

S1P2, the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, negatively regulates tumor angiogenesis and tumor growth in vivo in mice

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/25142">http://hdl.handle.net/2297/25142</a>

## 【総説】

## 第8回 高安賞最優秀賞受賞論文

論文 「S1P<sub>2</sub>, the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, negatively regulates tumor angiogenesis and tumor growth in vivo in mice」

Cancer Research誌

第70巻第2号 772頁~781頁 2010年1月掲載

杜 娃, 多久和典子, 吉岡和晃, 岡本安雄, 権太浩一,  
杉原一司, 深水昭吉, 浅野雅秀, 多久和陽 共著

脂質メディエータースフィンゴシン-1-リン酸受容体S1P<sub>2</sub>は  
マウスにおいて腫瘍血管新生と腫瘍増殖を抑制する

杜 娃 (どう わ)  
多久和 陽 (たくわ よう)

## はじめに

脂質メディエータースフィンゴシン-1-リン酸 (S1P) は、細胞膜脂質スフィンゴミエリンやセラミドの骨格部分をなすスフィンゴシンを前駆体として細胞内で合成され、細胞外に放出され、細胞膜受容体を介して作用する。脂質メディエーターとしてはプロスタグランジンやロイコトリエンが有名であるが、近年S1Pに関する研究が急速に発展し、生体においてプロスタグランジンに劣らず重要な役割を有していることが明らかになってきた。S1Pは、血管内皮細胞、神経細胞、リンパ球を始め様々な細胞に対して、細胞増殖作用、細胞運動・形態調節作用、細胞分化作用など多彩な作用を及ぼす。これらのS1P作用のほとんどは、1998年以降筆者の研究室<sup>1)</sup>を含むいくつかの研究室によって同定された、5種のS1P特異的Gタンパク共役型受容体S1P<sub>1-5</sub>を介して発揮される。5種の受容体のうち、S1P<sub>1</sub>、S1P<sub>2</sub>、S1P<sub>3</sub>は全身のほとんどすべての臓器・組織に広範に発現している主要な受容体であり、細胞内情報伝達経路も詳しく解析されている<sup>2,3)</sup>。S1P受容体のシグナル伝達経路は各受容体サブタイプ間で部分的に共通しているものの、サブタイプごとに独自のシグナル伝達経路を活性化する(図1)。各S1P受容体サブタイプによって活性化されるシグナル伝達経路を筆者らの検討を中心にまとめると、S1P<sub>1</sub>はGiを介して、PI3-キナーゼ-Akt/Rac、Ras-ERK (extracellular signal-regulated kinase) 両経路の活性化、ホスホリパーゼC (PLC) の活性化、アデニール酸シクラーゼの抑制に共役している。S1P<sub>3</sub>は、S1P<sub>1</sub>と同様にGiを介してRas-ERK、

Rac活性化に共役するほか、Gqを介してPLCの活性化に、G12/13を介してRhoの活性化に共役している。S1P<sub>2</sub>はG12/13を介したRho活性化が最も優勢なシグナル経路である。

S1P合成の律速酵素はスフィンゴシンをリン酸化するスフィンゴシンキナーゼ (SphK) である。SphKには2つのサブタイプ、SphK1とSphK2が存在するが、この二つの合成酵素の役割分担は十分に明らかとなっていない。SphK1とSphK2の二重KOマウスは血管系や神経系の発生異常により胎生致死であり、胎児組織中のS1Pは検出レベル以下の低値であることから、生体内でS1Pを合成する酵素はSphK1とSphK2のみであり、これら両酵素が

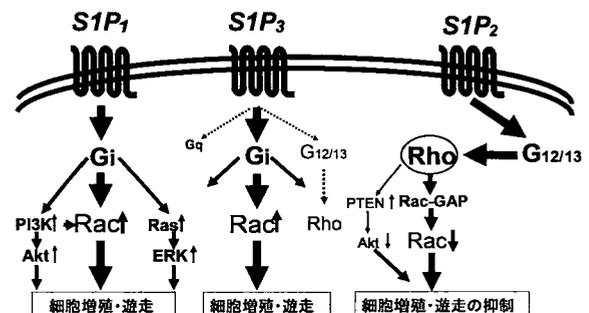


図1. S1P受容体によるRhoファミリー-G蛋白と細胞遊走の二方向性調節

S1P<sub>1</sub>とS1P<sub>3</sub>は主として三量体GタンパクGiを介してAkt, ERK, Racなどを活性化し、細胞増殖、細胞遊走を促進する。一方、S1P<sub>2</sub>はRhoを介してRac抑制、PTEN促進を引き起こし、細胞増殖、細胞遊走を抑制する。

発生に必須の役割をはたす<sup>1)</sup>。

S1Pは血漿中に約 $10^{-7}$  Mオーダーの濃度で存在し、その多くはアルブミンやHDL・LDLなどのリポ蛋白質に結合しており、遊離型S1Pの濃度は10 nM程度と見積もられている。HDL・LDL結合型のS1Pは血液中のS1Pリザーバーとして働いているものと考えられる<sup>2)</sup>。これまでに報告されているHDLやLDLの血管細胞作用の一部はこれらに結合しているS1Pが担っている可能性がある。血漿S1Pの主要な起源は、赤血球と血管内皮であるとの考えが有力である。血清中のS1P濃度は血漿濃度よりも数倍高いが、これは、血小板に豊富に貯蔵されているS1Pが血小板凝集に際して大量に細胞外へ放出されるためと考えられる。

### S1Pと血管新生

S1Pは培養内皮細胞に作用して細胞遊走と、管腔形成を促進する。これらの作用はS1P<sub>1</sub>とS1P<sub>3</sub>受容体を介し、低分子量G蛋白Racが関与している<sup>1,3)</sup>。一般に培養内皮細胞におけるS1P<sub>2</sub>受容体の発現は低い、ある種の内皮細胞ではS1P<sub>2</sub>の発現が比較的高く、このようなタイプの内皮細胞ではS1PはRacを抑制し、内皮細胞の遊走と管腔形成を抑制することを見出している。

S1P<sub>1</sub>ノックアウトマウスでは、胎生期の血管発生においてde novoに脈管を生み出す脈管形成 (vasculogenesis) 及び内皮細胞の増殖、遊走機構により既存の血管から出芽 (sprouting) や陥入によって誘導される血管新生 (angiogenesis) (図2) の段階は、正常に行われた。しかし、このマウスは胎生12.5~14.5日の間に、出血により子宮内で死亡した<sup>2)</sup>。血管の形態異常として、周皮細胞の脱落、中膜平滑筋細胞による被覆が不完全であり、十分に成熟した機能的な血管が形成されなかった。すなわち、S1P<sub>1</sub>ノックアウトマウスでは内皮細胞を裏打ちする血管壁細胞の集積の過程 (血管成熟あるいは安定化) が障害

され、その結果血管壁が脆弱となり出血を引き起こしたものと考えられる。S1P<sub>1</sub>機能の喪失によるこの血管成熟の異常は、内皮特異的S1P<sub>1</sub>ノックアウトマウスの解析により、内皮に発現しているS1P<sub>1</sub>の欠失によるものであることが示された。内皮のS1P<sub>1</sub>は、接着分子N-カドヘリンの発現誘導により、発生期の血管壁に血管平滑筋前駆細胞をリクルートすると考えられる。

### S1Pと腫瘍血管新生

腫瘍の増殖過程において血管新生が重要な役割を果たすことは周知の事実であり、主要な腫瘍血管新生促進因子である血管内皮成長因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) に対する中和抗体ベバシツマブが日本でも既に承認され悪性腫瘍の治療に臨床応用されている。S1Pは、血管成熟促進作用に加え、VEGF等の増殖因子作用を増強する作用も認められており、VEGFと同様に腫瘍血管新生作用を持つと予想された。実際に、米国のグループにより、動物の腫瘍モデルにおいて、S1P特異的中和抗体の投与が腫瘍血管新生を抑制し、腫瘍の増殖を強く抑えることが示された。また、マウスに移植した腫瘍では、血管内皮においてS1P<sub>1</sub>の発現が亢進しており、S1P<sub>1</sub>受容体遺伝子に対するsiRNAの局所投与によりS1P<sub>1</sub>受容体発現を低下させると、腫瘍血管新生が抑制され腫瘍の成長も抑えられることが示された。また、スフィンゴシナアナログであるFTY720 (体内でリン酸化されて生成するFTY720リン酸はS1P<sub>1</sub>, S1P<sub>3</sub>アゴニストとして作用し、特にS1P<sub>1</sub>を脱感作するので機能的S1P<sub>1</sub>アンタゴニストと呼ばれる) を投与することによりS1P<sub>1</sub>をダウンレギュレートすると腫瘍血管新生が抑制された。また、VEGF投与により誘導される血管新生もFTY720投与により抑制されたことから、VEGFの血管新生作用は部分的にS1Pに依存することが示唆された。これらの結果よりS1PはS1P<sub>1</sub>を含む受容体を介して腫瘍血管新生に関係しており、抗S1P療法が将来悪性腫瘍の治療の一つの選択肢となる可能性がある。

### 腫瘍血管新生におけるS1P<sub>2</sub>の役割

上述のように、S1P<sub>1</sub>は腫瘍血管新生促進的に作用することが明らかにされたが、腫瘍血管新生におけるS1P<sub>2</sub>の役割は全く不明であった。著者らはまず、S1P<sub>2</sub>遺伝子座にLacZ遺伝子をノックインしたマウスを樹立し、LacZ活性発現を指標として、各組織におけるS1P<sub>2</sub>発現細胞を同定した。多くの臓器で血管内皮と血管平滑筋がS1P<sub>2</sub>を発現している主要な細胞であった。腫瘍内にもS1P<sub>2</sub>発現細胞が認められた。免疫染色とLacZ活性染色の二重染色により、これらのS1P<sub>2</sub>陽性細胞は、腫瘍血管の内皮細胞と中膜平滑筋細胞の両細胞、および腫瘍内に浸潤している表面マーカーCD11b (骨髄単球系細胞マーカー) 陽性、CD45 (汎骨髄細胞マーカー) 陽性の骨髄由来細胞と同定した。

S1P<sub>2</sub>ノックアウトマウスにルイス肺癌、B16黒色腫両腫瘍細胞を移植したところ、腫瘍増殖が亢進した。抗内

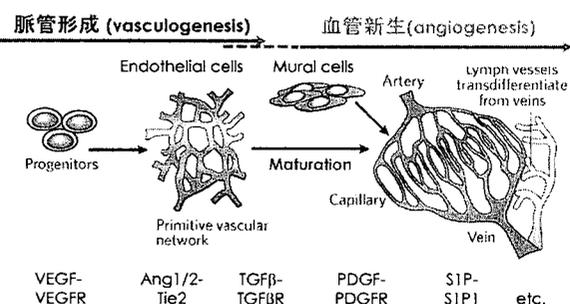


図2. 発生期の血管形成

発生中期に間葉系由来の血管芽細胞から内皮細胞が分化し、増殖・遊走して、原始血管網を形成する (脈管形成)。その後、形成された血管の分岐により、無血管野に血管網が形成されていく (血管新生)。同時に、血管の径拡大、退行、壁細胞の集積 (成熟)、血管の動脈静脈分化がおこる。脈管形成、血管新生、成熟、動脈静脈分化の過程はさまざまな生理活性因子により制御される。(Nature 438巻 p932-936 2005年より引用)

皮マーカー抗体, 抗平滑筋マーカー抗体を用いた免疫染色により,  $S1P_2$ ノックアウトマウスでは野生型マウスと比較して, いずれの腫瘍でも腫瘍内の新生血管密度が増加していた(図3). 腫瘍血管では, 平滑筋・周皮細胞両者のマーカーであるデズミン, 周皮細胞マーカーNG2いずれのマーカー陽性の血管が,  $S1P_2$ ノックアウトマウスで有意に増加しており,  $S1P_2$ ノックアウトマウスでは血管の壁細胞集積の亢進, すなわち血管の成熟・安定化が促進されていた. マウスにFITC標識高分子デキストランを静脈注射した後に摘出した腫瘍の切片を蛍光顕微鏡観察したところ,  $S1P_2$ ノックアウトマウスでは血液灌流のある機能血管の数が実際に増加していることが明らかになった.

マウスから単離した血管内皮細胞の機能を検討したところ,  $S1P_2$ ノックアウトマウスの血管内皮細胞では, 増殖, 細胞遊走, 毛細血管様管腔形成能のいずれも, 野生型内皮細胞に比較して亢進していた. この分子機構として, 細胞運動の分子スイッチである低分子量GタンパクRacの活性亢進および増殖・遊走の両者に関わるリン酸

化酵素Akt活性の亢進が見られた. KOマウス内皮細胞を腫瘍細胞とともに皮下移植したところ, 移植内皮細胞は新生腫瘍血管の内皮に組み込まれ, 野生型内皮細胞の移植に比較して, 血管新生および腫瘍増殖はともに亢進していた. これらの結果より, 内皮細胞の $S1P_2$ は, 腫瘍増殖, 血管新生を抑制することが明らかとなった.

$S1P_2$ ノックアウトマウスでは, 腫瘍内に浸潤している表面マーカーCD11b+, CD45+の骨髄由来細胞が増加し, これらの細胞は $S1P_2$ を発現していた. 単離した野生型マウスの骨髄細胞は $S1P_1$ により遊走が強く抑制されたが,  $S1P_2$ ノックアウトマウスの骨髄細胞では遊走はむしろ促進した. 野生型マウスに $S1P_2$ ノックアウトマウス骨髄を移植すると, 腫瘍増殖と血管新生が亢進した. 一方,  $S1P_2$ ノックアウトマウスに野生型マウス骨髄を移植すると, 腫瘍増殖は低下した.

以上の結果より, 内皮細胞および骨髄細胞の両者に発現している $S1P_2$ 受容体が腫瘍血管新生を抑制し, その結果腫瘍増殖を抑制すると結論された.

#### おわりに

本研究において, 多くの正常臓器において, 血管内皮と血管平滑筋が $S1P_2$ を発現している主要な細胞であることを明らかにした. マウスにおける腫瘍移植モデルにおいて,  $S1P_2$ ノックアウトマウスでは野生型マウスに比較して移植腫瘍の血管新生・成熟が亢進し, 腫瘍増殖が亢進していた. 腫瘍血管の内皮細胞と骨髄由来細胞に発現している $S1P_2$ が, これらの抗腫瘍作用を発揮すると結論された. 血管内皮細胞に発現する $S1P_2$ は細胞遊走, 増殖, 管腔形成を抑制し, この作用はRac活性とAkt活性の抑制を介する. 一方,  $S1P_2$ を発現している骨髄由来細胞は, 腫瘍血管新生に関与するVEGFなどの血管新生因子およびMMPを産生するCD11b+細胞であり,  $S1P_2$ は腫瘍内へのCD11b+細胞の浸潤に抑制的に作用する.

$S1P$ 中和抗体の抗腫瘍効果を考慮すると, おそらく, これらの実験腫瘍モデルにおいては, 内因性 $S1P$ は $S1P_1$ を介した腫瘍血管新生促進が $S1P_2$ を介した抗血管新生効果を上回っており,  $S1P$ の正味の対腫瘍効果は血管新生・増殖の促進と考えられる. しかし, 図4に示すように,  $S1P_1$ 遮断と $S1P_2$ 活性化を同時に講ずることにより, 腫瘍に対する $S1P$ 受容体の正味の効果は, 血管新生抑制, 腫瘍増殖抑制に転ずると期待できる. また, ある種の癌細胞は $S1P_2$ を発現しており,  $S1P_2$ は癌細胞直接の作用により浸潤, 転移を抑制する<sup>5)</sup>. 従って, 腫瘍血管新生を標的とした $S1P_2$ 活性化薬は, 癌細胞に対して直接の抗癌作用をおよぼすことも期待される.

#### 謝 辞

御指導をいただいた多久和典子非常勤講師(石川県立看護大学教授), 吉岡和晃助教, 岡本安雄准教授, 学際科学実験センター浅野雅秀教授に心から感謝いたします. また, ともに研究をし, ご協力, 励ましをいただいた教室員の皆様や共同研究者に深く感謝いたします.

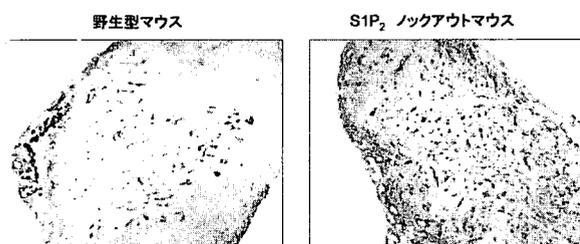


図3. 腫瘍血管の免疫染色像

ルイス肺癌細胞をマウス背部に移植し, 形成された腫瘍を摘出し, 内皮細胞マーカーCD31に対する特異抗体を用いて血管内皮を免疫染色した. 茶褐色のCD31陽性の腫瘍内新生血管が,  $S1P_2$ ノックアウトマウスでは, 野生型マウスに比較してより豊富に認められる.

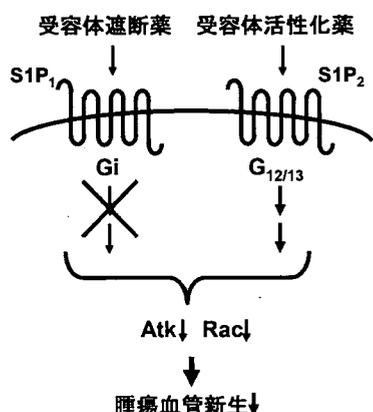


図4.  $S1P$ 受容体を標的とした抗腫瘍血管新生治療法の戦略

腫瘍内の血管内皮細胞には, 血管新生促進的に作用する $S1P_1$ と抑制的に作用する $S1P_2$ の両者が発現している. 血管新生を効果的に抑制するためには,  $S1P_1$ 選択的受容体遮断薬と $S1P_2$ 選択的受容体活性化薬を投与して, 血管新生の鍵となるシグナル分子AktおよびRacをより強く抑制することが有効と考えられる.

## 文 献

- 1) Takuwa Y, Okamoto Y, Yoshioka K, Takuwa N. Sphingosine-1-phosphate signaling and biological activities in the cardiovascular system. *Biochim Biophys. Acta* 2008; 1781: 483-488.
- 2) Okamoto H, Takuwa N, Gonda K, Okazaki H, Chang K, Yatomi Y, Shigematsu H, Takuwa Y. EDG1 is a functional sphingosine-1-phosphate receptor that is linked via a Gi/o to multiple signaling pathways, including phospholipase C activation, Ca<sup>2+</sup> mobilization, Ras-mitogen-activated protein kinase activation, and adenylate cyclase inhibition. *J Biol Chem* 1998; 273: 27104-27110.
- 3) Okamoto H, Takuwa N, Yokomizo T, Sugimoto N, Sakurada S, Shigematsu H, Takuwa Y. Inhibitory regulation of Rac activation, membrane ruffling, and cell migration by the G protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptor EDG5 but not EDG1 or EDG3. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 9247-9261.

4) Du W, Takuwa N, Yoshioka K, Okamoto Y, Gonda K, Sugihara K, Fukamizu A, Asano M, Takuwa Y. S1P2, the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, negatively regulates tumor angiogenesis and tumor growth in vivo in mice. *Cancer Res* 2010; 70: 772-781.

5) Arikawa K, Takuwa N, Yamaguchi H, Sugimoto N, Kitayama J, Nagawa H, Takehara K, Takuwa Y. Ligand-dependent inhibition of B16 melanoma cell migration and invasion via endogenous S1P2 G protein-coupled receptor. Requirement of inhibition of cellular RAC activity. *J Biol Chem* 2003; 278: 32841-51.



## Profile

所 属：米国ペイラー医科大学病理学

2001年：中国医科大学卒業

2010年：金沢大学医学系研究科 (循環医科学  
専攻・血管分子生理学 (旧第一生理学)) 修了

趣 味：読書，映画鑑賞