

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15471

研究課題名(和文)メタボローム解析による乳癌代謝動態に關する脂質メディエーター分子機構の解明

研究課題名(英文)The molecular mechanism of a lipid mediator involved in metabolic dynamics of breast cancer

研究代表者

永橋 昌幸 (Nagahashi, Masayuki)

新潟大学・医歯学総合病院・講師

研究者番号：30743918

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：スフィンゴシンキナーゼ(SphK1およびSphK2)によって産生されるスフィンゴシン-1-リン酸(S1P)は、多面的な生理活性脂質メディエーターである。S1Pの癌細胞特異的代謝調節における役割について研究を行った。SphK1およびSphK2ノックアウト乳癌細胞の代謝物プロファイルは、解糖経路およびTCAサイクル等において有意な変化を認めた。今回の結果は、S1Pとスフィンゴシンキナーゼが癌特異的代謝において重要な役割を果たすことを示唆している。

研究成果の概要(英文)：A pleiotropic bioactive lipid mediator, sphingosine-1-phosphate (S1P), produced by sphingosine kinases (SphK1 and SphK2) regulates many physiological and pathological processes. We hypothesized that SphKs regulates cancer cell-specific metabolism, which related to the cancer cell proliferation and survival. Metabolomics profiles of both SphK1KO and SphK2KO breast cancer cells were dramatically changed in the glycolysis pathway and TCA cycle compared to the control cells. Our data suggests that SphKs play an important role in cancer specific metabolism.

研究分野：腫瘍外科

キーワード：脂質メディエーター スフィンゴシン-1-リン酸 スフィンゴシンキナーゼ 癌代謝 メタボローム CR  
ISPR/Cas9

1. 研究開始当初の背景

癌細胞は酸素が十分に存在していても解糖系をより利用して ATP を産生することが Warburg 効果として知られている。癌細胞がエネルギー効率の悪い解糖系を使う理由として、癌細胞が活発に増殖するためには ATP のみならず、核酸、蛋白質、脂質などの生体高分子および抗酸化物質であるグルタチオンなどが不可欠であり、これらの分子の原料は解糖系で合成されるためであると推察されている。しかし、癌に特有の代謝動態の制御機構はいまだ分からない点が多い。

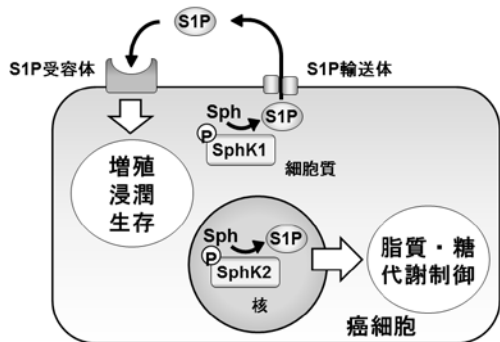


図 1. S1P による細胞機能制御

脂質メディエーターである S1P は細胞内で 2 つの異なるスフィンゴシンキナーゼによって産生される (図 1)。スフィンゴシンキナーゼ 1 型 (SphK1) は主に細胞質に存在し、SphK1 によって産生された S1P は細胞外に放出され、細胞表面の S1P 受容体に作用し、細胞の増殖、浸潤、生存などに寄与する。一方、スフィンゴシンキナーゼ 2 型 (SphK2) は、ミトコンドリア内や核内に豊富に存在しており、ミトコンドリア内の SphK2 は  $\beta$  酸化に関わっていることが報告されている。核内の SphK2 の生理作用はこれまで不明であったが、今回申請者らは、正常肝細胞において、核内に存在する SphK2 が産生した S1P が、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) を阻害し、ヒストンのアセチル化を促進することで、脂質・糖代謝に関わる遺伝子の転写を制御していることを解明し世界で初めて報告した (Nagahashi et al. Hepatology 2014) (図 2)。

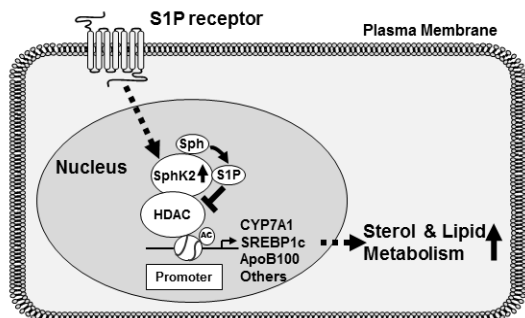


図 2. 核内 S1P による HDAC 阻害と転写の制御

しかし、S1P および SphK1、SphK2 が癌代謝動態に与える影響は未解明であった。申請者らのこれまでの予備実験により、乳癌においては SphK1 が亢進するとともに、SphK2 が抑制されていることが分かった (図 3)。申請者は「乳癌において、癌を悪化させる SphK1 が活性化され、正常細胞の代謝を司る SphK2 が抑制されることで、癌の代謝動態が制御されている (図 3)」という仮説を立て本研究を企画した。



図 3. 癌細胞におけるスフィンゴシンキナーゼと代謝の制御 (仮説)

2. 研究の目的

本研究の目的は、「脂質メディエーターによって制御される癌代謝動態の分子機構を明らかにし、その臨床的意義を明らかにすること」である。

3. 研究の方法

2 つのスフィンゴシンキナーゼ (SphK1・SphK2) をノックダウンさせた細胞株を樹立し、メタボロームおよびリポドミクス解析を行った。ノックダウンには shRNA もしくは CRISPR/Cas9 遺伝子編集技術を用いた。本研究では C57BL/6 系統のマウス由来の乳癌である 4T1 細胞及び E0771 細胞を用いて実験を行った。SphK1 もしくは SphK2 をノックダウンさせた各々の細胞株とコントロール細胞株において、癌細胞の増殖能・生存能の比較と、メタボローム解析およびリポドミクス解析とを行った。メタボローム解析では、網羅的に代謝産物を解析すると同時に、特に解糖系、TCA 回路、グルタミン代謝、グルタチオンの産生など癌細胞に特徴的な代謝経路に焦点を当て解析を行った。リポドミクス解析では S1P とその前駆体であるスフィンゴシン、セラミドなどに注目し、データを分析した。S1P 情報伝達系と癌代謝動態の関連を分析した。

4. 研究成果

SphK1 ノックダウン 4T1 細胞では、野生型の 4T1 細胞と比較して、細胞増殖能が有意に低下した。SphK1 ノックダウン細胞の遊走能も野生型と比して有意に抑制されていた。

E0771 細胞を用いた実験においても同様に SphK1 ノックダウン E0771 細胞では、野生型細胞と比較して、細胞増殖能が有意に低下した。SphK1 ノックダウン細胞の遊走能も野生型と比して有意に抑制されていた。

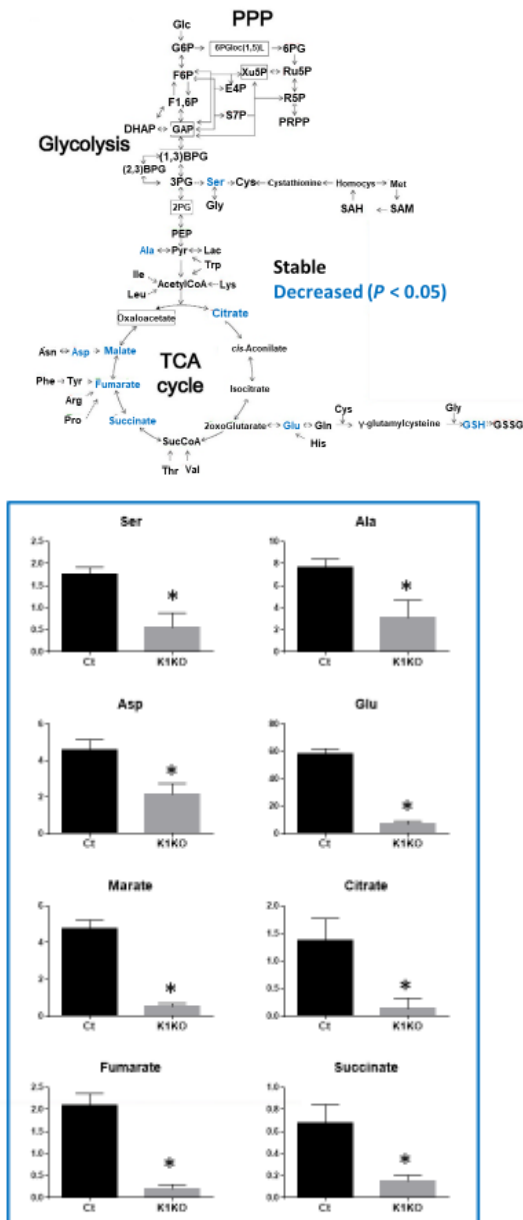


図 4. SphK1 ノックダウン 4T1 細胞のメタボローム解析

メタボローム解析の結果、SphK1 ノックダウン 4T1 細胞では野生型の 4T1 細胞と比較して一部のアミノ酸合成や TCA 回路の代謝産物の低下を認めた (図 4)。また、SphK1 ノックダウン 4T1 細胞では、ATP の産生が有意に低下していた。

さらに、SphK1 ノックダウン 4T1 細胞ではグルタチオン (GSH) の産生が有意に低下しており、細胞生存、酸化ストレス、薬剤耐性などに対する SphK1 の重要な働きを示唆していた (図 5)。E0771 細胞におけるメタボローム解析の結果も同様の結果が得られた。

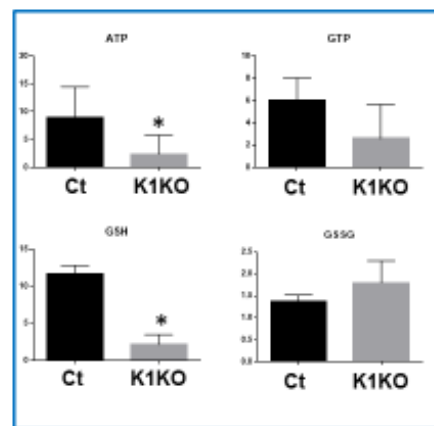
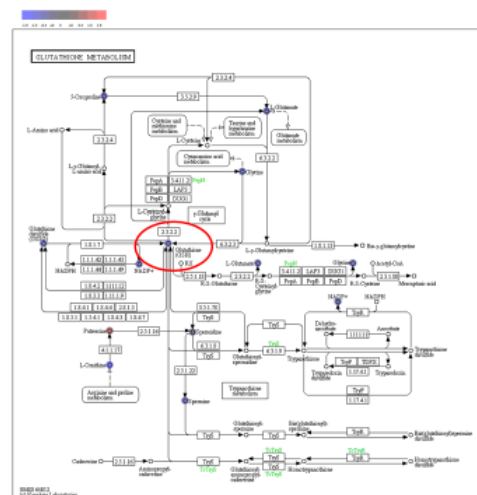


図 5. SphK1 ノックダウン 4T1 細胞における酸化ストレス関連代謝産物

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

Nagahashi M, Yuza K, Hirose Y, Nakajima M, Ramanathan R, Hait NC, Hylemon PB, Zhou H, Takabe K, Wakai T. The roles of bile acids and sphingosine-1-phosphate signaling in the hepatobiliary diseases. *J Lipid Res.* 2016;57:1636-43

Nagahashi M, Matsuda Y, Moro K, Tsuchida J, Soma D, Hirose Y, Kobayashi T, Kosugi S, Takabe K, Komatsu M, Wakai T. DNA damage response and sphingolipid signaling in liver diseases. *Surg Today.* 2016;46:995-1005

永橋昌幸, 大橋 拓, 滝沢一泰, 坂田 純, 小林 隆, 若井俊文. 脂質メディエーターを介した胆汁酸シグナル伝達系の役割. *胆道.* 2016;30:220-227

Moro K, Nagahashi M, Ramanathan R, Takabe K, Wakai T. Resolvins and omega three

polyunsaturated fatty acids: Clinical implications in inflammatory diseases and cancer. World J Clin Cases. 2016;4:155-64

Wang Y, Aoki H, Yang J, Peng K, Liu R, Li X, Qiang X, Sun L, Gurley EC, Lai G, Zhang L, Liang G, **Nagahashi M**, Takabe K, Pandak WM, Hylemon PB, Zhou H. The role of sphingosine 1-phosphate receptor 2 in bile-acid-induced cholangiocyte proliferation and cholestasis-induced liver injury in mice. Hepatology. 2017;65:2005-2018

Katsuta E, Yan L, **Nagahashi M**, Raza A, Sturgill JL, Lyon DE, Rashid OM, Hait NC, Takabe K. Doxorubicin effect is enhanced by sphingosine-1-phosphate signaling antagonist in breast cancer. J Surg Res. 2017;219:202-213

Hylemon PB, Takabe K, Dozmorov M, **Nagahashi M**, Zhou H. Bile acids as global regulators of hepatic nutrient metabolism. Liver Res 2017;1:10-16

Moro K, Kawaguchi T, Tsuchida J, Gabriel E, Qi Q, Yan L, Wakai T, Takabe K, **Nagahashi M**. Ceramide species are elevated in human breast cancer and are associated with less aggressiveness. Oncotarget. 2018;9:19874-19890

〔学会発表〕（計 17 件）

**永橋昌幸**, 廣瀬雄己, 須藤 翔, 大橋 拓, 滝沢一泰, 高野可赴, 坂田 純, 小林 隆, 若井俊文. 胆汁酸はスフィンゴシン-1-リン酸シグナル伝達系を介して肝臓における脂質代謝を調節している. 第 51 日本胆道学会学術集会 (栃木県宇都宮市) 2015.09.17

**Nagahashi M**, Moro K, Tsuchida J, Tatsuda K, Toshikawa C, Hasegawa M, Shimada Y, Takabe K, **Saijo Y**, Wakai T. Specific inhibitor of a bioactive lipid mediator suppresses breast cancer-induced angiogenesis and lymphangiogenesis. 第 13 回日本臨床腫瘍学会学術集会 (北海道札幌市) 2015.07.16

Tsuchida J, **Nagahashi M**, Moro K, Tatsuda K, **Koyama Y**, Takabe K, Wakai T. Obesity increases the lipid mediator, sphingosine-1-phosphate in the tumor and tumor microenvironment, and promotes tumor progression. San Antonio Breast Cancer Symposium 2015 (San Antonio, USA) 2015.12.08

**Nagahashi M**, Tsuchida J, Moro K, Niwano T, Tatsuda K, Toshikawa C, Hasegawa M, **Koyama Y**, **Kobayashi T**, **Kosugi SI**, Kameyama H, Aoki H, Takabe K, Wakai T. Dysregulation of Sphingolipids in Human Breast Cancer. The 11th

Annual Academic Surgical Congress (Jacksonville, USA) 2016.02.02

Tsuchida J, **Nagahashi M**, Moro K, Niwano T, Tatsuda K, Toshikawa C, Hasegawa M, **Koyama Y**, Kbayashi T, **Kosugi SI**, Kameyama H, Aoki H, Takabe K, Wakai T. Serum sphingosine-1-phosphate levels are elevated in breast cancer patients with lymph node metastasis. The 11th Annual Academic Surgical Congress. (Jacksonville, USA) 2016.02.02

**永橋昌幸**, 大溪彩香, 遠藤麻巳子, 土田純子, 諸 和樹, 庭野稔之, 辰田久美子, 利川千絵, 長谷川美樹, 五十嵐麻由子, 中島真人, **小山 諭**, 山田顕光, 青柳智義, 高部和明, 若井俊文. 肥満によって促進される乳癌の血管新生に対する抗スフィンゴシン-1-リン酸受容体治療. 第 24 回日本乳癌学会学術総会 (東京都江東区) 2016.06.16

中島真人, **永橋昌幸**, 大溪彩香, 遠藤麻巳子, 土田純子, 諸 和樹, 庭野稔之, 辰田久美子, 利川千絵, 長谷川美樹, 五十嵐麻由子, **小山 諭**, 若井俊文. 乳がん手術検体におけるスフィンゴリン脂質の定量. 第 24 回日本乳癌学会学術総会 (東京都江東区) 2016.06.16

土田純子, **永橋昌幸**, 遠藤麻巳子, 大溪彩香, 庭野稔之, 辰田久美子, 利川千絵, 長谷川美樹, 五十嵐麻由子, **小山 諭**, 高部和明, 若井俊文. 肥満を伴う乳癌患者における血清スフィンゴシン-1-リン酸の定量. 第 78 回臨床外科学会総会 (東京都港区) 2016.11.24

Hanyu T, Ichikawa H, Ishikawa T, **Kosugi S**, Nakajima M, Sakata J, **Kobayashi T**, Kameyama H, Wakai T, **Nagahashi M**. Expression of Phosphorylated Sphingosine Kinase 1 Is Associated with Invasiveness of Gastric Cancer. The 12th Annual Academic Surgical Congress (Las Vegas, USA) 2017.02.07

**Nagahashi M**, Nakajima M, Saito T, Komatsu M, Soga T, Zhao R, Zhou H, Okuda S, Takabe K, Wakai T. Sphingosine Kinase 1 Contributes to Breast Cancer Cell Metabolism and Survival. The 12th Annual Academic Surgical Congress (Las Vegas, USA) 2017.02.07

Tsuchida J, Nakajima M, Moro K, Ohtani A, Endo M, Niwano T, Tatsuda K, Toshikawa C, Hasegawa M, Ikarashi M, **Koyama Y**, Sakata J, **Kobayashi T**, Kameyama H, Wakai T, Takabe K, **Nagahashi M**. Obesity-induced Sphingosine-1-phosphate in Breast Cancer Interstitial Fluid Promotes Angiogenesis. The 12th Annual Academic Surgical Congress (Las Vegas, USA) 2017.02.07

Nakajima M, Miura Y, Ando T, Yuza K, Tsuchida J, Tajima Y, Abe M, Sakimura K, Wakai T, **Nagahashi M**. Roles of Sphingosine-1-Phosphate Produced by Sphingosine Kinases in Pancreatic Cancer Progression. The 12th Annual Academic Surgical Congress (Las Vegas, USA) 2017.02.07

諸 和樹, **永橋昌幸**, 遠藤麻巳子, 大溪彩香, 土田純子, 庭野稔之, 辰田久美子, 長谷川美樹, 利川千絵, 五十嵐麻由子, 中島真人, **小山 諭**, 坂田 純, 亀山仁史, 小林 隆, 高部和明, 若井俊文 乳癌および周囲微小環境では高濃度のセラミドが産生される. 第 117 回日本外科学会定期学術集会 (神奈川県横浜市) 2017.04.27

**永橋昌幸**, 中島真人, 土田純子, 諸 和樹, 遠藤麻巳子, 大溪彩香, 庭野稔之, 辰田久美子, 長谷川美樹, 利川千絵, 五十嵐麻由子, 坂田 純, 亀山仁史, 小林 隆, 高部和明, 斎藤哲也, 小松雅明, 曾我朋義, **小山 諭**, 若井俊文 乳癌細胞の代謝動態におけるスフィンゴシン-1-リン酸産生酵素の働き. 第 24 回外科侵襲とサイトカイン研究会 (新潟県新潟市) 2017.07.07

Tsuchida J, **Nagahashi M**, Nakajima M, Takabe K, Wakai T. Sphingosine-1-phosphate and tumor-associated immune cells in the tumor microenvironment. 第 76 回日本癌学会学術総会 (神奈川県横浜市) 2017.09.29

**Nagahashi M**, Nakajima M, Abe M, Saito T, Komatsu M, Soga T, Tsuchida J, Yuza K, Takabe K, Sakimura K, Wakai T. Breast Cancer Cell Metabolism Is Regulated by Sphingosine Kinases. The 13th Annual Academic Surgical Congress (Jacksonville, USA) 2018.02.01

Moro K, Kawaguchi T, Tsuchida J, Gabriel E, Qi Q, Yan L, Sato N, Wakai T, Takabe K, **Nagahashi M**. Ceramide species are elevated with activation of ceramide biosynthesis pathways in human breast cancer. The 13th Annual Academic Surgical Congress (Jacksonville, USA) 2018.02.01

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

〔その他〕 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永橋 昌幸 (NAGAHASHI, Masayuki)

新潟大学・医歯学総合病院・講師

研究者番号 : 30743918

(2) 研究分担者

西條 康夫 (SAIJO, Yasuo)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号 : 10270828

小山 諭 (KOYAMA, Yu)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号 : 10323966

小杉 伸一 (KOSUGI, Shin-ichi)

新潟大学・医歯学総合病院・特任教授

研究者番号 : 90401736

小林 隆 (KOBAYASHI, Takashi)

新潟大学・医歯学総合病院・講師

研究者番号 : 40464010

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし