

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008 年度～2010 年度

課題番号：20590357

研究課題名（和文）マントル細胞リンパ腫におけるスフィンゴシン-1-リン酸受容体の発現とその応用

研究課題名（英文）Expression of sphingosine-1-phosphate receptors in mantle cell lymphoma and its practical application

研究代表者 定平 吉都 (SADAHIRA YOSHITO) 川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：30178694

研究成果の概要（和文）：本研究では、スフィンゴシン-1-リン酸受容体 1 (S1PR1) が、マントル細胞リンパ腫や一部の成人 T 細胞白血病/リンパ腫に高発現しており、パラフィン切片での免疫組織学的マーカーとして日常病理診断に応用できることがわかった。さらに、S1PR1 を高発現するマントル細胞リンパ腫株や HTLV-1 感染 T 細胞株を用いて FTY720 の効果を検討したところ、 $10\mu\text{M}$  の高濃度では PP2A の活性を高めることで細胞の増殖・生存を抑制するが、 $1\sim 10\text{nM}$  の低濃度では、FTY720 phosphate/S1PR1 シグナルを介して血清で誘導される細胞遊走を抑制する可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：In this study, we found that sphingosine-1-phosphate (S1PR1) was strongly expressed in mantle cell lymphoma and adult T-cell leukemia/lymphoma and S1PR1 immunohistochemistry can be used as a robust means for the diagnosis of mantle cell lymphoma in formalin-fixed and paraffin-embedded sections. We further studied the impacts of FTY 720 on mantle cell lymphoma cells and HTLV-1 infected T-cells with high S1PR1 expression. It showed possibility that FTY 720 of  $10\mu\text{M}$  concentration suppresses cell proliferation and survival of these cells by activating PP2A whereas that of 1 to  $10\text{nM}$  concentrations suppresses serum-induced cell motility via FTY720 phosphate /S1PR1 signaling.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	900, 000	270, 000	1, 170, 000
2009 年度	800, 000	240, 000	1, 040, 000
2010 年度	500, 000	150, 000	650, 000
年度			
年度			
総計	2, 200, 000	660, 000	2, 860, 000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：血液

(1) スフィンゴシン-1-リン酸 sphingosine-1-phosphate (S1P) は、血管内皮細胞やリンパ球、癌細胞の細胞運動の調節や増殖、生存に関与する lysophospholipid であり、血小板や血漿中に多量に含まれている。研究代表者は、1992 年、米国において、S1P が細胞運動を調節する内因性脂質メディエータ

ーであることを発見した (Sadahira Y et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:9686-9690, 1992)。その後、他研究室で血管内皮細胞にある edg-1 が、sphingosine-1-phosphate receptor であることが見出された。さらに S1P は 5 つのサブタイプの Edg ファミリー G 蛋白共役型受容体を介して多彩な生理効果を発揮することが報

告され、edg-1 は現在 S1PR1 と名称変更された。S1PR1 は血管内皮細胞やリンパ球、アストロサイトの細胞増殖や遊走に関与することが知られている。しかしながら、ヒト腫瘍における S1PR の役割はほとんど解明されていない。この原因のひとつに、これまで、S1PR に特異性の高い抗体が得られておらず、ヒトの生体内組織や腫瘍のどのような細胞にどのようなタイプの S1PR が高発現しているのか具体的な知見には乏しいことが挙げられる。

(2) 一方、生体内で S1PR の chemical modulator として働く FTY720 が見付き、最近、多発性硬化症に臨床応用されている。FTY720 は、生体内でリン酸化されて FTY720P となり S1PR (S1PR2 を除く) と結合・内在化することでこれを強力に down-regulation することが判明している。

## 2. 研究の目的

本研究では、悪性リンパ腫、特にマントル細胞リンパ腫における 5 つのタイプの S1P receptor (S1PR1~5) の発現を免疫染色や QT RT-PCR 法を用いて定量化し、病理診断への応用を検討する。さらに FTY720 のマントル細胞リンパ腫やその他リンパ腫の細胞株の増殖・生存、また細胞遊走に対する影響について検討し、その治療応用の可能性を探る。

## 3. 研究の方法

本研究では、悪性リンパ腫における 5 つのタイプの S1P receptor (S1PR1~5) の発現を免疫染色や real time RT-PCR 法を用いて定量化し、臨床病理学的パラメーターとの相関を調べることによって、リンパ・造血器腫瘍における S1PR の発現の臨床病理学的意義について検討する。次いで、その高発現がみられた悪性リンパ腫に関しては、その培養細胞株における S1PR の発現を western blot と免疫細胞化学によって確認し、さらに FTY720 などの S1PR modulator による培養細胞の細胞走化性の抑制の有無を Transwell assay で検討する。また、可能ならば SCID マウス腹腔内に移植したマントル細胞リンパ腫に対する S1PR modulator の効果を検討し、FTY720 の治療応用の可能性を探る。

## 4. 研究成果

(1) まず、われわれは、S1PR1 に対する多数の抗体を S1PR1<sup>-/-</sup>マウスと S1PR1<sup>+/-</sup>マウス胎児心臓のホルマリン固定・パラフィン包埋切片、FFPE) の切片をスクリーニングした結果、免疫組織学的に使用可能な抗体を見出した。この特異性を確認した抗 S1PR1 ウサギ抗体を用いて、ヒトの正常組織における S1PR1 の発現を免疫組織化学により検索した。その結果、

S1PR1 は全身の血管・リンパ管内皮細胞、リンパ濾胞のマントル細胞、胸腺髄質のリンパ球に高発現していることが判明した (J Mol Histol 2008)。

(2) 上記の結果を参考に、S1PR1 を強発現すると予想される腫瘍について検討した。まず血管肉腫細胞株 (ISO-HAS) では、S1PR1 が強発現していることが immunocytochemistry, western blot および QT RT-PCR で明らかとなった。そして多数症例の肉腫における S1PR1 の発現を免疫組織化学で検討した結果、S1PR1 が血管肉腫の病理診断にきわめて有用な免疫組織学的マーカーとなることを報告した (Virchows Arch 2009.)。

表 1 : 各臓器における S1PR1 の発現細胞

Organs	Cells with positive staining	Staining pattern
Cerebellum	Neurons in cortex and some glia cells	Cytoplasmic (granular)
Cerebrum	Neurons in cortex and some glia cells	Cytoplasmic (granular)
Heart	No staining other than endothelial cells	
Lung	Alveolar macrophages	Cytoplasmic (weak)
Liver	Hepatocytes	Cytoplasmic (granular)
Kidney	Tubules	Cytoplasmic (granular)
Intestine	Epithelial cells	Cytoplasmic (weak)
Testis	No staining other than endothelial cells	
Skin	Epidermis, appendages	Cytoplasmic (weak)
Bone marrow	Megakaryocytes	Membranous, cytoplasmic
Spleen	Lymphocytes in white pulp	Membranous
Thymus	Medullary lymphocytes	Membranous
Lymph node	Primary lymphoid follicles	Membranous
	Mantle zone of secondary follicle	Membranous
Chorionic villi	Cytotrophoblasts	Cytoplasmic (weak)

表 2 : 血管肉腫における S1PR1 の発現

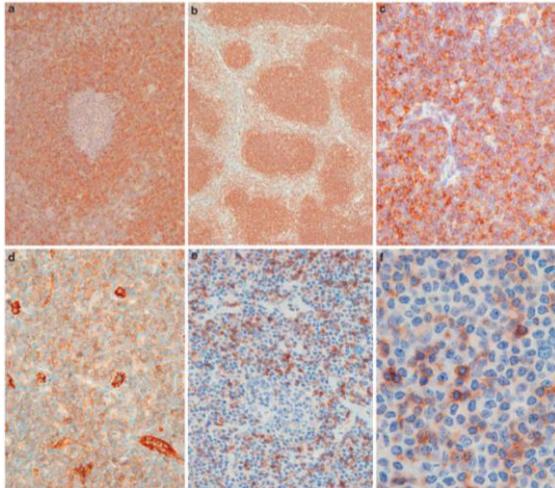
Patient's no.	Age (year)/ sex	Site of disease	Immunoreactivity <sup>a</sup>	
			CD31	S1P <sub>1</sub>
1	77/F	Skin head	3+	3+
2	51/M	Skin	2+	2+
3	76/F	Skin upper arm	2+	3+
4	64/M	Skin	2+	3+
5	65/M	Skin	2+	2+
6	26/F	Breast	2+	2+
		Breast, recurrence	2+	2+
		Breast, 2nd recurrence	3+	3+
7	69/F	Liver	1+	2+
8	61/M	Pericardium	2+	3+
		Lung (autopsy)	3+	3+
9	65/M	Chest wall	0	1+
		Lung (autopsy)	1+	2+
10	38/F	Ovary	3+	3+
		Ascites	2+	3+

<sup>a</sup>0, less than 1% of tumor cells reactive; 1+, 1% to 30% of tumor cells reactive; 2+, 31-70% of tumor cells reactive; 3+, more than 70% of tumor cells reactive

(3) 次に、マントル細胞リンパ腫細胞株 (Rec-1, Jeko-1, Granta) を western blot と QT RT-PCR で検討した。Rec-1 では S1PR1 が高発現していたが、その他 4 つの S1P レセプターの発現はすべて低値であった。また Jeko-1, あるいは Granta では cyclinD1 が Rec-1 と同程度発現しているにもかかわらず、すべての S1P レセプターの mRNA 発現量が低くかった。そして、

様々な悪性リンパ腫の FFPE を免疫組織学的に検討し、S1PR1 がマンテル細胞リンパ腫の組織学的診断に極めて有用であることが判明した (Mod Pathol 2010, 写真 1)。

写真 1 : マンテル細胞リンパ腫における S1PR1 の発現



a. Mantle zone パターンを示すマンテル細胞リンパ腫  
 b. 濾胞性リンパ腫に類似する濾胞パターンを示すマンテル細胞リンパ腫  
 c. びまん性パターンを示すマンテル細胞リンパ腫  
 d. Blastic type のマンテル細胞リンパ腫  
 e. cyclinD1 陰性のマンテル細胞リンパ腫  
 f. e の強拡大像

(4) さらに、S1PR1 は免疫組織学的に成人 T 細胞白血病リンパ腫 28 症例のうち 5 例に陽性であり、western blotting および QT RT-PCR の検討でも、HTLV-1 感染細胞株 5 株のうち特に MT2 には高発現を認め免疫染色陽性であったが、MT1 は MT2 に比較して 1/8 の mRNA 量であり、免疫染色陰性であった。

(5) 一方、40 症例の悪性リンパ腫の凍結リンパ節について、5 つの S1P レセプター(S1PR1 ~S1PR5)の発現を QT RT-PCR で調べた(表 3)。その結果、血管免疫芽球性 T 細胞リンパ腫 (AITL)において S1P3 mRNA の高発現が見られたが、組織学化学的にはリンパ球ではなく、血管・リンパ管内皮細胞や血管周囲細胞、血管平滑筋細胞に発現していた。S1PR4 は T 細胞リンパ腫で高発現していたが S1PR2 と S1PR5 はいずれにも発現は見られなかった。以上から S1PR1 は、マンテル細胞リンパ腫や一部の T 細胞リンパ腫の腫瘍細胞に高発現し、S1PR4 は T 細胞リンパ腫に高発現すること、一方 S1P3 はリンパ腫細胞には発現せず、間質細胞にのみ高発現していることが判明した。S1PR4 の発現については、免疫染色に有用な抗体が見出されておらず、蛋白レベルでの確認はできていない。

表 3 : 悪性リンパ腫の凍結組織における QT RT-PCT による S1PR と sphingosine kinase の発現の検討

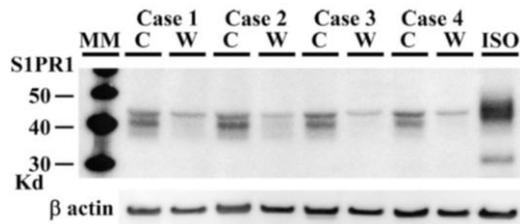
Case	Gender	Age	Diagnosis	Site	sphK-1	sphK-2	S1PR1	S1PR2	S1PR3	S1PR4	S1PR5
1	M	62	RH	Inguinal	1.18	0.00	0.80	0.01	0.07	1.20	0.03
2	F	43	RH	Axillary	1.96	0.05	0.86	0.00	0.06	1.43	0.03
3	F	31	RH	Submand	0.45	0.15	0.34	0.01	0.05	0.60	0.00
4	M	76	RH	Axillary	0.87	0.13	0.73	0.01	0.07	0.90	0.02
5	F	27	RH	Neck	1.00	0.00	0.84	0.01	0.08	1.30	0.03
6	M	73	MCL	Inguinal	0.61	0.15	1.34	0.00	0.16	1.47	0.01
7	M	71	MCL	Axillary	1.89	0.06	0.70	0.00	0.11	1.27	0.02
8	M	71	MCL	Axillary	0.94	0.00	0.52	0.00	0.09	0.97	0.01
9	M	76	MCL	Inguina	0.47	0.16	3.29	0.01	0.17	2.00	0.02
10	M	53	FL_G1	Inguinal	0.72	0.07	0.55	0.09	0.10	0.78	0.01
11	F	41	FL_G1	Axillary	0.44	0.13	1.24	0.00	0.15	1.46	0.02
12	M	50	FL_G1	Inguina	2.19	0.20	0.40	0.01	0.09	1.12	0.02
13	F	56	FL_G1	Axillary	0.90	0.17	0.43	0.03	0.08	0.67	0.01
14	F	47	FL_G2	Neck	1.73	0.27	1.29	0.01	0.16	1.88	0.03
15	F	66	FL_G2	Neck	0.72	0.23	1.58	0.02	0.13	1.57	0.02
16	F	73	FL_G3a	Axillary	0.43	0.12	0.56	0.00	0.04	1.22	0.01
17	F	70	FL_G3b	Inguinal	1.00	0.00	0.56	0.01	0.08	1.11	0.02
18	M	60	LPL?	Neck	0.71	0.06	1.27	0.01	0.06	2.35	0.01
19	M	57	MM	Neck	0.19	0.16	0.16	0.00	0.00	0.17	0.01
20	M	51	DLBCL	Submand	0.33	0.10	0.66	0.00	0.03	0.54	0.04
21	M	70	DLBCL	Tonsil	1.57	0.14	0.97	0.00	0.18	0.90	0.18
22	F	72	DLBCL	Inguinal	0.44	0.20	1.74	0.00	0.04	1.16	0.01
23	M	19	DLBCL	Neck	1.16	0.24	1.43	0.01	0.06	1.91	0.02
24	M	81	DLBCL	Inguinal	0.57	0.11	0.22	0.00	0.04	0.91	0.00
25	F	67	HD,MC	Neck	0.88	0.00	0.51	0.00	0.06	0.80	0.01
26	M	65	HD,MC	Axillary	0.99	0.00	1.62	0.00	0.10	1.36	0.07
27	F	14	HD,NLP	Submand	1.34	0.29	3.35	0.01	0.38	2.90	0.01
28	M	72	ALT	Axillary	1.63	0.36	1.44	0.01	0.46	1.16	0.05
29	F	69	ALT	Inguinal	0.84	0.17	0.35	0.02	0.13	0.55	0.01
30	M	78	ALT	Neck	2.03	0.12	2.28	0.00	0.25	2.08	0.11
31	M	78	ALT	Neck	1.62	0.19	0.85	0.01	0.18	0.99	0.03
32	M	79	ALT	Axillary	1.78	0.00	0.64	0.01	0.30	1.41	0.04
33	M	89	Per-T	Neck	0.64	0.12	1.15	0.01	0.03	6.08	0.01
34	M	8	T-LBL	Neck	1.22	0.50	0.19	0.00	0.04	4.30	0.01

Abbreviations: M, man; F, female; RH, reactive hyperplasia; DLBCL, diffuse large B cell lymphoma; MCL, mantle cell lymphoma; FL, follicular lymphoma; LPL, lymphoplasmacytic lymphoma; MM, multiple myeloma; HD, Hodgkin's lymphoma; MC, mixed cellularity; NLP, nodular lymphocyte predominance. Cases 12 and 13 are same patient. The expression of S1PR1 was evaluated semiquantitatively using 4 scores, according to the percentage of positive cells in individual lesions: 0, less than 1% of tumor cells reactive; 1+, 1% to 30% of tumor cells reactive; 2+, 31%-70% of tumor cells reactive; 3+, more than 70% of tumor cells reactive.

(6) このような悪性リンパ腫や血管肉腫での S1PR の発現に関するデータの信憑性を確認するために、正常のヒト脳における S1PR の発現についても検討し、抗 S1PR1 ウサギ抗体の特異性について確認した (J Histochem Cytochem 2010, 写真 2)。

(7) 次いで、日常検査に用いる FFPE から S1PR の QT RT-PCR が行えるか否か検討した。リンパ腫とヒト大脳のパラフィン切片より mRNA を抽出し、アンプリコンサイズが 100bp 前後の probe (Qiagen) を用いて real time PCR を施行した。その結果、S1PR1 がマンテル細胞リンパ腫に多い事や、パラフィン切片でも S1PR の mRNA の発現が定量的に解析できることが確認された。

写真 2 : ヒト剖検脳における S1PR1 の発現



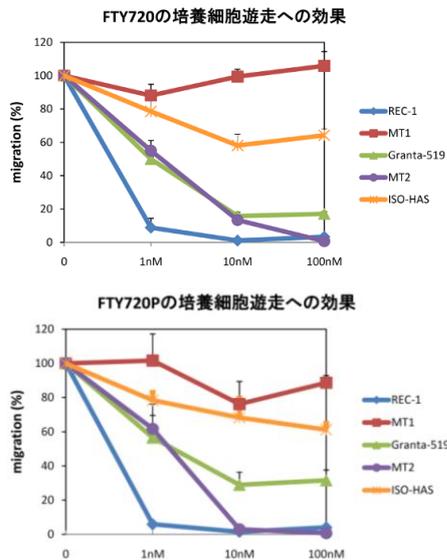
Case 1~4 の脳について、灰白質 (C) と白質 (W) に分け、蛋白を抽出し、western blot にて検討した。免疫染色の結果と一致し、白質には S1PR1 は少ない事がわかった。

(8) 一方、本研究中に米国の Ohio State University のグループからマウスを使った実

験で FTY720 がマンツル細胞リンパ腫の治療に有効であることが報告された (Clin Cancer Res. 2010;16:3182-392)。そこで、FTY720 のマンツル細胞リンパ腫に対する抗腫瘍効果に関するメカニズムについて *in vitro* で解析した。

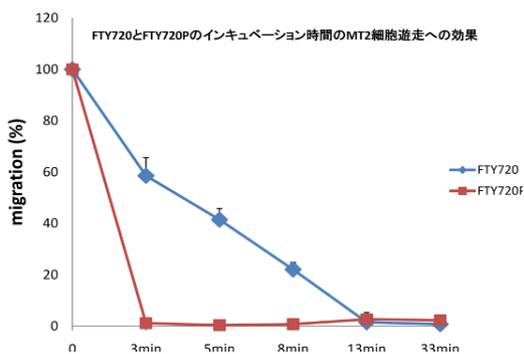
その結果、10 $\mu$ M の FTY720 は S1PR1 の発現量の有無にかかわらず、いずれのリンパ腫細胞株 (MT2・MT1・Rec-1・Granta) においても増殖・生存を抑制した。またおもしろい事に、MT2 や Rec-1 を 1nM の FTY720 や FTY720P と短時間 incubate するだけで、これら腫瘍細胞の血清への遊走が抑制された (図 1)。

図 1 : 各培養細胞株における血清で誘導される細胞遊走への FTY720 と FTY720P の効果



この極めて低濃度の FTY720 の細胞遊走抑制効果が FTY720P を介したのか否か検討するために、MT2 を 5nM の FTY720 と FTY720P で、それぞれ 0, 3, 5, 10, 30min 処理した後、血清に対する細胞走化性を Transwell assay で測定した。FTY720P では 3 分の処理で遊走抑制効果が見られたが、FTY720 の抑制効果は FTY720P に比べると 10 分の time-lag があった (図 2)。

図 2 : MT2 細胞遊走への FTY720 と FTY720P 暴露時間の影響



(9) Agonist 刺激後の S1PR1 の internalization を抗 S1PR1 抗体を用いた免疫細胞化学と western blot で検討したところ、S1P, FTY720-P, FTY720(S)-P のいずれの刺激後 10 分でもすでに S1PR1 は細胞膜から細胞質に移行した。しかし、FTY720-P や FTY720(S)-P では S1P と異なり S1PR1 の recycling は起こらず、一時的に細胞質から完全に消失した (写真 3)。一方、FTY720 の添加では S1PR1 の internalization と分解は起こっているが、FTY720P に比較した場合、時間的な遅延が起こっていた。S1PR1 の分解を western blot でみると、免疫染色の結果とほぼ一致し、100nM の FTY720P 添加後 4 時間後には、S1PR1 はほぼ消失した (写真 4)。

写真 3 : MT2 における S1P (500nM), FTY720 (100nM), FTY720P (100nM) 添加後の S1PR1 の internalization (免疫染色)

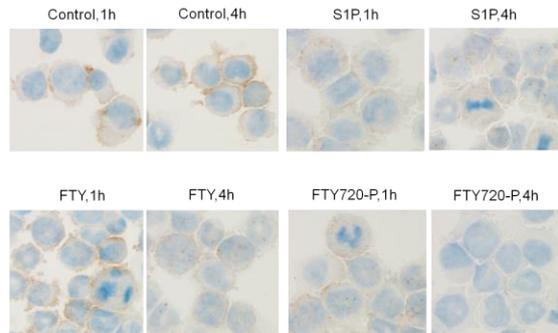
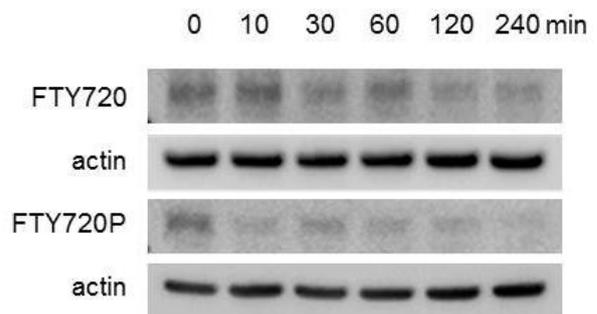


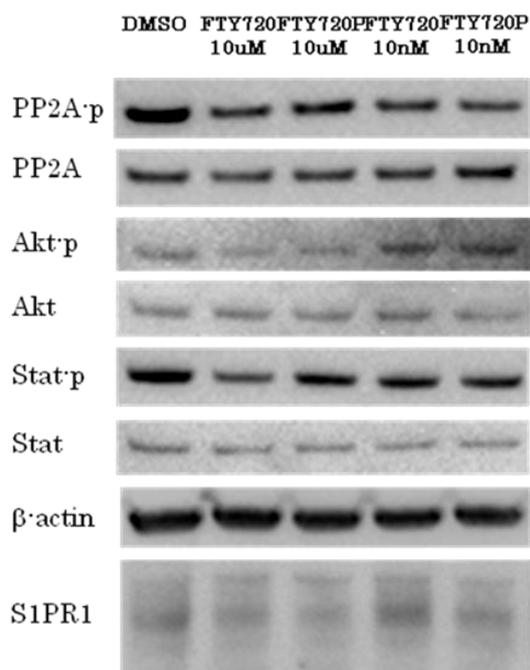
写真 4 : MT2 における FTY720 (100nM), FTY720P (100nM) 添加後の S1PR1 の発現 (western blot)



(10) 次に、MT2 と Rec-1 において、10nM ~ 10 $\mu$ M 濃度の FTY720 と FTY720P が、Akt, Erk1/2, stat-3 および protein phosphatase 2A (PP2A) のリン酸化に及ぼす影響を western blot で検討した。血清添加によって、MT2 細胞では Akt や Stat-3 のリン酸化が、Rec-1 では Akt のリン酸化がみられた。これらに 10 $\mu$ M の FTY720

を添加した場合、いずれもリン酸化の有意な抑制を認めた。一方 100nM 以下の添加では、これらリン酸化の抑制は認められなかった(写真5)。また PP2A に関しては、10 $\mu$ M では Y307 のリン酸化が抑制された。以上のことから 10 $\mu$ M の FTY720 でのリンパ腫細胞の増殖抑制効果は S1PR を介したのではなく、主に PP2A の活性化による Akt などの脱リン酸化亢進に基づく増殖シグナルの抑制によるものと思われた。また、FTY720 の 10 $\sim$ 1nM での細胞遊走抑制効果は、S1PR1 の発現量に依存していることから、細胞内での sphK2 による FTY720 の FTY720P への変換と外部への放出、S1PR への結合、FTY720/S1PR1 シグナルによる結果であり、悪性リンパ腫の転移能の抑制に關与する可能性が示唆される。

写真5: MT2 における FTY720 10nM, 10 $\mu$ M および FTY720P 10nM, 10 $\mu$ M 添加 30 分後の PP2A, Akt, Stat3 のリン酸化の状態と S1PR1,  $\beta$ -actin の発現 (免疫染色)



#### 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 4 件)

1. Cellular localization of sphingosine-1-phosphate receptor 1 expression in the human central nervous system. Nishimura H, Akiyama T, Irei I, Hamazaki S, Sadahira Y. J Histochem Cytochem.58(9):847-856. 2010. review(+).

2. Expression of sphingosine-1-phosphate receptor 1 in mantle cell lymphoma. Nishimura H, Akiyama T, Monobe Y, Matsubara K, Igarashi Y, Abe M, Sugihara T, Sadahira Y. Mod Pathol.23(3):439-449. 2010. review(+).
3. Sphingosine-1-phosphate receptor 1 is a useful adjunct for distinguishing vascular neoplasms from morphological mimics. Akiyama T, Hamazaki S, Monobe Y, Nishimura H, Irei I, Sadahira Y. Virchows Arch.454(2):217-222. 2009. review(+).
4. Immunohistochemical detection of sphingosine-1-phosphate receptor 1 in vascular and lymphatic endothelial cells. Akiyama T, Sadahira Y, Matsubara K, Mori M, Igarashi Y. J Mol Histol.39(5):527-533. 2008. review(+).

[学会発表] (計 8 件)

- ① Nishimura Hirotake, Akiyama Takashi, Irei Isao, Hamazaki Shuji, Sadahira Yoshito. Cellular localization of Sphingosine-1-Phosphate receptor 1 expression in the human central nervous system. 第 17 回国際神経病理学会 2010 年 9 月 11 日 Salzburg, Austria
- ② 定平吉都, 秋山隆, 伊禮功, 西村広健 sphingosine-1-phosphate receptor 1 阻害剤の血管肉腫治療への応用 川崎医学会 2010 年 8 月 7 日 倉敷
- ③ 定平吉都, 西村広健, 秋山隆, 伊禮功, 藤原英世, 濱崎周次: 腫瘍におけるスフィンゴシン-1-リン酸の発現とその役割 第 7 回日本病理学会カンファレンス 2010 年 8 月 6 日 岡山
- ④ 定平吉都, 西村広健, 坂井晃, 杉原尚 成人 T 細胞白血病細胞における S1PR1 の発現と FTY720 の効果 第 50 回日本リンパ網内系学会総会 2010 年 6 月 19 日 新潟
- ⑤ 定平吉都, 西村広健, 藤原英世, 秋山隆, 伊禮功, 濱崎周次, 物部泰昌 成人 T 細胞白血病におけるスフィンゴシン-1-リン酸レセプターの発現とその役割 日本病理学会 2010 年 4 月 29 日 東京
- ⑥ 定平吉都, 西村広健, 土山準二郎, 和田秀穂, 杉原尚 悪性リンパ腫におけるスフィンゴシン-1-リン酸レセプターの発現 第 71 回日本血液学会学術集会 2009 年 10 月 23 日 京都

⑦ 定平吉都, 土山準二郎, 杉原尚 血管免疫芽球性 T 細胞リンパ腫における sphingosine-1-phosphate receptor 3 (S1P3) 第 49 回日本リンパ網内系学会 2009 年 7 月 11 日 淡路夢舞台国際会議場

⑧ 定平吉都, 西村広健, 土山準二郎, 秋山隆, 伊禮功, 濱崎周次, 物部泰昌 悪性リンパ腫におけるスフィンゴシン-1-リン酸レセプターの発現 第 98 回日本病理学会総会 2009 年 5 月 1 日 京都国際会議場

[その他]

ホームページの作製:

[http://www.kawasaki-m.ac.jp/pathology/katudo\\_f/studies.html](http://www.kawasaki-m.ac.jp/pathology/katudo_f/studies.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

定平 吉都 (SADAHIRA YOSHITO)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号: 30178694

### (2) 連携研究者

和田 秀穂 (WADA HIDEHO)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号: 70191830

土山 準二郎 (TSUCHIYAMA JUNJIRO)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号: 50454806