

令和 2 年 4 月 22 日現在

機関番号：33910

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09025

研究課題名(和文) 抗がん剤耐性腫瘍細胞のスフィンゴ脂質代謝の変化とファイトケミカルによる耐性の克服

研究課題名(英文) The alteration of the sphingolipid metabolism of anti-cancer drug resistant tumor cells and the overcome of these resistance by the phytochemicals

研究代表者

村手 隆 (MURATE, Takashi)

中部大学・生命健康科学部・教授

研究者番号：30239537

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)：今回の研究により2つのテーマの論文を完成させた。1つは、パクリタキセル (PTX) 耐性前立腺癌細胞株 PC3-PRと親株 PC-3 を用いて、スフィンゴ脂質代謝系の変化がPTX耐性化機序に関与しているかを検討し、複数の代謝酵素の発現及び酵素活性の変化がPTX耐性化に関与する事を明らかにした。2つ目は、植物ファイトケミカルであるレスベラトロール (RVT) 及びその2量体から8量体まで15種の細胞障害作用を検討し、RVT 4量体VTCの優れた殺細胞効果を確認した。さらに複数の抗がん剤耐性株での有効性とその作用がアポトーシスによる事を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究により、抗がん剤耐性腫瘍細胞におけるスフィンゴ脂質代謝の変化がその抗がん剤耐性の一因となっている事が明らかになり、sphingosine kinase 1あるいはglucosylceramide synthaseの阻害剤あるいはsiRNAが抗がん剤耐性のある程度克服出来る事を示した。更にファイトケミカルであるレスベラトロール4量体のバチカノールCが、レスベラトロールよりも低濃度で強力な殺細胞効果を示す事、さらにはその効果発現にもバチカノールCがスフィンゴ脂質代謝酵素の発現レベルを修飾する事が一因である事を証明した。我々の研究が、将来の臨床応用にむけて追求すべき研究分野を提示した。

研究成果の概要(英文)：We have published 2 papers concerning this research project. The first one is the analysis of paclitaxel (PTX)-resistance prostate cancer cell line (PC3-PR) and its parental cell line (PC3) (BBRC 2017). PTX increased cellular ceramides of PC3 but not PC3-PR and that PC3-PR exhibited increased expression of sphingosine kinase 1 and glucosylceramide synthase as well as decrease of acid and neutral sphingomyelinases. The alteration of these enzymes could modulate PTX sensitivity. The second one is the analysis of resveratrol (RVT) oligomer, vaticanol C (VTC). Based on the previous paper describing the superior cytotoxicity of VTC to RVT (Carcinogenesis 2003), we analyzed RVT and its oligomers, and confirmed the robust cytotoxicity of VTC. Further analysis showed that anti-cancer drug resistant cancer cells with different mechanisms were all sensitive to VTC due to the apoptotic mechanism. We also found that VTC increased cellular ceramides and decreased cellular S1P.

研究分野：スフィンゴ脂質代謝

キーワード：tumor cell anti cancer drug resistance paclitaxel resveratrol vaticanol C sphingolipid apoptosis

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

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

1. 研究開始当初の背景

スフィンゴ脂質代謝産物は、細胞内あるいは細胞間の情報伝達物として細胞増殖、細胞運動、細胞死等への関与が注目されており、特に細胞内セラミド/スフィンゴシン 1 リン酸の細胞内比率が重要と考えられている (スフィンゴ脂質レオスタット)。代謝経路での代謝産物構造のわずかな違いが、細胞に対して全く逆の作用を有することが興味深く、その関連すると考えられている領域は、悪性腫瘍、生活習慣病、変性疾患、免疫異常など非常に多岐に及ぶ。これら代謝産物の比率の調節は、代謝酵素の発現レベルならびに活性の調節が主要な役割を演じている。

我々は、これまでにスフィンゴ脂質代謝酵素の発現量定量 RT-PCR (Leukemia 2006) とスフィンゴ脂質代謝産物の LC/MS/MS での測定系を樹立し、抗がん剤投与時のスフィンゴ脂質レオスタットモデルを検証した (Int J Hematol 2008)。Sphingosine kinase 1 (SPHK1) に着目し、生体組織での SPHK1 の局在 (J Histochem Cytochem 2001) と、各種細胞での **SPHK1** 発現調節を報告した (BBA 2003, BBA 2005, J Neurochem 2005)。RET 遺伝子変異による悪性腫瘍 MEN2 での腫瘍化過程への SPHK1 の関与を明らかにし (J Neurochem 2007)、フレンド赤白血病細胞の分化誘導過程での SPHK1 発現減少とその意義を解明した (BBA 2013)。さらに、SPHK2 (J Cell Biochem 2015)、ASMase, Ceramide kinase および S1P lyase 等の酵素についても、それらの発現調節機序を報告してきた (J Biol Chem 2002, BBA 2011, J Cell Biochem 2011)。ここ最近の研究では、C1q/TNF-related protein (CTRP)-1 の心臓の急性虚血性変化に対する抑制効果とスフィンゴ脂質代謝との関連 (FASEB J 2016)、セラミド合成酵素 **6** (CERS 6) の肺がん転移への関与を報告した (J Clin Invest 2016)。更に LC-MS/MS による代謝産物の詳細な解析結果から、これまで看過されて来たセラミド誘導体の低酸素刺激によるプロファイルの変化を初めて報告した (Glycoconj J 2015)。

2. 研究の目的

本申請では予備実験に基づき、タキソイド系抗がん剤パクリタキセル (PTX) 耐性株での耐性化機序におけるスフィンゴ脂質代謝酵素、なかでもスフィンゴシンキナーゼ 1 (SPHK1) の変化の関与の解析を進める。パクリタキセル PTX は、治療中に耐性が生じることが临床上深刻な問題となっている。上記 SPHK1 の変化が腫瘍細胞に普遍的に起こりうる現象か否かは、SPHK1 阻害剤の臨床的応用の判断に重要である。我々が最近興味を持って解析を行っている植物の微量有効成分 (ファイトケミカル) での抗がん剤耐性腫瘍細胞の増殖抑制・細胞死と細胞内スフィンゴシン脂質代謝との相関の解析を今回の主な解析テーマとする。特に RVT の 4 量体バチカノール C (VTC) は、RVT より低濃度での抗がん作用が、共同研究者である野澤博士ら (当時岐阜国際バイオ研) により報告されているが、その作用機序は未だ明らかにされていない。VTC の抗がん作用の作用機序を解明し、VTC の抗がん剤多剤耐性悪性腫瘍ないし白血病への将来の臨床応用の可能性を検証する。

3. 研究の方法

第 1 テーマ: 実験モデルとして解析しようとするヒト前立腺癌細胞株 **PC3** とそのパクリタキセル (PTX) 耐性株 PC3-PR は、基本的な遺伝的背景が同一であると考えられることから、より厳密に臨床で経験される耐性化 (薬剤暴露に対する腫瘍細胞の適応現象) の機序を探ることが可能である。予備的な細胞内セラミドおよび S1P の質量分析による測定ならびに主要なスフィンゴ脂質代謝酵素の発現量定量 RT-PCR の結果から、PC3-PR での SPHK1 高発現を興味ある知見として確認しており、SPHK1 の PTX 耐性化への関与、さらには SPHK1 高発現に至る細胞内シグナル伝達系について解析を行い、将来の臨床応用の可能性を念頭にして **SPHK** 阻害剤の有

用性を検証した。

第2テーマ： ファイトケミカルによる抗がん剤耐性機序の克服の問題を取り上げる。例えば食物由来のレスベラトロール(RVT)は、高濃度では細胞障害作用を果たすことが示され、その臨床的有用性が期待されている。我々も最近、RVTによる抗がん作用には、スフィンゴ脂質代謝の変化(酸性スフィンゴミエリナーゼの活性上昇)が重要であることを明らかにした(BBRC in press 2016)。しかし、その抗がん作用には高濃度のRVTが必要とされ、臨床的なRVTの有用性は現状では困難とされている。そこで、長年の我々の共同研究者である野澤博士らのRVT 4量体VTCの報告(Carcinogenesis 2003)をもとにして、この物質の更なる解析を行う。代謝酵素遺伝子発現測定ならびに酵素活性の測定系を行い、PC3, PC3-PRそれぞれの腫瘍細胞内のスフィンゴ脂質代謝あるいは情報伝達系の変化を解析することによって、将来の臨床的な検査法への展開の可能性を探る。予備実験では、白血病細胞株K562とその抗がん剤ダウノルピシン耐性株、あるいは前立腺癌細胞株PC3とパクリタキセル耐性株に対して、VTCの強力な細胞増殖抑制ないし細胞死誘導を観察しているため、この系を中心にしてスフィンゴ脂質代謝からみた機序の解明へと実験を進める。

4. 研究成果

第1のテーマに関して： タキソイド系抗がん剤は固形腫瘍の治療に汎用されているが、症例により無効だったり、治療の経過で耐性が出現して大きな問題となっている。我々は、パクリタキセル(PTX)耐性前立腺癌細胞株PC3-PRとその親株PC-3を用いて、スフィンゴ脂質代謝系の変化がこの耐性化機序に関与していないかどうかを検討した。PTX(20 nM)はPC-3の細胞増殖を抑制し、細胞内セラミドを増加させたが、PC3-PRではそのような変化は認められなかった。また、PC3-PRは親株PC3に比してsphingosine 1-phosphate(S1P)の増加を認め、それはPTX処理によっても変化しなかった。Western blottingによる蛋白の発現レベルの解析では、PC3-PR細胞株はPC3細胞株に比べてsphingosine kinase 1(SPHK1)及びglucosylceramide synthase(GCS)の増加と、酸性スフィンゴミエリナーゼ(ASMase)と中性スフィンゴミエリナーゼ(NSMase 2)の低下が明らかとなった。SPHK1 siRNAあるいはSPHK1活性阻害剤は、PC3-PR細胞のS1Pレベルを低下させ部分的にそのPTX耐性を減弱させた。同様に、GCS阻害剤(PDMP及びPPMP)はPC3-PR細胞の細胞内セラミドを増加させ、PC3-PR細胞の増殖を抑制した。さらに、プロテアゾーム阻害剤やヒストン脱アセチル化酵素阻害剤は、PC3-PR細胞のSMaseの活性を上昇させ、細胞内セラミドレベルの上昇と増殖の抑制を招いた。これらの結果は、スフィンゴ脂質代謝酵素の発現並びに活性の変化が、セラミドとS1Pとの比として理解されているスフィンゴ脂質レオスタットを変化させ、PTXに対する耐性化機序に関与している事を示している。

第2にテーマに関して： 植物由来のレスベラトロール(RVT)は、高濃度では細胞障害作用を果たすことが示され、その臨床的有用性が期待されている。我々も最近、RVTによる抗がん作用には、スフィンゴ脂質代謝の変化(酸性スフィンゴミエリナーゼの活性上昇)が重要であることを明らかにした(BBRC 2016)。しかし、その抗がん作用には高濃度のRVTが必要とされ、臨床的なRVTの有用性は現状では困難とされている。そこで、長年の我々の共同研究者である野澤博士らのRVT 4量体パチカノールC(VTC)の報告(Ito et al. Carcinogenesis 2003)をもとにして、この物質の更なる解析を行った。共同研究者の伊藤博士(岐阜薬科大学)から供与されたRVTを含めその2量体から8量体まで計15種の物質の細胞障害作用を検討し、上記の伊藤らの報告のごとくVTCが最も優れた殺細胞効果を示す事を確認した。3種類の異なった抗がん剤に対して親株とそ

の耐性株をそれぞれ用意して検討した所、親株、耐性株共にVTCに感受性を示し、またその作用がカスパーズ阻害剤 ZVAD-FMK で阻害されるアポトーシスによるものである事を確認した。VTCはsphingosine kinase 1 and 2, glucosylceramide synthaseの発現を強く抑制し、細胞内セラミドを増加させ、sphingosine 1-phosphate (S1P) レベルを低下させた。S1Pの添加がVTCの殺細胞効果を抑制した。またSPHK1, SPHK2, GCSの阻害剤を用いた実験から、これらの酵素レベルの変化がceramide, S1Pの細胞内レベルを変化させ、細胞死を引き起こす原因の一つである事を、初めて明らかにした。

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kawamoto Y, Kondo H, Hasegawa M, Kurimoto C, Ishii Y, Kato C, Botei T, Shinya M, Murate T, Ueno Y, Kawabe M, Goto Y, Yamamoto R, Iida M, Yajima I, Ohgami N, Kato M, Takeda K.	4. 巻 163
2. 論文標題 Inhibition of mast cell degranulation by melanin.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochem Pharmacol.	6. 最初と最後の頁 178-193
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bcp.2019.02.015.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Otaka N, Shibata R, Ohashi K, Uemura Y, Kambara T, Enomoto T, Ogawa H, Ito M, Kawanishi H, Maruyama S, Joki Y, Fujikawa Y, Narita S, Unno K, Kawamoto Y, Murate T, Murohara T, Ouchi N.	4. 巻 123
2. 論文標題 Myonectin Is an Exercise-Induced Myokine That Protects the Heart From Ischemia-Reperfusion Injury.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Circ Res.	6. 最初と最後の頁 1326-1338
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/CIRCRESAHA.118.313777.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Inoue C, Sobue S, Aoyama Y, Mizutani N, Kawamoto Y, Nishizawa Y, Ichihara M, Abe A, Hayakawa F, Suzuki M, Nozawa Y, Murate T.	4. 巻 15
2. 論文標題 BCL2 inhibitor ABT-199 and JNK inhibitor SP600125 exhibit synergistic cytotoxicity against imatinib-resistant Ph+ ALL cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Rep.	6. 最初と最後の頁 69-75
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrep.2018.07.001.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Aoyama Y, Sobue S, Mizutani N, Inoue C, Kawamoto Y, Nishizawa Y, Ichihara M, Kyogashima M, Suzuki M, Nozawa Y, Murate T.	4. 巻 486
2. 論文標題 Modulation of the sphingolipid rheostat is involved in paclitaxel resistance of the human prostate cancer cell line, PC3-PR	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communication	6. 最初と最後の頁 551-557
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2017.03.084	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Inoue C, Sobue S, Kawamoto Y, Nishizawa Y, Ichihara M, Abe A, Hayakawa F, Suzuki M, Nozawa Y, Murate T.	4. 巻 525
2. 論文標題 Involvement of MCL1, c-myc, and cyclin D2 protein degradation in ponatinib-induced cytotoxicity against T3151(+) Ph+leukemia cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communication	6. 最初と最後の頁 1074-1080
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.02.165	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Inoue C, Sobue S, Aoyama Y, Mizutani N, Kawamoto Y, Ichihara M, Suzuki M, Nozawa Y, Abe A, Hayakawa F, Murate T, Nishizawa Y.
2. 発表標題 BCL2 and JNK signaling pathway as the therapeutic target of imatinib-resistant Ph1-ALL cells, NphA2/STIR and MR87/STIR
3. 学会等名 第40回日本分子生物学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	鈴木 元 (Suzuki Motoshi) (80236017)	藤田医科大学・医学部・教授 (33916)	
連携研究者	京ヶ島 守 (Kyogashima Mamoru) (50225091)	日本薬科大学・薬学部・教授 (32425)	