

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2007～2008

課題番号：19890181

研究課題名（和文） スフィンゴ脂質代謝に着目した抗がん剤の神経障害メカニズムの解明

研究課題名（英文） Mechanism of anti-cancer drug induced neurite toxicity focused on sphingolipid metabolism

研究代表者

中村 光浩 (NAKAMURA MITSUHIRO)

岐阜薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：30433204

研究成果の概要：

抗がん剤治療の現場で末梢神経障害は大きな問題となっている。我々は細胞の生と死に深く関与する細胞内情報伝達物質のスフィンゴ脂質に着目して、抗がん剤による末梢神経障害メカニズムを検討した。本研究のために、質量分析装置による高感度スフィンゴ脂質分析法を開発した。神経細胞様の培養細胞を抗がん剤処理したところ細胞死に関与すると考えられる特異的なスフィンゴ脂質（セラミド）が上昇することを明らかとした。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,010,000	0	1,010,000
2008 年度	1,220,000	366,000	1,586,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,230,000	366,000	2,596,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学

キーワード：シグナル伝達、癌、脂質、薬理学、脳・神経

1. 研究開始当初の背景

がん化学療法において副作用はほぼ必発であり、その発現を防止軽減することはがん化学療法の有用性を高める上できわめて重要である。抗がん剤の主な副作用の一つに末梢神経障害（しびれ）がある。現在のところ末梢神経障害に対して確立した治療法はない。また障害の回復が非可逆的となる場合があることも報告されている。がん治療で広い適応を持つシスプラチン（CDDP）、大腸癌の標準治療レジメンの FOLFOX（オキサリプラチン+ロイコボリン）、乳がん治療のパクリタキセルなど末梢神経障害が投与制限毒性とな

る化学療法は少なくない。従って、抗がん剤投与による末梢神経障害のメカニズムを明らかにする臨床のニーズは極めて大きいといえる。

抗がん剤の副作用による末梢神経障害のメカニズムには神経細胞への直接障害、神経細胞に連続した軸索の一部の障害が考えられているが、その詳細は殆ど明らかになっていない。

近年、各種がん細胞に抗がん剤処理することにより細胞死が誘導されることが知られており、様々な細胞内情報伝達系の関与が報告されている。特にスフィンゴ脂質代謝は細

胞の生存・死に重要な役割を演ずるとされ、スフィンゴミエリンの分解により生産されるセラミドは細胞死誘導に、スフィンゴシンキナーゼ (SPHK) により産生されるスフィンゴシン 1-リン酸 (S1P) は、特異受容体を介して生存シグナリングを活性化させ、細胞生存に関与することが示唆されている。

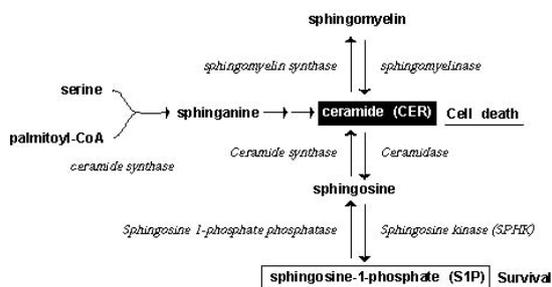


図 1 スフィンゴ脂質の代謝経路

Pisano ら (Clin. Cancer. Res. 9, 5756-5767, (2003)) は神経成長因子 (NGF) で分化させた PC12 細胞が CDDP により神経障害を生じたと報告している。また、Noda ら (J. Neurooncol. 52, 11-21, 2001) は、C6 glioma 細胞を CDDP 処理することにより細胞内セラミドが上昇し細胞死に至ることを報告している。しかし、末梢神経障害メカニズムとスフィンゴ脂質代謝を関連づけた研究はほとんど無い。

以上の点をふまえ、我々は、細胞増殖・細胞死に関与するスフィンゴ脂質代謝に着目し、分子生物学的手法を用いて抗がん剤による末梢神経障害発現メカニズムを明らかにしようとした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、抗がん剤治療の現場で大きな問題となっている末梢神経障害メカニズムをスフィンゴ脂質代謝に着目して解明することである。我々は LC-MS/MS によるスフィンゴ脂質代謝物の定量法を新たに開発し、分子生物学的手法を組み合わせる研究を行なうことを計画した。本メカニズムを解明することにより得られる知見は、抗がん剤治療の発展に寄与するものであり、末梢神経障害の症状を軽減する薬剤の探索・開発にも応用可能であると考えられる。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養：

PC12 は、10%FBS、5%HS、100 U/mL ペニシリン G および 100 U/mL ストレプトマイシンを含む D-MEM 培地 (高グルコース) を用い、5% CO₂ を含む 37°C のインキュベーター内で培養した。細胞を播種後、培地を 1 % (v/v) FBS、100 U/mL ペニシリン G および 100 U/mL ストレプトマイシンを含む D-MEM 培地 (高グルコース) に交換し 12

時間培養する。更に 50 ng/mL NGF を添加して 36 時間培養後、各種濃度の CDDP およびデセン酸 (DA) に 12 時間暴露させた。

(2) CDDP 処理による細胞死の測定：

PC12 細胞株に CDDP 処理を行い、MTT アッセイにて IC₅₀ を測定する。

(3) CDDP 処理による SPHK の変化：

ウエスタンブロッティングによる SPHK の蛋白発現量で評価した。

(4) LC-MS/MS を用いたスフィンゴ脂質代謝物定量法の確立：

我々のセラミド (C₁₆-、C₁₈-、C₂₄-セラミド)、S1P の変化を測定できる測定法の概略を以下に示す。PC12 細胞から酸性条件下にスフィンゴ脂質抽出を行い、液体クロマトグラフ-四重極タンデム型質量分析装置 (LC-MS/MS) により、C₁₆-、C₁₈-、C₂₄-セラミドおよび S1P の各標品を用いて分離定量を行う。LC は、オクタデシルシリカ-C₁₈ の逆相系カラムを用い、移動相として A: 水/トリフルオロ酢酸 (TFA) (100:0.1, v/v)、B: アセトニトリル/TFA (100:0.1, v/v)、C: アセトン/TFA (100:0.1, v/v) のグラジエント条件とした。MS/MS 検出は、エレクトロスプレーイオン化法 (+) でマルチプルリアクションモニタリングを設定して行う。本測定法は質量分析装置の特長をもつことから C₁₆-、C₁₈-、C₂₄-のアシル鎖毎にセラミドを分析できる。従って、抗がん剤処理により変化するセラミドが、セリンおよびパルミトイル CoA による *de novo* 合成由来か (C₁₆-、C₁₈-セラミド)、スフィンゴミエリン由来か (C₂₄-セラミド) といった全く新しい情報を得ることが出来た。

(5) CDDP 処理による細胞内シグナルの変化

4. 研究成果

我々は、LC-MS/MS によるセラミドおよび S1P を高感度、高選択的に定量できるスフィンゴ脂質分析系を開発した。本測定系は新規抗がん剤耐性バイオマーカーの探索、検証に有用と考えられた。

	溶出時間 (min)	MRM (m/z)	コーン電圧 (V)	コリジョンエネルギー (eV)
C17 S1P (IS)	3.6	366.2 > 250.4	25	17
S1P	3.7	380.2 > 264.4	25	17
DHS1P	3.7	382.2 > 284.3	30	17
C16 CER	4.9	538.2 > 520.4	25	11
C18 CER	5.2	566.5 > 548.4	25	11
C24 CER	6	650.6 > 632.5	20	11

表 1 スフィンゴ脂質の MS 条件

次に、神経増殖因子 (NGF) 添加により神経様細胞に分化させた PC12 細胞 (ラット褐色

細胞腫)を CDDP 処理したところ、濃度依存的な突起伸長の退縮を認めた。しかし、当該 CDDP 濃度において PC12 細胞生存率は変化しないことを見出した(図 1、2)。

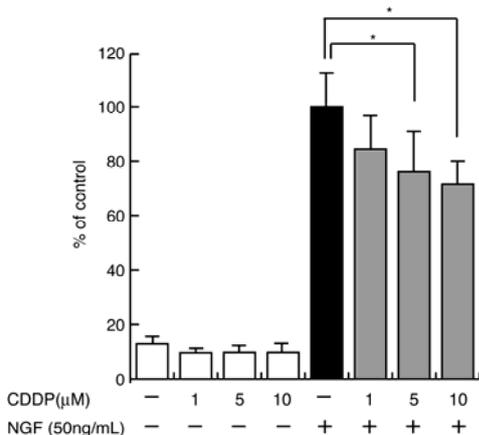


図 1. Effect of CDDP on PC12 neurite

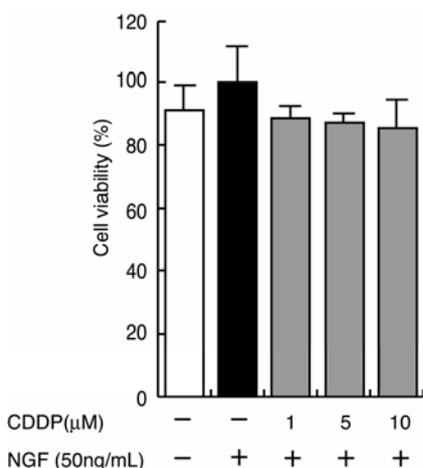


図 2. Dose-dependent effects of CDDP on the cell viability. PC12 cells were treated with the indicated concentration of CDDP for 12 hr. Cell viability was analyzed by MTT assay

突起伸長に関与すると考えられた SYNAPSIN あるいは GAP-43 の活性化は影響を受けなかった。

細胞増殖・細胞死に関与するスフィンゴ脂質代謝物を、LC-MS/MS 用いた分析法を用いて定量した。NGF により分化させた PC12 細胞に CDDP 処理を行ったところ、細胞死に関連すると考えられる特定のアシル鎖のセラミドの上昇を観察した。また、神経幹細胞の神経分化誘導作用を有するデセン酸(DA)が、NGF により神経様細胞に分化させた PC12 の突起伸長に対する CDDP の退縮効果を抑制することを見出した。DA あるいはその構造類縁体の末梢神経障害治療薬としての可能性が考えられた。

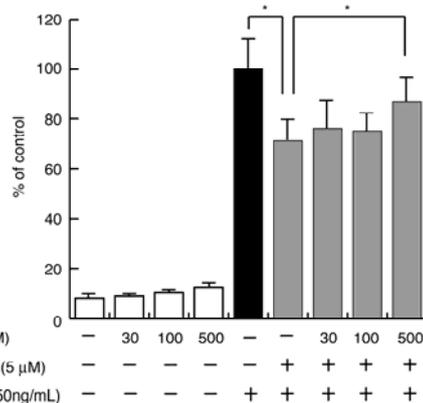


図 3 Effect of decenoic acid on CDDP-induced neurite retraction

一方、増殖に関与すると考えられるスフィンゴシンキナーゼの活性化は認められなかった。Noda らの (J. Neurooncol.、52、11-21、2001)、C6 glioma 細胞を CDDP 処理することにより細胞内セラミドが上昇し細胞死に至ることを報告からも、神経様細胞に分化させた PC12 の CDDP による細胞障害においてセラミド等のスフィンゴ脂質代謝物の関与が示唆された。

以上の結果から抗癌剤による末梢神経障害にスフィンゴ脂質代謝が関与していると考えられた。今後 MALDI-TOFMS により CDDP 処理によるスフィンゴ脂質代謝プロファイルをより詳細に検討し抗癌剤による末梢神経障害メカニズムを明らかにしていく予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- (1) Nemoto S, Nakamura M, Osawa Y, Kono S, Itoh Y, Okano Y, Murate T, Hara A, Ueda H, Nozawa Y, Banno Y. Sphingosine kinase isoforms regulate oxaliplatin sensitivity of human colon cancer cells through ceramide accumulation and AKT activation. *J Biol Chem* **284**, 10422-10432. (2009) (査読有)
- (2) Nakamura M, Ohmori T, Itoh Y, Terashita M, Hirano K. Simultaneous determination of benzodiazepines and their metabolites in human serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using a high resolution octadecyl silica column compatible with aqueous compounds. *Biomed Chromatogr* **23**, 357-364 (2009) (査読有)

- (3) Sobue S, Nemoto S, Murakami M, Ito H, Kimura A, Gao S, Furuhashi A, Takagi A, Kojima T, Nakamura M, Ito Y, Suzuki M, Banno Y, Nozawa Y, Murate T. Implications of sphingosine kinase 1 expression level for the cellular sphingolipid rheostat: relevance as a marker for daunorubicin sensitivity of leukemia cells. *Int J Hematol* **87**, 266-75 (2008) (査読有)
- (4) Ohmori T, Nakamura M, Tada S, Sugiyama T, Itoh Y, Udagawa Y, Hirano K. A highly sensitive assay for ritodrine in human serum by hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **861**, 95-100 (2008) (査読有)

[学会発表] (計6件)

- (1) 河野早紀、竹下未希、中村光浩、根本聡、坂野喜子、土屋照雄、伊藤善規、大腸がんのスフィンゴ脂質による抗がん剤感受性の調節機構、日本薬学会第129年会 2009年3月27日(京都)
- (2) 中村光浩、根本聡、原明、土屋照雄、坂野喜子、抗がん剤による末梢神経障害に及ぼすデセン酸の影響、第2回高次機能性食品(蜂産品)研究講演会 2008年8月9日(岐阜)
- (3) 河野早紀、竹下未希、根本聡、中村光浩、伊藤善規、土屋照雄、村手隆、野澤義則、坂野喜子、大腸癌細胞のスフィンゴ脂質代謝による抗癌剤感受性の制御機構、第3回スフィンゴテラピ研究会 2008年7月18-19日(鳥取)
- (4) 根本聡、中村光浩、村手隆、岡野幸雄、原明、野澤義則、坂野喜子、スフィンゴ脂質代謝による抗癌剤感受性の制御機構、第50回日本脂質生化学会 2008年6月5-6日(徳島)
- (5) 中村光浩、根本聡、伊藤善規、原明、坂野喜子。LC-MS/MSを用いたスフィンゴ脂質代謝産物同時定量法の開発。日本薬学会第128年会、2008年3月26-28日(横浜)
- (6) 根本聡、中村光浩、伊藤善規、祖父江沙矢加、村手隆、原明、野澤義則、坂野喜子: LC-MS/MSを用いたスフィンゴ脂質代謝産物の簡易定量法の試み。第2回スフィンゴテラピ研究会、2007年5月26-27日(鳥取)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村光浩 (NAKAMURA MITSUHIRO)
岐阜薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号 : 30433204

- (2) 研究分担者
なし
- (3) 連携研究者
なし