

氏 名 ・ (本籍)	川北 雄太 (秋田県)
専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	医博甲第 951 号
学位授与の日付	平成 29 年 9 月 27 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科 ・ 専攻	医学系研究科医学専攻
学位論文題名	Sphingosine-1-phosphate / sphingosine kinase 1-dependent lymph node metastasis in esophageal squamous cell carcinoma. (スフィンゴシン-1-リン酸 / スフィンゴシン・キナーゼ 1 は食道扁平上皮癌のリンパ節転移を規定する。)
論文審査委員	(主査) 教授 柴田 浩行 (副査) 教授 飯島 克則 教授 田中 正光

学位論文内容要旨

Sphingosine-1-phosphate / sphingosine kinase 1-dependent lymph node metastasis in esophageal squamous cell carcinoma.

スフィンゴシン-1-リン酸 / スフィンゴシン・キナーゼ 1 は
食道扁平上皮癌のリンパ節転移を規定する。

申請者氏名 川北 雄太

研究目的

スフィンゴシン-1-リン酸(S1P)は真核生物細胞膜の構成成分であるスフィンゴ脂質の最終代謝産物であり、細胞内においては主にスフィンゴシンキナーゼ 1(SphK1)によって産生される。S1P は脂質でありながら蛋白質と同じように細胞情報伝達物質として働く脂質メディエーターであり、癌における細胞増殖、遊走、浸潤、血管新生を促進する物質として注目を集めているが、近年の研究によって S1P がリンパ管新生も促進することが明らかとなった。

本研究では SphK1 によって産生された S1P がリンパ節転移を規定すると仮定し、以下の検証実験を行った。

研究方法

食道扁平上皮癌切除標本を用いて、SphK1 発現とリンパ節転移、並びに予後との関連を解析した。2001 年から 2011 年にかけて秋田大学医学部附属病院食道外科にて術前治療なしで食道癌根治術を受けた 177 名の食道癌切除検体から、1 名につき 3 つのコア(0.6mm 計 531 コア)を癌領域からランダムに採取して組織マイクロアレイを作成し、SphK1 の免疫組織化学染色を施行した。SphK1 発現の程度は、2 つ以上のコアで腫瘍全体が強染色を示すもの強陽性、中等度の染色を示すものを中陽性、弱染色を示すもの弱陽性と分類した。そこで、強陽性と中陽性を SphK1 陽性、弱陽性を SphK1 陰性として 2 群間で解析を行った。

次に、マウスリンパ節転移モデルを用いて、リンパ節転移の有無によって血清 S1P 濃度や腫瘍内の SphK1 発現に違いがあるかどうかを検証した。6-8 週齢の雌 C3H/HeN マウスの背部皮下にマウス口腔由来扁平上皮癌細胞である NR-S1M 細胞 5×10^6 個を移植した。5 週間後にマウスを安楽死させ、腫瘍、鼠径リンパ節、血液を採取した。リンパ節転移の有無は HE 染色と抗 pan-cytokeratin 抗体による免疫組織化学染色によって確認し、リンパ節転移陰性群と転移陽性群の 2 群に分けて解析を行った。血清 S1P 濃度は ELISA 法によって測定した。また、腫瘍細胞内の SphK1 発現は、Real-time RT-PCR 法による mRNA 定量とウェスタンブロッティングによる蛋白定量によって評価した。

研究成果

組織マイクロアレイの解析では 177 症例中 127 症例(約 72%)が SphK1 発現陽性であった。多変量解析の結果、SphK1 発現状態はリンパ節転移の有意な寄与因子であった(オッズ比;2.560, 95%信頼区間;1.267-5.177)。さらに、5 年全生存率と疾患特異的 5 年生存率は SphK1 発現陰性患者(n=50)と比較して SphK1 発現陽性患者(n=127)において有意に不良であった(それぞれ Log-rank test P=0.0001, P=0.0012)。

マウスリンパ節転移モデルの解析では、21 個体中 13 個体(約 62%)にリンパ節転移を認め、リンパ節転移陰性群(n=8)と転移陽性群(n=13)での腫瘍体積の中央値[四分位範囲]はそれぞれ 0.29 [0.12-0.50]×10³mm³, 0.29 [0.19-0.86]×10³mm³で、腫瘍重量は 0.65 [0.39-0.88]g, 0.74 [0.52-1.63]g であり、いずれも両群間で有意な差を認めなかった(それぞれ P=0.6121, P=0.4049)。腫瘍内の SphK1 mRNA 発現は転移陰性群で 1.02 [0.81-1.08]、転移陽性群で 1.30 [1.09-2.49]であり、リンパ節転移陽性群で有意に上昇していた(P=0.0272)。一方、蛋白発現も転移陰性群で 0.0076 [0-0.11]、転移陽性群で 0.91 [0.51-1.40]であり、リンパ節転移陽性群で有意に上昇していた(P=0.0004)。また、血清 S1P 濃度は転移陰性群で 2.52 [2.02-2.80]μmol/L、転移陽性群で 3.11 [2.89-5.06]μmol/L であり、リンパ節転移陽性群において有意に上昇していた(P=0.0023)。

結論

脂質メディエーターである S1P とその産生酵素である SphK1 は扁平上皮癌におけるリンパ節転移の発生を規定する因子であり、予後とも関連することが示された。

学位（博士—甲）論文審査結果の要旨

主 査：柴田浩行

申請者：川北雄太

論文題名：Sphingosine-1-phosphate/ sphingosine kinase 1-dependent lymph node metastasis in esophageal squamous cell carcinoma（スフィンゴシン -1- リン酸/スフィンゴシン・キナーゼ 1 は食道扁平上皮癌のリンパ節転移を規定する）

要旨

Sphingosine-1-phosphate (S1P) と sphingosine kinase 1 (SphK1) の食道扁平上皮癌のリンパ節転移への寄与について検証する目的で以下の実験を行った。胸部食道扁平上皮癌の切除標本 177 症例を組織マイクロアレイで解析した。また、リンパ節転移のあるマウスと無いマウスにおいて血清の S1P レベルや腫瘍内の SphK1 の遺伝子発現レベル/蛋白質発現レベルを検索した。177 例中、127 例 (72%) が SphK1 陽性であった。単変量、および多変量解析において SphK1 発現はリンパ節転移と 5 年生存率の予後不良に関する重要な因子であることが示された。マウスのリンパ節転移モデルでは移植した腫瘍の体積と重量はリンパ節転移の有無によらず差はなかったが、移植腫瘍における *SphK1* 遺伝子発現や SphK1 蛋白質の発現量、さらに血清中の S1P レベルはリンパ節転移が有る群で高かった。S1P/SphK1 は食道扁平上皮癌のリンパ節転移阻害の新たな標的となる可能性があり、食道扁平上皮癌リンパ節転移の治療戦略の重要な因子となる可能性がある。

1) 研究の斬新性

食道扁平上皮癌のリンパ節転移における S1P/SphK1 の重要性を示唆した。まず、177 例の胸部食道扁平上皮癌の臨床サンプルを用いて SphK1 の遺伝子発現や蛋白質発現を検索し、SphK1 の発現がリンパ節転移と 5 年生存に関する独立した予後因子であることを示した。食道扁平上皮癌のリンパ節転移の有無は診療上、極めて重要なファクターである。リンパ節転移を起しやすいか否かを原発巣で解析することができれば治療方針の決定に大きな影響を持つ。本研究は食道扁平上皮癌の好リンパ節転移性を原発巣の S1P/SphK1 診断によって可能にすることを示したという点において十分な斬新性が認められる。

2) 研究の重要性

口腔扁平上皮癌細胞株を移植した動物モデルによる検証でも好リンパ節転移性細胞の移植腫瘍では S1P/SphK1 の発現が高いことが示され、食道扁平上皮癌のリンパ節転移における S1P/SphK1 の重要性を示した。

3) 研究方法の正確性

本研究では 177 症例の胸部食道扁平上皮癌の SphK1 を組織マイクロアレイで解析した。また、SphK1 の発現を含む様々な臨床的なパラメーターを用いて単変量解析と多変量解析を行っている。さらに SphK1 発現の有無と生存との関係を Kaplan-Meier 曲線で示した。これらの臨床研究は臨床研究の倫理指針に基づいて行われた。また、C3H マウスを用いた口腔扁平上皮癌細胞株の移植リンパ節転移モデルを用いて SphK1 の発現量や S1P の血中濃度の解析を行っている。実験、データの統計学的処理は正確に行われたと評価される。動物実験はガイドラインや動物愛護の倫理指針に則って実施された。

4) 論旨の明瞭性

本論文「Sphingosine-1-phosphate/ sphingosine kinase 1-dependent lymph node metastasis in esophageal squamous cell carcinoma」は論旨に矛盾や錯誤、また結果解釈の誇張はなく、データに沿って明瞭に記載されている。本論文は *Surgery Today* 誌に 2017 年 3 月に受理、掲載されるなど外部査読においても十分な評価を得ている。

以上の観点から、本論文は学位を授与するに十分な条件を備えているものと判定された。