65　スキルス胃癌におけるS1P分子機構の解明と臨床的意義

永橋　昌幸

【目的】スキルス胃癌はびまん性浸潤を呈し、腹膜播種を伴うことが多く、極めて予後不良である。次世代シークエンサー解析により、スキルス胃癌は Genomically Stable（GS、ゲノム安定型）サブタイプに分類され、ドライバー遺伝子変異に乏しく、その病態は未だ不明な点が多い。興味深いことに、GS 胃癌ではスフィンゴシン-1-リン酸（S1P）情報伝達経路が亢進していることを示唆するデータが米国 The Cancer Genome Atlas によって報告された（Nature 2014）。S1P は、脂質でありながらタンパク質と同様に細胞表面の受容体に作用することで情報伝達物質として働き、癌の発生や転移に寄与する脂質メディエーターであり、我々はこれまでに S1P の癌における役割について研究を行ってきた。我々は、「脂質メディエーターであるスフィンゴシン-1-リン酸（S1P）の分子機構が GS スキルス胃癌の発癌機序や病態に重要な役割を担っている」と仮説を立て、本研究を企画した。本研究の目的はこの仮説を検証し、新たな治療法開発へ向けた研究基盤を確立することである。

【方法】2009 年から 2015 年までに自施設で手術を施行された胃癌症例 130 例を対象とし、手術切除標本のホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）腫瘍組織を用いて遺伝子解析を行った。EBV-DNA 解析、MSI 解析に加え、435 の癌関連遺伝子の解析データを基に、TCGA により提唱された 4 つの分子サブタイプに分類した。リン酸化 SphK1 抗体を用いて免疫染色を行った。臨床病理学的特徴と pSphK1 の発現強度の関連について検討を行った。

【結果】EBV サブタイプは 4 例（3%）、MSI サブタイプは 13 例（10%）、CIN サブタイプは 72 例（55%）、GS サブタイプは 41 例（32%）であった。免疫染色の結果、89 例が pSphK1 high、41 例が pSphK1 low であった。臨床病理学的因子と pSphK1 を比較検討した結果、Lauren 分類（P = 0.038）、HER2（P = 0.014）、分子サブタイプ（P = 0.048）、pN（P = 0.022）で有意差を認めた。*CDH1* と *RHOA* 遺伝子変異は GS サブタイプに特徴的な遺伝子変異として報告されているが、これらの 2 つの遺伝子変異と pSphK1 の発現強度に関連がないか解析を行ったところ、いずれも遺伝子変異がある症例において pSphK1 の陽性率が高かった（P = 0.049、0.027）。

胃癌 130 例におけるリン酸化スフィンゴシンキナーゼ 1 型（pSphK1）の発現と臨床病理学的特徴

			SphK1		
		全例 (N = 130)	High (N = 89)	Low (N = 41)	*P*
Lauren分類, N (%)	Intestinal	74 (57)	44 (49)	30 (73)	0.038
	Diffuse	35 (27)	30 (34)	5 (12)	
	Mixed	9 (7)	7 (8)	2 (5)	
	Indeterminate	12 (9)	8 (9)	4 (10)	
HER2, N (%)	Positive	19 (15)	8 (9)	11 (27)	0.014
	Negative	111 (85)	81 (91)	30 (73)	
分子サブタイプ, N (%)	EBV	4 (3)	2 (2)	2 (5)	0.048
	MSI	13 (10)	11 (12)	2 (5)	
	CIN	72 (55)	43 (48)	29 (71)	
	GS	41 (32)	33 (37)	8 (20)	
pN (規約14版), N (%)	pN0	37 (28)	27 (30)	10 (24)	0.022
	pN1	27 (21)	9 (17)	17 (29)	
	pN2	19 (15)	15 (10)	10 (24)	
	pN3	47 (36)	38 (43)	9 (22)	

65. スキルス胃癌における S1P 分子機構の解明と臨床的意義

永橋　昌幸

新潟大学 医歯学総合病院 消化器外科

Key words：スキルス胃癌，Genomically stable，脂質メディエーター，スフィンゴシン-1-リン酸，がんゲノム

緒　言

スキルス胃癌は若い女性に多く、組織学的にはびまん性浸潤を呈し、腹膜播種を伴うことが多く治癒切除が困難なことも多い。スキルス胃癌に対する薬物療法は未だ十分な治療効果を得ていないのが現状である。スキルス胃癌は極めて予後不良であることから、さらなる病態解明とそれに基づく新たな治療開発が望まれている。

近年、次世代シークエンサー（Next generation sequencer、以下 NGS）を用いた網羅的遺伝子解析により、癌の原因となるドライバー遺伝子変異が明らかとなってきた[1]。米国国家プロジェクト The Cancer Genome Atlas（TCGA）は NGS 解析データに基づき、胃癌を EB ウイルス（EBV）サブタイプ、マイクロサテライト不安定性（Microsatellite instability、以下 MSI）サブタイプ、染色体不安定性（Chromosomal instability、以下 CIN）型、Genomically stable（GS）サブタイプの 4 つのサブタイプに分類した［2]。スキルス胃癌の多くは GS 型に分類されるが、このサブタイプは癌の病態に関与するドライバー遺伝子変異に乏しく、病態は未だ不明な点が多い。

興味深いことに、GS 胃癌ではスフィンゴシン-1-リン酸（S1P）情報伝達経路が亢進していることを示唆するデータが TCGA によって報告された［2]。S1P は、脂質でありながらタンパク質と同様に細胞表面の受容体に作用することで情報伝達物質として働き、癌の発生や転移に寄与する脂質メディエーターである［3]。我々はこれまでに S1P の癌における役割についてこれまで研究を行ってきた［4〜6]。今回、我々は「GS 胃癌において、実は脂質メディエーターが病態メカニズムに重要な役割を担っている」という仮説を立て、本研究を企画した。本研究の目的は、胃癌外科切除例において、GS 胃癌の臨床病理学的特徴と GS 胃癌における S1P の関与について明らかにすることである。

方法および結果

1.　手術症例の NGS 解析によるサブグループ分類

多施設共同研究で NGS 解析を既に行った胃癌 207 例のうち［7]、自施設で手術を施行された 130 例を対象とした。遺伝子解析には手術切除標本のホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）腫瘍組織を用いて CANCERPLEX®（米国 KEW 社）を用いた。EBV-DNA 解析、MSI 解析に加え、435 の癌関連遺伝子の解析データを基に、胃癌 130 例を TCGA により提唱された 4 つの分子サブタイプ（図 1a）に分類した。EBV サブタイプは 4 例（3%)、MSI サブタイプは 13 例（10%)、CIN サブタイプは 72 例（55%)、GS サブタイプは 41 例（32%）であった（図 1b)。

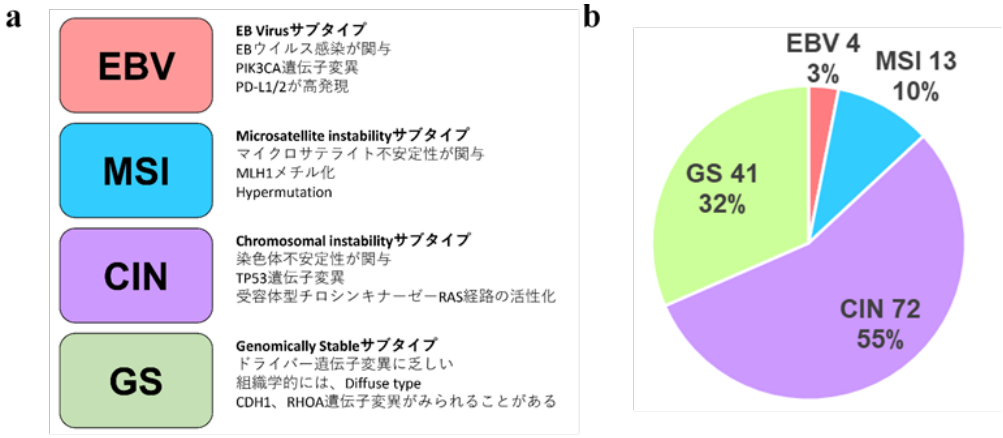


図 1. 遺伝子解析に基づく胃癌のサブタイプ分類

a) 4 つのサブタイプに分類の特徴。各々のサブタイプの臨床及び遺伝子学的特徴を示す。

b) 自験例 130 例における各サブタイプの症例数と割合。

2. 手術症例の免疫染色による S1P 産生酵素の活性化評価

S1P は多彩な生理活性を有し、炎症や免疫など様々な生理機能を制御する脂質メディエーターである。S1P は癌細胞内でスフィンゴシンキナーゼ（SphK1、SphK2）によって産生され、ABC 輸送体などを介して細胞外へ放出、オートクライン・パラクライン作用によって、細胞表面の S1P 受容体を活性化し、癌細胞の増殖や生存に寄与し、癌微小環境で血管・リンパ管新生を促進し、リンパ節転移や遠隔転移を促進する（図 2）。S1P 産生酵素であるスフィンゴシン 1 型キナーゼのリン酸化（pSphK1）を免疫染色により評価することで、腫瘍における S1P 産生能を評価することができる［8～10］。今回我々は、胃癌切除症例 130 例について、pSphK1 抗体を用いて免疫染色を行った。免疫染色の染色強度に従って、0、1＋、2＋、3＋の 4 段階に評価を行い、2＋以上を pSphK1 high と評価した［8～10］。結果、89 例が pSphK1 high、41 例が pSphK1 low であった（図 3）。

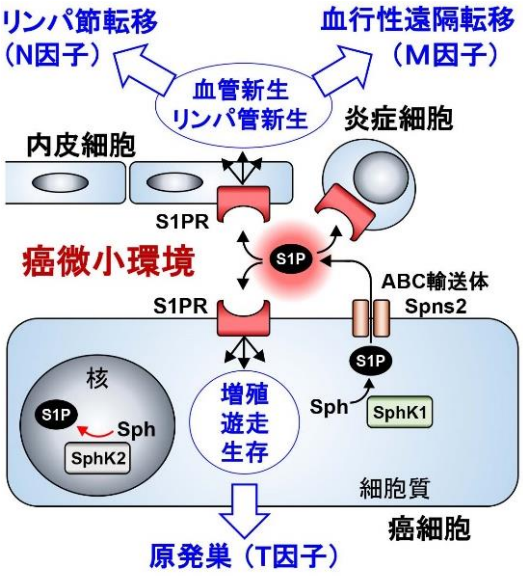


図 2. 癌における S1P 情報伝達系の働き

癌細胞内で産生された S1P は、SphK1、SphK2 によって産生され、細胞外へ放出され、オートクライン・パラクライン作用によって、S1P 受容体（S1PR）を活性化し、癌細胞の増殖や生存に寄与し、原発巣（T 因子）へ関与する。さらに、血管・リンパ管新生を促進し、リンパ節転移や遠隔転移（N、M 因子）を促進する。

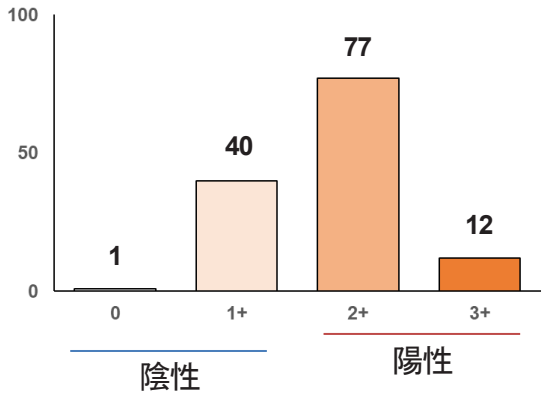


図 3. 胃癌 130 例におけるリン酸化スフィンゴシンキナーゼ 1 型（pSphK1）の発現強度
2＋及び 3＋を陽性、0 及び 1＋を陰性と判定した。

3. 手術切除症例 130 例の臨床病理学的特徴と pSphK1 との関連について

胃癌手術切除症例 130 例の臨床病理学的特徴と pSphK1 の発現強度の関連について検討を行った（表 1）。臨床病理学的因子として、年齢、性別、Lauren 分類、HER2、分子サブタイプ、*CDH1* 遺伝子変異、*RHOA* 遺伝子変異、局在、病理学的腫瘍因子（pT）、病理学的リンパ節転移（pN）、遠隔転移（pM）、リンパ管侵襲（ly）、静脈侵襲（ly）と pSphK1 の発現強度の関連について、Fisher 検定、もしくは X^2 検定により評価した。結果、Lauren 分類（P＝0.038）、HER2（P＝0.014）、分子サブタイプ（P＝0.048）、pN（P＝0.022）で有意差を認めた（表 1）。

表 1. 胃癌 130 例におけるリン酸化スフィンゴシンキナーゼ 1 型（pSphK1）の発現強度

		全例 (N = 130)	SphK1 High (N = 89)	SphK1 Low (N = 41)	*P*
年齢中央値, 歳 (範囲)		68 (27-87)	67 (46-87)	68 (27-85)	0.806
性別, N (%)	男性	92 (71)	62 (70)	30 (73)	0.836
	女性	38 (29)	27 (30)	11 (27)	
Lauren分類, N (%)	Intestinal	74 (57)	44 (49)	30 (73)	0.038
	Diffuse	35 (27)	30 (34)	5 (12)	
	Mixed	9 (7)	7 (8)	2 (5)	
	Indeterminate	12 (9)	8 (9)	4 (10)	
HER2, N (%)	Positive	19 (15)	8 (9)	11 (27)	0.014
	Negative	111 (85)	81 (91)	30 (73)	
分子サブタイプ, N (%)	EBV	4 (3)	2 (2)	2 (5)	0.048
	MSI	13 (10)	11 (12)	2 (5)	
	CIN	72 (55)	43 (48)	29 (71)	
	GS	41 (32)	33 (37)	8 (20)	
CDH1 alteration, N (%)	Positive	23 (18)	19 (21)	4 (10)	0.140
	Negative	107 (82)	70 (79)	37 (90)	
RHOA alteration, N (%)	Positive	11 (9)	9 (10)	2 (5)	0.501
	Negative	119 (91)	80 (90)	39 (95)	
局在, N (%)	GEJ/Cardia	18 (14)	12 (14)	6 (15)	0.870
	Body/Fundus	51 (39)	34 (38)	17 (41)	
	Antrum	61 (47)	43 (48)	18 (44)	
pT (規約14版), N (%)	pT1	2 (1)	1 (1)	1 (2)	0.569
	pT2	23 (18)	16 (18)	7 (17)	
	pT3	52 (40)	33 (37)	19 (46)	
	pT4	53 (41)	39 (44)	14 (34)	
pN (規約14版), N (%)	pN0	37 (28)	27 (30)	10 (24)	0.022
	pN1	27 (21)	9 (17)	17 (29)	
	pN2	19 (15)	15 (10)	10 (24)	
	pN3	47 (36)	38 (43)	9 (22)	
pM (規約14版), N (%)	pM0	107 (82)	72 (81)	35 (85)	0.627
	pM1	23 (18)	17 (19)	6 (15)	
リンパ管侵襲 (ly), N (%)	なし	35 (27)	22 (25)	13 (32)	0.404
	あり	95 (73)	67 (75)	28 (68)	
静脈侵襲 (v), N (%)	なし	55 (42)	39 (44)	16 (39)	0.703
	あり	75 (58)	50 (56)	25 (61)	

CDH1 と *RHOA* は GS サブタイプに特徴的な遺伝子変異として報告されている。次にこれらの 2 つの遺伝子変異と pSphK1 の発現強度との関連について解析を行った（表 2）。いずれも遺伝子変異がある症例の方が pSphK1 の陽性率が高かった（P = 0.049、0.027）。

表 2. CDH1 及び RHOA 遺伝子変異とリン酸化スフィンゴシンキナーゼ 1 型（pSphK1）の発現強度

			SphK1				
		全例 (N = 130)	3+ (N = 12)	2+ (N = 77)	1+ (N = 40)	0 (N = 1)	*P*
CDH1 alt., N (%)	Positive	23 (18)	4 (33)	15 (20)	4 (10)	1 (100)	0.049
	Negative	107 (82)	8 (67)	62 (80)	36 (90)	0 (0)	
RHOA alt., N (%)	Positive	11 (9)	0 (0)	9 (12)	1 (3)	1 (100)	0.027
	Negative	119 (91)	12 (100)	68 (88)	39 (97)	0 (0)	

次に、*TP53* 遺伝子変異や Cell cycle 関連遺伝子変異と pSphK1 の発現の関連性について解析を行った。興味深いことに、*TP53* 遺伝子変異や Cell cycle 関連遺伝子変異は、pSphK1 発現陽性と逆相関の関係を認めた（表 3）。

表 3. *TP53* および Cell cycle 経路遺伝子異常とリン酸化スフィンゴシンキナーゼ 1 型（pSphK1）の発現強度

			SphK1		
		全例 (N = 130)	High (N = 89)	Low (N = 41)	*P*
TP53 alt., N (%)	Positive	72 (55)	43 (48)	29 (71)	0.022
	Negative	58 (45)	46 (52)	12 (29)	
Cell cycle alt., N (%)	Positive	36 (28)	19 (21)	17 (42)	0.021
	Negative	94 (72)	70 (79)	24 (58)	
		GS (N = 41)	High (N = 33)	Low (N = 8)	*P*
TP53 alt., N (%)	Positive	11 (27)	7 (21)	4 (50)	0.178
	Negative	30 (73)	26 (79)	4 (50)	
Cell cycle alt., N (%)	Positive	5 (12)	5 (15)	0 (0)	0.563
	Negative	36 (88)	28 (85)	8 (100)	
		non-GS (N = 89)	High (N = 56)	Low (N = 33)	*P*
TP53 alt., N (%)	Positive	61 (69)	36 (64)	25 (76)	0.346
	Negative	28 (31)	20 (36)	8 (24)	
Cell cycle alt., N (%)	Positive	31 (35)	14 (25)	17 (52)	0.020
	Negative	58 (65)	42 (75)	16 (48)	

Cell cycle related genes: CCND1 CCND2 CCND3 CCNE1 CDK1 CDK12 CDK2 CDK4 CDK5 CDK6 CDK7 CDK8 CDK9 CDKN1A CDKN1B CDKN2A CDKN2B CDKN2C

pSphK1 の免疫染色による評価は、腫瘍における S1P 産生能を間接的に評価する方法であるが、腫瘍凍結切片を用いて、胃癌切除症例における S1P 濃度を質量分析装置により直接計測することも可能である。現在、腫瘍組織における S1P 濃度を解析中であり、pSphK1 発現と比較検証を行う予定である。

4. 動物実験

本研究では、スキルス胃癌自然発生マウスモデルとして、*CDH1*／*TP53* ダブル KO マウスを CRISPR/Cas9 遺伝子編集技術を用いて作製中である。発生した胃癌を細胞株化し、この細胞株の *SphK1* および *SphK2* をさらに KO し、細胞悪性度（増殖能、遊走能、生存能）における SphK1／SphK2 および S1P の役割について、細胞実験により分析する。*CDH1*／*TP53* ダブル KO マウスと、我々は既に作製した *SphK1*KO もしくは *SphK2*KO マウスとを掛け合わせ、スキルス胃癌の発癌や発育浸潤、転移における S1P 分子機構の役割を生化学・病理学的に解析する予定である。

考　察

びまん性浸潤をきたすスキルス胃癌は、TCGA による胃癌のマルチオミクス解析の結果、GS サブタイプ胃癌に分類され、癌の原因となるようなドライバー遺伝子に乏しいことから、その分子メカニズムは網羅的ゲノム解析にも関わらず未だ不明な点が多い。大変興味深いことに、他の 3 つのサブタイプと比較して、GS 胃癌において有意に亢進しているシグナル経路が TCGA において解析された結果、S1P 情報伝達に関連する経路の多くが亢進していることが報告された［2］。今回我々は、胃癌手術症例 130 例において、S1P 産生酵素である SphK1 の発現を解析し、SphK1 が高発現している癌では、組織学的にはびまん浸潤型とリンパ節転移が有意に多く、遺伝子解析データとの比較検討では、GS サブタイプが多い結果が得られた。

S1P は脂質であるがゆえに臨床上、直接測定することが難しくこれまで研究が進んでこなかった背景があり、未だ病態メカニズムが不明である GS サブタイプ胃癌において、実は脂質メディエーターが重要な役割を果たしている可能性が示唆されている。我々は GS スキルス胃癌では、S1P 分子機構が発癌機序や、癌の発育浸潤・転移等の病態に重要な役割を担っていると仮説を立てて本研究を企画したが、解析の結果、S1P 情報伝達系は GS 胃癌と有意に関連しており、SphK1 高発現がみられる腫瘍では、リンパ行性転移が多いという結果が得られた。

SphK1 の高発現は、GS サブタイプ胃癌の特徴の一つである *CDH1* や *RHOA* 遺伝子変異との関連が示唆されたが、一方で、*TP53* や Cell cycle 関連遺伝子変異とは逆相関を認めた。HER2 過剰発現とも逆相関を示しており、S1P 経路は強いドライバーがない症例でより重要な役割を担っている可能性がある。S1P が潰瘍性大腸炎などの炎症性発癌と関連がある［5, 10］ことも考慮すると、S1P 経路が従来の遺伝子変異に基づく発癌過程とは異なる経路で癌化や癌の発育進展に寄与している可能性が高い。

本研究では、今後動物モデルを用いた発癌過程における S1P 情報伝達系の役割解明やそれを基盤とした治療への応用へ向けて研究を継続していく予定である。従来の分子標的薬は、遺伝子変異から生じる蛋白質機能異常を標的としてきたが、本研究において解明する癌転移や薬剤耐性に関わる脂質メディエーターの分子機構は、これまでの癌研究の病態メカニズムとは異なるものであり、薬物療法における新規標的となりうる。これによって、従来の治療法との併用による相乗作用も期待される。また、本研究は胃癌を対象としているが、乳癌や大腸癌をはじめとする他の固形腫瘍においても、生体内で同様に S1P が関与する分子メカニズムが関与している可能性が考えられ、本研究の成果が他の固形腫瘍の治療に応用でされていくことが期待される。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、新潟大学脳研究所モデル動物開発分野の﨑村建司博士、阿部学博士である。本研究にあたり、上原記念生命科学財団よりご支援を頂いたことに心より御礼申し上げます。

文　献

1) Nagahashi M, Shimada Y, Ichikawa H, Kameyama H, Takabe K, Okuda S, et al. Next generation sequencing-based gene panel tests for the management of solid tumors. Cancer Sci. 2019;110(1):6-15. PMID: 30338623 DOI: 10.1111/cas.13837

2) Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. Nature. 2014;513(7517):202-9. PMID: 25079317 DOI: 10.1038/nature13480

3) Nagahashi M, Abe M, Sakimura K, Takabe K, Wakai T. The role of sphingosine-1-phosphate in inflammation and cancer progression. Cancer Sci. 2018;109(12):3671-8. PMID: 30238699 DOI: 10.1111/cas.13802

4) 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. PMID: 22298596 DOI: 10.1158/0008-5472.can-11-2167

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. PMID: 23273921 DOI: 10.1016/j.ccr.2012.11.013

6) Nagahashi M, Yamada A, Katsuta E, Aoyagi T, Huang WC, Terracina KP, et al. Targeting the SphK1/S1P/S1PR1 axis that links obesity, chronic inflammation and breast cancer metastasis. Cancer Res. 2018. PMID: 29351902 DOI: 10.1158/0008-5472.can-17-1423

7) Ichikawa H, Nagahashi M, Shimada Y, Hanyu T, Ishikawa T, Kameyama H, et al. Actionable gene-based classification toward precision medicine in gastric cancer. Genome medicine. 2017;9(1):93. PMID: 29089060 DOI: 10.1186/s13073-017-0484-3

8) Hanyu T, Nagahashi M, Ichikawa H, Ishikawa T, Kobayashi T, Wakai T. Expression of phosphorylated sphingosine kinase 1 is associated with diffuse type and lymphatic invasion in human gastric cancer. Surgery. 2018. PMID: 29370930 DOI: 10.1016/j.surg.2017.11.024

9) Tsuchida J, Nagahashi M, Nakajima M, Moro K, Tatsuda K, Ramanathan R, et al. Breast cancer sphingosine-1-phosphate is associated with phospho-sphingosine kinase 1 and lymphatic metastasis. The Journal of surgical research. 2016;205(1):85-94. PMID: 27621003 DOI: 10.1016/j.jss.2016.06.022

10) Yuza K, Nagahashi M, Shimada Y, Nakano M, Tajima Y, Kameyama H, et al. Upregulation of phosphorylated sphingosine kinase 1 expression in colitis-associated cancer. The Journal of surgical research. 2018;231:323-30. PMID: 30278948 DOI: 10.1016/j.jss.2018.05.085