

令和元年6月24日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15610

研究課題名(和文)胆道疾患における脂質メディエーターと胆汁酸とによる新しい細胞情報伝達機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of a novel cell signaling mechanism by lipid mediators and bile acids in biliary diseases

研究代表者

若井 俊文(WAKAI, TOSHIFUMI)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：50372470

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：胆汁酸は、胆道および腸管の浄化作用を担うだけでなく、種々の生理作用を引き起こす重要な情報伝達物質として働くことが明らかになってきた。私達は胆汁酸が脂質メディエーターであるスフィンゴシン-1-リン酸(S1P)の特異的受容体に直接作用し、細胞内情報伝達を活性化することを報告してきた。本研究では、胆道疾患(胆嚢炎、胆嚢癌、胆管癌等)における胆汁酸とS1P情報伝達機構について研究を行った。本研究では、各胆道疾患の胆汁及び組織中のS1P濃度を測定し、胆道癌組織では正常組織と比較してS1P濃度が有意に上昇していることを明らかにした。さらにS1Pが胆道癌のリンパ行性転移に寄与していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、胆道疾患において胆汁及び組織中のS1P濃度を質量分析装置で測定した初めての研究であり、学術的に意義がある。また、ヒトの胆道癌組織を用いた解析により、生体内の胆道癌組織においてもこれまでの基礎実験と同様、S1Pが癌のリンパ行性転移に寄与していることを明らかにしたことは臨床的に意義がある。今後、胆道癌のリンパ行性転移におけるS1Pの役割を明らかにすることで、胆道癌のリンパ行性進展転移を制御する新たな治療法開発へつながる可能性が期待される。

研究成果の概要(英文)：It has been revealed that bile acids work not only as detergent in the biliary tract and intestine, but also as signaling molecules that cause a variety of biological effects. We have previously reported that bile acids act directly on specific receptors of the lipid mediator, sphingosine-1-phosphate (S1P), to activate intracellular signal transduction. In this study, we investigated bile acids and S1P signaling in biliary diseases (cholecystitis, gallbladder cancer, cholangiocarcinoma, etc.). In this study, we measured S1P levels in bile and tissue in patients with each biliary disease, and revealed that S1P levels were significantly elevated in biliary tract cancer tissue compared with normal tissue. Furthermore, we revealed that S1P plays an important role in the lymphatic metastasis of biliary tract cancer.

研究分野：消化器外科学関連

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 胆汁酸 胆道疾患 細胞情報伝達機構 胆道癌 リンパ行性進展転移

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

### 1. 研究開始当初の背景

胆汁の主成分である胆汁酸は、胆道および腸管の浄化作用を担うだけでなく、細胞に直接作用することによって、種々の生理作用を引き起こす重要な情報伝達物質として働くことが、最近明らかになってきた。私達はこれまでに、脂質メディエーターであるスフィンゴシン-1-リン酸 (S1P) の特異的受容体に胆汁酸が直接作用し、細胞内情報伝達を活性化することを発見し (*Hepatology* 2012)、胆汁酸が S1P 受容体を介して肝臓における脂質代謝を制御していることを明らかにしてきた (*Hepatology* 2015)。さらに、S1P が腫瘍微小環境に作用しリンパ管新生・血管新生に関与すること (*Cancer Res* 2012)、炎症性発癌に関与すること (*Cancer Cell* 2013) を細胞培養実験、動物実験で実証してきた。これらの知見を踏まえ、今回私達は S1P と胆汁酸とによる細胞情報伝達機構に着目し、「S1P および胆汁酸が細胞膜上の S1P 受容体に作用し、情報伝達物質として働くことで、胆嚢炎の増悪、胆道癌の増殖・浸潤・転移に関与する」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「胆道疾患 (胆嚢炎、胆嚢癌、胆管癌等) において、S1P 受容体を介したシグナル伝達機構を解明し、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

#### (1) 肝胆道系組織のリピドミクス解析と胆汁 S1P 産生部位別濃度の解明

S1P は、細胞膜構成成分であるセラミドからセラミダーゼによって変換されたスフィンゴシンが、細胞内でスフィンゴシンキナーゼによりリン酸化されることで産生される。本研究では質量分析装置を用いた網羅的脂質解析 (リピドミクス解析) により、肝胆道系の組織内 S1P 濃度に加え、S1P の前駆体であるスフィンゴシン、セラミドの濃度を網羅的に解析した。切除標本から正常部組織 (肝臓、胆管上皮、胆嚢上皮、膵臓) および癌部 (肝細胞癌、胆管癌、胆嚢癌、膵癌) を採取し、直ちに液体窒素で凍結保存した。共同研究施設である米国バージニア州立大学リピドミクス部門において、各組織中の S1P 濃度および関連するスフィンゴリン脂質濃度を質量分析装置により測定した。また、米国の癌ゲノムデータベースである TCGA のデータを用いて、胆道癌および正常部におけるスフィンゴリン脂質に関連する代謝酵素の mRNA 発現量を解析し、胆道癌におけるスフィンゴリン脂質代謝経路について検討した。

#### (2) 胆道疾患 (胆嚢炎・胆道癌) における胆汁内 S1P および胆汁酸濃度測定

正常胆嚢内の胆汁、胆嚢炎における胆汁、胆嚢癌における胆汁、胆嚢炎を併発した胆嚢癌における胆汁を採取し、メタノール・クロロホルム混合液で保存した。リピドミクス解析により、胆汁中の S1P、スフィンゴシン、セラミド濃度を測定した。

#### (3) ヒト胆管癌・胆嚢癌細胞株を用いた細胞培養実験：S1P 受容体を介したシグナル伝達機構の解明

胆汁酸、精製 S1P、S1P 受容体阻害剤 JTE-013 と共にヒト胆管癌細胞株を培養し、細胞実験により細胞機能 (増殖能、浸潤能、遊走能、生存能) を解析した。癌細胞が産生する S1P の生理的機能を解析するために、胆管癌細胞株、膵癌細胞株を用いて、SphK1 をプラスミドベクターにより過剰発現、あるいは同酵素を CRISPR/Cas9 によりノックアウトした細胞株を樹立し、浸潤能・遊走能の制御実験を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 肝胆道系組織のリピドミクス解析と胆汁 S1P 産生部位別濃度の解明

胆道癌患者の外科切除標本より採取した正常部組織 (肝臓、胆管上皮、胆嚢上皮、膵臓) および癌部 (肝細胞癌、胆管癌、胆嚢癌、膵癌) を用いて、S1P を含むスフィンゴリン脂質濃度を質量分析装置で定量した結果、いずれの癌種においても癌部において S1P および関連する脂質メディエーターの濃度が有意に上昇していた。TCGA データを用いて、胆道癌における S1P 産生責任酵素 SPHK1 を含むスフィンゴリン脂質代謝関連酵素の mRNA 発現量を解析した結果、癌部においてセラミド合成経路の 1 つである de novo pathway を介し、S1P 産生が亢進していることが明らかとなった。癌部における SPHK1 発現は、リンパ行性転移関連因子の発現と正の相関関係を認めた。さらに胆嚢癌の外科切除標本を用いて免疫組織化学を行い、リンパ節転移陽性例と陰性例とで癌部におけるリン酸化 SPHK1 発現を比較した結果、リンパ節転移陽性例

において有意にリン酸化 SPHK1 が高発現していた。以上から、胆道癌ではセラミド合成経路の活性化と S1P 濃度の上昇を認め、SPHK1 により産生された S1P がリンパ行性転移を促進していることが示唆された。S1P は脂質であるが故に測定が困難であったため、ヒトの生体内での S1P の生理機能に関する研究は遅れており、胆道癌患者における S1P の癌に対する作用機序や、リンパ行性転移への関与を含めた臨床的意義については全く未解明であった。本研究において、ヒトの胆道癌組織を用いた解析により、生体内の胆道癌組織においても、これまでの基礎実験と同様、S1P が癌のリンパ行性転移に寄与していることを明らかにしたことは臨床的に意義がある。今後、胆道癌のリンパ行性転移における S1P の役割を明らかにすることで、胆道癌のリンパ行性転移を制御する新たな治療法開発へつなげる可能性が期待される。

## (2) 胆道疾患 (胆嚢炎・胆嚢癌) における胆汁内 S1P および胆汁酸濃度測定

正常な胆嚢内の胆汁、胆嚢炎における胆汁、胆嚢癌における胆汁、胆嚢炎を併発した胆嚢癌における胆汁を採取し、リポドミクス解析により、胆汁における S1P、スフィンゴシン、セラミド濃度を測定することに成功した。胆汁中の S1P やスフィンゴリン脂質を質量分析装置で直接測定した研究はこれまでほとんどなく、今後症例数を増やし、各疾患と胆汁中の脂質メディエーター関連について解明していく予定である。

## (3) ヒト胆管細胞・胆嚢癌細胞株を用いた細胞培養実験：S1P 受容体を介したシグナル伝達機構の解明

S1P は、胆管癌細胞株の遊走を促進し、S1P 受容体阻害薬のひとつである JTE-013 は S1P による胆管癌細胞の遊走を阻害した。また、S1P は胆管癌細胞株の浸潤能を有意に促進した。SphK1 を CRISPR/Cas9 によりノックアウトした細胞株を樹立し、浸潤能・遊走能の制御実験を行い、SphK1 が浸潤能・遊走能に寄与していることが明らかとなった。これらの知見から、S1P 情報伝達経路は胆道癌の発育進展に重要な役割を果たしており、今後、胆道癌における治療標的となりうる可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 5 件)

(1) Hirose Y, Nagahashi M, Katsuta E, Yuza K, Miura K, Sakata J, Kobayashi T, Ichikawa H, Shimada Y, Kameyama H, McDonald KA, Takabe K, Wakai T. Generation of sphingosine-1-phosphate is enhanced in biliary tract cancer patients and is associated with lymphatic metastasis. *Sci Rep*. 2018 Jul 17;8(1):10814. doi: 10.1038/s41598-018-29144-9.

(2) Hylemon PB, Takabe K, Dozmorov M, Nagahashi M, Zhou H. Bile acids as global regulators of hepatic nutrient metabolism. *Liver Res*. 2017 Jun;1(1):10-16. doi: 10.1016/j.livres.2017.03.002. Epub 2017 Apr 26.

(3) Wang Y, Aoki H, Yang J, Peng K, Liu R, Li X, Qiang X, Sun L, Gurley EC, Lai G, Zhang L, Liang G, Nagahashi M, Takabe K, Pandak WM, Hylemon PB, Zhou H. The role of sphingosine 1-phosphate receptor 2 in bile-acid-induced cholangiocyte proliferation and cholestasis-induced liver injury in mice. *Hepatology*. 2017 Jun;65(6):2005-2018. doi: 10.1002/hep.29076. Epub 2017 Apr 28.

(4) Nagahashi M, Yuza K, Hirose Y, Nakajima M, Ramanathan R, Hait NC, Hylemon PB, Zhou H, Takabe K, Wakai T. The roles of bile acids and sphingosine-1-phosphate signaling in the hepatobiliary diseases. *J Lipid Res*. 2016 Sep;57(9):1636-43. doi: 10.1194/jlr.R069286. Epub 2016 Jul 26.

(5) 永橋 昌幸, 大橋 拓, 滝沢 一泰, 坂田 純, 小林 隆, 若井 俊文. 脂質メディエーターを介した胆汁酸シグナル伝達系の役割. *胆道* (0914-0077)30 巻 2 号 Page220-227(2016.05)

### 〔学会発表〕(計 5 件)

(1) 廣瀬雄己, 永橋昌幸, 油座築, 安藤拓也, 相馬大輝, 諸和樹, 峠弘治, 石川博補, 堅田朋大, 三浦宏平, 市川寛, 滝沢一泰, 中島真人, 島田能史, 坂田純, 小林隆, 亀山仁史, 若井俊文. ヒト胆道癌組織における脂質メディエーター-S1P の発現とその意義. 第 118 回日本外科学会定期学術集会 (東京都) 2018.04.05-07

(2) Yuki Hirose, Masayuki Nagahashi, Kizuki Yuza, Kohei Miura, Jun Sakata, Takashi Kobayashi, Hiroshi Ichikawa, Yoshifumi Shimada, Hitoshi Kameyama, Kazuaki Takabe, Toshifumi Wakai. Human

biliary tract cancer contains high levels of S1P. The 13th Annual Academic Surgical Congress (Florida, USA) 2018.01.30-02.01

( 3 ) 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) 2017.02.07-09

( 4 ) Nakajima M, Miura Y, Ando T, Yuza K, Tsuchida J, Tajima Y, Abe M, Sakimura K, Wakai T, Nagahashi M. Roles of Sphingosine-1-Phosphate Produced by Sphingosine Kinases in Pancreatic Cancer Progression. The 12th Annual Academic Surgical Congress (Las Vegas, USA) 2017.02.07-09

( 5 ) 中島 真人, 永橋 昌幸, 土田 純子, 市川 寛, 島田 能史, 若井 俊文. スフィンゴシンキナーゼ欠損細胞の開発とその機能解析. 第 75 回日本癌学会学術総会 (神奈川県横浜市) 2016.10.06-08

〔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

## 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：Masayuki Nagahashi

所属研究機関名：新潟大学

部局名：医歯学総合病院

職名：講師

研究者番号 ( 8 桁 ): 30743918

研究分担者氏名：小林 隆

ローマ字氏名：Takashi Kobayashi

所属研究機関名：新潟大学

部局名：医歯学総合病院

職名：講師

研究者番号 ( 8 桁 ): 40464010

研究分担者氏名：坂田 純

ローマ字氏名：Jun Sakata

所属研究機関名：新潟大学

部局名：医歯学系

職名：講師

研究者番号 ( 8 桁 ): 70447605

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：亀山 仁史

ローマ字氏名：Hitoshi Kameyama

研究協力者氏名：堅田 朋大

ローマ字氏名：Tomohiro Katada

研究協力者氏名：廣瀬 雄己  
ローマ字氏名：Yuki Hirose

研究協力者氏名：安藤 拓也  
ローマ字氏名：Takuya Ando

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。