

令和元年6月11日現在

機関番号：34428

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11125

研究課題名(和文) 卵巣がんでのセラミドの意義

研究課題名(英文) roles of ceramide in ovarian cancer

研究代表者

北谷 和之(kazuyuki, kitatani)

摂南大学・薬学部・講師

研究者番号：40539235

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：セラミド量の変動は卵巣がん転移の重要因子である可能性が考えられる。本研究では卵巣がん転移におけるセラミドおよび生成・代謝酵素の意義を明らかにした。まずマウス卵巣がん転移モデルから4株の易転移性卵巣がん細胞を樹立した。これらのセラミド量を定量したところ、易転移性細胞ではセラミド量およびセラミド合成酵素2発現が低下することを発見した。さらに卵巣がん腹膜播種マウスモデルにおいて、セラミド合成酵素2の発現を抑えることで播種転移が有意に抑制された。したがって、セラミド合成酵素の発現抑制およびセラミド量低下が卵巣がん転移の原因であると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

セラミドはがん細胞において細胞増殖や運動性を抑える生物活性を有しており、抗転移性脂質であると予測されている。マウス卵巣がんモデルを用いた本研究により、セラミド合成酵素2(CerS2)発現低下およびセラミド量減少が高い転移性を有する卵巣がん細胞の特徴であることを見出した。さらに、CerS2発現をノックダウンすることで、卵巣がん細胞の転移能が低下することを明らかにした。これらの研究成果は、卵巣がん転移におけるセラミドおよび生成酵素の臨床的意義を明らかにするための基盤構築に資すると期待される。さらに、これらの分子生物学的な特徴を活用し、新たながん転移のバイオマーカーの開発が見込まれる。

研究成果の概要(英文)：Ceramide has been emerging as a bioactive lipid that regulate metastatic potential in ovarian cancer. However, whether ceramide contents and metabolism are dysregulated remained unknown. In the present study, I established highly metastatic ovarian cancer cells with ceramide synthesis and identified ceramide-generating enzyme responsible for suppressing cell motility and metastatic potential of ovarian cancer.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：セラミド セラミド合成酵素 転移 細胞運動性 卵巣がん

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体膜には、スフィンゴ脂質、糖脂質、リン脂質、脂肪酸誘導体や中性脂質が存在する。これらのうち、多くの脂質分子が生体恒常性維持に関わる機能性分子として同定されている。

スフィンゴ脂質はスフィンゴシンを基本骨格に有する分子群の総称である。セラミド(図1)はそのスフィンゴ脂質代謝の中心的分子であり、細胞内においてシグナル伝達分子として機能する。セラミドの生成・代謝には多くの酵素が関与し(図2:20種)、セラミド量とシグナルをコントロールする。実際にセラミドを生成・代謝酵素の遺伝的な欠損は重篤なスフィンゴ脂質蓄積症(ゴーシェ病)を引き起こす。よって、セラミド量調節の破綻が疾患の原因である。

セラミドはシグナル伝達分子として細胞応答に関与する:アポトーシス,オートファジーや抗炎症応答。これらには,ホスファチジルイノシトール-3-キナーゼ(PI3K)などの複数の分子がセラミド標的分子として活躍する。セラミドの標的分子への相互作用は,酵素活性を正もしくは負に制御することで細胞応答を調節する。これまでの研究から,セラミド生成・代謝酵素の制御はセラミドシグナル伝達の強度を決定し,本調節の破綻は異常な細胞応答を引き起こすことを明らかにした。このようにセラミドの細胞生物学的な意義は徐々に解明されつつあるが,婦人科腫瘍でのセラミドの臨床的意義は未解明である。

がんは,著しい科学の発展にもかかわらず依然としてヒト生命を脅かす疾患である。患者予後や生活の質は改善されつつあるが,依然として,がんは死を齎す病である。がん細胞では,異常な細胞機能の亢進が特徴的である:細胞運動,浸潤や増殖。これらは,エピジェネティック,融合遺伝子,外因性がん遺伝子,遺伝子変異・欠損,遺伝子発現変動に起因する。これらに起因して細胞内シグナル伝達調節の破綻が生じる。よって,がん細胞特有の生物学および生物応答の解明はがん治療法の開発の礎となる。

がん患者の予後悪化の原因は主にがんの再発や播種転移である。とくに卵巣がんでは腹膜への転移が頻発し,死亡率を著しく高める大きな要因である。よって,卵巣がんの転移を防ぐことで,劇的な患者予後の改善が期待される。卵巣がんでは,がん細胞の上皮間葉転換による運動性および浸潤性の亢進が転移に関与する。このうち,細胞の運動性は特に期待されている播種転移治療の標的である。したがって,この調節の鍵分子を同定することは重要課題である。

播種転移には上皮成長因子などの増殖因子も関与し,PI3Kの活性化がその受容体を介した運動性の亢進を生み出す原動力である。セラミドはPI3Kと相互作用することで本酵素の活性化および運動性の亢進を抑えることが判明した(図3)。さらに,この分子細胞生物学的な知見に加え,マウスモデルにおいてセラミドは卵巣がんの転移を抑える機能性生体分子であることを見いだした。これらを考慮すると,セラミド生成・代謝酵素の調節異常がセラミド量の減弱と細胞運動性の亢進に寄与している可能性が考えられる。

卵巣がん播種転移の克服はがん治療において最難関の課題である。著しい医学の進歩により,転移の機序が徐々に明らかにされつつあり,がん細胞の運動性および浸潤性の亢進が治療標的として注目を浴びている。最新の研究において,申請者は脂質分子セラミドが卵巣がん細胞の運動性を抑えるシグナル伝達分子であることを見出した(Kitatani et al., *Oncogene* 2016)。この新しい知見を考慮すると,生成・代謝調節の破綻によるセラミド量減少が転移の原因の一つであると推察される。そこで,本研究では卵巣がん転移でのセラミドの意義を明らかにする。

図1 スフィンゴ脂質

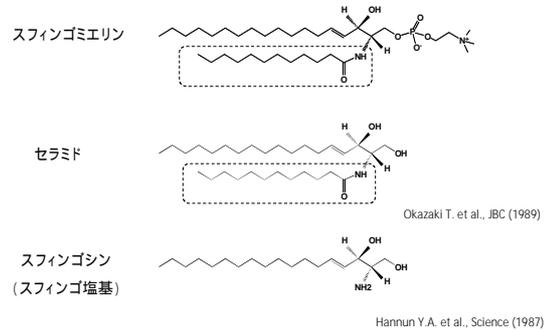


図2 セラミド生成・分解酵素(20 遺伝子)

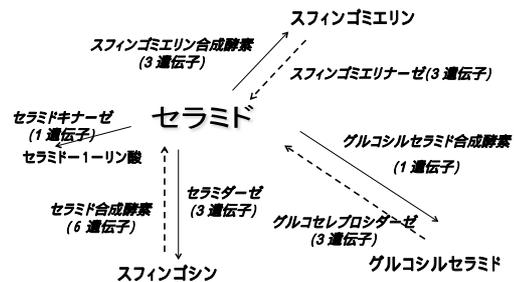


図3 セラミドによる卵巣がん転移の抑制

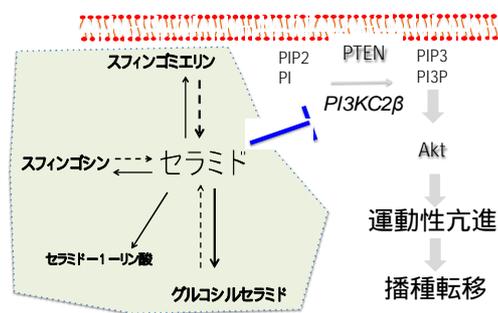
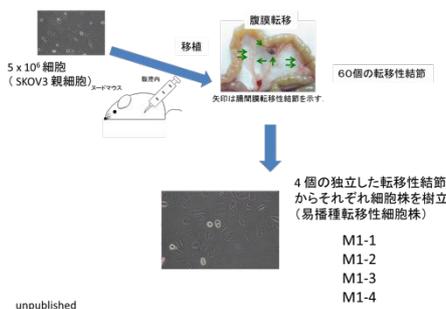


図4 In vivo 転移モデルからの転移性細胞の樹立



2. 研究の目的

セラミド量の変動は卵巣がん転移の重要因子である可能性が考えられる。しかしながら、セラミドの臨床的意義は全く不明である。そこで、本研究では卵巣がん転移におけるセラミドおよび生成・代謝酵素の意義を明らかにする。このために以下 2 つの Aims を実施した。

Aim-1, 転移性獲得の責任遺伝子を同定する。

Aim-2, 卵巣がん転移でのセラミド生成・代謝酵素の病理生物学的意義を解明する。

3. 研究の方法

・細胞培養: 卵巣がん細胞 SKOV3 細胞を 10% FBS 含有 DMEM 中で培養した。

・トランスフェクション: SKOV3 細胞を RNAiMax を用いて、5 nM siRNA でトランスフェクションした。

・セラミド定量: SKOV3 細胞から脂質を抽出した後、質量分析法によりセラミド分子種量を測定した。

・卵巣がん播種転移マウスモデルの作製: 卵巣がん転移モデルは、ヌードマウス (4 週齢、メス) の腹腔内にヒト卵巣がん SKOV3 細胞 (5,000,000 細胞/マウス) を移植することで作製した。移植後、セラミドナノリポソーム製剤を腹腔内に隔日に投与した。移植 4 週間後、マウスを安楽死させた後、マウスを開腹した。腹膜内での転移性結節数を目視下に計測した。直径 1 mm 以上の結節を転移性結節とした。

・易転移性細胞の樹立: 2 匹のヌードマウスに 500 万 SKOV3 細胞を腹腔内に移植し 4 週間後にマウスを安楽死させた。開腹後、複数の転移性結節を採取し、2 週間 10% FBS 含有 DMEM 中で培養した。その後、増殖した 4 株細胞を易転移性卵巣がん細胞とした (M1-1, M1-2, M1-3, M1-4)。

4. 研究成果

4 株の易転移性卵巣がん細胞を樹立した (M1-1, M1-2, M1-3, M1-4, 図 4)。これらのセラミド量を質量分析法により定量したところ、易転移性細胞ではセラミド量が低下することが判明した (図 5)。さらに、セラミド合成酵素 2 (ceramide synthase 2, CerS2) の発現が著しく低下することを発見した (図 6)。

さらに、転移での CerS2 の意義を明らかにするために、卵巣がん SKOV3 細胞の CerS2 をノックダウンした後、ヌードマウスの腹腔内に移植した (図 7)。4 週間後に腹膜転移性結節 (> 1 mm) の数をカウントした結果、CerS2 ノックダウン細胞では転移が増強した。さらに CerS2 ノックダウン細胞では運動性の亢進がみられた。

5. 主な発表論文等

Egiz M., Usui T., Ishibashi M, Zhang X, Toyoshima M, Shigeta S, Usui T, Kitatani K, Yaegashi N. (2019) "Regulation of Cell Motility by La-Related Protein 4 in Ovarian Cancer Cells." *Tohoku J. Exp. Med.*, 247, 59-67

Zhang X., Kitatani K, Toyoshima M., Ishibashi M., Usui T., Minato J., Egiz M., Shigeta S., Fox T., Deering T., Kester M., and Yaegashi N. (2018) "Ceramide nanoliposomes as a

図 5 易転移性細胞でのセラミド量

親株 (Parental) vs 易転移株 (M1, M2, M3, M4)

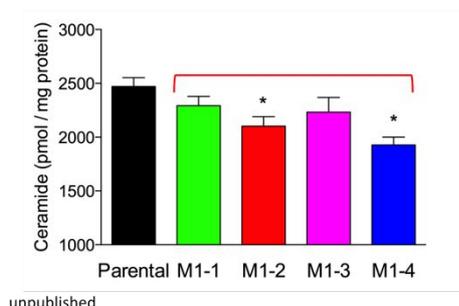


図 6 易転移性細胞における CerS2 発現

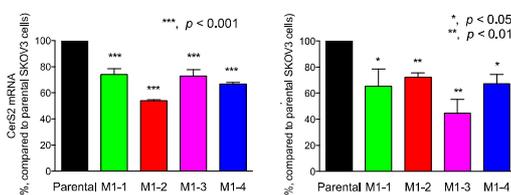
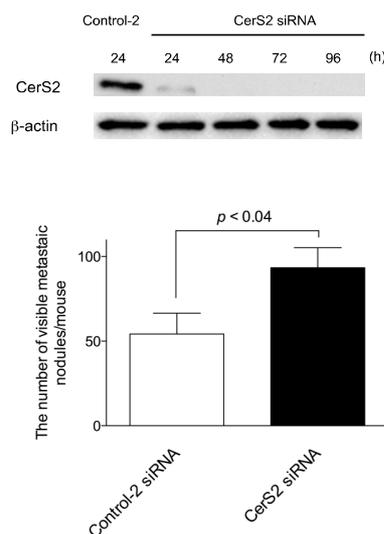


図 7 CerS2 ノックダウンの転移能への影響



MLKL-dependent, necroptosis-inducing, chemotherapeutic reagent in ovarian cancer.”
Mol. Cancer Ther., 17, 50-59

Hasegawa-Minato J, Toyoshima M., Ishibashi M., Zhang X., Shigeta S., Grandori C., Kitatani K. and Yaegashi N. (2018) “Novel cooperative pathway of c-Myc and Furin, a pro-protein convertase, in cell proliferation as a therapeutic target in ovarian cancers” *Oncotarget*, 9, 3483-3496

Ishibashi M, Toyoshima M, Zhang X, Hasegawa-Minato J, Shigeta S, Usui T, Kemp CJ, Grandori C, Kitatani K., Yaegashi N. (2018) “Tyrosine kinase receptor TIE-1 mediates platinum resistance by promoting nucleotide excision repair in ovarian cancer.” *Sci. Rep.*, 8, 13207

〔雑誌論文〕(計 4 件)

〔学会発表〕(計 15 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：

国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等：<http://www.setsunan.ac.jp/~p-yakko/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：