

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590418

研究課題名(和文)スフィンゴシン-1-リン酸受容体のリンパ造血器腫瘍の診断・治療への応用

研究課題名(英文) Application of sphingosine-1-phosphate receptors to diagnosis and treatment for lymphohematopoietic neoplasms

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：(1)びまん性大細胞型B細胞性リンパ腫におけるスフィンゴシン-1-リン酸受容体1(S1PR1)の陽性率は12%であり、陽性例の全生存率は陰性例に比べ統計学的に低かった。(2)HTLV-1感染T細胞株ではS1PR1の発現とSTAT3の活性化は相関しており、S1PR1の機能的拮抗薬FTY720は、HTLV-1感染T細胞株におけるSTAT3の活性化を抑制し、細胞増殖の抑制とアポトーシスを誘導した。しかし、HTLV-1感染T細胞株HUT102のSCIDマウスへの異種移植片を用いた実験では、FTY720(10mg/kg)投与によっては腫瘍細胞のS1PR1の発現抑制や腫瘍増殖抑制効果はみられなかった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we found that sphingosine-1-phosphate receptor 1 (S1PR1) was expressed in 12% of 183 diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) cases, in particular, as high as 56% in primary testicular DLBCL. However, the S1PR1 expression status was not associated with STAT3 activation. S1PR1 was also expressed in 20% of 25 adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL) cases. S1PR1 expression of HTLV-1-infected T cell lines was elevated under hypoxic condition. FTY720, functional antagonist of S1PR1, inhibited activation of STAT3, suppressed cell proliferation, and induced apoptosis of HTLV-1-infected T cell lines in vitro. FTY720 (10mg/kg) treatment did not induce significant suppression of S1PR1 expression nor tumor growth in SCID xenograft model of HTLV-1-infected T cell line HUT102. induce significant suppression of S1PR1 expression nor tumor growth in SCID xenograft model of HTLV-1-infected T cell line HUT102.

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：スフィンゴシン-1-リン酸 受容体 悪性リンパ腫 低酸素 FTY720

## 1. 研究開始当初の背景

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、また癌細胞の細胞運動の調節や増殖、生存に關与する lysophospholipid であり、血小板や血漿中に多量に含まれている。その生物活性は、G 蛋白質共役型のスフィンゴシン-1-リン酸受容体 sphingosine-1-phosphate receptor (S1PR) を介して発揮される。S1PR は S1PR1 ~ S1PR5 の 5 つのサブタイプが存在し、細胞種によって異なる分布を示す。最近では S1PR の機能的拮抗薬である FTY720 が、多発性硬化症の治療薬として使用されている。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かったためである。我々は、S1PR1 に対する多数の抗体を、S1PR1<sup>-/-</sup>マウスと S1PR1<sup>+/+</sup>マウスの心臓の切片を免疫染色することで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 (Akiyama T *et al.* *J Mol Histol* 2008)。ヒト正常組織では、S1P は全ての組織の血管、リンパ管の内皮細胞の細胞膜に分布していた。また、その腫瘍である血管肉腫でも高発現がみられた (Akiyama T *et al.* *Virchows Arch* 2009)。リンパ節では、血管、リンパ管内皮細胞ばかりでなく、リンパ濾胞のマントル層を構成するリンパ球の細胞膜が強陽性で、マントル細胞リンパ腫の良い免疫組織学的マーカーとなり、cyclinD1 との併用で低悪性度リンパ腫の鑑別に有用であることがわかった (Nishimura *et al.* *Mod Pathol* 2010)。また S1PR1 が、マントル細胞リンパ腫や成人 T 細胞白血病細胞の細胞遊走能に關与している可能性について培養細胞株を用いて明らかにしてきた。さらに、S1PR1 が中枢神経では主にグリア細胞に分布し、病態によってその発現強度が変化することを病理検体を用いて明らかにした (Nishimura *et al.* *J Histochem Cytochem* 2010)。

## 2. 研究の目的

(1) リンパ造血器腫瘍細胞における S1P 受容体 (S1PR1~5) 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 の発現の意義について検討する。

(2) S1PR1 の高発現が認められたリンパ造血器腫瘍に関しては、腫瘍細胞株の細胞増殖やアポトーシス・細胞遊走に対する S1PR1 拮抗薬の *in vivo* での効果を、定常状態と低酸素下の双方で検討する。

(3) S1PR の機能的拮抗薬 FTY720 の治療応用について、S1PR1 の高発現が認められた HTLV-1 感染細胞株の SCID マウスへの異種移

植系を用いて検討する。

## 3. 研究の方法

(1) 川崎医科大学附属病院病理部で診断された悪性リンパ腫症例を用いて悪性リンパ腫 (主にびまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫) における S1P 受容体 (S1PR1~5) の発現を、ホルマリン固定パラフィン包埋切片 (FFPE) の免疫組織化学、新鮮材料あるいは FFPE サンプルから分離した mRNA を用いた qRT-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た。

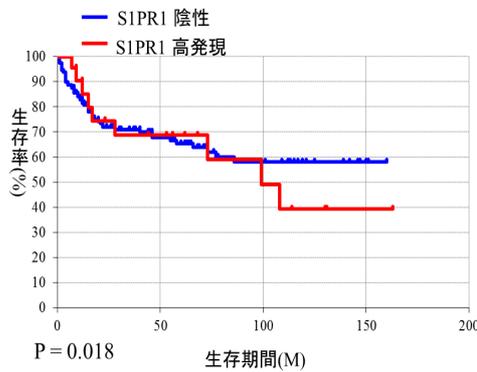
(2) S1PR1 陽性の HTLV-1 陽性細胞株 (主に MT2) に対する S1PR1 の機能的拮抗薬 FTY720 の効果を、5 μm のトランスウェルを用いた細胞遊走能の測定、Cell Counting Kit を用いた細胞増殖能の測定、イメージベースサイトメーターを用いたアポトーシスの測定により検討した。

(3) 2x10<sup>7</sup> 細胞の HTLV-1 陽性細胞リンパ腫株 HUT102 (成人 T 細胞白血病由来) を SCID マウスの腹腔内投与後、6 日目から FTY720 (10mg/kg) を連日投与し、移植後 20 日目に屠殺し、腫瘍重量や病理組織像について非投与群と比較検討した。

## 4. 研究成果

(1) びまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫 (DLBCL) 183 例についての検討: 2000 年から 2013 年までに川崎医科大学附属病院で診断された DLBCL において S1PR1 の発現、STAT3 の発現およびその活性化について、パラフィン切片による免疫組織化学および凍結組織の qRT-PCR 法を用いて検討し、その臨床病理学的特徴を調べた。DLBCL においては、S1PR1 の高度発現例は 22 例 (12%) と比較的低頻度であったが、精巣原発の DLBCL に限れば 9 例中 5 例 (55.5%) と高頻度に陽性であった。細胞起源で比較すると、S1PR1 陽性例においては、non-GCB type が 22 例中 17 例 (77.2%) と高率であった。また、DLBCL における S1PR1 と STAT3 の mRNA 量は、免疫組織化学的染色の結果と良く相関していたが、S1PR1 の発現と STAT3 の活性化を意味する STAT3-pY<sup>705</sup> の染色性とは相関はみられなかった。Non-germinal center (non-GC) type-DLBCL における S1PR1 の発現は、転写因子である STAT3 の恒常的な活性化と密接な関係があると報告されているが、本研究において、そのような関連性は見いだせなかった。これは、リンパ造血系腫瘍においては、JAK/STAT3 経路以外のシグナル伝達系も關与していることを示唆している。一方、S1PR1 の高発現は DLBCL において OS を有意に増悪させる (P = 0.018) ことが統計学的に判明し、S1PR1 は、DLBCL におけるリスクの層別化マーカーとなり得ることが示唆された (表 1)。

表 1. 183 例の DLBCL における S1PR1 陽性例と S1PR1 陰性例の全生存率の比較。



(2) マントル細胞リン腫についての検討：前回の研究課題(20590357)で、S1PR1 がマントル細胞リン腫に高発現していることを報告した。今回、腫瘍細胞の S1PR1 の染色性が、内在性コントロールである血管内皮細胞の染色性に比較して明らかに低下しているマントル細胞リン腫 3 症例について、その臨床病理学的特徴を調べた。その結果、3 症例はいずれも、末梢血に異型的なリンパ球の出現と強い骨髄浸潤像を示していた(表 2)

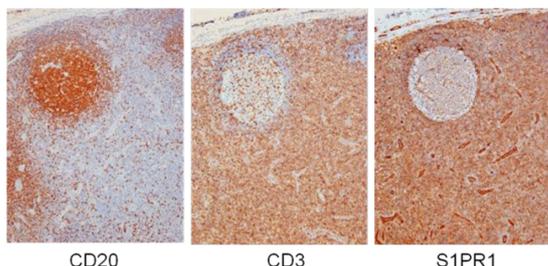
表 2. マントル細胞リン腫と診断された症例で、S1PR1 の発現が低下していた 3 症例の臨床病理学的特徴。

症例	年齢 / 性	原発部位	骨髄浸潤の程度	臨床病期
1	63 / M	Ing. LN	atyp. cells 36%	
2	89 / F	Unknown	免疫染色で確認	
3	77 / M	Axilla. LN	lymphoblasts 64%	
4	60/M	Axilla. LN	ab. lymph 85%	

(3) 成人 T 細胞白血病/リン腫 (ATLL) についての検討：

25 症例の ATLL をパラフィン切片の免疫組織学で検討したところ、20% の症例が S1PR1 陽性であった(写真 1)。

写真 1. 成人 T 細胞白血病/リン腫における S1PR1 の発現。CD3 陽性細胞の分布に一致して S1PR1 の陽性所見がみられる。

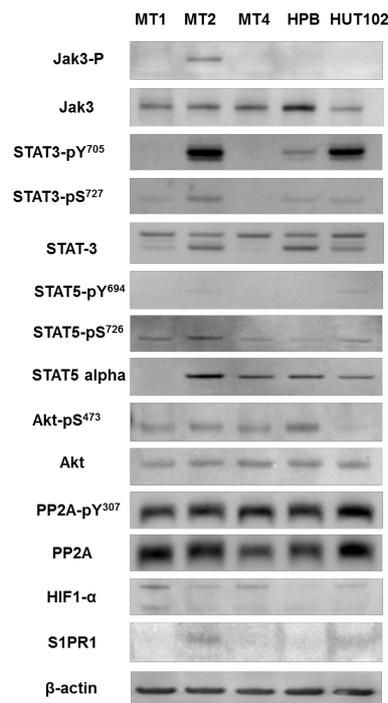


陽性症例において免疫 2 重染色を行うと、S1PR1 陽性の腫瘍細胞の核には STAT3-pY<sup>705</sup> の陽性所見が認められたが、FOXP3 は陰性であった。

次に S1PR の機能的拮抗薬である FTY720

が HTLV-1 陽性 T 細胞株の増殖に対してどのような効果があるかを *in vitro* で調べた。5 つの HTLV-1 感染 T 細胞株のうち MT2 と HUT102 の 2 株がウエスタンブロットで S1PR1 陽性であり、また同時に STAT3 が恒常的に活性化しており、S1PR1 の発現と STAT3 の活性化に相関が認められた。MT2 および HUT102 では、STAT5 も活性化していた。JAK についても検討したが、MT2 のみ JAK3 が活性化していた(写真 2)。

写真 2. HTLV-1 感染細胞 5 株における STAT3/STAT5 の恒常的活性化やその他のタンパク質の発現の検討 (western blotting)。

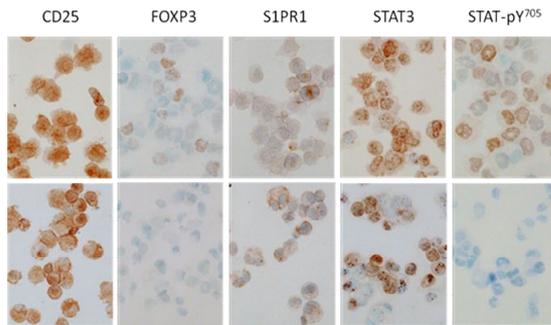


免疫染色では、MT2 は細胞膜が強陽性であったが、HUT102 は一部の細胞のみが強陽性であった。S1PR1 と FOXP3 の発現に関連性は見られなかった。MT2 培養への FTY720 (5-20 μM) の高濃度の添加では、濃度および時間依存性に STAT3-Y<sup>705</sup> のリン酸化の抑制がみられたが、STAT3-S<sup>727</sup> のリン酸化には影響は見られなかった。添加後 24 時間では、細胞増殖・生存が低下し、形態学的には細胞突起が消失していた。また、CD25 の免疫染色の強度には変化がみられなかったが、FOXP3 mRNA の発現は 20% まで減少し、免疫染色でも FOXP3 の核陽性所見は減弱した(写真 3)。一方、リン酸化型 FTY720 である FTY720-P (5 μM) では、このような効果は認められなかった。

さらに、低酸素環境における悪性リンパ腫の耐性機構に S1P/S1PR1 シグナルが関与しているか否か検討した。HTLV-1 感染 T 細胞株においてはいずれも HIF-1 は恒常的に活性化していた。MT2 を低酸素環境で培養すると、HIF-1 タンパク質はやや増量し、S1PR1、STAT3、および FOXP3 の mRNA の発現亢進も

みられた (表 3)。

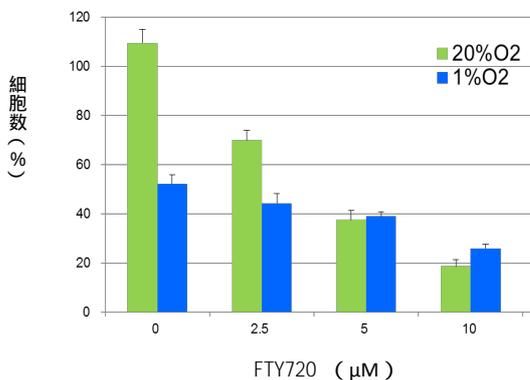
**写真 3.** 免疫細胞化学的染色での MT2 に対する FTY720 (10 μM) の効果の検討。CD25 の発現に変化は認めないが STAT3 の活性化が抑制された。S1PR1 の発現抑制はみられなかった。



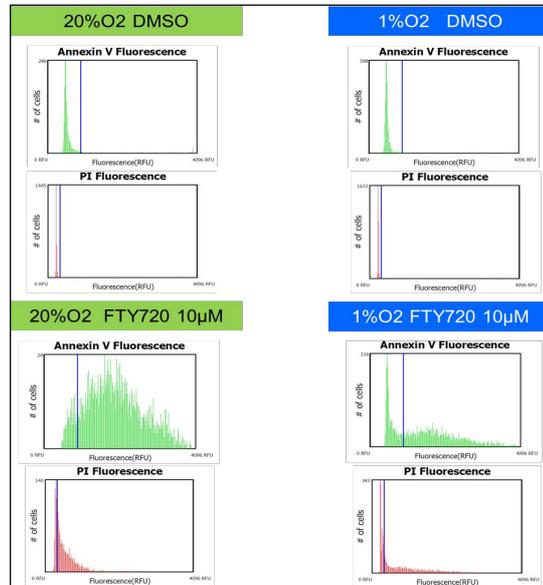
**表 3.** MT2 細胞株の 20%O2 および 1%O2 培養環境における S1PR1, S1PR2, S1PR4, SPHK1, FOXP3, STAT3, BCL2, CCDN1 発現への FTY720 (10 μM) の影響。FOXP3 は低酸素によって発現が著しく高まる。内在性コントロールは 18S rRNA を使用した。

MT2	20%O2	20%O2 FTY720	1%O2	1%O2 FTY720
S1PR1	1.0	0.76	2.67	0.59
S1PR2	1.0	2.53	5.94	1.89
S1PR4	1.0	0.34	2.64	0.58
SPHK1	1.0	1.07	2.32	1.22
FOXP3	1.0	0.19	11.8	3.45
STAT3	1.0	0.42	2.85	0.81
Bcl-2	1.0	1.71	3.95	0.84
GAPDH	1.0	1.53	3.14	1.85
CCDN1	1.0	0.16	2.59	1.93

**表 4.** 20%O2 および 1%O2 での MT2 細胞株の細胞増殖への FTY720 の影響 (24 時間後)。低酸素下で生存する細胞は、FTY720 への耐性が高まっている。



**表 5.** FTY720 (10 μM) 添加 48 時間後における MT2 のアポトーシスの 20%O2 と 1%O2 での比較。1%O2 では、FTY720 に耐性の細胞の割合が多い。

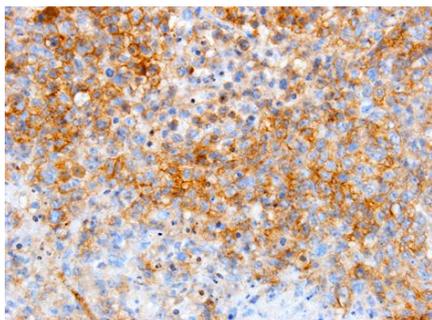


MT2 細胞では、低酸素環境でも FTY720 (10 μM) で、caspase-3 を介したアポトーシスが誘導されたが、20%O2 に比較すると FTY720 に対する感受性が軽度低下した (表 4)。FTY720 (10 μM) では、20%O2 および 1%O2 いずれにおいても STAT3-Y705 のリン酸化の抑制がみられ、STAT3 の標的遺伝子である S1PR1 と CCND1 の発現が抑制された。したがって、FTY720 投与は、STAT3-Y705 リン酸化を抑制することで ATL 細胞に対して抗腫瘍効果を発揮する可能性が考えられる。しかし、低酸素下で生存している腫瘍細胞に対しては、S1PR1/STAT3 の発現が亢進するために、FTY720 の効果が減弱する可能性が考えられた。

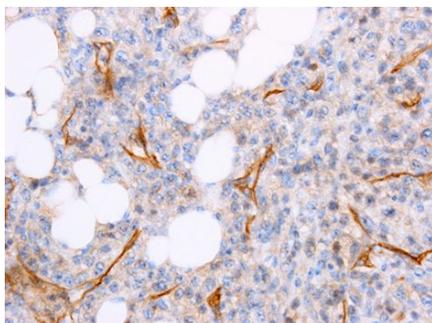
最終目的の一つである、S1PR1 の機能的拮抗薬である FTY720 の投与が、S1PR1 陽性悪性リンパ腫の増殖を *in vivo* で抑制するか否かについて検討した。動物実験委員会の承認のもと (承認番号 14-001), western blot と免疫組織化学で S1PR1 陽性かつ STAT3 の恒常的活性化がみられた成人 T 細胞白血病ウイルス感染細胞株 MT2 と HUT102 について、SCID (C.B17/lcr-scidJcl) 異種移植片モデルの作製を検討したところ、HUT102 (2x10<sup>7</sup> cells) の腹腔内投与では、投与後 3 週間には 1.5 ~ 2g に至る腫瘍形成がみられた。2x10<sup>7</sup> の HUT102 の移植後 6 日目より FTY720 (10mg/kg) を連日腹腔内投与して、その抗腫瘍効果を、移植後 20 日目に検討した。その結果、10mg/kg の FTY720 投与では、腫瘍重量の減少は認められなかった (1.45 ± 0.31 vs 1.43 ± 0.50, n=4)。S1PR1 の免疫染色では、形成された腫瘍は S1PR1 陽性であり、この HUT102 腫瘍における S1PR1 の発現は壊死部周辺で強度が増しており、腫瘍結節の周辺部では陰性のももみられた (写真 4a)。これは、低酸素下で S1PR1 の発現が高まるという *in vitro* での実験結果と一致している。一方、これまでのリンパ球に関する報告を参考にすれば、1mg/kg 以上の FTY720 投与群では、FTY720 が生体内でリン酸化され FTY720-P となり腫瘍細胞の S1PR1 の内在化および分解を引き起こす結果、

S1PR1 陰性となるはずであるが、今回の我々の実験では、腫瘍細胞や腫瘍内血管内皮細胞の S1PR1 の陰性化は認められなかった(写真 4b)。また、同時に採取した脳組織のアストロサイトや血管内皮細胞についても S1PR1 の染色性に变化は認められなかった。今後、投与量や投与方法を変えて追加の実験を行う予定である。

**写真 4a.** 虚血性壊死に陥っている部位における移植 HUT102 細胞の S1PR1 の高発現



**写真 4b.** 移植 HUT102 腫瘍周辺の浸潤部位における S1PR1 の低発現



## 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 0 件)

〔学会発表〕(計 8 件)

(1) 是澤里紗, 岡大五, 藤原英世, 定平吉都. Primary testicular diffuse large B-cell lymphoma における sphingosine-1-phosphate receptor 1 の高発現 第 103 回日本病理学会総会 2014 年 4 月 25 日 広島国際会議場(広島)

(2) 定平吉都, 西村広健, 藤原英世, 小原由美, 秋山隆, 伊禮功, 濱崎周次, 物部泰昌. FTY720 による HTLV-1 感染 T 細胞株における STAT3 活性化と FOXP3 発現の抑制. 第 102 回日本病理学会総会 2013 年 6 月 8 日 札幌芸文館(札幌)

(3) 岡大五, 是澤里紗, 杉原尚, 定平吉都. HTLV-1 感染 T 細胞株の低酸素による FOXP3 発現の増強と FTY720 の効果. 第 53 回日本リン

パ網内系学会総会 2013 年 5 月 18 日 京都国際会議場(京都)

(4) Sadahira Y, Fujiwara H, Nishimura H, Akiyama T, Irei I, Hamazaki S. Impact of FTY720 on S1PR1-positive HTLV-1-infected T-cell lines. USCAP 101<sup>st</sup> annual meeting. 2012 年 3 月 17-23 日 Vancouver convention center (Vancouver, Canada)

(5) 定平吉都. リンパ造血器腫瘍の診断・予後予測への sphingosine-1-phosphate receptor の応用. 第 3 回川崎医学会 2012 年 8 月 4 日 川崎医科大学校舎棟 M-800 (倉敷)

(6) 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, 塩見達志. 高濃度の FTY720 は HTLV-1 感染 T 細胞株における STAT3 の恒常的活性化を S1PR1 非依存性に抑制する. 第 101 回日本病理学会総会 2012 年 4 月 28 日 京王プラザホテル(東京)

(7) 藤原英世, 西村広健, 秋山隆, 伊禮功, 濱崎周次, 定平吉都, 海野正俊, 竹内誠, 物部泰昌, 白血化・骨髄浸潤を示し, S1PR1 の発現が低下していたマントル細胞リンパ腫の 3 例. 第 101 回日本病理学会総会 2012 年 4 月 27 日 京王プラザホテル(東京)

(8) Nishimura H, Fujiwara H, Akiyama T, Irei I, Monobe Y, Hamazaki S, Sugihara T, Sakai A, Sadahira Y. The impact of FTY720 on malignant lymphoma. 第 73 回日本血液学会学術集会 2011 年 10 月 16 日 名古屋国際会議場(愛知県)

〔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  
<http://www.kawasaki-m.ac.jp/pathology/studeis.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) 研究分担者  
秋山隆 (AKIYAMA TAKASHI)  
川崎医科大学・医学部・准教授  
研究者番号: 80294411