Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-05

Expressions of Sphingosine-1-phosphate (S1P) Receptors, Sphingosine Kinases in Malignant Bone and Soft Tissue Tumors, and The role of Sphingosine Kinase-1 in Growth of MFH Cell…

岸本，真一郎

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
2010-03-25
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲5039
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005039

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

氏　　名	岸本　真一郎
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学　位　記　番　号	博い第 5039 号
学位授与の　要　件	学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与の　日　付	平成 22 年 3 月 25 日

【 学位論文題目 】

Expressions of Sphingosine-1-phosphate (S1P) Receptors, Sphingosine Kinases in Malignant Bone and Soft Tissue Tumors, and The role of Sphingosine Kinase-1 in Growth of MFH Cell Lines(悪性骨軟部腫瘍における S1P レセプターとスフィンゴシンキナーゼの発現、および MFH 細胞におけるスフィンゴシンキナーゼの役割)

審　査　委　員

主　査　　教　授　南　博信
　　教　授　横崎　宏
　　教　授　平井　みどり

（課程博士関係）

学位論文の内容要旨

Expressions of Sphingosine-1-phosphate (S1P) Receptors, Sphingosine Kinases in Malignant Bone and Soft Tissue Tumors, and The role of Sphingosine Kinase-1 in Growth of MFH Cell Lines

悪性骨軟部腫瘍における S1P レセプターとスフィンゴシンキナーゼの発現、
および MFH 細胞におけるスフィンゴシンキナーゼの役割

神戸大学大学院医学系研究科医科学専攻
整形外科学
（指導教員：黒坂昌弘教授）

岸本　真一郎

（目的）細胞内代謝経路のうち、脂質代謝経路であるスフィンゴシン脂質代謝経路は様々な種類の細胞における増殖、分化、アポトーシスに関与していることがわかっている。スフィンゴシン脂質代謝経路における代謝産物であるセラミド、およびスフィンゴシンは主にアポトーシスあるいは細胞増殖の抑制に働いていると考えられており、一方スフィンゴシンはスフィンゴシンキナーゼによりスフィンゴシン-1-リン酸 (S1P) と代謝されこの S1P は細胞増殖に働くと考えられている。さらにこの S1P は細胞外伝達物質として S1P レセプターを介することにより様々な細胞活性に働く。まず今回我々は、細胞遊走、増殖、分化、アポトーシスに関わっている S1P レセプター及び細胞増殖に対しスウィッチの働きをしているスフィンゴシンキナーゼ（SPHK１）に注目し、悪性骨軟部腫瘍についての発現状況を調べた。そして悪性軟部腫瘍である malignant fibrous histiocytoma（ＭＦＨ）の細胞株を使い、細胞増殖に深く関わっていると考えられるスフィンゴシンキナーゼ（SPHK１）に注目し、MFH 細胞株におけるその蛋白発現と、siRNA を用いて SPHK1 の細胞増殖への影響を調べた。

（方法）当院および他院生検時に採取し、研究目的の使用に同意の得られた悪性骨軟部腫瘍組織２１例（骨肉腫６例、軟骨肉腫３例、ＭＦＨ５例、脂肪肉腫７例）を使用した。これらを RT-PCR 法を用いて、S1P1、S1P2、S1P3 レセプターの発現を検討した。さらに、real-time PCR 法を用いて、SPHK１の発現量を検討した。使用した検体の悪性度の評価法としては、病理検体標本を利用し Ki-67（MIB-1）にて染色することにより低および高悪性度の評価を行った。MFH の細胞株である cell line（Nara F, Nara H, TNMY-1,GBS1）を使用し Western blotting 法にて SPHK1 の蛋白発現を調べた。そして MFH 細胞株を利用

し、SPHK1の発現をsiRNAにて抑制後、real time PCRとWestern blotting法にて抑制効果を調べた。さらにSPHK1の発現を抑制した細胞を用いて細胞増殖への影響を調べた。細胞増殖はWST assayを用いて評価した。

（結果）Ki-67染色では脂肪肉腫が2.2%（1.1～3.1%）、軟骨肉腫が6.4%（4.0～10.1%）、骨肉腫が48%（37～52%）、MFHが35%（24～42%）の染色率であった。一般的にKi-67染色は細胞増殖能を表しており、脂肪肉腫および軟骨肉腫を低悪性度、骨肉腫およびMFHを高悪性度として比較検討した。RT-PCR法では、高悪性度の骨肉腫及びMFHにおいてS1P1、S1P2、S1P3レセプターが全ての株で発現しており低悪性度の軟骨肉腫、脂肪肉腫と比べ発現割合は高かった。低悪性度（軟骨肉腫、脂肪肉腫）と高悪性度（骨肉腫、MFH）とで発現の割合を比較すると、S1P1、S1P2、S1P3レセプターすべてにおいて有意差（$P<0.05$）を認めた。さらに、real-time PCR法では低悪性度（軟骨肉腫、脂肪肉腫）の腫瘍および高悪性度（骨肉腫、MFH）の腫瘍においてSPHK1の発現量に有意差はみとめなかった。Western blotting法では、MFHのcell-lineにおいてすべての株にSPHK1の蛋白発現を認めた。MFHのcell-lineをSPHK1のsiRNAを用いて抑制した結果、それぞれにおいて約50%～80%の遺伝子発現の抑制効果をreal time PCR法にて確認した。Western blotting法にてもSPHK1のタンパク質発現の抑制効果が確認された。それぞれのMFHの細胞株と、SPHK1を抑制した細胞株を培養した結果、すべてのMFHのcell-lineにおいてSPHK1を抑制した細胞の増殖抑制効果がみられた。

（考察）スフィンゴシン脂質代謝経路内において、S1Pはそれ自体細胞内で細胞増殖に、また細胞外では伝達物質としてS1Pレセプターと結合することにより様々な活性を示すことが知られている。そしてスフィンゴシンキナーゼ1（SPHK1）はS1Pを作り出すことにより細胞増殖に関わっていると考えられている。現在様々な細胞でこの作用は認められており、様々な癌腫などでもこの作用は確認されている。しかし悪性骨軟部腫瘍においてはスフィンゴシン脂質代謝経路に関しての研究は現在のところ行われてはいない。今回の検討では、悪性骨軟部腫瘍においても腫瘍によりS1P1、S1P2、S1P3レセプターが発現しており、悪性度においてその発現に差が認められるため、S1Pレセプターが悪性度に関わっている可能性が示唆された。また前述のようにスフィンゴシン脂質代謝経路内において、スフィンゴシンキナーゼ1（SPHK1）は細胞増殖に関わっていると考えられている。今回の検討では、悪性軟部腫瘍MFHのcell lineにおいてすべての細胞にSPHK1の発現を認めた。そしてSPHK1を抑制することにより細胞増殖を抑えられる結果が得られた。このことから今後MFHに対し、SPHK1をターゲットとした治療が効果を得られる可能性が示唆された。

神戸大学大学院医学系研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨

受付番号	甲 第2112号	氏　名	岸本 真一郎
論文題目 Title of Dissertation	悪性骨軟部腫瘍におけるS1Pレセプターとスフィンゴシンキナーゼの発現、およびMFH細胞におけるスフィンゴシンキナーゼの役割 Expression of sphingosine-1-phosphate (S1P) receptors, sphingosine kinases in malignant bone and soft tissue tumors, and the role of sphingosine kinase-1 in growth of MFH cell lines.		
審査委員 Examiner	主　査 Chief Examiner 南 博信 副　査 Vice-examiner 横崎 宏 副　査 Vice-examiner 平井 みどり		

（要旨は１，０００字～２，０００字程度）

細胞内代謝経路のうち、脂質代謝経路であるスフィンゴシン脂質代謝経路は様々な種類の細胞における増殖、分化、アポトーシスに関与している。スフィンゴシン脂質代謝経路における代謝産物であるセラミド、およびスフィンゴシンは主にアポトーシスあるいは細胞増殖の抑制に働いていると考えられており、一方スフィンゴシンはスフィンゴシンキナーゼによりスフィンゴシン-1-リン酸（S1P）に代謝されS1Pは細胞増殖に働くと考えられている。さらにS1Pは細胞外伝達物質としてS1P受容体を介し細胞遊走、増殖、分化、アポトーシスに関わっている。今回の研究では、S1P受容体及びスフィンゴシンキナーゼ（SPHK１）の悪性骨軟部腫瘍における発現を調べた。次にmalignant fibrous histiocytoma（ＭＦＨ）の細胞株を使いスフィンゴシンキナーゼ（SPHK１）の蛋白発現を検討し、siRNAを用いてSPHK1の細胞増殖への影響を調べた。

【材料と方法】

研究目的の使用に同意の得られた悪性骨軟部腫瘍生検組織２１例（骨肉腫６例、軟骨肉腫３例、ＭＦＨ5例、脂肪肉腫７例）を使用し、RT-PCR法によりS1P1、S1P2、S1P3レセプターの発現を検討した。さらに、real-time PCR法を用いてSPHK１の発現量を検討した。使用した検体の悪性度はKi-67（MIB-1）染色で評価した。次に、MFHの細胞株であるcell line（Nara F, Nara H, TNMY-1,GBS1）を使用しWestern blotting法にてSPHK1の蛋白発現を調べ、SPHK1の発現をsiRNAにて抑制後、real time PCRとWestern blotting法にて抑制効果を調べた。さらにSPHK1の発現を抑制した細胞を用いてWST assay法にて細胞増殖への影響を調べた。

【結果】

Ki-67の染色率は脂肪肉腫が2.2%（1.1～3.1%）、軟骨肉腫が6.4%（4.0～10.1%）、骨肉腫が48%（37～52%）、MFHが35%（24～42%）であった。Ki-67染色は細胞増殖能を表しており、脂肪肉腫および軟骨肉腫を低悪性度、骨肉腫およびMFHを高悪性度として比較した。RT-PCR法では、高悪性度の骨肉腫及びMFHにおいてS1P1、S1P2、S1P3受容体が全ての株で発現しており、低悪性度の軟骨肉腫、脂肪肉腫と比べ発現割合が高かった。低悪性度（軟骨肉腫、脂肪肉腫）と高悪性度（骨肉腫、ＭＦＨ）の発現割合は、S1P1、S1P2、S1P3受容体すべてにおいて有意差（$P<0.05$）を認めた。real-time PCR法では低悪性度（軟骨肉腫、脂肪肉腫）の腫瘍と高悪性度（骨肉腫、MFH）の腫瘍でSPHK１の発現量に有意差はみとめなかった。

MFHの細胞株を用いてWestern blotting法で検討した結果、すべての細胞株でSPHK1の蛋白発現を認めた。siRNAを用いてSPHK1を抑制した結果、 real time PCR法では遺伝子発現がそれぞれ約50%～80%抑制され、Western blotting法にてもSPHK1のタンパク発現が抑制されていた。それぞれのMFHの細胞株と、SPHK1を抑制した細胞株を培養した結果、すべてのMFHのcell-lineにおいてSPHK1を抑制した細胞の増殖抑制効果がみられた。

【考察ならびに結論】

スフィンゴシン脂質代謝経路内において、S1P はそれ自体細胞内で細胞増殖に、また細胞外では伝達物質として S1P 受容体と結合することにより様々な活性を示すことが知られている。そしてスフィンゴシンキナーゼ 1（SPHK1）は S1P を作り出すことにより細胞増殖に関わっていると考えられている。現在様々な細胞でこの作用は認められており、様々な癌腫などでもこの作用は確認されている。しかし悪性骨軟部腫瘍においてはスフィンゴシン脂質代謝経路に関しての研究は現在のところ行われてはいない。

今回の検討では、悪性骨軟部腫瘍においても腫瘍により S1P1、S1P2、S1P3 レセプターが発現しており、悪性度においてその発現に差が認められるため、S1P レセプターが悪性度に関わっている可能性が示唆された。また前述のようにスフィンゴシン脂質代謝経路内において、スフィンゴシンキナーゼ 1（SPHK1）は細胞増殖に関わっていると考えられている。今回の検討では、悪性軟部腫瘍 MFH の cell line においてすべての細胞に SPHK 1 の発現を認めた。そして SPHK1 を抑制することにより細胞増殖を抑えられる結果が得られた。このことから今後 MFH に対し、SPHK 1 をターゲットとした治療が効果を得られる可能性が示唆された。

本研究は、悪性骨軟部腫瘍において、その脂質代謝経路の発現および役割について研究したものであるが、現在まで行われていなかったスフィンゴシン脂質代謝経路について重要な知見を得たと同時に、今後悪性骨軟部腫瘍をターゲットとした分子的治療の新たなる材料となりうる点において価値ある業績であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。