

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08672

研究課題名(和文)肝細胞癌の脈管侵襲における脂質メディエーター分子機構の解明と臨床的意義

研究課題名(英文)The role of lipid mediators for lymphovascular invasion in hepatocellular carcinoma and its clinical significance

研究代表者

廣瀬 雄己(Hirose, Yuki)

新潟大学・医歯学総合病院・特任助教

研究者番号：10737365

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：肝細胞癌では、周囲への脈管侵襲を伴う場合、予後不良である。我々は、脂質でありながらタンパク質のように情報伝達物質として働くスフィンゴシン-1-リン酸(S1P)に着目し、「癌細胞内で産生されたS1Pが血管・リンパ管新生形成を促進し、癌の浸潤・転移に寄与している」との仮説をたてて検証した。その結果、肝細胞癌組織内でのS1PおよびS1P産生タンパク質であるSphK1が、肝細胞癌の増殖・浸潤に寄与することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

S1Pは、脂質であることから、臨床検体における定量が困難なことが問題であった。我々は、手術検体などの組織中や血液中のS1Pの定量に成功し、S1Pと癌の病理所見や臨床像との関連を研究することを可能とした。今回、肝細胞癌において、S1Pが肝細胞癌の増殖・浸潤に寄与することが明らかになったことにより、肝細胞癌に対する新たな標的治療を開発する足掛かりを築いたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Lymphovascular invasion is a dismal prognostic factor in hepatocellular carcinoma (HCC). Focusing on the role of a lipid mediator "Sphingosine-1-phosphate (S1P)", we hypothesized that S1P produced by HCC promotes lymphangiogenesis, and then contributes cancer progression and metastasis. As a result, we revealed that S1P and S1P-producing protein "SphK1" was associated with cancer progression and invasion in HCC.

研究分野：消化器外科

キーワード：S1P 肝細胞癌 スフィンゴ脂質 SphK1 TCGA 免疫組織化学

## 1. 研究開始当初の背景

我々は、肝細胞癌において脈管侵襲が重要な予後規定因子であることを明らかにしてきた (Ann Surg Oncol 2007; Eur J Surg Oncol 2008)。脈管侵襲の機序解明は、肝細胞癌を制御するために必須である。脈管侵襲の病態メカニズムに関して、VEGF やさまざまなサイトカインの関与が明らかになり、これらを標的とした新規治療薬が臨床応用されてきた。しかし、肝細胞癌に対して有効性が証明された薬剤は未だ存在せず、肝細胞癌の脈管侵襲には未知の病態メカニズムがあるのではないかと推察される。

脂質メディエーターである S1P は、血管・リンパ管新生形成を促すこと、癌の浸潤・転移・薬剤耐性に関わることが報告されている。我々は、肝細胞癌患者の癌部・非癌部肝組織における S1P 濃度を測定したところ、癌部において有意に S1P 濃度が高値であるという興味深い結果を得た。S1P は脂質であるがゆえに臨床上、直接測定することが難しくこれまで研究が進んでこなかった背景があり、「未だ病態メカニズムが不明である肝細胞癌の脈管侵襲および薬剤耐性において、脂質メディエーターである S1P が重要な役割を果たしているのではないか」という着想に至った。我々は、「肝細胞癌の癌細胞内で産生された S1P が、癌周囲の微小環境における血管・リンパ管新生形成を促進し脈管侵襲を促すとともに、癌細胞自身の薬剤耐性に寄与している」との仮説を立て、本研究を立案した。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、「肝細胞癌の脈管侵襲における S1P と S1P 産生責任酵素 (SphK1) の分子機構を解明し、その臨床的意義を明らかにして、新たな治療法開発への研究基盤を確立すること」である。

## 3. 研究の方法

### 肝細胞癌外科切除標本における S1P の臨床的意義

肝細胞癌患者 20 例の癌部・非癌部組織を収集して凍結保存し、マス・スペクトロメトリー (Liquid chromatography–electrospray ionization–tandem mass spectrometry) を用いて同組織に含まれる脂質メディエーターの量を定量した。S1P を含めた脂質メディエーターのリピドミクス解析結果と、肝細胞癌患者の臨床病理学的因子との関連を解析し、肝細胞癌における S1P の臨床的意義を明らかにした。

また、肝細胞癌患者 61 例の癌部・非癌部組織を中性ホルマリンで固定し、パラフィン包埋し、薄切した組織に対して免疫組織化学を行った。S1P 産生タンパク質である SphK1 のリン酸化タンパク質 (pSphK1) に対する抗体 (phospho-specific SphK1 polyclonal antibody; 1 : 100 dilution; ECM Biosciences LLC, Versailles, KY, USA) を用いて、同組織を免疫組織化学で染色した。癌細胞内での染色強度を、inner control と比較して 0 (negative staining) 1 (weaker staining) 2 (equal staining) 3 (stronger staining) に分類し、0 と 1 を pSphK1 陰性、2 と 3 を pSphK1 陽性と判定した。肝細胞癌の臨床病理学的因子と

pSphK1 発現との関連を検証した。

### The Cancer Genome Atlas (TCGA) を用いた、肝細胞癌における S1P 関連タンパク質発現の臨床病理学的意義の検証

TCGA のデータベースから肝細胞癌患者データを抽出し、S1P 産生に関連するタンパク質の mRNA 発現を癌部・非癌部で比較検証し、癌の発育進展に寄与するタンパク質や、S1P 関連物質の発現経路を明らかにした。TCGA データは、cBioPortal (<http://www.cbioportal.org/>) および UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/>) からダウンロードした。

### SphK1 ノックアウト肝細胞癌細胞株を用いた細胞実験

HepG2 細胞の SphK1 KO 細胞 (CRISPR-CAS9) を作成した。その際、*SphK1* の exon4 に存在する配列 (GTT GGG TCA CTG GGA CGC CC -30 or 50 - TGC ATC TAC ACC TAC CCA AC) をガイド RNA に導入し、*SphK1* のノックアウトを行った。KO 細胞と wild type 細胞の細胞増殖能を比較するため、WST assay を用いて検証した。また、wound healing assay を用いて、両者の浸潤能を比較解析した。

## 4. 研究成果

まず、肝細胞癌の癌部・非癌部における S1P を含む脂質メディエーターの量を mass spectrometry にて解析した。その結果、スフィンゴ脂質に関しては、癌部において S1P、DHS1P およびその前駆物質である Sph、DHSph、セラミドはいずれも高発現していることが明らかになった。S1P に関連するこれらのスフィンゴ脂質は相互に複雑な産生経路を形成しているが、S1P に関連するこれらのスフィンゴ脂質が肝細胞癌の癌部で高発現している結果から、肝細胞癌において S1P およびその前駆物質が重要な働きを持つ可能性が示唆された。

次に、TCGA を用いて、肝細胞癌の癌部・非癌部における S1P 関連タンパク質の mRNA 発現量を解析した。その結果、S1P 産生に関わるタンパク質 (DEGS1, GBA, GBA2, SMPD2, SMPD4) の mRNA が癌部で有意に高発現していることが明らかになった。一方、S1P 産生に抑制的に働くタンパク質 (UGCG, SGM2) の mRNA は癌部で有意に低発現していた。この結果から、肝細胞癌の癌部において、S1P 産生酵素の高発現により S1P 産生が促進されていることが明らかになった。

続いて、肝細胞癌患者の肝細胞癌組織において、S1P 産生タンパク質である SphK1 のリン酸化タンパク (pSphK1) の発現を免疫組織化学で検証した。その結果、pSphK1 高発現群では低発現群に比べ、有意に腫瘍径が大きく、また、T 因子が高い傾向が認められた。in vitro では、肝細胞癌細胞を用いた細胞実験において、SphK1 をノックアウト細胞と wild type を比較検証したところ、ノックアウト細胞は Wild type に比べて増殖能、浸潤能が低下することが明らかになった。以上の結果から、S1P は肝細胞癌において高発現し、腫瘍の増殖・浸潤に関与することが示唆された。

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 0件）

1. 著者名 Miura Kohei, Nagahashi Masayuki, Prasoon Pankaj, Hirose Yuki, Kobayashi Takashi, Sakata Jun, Abe Manabu, Sakimura Kenji, Matsuda Yasunobu, Butash Ali L., Katsuta Eriko, Takabe Kazuaki, Wakai Toshifumi	4. 巻 51
2. 論文標題 Dysregulation of sphingolipid metabolic enzymes leads to high levels of sphingosine 1 phosphate and ceramide in human hepatocellular carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Hepatology Research	6. 最初と最後の頁 614 ~ 626
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/hepr.13625	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 永橋 昌幸, 廣瀬 雄己, 三浦 宏平, 油座 築, 相馬 大輝, 安藤 拓也, 峠 弘治, 石川 博輔, 堅田 朋大, 坂田 純, 小林 隆, 中島 真人, 羽入 隆晃, 市川 寛, 石川 卓, 島田 能史, 亀山 仁史, 高部 和明, 若井 俊文
2. 発表標題 肝細胞癌患者における脂質メディエーター・スフィンゴシン-1-リン酸及びセラミドの定量とその意義
3. 学会等名 日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2018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	中島 真人 (Nakajima Masato)  (60588250)	新潟大学・医歯学総合研究科・客員研究員  (13101)	

6. 研究組織（つづき）

	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	油座 築 (Yuza Kizuki)  (00745565)	新潟大学・医歯学総合病院・専任助教  (13101)	
研究分担者	三浦 宏平 (Miura Kohei)  (70733658)	新潟大学・医歯学系・助教  (13101)	
研究分担者	坂田 純 (Sakata Jun)  (70447605)	新潟大学・医歯学系・講師  (13101)	
研究分担者	小林 隆 (Kobayashi Takashi)  (40464010)	新潟大学・医歯学総合病院・講師  (13101)	
研究分担者	亀山 仁史 (Kameyama Hitoshi)  (40626420)	新潟大学・医歯学総合研究科・客員研究員  (13101)	
研究分担者	若井 俊文 (Wakai Toshifumi)  (50372470)	新潟大学・医歯学系・教授  (13101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------