

令和元年6月25日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19888

研究課題名(和文) 乳癌の浸潤・転移における癌間質液中スフィンゴシン-1-リン酸の役割と臨床的意義

研究課題名(英文) The role of sphingosine-1-phosphate in interstitial fluid promoting the breast cancer progression

研究代表者

土田 純子 (Tsuchida, Junko)

新潟大学・医歯学総合病院・医員

研究者番号：90769415

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：スフィンゴシン-1-リン酸(S1P)は癌の進展を制御する生理活性物質である。癌および正常乳腺組織間質液中のS1Pを定量し、S1Pの腫瘍微小環境における役割について研究を行った。本研究では、乳癌マウスモデルにおいて、S1P受容体拮抗薬であるFTY720の投与により、腫瘍中のS1P濃度が低下することや、乳癌患者において、乳癌組織間質液中のS1P濃度が正常乳腺に比べて高いことが分かった。本研究はS1Pの癌微小環境における役割を検討する上で新たな視点をもたらしたと言える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌間質液中のS1P濃度を定量する方法がこれまでになく、研究はなされてこなかった。我々は、低速遠心分離による組織間質液抽出法を開発し、質量分析装置を用いて、間質液中のS1P濃度を定量することに成功した。癌間質液中のS1Pが癌の発育進展に関わっていることが示唆される結果が得られた。本研究はS1Pの癌微小環境における役割を検討する上で新たな視点をもたらしたと言える。

研究成果の概要(英文)：Sphingosine-1-phosphate (S1P) is a bioactive lipid mediator that regulates processes important for cancer progression. We studied the role of S1P in the tumor microenvironment utilizing the experiments using our improved centrifugation method to collect breast tumor and normal tissue interstitial fluid (IF). Importantly, levels of S1P in IF from mammary tumors were reduced when tumor growth was suppressed by oral administration of FTY720/fingolimod. S1P levels were significantly higher in human breast tumor tissue IF than in the normal breast tissue IF. S1P tumor IF measurement illuminates new aspects of the role of S1P in the tumor microenvironment.

研究分野：外科学一般

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 癌間質液

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、乳癌の治療成績は改善傾向にあるが、転移再発により治療困難となる症例は後を絶たない。転移は癌の最も重要な予後規定因子であり、遠隔転移した癌のほとんどがいずれ治療困難となる。癌転移の機序を明らかにし、新たな治療法を確立することが望まれる。癌間質および癌間質液は、癌との相互作用によって、癌の浸潤・転移に重要な役割を果たす。癌間質は、マクロファージなどの骨髄由来細胞、線維芽細胞、血管・リンパ管内皮細胞、細胞外基質などで構成され、周囲を癌間質液が満たしている。癌や癌間質が産生するサイトカインや液性因子は、癌間質液中に放出され、これらの因子がオートクライン、パラクライン作用により癌細胞を刺激し、癌の増殖や浸潤、転移に寄与していると考えられている。

癌と間質の相互作用に寄与するメディエーターとして、IL-6 や NF- κ B などの炎症性サイトカインが脚光を浴びているが、これらの蛋白質に加え、最近、脂質メディエーターの役割が注目されるようになってきた。スフィンゴリン脂質であるスフィンゴシン-1-リン酸 (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サラ・スピーゲルによって解明された (Nature 1993, Nature 1996)。私達の研究グループは「乳癌が産生した S1P が、リンパ管新生を促進する」ことを世界に先駆けて報告した (Cancer Research 2012)。これらの研究により、S1P が癌の血管・リンパ管新生の一端を担っており、癌微小環境において重要な働きをしていることが広く認識されるようになった。

現在の問題点として、以下の 3 点が挙げられる。(1) S1P は脂質であるが故に測定することが困難であったことから、実験動物 (in vivo) および臨床での S1P の生理的機能に関する研究は遅れており、その臨床的意義は未解明のままである。(2) 生体内においては、癌が産生する S1P に加えて、宿主側が産生する S1P も存在し、癌と宿主の相互作用における S1P の生理的機能はいまだ不明である。(3) 癌間質液における S1P 濃度は、測定する方法がなかったため、未だ不明である。

私達は、癌細胞はスフィンゴシンキナーゼ 1 型 (SphK1) を高発現しており、S1P の産生能が高いことから、「癌間質液中の S1P が高濃度に保たれ、癌間質液中の S1P が癌細胞を刺激することによって、癌の浸潤・転移に寄与している」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、新規に開発した間質液収集法を用いて、癌および正常乳腺組織の間質液中の S1P を定量することで仮説を検証し、癌間質における癌と宿主の相互作用の中で、S1P が癌転移に関与する分子機構を明らかにし、癌間質を標的とした新たな治療開発へ向けた研究基盤を確立することである。

3. 研究の方法

乳癌移植マウスモデルにおける癌間質液中 S1P の測定および癌浸潤・転移における癌間質液 S1P の役割の解明

本課題では、私達が新規に開発した低速遠心分離による組織間質液抽出法を用いた。SphK1 とスフィンゴシンキナーゼ 2 型 (SphK2) の乳腺組織間質液中での役割を解明するために、SphK1KO および野生型マウスと SphK2KO および野生型マウスの乳腺組織間質液と乳腺組織全体の中のスフィンゴリン脂質濃度を定量し、比較した。

4T1 細胞株を用いた乳癌移植マウスモデルを使って、癌および正常乳腺組織から間質液を抽出し、S1P を含めたスフィンゴリン脂質の濃度を定量した。乳癌細胞移植マウスにおいて、S1P 受容体の機能的阻害薬である FTY720 を経口投与することによって、癌間質液中のスフィンゴリン脂質濃度と S1P シグナル阻害による癌に対する抑制効果の関係を検討した。

乳癌患者における癌間質液中 S1P 測定と臨床的意義の解明

本課題では、乳癌患者手術症例において、乳癌組織および正常乳腺組織より間質液を抽出し、間質液中 S1P 濃度を質量分析により測定した。また、乳癌組織検体におけるリン酸化 SphK1 の発現を免疫組織化学より検出し、血中 S1P 濃度と間質液中 S1P 濃度との関係について解析した。

4. 研究成果

乳癌移植マウスモデルにおける癌間質液中 S1P の測定および癌浸潤・転移における癌間質液 S1P の役割の解明

まず、S1P 産生責任酵素である SphK1 と SphK2 の乳腺組織間質液における役割を解明するために、SphK1KO マウスおよび野生型マウスと、SphK2KO マウスおよび野生型マウスの乳腺組織と乳腺組織間質液中のスフィンゴリン脂質濃度を定量し、比較した。いずれのマウスにおいても、これまでの報告と一致して乳腺組織中の S1P とジヒドロ S1P (DHS1P) 濃度は、

スフィンゴシン (Sph) やジヒドロ Sph (DHSph) 濃度に比べ、低濃度であった。SphK1KO と野生型とで乳腺組織全体の S1P 濃度に差は見られなかったが、SphK1KO マウスにおける DHS1P や Sph 濃度は野生型に比べて有意に低下した。SphK2KO マウスでは野生型と比較して S1P 濃度がやや上昇していたが、Sph 濃度は差が見られなかった。乳腺組織の間質液中の S1P および DHS1P 濃度は、乳腺組織全体の S1P および DHS1P 濃度と比べて、10 倍近く高かった。SphK1KO マウスは野生型に比べて、乳腺組織の間質液中における S1P、DHS1P、Sph、DHSph の濃度がいずれも有意に低下していた。一方で、SphK2KO マウスでは、S1P や Sph がやや上昇傾向を認めたが、有意差は認めなかった。

乳癌移植モデルを用いて、癌および正常乳腺組織から間質液を抽出し、S1P を含めたスフィンゴリン脂質の濃度を定量した。癌では S1P や DHS1P の濃度上昇を認めた。乳癌細胞移植マウスに FTY720 を投与すると、腫瘍の増殖が抑制された。また、癌間質液中の S1P 濃度および DHS1P 濃度は有意に低下した。

本研究によって、癌間質液中で S1P が高濃度で存在し、癌の発育進展に重要な役割を果たしていることが示唆された。今後は、癌と宿主の相互作用により、間質液中 S1P 濃度が調節され、癌浸潤・転移を促進するメカニズムを解明していく予定である。現在、遺伝子改変ツールである CRISPR/Cas9 を用いて細胞外 S1P の産生責任酵素である SphK1 のノックアウト細胞株や過剰発現細胞株を樹立し、SphK1 ノックアウトマウスに樹立した各細胞株を移植し、癌と宿主の SphK1 による癌間質液中 S1P 濃度調節機構を解明中である。さらに癌間質液中 S1P の薬剤耐性への寄与を解明し、S1P 治療の可能性を探る。

乳癌患者における癌間質液中 S1P 測定と臨床的意義の解明

動物実験で証明された現象が乳癌患者でも同様の結果が得られるか証明するために、乳癌患者の癌間質液中のスフィンゴリン脂質濃度を定量した。乳癌患者における乳癌組織、腫瘍近傍正常乳腺組織、腫瘍遠隔正常乳腺における間質液中のスフィンゴリン脂質濃度を定量した。乳癌組織中の Sph、DHSph、S1P 濃度は正常乳腺組織に比べ有意に上昇していた。腫瘍遠隔正常乳腺と腫瘍近傍正常乳腺中の Sph、DHSph、S1P、DHS1P 濃度に有意な差は見られなかった。

今後は、癌間質液中 S1P 濃度と臨床病理学的因子および長期成績との比較を行い、癌間質液中 S1P 濃度と癌転移に関わる病理学的因子や、化学療法感受性、長期成績 (再発・予後) などについて検証していく予定である。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

- (1) Masayuki Nagahashi, Akimitsu Yamada, Hiroshi Miyazaki, Jeremy C. Allegood, Junko Tsuchida, Tomoyoshi Aoyagi, Wei-Ching Huang, Krista P. Terracina, Barbara J. Adams, Omar M. Rashid, Sheldon Milstien, Toshifumi Wakai, Sarah Spiegel, Kazuaki Takabe. Interstitial Fluid Sphingosine-1-Phosphate in Murine Mammary Gland and Cancer and Human Breast Tissue and Cancer Determined by Novel Methods. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 2016;21:9-17
- (2) Masayuki Nagahashi, Junko Tsuchida, Kazuki Moro, Miki Hasegawa, Kumiko Tatsuda, Ingrid A. Woelfel, Kazuaki Takabe, Toshifumi Wakai. High levels of sphingolipids in human breast cancer. *Journal of Surgical Research* 2016;204:435-44
- (3) Junko Tsuchida, Masayuki Nagahashi, Masato Nakajima, Kazuki Moro, Kumiko Tatsuda, Rajesh Ramanathan, Kazuaki Takabe, Toshifumi Wakai. Breast cancer sphingosine-1-phosphate is associated with phospho-sphingosine kinase 1 and lymphatic metastasis. *Journal of Surgical Research* 2016;205:85-94
- (4) Junko Tsuchida, Masayuki Nagahashi, Kazuaki Takabe, Toshifumi Wakai. Clinical Impact of Sphingosine-1-Phosphate in Breast Cancer. *Mediators of Inflammation* 2017;2017:2076239
- (5) Masayuki Nagahashi, Akimitsu Yamada, Eriko Katsuta, Tomoyoshi Aoyagi, Wei-Ching Huang, Krista P. Terracina, Nitai C. Hait, Jeremy C. Allegood, Junko Tsuchida, Kizuki Yuza, Masato Nakajima, Manabu Abe, Kenji Sakimura, Sheldon Milstien, Toshifumi Wakai, Sarah Spiegel, Kazuaki Takabe. Targeting the SphK1/S1P/S1PR1 Axis That Links Obesity, Chronic Inflammation, and Breast Cancer Metastasis. *Cancer Research* 2018;78:1713-1725
- (6) Kazuki Moro, Tsutomu Kawaguchi, Junko Tsuchida, Emmanuel Gabriel, Qianya Qi, Li Yan, Toshifumi Wakai, Kazuaki Takabe, Masayuki Nagahashi. Ceramide species are

elevated in human breast cancer and are associated with less aggressiveness. Oncotarget 2018;9:19874-19890

[学会発表](計14件)

- (1) Junko Tsuchida, Masayuki Nagahashi, Kazuki Moro, Mayuko Ikarashi, Yu Koyama, Hiroshi Ichikawa, Yoshifumi Shimada, Jun Sakata, Takashi Kobayashi, Hitoshi Kameyama, Kazuaki Takabe, Toshifumi Wakai . Levels of sphingolipids in plasma are elevated in breast cancer patients with lymph node metastasis . The 14th Annual Academic Surgical Congress (Houston , USA) 2019.02.05
- (2) 諸和樹, 永橋昌幸, 遠藤麻巳子, 大溪彩香, 土田純子, 庭野稔之, 山浦久美子, 長谷川美樹, 利川千絵, 五十嵐麻由子, 中島真人, 廣瀬雄己, 坂田純, 亀山仁史, 小林隆, 川口耕, 高部和明, 若井俊文 . ヒト乳癌組織では全ての Ceramide 主合成経路が活性化されている . 第 118 回日本外科学会定期学術集会 (東京都千代田区) 2018.04.05
- (3) 永橋昌幸, 土田純子, 油座築, 中島真人, 高部和明, 若井俊文 . 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 . 第 25 回外科侵襲とサイトカイン研究会 (大阪府大阪市) 2018.07.05
- (4) Kohei Miura ,Masayuki Nagahashi ,Masato Nakajima ,Kizuki. Yuza Junko Tsuchida , Yuki Hirose , Manabu Abe , Kenji Sakimura , Toshifumi Wakai . The Roles of Sphingosine-1-phosphate Produced by Sphingosine Kinases in Tumor and Its Microenvironment . 13th Annual Academic Surgical Congress (Jacksonville, USA) 2018.01.30
- (5) Junko Tsuchida ,Masayuki Nagahashi ,Masato Nakajima ,Kazuaki Takabe ,Toshifumi Wakai . The levels of Sphingosine-1-phosphate and its related gene expressions in breast cancer patients . 2017 San Antonio Breast Cancer Symposium (San Antonio, USA) 2017.12.06
- (6) 三浦要平, 中島真人, 永橋昌幸, 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 . CRISPR/Cas9 によるスフィンゴシン-1-リン酸産生酵素の乳癌発育進展における役割解明 . 第 117 回日本外科学会定期学術集会 (神奈川県横浜市) 2017.04.29
- (7) 土田純子, 永橋昌幸, 遠藤麻巳子, 大溪彩香, 諸和樹, 庭野稔之, 辰田久美子, 利川千絵, 長谷川美樹, 五十嵐麻由子, 中島真人, 小山諭, 坂田純, 小林隆, 亀山仁史, 高部和明, 若井俊文 . 乳がん患者における脂質メディエーター・スフィンゴシン-1-リン酸の定量と臨床的意義 . 第 117 回日本外科学会定期学術集会 (神奈川県横浜市) 2017.04.27
- (8) Junko Tsuchida, Masayuki Nagahashi, Kazuki Moro, Ayaka Otani, Maiko Endo, Toshiyuki Niwano, Kumiko Tatsuda, Chie Toshikawa, Miki Hasegawa, Mayuko Ikarashi, Masato Nakajima, Yu Koyama, Jun Sakata, Takashi Kobayashi, Hitoshi Kameyama, Kazuaki Takabe, Toshifumi Wakai . Peri-tumor sphingosine-1-phosphate levels are affected by the tumor . The 12th Annual Academic Surgical Congress (Las Vegas, USA) 2017.02.07
- (9) Junko Tsuchida, Masato Nakajima, Kazuki Moro, Ayaka Ohtani, Maiko Endo, Toshiyuki Niwano, Kumiko Tatsuda, Chie Toshikawa, Miki Hasegawa, Mayuko Ikarashi, Yu Koyama, Jun Sakata, Takashi Kobayashi, Hitoshi Kameyama, Toshifumi Wakai, Kazuaki Takabe, Masayuki Nagahashi . Obesity-induced sphingosine-1-phosphate in breast cancer interstitial fluid promotes angiogenesis . The 12th Annual Academic Surgical Congress (Las Vegas, USA) 2017.02.07
- (10) 土田純子, 永橋昌幸, 遠藤麻巳子, 大溪彩香, 庭野稔之, 辰田久美子, 利川千絵, 長谷川美樹, 五十嵐麻由子, 中島真人, 小山諭, 高部和明, 若井俊文 . 肥満を伴う乳癌患者における血清スフィンゴシン-1-リン酸の定量 . 第 78 回日本臨床外科学会総会 (東京都港区) 2016.11.26
- (11) Masato Nakajima , Masayuki Nagahashi , Junko Tsuchida , Toshifumi Wakai . Roles of sphingosine-1-phosphate produced by sphingosine kinases in cancer progression . 第 75 回日本癌学会学術総会 (神奈川県横浜市) 2016.10.06

(12)中島真人,永橋昌幸,大溪彩香,遠藤麻巳子,土田純子,諸和樹,庭野稔之,辰田久美子,利川千絵,長谷川美樹,五十嵐麻由子,小山諭,高部和明,若井俊文.乳がん手術検体におけるスフィンゴリン脂質の定量.第24回日本乳癌学会学術総会(東京都江東区)2016.06.16

(13)永橋昌幸,大溪彩香,遠藤麻巳子,土田純子,諸和樹,庭野稔之,辰田久美子,利川千絵,長谷川美樹,五十嵐麻由子,中島真人,小山諭,山田顕光,青柳智義,高部和明,若井俊文.肥満によって促進される乳癌の血管新生に対する抗スフィンゴシン-1-リン酸受容体治療.第24回日本乳癌学会学術総会(東京都江東区)2016.06.16

(14)土田純子,永橋昌幸,遠藤麻巳子,大溪彩香,庭野稔之,辰田久美子,利川千絵,長谷川美樹,五十嵐麻由子,中島真人,小山諭,高部和明,若井俊文.乳がん患者における腫瘍内スフィンゴシン-1-リン酸濃度と臨床病理学的因子の関連について.第24回日本乳癌学会学術総会(東京都江東区)2016.06.16

〔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:
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:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名:なし

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

(2)研究協力者 なし

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

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、研究者個人に帰属されます。