



Accumulation of arachidonic acid-containing phosphatidylinositol at the outer edge of colorectal cancer

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2016-11-01 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 平出, 貴乗 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/3044

博士(医学) 平出 貴乗

論文題目

Accumulation of arachidonic acid-containing phosphatidylinositol at the outer edge of colorectal cancer

(大腸がん辺縁にはアラキドン酸含有ホスファチジルイノシトールが集積する)

論文の内容の要旨

[はじめに]

3次元培養系は生体内環境を模倣することができる。特に2011年に井上らが報告したヒト大腸がん組織から細胞スフェロイドを作成する初代培養 Cancer Tissue-Originated Spheroid (CTOS) 法は、がん細胞株由来スフェロイド (multicellular tumor spheroid: MCTS) と比べて、KRAS をはじめとしたがん遺伝子発現パターン保持などの点において生体内での状況を近似している。しかし、CTOS, MCTS の生理解剖学的な比較解析の報告は未だ少ない。本研究は、質量顕微鏡法の空間分解能向上によって細胞1個レベルまで生体分子分布の解析が可能となったことを利用し、微小細胞凝集構造であるCTOS、MCTS 内部における生体分子(主に脂質)分布を解析しCTOS 特異的な分布を示す分子を解明するとともに、大腸がん臨床検体における整合性およびその意義を調べることを目的とした。

[方法]

浜松医科大学医学部附属病院で施行された大腸がん手術検体20例の大腸がん原発巣から作成したCTOS および大腸がん細胞株(HCT116, DLD-1)からクラレ社製3次元細胞培養プレート Elplasia[®]を用いて作成したMCTS を質量顕微鏡法によって解析した。試料は-80度に急速凍結後、クライオスタットを用いて10 μm に薄切。同大腸がん手術検体20例を-80度に急速凍結後、4 μm に薄切した。マトリクスとして2',5',-Dihydroxyacetophenone (DHAP) を蒸着法により塗布したのち、質量顕微鏡(iMScope prototype, 島津製作所)を用いて陽イオン、陰イオンモードで測定した。また、Laser Capture Microdissection 法を用いてCTOS 切片の辺縁と中心部を別々に採取し、Bligh & Dyer 法により脂質抽出をおこなった後、液体クロマトグラム質量分析(LC-MS)を用いて、質量顕微鏡で得られた結果の検証も行った。本研究は浜松医科大学倫理委員会承認のもと行った【第23-57号】。

[結果]

CTOS, MCTS を質量顕微鏡により解析した結果、様々なリン脂質が同定された。同定されたリン脂質の大部分は切片内に一様に集積を認めていたが、陰イオンモード解析において m/z 885.5 の分子のみCTOS の辺縁部に集中していることを確認した。一方、MCTS では特異的な集積は認めなかった。MS/MS 解析の結果、 m/z 885.5 の分子は脂肪酸としてステアリン酸、アラキドン酸を持つホスファチジルイノシトール Phosphatidylinositol(18:0/20:4) (PI(18:0/20:4)) であることが判明した。

LC-MS の結果、CTOS 辺縁部には中心部と比較し約 2.5 倍の濃度で PI(18:0/20:4) が集積していることが確認された。また、MCTS では辺縁部と中心部における差は認めなかった。以上の結果から、CTOS 辺縁部にのみ PI(18:0/20:4) が優位に増加していることが判明した。

大腸がん組織検体を質量顕微鏡の最大分解能 (scan pitch: 5 μm) で解析した結果、がん間質およびがん間質と接するがん包巣の辺縁から 50 μm 内側まで PI(18:0/20:4) の集積を認めた。

[考察]

近年、脂質解析技術の進歩に伴い、リン脂質内の脂肪酸組成の変化、脂肪酸代謝酵素が、がんの増殖、浸潤、転移などに関与していることが明らかになり、がん研究における脂質の関与は非常に注目されている。

今回我々はヒト大腸がん組織から作成した CTOS、大腸がん検体を質量顕微鏡を用いて詳細に解析した結果、がん辺縁に PI(18:0/20:4) が優位に集積していることを解明した。PI は細胞膜を構成する全脂質の 10%未満と微量な脂質である。しかし、その大部分は PI(18:0/20:4) であり、PI(18:0/20:4) はホスホイノシタイド (PIP, PIP2, PIP3) へ変換される基質であり、細胞内シグナルの重要な鍵分子ある。また、炎症やがん化、代謝性疾患への関与も報告されており生体において重要な脂質の 1 つである。

CTOS および組織検体におけるがん部辺縁は細胞増殖が盛んであることは知られている。また、PI3K-Akt 阻害剤 (LY294002) を培養液に添加することで、CTOS の増殖は抑制され、CTOS 辺縁における PI(18:0/20:4) の集積の減弱を確認した。以上の結果から PI(18:0/20:4) が CTOS やがん細胞の維持や増殖、浸潤などに関与している可能性が考慮された。

[結論]

空間分解能の向上した質量顕微鏡法により、がん細胞集団などの超微小構造物に特異的分布を示すリン脂質の同定が可能になり、3 次元培養 CTOS および大腸がん組織検体のがん包巣辺縁に PI(18:0/20:4) が高濃度に集積していることが判明した。PI(18:0/20:4) ががんの増殖などに関与している可能性が示唆されるとともに、今後リン脂質の機能解析がさらに進むことで、新たながん治療への発展が期待できる。