Effects of overexpression of sphingosine kinase-1 on B16 melanoma growth and in vivo tumor angiogenesis

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	http://hdl.handle.net/2297/19116

【要約】

修士課程優秀論文

癌細胞における生理活性脂質スフィンゴシン-1-リン酸合成酵素スフィンゴシンキナーゼ－1の過剰発現の癌の増殖および血管新生に及ぼす影響

Effects of overexpression of sphingosine kinase-1 on B16 melanoma growth and in vivo tumor angiogenesis

金沢大学大学院医学系研究科血管分子生理学
（生理学第一）
金　子　えりか

はじめに

スフィンゴシンキナーゼ (sphingosine kinase, SK) はスフィンゴシンをリン酸化し，脂質メデイエーターであるスフィンゴシン-1-リン酸 (S1P) を生成する律速酵素である．SKには2つのサブタイプ，SK-1，SK-2があり，ともに全身のさまざまな細胞に広く発現している[1]．

S1Pは細胞増殖促進，アポトーシス抑制，細胞運動調節，などの多彩な生理活性を示す．また，免疫，炎症，癌の成長・浸潤・転移や血管新生などに密接に関連することが明らかになってきた[1,2]．S1Pは細胞膜表面にあるS1P特異的G蛋白共役型受容体ファミリーに結合して作用する．S1P受容体にはS1P1からS1P5の5つのサブタイプがあり，S1P1，S1P2，S1P3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のに対し，S1P4とS1P5の発現はリンパ系組織および肺，神経系および脾臓にそれぞれ限局している．受容体を介する機序とは別に，産生されたS1Pが細胞内ではたらいて，細胞増殖，アポトーシス抑制などの作用を及ぼす可能性も示唆されている．

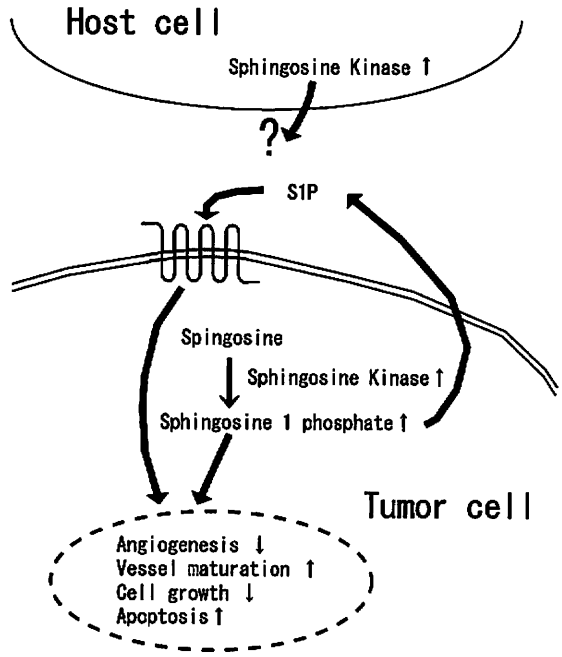
近年，多形神経膠芽腫，赤血白血病，そして大腸がんなど種々のがんで，SK-1 mRNAの発現が亢進していることが報告されている．SK-1の発現量が腫瘍の悪性度を表す浸潤や増殖の程度と相関しており，その患者の生存率とも関係していることが示されている．NIH3T3細胞においてはSK-1過剰発現が，形質転換を引き起こすことが報告されている．また，SK-1ノックアウトマウスでは大腸ガンの形成が抑制されることが示されている[3]．さらに，S1Pは血管内皮細胞の遊走を促し，血管新生を促進させることから，腫瘍血管新生に及ぼす作用も注目されている．これらの知見から，腫瘍におけるS1P作用の解明は重要であると考えられる．

本研究においては，SK-1過剰発現B16BL6メラノーマ細胞株を作成し，マウス移植モデルを用いて，腫瘍細胞内のS1P産生亢進が腫瘍形成に及ぼす影響を明らかにし，この作用が腫瘍血管新生の変化を伴うのかあるいは腫瘍細胞自身への影響によるのかを解析した．

結　果

スフィンゴシン-1-リン酸 (S1P) を生成するスフィンゴシンキナーゼ1 (sphingosine kinase-1, SK-1) を安定的に過剰発現するB16BL6メラノーマ細胞株を樹立した．SK-1過剰発現株は対象のベクター導入株に比較して，SK活性の約9倍の上昇と，細胞内S1P含量の1.9倍の増加を示した．

SK-1過剰発現株とベクター株をC57BL/6Jマウスの側腹部皮下に移植し腫瘍形成を比較したところ，SK-1発現株の腫瘍の成長はベクター株に比較して明らかに低下していた．内皮マーカーである抗CD31抗体や周皮細胞・平滑筋マーカー抗体を用いて腫瘍血管を免疫蛍光染色したところ，SK-1発現株の腫瘍においてCD31陽性の腫瘍新生血管はベクター株より低密度であっ



図．腫瘍細胞内S1P産生亢進が腫瘍に及ぼす影響

た．一方，SK-1発現株では，周皮細胞および平滑筋細胞の血管への集積はむしろ増加し血管成熟は促進していた．SK-1発現株の腫瘍ではS1P2受容体のmRNA発現量はベクター株より軽度に亢進していた．VEGF-Aおよびその受容体mRNAの発現レベルはベクター株と差が見られなかった．SK-1発現株のインビトロでの細胞増殖はベクター株より低下し，スタウロスポリンによるアポトーシスは亢進していた．

考　　察

本研究より，SK-1過剰発現細胞株では，細胞内S1P含量が約2倍に増加し，過剰発現したSK-1がS1Pを過剰に産生していることが示された．インビトロにおいてSK-1過剰発現細胞の増殖能は低下し，一方でアポトーシスが亢進していたことから，インビボで観察されたSK-1過剰発現腫瘍の増殖抑制には，少なくとも部分的にはS1Pの腫瘍細胞に対する直接作用が関与していることが示唆された (図)．

腫瘍細胞内で産生されたS1Pは細胞内で作用した可能性と細胞外に分泌されて細胞表面に存在する受容体を介して作用した可能性の両方が考えられる．S1Pの細胞内作用として細胞増殖や形質転換が報告されているが，一方アポトーシスをひきおこすとの報告もあり，一致を見ない．B16BL6細胞は主としてS1P2受容体を発現しており，この受容体の活性化は細胞生存に重要なタンパクリン酸化酵素Aktを抑制するので，アポトーシス亢進・増殖抑制に関与した可能性は考えられる．また，当研究室では，S1P2受容体は低分子量GタンパクRacの抑制を介してB16メラノーマ細胞の細胞遊走および浸潤を抑制することを既に報告している[4,5]ので，細胞増殖低下やアポトーシス促進の他に，S1P2を介して細胞浸潤を抑制して腫瘍の増殖抑制をきたした可能性も考えられる．

SK-1過剰発現株腫瘍組織でのS1P2 mRNA発現の亢進が観察された．インビトロでは，SK-1過剰発現細胞とベクター細胞の間でS1P2のmRNA発現レベルには差は見られなかったので，間質の宿主由来の血管内皮細胞や血管平滑筋，線維芽細胞，浸潤白血球などのS1P2発現を反映している可能性が考えられる．これらの細胞に発現しているS1P2が腫瘍増殖を抑制したことも考えられる．たとえば，S1P2受容体は内皮細胞遊走を抑制して血管新生を抑制することが示唆されている[2,6]．過剰に産生されたS1Pにより内皮のS1P2受容体が活性化されて血管新生が抑制された可能性は興味深い．

今回の研究において腫瘍細胞内のS1P産生亢進が腫瘍形成・腫瘍血管新生におよぼす影響を示したが，宿主細胞のS1P産生亢進は腫瘍形成・腫瘍血管新生に異なる影響を及ぼす可能性も考えられ．今後，当研究室で確立したSK-1トランスジェニックマウスを用いてこの点を検討する必要がある．

結　　語

以上の結果から，B16BL6メラノーマ細胞におけるSK-1過剰発現はS1Pの産生亢進をきたし，インビボでの移植腫瘍の増殖と腫瘍血管新生に抑制作用を及ぼすことが明らかとなった．

参 考 文 献

1） Spiegel S. et al.: Nat Rev Mol Cell Biol. 2003;4:397-407
2） Takuwa Y. et al.: Biochim Biophys Acta. 2008;1781:483-8
3） Kawamori T. et al.: FASEB J. 2009;23:405-14.
4） Yamaguchi H. et al.: Biochem J. 2003 ;15;374-
5） Arikawa K. et al.: J Biol Chem. 2003 ;29;278:32841-51
6） Inoki I et al. : Biochem Biophys Res Commun. 2006;346:293-300



Profile

2007年3月	金沢大学工学部
	物質化学工学科 卒業
2009年3月	金沢大学大学院
	医学系研究科 修了
同年4月～	横河電機株式会社 勤務