

令和 3 年 8 月 19 日現在

機関番号：23303

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02697

研究課題名(和文) SMS2欠損による腫瘍免疫活性化の分子機構解明とその新規AML療法への応用

研究課題名(英文) The mechanism by which anti-tumor effect by sphingomyelin deficiency and its application to tumor medication.

研究代表者

岡崎 俊朗 (Okazaki, Toshiro)

石川県立大学・生物資源環境学部・客員教授

研究者番号：40233308

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：免疫応答性SMS2-KOマウスにMLL/AF9遺伝子改変急性骨髄性白血病(AML)細胞を移植したところ、一旦増殖するが、その後次第に排除され、コントロールAMLマウスに比べて有意に長期生存した。移植前の放射線照射により免疫不全となったマウスはSMS2-KO状態であっても、白血病を発症し生存期間の延長も認められなかった。このAML進展抑制の機序として、SMS2欠損状態による同時的CTLの活性化とMDCの抑制による腫瘍免疫の活性化を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者が開発した免疫応答性マウスAMLモデルでは、抗PD-1抗体投与は腫瘍抑制効果を示さない。従って、SMS2欠損を介した腫瘍抑制は、既存の免疫チェックポイント療法とは異なる新規免疫活性化機構であり、SMS2欠損を介した腫瘍免疫活性化によるAMLマウスの長期生存の分子機構を解明することで、抗PD-1抗体療法に無効の腫瘍に対して、SMS2阻害免疫療法が有効と考えられ、SMS2阻害剤の開発を目指す研究は学術的、医学的にも非常に意義深い。

研究成果の概要(英文)：_In mouse immune-competent AML model the activation of anti-tumor immunity by anti-PD1 antibody was not shown. Therefore, anti-tumor immunity shown in SMS2-KO mice is different from the known anti-tumor immunity by PD-1/PDL1 axis. By understanding the mechanisms by which SMS2-deficiency induces anti-tumor immunity to AML the novel anti-tumor therapy to cancer which shows the resistant to PD1-inhibiting medication, suggesting that the development of SMS2 inhibition way becomes very valuable clinically and important medically to find a novel tumor immunity-activation medicine.

研究分野：医学

キーワード：スフィンゴミエリン合成酵素 セラミドスフィンゴミエリン 腫瘍免疫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

急性骨髄性白血病 (AML) の治療成績は、化学療法の進歩、造血肝細胞移植法の改良により向上したが、未だに、その5年生存率は50%前後であり、改善策としてPD1/PDL系やCALT4などの腫瘍免疫抑制システムを阻害する新規治療が脚光を浴びている。実際、これまでの臨床的白血病治療戦略の重要な柱である造血幹細胞移植 (SCT) において、(1) 移植片対宿主病 (GVHD) の強い症例では移植片対白血病 (GVL) 効果が大きく再発リスクが低い、(2) ドナーリンパ球療法 (DLI) の有効症例がある、や(3) T細胞除去ドナー細胞を用いたSCTではGVHDが少ないがGVL効果も少ない、などの細胞障害性T細胞 (CTL) のAML治療への有用性を示す知見が多く得られ、慢性リンパ性白血病やホジキンリンパ腫に対する抗PD-1抗体による免疫療法は主要な治療戦略の一つになった。しかし、AMLに対しては、抗PD1抗体による免疫チェックポイント療法によって画期的な治療成績の改善は認められず、新たな免疫治療の開発が必要である。

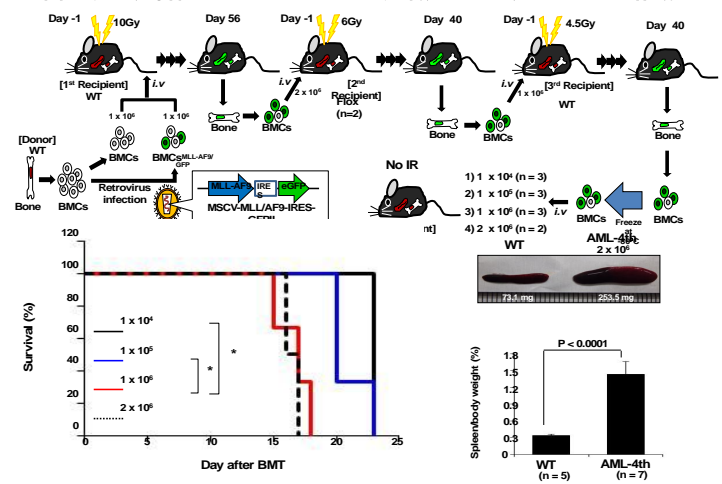
これまでのAML発症モデルは、T細胞、B細胞、NK(T)細胞などを欠損し、自然免疫や獲得免疫を発現できない免疫不全マウスを用いてAML細胞の増殖抑制機構を解析してきたが、個体での腫瘍免疫監視システムの分子基盤の解析には、免疫応答性を保持したマウス

でのAMLモデルの確立が不可欠であった。従来のマウスAMLモデルは、レシピエントマウスを移植前に全身照射するが、申請者らは、AML関連遺伝子MLL/Af9過剰発現細胞の移植時に照射を継代ごとに10Gyから6Gyへ、さらに4.5Gyへと減弱して行くことで、最終的に放射線照射なしに免疫応答性を保持したマウスにヒト型AMLを発症させ、3週間程度で死亡するAMLマウスモデルを完成した(図1)

スフィンゴ脂質スフィンゴミエリン(SM)は生体膜マイクロドメイン形成に必須の分子であり、SMはスフィンゴミエリン合成酵素(SMS)により産生される。申請者らは、SMS1、SMS2、SMSrの遺伝子クローニングを初めて成功させ、KOマウスを作成し、その生理機能解析を行った。SMS1およびSMS2の欠損は、動脈硬化、肥満の改善や耐糖能異常を誘導し、SMS1は膜マイクロドメインのSMホメオスターシスに関与し、その欠損は腫瘍細胞増殖を抑制する。一方、SMS2はその発現が刺激応答性であり、DS(デキストラン硫酸ナトリウム)/AOM(アゾキシメタン)誘導マウス大腸炎、腫瘍モデルでSMS2が欠損すると、増殖性サイトカインや炎症誘導ケモカインの抑制によって大腸炎、大腸癌の発症が阻害される事を報告した。

これらの結果は、SMS2が、炎症、腫瘍における免疫監視機構の制御に関与することを強く示唆し、申請者らは、免疫応答性マウスにおけるSMS2欠損のAML発症への影響を検討したところ、AML細胞が排除されマウスは長期生存する事を確認した。興味深いことに、移植前照射を施行し、MLL/Af9過剰発現細胞を移植したところ、コントロールマウスとSMS2-KOマウスとの生存期間の差異は認められなかった。即ち、SMS2欠損状態での腫瘍免疫細胞の活性亢進が、AMLの進展阻害に必須な事が確認された。

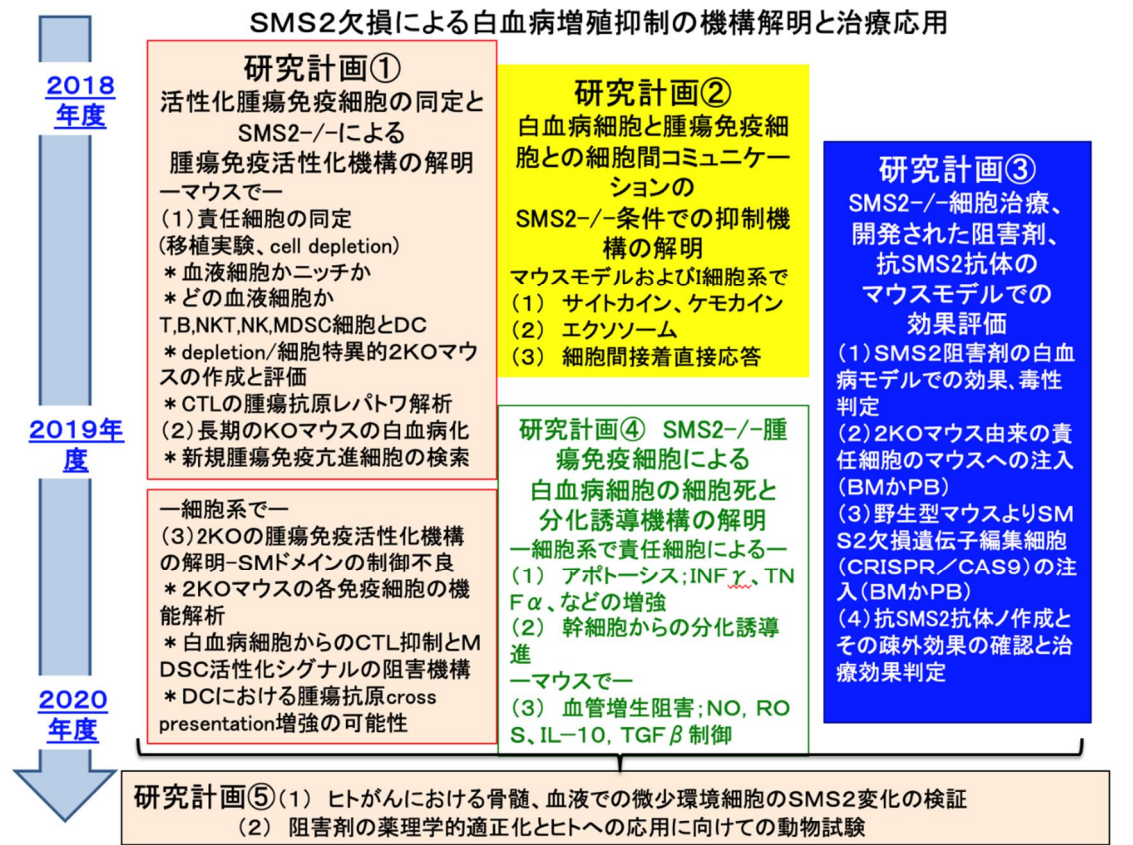
図1 免疫応答性マウスでのAML/Af9過剰発現AML発症モデルの作成



2. 研究の目的

本研究の目的は、上記の「問い」に対する解決策を示すことである。(1) SMS2欠損によるマウスAML進展抑制が、どのクラスの免疫細胞(T細胞、B細胞、NK(T)細胞や骨髄由来免疫抑制細胞(MDSC)および樹状細胞など)の抗腫瘍機能を、どのような細胞間コミュニケーションの制御に基づき可能か、解明する。(2) AML細胞による免疫監視システムの制御について直接的細胞間接着、AML由来のエクソソームやサイトカインによる間接的作用などが、SMS2欠損により如何に制御されるか、解明する。(3) どのような機構でSM減少による免疫細胞の活性化を亢進するかについて、免疫細胞の生体膜を含むどの小器官膜でのSM変化が必須か同定し、その生化学的、分子機構を解明する。(4) SMS2阻害低分子化合物(北海道大学との共同研究)や抗SMS2抗体(国立感染研との共同研究)や同定されたSMS2欠損CTL細胞による免疫細胞治療などのマウスAMLモデルでの抑制効果を明らかにして、新規の免疫監視亢進療法を開発することを目指す。

3. 研究の方法



4 . 研究成果

SMS2 欠損がどのような機構でマウス AML モデルの発症を抑制し生存期間を延長するかを検討した結果、(1) SMS2 欠損状態は抗腫瘍性 CTL の亢進と腫瘍増殖性 MDSC の抑制の 2 方向から腫瘍免疫を増強し、PD-1 /PDL-1 系の抑制作用とは異なる作用機序を介して AML 発症マウスの生存期間を優位に延長すること、(2) 抗 PD-1 抗体との併用で SMS2 欠損状態が悪性リンパ腫、乳がん、卵巣癌などの腫瘍でも相乗効果を発揮すること、(3) SMS2 阻害剤による CTL の亢進と MDSC の抑制は樹状細胞の膜ミクロドメイン構造の変化によって誘導される可能性が明らかになった。したがって、SMS2 欠損状態による樹状細胞を介した同時的 CTL の活性化と MDSC の抑制による腫瘍免疫活性化が腫瘍進展抑制の機序と考えられ、腫瘍免疫抑制性 PD-1 の阻害を介した作用と相乗効果を示す新たな腫瘍免疫活性化機構の可能性を示した。したがって、本研究で SMS2 阻害剤を創成し、その抗腫瘍効果を種々のがんモデルで検証し、その効果発現機序をスフィンゴ脂質による樹状細胞制御の観点から明らかにしようと考えた。すでに、研究の前準備として、SMS2 阻害低分子化合物 (北海道大学、門出研究室との共同研究) の探索に着手し、SMS1/2 遺伝子の完全欠損 MEF 細胞に SMS1 または SMS2 遺伝子をそれぞれ過剰発現した MEF-SMS1 と MEF-SMS2 細胞のライゼートを用いて、SMS1 に比べて SMS2 に対する阻害活性が *in vitro* で 10^3 オオーダー程度強い候補分子群を発見している。SMS 阻害によって SM/セラミド・レオスタットを亢進させて、アポトーシス誘導脂質セラミド作用を増強する試みは、我々の研究グループを中心として、SMS2-KO マウスを用いて種々のがん細胞でその効果が明らかになっているが、腫瘍免疫を活性化することで、SMS2 阻害剤による抗腫瘍効をマウス腫瘍モデルで明らかにした報告はない。国内外で PD-1/PDL-1 系抑制による、種々のがん増殖抑制は実臨床で実践されているが、有効例が少数で短期の再発が問題となっている。SMS 阻害による腫瘍免疫亢進機構は PD-1/PDL-1 系とは異なるため、本研究により SMS2 阻害剤効果が実証された暁には、併用による抗腫瘍効果の飛躍的な増強を認める可能性が高い。同様の研究成果は、国内外を通じて確認できないため、本研究は非常に独創的で、学術的にも医学的にも重要であり、新規性に優れた課題であったと確信する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件／うち国際共著 3件／うちオープンアクセス 13件）

1. 著者名 Zhang Xuwei, Sakamoto Wataru, Canals Daniel, Ishibashi Masumi, Matsuda Masaya, Nishida Kentaro, Toyoshima Masafumi, Shigeta Shogo, Taniguchi Makoto, Senkal Can E., Okazaki Toshiro, Yaegashi Nobuo, Hannun Yusuf A., Nabe Takeshi, Kitatani Kazuyuki	4. 巻 35
2. 論文標題 Ceramide synthase 2 C 24:1 ceramide axis limits the metastatic potential of ovarian cancer cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.202001504RR	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Taniguchi Makoto, Okazaki Toshiro	4. 巻 9
2. 論文標題 Ceramide/Sphingomyelin Rheostat Regulated by Sphingomyelin Synthases and Chronic Diseases in Murine Models	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Lipid and Atherosclerosis	6. 最初と最後の頁 380 ~ 380
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.12997/jla.2020.9.3.380	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Bestard-Escalas Joan, Maimo-Barcelo Albert, Lopez Daniel H., Reigada Rebeca, Guardiola-Serrano Francisca, Ramos-Vivas Jose, Hornemann Thorsten, Okazaki Toshiro, Barcelo-Coblijn Gwendolyn	4. 巻 12
2. 論文標題 Common and Differential Traits of the Membrane Lipidome of Colon Cancer Cell Lines and Their Secreted Vesicles: Impact on Studies Using Cell Lines	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 1293 ~ 1293
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers12051293	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Taniguchi Makoto, Ueda Yoshibumi, Matsushita Michiko, Nagaya Shingo, Hashizume Chieko, Arai Kenta, Kabayama Kazuya, Fukase Koichi, Watanabe Ken, Wardhani Lusi Oka, Hayashi Kazuhiko, Okazaki Toshiro	4. 巻 34
2. 論文標題 Deficiency of sphingomyelin synthase 2 prolongs survival by the inhibition of lymphoma infiltration through ICAM 1 reduction	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 3838 ~ 3854
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.201901783RR	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Matsumoto Goichi, Hashizume Chieko, Watanabe Ken, Taniguchi Makoto, Okazaki Toshiro	4. 巻 25
2. 論文標題 Deficiency of sphingomyelin synthase 1 but not sphingomyelin synthase 2 reduces bone formation due to impaired osteoblast differentiation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Medicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s10020-019-0123-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 YOSHIKAWA Yoshihiro, YOSHIKAWA Tatsuya, DOMAE Eisuke, HIRAI Yuya, KAMADA Aiko, OKAZAKI Toshiro, IKEO Takashi	4. 巻 40
2. 論文標題 Knockdown of sphingomyelin synthase 2 inhibits osteoclastogenesis by decreasing RANKL expression in mouse primary osteoblasts	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biomedical Research	6. 最初と最後の頁 189 ~ 196
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2220/biomedres.40.189	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nakamura T, Satoh-Nakamura T, Nakajima A, Kawanami T, Sakai T, Fujita Y, Iwao H, Miki M, Masaki Y, Okazaki T, Ishigaki Y, Kawano M, Yamada K, Matsui S, Saeki T, Kamisawa T, Yamamoto M, Hamano H, Origuchi T, Hirata S, Tanaka Y, Tsuboi H, Sumida T, Okazaki K, Tanaka M, Chiba T, Mimori T, Umehara H	4. 巻 30
2. 論文標題 Impaired expression of innate immunity-related genes in IgG4-related disease: A possible mechanism in the pathogenesis of IgG4-RD	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Modern Rheumatology	6. 最初と最後の頁 551 ~ 557
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14397595.2019.1621475	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Toshima Kaoru, Nagafuku Masakazu, Okazaki Toshiro, Kobayashi Toshihide, Inokuchi Jin-ichi	4. 巻 31
2. 論文標題 Plasma membrane sphingomyelin modulates thymocyte development by inhibiting TCR-induced apoptosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 211 ~ 223
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxy082	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hanamatsu Hisatoshi, Mitsutake Susumu, Sakai Shota, Okazaki Toshiro, Watanabe Ken, Igarashi Yasuyuki, Yuyama Kohei	4. 巻 7
2. 論文標題 Multiple Roles of Sns2 in White and Brown Adipose Tissues from Diet-induced Obese Mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Metabolic Syndrome	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4172/2167-0943.1000241	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Lopez Daniel H., Bestard-Escalas Joan, Garate Jone, Maimo-Barcelo Albert, Fernandez Roberto, Reigada Rebeca, Khorrami Sam, Ginard Daniel, Okazaki Toshiro, Fernandez Jose A., Barcelo-Coblijn Gwendolyn	4. 巻 1863
2. 論文標題 Tissue-selective alteration of ethanolamine plasmalogen metabolism in dedifferentiated colon mucosa	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids	6. 最初と最後の頁 928 ~ 938
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbalip.2018.04.017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Zama Kota, Mitsutake Susumu, Okazaki Toshiro, Igarashi Yasuyuki	4. 巻 42
2. 論文標題 Sphingomyelin in microdomains of the plasma membrane regulates amino acid-stimulated mTOR signal activation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Biology International	6. 最初と最後の頁 823 ~ 831
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cbin.10941	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nomoto Koji, Itaya Yurina, Watanabe Ken, Yamashita Tadashi, Okazaki Toshiro, Tokudome Yoshihiro	4. 巻 27
2. 論文標題 Epidermal permeability barrier function and sphingolipid content in the skin of sphingomyelin synthase 2 deficient mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Experimental Dermatology	6. 最初と最後の頁 827 ~ 832
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/exd.13497	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ueda Yoshibumi, Ishiwata Toshiyuki, Shinji Seiichi, Arai Tomio, Matsuda Yoko, Aida Junko, Sugimoto Naotoshi, Okazaki Toshiro, Kikuta Junichi, Ishii Masaru, Sato Moritoshi	4. 巻 8
2. 論文標題 In vivo imaging of T cell lymphoma infiltration process at the colon	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-22399-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計5件(うち招待講演 4件/うち国際学会 5件)

1. 発表者名 Toshiro Okazaki, Makoto Taniguchi and Chieko Hashizume
2. 発表標題 Inhibition of inflammation and tumor progression in mouse model by SMS2 deficiency
3. 学会等名 8th International Conference of Lipids and Atherosclerosis, Seoul, Korea (招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toshiro Okazaki
2. 発表標題 Sphingomyelin synthase 2 deficiency inhibits the induction of murine colitis-associated colon cancer
3. 学会等名 1st Japan-Europe workshop on glycolipids and membrane homeostasis, Strasbourg, France (招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hirabayashi Yoshiro and Okazaki Toshiro
2. 発表標題 ROLE OF GLYCOSPHINGOLIPID BALANCE REGULATED BY SPHINGOMYELIN SYNTHASE 2 IN INFLAMMATION AND PROGRESSION OF CANCER IN MURINE MODELS
3. 学会等名 25th International symposium on glycoconjugates, Milano, Italy (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Okazaki Toshiro
2. 発表標題 SMS2 deficiency suppresses the infiltration of EL4 T lymphoma cells through ICAM-1 reduction
3. 学会等名 2nd Korea-Japan joint coference on Sphingolipids, Sapporo, Japan (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Okazaki Toshiro
2. 発表標題 International organizer and session key note speaker: sphingolipids metabolism and metabolic syndrome
3. 学会等名 4th international conference of molecular medicine of sphingolipids (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 橋爪千恵子、谷口真、岡崎俊朗	4. 発行年 2019年
2. 出版社 食品化学新聞社	5. 総ページ数 337
3. 書名 セラミド研究の新展開	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	橋爪 智恵子 (HASHIZUME Chieko) (70564128)	金沢医科大学・医学部・特定助教 (33303)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	長屋 進吾 (NAGAYA Shingo) (20403339)	金沢医科大学・医学部・特定助教 (33303)	
連携研究者	谷口 真 (Taniguchi Makoto) (30529433)	金沢医科大学・医学部・特定助教 (33303)	
連携研究者	門出 健次 (MONDE Kenji) (40210207)	北海道大学・先端生命科学研究科(研究院)・教授 (10101)	
連携研究者	深澤 征義 (FUKAZAWA Masayoshi) (20291130)	国立感染症研究所・その他部局等・室長 (82603)	
連携研究者	榊山 一哉 (KABAYAMA Kazuya) (00399974)	大阪大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授 (14401)	
連携研究者	土川 博史 (TSUCHIKAWA Hiroshi) (30460992)	大阪大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授 (14401)	
連携研究者	岡崎 俊朗 (OKAZAKI Toshiro) (40233308)	金沢医科大学・医学部・教授 (33303)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------