

令和 4 年 5 月 8 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03714

研究課題名(和文) 乳癌免疫微小環境における脂質メディエーター分子の役割解明と治療応用を目指した研究

研究課題名(英文) The role of lipid mediator in the tumor immune microenvironment of breast cancer and its therapeutic application

研究代表者

永橋 昌幸 (Nagahashi, Masayuki)

兵庫医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30743918

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：我々は乳癌患者の腫瘍免疫微小環境において脂質メディエーター・スフィンゴシン-1-リン酸(S1P)が重要な役割を担っていると仮説を立て、本研究を企画した。本研究の目的は、腫瘍免疫微小環境におけるS1Pの役割を解明し、その臨床的意義を明らかにして治療応用のための研究基盤を築くことである。動物実験ではS1Pが供給されない腫瘍微小環境では癌の発育が困難であることが示され、腫瘍微小環境におけるS1Pの重要性が示唆された。手術検体の免疫組織化学やトランスクリプトームデータのバイオインフォマティクス解析の結果、腫瘍微小環境においてS1Pは抗腫瘍免疫及び免疫逃避機構と関連していることが明らかとなった。

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は、蛋白ではなく脂質分子であるS1Pの腫瘍免疫微小環境における働きを解析し、癌と宿主とが産生するS1Pが腫瘍形成において必須の役割を担っていることと、腫瘍免疫微小環境において、抗腫瘍免疫と免疫逃避機構とに関連していることを明らかにしたことである。社会的意義として、本研究の成果を基盤として、今後、免疫療法をはじめとした乳癌の新しい治療法開発につながり、ひいては乳癌治療成績の向上につながっていくことが期待されることである。

研究成果の概要(英文)：We hypothesized that a lipid mediator, sphingosine-1-phosphate (S1P), plays an important role in the tumor immune microenvironment of breast cancer patients, and planned this study. The aim of this study is to elucidate the role of S1P in the tumor immune microenvironment, clarify its clinical significance, and establish a research base for its therapeutic application. Animal studies showed that cancer development is difficult in tumor microenvironments to which S1P is not supplied, suggesting that the importance of S1P in tumor microenvironments. Immunohistochemistry of surgical specimens and bioinformatics analysis of transcriptome data revealed that S1P is associated with antitumor immunity and escape mechanisms of the immune system in the tumor microenvironment.

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

1. 研究開始当初の背景

日本では乳癌治療の進歩にもかかわらず乳癌死亡数は年々増加し続けており、日本人の乳癌に特異的な治療開発が必須である。乳癌は比較的早期からミクロ病変を伴う全身病を来していると考えられており、このような乳癌の根治には主病巣の外科治療に加え、切除範囲外や遠隔臓器に存在するミクロ病変を根絶することが必要である。癌の転移は、癌細胞自体の能力と、癌を取り巻く微小環境との相互作用によって成立する。近年、腫瘍免疫の重要性が大きく注目されているが、癌の転移・再発抑制には「微小環境において如何に腫瘍免疫を制御し、ミクロ病変を根絶できるか」が1つの鍵と考えられる。腫瘍免疫微小環境の調節因子としてサイトカインやケモカインが知られるが、新たな調節因子として脂質メディエーター分子が注目されている。

脂質メディエーター・スフィンゴシン-1-リン酸 (sphingosine-1-phosphate; S1P) は、脂質でありながらタンパク質と同じように情報伝達物質として働く脂質メディエーターであり、細胞の増殖、遊走等の細胞機能を調節する。S1Pは細胞内で2つの異なるS1P産生酵素(SphK1とSphK2)によって産生される。SphK1とSphK2とでは細胞内での局在が異なり、産生されるS1Pも各々局在の違いから異なる作用を示す。SphK1は細胞質内に存在し、産生されたS1PはSpns2等の輸送体によって細胞外に放出され、細胞表面のS1P受容体を活性化し、細胞の増殖や生存に寄与する。SphK2は核に存在し、産生されたS1Pは遺伝子の転写調節等に関わる。我々はこれまでに、癌ではSphK1が高発現し、S1Pが癌のリンパ行性転移を促進すること、炎症性腸疾患に伴う大腸癌において、SphK1とS1Pが炎症を増幅し炎症性発癌を促進すること、肥満状態ではSphK1によって産生されたS1Pが炎症細胞の動員と炎症性サイトカインの産生を促進し乳癌を悪化させることを発見した。これらの知見から、癌が産生したS1Pが腫瘍微小環境中の免疫細胞に作用し癌の発育や転移を促進している可能性があるという発想に至った。

腫瘍免疫微小環境においては、癌を抑制する免疫細胞と、癌に対する免疫を抑制し癌の進展を促進する免疫細胞とが存在する。S1Pは腫瘍免疫微小環境において、癌細胞を制御するこれらの免疫細胞に影響を及ぼしている可能性が示唆された。申請者は「乳癌においてS1Pが免疫細胞に作用することで腫瘍免疫微小環境の形成に寄与し、癌の発育、転移や薬物治療効果に影響を及ぼす」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、腫瘍免疫微小環境におけるS1Pの役割を解明し、その臨床的意義を明らかにして治療応用のための研究基盤を築くことである。

3. 研究の方法

(1) S1Pによる腫瘍免疫微小環境制御機構の解明とS1P標的治療の可能性の検討

S1P産生酵素ノックアウト(KO)マウスを用いた癌移植モデルによる腫瘍免疫微小環境の解析として、CRISPR/Cas9遺伝子編集技術を用いて作製したSphK1KO乳癌細胞株及びSphK1KOマウスを用いて癌移植実験を行い、癌の発育進展と微小環境を解析した。

乳癌細胞株E0771、MDA-MB-231に対してS1P情報伝達経路に対する特異的阻害薬であるFTY720を用いて、S1P標的治療の可能性を検討した。WST-8アッセイにより細胞増殖能を評価し、IC₅₀を算出した。

(2) 乳癌患者におけるS1Pと腫瘍免疫微小環境との関連性とその臨床的意義

乳癌患者におけるS1Pと腫瘍免疫微小環境との関連性を検討するため、外科手術検体を用い、質量分析装置によりスフィンゴリン脂質の網羅的リポミクス解析とゲノム解析、トランスクリプトーム解析を行った。免疫組織化学を用いてリン酸化SphK1の発現を評価し、TIL、TAM、Treg等の腫瘍関連免疫細胞について評価した。得られたデータを比較解析し、S1Pを含めた脂質メディエーターと腫瘍微小環境との関連性と、その臨床的意義について検討した。

(3) バイオインフォマティクスによるS1Pと腫瘍免疫微小環境との関連性の検証

公的データベースを用いたバイオインフォマティクス解析として、The Cancer Genome Atlas (TCGA)を基盤とした公的データベースを用いてバイオインフォマティクス解析を行い、乳癌におけるS1P情報伝達系と腫瘍免疫微小環境との関連性を検証した。

4. 研究成果

(1) S1Pによる腫瘍免疫微小環境制御機構の解明とS1P標的治療の可能性の検討

S1Pによる腫瘍免疫微小環境制御機構とS1P標的治療の可能性を検討するため、S1P産生酵素ノックアウト(KO)マウスを用いた癌移植モデルを作製した。CRISPR/Cas9遺伝子編集技術を用

用いて作製した SphK1KO E0771 乳癌細胞株及び SphK1KO マウスを用いて癌移植実験を行った。E0771 細胞株は C57BL/6 系統マウスから作成された乳癌細胞株であり、これを C57BL/6 マウスに移植することで拒絶反応を回避でき、免疫微小環境の解析が可能となった。SphK1KO 細胞を WT マウスに移植すると、WT 細胞を WT マウスに移植した場合と比較して腫瘍体積が有意に低下した。さらに SphK1KO 細胞を SphK1KO マウスに移植すると腫瘍が形成されず、腫瘍微小環境において、腫瘍からも宿主からも S1P が供給されない場合に腫瘍形成が著しく阻害されることが示唆された。さらに癌細胞と宿主の産生する S1P が、TIL、腫瘍関連マクロファージ (TAM)、Treg に与える影響について解析を行っている。

細胞外へ放出される S1P は主として SphK1 によって産生されることから、癌微小環境では SphK1 が産生する S1P が重要であると考え、上記実験では SphK1KO マウスを用いたが、宿主の SphK2 によって産生された S1P の影響は不明である。SphK1 と SphK2 のダブル KO は胎生致死となるため、本研究課題では標的臓器においてのみ SphK1 及び SphK2 を KO する条件的ダブル KO の作製に着手し、SphK1 及び SphK2 の Cre マウスを樹立した。現在、Cre-loxP システムを用いて乳房における条件的ダブル KO マウスを作製中である。

乳癌細胞株 E0771、MDA-MB-231 に対して S1P 情報伝達経路に対する特異的阻害薬である FTY720 を用いて、S1P 標的治療の可能性を検討した。WST8 アッセイでは、いずれの細胞株も 5~10 μ M の FTY720 によって増殖が抑制された。現在、乳癌患者から採取した癌組織を用いて細胞外マトリックス内でオルガノイドを作製し、S1P 標的治療の効果を検討中である。今後はさらに既存の抗癌薬物療法や分子標的薬、免疫チェックポイント阻害薬との組み合わせによる相乗効果についても検討を行う。

(2) 乳癌患者における S1P と腫瘍免疫微小環境との関連性とその臨床的意義

乳癌患者における S1P と腫瘍免疫微小環境との関連性について、外科手術検体を用い、質量分析装置によりスフィンゴリン脂質の網羅的リピドミクス解析とゲノム解析を行った。リピドミクス解析では乳癌患者の腫瘍組織では、正常組織や境界部と比較して、S1P の濃度が有意に高値であることを確認した。免疫組織化学を用いてリン酸化 SphK1 の発現を評価し、腫瘍関連免疫細胞について評価した。腫瘍における S1P が高濃度の乳癌では、pSphK1 の発現が高く、CD4 や CD8 などの T 細胞や CD68 や CD163 などの単球系のマーカーの発現が高まっており、S1P と腫瘍免疫との関連が示唆された。乳癌患者血漿検体のリピドミクス解析では、乳癌患者の血漿中 S1P 濃度が乳癌の進行度やホルモン感受性と関連することを見出した。乳癌患者の腫瘍検体のゲノム解析では、乳癌の悪性度に関わる遺伝子変化を見出し、トランスクリプトーム解析を追加し、S1P との関連についてさらに検討を行っている。

(3) バイオインフォマティクスによる S1P と腫瘍免疫微小環境との関連性の検証

The Cancer Genome Atlas (TCGA) を基盤とした公的データベースを用いてバイオインフォマティクス解析を行い、腫瘍免疫微小環境について、免疫関連の分子について解析を行った。SphK1 を高発現している乳癌では、CD4 や CD8 などの抗腫瘍免疫に関わる T 細胞マーカーや、CD68 や CD163 をはじめとした腫瘍関連マクロファージのマーカーが高値を示した。さらに TNF や IL-6、TGF- β などの腫瘍免疫に関わるサイトカインの発現が高値を示し、PD-1 や PD-L1、CTLA4 の発現も有意に高くなっており、S1P 産生の高い腫瘍では免疫逃避機構の働きも強くなっていることが示唆された。以上より、S1P は抗腫瘍免疫に影響を及ぼしており、高 S1P 状態の腫瘍免疫微小環境では、腫瘍と免疫が拮抗状態にあることが推察された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Tsuchida J, Nagahashi M, Nakajima M, Katsuta E, Rashid OM, Qi Q, Yan L, Okuda S, Takabe K, Wakai T	4. 巻 256
2. 論文標題 Sphingosine kinase 1 is associated with immune cell-related gene expressions in human breast cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Surg Res	6. 最初と最後の頁 645-656
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jss.2020.06.057.	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
1. 著者名 Oshi M, Newman S, Tokumaru Y, Yan L, Matsuyama R, Endo I, Nagahashi M, Takabe K	4. 巻 21
2. 論文標題 Intra-tumoral angiogenesis is associated with inflammation, immune reaction and metastatic recurrence in breast cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 6708
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21186708.	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
1. 著者名 Oshi M, Satyananda V, Angarita FA, Kim TH, Tokumaru Y, Yan L, Matsuyama R, Endo I, Nagahashi M, Takabe K.	4. 巻 11
2. 論文標題 Angiogenesis is associated with an attenuated tumor microenvironment, aggressive biology, and worse survival in gastric cancer patients	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Am J Cancer Res	6. 最初と最後の頁 1659-1671
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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
1. 著者名 Ikarashi M, Tsuchida J, Nagahashi M, Takeuchi S, Moro K, Toshikawa C, Abe S, Ichikawa H, Shimada Y, Sakata J, Koyama Y, Sato N, Hait NC, Ling Y, Okuda S, Takabe K, Wakai T.	4. 巻 22
2. 論文標題 Plasma Sphingosine-1-Phosphate Levels Are Associated with Progression of Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 13367-13367
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms222413367	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

1. 著者名 Tokumaru Y, Oshi M, Murthy V, Tian W, Yan L, Angarita FA, Nagahashi M, Matsuhashi N, Futamura M, Yoshida K, Miyoshi Y, Takabe K.	4. 巻 11
2. 論文標題 Low intratumoral genetic neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR) is associated with favorable tumor immune microenvironment and with survival in triple negative breast cancer (TNBC)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Am J Cancer Res	6. 最初と最後の頁 5743-5755
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 永橋 昌幸, 土田 純子, 諸 和樹, 長谷川 逢, 小幡 泰生, 遠藤 麻巳子, 利川 千絵, 五十嵐 麻由子, 小山 諭, 高部 和明, 若井 俊文
2. 発表標題 肥満状態下の乳癌転移におけるスフィンゴシン-1-リン酸の役割
3. 学会等名 第29回日本乳癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 永橋 昌幸, 土田 純子, 油座 築, 諸 和樹, 根本 万里子, 廣瀬 雄己, 利川 千絵, 五十嵐 麻由子, 三浦 宏平, 市川 寛, 羽入 隆晃, 滝沢 一泰, 中島 真人, 島田 能史, 小林 隆, 坂田 純, 石川 卓, 亀山 仁史, 若井 俊文
2. 発表標題 慢性炎症による癌の増殖・転移を促進する脂質メディエーター分子機構
3. 学会等名 第120回日本外科学会定期学術集会
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

〔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	奥田 修二郎 (Okuda Shujiro) (00512310)	新潟大学・医歯学系・准教授 (13101)	
研究分担者	阿部 学 (Abe Manabu) (10334674)	新潟大学・脳研究所・准教授 (13101)	
研究分担者	諸 和樹 (Moro Kazuki) (10745566)	新潟大学・医歯学総合病院・専任助教 (13101)	
研究分担者	崎村 建司 (Sakimura Kenji) (40162325)	新潟大学・脳研究所・フェロー (13101)	
研究分担者	三好 康雄 (Miyoshi Yasuo) (50283784)	兵庫医科大学・医学部・教授 (34519)	
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	土田 純子 (Tsuchida Junko) (90769415)	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	五十嵐 道弘 (Ikarashi Michihiro) (50193173)	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