

令和元年5月30日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19055

研究課題名(和文)ABC輸送体による脂質メディエーター排出が乳癌微小環境に及ぼす影響

研究課題名(英文)Effect of lipid mediator pumped out by ABC transporter to breast cancer microenvironment

研究代表者

山田 顕光(Akimitsu, Yamada)

横浜市立大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：90567603

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：ABC輸送体過剰細胞乳癌細胞を用いた細胞実験およびマウスへの同種/異種移植モデルを用いて、脂質メディエーターであるスフィンゴシン1リン酸(S1P)がABC輸送体によって汲み出されることで乳癌の発育を促進し、微小環境、特に血管・リンパ管新生を促進させていることを立証した。またヒト乳癌においてもS1P生成酵素とABC輸送体が共発現する乳癌の予後が不良となることを明らかにした。S1Pがヒト乳癌において微小環境に影響を与えて乳癌の増悪に関わっており、S1Pは乳癌治療の標的となりうることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、脂質シグナル伝達物質S1Pが生成/排出のサイクルを介して乳癌微小環境に作用し乳癌の増悪に関与していることが示された。現在S1Pシグナルを標的とした治療薬として、S1P受容体修飾薬が、本邦では未承認であるが海外では免疫修飾薬として多発性硬化症に投与されており、潰瘍性大腸炎・関節リウマチなどに対する臨床試験が行われている。今後、S1Pシグナル標的治療が癌治療へ応用される可能性があり、本研究がその一助となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Sphingosine-1-phosphate (S1P), a bioactive sphingolipid mediator, has been implicated in regulation of many processes important for breast cancer progression. We demonstrated that overexpression of ABC transporter that efflux S1P in breast cancer cells enhanced S1P secretion, proliferation and migration of breast cancer cells. Implantation of these cells into the mammary fat pad of mice markedly enhanced tumor growth, angiogenesis and lymphangiogenesis with a concomitant increase in lymph node and lung metastases as well as shorter survival. Furthermore, patients with breast cancers that express both activated SPHK1 and ABC transporter have significantly shorter disease-free survival. These findings suggest that export of S1P via ABC transporter functions in a malicious feed-forward manner to amplify the S1P axis involved in breast cancer progression and metastasis, which has important implications for prognosis of breast cancer patients and for potential therapeutic targets.

研究分野：医歯薬学

キーワード：乳癌 ABC輸送体 S1P 癌微小環境

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

乳癌は本邦女性において最も罹患率の高い癌種である(1)。その治療の一つには抗癌剤を含めた薬物療法を行うことがあるが、腫瘍の抗癌剤抵抗性機序の一つに薬物排出蛋白である ABC 輸送体の存在が知られている(2)。申請者は、予後不良と言われる乳癌亜型で特定の ABC 輸送体の頻度が高いことを報告したがその機序は明らかではなく、ABC 輸送体の薬剤耐性以外の要素の存在が疑われた(3)。

2. 研究の目的

ABC 輸送体はこれまで薬剤排出輸送体として癌治療抵抗性との関連が報告されてきた。新規脂質メディエーターである S1P は細胞内での生成・細胞内から外への排出・受容体への結合を経て細胞増殖・浸潤や免疫細胞や脈管細胞の遊走に寄与する(4)。ABC 輸送体は S1P も輸送する。本研究では ABC 輸送体による S1P の排出に着目し、細胞外の S1P が癌の微小環境を整えて乳癌の発育を促進することを証明する。ABC 輸送体を過剰発現させた乳癌細胞株を用いた細胞実験において S1P シグナル経路の発現・動物実験において S1P による癌微小環境の変化を分子生物学的に解析する。ヒト乳癌組織中の S1P シグナル経路および微小環境に関する蛋白発現解析を免疫組織化学染色法にて行う。本研究によって S1P シグナル経路が新たな乳癌治療の標的となる可能性がある。

3. 研究の方法

ABC 輸送体による S1P の排出に着目し、癌細胞から汲みだされた細胞外の S1P によって癌の微小環境が整えられることで乳癌の発育が促進されると仮定した。そこで申請者は ABC 輸送体の発現多寡による S1P シグナル経路の活性の変化の解析、および増殖・浸潤・薬剤耐性といった細胞の生物学的特徴の変化の解析、ABC 輸送体過剰発現乳癌細胞を用いたマウス同所移植モデルによる、微小環境解析、ヒト乳癌組織における S1P シグナル系と微小環境の関連を検証した。

4. 研究成果

S1P 排出性 ABC 輸送体過剰発現乳癌細胞は、S1P 分泌を促進し、血管・リンパ管新生を促し、癌細胞の発育や遊走を促進させる：ヒト乳癌細胞 MCF7、マウス乳癌細胞 4T1 に S1P を排出する ABCC1 と S1P を排出しない ABCB1 を

過剰発現させ、コントロール細胞群と、細胞増殖能、遊走能、脈管新生能を検証した。細胞外の S1P 濃度は、ABCC1 過剰発現細胞株で有意に上昇し(図 1A)、細胞増殖・郵送・脈管形成を促進させた(図 1B-D)。

マウスモデルにおいて S1P 排出性 ABC 輸送体過剰発現乳癌腫瘍は増殖が速く、腫瘍周囲の脈管形成を促進し、予後不良となる：上記 ABC 輸送体過剰発現乳癌細胞を Balb/c マウス(4T1)、ヌードマウス(MCF7)の乳腺に移植しその発育を検証した。ABCC1 発現乳癌腫瘍は増殖が速く(図 2A)、予後不良であった。腫瘍を単細胞分離し、フローサイトメトリーで

腫瘍内の血管上皮細胞・リンパ上皮細胞を定量したところ ABCC1 過剰発現乳癌内の血管・リンパ管上皮数が有意に上昇していた。

ヒト乳癌において S1P 産生酵素(スフィンゴキナーゼ 1 : SphK1)と S1P 排出 ABC 輸送体が共発現しているものは予後不良である：約 300 例のヒト乳癌における SphK1 と ABC 輸送体の発現(図 3A)および予後との相関(図 3B)を解析した。ヒト乳癌において S1P を作り出し(pSphK1 発現あり)、汲みだせる(ABCC1 発現あり)乳癌が予後不良であることが明らかになり、ヒト乳癌においても S1P が癌の発育に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

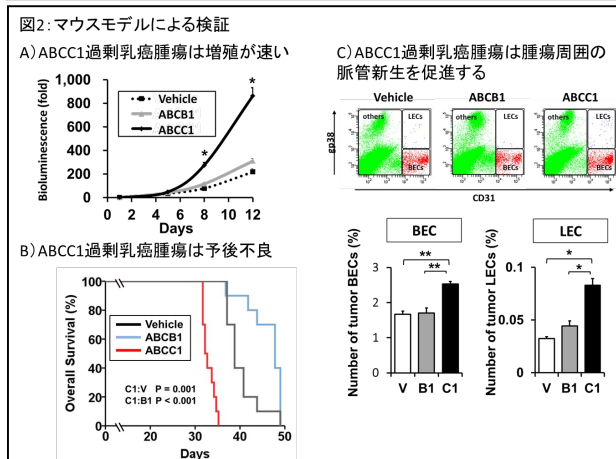
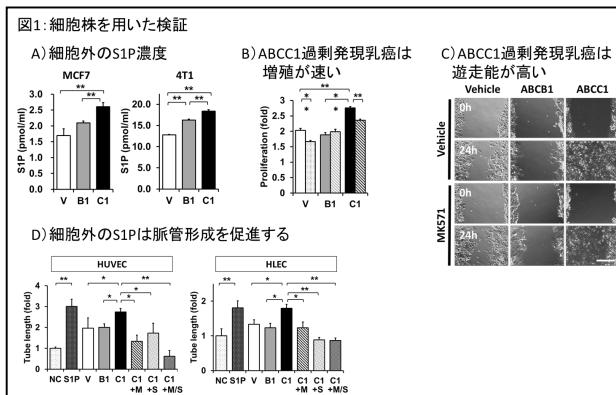
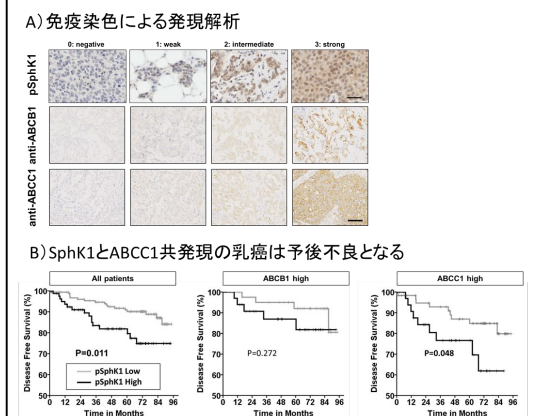


図3: ヒト乳癌検体におけるS1P産生酵素(SphK1)とABC輸送体発現解析



本研究によって乳癌細胞内で作り出された S1P が、ABC 輸送体によって汲み出されることで周囲の微小環境に作用し、腫瘍の増殖促進に寄与することを明らかにした。S1P シグナルを標的とした治療薬は種々開発されており(4)、今後はヒト乳癌に対する抗 S1P シグナル薬への適応にむけた研究が期待される。

#### 引用文献

1) 国立がん研究センターがん対策情報センター, 2) Dean M, J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2009, 3) Yamada A, Breast Cancer Res Treat 2013, 4) Kunkel GT, Nat Rev Drug Discov 2013

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. Yamada A, Nagahashi M, Aoyagi T, Huang WC, Lima S, Hait NC, Maiti A, Kida K, Terracina KP, Miyazaki H, Ishikawa T, Endo I, Waters MR, Qi Q, Yan L, Milstien S, Spiegel S, Takabe K. ABCC1-Exported Sphingosine-1-phosphate, Produced by Sphingosine Kinase 1, Shortens Survival of Mice and Patients with Breast Cancer. Mol Cancer Res. 2018 Jun;16(6):1059-1070. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-17-0353. (査読あり)
2. Nagahashi M, Yamada A#, Katsuta E, Aoyagi T, Huang WC, Terracina KP, Hait NC, Allegood JC, Tsuchida J, Yuza K, Nakajima M, Abe M, Sakimura K, Milstien S, Wakai T, Spiegel S, Takabe K. Targeting the SphK1/S1P/S1PR1 Axis That Links Obesity, Chronic Inflammation, and Breast Cancer Metastasis. Cancer Res 2018 Apr 1;78(7):1713-1725. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-1423. # contributed equally (査読あり)
3. Shima H, Kida K, Adachi S, Yamada A\*, Sugae S, Narui K, Miyagi Y, Nishi M, Ryo A, Murata S, Taniguchi H, Ichikawa Y, Ishikawa T, Endo I. Lnc RNA H19 is associated with poor prognosis in breast cancer patients and promotes cancer stemness. Breast Cancer Res Treat. 2018 Aug;170(3):507-516. doi: 10.1007/s10549-018-4793-z. (査読あり)

〔学会発表〕(計 5 件)

Sphingosine-1-phosphate Produced by Sphingosine Kinase 1 and Exported via ABCC1 Shortens Survival of Mice and Humans with Breast Cancer, 40th Annual CTRC-AACR San Antonio Breast Cancer Symposium, San Antonio, 米国, 2017 年 12 月 8 日, ポスター(筆頭)

Targeting the SphK1/S1P/S1PR1 axis that connects obesity, chronic inflammation, and breast cancer metastasis, 40th Annual CTRC-AACR San Antonio Breast Cancer Symposium, San Antonio, 米国, 2017 年 12 月 6 日, ポスター(共著)

Long non-coding RNA H19 promotes cancer stemness and worsen breast cancer survival, 40th Annual CTRC-AACR San Antonio Breast Cancer Symposium, San Antonio, 米国, 2017 年 12 月 9 日, ポスター(共著)

ABCC11 はスフィンゴシン 1 リン酸 (S1P) を輸送して微小環境を整え、乳癌の増殖に寄与する, 第 26 回日本癌病態治療研究会, 2017 年 6 月 2 日, 横浜, ポスター(筆頭)

乳癌における H19 遺伝子の予後予測因子としての有用性の検討, 第 25 回日本乳癌学会学術総会, 2017 年 7 月 13 日, ポスター(共著)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

#### 6. 研究組織

(1)研究分担者: なし

(2)研究協力者：なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。