

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月 24日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592060

研究課題名（和文） ネクロプトーシスによる細胞死におけるスフィンゴ脂質代謝の役割

研究課題名（英文） Roles of sphingolipid metabolism on cell death by necroptosis

研究代表者

横山 三紀 (YOKOYAMA MIKI)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号：70191533

研究成果の概要（和文）：

スフィンゴシンおよびスフィンゴシンアナログ(SG-12)が細胞内でスフィンゴシンキナーゼによってリン酸化されることにより細胞死を誘導することを見出した。スフィンゴシンキナーゼは癌細胞において発現が亢進していることが知られており、この結果はスフィンゴシンキナーゼの阻害剤に注目した従来の方針とは異なる、新しいタイプの抗がん剤の可能性を示唆する。

研究成果の概要（英文）：

Sphingosine kinase (SPHK), which catalyzes the phosphorylation of sphingosine to generate sphingosine-1-phosphate, has two mammalian isotypes, SPHK1 and SPHK2. Both isozymes are promising anti-cancer therapeutic targets. In this study, we found that sphingosine and SG-12, a synthetic analogue of sphingosine that acts as a SPHK2 inhibitor, induce cell death via phosphorylation by SPHK1 and SPHK2, respectively. The present results revealed the novel anti-cancer potential of a sphingosine analogue in the pathological setting where SPHK2 is upregulated.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学、機能系基礎歯科学

キーワード：口腔生化学、細胞死

1. 研究開始当初の背景

本研究は平成22年度から24年度(2010-2012)に渡っておこなった。スフィンゴ脂質の機能には生体膜の主要な構成要素および生理活性物質としての二つの側面がある。これに対応して、研究開始当初には大きく分けて二つの研究の潮流があった。

一つはスフィンゴ脂質・コレステロールの集合による膜ドメインの実験的裏付けであり、もう一つはスフィンゴシン-1-リン酸(S1P)の機能解明である。本研究は後者の範疇に属する。

S1Pは当初、Gタンパク質共役型受容体Edgのリガンドとして、その生理活性が注目された生理活性脂質である。Edg-1(S1P受

容体, S1P₁) 欠損マウスの代表的な表現型として、平滑筋細胞が大動脈の周囲に正しく配置されず血管の裏打ちが不完全になる(したがって出血や浮腫が起こり胎生致死になる)、二次リンパ器官から循環血へのリンパ球の動員がおこらない(免疫不全)ことが報告された。これらの研究結果から、循環血中には高濃度(200-900 nM)の S1P が存在し、S1P 受容体を発現している細胞を循環血中に動員するという図式が明らかになった。また走化性因子としての S1P の作用を弱めることにより、多発性硬化症における免疫細胞の過度な中枢神経系の攻撃を抑制できること、免疫抑制により移植時の拒絶を回避できることが報告され、スフィンゴシンの類似化合物である FTY720 (細胞内にとりこまれてリン酸化され S1P のアナログとして作用する)の臨床応用が始まった。

一方 S1P は細胞内においても作用をもつことが指摘され、S1P の標的分子として TRAF2, プロヒビン (ミトコンドリア呼吸鎖)、ヒストンデアセチラーゼなどが報告された。これらの分子と S1P との相互作用は、総じて S1P による増殖促進効果を説明するものであった。癌細胞では SPHK が高発現し、それにより細胞増殖が亢進することから、SPHK 阻害剤は抗がん剤の有力な候補と考えられた。

2. 研究の目的

本研究ではスフィンゴ脂質代謝と細胞死誘導の関連を解析した。

3. 研究の方法

S1P 産生に関わるスフィンゴ脂質代謝酵素 (スフィンゴシンキナーゼ 1 および 2, スフィンゴシンリアーゼ、スフィンゴシンホスファターゼ) の安定発現細胞を作成し、スフィンゴシンアナログやスフィンゴシンによる細胞死誘導の有無を調べた。

4. 研究成果

(1) スフィンゴシンキナーゼ 2 (SPHK2) 阻害剤 SG-12 による SPHK2 発現細胞の細胞死誘導

スフィンゴシンをリン酸化して S1P を生成する酵素には SPHK1, SPHK2 の二種類がある。SPHK1, SPHK2 は組織分布、細胞内局在が異なる。また SPHK2 は SPHK1 に比べて基質特異性が厳密ではなく、従って FTY720 の細胞内におけるリン酸化は SPHK2 によって起こる。SPHK は抗がん剤の候補として注目されてきたが、これまでの研究では SPHK1 に焦点をあてたものが多かった。

報告者らはスフィンゴシン類似化合物であり、SPHK2 の酵素活性を阻害する SG-12 [(2*S*, 3*R*) -2-amino-4- (4-octylphenyl) butane -1-3-diol] がマウス B 細胞由来細胞株 A20/2J 細胞において Fas 依存性の細胞死を亢進することを見出していた (Hara-Yokoyama, M. T., K.; Kihara, A.; Kim J. W.; Park, C. S.; Hirabayashi, Y.; Igarashi, Y.; Yanagishita, M. *The Open bioactive compounds journal* **2008**, *1*, 22)。本研究では SG-12 の効果を SPHK1, SPHK2 を安定発現させた A20/2J 細胞で調べたところ、SG-12 は SPHK2 発現細胞において細胞死 (細胞質酵素であるラクトースデヒドロゲナーゼの培地中への放出を指標として測定) を誘導することがわかった。この結果は予想外であった。SG-12 が SPHK2 の阻害剤として作用とするならば、SPHK2 の発現により SG-12 の作用は減弱するはずであり、実際に A20/2J 細胞に [³H] スフィンゴシンを取り込ませた場合に、SG-12 による [³H] S1P SG-12 による [³H] S1P 産生の抑制は SPHK2 発現により解除された。そこで次に SPHK2 のどのような性質に依存して SG-12 は細胞死を誘導したのかを解析した。

SPHK2 の核移行シグナル、活性部位、BH3 ドメインに機能変異を起こした変異体、それぞれ (R93E/R94E), G213D, L219A, の安定発現株を作成し SG-12 の効果を調べたところ、活性部位を変異させた場合にのみ SG-12 による細胞死誘導がみられなくなった。このことから SG-12 は SPHK2 の活性に依存して細胞死を誘導することが明らかになった。さらに SG-12 は SPHK2 活性に依存して [^γ-³²P] ATP によりリン酸化され、その時の Km 値は 5.5 μM であった。この Km 値はスフィンゴシンに対する値とほぼ同等であった。

SG-12 による SPHK2 依存性の細胞死はカスパーゼ阻害剤 α-VAD により部分的に抑制された。電子顕微鏡観察においてもクロマチンの凝集がみられ、またカスパーゼ 3 の活性化も確認された。以上の結果を総合すると、基質特異性の広い SPHK2 が SG-12 をリン酸化し、それによりアポトーシスが誘導されたと考えられる。この結果は *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* (2013) 23, 2220-2224 に掲載された。

(2) SPHK1 発現細胞のスフィンゴシンによる細胞死誘導

SG-12 が SPHK2 によってリン酸化されて細胞死を誘導したので、次に、S1P 産生に依存した細胞死の可能性を調べた。するとスフィンゴシンの添加により SPHK1, SPHK2 の触媒活性に依存して細胞死が誘導された。しかし SG-12 による細胞死誘導の場合とは異なり、

スフィンゴシンの場合にはカスパーゼ阻害剤 Z-VAD による解除はみられなかった。また電子顕微鏡観察においても、クロマチン凝集はみられず、リン酸化 SG-12 の産生による細胞死と SIP 産生による細胞死とは異なる機序で進行することが示唆された。

SIP 産生による細胞死はネクロスタチンによっても解除されず、ネクロプトーシスとも異なる機序であると考えられる。

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 6 件)

1. Sphingosine kinase 2 inhibitor SG-12 induces apoptosis via phosphorylation by sphingosine kinase 2
Miki Hara-Yokoyama, Kazue Terasawa, Shizuko Ichinose, Akihiko Watanabe, Katarzyna A. Podyma-Inoue, Kazunari Akiyoshi, Yasuyuki Igarashi, Masaki Yanagishita.
Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters (2013) **23**, 2220-2224.
2. Tetrameric interaction of the ectoenzyme CD38 on the cell surface enables its catalytic and raft-association activities.
Miki Hara-Yokoyama, Mutsuko Kukimoto-Niino, Kazue Terasawa, Satoru Harumiya, Katarzyna A. Podyma-Inoue, Nobumasa Hino, Kensaku Sakamoto, Satsuki Itoh, Noritaka Hashii, Yoko Hiruta, Nana Kawasaki, Chiemi Mishima-Tsumagari, Yoko Kaitsu, Tomoko Matsumoto, Motoaki Wakiyama, Mikako Shirouzu, Takeshi Kasama, Hiroshi Takayanagi, Naoko Utsunomiya-Tate, Kiyoshi Takatsu, Toshiaki Katada, Yoshio Hirabayashi, Shigeyuki Yokoyama and Masaki Yanagishita.
Structure (2012) **20**, 1-11.
3. Structural basis of interleukin-5 dimer recognition by its α receptor.
Kusano S, Kukimoto-Niino M, Hino N, Ohsawa N, Ikutani M, Takaki S, Sakamoto K, Hara-Yokoyama M, Shirouzu M, Takatsu K, Yokoyama S.
Protein Sci. (2012) **21**, 850-64.
4. Syndecans reside in

sphingomyelin-enriched low-density fractions of the plasma membrane isolated from a parathyroid cell line.

Podyma-Inoue KA, Hara-Yokoyama M, Shinomura T, Kimura T, Yanagishita M. PLoS One. (2012) **7(3)**:e32351.

5. Pocket epithelium in the pathological setting for HMGB1 release.

Ebe N, Hara-Yokoyama M, Iwasaki K, Iseki S, Okuhara S, Podyma-Inoue KA, Terasawa K, Watanabe A, Akizuki T, Watanabe H, Yanagishita M, Izumi Y. Journal of Dental Reserch. (2011) **90**, 235-40.

6. Survival signals of hepatic stellate cells in liver regeneration are regulated by glycosylation changes in rat vitronectin, especially decreased sialylation.

Sano K, Miyamoto Y, Kawasaki N, Hashii N, Itoh S, Murase M, Date K, Yokoyama M, Sato C, Kitajima K, Ogawa H. J Biol Chem. (2010) **285**, 17301-17309.

[学会発表] (計 9 件)

1. YOKOYAMA Miki, YOKOYAMA Shigeyuki, YANAGISHITA MASAKI, CD38 の触媒活性と膜ドメイン局在化を両立させている細胞表面アセンブリの構造基盤 第 40 回日本免疫学会、幕張、平成 23 年 11 月 27-29 日
2. 江部 典子、横山 三紀、寺澤 和恵、柳下 正樹、和泉 雄一、酪酸による酸化ストレス誘導時に放出される HMGB1 の役割、第 135 回日本歯科保存学会、大阪、平成 23 年 10 月 20-21 日
3. Katarzyna A. Podyma-Inoue, Miki Yokoyama, and Masaki Yanagishita, Characterization of Membrane Rafts Enriched in Cell Surface Heparan Sulfate Proteoglycans Isolated from a Rat Parathyroid Cell Line, 第 84 回日本生化学会、京都、平成 23 年 9 月 21-24 日
4. 横山 三紀、市野瀬 志津子、市野瀬 省三、多田 昇弘、寺澤 和恵、吉垣 純子、只野一有富 桂子、古川 鋼一、柳下 正樹、岩渕 和久、GM2/GD2 合成酵素欠損マウスにおける血液-精巣関門の異常、第 84 回日本生化学会、京都、平成 23 年 9 月 21-24 日
5. 横山 三紀、新野 睦子、寺澤 和恵、橋井 則貴、蛭田 葉子、川崎 ナナ、脇山 素明、白水 美香子、横山 茂之、柳下 正樹、リンパ球表面抗原 CD38 の四量体化を反映した N 型糖鎖プロセッシング、第 30 回日本

糖質学会、長岡、平成23年7月11-13日

6. Miki Yokoyama, Kazue Terasawa, Shizuko Ichinose, Yoshiko Banno, Yoshio Hirabayashi, Yasuyuki Igarashi, Masaki Yanagishita, Plasma membrane permeabilization-associated cell death induced by intracellular generation of sphingosine-1-phosphate, The 30th NAITO CONFERENCE ON Membrane Dynamics and Lipid Biology [II], 札幌、平成23年6月28日-7月1日

7. 横山 三紀、寺澤 和恵、市野瀬 志津子、柳下 正樹、セラミド産生にともなうリソソーム関連膜構造物、第53回日本脂質生化学会、東京、平成23年5月12-13日

8. Miki Yokoyama, Kazue Terasawa, Shizuko Ichinose, Yoshiko Banno, Yoshio Hirabayashi, Yasuyuki Igarashi, Masaki Yanagishita, Increase in the plasma membrane permeability by intracellular generation of sphingosine-1-phosphate, 第83回日本生化学会大会、神戸、平成22年12月7日-10日

9. 横山 三紀、寺澤 和恵、五十嵐 靖之、平林 義雄、柳下 正樹、スフィンゴシンキナーゼ2の酵素活性に依存したスフィンゴ脂質誘導体化合物による細胞死誘導、第52回日本脂質生化学会、伊香保、平成22年6月14-15日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横山 三紀 (YOKOYAMA MIKI)

東京医科歯科大学、大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号：70191533