

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590185

研究課題名(和文) 悪性黒色腫における生理活性脂質の抗がん剤耐性調節機序の解明

研究課題名(英文) Study on the regulation of anticancer agent-resistance by sphingolipids in melanoma cells

研究代表者

清島 真理子 (SEISHIMA, MARIKO)

岐阜大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00171314

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：スフィンゴ脂質代謝において重要な役目を果たすスフィンゴシキナーゼ(SK)はS1P合成を制御し、種々のがん細胞で高発現が知られている。そこで、S1P受容体拮抗薬であるFTY720とシスプラチン(CP)との併用効果を悪性黒色腫の抗がん剤耐性株SK-Mel28を用いて検討した。CPとFTY720の併用により細胞死及びアポトーシスが増加した。またSKのアイソザイムであるSK1の発現が低下し、リン酸化(p)-PI3K、p-Akt、p-mTORの発現量が減少した。したがってS1Pを介する系を基にした抗がん治療の可能性が考えられ、そのシグナル伝達は主にPI3K/Akt/mTOR経路が担うことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Sphingosine kinase (SK), a key enzyme in sphingosine-1-phosphate (S1P) synthesis, is known to be overexpressed in various cancer cells. The effects of anti-cancer agents on SK1/S1P signaling have not been fully assessed in melanoma cells. We investigated the effects of combination of FTY720, an S1P receptor antagonist, and cisplatin, an anti-cancer drug, on cell viability and molecular mechanisms in human melanoma line, SK-Mel-28 cells. By combination of FTY720 and cisplatin, the viability of melanoma cells was reduced, and expression of apoptosis-associated cleaved-PARP was significantly enhanced. In addition, combination of FTY720 and cisplatin reduced SK1 expression and also reduced the expression of phosphorylated PI3K, Akt, and mTOR. These findings suggest that FTY720 and cisplatin synergistically induce cell death and apoptosis through downregulation of the PI3K/Akt/mTOR pathway in SK-Mel-28 cells.

研究分野：皮膚科学

キーワード：sphingosine kinase 1 sphingosine 1-phosphate FTY720 melanoma cisplatin

### 1. 研究開始当初の背景

(1) スフィンゴ脂質の代謝産物のなかでセラミド (CER) はスフィンゴミエリン (SM) からスフィンゴミエリナーゼ (SMase) によって産生され、細胞死 (アポトーシス) を誘導するが、一方、CER からスフィンゴシンを経てスフィンゴシンキナーゼ (SK) により産生されたスフィンゴシン 1-リン酸 (S1P) は、逆に細胞増殖・生存に働く。すなわち CER および S1P は種々の細胞機能 (増殖・生存・アポトーシスなど) の調節に重要な役割を果たす。

(2) 抗がん剤感受性にセラミドトランスファープロテイン (CERT) が関与し、その変化による CER の異常蓄積が抗がん剤耐性に関係する因子として注目されている。これまで 1) 抗がん剤によるがん細胞死誘導に対する細胞内セラミド産生増加の関与、2) スフィンゴ脂質代謝のキー酵素である SK のがん細胞における高発現、3) 大腸がん細胞などを用いて、SPHK の高発現が抗がん剤耐性に関与することを明らかにしてきた。そこで、悪性黒色腫においてスフィンゴ脂質代謝による薬剤耐性制御機序を解明したいと考えた。

### 2. 研究の目的

抗がん剤耐性を示す悪性黒色腫細胞株において、S1P 受容体のアンタゴニストである FTY720 と抗がん剤の併用による細胞の生存およびアポトーシスの変化を検討する。さらにその作用メカニズムを明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) MTT assay

悪性黒色腫細胞培養株 5 種 (SK-MeL-28、A375、WM115、A2058、B16) を培養し、培養液にシスプラチン (CDDP)、パクリタキセル、カルボプラチン、ダカルバジン (DTIC) を添加し、MTT 測定法を用いて細胞生存率、すなわち各々の IC<sub>50</sub> を測定する。さらに、これらの培養液に S1P 受容体のアンタゴニストである FTY720 を添加する。

#### (2) ウエスタンブロット法

培養細胞抽出液を基質として SK1、SK2、cleaved PARP、total PI3K、リン酸化 (p)-PI3K、total Akt、p-Akt、total mTOR、p-mTOR、total EGFR、p-EGFR に対する抗体を用いてウエスタンブロットを行なう。ECL Western Blotting Detection system を用いて検出し、そのバンドの濃さをデンシトメーターで測定して得られた値について Student's *t*-test により有意差検定を行う。

### 4. 研究成果

(1) 悪性黒色腫細胞培養株の各種抗がん剤存在下での生存率

IC<sub>50</sub> は、5 種類の悪性黒色腫細胞培養株の中で SK-MeL-28 が最も高く、A375 が最も低かった。その差は抗がん剤の種類によって異な

った (図 1)。シスプラチンとパクリタキセルではこれらの細胞株で有意に IC<sub>50</sub> に差がみられた。そこで、以下の実験には抗がん剤としてシスプラチンを使用し、シスプラチン耐性株として SK-MeL-28、感受性株として A375 を用いることとした。

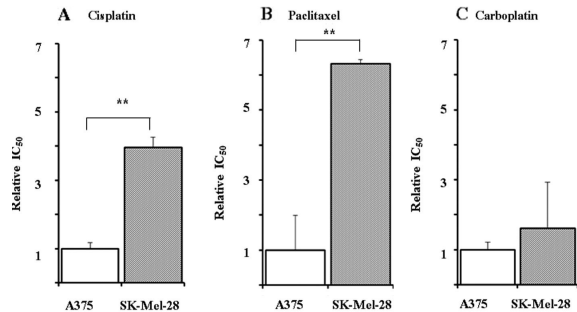


図 1: SK-MeL-28 と A37 細胞株における、シクロスポリン、パクリタキセル、カルボプラチンに対する TC<sub>50</sub> の比較。 \*\* P < 0.01

(2) シスプラチン耐性株の生存率に対する FTY720 の効果

シスプラチン耐性株 SK-MeL-28 において、FTY720 を加えることにより生存は抑制された (図 2)。

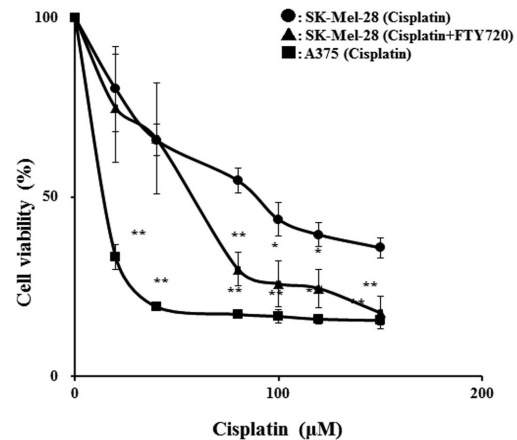


図 2: SK-MeL-28 細胞株における、シスプラチン単独およびシスプラチンと 3 μM FTY720 併用時の生存率の比較。 \* P < 0.05, \*\* P < 0.01

(3) FTY720 のアポトーシスに対する影響

シスプラチン耐性株 SK-MeL-28 において、FTY720 を加えることによりアポトーシスマーカーである cleaved PARP が増加した (図 3)。FTY720 はシスプラチンとの synergistic な効果によりアポトーシスを誘導すると考えられる。

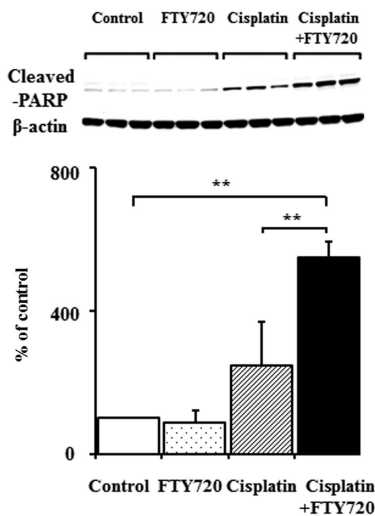


図 3: SK-MeL-28 細胞株における、3  $\mu$ M FTY720 単独、シスプラチン単独、および FTY720 とシスプラチン併用時の cleaved PARP の比較。\* $P < 0.01$

(4) FTY720 およびシスプラチンの SK1、SK2 発現に対する効果

SK-MeL-28 において、FTY720 を加えることにより SK1 の発現は 24 時間後、48 時間後とも増加した(図 4)。しかし、SK2 には変化がなかった。

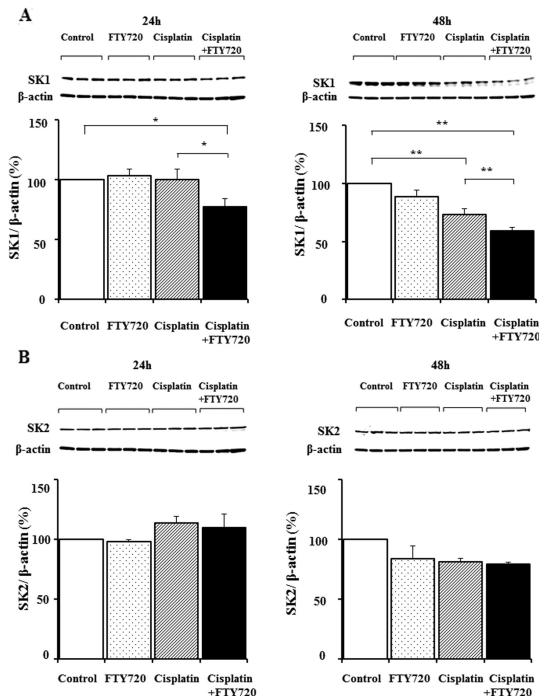


図 4: SK-MeL-28 細胞株における、3  $\mu$ M FTY720 単独、シスプラチン単独、および FTY720 とシスプラチン併用時 (24 時間あるいは 48 時間) の SK1 (A)、SK2 (B) の発現量の比較。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

(5) FTY720 およびシスプラチンのシグナル伝達 (PI3K/Akt 系) に対する効果

SK-MeL-28 において、FTY720 を加えることにより p-PI3K、p-Akt、p-mTOR の発現が低下した。また、Total EGFR の発現は FTY720 併用により減少した(図 5)。S1P 受容体を介するシグナル伝達は主に PI3K/Akt/mTOR 経路が担っていると考えられた。

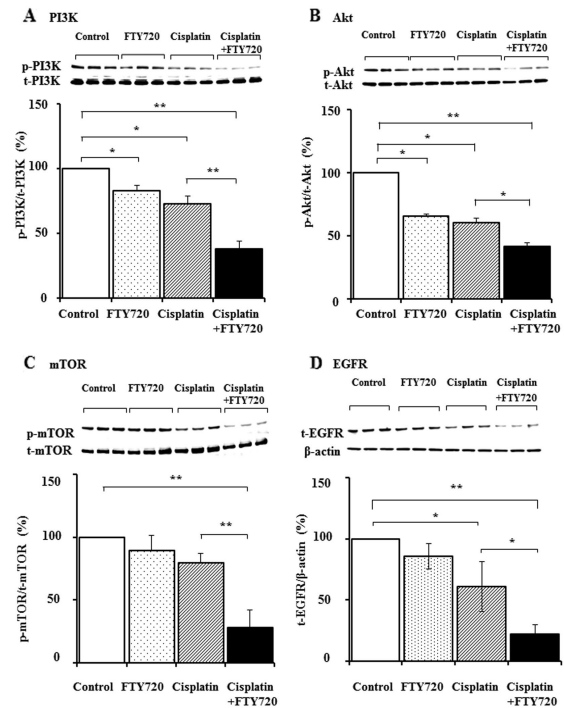


図 5: SK-MeL-28 細胞株における、3  $\mu$ M FTY720 単独、シスプラチン単独、および FTY720 とシスプラチン併用時の total PI3K、p-PI3K、total Akt、p-Akt、total mTOR、p-mTOR、total EGFR の発現量の比較。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

5. 主な発表論文等

(研究代表者及び研究分担者には下線)

(雑誌論文)(計 20 件)

Tokuzumi M, Fujisawa T, Shu E, Kanoh H, Saigo C, Miyazaki T, Hamaguchi Y, Seishima M. Anti-SRP Antibody-positive myopathy with universal alopecia and multiple vitiligo. *Acta Derm Venereol*, 2015,15: 497-498. doi: 10.2340/00015555-1985. (査読有)

Mizuno Y, Kato G, Shu E, Ohnishi H, Fukao T, Ohara O, Fukumoto H, Katano H, Seishima M. Merkel cell polyomavirus-positive Merkel cell carcinoma in a patient with epidermodysplasia verruciformis. *Acta Derm Venereol*, 2015, 95:98-99. doi: 10.2340/00015555-1868. (査読有)

Ishitsuka A, Fujine E, Mizutani Y, Tawada C, Kanoh H, Banno Y, Seishima M FTY720 and cisplatin synergistically induce the death of cisplatin-resistant melanoma cells through the downregulation

of the P13K pathway and the decrease in epidermal growth factor receptor expression. *Int J Mol Med*, 2014, 34: 1169-1174. doi: 10.3892/ijmm.2014.1882. (査読有)

Tawada C, Kanoh H, Nakamura M, Mizutani Y, Fujisawa T, Banno Y, Seishima M. Interferon- decreases ceramides with long-chain fatty acids: possible involvement in atopic dermatitis and psoriasis. *J Invest Dermatol*, 2014, 134: 712-718. doi: 10.1038/jid.2013.364. (査読有)

Mizutani Y, Iwamoto I, Kanoh H, Seishima M, Nagata K. Expression of drebrin, an actin binding protein, in basal cell carcinoma, trichoblastoma and trichoepithelioma. *Histol Histopathol*, 2014, 29: 757-766. (査読有)

Kanno Y, Kawashita E, Kokado A, Kuretake H, Ikeda K, Okada K, Seishima M, Ueshima S, Matsuo O, Matsuno H. 2AP mediated myofibroblast formation and the development of renal fibrosis in unilateral ureteral obstruction. *Sci Rep*, 2014, 4: 5967. doi: 10.1038/srep05967. (査読有)

Fujisawa T, Tawada C, Mizutani Y, Doi T, Yoshida S, Ogura S, Seishima M. Efficacy of granulocyte and monocyte adsorption apheresis for treatment of palmoplantar pustulosis. *Ther Apher Dial*, 2014, 18: 238-243. doi: 10.1111/1744-9987.12210. (査読有)

Fujisawa T, Fukao T, Shimomura Y, Seishima M. A novel TRPS1 mutation in a family with tricho-rhino-phalangeal syndrome type 1. *J Dermatol*, 2014, 41: 514-517. doi: 10.1111/1346-8138.12511. (査読有)

Okumura Y, Yamauchi A, Nagano I, Itoh M, Hagiwara K, Takahashi K, Uezato H, Maeda M, Seishima M. A case of mucocutaneous leishmaniasis diagnosed by serology. *J Dermatol*, 2014, 41: 739-742. doi: 10.1111/1346-8138.12564. (査読有)

Shu E, Kanoh H, Seishima M. Scleroderma renal crisis following pericardial effusion in a Japanese female. *J Dermatol*, 2014, 41: 824-826. doi: 10.1111/1346-8138.12574. (査読有)

Tawada C, Oshitani Y, Kimura M, Seishima M. Successful treatment of anal and perianal condyloma acuminata with imiquimod. *Acta Derm Venereol*, 2014, 94: 118-119. doi: 10.2340/00015555-1636. (査読有)

Kawase K, Oshitani Y, Mizutani Y, Shu E, Fujine E, Seishima M. Inflammatory epidermolysis bullosa acquisita

effectively treated with minocycline. *Acta Derm Venereol*, 2014, 94: 615-616, doi: 10.2340/00015555-1804. (査読有)

Ohashi M, Moriya C, Tanahashi K, Nakano H, Sawamura D, Seishima M. A new EDA gene mutation in a family of X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia. *J Dermatol Sci*, 2014, 74: 175-177. doi: 10.1016/j.jdermsci.2014.01.003. (査読有)

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: 473-483. doi: 10.1097/CAD.0b013e32835f705f. (査読有)

Mizutani Y, Ito H, Iwamoto I, Morishita R, Kanoh H, Seishima M, Nagata K. Possible role of a septin, SEPT1, in spreading in squamous cell carcinoma DJM-1 cells. *Biol Chem*, 2013, 394: 281-290. doi: 10.1515/hsz-2012-0258. (査読有)

Kimura M, Yoshioka T, Saio M, Banno Y, Nagaoka H, Okano Y. Mitotic catastrophe and cell death induced by depletion of centrosomal proteins. *Cell Death & Disease*, 2013, 4:e603. doi: 10.1038/cddis.2013.108. (査読有)

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, 1833: 1006-1016. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.01.001. (査読有)

[学会発表](計 8件)

Ishitsuka A, Fujine E, Kanoh H, Banno Y, Seishima M: FTY720 and cisplatin induce cell death of cisplatin-resistant melanoma cells through P13K pathway and decrease in EGFR expression. The 39th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, 2014.12.12-14, ホテル阪急エキスポパーク(大阪府・吹田市)

Yasue Y, Ishitsuka A, Fujine E, Banno Y, Kanoh H, Seishima M: Effects of interferon-gamma on expression of ceramide synthases and elongases of long-chain fatty acids in cultured human keratinocytes. The 39th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, 2014.12.12-14, ホテル阪急エキスポパーク(大阪府・吹田市)

石塚麻子, 藤根悦子, 坂野喜子, 加納宏

行, 清島真理子: シスプラチン耐性悪性黒色腫における S1P 受容体を介するシグナル伝達経路. 第 87 回日本生化学会, 2014. 10.15-18, 国立京都国際会館(京都府・京都市)

石塚麻子, 藤根悦子, 坂野喜子, 加納宏行, 清島真理子: 抗癌剤耐性悪性黒色株における S1P 受容体を介するシグナル伝達経路. 第 113 回日本皮膚科学会総会, 2014.5.30-6.1, 国立京都国際会館(京都府・京都市)

Kanoh H, Tawada C, Nakamura M, Mizutani Y, Fujisawa T, Banno Y, Seishima M: Decrease in ceramides with long-chain fatty acids in atopic dermatitis and psoriasis possibly by interferon-gamma. The 22nd Congress of the European Academy of Dermatology and Venereology, 2013,10.2-5, Istanbul (Turkey)

石塚麻子, 藤根悦子, 加納宏行, 坂野喜子, 清島真理子: Combination effect of antineoplastic drugs and S1P receptor antagonist FTY720 in malignant melanoma cells. 第 86 回日本生化学会大会, 2013.9.12, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

石塚麻子, 藤根悦子, 加納宏行, 坂野喜子, 清島真理子: 悪性黒色腫細胞株における、抗癌剤と S1P 受容体アンタゴニスト FTY720 の併用効果. 第 29 回日本皮膚悪性腫瘍学会, 2013.8.9-10, 甲府富士屋ホテル(山梨県・甲府市)

Naito M, Kato A, Miyazaki T, Ishitsuka A, Fujine E, Banno Y, Seishima M: Synergistic effects of sphingosine kinase 1 inhibitors and anti-neoplastic agents on melanoma cell apoptosis. The 37th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, 2012.11.7-9, ロワジュールホテル那覇(沖縄県・那覇市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

清島 真理子 ( MARIKO SEISHIMA )  
岐阜大学・医学系研究科・教授  
研究者番号: 00171314

### (2) 研究分担者

加納 宏行 ( HIROYUKI KANOH )  
岐阜大学・医学系研究科・准教授  
研究者番号: 40566494

坂野 喜子 ( YOSHIKO BANNO )  
岐阜大学・医学系研究科・非常勤講師  
研究者番号: 50116852