



Decreased level of phosphatidylcholine (16:0/20:4) in multiple myeloma cells compared to plasma cells: a single-cell MALDI-IMS approach

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2016-03-08 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: Hossen, Md Amir メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/2919

博士(医学) Md Amir Hossen

論文題目

Decreased level of phosphatidylcholine (16:0/20:4) in multiple myeloma cells compared to plasma cells: a single-cell MALDI-IMS approach

(多発性骨髄腫細胞において正常形質細胞と比較してホスファチジルコリン (16:0/20:4) が減少する:1 細胞レベルでの MALDI-IMS による解析)

論文の内容の要旨

[はじめに]

近年、脂質代謝の変化とがんとの関連が注目されている。固形がんでは、マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量顕微鏡法 (MALDI-IMS) により、腫瘍組織におけるホスファチジルコリン (PC) の組成変化が明らかとなり、新たなバイオマーカーや治療標的としての応用が期待されている。一方、血液がんは、一般的に腫瘍を形成しないため、MALDI-IMS での解析はこれまで行われていない。多発性骨髄腫 (MM) は形質細胞 (NPC) が腫瘍化した血液がんの一つであり、MM においても脂質代謝に関連した研究が報告されつつあるが、MM 細胞における脂質プロファイルは未だ明らかでない。このため、単一細胞での脂質組成を調べるため、蛍光活性化セルソーター (FACS) を用いて分離した MM 細胞および NPC を MALDI-IMS を用いて解析した。

[材料ならびに方法]

本研究は浜松医科大学医の倫理委員会で承認を受けた上で実施された。MM 患者 3 人と健常ボランティア 3 人から骨髄穿刺液を採取し、FACS を用いて MM 細胞、NPC をそれぞれ分離した。回収した細胞をサイトスピンにより導電性スライドガラス表面へ接着した。マトリックスとして 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHAP) を専用装置により試料表面に蒸着し、iMScope (島津製作所) にて各細胞を中心とした 25 x 25 μm のサンプル領域における陽イオンを m/z 700-900 の範囲で測定した。測定条件の精度を確認するためにヒト MM 細胞株である U266 細胞を同じスライドガラス上に接着し、U266 細胞の測定も同時に行った。

得られたデータは、専用ソフトウェアを用いてサンプル毎に 16 細胞ずつ結合した後、total ion current で標準化し、マススペクトルを作成した。MM サンプル 1 (MM1) のピークから信号強度順に上位 50 の分子を抽出し、データベースと照合してリン脂質のみをリストに挙げ、NPC サンプル 1 (NPC1) と比較した。MM1 と NPC1 の間で信号強度に 1.6 倍以上の違いがみられたリン脂質を検討候補として選択し、各サンプル間で統計解析を行った。 P 値 0.05 未満を統計学的有意とした。

また、MM 細胞及び NPC からクロロホルムを用いて抽出した脂質を dried droplet 法により測定し、各脂質濃度を標準溶液で作成した検量線を用いて定量的に確認した。

[結果]

まず、MALDI-IMS を用いて U266 細胞の測定を行い、細胞を接着した領域の測定

によりリン脂質のマスペクトルが得られることを確認した。

骨髓穿刺液から FACS により分離した MM 細胞、NPC の総有核細胞数に占める割合は、それぞれ、1.31 - 5.77 %、0.03 - 0.24%であった。

分離した MM 細胞と NPC の単一細胞 MALDI-IMS の結果から、MM1 と NPC1 の間で 1.6 倍の違いがみられた五つのリン脂質を抽出した。これらのリン脂質のイオン強度について、全てのサンプルで統計学的に比較を行ったところ、 m/z 782.5 のイオン強度は NPC と比較して MM 細胞で有意に低かった。Dried droplet 法による定量的測定でも、 m/z 782.5 の濃度は NPC で 11.7 $\mu\text{g/ml}$ であったのに対し、MM 細胞では 3.02 $\mu\text{g/ml}$ と低かった。MALDI-MS/MS 測定により、 m/z 782.5 は $[\text{PC}(16:0/20:4)+\text{H}]^+$ であると同定した。

[考察]

本研究で、我々は MALDI-IMS により MM 細胞および NPC の単一細胞での脂質を測定することに初めて成功した。単一細胞 MALDI-IMS は、液体クロマトグラフィー質量分析法のように脂質抽出や大量の細胞は必要なく、また、マーカー等によるラベルも必要ないことが利点であり、臨床検体における脂質プロファイリングや稀な標的集団の測定に有用である。IMS でこのような小さな対象の測定を可能としたのは、1) IMS と同時に顕微鏡を使用することやレーザー収束による空間分解能の改善、2) MALDI-IMS におけるリン脂質検出感度向上のために DHAP をマトリクスとして用いること、3) 細胞固定法などの検体前処理法開発、といった方法論の改善による。

我々は、MM 細胞で NPC と比較して PC(16:0/20:4)が有意に減少していることを発見した。これまで PC(16:0/20:4)とがんとの直接的な関連を示す研究は報告されていない。Guo らは、6 種類の固形がんにおいて、非がん部と比較してがん部で、 $\text{C}_{20:4}$ などの多価不飽和脂肪酸を含む PC が減少していたと報告している。我々は、飛行時間型二次イオン質量分析法により、NPC と比較して MM 細胞で $\text{C}_{16:0}$ が減少していることを既に報告している。これらから、MM 細胞における PC(16:0/20:4)の減少は、それを構成する脂肪酸である $\text{C}_{20:4}$ 、 $\text{C}_{16:0}$ の減少によると考えられる。

$\text{C}_{16:0}$ の減少に関しては、MM 細胞の脂質代謝における長鎖脂肪酸伸長酵素 Elovl6 の関与が考えられ、MM で Elovl6 の過剰発現が mRNA レベルで報告されている。脂質代謝酵素の阻害剤が新たな治療薬として注目されており、我々の新しい脂質解析法が、がんの脂質代謝関連薬剤の開発に貢献できると考えられる。また、MM 細胞の脂質プロファイルデータは、脂質関連治療が有効な患者を選択する一助となり得る。

また、単一細胞 MALDI-IMS は、ほかの血液悪性腫瘍のほか、循環腫瘍細胞やがん幹細胞などの稀な細胞集団の研究にも応用でき、それらの細胞の生物学や脂質代謝についての知見や、疾患の進展機序の理解を深めることに貢献できる。

[結論]

我々は、数十 μm の大きさの MM 細胞、NPC について単一細胞 MALDI-IMS 測定

を行った。MM 細胞の脂質プロファイルを明らかとし、NPC と比較して PC (16:0/20:4) が有意に減少していることを発見した。本研究は、MM 細胞における将来の研究や、脂質代謝に関連した新規薬剤の開発に貢献できると考えられる。