

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 17 日現在

機関番号：33910

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460674

研究課題名(和文) スフィンゴ脂質代謝から見た腫瘍細胞のストレス応答と食品成分による抗がん作用機序

研究課題名(英文) Stress response of cancer cells focusing the sphingolipid metabolism and its modulation by food ingredients

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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：平成26年度から28年度までに本研究費に関連して発表した9編の英文論文は、細胞のストレス応答とスフィンゴ脂質代謝腫瘍の関係が6編、抗がん剤耐性機序が2編、食品成分ファイトケミカルの抗がん作用が1編である。

我々の結論としては、(1)腫瘍細胞は低酸素、増殖因子の欠乏、抗がん剤暴露によるストレスを乗り越えるため、スフィンゴ脂質代謝、DNA複製系、微小管の代謝、mRNAの寿命の変化、クロマチンリモデリングなど様々な機序を駆使し、生存、増殖を図る。(2)腫瘍細胞のストレス応答に関しては、提唱されているスフィンゴ脂質レオスタットモデルが、ストレスでの細胞死あるいはストレスの耐性化にとって重要である。

研究成果の概要(英文)：We have published 9 papers corresponding to the main title of the grant No. 26460674 between 2013 and 2016. Among them, 6 papers described the stress responses and the sphingolipid metabolism of cancer cells, whereas 2 papers analyzed the anti-cancer drug resistance of malignant cells. One paper elucidated the molecular mechanism of anti-cancer function of resveratrol, a food ingredient.

Based on these works, we concluded that malignant cells utilize heterogeneous mechanisms including aberrant sphingolipid metabolism, changes of DNA repair system, microtubules dynamics, mRNA half-life, and chromatin remodeling. As far as the sphingolipid metabolism was concerned, our data strongly supported the validity of the sphingolipid rheostat model telling that the balance between ceramide and sphingosine 1-phosphate determined cells' fate such as cell growth, survival, motion and differentiation.

研究分野：腫瘍学ならびにスフィンゴ脂質代謝解析

キーワード：Sphingolipid metabolism Cancer cell Stress response Food ingredient Phytochemical Anti-cancer action

## 1. 研究開始当初の背景

スフィンゴ脂質代謝中間産物は、細胞内あるいは細胞間情報伝達物質として、細胞増殖、細胞死との関連から注目されており、なかでもセラミド/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モデル Spiegel S. *et al.* Nature 1996)。

これまでに我々は、SPHK1 を中心としてスフィンゴ脂質代謝酵素とその機能、特に転写調節機序の解明の観点から一連の報告を行ってきた。LC/MS-MS を用いてスフィンゴ脂質代謝中間産物を効率よく定量解析できるシステムを開発し (J Biol Chem 2009)、この測定系ならびにスフィンゴ脂質代謝主要酵素 mRNA の定量的解析 (Leukemia 2006) により、各種刺激時の細胞株モデルから臨床検体までのスフィンゴ脂質代謝酵素各遺伝子、蛋白、酵素活性、スフィンゴ脂質代謝産物定量をすべて測定できる体制を確立した。これに基づいて白血病細胞株における SPHK1、NSMase2 の変化と抗がん剤投与時のスフィンゴ脂質レオスタットモデルの妥当性を検証した (Sobue *et al.* Int J Hematol 2008, Kyogashima *et al.* J Biochem 2008)。

## 2. 研究の目的

研究費の申請にあたっては、予備実験の結果に基づいて

- (1) 腫瘍細胞のストレス応答とスフィンゴ脂質代謝酵素との関連、
- (2) 食品成分のファイトケミカルによる腫瘍細胞の増殖抑制と酸性スフィンゴミエリナーゼの発現調節
- (3) アンドロジェン依存性前立腺がん細胞のアンドロジェン依存性と酸性セラミダーゼの変化などの解析を計画した。

## 3. 研究の方法

(1) スフィンゴ脂質代謝産物の測定には LS-MS/MS による解析を用いた (Takana K. *et al.* J Biochem 2012)。スフィンゴ脂質代謝酵素なかでも sphingosine kinase, sphingomyelinase, ceramidase 等の活性の測定は、我々のグループの既報に基づいて行った (Murakami M. *et al.* J Cell Biochem 2011, J Neurochem 2010, Ito H. *et al.* Biochim Biophys Acta 2009)。主要スフ

インゴ脂質代謝酵素の mRNA、タンパクレベルの解析はグループの既報のプライマーを用いた定量 RT-PCR 並びに Western blotting にて測定した (Mizutani N. *et al.* Biochim Biophys Acta 2013, Kawahara S. *et al.* Anticancer Drugs 2013)。抗がん剤耐性亜株を含めたヒト白血病細胞株、大腸癌、肺がん、前立腺癌細胞株は、既に我々のグループを始めとして文献上で報告のあるものを使用した。

## 4. 研究成果

1) 低酸素下の大腸癌細胞株のスフィンゴ脂質代謝産物の変化：低酸素下での大腸癌細胞株 Caco2 あるいは LS147T におけるスフィンゴ脂質代謝産物セラミド (主に Caco2 での解析)、および Hexosyl ceramide あるいはその類縁物質 (主に LS147T での解析) についての詳細な質量分析の結果およびそれをもたらす酵素レベルの変化を報告した (Tanaka K. *et al.* Glycoconj J. 2014 and 2015)。

2) 血清除去下での sphingosine kinase 2 の発現調節機序の解明：ヒト大腸癌細胞株 HCT116 を用いて、血清除去にて培養を続けると SPHK2 の発現および酵素活性が上昇する事を明らかにし、その機序が一過性の JNK の活性化とそれに引き続いた転写因子 CREB の活性上昇によることを証明した (Mizutani N. *et al.* J Cell Biochem 2015)。

3) 酸性セラミダーゼのアンドロジェンによる発現調節機序の解明：アンドロジェン感受性細胞株 LNCaP を用いて、培養液中のアンドロジェンの有無により acid ceramidase (ACDase) の発現が変化する事、またその調節にはアンドロジェン感受性脱ユビキチン化酵素 USP2 が重要で、その働きにより ACDase タンパクの寿命が変化する事を初めて明らかにした (Mizutani N. *et al.* J Biochem 2015)。

4) 肺がん細胞における Ceramide synthase 6 (CeRS6) の高発現とがん転移との相関：手術時に得られた 140 余りの肺がん症例由来の癌組織の大規模遺伝子発現解析野結果とそれら症例の予後の解析から、CERS6 と肺がん転移の有意な相関を明らかとし、その機序について肺がん細胞株を用いて解析した。CERS6 の高発現には miR-101 の発現レベルの変化が関連しており、さらに CERS6 の発現低下によりがん転移を軽減できることをがん細胞移植ヌードマウスの実験で証明した (Suzuki M. *et al.* J Clin Invest 2016)。

5) 食品成分レスベラトロールの抗がん作

用とスフィンゴ脂質代謝：ヒト白血病細胞株及び固形腫瘍細胞株を用いてファイトケミカルであるレスベラトロールの殺細胞効果を検証した。レスベラトロールは、検討したほぼ全ての白血病細胞株および腫瘍細胞株の増殖を強く抑制した。スフィンゴ脂質代謝酵素の mRNA 発現レベルの解析結果から酸性および中性のスフィンゴミエリナーゼ(SMase)の発現増加が明らかとなり、酵素活性の解析から酸性 SMase (ASMase)が最も重要である事が示唆された。ASMase のプロモーター解析、レスベラトロールで発現が増加する事が知られているいくつかの転写因子の cDNA 及び siRNA の導入実験から、最終的に EGR1 および EGR3 転写因子がレスベラトロールによる ASMase 高発現に寄与する事が示された。それら転写因子とプロモーター領域との結合を EMSA および ChIP アッセイにて初めて証明した (Mizutani N. *et al.* **Biochim Biophys Res Commun** 2016)。

#### 5. 主な発表論文など [雑誌論文] (計9件)

1. Yuasa D, Ohashi K, Shibata R, Mizutani N, Kataoka Y, Kambara T, Uemura Y, Matsuo K, Kanemura N, Hayakawa S, Hiramatsu-Ito M, Ito M, Ogawa H, **Murate T**, Murohara T, Ouchi N. C1q/TNF-related protein-1 functions to protect against acute ischemic injury in the heart. *FASEB J.* 2016;30(3):1065-75. doi: 10.1096/fj.15-279885. 査読あり
2. **Suzuki M**, Cao K, Kato S, Komizu Y, Mizutani N, Tanaka K, Arima C, Tai MC, Yanagisawa K, Togawa N, Shiraishi T, Usami N, Taniguchi T, Fukui T, Yokoi K, Wakahara K, Hasegawa Y, Mizutani Y, Igarashi Y, Inokuchi J, Iwaki S, Fujii S, Satou A, Matsumoto Y, Ueoka R, Tamiya-Koizumi K, **Murate T**, Nakamura M, Kyogashima M, Takahashi T. Targeting ceramide synthase 6-dependent metastasis-prone phenotype in lung cancer cells. *J Clin Invest.* 2016; 126(1):254-65. doi: 10.1172/JCI79775. 査読あり
3. Mizutani N, Omori Y, Kawamoto Y, Sobue S, Ichihara M, **Suzuki M**, Kyogashima M, Nakamura M, Tamiya-Koizumi K, Nozawa Y, **Murate T**. Resveratrol-induced transcriptional up-regulation of ASMase (SMPD1) of human leukemia and cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016 ;19;470(4):851-6. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.01.134. 査読あり
4. Sobue S, Mizutani N, Aoyama Y, Kawamoto Y, **Suzuki M**, Nozawa Y, Ichihara M, **Murate T**. Mechanism of paclitaxel resistance in a human prostate cancer cell line, PC3-PR, and its sensitization by cabazitaxel. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016;479(4):808-813. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.09.128. 査読あり
5. Mizutani N, Omori Y, Tanaka K, Ito H, **Takagi A**, **Kojima T**, Nakatochi M, Ogiso H, Kawamoto Y, Nakamura M, **Suzuki M**, Kyogashima M, Tamiya-Koizumi K, Nozawa Y, **Murate T**. Increased SPHK2 Transcription of Human Colon Cancer Cells in Serum-Depleted Culture: The Involvement of CREB Transcription Factor. *J Cell Biochem.* 2015;116(10):2227-2238. doi: 10.1002/jcb.25173. 査読あり
6. Mizutani N, Inoue M, Omori Y, Ito H, Tamiya-Koizumi K, **Takagi A**, **Kojima T**,

- Nakamura M, Iwaki S, Nakatochi M, Suzuki M, Nozawa Y, **Murate T**. Increased acid ceramidase expression depends on upregulation of androgen-dependent deubiquitinases, USP2, in a human prostate cancer cell line, LNCaP. *J Biochem.* 2015 ;158(4):309-319. doi: 10.1093/jb/mvv039. 査読あり
7. Tanaka K, Tamiya-Koizumi K, Yamada M, **Murate T**, Kannagi R, Kyogashima M. Hypoxia remodels the composition of the constituent ceramide species of HexCer and Hex2Cer with phytosphingosine and hydroxy fatty acids in human colon cancer LS174T cells. *Glycoconj J.* 2015 ;32(8):615-623. doi: 10.1007/s10719-015-9607-5. 査読あり
8. Tanaka K, Tamiya-Koizumi K, Yamada M, **Murate T**, Kannagi R, Kyogashima M. Individual profiles of free ceramide species and the constituent ceramide species of sphingomyelin and neutral glycosphingolipid and their alteration according to the sequential changes of environmental oxygen content in human colorectal cancer Caco-2 cells. *Glycoconj J.* 2014;31(3):209-219. doi: 10.1007/s10719-013-9511-9. 査読あり
9. Nishida Y, Mizutani N, Inoue M, Omori Y, Tamiya-Koizumi K, Takagi A, Kojima T, Suzuki M, Nozawa Y, Minami Y, Ohnishi K, Naoe T, **Murate T**. Phosphorylated Sp1 is the regulator of DNA-PKcs and DNA ligase IV transcription of daunorubicin-resistant leukemia cell lines. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1839(4):265-74. doi: 10.1016/j.bbagr.2014.02.004. 査読あり
- [学会発表] (計2件)
1. Omori Y, Mizutani N, Murata M, Suzuki M, Tamiya-Koizumi K, Takagi A, Kojima T, Iwaki S, Fujii S, Nakamura M, Nozawa Y, **Murate T**. The mechanism of cytotoxicity by resveratrol against human leukemia cell lines. 55<sup>th</sup> International Conference on the Biosciences of Lipids June 23<sup>rd</sup>~27<sup>th</sup>, 2014, Aberdeen, Scotland
2. Mizutani N, Omori Y, Inoue M, Murata M, Tamiya-Koizumi K, Takagi A, Kojima T, Nakamura M, Iwaki S, Fujii S, Onishi K, Suzuki M, Nozawa Y, **Murate T**. Androgen-dependent up-regulation of USP2/10 increases acid ceramidase expression in a human prostate cancer cell line, LNCAP. 55<sup>th</sup> International Conference on the Biosciences of Lipids June 23<sup>rd</sup>~27<sup>th</sup>, 2014, Aberdeen, Scotland
- [図書] 該当なし
- [産業財産権] 該当なし
6. 研究組織  
 (1) 研究代表者  
 村手 隆 (MURATE, Takashi)  
 中部大学・生命健康科学部生命医科学科・教授  
 研究者番号： 30239537

( 2 ) 研究分担者

小嶋 哲人 (KOJIMA, Tetsuhito)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号： 40161913

高木 明 (TAKAGI, Akira)

名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授

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・准教授

研究者番号： 80236017