

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460442

研究課題名(和文)細胞膜スフィンゴ脂質のラフト形成を介した肺腺癌浸潤・転移への関与の解明

研究課題名(英文)Is sphingolipid of the cell membrane involved in invasion and metastasis of adenocarcinoma of the lung?

研究代表者

上田 善道 (UEDA, Yoshimichi)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：50271375

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：非小細胞性肺癌の浸潤・転移における細胞膜活性脂質に関する研究で以下の成績を得た：Sphingosin kinase (SpK)-1は、癌浸潤先進部と微小乳頭状腺癌で高発現し、EMT関連分子発現との関連を示した。Sphingosin-1-P受容体 S1PR-2は腫瘍浸潤先進部癌細胞細胞膜に局限する発現をみた。Sphingomyelin synthase (SMS)-1, -2のsiRNAによる遺伝子発現抑制による機能解析に向け、ヒト線維肉腫細胞 HT1080を用いた解析で、SMS-1, SMS-2単独及び両遺伝子の抑制による細胞移動能の有意な抑制が示された。

研究成果の概要(英文)：Investigation aimed at elucidating the involvement of sphingolipid, particularly sphingosin-1 phosphate and sphingomyelin, in the aggressiveness of non-small cell lung cancer (NSCLC) revealed the following results: 1) Sphingosin kinase (SpK)-1 was expressed in the tumor cells at the front of invasion of NSCLC and micropapillary adenocarcinoma as well as bronchioloalveolar carcinoma cells. 2) Expression of SpK-1 correlated with that of not proliferation-related but of EMT-related molecules. 2) S1P receptor-2 was localized in the cell membrane of tumor cells at the invasion front. 3) Inhibition of SMS-1, SMS-2 or both gene by siRNA decreased cell motility and invasiveness of HT1080 cells.

These results suggest the pivotal role of cell membranous sphingolipid, particularly sphingosine and sphingomyelin in the invasiveness of NSCLC cells. Further study is warranted to establish a novel therapy against intractable advanced NSCLC from the view of cell membranous sphingolipid.

研究分野：人体病理

キーワード：細胞膜スフィンゴ脂質 肺腺癌 浸潤・転移 Sphingosin kinase 1 Sphingosine-1-p受容体 Sphingomyelinase 細胞移動

1. 研究開始当初の背景

肺癌は本邦の癌死の首座を占める臨床腫瘍学上の最重要疾患であり、今後も増加が予想されている。近年、特に腺癌症例の増加が著しい。肺腺癌に対する治療として従来の抗癌剤の改良に加え、EGFR や ALK 遺伝子の driving mutation による活性化チロシンキナーゼに対する分子標的治療が導入され、生命予後の延長が得られている。しかし、最終的に浸潤・転移による広範な進展を来し患者の生命を奪う。肺腺癌の浸潤・転移に関わる分子機構の解明とそれに基づいた新たな治療法の開発は現代医療の重要課題の一つである。

我々のグループはこれまで、非小細胞性肺癌の浸潤・転移に関わる機能分子群の発現と生命予後との関係を明らかにしてきた。これら機能分子ががん細胞の細胞移動・浸潤能亢進に関わるためには、浸潤先進部がん細胞の細胞膜における適切な再分配とそれに引き続く lamellipodia 形成に連なる細胞骨格再構成が必須であり、その制御機構の解明が肺腺癌に対する新たな進展阻止法確立に向け重要な研究課題となった。

Sphingolipid は細胞膜を構成する脂質の一種である。Sphingolipid は、従来、細胞膜二重脂質層の単なる構成成分とみなされていたが、ceramid/sphingosin系が各々 pro-, anti-apoptotic な機能分子として働くことが示された。さらに Hela 細胞の EGF 刺激による浸潤能亢進には、sphingosin kinase (SpK)-1,-2 による sphingosin のリン酸化とその細胞膜受容体の一種である sphingosin-1-P-receptor (S1PR)-2 を介した ERM の活性化も報告された。また、ceramid/sphingomyelin は細胞膜において脂質ラフトと呼ばれる構造を形成し、細胞膜受容体の局在を制御し細胞内外のシグナル伝達に対するプラットフォーム機能を果たす。連携研究者の岡崎らは自らが作製した sphingomyelin synthase (SMS)-1,-2 欠損マウスから得た線維芽細胞を用い、sphingomyelin が脂質ラフト構造を変化させ、CXCR4 の再分配による二量体形成を調節することにより、細胞移動能の制御に重要な役割を演ずることを初めて報告した。

これらの情報から sphingolipid は、がん細胞の浸潤・転移への関与が示されてきた機能分子群の細胞膜上での再配分と ERM の活性化による細胞骨格再構成を制御する、非小細胞性肺癌進展におけるキー分子である可能性が示唆され、その検証が重要な研究課題となった。

2. 研究の目的

非小細胞性肺癌の浸潤・転移における機能分子の再配分と細胞骨格再構成による epithelial mesenchymal transition (EMT) の活性化への、細胞膜 sphingolipid である sphingosin-1-phosphate と sphingomyelin

の産生に関わる酵素群とその受容体発現と遺伝子発現修飾による肺癌細胞の細胞移動及び浸潤能への影響を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 金沢医科大学呼吸器外科で外科的に切除された非小細胞性肺癌 74 組織 (腺癌 54 組織、扁平上皮癌 17 組織、リンパ節転移組織 3 組織) と、参考として頭頸部原発扁平上皮癌 94 組織と高度・軽度異形成組織 13 組織のホルマリン固定・パラフィン包埋、OCT-compound 包埋凍結組織と急速凍結新鮮組織を用い、以下の検討を行った。

Western blot 法を用いた sphingosin kinase-1 (SpK-1) の発現

ホルマリン固定・パラフィン包埋切片を用いた免疫染色による SpK-1 の発現と局在の解析

ホルマリン固定・パラフィン包埋切片での Ki67 標識率を指標として増殖活性との関連の検討

ホルマリン固定・パラフィン包埋切片での EMT 関連分子群 (E-cadherin, vimentin)、浸潤性増殖に関わる機能分子群 (membrane type matrix metalloproteinase (MT-MMP)-1, MMP-2, aquaporin 1, 5) と遺伝子発現調整に関わる structural factor の一種の high mobility group AT-hook (HMGA)-2 の発現と SpK-1 の発現との比較検討

OCT-compound 包埋凍結組織を用いた fluorescence in situ gelatin zymography (FIZ) による gelatinase 活性と SpK-1 の発現との比較検討

ホルマリン固定・パラフィン包埋切片を用いた免疫染色による sphingosine-1-phosphate receptor (S1PR)-1, 2, 3, 4, 5 の発現と局在の解析

ホルマリン固定・パラフィン包埋切片を用いた RNA in situ hybridization 法 (RNA scope, Advanced Cell Diagnostics 社) 法による S1PR 遺伝子発現の局在と半定量的解析

通常型肺乳頭状腺癌 3 例を対象とした微小乳頭状肺腺癌 4 例での Affimatrix 社 Gene Chip (Human genome U133 Plus 2.0 Array) を用いた遺伝子発現プロファイリングの Q-FARMS を含む複数のアルゴリズムによる遺伝子発現のクラスター解析と real time RT-PCR による検証

(2) Sphingomyelinase (SM)-1, 2 遺伝子発現修飾による sphingomyelin のがん細胞の移動能及び浸潤能への影響に関する検討

ヒト非小細胞性肺癌樹立細胞株における SMS-1, SMS-2 の遺伝子発現抑制による機能解析に向け、我々のこれまでの浸潤・転移に関する実験で豊富な基礎データを得ている骨髓間葉系組織幹細胞とヒト線維肉腫細胞 HT1080 を用い検討を行った。

SMS-1, SMS-2 の発現状態の western blot での検討

SMS-1, SMS-2 発現及び局在の蛍光抗体法による検討

(3) siRNA 法による SMS-1, -2 の遺伝子発現抑制の細胞移動能と浸潤能への影響の検討

siRNA 法による SMS-1, SMS-2 遺伝子発現抑制の western blot 法ならびに蛍光抗体法による確認

Oris Pro Cell Migration Assay (Platypus Technologies LLC 社)を用いた SMS-1, SMS-2 遺伝子発現抑制の細胞移動への影響の検討

マトリゲル法を用いた SMS-1, SMS-2 遺伝子発現抑制の浸潤能への影響の検討

4. 研究成果

(1) 肺小細胞癌の浸潤・転移における sphingosin kinase-1 の関与

非小細胞性肺癌（腺癌及び扁平上皮癌）及び頭頸部扁平上皮癌組織における sphingosin kinase-1 (SpK-1) の発現が western blot 法により示された。

非腫瘍性肺組織では Spk-1 の発現は細気管支粘膜上皮、II 型肺胞上皮が主体で、肺胞マクロファージと肺胞中隔の毛細血管の一部にも陽性所見を認めた。

細気管支肺胞上皮癌細胞に SpK-1 の恒常的な高発現を認めた。この発現は、Ki67 標識率、E-cadherin の喪失や vimentin の発現との関連は認めず、細胞分化に起因する発現と考えられた。

腫瘍辺縁部に近い乳頭状発育が主体で浸潤性格の乏しい高分化腺癌部では SpK-1 の発現は著明に低下した一方、腫瘍中心部の間質の fibroblastic reaction を伴う浸潤部では、肺腺癌細胞に SpK-1 の高発現を認めた。反応性間質細胞にも SpK-1 の発現が亢進していた。

微小乳頭癌成分における著明な SpK-1 発現の亢進を認めた。

扁平上皮異形成部ならびに扁平上皮癌膨張性発育部では SpK-1 の発現は陰性～弱陽性なのに対して、浸潤性扁平上皮癌の浸潤先進部に一致して SpK-1 の発現亢進を認めた。浸潤性と SpK-1 の関係は頭頸部扁平上皮癌でも顕著であった。

非小細胞性肺癌浸潤部における SpK-1 の発現は、Ki67 標識率とは相関せず、E-cadherin の喪失と vimentin 発現と有意な関連を認めた。

腺癌・扁平上皮癌浸潤先進部における SpK-1 の発現は、MT1-MMP、MMP-2 の発現に加え、FIZ 法による gelatinase 活性との関係を認めた。

SpK-1 と aquaporin (AQP)-1 の発現の比較解析により、両者とも肺胞上皮癌、腺癌・扁平上皮癌浸潤先進部と微小乳頭状腺癌での高発現を認めた。

肺扁平上皮癌では、浸潤先進部の SpK-1, MT-MMP-1/MMP-2 の発現は、structural factor の一種である high mobility group AT-hook

(HMGA)-2 発現との関連を認めた。

肺微小乳頭状腺癌 4 例と肺通常型乳頭状腺癌 3 例との Affimetrix 社 Gene Chip (Human genome U133 Plus 2.0 Array)を用いた遺伝子発現プロファイリングのクラスター解析では、微小乳頭状腺癌における CXCL-14 遺伝子発現低下と S100 protein A4 の発現亢進を認め、real time RT-PCR で検証された。しかし、SpK-1 の遺伝子発現には有意な差異は cDNA アレイ解析では検出されなかった。

免疫染色における SpK-1 発現は、頭頸部扁平上皮癌では有意な予後不良因子であることが Kaplan Meyer 法 log rank 試験により示されたが、肺癌では非小細胞癌全体、腺癌、扁平上皮癌別でも生命予後への有意な関与は検出されなかった。

腫瘍組織における sphingosine-1-phosphate receptor (S1PR)-1, 2, 3, 4, 5 発現の免疫染色による検討により、S1PR-1, 3, 5 は腫瘍浸潤先進部癌細胞、その周囲の反応性間質細胞、血管内皮及びリンパ球の核に発現を認めた。S1PR-2, 4 は癌細胞の細胞膜に発現を認めた。特に、S1PR-2 は腫瘍浸潤先進部の癌細胞に発現局在を示した。

RNA in situ hybridization 法を用い、生検ならびに外科切除標本の肺癌浸潤部局所における S1PR-1, 2 遺伝子発現の半定量解析を試みた。House keeping 遺伝子 mRNA 発現は検出できたが、S1PR-1, 2 遺伝子 mRNA 遺伝子の検出感度は低く、半定量解析は困難であった。固定法の改良による検出感度の向上が課題として残った。

(2) Sphingomyelinase-1, 2 のがん細胞の移動性と浸潤能への関与

培養骨髄由来間葉系組織幹細胞における SMS-1, SMS-2 の発現が、western blot 法ならびに蛍光抗体法により示された。

siRNA 法による SMS-1, SMS-2 遺伝子発現抑制が western blot 法により確認された。

siRNA 法による SMS-1, SMS-2 ならびに両遺伝子の同時抑制は、間葉系組織幹細胞の細胞移動能、マトリゲル浸潤能への抑制効果が示された。

HT1080 ヒト線維肉腫培養細胞でも、SMS-1, SMS-2 の発現が、western blot 法ならびに蛍光抗体法により示された。

siRNA 法による SMS-1, SMS-2 遺伝子発現抑制が western blot 法により確認された。SMS-1 あるいは SMS-2 遺伝子発現の抑制とも、他方の SMS の発現亢進は誘導されなかった。

HT1080 細胞における siRNA 法による SMS-1, SMS-2 ならびに両遺伝子の同時抑制は、がん細胞の基質接着性、細胞移動能、マトリゲル浸潤能への抑制効果が示されるとともに、細胞突起形成の減少が形態的に示された。

HT1080 細胞における siRNA 法による SMS-1, SMS-2 ならびに両遺伝子の同時抑制は、細胞増殖への有意な影響は示さなかった。

以上の所見から、肺非小細胞性肺癌の進展における細胞膜リン脂質は、細胞増殖とは直接の関連は乏しく、epithelial mesenchymal transition (EMT)の亢進と浸潤関連機能分子の局在の変化に關与する可能性が強く示唆された。

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 1 件)

Kotaro Higashi, Toshiaki Yamagishi, Yoshimichi Ueda, Yasuhito Ishigaki, Miyako Shimasaki, Yuka Nakamura, Manabu Oguchi, Tsutomu Takegami, Motoyasu Sagawa, Hisao Tonami: Correlation of HIF-1/HIF-2 with FDG uptake in lung adenocarcinoma. Ann. Nucl. Med. 30:708-715, 2016. 有 査 読、doi: 10.1007/s12149-016-1116-5

〔学会発表〕(計 2 件)

島崎 都、谷口 綾佳、佐藤勝明、上田善道 . Sphingosin kinase 1 の発現はヒト口腔癌の EMT に関係する . 第 104 回日本病理学会総会、平成 27 年 4 月 30 日～5 月 2 日、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

島崎 都、谷口 綾佳、佐藤勝明、上田善道 . Sphingosin kinase 1 の発現はヒト口腔癌と非小細胞生肺癌がん細胞の EMT に関係する . 第 11 回スフィンゴセラピー研究会 平成 28 年 7 月 14 日～16 日 ホテルアローレ(石川県加賀市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

上田 善道 (UEDA, Yoshimichi)
金沢医科大学・医学部・教授
研究者番号：50271375

(2)研究分担者

(3)連携研究者

岡崎 俊朗 (OKAZAKI, Toshiro)
金沢医科大学・医学部・教授
研究者番号：40233308

(4)研究協力者

島崎 都 (SHIMASAKI, Miyako)