

平成 30 年 9 月 4 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04927

研究課題名(和文)胆道癌・膵癌の転移能に関与する脂質メディエーター分子制御機構の解明および臨床応用

研究課題名(英文)Elucidation of molecular mechanism of lipid mediator involved in metastatic ability of biliary tract cancer / pancreatic cancer and clinical application

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) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：本発明者らは、腫瘍微小環境において癌細胞を貪食する間質液中のスフィンゴシン-1-リン酸レベルを測定する方法を開発し、腫瘍間質液中に高レベルのスフィンゴシン-1-リン酸が存在すると報告した。重要なことに、スフィンゴシン-1-リン酸は、腫瘍微小環境における癌細胞および免疫細胞および血管/リンパ内皮細胞などの非癌成分から分泌され得る。我々は、腫瘍微小環境における癌細胞と非癌細胞との間の相互作用におけるスフィンゴシン-1-リン酸の役割を解明し、癌患者のための標的化されたスフィンゴシン-1-リン酸シグナル伝達の将来の可能性について議論する。

研究成果の概要(英文)：We have developed a method to measure sphingosine-1-phosphate levels in the interstitial fluid that bathes cancer cells in the tumor microenvironment, and reported that high levels of sphingosine-1-phosphate exist in the tumor interstitial fluid. Importantly, sphingosine-1-phosphate can be secreted from cancer cells and non-cancer components such as immune cells and vascular/lymphatic endothelial cells in the tumor microenvironment. We elucidate the roles of sphingosine-1-phosphate in the interaction between cancer and non-cancer cells in tumor microenvironment, and discuss future possibilities for targeted therapies against sphingosine-1-phosphate signaling for cancer patients.

研究分野：消化器外科学

キーワード：脂質メディエーター 胆道外科学 膵臓外科学

1. 研究開始当初の背景

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ことが研究協力者である Sarah Spiegel によって解明された (Nature 1993; Nature 1996)。

申請者らは、細胞株及び動物実験モデルを用いて、「乳癌細胞株が産生した S1P がリンパ管新生形成に重要な役割を果たしている」ことを世界に先駆けて報告してきた (Cancer Research 2012) (図 1)。



図 1. スフィンゴシン-1-リン酸 (S1P) による情報伝達系: S1P は細胞質内に存在するスフィンゴシンキナーゼ 1 型 (SphK1) によってスフィンゴシン (Sph) から産生され、S1P 輸送体によって細胞外に放出、癌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、増殖・浸潤・生存等の細胞機能を促進する。申請者らは、癌細胞より放出された S1P がパラクライン効果でリンパ管内皮細胞の SphK1 を活性化し () S1P の産生・放出を促進 () オートクライン・パラクライン効果で癌細胞の S1P 受容体を刺激し、癌の増殖・浸潤・生存を促している () という仮説を立てた。

さらに 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)。Nature Review 誌において、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が引用され、S1P の働きが広く認識されるようになってきた (Nature Review Cancer 2014)。

近年、S1P は、免疫、炎症、代謝、悪性腫瘍など様々な疾患の病態に関与している可能性が示唆されているが、S1P 自体は脂質メ

ディエーターであるが故に直接測定することが困難であったことから実験動物 in vivo およびヒト人体における S1P の生理的機能に関しては研究が進んでおらず、未解明のままである。

胆道癌・膵癌においては、リンパ行性進展を介したリンパ節転移は最も重要な予後規定因子の 1 つである。申請者らは、胆道癌におけるリンパ行性進展を介したリンパ節転移の研究を過去 20 年以上行ってきた実績があり (Cancer 2010, Ann Surg Oncol 2010, 他 100 編以上の英文論文)、胆嚢癌のリンパ行性進展、リンパ節転移の生物学的悪性度を解明し、2010 年には胆嚢癌の肝内進展は血行性転移ではなく肝内グリソン鞘沿いのリンパ行性進展が主体であることを解明し、胆嚢床周囲の肝実質切除の重要性を提唱してきた (Am J Surg Pathol 2010)。胆道癌・膵癌における S1P 産生機構、S1P による宿主のリンパ管新生機構、S1P シグナルにより形成される癌微小環境における癌細胞生存の臨床的意義に関しては未解明である。

申請者らは、上述した S1P 研究の学術的背景から、『癌細胞と宿主側の間質との相互作用における S1P シグナルの生理的機能を解明することは重要な課題である』という着想に至った。

申請者らは、「癌細胞より放出された S1P が、パラクライン効果でリンパ管内皮細胞の SphK1 を活性化し、リンパ管新生を促し、オートクライン・パラクライン効果で癌細胞の S1P 受容体を刺激し、癌の浸潤・転移能を促進している」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、「S1P 産生責任酵素の遺伝子改変マウスや臨床検体を駆使し、浸潤・転移能に関与する S1P シグナルの分子制御機構を解明し、S1P シグナルにより形成される癌微小環境における癌細胞生存の臨床的意義を解明し、新たな治療法開発への足がかりとすること」である。

3. 研究の方法

S1P 産生責任酵素の遺伝子改変マウスや臨床検体を駆使し、**課題 A**: S1P 産生責任酵素 (SphK1) 過剰発現/ノックダウンによる癌細胞の浸潤能・遊走能の制御実験を行い、**課題 B**: ノードマウスおよびリンパ管内皮細胞特異的 SphK1 コンディショナルノックアウトマウスに SphK1 過剰発現/ノックダウン癌細胞を移植し、リンパ管新生および S1P を介した癌微小環境 (癌と宿主の相互作用) を明らかにする。**課題 C**: コンドロイチン硫酸プロテオグリカンの糖鎖合成酵素 (CSGα1NAc-T1) のノックアウトマウスに膵癌移植実験を行い、宿主側の細胞外基質が、癌の S1P シグナ

ルに与える影響、癌の浸潤能、リンパ管新生能に与える影響を解明する。**課題 D:**リンパ管浸潤をきたした癌細胞における SphK1 発現を明らかにし、**課題 E:**リンパ節転移における S1P および pSphK1 発現の臨床的意義を明らかにする。課題 A~E を総括して、浸潤・転移能に与える S1P シグナルの分子制御機構を解明し、胆道癌・膵癌における脂質メディエーターの臨床的意義を解明する。研究期間内には以下の諸点を解明する(図2)。

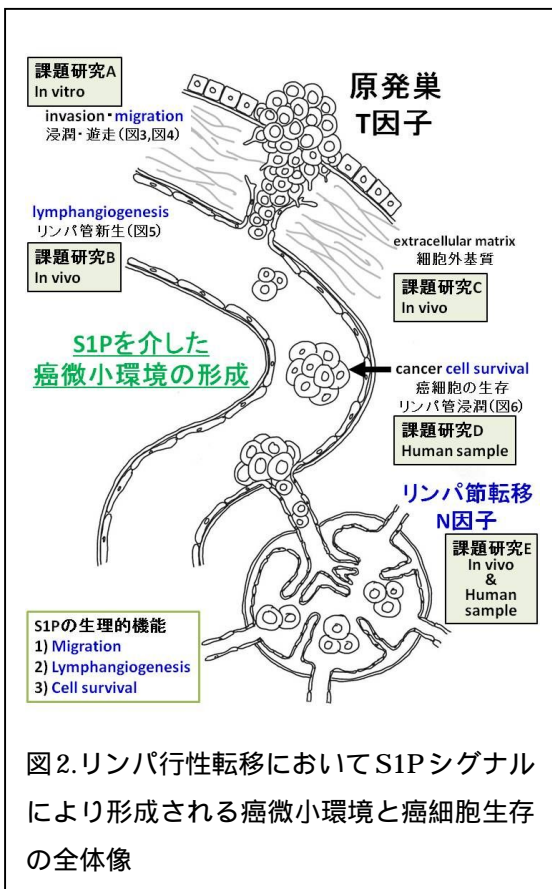


図2.リンパ行性転移においてS1Pシグナルにより形成される癌微小環境と癌細胞生存の全体像

4. 研究成果

課題研究 A: S1P 産生責任酵素(SphK1)過剰発現/ノックダウンによる癌細胞の浸潤能・遊走能の制御実験 (in vitro): SphK1 をプラスミドベクターにより過剰発現、同酵素をCRISPR/Cas9によりノックダウンした B/6 系マウス膵癌細胞株細胞株を樹立し、浸潤能・遊走能の分子制御実験を行い S1P シグナルの分子制御機構を明らかにして、学術発表した。

課題研究 B: S1P を介したリンパ管新生および癌と宿主の相互作用 (in vivo): SphK1 ノックダウンした膵癌細胞株を B/6 系マウスおよびリンパ管内皮細胞特異的 SphK1&SphK2 コンディショナルダブルノックアウトマウスに移植し、リンパ管新生を解析し、S1P シグナルを介したリンパ管新生および癌微小環境の形成機序(癌と宿主の相互作用)に関する学術発表を行い、更にダブルノックアウトマウス研究を継続中である。

課題研究 C: Extracellular matrix 細胞外基質における S1P の生理的役割 (in vivo): コンドロイチン硫酸プロテオグリカンの糖鎖合成酵素 (CSGαINAc-T1) のノックアウトマウスは、コンドロイチン硫酸の発現抑制に伴いヘパラン硫酸の発現が相対的に亢進しており、細胞外マトリックスの変化を研究できる稀有なモデルである。この CSGαINAc-T1 ノックアウトマウスに B/6 系 wild 膵癌移植実験を行う。宿主側の細胞外基質が、癌の S1P シグナルに与える影響、癌の浸潤能、リンパ管新生能に与える影響を明らかにし、学術発表を行い、更に研究を継続中である。

課題研究 D: リンパ管浸潤をきたした癌細胞の生存に関わるスフィンゴシンキナーゼの役割 (Human sample): 臨床検体を用いてリンパ管浸潤部の SphK1 のリン酸化と Ki67 による細胞増殖能を評価し、リンパ管浸潤をきたした癌細胞の生存に関わる S1P の臨床的意義を明らかにし、学術発表した。

課題研究 E: リンパ節転移における S1P および pSphK1 発現の臨床的意義 (in vivo & human sample) を解明し、学術発表した。

腫瘍微小環境における癌細胞と非癌細胞(例えば、血管、免疫細胞、および他の間質細胞)との間の相互作用を解明することは、癌の進行および転移の根底にある機構を理解する上で不可欠であり、新規治療薬の創出に繋がる。スフィンゴシン-1-リン酸は、癌の進行に関与する全ての因子である、細胞の生存、増殖、移動、血管新生/リンパ管形成および免疫応答を促進する生物活性脂質メディエーターである。スフィンゴシン-1-リン酸は、スフィンゴシンキナーゼによって癌細胞内で生成され、次いで、腫瘍微小環境に輸出される。スフィンゴシン-1-リン酸は、腫瘍微小環境および癌進行において重要な役割を果たすと予想されるが、確立された方法の欠如のために、腫瘍微小環境におけるスフィンゴシン-1-リン酸レベルを決定することは困難であった。本発明者らは、腫瘍微小環境において癌細胞を浸潤する間質液中のスフィンゴシン-1-リン酸レベルを測定する方法を開発し、高レベルのスフィンゴシン-1-リン酸が腫瘍間質液中に存在すると報告した。重要なことに、スフィンゴシン-1-リン酸は、腫瘍微小環境における癌細胞および免疫細胞および血管/リンパ管内皮細胞などの非癌成分から分泌され得る。さらに、スフィンゴシン-1-リン酸は、腫瘍の微小環境において癌の進行を促進する癌細胞および非癌細胞の両方に影響を及ぼす。ここでは、腫瘍微小環境における癌細胞と非癌細胞との相互作用におけるスフィンゴシン-1-リン酸の役割を検討し、癌患者に対するスフィンゴシン-1-リン酸シグナル伝達に対する標的療法の将来の可能性に関して研究成果を得ることができた。

5 . 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 8 件)

Sai S, Wakai T, Vares G, Yamada S, Kamijo T, Kamada T, Shirai T.
Combination of carbon ion beam and gemcitabine causes irreparable DNA damage and death of radioresistant pancreatic cancer stem-like cells in vitro and in vivo. *Oncotarget*. 2015;6(8):5517-35.

Sakata J, Wakai T, Matsuda Y, Ohashi T, Hirose Y, Ichikawa H, Kobayashi T, Minagawa M, Kosugi S, Koyama Y, Akazawa K, Ajioka Y. Comparison of Number Versus Ratio of Positive Lymph Nodes in the Assessment of Lymph Node Status in Extrahepatic Cholangiocarcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2016;23(1):225-34. doi: 10.1245/s10434-015-4609-x.

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;57(9):1636-43. doi: 10.1194/jlr.R069286.

Nagahashi M, Matsuda Y, Moro K, Tsuchida J, Soma D, Hirose Y, Kobayashi T, Kosugi S, Takabe K, Komatsu M, Wakai T. DNA damage response and sphingolipid signaling in liver diseases. *Surg Today*. 2016;46(9):995-1005. doi: 10.1007/s00595-015-1270-8.

Sakata J, Kobayashi T, Ohashi T, Hirose Y, Takano K, Takizawa K, Miura K, Ishikawa H, Toge K, Yuza K, Soma D, Ando T, Wakai T. Prognostic heterogeneity of the seventh edition of UICC Stage III gallbladder carcinoma: Which patients benefit from surgical resection? *Eur J Surg Oncol*. 2017;43(4):780-787. doi: 10.1016/j.ejso.2017.01.001.

Nakajima M, Nagahashi M, Rashid OM, Takabe K, Wakai T. The role of sphingosine-1-phosphate in the tumor microenvironment and its clinical implications. *Tumour Biol*. 2017;39(4):1010428317699133. doi: 10.1177/1010428317699133.

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 2016 年 30 巻 2 号 Page220-227

永橋昌幸, 若井俊文
癌と宿主におけるスフィンゴシン-1-リン酸の役割
BIO Clinica 2017 年 32 巻 4 号 Page397-404

〔学会発表〕(計 17 件)

若井俊文
International session Extent of liver resection for gallbladder carcinoma
第 114 回日本外科学会定期学術集会(名古屋) 2015.4.16

Toshifumi Wakai
SymposiumIII Laparoscopic cholecystectomy with LN dissection
The 36th Annual Meeting of the Korean Society of Endoscopic & Laparoscopic Surgeons, 2015 International Symposium(Jeju, Korea)2015.5.29

若井俊文
シンポジウム 3 Front line in open and endoscopic biliary surgery
Evaluation of ductal resection margin status and regional lymphadenectomy for extrahepatic cholangiocarcinoma
第 27 回日本肝胆膵外科学会・学術集会(東京) 2015.6.13

T. Wakai, J. Sakata, Y. Hirose, N. Sudo, T. Katada, K. Takizawa, M. Nagahashi, T. Kobayashi
IMPACT OF SURGICAL RESECTION AND CHEMOTHERAPY ON LONG-TERM OUTCOMES IN PATIENTS WITH LOCALLY ADVANCED GALLBLADDER CARCINOMA
46th World Congress of Surgery (Bangkok, Thailand) 2015.8.26

T. Wakai, J. Sakata, Y. Hirose, N. Sudo, T. Katada, K. Takizawa, M. Nagahashi, T. Kobayashi
LONG-TERM OUTCOMES OF SURGICAL RESECTION FOR EARLY GALLBLADDER CARCINOMA
46th World Congress of Surgery (Bangkok, Thailand) 2015.8.26

T. Katada, N. Sudo, Y. Hirose, K. Takizawa, M. Nagahashi, T. Kobayashi, J. Sakata, T. Wakai
CLINICAL SIGNIFICANCE OF RIBONUCLEOTIDE REDUCTASE M1 EXPRESSION IN PATIENTS WITH INTRAHEPATIC CHOLANGIOCARCINOMA
46th World Congress of Surgery (Bangkok, Thailand) 2015.8.27

N. Sudo, T. Katada, Y. Hirose, K. Takizawa, M. Nagahashi, J. Sakata, T. Kobayashi, T. Wakai
PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF NAD(P)H:
QUINONE OXIDOREDUCTASE-1
EXPRESSION IN INTRAHEPATIC
CHOLANGIOCARCINOMA
46th World Congress of Surgery (Bangkok,
Thailand) 2015.8.27

若井俊文, 廣瀬雄己, 坂田純
統合プログラム 5 (PD) 肝内胆管癌と肝門部
胆管癌の取扱いと治療方針をめぐって：肝門
部領域胆管癌における血管胆管鞘
Vasculo-Biliary Sheaths への組織学的腫瘍浸潤
の評価：原発部位判定法の提唱
JDDW2015 (東京) 2015.10.10

若井俊文
教育セッション 12 肝胆膵「肝胆膵外科診療
の最前線」
第 53 回日本癌治療学会学術集会 (京都)
2015.10.30

永橋 昌幸, 諸 和樹, 土田 純子, 辰田 久
美子, 利川 千絵, 長谷川 美樹, 萬羽 尚
子, 五十嵐 真由子, 坂田 純, 小林 隆,
亀山 仁史, 皆川 昌広, 小杉 伸一, 小山
諭, 高部 和明, 若井 俊文
肥満はスフィンゴシン-1-リン酸を癌微小環
境において増加させる
第 115 回日本外科学会定期学術集会 (名古屋)
2015.4.16

永橋 昌幸, 廣瀬 雄己, 須藤 翔, 大橋 拓,
滝沢 一泰, 高野 可赴, 坂田 純, 小林 隆,
若井 俊文
胆汁酸はスフィンゴシン-1-リン酸シグナル
伝達系を介して 肝臓における脂質代謝を調
節している
第 51 日本胆道学会学術集会 (宇都宮)
2015.9.17

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 (横浜) 2016.10.7

中島 真人, 永橋 昌幸, 三浦 要平, 安藤
拓也, 油座 築, 土田 純子, 田島 陽介,
坂田 純, 小林 隆, 亀山 仁史, 阿部 学,
崎村 建司, 若井 俊文
膵がんにおける CRISPR/Cas9 を用いたスフ
ィンゴシン-1-リン酸産生酵素の機能解析
第 117 回日本外科学会定期学術集会 (横浜)
2017.4.29

中島 真人, 永橋 昌幸, 三浦 要平, 安藤
拓也, 油座 築, 土田 純子, 田島 陽介,
坂田 純, 小林 隆, 亀山 仁史, 阿部 学,

崎村 建司, 曾我 朋義, 若井 俊文
膵癌細胞におけるスフィンゴシン-1-リン酸
産生酵素の働きとその代謝動態制御の解析
日本外科代謝栄養学会第 54 回学術集会 (新
潟) 2017.7.7

Masato Nakajima, Masayuki Nagahashi, Junko
Tsuchida, Hiroshi Ichikawa, Yoshifumi Shimada,
Toshifumi Wakai
Function Analysis of Sphingosine-1-Phosphate
Produced by Sphingosine Kinases in Pancreatic
Cancer Progression
第 76 回日本癌学会学術総会 (横浜) 2017.9.30

M. Nakajima, K. Yuza, J. Tsuchida, Y. Hirose, K.
Miura, H. Ichikawa, Y. Shimada, T. Kobayashi, J.
Sakata, H. Kameyama, M. Abe, K. Sakimura, T.
Wakai, M. Nagahashi
Sphingosine-1-phosphate produced by
sphingosine kinase type 1 and type 2 works
differently in pancreatic cancer
The 13th Annual Academic Surgical Congress
(Jacksonville, USA) 2018.1.31

K. Miura, M. Nagahashi, Y. Hirose, T. Kobayashi,
J. Sakata, H. Kameyama, Y. Shimada, H.
Ichikawa, K. Takabe, T. Wakai
Dysregulation of Sphingolipids in Human
Hepatocellular Carcinoma
The 13th Annual Academic Surgical Congress
(Jacksonville, USA) 2018.1.31

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)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

(2)研究分担者

松田 康伸 (Matsuda Yasynobu)
新潟大学・医歯学系・准教授
研究者番号：40334669

永橋 昌幸 (Nagahashi Masayuki)
新潟大学・医歯学総合病院・講師
研究者番号：30743918

味岡 洋一 (Ajioka Yoichi)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号：80222610

五十嵐 道弘 (Igarashi Michihiro)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号：50193173

小杉 伸一 (Kosugi Shin-ichi)
新潟大学・医歯学総合病院・特任教授
研究者番号：90401736

小林 隆 (Kobayashi Takashi)
新潟大学・医歯学総合病院・講師
研究者番号：40464010

坂田 純 (Sakata Jun)
新潟大学・医歯学系・講師
研究者番号：70447605

(3)連携研究者

小松 雅明 (Komatsu Masaaki)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号：90356254

(4)研究協力者

サラ・スピーゲル (Sarah Spiegel)
米国バージニア州立大学・教授
フィリップ・ハイレモン (Phillip B. Hylemon)
米国バージニア州立大学・教授
高部和明 (Takabe Kazuaki)
米国 Roswell Park Cancer Institution・教授