

令和 2 年 7 月 5 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：17K10692

研究課題名(和文) 脂質メディエーター産生酵素の膵癌微小環境形成における役割と臨床的意義

研究課題名(英文) Roles and clinical significance of lipid mediator producing enzymes in the formation of the tumor microenvironment of pancreatic cancer

研究代表者

中島 真人(Nakajima, Masato)

新潟大学・医歯学総合研究科・客員研究員

研究者番号：60588250

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：スフィンゴシン-1-リン酸(S1P)は、癌の進行に重要な機能を制御する脂質メディエーターである。膵癌微小環境形成におけるS1Pシグナルの役割を解明することを目的として研究を行った。本研究では、膵癌手術検体のS1P濃度が、非癌の膵組織より有意に高いことを明らかにした。また、S1P産生酵素(SphK1とSphK2)をCRISPR/Cas9でノックアウトしたマウス膵癌細胞株を作成し、野生型細胞との比較を行い、膵癌細胞においてSphK1は抗癌剤耐性に、SphK2は発育進展に関与する結果を得た。本研究は膵癌微小環境形成に関わるシグナル伝達経路を検討する上で新たな視点をもたらすと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで癌組織中のS1P濃度を測定する方法がなく、癌の発育進展における脂質メディエーターの役割が注目を集める中、手術検体を用いた研究はなされてこなかった。我々は、膵癌手術検体から組織間液を抽出し、質量分析装置を用いて間質液中のS1P濃度を測定することに成功した。さらに培養細胞におけるS1P産生酵素をノックアウトし、野生型細胞との比較を行うことで、S1Pシグナルが癌の微小環境形成ならびに発育進展に関わる可能性を示唆する結果を得た。本研究はS1Pシグナルの膵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 lipid mediator that regulates important functions in cancer progression. The aim of this study was to elucidate roles of S1P signaling in the formation of pancreatic cancer microenvironment. We revealed that the S1P level in surgical specimens of pancreatic cancer tissue was significantly higher than that in noncancerous pancreatic tissue. Furthermore, we produced murine pancreatic cancer cell lines in which gene of S1P producing enzyme (SphK1 or SphK2) was knocked out, and compared them with wild type cells. Our study indicated that SphK1 promotes anticancer drug resistance, and that SphK2 is involved in proliferation and progression of pancreatic cancer cells. This study will bring a new perspective in signal transduction pathways involved in the formation of pancreatic cancer microenvironment.

研究分野：外科学一般

キーワード：スフィンゴシン-1-リン酸 脂質メディエーター 癌微小環境 膵癌 CRISPR/Cas9

## 1. 研究開始当初の背景

膵癌は極めて予後不良な悪性腫瘍の一つであり、手術により治癒できる症例はごく一部に限られる。また化学療法や放射線療法にも高い抵抗性を示すことから、新たな治療法の開発が望まれている。膵癌が治療困難な原因の一つとして、腫瘍微小環境 (tumor microenvironment、以下 TME) の関与が考えられる。一般に、低酸素環境は癌細胞の化学療法や放射線療法に対する抵抗性を高めるが、膵癌の TME は腫瘍血管が少なく、厳しい低酸素状態である。さらに、腫瘍内の間質が密で治療薬が有効に到達しづらいことも、癌の発育進展や治療抵抗性に関与することが明らかになりつつある (Oncotarget 2016)。そのため膵癌 TME は、新たな治療標的として注目を集めている。

スフィンゴリン脂質であるスフィンゴシン-1-リン酸 (Sphingosine-1-phosphate、以下 S1P) は、癌細胞の増殖や生存、血管・リンパ管新生など、癌の進行に重要な機能を制御する脂質メディエーターである。S1P は、癌細胞や周囲の間質細胞内にある 2 種類のスフィンゴシンキナーゼ (SphK1、SphK2) によって産生され、細胞外に分泌されて機能を発揮する。私達の研究グループはこれまでに、S1P が「リンパ管新生およびリンパ節転移に重要な役割を果たしている」ことや「SphK1 が乳癌の発育進展に重要な機能を有する」こと、「慢性炎症を伴う発癌に関与する」ことなどを発見した (Cancer Res 2012、FASEB J 2013、Cancer Cell 2013)。

S1P は脂質であるため直接測定することが難しく、タンパク質よりも研究が遅れている。私達の研究グループは、質量分析器による S1P 濃度測定を用いて、実験モデルのみならず、癌患者においても S1P が重要な役割を果たしていることを世界に先駆けて明らかにした (J Surg Res 2016)。S1P は、悪性腫瘍のみならず様々な疾患に関与していることが明らかになり (Adv Biol Reg 2014)、S1P 受容体の機能的阻害薬 FTY720 は、多発性硬化症に対する治療薬として FDA および厚生労働省で既に認可されている。S1P は、悪性腫瘍に対する新規治療の標的としても、注目を集めている。一方、膵癌の TME 形成における S1P の役割は未だに明らかでない。

申請者らは、S1P の多彩な作用は、癌の TME 形成において重要な役割を果たしていると推察し、「膵癌 TME 形成における S1P シグナルの役割を解明することは、膵癌の治療成績向上に重要な課題である」という着想に至った。以上を踏まえ、「膵癌 TME 内で活性化された S1P 産生酵素が、脂質メディエーターである S1P の産生を亢進し、膵癌 TME 形成を促進すると共に、癌細胞の浸潤能、生存能を高めることで癌の発育進展に関与している」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、「膵癌の TME 形成における S1P 産生酵素と S1P の分子制御機構を解明し、その臨床的意義を明らかにして、新たな治療法開発へ向けた科学的基盤を確立すること」である。

## 3. 研究の方法

### 膵癌患者における癌間質液中 S1P 測定と臨床的意義の解明

膵癌患者手術症例において、膵癌組織と非癌部の膵組織から間質液を低速遠心分離による組織間質液抽出法を用いて抽出し、質量分析により S1P を含めたスフィンゴリン脂質の濃度を測定した。

## マウス膵癌細胞におけるスフィンゴシンキナーゼ 1 型および 2 型の機能解析

S1P 産生酵素である SphK1 遺伝子または SphK2 遺伝子を、CRISPR/Cas9 を用いてノックアウト (KO) したマウス膵癌細胞株 (PAN02) を作成した。KO 細胞と野生型 (WT) 細胞を用いて WST-8 を用いた増殖アッセイとスクラッチアッセイを行い、増殖能や遊走能を検討した。また膵癌微小環境に近い状況を想定し、低酸素培養下でも増殖能や遊走能を検討した。さらに抗癌剤であるジェムシタピンを添加した培地で増殖能を比較した。

動物実験では、これらの細胞をマウスに腹注して腹膜播種モデルを作成し、生存期間を比較した。

## 4. 研究成果

### 膵癌手術検体における癌間質液中のS1Pの測定

膵癌組織におけるS1Pを含むスフィンゴリン脂質の発現を検討するため、膵癌手術検体中の膵癌組織と非癌部膵組織から間質液を抽出し、質量分析を用いてスフィンゴリン脂質の濃度を測定した。膵癌組織中のS1P、DHS1P、Sph、DHSph濃度は、非癌部膵組織に比べ有意に上昇していた。S1Pは、膵癌組織内で非癌膵組織より多く産生されていることが示唆された。

今後は、膵癌組織中のS1P発現と臨床病理学的因子および長期成績との比較を行い、膵癌間質液中のS1P濃度と転移・浸潤に関わる病理学的因子や、化学療法感受性、再発や予後などについて検証していく予定である。

### マウス膵癌細胞におけるSphK1およびSphK2の機能解析

最初に膵癌細胞におけるSphK1とSphK2の役割を解析するため、通常の培養条件でSphK1 KO細胞・SphK2 KO細胞とWT細胞の増殖能を検討したところ、SphK1 KO細胞は、WT細胞と比較して細胞の増殖能が有意に上昇し、SphK2 KO細胞の増殖能はWT細胞と比して有意に低下していた。また、膵癌微小環境に近い状況を想定し、酸素濃度1%未満の低酸素培養下で同様に増殖能を検討したところ、通常の培養条件での実験同様に、SphK1 KO細胞は、WT細胞と比較して細胞の増殖能が有意に上昇し、SphK2 KO細胞の増殖能はWT細胞と比して有意に低下していた。スクラッチアッセイを用いた遊走能の検討では、SphK1 KO細胞の有意な遊走能の上昇とSphK2 KO細胞の有意な遊走能の低下を認め、増殖アッセイと同様の傾向が確認された。さらに低酸素培養下での遊走能を検討したところ、通常の培養条件での実験と同様に、SphK1 KO細胞ではWT細胞と比較して遊走能の有意な上昇が認められ、SphK2 KO細胞ではWT細胞と比較して有意な遊走能の低下が認められた。SphK2が膵癌細胞において増殖や遊走を促進することを示唆する所見と考えられた。

続いて、膵癌細胞におけるS1P産生酵素の役割をin vivoで検討するため、マウスの腹腔内に膵癌細胞を注入することで腹膜播種モデルを作成し、その生存期間を比較した。SphK1 KO細胞移植マウスは、WT細胞移植マウスよりも生存期間が短く、SphK2 KO細胞移植マウスは、WT細胞移植マウスより生存期間が長かった。in vitroの実験と同様に膵癌の発育進展には、SphK2が重要な役割を有する可能性が考えられた。

S1Pは、癌細胞の増殖や遊走だけでなく、抗癌剤耐性に関与することも知られているため、抗癌剤 (ジェムシタピン) 存在下での膵癌細胞の生存能について検討を行ったところ、意外なことにSphK1 KO細胞はWT細胞と比較して生存能が有意に低下した。SphK2 KO細胞につい

でもこれまでの増殖能や遊走能の実験結果と異なり、生存能の有意な上昇が認められた。

SphK1は、抗癌剤耐性に関与している可能性が考えられた。

膵癌細胞におけるS1P産生酵素の様々な機能発現のメカニズムをさらに検討するため、S1P産生酵素が膵癌細胞の代謝動態の制御に関与し、その多彩な機能を発現するという仮説を立て、メタボローム解析を実施した。SphK1 KO細胞では、WT細胞と比較してアミノ酸合成やTCA回路の代謝産物の低下、ATP産生の低下が認められた。また抗酸化物質であるグルタチオンについては明らかな変化を認めないものの、酸化ストレスに対するGSHの代謝産物であるGSSGの低下が認められ、SphK1の膵癌細胞における代謝動態への影響や特殊な微小環境中の細胞生存や抗酸化能に対する関与が示唆された。

本研究によって、膵癌組織中にS1Pが高濃度で存在すること、SphK1とSphK2によって産生されるS1Pが膵癌細胞において異なる機能を有し、膵癌細胞の代謝動態に影響を及ぼしながら、増殖や遊走、薬剤耐性に関与する可能性が示唆された。今後はS1P産生酵素KOマウスと本研究で使用したS1P産生酵素KO膵癌細胞を用いて、宿主と癌細胞が産生するS1P産生酵素の相互作用と膵癌微小環境形成における意義について検証し、S1Pシグナルを標的とした膵癌治療の可能性を探る。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 K Yuza, M Nakajima, M Nagahashi, J Tsuchida, Y Hirose, K Miura, Y Tajima, M Abe, K Sakimura, K Takabe, T Wakai	4. 巻 232
2. 論文標題 Different Roles of Sphingosine Kinase 1 and 2 in Pancreatic Cancer Progression.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Surg Res	6. 最初と最後の頁 186-194
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jss.2018.06.019	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

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 中島 真人
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第118回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masato Nakajima
2. 発表標題 Sphingosine kinase type 1 and type 2 works differently in pancreatic cancer
3. 学会等名 13th Annual Academic Surgical Congress（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masato Nakajima
2. 発表標題 Sphingosine kinase type 1 and type 2 works differently in pancreatic cancer
3. 学会等名 13th Annual Academic Surgical Congress（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中島 真人
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第117回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中島 真人
2. 発表標題 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
3. 学会等名 日本外科代謝栄養学会第54回学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Masato Nakajima
2. 発表標題 Function Analysis of Sphingosine-1-Phosphate Produced by Sphingosine Kinases in Pancreatic Cancer Progression
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

悪性腫瘍におけるスフィンゴシン-1-リン酸の機能と臨床的意義に関する研究  
<https://www.med.niigata-u.ac.jp/contents/activity/research/rinsyou/geka01.html>

## 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	若井 俊文  (Wakai Toshifumi)  (50372470)	新潟大学・医歯学系・教授    (13101)	
研究分担者	坂田 純  (Sakata Jun)  (70447605)	新潟大学・医歯学系・講師    (13101)	
研究協力者	油座 築  (Yuza Kizuki)		
研究協力者	三浦 要平  (Miura Yohei)		