

令和 2 年 7 月 7 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10538

研究課題名(和文) 乳癌ホルモン療法耐性機序における脂質メディエーター分子機構の解明および臨床的意義

研究課題名(英文) Elucidation of molecular mechanisms of a lipid mediator in resistance of breast cancer hormone therapy and its clinical significance

研究代表者

五十嵐 麻由子 (Ikarashi, Mayuko)

新潟大学・医歯学総合病院・医員

研究者番号：50790284

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：乳癌ホルモン療法における耐性機序の解明と克服は临床上重要な課題である。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。本研究の目的はS1Pを介したホルモン療法の耐性機序を解明し、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。本課題研究では、ホルモン療法耐性乳癌細胞株において、S1P情報伝達経路を遮断するFTY720が細胞増殖抑制効果を示すことを発見した。また、臨床検体を用いてリポミクス解析を行い、臨床病理学的因子との関連を比較検討した結果、乳癌患者の血漿中S1Pとリンパ行性転移との関連を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義として、(1)脂質メディエーターであるS1Pがホルモン療法耐性機序に関与しており、S1Pシグナルを標的とした治療の有効性が実験レベルで明らかになったことと、(2)臨床検体において、S1Pのリンパ節転移との関連が示され、ホルモン陽性乳癌におけるS1Pの重要性が示唆されてことが挙げられる。本研究の成果により、新しいホルモン療法耐性機序に基づいた標的治療薬の開発へつながることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Elucidation and overcoming of resistance mechanism in breast cancer hormone therapy is an important clinical issue. Sphingosine-1-phosphate (S1P) is a lipid mediator that acts as a cell signal transmitter in the same way as a protein, although it is a lipid. The aim of this study was to elucidate the resistance mechanism of hormone therapy through S1P and to establish the research basis for the development of new treatments. In this study, we found that FTY720, which blocks the S1P signaling pathway, suppress the proliferation of hormone therapy-resistant breast cancer cells. In addition, we performed a lipidomics analysis using clinical samples and compared the association with clinicopathologic factors. As a result, we found that high plasma S1P levels are significantly associated with lymph node metastasis in breast cancer patients.

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 ホルモン療法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

乳癌は日本人女性の臓器別癌罹患数において第1位であり、年間約8万人の女性が新たに乳癌に罹患する。エストロゲン受容体(ER)陽性例は乳癌全体の約7割を占め、更に増加している。タモキシフェン(TAM)をはじめとするホルモン療法の成否は、ER陽性乳癌患者の予後を大きく左右し、ホルモン療法耐性機序の解明と克服は、乳癌治療における重要な課題である。

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のSarah Spiegelによって解明された(Nature 1993; Nature 1996)。その後、S1Pは、細胞内でスフィンゴシンキナーゼ(SphKs)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(inside-out シグナル)ことで、細胞増殖や生存などに関与していることが明らかになった(Nagahashi et al. *Advances in biological regulation* 2014)。

我々はこれまでS1Pシグナルが乳癌の発育・浸潤に重要な働きをもつことを明らかにしてきた。さらに、乳癌によって産生・放出されたS1Pが周囲の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(Nagahashi et al. *Cancer Research* 2012)。

乳癌のホルモン療法耐性には、ERK及びAKT経路の2つの情報伝達経路が特に重要な役割を担っている(Musgrove et al. *Nature Review Cancer* 2009)。これまでに多くの研究が行われてきたが、これらの2つの経路を上流で統括制御している分子機構は未だによく分かっていない。

我々はこれまでにER陽性乳癌において、(1)エストロゲンと結合したERが、遺伝子発現の誘導を介さないnon-genomic作用によりS1P産生酵素であるSphK1を活性化すること、(2)活性化されたSphK1によって産生されたS1Pのinside-outシグナルにより、ERK及びAKT経路が活性化され、細胞生存能に寄与していることを発見した(*J Biol Chem* 2010)。このことから我々は「乳癌において、SphK1が高発現することで、エストロゲン刺激に関わらずERK及びAKT経路が恒常的に活性化され、ホルモン療法耐性に寄与している」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情報伝達系を介したホルモン療法の耐性機序を解明し、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

TAM耐性乳癌細胞株を用いたホルモン療法耐性機序におけるS1Pの役割の解明

MCF-7細胞株において、遺伝子改変ツールであるCRISPR/Cas9によりSphK1遺伝子をノックダウンし、ホルモン療法耐性機序におけるSphK1の役割について、細胞生存能及び細胞シグナル解析により検証を行った。また、TAM耐性乳癌細胞株に対し、S1P1型受容体とSphK1の機能的阻害薬であるFingolimod(FTY720)を用いて、その抗癌治療効果を検証した。細胞生存能はWST-8アッセイを用いて評価を行った。

SphK1ノックダウンMCF-7細胞株、TAM耐性MCF-7細胞株において、スフィンゴシン、ジヒドロスフィンゴシン、S1PおよびジヒドロS1Pを含むスフィンゴリン脂質を質量分析法(LC-ESI-MS/MS)によって測定し、ホルモン療法耐性機序におけるS1Pの役割について解析した。

臨床検体を用いたS1Pの臨床的意義の検証

臨床検体を用いた研究として、本施設で手術を施行され、病理組織学的に乳癌と診断された88例を対象とした。術前に採取された血液より分離保存されていた血漿を用いて、スフィンゴシン、ジヒドロスフィンゴシン、S1PおよびジヒドロS1Pを含むスフィンゴリン脂質の濃度を質量分析法(LC-ESI-MS/MS)によって測定した。スフィンゴリン脂質濃度と臨床病理学的因子との比較を行った。統計解析にはMann-Whitney U検定を用い、 $P < 0.05$ を有意差ありと判定した。

## 4. 研究成果

TAM耐性乳癌細胞株を用いたホルモン耐性におけるS1Pの役割の解明

低濃度のTAM在下でのMCF-7細胞の培養を長期間において継続し、TAM耐性乳癌細胞株の樹立を行った。TAM濃度別の生存能を確認したところ、十分なTAM耐性能を得られずに機能解析に耐えうる十分な細胞株の樹立に至らなかったため、代替手段として既に確立されたTAM耐性乳癌細胞株であるMCF7/TAMR-1細胞とTAM感受性細胞株であるMCF7/S0.5を用いて実験を行った。主にS1P受容体に作用することでS1P情報伝達経路を遮断するFTY720がTAM耐性乳癌細胞株において、細胞増殖抑制効果がみられた。興味深いことに、FTY720の作用はTAM感受性乳癌細胞株よりもTAM耐性細胞株により強い細胞増殖抑制効果を示す傾向があることを発見した。遺伝子改変ツールであるCRISPR/Cas9によりSphK1をノックダウンしたMCF-7細胞株を樹立した。SphK1ノックダウンMCF-7細胞株、ホルモン療法耐性株に対して、スフィンゴ

リン脂質濃度を測定した結果、SphK1 ノックダウン細胞では細胞内および培養液中の S1P 濃度が有意に低下していることを確認した。TAM 耐性乳癌細胞株では細胞内の S1P 濃度が有意に上昇しており、TAM 耐性機序に S1P 産生が寄与している可能性が示唆された。

#### 臨床検体を用いた S1P の臨床的意義の検証

対象とした 88 症例の全ての乳癌患者の血漿において、スフィンゴシン、ジヒドロスフィンゴシン、S1P、ジヒドロ S1P を含むスフィンゴリン脂質が検出され、濃度を定量することが可能であった。術前化学療法 (N=18) を受けた患者における S1P 濃度は、術前化学療法を受けていない患者 (N=70) よりも有意に高かった ( $P < 0.05$ )。これは術前化学療法群の方がリンパ節転移の頻度が高く、進行癌がより多く、生体内の癌量 (tumor burden) がより多いことが影響している可能性が示唆された。術前化学療法を受けていない 70 人の患者のうち、病理学的にリンパ節転移が確認された患者の S1P 濃度は、リンパ節転移のない患者よりも有意に高かった ( $P < 0.05$ )。我々のこれまでの動物実験の結果からも癌が進行するにつれて血中 S1P が次第に上昇するという結果を得ており (Nagahashi et al. Cancer Res 2012)、今回のデータはこれまでの実験結果を臨床検体で裏付けるデータであると考えられる。また、ER 陽性患者は、ER 陰性患者と比較して血漿中 S1P 濃度が高い傾向が見られ、ER 陽性乳癌において S1P が重要な役割を担っていることが実際の乳癌患者においても示唆された。ER 陽性乳癌において S1P 情報伝達経路をターゲットとした治療が、特にホルモン耐性乳癌において役立つ可能性があり、さらなる研究の遂行が望まれる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4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 Junko Tsuchida, Masayuki Nagahashi, Mayuko Ikarashi, Kazuki Moro, Chie Toshikawa, Hiroshi Ichikawa, Yoshifumi Shimada, Kazuaki Takabe, Toshifumi Wakai
2 . 発表標題 Involvement of sphingosine-1-phosphate in tumor immune microenvironment of 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 五十嵐 麻由子, 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, 中島 真人, 小山 諭, 若井 俊文
2 . 発表標題 乳癌患者における血漿中スフィンゴシン-1-リン酸濃度の臨床的意義
3 . 学会等名 第27回日本乳癌学会学術総会
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Nagahashi M, Tsuchida J, Moro K, Yuza K, Hirose Y, Ikarashi M, Sakata J, Kobayashi T, Kameyama H, Wakai T, Takabe K
2 . 発表標題 Obesity-induced sphingosine-1-phosphate in tumor interstitial fluid promotes angiogenesis and breast cancer progression
3 . 学会等名 第15回臨床腫瘍学会
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

1. 発表者名 Junko Tsuchida, Masayuki Nagahashi, Kazuki Moro, Mayuko Ikarashi, Yu Koyama, Jun Sakata, Takashi Kobayashi, Hitoshi Kameyama, Kazuaki Takabe, Toshifumi Wakai
2. 発表標題 Levels of sphingolipids in plasma are elevated in breast cancer patients with lymph node metastasis
3. 学会等名 The 14th Annual Academic Surgical Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 永橋昌幸, 中島真人, 土田純子, 諸 和樹, 遠藤麻巳子, 大浜彩香, 庭野稔之, 辰田久美子, 長谷川美樹, 利川千絵, 五十嵐麻由子, 坂田純, 亀山仁史, 小林 隆, 高部和明, 斎藤哲也, 小松雅明, 曾我朋義, 小山 諭, 若井俊文
2. 発表標題 乳癌細胞の代謝動態におけるスフィンゴシン-1-リン酸産生酵素の働き
3. 学会等名 第24回外科侵襲とサイトカイン研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中島 真人, 永橋 昌幸, 大谷 彩香, 遠藤 麻巳子, 土田 純子, 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, 小山 諭, 坂田 純, 亀山 仁史, 小林 隆, 若井 俊文
2. 発表標題 乳がんのがん細胞と宿主におけるスフィンゴシン-1-リン酸産生酵素の機能解析
3. 学会等名 第25回日本乳癌学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 永橋 昌幸, 大浜 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, 高部 和明, 若井 俊文
2. 発表標題 シンポジウム15 私たちが日本でやるべき乳癌研究 基礎から臨床まで 日本だからこそできるトランスレーショナルリサーチの実践を目指して
3. 学会等名 第25回日本乳癌学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tsuchida J, Nagahashi M, Moro K, Otani A, Endo M, Ikarashi M, Nakajima M, Koyama Y, Sakata J, Kobayashi T, Kameyama H, Yan Q, Yan L, Takabe K, Wakai T
2. 発表標題 Sphingosine-1-phosphate affects tumor-associated immune cells in human breast cancer patients
3. 学会等名 The 13th Annual Academic Surgical Congress
4. 発表年 2017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	永橋 昌幸 (Nagahashi Masayuki)  (30743918)	新潟大学・医歯学総合病院・研究准教授  (13101)	
研究分担者	土田 純子 (Tsuchia Junko)  (90769415)	新潟大学・医歯学総合病院・特任助教  (13101)	
研究分担者	小山 諭 (Yu Koyama)  (10323966)	新潟大学・医歯学系・教授  (13101)	

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	中島 真人  (Nakajima Masato)		
研究協力者	利川 千絵  (Toshikawa Chie)		
研究協力者	諸 和樹  (Moro Kazuki)		
研究協力者	大湊 彩香  (Otani Ayaka)		