

令和元年6月19日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09343

研究課題名(和文) 肝臓におけるスフィンゴシン1リン酸の役割解明と治療への応用

研究課題名(英文) Clarification of a role of sphingosine 1-phosphate in pathology of hepatocellular carcinoma, and its application for treatment strategy

研究代表者

池田 均 (Ikeda, Hitoshi)

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：80202422

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：細胞増殖や生死の決定に重要な役割を果たすとされるスフィンゴシン1リン酸(sphingosine 1-phosphate; S1P)の動態をヒト肝臓組織で検討したところ、S1P産生酵素発現は亢進していたが、従来の報告と異なり、分解酵素発現も亢進し、S1P量は増加していなかった。そこで、これまでの定説の根拠の一つとなっている大腸癌での検討を再度行った。ヒト大腸癌組織においても、S1P産生および分解酵素、細胞外への移動に働くトランスポーター、受容体S1P2発現は亢進しており、S1P量の増加は癌組織で確認されなかった。このため、細胞増殖にはS1Pの細胞内増加ではなく、代謝の亢進が重要であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脂質メディエーターのS1Pは、その前駆物質であるセラミドとの細胞内のバランスが細胞増殖や生死の決定に重要であることが知られている。すなわち、S1Pの細胞内レベルが亢進すると、細胞は増殖し、アポトーシスは起こりにくくなるとされる。ところが、この現象を肝臓において検討したところ、分解酵素発現は亢進し、S1Pレベルの上昇は見られなかった。さらに大腸癌における検討により、S1Pの細胞内レベルではなく、代謝の亢進が細胞増殖に重要であることを発見した。この、従来の説を覆す知見に基づき、S1P代謝の抑制による癌治療の可能性が考えられる。さらに細胞のアポトーシスが原因とされる疾患の治療への応用も期待される。

研究成果の概要(英文)：Because sphingosine 1-phosphate (S1P) is a lipid mediator to be assumed to play a key role in cell growth and death, we examined potential roles of S1P in growth of hepatocellular carcinoma (HCC). Although the increase in intracellular S1P has been reported to be importantly involved in cell proliferation, mRNA expressions of not only a generating enzyme but also a degrading enzyme of S1P were enhanced in HCC tissues, and as a result, S1P was not increased in HCC tissues compared to non-cancerous tissues, suggesting that enhanced S1P metabolism but not increased intracellular S1P levels may play a pivotal role in HCC growth. Furthermore, our novel findings were similarly observed in colorectal cancer tissues, in which the theory showing a role of intracellular S1P levels on cell growth has been established.

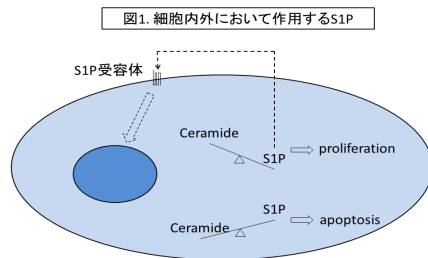
研究分野：医学、肝臓病学、腫瘍学

キーワード：スフィンゴシン1リン酸 肝細胞癌 大腸癌 S1Pリアーゼ トランスレーショナル・リサーチ

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

### 1. 研究開始当初の背景

スフィンゴ脂質は、細胞膜の脂質二重層を構成し、疎水性部分にスフィンゴシンとセラミド骨格を有する脂質であるが、S1P (スフィンゴシン 1 リン酸、sphingosine 1-phosphate) は、このスフィンゴ脂質に分類される。これら脂質は細胞膜構成成分として単に細胞内外のバリアを形成する静的な役割のみならず、細胞外からのシグナルを検知して細胞応答が発揮されるまでの精緻な情報伝達機構に関わり、その機構の破綻・異常が種々の病態に関連することが明らかとなり注目されている。すなわち、1990 年代にスフィンゴ脂質であるセラミド、スフィンゴシン、S1P の細胞内シグナル伝達物質としての役割解明が始まり、重要な知見として細胞内のセラミドと S1P の量的バランスが細胞の生死を決定することが報告された (細胞はセラミド増加でアポトーシス、S1P 増加で増殖へ傾く、図 1)。



さらに S1P は、血小板などの細胞から刺激に依存して放出されることが解明され、細胞の外においても存在することが明らかとなり、S1P に対する G 蛋白質共役型受容体の存在が証明され、S1P は細胞内シグナル伝達物質のみならず、細胞間メディエーターとして働くことが知られるようになった。我々は、これまで、肝臓を構成する細胞においては S1P 受容体が豊富に発現しており、S1P は肝細胞には増殖抑制的に、線維化に重要な役割を果たす星細胞においては、その増殖や収縮を促進することを明らかにした。さらに、S1P が *in vivo* においても肝再生抑制的に働き、肝線維化は促進することを受容体欠損動物により解明した。また、S1P による星細胞の収縮亢進は門脈圧上昇をもたらし、受容体アンタゴニストによる S1P 作用抑制が門脈圧亢進症治療に繋がる可能性も示した。以上、S1P は肝臓病、とくに肝線維化において深く病態に関与することを明らかにすることができたが、線維化の進んだ肝臓から高頻度に発生する肝臓における S1P の役割は、ほとんど分かっていない。

一方、近年、S1P の癌における意義の解明が相次ぎ注目されている。細胞内 S1P 量が増加すると増殖が促進されること、S1P により活性化される NFκB、STAT3 が炎症を亢進させることに着目し、S1P が発癌促進的に働くとする知見が大腸癌を始めとして、報告されている。しかしながら、これらの知見は株化した癌細胞における検討結果がほとんどであり、実際のヒト癌組織における S1P およびその代謝産物の *in vivo* の動態を詳細に解析した報告はないことが、本研究分野での問題であった。

### 2. 研究の目的

S1P と、その前駆物質セラミドの細胞内バランスが、細胞の生死を規定するとの従来の定説を再検討する。とくに癌と S1P については、その細胞内レベルの増加が増殖を刺激し、発癌促進的に作用するとの立場に立って、産生酵素である sphingosine kinases の癌における発現亢進の報告が相次いでいるが、実際に癌組織で S1P を定量した仕事はほとんどない。本研究は、従来の学説の大前提条件を改めて調べることを目的とする。生理活性脂質の測定には、検体の調整や扱いに格段の注意を要するが、我々は、これらに関して詳細な基礎検討を行い、国内外において最も信頼性の高いデータを得ることができるグループの一つと自負している。

S1P やリゾホスファチジン酸といった生理活性脂質は、基礎的検討によって、種々の細胞・臓器における多彩な役割を担っていると推定されているものの、実際の臨床的意義は不明の点が多く、ましてや、治療学への応用は進んでいない。我々は今まで一貫して、肝臓病における S1P の臨床的意義解明に取り組んで来ており、今回、肝臓病の中でも未だに難治である肝臓癌、また、罹患する患者さんが増加の一途を辿っている大腸癌における S1P の臨床的役割を明らかにすることを旨とした。S1P 受容体は G 蛋白質共役型でアゴニスト、アンタゴニストが多く知られており、S1P 産生・分解酵素の抑制剤も多くのもが知られている。S1P およびその代謝産物、代謝関連酵素において、癌部に特徴的な変化を抑制し得る適切な薬剤を選択し、S1P 作用修飾による肝臓癌や大腸癌の治療法の確立を試みたい。

### 3. 研究の方法

肝臓癌、大腸癌における S1P の意義を知るために、検討対象を手術による摘除例の検体として、癌組織、周囲の非癌部および血液中における S1P およびその代謝産物、代謝関連酵素の発現量を測定し、非癌部との比較の中から、肝臓癌、大腸癌に特徴的な変化を明らかにする。この癌特有な変化については、肝臓癌細胞株を用いて、細胞レベルで発現促進および抑制実験を行い、細胞生物学的役割、意義を解明する。さらに、癌特有な変化と各臨床パラメーター、病理所見、再発・予後との関連の解析により臨床的意義を明らかにする。

### 4. 研究成果

東大病院にて手術治療を受けた 77 例の肝臓癌例の癌組織における S1P の代謝動態 (図 2) について検討した。まず、従来の報告と同様に癌部における S1P 産生酵素 SK1 (図 2) および SK2 (図 2) mRNA 発現は非癌部に比較して亢進していた。ただし、SK1 については 77 例中 42 例で亢

進んでいたのに比してSK2では、ほぼ全例で亢進していた。SK1、SK2ともに、その高発現レベルは癌の未分化度、微小血管浸潤と相関しており、治療後の経過観察における再発のリスクであった。最も重要な知見として、従来の学説により、癌細胞において増加するとされている（信じられている）S1Pレベルについては、上昇しているとのデータは得られなかった。さらに、癌部において発現は低下するとされるS1P分解酵素SPL（図2）mRNAレベルは、むしろ亢進しているとの結果が得られ、その発現レベルは癌の未分化度と相関していた。これらの言わば想定外の知見について、その意義を探るべく肝癌細胞株を用いて産生酵素および分解酵素発現の刺激および抑制実験を行った。SK1およびSK2の発現を抑制したところ、肝癌細胞は増殖、運動、浸潤ともに低下し、逆に発現を亢進させたところ、細胞増殖は促進された。以上の肝癌における知見は、従来のS1Pに関する定説とは相反するものであり、とくに、S1Pレベルの増加が認められなかった点は、S1P研究分野において報告は殆どなく、その真偽を調べることは重要な問題となった。従来の定説については、主として大腸癌での検討結果から支持、確立されており、この経緯を考慮して大腸癌において、S1Pの動態の再検討を行うこととした。

大腸癌症例は東大病院で手術により治療を受けた26例であった。そのうち24例において、癌部でのS1P産生酵素SK1 mRNA発現は非癌部に比して、従来の報告どおり亢進していた。S1P産生酵素SK2 mRNA発現は全ての例で癌部において非癌部に比して亢進していた。従来の報告と異なる知見として、24例においてS1P分解酵素SPL mRNA発現は非癌部に比して癌部で亢進していた。また、別のS1P分解酵素SPP1（図2）mRNA発現も23例において、非癌部に比して癌部で亢進していた。これらの産生酵素と分解酵素の作用により規定されるS1Pの細胞内レベルは従来の定説と異なり、癌部で亢進しておらず、非癌部に比して有意な差は無かった。S1Pの動態については、細胞内から細胞外に移動し、さらに受容体と結合して細胞に働くことが明らかとなって注目されているが、この細胞内から外への動きに関連するトランスポーターSPNS2（図2）RNA発現は21例において非癌部に比して癌部において亢進していた。これらの知見を総括すると、癌組織ではS1P代謝が亢進しており、活発に産生されるとともに分解されることが推定され、この現象が活発な増殖と関連する可能性が考えられた。ただし、これらS1P代謝酵素、産物、受容体の発現レベルと癌の未分化度、微小血管浸潤、再発との相関は肝癌の場合と異なって認められなかった。検討症例数が26例であり、肝癌の77例に比べて少なかったことも、その一因と考えられる。

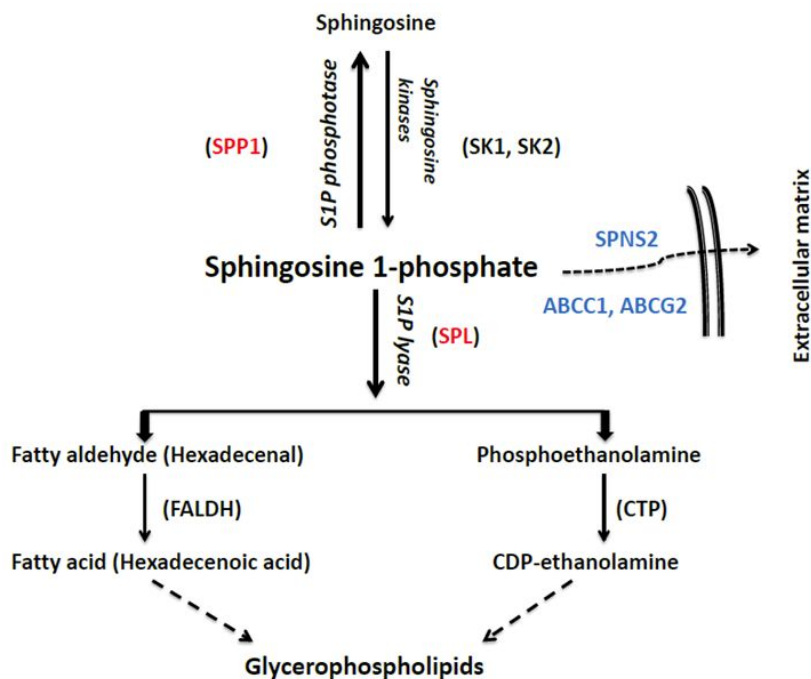


図2 S1Pの産生代謝経路

S1P分解酵素SPL発現亢進の細胞生物学的意義を調べるために、SPLと他の代謝産物、代謝酵素の発現との関連を調べた。発現量において、SPLはSPNS2と最も強く相関し、S1P2、SK2との有意な相関が認められた。また、SK2とS1P2、SPNS2とS1P2との有意な相関も確認された。このことから、S1P産生、分解、細胞外への移動がダイナミックに大腸癌の発生、進展に関わっている可能性が示唆された。さらに、大腸癌細胞株を用いて、SPL発現を強制的に亢進させたところ細胞増殖は亢進し、一方、siRNAによりSPL発現を低下させたところ、細胞増殖と浸潤能は低下すること確認された。

以上より、S1P産生と分解および細胞内の動きに関わる酵素の活性化が肝癌および大腸癌で初めて確認された。従来の学説が示す癌細胞内のS1Pレベルの上昇は確認されなかった。今回の

結果から、細胞増殖にはS1P量の増加ではなく、代謝の亢進が重要である可能性が考えられる。すなわち、癌細胞において、S1Pは活発に作られ、分解されており、恐らくグリセロリン脂質などの産生産物が、細胞の旺盛な増殖に意義があるのではと推定している。この点は、今後の課題として検討して行きたい。また、臨床応用を考えると、今回の我々の結果からは、S1P代謝に関わる酵素の中で、分解酵素SPLの作用の調節により、細胞の増殖およびアポトーシスの誘導が可能となることが期待される。この知見の治療学への応用を期したい。

最後に、従来、S1Pと肝線維化については、動物レベルの検討により、S1Pが線維化促進的に働くという点は、研究者間でほぼ一致し、承認されているものの、機序については異論があり、受容体のS1P1とS1P3が重要とする報告とS1P2が深く関与するとの我々の報告があって、結論が出ていなかった。とくにヒトにおいて、この点を解明するために、本検討（S1Pと肝癌、大腸癌）を進めるに当たり、非癌部組織でのデータを抽出解析し、肝線維化におけるS1P代謝の変化を調べた。線維化に伴い、肝組織のSK1発現は亢進するが、SK2発現には変化がなかった。線維肝では、S1Pレベルの増加は認められず、SPNS2発現の亢進が認められたもののSPL発現の変化は明らかでなかった。また、受容体発現についてはS1P2が亢進しており、一方、S1P1とS1P3の変化は認められなかった。以上から、肝線維化においては、S1Pは活発に産生されるとともに、細胞外へ輸送され、さらに受容体に結合すると考えられた。この肝線維化におけるS1P代謝の変動は、線維化治療のターゲットとなることが期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Uranbileg B, Nishikawa T, Ikeda H, Kurano M, Sato M, Saigusa D, Aoki J, Watanabe T, Yatomi Y. Evidence Suggests Sphingosine 1-Phosphate Might Be Actively Generated, Degraded, and Transported to Extracellular Spaces With Increased S1P2 and S1P3 Expression in Colon Cancer. Clin Colorectal Cancer. 2018 Jun;17(2):e171-e182. doi: 10.1016/j.clcc.2017.11.004. Epub 2017 Nov 21. PMID: 29223361

Sato M, Ikeda H, Uranbileg B, Kurano M, Saigusa D, Aoki J, Maki H, Kudo H, Hasegawa K, Kokudo N, Yatomi Y. Sphingosine kinase-1, S1P transporter spinster homolog 2 and S1P2 mRNA expressions are increased in liver with advanced fibrosis in human. Sci Rep. 2016 Aug 26;6:32119. doi 10.1038/srep32119 PMID: 27562371

〔学会発表〕(計 1 件)

Uranbileg B, Nishikawa T, Ikeda H, Kurano M, Sato M, Saigusa D, Aoki J, Watanabe T, Yatomi Y. S1P is actively metabolized and transported to extracellular spaces with increased receptors expression in colon cancer  
29th World Congress of World Association of Societies of Pathology and Laboratory Medicine (国際学会) 2017年

〔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 無し

## 6. 研究組織

(1)研究分担者 無し

(2)研究協力者

研究協力者氏名：バーサンジャブ・ウランビレグ、矢富 裕

ローマ字氏名：Baasanjav Uranbileg、Yutaka Yatomi

※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。