

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590197

研究課題名(和文)がん細胞のセラミド代謝系制御による効果的がん化学療法の開発

研究課題名(英文)Efficient cancer therapy by regulating ceramide metabolism in cancer cells

研究代表者

尾崎 恵一(OZAKI, Keiichi)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・准教授

研究者番号：50252466

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：セラミドのアポトーシス誘導能を不活化することが知られているセラミド代謝酵素Glucosylceramide synthase (GCS)の発現レベルが、PI3-kinase/Akt経路の活性化レベルの高いがん細胞で亢進していた。そこで、本経路を遮断すると、がん細胞のGCS mRNAの発現が抑制され、酵素活性が低下した。その際、セラミド誘導性の抗がん剤に対するがん細胞の感受性が顕著に上昇した。また、GCS阻害剤やGCS siRNAによる発現抑制によっても同様の効果が認められた。即ち、PI3-kinase/Akt経路下流のGCSは、抗がん剤感受性を左右する「がん分子標的」であることが示唆された。

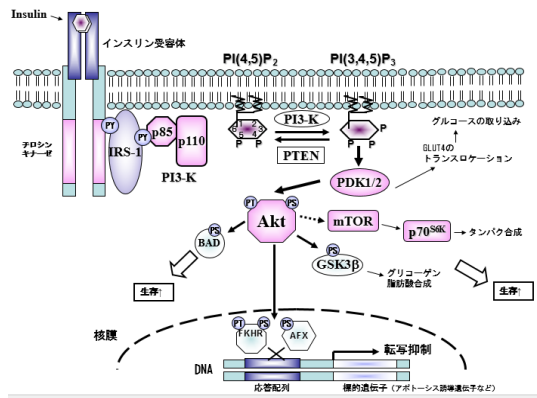
研究成果の概要(英文)：Glucosylceramide synthase (GCS), which inactivates the apoptosis-inducing efficacy of ceramide, is highly expressed in cancer cell lines in which PI3 kinase/Akt pathway is constitutively activated. Specific blockade of activated PI3 kinase/Akt pathway decreased the mRNA expression and enzymatic activity of GCS in cancer cells, and then increased the sensitivity of cancer cells to doxorubicin and vincristine which are ceramide-inducing anti-tumor drugs. Moreover, suppression of GCS by a specific inhibitor or transfection of GCS siRNA also enhanced apoptosis inducing efficacy of doxorubicin and vincristine in cancer cells. These results suggest that GCS, a putative downstream effector of PI3 kinase/Akt pathway is a crucial molecular target for cancer treatment to determine the sensitivity of cancer cells to some anti-tumor drugs.

研究分野：生化学 分子生物学

キーワード：セラミド 抗がん剤 PI3 kinase Akt

1. 研究開始当初の背景

活性化型変異 Ras や PTEN の機能喪失などによって恒常的に PI3-kinase/Akt 経路(下図)の活性化レベルの高いがん細胞に対して、PI3-kinase/Akt 経路を遮断すると、いくつかの抗がん剤(doxorubicin, vincristine)感受性が大幅に上昇することをこれまで見出していった。



2. 研究の目的

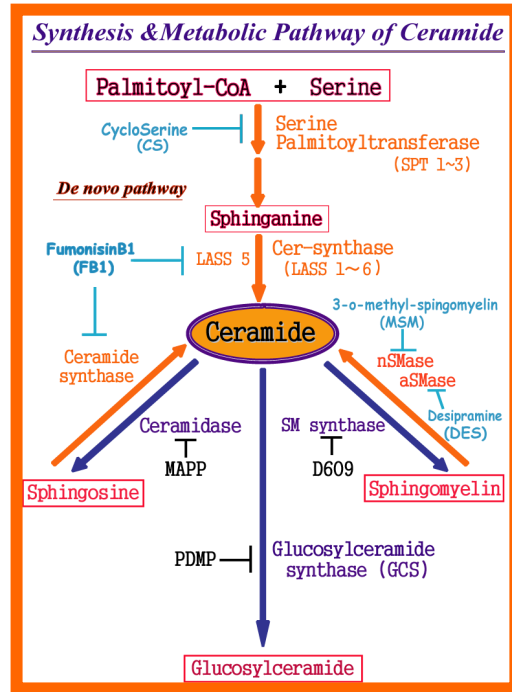
生存シグナルの中心としての PI3-kinase/Akt 経路は、正常な機能において極めて重要なため、PI3-kinase/Akt 経路を遮断による副作用の回避や、抗がん剤の感受性の増強メカニズムを明らかにするうえでも、PI3-kinase/Akt 経路に関わる新たなターゲット分子の同定を目指した。すなわち、PI3-kinase/Akt 経路の活性化レベルの高いがん細胞に対して、PI3-kinase/Akt 経路遮断剤ではなく、PI3-kinase/Akt 経路に関わるよりがん細胞に特徴的な標的分子を同定し、そのターゲット阻害によって抗がん剤感受性を増強させる新しい併用療法の開発を目指した。

3. 研究の方法

1) セラミド生合成・代謝酵素阻害剤を用いた抗がん剤感受性解析

- a) 次の様な図に示すようなセラミド異化酵素; Ceramidase, Sphingomyelin synthase (SMS), Glucosylceramide synthase (GCS) に対するそれぞれの特異的阻害剤 MAPP, D609, PDMP を併用することで、PI3-kinase/Akt 経路の活性化レベルの高いがん細胞の抗がん剤 (doxorubicin [DXR], vincristine [VCR]) に対する感受性が、どのように変わるかを検討した。
- b) 次の様な図に示すようなセラミド生合成酵素; de novo 合成系酵素である Serine palmitoyltransferase (SPT)、LASS およびサルベージ経路酵素である Ceramide synthase, neutral/acid sphingomyelinase (n/aSMase) に対する

それぞれの特異的阻害剤を併用することで、PI3-kinase/Akt 経路の活性化レベルの高いがん細胞の抗がん剤 (doxorubicin [DXR], vincristine [VCR]) に対する感受性が、どのように変わるかを検討した。



2) セラミド代謝酵素 GCS に関する解析

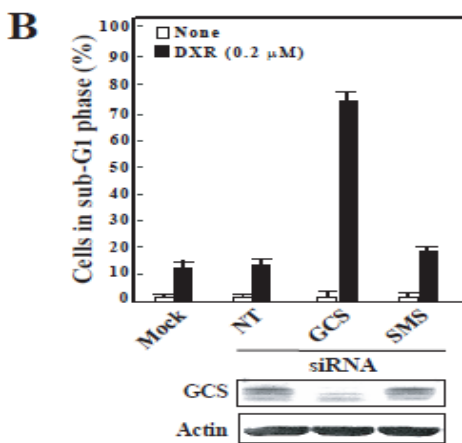
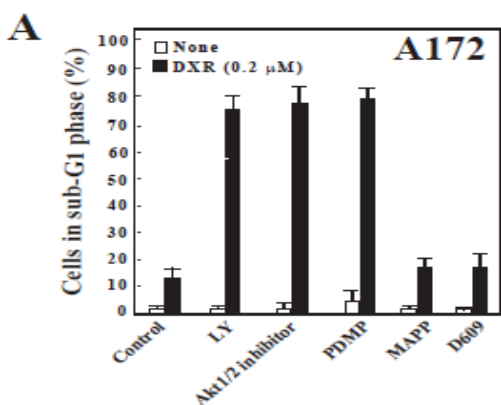
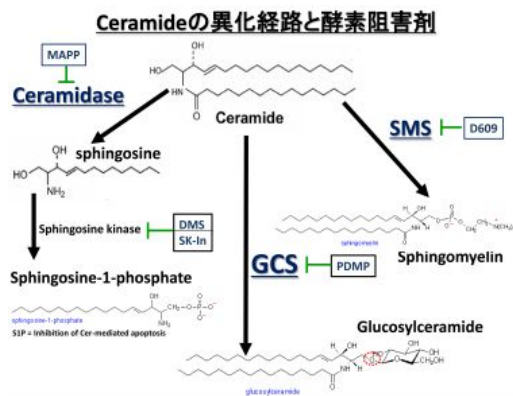
セラミド代謝酵素 GCS の mRNA 発現レベルは、real-time PCR 法によって評価した。また、GCS 酵素活性に関しては、蛍光ラベルした ceramide (BODIPY-FL-C5-ceramide) を基質として、細胞ライセートと反応させたのち、TLC に展開し蛍光強度を測定することで各スポットの Glc-ceramide/Ceramide 比率を算出しコントロールと比較することで評価した。

3) 細胞内セラミド各種分子の含量測定

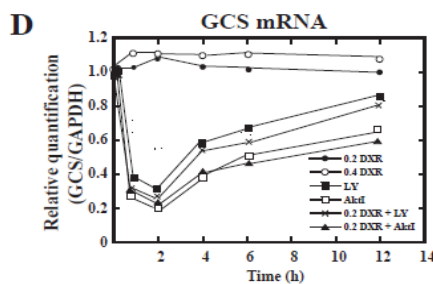
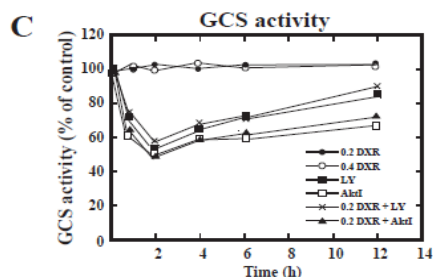
様々な試薬で処理後の細胞ライセートを HPLC で分離し、各種 Ceramide (C16, 18, 22, 24) の標準品により定量評価する。

4. 研究成果

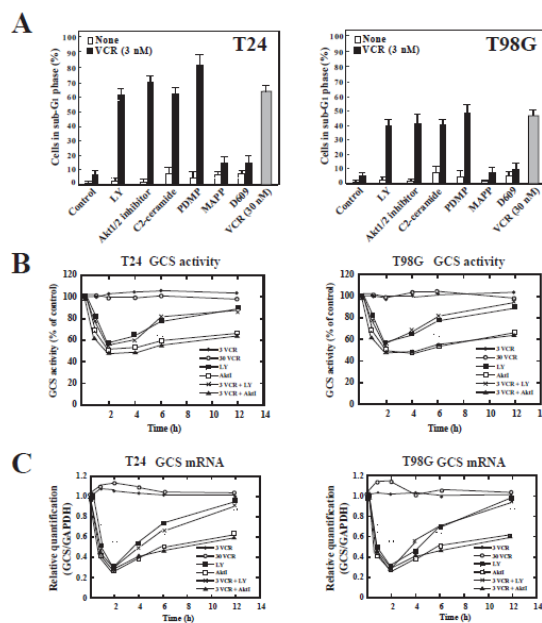
次の図の様に Ceramidase, Sphingomyelin synthase (SMS), Glucosylceramide synthase (GCS) に対するそれぞれの特異的阻害剤 MAPP, D609, PDMP の併用効果を解析した。PI3-kinase/Akt 経路の活性化レベルの高いがん細胞 A172 は、GCS 阻害剤 PDMP によって、PI3-kinase/Akt 経路阻害剤と同様に DXR に対する感受性が上昇した(A)。さらに、GCS siRNA トランスフェクションによる GCS の発現阻害によっても同様の結果が得られた(B)。



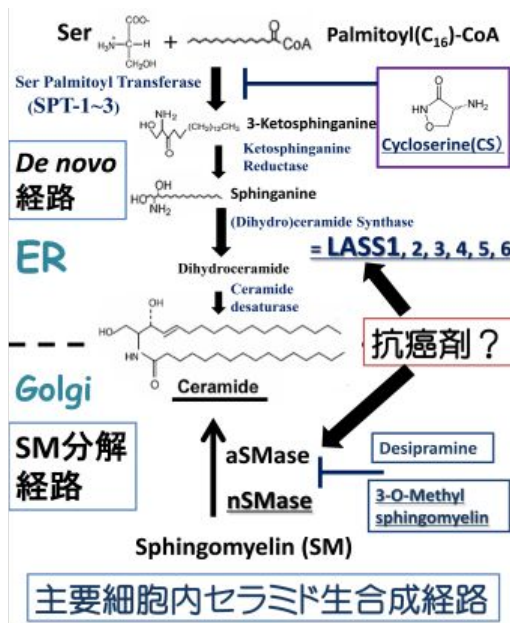
PI3-kinase/Akt 経路阻害剤(LY/AktI)は、A172 細胞の GCS 酵素活性(C)および mRNA レベル(D)を以下のように一時的に低下させた。



さらに、PI3-kinase/Akt 経路の活性化レベルの高いがん細胞 T24、T98G 細胞においては、VCR に対する感受性が GCS 阻害剤 PDMP によって上昇した(A)。また、PI3-kinase/Akt 経路阻害剤(LY/AktI)は、GCS 酵素活性(B)および mRNA レベル(C)を以下のように一時的に低下させた。



さらに、感受性上昇が見られた抗がん剤である DXR や VCR が細胞内セラミド量に及ぼす影響について解析したところ、PI3-kinase 阻害剤併用によって細胞内セラミドが顕著に上昇することが分かった。なお、それぞれの薬剤のセラミド誘導経路(下図)を解析したところ、DXR は nSMase を介した SM 分解経路、VCR は SPT を介した De novo 経路を活性化して細胞内にセラミドを誘導していることを明らかにした。



以上の結果から、PI3-kinase/Akt 経路下流因子としてセラミド代謝酵素 GCS が存在することを明らかにした。また、GCS はセラミド誘導性の抗がん剤感受性の決定因子として重要であることが分かった。今後は、GCS をがん分子標的としたより効率的な抗がん剤治療が望ましいと考えられる。

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2件)

1) “Atypical protein phosphatases: emerging players in cellular signaling”

Int. J. Mol. Sci. **14**, 4596-4612. (2013)

[査読有]

D. Sadatomi, S. Tanimura, K. Ozaki and K. Takeda.

2) “Blockade of the ERK pathway enhances the therapeutic efficacy of the histone deacetylase inhibitor MS-275 in human xenograft models.”

Biochem. Biophys. Res. Commun. **433**, 456-462. (2013)

[査読有]

S. Sakamoto, K. Ozaki, K. Fujio, S. Kajikawa, S. Uesato, K. Watanabe, S. Tanimura, T. Koji and M. Kohno.

[学会発表](計4件)

1) ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤感受性の規定因子としての p21

尾崎恵一, 田淵雄介, 谷村進, 武田弘資
第18回 日本がん分子標的治療学会学術集会 [2014年6月26日、仙台市情報産業プラザ(宮城県・仙台市)]

2) ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤に対する感受性における p21 の役割

田淵雄介, 小野真依, 柿本貴子, 谷村進, 武田弘資, 尾崎恵一

第30回日本薬学会九州支部大会

[2013年12月7日、長崎国際大学(長崎県・佐世保市)]

3) ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤に対する感受性因子の探索

川崎亮平, 谷村進, 武田弘資, 尾崎恵一

第29回日本薬学会九州支部大会

[2012年12月8日、熊本大学(熊本県・熊本市)]

4) Cytotoxic effects of pemetrexed in combination with cisplatin on non-small cell lung cancer cell lines.

尾崎恵一, 村山裕一, 川崎量子

第71回 日本癌学会学術総会 (2012)

[2012年9月20日、ロイトン札幌(北海道・札幌市)]

[図書](計0件)

[産業財産権] 該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

尾崎 恵一 (OZAKI, Keiichi)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・准教授

研究者番号: 50252466

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし