

令和 3 年 8 月 17 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09787

研究課題名（和文）Sphingosine kinaseを標的とした口腔癌の分子標的治療の開発

研究課題名（英文）Development of Molecular Targeted Therapy for Oral Cancer by Targeting Sphingosine Kinase

研究代表者

濱田 正和（Hamada, Masakazu）

大阪大学・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） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）： 生体における細胞死には、ネクロシス、アポトーシスに加えオートファジーを介した細胞死が存在する。ヒト口腔扁平上皮癌細胞を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た。PF-543とオートファジー阻害剤の併用にて、PF-543単剤よりも細胞死は増強されたことから、オートファジーは細胞生存に働いている可能性が示唆された。SphKに対する阻害薬の研究は進行しており、新規薬剤の開発、作用機序の解明によって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できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

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た。さらにPF-543とオートファジー阻害剤の併用にて、PF-543単剤よりも細胞死は増強されたことから、オートファジーは細胞生存に働いている可能性が示唆された。SphKに対する阻害薬の研究は進行しており、S1Pシグナルによるオートファジーの細胞死制御機序の解明を通して、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）： In addition to necrosis and apoptosis, cell death is mediated by autophagy. Treatment of human oral squamous cell carcinoma cells with PF-543 induced necrosis, apoptosis and autophagy, and the combination of PF-543 and autophagy inhibitor enhanced cell death more than PF-543 alone, suggesting that autophagy may play a role in cell survival. Research on inhibitors of SphK is ongoing, and further development of molecular targeted therapy targeting SphK is expected through the development of new drugs and elucidation of their mechanisms of action.

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

分子標的薬の開発は目覚ましく、わが国では口腔扁平上皮癌 (OSCC) に対して抗 epidermal growth factor receptor (EGFR) 抗体、免疫チェックポイント阻害薬の抗 PD-1 抗体が承認されて、従来のシスプラチンや 5FU とは違った分子標的治療が現実のものとなっている。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 safinol を用いて 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てきた。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。開発が進む多様な SphK 選択的阻害剤を用いて、その OSCC に対するプログラム細胞死とオートファジー誘導能について解明し、分子標的治療に繋がりたいと考えた。

2. 研究の目的

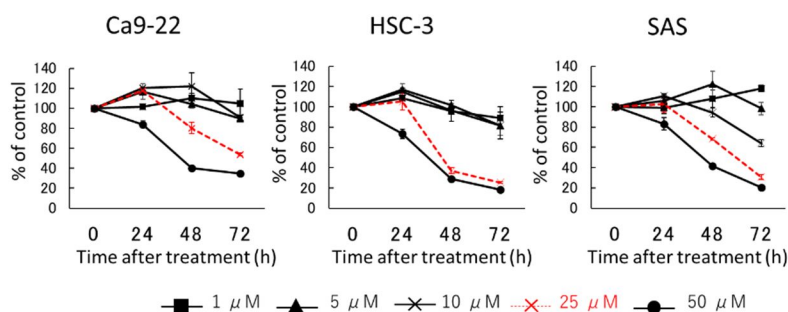
そこで、本研究では、PKC ならびに SphK1 阻害作用のある safinol での口腔癌細胞に対する実験結果を踏まえて、SphK1 阻害薬として開発された PF-543 の OSCC 細胞に対する抗腫瘍効果とまだ明らかにされていないオートファジー誘導能につき検討を行った。

3. 研究の方法

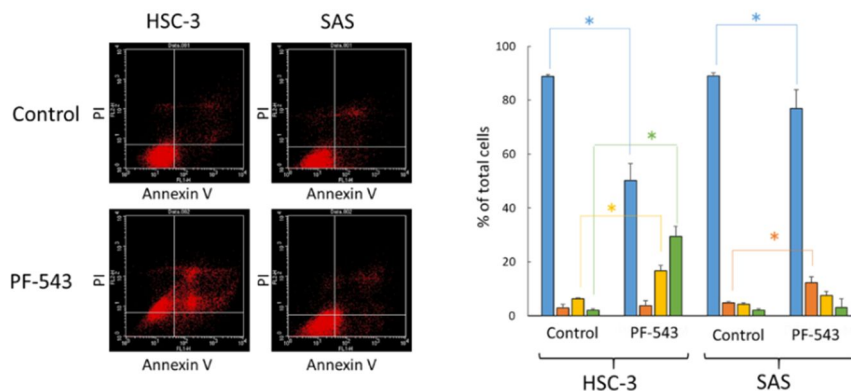
ヒト OSCC 細胞である Ca9-22 細胞、HSC-3 細胞、SAS 細胞を用いた。試薬は SphK1 阻害剤 PF-543、オートファジー阻害薬 3-MA、wortmannin、bafilomycin を用いた。細胞生存率は MTT assay にて測定し、アポトーシス細胞は annexin V - fluorescein isothiocyanate と propidium iodide (PI) を用いて染色を行い、フローサイトメトリーにより検出した。免疫プロット法および免疫蛍光染色には抗 microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) 抗体を用いた。LC3 は共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。オートファジーの形態観察は電子顕微鏡にて観察した。また The Cancer Genome Atlas (TCGA) データを用い SphK1 および SphK2 の発現についても検討を行った。

4. 研究成果

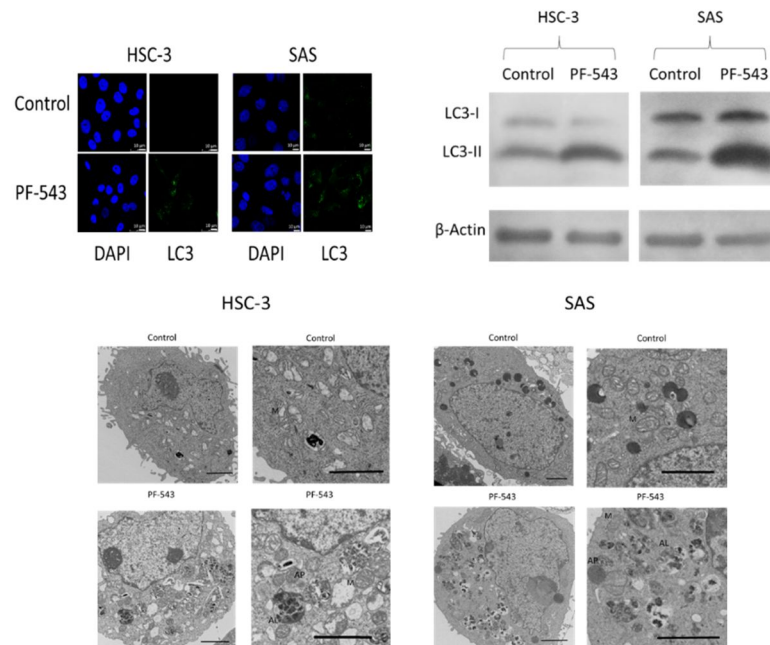
(1) Ca9-22 細胞、HSC-3 細胞、SAS 細胞を各濃度の PF-543 処理したところ、濃度依存的に細胞生存率は減少した。25 μ M の濃度で処理すると生細胞は 48 時間、72 時間で顕著に減少した。



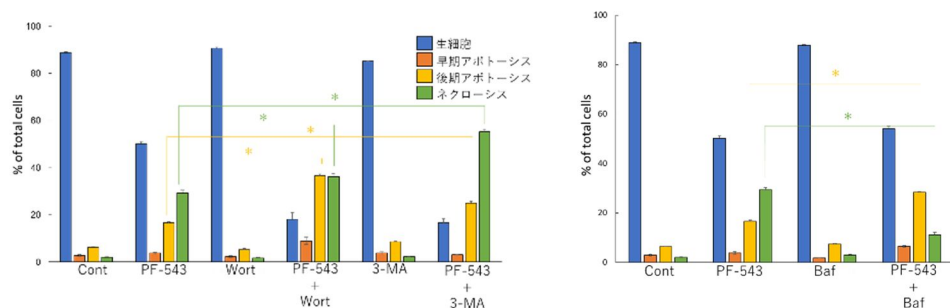
(2) PF-543 による細胞死の形態を明らかにするため、2 種類のヒト OSCC 細胞を 25 μ M PF-543 で 72 時間処置した後に annexin V と PI で染色し、フローサイトメトリー解析を行った HSC-3 細胞では生細胞の割合は非処置対照の約 50% であり、ネクローシス細胞の割合は約 30% と増加した。また、annexin V (+)PI (+) である後期アポトーシス細胞は約 20% と増加した。SAS 細胞では生細胞の割合は非処置対照の約 80% であり、ネクローシス細胞の割合には変化がなかった。



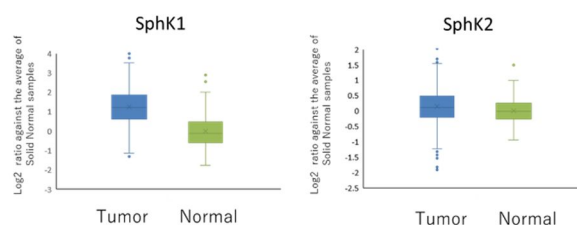
(3) LC3 は哺乳類で初めて発見されたオートファゴソーム膜結合タンパク質であり、現在オートファジーのマーカーとして広く用いられている。オートファジーが誘導される場合、形成されるオートファゴソームへの LC3 が集積し、LC3-I から LC3-II への変換が見られる。LC3 抗体を用いた蛍光免疫化学シグナルを共焦点レーザー顕微鏡にて観察したところ、25 μ M PF-543 で HSC-3 細胞, SAS 細胞を 72 時間処置した場合、LC3 の発現が増強し、顆粒状を呈した。PF-543 存在下で HSC-3 細胞, SAS 細胞を 72 時間処置したところ、すべての細胞で LC3-II の発現増強を認めた。さらに電子顕微鏡でも形態を観察したところ、PF-543 を処理した細胞ではオートファゴソームやオートリソソームが観察できた。



(4) HSC-3 細胞では PF-543 と 3-MA、wortmannin の併用にてネクローシスの増強を認め、bafilomycin の併用ではアポトーシスの増強を認めた。



(5) TCGA COAD study の RNA-seq データ (primary solid tumor, n = 499; solid tissue normal, n = 44) から HNSCC における SphK1, SphK2 の発現を解析したところ、SphK1 では正常組織にくらべ腫瘍組織で発現が多かった、一方 SphK2 は正常組織と腫瘍組織で差は認めなかった。



TCGA データ解析にて頭頸部癌において SphK1 では正常組織に比べ腫瘍組織で発現が多かった。一方 SphK2 は正常組織と腫瘍組織で差は認めなかった。SphK1 阻害薬 PF-543 による細胞傷害性にはオートファジーの誘導を伴い、誘導されたオートファジーは細胞生存に寄与することが示唆された。頭頸部癌において、正常組織に比べ腫瘍組織で SphK1 の発現が多いことより SphK1 は分子標的治療のターゲットになると考えられた。また、このような報告はなく、本実験系は PF-543 の口腔癌に対する抗腫瘍活性および細胞死誘導作用機序を解明するうえで有用と考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yura Yoshiaki, Tada Shinya, Fujita Yusei, Hamada Masakazu	4. 巻 16
2. 論文標題 Current treatment, particle radiotherapy, and boron neutron capture therapy for advanced oral cancer in patients	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oral Science International	6. 最初と最後の頁 49 ~ 68
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 由良義明, 濱田正和.	4. 巻 28
2. 論文標題 腫瘍融解性ウイルス療法とプロテオミクス	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 炎症と免疫	6. 最初と最後の頁 26-30
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yura Yoshiaki, Masui Atsushi, Hamada Masakazu	4. 巻 12
2. 論文標題 Inhibitors of Ceramide- and Sphingosine-Metabolizing Enzymes as Sensitizers in Radiotherapy and Chemotherapy for Head and Neck Squamous Cell Carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 2062 ~ 2062
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers12082062	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hamada Masakazu, Yura Yoshiaki	4. 巻 21
2. 論文標題 Efficient Delivery and Replication of Oncolytic Virus for Successful Treatment of Head and Neck Cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 7073 ~ 7073
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21197073	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hamada M, Uzawa N
2. 発表標題 Targeting for sphingosine kinase 1 in oral squamous cell carcinoma based on analysis of TCGA data
3. 学会等名 日本癌学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hamada M, Iwai S, Uzawa N
2. 発表標題 SphK1 inhibitor PF-543 induces autophagy regulated by ROS generation in oral squamous cell carcinoma cells
3. 学会等名 日本癌学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hamada M, Kameyama H, Iwai S, Uzawa N
2. 発表標題 Bidirectional effect of autophagy on sphingosine kinase I inhibitor PF543-induced cell death of oral squamous cell carcinoma cells
3. 学会等名 11th Joint Conference of the American Association for Cancer Research and the Japanese Cancer Association (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hamada M, Nishiyama K, Uzawa N
2. 発表標題 Targeting for SphK1, 2 and CERK in head and neck squamous cell carcinoma based on analysis of TCGA data
3. 学会等名 日本癌学会
4. 発表年 2020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
---------	---------