

令和元年6月24日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10491

研究課題名(和文) 食道癌のリンパ行性進展に關する脂質メディエーター分子機構の解明および臨床的意義

研究課題名(英文) Clinical significance of sphingosine-1-phosphate and sphingosine kinase 1 in lymphatic spread of esophageal cancer

研究代表者

市川 寛 (Ichikawa, Hiroshi)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：50721875

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)：食道癌92症例の手術検体を対象に、活性型のリン酸化SphK1(pSphK1)とSphK1の腫瘍組織における発現を免疫組織化学で評価した。pSphK1高発現群では病理学的なリンパ節転移陽性、リンパ管侵襲陽性、壁内転移陽性の頻度が高かった。さらに、pSphK1高発現群の術後5年全生存割合は50.8%であり、低発現群の67.3%と比較して有意に低かった。一方、SphK1発現とリンパ行性進展や術後生存期間との有意な関連は認められなかった。pSphK1発現は食道癌のリンパ行性進展や患者の不良な予後と関連している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食道癌ではリンパ節転移が強力な予後因子であり、リンパ行性進展は最も重要な進展形式である。スフィンゴシン-1-リン酸(以下S1P)は細胞情報伝達物質として働く脂質メディエーターであり、S1P産生責任酵素であるスフィンゴシンキナーゼ1型が活性化されることで産生される。このS1Pシグナルは癌のリンパ行性進展に関わることが報告されているが、食道癌における役割は未解明である。本研究成果により、食道癌のリンパ行性進展にはS1Pシグナルが関与している可能性が示唆された。S1Pシグナルを阻害する薬剤が既に他の疾患で臨床応用されており、今後は同シグナルを標的とした新たな食道癌治療開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：We evaluated pSphK1 and SphK1 expression in 92 surgically resected tumor tissues of esophageal cancer by the immunohistochemistry. Lymph node metastasis, lymphatic invasion and intramural metastasis were significantly associated with high expression of pSphK1. The 5-year overall survival rate of patients with pSphK1-high expression was significantly lower than that of patients with pSphK1-low expression. SphK1 expression was not associated with lymphatic spread and prognosis in patients with esophageal cancer. We provide the first evidence of the association between high expression of pSphK1 and both lymphatic spread and patient outcomes in esophageal cancer.

研究分野：消化器外科学

キーワード：食道癌 リンパ行性進展 スフィンゴシンキナーゼ1型 スフィンゴシン-1-リン酸

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

食道癌においてリンパ節転移陰性例の5年生存率が65.9%であるのに対し、陽性例は36.7%と低く、最も重要な予後規定因子とされている。また、食道癌の進展形式においてリンパ行性進展は最も重要な進展形式である。

スフィンゴ脂質であるスフィンゴシン-1-リン酸(Sphingosine-1-phosphate、以下S1P)は、脂質でありながらタンパク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解明された(Nature 1993; Nature 1996)。これまでの研究から、我々は「乳癌細胞株が産生したS1Pがリンパ管新生形成及びリンパ節転移に重要な役割を果たしている」ことを明らかにした(Cancer Research 2012)

(図1)。さらに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)、S1Pが慢性炎症状態において、癌の発生に関与することを解明してきた(Cancer Cell 2013)。また、S1Pは、免疫、炎症、代謝、そして悪性腫瘍など様々な疾患の病態に関与していることが分かってきた(Advances in biological regulation 2014)。これらの研究を受け、Nature Review誌が、癌によるリンパ管新生に関する総説の中で申請者らの論文を引用したことで、リンパ管新生の分子機構におけるS1Pの重要性が広く認識されるようになってきた(Nature Review Cancer 2014)。すなわち、S1Pは癌のリンパ行性進展の分子機構を解明する上で重要な分子であると考えられる。

しかしながら、S1Pは脂質であるため直接測定することが難しく、タンパク質を主体としたシグナル系よりも研究が遅れている。特に、臨床検体におけるS1P産生責任酵素であるスフィンゴシンキナーゼ1型(SphK1)の活性化の解析や、質量分析によるS1Pの測定から、臨床的意義を明らかにした研究は未だ行われていない。食道癌のリンパ行性進展におけるS1Pシグナルの役割については未解明である。

申請者らは、上述した食道癌及びS1P研究の学術的背景から、『食道癌のリンパ行性進展におけるS1Pシグナルの役割を解明することは、食道癌治療成績の向上のために重要な課題である』という着想に至った。

以上を踏まえ、「食道癌の癌細胞内で活性化されたSphK1が、脂質メディエーターであるS1Pの産生を亢進し、リンパ管新生を促進すると共に、癌細胞の浸潤能、生存能を高めることでリンパ行性進展に寄与している」という仮説を立て、本研究を企画した。

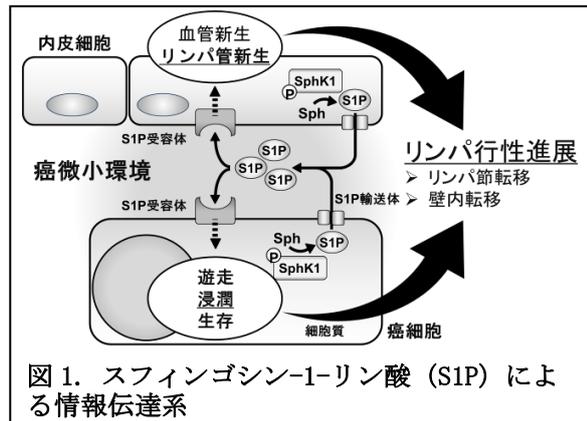


図1. スフィンゴシン-1-リン酸(S1P)による情報伝達系

2. 研究の目的

本研究の目的は、食道癌切除検体の原発巣におけるSphK1と活性化型であるリン酸化SphK1(pSphK1)の発現を免疫組織化学で評価し、臨床病理学的因子、患者予後との関連を検討することで、「食道癌のリンパ行性進展におけるSphK1とS1Pの分子制御機構を解明し、その臨床的意義を明らかにして、新たな治療法開発への科学的基盤を確立すること」である。

3. 研究の方法

(1) 対象は2000年から2008年に術前補助化学療法を施行せずに外科切除が施行された食道癌92症例の手術検体とした。活性化型であるリン酸化SphK1(pSphK1)の腫瘍組織中の発現を、モノクローナル抗体による免疫組織化学染色によって検出した。Tris-EDTA緩衝液(pH9.0)にて抗原の賦活化を行い、pSphK1抗体(1:100, ECM Biosciences LLC, Versailles, KY)は4℃にて一晩反応させた。血管内皮細胞の染色強度より弱い染色を1+、同程度の染色を2+、強い染色を3+と定義した。浸潤先進部にて染色強度を評価し、2+以上を高発現と定義した(図2)。各分子の発現と臨床病理学的因子や患者予後との関連について統計学的な解析を行った。

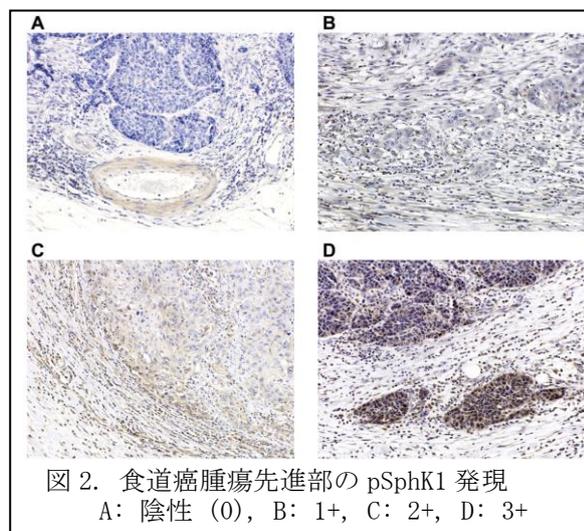


図2. 食道癌腫瘍先進部のpSphK1発現  
A: 陰性(0), B: 1+, C: 2+, D: 3+

(2) さらに、活性化型のpSphK1が食道癌のリンパ行性進展に重要であることを証明するために、非活性化型であるSphK1の発現も検討した。同様の検体を用いて、Tris-EDTA緩衝液

(ph9.0)にて抗原の賦活化を行い、SphK1抗体(1:100, Sigma Aldrich, St. Louis, MO)は4°Cにて一晚反応させた。腫瘍細胞に血管内皮細胞の染色強度より強い染色を認めた場合をSphK1陽性、それ以外の染色をSphK1陰性と定義した(図3)。SphK1発現とpSphK1発現の相関、臨床病理学的因子や患者予後との関連について統計学的な解析を行った。

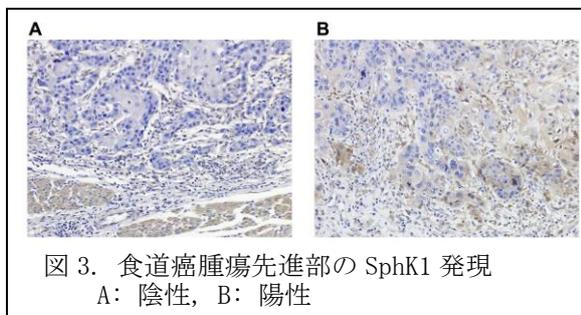


図3. 食道癌腫瘍先進部のSphK1発現  
A: 陰性, B: 陽性

#### 4. 研究成果

##### (1) 食道癌におけるpSphK1発現と臨床病理学的因子の関連

pSphK1高発現は59例(64%)、低発現は33例(36%)に認められた。pSphK1高発現群は低発現群と比較して有意に病理学的リンパ節転移個数が多く(中央値2個 vs. 0個、 $P < 0.01$ )、N因子(pN0/1/2/3)が高度であった(15/19/14/11例 vs. 24/6/3/0例、 $P < 0.01$ )。リンパ管侵襲陽性(69% vs. 18%、 $P < 0.01$ )、壁内転移陽性(27% vs. 3%、 $P < 0.01$ )はpSphK1高発現群において有意に頻度が高かった。多変量解析ではリンパ管侵襲陽性(オッズ比 = 5.63、 $P < 0.01$ )とリンパ節転移陽性(オッズ比 = 3.26、 $P = 0.04$ )が独立してpSphK1高発現に関連していた。pSphK1高発現群の5年生存率はpSphK1低発現群に対して有意に低かった(50.8% vs. 67.3%、 $P = 0.01$ )。

##### (2) pSphK1発現と食道癌患者の予後

単変量解析では、pSphK1高発現群の術後5年全生存率はpSphK1低発現群と比較して有意に低かった(50.8% vs. 68.5%、 $P = 0.01$ ) (図4)。その他、性別、病理学的T因子、N因子、リンパ管侵襲、静脈侵襲、壁内転移が全生存に関連する因子であった。これら7因子を共変量とした多変量解析を行った結果、男性、静脈侵襲陽性、壁内転移陽性が独立した予後不良因子であったが、pSphK1高発現は独立した予後不良因子ではなかった(ハザード比 = 1.58、 $P = 0.19$ )。

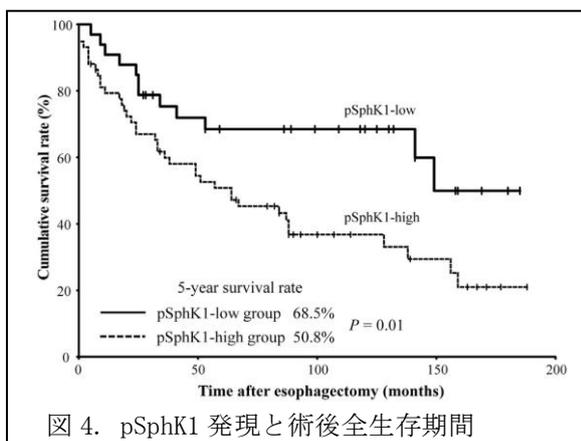


図4. pSphK1発現と術後全生存期間

##### (3) 食道癌におけるSphK1発現とpSphK1発現の相関、及び臨床病理学的因子や患者予後との関連

全92例中、SphK1陽性は72例(78%)、陰性は20例(22%)であった。SphK1発現と臨床病理学的因子や術後全生存期間に有意な関連は認められなかった。SphK1陽性72例中pSphK1高発現は49例(68%)、pSphK1低発現は23例(32%)であった。SphK1陽性かつpSphK1高発現群は有意に病理学的リンパ節転移個数多く、N因子が高度であり、リンパ管浸潤陽性や壁内転移陽性の頻度が高かった。SphK1陽性かつpSphK1高発現群の術後5年全生存率はSphK1陽性かつpSphK1低発現群と比較して有意に低かった(51.9% vs. 77.4%、 $P < 0.01$ ) (図5)。

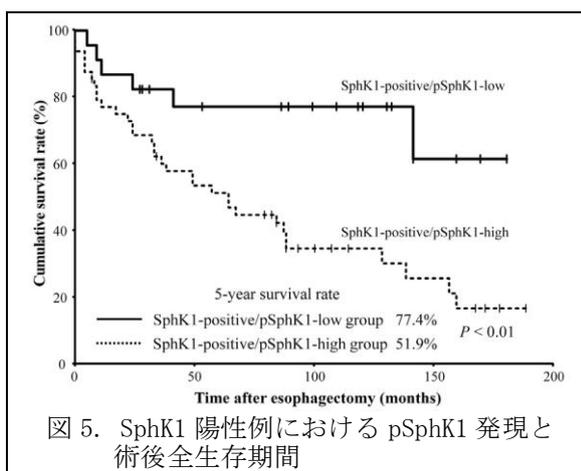


図5. SphK1陽性例におけるpSphK1発現と術後全生存期間

結論: 以上の結果から、腫瘍組織におけるpSphK1高発現は食道癌のリンパ行性進展や患者の不良な予後に関連していることが明らかになった。他の癌腫を対象とした研究結果と同様に、食道癌のリンパ行性進展にはS1Pシグナルが関与している可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2件)

- (1) Nemoto M, Ichikawa H, Nagahashi M, Hanyu T, Ishikawa T, Kano Y, Muneoka Y, Wakai T. Phospho-Sphingosine Kinase 1 Expression in Lymphatic Spread of Esophageal Squamous Cell Carcinoma. J Surg Res 2019;234:123-31. 10.1016/j.jss.2018.09.012 (査読あり)
- (2) Muneoka Y, Ichikawa H, Kosugi S, Hanyu T, Ishikawa T, Kano Y, Shimada Y, Nagahashi M, Sakata J, Kobayashi T, Kameyama H, Akazawa K, Wakai T. Hyperbilirubinemia predicts the infectious complications after esophagectomy for esophageal cancer. Ann Med Surg 2019;39:16-21. 10.1016/j.amsu.2019.02.004 (査読あり)

[学会発表] (計7件)

- (1) 市川 寛, 根本万理子, 石川 卓, 羽入隆晃, 角田知行, 須藤 翔, 島田能史, 永橋昌幸, 坂田 純, 小林 隆, 亀山仁史, 若井俊文. 食道扁平上皮癌リンパ行性進展における phospho-sphingosine kinase 1 発現の意義. 第118回日本外科学会定期学術集会 (東京) 2018年4月5日
- (2) Yuza K, Nagahashi M, Shimada Y, Nakano M, Tajima Y, Kameyama H, Nakajima M, Ichikawa H, Sakata J, Kobayashi T, Takabe K, Wakai T. High Expression of Sphingosine Kinase 1 in Colitis-Associated Cancer. 13th Annual Academic Surgical Congress (Jacksonville, USA) 2018年2月1日
- (3) Nakajima M, Yuza K, Tsuchida J, Hirose Y, Miura K, Ichikawa H, Shimada Y, Kobayashi T, Sakata J, Kameyama H, Abe M, Sakimura K, Wakai T, Nagahashi M. Sphingosine Kinase Type 1 and Type 2 Works Differently in Pancreatic Cancer. 13th Annual Academic Surgical Congress (Jacksonville, USA) 2018年1月31日
- (4) Yuza K, Nagahashi M, Hirose Y, Nakajima M, Miura K, Ichikawa H, Shimada Y, Sakata J, Kameyama H, Kobayashi T, Takabe K, Wakai T. High Levels of Sphingolipids in Human Pancreatic Cancer. 13th Annual Academic Surgical Congress (Jacksonville, USA) 2018年1月31日
- (5) Hirose Y, Nagahashi M, Yuza K, Miura K, Sakata J, Kobayashi T, Ichikawa H, Shimada Y, Kameyama H, Wakai T. Human Biliary Tract Cancer Contains High Levels of SIP. 13th Annual Academic Surgical Congress (Jacksonville, USA) 2018年1月31日
- (6) Miura K, Nagahashi M, Hirose Y, Kobayashi T, Sakata J, Kameyama H, Shimada Y, Ichikawa H, Takabe K, Wakai T. Dysregulation of Sphingolipids in Human Hepatocellular Carcinoma. 13th Annual Academic Surgical Congress (Jacksonville, USA) 2018年1月31日
- (7) Ichikawa H, Nagahashi M, Nemoto M, Hanyu T, Ishikawa T, Kano Y, Muneoka Y, Hirose Y, Shimada Y, Sakata J, Kobayashi T, Kameyama H, Kazuaki T, Wakai T. The Significance of Phospho-Sphingosine Kinase 1 in the Lymphatic Spread of Esophageal Carcinoma. 13th Annual Academic Surgical Congress (Jacksonville, USA) 2018年1月30日

## 6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：永橋 昌幸

ローマ字氏名：NAGAHASHI, Masayuki

所属研究機関名：新潟大学

部局名：医歯学総合病院

職名：研究准教授  
研究者番号（8桁）：30743918

研究分担者氏名：羽入 隆晃  
ローマ字氏名：HANYU, Takaaki

所属研究機関名：新潟大学  
部局名：医歯学総合病院

職名：助教  
研究者番号（8桁）：50719705

研究分担者氏名：小杉 伸一  
ローマ字氏名：KOSUGI, Shin-ichi

所属研究機関名：新潟大学  
部局名：医歯学総合病院

職名：特任教授  
研究者番号（8桁）：90401736

研究分担者氏名：若井 俊文  
ローマ字氏名：WAKAI, Toshifumi

所属研究機関名：新潟大学  
部局名：医歯学系

職名：教授  
研究者番号（8桁）：50372470

## (2) 研究協力者

研究協力者氏名：宗岡 悠介  
ローマ字氏名：MUNEOKA, Yusuke

研究協力者氏名：中野 雅人  
ローマ字氏名：NAKANO, Masato

研究協力者氏名：田中 花菜  
ローマ字氏名：TANAKA, Kana

研究協力者氏名：須藤 翔  
ローマ字氏名：SUDO, Natsuru

研究協力者氏名：崎村 健司  
ローマ字氏名：SAKIMURA, Kenji

研究協力者氏名：阿部 学  
ローマ字氏名：ABE, Manabu

※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。