

博士論文

論文題目 大腸癌の進展に及ぼす
ホスファチジルセリン特異的ホスホリパーゼ A1 および
リゾホスファチジルセリンの影響についての検討

氏名 飯田祐基

目次

・ 要旨	2
・ 背景と目的	3
大腸癌組織における PS-PLA ₁ の発現に関する検討	
・ 実験方法	8
・ 実験結果	11
LysoPS の大腸癌細胞株に及ぼす影響の検討	
・ 実験方法	19
・ 実験結果	27
・ 考察	40
・ まとめ	50
・ 謝辞	51
・ 引用文献	52

要旨

本研究では、ホスファチジルセリン特異的ホスホリパーゼ A1 (PS-PLA₁) (リン脂質分解酵素) およびリゾホスファチジルセリン (lysoPS) (産生されるリゾリン脂質) が大腸癌の発育・進展に及ぼす影響について検討した。その結果、PS-PLA₁ 発現は大腸癌の深達度及び血行性転移の有無と相関し、一方、lysoPS は、GPR34 (lysoPS 受容体) および PI3K/Akt 経路を介した大腸癌細胞株の遊走能促進作用を有した。以上より、PS-PLA₁ 及びその産生物質である lysoPS は、大腸癌の発育・進展に重要な役割を果たすと考えた。

背景と目的

悪性新生物は、本邦における死因の第一位であり、特に大腸癌は本邦においても増加傾向をたどっており、罹患率・死亡率の高い疾患である(1)。大腸癌の治療としては、根治的な外科的切除が第一選択であるが、遠隔転移による根治的切除不能症例や局所再発などを伴う進行大腸癌症例に対しては、化学療法・放射線療法を含めた集学的治療が行われている(2)。化学療法については分子標的薬を含めた新規薬剤が導入されつつあるものの、切除不能な進行再発大腸癌の生存期間中央値は約 24 ヶ月と短く(3-5)、現状では十分な治療成績が得られているとは言い難い。大腸癌の発育・進展に対する新たな知見が得られ、それを治療のターゲットとすることができれば、大腸癌患者の予後改善に大きく寄与できるものと考えられる。

近年、細胞の脂質二重膜を構成する主要な成分であるリン脂質が細胞内外におけるシグナル伝達に重要な役割を担っていることが明らかにされている。リン脂質およびこれを分解する酵素であるホスホリパーゼ、さらにこれにより産生されるリゾリン脂質が様々な生理活性を発揮し、癌の発育や進展にも関与していることが報告されるようになった (図 1)。

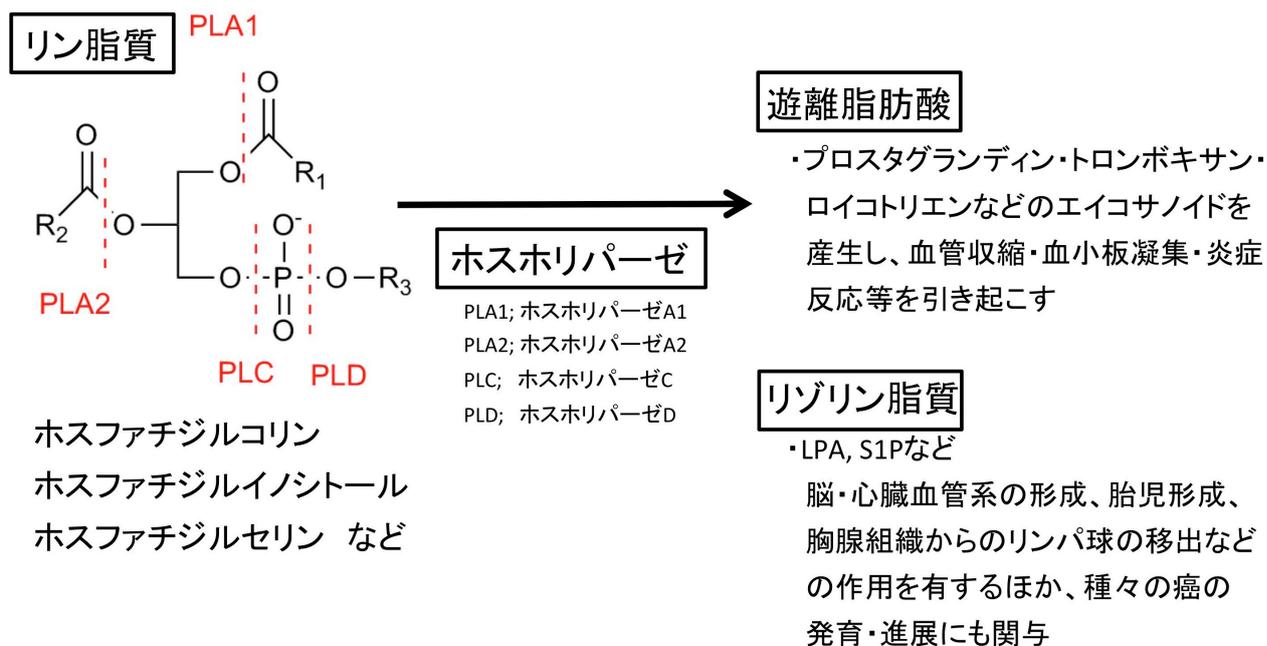


図1 ホスホリパーゼの作用と、分解産物の生理活性

リン脂質は、グリセリンを骨格とするグリセロリン脂質と、スフィンゴシンを骨格とするスフィンゴリン脂質に大別される(6)。代表的なリン脂質として、真核細胞の細胞膜を構成する主成分でアセチルコリン生合成におけるコリンの供給源となるホスファチジルコリン (別名レシチン)(7)、細胞内シグナル伝達経路の一つであるPI3K/Akt 経路において、PI3 キナーゼの基質となりこの経路の活性化に関与するホスファチジルイノシトール(8)、細胞の脂質二重膜の細胞質側に局在しており、アポトーシス等で細胞表面に露出するホスファチジルセリン (以後 PS と記載) などが上

げられる (9, 10)。これらリン脂質を分解する酵素がホスホリパーゼであり、特にホスホリパーゼ A2 については以前より多くの研究が進められており、多くの報告が存在する。分泌型ホスホリパーゼ A2、細胞質型ホスホリパーゼ A2 を初めとした多くの種類の酵素が存在するが(11)、近年、ホスホリパーゼ A2 が、大腸癌・前立腺癌・肺癌・膵癌などの発育・進展に関与することが明らかとなった(12-15)。また、ホスホリパーゼ A2 により産生される遊離脂肪酸からプロスタグランジン・トロンボキサン・ロイコトリエンなどのエイコサノイドが産生され、これらが血管収縮・血小板凝集・炎症反応などの反応を引き起こす (アラキドン酸カスケード) ことが知られている(16)。また、代表的なリゾリン脂質としてリゾホスファチジン酸 (lysophosphatidic acid、LPA)、スフィンゴシン-1-リン酸 (sphingosine-1-phosphate、S1P) などがあるが、これらのリゾリン脂質は脳・心臓血管系の形成、胎児形成、胸腺組織からのリンパ球の移出といった生理現象に関与するだけでなく、大腸癌・乳癌・卵巣癌などの発育・進展にも関与していることが明らかにされている(17-21)。これらのことから、ホスホリパーゼやリゾリン脂質が癌の発育・進展に強く関与しているものと考えられる。

リゾリン脂質の中でも、リゾホスファチジルセリン (lysophosphatidylserine、以後 lysoPS と記載)、そしてその産生に関与するホスホリパーゼであるホスファチジルセリン特異的ホスホリパーゼ A1 (Phosphatidylserine-Specific Phospholipase A1、以後

PS-PLA₁と記載) は、肥満細胞からのヒスタミン遊離を促進し、アレルギー反応に関与していることが明らかとなり、近年注目されている(22, 23) (図 2)。アレルギー反応の他、lysoPS は T 細胞の増殖抑制(24)、神経細胞の分化など(25)の生理活性を有すると報告されている。さらに、lysoPS がグリオーマ細胞・繊維芽細胞の細胞遊走能を促進するというものや(26, 27)、lysoPS の受容体の一つである GPR34 の発現が胃癌の浸潤に関与しているとの報告もあり(28)、lysoPS およびその産生酵素である PS-PLA₁ が癌の発育・進展に関与している可能性がある。

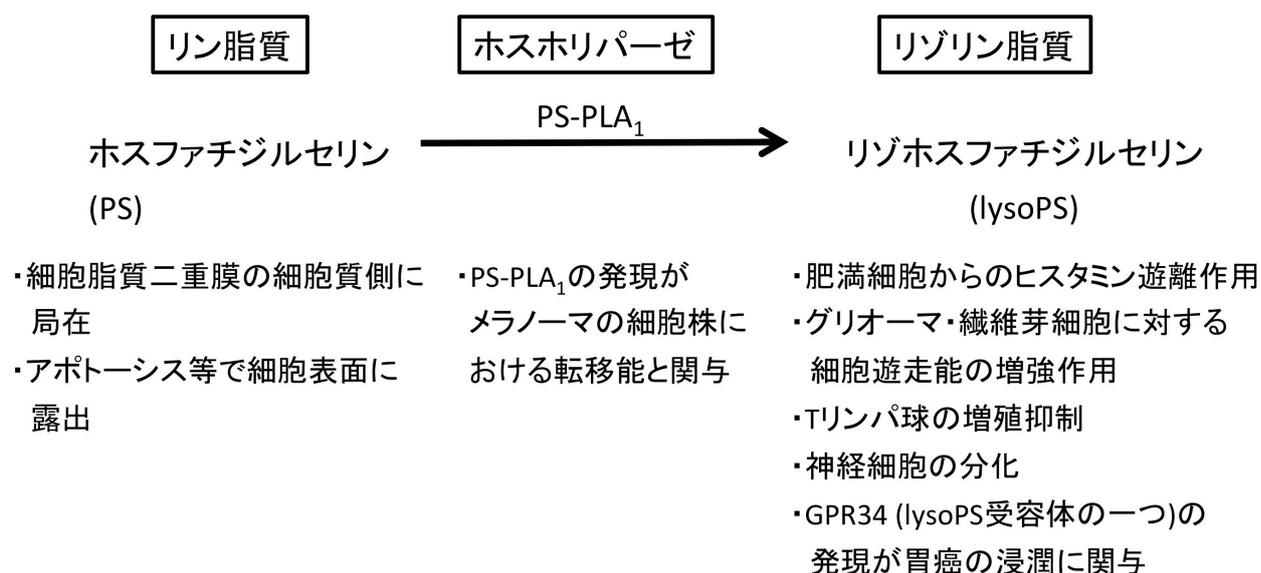


図 2 PS-PLA₁ と lysoPS の生理活性

多くのホスホリパーゼ・リゾリン脂質が腫瘍の発育・進展に影響を及ぼすことが確

認されているが、私は特に lysoPS がグリオーマ細胞・繊維芽細胞の遊走能に関与していたこと、および lysoPS 受容体発現が胃癌の浸潤能と相関していたことに注目し、PS-PLA₁ および lysoPS が大腸癌の発育・進展の過程に重要な役割を果たしている可能性があるかと推測した。この仮説を検証するために、抗 PS-PLA₁ 抗体を用いた大腸癌組織の免疫組織化学染色による検討、ならびに大腸癌細胞株を用いた lysoPS の in vitro の検討を行った。

【大腸癌組織における PS-PLA₁ の発現に関する検討】

実験方法

【症例】

2005 年 1 月から 12 月までに東京大学大腸肛門外科・血管外科にて手術を施行した大腸癌患者 85 例を対象とした。潰瘍性大腸炎合併症例、家族性大腸腺腫症症例、遺伝性非ポリポーシス性大腸癌症例、多発大腸癌症例、術前化学放射線療法施行例、緊急手術症例、術前内視鏡的切除症例は除外した。85 例のうち 75 例で根治的な外科切除術が施行された。摘出後、10% ホルマリンにて固定した後、パラフィン包埋された標本に対し免疫組織化学染色を行った。本研究は倫理委員会の承認をうけて施行した (審査番号 3252)。

【抗ヒト PS-PLA₁ モノクローナル抗体】

ラット抗ヒト PS-PLA₁ モノクローナル抗体 (6F8) は東北大学大学院薬学研究科機能解析薬学講座青木淳賢教授より供与して頂いた(29)。

【免疫組織化学染色】

免疫組織化学染色は酵素ポリマー法にて行った。

ホルマリン固定後パラフィン包埋された組織標本を 3 μ m の厚さに薄切し、スライドグラスにマウントした。キシレンおよびエチルアルコールにて、脱パラフィンおよび脱キシレン処理を行った。抗原賦活化のため、0.01M クエン酸緩衝液中にてマイクロウェーブ処理 (15 分) し、次いで内因性ペルオキシダーゼ不活化のため、1% H₂O₂ 入りメタノールにて室温 30 分間で処理した。更に一次抗体の非特異的結合をブロッキングするために rabbit serum にて室温 30 分間処理した。一次抗体として 150 倍に希釈した抗ヒト PS-PLA₁ 抗体 (6F8) を 4°C にて一昼夜反応させた後、ペルオキシダーゼと二次抗体を結合させた標識ポリマー (Nichirei Biosciences Inc., Tokyo, Japan) を室温にて 30 分反応させた。発色は DAB 溶液にて行った。ヘマトキシリンにて核染色を施行した後観察した。

【評価】

免疫染色により主に癌細胞の細胞質に染色を認めた。最深部を含む最大断面を顕微鏡下 (200 倍) で観察し、異なる 10 視野における染色強度を 4 段階 (Negative, Weak,

Moderate, Strong) に分類した。5 視野以上において Moderate 以上の強い発現を認めた症例を PS-PLA₁ 強発現例、5 視野未満であった症例を PS-PLA₁ 弱発現例と定義した。なお、上記の評価については、客観性が損なわれることを排する意味で、臨床病理学的因子に関する情報を伏せて実施した。免疫染色の判定は二名の異なる観察者が独立して評価を行った ($\kappa=0.69$)。

【統計学的処理】

2 群間の統計学的有意差の検定は、単変量解析では χ^2 検定、Fisher's exact test、non-paired *t* test を、多変量解析ではロジスティック回帰分析を用いた。無再発生存率は Kaplan-Meier method を用いて算出し、2 群間の差については、log-rank test、Cox の比例ハザードモデルを用いて検定を行った。P 値が 0.05 未満の場合を統計学的に有意であると判断した。

実験結果

【大腸癌組織での PS-PLA₁ の発現】

抗 PS-PLA₁ 抗体を用いて大腸癌組織を免疫染色した結果、PS-PLA₁ は主に癌細胞の細胞質に発現しており、強く染色されている細胞 (Strong, Moderate) と、弱くまたは染色されていない細胞 (Weak, Negative) が混在していた (図 3)。隣接する正常組織においては、PS-PLA₁ の発現は Weak もしくは Negative でありほとんど発現を認めなかった。異なる 10 視野において、5 視野以上で Moderate 以上の強い発現を認めた症例を PS-PLA₁ 強発現例、5 視野未満であった症例を PS-PLA₁ 弱発現例と判定したところ、PS-PLA₁ 強発現例は 42 例 (49.4%)、弱発現例は 43 例 (50.6%) であった。

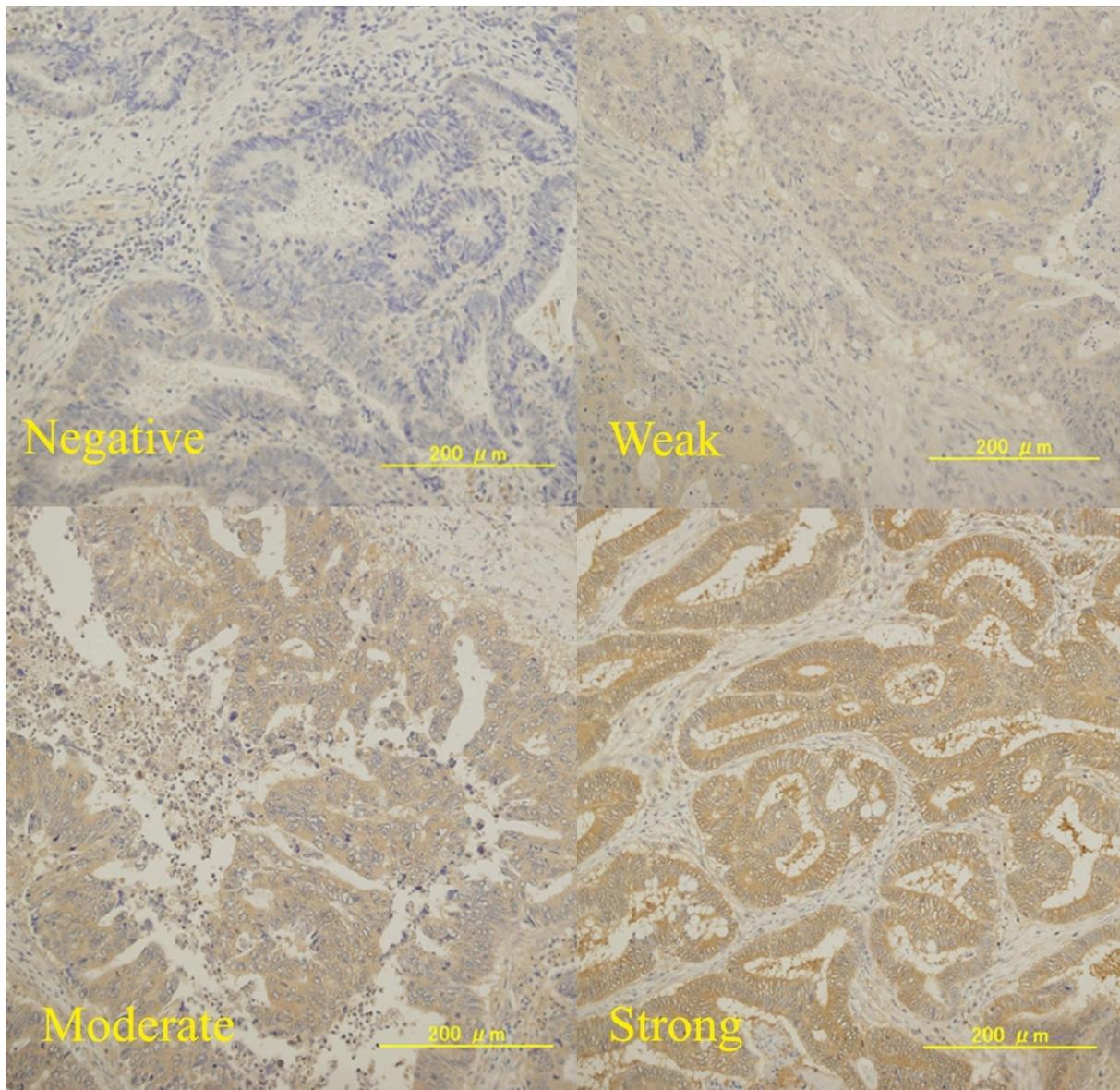


図3 大腸癌組織の抗 PS-PLA₁ 抗体による免疫染色像
PS-PLA₁ の発現は主に癌細胞の細胞質に認められた (Mayer
hematoxylin による counter-staining)。

PS-PLA₁の発現と臨床病理学的因子との相関について解析したところ、単変量解析では深達度、腫瘍径、血行性転移の有無との間に有意な相関を認め、性別、年齢、癌の占拠部位、組織型、リンパ管浸潤、脈管浸潤、リンパ節転移の有無との間には有意な相関を認めなかった(表1)。すなわち、PS-PLA₁強発現症例では、腫瘍径が大きく(P=0.0091)、深達度がより高度で(P=0.0040)、血行性転移を有する症例を多く認める(P=0.0082)という結果であった。

表 1 PS-PLA₁の発現と大腸癌の臨床病理学的因子との相関 (単変量)

		PS-PLA ₁ 強発現	PS-PLA ₁ 弱発現	p値
性別	男性	22	29	0.16
	女性	20	14	
平均年齢 (yrs) ± SD		63.4±10.2	66.3±11.7	0.22
部位	Colon	24	32	0.092
	Rectum	18	11	
組織型	Well/mod	41	38	0.20
	Muc/por	1	5	
深達度	T1-T2	6	18	0.0040
	T3-T4	36	25	
腫瘍径 (mm) ± SD		51.7±23.4	38.3±23.1	0.0091
ly	Negative	31	32	0.95
	Positive	11	11	
v	Negative	15	20	0.31
	Positive	27	23	
リンパ節転移	Negative	18	22	0.44
	Positive	24	21	
血行性転移	Negative	28	39	0.0067
	Positive	14	4	

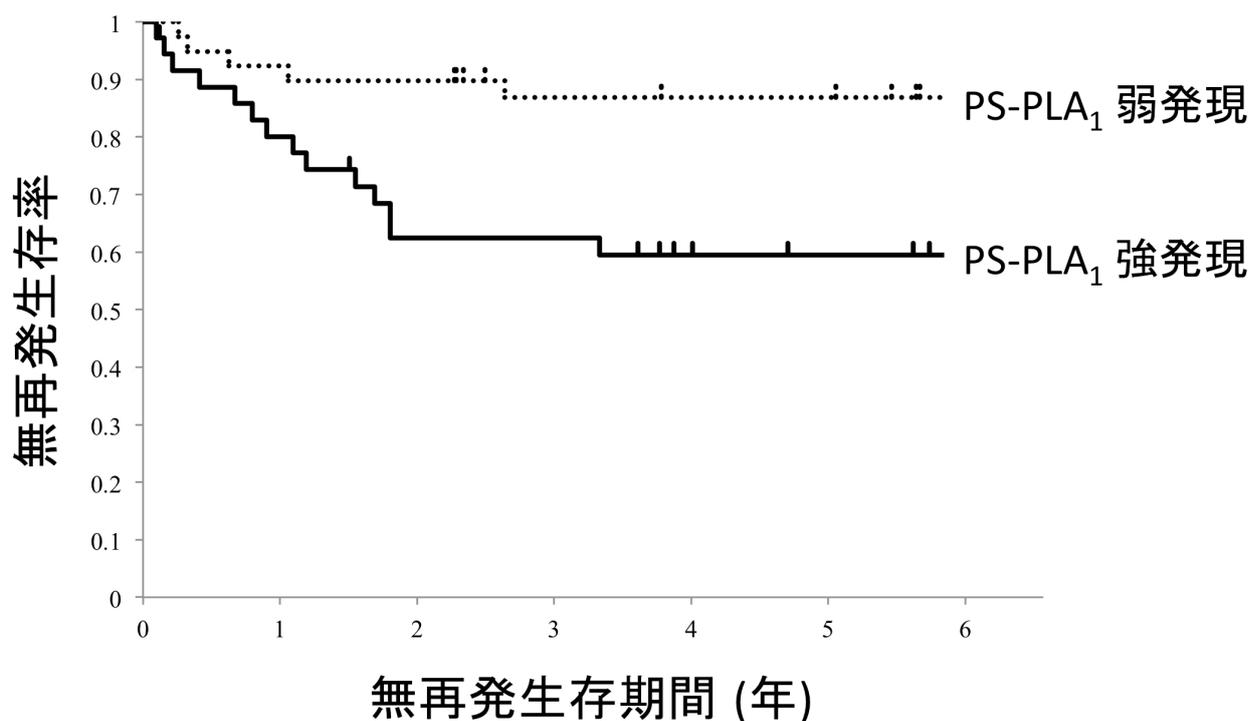
単変量解析にてPS-PLA₁の発現と相関を認めた上記3つの因子に対し多変量解析を行ったところ、深達度 (P=0.039) および血行性転移の有無 (P=0.040) がPS-PLA₁の発現と有意に相関していた (表 2)。PS-PLA₁強発現例では、深達度が高度な症例が多いこと、血行性転移を有する症例が多いことが明らかとなった。

表 2 PS-PLA1 の発現と大腸癌の臨床病理学的因子との相関 (多変量)

	オッズ比	p値
腫瘍径 (50mm以上 対 50mm未満)	1.16 (0.38-3.59)	0.79
深達度 (T3-4 対 T1-2)	3.64 (1.28-11.53)	0.039
血行性転移 (Positive 対 Negative)	4.00 (1.23-15.71)	0.040

【PS-PLA₁の発現と予後】

免疫組織化学染色を行った85例のうち、根治的切除を施行し得た75例に対し無再発生存期間を検討した。5年無再発生存率はPS-PLA₁強発現例で74.0%、弱発現例で86.9%となり、PS-PLA₁強発現症例は弱発現症例と比較し、有意に無再発生存期間が短く予後不良であった (P=0.0087、図4)。



Number at Risk	0	1	2	3	4	5	(年)
PS-PLA ₁ 強発現例	36	28	21	21	17	15	
PS-PLA ₁ 弱発現例	39	36	35	30	29	29	

図4 PS-PLA₁の発現と無再発生存期間

PS-PLA₁強発現群では低発現群に比較し、無再発生存率は有意に低かった (P<0.05)。

その他、深達度 (P=0.024)、脈管浸潤 (P=0.0046)、血行性転移の有無 (P<0.0001) が無再発生存期間と相関を示した。すなわち、PS-PLA₁ 強発現例、深達度がより高度である症例、脈管浸潤陽性例、血行性転移陽性例において予後不良例を多く認めた (表 3)。

表 3 大腸癌の臨床病理学的因子と無再発生存率との相関 (単変量)

	5年無再発生存率 (%)		p値
PS-PLA ₁ (強発現 対 弱発現)	74.0	86.9	0.0087
性別 (男性 対 女性)	72.1	77.1	0.58
部位 (Colon 対 Rectum)	79.3	63.6	0.084
組織型 (Muc/por 対 Well/mod)	100	72.5	0.26
深達度 (T3-4 対 T1-2)	65.6	91.7	0.024
腫瘍径 (50mm以上 対 50mm未満)	62.2	79.7	0.086
ly (Positive 対 Negative)	57.8	78.8	0.073
v (Positive 対 Negative)	60.1	90.9	0.0046
リンパ節転移 (Positive 対 Negative)	65.0	82.1	0.14
血行性転移 (Positive 対 Negative)	20.0	82.5	<0.0001

以上の4つの因子について、独立した予後不良のリスク因子をCoxの比例ハザードモデルを用いて検討したところ、血行性転移陽性のみが予後不良の独立したリスク因子であった(表4)。

表4 大腸癌の臨床病理学的因子と無再発生存率との相関(多変量)

	ハザード比 (95% 信頼区間)	p値
PS-PLA ₁ (強発現 対 弱発現)	1.89 (0.61-6.64)	0.27
深達度 (T3-4 対 T1-2)	2.60 (0.63-17.8)	0.20
v (Positive 対 Negative)	2.52 (0.71-11.8)	0.16
血行性転移 (Positive 対 Negative)	5.09 (1.75 - 15.2)	0.0033

【LysoPS の大腸癌細胞株に及ぼす影響の検討】

実験方法

【細胞株と培養方法】

ヒト大腸癌細胞株である Caco-2, SW480, HT-29, DLD-1, WiDr, LoVo を Japanese Cancer Research Resource Bank (JCRRB) より購入した。全ての細胞株を 5% 胎児ウシ血清 (Fetal calf serum, FCS) 添加 RPMI-1640 培養液 (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) に 1% 抗菌剤/抗真菌剤 (100U/ml penicillin G, 100 μ g/ml streptomycin sulfate, 250 ng/ml amphotericin B; Life Technologies, Grand Island, NY, USA) を加えた培地にて 37 $^{\circ}$ C にて培養し実験を行った。

【LysoPS】

L- α -lysophosphatidylserine (18:1、図 5、以後 lysoPS と記載) を Avanti Polar Lipid (Alabaster, AL, USA) より購入した。FCS 中には lysoPS を含めた脂質が含有されている可能性があるため、lysoPS による細胞遊走能・増殖能・接着能の変化を検討する際

には、Fatty acid free 胎児ウシアルブミン (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA, 以後 FA (-) BSA と記載) を用いて、0.1% FA (-) BSA 添加 RPMI-1640 培養液を作成し使用した。

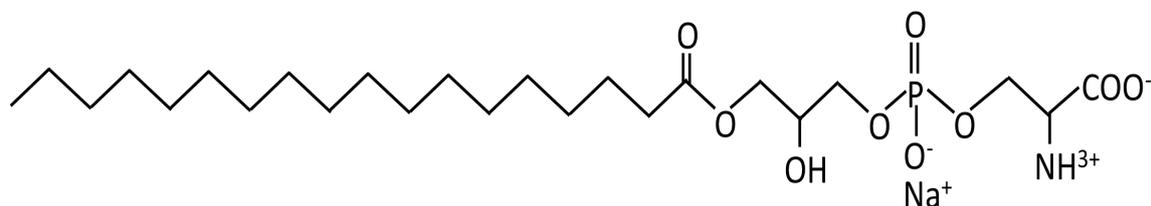


図5 L- α -lysophosphatidylserine

【大腸癌細胞株における lysoPS 受容体の発現の検討 - RT-PCR 法】

大腸癌細胞株 (Caco-2, SW480, HT-29, DLD-1, WiDr, LoVo) における lysoPS 受容体 (GPR34, P2Y10, GPR174) (30)の発現を RT-PCR 法にて検討した。5% FCS 添加 RPMI-1640 培養液を用いて大腸癌細胞株を Subconfluent の状態に培養し、培地を除去して PBS で2回洗浄した後、RNeasy Mini Kit (Qiagen, Austin, TX, USA) を用いて mRNA を抽出し、High Capacity RNA-to-cDNA kit (Applied Biosystems, Foster, CA, USA) による逆転写反応を行い、cDNA を合成した。合成した cDNA, GoTaq Green Master Mix (Promega, Fitchburg, WI, USA), プライマー (GPR34: forward, 5'-GGG ACT GGT TGG GAA CAT AA-3'; reverse, 5'-GAA AGG GAG GCA GAA GAT GA-3'、P2Y10: forward,

5'-GCA GGA TTT GTG ATC CCA GT-3'; reverse, 5'-CCT CTC ACT GAT CCC TTG GA-3', GPR174: forward, 5'-TTC CTT GCC ACT GAG GAT CT-3'; reverse, 5'-AAA ATC GTC GCA CAC TGA TG-3', GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, Operon, Huntsville, AL, USA)) を混合し、95°C 5分→(95°C 1分→55°C 1分→72°C 1分) x 40 サイクル→72°C 10分のサイクルで PCR を行った。増幅産物を 2% アガロースゲルにて電気泳動し、臭化ブロマイドを用いてゲル上の DNA を染色し評価した。

【細胞遊走能の検討 – Boyden Chamber Assay】

SW480 および LoVo を用い、lysoPS の細胞遊走能に及ぼす影響について Boyden chamber Assay を用いて評価した。直径 8 μ m の穴が開いているポリカーボネイトのフィルター (Neuro Probe, Gaithersberg, MD, USA) を Collagen type I でコーティングした後、96-well chamber (Neuro Probe) にセットし、SW480 もしくは LoVo をそれぞれ 5×10^5 cells/200 μ l/well ずつ上側チャンバーの各ウェルに分注した。LysoPS (0~50 μ M) に対する Chemotaxis、すなわち濃度勾配に対する方向性を持った細胞遊走能を評価する際には下側チャンバーのみに lysoPS を加え、lysoPS 刺激による Chemokinesis、すなわち方向性を持たない細胞遊走能の評価においては、上側・下側チャンバー双方に lysoPS を加え、37°C、5% CO₂ の環境で 6 時間培養を行った。その後、フィルターを

取り出し、99% メタノールで固定、Diff-Quick staining kit (Sysmex Co, Kobe, Japan) で染色し、吸光度リーダーを用いて 595nm 波長におけるフィルターの吸光度を測定した。百日咳毒素 (Pertussis toxin, PTX; Sigma, St Louis, MO, USA)、genistein (Sigma, St Louis, MO, USA)、wortmannin (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) を用いた実験においては、それぞれを assay の 4 時間前 (100ng/ml)、1 時間前 (200 μ M)、1 時間前 (400nM) に細胞にあらかじめ作用させた後に lysoPS を添加し、細胞遊走能を評価した。実験はすべて Triplicate (3 wells) で行い、遊走能はコントロール (lysoPS 0 μ M) に対する吸光度の比率として算出し、平均値および標準偏差をグラフとして提示した。

【細胞増殖能の検討 – MTS 法】

96-well flat-bottomed plate に 5×10^3 cells/well の SW480、または LoVo を加え、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ の環境で 24 時間培養した。その後 lysoPS (0.01~20 μ M) を添加し、72 時間培養後に細胞増殖能を MTS 法にて評価した。MTS 試験薬 (Promega, Madison, WI, USA) を 20 μ l/well 加え、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ の環境で 3 時間培養を行った後、Plate Reader (Immuno Mini NJ-2300, Biotec, Tokyo, Japan) にて 490 nm のフィルターを用いて吸光度 (OD 値) を測定した。実験はすべて Triplicate (3 wells) で行い、増殖率は lysoPS 添加直前 (0 時間) のコントロールで得られた OD 値に対する比率として算出し、平均値および標

準偏差をグラフとして提示した。

【 β 1-インテグリンの測定 – フローサイトメトリー法】

37°C、5% CO₂の環境で、6 well plate に 1x10⁵ cells/well ずつの SW480 または LoVo を加え、24 時間培養した。その後、lysoPS (1, 10 μ M) を添加し、各種時間 (30 分、2 時間、4 時間、12 時間) 培養した。培養後、細胞を回収し、PBS で 2 回洗浄後、 β 1-インテグリン抗体もしくはマウス IgG (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) をそれぞれ加え、4°C、30 分間反応させた。洗浄したのち、FITC 蛍光二次抗体 (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) を 4°C 30 分作用させ、再度洗浄し、Flow cytometer (FACS Calibur, Becton- Dickinson, San Jose, CA, USA) を用いて細胞表面の FITC を single color で測定した。結果は mean fluorescence intensity (MFI) で評価した。

【細胞接着能の検討 – Adhesion Assay】

SW480 および LoVo の細胞外基質 (Collagen type I) に対する接着能についての評価を行った。96-well plate に Collagen type I 30 μ g/ml (Nitta Gelatin, Osaka, Japan) を添加し、4°C で一晩コーティングした。Collagen type I を除去し、PBS で洗浄した後、非特異反応防止のため、0.1% FA (-) BSA 添加 RPMI-1640 を加え、37°C で 1 時間イン

キューベーションした。SW480 および LoVo をカルセイン (Dojindo, Kumamoto, Japan) で 30 分間蛍光染色した後、0.1% FA (-) BSA 添加 RPMI-1640 に浮遊させ、lysoPS (0.1 ~20 μ M) を添加した。細胞数が 1×10^5 cells/100 μ l/well となるように、コーティングした 96-well plate へ分注し、全ての細胞が基質と接触するよう数秒間遠心した後、37 $^{\circ}$ C で 15 分間培養した。その後、非接着細胞を除去するため、PBS で二回洗浄し、接着細胞を評価するため、プレート底の蛍光強度を蛍光測定器 (TERA SCAN VP, MINERVA TECH, Tokyo, Japan) にて測定した。接着後に洗浄しないウェルをポジティブコントロール、細胞を加えていない Collagen type I でコーティングされたウェルをネガティブコントロールとして、接着率を以下の計算式を用いて算出した。実験はすべて Triplicate (3 wells) で行い、コントロール細胞に対する比率として平均値および標準偏差をグラフとして提示した。

$$\text{接着率} = \frac{\text{実験ウェル蛍光強度} - \text{ネガティブコントロール蛍光強度}}{\text{ポジティブコントロール蛍光強度} - \text{ネガティブコントロール蛍光強度}}$$

【GPR34、Akt リン酸化の測定 - Western Blotting 法】

LysoPS 受容体の一つである GPR34 の発現および lysoPS 刺激による細胞内の Akt

リン酸化の経時的な変化については Western blotting にて評価した。

GPR34 の発現については、6-well plate に培養した大腸癌細胞株 (SW480) の培地を除去し、PBS で 3 回洗浄した後、1% Triton-X およびプロテアーゼ阻害剤を含む溶解液を加えて氷上で 1 時間静置し、癌細胞を溶解した。回収した溶解液を遠心し、上清の蛋白濃度を 2000 μ g/ml に調製した。Akt リン酸化については、Subconfluent の状態の大腸癌細胞株 (SW480) に lysoPS (10 μ M) を添加し、2~120 分後にホスファターゼ阻害剤を加えた溶解液を用いて同様の手順で蛋白を回収した。蛋白抽出液に 2% メルカプトエタノールを加え、95 $^{\circ}$ C で 5 分間煮沸した。電気泳動には polyacrylamide ゲル (anykD Mini-PROTEAN TGX GEL, Bio-Rad, CA, USA) を用いた。Hybond ECL ニトロセルロース膜 (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK) に転写し、5% スキムミルクにて非特異的結合のブロッキングを 30 分行った後、マウス抗 GPR34 抗体 (R & D Systems, Minneapolis, MN, USA; 100 倍希釈で使用)、マウス抗 β -actin 抗体 (Santa-Cruz, Biotechnology, Dallas, Texas, USA; 5000 倍希釈で使用)、ラビット抗 Phospho-Akt 抗体 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA; 1000 倍希釈で使用) を加えて、一晩反応させた。洗浄した後、Horseradish peroxidase (HRP) 標識抗ラビット IgG 抗体 (Vector Laboratories Inc, CA, USA; 10000 倍希釈で使用)、もしくは抗マウス IgG 抗体 (Vector Laboratories Inc, CA, USA; 10000 倍希釈で使用) を各々二次

抗体として反応させた。その後、ECL detection system (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK) を用いて現像した。

【トランスフェクション】

GPR34 ノックダウン SW480 細胞は si-RNA を用いた RNA 干渉法にて作製した。GPR34 si-RNA, Control si-RNA および Transfection Reagent を Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Texas, USA) より購入した。Transfection Reagent を用いて、GPR34 si-RNA を $1\mu\text{g} / 2 \times 10^5 \text{ cell}$ の濃度で、SW480 にトランスフェクションさせた。コントロールには、Control si-RNA をトランスフェクションさせた SW480 を用いた。トランスフェクションさせた細胞の GPR34 発現レベルを RT-PCR および Western blotting で測定した。またトランスフェクションさせた細胞を細胞遊走能の検討に用いた。

【統計学的解析】

統計学的有意差の検定には Student's *t*-test を用い、P 値が 0.05 未満を統計学的に有意とした。

実験結果

【大腸癌細胞株における lysoPS 受容体の発現】

大腸癌細胞株 6 種類における lysoPS 受容体の発現を RT-PCR 法にて検討した (図 6)。現在 3 種類のヒト lysoPS 受容体 (GPR34, P2Y10, GPR174、いずれも G 蛋白共役型受容体) が知られており(30)、それぞれの発現を検討した。その結果、GPR34 は何れの細胞株においても発現していたが、P2Y10 および GPR174 は、WiDr および LoVo には発現が見られなかった。LysoPS 受容体の発現パターンより SW480 および LoVo を比較すると、前者には 3 種類の lysoPS 受容体が発現しているのに対し、後者は GPR34 のみ発現しており、2 つの細胞株間で相違を認めた。このため、次の実験ではこの 2 つの細胞株を選択し、大腸癌細胞株に及ぼす lysoPS の影響に関与する lysoPS 受容体を明らかにすることとした。

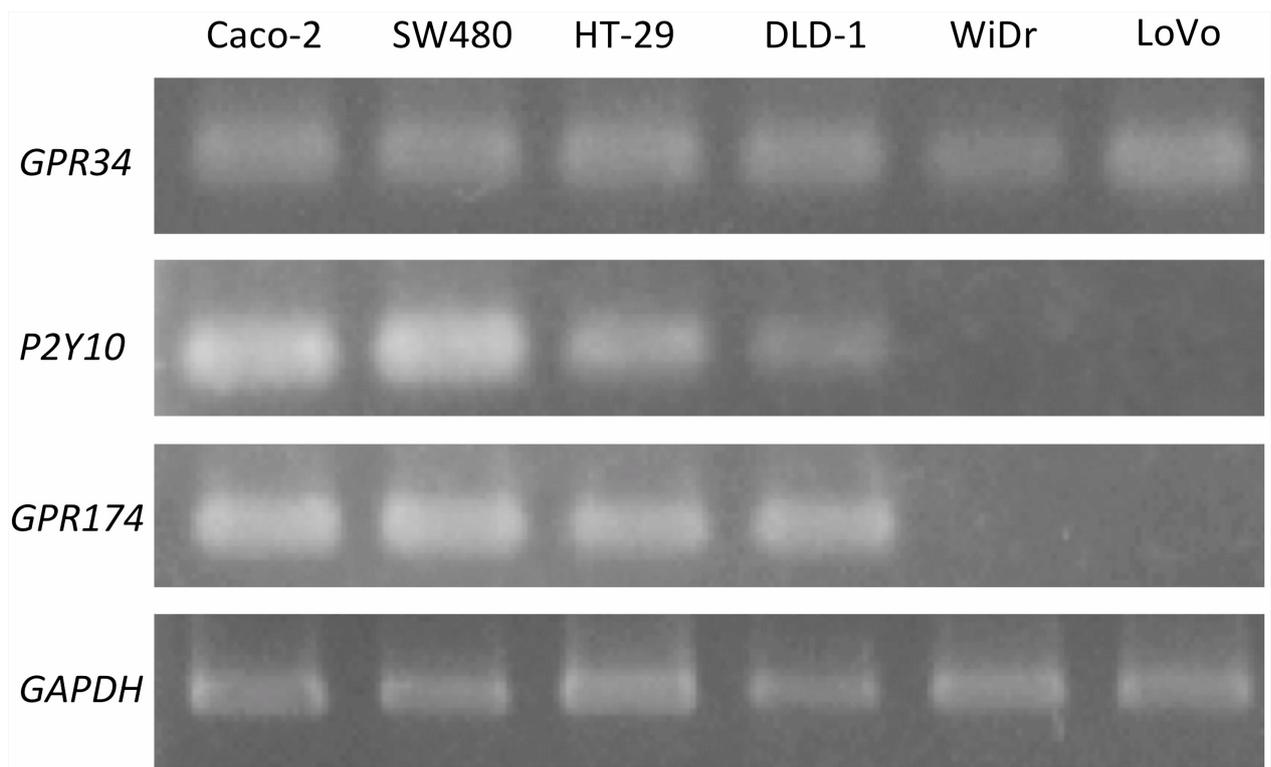


図 6 大腸癌細胞株における lysoPS 受容体の発現

6種類の大腸癌細胞株を用いて lysoPS 受容体 (*GPR34*, *P2Y10*, *GPR174*) の発現を RT-PCR 法を用いて検討した。*GAPDH* を内在性コントロールとして用いた。*GPR34* はすべての細胞株に発現していたのに対して、*P2Y10*、*GPR174* は6種類のうち4種類のみで発現を認めた。

【LysoPS が細胞遊走能に及ぼす影響】

SW480 および LoVo の細胞遊走能に及ぼす lysoPS の影響を検討した結果を図 7 に示した。LysoPS は、SW480 の Chemotaxis、および Chemokinesis とともに促進させた (lysoPS 10 μ M にて Chemotaxis は 247% \pm 7% 増強)。細胞遊走能は lysoPS 濃度が 5 μ M

もしくは $10\mu\text{M}$ で最大となり、さらに高濃度では遊走能は減弱するといった、
Chemotaxis, Chemokinesis に特有な釣鐘状の応答を示した。LoVo の Chemotaxis および
Chemokinesis も、SW480 と同様、lysoPS によって促進された。LysoPS は SW480 およ
び LoVo のいずれに対しても遊走能の促進効果を示したことから、この lysoPS 作用
は双方の細胞株に共通する GPR34 受容体を介したものであることが示唆された。

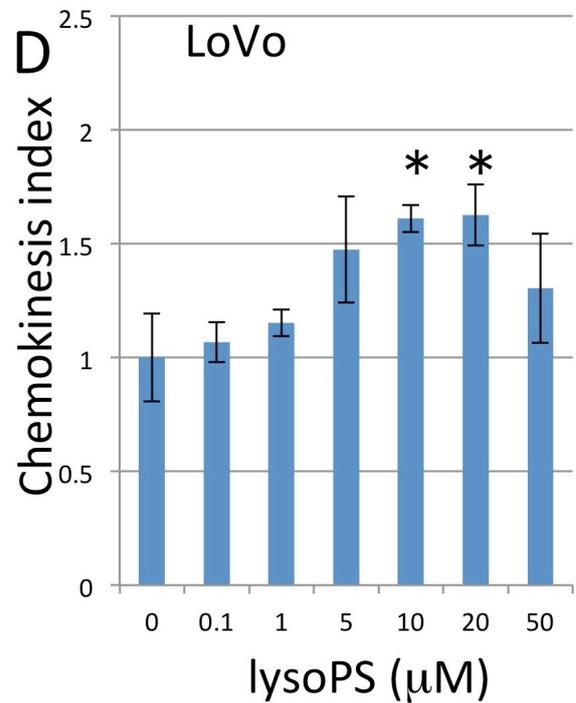
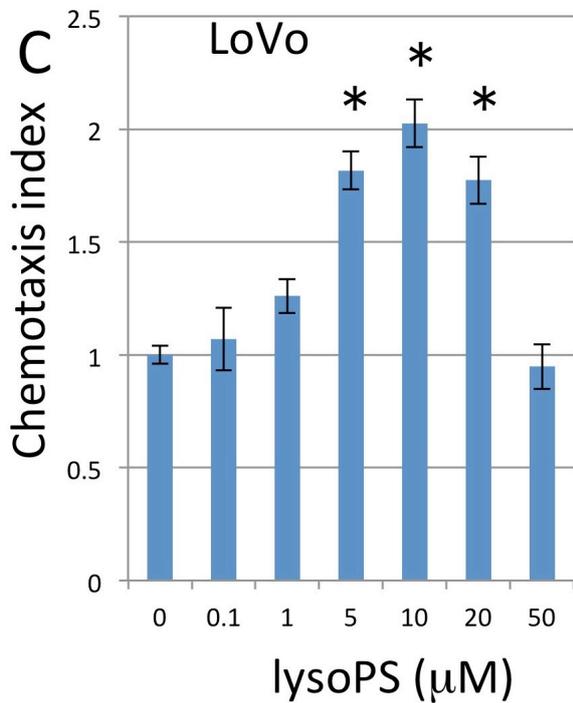
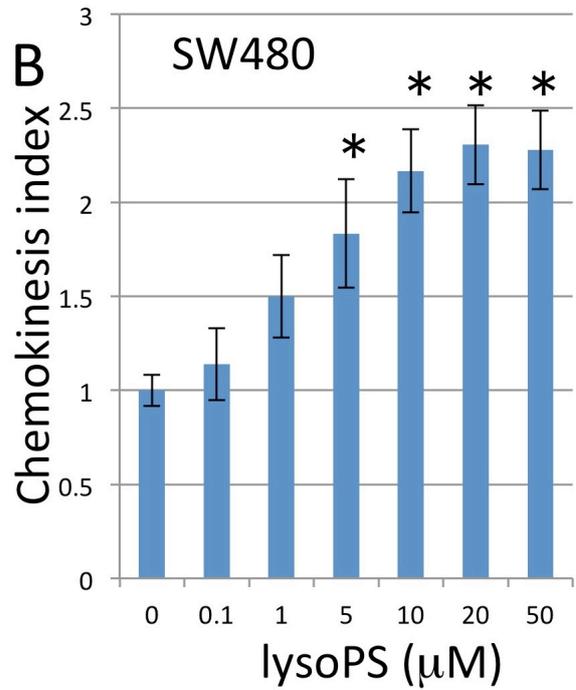
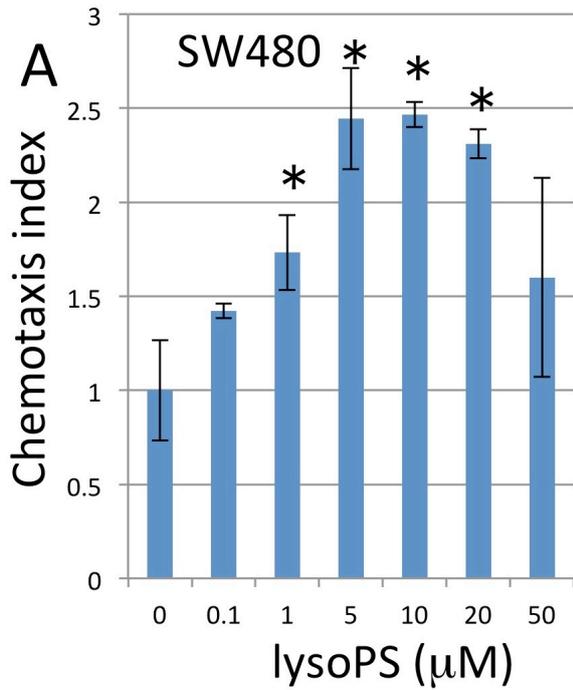


図7 LysoPSが大腸癌細胞株の遊走能に及ぼす影響

Boyden Chamber法を用いて、大腸癌細胞株 (SW480; 図A, B、LoVo; 図C, D) に lysoPS を6時間作用させたところ、細胞遊走能 (Chemotaxis; 図A, C、Chemokinesis; 図B, D) の促進効果を認めた。 (*; $P < 0.05$)

【LysoPS が細胞増殖能、細胞接着能に及ぼす影響】

LysoPS が大腸癌細胞株の増殖能に及ぼす影響について検討した (図 8)。LysoPS 0.01~1 μ M では、増殖能への影響を認めなかったが、それよりも高い濃度ではいずれの細胞株においても増殖抑制効果が認められた。細胞遊走能については lysoPS を 6 時間作用させた後に促進効果を認めたが、増殖抑制効果を示すには、より長時間 (約 72 時間) の lysoPS 作用を要した。

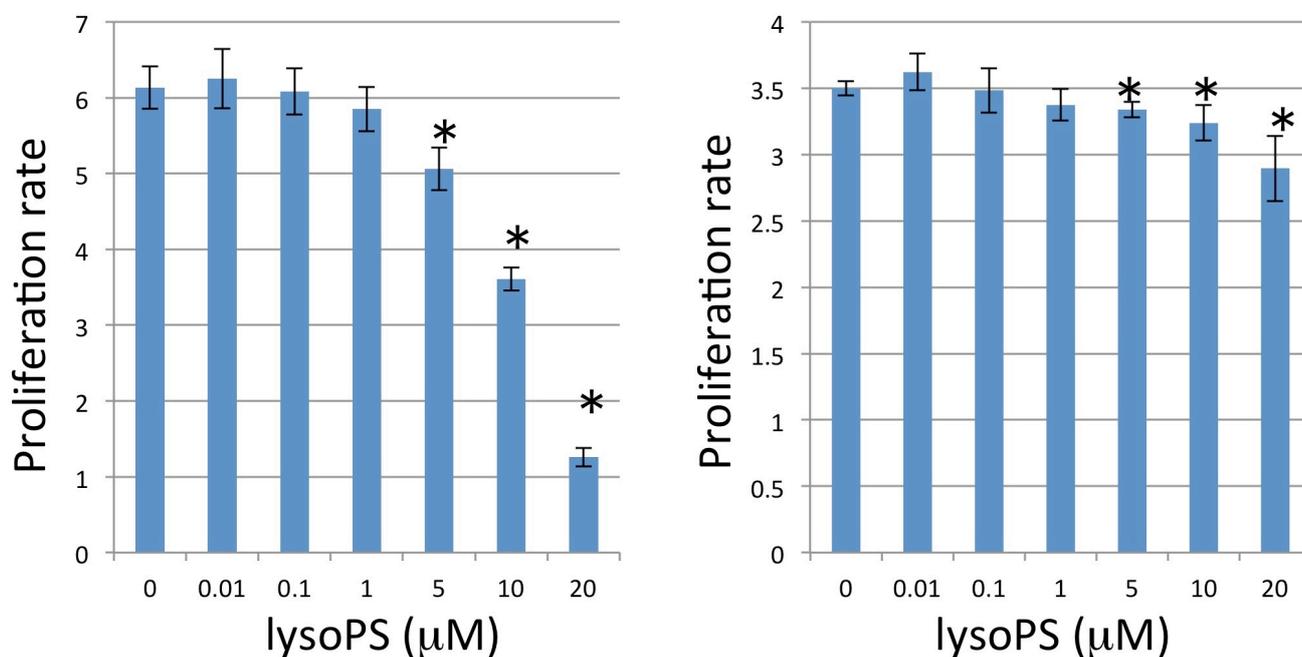


図 8 LysoPS が大腸癌細胞株の増殖能に及ぼす影響

大腸癌細胞株 (SW480、LoVo) に lysoPS を作用させる直前 (コントロール)、および 72 時間作用させた後に、MTS 法にて細胞増殖能を評価した。増殖率はコントロールで得られた OD 値に対する比率として計算した。LysoPS による増殖促進作用は認められず、5 μ M 以上では増殖抑制作用が認められた。

(*; $P < 0.05$)

次に、基底膜や腫瘍間質を構成する細胞外基質であるコラーゲン・ラミニン・フィブロネクチン等との接着に重要な接着因子であるインテグリン受容体の発現に及ぼす lysoPS の影響について検討した。インテグリンは α 鎖と β 鎖の二量体を形成するが、細胞外基質への接着に関与する多くの α 鎖は β 1-インテグリンと二量体を形成するため、 β 1-インテグリンの発現について検討した(31)。 β 1-インテグリン発現は、SW480 および LoVo のいずれにおいても lysoPS 刺激 (1, 10 μ M) によって変化を認めなかった (図 9)。

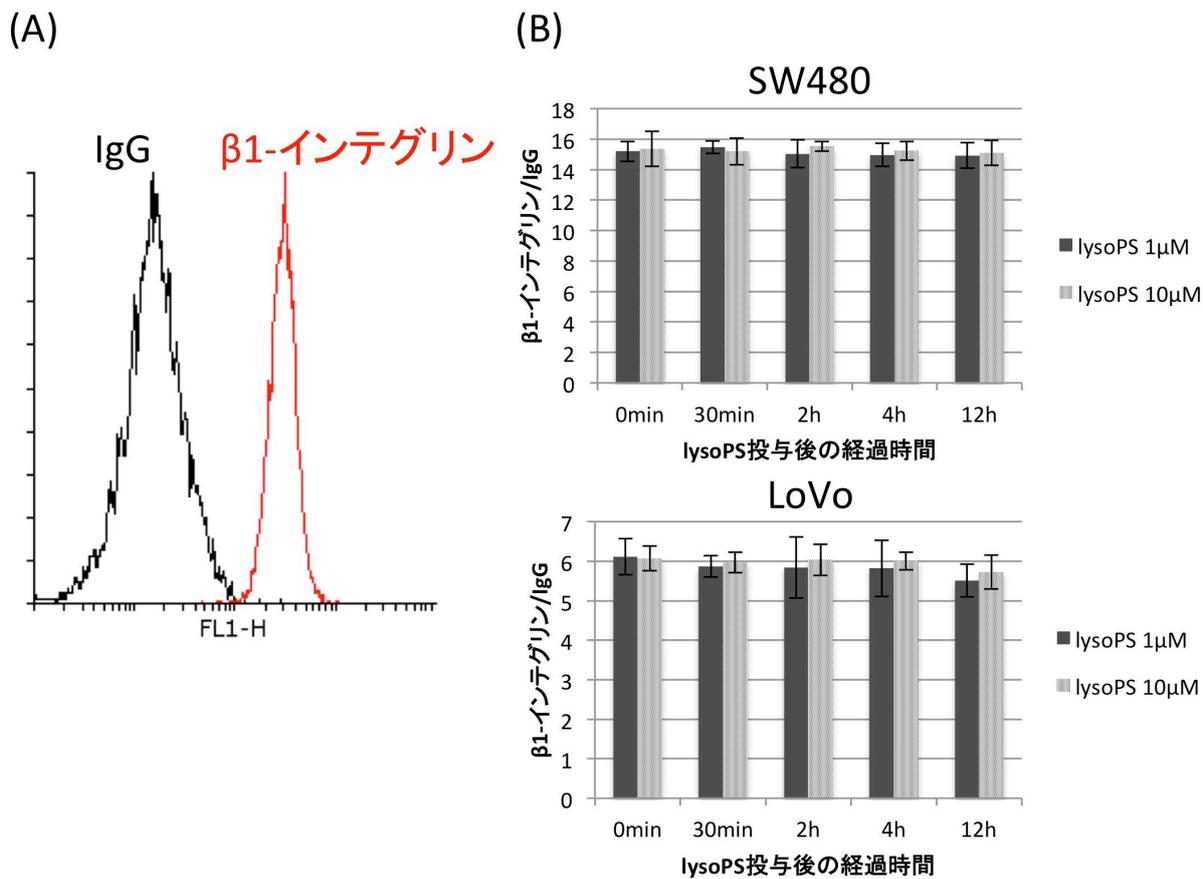


図9 LysoPSが大腸癌細胞株の β 1-インテグリン発現量に及ぼす影響
大腸癌細胞株 (SW480、LoVo) に lysoPS (1 μ M, 10 μ M) を添加し、 β 1-インテグリンの発現量の経時的な変化をフローサイトメトリーにて計測した (A)。LysoPS による β 1-インテグリン発現量 (コントロール (IgG) に対する β 1-インテグリンの発現量比) への影響は認められなかった (B)。

LysoPS のインテグリン発現への影響が認められなかったことから、細胞接着能に lysoPS が影響を及ぼす可能性は低いと予想されたが、細胞接着能についても adhesion

assay を用いて検討した (図 10)。Collagen type I に対する細胞接着能への lysoPS の影響は SW480 および LoVo のいずれにおいても認められなかった。

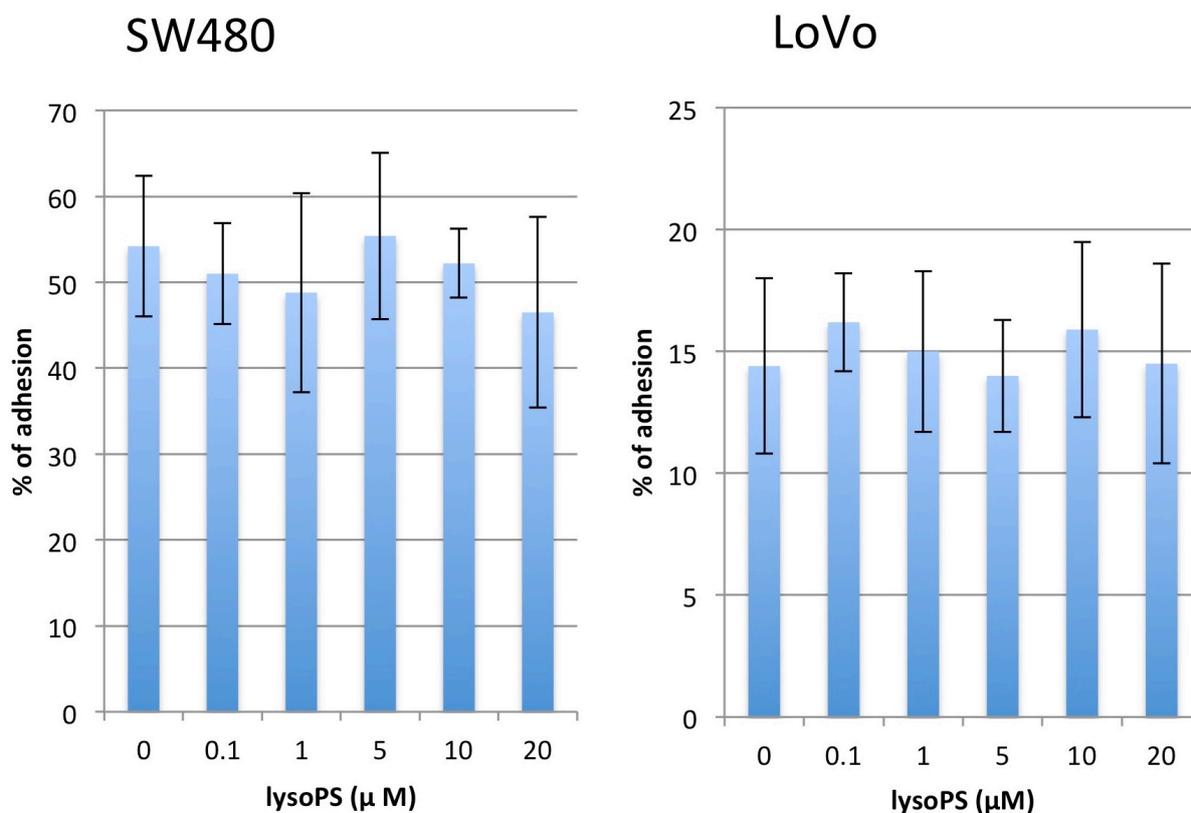


図 10 LysoPS が大腸癌細胞株の細胞接着能に及ぼす変化
LysoPS (0.1~20μM) にて大腸癌細胞株 (SW480、LoVo) を刺激し、Collagen type I に対する細胞接着能の変化を計測した。LysoPS による細胞接着能への影響は認められなかった。

【LysoPS の細胞遊走能促進作用に関与する lysoPS 受容体】

先の実験にて lysoPS の細胞遊走能促進作用には GPR34 が関与することが示唆されたが、それを確認するため siRNA を用いて SW480 の GPR34 をノックダウンし、検討を行った。siRNA 導入により、SW480 における GPR34 発現が mRNA レベルで 58%、蛋白レベルで 48% 減少した (図 11A)。この細胞を用いて lysoPS の細胞遊走能への影響について検討した (図 11B)。コントロール (Mock-transfected cells) では、lysoPS の細胞遊走能促進効果を認めたのに対し、GPR34 ノックダウン細胞では lysoPS の細胞遊走能促進効果が認められなかった。このことから、lysoPS は GPR34 を介して大腸癌細胞株の細胞遊走能を促進すると考えられた。

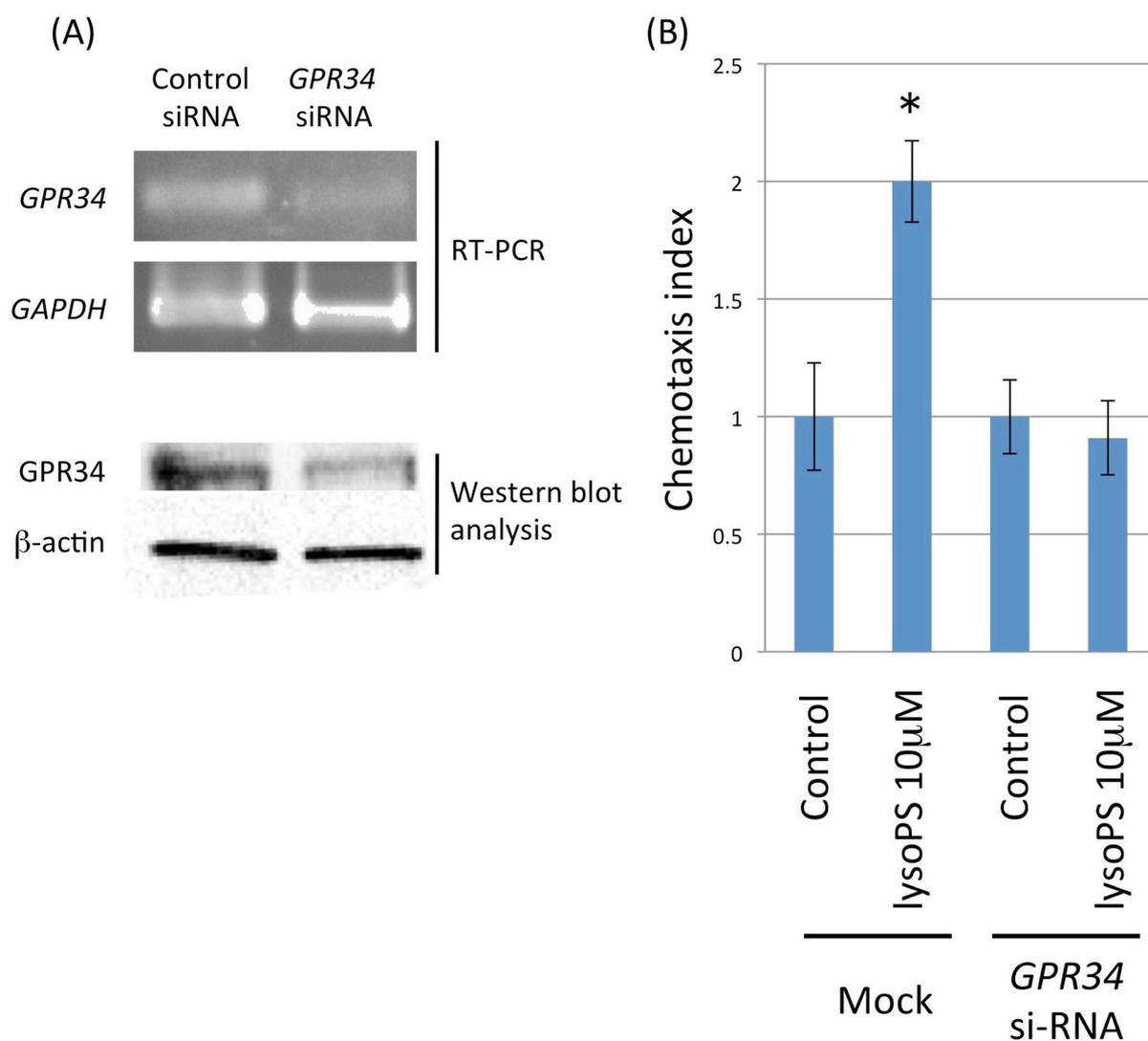


図 11 GPR34 ノックダウンによる大腸癌細胞株 (SW480) の細胞遊走能の変化

(A) siRNA を用いた GPR34 ノックダウンによる GPR34 の発現低下を RT-PCR および Western blot により確認した。

(B) Mock-transfected cells では lysoPS の細胞遊走能促進作用が認められたのに対し、GPR34 ノックダウン細胞ではその効果が認められなかった。 (*; $P < 0.05$)

【LysoPS の細胞遊走能促進作用に関与する細胞内シグナル伝達経路】

LysoPS の細胞遊走能促進作用に関与する細胞内シグナル伝達経路を解明するために、シグナル伝達経路を遮断する阻害薬を投与し細胞遊走能への影響を検討した。G 蛋白共役型受容体の α サブユニット (G_i) に作用し、受容体からの情報伝達を阻害する Pertussis Toxin (PTX, 百日咳毒素; 100ng/ml)、PI3 kinase/Akt 阻害剤である wortmannin (400nM)、チロシンキナーゼ阻害剤の一種で mitogen-activated protein kinase (MAPK) 経路を阻害する genistein (200 μ M) にて SW480 をあらかじめ処理した後、lysoPS を作用させ、細胞遊走能を評価した。PTX および wortmannin は、lysoPS の細胞遊走能促進作用を減弱させたのに対し、genistein の細胞遊走能への影響は認められなかった (図 12)。このことから lysoPS の大腸癌細胞遊走能促進作用には、G 蛋白共役型受容体および PI3K/Akt 経路が関与していることが示唆された。

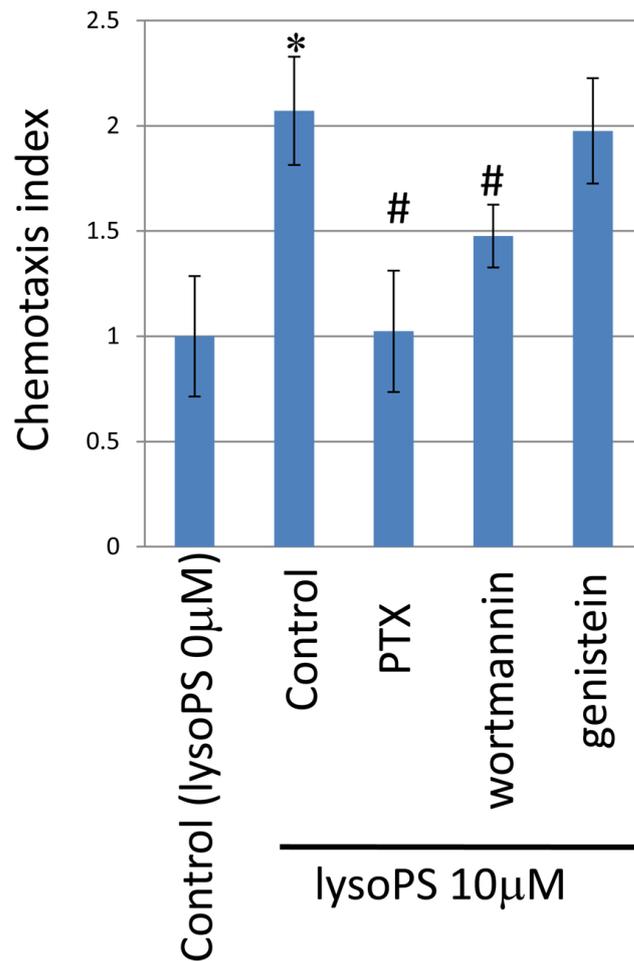


図 12 各種阻害剤による大腸癌細胞株 (SW480) の細胞遊走能の変化
SW480 に各種阻害剤をあらかじめ作用させたあと、lysoPS による細胞遊走能の変化を計測した。

PTX および wortmannin をあらかじめ作用させた場合には、lysoPS による細胞遊走能促進効果の減弱を認めた。

(*; $P < 0.05$ 、コントロール (lysoPS 0 μ M) との比較、#; $P < 0.05$ 、コントロール (lysoPS 10 μ M) との比較)

また、PI3K/Akt 経路の関与について確認するため SW480 に lysoPS (10 μ M) を作用させた後、Akt のリン酸化を Western blotting にて経時的に評価した (図 13)。LysoPS 作用によりリン酸化 Akt は増強し、刺激開始後 5-10 分でその効果は最大となった。このことから lysoPS の SW480 に対する細胞遊走能促進作用には PI3K/Akt 経路が関与していると考えられた。

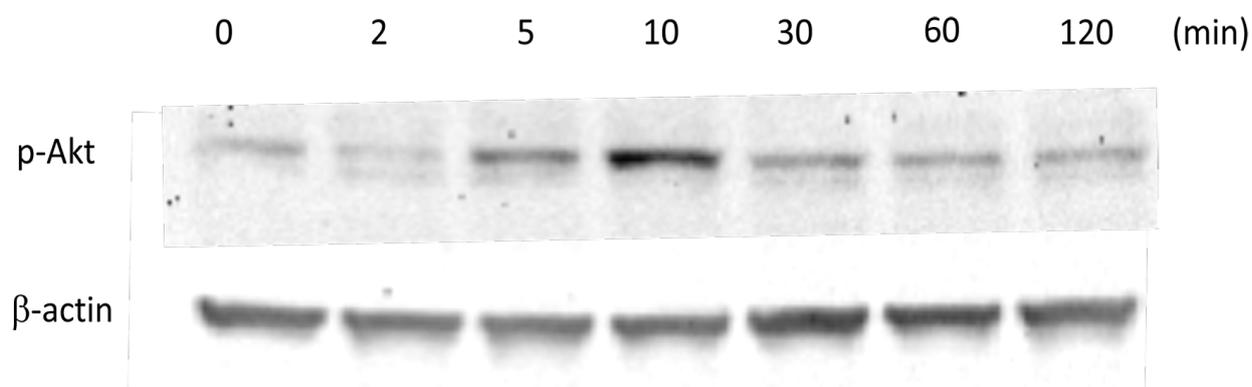


図 13 LysoPS 作用によるリン酸化 Akt の経時的変化

LysoPS (10 μ M) 作用による、SW480 のリン酸化 Akt を Western Blotting にて評価。LysoPS 作用によるリン酸化 Akt の発現は 5-10 分で最大となった。

考察

本研究では、様々な生理活性を有し、近年、癌の発育・進展にも重要な役割を果たす可能性が示唆されている lysoPS およびその産生酵素である PS-PLA₁ に注目し、大腸癌の浸潤・転移過程に及ぼす影響について検討を行った。まず、最初に、免疫染色により大腸癌組織における PS-PLA₁ の発現を検討し、PS-PLA₁ 発現と臨床病理学的因子の関連を解析した。次いで、大腸癌細胞株を用いた *in vitro* の系において、癌の浸潤・転移に重要な細胞遊走能、接着能などに及ぼす lysoPS の影響について検討を加えた。

その結果、大腸癌組織において、PS-PLA₁ は主に癌細胞の細胞質に発現することが確認され、発現の程度により PS-PLA₁ 強発現および弱発現群に分類して臨床病理学的因子との関連を解析したところ、PS-PLA₁ 発現は癌の深達度・血行性転移の有無と有意に相関することが確認された。すなわち、PS-PLA₁ 高発現群では、より深達度の高い症例や、血行性転移を有する症例が多いという結果であった。この結果は、大腸癌における PS-PLA₁ 発現が、浸潤や転移に重要な因子である可能性を示唆するものであった。これまで腫瘍組織における PS-PLA₁ 発現に関する報告は検索し得た限りでは他

になく、本研究が大腸癌の発育・進展における PS-PLA₁ の関与を示した初の検討であると考えられる。

既報では、PS-PLA₁ 発現がメラノーマ細胞株の転移能と逆相関することが確認されている(32)。4種類のメラノーマ細胞株における PS-PLA₁ の発現を northern blot で確認した報告であるが、転移を起こしにくい2種類の細胞株では PS-PLA₁ 発現を認めただのに対し、転移を起こしやすい2種類の細胞株では PS-PLA₁ 発現を認めなかった。今回行った免疫染色では、PS-PLA₁ 強発現例には、深達度が高度な症例、血行性転移を有する症例が多い結果となっており、メラノーマ細胞株についての報告とは相反するものであった。結果に相違がみられた原因であるが、本検討では組織を用いたのに対し、メラノーマの報告では細胞株を用いており、異なる検体を用いていることが原因の一つとして考えられる。また今回6種類の大腸癌細胞株において lysoPS 受容体の中でも GPR34 の発現が優位であったのに対し、メラノーマ組織では母斑と比較して P2Y₁₀ の発現が高いという報告があり(33)、lysoPS 受容体の発現パターンが異なることにより、結果に相違を認めた可能性も考えられる。今後、大腸癌を含めた腫瘍組織における PS-PLA₁ や lysoPS 受容体の発現についての検討が実施され明らかにされることを期待したい。

今回の検討結果から、PS-PLA₁ 強発現群の予後は、弱発現群に比して不良であった。しかし、多変量解析において、予後予測因子として見出されたのは血行性転移の有無のみであり、PS-PLA₁ 発現は独立した予後予測因子ではなかった。PSPLA1 発現が予後予測のためのバイオマーカーとなりうるかについては今後更なる検討が必要であるが、本検討で得られた最も重要な知見は、PS-PLA₁ 発現が癌の浸潤・転移と関連していたということである。今回の免疫染色の結果のみでは、大腸癌細胞に発現している PS-PLA₁ が大腸癌の発育・進展を促進するのか、それとも大腸癌が発育・進展した結果 PS-PLA₁ の発現が増強しているのかは区別が困難であり、今後動物実験などによる検討が必要であると考えられる。

前述のとおり、lysoPS は、細胞膜の外側に露出した phosphatidylserine (PS) が細胞外に存在する PS-PLA₁ の酵素活性により分解されて産生され、その結果、生理活性を發揮すると考えられている。しかし、PS は通常、細胞膜の内側に存在することが知られており、また、本検討では、PS-PLA₁ は主に癌細胞の細胞質に発現が確認された。このことから、細胞内に存在する PS-PLA₁ が細胞脂質二重膜の細胞質側に局在する PS を分解するか否か、またそれによって細胞にどのような変化が起こるかについては、現在、不明である。ラットでは、PS-PLA₁ が細胞内の α granule に蓄えられているという報告もあり(22)、細胞内においては、PS-PLA₁ は活性を發揮できない状態に

あると考えられる。PS は細胞のアポトーシスによって細胞膜外に露出することが知られている。大腸癌細胞内にある PS-PLA₁ が何らかの刺激により細胞外に遊離して PS に作用し、lysoPS を産生し、その lysoPS が癌細胞を含めた周囲環境に作用する結果、癌の浸潤・転移を促進している可能性が考えられる。大腸癌細胞から PS-PLA₁ が遊離する機序については、今後の検討が必要である。大腸癌組織において、PS-PLA₁ により lysoPS が産生されているものと推測されるが、次に、この lysoPS が大腸癌細胞株に及ぼす影響、特に癌の発育・進展に重要な要素である細胞増殖能、遊走能、および接着能を中心に検討を行った。

細胞実験には 6 種類の大腸癌細胞株を用い、まず、最初に、lysoPS 受容体 (GPR34, P2Y10, GPR174) (18) の発現を検討し、これらの受容体の発現パターンが異なる細胞株 2 種 (LoVo および SW480) をその後の検討に用いた。すなわち、SW480 には 3 種類の lysoPS 受容体すべてが発現していたのに対し、LoVo は GPR34 のみを発現していた。両細胞において、lysoPS は細胞遊走能を促進したが、細胞外基質との接着に重要な役割を果たす β 1-インテグリンの発現には影響しなかった。LysoPS の細胞遊走能促進作用は両細胞株で同様であったことから、両者に共通して発現する GPR34 が関与している可能性が示唆された。また、lysoPS の作用に関与する細胞内シグナル伝達経路について検討した結果、G 蛋白共役型受容体および PI3K/Akt 経路が重要で

あることが示唆された。さらに、siRNA を用いた GPR34 のノックダウンの検討から、lysoPS の作用には GPR34 が関与していることも示唆された。しかし SW480 のみでノックダウンの検討をしており、GPR34 の関与を示すには今後複数の大腸癌細胞株で同様の検討を行う必要がある。また P2Y10, GPR174 のノックダウンを行っておらず、これらの受容体と細胞遊走能促進作用との関与についても否定することはできない。今後複数の大腸癌細胞株を用いて、3 種類の lysoPS 受容体のノックダウンを行い、それぞれの受容体と生理活性について詳細に検討を行う必要がある。また lysoPS の細胞遊走能促進作用は、wortmannin では部分的にしか阻害できなかったため、PI3K/Akt 経路以外の細胞内シグナル伝達経路が関与している可能性が考えられる。今回 PI3K/Akt 経路、MAPK 経路それぞれを阻害する薬剤を 1 種類ずつ検討したのみであり、今後複数の大腸癌細胞株を用いて複数の阻害剤の効果を検討する必要がある。

今回の大腸癌細胞株を用いた検討では、lysoPS による細胞増殖促進作用は認められなかったが、lysoPS 10 μ M 以上で増殖抑制作用が認められており、細胞遊走能促進作用を發揮する濃度と overlap していた。すなわち、ある濃度域の lysoPS では、細胞遊走能が促進されると同時に増殖能が抑制される可能性があり、結果的に癌の浸潤・転移に有意に働くか否かは明らかでない。しかし、細胞遊走能は、lysoPS 作用の後、6 時間程度で促進される一方、細胞増殖能の抑制作用は 72 時間といった長時間を要し、

作用時間によって発揮される作用が異なると考えられる。LysoPS は PS-PLA₁ やその他のリゾホスホリパーゼにより分解されグリセロホスホセリンになると報告されており(34, 35)、癌細胞周囲で産生された lysoPS は比較的短時間・高濃度で周囲の細胞に作用し、その後分解されている可能性がある。生体内における lysoPS の濃度については、マウス血漿中では 30~50nM、マウス血清中では 200~300nM 程度であると報告されている(36)。しかし、組織中における lysoPS の濃度についての報告はなく、ヒト血中・組織における濃度についても現在のところ明らかではない。LysoPS が実際に組織中でどのような分布を示し、どの程度の時間作用しているかは今後の重要な研究課題である。LysoPS が癌の浸潤・転移を促進すると仮定するならば、細胞遊走能・細胞接着能・細胞増殖能の中で、細胞遊走能の促進作用がこれに最も寄与していると考えられる。

今回得られた知見に基づき推測される、大腸癌組織における PS-PLA₁、lysoPS の作用についてのシエーマを図 14 に示す。癌細胞内に局在している PS-PLA₁ が何らかの刺激により細胞外に遊離し、細胞膜外に露出した PS を分解して lysoPS が産生される。この lysoPS が癌細胞や免疫細胞に作用した結果、癌の浸潤や転移に促進的に働いているものと推測される。本研究では、lysoPS が癌細胞に作用した結果、細胞遊走能が増強することを示した。LysoPS が T 細胞の増殖を抑制するという報告があることか

ら(24)、lysoPS が免疫細胞等に抑制的に作用し癌の浸潤や転移を促進する可能性も考えられるが、リンパ球を初めとした免疫系への作用については今後の研究が待たれるところである。どのような状況下で細胞内に局在している PS-PLA₁ が細胞外に遊離するかは今のところ明らかではない。癌細胞が抗癌剤刺激や放射線照射を受けると、PS-PLA₁ の基質である PS が細胞脂質二重膜の細胞質側から細胞外側に露出することが知られており(37, 38)、またそのような状況下では癌細胞自体も傷害を受け細胞内の PS-PLA₁ が遊離すると推測され、その結果 PS-PLA₁ が癌細胞表面の PS と反応し lysoPS が産生されている可能性がある。進行再発大腸癌の治療において化学療法や放射線治療が不可欠となっているが、PS・PS-PLA₁・lysoPS といった一連の反応が、治療効果に及ぼす影響について検討することも重要なテーマであると考えられる。

何らかの刺激(抗癌剤・放射線?)、
もしくは細胞傷害によりPS-PLA₁
が細胞内から細胞外へ

抗癌剤・放射線などの刺激により
細胞表面にPSが露出

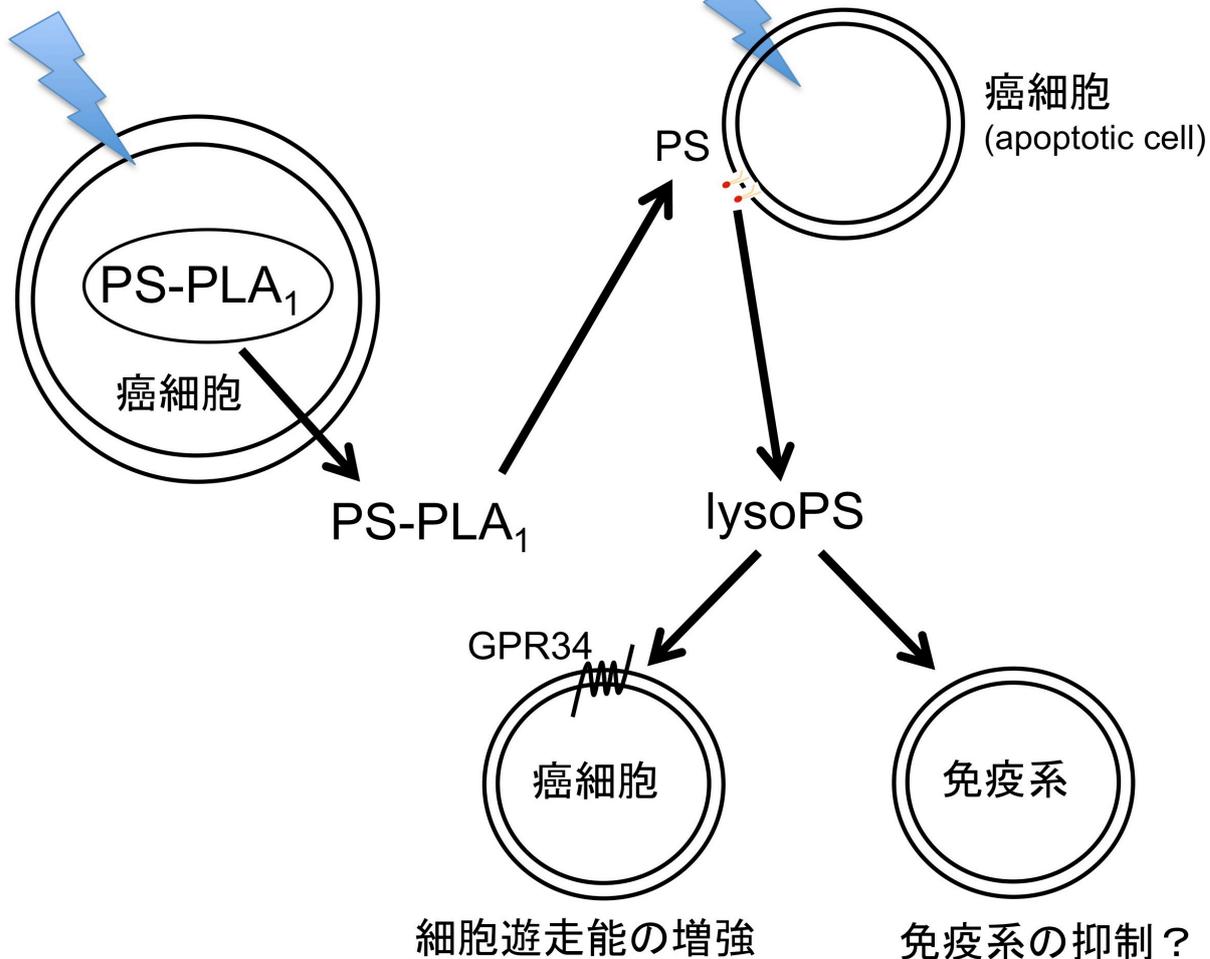


図 14 大腸癌における PS、PS-PLA₁、lysoPS のシエーマ

PS-PLA₁ および lysoPS の作用を特異的に阻害することができれば将来的に大腸癌
の治療、特に抗癌剤や放射線治療を行う際の治療効果の向上につながる可能性がある

が、今のところ臨床レベルで使用可能な薬剤は報告されていない。LysoPS の analog が 3 種類の lysoPS 受容体それぞれにどの程度作用するかが研究されており、1 種類もしくは 2 種類の lysoPS 受容体に特異的に作用する lysoPS analog が見つかった(39, 40)。現状では agonist のみで、antagonist として作用する analog は報告されていないが、これらの analog を単体もしくは組み合わせて用いることで、さらに今後 antagonist が開発されることにより、3 種類の lysoPS 受容体それぞれを特異的に作動させる、もしくは阻害することが可能になると思われる。今後さらなる研究が期待されるところである。また、海外では、PS に結合するモノクローナル抗体製剤 (バビツキシマブ) の肺癌に対する臨床試験が開始されている(41, 42)。この薬剤は、①強い免疫抑制作用(43, 44)を有する PS に結合して、その免疫抑制作用を阻害する、②腫瘍栄養血管の内皮細胞表面に多く露出している PS に結合することで、マクロファージ等による血管内皮細胞破壊を誘導する、といった 2 つの機序により抗腫瘍効果を発揮する薬剤である(45)。バビツキシマブが PS-PLA₁ の作用にどのような影響を及ぼすかは今のところ明らかではないが、PS・PS-PLA₁・lysoPS の一連の反応に対するバビツキシマブの影響についても今後の研究が期待される。

本研究は、PS-PLA₁、lysoPS と大腸癌浸潤・転移との関与を初めて示したものであり、今後、PS・PS-PLA₁・lysoPS の一連の経路を標的とした新たな大腸癌治療戦略開発につながることを期待される。

まとめ

PS-PLA₁ および lysoPS が大腸癌に及ぼす影響について検討し、以下の結論を得た。

- ① 大腸癌組織において、癌細胞の PS-PLA₁ 発現が、癌の深達度・血行性転移と相関していた。
- ② LysoPS は、GRP34 受容体および PI3K/Akt 経路を介して、大腸癌細胞の遊走能を促進した。

以上より、PS-PLA₁ および lysoPS は大腸癌の浸潤・転移に関与していることが示唆された。今後、PS-PLA₁ および lysoPS の大腸癌の発育・進展に関与するメカニズムがさらに明らかになり、PS・PS-PLA₁・lysoPS の一連の経路を標的とした新たな大腸癌治療戦略の開発につながることを期待する。

謝辞

本研究をすすめるにあたり、東京大学大学院 医学系研究科 外科学専攻 臓器病態外科学講座 腫瘍外科学・血管外科学 渡邊聡明教授にはひとかたならぬ御指導・御鞭撻を賜り、深く感謝いたします。そして、検査部 矢富裕教授、腫瘍外科学・血管外科学 北山丈二准教授、須並英二先生、石原聡一郎先生、山口博紀先生、輸血医学 津野寛和先生、池田敏之先生、東北大学大学院薬学系研究科医療薬化学専攻機能解析薬学講座分子細胞生化学分野 青木淳賢教授には、具体的な実験方法、実験手技の習得、データの解釈、研究の進め方など、多岐に渡る詳細な御指導を頂きました。同大学院輸血医学 高橋孝喜前教授には実験の場を提供していただき、また論文の作成にあたってもひとかたならぬ御指導・御鞭撻を賜りました

さらに、実際の実験に際しては、多くの先生方に多大なるご協力を頂きました。

ここに深甚なる謝意を表します。

引用文献

- 1 財団法人厚生統計協会. 国民衛生の動向 2010/2011年. 47-51, 2010.
- 2 Chau I and Cunningham D. Treatment in advanced colorectal cancer: what, when and how? *Br J Cancer* 100: 1704-1719, 2009.
- 3 Van Cutsem E, Kohne CH, Hitre E, Zaluski J, Chang Chien CR, Makhson A, D'Haens G, Pinter T, Lim R, Bodoky G, Roh JK, Folprecht G, Ruff P, Stroh C, Tejpar S, Schlichting M, Nippgen J and Rougier P. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 360: 1408-1417, 2009.
- 4 Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, Berlin J, Baron A, Griffing S, Holmgren E, Ferrara N, Fyfe G, Rogers B, Ross R and Kabbinavar F. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 350: 2335-2342, 2004.
- 5 Winder T and Lenz HJ. Vascular endothelial growth factor and epidermal growth factor signaling pathways as therapeutic targets for colorectal

cancer. *Gastroenterology* 138: 2163-2176, 2010.

6 Voet D, Voet JG, Pratt CW. *Fundamentals of Biochemistry*. 241-254, 2013.

7 Blusztajn JK, Liscovitch M, Mauron C, Richardson UI and Wurtman RJ. Phosphatidylcholine as a precursor of choline for acetylcholine synthesis. *J Neural Transm Suppl* 24: 247-259, 1987.

8 Hassan B, Akcakanat A, Holder AM and Meric-Bernstam F. Targeting the PI3-kinase/Akt/mTOR signaling pathway. *Surg Oncol Clin N Am* 22: 641-664, 2013.

9 Yamaji-Hasegawa A and Tsujimoto M. Asymmetric distribution of phospholipids in biomembranes. *Biol Pharm Bull* 29: 1547-1553, 2006.

10 Arcaro A. Targeting PI3K/mTOR Signaling in Cancer. *Frontiers in oncology* 4: 84, 2014.

11 Schaloske RH and Dennis EA. The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. *Biochim Biophys Acta* 1761: 1246-1259, 2006.

12 Hiyoshi M, Kitayama J, Kazama S, Taketomi Y, Murakami M, Tsuno NH, Hongo K, Kaneko M, Sunami E and Watanabe T. The expression of

phospholipase A2 group X is inversely associated with metastasis in colorectal cancer. *Oncology letters* 5: 533-538, 2013.

13 Dong Z, Liu Y, Scott KF, Levin L, Gaitonde K, Bracken RB, Burke B, Zhai QJ, Wang J, Oleksowicz L and Lu S. Secretory phospholipase A2-IIa is involved in prostate cancer progression and may potentially serve as a biomarker for prostate cancer. *Carcinogenesis* 31: 1948-1955, 2010.

14 Yu JA, Mauchley D, Li H, Meng X, Nemenoff RA, Fullerton DA and Weyant MJ. Knockdown of secretory phospholipase A2 IIa reduces lung cancer growth in vitro and in vivo. *J Thorac Cardiovasc Surg* 144: 1185-1191, 2012.

15 Cai H, Chiorean EG, Chiorean MV, Rex DK, Robb BW, Hahn NM, Liu Z, Loehrer PJ, Harrison ML and Xu Y. Elevated phospholipase A2 activities in plasma samples from multiple cancers. *PLoS One* 8: e57081, 2013.

16 Murakami M. Lipid mediators in life science. *Exp Anim* 60: 7-20, 2011.

17 Pyne NJ, Tonelli F, Lim KG, Long JS, Edwards J and Pyne S. Sphingosine 1-phosphate signalling in cancer. *Biochem Soc Trans* 40: 94-100, 2012.

18 Hisano Y, Nishi T and Kawahara A. The functional roles of S1P in

immunity. *J Biochem* 152: 305-311, 2012.

19 Houben AJ and Moolenaar WH. Autotaxin and LPA receptor signaling in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 30: 557-565, 2011.

20 Okudaira S, Yukiura H and Aoki J. Biological roles of lysophosphatidic acid signaling through its production by autotaxin. *Biochimie* 92: 698-706, 2010.

21 Shida D, Kitayama J, Yamaguchi H, Okaji Y, Tsuno NH, Watanabe T, Takuwa Y and Nagawa H. Lysophosphatidic acid (LPA) enhances the metastatic potential of human colon carcinoma DLD1 cells through LPA1. *Cancer Res* 63: 1706-1711, 2003.

22 Aoki J, Inoue A, Makide K, Saiki N and Arai H. Structure and function of extracellular phospholipase A1 belonging to the pancreatic lipase gene family. *Biochimie* 89: 197-204, 2007.

23 Hosono H, Aoki J, Nagai Y, Bandoh K, Ishida M, Taguchi R, Arai H and Inoue K. Phosphatidylserine-specific phospholipase A1 stimulates histamine release from rat peritoneal mast cells through production of 2-acyl-1-lysophosphatidylserine. *J Biol Chem* 276: 29664-29670, 2001.

24 Bellini F and Bruni A. Role of a serum phospholipase A1 in the

phosphatidylserine-induced T cell inhibition. FEBS Lett 316: 1-4, 1993.

25 Lourenssen S and Blennerhassett MG. Lysophosphatidylserine potentiates nerve growth factor-induced differentiation of PC12 cells. Neurosci Lett 248: 77-80, 1998.

26 Park KS, Lee HY, Kim MK, Shin EH, Jo SH, Kim SD, Im DS and Bae YS. Lysophosphatidylserine stimulates L2071 mouse fibroblast chemotactic migration via a process involving pertussis toxin-sensitive trimeric G-proteins. Mol Pharmacol 69: 1066-1073, 2006.

27 Lee SY, Lee HY, Kim SD, Jo SH, Shim JW, Lee HJ, Yun J and Bae YS. Lysophosphatidylserine stimulates chemotactic migration in U87 human glioma cells. Biochem Biophys Res Commun 374: 147-151, 2008.

28 Yu W, Ma S, Wang L, Zuo B, Li M, Qiao Z, Pan X, Liu Y and Wang J. Upregulation of GPR34 expression affects the progression and prognosis of human gastric adenocarcinoma by PI3K/PDK1/AKT pathway. Histol Histopathol 28: 1629-1638, 2013.

29 Nakamura K, Igarashi K, Ohkawa R, Saiki N, Nagasaki M, Uno K, Hayashi N, Sawada T, Syukuya K, Yokota H, Arai H, Ikeda H, Aoki J and Yatomi

Y. A novel enzyme immunoassay for the determination of phosphatidylserine-specific phospholipase A(1) in human serum samples. *Clin Chim Acta* 411: 1090-1094, 2010.

30 Inoue A, Ishiguro J, Kitamura H, Arima N, Okutani M, Shuto A, Higashiyama S, Ohwada T, Arai H, Makide K and Aoki J. TGFalpha shedding assay: an accurate and versatile method for detecting GPCR activation. *Nat Methods* 10: 1021-1029, 2012.

31 Takada Y, Ye X and Simon S. The integrins. *Genome biology* 8: 215, 2007.

32 van Groningen JJ, Egmond MR, Bloemers HP and Swart GW. nmd, a novel gene differentially expressed in human melanoma cell lines, encodes a new atypical member of the enzyme family of lipases. *FEBS Lett* 404: 82-86, 1997.

33 Qin Y, Verdegaal EM, Siderius M, Bebelman JP, Smit MJ, Leurs R, Willemze R, Tensen CP and Osanto S. Quantitative expression profiling of G-protein-coupled receptors (GPCRs) in metastatic melanoma: the constitutively active orphan GPCR GPR18 as novel drug target. *Pigment Cell Melanoma Res* 24: 207-218, 2011.

- 34 Frasch SC and Bratton DL. Emerging roles for lysophosphatidylserine in resolution of inflammation. *Prog Lipid Res* 51: 199-207, 2012.
- 35 Nagai Y, Aoki J, Sato T, Amano K, Matsuda Y, Arai H and Inoue K. An alternative splicing form of phosphatidylserine-specific phospholipase A1 that exhibits lysophosphatidylserine-specific lysophospholipase activity in humans. *J Biol Chem* 274: 11053-11059, 1999.
- 36 Nishikawa M, Kurano M, Ikeda H, Aoki J and Yatomi Y. Lysophosphatidylserine has Bilateral Effects on Macrophages in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb Epub* ahead of print 2014.
- 37 He J, Luster TA and Thorpe PE. Radiation-enhanced vascular targeting of human lung cancers in mice with a monoclonal antibody that binds anionic phospholipids. *Clin Cancer Res* 13: 5211-5218, 2007.
- 38 Huang X, Bennett M and Thorpe PE. A monoclonal antibody that binds anionic phospholipids on tumor blood vessels enhances the antitumor effect of docetaxel on human breast tumors in mice. *Cancer Res* 65: 4408-4416, 2005.
- 39 Iwashita M, Makide K, Nonomura T, Misumi Y, Otani Y, Ishida M, Taguchi R, Tsujimoto M, Aoki J, Arai H and Ohwada T. Synthesis and evaluation

of lysophosphatidylserine analogues as inducers of mast cell degranulation.

Potent activities of lysophosphatidylthreonine and its 2-deoxy derivative. *J Med Chem* 52: 5837-5863, 2009.

40 Uwamizu A, Inoue A, Suzuki K, Okudaira M, Shuto A, Shinjo Y, Ishiguro J, Makide K, Ikubo M, Nakamura S, Jung S, Sayama M, Otani Y, Ohwada T and Aoki J. Lysophosphatidylserine analogues differentially activate three LysoPS receptors. *J Biochem Epub* ahead of print 2014.

41 DeRose P, Thorpe PE and Gerber DE. Development of bavituximab, a vascular targeting agent with immune-modulating properties, for lung cancer treatment. *Immunotherapy* 3: 933-944, 2011.

42 Digumarti R, Bapsy PP, Suresh AV, Bhattacharyya GS, Dasappa L, Shan JS and Gerber DE. Bavituximab plus paclitaxel and carboplatin for the treatment of advanced non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer* 86: 231-236, 2014.

43 Fonseca C and Dranoff G. Capitalizing on the immunogenicity of dying tumor cells. *Clin Cancer Res* 14: 1603-1608, 2008.

44 Doffek K, Chen X, Sugg SL and Shilyansky J. Phosphatidylserine

inhibits NFkappaB and p38 MAPK activation in human monocyte derived dendritic cells. *Mol Immunol* 48: 1771-1777, 2011.

45 He J, Yin Y, Luster TA, Watkins L and Thorpe PE. Antiphosphatidylserine antibody combined with irradiation damages tumor blood vessels and induces tumor immunity in a rat model of glioblastoma. *Clin Cancer Res* 15: 6871-6880, 2009.