

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05676

研究課題名(和文) 脂質メディエーターを介した癌と宿主の相互作用による乳癌の浸潤・転移機序の解明

研究課題名(英文) The role of a lipid mediator in an interaction between cancer and the host, promoting breast cancer progression

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) 18,300,000円

研究成果の概要(和文)：スフィンゴシン-1-リン酸(S1P)は、多彩な生理活性を示す脂質メディエーターである。S1P産生責任酵素の遺伝子改変癌細胞やマウスを用いた実験や、臨床検体の解析により、癌と宿主(癌微小環境)の相互作用におけるS1Pの役割について研究した。本研究の成果によって、癌と宿主の産生するS1Pが共に癌の発育進展に重要であることが分かり、リンパ節転移を伴う乳癌患者では、腫瘍内のS1P濃度が高いことが分かった。

研究成果の概要(英文)：Sphingosine-1-phosphate (S1P) is a pleiotropic bioactive lipid mediator. We studied the role of S1P in the interaction between cancer and host (tumor microenvironment) utilizing experiments using genetically modified cancer cells and mice of S1P production responsive enzymes and analysis of clinical specimens. Based on the results of this study, it was revealed that both S1P produced by cancer and that produced by the host are important for the cancer progression. Our data showed that S1P concentration in the tumor of breast cancer patients with lymph node metastasis is higher than that without lymph node metastasis.

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 癌と宿主 リンパ節転移
乳癌

1. 研究開始当初の背景

乳癌においては、リンパ行性進展を介したリンパ節転移は最も重要な予後規定因子の1つである。リンパ管は最終的に血管に合流すること、遠隔転移症例では既にリンパ節転移をきたしていることが多いことなどから、リンパ行性経路は遠隔転移の主要経路の1つであると考えられている。したがって、リンパ行性転移の機序解明は、乳癌の遠隔転移の制御において必須である。

スフィンゴ脂質であるスフィンゴシン-1-リン酸 (以下 S1P) は、脂質でありながら蛋白質と同じように細胞情報伝達物質として働く脂質メディエーターであることが研究協力者である Sarah Spiegel によって解明された (Nature 1993, Nature 1996)。

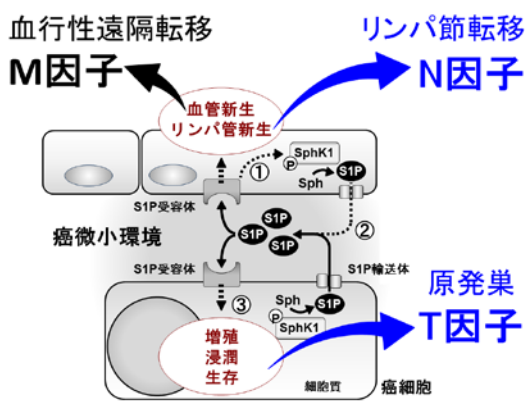


図1. スフィンゴシン-1-リン酸 (S1P) による情報伝達系

S1P は細胞質内に存在するスフィンゴシンキナーゼ 1 型 (SphK1) によってスフィンゴシン (Sph) から産生され、S1P 輸送体によって細胞外に放出、癌細胞自身や周囲の血管・リンパ管内皮細胞表面にある S1P 特異的受容体に作用し、増殖・浸潤・生存等の細胞機能を促進する (図 1)。申請者は「乳癌が産生した S1P が、リンパ管新生を促進する」ことを世界に先駆けて報告した (Cancer Research 2012)。さらに癌やリンパ管新生における S1P の役割をさらに追究し、「S1P が慢性炎症と癌の発生、進展をリンクさせること」 (Cancer Cell 2013)、「S1P の輸送体である Spns2 がリンパ管形成に関与すること」 (FASEB Journal 2013) を解明した。

現在の問題点として、以下の 2 点が挙げられる。(1) S1P は脂質であるが故に測定することが困難であったことから、実験動物 (in vivo) および臨床での S1P の生理的機能に関する研究は遅れており、その臨床的意義は未解明のままである。(2) 生体内においては、癌が産生する S1P に加えて、宿主側が産生する S1P も存在し、癌と宿主の相互作用における S1P の生理的機能はいまだ不明である。

上述した S1P 研究の学術的背景から、『癌

細胞と宿主側の癌微小環境との相互作用における S1P の生理的機能を解明することは非常に重要である』という着想に至った。

申請者は、「癌細胞より放出された S1P がパラクライン効果でリンパ管内皮細胞の SphK1 を活性化し (①)、S1P の産生・放出を促進 (②)、オートクライン・パラクライン効果で癌細胞の S1P 受容体を刺激し、癌の増殖・浸潤・生存を促している (③) (図 1)」という仮説を立て、本研究を企画した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、「S1P 産生責任酵素の遺伝子改変マウスや臨床検体を駆使し、癌と宿主 (癌微小環境) の相互作用における S1P の生理的機能と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

癌と宿主の相互作用における S1P の生理的機能

E0771 マウス乳癌細胞の SphK1 と SphK2 遺伝子を、CRISPR/Cas9 システムを用いてノックアウト (KO) した。KO 細胞と野生型 (WT) 細胞を用いて WST-8 細胞増殖アッセイとスクラッチアッセイを行い、乳癌の細胞の SphK1 と SphK2 の機能を検討した。さらに、SphK1KO マウスに SphK1KO 癌細胞を移植し、マウス乳癌移植モデルを作成し、腫瘍径の推移を比較した。

SphK1 および S1P のリンパ管浸潤・リンパ節転移への関与と臨床的意義

リンパ管浸潤をきたした癌細胞の生存能に関わる SphK1 の役割を調べるため、乳癌外科切除例に対し、抗リン酸化 SphK1 (pSphK1) による免疫組織化学を行い、癌および周囲組織における SphK1 のリン酸化を評価した。

リンパ節転移における S1P の臨床的意義を解明するため、乳癌外科切除例を対象として、原発巣、リンパ節転移巣を免疫組織化学 (pSphK1) で評価し、リンパ行性進展における pSphK1 発現について分析した。また、癌組織、周囲正常組織の新鮮凍結標本、血清を用いて、S1P を含めたリポドミクス解析を行った。

S1P の癌代謝動態および生存能への関与と、癌と宿主とに対する標的治療の効果

SphK1 および S1P の癌代謝動態および細胞生存能への関与を解明するため、SphK1 ノックダウン乳癌細胞を用いてメタボローム解析を行い、SphK1 の癌代謝動態を分析した。乳癌細胞移植マウスモデルと乳癌自然発生トランスジェニックマウスモデルを用い、

S1P 受容体特異的阻害薬として FTY720 の作用を分析した。さらに、S1P 阻害の効果をもより明らかにするため通常食と高脂肪食との 2 群間において、乳癌転移と生存期間を比較解析した。

4. 研究成果

癌と宿主の相互作用における S1P の生理的機能

WST-8 細胞増殖アッセイを用いて、細胞増殖における SphK1 の役割を解析したところ、SphK1KO E0771 細胞の増殖は WT 細胞と比較して有意に低かった (図 2)。

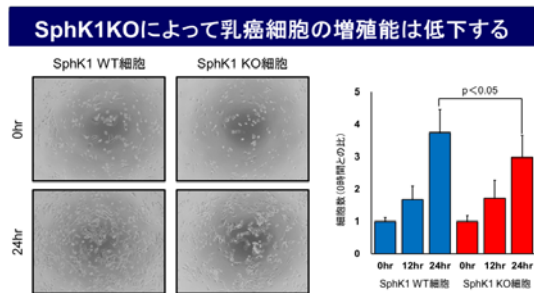


図 2. 細胞増殖における SphK1 の役割

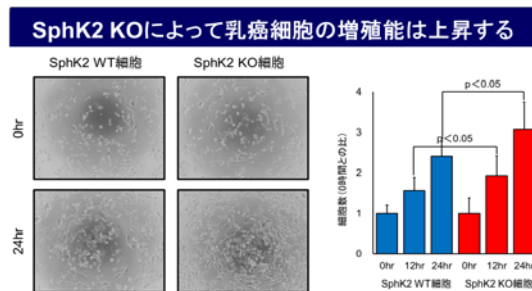


図 3. 細胞増殖における SphK2 の役割

同様に SphK2 の役割について解析を行ったところ、SphK2KO E0771 細胞の増殖は、WT 細胞と比較して有意に高かった (図 3)。

次にスクラッチアッセイを用いて migration に関して解析を行った。SphK1KO 細胞と WT 細胞の間、または Sph2KO 細胞と WT 細胞との間に migration の有意差はなかった。

癌細胞同種移植によるマウス実験 (図 4) では、SphK1KO 細胞を移植したマウスは、WT 細胞を移植したマウスよりも形成された腫瘍は有意に小さく、SphK1KO 細胞移植マウスがより長期間生存した。SphK2KO 細胞を移植したマウスも、WT 細胞を移植したマウスよりも、腫瘍が小さく、生存期間が長いという同様の傾向を示した。次に、WT 細胞を SphK1KO および SphK2KO マウスに移植したところ、SphK1KO および SphK2KO においては、WT マウスと比較してより小さい腫瘍をそれぞれ形成した。また、SphK1KO 細胞を SphK1KO マウスおよび WT マウスに移植したところ、SphK1KO マウスに移植した SphK1KO 細胞の腫瘍形成は極めて低いこと

を見出した (図 4)。これらの結果は癌および腫瘍微小環境から提供される S1P が共に腫瘍増殖に重要であり、いずれから S1P が供給されないと腫瘍形成が困難であることが示唆された。

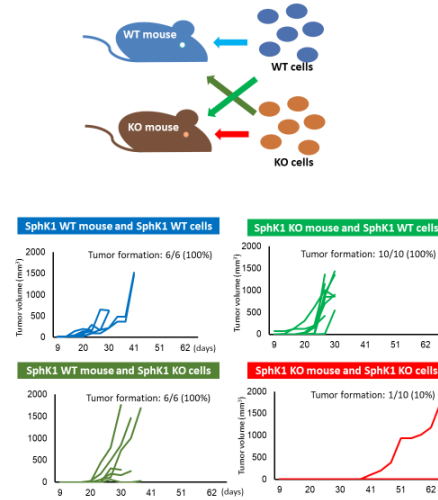


図 4. 癌細胞同種移植によるマウス実験

SphK1 および S1P のリンパ管浸潤・リンパ節転移への関与と臨床的意義

乳癌臨床検体におけるスフィンゴシン (Sph)、デヒドロスフィンゴシン (DHSph)、S1P、デヒドロスフィンゴシン-1-リン酸 (DHS1P) は、いずれの症例においても測定可能であった。腫瘍部におけるこれらの脂質濃度は、正常乳腺組織を比較していずれも有意に高値であった (図 5)。

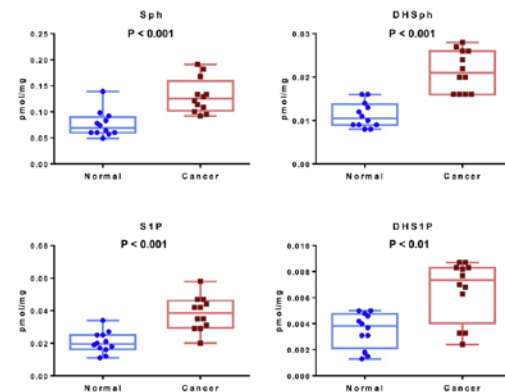


図 5. 細胞増殖における SphK2 の役割

腫瘍内 S1P 濃度と臨床病理学的因子の相関について解析を行ったが、ホルモン受容体発現 (ER、PgR)、Ki-67 index、核グレード、血管・リンパ管浸潤の有無、pT において、腫瘍内 S1P 濃度との明らかな関連は見られなかった。一方、病理学的にリンパ節転移陽性の症例では転移陰性の症例に比べ S1P の値が有意に高かった (P=0.044) (図 6)。また、HER2 陰性の症例では HER2 陽性の症例に比べ S1P の値が有意に高かった (P=0.001)。

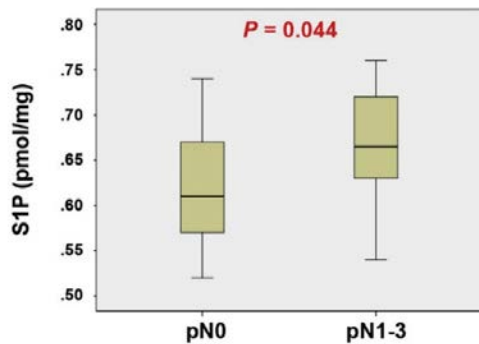


図 6. 細胞増殖における SphK2 の役割

S1P の癌代謝動態および生存能への関与と、癌と宿主とに対する標的治療の効果

乳癌細胞移植マウスモデルと乳癌自然発生トランスジェニックマウスモデルにおいて、S1P 受容体作用薬である FTY720 を用いて SphK1/S1P/S1PR1 情報伝達系を特異的に阻害すると、炎症性サイトカイン、マクロファージ浸潤および腫瘍の増殖が抑制された。肺転移ニッチ形成において、肥満は肺へのマクロファージ動員を増加させ、IL-6 を誘導した。FTY720 は肺におけるマクロファージ浸潤、IL-6 および S1P 情報伝達系を抑制し、肺転移ニッチ形成を抑制した。さらに FTY720 は肺転移を減少させただけでなく、マウスの生存期間を延長した。高脂肪食は、乳癌において S1P 産生酵素である SphK1 と、特異的 S1P 受容体である S1P1 型受容体 S1PR1 の発現を増加させた。我々の結果は、肥満に関連した慢性炎症、肺転移ニッチ形成および乳癌転移における S1P の重要な役割を示唆する。SphK1/S1P/S1PR1 情報伝達系は、S1P 受容体作用薬である FTY720 を用いて阻害することにより乳癌の原発巣縮小効果のみならず遠隔転移抑制効果も期待できる有望な治療ターゲットと考えられた。

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 11 件)

永橋昌幸. 癌における脂質メディエーター・スフィンゴシン-1-リン酸の働き. 新潟県医師会報. 2015;789:1-7

Nagahashi M, Tsuchida J, Moro K, Hasegawa M, Tatsuda K, Woelfel IA, Takabe K, Wakai T. High levels of sphingolipids in human breast cancer. J Surg Res. 2016;204:435-444

Nagahashi M, Yamada A, Miyazaki H, Allegood JC, Tsuchida J, Aoyagi T, Huang WC, Terracina KP, Adams BJ, Rashid OM, Milstien S, Wakai T, Spiegel S, Takabe K. Interstitial Fluid Sphingosine-1-Phosphate in Murine Mammary

Gland and Cancer and Human Breast Tissue and Cancer Determined by Novel Methods. J Mammary Gland Biol Neoplasia. 2016;21:9-17

Nagahashi M, Yamada A, Aoyagi T, Allegood J, Wakai T, Spiegel S, Takabe K. Sphingosine-1-phosphate in the lymphatic fluid determined by novel methods. Heliyon. 2016;2

Huang WC, Liang J, Nagahashi M, Avni D, Yamada A, Maceyka M, Wolen AR, Kordula T, Milstien S, Takabe K, Oravec T, Spiegel S. Sphingosine-1-phosphate phosphatase 2 promotes disruption of mucosal integrity, and contributes to ulcerative colitis in mice and humans. FASEB J. 2016;30:2945-2958

Tsuchida J, Nagahashi M, Nakajima M, Moro K, Tatsuda K, Ramanathan R, Takabe K, Wakai T. Breast cancer sphingosine-1-phosphate is associated with phospho-sphingosine kinase 1 and lymphatic metastasis. J Surg Res. 2016;205:85-94

Nakajima M, Nagahashi M, Rashid OM, Takabe K, Wakai T. The role of sphingosine-1-phosphate in the tumor microenvironment and its clinical implications. Tumour Biol. 2017;39:1010428317699133

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;16:1059-1070

Tsuchida J, Nagahashi M, Takabe K, Wakai T. Clinical Impact of Sphingosine-1-Phosphate in Breast Cancer. Mediators Inflamm. 2017;2017:2076239

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;78:1713-1725

永橋昌幸, 若井俊文. 癌と宿主におけるスフィンゴシン-1-リン酸の役割. BIO Clinica. 2017;32:397-404

関連する報告書 2015 実績報告書
[学会発表] (計 17 件)

Nagahashi M, Moro K, Tsuchida J, Tatsuda K, Jun Sakata, Kobayashi T, Takabe K, Wakai T. FTY720 decreases levels of lipid mediator in tumor microenvironment and suppresses breast cancer progression. 46th World Congress of Surgery (Bangkok, Thailand) 2015.08.23

Nagahashi M, Shimada Y, Jun Sakata, Kameyama H, Kobayashi T, Takabe K, Saijo Y, Wakai T. A lipid mediator, sphingosine-1-phosphate as a promising target for colitis-associated cancer. 第13回日本臨床腫瘍学会学術集会(北海道札幌市) 2015.07.16

永橋昌幸, 土田純子, 諸和樹, 辰田久美子, 利川千絵, 長谷川美樹, 萬羽尚子, 五十嵐麻由子, 小山諭, 山田顕光, 青柳智義, 高部和明, 若井俊文. がん微小環境中にはスフィンゴシン-1-リン酸(S1P)が高濃度で存在する. 第23回日本乳癌学会学術集会(東京都千代田区) 2015.07.02

Nakajima M, **Nagahashi M**, Tsuchida J, Wakai T. Roles of sphingosine-1-phosphate produced by sphingosine kinases in cancer progression. 第75回日本癌学会学術総会(神奈川県横浜市) 2017.09.30

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, 中島真人, 小山諭, 高部和明, 若井俊文. 乳がん患者における腫瘍内スフィンゴシン-1-リン酸濃度と臨床病理学的因子の関連について. 第24回日本乳癌学会学術総会(東京都江東区) 2016.06.16

Nagahashi M, Moro K, Tsuchida J, Niwano T, Tatsuda K, Toshikawa C, Hasegawa M, Koyama Y, Kobayashi T, Kosugi SI, Kameyama H, Yamada A, Aoyagi T, Takabe K, Wakai T. Targeting sphingosine-1-phosphate in obesity-induced angiogenesis in breast cancer progression. The 11th Annual Academic Surgical Congress (Jacksonville, USA) 2016.02.02

Moro K, **Nagahashi M**, Tsuchida J, Niwano T, Tatsuda K, Toshikawa C, Hasegawa M, Koyama Y, Kobayashi T, Kosugi SI, Kameyama H, Aoki H, Takabe K, Wakai T. Very Long Acyl Chain (C24:0 and C22:0) Ceramides are Associated with Obesity and Breast Cancer Progression. The 11th Annual Academic Surgical Congress (Jacksonville, USA) 2016.02.02

Nagahashi M, Yamada A, Aoyagi T, Allegood J, Wakai T, Spiegel S, Takabe K. Sphingosine-1-phosphate in the Lymphatic Fluid Determined by Novel Methods. The 12th Annual Academic Surgical Congress (Las Vegas, USA) 2017.02.07

Tsuchida J, Moro K, Ohtani A, Endo M, Niwano T, Tatsuda K, Toshikawa C, Hasegawa M, Ikarashi M, Nakajima M, Koyama Y, Sakata J, Kobayashi T, Kameyama H, Takabe K, Wakai T, **Nagahashi M**. Peri-tumor Sphingosine-1-phosphate Levels Are Affected by the Tumor. The 12th Annual Academic Surgical Congress (Las Vegas, USA) 2017.02.07

Moro K, Tsuchida J, Ohtani A, Endo M, Niwano T, Tatsuda K, Toshikawa C, Hasegawa M, Ikarashi M, Nakajima M, Koyama Y, Sakata J, Kobayashi T, Kameyama H, Takabe K, Wakai T, **Nagahashi M**. High Levels of Ceramide in Breast Cancer and Its Microenvironment. The 12th Annual Academic Surgical Congress. (Las Vegas, USA) 2017-02-07

Takabe K, Katsuta E, **Nagahashi M**. Immune-modulator FTY720 potentiate Doxorubicin in obesity-related breast cancer. The 12th Annual Academic Surgical Congress (Las Vegas, USA) 2017.02.07

三浦要平, 中島真人, **永橋昌幸**, 安藤拓也, 油座 築, 土田純子, 田島陽介, 坂田 純, 小林 隆, 亀山仁史, 阿部 学, 崎村建司, 若井俊文. CRISPR/Cas9によるスフィンゴシン-1-リン酸産生酵素の乳癌発育進展における役割解明. 第117回日本外科学会定期学術集会(神奈川県横浜市) 2017.04.29

中島真人, **永橋昌幸**, 大谷彩香, 遠藤麻巳子, 土田純子, 諸和樹, 庭野稔之, 山浦久美子, 利川千絵, 長谷川美樹, 五十嵐麻由子, 小山諭, 坂田 純, 亀山仁史, 小林 隆, 若井俊文. 乳がんのがん細胞と宿主におけるスフィンゴシン-1-リン酸産生酵素の機能解析. 第25回日本乳癌学会学術集会(福岡県福岡市) 2017.07.14

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, 高部和明, 若井俊文. シンポジウム15 私たちが日本で行うべき乳癌研究 基礎から臨床まで 日本だからこそできるトランスレーショナルリサーチの実践を目指して. 第25回乳癌学会(福岡県福岡市) 2017.07.15

Nagahashi M, Yamada A, Aoyagi T, Huang WC, Terracina KP, Hait N, Allegood JC, Tsuchida J, Nakajima M, Katsuta E, Milstien S, Wakai T, Spiegel S, Takabe K. Targeting the SphK1/S1P/S1PR1 axis that connects obesity, chronic inflammation, and breast cancer metastasis. 2017 San Antonio Breast Cancer Symposium (San Antonio, USA) 2017.12.06

Miura K, **Nagahashi M**, Nakajima M, Yuza K, Tsuchida J, Hirose Y, Abe M, Sakimura K, Wakai T. The roles of sphingosine-1-phosphate produced by sphingosine kinases in tumor and its microenvironment. The 13th Annual Academic Surgical Congress (Jacksonville, USA) 2018.01.30

Tsuchida J, **Nagahashi M**, Moro K, Otani A, Endo M, Ikarashi M, Nakajima M, Koyama Y, Sakata J, Kobayashi T, Kameyama H, Yan Q, Yan L, Takabe K, Wakai T. Sphingosine-1-phosphate affects tumor-associated immune cells in human breast cancer patients. 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