

令和 3 年 4 月 29 日現在

機関番号：33303

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18226

研究課題名（和文）スフィンゴリン脂質およびMMPを介する肺癌の治療抵抗性のメカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of treatment resistance of lung cancer mediated by sphingolipids and MMP

研究代表者

本野 望（MOTONO, Nozomu）

金沢医科大学・医学部・講師

研究者番号：30634901

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：肺腺癌において抗酸化酵素であるPRDX4の発現低下と細胞増殖の指標あるMIB-1陽性例で予後が不良で、PRDX4の発現低下は上皮成長因子受容体であるEGFR野生型に多かった。また、PRDX4を過剰発現させると、肺腺癌の増殖が抑制されたことから、肺腺癌においてPRDX4が予後に影響を及ぼす因子である事が判明した。さらに、核内蛋白であるTSHZ2を過剰発現させることで細胞増殖の抑制、アポトーシスが誘導されることを確認した。また、スフィンゴリン脂質の一種であるSPHK1は肺腺癌浸潤部のfibroblastで、SPHK1の染色濃度と増殖能の指標のKi-67との間に正の相関を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

予後不良を引き起こす因子が癌幹細胞の活性化に関するとの仮説を立てて、肺癌の多くを占める肺腺癌を標的とし、癌の浸潤・増殖および予後に影響を及ぼす因子を解析した。PRDX4やTSHZ2の発現低下による増殖能の活性化、SPHK1が肺癌の浸潤部のfibroblastで高発現することで増殖能が活性化することが確認された。また、SPHK1高発現例は予後不良となる傾向も認めた。今後、これらの因子が肺癌の癌幹細胞の活性化に寄与するかを検証・解明し創薬につなげることができれば、治療抵抗性の肺癌の治療成績を劇的に向上させる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In lung adenocarcinoma, the prognosis was poor in MIB-1 positive cases with decreased expression of the antioxidant enzyme PRDX4 and an index of cell proliferation, and decreased expression of PRDX4 was more common in the EGFR wild-type, which is the epidermal growth factor receptor. In addition, overexpression of PRDX4 suppressed the growth of lung adenocarcinoma, indicating that PRDX4 is a factor affecting prognosis in lung adenocarcinoma. Furthermore, it was confirmed that overexpression of TSHZ2, a nuclear protein, suppresses cell proliferation and induces apoptosis. In addition, SPHK1, which is a type of sphingosine lipid, showed a positive correlation between the staining concentration of SPHK1 and Ki-67, which is an index of proliferative ability, in fibroblast of the infiltrated part of lung adenocarcinoma.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：肺癌 幹細胞 スフィンゴリン脂質 PRDX4 TSHZ2

1. 研究開始当初の背景

肺癌は世界において癌死の首座を占める臨床上の最重要疾患であり、今後も増加が予想されている。癌細胞の特徴は無限の増殖と浸潤・転移能である。増殖性に対する制御に関して、抗癌剤に加え、近年では driving mutation や angiogenesis に着目した分子標的治療の開発が精力的に展開されている。また、免疫療法の進歩も著しく、肺癌の治療成績は向上している。しかしながら、治療効果はある一定期間に限定され、効果を占めず群も限定されているのが現状である。原因として、治療抵抗性の癌幹細胞による自己複製能・多分化能と、それに伴う癌組織の不均一性が考えられる。また、浸潤・転移は複数のステップから構成される複雑な現象であり、癌の増殖抑制における driving mutation のようにピンポイントで制御可能な点がこれまで明らかでなかったためと考えられる。複数の異なるパスウェイの統合に関わる細胞膜構成成分であるスフィンゴリン脂質の細胞膜での再配分・細胞骨格再構成や、serpin や MMP による癌の移動・浸潤能亢進が治療抵抗性を生じ、さらにそれらの因子が肺癌幹細胞の活性化および増殖を促進するのでは？という仮説に至り、新たな転移制御法確立に向け、その検証が必要となった。

2. 研究の目的

肺癌浸潤部におけるスフィンゴリン脂質系物質やその他の因子の作用機序および癌幹細胞化への関与を探求するのが目的である。スフィンゴリン脂質系や MMP を標的とした機能分子の不活化により、癌浸潤抑制および癌幹細胞の不活化という新たな観点から、これまででない肺癌治療が確立できることが期待される。

スフィンゴリン脂質やその他の因子を介する肺癌の浸潤・転移能の獲得、さらに幹細胞化の機序を解明することはこれまでの肺癌研究での報告はなく独創的であり、治療抵抗性の肺癌の治療成績を劇的に向上させる可能性がある。特に、SphK1, sphingosin-1-phosphate receptor (S1PR) や細胞内シグナル伝達経路に対する阻害薬は既に開発が進み商業ベースで入手可能であり、研究結果のヒトへの迅速なトランスレーションが期待できる。また、肺癌幹細胞における知見は、多臓器のがんに対する制御法の確立への応用へと発展することが期待される。

3. 研究の方法

(1) 非小細胞肺癌におけるスフィンゴシンキナーゼ 1 (SPHK1) の発現と上皮間葉転換・増殖能との関連の評価

手術で切除された非小細胞肺癌のパラフィン包埋切片を用いて SPHK1 および上皮間葉転換のマーカである E-cadherin, Vimentin, 増殖能のマーカである Ki-67 の免疫染色を行った。免疫染色の染色強度を染色細胞の割合 (0 = 陽性細胞なし, 1 = 陽性細胞 < 10%, 2 = 10 ~ 50% 陽性細胞 < 50%, 3 = 陽性細胞 ≥ 50%) × 染色濃度 (0 = 染色なし, 1 = 弱く染まる・淡黄色, 2 = 中等度に

染まる・黄褐色，3=強く染まる・茶褐色)でスコア化した。

(2) ウエスタンブロット法による肺癌での SPHK1 発現の評価

凍結保存されている非小細胞肺癌の検体を用いてウエスタンブロット法により SPHK1 の発現の有無を評価した。

(3) SPHK1 発現と予後との関係の評価

Kaplan-Meier 法による生存解析を用いて，SPHK1 発現と予後の関係を比較した。

(4) 肺腺癌での抗酸化酵素 (PRDX4) の発現と予後との関連の評価

病理病期 I 期の肺腺癌のパラフィン包埋切片を用いて PRDX4 の発現と予後の関係を評価した。

(5) 肺腺癌での核内蛋白 (TSHZ2) の発現と予後との関連の評価

肺腺癌細胞株 (A549, H1573, PC9) を用いてウエスタンブロット法により TSHZ2 の発現を評価し，肺腺癌のパラフィン包埋切片を用いて TSHZ2 の発現と予後との関係を評価した。

4. 研究成果

(1) 非小細胞肺癌におけるスフィンゴシンキナーゼ 1 (SPHK1) の発現と上皮間葉転換・増殖能との関連の評価

53 例の非小細胞肺癌の検体を用いて解析を行った。対象症例の患者背景は表 1 のごとくであった。腫瘍周囲の fibroblast も SPHK1 に染まるため、スコア化した。SPHK1 のスコアは腺癌と扁平上皮癌で有意差を認めなかったが，fibroblast での SPHK1 スコア，vimentin スコア，Ki-67 の発現は扁平上皮癌で有意に高値であった (表 2)。SPHK1 のスコアと他のマーカーとの相関関係を評価したところ 腺癌では腫瘍と fibroblast の SPHK1 スコアと Ki-67 が正の相関を認めた (表 3)。一方，扁平上皮癌では SPHK1 はどのマーカーとも相関関係を認めなかった (表 4)。この点から，腺癌では SPHK1 の発現が腫瘍の増殖能に影響する可能性が示唆されたが，扁平上皮癌においては SPHK1 の発現が上皮間葉転換や増殖能に影響を及ぼさないと考えられた。

表 1 患者背景

性別 (男性/女性)	30/23
年齢 (歳)	71.3 (43-83)
喫煙指数	380 (0-2700)
CEA (ng/ml)	3.5 (1-148.2)
組織型 (腺癌/扁平上皮癌)	37/16
病理病期 (IA/IB/IIA/IIB/IIIA)	21/20/6/3/3
リンパ管侵襲 (0/1)	25/28
脈管侵襲 (0/1)	23/30
分化度 (1/2/3)	10/35/8
SPHK1スコア (2/4/6/9)	5/10/25/13
Fibroblastスコア (0/1/2/4/6/9)	1/1/4/19/18/10
Vimentinスコア (0/2/4/6/9)	20/6/3/11/10/3
E-Cadherinスコア (1/2/4/6/9)	1/15/25/8/4
Ki-67発現 (%)	2.9 (0.2-54)

表 2 組織型別患者背景

	腺癌 (n=37)	扁平上皮癌 (n=16)	P値
性別 (男性/女性)	14/23	15/1	<0.01
年齢 (歳)	71.9 (43-83)	71.3 (53-83)	0.83
喫煙指数	0 (0-2700)	1030 (0-2000)	<0.01
CEA (ng/ml)	3.4 (1.1-148.2)	3.7 (1-18.4)	0.93
病理病期 (IA/IB/IIA/IIB/IIIA)	14/16/3/1/3	7/4/3/2/0	0.25
リンパ管侵襲 (0/1)	15/22	10/6	0.14
脈管侵襲 (0/1)	16/21	7/9	0.97
分化度 (1/2/3)	10/23/4	0/12/4	0.04
SPHK1スコア (2/4/6/9)	2/9/17/9	3/1/8/4	0.25
Fibroblastスコア (0/1/2/4/6/9)	1/1/4/19/9/3	0/0/0/0/9/7	<0.01
Vimentinスコア (0/2/4/6/9)	18/4/6/8/1	2/2/3/5/2/2	0.01
E-Cadherinスコア (1/2/4/6/9)	1/5/20/8/3	0/10/5/0/1	<0.01
Ki-67発現 (%)	2.2 (0.2-22.6)	19.4 (9-54)	<0.01

表 3 腺癌患者での免疫染色スコアの相関関係

免疫染色	相関係数	P値	
SPHK1			
Fibroblast	0.302	0.06	
Vimentin	0.187	0.26	
E-Cadherin	0.080	0.63	
Ki-67	0.366	0.02	
Fibroblast	Ki-67	0.350	0.03
Vimentin	E-Cadherin	-0.118	0.48

表 4 扁平上皮癌患者での免疫染色スコアの相関関係

免疫染色	相関係数	P値	
SPHK1			
Fibroblast	0.398	0.12	
Vimentin	0.073	0.78	
E-Cadherin	-0.268	0.31	
Ki-67	-0.573	0.02	
Fibroblast	Ki-67	-0.177	0.51
Vimentin	E-Cadherin	-0.298	0.26

(2) ウェスタンブロット法による肺癌での SPHK1 発現の評価

ウェスタンブロット法で SPHK1 の発現を評価したところ、腺癌および扁平上皮癌で SPHK1 の発現が確認できた(図1)。

(3) SPHK1 発現と予後との関係の評価

肺扁平上皮癌において SPHK1 が予後に影響しない可能性が示唆されたため、肺腺癌での SPHK1 発現と予後の関係を検討した。SPHK1 低発現群は高発現群と比較し、予後が良い傾向を認めた(図2)。このことから肺腺癌において SPHK1 の発現が予後に影響する可能性が示唆された。

図1 ウェスタンブロット法

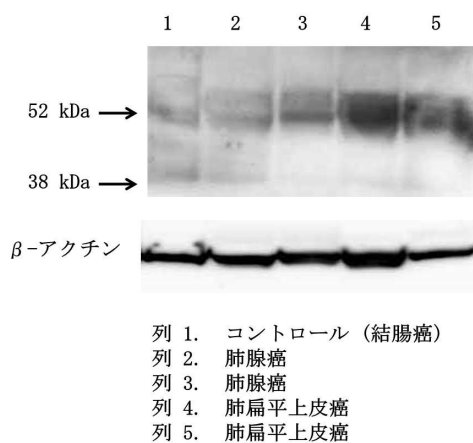
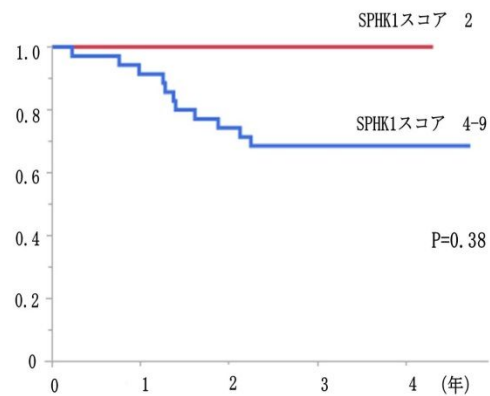


図2 肺腺癌患者でのSPHK1スコア別の無再発生存曲線



(4) 肺腺癌での抗酸化酵素(PRDX4)の発現と予後との関連の評価

206例の病理病期I期の肺腺癌のパラフィン包埋切片を用いてPRDXの免疫染色を行ったところ、PRDXの弱発現群は有意に分化度が低く、浸潤傾向が強かった($P < 0.0001$)。さらに、増殖能の指標であるMIB-1指数はPRDX弱発現群で有意に高い結果であった($P = 0.0018$)。Kaplan-Meier法による生存解析ではPRDX弱発現は有意に予後不良であった(図3)。

(5) 肺腺癌での核内蛋白(TSHZ2)の発現と予後との関連の評価

肺腺癌細胞株(A549、H1573、PC9)を用いてウェスタンブロット法によりTSHZ2の発現を評価したところ、115kDaのTSHZ2の発現が確認できた(図4)。226例の肺腺癌症例のパラフィン包埋切片を用いてTSHZ2の免疫染色を行い、発現の有無と予後の比較を行ったところ、TSHZ2陰性群が有意に予後不良であった(図5)。

図3

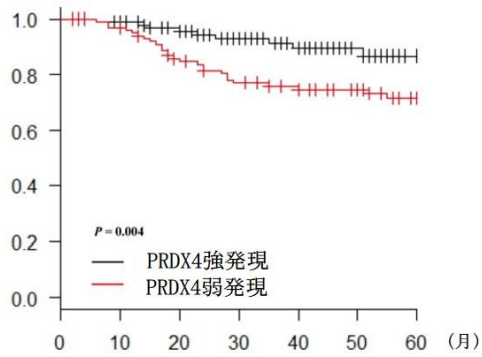


図4

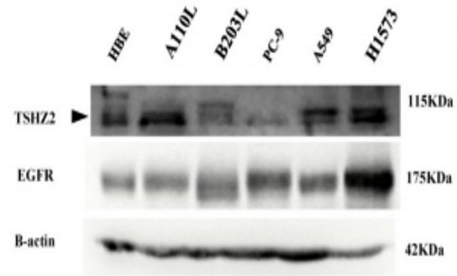
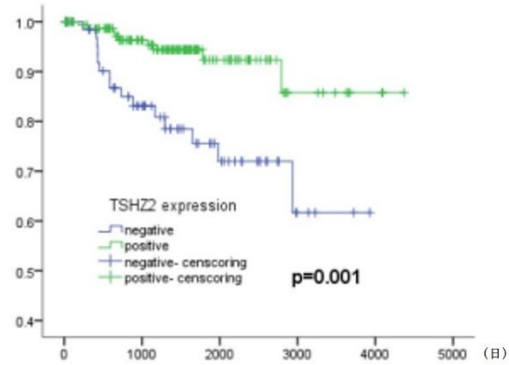


図5



以上の結果より，肺腺癌において PRDX4，TSHZ2，SPHK1 が予後不良因子である可能性があり，今後，これらの因子が癌幹細胞の活性化に寄与するかを 検証する必要がある．

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 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Motono Nozomu, Ueda Yoshimichi, Shimasaki Miyako, Iwai Shun, Iijima Yoshihito, Usuda Katsuo, Uramoto Hidetaka	4. 巻 14
2. 論文標題 Prognostic Impact of Sphingosine Kinase 1 in Nonsmall Cell Lung Cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical Pathology	6. 最初と最後の頁 1~7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/2632010X20988531	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------