

機関番号：13901
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20590566
 研究課題名(和文) リゾリン脂質代謝酵素の腫瘍性疾患における発現異常とその病態への関与の解析
 研究課題名(英文) Involvement and abnormality of lysosphingolipid metabolic enzymes in malignant diseases
 研究代表者
 村手 隆(MURATE TAKASHI)
 名古屋大学・医学部・教授
 研究者番号：30239537

研究成果の概要(和文)：

sphingosine 1-phosphate lyase (SPL)の転写調節：ヒト肺がん細胞株でSPL高発現としてH1155を、低発現株としてH1299を用いた。SPL活性およびmRNAはH1155が高く、細胞内S1PはH1299が高値であった。SPL転写と関連が示唆された転写因子GATA-4も、H1155にのみ発現していた。SPLプロモーター解析で5'側上流に2つのSp1 siteを含む重要領域を同定したが、GATA結合部位は認められなかった。EMSA及びChIP assayにてSp1がこれらSp1 siteに結合しGATA-4はプロモーターに直接結合せずSp1との複合体形成によりSPL転写を刺激する事を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：

The gene expression of human sphingosine 1-phosphate lyase (SPL) catalyzing sphingosine 1-phosphate (S1P) remains to be determined. Among 5 human lung cancer cell lines examined, SPL protein levels paralleled the respective mRNA and enzyme activities. Between H1155 and H1299 cells used for further experiments, lower cellular S1P was observed in H1155 with higher SPL activity compared with H1299 with lower SPL activity. Previous reports by others have shown that GATA-4 affect *SPL* transcription in *Dictyostelium discoideum*. GATA-4 was observed in H1155 but not in other cell lines. Promoter analysis of human *SPL* revealed that the most important region was located between -136 bp and -88 bp from the first exon, where 2 Sp1 sites exist but no GATA site. Electrophoresis mobility shift assay (EMSA), chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay, reporter assay using reporter with mutated binding motif suggest the major role of Sp1 in *SPL* transcription and no direct binding of GATA-4 with this 5' promoter region. The collaborative role of GATA-4 was proved by showing co-immunoprecipitation of Sp1 and GATA-4. Thus, high *SPL* transcription of H1155 cells was regulated by Sp1 and GATA-4/Sp1 complex formation, both of which bind to Sp1 sites of the 5' -SPL promoter.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：リゾスフィンゴ脂質の生化学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：セラミド、スフィンゴシン1リン酸、スフィンゴシンキナーゼ1、スフィンゴシンキナーゼ2、セラミドキナーゼ、中性スフィンゴミエリナーゼ2、スフィンゴシン1リン酸リアーゼ、転写調節、ホスホリパーゼD1、ホスホリパーゼD2。

1. 研究開始当初の背景

細胞は外界からの刺激に対応して細胞の形態や機能を柔軟に変化させて自らの生存あるいは死を制御している。環境の急激な変化に速やかに対応するには、秒あるいは分単位での活性調節、作用場所の変化が重要であり、蛋白の修飾ことにリン酸化などがその機序とされている。しかしながら細胞の生存や分化と行ったある程度の時間経過を伴う事象においてはむしろタンパク量の変化に伴う酵素活性や細胞内小器官の量的変化が調節機序の主体となっている。我々が本研究を開始した時点ではリゾスフィンゴ脂質あるいはスフィンゴ脂質代謝酵素の発現調節機序の解明は十分になされてはいなかった。

2. 研究の目的

近年スフィンゴ脂質代謝産物は代謝の過程でのそのわずかな構造変化が細胞の運命の決定に主要な役割を果たしうる事が提唱され認知されるようになってきた。上記の背景で述べたごとく、細胞とくに腫瘍細胞の特性をスフィンゴ脂質代謝の観点から理解する事は細胞生物学的興味ばかりでなく、治療手段としてこれら酵素活性の調節例えば阻害剤の開発等によって従来の抗がん剤では治療の限界が示されている悪性腫瘍における新規抗がん化学療法につながる可能性が想定される。我々は同一癌腫においても多様な発現レベルを呈するスフィンゴ脂質代謝酵素を主要な解析の標的として、細胞株のモデルを用いスフィンゴ脂質代謝酵素遺伝子の転写を特異的に正にあるいは負に調節する刺激因子ならびにその詳細な調節機序の解明を目指した。

3. 研究の方法

これまでの3年間の研究期間に我々は種々のモデル、とくに細胞株を用いて実験を行ってきた。それらは癌遺伝子 ras や v-Src の導入細胞株を用いたスフィンゴシンキナーゼ 1 (SPHK1) の解析、薬剤耐性の異なる大腸がん細胞株、白血病細胞株での薬剤耐性とスフィンゴシンキナーゼ 1 および 2 の解析、抗がん剤投与時の細胞死と中性スフィンゴミエリナーゼ (NSMase) 遺伝子発現との相関、肺がん細胞株におけるスフィンゴシン 1 リン酸リアーゼ (SPL) の発現調節機序解明、脂肪細胞の分化におけるホスホリパーゼ D 1 (PLD1) の役割とその発現機序など多岐にわたる。一部の実験では実際の白血病および骨髄異形成症候群の患者骨髄検体を用いた解析を行なって成果をあげた。

実際の実験戦略としては細胞株を主に用いた細胞生物学的な解析で、まず解析対象の生物学的あるいは臨床医学的な意義を確認の

後に、定量ないし半定量 RT-PCR にて mRNA を定量しその後主として 5 側の遺伝子プロモーターをクローニングして解析をスタートさせた。それぞれの系にて特異的な転写因子への応答責任部位が同定されれば、結合している転写因子を electrophoresis mobility shift assay (EMSA) ならびに chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay、DNA pull-down assay 等にて同定し場合によっては精製した転写因子タンパクでの転写活性化の再現実験を試みた。

4. 研究成果

文献1 の SPL については巻頭で概要を述べたのでそれ以外の論文化されたテーマについて得られた結論を簡潔に述べる。

文献2 前脂肪細胞株 3T3L1 株を既報の方法により脂肪細胞に分化させたときに、PLD1 発現が上昇する事を見いだした。プロモーター解析の結果から 2 つの C/EBP 転写因子結合部位が同定され、脂肪分化刺激に伴い細胞内 cAMP の増加による C/EBP β がこの部位に結合する事が転写増強の主要な機序である事を明らかにした。

文献3 神経芽細胞腫 SH-SY5Y と神経系分化刺激因子 all *trans*-retinoic acid (ATRA) を用いて分化誘導時にセラミドキナーゼが減少する事、それが分化の結果ではなく原因の一つになりうる事を証明した。さらにはその分子機序にはこの細胞株特異的に ATRA に反応する抑制系の転写因子 COUP-TFI が retinoic acid receptor (RAR α and RXR α) と複合体を形成して転写抑制補助因子を呼び寄せるためである事を証明した。

文献4 ヒト乳がん細胞株 MCF-7 を用いて抗がん剤ダウノルビシンの処置により細胞内セラミドが増加する事、その原因が酸性ではなく中性スフィンゴミエリナーゼ 2 の転写増加による事が大きい事をはじめ明らかにした。さらにこの機序として責任プロモーター領域を明らかにし、ダウノルビシンの処置に応じて結合する転写因子として Sp1 の関与が大きい事も併せて証明した。

文献5 各種ヒト大腸がん細胞株の検索で抗がん剤オキザリプラチン感受性が RK0 細胞と HCT116 細胞とで大きく異なり、前者が抵抗性、後者が感受性を示す事、薬剤抵抗性は SPHK1 ならびに SPHK2 の発現レベルと、逆に感受性はオキザリプラチン処理後の中性スフィンゴミエリナーゼ活性上昇の有無とよく相関する事を見いだした。細胞内シグナル伝達分子 Akt の活性化も RK0 が遥かに高かった。SPHK 活性阻害剤さらには Akt の活性抑制により RK0 細胞のオキザリプラチン感受性は回復した。さらに Akt の活性化 (リン酸化) に SPHK の関与を示唆するデータを得た。

文献6 mutated ras(G12V)遺伝子を導入した NIH3T3(NIH3T3-Ras)細胞株では PLD1 遺伝子の発現が上昇している事、PLD2 遺伝子には変化のない事を明らかにした。マウス SPHK1 遺伝子のプロモーター解析から ras に応答する領域を確定しそれが Sp1 転写因子結合部位であること、さらには NIH3T3-Ras では Sp1 タンパクそのものが増加しており、同様の事がヒト大腸がん細胞の一部でも認められる事を報告した。この結合部位と Sp1 蛋白との結合を EMSA, ChIP assay にて証明した。

文献7 NIH3T3 細胞に v-Src 遺伝子を導入した亜株で SPHK1 遺伝子の発現が著明に上昇しており、SPHK1 の活性化が細胞の増殖を調節している事を見いだした。さらにそれが通常の転写の亢進ではなく mRNA の寿命の延長による事を明らかにした。その機序として v-Src の協力なチロシンキナーゼ活性により mRNA の寿命に関係する蛋白群のうちで安定化に働く HuR タンパクのリン酸化による活性化、寿命を短縮させる AUF1 の蛋白レベルでの減少とリン酸化による活性の低下の両方が寄与している事を証明した。またこれらの因子が結合する AU に富む領域が 3' untranslated region に存在し、v-Src からの情報伝達系としては PKCa が最も重要である事も提示した。

文献8 馬の腎臓組織から抽出した4種のセラミド種について electrospray ionization mass spectrometry にて詳細に解析し、構造を決定した。さらにそれらセラミドのアポトーシス誘導能についてヒト白血病細胞株ならびに神経芽細胞腫細胞株を用い検討を行った。両者のデータから長鎖脂肪酸を持つセラミド分子とアポトーシス誘導能の関係について考察を行った。

文献9 抗がん剤ダウノルピシンに対する感受性の異なる16種のヒト白血病細胞株を用いてダウノルピシンへの IC₅₀ と SPHK1 発現量との間に有意な相関が有る事を示した。さらに SPHK1 の発現の高い細胞株ではそのリン酸化レベルも上昇している事が明らかとなった。一方 SPHK2 発現量には細胞株間で差異は見られなかった。SPHK1 阻害剤とダウノルピシンとの併用には相乗的な殺細胞効果が有る事を示した。さらに細胞内セラミド量を LC/MS-MS を用いて測定しダウノルピシン感受性の低い株では高い株に比してダウノルピシン処理による C18, C24 セラミドの増加が少なく、S1P の減少も少ない事が明らかとなった。この研究はこれまで言われてきた細胞内のスフィンゴ脂質レオスタットモデルを抗がん剤に対する細胞の反応性から示した興味ある報告であり他の研究者からもよく引用される論文である。

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9件)

1. Ito H., Murate T. et al. Heterogeneous sphingosine-1-phosphate lyase gene expression and its regulatory mechanism in human lung cancer cell lines. *Biochim Biophys Acta* in press, 2011. (査読有り)
2. Gao S., Murate T. et al. Mechanism of increased PLD1 gene expression during early adipocyte differentiation process of mouse cell line 3T3-L1. *J Cell Biochem* 109:375-382, 2010 (査読有り)
3. Murakami M., Murate T. et al. ATRA inhibits ceramide kinase transcription in a human neuroblastoma cell line, SH-SY5Y cells: the role of COUP-TFI. *J Neuro-chem* 112:511-520, 2010 (査読有り)
4. Ito H., Murate T. et al. Transcriptional regulation of neutral sphingomyelinase 2 gene expression of a human breast cancer cell line, MCF-7, induced by the anti-cancer drug, daunorubicin. *Biochim Biophys Acta* 1789: 681-690, 2009 (査読有り)
5. Nemoto S., Nakamura M., Osawa Y., Murate T. et al. Sphingosine kinase isoforms regulate oxaliplatin sensitivity of human colon cancer cells thorough ceramide accumulation and Akt activation. *J Biol Chem* 284:10422-10432, 2009 (査読有り)
6. Gao S., Murate T. et al. Mutated ras induced PLD1 gene expression through increased Sp1 transcription factor. *Nagoya J Med Sci* 71:127-136, 2009 (査読有り)
7. Sobue S., Murate T. et al. V-Src onco-gene product increases sphingosine kinase1 expression through mRNA stabilization: alteration of AU-rich element-binding proteins. *Oncogene* 27:6023-6033, 2008 (査読有り)
8. Kyogashima M., Murate T. et al. Chemical and apoptotic properties of hydroxy-ceramides containing long-chain bases with unusual alkyl chain lengths. *J Biochem* 144:95-106, 2008 (査読有り)
9. Sobue S., Murate T. et al. 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 87:266-275, 2008 (査読有り)

〔学会発表〕(計5件)

1. Ito H., Murate T. et al. The regulatory mechanism of NSMase2 gene expression by ATRA in MCF7 cells. 51th International Conference of the Bioscience of Lipids, 2010年9月10日, スペイン ビルバオ市
2. Murate T. et al. Heterogeneous sphingosine 1-phosphate lyase gene expression and its regulatory mechanism in human lung cancer cell lines. 51th International Conference of the Bioscience of Lipids, 2010年9月10日, スペイン ビルバオ市
3. Murakami M., Murate T. et al. Regulatory mechanism of ATRA-induced ceramide kinase gene suppression in a human neuroblastoma cell line, SH-SY5Y cells. 50th International Conference of the Bioscience of Lipids, 2009年9月4日, ドイツ レーゲンスベルグ市
4. Ito H., Murate T. et al. Daunorubicin induced neutral sphingomyelinase 2 gene expression on MCF7 cells. 50th International Conference of the Bioscience of Lipids, 2009年9月4日, ドイツ レーゲンスベルグ市
5. 祖父江沙矢加, 村手隆ら v-Src による SPHK1 mRNA 安定化と発現の増強 第81回日本生化学会大会 2008年12月9日 神戸市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村手 隆 (MURATE TAKASHI)

名古屋大学・医学部・教授

研究者番号 : 30239537

(2) 研究分担者

小嶋 哲人 (KOJIMA TETSUHIITO)

名古屋大学・医学部・教授

研究者番号 : 40161913

高木 明 (TAKAGI AKIRA)

名古屋大学・医学部・助教

研究者番号 : 30135371

鈴木 元 (SUZUKI MOTOSHI)

名古屋大学大学院・医学系研究科・講師

研究者番号 : 80236017

(3) 連携研究者

坂野 喜子 (BANNO YOSHIKO)

岐阜大学・医学部・准教授

研究者番号 : 50116852

野澤 義則 (NOZAWA YOSHINORI)

財団法人岐阜県研究開発財団・岐阜県

国際バイオ研究所・研究所長

研究者番号 : 10021362