

論文の内容の要旨

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

背景と目的

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。さらに、リン脂質を分解する酵素であるホスホリパーゼ、および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、癌の発育や浸潤にも関与していることが報告されるようになった。

代表的なリン脂質として、アセチルコリン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、PI3 キナーゼの基質となり PI3K/Akt 経路の活性化に関与するホスファチジルイノシトール、細胞の脂質二重膜の細胞質側に局在し、アポトーシス誘導に際して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。これらリン脂質はホスホリパーゼにより分解されるが、特にホスホリパーゼ A2 は以前より多く研究されており、近年、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。また、代表的なリゾリン脂質であるリゾホスファチジン酸、スフィンゴシン-1-リン酸が脳・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様々な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。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促進作用、T 細胞の増殖抑制作用、また神経細胞の分化誘導作用など、様々な生理活性を有することが報告されている。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報告や 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、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と考えられる。

私は、特に lysoPS が腫瘍細胞遊走能に関与すること、および lysoPS 受容体発現が胃癌浸潤能と相関関係にあることに注目し、PS-PLA₁ および lysoPS が大腸癌の発育・進展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、大腸癌組織における PS-PLA₁ 発現と臨床病理学的因子の関連について、免疫組織化学染色により検討し、次いで、lysoPS のヒト大腸癌細胞株への

影響について *in vitro* の系を用いて検討を行った。

方法・結果

1) 【大腸癌組織における PS-PLA₁ 発現と臨床病理学的因子の関連】

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 例を対象に、ラット抗ヒト PS-PLA₁ モノクローナル抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。PS-PLA₁ は主に癌細胞の細胞質に発現しており、その染色強度により PS-PLA₁ 強発現・弱発現に分類したところ、PS-PLA₁ 強発現例は 42 例 (49.4%)、弱発現例は 43 例 (50.6%) であった。PS-PLA₁ の発現と臨床病理学的因子との関連について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おり、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。また、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ところ、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)。しかし、Cox の比例ハザードモデルを用いた予後不良の独立リスク因子の検討では、血行性転移陽性のみが予後不良の独立リスク因子であった。

2) 【LysoPS のヒト大腸癌細胞株への影響】

ヒト大腸癌細胞株 (Caco-2, SW480, HT-29, DLD-1, WiDr, LoVo) における lysoPS 受容体 (GPR34、P2Y10 および GPR174) 発現を RT-PCR 法にて検討したところ、GPR34 は全ての細胞株に発現していたが、P2Y10 および GPR174 は、WiDR および LoVo に発現が見られなかった。この結果を踏まえ、lysoPS 受容体発現の異なる SW480 および LoVo を実験に用いることとした。最初に、細胞遊走能に及ぼす lysoPS の影響を検討したところ、lysoPS は両細胞株の遊走能 (Chemotaxis および Chemokinesis) を促進させた。このことから、両細胞株に共通する GPR34 受容体を介した作用であると考えた。それを確認するため、次に siRNA 技術により GPR34 をノックダウンした SW480 細胞を用いて検討したところ、lysoPS の細胞遊走能促進効果は認められず、GPR34 を介した作用であることを確認した。また、この GPR34 を介した lysoPS 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、シグナル伝達経路の阻害薬を用いて検討を行った。百日咳毒素 (G 蛋白共役型受容体の α サブユニット (Gi) を阻害)、もしくは wortmannin (PI3 kinase/Akt 阻害剤) で前処理した場合、lysoPS の細胞遊走能促進作用が減弱したが、genistein (mitogen-activated protein kinase (MAPK) を阻害) の影響は認められなかった。さらには、SW480 に lysoPS (10 μ M) を作用させ、Akt のリン酸化を Western blotting にて経時的に評価したところ、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。これらのことから、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と考えた。一方、大腸癌細胞株の増殖能に対する lysoPS の促進効果や、細胞外基質との接着能および β 1-インテグリンの発現に対する lysoPS の影響は認められなかった。

考察

本研究では、まず、免疫染色により大腸癌組織における PS-PLA₁ 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。その結果、大腸癌組織において、PS-PLA₁ は癌細胞の細胞質に主に発現することが確認され、さらに PS-PLA₁ 発現は大腸癌の深達度・血行性転移の有無と有意に相関することが確認された。PS-PLA₁ 高発現群では、深達度がより高度な症例や、血行性転移を有する症例が多いという結果であり、PS-PLA₁ 発現が、大腸癌の浸潤や転移における重要な因子であると考えた。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。

次いで、大腸癌細胞株を用い、癌が浸潤・転移する過程において重要な機能である細胞遊走能、増殖能、および接着能に及ぼす lysoPS の影響を検討した。その結果、lysoPS による細胞遊走能促進効果が認められ、3 種類の lysoPS 受容体 (GPR34, P2Y10, GPR174) のうち、GPR34 がその作用に関与すること、さらに細胞内シグナル伝達経路において PI3K/Akt 経路が重要であると考えた。一方で細胞増殖能に対する lysoPS の促進効果、接着能に対する lysoPS の影響は認められなかった。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。

今回の免疫染色と細胞実験の結果を合わせると、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、アポトーシス誘導などにより細胞表面に露出した PS を分解し、lysoPS が産生され、この lysoPS が GPR34、PI3K/Akt 経路を介して大腸癌細胞の遊走能を促進し、その結果癌の浸潤・転移に促進的に働いているものと推測される。本研究は、PS-PLA₁、lysoPS と大腸癌浸潤・転移へ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。