

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K10111

研究課題名(和文) オミクス解析に基づく口腔癌におけるSphingosine kinaseの標的化

研究課題名(英文) Targeting for sphingosine kinase in oral squamous cell carcinoma based on omics analysis

研究代表者

濱田 正和 (Hamada, Masakazu)

大阪大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：80506361

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：TCGAデータベースの解析より、『Sphingosine』に関連する遺伝子としてCERS5、PLPP3、SGPP1、SPNS3、S1PT4が腫瘍組織と正常組織で差を認め、頭頸部癌の予後とも関連していた。さらにSphk1阻害剤であるPF-543を口腔扁平上皮癌(OSCC)細胞に処理したところ、生体における細胞死であるネクロシス、オートファジー、アポトーシスに共通する経路はNOD-like receptor signaling pathwayとNecroptosisであった。今後、さらなるメカニズムの解析やオミクスデータ解析によりOSCCに対する分子標的治療に繋がりたいと考える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TCGAデータベースの解析より、『Sphingosine』に関連する遺伝子としてCERS5、PLPP3、SGPP1、SPNS3、S1PT4が腫瘍組織と正常組織で差を認め、予後とも関連していた。さらに、ヒト口腔扁平上皮癌細胞をSphK1阻害薬であるPF-543で処理すると、ネクロシス、アポトーシスならびにオートファジーが誘導され、共通する経路はNOD-like receptor signaling pathwayとNecroptosisであった。今後、これらのメカニズムの解明を通して、副作用の少ないより効率的なSphKをターゲットとした分子標的治療のさらなる発展が期待出来る。

研究成果の概要(英文)：Analysis of the TCGA database revealed that CERS5, PLPP3, SGPP1, SPNS3, and S1PT4 as genes related to "Sphingosine" showed differences between primary tumor and solid tissue normal and were also associated with prognosis of head and neck squamous cell carcinoma. Furthermore, treatment of oral squamous cell carcinoma (OSCC) cells with PF-543, a Sphk1 inhibitor, revealed that the NOD-like receptor signaling pathway and necroptosis are common pathways for necrosis, autophagy, and apoptosis, which are cell death in vivo. Further mechanistic and omics data analysis will lead to molecular targeted therapy for OSCC.

研究分野：口腔外科全般、口腔癌、分子標的治療

キーワード：オートファジー 分子標的治療 Sphingosine kinase 口腔癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

2015年にThe Cancer Genome Atlas (TCGA) から頭頸部癌における包括的ゲノム特性についての報告がされた。しかしながらセラミドやスフィンゴシン代謝酵素を標的にした報告はなかった。研究代表者は、プロテインキナーゼC (PKC) を分子標的とする safingol を用いて口腔扁平上皮癌 (OSCC 細胞の caspase 非依存的アポトーシス誘導機構を解明した。その後、safingol はスフィンゴ脂質代謝物 sphingosine-1-phosphate (S1P) を生成する sphingosine kinase 1 (SphK1) を阻害することも判明したため、SphK1 選択的阻害剤 PF-543 の研究に着手した。S1P はシグナル伝達物質で、細胞膜上のレセプターを介して細胞増殖ならびにプログラム細胞死を制御するシグナル伝達物質で、頭頸部癌をはじめ多くの癌で高発現している。実際に TCGA データ解析を行い、SphK1 の発現が、正常組織よりも腫瘍組織で有意に高いことを確認していた。開発が進む多様な SphK 選択的阻害剤を用いて、TCGA データ解析を利用し OSCC に対する分子標的治療に繋がりたいと考えた。

2. 研究の目的

そこで、本研究では、TCGA データ解析を行い、実際に Sphingosine 関連遺伝子と予後との関連を調べることとした。また SphK1 阻害薬として開発された PF-543 の OSCC 細胞株に対する細胞死メカニズムについて次世代シーケンサーを用いて検討を行った

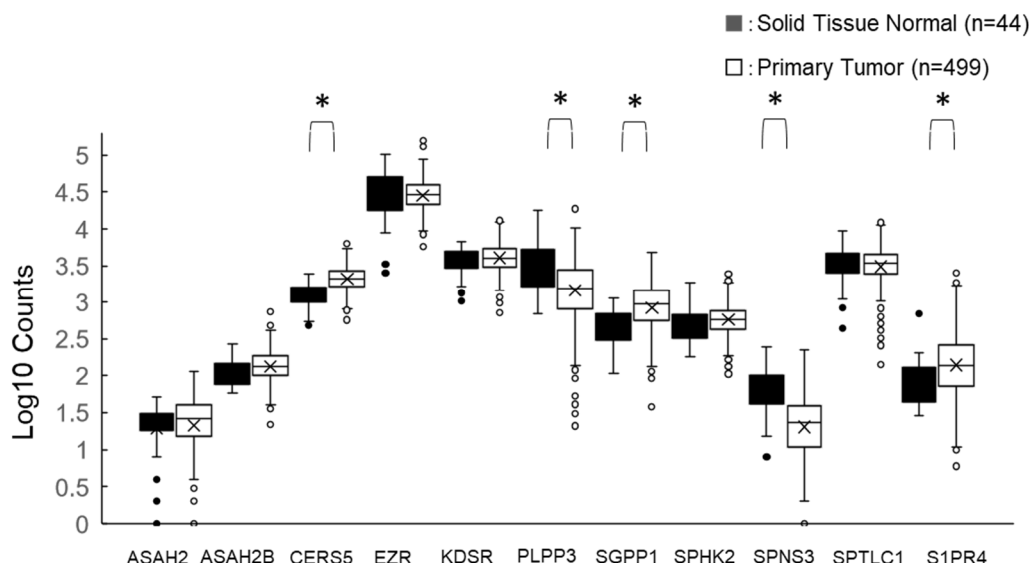
3. 研究の方法

GDC データポータル (<https://portal.gdc.cancer.gov>) から TCGA-HNSC (原発腫瘍 499 検体、固形組織正常 45 検体) の RNA-Seq カウントデータ (HTSeq 版) を入手した。TCGA のデータを「sphingosine」をキーワードに検索し、抽出した遺伝子を正常組織と腫瘍組織で比較検討した。さらにそれらの遺伝子の発現量を中央値にて High、Low にクラス分けを行い、予後との関連を検討した。

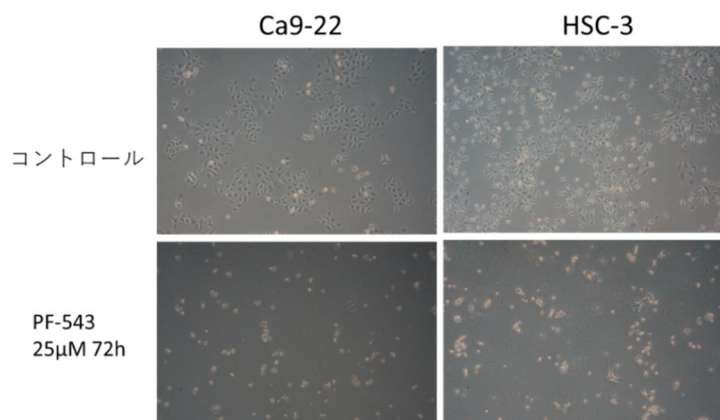
ヒト OSCC 細胞である Ca9-22 細胞、HSC-3 細胞を用いた。試薬は SphK1 阻害剤 PF-543 を用いた。ヒト OSCC 細胞を SphK1 阻害剤 PF-543 で処理し TRIsure を用いて RNA を抽出した。その後、次世代シーケンサーを用いてシーケンス解析を行った。細胞死メカニズムの解析は Fold Change が 2.0 以上もしくは 0.5 以下になった遺伝子のうちネクローシス、オートファジー、アポトーシスのキーワードで遺伝子を絞り、DAVID (Database for Annotation Visualization and Integrated Discovery) を用いて、Pathway 解析を行った。

4. 研究成果

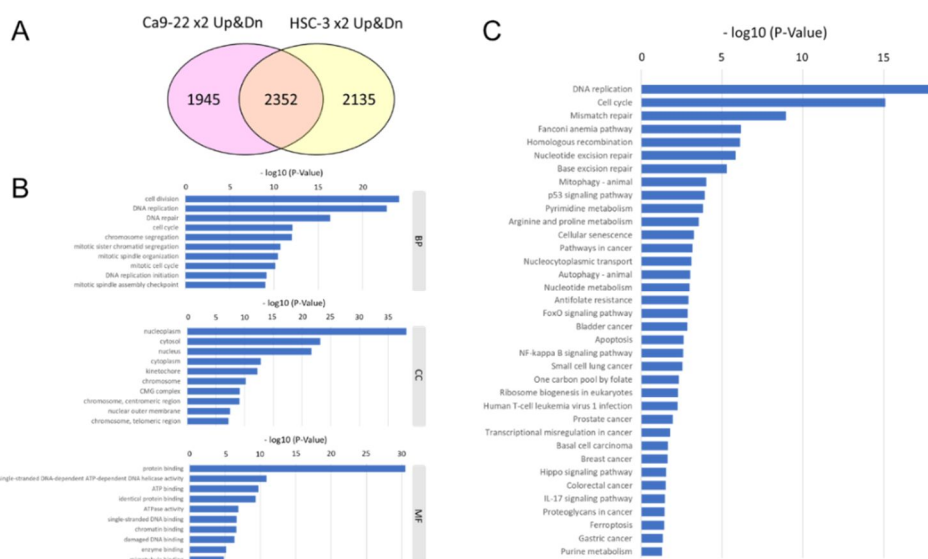
(1) ダウンロードした TCGA データより『sphingosine』のキーワードで抽出したところ、37 の遺伝子 (ACER1、ACER2、ACER3、ASAH1、ASAH2、ASAH2B、CERS1、CERS2、CERS3、CERS4、CERS5、CERS6、DEGS2、EZR、FAM57B、GBA、GPR6、KDSR、PLPP1、PLPP2、PLPP3、S1PR1、S1PR2、S1PR3、S1PR4、S1PR5、SGPL1、SGPP1、SGPP2、SPHK1、SPHK2、SPNS1、SPNS2、SPNS3、SPTLC1、SPTLC2、UGT8) が抽出された。これらの遺伝子について発現量を中央値にて High、Low にクラス分けを行い、予後との関連を検討したところ、11 の遺伝子 (ASAH2、ASAH2B、CERS5、EZR、KDSR、PLPP3、SGPP1、SPHK2、SPNS3、S1PR4) が抽出された。さらに治療のターゲットになりやすい、正常組織と腫瘍組織で有意差の認められたものは、5 遺伝子あり、CERS5、PLPP3、SGPP1、SPNS3、S1PT4 であった。



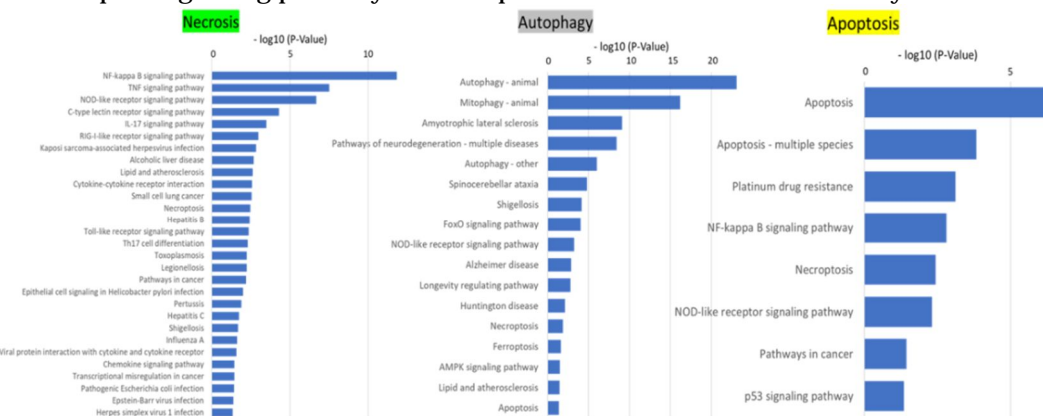
(2) Ca9-22 細胞および HSC-3 細胞を PF-543 25 μ M で 72 時間処理した後細胞形態を観察したところ、コントロールと比較して処理すると細胞が浮遊しており、細胞死が誘導されていた。



(3) Ca9-22 細胞および HSC-3 細胞を PF-543 で処理し、72 時間後にシーケンス解析を行った。Fold Change ($<0.5, 2.0<$) の遺伝子は Ca9-22 細胞では 4297 遺伝子、HSC-3 細胞では 4487 遺伝子であった。Ca9-22 細胞と HSC-3 細胞に共通する 2352 遺伝子について、David を用いて GO 解析と Pathway 解析を行った。



(4) 先ほどの抽出した Ca9-22 細胞と HSC-3 細胞に共通する 2352 遺伝子について、ネクローシス、オートファジー、アポトーシスの 3 つのキーワードで絞込み、Pathway 解析を行った。NOD-like receptor signaling pathway と Necroptosis は全てに共通した Pathway であった。



TCGA データベースの解析より、『Sphingosine』に関連する遺伝子として CERS5、PLPP3、SGPP1、SPNS3、S1PT4 が腫瘍組織と正常組織で差を認め、頭頸部癌の予後とも関連していた。さらに Sphk1 阻害剤である PF-543 を OSCC 細胞株に処理したところ、生体における細胞死であるネクローシス、オートファジー、アポトーシスに共通する経路は NOD-like receptor signaling pathway と Necroptosis であった。今後、さらなるメカニズムやオミクスデータ解析により OSCC に対する分子標的治療に繋がたいと考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Hamada Masakazu, Inaba Hiroaki, Nishiyama Kyoko, Yoshida Sho, Yura Yoshiaki, Matsumoto-Nakano Michiyo, Uzawa Narikazu	4. 巻 11
2. 論文標題 Prognostic association of starvation-induced gene expression in head and neck cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 19130
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-98544-1	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 Hamada Masakazu, Inaba Hiroaki, Nishiyama Kyoko, Yoshida Sho, Yura Yoshiaki, Matsumoto-Nakano Michiyo, Uzawa Narikazu	4. 巻 24
2. 論文標題 Potential Role of the Intratumoral Microbiota in Prognosis of Head and Neck Cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 15456 ~ 15456
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms242015456	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 Hamada Masakazu, Inaba Hiroaki, Nishiyama Kyoko, Yoshida Sho, Yura Yoshiaki, Matsumoto Nakano Michiyo, Uzawa Narikazu	4. 巻 28
2. 論文標題 Transcriptomic analysis of Porphyromonas gingivalis infected head and neck cancer cells: Identification of PLAU as a candidate prognostic biomarker	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Cellular and Molecular Medicine	6. 最初と最後の頁 28
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jcmm.18167	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西山今日子, 稲葉裕明, 濱田正和, 吉田 翔, 仲野道代
2. 発表標題 口腔細菌が頭頸部癌細胞株に及ぼす影響と予後との関連性
3. 学会等名 第64回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Masakazu Hamada, Kyoko Nishiyama, Uzawa Narikazu
2. 発表標題 Prognostic association of starvation-induced genes in head and neck cancer
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hamada M, Nishiyama K, Uzawa N.
2. 発表標題 Prognostic association of starvation-induced genes in head and neck cancer based on analysis of TCGA data
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西山今日子, 稲葉裕明, 濱田正和, 吉田翔, 仲野道代
2. 発表標題 血清飢餓状態が頭頸部癌細胞株に及ぼす影響と飢餓誘導遺伝子の予後との関連性
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西山今日子, 濱田正和, 鶴澤成一
2. 発表標題 口腔細菌が頭頸部癌細胞株に及ぼす影響と予後との関連性
3. 学会等名 第77回日本口腔科学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hamada M, Nishiyama K, Uzawa N.
2. 発表標題 Transcriptomic analysis of sphingosine kinase 1 inhibitor PF543 induced autophagy in oral squamous cell carcinoma cells
3. 学会等名 第82回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2023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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------