

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09099

研究課題名（和文）膵癌患者の免疫微小環境における脂質メディエーター分子の役割と臨床的意義

研究課題名（英文）Clinical Significance of Lipid Mediator in the tumor Microenvironment of Pancreatic Adenocarcinoma

研究代表者

滝沢 一泰（TAKIZAWA, KAZUYASU）

新潟大学・医歯学総合病院・講師

研究者番号：30706437

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：膵癌の腫瘍免疫微小環境において脂質メディエーターであるスフィンゴシン-1-リン酸（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を目的として研究を行った。S1P産生酵素であるSphK1に着目し、膵癌組織における活性型のリン酸化SphK1（pSphK1）発現を免疫組織化学染色にて評価した。pSphK1高発現群ではリンパ管侵襲、リンパ節転移の頻度が有意に高く、pSphK1高発現は独立した予後不良因子であった。S1P経路の活性化は、膵癌のリンパ管侵襲やリンパ節転移に関与し、患者に不良な予後をもたらす可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌の転移・再発における腫瘍免疫微小環境の働きが注目されている。脂質メディエーターであるスフィンゴシン-1-リン酸（S1P）は、脂質であるが故に直接測定することが困難であったことから、臨床でのS1Pの生理的機能に関する研究は遅れており、その臨床的意義は未解明であった。本研究ではS1P経路の活性化が、膵癌組織におけるリンパ管侵襲およびリンパ節転移を促進し、予後を悪化させている可能性を示した。本研究結果から膵癌におけるS1P経路は、新たな治療標的として有望であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Sphingosine-1-phosphate (S1P) is a pleiotropic, bioactive, lipid mediator, produced by sphingosine kinase 1 (SphK1). In this study, we evaluated the expression of active phosphorylated SphK1 (pSphK1) in pancreatic cancer tissues by immunohistochemical staining and investigated its clinical significance. High pSphK1 expression is independently associated with lymphatic invasion and unfavorable prognosis in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) patients. Thus, the SphK1-S1P axis may be important in mechanisms of tumor progression, such as lymphatic invasion, in PDAC patients.

研究分野：消化器外科学

キーワード：膵癌 S1P pSphK1

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 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、比較的早期から間質浸潤、血管・リンパ管浸潤を介して周囲に広がり、ミクロ病変を伴う全身病を来していると考えられている。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。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ており、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。スフィンゴシン-1-リン酸(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、細胞増殖や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。研究代表者は、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、膵癌においても発育進展や生存においてSphK1とSphK2がそれぞれ重要な役割を果たしていることを発見した。

研究代表者はこれらの知見から、膵癌においては、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。現在の問題点として以下の2点が挙げられる。

(1) S1Pは脂質であるが故に測定が困難であったため、特に生体内でのS1Pの生理機能に関する研究は遅れており、腫瘍免疫微小環境におけるS1Pの役割は未解明である。

(2) 生体内においては癌が産生するS1Pと宿主が産生するS1Pとが存在するが、癌と宿主とが産生するS1Pが、各々、腫瘍免疫にどのように影響を及ぼすのかは未解明である。

研究代表者は「膵癌において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、膵癌における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

#### 膵癌におけるpSphK1(Ser-225)発現

外科的切除が施行された膵癌の腫瘍組織を用いて、腫瘍細胞におけるpSphK1(Ser-225)発現をモノクローナル抗体による免疫組織化学染色によって検出した。pH9のcitrate bufferにて抗原の賦活化を行い、polyclonal anti-pSphK1(Ser-225)抗体(1:100, ECM Biosciences LLC, Versailles, KY, USA)を用い4にて一晚反応させた。血管のリンパ管内皮細胞はpSphK1免疫活性を示し、この染色を内部対照とみなした。膵癌細胞のpSphK1免疫活性を内皮細胞免疫活性と比較し、negative(0)、weak(1)、moderate(2)、strong(3)として半定量的に評価した。染色した切片を10高倍率(HPF)で100倍に拡大して1サンプルにつき10HPFごとに評価し、各フィールドでの最も高い染色強度を、そのフィールドの強度と定義した。各サンプルの染色スコアは、10個のHPFの強度の合計で算出した。染色スコア<16はpSphK1低発現、スコア16はpSphK1高発現と定義した。

#### pSphK1(Ser-225)発現と膵癌患者の予後に関する検討

外科的切除が施行された膵癌患者111例を対象とした。切除膵の腫瘍組織の免疫組織化学にてpSphK1(Ser-225)発現を抽出した。このpSphK1(Ser-225)発現と、各臨床病理学的因子や予後との関連を統計学的に解析した。

#### pSphK1(Ser-225)発現と腫瘍微小環境中の免疫細胞に与える影響の検討

S1Pが、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)、腫瘍関連マクロファージ(TAM)、制御性T細胞(Treg)に与える影響について解析する。TILの同定にはCD3/4/8等のT細胞特異的表面マーカーを用い、TAMの同定にはF4/80、CD11b(マウス)、CD68(ヒト)、Tregの検出にはFOXP3等の特異的表面マーカーを用いて、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する。

### 4. 研究成果

#### 膵癌におけるpSphK1(Ser-225)発現

外科的切除が施行された膵癌患者111例におけるpSphK1(Ser-225)発現は、計1110HPF

で negative 94HPF、weak 381 HPF、moderate 510 HPF、strong 25 HPF と評価され、サンプルの染色スコアは、中央値 16 であった。pSphK1 低発現(染色スコア < 16)は、48 例(43%)、pSphK1 高発現(染色スコア ≥ 16)は 63 例(57%)であった。

#### pSphK1 (Ser-225) 発現と膵癌患者の予後に関する検討

外科的切除が施行された膵癌患者 111 例において、pSphK1-高発現群では、pSphK1-低発現群と比較して、G2/G3 腫瘍(それぞれ 57% : 37%;  $P = 0.031$ )、リンパ管侵襲(それぞれ 44% : 19%;  $P = 0.004$ )、門脈浸潤(それぞれ 25% : 8%;  $P = 0.017$ )、膵外神経叢浸潤(それぞれ 22% : 6%;  $P = 0.018$ )、術後の顕微鏡的癌遺残(それぞれ 22% : 8%;  $P = 0.041$ )が多く認められた。ロジスティック回帰分析では、リンパ管侵襲は pSphK1 発現と関連していた(オッズ比 3.550、95%信頼区間[CI] 1.421-8.869,  $P = 0.007$ )。

膵癌切除後患者 111 例の疾患特異的生存率(DSS)では、5年DSS率はpSphK1高発現群 19.6%、pSphK1低発現群 58.7%であり、生存期間中央値はそれぞれ 24.0ヶ月と 76.4ヶ月であった( $P = 0.001$ )。

Cox 比例ハザード回帰モデルを用いた多変量解析では、pSphK1 高発現は、DSS の有意な独立した予後因子であった(ハザード比 2.547, 95% CI 1.434-4.527,  $P = 0.001$ )。

#### pSphK1 (Ser-225) 発現と腫瘍微小環境中の免疫細胞に与える影響の検討

免疫組織化学を用いて pSphK1 と腫瘍浸潤リンパ球(TIL) 腫瘍関連マクロファージ(TAM)、制御性 T 細胞(Treg) との関連を検討したが、統計学的に有意な関連は見いだせなかった。

以上より、膵癌患者における S1P 高発現群は、低発現群と比較し、リンパ管侵襲を来しやすく結果的にリンパ節転移の頻度が有意に高いことが確認された。S1P の臨床的意義は確認されたが、腫瘍免疫微小環境との関連性は解明できなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kazuyasu Takizawa, Hiroki Nagaro, Jun Sakata, Hiroshi Ichikawa, Masayuki Nagahashi, Yoshifumi Shimada, Takashi Kobayashi, Toshifumi Wakai
2. 発表標題 Clinical Significance of the Expression of Phosphorylated Sphingosine Kinase1 in Pancreatic cancer
3. 学会等名 The 17th Annual Academic Surgical Congress (ASC) (国際学会)
4. 発表年 2022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	油座 築 (Yuza Kizuki) (00745565)	新潟大学・歯学部総合病院・専任助教  (13101)	
研究分担者	廣瀬 雄己 (Hirose Yuki) (10737365)	新潟大学・歯学部総合研究科・客員研究員  (13101)	
研究分担者	諸 和樹 (Moro Kazuki) (10745566)	新潟大学・歯学部総合病院・特任助教  (13101)	
研究分担者	永橋 昌幸 (Nagahashi Masayuki) (30743918)	新潟大学・歯学部総合研究科・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	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・准教授    (13101)	
研究分担者	三浦 宏平  (Miura Kohei)  (70733658)	新潟大学・医歯学系・客員研究員    (13101)	
研究分担者	長櫓 宏規  (Nagaro Hiroki)  (90888033)	新潟大学・医歯学総合研究科・助教    (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