

論文の内容の要旨

論文題目

スフィンゴシン 1-リン酸の癌転移抑制作用とその機序に関する検討

指導教官 名川 弘一 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 10 年 4 月 入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 山口 博紀

癌転移, 特に血行性転移は, 癌治療における克服すべき課題である. 現在, これに対して化学療法や免疫療法が行われているが, いまだにその治療成績は不十分であるといわざるを得ない. このため, 癌の転移メカニズムを分子生物学的アプローチにより解明し, これに基づいた全く新しい治療法や治療薬を開発することが必要とされている. 癌血行性転移の分子機構解明は, 1973 年の肺選択的高転移能を持つメラノーマ細胞株 B16 F10 の樹立によってその端緒が開かれた. 1990 年代初頭から, この B16 F10 の運動・浸潤を抑制する作用を有する脂質として, スフィンゴシン 1-リン酸 (Sphingosine 1-phosphate, 以下 S1P) は着目されるようになった. S1P は, 細胞膜の成分であるスフィンゴミエリンの代謝経路において, セラミドから生成されたスフィンゴシンがスフィンゴシンキナーゼによりリン酸化されることで生合成される. これまでに, S1P は細胞増殖促進作用および細胞運動制御機能を持ち, 生体内においては血小板に多く含まれ, 血漿には約 0.2 μM 存在することが報告されてきた. 1998 年には S1P は 7 回膜貫通型 G タンパク質共役型受容体の一種である Edg1 (Endothelial Differentiation Gene1) のリガンドであることが判明し, その後, Edg ファミリーの中で, Edg3, Edg5, Edg6, Edg8 が S1P の受容体であることが次々に報告された. これ

以降、細胞間情報伝達物質としての S1P の生理作用とその細胞内シグナル伝達機構の解析が精力的にすすめられている。2000 年には、S1P は Edg5 を介して低分子量 GTP 結合タンパク質 Rac の活性を抑制し、細胞運動を抑制することが報告された。

癌が転移する過程に細胞運動は不可欠の要素である。S1P は B16 F10 に対して運動抑制作用を持ち、また、S1P と N,N,N-trimethyl sphingosine の併用投与によって B16/BL6 メラノーマ細胞の肺転移が抑制されたという報告があることから、S1P が B16 F10 の肺転移抑制作用を有する可能性が十分に考えられた。また、その転移抑制のメカニズムに Edg 受容体と Rac が関与することが予想された。本研究では、ユニークな生理活性作用を有する S1P という新しいリゾリン脂質メディエーターに注目し、S1P による癌転移抑制作用とその機序を解明するために、以下の実験を行った。

まず、S1P 投与による肺転移抑制効果を検討した。C57BL/6 マウス尾静脈内に、Hank's 液に浮遊させた B16 F10 細胞を 1×10^5 個注入し、3 週間後、肺表面に形成された肺転移結節数をカウントした。B16 F10 を静脈注入する直前に S1P 10^{-7} M にて 5 分間前処理することにより、肺転移数は 42% 減少した。B16 メラノーマ細胞をマウス静脈内に注入すると、癌細胞はその直後から肺微小血管内に捕捉され、管外への遊走を開始することが報告されている。本実験で観察されたように、低濃度かつ短時間の S1P 処理によって肺転移が抑制されるためには、この微小血管内捕捉・管外遊走開始という、静脈内投与されてからごく早期の段階での抑制作用の出現が必要であることが推測された。これを確認するため、PKH26 を用いて蛍光標識した B16 F10 を尾静脈内に注入してから一定時間後に肺を摘出、凍結切片を作製し、肺微小血管内に捕捉された癌細胞をレーザー蛍光顕微鏡で観察してカウントし、S1P による影響を調べた。この結果、S1P 前処理によって、静脈注入 10 分後にすでに、捕捉細胞数の 32% の減少が認められた。これら S1P 前処理による肺転移抑制の他に、S1P 10 μ g/日、3 週間腹腔内投与による肺転移数の 45% の減少、および、S1P 前処理と腹腔内投与の併用による 64% の減少が観察され、持続的な抑制機序の存在が示唆された。

次に、S1P が Edg1, Edg3, Edg5 受容体を介し、肺転移、細胞遊走、細胞増殖にどのような影響を与えるかを検討した。B16 F10 に各受容体発現プラスミド (pCAGGS rat Edg1, pME18S human Edg3, pME18S rat Edg5) をリポフェクチ

ンを用いて導入, G418 にて選択維持し, 各 Edg 受容体安定発現細胞を作製した. ノーザンブロッティングにより各受容体の発現状態を確認したところ, それぞれの受容体の過剰発現と内因性 Edg5 の発現が認められたが, 内因性の Edg1, Edg3, Edg6, Edg8 の発現は認められなかった. これらの細胞株と B16 F10 に空ベクターを導入したベクター細胞を実験に用いた. ベクター細胞の肺転移数は S1P 10^{-7} M の前処理により, 56%の減少が認められた. Edg5 細胞は 10^{-9} M の低濃度で 53%の減少が, 10^{-7} M で 81%と著しい減少が認められた. このことから, S1P は Edg5 を介して肺転移を抑制することが強く示唆された. 一方, Edg1 細胞は 10^{-9} M で 165%の増加が, Edg3 細胞は 10^{-9} M で 110%の増加が認められたが, これより高濃度の 10^{-8} M, 10^{-7} M には有意な影響は認められなかった. これらの結果は, ごく低濃度の S1P によって過剰発現した Edg1, Edg3 を介した転移亢進作用が観察され, 高濃度の S1P によっては内因性 Edg5 を介した抑制作用が Edg1, Edg3 を介した亢進作用をしのいだものと推測された. この傾向は細胞遊走実験においても再現された. 細胞遊走の測定には Boyden チャンバーおよび下面をフィブロネクチンでコートした径 8 μ m ポアサイズのフィルターを用い, 上室に細胞浮遊液を, 下室には各濃度の S1P 溶液を入れ, S1P の接触走化性運動に与える影響を検討した. ベクター細胞の細胞遊走は S1P 10^{-7} M にて 56%抑制された. Edg5 細胞は, これより低濃度の 10^{-8} M にて 74%と強く抑制された. また, Edg1 細胞は 10^{-8} M にて 37%亢進する傾向を示したが, 10^{-7} M にて 14%抑制された. Edg3 細胞は 10^{-9} M でわずかに亢進し, 10^{-7} M にて 41%抑制された. 以上より, S1P は Edg5 を介し肺転移と細胞遊走を抑制し, Edg1, Edg3 を介してそれらを逆に亢進することが明らかになった. 細胞増殖能の測定には, MTS tetrazolium compound を用いた. 培養開始 72 時間後, 培養液に MTS を加え 4 時間反応させた後, 分光光度計により 490 nm の吸光度を測定して細胞数を定量した. S1P は 10^{-6} M にて Edg5 細胞の細胞増殖を 28%抑制した. また, 10^{-7} M にて Edg3 細胞を 14%亢進した. いずれも肺転移や細胞遊走に対する影響に比較すると軽度な変化であったが, Edg5 を介した細胞増殖抑制が, 持続的な転移抑制作用を生ずる可能性が示唆された.

つづいて, Edg 受容体とこれらの多彩な作用を結ぶメカニズムとして, 低分子量 G

タンパク質 Rac および Rho に焦点を当て検討した。活性型 Rac は GST-p21-activated kinase (PAK) を、活性型 Rho は GST-Rhotekin を用いて GST 融合タンパク質共沈降法にて回収し、それぞれの抗体を用いてウエスタンブロットイングにて定量した。Rac 活性は、S1P により、ベクター細胞において抑制され、Edg5 細胞においてさらに強く抑制されたが、Edg1, Edg3 細胞においては有意な変化は認められなかった。Rho 活性はすべての細胞で増強したが、Edg3, Edg5 細胞でさらに強く増強された。内因性 Edg5 を考慮すると、Rac 活性は Edg5 で抑制、Edg1, Edg3 で増強され、Rho 活性は Edg3, Edg5 で増強されることが推測された。S1P による肺転移、細胞遊走、細胞増殖の抑制作用は Edg5 を介して観察されたので、これらの機序は、S1P の Edg5 を介した Rac 活性の抑制であることが示唆された。そこで、Rac 活性の抑制が各抑制作用を生ずるかを確認するため、優性不活性型 Rac を B16 F10 にアデノウイルスベクター (N¹⁷Rac) を用いて一過性に発現させ、肺転移、細胞遊走、細胞増殖に与える影響を観察した。この結果、優性不活性型 Rac の発現によって、肺転移は 74%、細胞遊走は 76%、細胞増殖は 18%それぞれ抑制された。また、蛍光標識した癌細胞を用いて肺組織分布を検討したところ、静脈注入 10 分後に肺微小血管内に捕捉された細胞数は、優性不活性型 Rac の発現によって 47%の減少が認められた。これとは逆に、B16 F10 において Rac 活性が増強すると、肺転移が亢進することが予想された。S1P の類縁脂質である LPA (lysophosphatidic acid) を B16 F10 に作用させると Rac 活性の増強が認められた。そこで、B16 F10 を LPA にて 10⁻⁷ M 前処理したところ、肺転移数の 101%の増加が観察された。また、RT-PCR によって B16 F10 に LPA 受容体 Edg2 と Edg4 の発現が確認され、これらの受容体を介した作用であることが推測された。

以上より以下の結論を得た。1) S1P 前処理または腹腔内投与により、肺転移は抑制される、2) S1P は Edg5 受容体を介して、肺転移・細胞遊走・細胞増殖を抑制する、3) これらの作用は、Rac 活性を抑制することにより生じる。なお、S1P は Edg1, Edg3 を介して Rac 活性を増強することにより、転移を亢進させる可能性がある。

本研究が発端となり、癌転移における S1P と Edg 受容体の作用とその機序が全て明らかとなり、これを武器として転移治療に新たな戦略が展開されることを期待する。