

平成 30 年 6 月 10 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10087

研究課題名(和文) 胃癌の浸潤・転移能に關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的意義

研究課題名(英文) Clinical Significance and elucidation of molecular regulation mechanism of lipid mediators in invasion and metastatic ability of gastric cancer

研究代表者

羽入 隆晃 (Hanyu, Takaaki)

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号：50719705

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：「胃癌細胞内でスフィンゴシンキナーゼ1型(SphK1)および産生されるスフィンゴシン-1-リン酸(S1P)が胃癌の進行・リンパ管浸潤に寄与している」という仮説をたて、胃癌外科切除例に対し、免疫組織化学検査および質量分析によりSphK1・S1Pと臨床病理学的因子および予後との関連を解析した。SphK1発現は胃癌進行度、特にびまん浸潤型およびリンパ管侵襲陽性と関連していることを発見し、更に生存率においてもSphK1陽性群は陰性群に比べて予後不良であった。また組織中のS1P濃度はSphK1発現との相関を認め、胃癌の進行においてSphK1およびS1Pが重要な役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We hypothesized that sphingosine kinase type 1 (SphK1) and sphingosine-1-phosphate (S1P) is associated with the progression of human gastric cancer and lymphatic invasion. To test this hypothesis, we analyzed relationship between SphK1, S1P, clinicopathological features, and prognosis in human gastric cancer by immunohistochemistry and mass spectrometry.

SphK1 expression was correlated with gastric cancer progression, especially diffuse infiltrative type and lymphatic invasion, and furthermore in survival rate SphK1 positive group was poor prognosis as compared with negative group. pSphK1 expression significantly associated with S1P levels in the gastric cancer tissue.

We reported that SphK1 and S1P play an important role in the progression of human gastric cancer.

研究分野：消化管外科学

キーワード：胃癌 脂質メディエーター スフィンゴシン-1-リン酸 スフィンゴシンキナーゼ リンパ節転移

1. 研究開始当初の背景

(1) 胃癌においてリンパ節転移の頻度は約40%と高率であり、最も重要な予後規定因子である。リンパ節転移は、癌細胞が周囲のリンパ管に浸潤をきたし、リンパ管内を通過してリンパ節に辿り着き、そこに生着することで成立する。リンパ管浸潤において、癌細胞が産生するVEGF-Cやアンジオポエチンなどのサイトカインやケモカインの関与が指摘されてきた。即ち、これらの因子によって、癌周囲のリンパ管新生が誘導されることで、癌細胞がリンパ管に浸潤しやすくなり、リンパ節転移が促進されると考えられている。しかし、これらの因子の阻害薬が臨床応用されているものの、未だ胃癌に対して十分な治療効果は得られていない。

(2) スフィンゴ脂質である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り、細胞内でスフィンゴシンキナーゼによって産生され、細胞外に放出、細胞表面のS1P特異的受容体に作用することで、細胞の増生、遊走、血管新生などに関与していることが明らかになった。S1Pは免疫、炎症、代謝、そして悪性腫瘍など様々な疾患の病態に関与していることが分かってきた¹⁾。分担研究者であるNagahashiらは、癌が産生するS1Pがリンパ管新生を促進し、リンパ節転移に関与していることを細胞及び動物実験モデルを用いて世界に先駆けて報告した(*Cancer Research* 2012)(図1)。

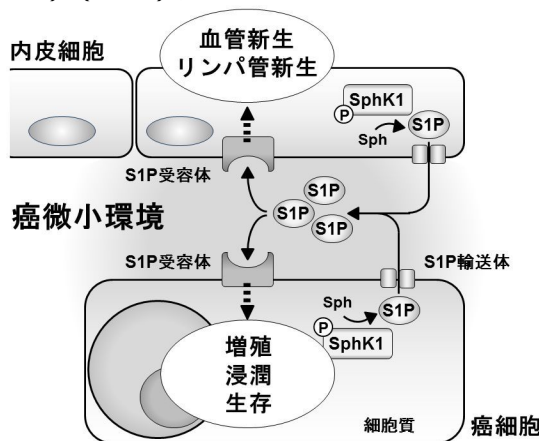


図1：スフィンゴシン-1-リン酸による情報伝達系

さらにS1Pの輸送体であるSpns2がリンパ管形成に関与すること(*FASEB Journal* 2013)、S1Pが慢性炎症状態において、癌の発生に関与すること(*Cancer Cell* 2013)を発見し、各々発表した。Nature Review Cancer誌の癌によるリンパ管新生に関する総説の中でも研究分担者の論文が引用され、S1Pがその一端を担っていることが取り上げられ(*Nature Review Cancer* 2014)、一般に認識されるようになった(図2)。

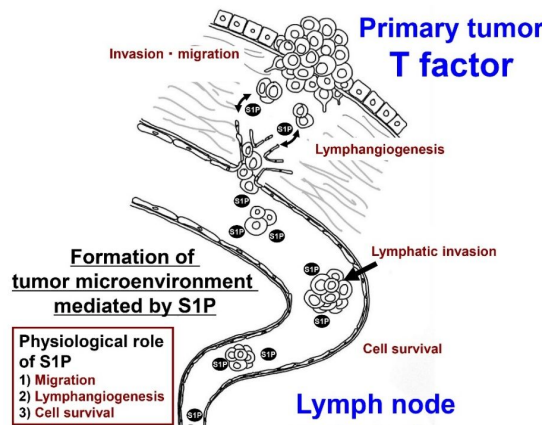


図2：S1Pを介した癌微小環境の形成

(3) S1Pは脂質であるため直接測定することが難しく、蛋白質を主体としたシグナル研究よりも研究が遅れており、その臨床的意義は未だよく分かっていない。特に胃癌臨床検体においてスフィンゴシンキナーゼ1型(SphK1)の活性化を解析した研究や、S1Pを質量分析により測定し、その臨床的意義を検証した研究は未だにない。

2. 研究の目的

(1) 抗リン酸化SphK1抗体を用いることで、胃癌患者検体に対して、S1Pシグナルの機能的評価を病理形態学的解析と組み合わせることで詳細に評価することが可能であり、我々が予備実験として進行胃癌症例の癌組織標本を免疫組織化学検査により抗リン酸化SphK1抗体を用いて染色したところ、リン酸化SphK1は癌の発育先進部やリンパ管浸潤を来している癌病巣に高発現していた。これまでの研究成果と、予備実験の結果により、S1Pが胃癌のリンパ管浸潤に重要な役割を担っていることが推測される。

(2) 「胃癌細胞内で活性化されたスフィンゴシンキナーゼがS1Pを産生し、リンパ管新生を促進すると共に、癌の浸潤能、生存能を高めることでリンパ管浸潤に寄与している」という仮説をたて、「胃癌リンパ管浸潤におけるスフィンゴシンキナーゼとS1Pの分子制御機構を解析し、その臨床的意義を明らかにすること」を目的として本研究を企画した。

3. 研究の方法

(1) 胃癌外科切除例に対し、免疫組織化学検査による癌および周囲組織におけるSphK1のリン酸化の評価を行う。リン酸化抗体の染色は、染色強度4段階(0-3)と染色領域の割合4段階(1-4)の組み合わせにより0-12の染色スコアで評価する(図3)。SphK1の発現と臨床病理学因子および予後因子との関連を解析する。

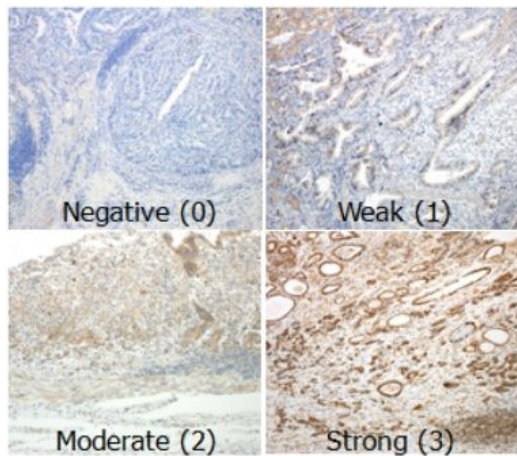


図3：胃癌組織におけるpSphK1の免疫組織化学的発現

(2) バージニア州立大学の Sarah Spiegel 教授の協力により、胃癌切除検体の凍結新鮮標本に対して、質量分析によるリビドミクス解析を行い、S1Pの測定を行って臨床病理学的因子、サブタイプ分類、患者予後との関連を解析し、脂質メディエーターの臨床的に意義について検証する。

4. 研究成果

(1) 胃癌外科切除例136例に対し、免疫組織化学検査による癌および周囲組織における SphK1 のリン酸化の評価を行い、染色スコア 0-5のSphK1発現陰性群と、スコア6-12のSphK1発現陽性群に分類し、臨床病理学的因子・予後との関連を解析した。SphK1陽性群は76例(56%)に認め、単変量解析の結果、SphK1発現は腫瘍深達度 ($P=0.029$)、リンパ節転移 ($P=0.035$)、組織学的分化度 ($P=0.050$) およびリンパ管侵襲 ($P=0.002$) と有意に関連していた。深達度やリンパ節転移といった腫瘍進行度に関わる直接的な因子との関連を認め、胃癌進行における重要性が示唆される結果であった(表1)。また、多変量解析の結果、Diffuse type胃癌 (Odds比 2.210, 95%信頼区間 1.046-4.671, $P=0.038$) およびリンパ管侵襲陽性 (Odds比 3.697, 95%信頼区間 1.611-8.483, $P=0.002$) と独立した関連性を認めた(表2)。5年全生存率は、SphK1陰性群 85.9%、陽性群 70.3%であった。更に5年疾患特異的生存率においては、SphK1陰性群 98.3%、陽性群79.3%であり、SphK1陽性群は陰性群に対して予後不良であった ($P=0.002$) (図4)。ヒト胃癌においても進行・浸潤に重要な役割を果たしていることを報告した。

(2) 2015年に切除された胃癌16例の新鮮凍結検体を連携研究者であるバージニア州立大学へ送付して、質量分析によりリビドミクス解析を行った。組織中S1P濃度を分析した結果、SphK1陽性群ではS1P濃度が著明に高値を示し、SphK1とS1P値は相関を認めた ($P=0.020$)。先の結果と合わせて、SphK1, およびSphK1によって産生されるS1Pが胃癌の進行において重要な役割を果たしていることと示唆された(図5)。

Variables	SphK1 Negative (N=60)	SphK1 Positive (N=76)	P value
Depth of invasion			0.029
pT1	41	38	
pT2	8	6	
pT3	9	25	
pT4	2	7	
LN metastasis			0.035
pN0	46	45	
pN1	9	10	
pN2	2	12	
pN3	3	9	
Distant metastasis			0.134
pM0	59	70	
pM1	1	6	
Stage			0.011
Stage I	47	41	
Stage II	9	15	
Stage III	3	14	
Stage IV	1	6	
Histological type			0.050
Intestinal	43	41	
Diffuse	17	35	
Lymphatic invasion			0.002
ly 0	50	44	
ly 1/2/3	10	32	
Venous invasion			0.266
v 0	52	60	
v 1/2/3	8	16	

表1：pSphK1 発現と臨床病理学的特徴

Variables	Odds ratio	95% Confidence Interval	P value
Histological type			
Intestinal	1.000		
Diffuse	2.210	1.046 – 4.674	0.038
Lymphatic invasion			
ly 0	1.000		
ly 1/2/3	3.697	1.611 – 8.483	0.002

表2：多変量解析結果

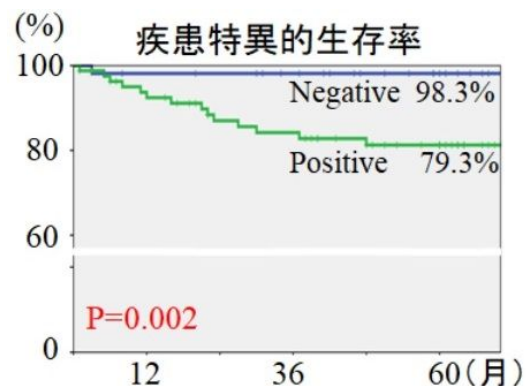


図4：SphK1発現別の疾患特異的5年生存率

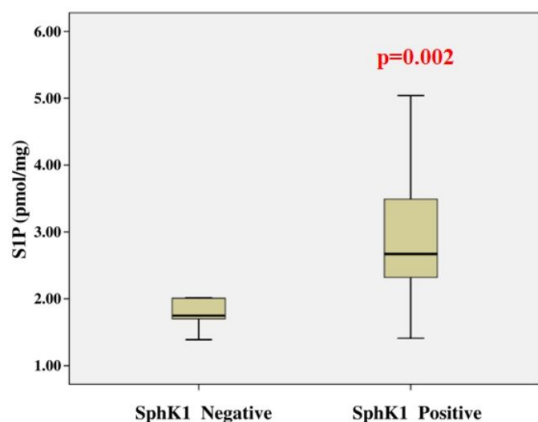


図5：胃癌組織におけるS1Pレベル

< 引用文献 >

- 1) Nagahashi M, Hait NC, Maceyka M, Avni D, Takabe K, Milstien S, Spiegel S. Sphingosine-1-phosphate in chronic intestinal inflammation and cancer. **Adv Biol Regul** 2014;54:112-20.

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1件)

Hanyu T, Nagahashi M, Ichikawa H, Ishikawa T, Kobayashi T, Wakai T. Expression of phosphorylated sphingosine kinase 1 is associated with diffuse type and lymphatic invasion in human gastric cancer. *Surgery*. 2018. [Epub ahead of print] doi: 10.1016/j.surg.2017.11.024. 査読有

[学会発表](計3件)

羽入隆晃、永橋昌幸、市川寛、石川卓、角田知行、須藤翔、根本万理子、小杉伸一、島田能史、坂田純、小林隆、亀山仁史、若井俊文、リン酸化スフィンゴシンキナーゼ1の発現と胃癌の進行についての関連、第118回日本外科学会定期学術集会、2018年

Hanyu T, Nagahashi M, Ichikawa H, Ishikawa T, Kosugi S, Nakajima M, Sakata J, Kobayashi T, Kameyama H, Wakai T. Expression of phosphorylated sphingosine kinase 1 is associated with invasiveness of gastric cancer. The 12th Annual Academic Surgical Congress (国際学会), 2017年

Hanyu T, Nagahashi M, Ichikawa H, Ishikawa T, Kosugi S, Nakajima M, Sakata J, Kobayashi T, Kameyama H, Wakai T.

Expression of phosphorylated sphingosine kinase 1 is associated with invasiveness of human gastric cancer.

第89回日本胃癌学会総会、2017年

[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)研究代表者

羽入 隆晃 (HANYU, Takaaki)
新潟大学・医歯学総合病院・助教
研究者番号：50719705

(2)研究分担者

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

若井 俊文 (WAKAI, Toshifumi)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号：50372470

石川 卓 (ISHIKAWA, Takashi)
新潟大学・医歯学総合病院・准教授
研究者番号：70586940

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

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

高部 和明 (TAKABE, Kazuaki)
サラ・スピーゲル (Sarah Spiegel)