

# スフィンゴ脂質バランスを指標とした大腸癌の早期診断技術の開発

長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科

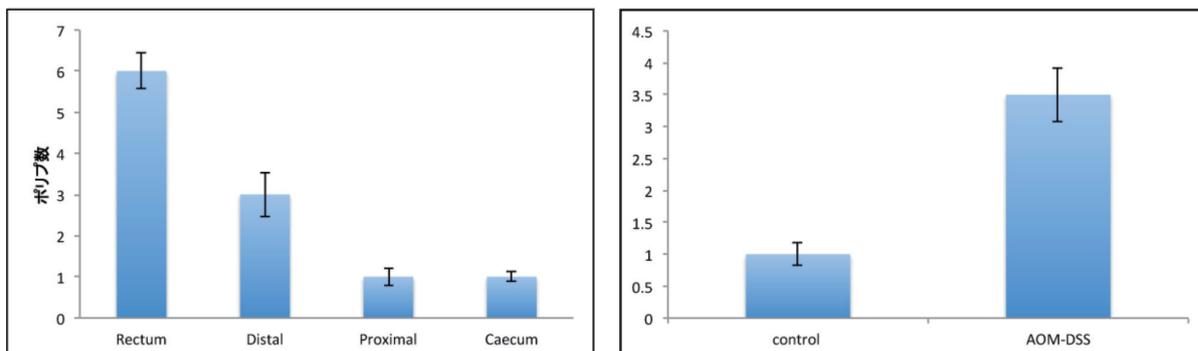
准教授 塚原 完

## はじめに

大腸癌は中高年において増加している癌であるが、早期発見、早期治療で治癒できる可能性が高い癌でもある。しかしながら早期発見のかけ声で行われている大腸癌検査に抵抗を示すヒトがいることも確かである。我々は早期診断技術の開発を行うために、金沢医科大学消化器外科の医員と共同でヒト大腸癌患部組織を採取し、組織中のスフィンゴ脂質量をLC-MS法により測定してきた。その結果、癌組織中にはスフィンゴ脂質の1つであるスフィンゴミエリン量が上昇し、セラミド量が有為に減少していることを突き止めた。セラミドは細胞死を誘導する脂質として報告されてきたが、大腸発癌の亢進とスフィンゴ脂質のバランス量に関連性が認められた。これらの結果を元に早期診断技術の開発を行う。大腸癌組織中におけるスフィンゴ脂質の働きは未だ明らかにされていない。その理由として、セラミドに限定しても脂肪酸とスフィンゴインドの炭素鎖の長さの違いを考えると、実に350種類以上ものセラミド分子種が存在することが明らかになっている。これらの多数の分子種を高速かつ高精度で測定するためには、高性能かつ最適化されたLC-MS/MS装置が必要となる。これらの分子種を正確に明らかにするためにマウスのDSSモデルを作製し、セラミド分子種を明らかにすることを第一目標とし、その後、ヒトサンプルによる解析を行う手順とした。我々は、大腸癌の転移・耐性化抑制機構における脂質代謝の役割をリポミクス技術の応用により大腸癌の存在や進行度に反映した脂質代謝物を明確にすることを目標とする。本研究では、ヒト大腸癌患部組織中のスフィンゴ脂質量をLC-MS/MS法により測定する前に、マウスを利用した炎症性大腸発癌モデルを作製し、そのがん患部組織からの効率的な全脂質の抽出法を検討した。その理由として、これまで脂質抽出に利用してきたBligh & Dyer法のみでは目的とするスフィンゴ脂質の抽出が不完全であり、これらの脂質の多種多様な分子種の微量解析をより正確に行うためである。

## 結 果

慢性的炎症が大腸癌の発癌に関与することに着目して、アゾキシメタン (AOM) とデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) によるマウス炎症発癌モデルを作出した。AOM/DSS投与11週後に開腹し、大腸の長さおよびポリープの数をカウントした。AOM/DSS化学発癌モデルでは大腸の短縮がコントロールと比較して有為に認められた。本法では平均分子量40kDaのDSSを使



用したが、既報通り、発生したポリープは大腸遠位のdistalおよびrectumに多発した（左上図）。HE染色像においても、前癌段階に見られる粘膜上皮杯細胞の高度な異形成が観察され、粘膜上皮細胞および杯細胞の形態が著しく変化していた。AOM/DSS処理マウスの大腸ポリープにおけるマーカー遺伝子とスフィンゴ脂質関連酵素遺伝子群の解析をリアルタイムPCR法により明らかにした。その結果、ポリープ多発部位には炎症性マーカー（TNF- $\alpha$ 、IL-6、MCP-1）が高発現することが明らかとなり、大腸上皮腫瘍マーカーの一つである核内受容体の一つであるPPAR $\gamma$ の発現が有意に増加していた（右上図）。さらに、ポリープ多発部位にはSMase（SMase1およびSMase2）のmRNAレベルが低下することを明らかにした。このことから、セラミド生成・代謝酵素群の活性変動の可能性が予想された。

## 考 察

本モデルの作出に予想以上の時間を消費しており、現在、マウス大腸から正常組織（N）およびAOM/DSS処理組織（caecum、proximal、distal、rectum）を採取したところである。今後、全蛋白質の抽出および全脂質を新規に検討したB&W改法により抽出し、LC-MS/MSによる解析を行う予定である。その後、ヒト大腸癌患部組織中のスフィンゴ脂質量をLC-MS/MS法により測定する予定である。

## 要 約

大腸癌細胞株に作用させるとセラミドが増加することが報告されている。このことはセラミドが抗腫瘍作用に関係すると考えられている。しかしながら、大腸癌組織中におけるスフィンゴ脂質の働きは未だ明らかにされていない。その理由として、セラミドに限定しても脂肪酸とスフィンゴインドの炭素鎖の長さの違いを考えると、実に350種類以上ものセラミド分子種が存在することが明らかになっている。これらの多数の分子種を高速かつ高精度で測定するためには、高性能かつ最適化されたLC-MS/MS装置が必要となる。共同研究先であるお茶の水女子大学にはこれらの設備が既に設置済みであり、スフィンゴ脂質を標的とした高分解能解析が既に実働中である。我々はこれらの分子種を網羅的に迅速かつ高感度に測定す

ることで、大腸癌における特異的な新規脂質性バイオマーカーの同定を行い、これらの結果を大腸癌早期診断技術の開発へ開花させたい。

## 文 献

1. Tsukahara T, Haniu H, Matsuda Y. Cyclic phosphatidic acid induces G0/G1 arrest, inhibits AKT phosphorylation, and downregulates cyclin D1 expression in colorectal cancer cells. *Cell Mol Biol Lett.* 2015 Mar;20 (1) :38-47. doi: 10.2478/s11658-014-0224-2.