増殖や浸潤能に変化が生じるか、また逆に過剰発現させた場合には、どのような変化が生じるか確認する。

## 3. 研究の方法

- 1) 肝臓癌 37 例 (C 型肝炎由来 25 例、B 型肝炎由来 7 例、非 B 非 C 5 例) を対象に質量顕微鏡法を用いて脂質解析を行う。
- 2) 癌部と隣接非癌部においてリン脂質のリモデリング酵素である Lysophosphatidylcholine acyltransferase (LPCAT) の 4 種類のサブタイプの発現を RT-PCR と Western blotting にて

解析する。また、リモデリングに関係するもう片方の酵素群 Phospholipase (PLA2) の発現も解析する。

3) LPCAT1 の肝細胞癌に対する影響を調べるために、2 種類の肝細胞癌細胞株

(Huh7, HepG2) に対して siRNA を用いて LPCAT1 の遺伝子発現を抑制し、リン脂質の組成や増殖能・浸潤能・遊走能の変化を確認する。

4) LPCAT1 を過剰発現させた際における、リン脂質組成や増殖能・浸潤能・遊走能の変化を確認する。

#### 4. 研究成果

1) 肝細胞癌と隣接非癌部においてリン脂質の分布が異なることが判明した (Fig. 1)。また肝細胞癌であっても C 型肝炎由来、B 型肝炎由来、非 B 非 C 肝細胞癌で同じような分布を示すわけではなく、リン脂質の分子種によっては分布が異なることも明らかになった。

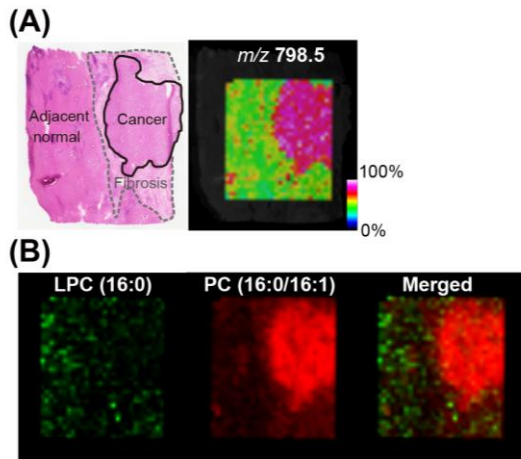


Fig. 1 肝細胞癌組織切片を質量顕微鏡で解析した結果。(A) 癌部と非癌部ではリン脂質の分布が異なる。(B) 癌部では PC (16:0/16:1) が多く、LPC (16:0) が少ない。

2) 組織から抽出した RNA を用いて RT-PCR を行ったところ、LPCAT1 と LPCAT4 の発現が癌部で増加していた (Fig. 2)。

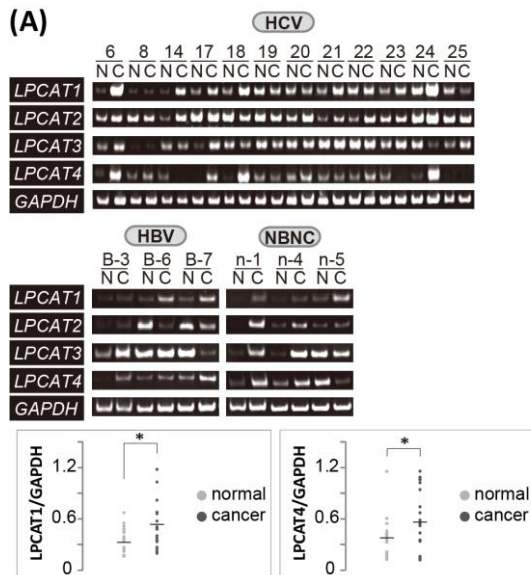


Fig. 2 LPCATs の RT-PCR

また LPCAT1 に関しては、Western blotting にて蛋白レベルでも発現が癌部で増加していることが明らかになった (Fig. 3)。

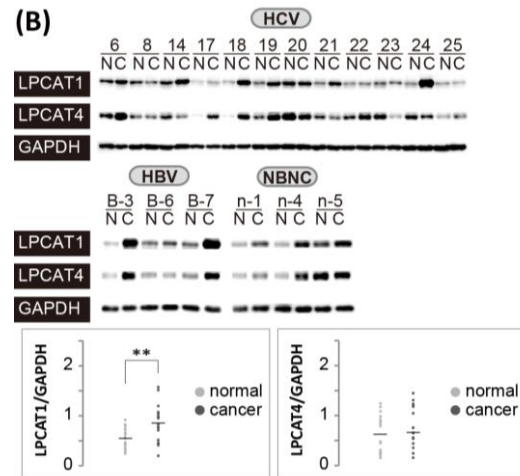


Fig. 3 LPCAT1 と LPCAT4 の Western blotting 一方、リン脂質リモデリングに関係するとされている PLA2 に関しては、差が無かった (Fig. 4)。

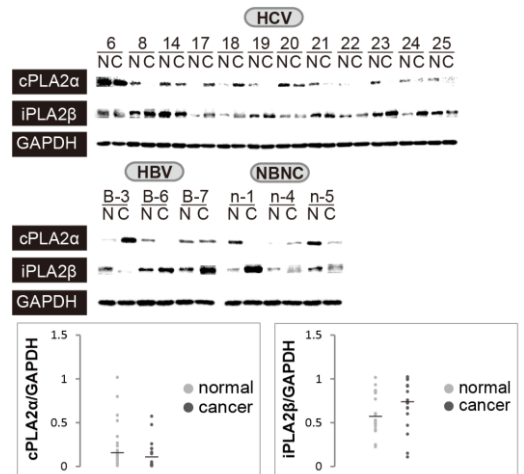


Fig. 4 PLA2s の Western blotting

3) LPCAT1 をノックダウンしたところ、肝細胞癌細胞のリン脂質組成が変化し (Fig. 5)、増殖能・浸潤能・遊走能が抑制された (Table. 1, 2)。

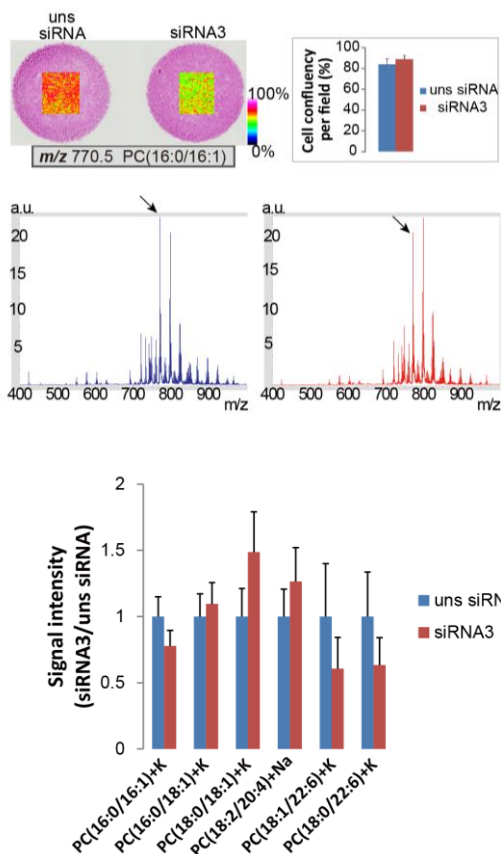


Fig.5 LPCAT1 ノックダウン後のリン脂質組成変化

	Cell proliferation (absorbance 570-630 nm)			
	Huh7		HepG2	
	Day 3	Day 5	Day 3	Day 5
Control siRNA				
uns siRNA	0.066 ± 0.011	0.135 ± 0.013	0.409 ± 0.025	0.639 ± 0.043
LPCAT1-siRNA				
siRNA1	0.079 ± 0.008**	0.127 ± 0.010**	0.364 ± 0.021**	0.790 ± 0.097
siRNA3	0.041 ± 0.005**	0.082 ± 0.017**	0.304 ± 0.020**	0.740 ± 0.050**
Control vector		Day 2		Day 4
pCMV-Tag3c	0.266 ± 0.028	0.294 ± 0.042	0.170 ± 0.020	0.226 ± 0.024
LPCAT1-overexpression				
pCMV-Tag2-LPCAT1	0.296 ± 0.028**	0.309 ± 0.031	0.182 ± 0.022	0.312 ± 0.028**

Table.1 LPCAT1 発現変化させた場合の増殖能

	HuH7	HepG2
<b>Migrated cells per field (cell migration)</b>		
Control siRNA		
uns siRNA	297 ± 119	289 ± 120
LPCAT1-siRNA		
siRNA3	210 ± 78**	132 ± 49**
Control vector		
pCMV-Tag3c	143 ± 51	37 ± 34
LPCAT1-overexpression		
pCMV-Tag2-LPCAT1	140 ± 58	42 ± 40
<b>Invaded cells per field (cell invasion)</b>		
Control siRNA		
uns siRNA	102 ± 55	173 ± 130
LPCAT1-siRNA		
siRNA3	22 ± 11**	76 ± 59**
Control vector		
pCMV-Tag3c	48 ± 18	11 ± 11
LPCAT1-overexpression		
pCMV-Tag2-LPCAT1	76 ± 48**	22 ± 21**

Table.2 LPCAT1 発現変化させた場合の浸潤能と遊走能

4) LPCAT1 を過剰発現させると、ノックダウ

ンした場合と逆の変化が確認された。

### 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)

Yoshifumi Morita, Takanori Sakaguchi, Koji Ikegami, Naoko Goto-Inoue, Takahiro Hayasaka, Vu Thi Hang, Hiroki Tanaka, Takashi Harada, Yasushi Shibasaki, Atsushi Suzuki, Keisuke Inaba, Makoto Murakami, Mitsutoshi Setou, Hiroyuki Konno, Lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 altered phospholipid composition and regulated hepatoma progression, Journal of Hepatology, 査読あり, in press

DOI: 10.1016/j.jhep.2013.02.030

[学会発表] (計10件)

① 森田 剛文, Lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 altered phospholipid composition and regulated hepatoma progression, 第12回慶北-浜松合同医学シンポジウム, 2012年9月26日, 浜松

② 森田 剛文, Lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 altered phospholipid composition and regulated hepatoma progression, 第71回日本癌学会総会, 2012年9月19日, 札幌

③ 森田 剛文, リン脂質リモデリング酵素 LPCAT1 は肝細胞癌の進展を促進する, 第17回日本病態プロテアーゼ学会総会, 2012年8月10日, 浜松

④ 森田 剛文, 質量顕微鏡法によるバイオマーカー探索と臨床応用に向けた取り組み, 第67回日本消化器外科学会総会, 2012年7月18日, 福井

⑤ 森田 剛文, Imaging mass spectrometry revealed the altered phospholipid distribution caused by lysophosphatidylcholine acyltransferase 1, related to hepatocellular carcinoma progression, IASGO 2011, 2011年11月11日, 東京

⑥ 森田 剛文, 質量顕微鏡法による肝細胞癌における脂質異常の解析, 第19回JDDW, 2011年10月20日, 福岡

⑦ 森田 剛文, 質量顕微鏡法を用いた肝細胞癌のリン脂質解析, 第70回日本癌学会総会, 2011年10月3日, 名古屋

⑧ 森田 剛文, 質量顕微鏡法を用いた肝細胞癌の脂質解析, 第111回日本外科学会総会, 2011年5月26日, 東京

⑨ 森田 剛文, 質量顕微鏡法による肝細胞

癌・前癌病変での脂質異常の解析, 第 18 回  
JDDW, 2010 年 10 月 13 日, 横浜

⑩森田 剛文, 質量顕微鏡法を用いた肝細胞  
癌の脂質解析, 第 110 回日本外科学会総  
会, 2010 年 4 月 8 日, 名古屋

## 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・診療助教

研究者番号：6 0 4 6 4 1 2 9