



Imaging mass spectrometry distinguished the cancer and stromal regions of oral squamous cell carcinoma by visualizing phosphatidylcholine (16:0/16:1) and phosphatidylcholine (18:1/20:4)

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-04-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 内山, 佳之 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/2706

博士(医学) 内山 佳之

論文題目

Imaging mass spectrometry distinguished the cancer and stromal regions of oral squamous cell carcinoma by visualizing phosphatidylcholine (16:0/16:1) and phosphatidylcholine (18:1/20:4)

(質量分析イメージングはホスファチジルコリン(16:0/16:1)と(18:1/20:4)を用いて口腔扁平上皮癌の癌領域と間質領域を区別した)

論文の内容の要旨

[はじめに]

脂質は、タンパク質、核酸と糖に加えて重要な生物学的材料である。脂質は、細胞増殖と分化、代謝制御、免疫と炎症に関与していることが知られている。脂質の抽出を行うと、その位置情報が失われてしまう。質量分析イメージング法(以下 IMS)は、検体への簡単な前処理により生体分子の局在を明らかにし、物質組成を解析することを可能とする。IMS は、さらに脂質の脂肪酸成分の相違さえ視覚化することが可能である。これまで癌領域と正常領域を比較し、癌領域でリン脂質の一つであるホスファチジルコリン(以下 PC)の増加を認め、さらにその局在を明らかにしてきた。しかし、IMSを使用し癌領域と間質領域を比較する報告がなかった。今回我々は口腔扁平上皮癌の癌領域と間質領域を区別するリン脂質を検出し、2つの領域を識別することについて検討した。

[材料ならびに方法]

浜松医科大学口腔外科を受診した未治療の歯肉口腔扁平上皮癌患者5人から生検にて採取した組織の一部を試料として測定した。試料は液体窒素で凍結し、 -80°C で保存した。 -20°C で厚さ $8\text{ }\mu\text{m}$ の薄切片を作成し、導電性のあるスライドガラスに貼り付けた。切片に分子化合物をイオン化するため 2,5-dihydroxybenzoic acid を主成分としたマトリックスを噴霧した後に、ultraflexII (Bruker Daltonics)にて測定を行った。同じ切片を用いて、質量分析を二回繰り返して行い(MS/MS 測定)、生体分子を同定した。尚、当研究は本学医の倫理委員会の承認を受けて行った。

[結果]

無固定の口腔扁平上皮癌の切片を HE 染色後、検鏡し各領域が癌領域と間質領域に同定可能であることを確認した。

質量顕微鏡で得られるマススペクトル m/z 400-1200 を癌領域と間質領域で比較したところ、異なるシグナル群を検出した。 m/z 400-700 と m/z 850-1200 の範囲で 65 個のシグナルを検出し、リン脂質に相当する m/z 700-850 で 15 のシグナルを検出した。この 15 個のシグナルを用いて構築したイメージ像で、 m/z 720.1、770.5 と 794.5 は癌領域を示し、 m/z 804.5、820.5 と 846.6 は間質領域を示し、これらは有意差があることが統計解析によって確認され、特に m/z 770.5 と m/z 846.6 の組み合わせたイメージ像が、癌領域と間質領域を明瞭に可視的に区別可能であった。

MS/MS 測定の結果、 m/z 770.5 からトリメチルアミン 59 Da がはずれた m/z 711.4、さらにコリンヘッド群 183 Da がはずれた m/z 587.4 というピークを測定した。またパルミチン酸(16:0)がはずれたピークも測定され、癌領域を識別した m/z 770.5 の生体分子は PC(16:0/16:1) と同定された。同様

に間質領域を識別した m/z 846.6 の生体分子は PC (18:1/20:4)と同定された。

[考察]

質量顕微鏡はペプチドやリン脂質のような生体分子の解析に有用であり、簡単な前処理のみで一度に癌領域と間質領域が識別できる。本研究で IMS を用いて検出した癌領域と間質領域の構造に特異的なシグナルは、先行研究からそれらは PC やスフィンゴミエリンなどのリン脂質によるものと推測される。Ishikawa らによると PC は甲状腺癌で増加を認められている。2 つの PC(16:0/16:1) と PC(18:1/20:4)の局在が認められるのは、各領域の細胞増殖を示していると考ええる。細胞膜の構成要素である PC は増殖する細胞の密度が増加していることを反映していると推測できる。癌領域に局在する PC(16:0/16:1) と間質領域に局在する PC(18:1/20:4)が明確に識別されることは、2 つの PC は何らかの異なる役割を有していることを示している可能性がある。

最近の研究では、乳癌の血清にパルミチン酸(16:0)、ステアリン酸(18:0)、リノール酸(18:2)の増加を認め、脂肪酸組成はバイオマーカーとして注目されている。癌領域でパルミチン酸(16:0)結合の PC が同定されたことは、腫瘍細胞にそれら脂肪酸を含む PC が増加すると考える。しかし、PC(16:0/16:1)は肝癌や乳癌でも局在が認められているが、甲状腺癌では対応するシグナルが測定されていない。一方、Hanada らの報告によるとアラキドン酸(20:4)結合 PC の局在が脊椎損傷の炎症領域に認められている。本研究で間質領域には多くのリンパ球細胞が認められており、間質領域で PC (18:1/20:4)の局在が認められることは、癌浸潤に対するリンパ球細胞などの炎症の免疫応答反応を反映しているものと考えられる。

[結論]

我々は IMS を用いて口扁平上皮癌領域と間質領域をそれぞれ特徴付ける物質の分布を可視化し解析した。PC(16:0/16:1) と PC(18:1/20:4) のシグナルを組み合わせることにより、癌領域と間質領域を明確に区別することに成功した。