

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861304

研究課題名(和文) 卵巣がん転移を標的とした創薬の基盤構築：セラミドの利用

研究課題名(英文) Establishment of new therapeutics for ovarian cancer metastasis: ceramide-based therapy

研究代表者

北谷 和之(KITATANI, Kazuyuki)

東北大学・東北メディカル・メガバンク機構・助教

研究者番号：40539235

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：卵巣がんは婦人科腫瘍の主要な疾患であり、転移・再発の改善が急務である。細胞の運動性はがん播種転移において重要な要素であることから、抗運動性の制御分子を同定することで、播種転移を抑える創薬への応用が見込まれる。研究代表者は、がん細胞生物学研究において、スフィンゴ脂質セラミドは細胞の運動性を抑える生体機能性分子であることを明らかにした。細胞の運動性は転移を促進する要素であることから、セラミドの転移への効果を検証した。その結果、セラミド製剤はヒト卵巣がん細胞の播種転を抑えた。この一連の研究から、卵巣がん播種転移の克服に向けたセラミド創薬の基盤を構築することができた。

研究成果の概要(英文)：Ovarian cancer is one of major Gynecologic cancer and improving cancer metastasis and recurrence is socially urgent. Cell motility is believed to promote metastasis. Uncovering the molecular mechanisms in cell motility regulation is expected to develop novel therapeutics. The PI has identified ceramide as a novel suppressor in cell motility that promotes cancer metastasis. Those results allowed us to examine effects of ceramide formulations on ovarian cancer metastasis. Ovarian cancer metastasis model has been established by xenografting human ovarian cancer SKOV3 cells in nude mice. Treatment of nude mice with ceramide formulation significantly suppressed the metastasis. Our studies could promote to develop ceramide-based therapy for ovarian cancer treatment.

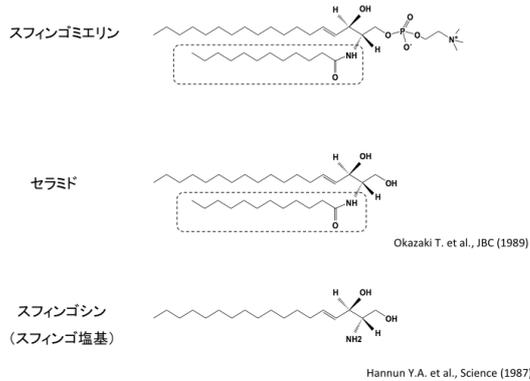
研究分野：脂質生化学

キーワード：セラミド 卵巣がん 転移 細胞運動性

1. 研究開始当初の背景

セラミドは生体膜構成脂質であるスフィンゴ脂質の一つであり、スフィンゴ脂質代謝の中心的

図1 スフィンゴ脂質



分子である。この分子は、細胞内シグナル伝達分子として細胞応答を担う生理活性分子である(図1)。

代表的な生物活性は、アポトーシスやオートファジー誘導、細胞周期停止や抗炎症作用である。この生物活性の発現には、特異的なセラミド相互作用分子が介在している。たとえば、セリン・スレオニンプロテインキナーゼ ceramide-activated protein kinases、セリン・スレオニンプロテインホスファターゼ ceramide-activated protein phosphatases、Raf, protein kinase zeta などがすでに同定されている。セラミドには多彩な生物活性が見出されているにもかかわらず、介在分子の同定はすすんでいない。

本研究において、セラミドは血清または細胞増殖因子に応答した卵巣がん細胞の葉状および糸状仮足形成(F-アクチンの集積)を抑えることを見出した。本仮足形成は細胞運動性を示し、がん細胞の高い運動性はがんの転移・浸潤を促す主要因子である。よって、セラミドは細胞の運動性およびがん転移を制御する鍵分子である

と推察された。本研究の遂行は卵巣がんの転移阻止に向けた創薬基盤の形成に資すると考えられた。

2. 研究の目的

生物学および生化学的にセラミドの抗運動性分子としての機能を同定する。細胞運動性の転移への関わりに着目し、セラミド製剤の卵巣がん播種転移への効果を検証し、本製剤の臨床応用への可能性を探る。したがって、申請者は以下の2つのAimsを検証する。

Aim-1: セラミドの抗運動性分子としての同定と作用機序の解明

Aim-2: 抗卵巣がん播種転移薬としてのセラミドリポソームの可能性

3. 研究の方法

(1) 細胞運動性は仮足形成および化学走化性を指標とした。SKOV3 卵巣がん細胞を8種のホスファチジルイノシトール-3-キナーゼ(PI3K)アイソフォームの small interfering RNA (siRNA) で48時間トランスフェクションした後、細胞をホルマリンで固定した。固定後、0.1% Triton-X100 で10分間処理した。PBSで洗浄後、重合化アクチンおよび核をそれぞれ蛍光ラベル phalloidin およびヘキストを用いて可視化した。蛍光染色された細胞の仮足形成を、蛍光顕微鏡または共焦点レーザー顕微鏡下に判定した。各サンプルにおいて、200個の細胞を対象とした。また、細胞の化学走化性はトランスウェル法(8 μ M pore)を採用した。50、000細胞をトランスウェルに播種した。6時間後、細胞をホルマリンで固定した。固定細胞をヘキストで染色した後、蛍光顕微鏡下に移動細胞数を計測した。

(2) 卵巣がん転移モデルは、ヌードマウス(4週齢、メス)の腹腔内にヒト卵巣がん SKOV3 細胞(5,000,000 細胞/マウス)を移植することで作製した。移植後、セラミドナノリポソーム製剤を腹腔内に隔日に投与した。移植 4 週間後、マウスを安楽死させた後、マウスを開腹した。腹膜内での転移性結節数を目視下に計測した。直径 1 mm 以上の結節を転移性結節とした。

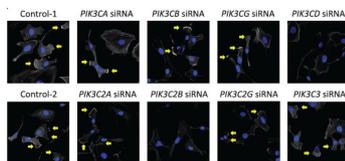
4. 研究成果

Aim-1: セラミドの抗運動性分子としての同定と作用機序の解明

PI3K 阻害剤 ワートマンニン(wortmannin)を用いて、SKOV3 卵巣がん細胞の仮足への PI3K の関与を探索したところ、仮足形成は本酵素に依存していることが判明した。PI3K には複数のアイソフォームが存在することから、特異的な siRNAs を用いて責任アイソフォームを同定した(図2)。その結果、PI3KC2β が仮足形成に関わる最も主要な PI3K であることが判明した。

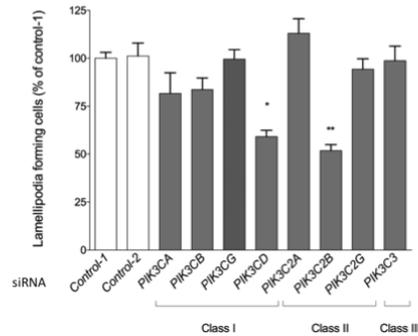
図2A, 仮足形成に関する特異的な PI3K 触媒サブユニットの同定

Class	Protein	Gene/symbol
Class IA	p110α%	PIK3CA%
	p110β%	PIK3CB%
	p110δ%	PIK3CD%
Class IB	p110γ%	PIK3CG%
	PI3KC2α%	PIK3C2A%
Class IC	PI3KC2β%	PIK3C2B%
	PI3KC2γ%	PIK3C2G%
Class II	VPS34p%	PIK3C3%



この仮足形成に対してのセラミドの作用を探索したところ、セラミドは強力に PI3KC2β 依存的な仮足形成を抑えることが明らかとなった。さらに、この分子メカニズムの解明を試みたところ、セラミドは PI3KC2β に相

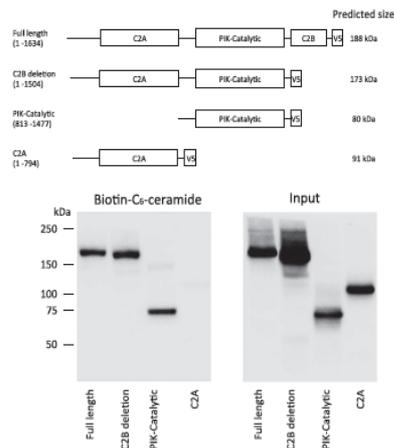
図2B, 仮足形成に関する特異的な PI3K 触媒サブユニットの同定



互作用することで本酵素の活性化を抑え細胞運動性を減弱させたと考えられた(図3)。さらに、セラミドの PI3KC2β 内での結合部位を同定するために、まずは PI3K ドメイン、C2 ドメインを欠損させたヒト PI3KC2β 発現ベクターを作製した。これらの欠損分子へのセラミドの結合性を評価したところ、セラミドは特異的に PI3K ドメインと相互作用することが明らかになった(図3)。

Aim-2, セラミドリポソームの抗卵巣がん転移効果と臨床応用への可能性

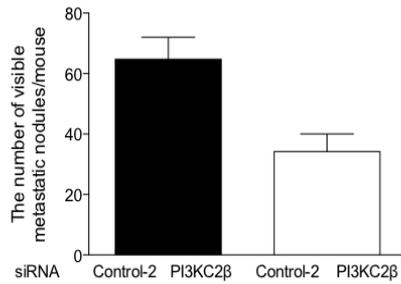
図3 セラミド結合ドメインの同定



(1) まず、PI3KC2β 依存的な細胞運動性の転移への関与を明らかにするために、本酵素ノックダウンの転移への効果を検証した。その結果、ノックダウン細胞の転移能は減弱す

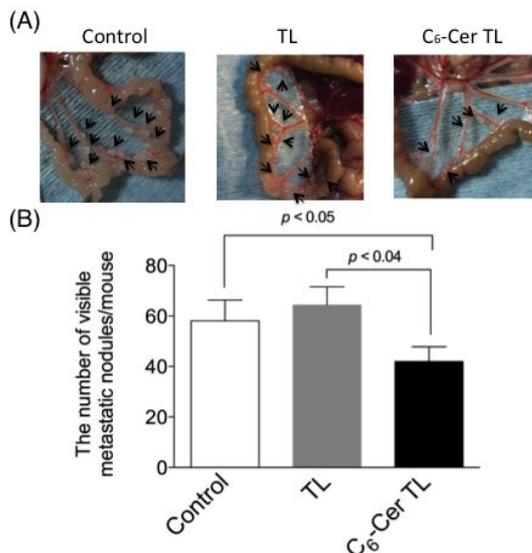
ることが判明した(図4)。したがって、SKOV3 卵巣がん細胞では、PI3KC2 β は転移を促進する分子であると考えられる。

図4 PI3KC2beta 依存的な播種転移



(2) セラミド製剤の抗転移効果を検証するために、ヌードマウスを用いたヒト卵巣がん細胞 in vivo 転移モデルを採用した。この転移マウスモデルにトランスフェリン結合型セラミドリポソーム製剤(15 mg/kg/日)を隔日に4週間腹腔内投与を行った。その結果、セラミドリポソーム投与により、腹腔内での卵巣がん細胞の播種転移はセラミド非含有リポソーム製剤投与群に比して有意に減少した(図5)。これらの結果から、セラミド

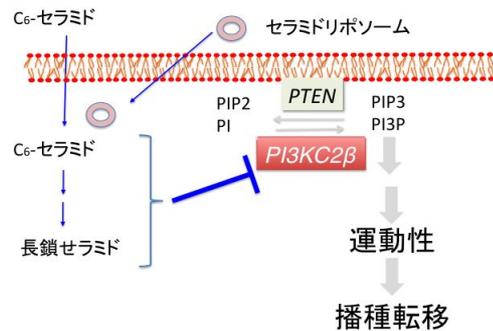
図5, セラミド製剤投与による卵巣がん転移の抑制



リポソーム製剤は卵巣がんの PI3KC2 β 依存的な播種転移を抑える新しいタイプの薬剤である可能性が考えられた。

以上のことより、セラミドは PI3KC2 β の活性化を抑えることで細胞の運動性および転移能を減弱させる(図6)と考えられた。

図6 セラミドはがん転移抑制分子である。



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 1 件)

1, Kazuyuki Kitatani, Toshinori Usui, Sriraman S.K., Masafumi Toyoshima, Ishibashi Masumi, Shogo Shigeta, Hideo Ogiso, Toshiro Okazaki, Yusuf A. Hannun, Vladmir P. Torchilin, Nobuo Yaegashi (2015) “Ceramide limits phosphatidylinositol-3-kinase C2β-controlled cell motility in ovarian cancer: potential of ceramide as a metastasis-suppressor lipid” *Oncogene, in press* (査読有り , 責任著者)
doi: 10.1038/onc.2015.330.

[学会発表] (計 2 件)

1, Kazuyuki Kitatani, Zhang Xuewei, Masafumi Toyoshima, Masumi Ishibashi, Shogo Shigeta, Nobuo Yaegashi
“Possible involvement of ceramide synthase in regulatory mechanism of ovarian cancer metastasis.”
63th Society for Reproductive Investigation
モントリオール (カナダ)
2016年3月19日

2, 北谷和之, 張雪薇, 臼井利典, 豊島将文, 重田昌吾, 石橋ますみ, 湊純子, 小木曾英夫, 岡崎俊朗, 八重樫伸生
“卵巣がん転移に関わるセラミド生成代謝酵素”
第4回婦人科がんバイオマーカー研究会
岐阜大学サテライトキャンパス (岐阜県岐阜市)
2016年2月27日

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

北谷 和之 (KITATANI, Kazuyuki)
東北大学 東北メディカル・メガバンク機構・助教

研究者番号 : 40539235