

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 19 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590667

研究課題名(和文) 悪性腫瘍細胞の薬剤感受性に及ぼすスフィンゴ脂質代謝の関与

研究課題名(英文) The involvement of sphingolipid metabolism in anti cancer drug sensitivity of malignant cells

研究代表者

村手 隆 (Murate, Takashi)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30239537

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)： 研究初年度は刺激因子GDNF処理神経系細胞株TGWにおける神経突起伸張に寄与するGAP43発現に対するsphingosine einase 1 (SPHK1)/S1P pathwayの関与を詳細に解明した。

2年度目はall trans retinoic acid (ATRA)によるneutral sphingomyelinase 2ならびにneutral ceramidaseの発現調節機序を明らかにした。

最終年度はマウス赤白血病細胞株における転写因子c-MYBによるSPHK1の過剰発現の機序と終末分化誘導によるその変化ならびに意義について解析をし報告した。

研究成果の概要(英文)： In the first year, we analyzed the mechanism of GAP43 expression during GDNF treatment of a neuronal cell line, TGW. Our analysis revealed that GDNF induced SPHK1 expression through RET receptor, followed by S1P secretion and S1P1/3 receptor activation. We further found that GAP43 expression was due to the increased CREB transcription factor binding to the GAP43 5'-promoter region.

Next, we analyzed the regulatory mechanism of neutral sphingomyelinase 2 and neutral ceramidase with all trans retinoic acid (ATRA). Our analysis revealed that activated Sp1 transcription factor and decreased GATA2 were responsive for the observed changes in treated MCF-7 and SH-SY5Y cells, respectively.

In the third year, we analyzed the mechanism of high SPHK1 expression of mouse Friend cells. We found that c-MYB is responsible for this overexpression and that chemical inducer, HMBA, rapidly decreased SPHK1 expression, which is at least partially responsible for this terminal differentiation process.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学、病態検査学

キーワード： sphingolipid metabolic enzyme gene expression anti-cancer drug human cancer cell lines

1. 研究開始当初の背景

スフィンゴ脂質代謝はその中間産物が、細胞内あるいは細胞間の情報伝達物質として、特に細胞増殖、細胞運動、細胞死との関連から注目されており、細胞の細胞増殖、生存、死にさいしてことにセラミド/スフィンゴシン1リン酸の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)。我々は、白血病の病態に関してこれらスフィンゴ脂質代謝主要酵素の定量 RT-PCR を確立し、白血病およびその前段階と考えられる骨髄異形成症候群における各酵素遺伝子メッセージを定量し、正常対照と比較して SPHK1 および neutral sphingomyelinase 2 の発現がこれら疾患で変化していることを報告した(Sobue et al. Leukemia 2006)。さらに主要スフィンゴ脂質腫瘍代謝産物を LC/MS/MS あるいは ESI/MS で測定する系を樹立し、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

これまでのこれらの研究成果をふまえて、

(1) 各種悪性腫瘍において未だ解析のされていない個々のスフィンゴ脂質代謝酵素の発現レベルおよびスフィンゴ脂質代謝産物量の腫瘍性疾患の病態に対する意義を明らかにする。

(2) その代謝産物である sphingosine 1-phosphate, ceramide1-phosphate の細胞膜受容体からのシグナル伝達系を解明し、悪性腫瘍を中心とする疾患にたいして、どの代謝酵素が分子標的療法の候補になりうるか、また、抗がん剤の感受性に対してどのような効果をもたらしているかを解析する。

(3)我々の予備実験で、SPHK1 の発現増加ががん幹細胞の特異抗原として注目されている CD44 を増加させることを明らかにした。さらに CD44 発

現の多い細胞株での SPHK1 発現レベルの解析、抗がん剤抵抗性の有無を解析する。

3. 研究の方法

(1) フレンド細胞株における SPHK1 の過剰発現の機序と、分化誘導時の変化のテーマについて研究方法を詳説する。共同研究者の坂野らはマウス赤白血病細胞株、フレンド細胞の腫瘍化に SPHK1 の過剰発現が関与することを報告した (Le Scolan et al. Blood 2005)。この細胞株はウイルス発ガンのモデルとして、また分化誘導療法のよいモデルとして汎用されている。この細胞株の SPHK1 過剰発現に関与する責任転写因子を同定し、HMBA 等による赤血球系の分化誘導にさいして SPHK1 がどのような変化を示すか、さらにその変化は赤血球分化の決定(commitment)にどのように関与しているのかを検討する。また HMBA 分化過程において SPHK1 mRNA、SPHK1 タンパクが著明に減少することを既に予備実験で明らかにしており、さらに詳細な解析のために HMBA 分化抵抗性株、SPHK1 ならびに SPHK2 過剰発現細胞株を樹立し、その細胞生物学的な性格を検討中である。さらにはフレンド細胞の白血化に重要と報告のある Pu.1, Fli-1, Myb 遺伝子の過剰発現株も樹立されつつあり、それらを使って分化感受性親株との比較で SPHK1 あるいは SPHK2 が分化あるいは増殖の停止に直接影響するかどうかも検討する。

(2) 乳がん細胞株の All trans retinoic acid (ATR)感受性、非感受性細胞株の代表として MCF-7, MDA-MB231 細胞株を用い、ATRA 刺激後のスフィンゴ脂質代謝酵素の発現の変化を我々が確立した定量 RT-PCR にて解析する。さらに代謝産物の量を LC/MS-MS にて測定する。両細胞株の比較で解析の候補遺伝子が確定すれば、その発現が転写レベルによるものか、あるいは転写後調節かを検討し、もしメッセージレベルの変化であること

が判明すれば転写機序そのものによるものか、それともメッセージの寿命の変化によるものかを解析する。

(3) CD44 を発現する細胞群で SPHK1 のレベルが高いのかそれとも SPHK1 高発現自体ががん幹細胞の特性であるかを検討するために、CD44 の発現のある各種がん細胞株について、フローサイトメトリーで CD44 抗体を用いてソーティングし、高発現細胞と低発現細胞で SPHK1 の発現レベルの差異を解析する。MDR などを発現している多耐性株とその親株とでも、CD44 抗原の発現レベルさらには SPHK1 発現レベルとの相関の有無を検討する。我々は既に wild type ならびに dominant negative の SPHK1 過剰発現細胞株を樹立、保持しており、これらをモデルとして CD44 発現レベルに差異が認められるかどうかを検討する。CD44 はヒアルロン酸の受容体でありそれ以降のシグナル伝達の徐々に明らかにされつつあるので、SPHK1 遺伝子発現レベルに CD44 以降のシグナル伝達がどのように関係しているのかも、シグナル伝達阻害剤などの用いた解析さらにプロモーター解析により検討する。

4. 研究成果

(1) 我々は神経系細胞株 TGW を用いて、GDNF 刺激による GAP43 の発現調節機序を解析した。TGW 細胞は GDNF 受容体の RET を発現しているので、本研究モデルとして用いた。以前、我々は GDNF がこの TGW 細胞において神経突起伸張を刺激し、さらに SPHK1 の転写を亢進する事、またこの神経突起の伸張が SPHK1 の siRNA によって阻害される事を報告している (Murakami et al. J Neurochem 102:1585-1594, 2007)。我々は、さらにこの神経突起の先端に存在して突起同士の接着に関与する GAP43 タンパクと SPHK1 との関係性を解析した。wild-type と dominant negative SPHK1 expression vectors を用いて、SPHK1 が GAP43 の発現を調節し

ている事を明らかにした。さらに、S1P の受容体である S1P1 と S1P3 が細胞外からの S1P の刺激伝達に重要である事も明らかにした。ついで、GAP43 のプロモーター解析を行い、5'側の -131塩基と第一エクソンの間に重要な活性部位が存在する事、とりわけ C/EBP 結合モチーフが重要であることを証明した。その後、EMSA, ChIP assay ならびに DNA pull down assay を用いて C-EBP alpha 転写因子とプロモーター領域の直接の結合を証明した。細胞内情報伝達系の解析では、S1P1/3 受容体から ERK を経て C/EBP beta 転写因子に至る経路が明らかになった。しかしながら、その他の転写因子、C/EBP beta, Neuro D1 ならびに Neuro D6 の GAP43 転写に対する関与は否定された。この成果は、J Cell Biochem 112:3449-3458, 2011 に発表した。

(2) All trans retinoic acid (ATRA) による neutral sphingomyelinase 2 (NSMase 2) 発現調節機序を解析した。ATRA はヒト乳がん細胞株 MCF-7 の増殖を抑制したが、MDA-MB231 細胞株の増殖は抑制しなかった。ATRA は MCF-7 細胞の NSMase2 mRNA と酵素活性を促進したが、MDA-MB231 ではその作用を認めなかった。LC-MS/MS 解析を行うと、ATRA は MCF-7 細胞において C24:1 ceramide を増加させたが、MDA-MB231 細胞ではその効果を認めなかった。ATRA による NSMase2 mRNA の増加は RAR siRNA により抑制された。さらに 5'-プロモーター領域の解析では、第一エクソンから 148 bp の領域が重要であり、プロモーター領域への変異の挿入、Sp1 タンパクの特異的阻害剤であるミスラマイシン A を用いた詳細な解析から、この領域に存在する 3 つの Sp1 結合モチーフが主要なプロモーター活性を担っている事を明らかにした。この Sp1 転写因子による NSMase 2 転写調節までの細胞内シグナルとして、我々は、ATRA による PKC delta の活性化が Sp1 タンパクのセリンリ

ン酸化を引き起こし、それによりNSMase 2の転写が活性化することを初めて明らかにした。ChIP assayではSp1, Sp3, AR alpha さらにH3およびH4のアセチル化（転写の活性化部位の特徴）がNSMase2の転写調節に関与している事を証明した。この研究成果は、J Biochem 151:599-610, 2012. に発表した。

(3) 同じく、ATRAによるneutral ceramidase (NCDase) の調節機序を、ヒト神経芽細胞株 SH-SY5Yを用いて解析した。これまでにATRAはSH-SY5Y細胞の分化を誘導し、細胞増殖を停止する事が知られている。我々のLC-MS/MSを用いた解析により、ATRAにより細胞内のd18:1-C16:0, d18:1-C18:0, d18:1-C24:1, and d18:1-C24:0 セラミドが増加する事が示された。定量 RT-PCR の結果、ATRAによるNCDase mRNA の減少が明らかとなった。更なる解析によってATRAが核内の転写因子GATA2 が減少する事を証明し、さらにGATA2 expression vectorとsiRNA for GATA2 を用いた実験ならびにChIP assayの実験などにより、NCDase mRNA levelはGATA2の発現レベルにより調節されている事を明らかにした。さらに、NCDaseのshRNAを安定過剰発現させた亜株の解析から、これらの細胞では細胞内セラミドが増加しており、神経突起形成が無刺激下でも観察された。これらの結果は、ATRAによるGATA2の量的変化とNCDaseおよび神経系の分化過程との密接な関連を示唆するものである。本研究成果は J Biochem 151:611-620, 2012に論文化した。

(4) 我々はマウスの各種細胞株の解析から、マウス赤白血病細胞株フレンド細胞が SPHK1 を mRNA、タンパクレベルで過剰発現していることを明らかにした。マウス SPH1 の遺伝子プロモーター領域の解析から、c-Myb 結合予想領域がプロモーター活性の主体をなしている事が証明され

た。フレンド細胞に過剰に発現しており、その白血化への関与が知られている転写因子 c-Myb の SPHK1 プロモーター領域への直接結合を、EMSA および ChIP assay を用いて証明した。フレンド細胞はHMBA, DMSO などの低分子化学物質で高率に終末分化する事が知られている。我々は、HMBA 処理フレンド細胞では既報のようにc-Myb が急速に減少する事を確認した。さらに興味深い事に、SPHK1 もこの c-Myb の減少により同じく急速に減少する事、さらにその SPHK1 の減少も細胞増殖の停止に密接に関係している事を明らかにした。本研究成果は Biochim Biophys Acta 1833:1006-1016, 2013 に発表した。

5. 主な発表論文など

[雑誌論文] (計6件)

1. Kawahara S, Otsuji Y, Nakamura M, Murakami M, **Murate T**, Matsunaga T, Kanoh H, Seishima M, Banno Y, Hara A. Sphingosine kinase 1 plays a role in the upregulation of CD44 expression through extracellular signal-regulated kinase signaling in human colon cancer cells. *Anticancer Drugs*. 2013;24(5): 473-83. doi: 10.1097/CAD.0b013e32835f705f. 査読あり
2. Mizutani N, Kobayashi M, Sobue S, Ichihara M, Ito H, Tanaka K, Iwaki S, Fujii S, Ito Y, Tamiya-Koizumi K, **Takagi A**, **Kojima T**, Naoe T, **Suzuki M**, Nakamura M, Banno Y, Nozawa Y, **Murate T**. Sphingosine kinase 1 expression is downregulated during differentiation of Friend cells due to decreased c-MYB. *Biochim Biophys Acta*. 2013 May;1833(5):1006-16. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.01.001. 査読あり
3. Ito H, Tanaka K, Hagiwara K, Kobayashi M, Hoshikawa A, Mizutani N, **Takagi A**, **Kojima T**, Sobue S, Ichihara M, **Suzuki M**, Tamiya-Koizumi K, Nakamura M, Banno Y, Nozawa Y, **Murate T**.

Transcriptional regulation of neutral sphingomyelinase 2 in all-trans retinoic acid-treated human breast cancer cell line, MCF-7. *J Biochem.* 2012 Jun;151(6):599-610. doi: 10.1093/jb/mvs037. 査読あり

4. Tanaka K, Tamiya-Koizumi K, Hagiwara K, Ito H, Takagi A, Kojima T, Suzuki M, Iwaki S, Fujii S, Nakamura M, Banno Y, Kannagi R, Tsurumi T, Kyogashima M, **Murate T**. Role of down-regulated neutral ceramidase during all-trans retinoic acid-induced neuronal differentiation in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *J Biochem.* 2012 Jun;151(6):611-20. doi: 10.1093/jb/mvs033. 査読あり

5. Cao K, Tanaka K, Komizu Y, Tamiya-Koizumi K, **Murate T**, Ueoka R, Kyogashima M, Usukura J, Takahashi T, Suzuki M. Hybrid liposomes affect cellular lipid constituents and caveolae structures. *Bioorg Med Chem Lett.* 2012 Feb 15;22(4):1731-3. doi: 10.1016/j.bmcl.2011.12.093. 査読あり

6. Murakami M, Ito H, Hagiwara K, Kobayashi M, Hoshikawa A, Takagi A, Kojima T, Tamiya-Koizumi K, Sobue S, Ichihara M, Suzuki M, Banno Y, Nozawa Y, **Murate T**. Sphingosine kinase 1/S1P pathway involvement in the GDNF-induced GAP43 transcription. *J Cell Biochem.* 2011 Nov;112(11):3449-58. doi: 10.1002/jcb.23275. 査読あり

[学会発表] (計 2 件)

1) Mizutani N, Inoue M, Nishida Y, Omori Y, Suzuki M, Koizumi K, Takagi A, Kojima T, Iwaki S, Fujii S, Nakamura M, Banno Y, Nozawa Y, Murate T. Regulatory mechanism of SPHK2 expression in colon cancer cell lines. 7th International Conference of Ceramide October 21st 2013. Montauk, NY. USA

2) Omori Y, Mizutani N, Inoue M, Nishida Y, Suzuki M, 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. 7th International Conference of Ceramide October 22nd, 2013. Montauk, NY. USA

[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)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号： 30239537

(2) 研究分担者

小嶋 哲人 (KIJIMA 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・助教

研究者番号： 30136371

鈴木 元 (SUZUKI Motoshi)

名古屋大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号： 80236017