

184. 脂質メディエーターによる乳癌の前転移ニッチ形成機序

永橋 昌幸

*新潟大学 医学部 腫瘍内科学講座

Key words : 脂質メディエーター, 乳癌, スフィンゴシン-1-リン酸, 前転移ニッチ, スフィンゴシンキナーゼ

緒 言

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、強力な生理活性物質であり、炎症や癌の発育浸潤など様々な病態プロセスに関与している¹⁻⁵⁾。S1P は細胞内で2つの異なるスフィンゴシンキナーゼ (SphK1、SphK2) によって産生され、S1P に特異的なトランスポーターを介して細胞外に放出され、細胞表面に存在する S1P 特異的 G タンパク結合型受容体である5種類の S1P 受容体 (S1PR1-5) に作用することで、オートクライン・パラクライン作用により、様々な細胞機能を調節している⁶⁾。

これまでに S1P や、S1P の産生酵素である SphK 1、S1P 受容体の S1PR1 が癌の発育、転移、進行に重要な役割を果たしていることが報告されてきた。また乳癌患者では、SphK1 の過剰発現と不良な予後が関連することが報告されている。我々は、以前に乳癌細胞において SphK1 が細胞外の癌微小環境へ放出される S1P の産生に関わっていることを示した⁷⁾。さらに、腫瘍の微小環境に放出された S1P は、血管やリンパ管新生などに重要な働きを示しており、癌の進展に非常に重要な役割を果たしている^{8,9)}。このことから、腫瘍の微小環境において S1P シグナルを阻害することは、癌の進行や転移の抑制に寄与することが期待される。FTY720 は S1PR1 の機能的阻害薬として知られ、多発性硬化症の治療薬として既に厚生省で認可され、臨床で使用されている²⁾。

最近の癌研究において、癌細胞が転移する前に、原発巣の癌細胞が産生する VEGF や PDGF などのサイトカインが肺などの転移先臓器においてマクロファージの集積や線維芽細胞などの間質細胞を活性化させ、TNF- α や fibronectin の産生により、癌細胞が転移しやすい環境「前転移ニッチ」を構築し、そこに癌細胞が転移するという学説が唱えられるようになった¹⁰⁾。この前転移ニッチ形成において、マクロファージなどの炎症細胞における STAT3 の恒常的活性化が重要であると言われ、S1PR1 の活性化が STAT3 の恒常的活性化をもたらし前転移ニッチ形成に寄与することが報告された¹⁰⁾。しかしながら、S1PR1 のリガンドである S1P 自体の前転移ニッチ構築における働きは未だ不明であり、また S1P を産生するスフィンゴシンキナーゼの役割も分かっていない。本研究では、乳癌肺転移における前転移ニッチ形成において、S1P と SphK1、S1PR1 の役割を明らかにし、その分子機構を解明することで、新しい標的治療の開発を目指すことを目的とする。

方 法

プラスミドベクターを用いて SphK1 の過剰発現を行ったマウス乳癌 E0771 細胞の細胞培養液を C57bl6 マウスに5日間腹注した後、正常の E0771 細胞の尾静注を行った (前転移ニッチ形成実験、Fig. 1)。7日後の肺を病理組織学的に解析し、qPCR で mRNA の発現、蛍光免疫染色ならびにウエスタンブロットで蛋白発現を検討した。次にマウスに高脂肪食を付加し、肥満マウスモデルを作製し、正常マウスと共に E0771 培養液による前転移ニッチ形成実験を行った (Fig. 2)。

*現所属：新潟大学医歯学総合病院 消化器外科

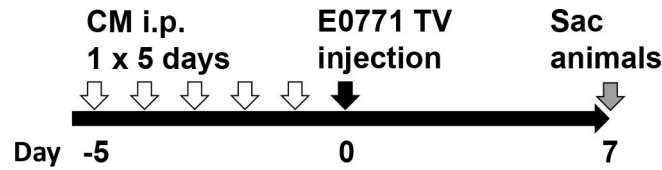


Fig. 1. Scheme for examination of metastatic niche formation in the lung utilizing cancer cell conditioned media (CM)

Mice were treated with CM from SphK1-overexpressing E0771 mouse breast cancer cells or control E0771 cells for 5 days prior to cancer cell challenge.

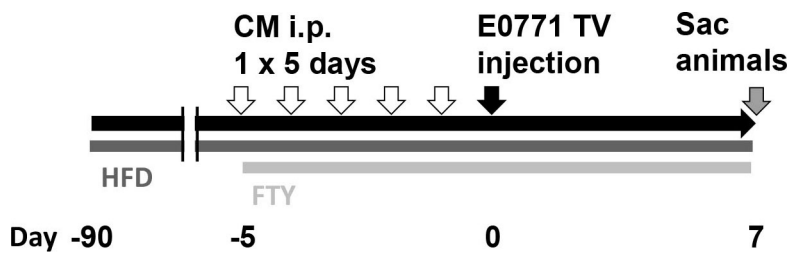


Fig. 2. Scheme for examination of metastatic niche formation in the lungs of HFD fed mice utilizing E0771 cell conditioned media (CM)

Mice were fed with HFD or normal diet (ND) for 12 weeks and treated with CM from SphK1-overexpressing E0771 mouse breast cancer cells for 5 days prior to parental tumor cell challenge. Mice were treated with daily with FTY720 (1 mg/kg/day) or PBS by gavage for the indicated period.

結果および考察

本研究では、乳癌の原発腫瘍から腫瘍間質液に分泌された SIP は、原発腫瘍の微小環境に影響を与えるだけでなく、肺などの遠隔部位において、癌細胞が転移するのを促す前転移ニッチを形成するかどうか検討した。我々は、SIP を産生する SphK1 を過剰発現した E0771 乳癌細胞の細胞培養液をマウスに連続 5 日間腹注し、その後、E0771 細胞を尾静注した (Fig. 1)。ウェスタンブロットにより SphK1 の過剰発現を確認した (Fig. 3A)。HE 染色による組織学的検査では、SphK1 を過剰発現させた E0771 細胞の培養液を腹注されたマウスでは、正常の E0771 細胞の培養液を腹中したマウスと比較して、肺における炎症細胞浸潤が多く認められた (Fig. 3B)。興味深いことに SphK1 過剰発現した E0771 乳癌細胞の培養液を注入されたマウスでは、そうでないマウスと比較して有意に肺におけるマクロファージの浸潤が多く、IL-6 の分泌が高かった (Fig. 4)。さらに、この肺においては SphK1、S1PR1 および IL-6 の mRNA の発現が、正常群と比較して有意に高かった (Fig. 5)。ERK や AKT などの生存シグナルの活性化 (リン酸化) は、SphK1 過剰発現細胞の培養液を注入されたマウスの肺で、正常細胞培養液注入マウスの肺と比較して、有意に高度であった (Fig. 6)。SphK1 過剰発現細胞の培養液を注入されたマウスでは、肺における Stat3 と NF- κ B の p65 サブユニットのリン酸化を認め、これらのシグナルが癌の発育進展に重要な働きを果たしていることが考えられた (Fig. 6)。

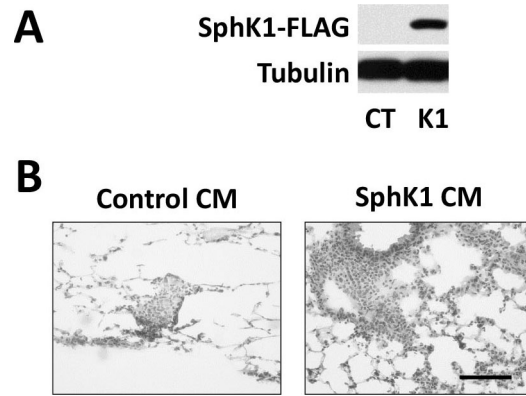


Fig. 3. Immunoblot for SphK1 overexpression and pathological examination of the lung after the cancer cell challenge

A) Equal amounts of cell lysates were analyzed by western blotting with the indicated antibodies 48 hours after overexpression of SphK1 or control plasmid. B) Hematoxylin and eosin (HE) of the the lung 7 days after iv injection of E0771 cells. Scale bar, 100 μ m.

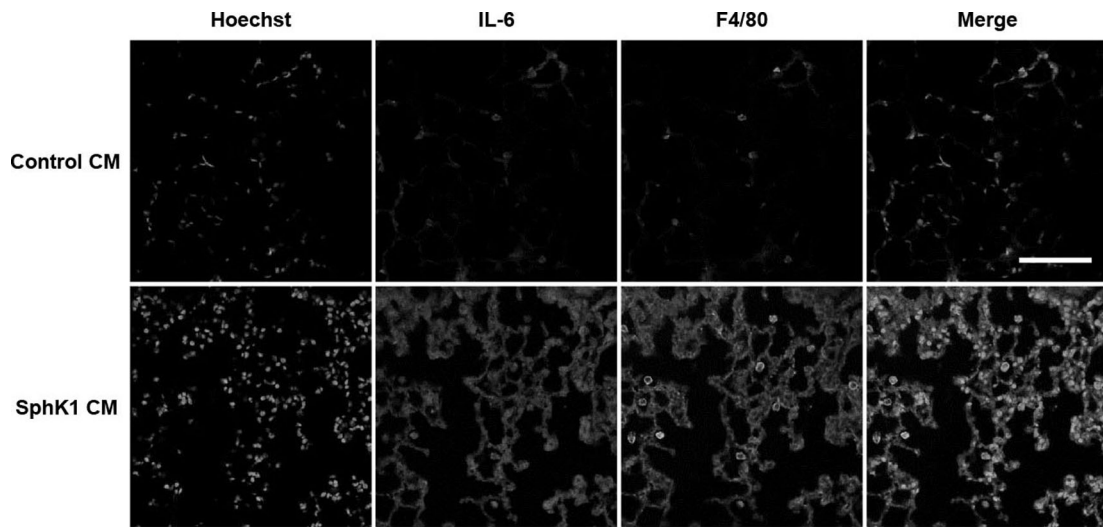


Fig. 4. Immunofluorescent analysis of the lung after the cancer cell challenge

The animals were treated with CM from SphK1-overexpressing E0771 cells (K1) or control E0771 cells (CT) followed by tumor cell challenge. The lungs were analyzed 7days after parental tumor cell challenge. Cells were stained for IL-6, F4/80 and Hoechst. Scale bar: 100 μ m.

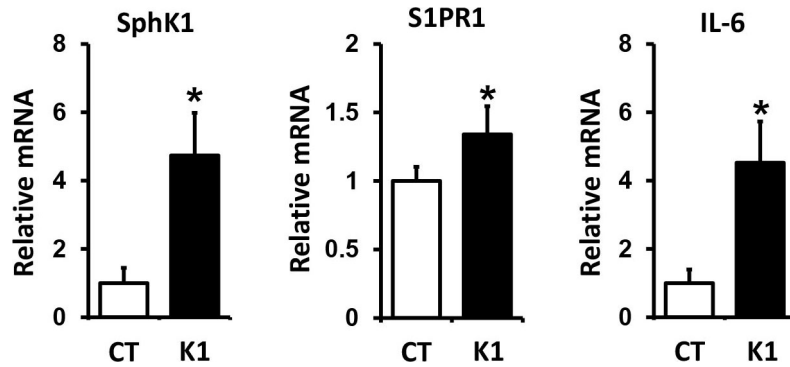


Fig. 5. Expression of SphK1, S1PR1, IL-6, in the lung after the cancer cell challenge
Expression of SphK1, S1PR1, IL-6, in the lung 7days after E0771 breast cancer cell challenge were determined by QPCR and normalized to levels of GAPDH mRNA. Statistical analysis was performed using unpaired two-tailed Student's t-test for comparison of two groups. $P < 0.05$ was considered significant. Data are expressed as means $\pm$ SEM. *, $P < 0.05$.

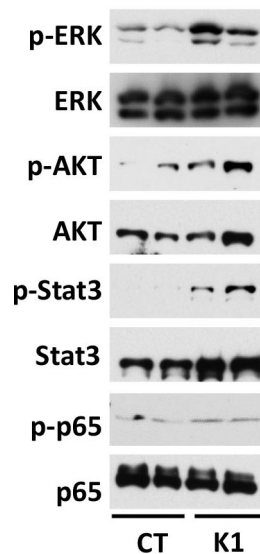


Fig. 6. Expression of p-ERK, p-AKT, p-Stat3 and p-p65 in the lung after the cancer cell challenge
Equal amounts of lung lysates were analyzed by western blotting with the indicated antibodies.

次に、高脂肪食による肥満が、肺における前転移ニッチに与える影響について調べた。マウスは、E0771 細胞培養液の注入を行う前に、あらかじめ高脂肪食、もしくは正常食にて 12 週間飼育され、肥満マウスを作製した。E0771 細胞を注入し、1 週間後に肺を組織学的に調べた (Fig. 2)。肥満マウスの肺は、正常マウスの肺と比較してやや重く、肺転移によって重量が増加している可能性が示唆された (Fig. 7)。実際、病理組織学的に検索を行ったところ、肥満マウスで有意により多くの肺転移を認めた (Fig. 8)。重要なことに S1PR1 の機能的阻害薬である FTY720 は肺の重量増加と肺転移を有意に抑制した (Fig. 7, 8)。免疫蛍光染色により肥満マウスでは正常マウスと比較して、IL-6 の発現が高

く、F4/80 陽性のマクロファージ浸潤が有意に多かった (Fig. 9)。FTY720 は肺における IL-6 の発現とマクロファージの浸潤を抑制した (Fig. 9)。肥満はまた、肺における pERK、pAKT、pStat3、pp65 を増強し、FTY720 はこれらのシグナルを抑制した (Fig. 10)。

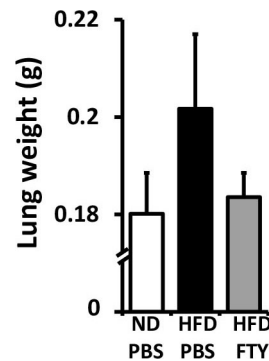


Fig. 7. Lung weight after cancer cell challenge from mice fed with ND or HFD, or HFD plus treatment with FTY720

Lung weight was measured when animals were sacrificed 7 days i.v. injection of E0771 cells. Data are means $\pm$ SEM.

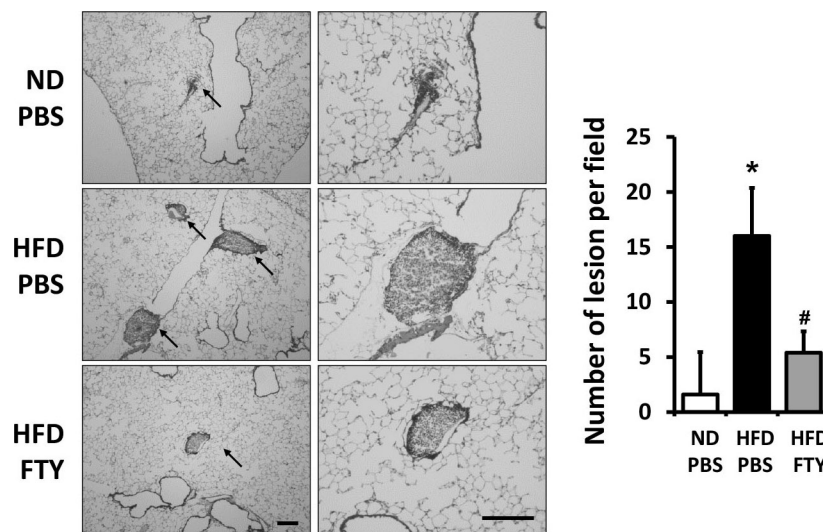


Fig. 8. Hematoxylin and eosin (HE) staining of the lung from mice fed with ND or HFD, or HFD plus treatment with FTY720 7 days after cancer cell challenge

The left panels show lower magnification (x40). Metastatic lesions are indicated by arrows; the right panels show higher magnification (x100). Scale bar, 200 μ m. Number of metastatic lesions was determined under low power fields (x20). Statistical analysis was performed using analysis of variance (ANOVA) followed by post hoc tests for multiple comparisons. $P < 0.05$ was considered significant. Data are expressed as means $\pm$ SEM. *, $P < 0.05$ vs. ND PBS; #, $P < 0.05$ vs. HFD PBS.

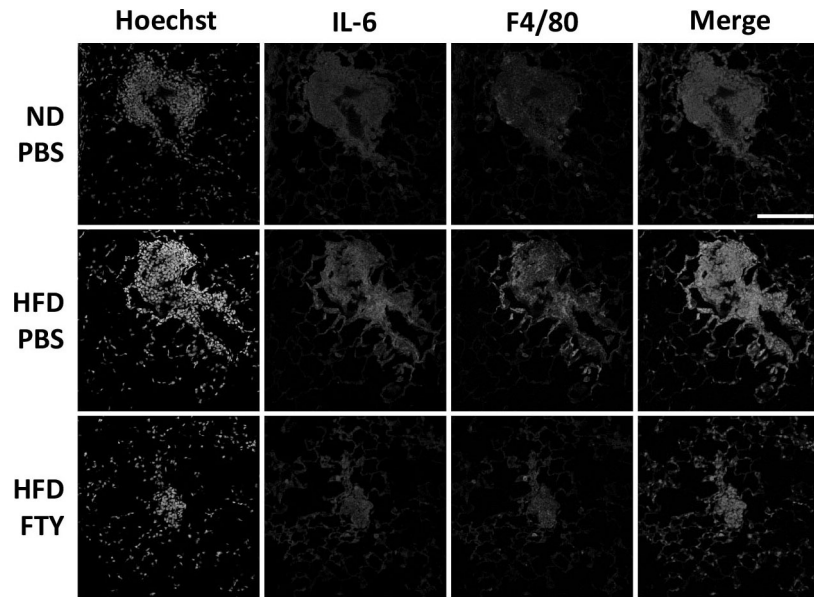


Fig. 9. Expression of SphK1, S1PR1, IL-6, in the lung from mice fed with ND or HFD, or HFD plus FTY720 after the cancer cell challenge
Immunofluorescent analysis of the lungs from mice fed with ND or HFD, or HFD plus FTY720 treatment on day 7 after cancer cell challenge stained for IL-6, F4/80, and Hoechst. Scale bar, 100 μ m.

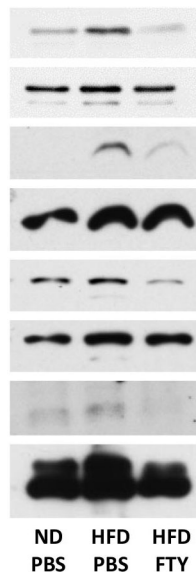


Fig. 10. Expression of p-ERK, p-AKT, p-Stat3 and p-p65 in the lung from mice fed with ND or HFD, or HFD plus FTY720 treatment after the cancer cell challenge
Equal amounts of lung lysates were analyzed by western blotting with the indicated antibodies.

以上の結果より, S1P を多く含む SphK1 過剰発現 E0771 細胞の培養液は前転移ニッチの形成と肺転移を促進した。

このことから、原発巣で産生された S1P は、肺などの遠隔部位の微小環境に影響を与え、マクロファージ等の炎症細胞を引き寄せ、癌の転移を促進していることが推測される。我々はさらに高脂肪食による肥満が前転移ニッチ形成を促進し、FTY720 がニッチ形成と乳癌の転移を抑制することを示した。S1P は乳癌の転移を抑制する治療標的となる可能性がある。

文 献

- 1) Spiegel S, Milstien S. The outs and the ins of sphingosine-1-phosphate in immunity. *Nature reviews Immunology*. 2011;11(6):403-15. Epub 2011/05/07. doi: 10.1038/nri2974. PubMed Central PMCID: PMC3368251.
- 2) Nagahashi M, Hait NC, Maceyka M, Avni D, Takabe K, Milstien S, et al. Sphingosine-1-phosphate in chronic intestinal inflammation and cancer. *Advances in biological regulation*. 2014;54:112-20. Epub 2013/11/12. doi: 10.1016/j.jbior.2013.10.001. PubMed PMID: 24210073; PubMed Central PMCID: PMC3946530.
- 3) Nagahashi M, Matsuda Y, Moro K, Tsuchida J, Soma D, Hirose Y, et al. DNA damage response and sphingolipid signaling in liver diseases. *Surg Today*. 2015. Epub 2015/10/31. doi:10.1007/s00595-015-1270-8. PubMed PMID: 26514817.
- 4) Nagahashi M, Takabe K, Liu R, Peng K, Wang X, Wang Y, et al. Conjugated bile acid-activated S1P receptor 2 is a key regulator of sphingosine kinase 2 and hepatic gene expression. *Hepatology*. 2015;61(4):1216-26. Epub 2014/11/05. doi: 10.1002/hep.27592. PubMed PMID: 25363242; PubMed Central PMCID: PMC4376566.
- 5) Liang J, Nagahashi M, Kim EY, Harikumar KB, Yamada A, Huang WC, et al. Sphingosine-1-Phosphate Links Persistent STAT3 Activation, Chronic Intestinal Inflammation, and Development of Colitis-Associated Cancer. *Cancer Cell*. 2013;23(1):107-20. Epub 2013/01/01. doi: 10.1016/j.ccr.2012.11.013. PubMed PMID: 23273921.
- 6) Nagahashi M, Takabe K, Terracina KP, Soma D, Hirose Y, Kobayashi T, et al. Sphingosine-1-phosphate transporters as targets for cancer therapy. *BioMed research international*. 2014;2014:651727. Epub 2014/08/19. doi: 10.1155/2014/651727. PubMed PMID: 25133174; PubMed Central PMCID: PMC4123566.
- 7) Takabe K, Kim RH, Allegood JC, Mitra P, Ramachandran S, Nagahashi M, et al. Estradiol induces export of sphingosine 1-phosphate from breast cancer cells via ABCC1 and ABCG2. *J Biol Chem*. 2010;285(14):10477-86. Epub 2010/01/30. doi: 10.1074/jbc.M109.064162. PubMed PMID: 20110355; PubMed Central PMCID: PMC2856255.
- 8) Nagahashi M, Ramachandran S, Kim EY, Allegood JC, Rashid OM, Yamada A, et al. Sphingosine-1-phosphate produced by sphingosine kinase 1 promotes breast cancer progression by stimulating angiogenesis and lymphangiogenesis. *Cancer Res*. 2012;72(3):726-35. Epub 2012/02/03. doi: 10.1158/0008-5472.can-11-2167. PubMed PMID: 22298596; PubMed Central PMCID: PMC3289261.
- 9) Nagahashi M, Kim EY, Yamada A, Ramachandran S, Allegood JC, Hait NC, et al. Spns2, a transporter of phosphorylated sphingoid bases, regulates their blood and lymph levels, and the lymphatic network. *FASEB J*. 2013;27(3):1001-11. Epub 2012/11/28. doi: 10.1096/fj.12-219618. PubMed PMID: 23180825; PubMed Central PMCID: PMC3574288.
- 10) Deng J, Liu Y, Lee H, Herrmann A, Zhang W, Zhang C, et al. S1PR1-STAT3 signaling is crucial for myeloid cell colonization at future metastatic sites. *Cancer Cell*. 2012;21(5):642-54. Epub 2012/05/26. doi: 10.1016/j.ccr.2012.03.039. PubMed PMID: 22624714; PubMed Central PMCID: PMC3360884.