

平成 21 年 5 月 8 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590205
 研究課題名（和文） S1P 合成・分解酵素トランスジェニックマウスを用いた癌転移・血管新生の研究
 研究課題名（英文） Tumor metastasis in S1P metabolic enzyme transgenic mice
 研究代表者
 杉本 直俊（SUGIMOTO NAOTOSHI）
 金沢大学・医学系・准教授
 研究者番号：80272954

研究成果の概要：

癌自然転移モデルでの内因性脂質メディエータースフィンゴシン-1-リン酸（S1P）レベルの高低が及ぼす癌増殖・転移、そして血管新生への影響を検討した。S1P レベルが高いと、癌増殖能・血管新生能が昂進しており、低いと抑制していることが示された。転移においては、明らかな相違は認められなかった。以上から、内因性 S1P レベルの高低が癌増殖・血管新生・血管成熟への影響へ与えることが示された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：細胞分子生理学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：分子・細胞生理学、がん、転移、血管新生

1. 研究開始当初の背景

脂質メディエータースフィンゴシン-1-リン酸（S1P）は、細胞の運動制御、細胞骨格制御、形態変化、増殖など多彩な生理活性を示す。S1P はスフィンゴシンキナーゼ（SphK）によりスフィンゴシンがリン酸化されることによって、S1P リアーゼ（SPL）によりホスフォエタノールアミンとパルミトイルアルデヒドに加水分解される。SphK 活性は成長因子、サイトカインやケモカインで活性化されるため、炎症などの局所で S1P 産生が亢進し

ていると考えられている。一方、SPL 活性の制御はほとんどわかっていない。体液中の S1P は細胞内で生成された S1P が細胞外に放出されたものであり、体液中の S1P 濃度は SphK、SPL 両酵素により調節されていると言える。S1P は主として細胞表面受容体への結合を介して作用すると考えられている。

私達の S1P 受容体群の機能解析の過程で、S1P 受容体のうち S1P₁ と S1P₃ はともに細胞運動の分子スイッチと考えられる低分子量 G 蛋白質 Rac の活性を促進し、化学遊走を誘導するのに対し、S1P₂ 受容体は逆に Rac 活性

を抑制し、その結果細胞運動を抑制することを世界に先駆けて発表した (Okamoto H. et al. Mol Cell Biol. 2000)。S1P₂受容体を発現する血管平滑筋細胞 (Ryu Y. et al. Cir. Res., 2002) や CHO 細胞において S1P₂受容体による Rac、細胞運動の抑制作用を報告した。さらに、細胞遊走の抑制性制御の分子基盤として S1P₂受容体による Rac の抑制には Rho の活性化が必須であり、その上流には三量体 G 蛋白質 G₁₂ 及び G₁₃ が介在していることを証明した (Sugimoto N. et al. Mol. Cell. Biol. 2003)。この発見は細胞運動制御の分子機構解明の研究全般に大きなインパクトを与え、Science 誌 On Line 版の Signal Transduction Knowledge Environment (STKE) で紹介された。メラノーマ細胞等のある種の癌細胞においては、S1P₂受容体は Rac 抑制を介して、遊走・浸潤を強く抑制すること、一方、S1P₁受容体は逆に遊走・浸潤を亢進させることを見いだした (Arikawa K. et al. J Biol Chem. 2003)。私達は、さらに、マウス尾静注後の癌肺転移モデルにおいて、S1P が S1P₂受容体を介してメラノーマ細胞の血行転移を抑制すること、逆に S1P₁受容体を介して血行転移を促進することを示した (Yamaguchi H., et al. Biochem. J. 2003)。しかし、一方で、S1P は血管内皮細胞に存在する S1P 受容体への作用を介して、白血球の血管内皮接着に影響することが最近国外のグループにより報告されており、S1P の癌転移修飾作用において宿主側の S1P 受容体の関与も考慮する必要があると、私達は考えている。癌組織では癌細胞の産生した TNF α や VEGF をはじめとするサイトカイン・増殖因子の作用により、マクロファージや T リンパ球等の免疫担当・炎症細胞の浸潤が通常みられる。これらの浸潤細胞はさらに TNF α 等のサイトカインを産生すると考えられ、局所で産生されたこれらの生理活性物質は腫瘍組織内の癌細胞や血管細胞等の SphK 活性を亢進させていると考えられる。腫瘍組織内の S1P 産生の亢進は、腫瘍血管新生・癌細胞の増殖・浸潤能、及び転移に影響を及ぼすことにより、癌の進展に大きく関わっていると推測された。

2. 研究の目的

本研究では、私達の作成した SphK トランスジェニック (-Tg) マウス及び SPL-Tg マウスを用いて、生体における内因性 S1P 産生の高低が癌の進展・血管新生に及ぼす影響を解明した。

3. 研究の方法

I、癌自然転移モデルでの内因性 S1P レベルの高低が及ぼす癌転移への影響 癌の増殖・浸潤、転移の検討

S1P 産生酵素 (SphK)、S1P 分解酵素 (SPL) のトランスジェニックマウス及び同腹野生型マウスの足底あるいは側腹部に B16 メラノーマ細胞やルイス肺癌細胞を接種する。癌組織の増殖を体表からその大きさを計測することで経時的に観察する。癌細胞接種後 28 日目に、多量の麻酔薬にて安楽死させ、肺、リンパ節や他の臓器への転移を観察する。

II、癌自然転移モデルでの内因性 S1P レベルの高低が及ぼす癌血管新生への影響

(1)血管新生、血管成熟等の免疫組織化学的検討

SphK-Tg マウスと SPL-Tg マウス及び同腹野生型マウスに移植した癌細胞を接種後 28 日目に摘出して、凍結切片を作成する。各種特異的抗体を用いて免疫組織化学染色をおこない、血管新生および血管成熟を評価する。

血管新生の評価のために、抗 CD31 抗体や抗フォンビルブランド抗体により血管内皮細胞を標識し、光学及び蛍光顕微鏡下で単位面積あたりの陽性細胞数や血管腔面積を検討する。

血管成熟の評価のために、抗 α 平滑筋アクチン抗体により血管平滑筋を標識し、抗 NG2 抗体により周皮細胞を標識し、光学及び蛍光顕微鏡下で単位面積あたりの陽性細胞数や陽性細胞で覆われた血管数及び面積を検討する。

さらに、抗 caspase-3 抗体によりアポトーシス陽性の細胞や癌組織内でのその分布を、抗 Ki-67 抗体により増殖中の細胞やがん組織内でのその分布を評価する。また、抗 CD4、CD8、CD34 抗体により血球由来細胞を、抗 Mac-1 抗体によりモノサイト・マクロファージを標識して、免疫・炎症性細胞侵入の程度等を評価する。

(2)血管透過性の検討

SphK-Tg および SphL-Tg マウス及び同腹野生型マウスの側腹部に癌細胞を接種し、接種後 21 日目に、麻酔下にて、尾静脈から色素 (エバンスブルー等) を注入する。注入 30 分後、癌組織から漏出した色素を可視的およびホルムアミド抽出により評価する。血管成熟が進行するにつれて、色素漏出量が減少する。

以上の検討から、内因性 S1P レベルの癌の進展への影響を明らかにした。

4. 研究成果

移植後 7-10 日間で、SphK-Tg マウスで、増殖がコントロールと比べ腫瘍増殖が早く、SPL-Tg マウスではコントロールと比べ腫瘍増殖が遅い傾向があった。移植腫瘍の浸潤・転移については、各群間で、有意な違いは認められなかった。今後、飼育期間を延長して観察する必要があると思われる。

SphK-Tg マウスと SPL-Tg マウス及び同腹野生型マウスに移植した癌細胞を接種後 28 日目に摘出して、凍結切片を作成して、各種特異的抗体を用いて免疫組織化学染色をおこない、さらに、マウスの側腹部に癌細胞を接種し、接種後 21 日目に、麻酔下にて、尾静脈から色素（エバンスブルー等）を注入する血管透過性試験をおこない、血管新生および血管成熟を評価した。SPL-Tg マウスでは、血管新生および血管成熟が抑制もしくは抑制傾向にあること、一方、SphK-Tg マウスでは、血管新生および血管成熟が亢進もしくは亢進傾向にあることが判明した。

以上から、内因性 S1P レベルの高低が癌増殖・血管新生・血管成熟への影響へ与えることが示された。

今後、外部から S1P 濃度を制御することで、癌への新しい治療ストラテジーを確立していきたい。

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 6 件)

①Oyama O., Sugimoto N. (7 名中②番目), The lysophospholipid mediator sphingosine-1-phosphate promotes angiogenesis in vivo in ischaemic hindlimbs of mice. **Cardiovasc. Res.** 78: 301-307, 2008. 査読有。

②Takashima S, Sugimoto N (10 名中②番目), G_{12/13} and Gq mediate S1P2-induced inhibition of Rac and migration in vascular smooth muscle in a manner dependent on Rho but not Rho kinase. **Cardiovasc. Res.** 79: 689-697, 2008. 査読

有。

③Yoshioka K., Sugimoto N. (4 名中②番目) Essential role for class II phosphoinositide 3-kinase alpha-isoform in Ca²⁺-induced, Rho- and Rho kinase-dependent regulation of myosin phosphatase and contraction in isolated vascular smooth muscle cells. **Mol. Pharmacol.** 71: 912-920, 2007. 査読有。

④Azam M.A., Sugimoto N. (7 名中⑤番目), Ca²⁺-independent, inhibitory effects of cyclic adenosine 5'-monophosphate on Ca²⁺ regulation of phosphoinositide 3-kinase C2alpha, Rho, and myosin phosphatase in vascular smooth muscle. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 320: 907-916, 2007. 査読有。

⑤Sakamoto T., Sugimoto N. (13 名中⑨番目), RhoA-dependent PAI-1 gene expression induced in endothelial cells by monocyte adhesion mediates geranylgeranyl transferase I and Ca²⁺ signaling. **Atheroscler.** 193: 44-54, 2007. 査読有。

⑥杉本直俊、多久和典子、多久和陽、S1P の生成・受容体・生理的機能、**細胞工学**、26: 1260-1263, 2007. 査読無。

[学会発表] (計 6 件)

①杉本直俊、FOK ラットにおける急性期熱負荷時の体温調節反応「高温耐性 FOK ラットシンポジウム 2008」(招待講演)、2008. 9. 13、名古屋。

②吉田優也、杉本直俊 (9 名中⑥番目)、神経膠芽腫の予後規定因子、細胞増殖規定因子としてのスフィンゴシン 1-リン酸受容体の解析、第 3 回スフィンゴテラピー研究会、2008. 7. 18、鳥取・大仙。

③Qi X., Sugimoto N. (6 名中②番目)、Sustained delivery of sphingosin-1-phosphate by using PLGA microparticles stimulates post-ischemic angiogenesis、第 85 回日本生理学会、2008. 3. 26、大阪。

④杉本直俊 (5 名中①番目)、S1P 受容体 S1P2 による低分子量 G 蛋白質 Rac 抑制のメカニズム、第 30 回日本分子生物学年会、2007. 12. 11、横浜。

⑤杉本直俊 (3 名中①番目)、S1P2 受容体の

細胞遊走抑制作用を仲介する Rho エフェクターの検討、第 49 回日本脂質生化学会、2007. 6. 5、札幌.

⑥杉本直俊 (3 名中①番目)、S1P2 受容体の細胞遊走抑制作用を仲介する Rho エフェクターの検討、第 2 回スフィンゴセラピー研究会、2007. 5. 18、鳥取・大仙.

[その他]

ホームページアドレス

www.med.nagoya-cu.ac.jp/animal.dir/animalweb/fok/DrSugimoto.pdf

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉本 直俊 (SUGIMOTO NAOTOSHI)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：80272954

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし