

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19576

研究課題名（和文）S1Pの癌代謝制御機構に着眼したトリプルネガティブ乳癌の病態と薬剤耐性機序の解明

研究課題名（英文）Mechanisms of cancer metabolism and drug resistance regulated by S1P in triple negative breast cancer

研究代表者

永橋 昌幸（Nagahashi, Masayuki）

新潟大学・医歯学総合病院・研究准教授

研究者番号：30743918

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：TNBC細胞株に対しS1P産生酵素SphK1のノックアウト（KO）を行い、SphK1が細胞増殖能、遊走能、浸潤能に寄与していることを確認した。乳癌手術切除症例に対してリポミクス解析を行い、TNBCは組織中および血清中のS1P濃度が他のサブタイプよりも有意に高く、S1Pが重要な役割を担っていることが示唆された。メタボローム解析によって、SphK1KO細胞では解糖系やTCA回路の代謝産物が有意に減少し、酸化ストレスや薬剤耐性に関わるグルタチオンの産生も減少がみられ、これらの経路にS1Pが関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年のがん研究の飛躍的な進歩にも関わらず、TNBCをはじめとする一部の癌では、遺伝子変異に乏しく、タンパク分析を行っても治療に直接結びつくような異常が見つかりにくい。本研究は、脂質であることから研究することが難しく、これまで看過されてきた脂質メディエーターを介した癌代謝制御機構に着目し、TNBCの高悪性度の病態メカニズムの追究を行った。本研究において、TNBCの薬剤耐性における脂質メディエーターを介した癌代謝制御機構の役割を解明することによって、S1Pを標的とした新規治療開発の足掛かりとなる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：The sphingosine-1-phosphate (S1P)-producing enzyme SphK1 was knockout (KO) on the triple negative breast cancer (TNBC) cell line, and it was confirmed that SphK1 contributed to cell proliferation, migration, and infiltration. Lipidomics analysis of surgical specimens of breast cancer showed that TNBC showed significantly higher S1P concentrations in tissues and serum than other subtypes, suggesting that S1P plays an important role. Metabolome analysis significantly reduced glycolytic and TCA cycle metabolites in SphK1KO cells, as well as reduced glutathione production associated with oxidative stress and drug resistance, suggesting that S1P may be involved in these pathways.

研究分野：腫瘍外科学

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 乳癌

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) トリプルネガティブ乳癌 (Triple Negative Breast Cancer、以下 TNBC と略) は、エストロゲン受容体陰性、プロゲステロン受容体陰性、及び HER2 蛋白陰性を示す乳癌のサブタイプであるが、生物学的に高悪性度で浸潤や転移をきたしやすく、薬物療法に対しても治療抵抗性を生じやすいことから、乳癌患者の中で最も予後不良の一群である。近年、次世代シーケンサー (NGS) を用いた網羅的遺伝子解析により、発癌や癌の悪化に直接寄与するドライバー遺伝子変異が明らかとなり、これらを標的とした新たな分子標的治療薬が次々と開発され、肺腺癌や大腸癌など様々な癌種において患者予後の改善に寄与している。しかし、TNBC は肺腺癌や大腸癌とは異なり、治療標的となるドライバー遺伝子変異に乏しく、網羅的遺伝子解析にも関わらず、その病態メカニズムは未だに不明の点が多い。TNBC の浸潤や転移、薬剤抵抗性に関わる未知の分子機構を明らかにし、新たな治療法を開発することが望まれる。

(2) スフィンゴシン-1-リン酸 (Sphingosine-1-phosphate、以下 S1P と略) 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。これまでの研究により、炎症や免疫調節、癌の発育進展など脂質メディエーターの様々な役割が明らかになってきた。興味深いことに NGS による網羅的癌遺伝子研究の結果、ドライバー遺伝子変異に乏しい Genomically Stable 型の癌において、S1P が重要な働きを担っている可能性が示唆された (Nature 2014)。応募者はパイロット研究を行い、乳癌の中でも特に TNBC で癌部位において SphK1 の発現が高く、腫瘍内 S1P 濃度が高いことを発見し、「TNBC の高悪性度の病態は、遺伝子やタンパク質の異常だけでは説明がつかず、その背景には脂質メディエーターを介した癌代謝制御機構が関与している」と仮説を立て、本研究を企画した。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、「脂質メディエーター・S1P を介した癌代謝制御機構に着目して TNBC の病態メカニズムを解明し、新規治療法開発への研究基盤を確立すること」である。

### 3. 研究の方法

(1) TNBC の増殖・浸潤、転移に関わる S1P 癌代謝制御機構の解明：TNBC 細胞株の S1P 産生酵素 (SphK1、SphK2) を各々ノックアウト (KO) し、癌代謝と増殖・浸潤能とを分析する。SphK1/SphK2KO 細胞を SphK1/SphK2KO マウスに移植し、癌浸潤や転移を解析する。

(2) バイオインフォマティクスによる TNBC における S1P の臨床的意義の検討：TNBC 症例に対し、新鮮凍結標本・血清を用いて S1P を含めたりピドミクス解析を行い、臨床病理学的因子との比較検討を行い、TNBC における S1P の臨床的意義を明らかにする。

(3) TNBC の薬剤耐性に関わる S1P 癌代謝制御機構の解明：作製した KO 細胞を用い、S1P により制御される癌の代謝状態と、殺細胞薬や分子標的薬への薬剤感受性とを比較解析する。また、既存の治療薬と S1P 標的治療薬との相乗作用を実験的に検証する。

### 4. 研究成果

(1) TNBC 乳癌における S1P の役割を明らかにするため、CRISPR/Cas9 遺伝子編集技術を用いて、マウスおよびヒト由来の TNBC 細胞株 (E0771 細胞株) に対し、S1P 産生酵素 SphK1 の KO を行った。SphK1 の細胞増殖能、遊走能、浸潤能における役割を *in vitro* 実験で分析し、SphK1 が細胞増殖能、遊走能、浸潤能に寄与していることを確認した。また、CRISPR/Cas9 遺伝子編集技術を用いて、SphK1KO および SphK2KO マウスを各々作製し、SphK1KO 細胞を SphK1KO マウスに移植する実験を実施した。SphK1KO 細胞を SphK1KO マウスに移植すると、野生型細胞や野生型動物と比較して、腫瘍の増殖が著しく抑制され、癌および宿主が産生する S1P が癌の増殖に相補的に寄与している可能性が示唆された。

(2) 乳癌手術切除症例に対し、新鮮凍結標本・血清に対するリピドミクス解析を行い、S1P 及び関連代謝物質について網羅的に解析した。乳癌のサブタイプの中で、TNBC は組織中および血清中の S1P 濃度が有意に高く、TNBC において S1P が特に重要な役割を担っていることが示唆された。また血清 S1P 濃度は、癌の進行度と相関することを認め、乳癌の発育進展の過程において S1P が寄与していることが明らかとなった。

(3) 作製した SphK1KO 及び SphK2KO 細胞を用いて、メタボローム解析を行った。SphK1KO 細胞では、解糖系や TCA 回路の代謝産物が有意に減少し、酸化ストレスや薬剤耐性に関わるグルタチオン (GSH) の産生も減少がみられ、これらの経路に S1P が関与している可能性が示唆された。また、各律速酵素の発現を解析し、更に標識を行ったグルコースやアミノ酸を付加したトレース実験を行うことで、S1P シグナル経路が関与する癌代謝経路について解析中である。また、S1P 受容体阻害薬である FTY720 は、乳癌細胞株の増殖を抑制し、薬剤耐性に関わるグルタチオン産生を阻害する可能性について、今後検証を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kazuki Moro, Masayuki Nagahashi, Emmanuel Gabriel, Kazuaki Takabe & Toshifumi Wakai	4. 巻 26
2. 論文標題 Clinical application of ceramide in cancer treatment	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Breast Cancer	6. 最初と最後の頁 407-415
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12282-019-00953-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Nagahashi Masayuki, Abe Manabu, Sakimura Kenji, Takabe Kazuaki, Wakai Toshifumi	4. 巻 109
2. 論文標題 The role of sphingosine-1-phosphate in inflammation and cancer progression	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3671 ~ 3678
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.13802	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

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Masayuki Nagahashi, Junko Tsuchida, Mayuko Ikarashi, Kazuki Moro, Chie Toshikawa, Hiroshi Ichikawa, Yoshifumi Shimada, Kazuaki Takabe, Toshifumi Wakai
2. 発表標題 Association between estrogen receptor status and plasma S1P levels in breast cancer patients
3. 学会等名 The 15th Annual Academic Surgical Congress (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 永橋 昌幸, 土田 純子, 遠藤 麻巳子, 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, 中島 真人, 小山 諭, 神林 智寿子, 金子 耕司, 佐藤 信昭, 若井 俊文
2. 発表標題 シンポジウム 5 ゲノム医療推進に向けた取り組みの課題と展望 当科におけるゲノム医療推進に向けた取り組み
3. 学会等名 第26回日本乳癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nagahashi M, Ling Y, Hayashida T, Kitagawa Y, Futamura M, Yoshida K, Kuwayama T, Nakamura S, Toshikawa C, Yamauchi H, Yamauchi T, Kaneko K, Kanbayashi C, Sato N, Miyoshi Y, Tsuchida J, Nakajima M, Shimada Y, Ichikawa H, Lyle S, Takabe K, Okuda S, Wakai T
2. 発表標題 Tumor mutation burden in triple negative breast cancer patients in Japan
3. 学会等名 2018 American Society of Clinical Oncology Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 永橋 昌幸, 土田 純子, 油座 築, 中島 真人, 高部 和明, 若井 俊文
2. 発表標題 肥満が引き起こす慢性炎症による乳癌の転移促進と脂質メディエーターの役割
3. 学会等名 第25回外科侵襲とサイトカイン研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nagahashi M, Tsuchida J, Moro K, Ikarashi M, Nakajima M, Abe M, Saito T, Komatsu M, Soga T, Takabe K, Sakimura K, Wakai T
2. 発表標題 Sphingosine-1-phosphate Signaling Regulates Drug Resistance Mediated by Glutathione
3. 学会等名 The 14th Annual Academic Surgical Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔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
研究分担者	若井 俊文  (Wakai Toshifumi)  (50372470)	新潟大学・医歯学系・教授    (13101)	

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
研究分担者	五十嵐 道弘  (Ikarashi Michihiro)  (50193173)	新潟大学・医歯学系・教授    (13101)	
研究分担者	崎村 建司  (Sakimura Kenji)  (40162325)	新潟大学・脳研究所・フェロー    (13101)	
研究分担者	阿部 学  (Abe Manabu)  (10334674)	新潟大学・脳研究所・准教授    (13101)	
研究分担者	奥田 修二郎  (Okuda Shujiro)  (00512310)	新潟大学・医歯学系・准教授    (13101)	
研究分担者	土田 純子  (Tsuchida Junko)  (90769415)	新潟大学・医歯学総合病院・専任助教    (13101)	

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