



質量分析イメージングによるヒト乳がん組織内脂質の可視化

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2022-12-02 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 荒巻, 修平, 華表, 友暁, 瀬藤, 光利 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/00004225

質量分析イメージングによるヒト乳がん組織内脂質の可視化

浜松医科大学細胞分子解剖学講座

荒牧 修平

同 細胞分子解剖学講座 准教授

同 国際マスイメージングセンター

華表 友暁

同 細胞分子解剖学講座 教授

同 国際マスイメージングセンター センター長

瀬藤 光利

はじめに

本企画のテーマでもある脂質の可視化は、近年、脂質分子の生体機能への役割が明らかにされるにつれて重要性を増してきている。脂質可視化の方法は多岐にわたるが、今回われわれが提示した画像は、質量分析イメージング (imaging mass spectrometry ; IMS) という手法によって得られたものである。IMSは、位置情報を保持したまま観察対象をイオン化し、質量分析 (mass spectrometry ; MS) を行う画期的な手法である¹⁾。従来の標識化が必要である手法と比較して、MSは標識化の必要なしに、わずかな構造の違いしかない多種多様な脂質の解析が可能である。また、それに加えて、IMSでは生体組織における脂質の分布像も取得でき、脂質の生体内での役割を解き明かす上で重要な情報を多く得ることができる²⁾。IMSの詳しい解説はThe Lipid 2019年10月号にあるので文献2を参照していただきたい。本項では、IMSによる乳がん組織内の脂質の可視化についてわれわれが行った2つの研究を中心に解説したい。

▶▶ 乳がん和脂質

細胞膜の主な構成要素であるホスファチジルコリン

(phosphatidylcholine ; PC) は、細胞増殖や細胞運動、浸潤、分化において重要な役割を果たすセカンドメッセンジャーの産生に、基質として寄与する³⁾。脂質代謝の変化は、乳がんを含むさまざまながん種で報告されており、がんの特性において脂質代謝が重要な役割を担っていると考えられている⁴⁾。また、過去の研究から、乳がん和乳腺上皮細胞におけるPCの脂肪酸 (fatty acid ; FA) 組成は異なり、この脂肪酸組成の違いが乳がん細胞の遠隔転移能力に関与している可能性が示唆されている⁵⁾。そこで、当研究室では、IMSを用いて2つの解析を行った。1つ目は、乳がん組織におけるPCとリゾホスファチジルコリン (lysophosphatidylcholines ; LPC) の分布の可視化、並びにがん組織の脂質合成酵素についての解析である (図1~3)⁶⁾。2つ目は、トリプルネガティブ乳がん (triple-negative breast cancer ; TNBC) の再発予測因子を同定することを目的とした乳がん組織内のPCの脂肪酸組成の解析である (図4)⁷⁾。TNBCとはエストロゲン受容体とプロゲステロン受容体、ヒト上皮増殖因子受容体2が3つとも発現していない乳がんを指し、転移をきたしやすく生存率の低いことが知られている。一般的に受容体が治療ターゲットとなりうるため、受容体が発現していないTNBCでは、治療の選択肢が狭まる。そのうえ、TNBCでは、再発予測因子が明らかに

なっていないため、術後治療選択に課題が残されている。この課題の解決を目指し、乳がんにおける再発予測因子になりうる脂質の同定を試みた。

IMSによるヒト乳がん組織内脂質の可視化

乳がん組織標本におけるPCの可視化

図1は、マトリックス支援レーザー脱離イオン化法(matrix assisted laser desorption/ionization; MALDI)-IMSによって得られた像とヘマトキシリン・エオジン(hematoxylin and eosin; HE)染色像を示している。病理診断によって、がんと診断された領域をがん領域、その周辺の間質が存在する(がんではない)領域を間質領域と定義した(図1-A)。がん領域にPC(32:1)+Kが多く発現し(図1-B)、間質領域にPC(36:0)+Kが多く発現していることがわかる(図1-C)。がん領域(図

1-D)と間質領域(図1-E)で得られたマスペクトルで確認してみると、 m/z 828.5 [PC(36:0)+K]シグナルは、がん領域と間質領域の両方で低い結果となったのに対して、 m/z 770.5 [PC(32:1)+K]シグナルは、間質領域よりもがん領域において強く検出されているのがわかる。

がん領域と間質領域におけるMUFA-PCs/SFA-PCs比の比較

図2は、がん領域と間質領域における一価不飽和脂肪酸(mono-unsaturated fatty acids; MUFAs)-PCs/飽和脂肪酸(saturated fatty acids; SFAs)-PCs比を比較した結果である。HE染色像の赤点線内はがん領域を示す(図2-A)。分子イオンのヒートマップ(図2-B~2-G)は、がん領域と間質領域におけるシグナル強度比較の結果を示す。がん領域においてPC(32:1)+KとPC(34:1)+K, PC(34:0)+K, PC(36:1)+Kの高

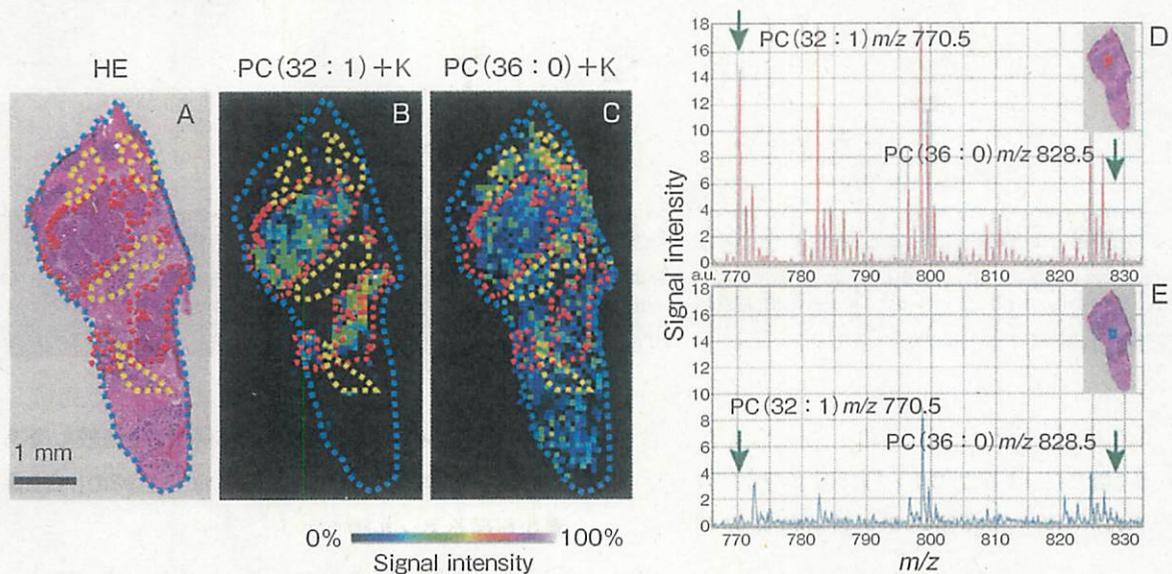


図1 乳がん組織標本におけるホスファチジルコリンの可視化

A: HE染色像を示す。赤点線内はがん領域、黄点線内は間質領域を示す。B: MALDI-IMSによるPC(32:1)+Kの分布を示す。C: MALDI-IMSによるPC(36:0)+Kの分布を示す。D: HE染色内の赤枠はがん領域を示す。スペクトルは赤枠内の解析結果を示す。E: HE染色内の青枠はがん領域を示す。スペクトルは赤枠内の解析結果を示す。

(文献5より引用)

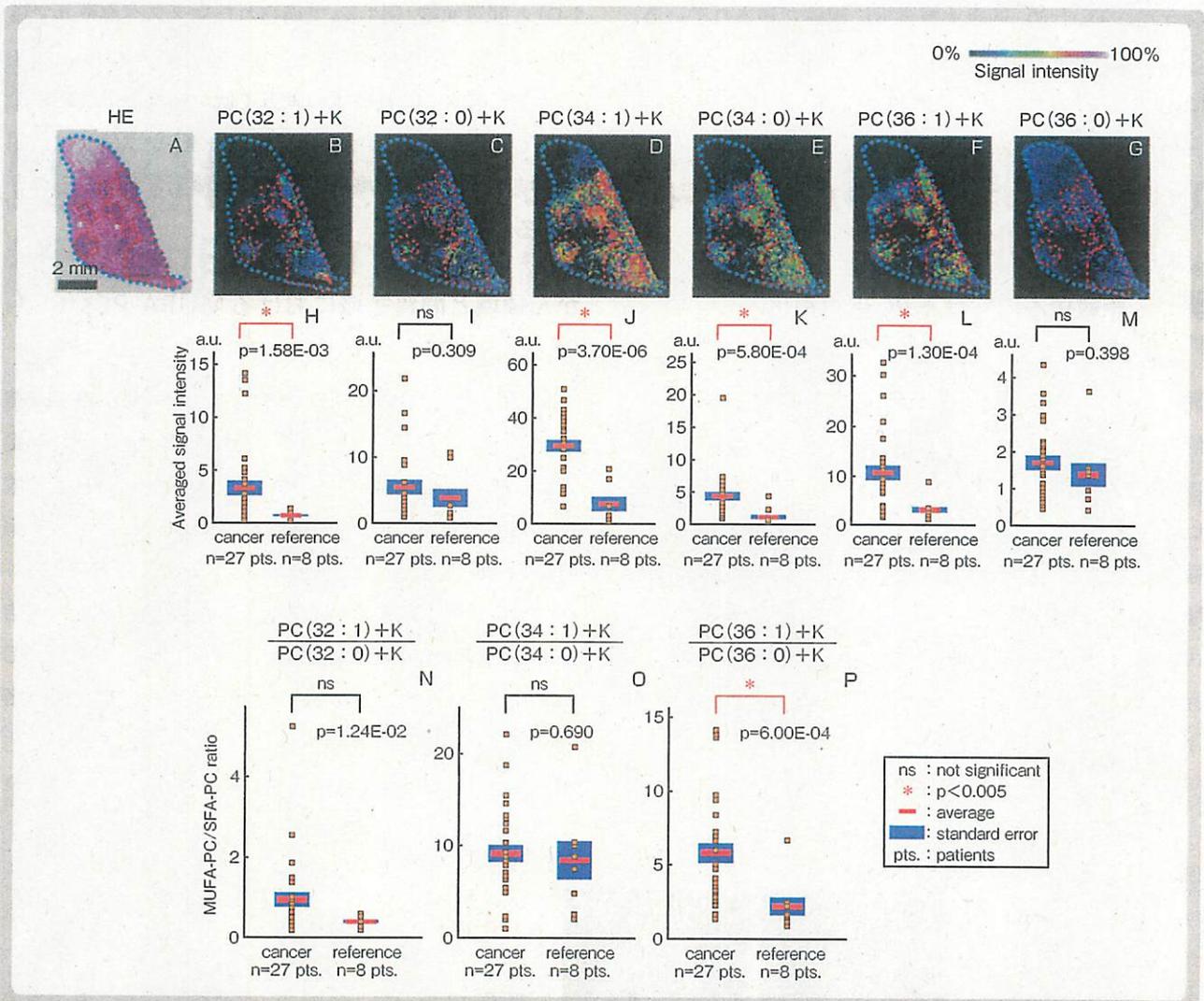


図2 がん領域と対照領域における MUFA-PCs/SFA-PCs 比の比較

A: HE 染色像を示す。赤点線内はがん領域を示す。B~G: MALDI-IMS による乳がん組織内 PC の可視化。H~M: B~G に対応した各 PC のがん領域 (cancer) と 間質領域 (reference) におけるシグナル強度。N~P: MUFA-PCs/SFA-PCs 比。

(文献より引用)

集積を認めた (図 2-H~I)。PC (32 : 1) + K / PC (32 : 0) + K 比 (図 2-N) と PC (34 : 1) + K / PC (34 : 0) + K 比 (図 2-O) では、比較領域間で統計的差異を認めなかった。一方で、PC (36 : 1) + K / PC (36 : 0) + K 比の解析から、対照領域に比べてがん領域で有意な上昇を認めた (図 2-P ; $p = 6.00E-04$)。MALDI-IMS を用いた以上の解析から、がん領域において、36 個の炭素からなるアシル鎖を有する MUFA-PCs は、同じ 36 個の炭素

からなるアシル鎖を有する SFA-PCs と比較して有意な上昇を認め、統計的な有意差はないものの、32 個の炭素からなるアシル鎖を有する MUFA-PCs と SFA-PCs についても同様の傾向がみられた。

がん領域と対照領域における MUFAs-PC/LPC 比の比較

過去の研究から、SFAs から MUFAs を合成するステ

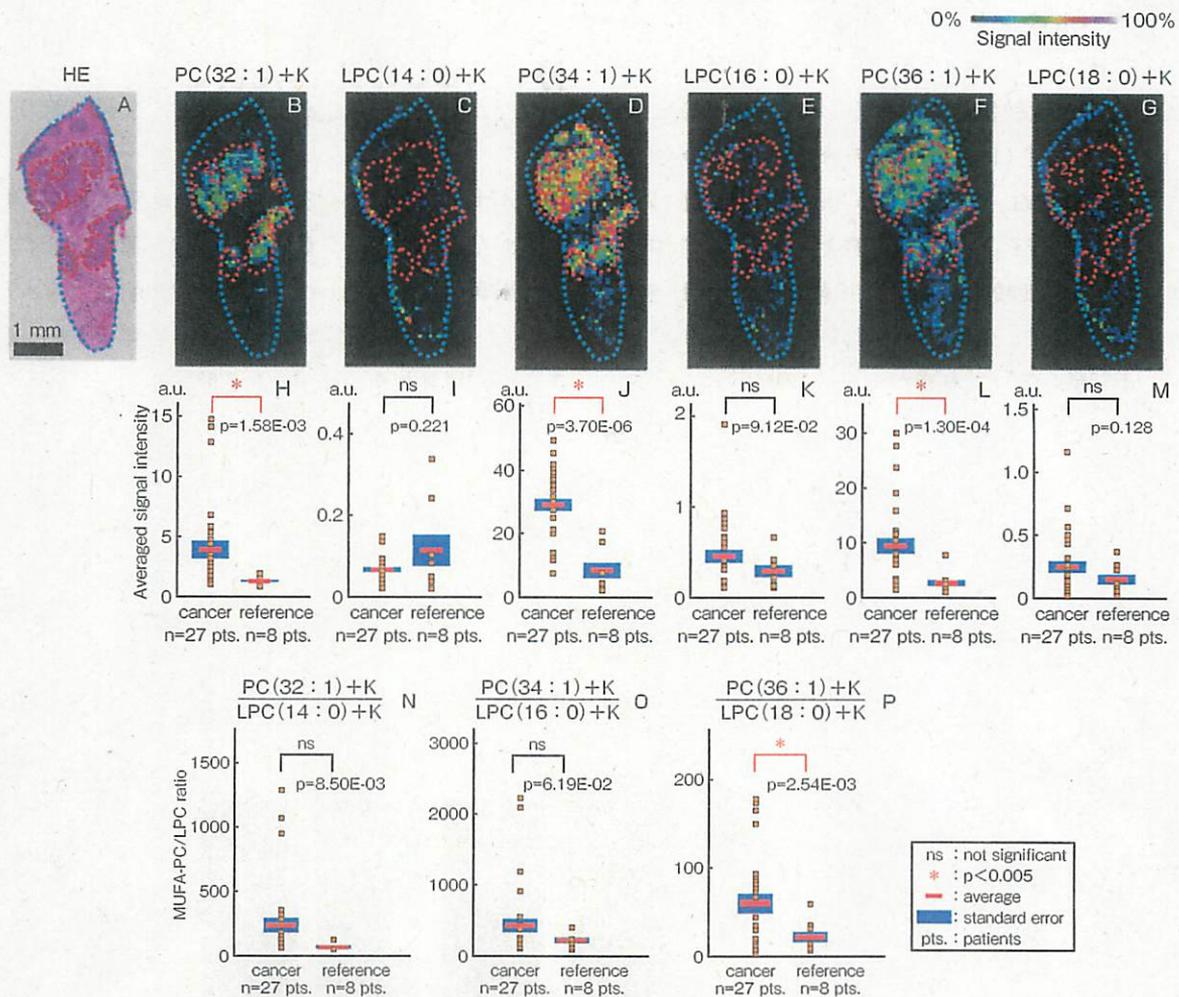


図3 がん領域と対照領域におけるMUFAs-PCs/LPCs比の比較

A: HE染色像を示す。赤点線内はがん領域を示す。B~G: MALDI-IMSによる乳がん組織内PCとLPCの可視化。H~M: B~Gに対応した各PC, LPCのがん領域(cancer)と間質領域(reference)におけるシグナル強度。(N-P) PCs/LPCs比。

(文献5より引用)

アロイル-CoA不飽和化酵素1 (stearoyl-CoA desaturase ; SCD1) の発現量とがん細胞増殖の間での相関が知られているため⁸⁾, われわれは, がん領域におけるSCD1の発現量を調べた。免疫染色法により間質領域よりもがん領域にSCD1が多く発現しており, 図2のMALDI-IMS解析結果とあわせると, 36個の炭素を含むアシル基を有するMUFA-PCs/SFA-PCs比とSCD1との間で発現量の相関が得られた。また, MUFA-PCsは, リ

ゾホスファチジルコリンアシルトランスフェラーゼ (lysophosphatidylcholine acyltransferases ; LPCATs) によってMUFAsとLPCsから合成されることが知られている。これらより, がん領域におけるMUFA-PCsの増加が, LPCs存在量とも関連があるかを検証するためにがん領域と間質領域でのLPCsの分布の比較を行った(図3)。HE染色像の赤点線内をがん領域, その周囲を間質領域と定義する(図3-A)。結果は, 間質領域と比較し

てがん領域では、PC (32 : 1) + KとPC (34 : 1) + K, PC (36 : 1) + Kのシグナルが強く検出されたが(図3-B, D, F, H, J, L; $p = 1.58E-03$, $p = 3.70E-06$, $p = 1.03E-04$), 比較領域間でLPC (14 : 0) + KとLPC (16 : 0) + K, LPC (18 : 0) + Kの分布に差はみられなかった(図3-C, E, G, I, K, M; $p = 0.221$, $p = 9.12E-02$, $p = 0.128$)。そこでPCの合成と代謝のバランスを評価するために、比較領域間でMUFAs-PC/LPC比を比較したところ、PC (36 : 1) + K/LPC (18 : 0) + K比(図3-P)は、がん領域で有意な上昇を認め($p = 2.54E-03$), PC (32 : 1) + K/LPC (14 : 0) + K比とPC (34 : 1) + K/LPC (16 : 0) + K比も、対照領域に比べてがん領域で上昇がみられた(図3-N, O; $p = 8.50E-03$, $p = 6.19E-02$)。以上のMALDI-IMSの解析結果から、がん領域におけるMUFAs-PCsの増加はLPC存在量とも関連

があることが示唆された。

▶ TNBCの非再発群と再発群におけるイオン分布

図4は、TNBCをIMSで解析した結果である。黒点線内のがん領域を示し、黄点線内が間質領域を示す。再発群と非再発群のがん領域を比較した場合、 m/z 734.5と m/z 706.5のシグナル強度は再発群で高かった。また、がん領域とその周囲にある間質領域とを比較した場合、 m/z 734.5のシグナル強度は再発群、非再発群共に間質領域で高かった。MS/MSの結果と過去の報告から各PCの脂肪酸組成を検討した結果、 m/z 732.5, 706.5, 806.5, 734.5のイオンは、それぞれ、プロトン化されたPC (32 : 1), PC (30 : 0), PC (38 : 6),

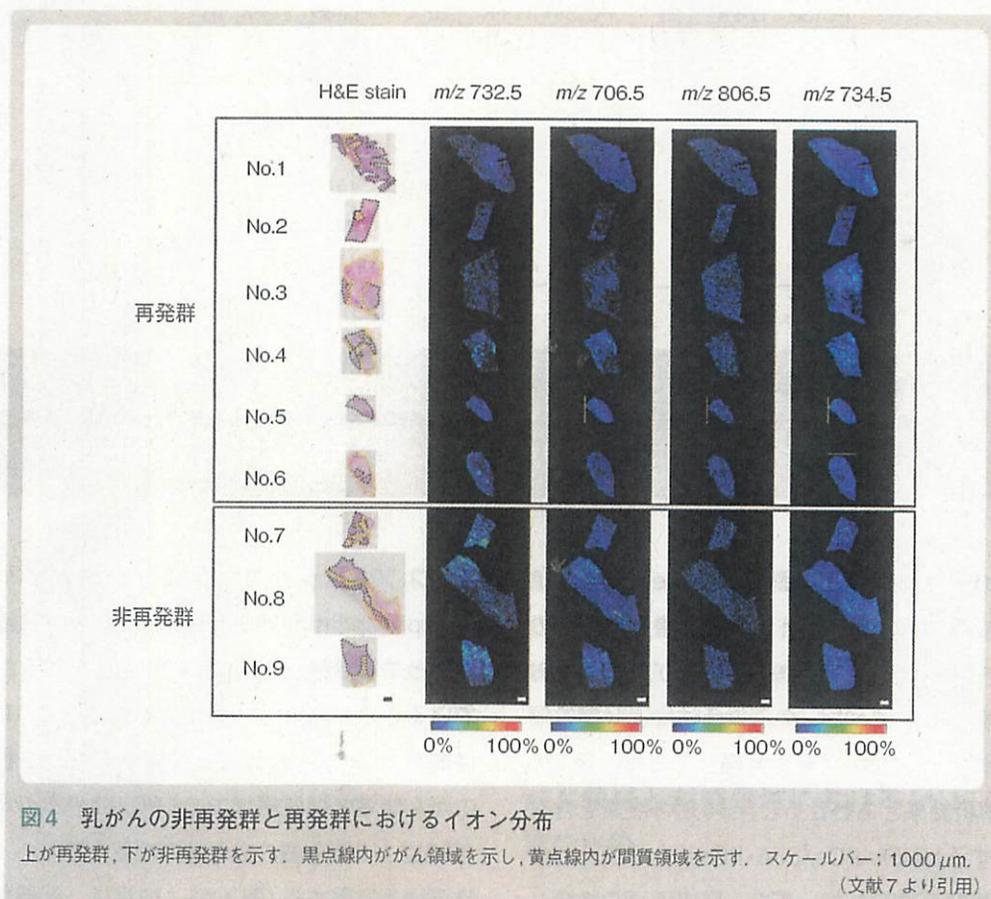


図4 乳がんの非再発群と再発群におけるイオン分布

上が再発群、下が非再発群を示す。黒点線内のがん領域を示し、黄点線内が間質領域を示す。スケールバー：1000 μ m。
(文献7より引用)

PC (32 : 0) と同定された。これらのMALDI-IMSの結果から、再発したトリプルネガティブ乳がん組織では、非再発群よりもPC (32 : 1) の発現量が間質領域よりも多く、同時に再発予測因子の候補となる可能性が示された。

● おわりに

乳がんの手術検体を用いたMALDI-IMSによる脂質の可視化について解説したが、がん領域と間質領域が混在する手術検体のような場合に、とても有効な解析手法であることがわかっていただけたら幸いである。実際に、日本脂質生化学会では「LipidBank」という生理活性脂質データベースを公開し、質量分析イメージングのデータ

も拡大中であり (<http://lipidbank.jp/>)、データの蓄積に伴いその解析も重要性が増している。われわれの国際マスイメージングセンターの質量分析イメージング装置は、文部科学省先端研究基盤共用促進事業である「原子・分子の顕微イメージングプラットフォーム」を通じて利用申請可能である (<http://www.imaging-pf.jp/>)。また、浜松医科大学発ベンチャー「株式会社プレッパーズ」を発足し、質量分析イメージングの受託サービスも開始した (<http://www.preppers.business/>)。本項を読んで質量分析イメージングに少しでも興味をもった方がいれば、ヒト検体に限らず、これらにアプローチしていただけると幸いである。

● 文 献

- 1) 瀬藤光利(編). 質量顕微鏡法. 東京:丸善出版株式会社: 2012.
- 2) 菊島健児, 瀬藤光利. リボクオリティの可視化. *The Lipid*. 2019; 136: 67-74.
- 3) Abalsamo L, Spadaro F, Bozzuto G, et al. Inhibition of phosphatidylcholine-specific phospholipase C results in loss of mesenchymal traits in metastatic breast cancer cells. *Breast Cancer Res*. 2012; 14: R50.
- 4) Baumann J, Sevinsky C, Conklin DS. Lipid biology of breast cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2013; 1831: 1509-17.
- 5) He M, Guo S, Li Z. In situ characterizing membrane lipid phenotype of breast cancer cells using mass spectrometry profiling. *Sci Rep*. 2015; 5: 11298.
- 6) Ide Y, Waki M, Hayasaka T, et al. Human breast cancer tissues contain abundant phosphatidylcholine (36 : 1) with high stearoyl-CoA desaturase-1 expression. *PLoS One*. 2013; 8: e61204.
- 7) Hosokawa Y, Masaki N, Takei S, et al. Recurrent triple-negative breast cancer (TNBC) tissues contain a higher amount of phosphatidylcholine (32 : 1) than non-recurrent TNBC tissues. *PLoS One*. 2017; 12: e0183724.
- 8) Angelucci C, D'Alessio A, Iacopino F, et al. Pivotal role of human stearoyl-CoA desaturases (SCD1 and 5) in breast cancer progression: oleic acid-based effect of SCD1 on cell migration and a novel pro-cell survival role for SCD5. *Oncotarget*. 2018; 9: 24364-24380.