

令和 7 年 6 月 12 日現在

機関番号：34519

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2024

課題番号：21K19522

研究課題名（和文）トリプルネガティブ乳癌におけるTP53と脂質分子の相補的な細胞制御機構の解明

研究課題名（英文）Complementary cellular regulatory mechanisms of TP53 and lipid molecules in triple negative breast cancer

研究代表者

永橋 昌幸（Nagahashi, Masayuki）

兵庫医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30743918

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：スフィンゴシン-1-リン酸（S1P）は、脂質でありながら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、TP53遺伝子の細胞死制御機構にも関与する可能性がある。本研究では、TP53遺伝子異常におけるS1Pを介した分子制御機構に着目し、トリプルネガティブ乳癌における新たな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。臨床検体解析の結果、トリプルネガティブ乳癌患者において、TP53遺伝子異常は予後因子であり、癌の浸潤や転移にスフィンゴ脂質の関与が示唆された。S1Pシグナル阻害薬は、TP53変異の有無にかかわらず、乳癌細胞の生存を阻止し、臨床応用の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

本研究は、次のような学術的意義や社会的意義がある。1．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TP53による細胞制御機構に着目し、高悪性度の癌の病態メカニズムにS1Pが寄与していることを明らかにした。2．TNBCにおけるTP53変異と脂質メディエーターの臨床的意義を明らかにした。3．TNBCにおけるS1Pを標的とした新規治療開発の可能性を示した。TP53に対する癌治療開発は世界で切望されており、本研究の成果は、乳癌ならびに多くの癌患者の治療向上と医学の発展に貢献できるものと考えている。

研究成果の概要（英文）：Sphingosine-1-phosphate (S1P) is a lipid mediator that acts as a signaling molecule like a protein, and may also contribute to the regulatory mechanism of cell viability mediated by the TP53 gene. The purpose of this study is to focus on the molecular regulatory mechanism mediated by the lipid mediator S1P in TP53 gene abnormalities, to elucidate a new pathological mechanism in triple-negative breast cancer, and to provide a research basis for the development of new treatment methods. The results of clinical sample analysis indicated that TP53 gene abnormality is a prognostic factor in patients with triple-negative breast cancer, and sphingolipids are involved in cancer invasion and metastasis; an S1P signaling inhibitor prevents breast cancer cell survival with or without TP53 alteration, suggesting its potential for clinical application.

研究分野：腫瘍外科学（乳腺）

キーワード：スフィンゴシン-1-リン酸 TP53 乳癌 脂質メディエーター トリプルネガティブ 薬物療法 臨床検体 治療開発

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ホルモン受容体(エストロゲン受容体及びプロゲステロン受容体)陰性、HER2 陰性であるトリプルネガティブ乳癌(TNBC)は、生物学的に高悪性度であり、乳癌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、これらに対する分子標的薬が次々と開発されている。しかし、TNBCは治療標的となるドライバー遺伝子変異に乏しく、治療開発が十分に進んでいない。TNBCで唯一、高頻度に変異が認められるのが癌抑制遺伝子TP53である。申請者が自験例の長期成績を検討した結果、TP53変異を伴うTNBC患者は有意に予後不良であった。TP53に対する標的治療は「夢の治療」であり、世界中で開発が行われているが実用には至っていない。

スフィンゴリン脂質であるスフィンゴシン-1-リン酸(S1P)は、脂質でありながら蛋白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。S1Pは細胞内に存在する2つの異なるスフィンゴシンキナーゼ(SphK1、SphK2)によってスフィンゴシン(Sph)がリン酸化されることで産生され、S1P輸送体によって細胞外に放出、細胞自身や周囲の血管・リンパ管内皮細胞表面にあるS1P特異的受容体に作用し、細胞増殖・遊走・生存・脈管新生等を促進する。応募者の解析においても、TNBCは遺伝子変異が少なく、遺伝子やタンパク質の異常だけでは病態を説明できなかった。唯一高頻度に変異を認めた遺伝子がTP53であり、TP53変異は患者予後にも大きな影響がある。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た。TP53タンパクによる細胞の生死に関わる制御機構にS1Pを含めた脂質メディエーターが寄与している可能性が示唆されていることから、「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

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。TP53による細胞の生死に関わる制御機構にもS1Pを含めた脂質メディエーターが寄与している可能性が示唆されており、応募者は、「TNBCの高悪性度の病態は、遺伝子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分子機構が関与している」と仮説を立て、本研究を企画した。本研究の目的は、「TP53の脂質メディエーター・S1Pを介した分子制御機構に着目し、TNBCにおける新たな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におけるTP53遺伝子異常とS1P分子機構の役割解明：CRISPR/Cas9遺伝子編集技術を用いて、TP53変異細胞株(HCC38、MDA-MB-468)に対し、正常TP53のノックイン、野生型細胞株(MDA-MB-361、MDA-MB-175VII)に対し、TP53のノックアウトを行い、細胞のバイオロジーを解析した。また、動物実験を駆使して、TP53変異とS1Pの役割をin vivoで検証するため、C57BL/6マウスを用いてSphK1KOおよびSphK2KOマウスを作製した。

(2) バイオインフォマティクスによるTNBCにおけるTP53変異とS1Pの臨床的意義の検討：既存の網羅的ゲノム解析データベースを用い、TNBC患者におけるTP53遺伝子変異と臨床的意義について検討した。TNBC手術切除症例に対し、新鮮凍結標本・血清に対するリポミクス解析を行い、スフィンゴ脂質として、スフィンゴシン(So)、ジヒドロスフィンゴシン(DHSo)、S1P、ジヒドロS1P、セラミド(Cer)の各分画、総セラミド、S1P/セラミド比を定量し、臨床病理学的因子との比較検討を行った。

(3) TNBCの薬剤耐性に関わるS1P癌代謝制御機構の解明：TP53変異を有する5つのTNBC細胞株を用いた：MDA-MB-231(p.R280K)、HCC38(p.R273L)、HCC70(p.R248Q)、BT-549(p.R249s)およびMDA-MB-468(p.R273H)である。TP53野生型のコントロールとして、MCF-7、MDA-MB-361、MDA-MB-175VIIを用いた。薬剤の効果はWST-8アッセイで評価し、IC₅₀を決定した。MDA-MB-231は抗がん剤で長期培養し多剤耐性株を作製し、耐性細胞に対するS1P受容体阻害薬FTY720の効果を検証した。また患者検体より細胞株・オルガノイドを作成し、上記薬剤の治療効果をin vitroで検証した。

4. 研究成果

(1) TNBC における TP53 遺伝子異常と S1P 分子機構の役割解明：CRISPR/Cas9 遺伝子編集技術を用いて、TP53 変異細胞株 (HCC38、MDA-MB-468) に対して正常 TP53 遺伝子のノックイン、野生型細胞株 (MDA-MB-361、MDA-MB-175VII) に対して TP53 遺伝子のノックアウトを行ったが、細胞の増殖能が低下し、薬剤感受性などの細胞のバイオロジーの解析は困難であった。TP53 遺伝子の hot spot mutation の有無と S1P を介した細胞制御機構の関連を見るために、TP53 が wild type の乳癌細胞株と hot spot mutation (R273L、R248Q、R175H) を伴う乳癌細胞株を用いて、S1P シグナル阻害薬による細胞抑制効果について検討を行ったところ、TP53 遺伝子変異の有無に関わらず、S1P シグナル阻害薬は細胞増殖抑制効果を示した。また、TP53 変異と S1P の役割を in vivo で検証するためのマウス作製に取り組んでおり、SphK1KO および SphK2KO マウスを作製し、TP53 変異発癌マウスと交配して解析を行うため、動物実験を継続中である。

(2) バイオインフォマティクスによる TNBC における TP53 遺伝子変異と S1P の臨床的意義の検討：既存の網羅的ゲノム解析データベースを用い、TNBC 患者における TP53 遺伝子変異と臨床的意義について検討し、TP53 遺伝子に変化のある患者は、TP53 遺伝子に変化のない患者と比較して、無再発生存期間が悪化する傾向を認め、全生存期間が有意に悪化した。多変量解析により、コピー数高値と TP53 遺伝子変異の組み合わせが、全生存期間に関して独立した予後因子であることが明らかになった。TNBC 手術切除症例に対し、新鮮凍結標本・血清に対するリポミクス解析を行い、スフィンゴ脂質として、スフィンゴシン (So)、ジヒドロスフィンゴシン (DHSO)、S1P、ジヒドロ S1P、セラミド (Cer) の各分画、総セラミド、S1P/セラミド比を定量し、臨床病理学的因子との比較検討を行ったところ、リンパ管侵襲陽性群では陰性群と比較して、So、DHSO、S1P/Cer 比が高値であり、C24:1、total Cer が低値であった。また血管侵襲陽性群で陰性群と比較して total Cer が低値であった。リンパ節転移陽性群では、C24:0 が高値であった。腫瘍径、核グレード、組織グレードとスフィンゴ脂質には関連を認めなかった。リンパ管侵襲、血管侵襲、リンパ節転移の有無によって血漿中スフィンゴ脂質濃度に変化が認められ、乳癌患者において、癌の浸潤や転移にスフィンゴ脂質が関与している可能性が示唆された。さらにスフィンゴ脂質と腫瘍浸潤リンパ球 (TILs) との関連を解析したところ、腫瘍浸潤リンパ球とスフィンゴシン、ジヒドロスフィンゴシン、S1P/セラミド比に有意差を認めた。ジヒドロ S1P も TILs high で高値となる傾向が見られ、S1P も同様の挙動を示した。リンパ管侵襲、リンパ節転移の有無によって血漿中スフィンゴ脂質濃度に変化が認められ、乳癌患者において、癌の浸潤や転移にスフィンゴ脂質が関与している可能性が示唆された。

(3) TNBC の薬剤耐性に関わる S1P 癌代謝制御機構の解明： TP53 変異細胞株 (MDA-MB-231、HCC38、HCC70、BT-549 および MDA-MB-468) 野生型細胞株 (MCF-7、MDA-MB-361、MDA-MB-175VII) とともに S1P シグナル阻害薬である FTY720 は阻害作用を示し、IC₅₀ はすべての細胞株で 1~5 μM であった。多剤耐性 MDA-MB-231 ではドキソルピシンやパクリタキセルなどの抗癌剤が耐性を示したが、FTY720 は多剤耐性細胞にも有効であり、IC₅₀ は 3 μM と正常 MDA-MB-231 と同程度であった。FTY720 は TP53 変異の有無にかかわらず細胞株に対して増殖抑制効果を示し、多剤耐性細胞においても同様の効果が認められたことから、S1P シグナル経路阻害は TNBC の有望な治療標的となる可能性が示唆された。また、乳癌患者検体から作製したオルガノイドに対し、FTY720 は有効性を示し、S1P シグナル阻害薬の臨床応用の可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nagahashi M, Miyoshi Y	4. 巻 25
2. 論文標題 Targeting Sphingosine-1-Phosphate Signaling in Breast Cancer	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3354 ~ 3354
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms25063354	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 Nagahashi M, Ling Y, Toshikawa C, Hayashida T, Kitagawa Y, Futamura M, Kuwayama T, Nakamura S, Yamauchi H, Yamauchi T, Kaneko K, Kanbayashi C, Sato N, Tsuchida J, Moro K, Nakajima M, Shimada Y, Ichikawa H, Lyle S, Miyoshi Y, Takabe K, Okuda S, Wakai T	4. 巻 30
2. 論文標題 Copy number alteration is an independent prognostic biomarker in triple-negative breast cancer patients	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Breast Cancer	6. 最初と最後の頁 584 ~ 595
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12282-023-01449-2	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 該当する

1. 著者名 永橋 昌幸	4. 巻 46
2. 論文標題 スフィンゴシン-1-リン酸のがん進展における生体内での作用メカニズムと臨床的意義	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 兵庫医科大学医学会雑誌	6. 最初と最後の頁 57-63
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Masayuki Nagahashi, Miki Komatsu, Sayaka Urano, Mamiko Kuroiwa, Yasuo Miyoshi
2. 発表標題 Targeting S1P signaling pathway in triple negative breast cancer with TP53 mutations.
3. 学会等名 第21回日本臨床腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 永橋 昌幸
2. 発表標題 Actionable gene alterations in Japanese patients with triple-negative breast cancer
3. 学会等名 第121回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 服部彬、永橋昌幸、阿竹優紗、文垂也子、福井玲子、藤本由希枝、樋口智子、村瀬慶子、高塚雄一、三好康雄
2. 発表標題 乳癌患者における血漿中スフィンゴ脂質の質量分析と臨床病理学的因子との関連
3. 学会等名 第31回日本乳癌学会学術集会
4. 発表年 2023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	奥田 修二郎 (Okuda Shujiro) (00512310)	新潟大学・医歯学系・教授 (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	諸 和樹 (Moro Kazuki) (10745566)	新潟大学・医歯学総合病院・助教 (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	土田 純子 (Tsuchida Junko) (90769415)	兵庫医科大学・医学部・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