

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460445

研究課題名(和文) 血管肉腫におけるスフィンゴシン-1-リン酸受容体の発現と治療への応用

研究課題名(英文) Sphingosine-1-phosphate receptor 1 as a potential therapeutic target for patients with angiosarcoma

研究代表者

定平 吉都 (Sadahira, Yoshito)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：30178694

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：血管肉腫細胞はスフィンゴシン-1-リン酸受容体1(S1PR1)を高発現しており、S1PR1の機能的アンタゴニストであるphospho-FTY720は、血清中でもS1PR1を内在化・分解することで、血管肉腫細胞のS1Pおよび血清への細胞走化性や細胞遊走が抑制された。血管肉腫症例では、S1PR1とスフィンゴシンキナーゼ1(SPHK1)が高発現しており、STAT3活性化との関連性がみられた。したがって、血管肉腫では、SPHK1/S1P/S1PR1/STAT3のオートクラインループが腫瘍細胞の恒常的な細胞運動の亢進をもたらすこと、また、FTY720の投与が腫瘍の転移を抑える可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effect of S1PR1 modulation on cell migration, and examined its potential role as a therapeutic target against metastatic dissemination of angiosarcoma. Immunostaining revealed high expression of S1PR1 on a angiosarcoma cell line MO-LAS cell membrane. S1P enhanced chemotactic and random migration of MO-LAS cells, respectively. Inhibition of S1PR1 expression with siRNA significantly attenuated chemotaxis of cells towards S1P. Further, FTY720P strongly induced the internalization and degradation of S1PR1 even in the presence of serum containing S1P. It attenuated chemotactic cell migration of MO-LAS towards both S1P and serum, as well as the random motility of cells at nanomolar concentrations. We found that all angiosarcoma cases showed high expression of S1PR1, sphingosine kinase 1, and phospho-STAT3. Thus, SK1/S1P/S1PR1/STA3 axis may be a potential therapeutic target for inhibition of angiosarcoma metastasis by controlling its cell motility.

研究分野：病理学

キーワード：血管肉腫 Sphingosine-1-phosphate S1PR1 FTY720 細胞運動 転移 免疫組織化学

1. 研究開始当初の背景

スフィンゴシン-1-リン酸 sphingosine-1-phosphate (S1P)は、血管内皮細胞やリンパ球、癌細胞の細胞運動の調節や増殖、生存に関与する lysophospholipid であり、血小板や血漿中に多量に含まれている。その生物活性は、G 蛋白質共役型のスフィンゴシン-1-リン酸受容体 sphingosine-1-phosphate receptor (S1PR) を介して発揮される。S1PR は5つのタイプが存在し、細胞種によって異なる分布を示す。最近では S1PR のスーパーアゴニストである FTY720 が、多発性硬化症の治療薬として使用されている。しかしながら、ヒト生体内における S1PR の役割はほとんど解明されていない。この原因のひとつに、これまで、S1P に特異性の高い抗体が得られておらず、ヒトの生体内組織のどのような細胞にどのようなタイプの S1PR が高発現しているのか具体的な知見には乏しかったためである。われわれは、S1PR1 に対する多数の抗体を、S1PR1^{-/-}マウスと S1PR1^{+/-}マウスの心臓の切片を免疫染色することでスクリーニングした結果、免疫組織学的に使用可能な抗体を見出した。ヒト正常組織では、S1PR1 は全ての組織の血管、リンパ管の内皮細胞の細胞膜に分布していた。リンパ節では、血管、リンパ洞内皮細胞ばかりでなく、リンパ濾胞のマントル層を構成するリンパ球の細胞膜が強陽性で、マントル細胞リンパ腫の良好な免疫組織学的マーカーとなり、cyclinD1 との併用で低悪性度リンパ腫の鑑別に有用であることを報告した (Nishimura et al. *Modern Pathology* 2010)。さらに中枢神経では、皮質のアストロサイトに高発現することを見出し、多発性硬化症における FTY720 の治療効果は、中枢神経に対する直接的作用である可能性を示唆した (Nishimura et al. *J Histochem Cytochem* 2010)。一方、最近、S1PR1 が STAT3 の標的遺伝子となることが報告された (Lee H et al. *Nat Med* 2010)。われわれも S1PR に特異的な機能的拮抗薬である FTY720 の高濃度 (5 μ M 以上)では、STAT3 の恒常的活性化がみられる成人 T 細胞白血病ウイルス感染細胞の増殖や遊走を抑制することを報告している (日本病理学会 2012, 2013)。血管肉腫は皮膚に好発し、高率に血行性転移するきわめて予後不良の腫瘍である。本腫瘍の治療法は未だ確立していない。われわれは、免疫組織化学的手法を用いて S1PR1 が血管肉腫に高発現していることを報告しているが (Akiyama T et al. *Virchows Arch* 2009)、その生体内での役割は不明である。

2. 研究の目的

われわれは、今回、血管肉腫症例における S1P 受容体 (S1PR1~5) の発現を調べ、S1P 受容体に対するさまざまな modulator の作用を、培養細胞株を用いて解析することによ

って、細胞遊走を強力に抑制するものを新たに見出し、それらを新規治療薬として応用することを考えた。また、血管肉腫における5つのタイプの S1P レセプター (S1PR) 発現を免疫染色や real time RT-PCR 法を用いて調べることで、血管肉腫における S1PR の発現の意義について検討する。

3. 研究の方法

(1) 血管肉腫細胞株 (ISO-HAS または MO-LAS: いずれも北里大学 増澤先生より供与されたもの) から RNeasy mini kit により RNA を分離した。その後 QIAGEN kit を用いて cDNA に変えた。次に、S1PR1~5 と sphingosine kinase 1 および sphingosine-kinase 2 に対する 100bp 前後のアプリコンを増幅するプライマー (QIAGEN より購入) を用いた定量リアルタイム PCR (SYBR Green を用いた fast step RT-PCR kit, QIAGEN) を Applied Biosystems 7500 PCR System で行った。S1PR の相対的発現量を、Ct 法により解析した。

(2) 血管肉腫細胞株 (MO-LAS) に、lipofection により S1PR の siRNA を導入し、また S1PR modulator (FTY720, FTY720P) を添加し、下記のトランスウェルを用いた細胞遊走能の測定、wound healing assay、アポトーシスの測定を行って、その効果を調べた。

(3) 細胞遊走能の測定: 5 μ m 径のトランスウェルを用いた。培養液は 0.5% の fatty acid-free BSA を添加した RPMI-1640 を用いた。上室に細胞を入れ、下方に FTY720 などの薬剤を入れ、24 時間後に下方に移動した細胞をカウントした。

(4) Wound healing assay: ビデオ装置が付いた専用の測定装置ライブセルアナライザー (JuLI Br, Nano EnTek) をすでに購入しており、これを用いて細胞遊走能を継続的に測定し、ビデオによる結果の提示が可能であった。

(5) アポトーシスの測定: Tali image based cytometry を使用し、アネキシン V により測定した。

(6) 血管肉腫細胞株の免疫組織化学的染色培養細胞を、S1PR に対する抗体: 抗 S1PR1 (edg-1) Rabbit 抗体, 抗 S1PR2 (edg-5) 抗体, 抗 S1PR3 (edg-3) Rabbit 抗体, 抗 sphingosine kinase 1 Rabbit 抗体, 抗 phospho-Akt (Ser473) Rabbit 抗体, 抗 phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) Rabbit 抗体を用いて自動免疫染色装置 (Ventana XT system Discovery) で染色した。

(7) 血管肉腫症例の免疫組織化学的染色血管肉腫症例は、川崎医科大学附属病院病理部の病理診断システムのデータベースよりその臨床病理学的パラメーターとともに抽出し、連結可能匿名化した後、実験に使用し

た。また、緩衝ホルマリン液で固定された組織のパラフィン包埋切片を、抗 S1PR1 (edg-1) Rabbit 抗体, 抗 sphingosine kinase 1 Rabbit 抗体, 抗 phospho-STAT3 (Y705) 抗体, 抗 vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1 抗体を用いて自動免疫染色装置 (Ventana XT system Discovery) で染色した。

4. 研究成果

(1) 血管肉腫細胞における S1PR1 の発現と細胞遊走および細胞走化性における役割

まず、血管肉腫細胞株である ASO-HAS および MO-LAS におけるスフィンゴシン-1-リン酸レセプター-1 (S1PR1) の発現量を qRT-PCR および Western blot で比較したところ、MO-LAS の方が高発現していたため、以後の invitro の実験には MO-LAS を使用した。MO-LAS のセルブロックを用いた免疫細胞化学では、S1PR1 は細胞突起の細胞膜に強陽性となった。

血管肉腫細胞株 MO-LAS について S1PR1 ~ S1PR5 について発現量を qRT-PCR にて検討した結果、S1PR1 の発現量が他の S1P レセプターに比較して著しく高いことが判明した。

MO-LAS では、細胞遊走に関連するシグナル伝達蛋白である p44/42MAPK (Erk1/2), STAT3, および AKT が恒常的に活性化しており、fatty-acid free bovine serum albumin のみでも細胞遊走が認められた。

非血清存在下で、S1P による MO-LAS の細胞遊走能および細胞走化性の亢進を、それぞれ time-lapse video による wound healing assay および transwell migration assay (図 1) で確認した。

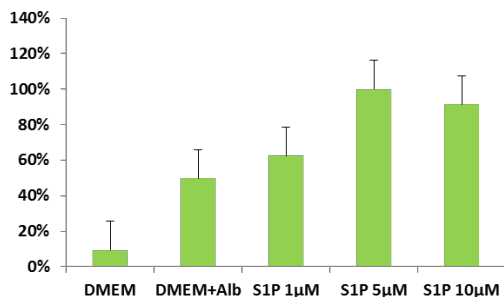


図 1 . Transwell migration assay における lower chamber への S1P 添加後の血管肉腫細胞株 MO-LAS の細胞走化性の亢進

⑤さらに S1PR1 に特異的な siRNA を、血管肉腫細胞株 (MO-LAS) にトランスフェクションした場合には、S1PR1 の発現が著しく減弱し、S1P のみならず 10% ウシ胎児血清 (FBS) への走化性が有意に低下した。しかし、p44/42MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204), STAT3 (Tyrosine705), および AKT (Ser473) のリン酸化には影響はなかった。

S1PR1 の機能的アンタゴニストであるリン

酸化 FTY720 (FTY720P) を添加後では、MO-LAS の S1PR1 の内在化及び分解が時間依存性に確認された (図 2)。また、FTY720P (100 nM) による前処置によって S1PR1 を内在化した状態では、MO-LAS の血清への走化性は、FTY720P 濃度依存性に抑制された (図 3)。

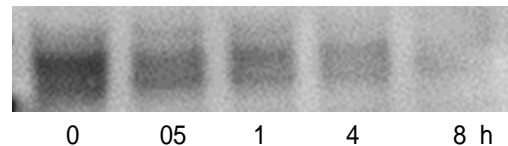


図 2 . FTY720P 添加後の MO-LAS 細胞における S1PR1 発現の推移 (ウエスタンブロット)

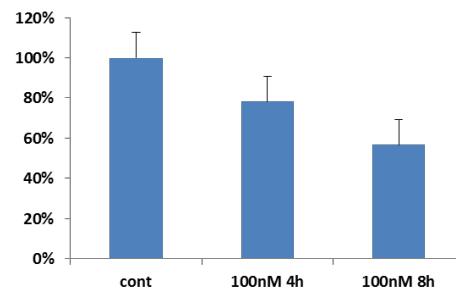


図 3 . Transwell migration assay における FTY720P (100nM) の前処置による MO-LAS の血清への走化性の抑制

また、time-lapse video による wound healing assay でも FTY720P (100nM) 添加では血清で誘導される MO-LAS 細胞の細胞遊走能の抑制がみられた (図 4)。

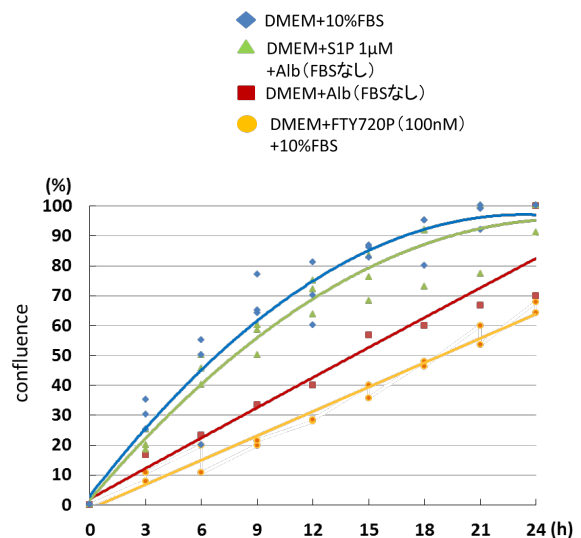


図 4 . Wound healing assay における S1P, 血清の MO-LAS 細胞の細胞遊走への効果と FTY720P 添加による細胞遊走の抑制。

FTY720P の添加では p44/42MAPK (Erk1/2), STAT3, および AKT のうち、STAT3 のリン酸化のみが有意に抑制されていた。FTY720P の添加では、S1PR1 の細胞膜での発現がほとんど

見られなることから、S1P/S1PR1 シグナルの減弱による STAT3 の活性化の抑制も、FTY720P による血管肉腫の細胞遊走の抑制と関連している可能性がある。

FTY720P による強い細胞遊走の抑制効果が、FTY720P が結合しないと考えられている S1PR2 を介したものではないことは、S1PR2 のアンタゴニストである JTE013 を添加してもなお FTY720P の抑制効果がみられたことより確認された。また、使用した FTY720P の濃度 (100nM) では、MO-LAS にアポトーシスは誘導されず、細胞運動を抑制する濃度では細胞毒性はみられないことが判明した。

以上から、MO-LAS 細胞では S1P/S1PR1 シグナルにより細胞遊走および細胞走化性が亢進することがわかった。また、FTY720P は、100nM で、細胞膜の S1PR1 を内在化・分解することで、血管肉腫細胞の S1P および血清への細胞走化性を抑制することが判明した。

(2) 血管肉腫における低酸素の S1P/S1PR1 シグナルへの影響

低酸素下 (1%O₂) では、MO-LAS の HIF-1 蛋白の分解は抑制され、SPHK2, S1PR1, STAT3 の発現亢進が認められ (図 5)、また細胞走化性が亢進したが、FTY720P (100nM) 添加では、定常状態 (20%O₂) に比較して FTY720P の細胞走化性抑制効果が減弱した。以上より、臨床的に応用されている濃度の FTY720P が、S1PR1 の機能的アンタゴニストとして血管肉腫細胞の転移を抑制する可能性が示唆されたが、周囲環境の酸素濃度により、その有効性が左右される可能性があることがわかった。

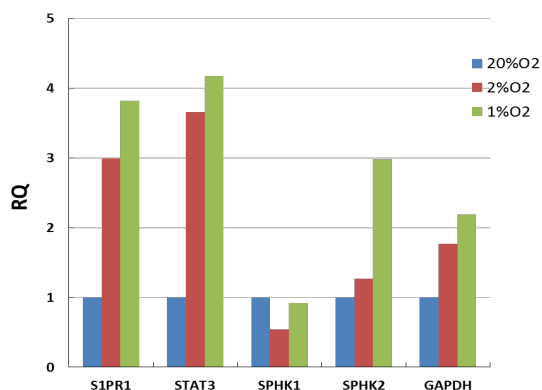


図 5 . 低酸素下 (1%O₂) では、MO-LAS 細胞での SPHK2, S1PR1, STAT3 の mRNA の発現亢進が認められた。

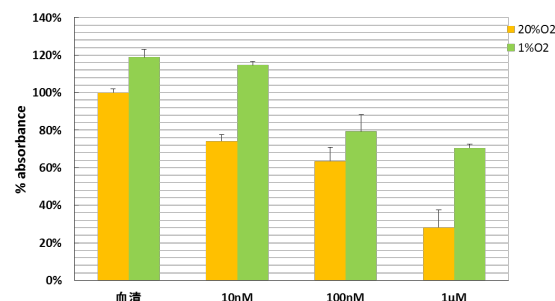


図 6 . 低酸素下 (1%O₂) では、MO-LAS 細胞の細胞走化性の亢進と、FTY720P (100nM) 添加の細胞走化性抑制効果がみられた (Transwell assay)。

(3) ヒト血管肉腫症例における S1PR1 の発現と STAT3 の活性化との関連性の検討

血管肉腫細胞株 (MO-LAS) を用いて、sphingosine-1-phosphate (S1P) レセプターである、S1PR1, S1PR2, S1PR4, S1PR5 の免疫組織化学的発現について市販のモノクローナル抗体を用いて検討した。しかしながら、いずれも特異的な染色性が得られず、現時点では、S1P レセプターの発現をホルマリン固定パラフィン包埋切片を免疫組織化学的に検討するには、ポリクローナル抗体である抗 S1PR1 ウサギ抗体 (H-60, Santa Cruz 社) のみが使用可能であることがわかった。

肺転移を示した血管肉腫 1 例の原発巣と肺転移部を免疫組織化学にて検討し、血管肉腫では、原発部位のみならず転移部位でも S1PR1 が高発現していることを確認した。

皮膚の血管肉腫症例 (13 例) における、S1PR1 と STAT3 の活性化の関係について H-60 抗体と anti-phospho STAT3 (Try705) 抗体を用いた免疫組織化学にて検討した。その結果、すべての血管肉腫症例において、S1PR1 の高発現 (図 7) と STAT3 の活性化との関連性が明らかとなった。特に血管構造を示さない異型の強い腫瘍細胞の核に phospho STAT3 の強い染色性がみられた (図 8)。また、S1P の生成に関与する sphingosine kinase 1 (SPHK-1) についても、全例が細胞質に強陽性となった (図 9)。さらに、S1P/S1PR1 シグナルによる発現の増強が報告されている細胞接着因子である vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1 の発現についても 13 例の血管肉腫症例について検討したが、VCAM-1 は管腔を形成する腫瘍細胞に強く発現しており、異型の強い症例や血管肉腫細胞株 (MO-LAS) では、染色性の強い細胞や弱い細胞などが混在し、その発現は不均一であり、S1PR1 の発現との相関は得られなかった。

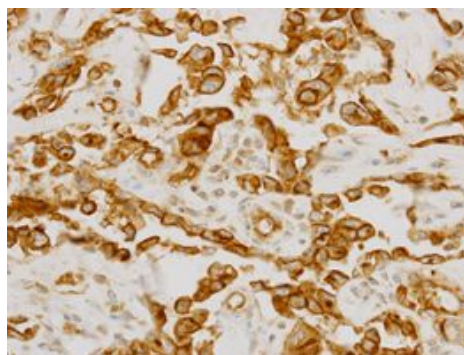


図 7 . 血管肉腫症例における S1PR の発現：脈管形成を示す異型細胞の細胞膜と細胞質に陽性。

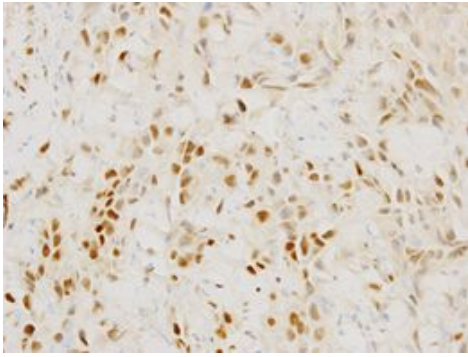


図8 . 血管肉腫症例における phospho-STAT3 の発現:ほとんどの腫瘍細胞の核に発現がみられる。

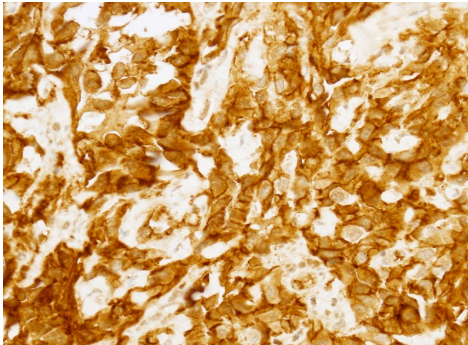


図9 . 血管肉腫症例における SPHK-1 の発現:細胞質と細胞膜に陽性所見がみられる。

(4) 結論

S1PR1 は STAT3 の target gene であり,かつ S1P/S1PR1 シグナルが STAT3 を活性化することが知られている。本研究における血管肉腫細胞株を用いたこれまでの結果を考慮すると,血管肉腫では,SPHK-1/S1P/S1PR1/STAT3 のオートクラインループが恒常的な細胞運動の亢進をもたらし,これが血管肉腫の強い転移能に關与していることが示唆された。*In vitro* の実験から FTY720 の投与が血管肉腫の転移を抑える可能性はあるが,血管肉腫の動物モデルが作製できておらず,臨床的応用の可能性については検証できていない。

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 1 件)

Daigo OKA, Risa KORESAWA, Hideyo FUJIWARA, Hirotake NISHIMURA, Isao IREI, Takashi AKIYAMA, Shuji HAMAZAKI, Wataru FUJIMOTO, Mikio MASUZAWA, Yoshito SADAHIRA. Sphingosine-1-phosphate receptor 1 expression in angiosarcoma: Possible role in metastasis and a potential therapeutic target. *Kawasaki Medical Journal*. 査読有, vol.42, 2016, pp31-45

[学会発表](計 3 件)

岡大五, 是澤里紗, 西村広健, 伊禮功, 秋山隆, 濱崎周次, 定平吉都. 血管肉腫における S1P/S1PR1 シグナルの治療標的の可能性の検討. 第 104 回日本病理学会総会 2015 年 5 月 2 日. 名古屋国際会議場(愛知)

Daigo Oka, Risa Koresawa, Hideyo Fujiwara, Hirotake Nishimura, Isao Irei, Takashi Akiyama, Shuji Hamazaki, Yoshito Sadahira, Wataru Fujimoto, Makio Masuzawa. The sphingosine-1-phosphate/S1PR1 axis as a potential therapeutic target in angiosarcoma. 日本研究皮膚科学会 第 40 回年次学術大会・総会. 2015 年 12 月 11 日~13 日. 岡山コンベンションセンター(岡山)

定平吉都, 岡大五

血管肉腫細胞の走化性におけるスフィンゴシン-1-リン酸受容体の役割

第 7 回 川崎医科大学学術集会 2016 年 8 月 6 日. 川崎医科大学(倉敷)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://www.kawasaki-m.ac.jp/pathology/studeis.html>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

定平吉都(SADAHIRA YOSHITO)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号: 30178694

(2) 研究分担者

秋山隆(AKIYAMA TAKASHI)

川崎医科大学・医学部・准教授
研究者番号： 80294411