

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 25 日現在

機関番号：23701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590663

研究課題名(和文) リピドミクスによる新規白血病バイオマーカーの探索と臨床応用

研究課題名(英文) Search of new biomarker of leukemia focused on lipidomics

研究代表者

中村 光浩 (Nakamura, Mitsuhiro)

岐阜薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：30433204

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)：本研究は、白血病メカニズムをスフィンゴ脂質代謝物プロファイルに着目して分子レベルで解明し、得られた新規白血病バイオマーカーを白血病の診断・予測・治療的介入に応用することにある。申請者は、質量分析装置を駆使したリピドミクス手法を用いて白血病細胞のバイオマーカーを測定し、分子生物学的知見と組み合わせることにより、白血病の病因を明らかとした。我々が見出した新規バイオマーカーは、白血病の病態解明および治療に極めて強力なツールとなる。

研究成果の概要(英文)：Ceramide is the key intermediate involved in sphingolipid metabolism. Development of sensitive and specific methods is required to quantify the intra- and extracellular ceramide levels and to understand the physiological role of ceramides. The combination of liquid chromatography with mass spectrometry can serve as a powerful tool for analyzing complex intact ceramides. We developed a new method using mass spectrometer coupled with ultra performance liquid chromatography (UPLC) for the rapid and simultaneous quantification of ceramides such as C16-, C18-, C20-, C22-, C24-, C24:1-, and C26-ceramide. This method was successfully applied to monitor ceramides in the subcellular fraction obtained from cultured cells. In conclusion, our new method was validated for ceramide analysis, and this can be used in a wide range of clinical applications and to perform biological studies for discerning the role(s) of sphingolipid metabolites.

研究分野：生化学

キーワード：リピドミクス 白血病 質量分析装置 LCMS

1. 研究開始当初の背景

わが国の白血病発生率は年々増加傾向にあり、2006年には年間人口10万人当たり5.9人で、年間7400人以上が死亡している。その治療法の確立に向けて分子レベルでの病態解明が待たれる疾患である。臨床現場では白血病治療の有効性・安全性評価のための高感度、高選択性のバイオマーカーが待ち望まれている。がん化学療法の問題点に、抗がん剤による抵抗性(耐性)がある。抗がん剤耐性の機構については、p53をはじめ多くの因子が関与することが知られているが、研究代表者らは、スフィンゴ脂質(SL)代謝が各種抗がん剤抵抗性の制御に深く関与していることを明らかにした。そこでこの先行研究を進展させ白血病の病態解明と診断に有用なSLバイオマーカーを検討した。

SLのスフィンゴミエリンの代謝産物は細胞の生と死の調節に重要であることが知られている。スフィンゴミエリナーゼ(SMase)により産生されるセラミド(Cer)は、細胞死誘導に関与し、また、スフィンゴシンキナーゼ(SPHK)により産生されるスフィンゴシン1-リン酸(S1P)は、細胞外に分泌されG蛋白共役型受容体(Edg/S1Pファミリー)を介して様々な細胞にアゴニストとして作用し、細胞増殖・生存や細胞運動に重要な役割を果たすことが示されている(図1)。

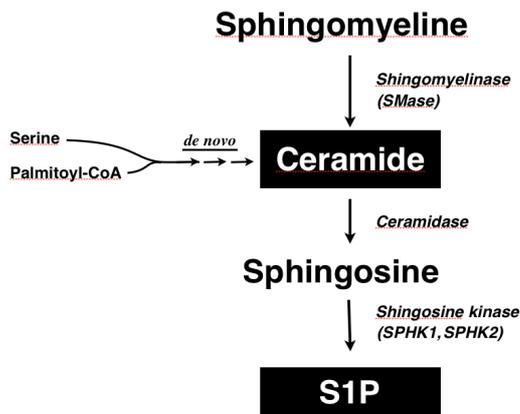


図1 スフィンゴ脂質代謝物(SL)

研究代表者および共同研究者(村手隆)は、遺伝子レベルでの白血病メカニズムの解明を行っている。急性白血病(AL)においてSL代謝酵素発現量を定量RT-PCRを用いて解析し、これらの疾患ではスフィンゴシンキナーゼ1(SPHK1)の過剰発現と中性SMase2の発現低下が特徴であることを明らかにした(Int J Hematol 87, 266-75 (2008))。さらにこれらの変化が実際にSLプロファイルに影響を与えるか、またそれが細胞の特性に影響するかを抗がん剤ダウノルビシン(DA)への感受性について解析を行った。16種の白血病細胞株におけるSPHK1の発現には多様性があったが、SPHK1メッセージ、タンパク、酵素活性に良好な相関が認められ、これらの発現レベルの高いものが、DAのIC₅₀において高い傾

向が認められた。DAの耐性とSPHK1の発現レベルに有意の相関が認められた。更にSLプロファイルをLC-MS/MSを用いて解析したところ、DA処理によりCerの増加、S1Pの減少が各々のIC₅₀レベルに応じて認められた。SPHK阻害剤はDAと相加効果を有した。これらの結果はSPHK1阻害剤がSPHK1高発現がん細胞においてよい治療標的薬剤となることを示唆している。我々のデータは、造血系の細胞においてSpiegelらの提唱するsphingolipid rheostat model(図2)(Biochim Biophys Acta 1758, 2016-26 (2006))が成立することを支持した。

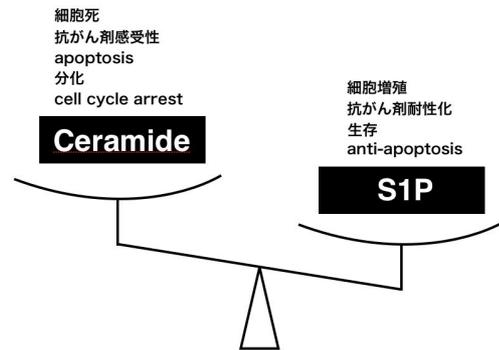


図2 SL rheostat 仮説

白血病細胞HL60の好中球への分化誘導過程におけるSPHK1の関与を明らかにし、S1P受容体シグナルがホスホリパーゼD(PLD)、PI3K/Akt系の生存シグナル系を活性化し、アポトーシス抑制に関与することを初めて示した。抗がん剤耐性とSPHK1活性の高発現の関連性を明らかにするために、白血病細胞で抗がん剤処理による細胞死誘導に抵抗性を示す細胞と非抵抗性細胞におけるSPHKの活性を比較検討したところ、SPHK1の過剰発現により細胞死が抑制された。抗がん剤に対するIC₅₀の高いがん細胞ではCer産生が低く、抗がん剤による細胞死に抵抗性を示し、IC₅₀の低いがん細胞は、抗がん剤処理によりCer産生が上昇し、S1Pは著しく低下した。SL rheostat はがん化学療法の指標になることを示した。

慢性骨髄性白血病(CML)由来の細胞では、Bcr-Abl蛋白質の阻害と細胞内Cerの蓄積が関連している(FASEB J 25, 3661-75)。CML患者において、CerがグルコシルCerに変換され細胞内濃度が減少するとCML由来細胞で抗がん剤イマチニブ、ニロチニブの耐性化が進むことが示唆されている(Ann Hematol 90, 1265-75, J Cancer Res Clin Oncol, 137, 1535-44)。以上のSLプロファイルにより、SLががん化学療法の指標となると考えられた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、白血病メカニズムをスフィンゴ脂質代謝物(SL)プロファイルに着目し

て分子レベルで解明し、得られた新規 SL バイオマーカーを白血病の診断・予測・治療的介入に応用することにある。申請者は、質量分析装置(MS)を駆使したリポドミクスにより白血病患者の SL プロファイルを求め、分子生物学的知見と組み合わせることにより、白血病の病因を探る。我々が見出す新規 SL バイオマーカーは、白血病の病態解明および治療に極めて強力なツールとなる。本研究の最終目標は客観的かつ精度の高い SL バイオマーカーの有用性を明らかとすることである。

3. 研究の方法

リポドミクスにおいて SL バイオマーカーの量的変化を正確に測定するための最大の技術的課題は、高選択かつ高感度な質量分析(MS)測定系の確立である。申請者の研究室は、種々の生体マトリックス(白血病細胞、大腸がん細胞、皮膚)の高い検出感度および質量精度を有しリポドミクスに適する MALDI-TOF/TOF、LC-MS 法を用いる。

4. 研究成果

白血病に関連する SL プロファイルのリポドミクス分析系を確立し、培養細胞を用いた分子生物学的検討を行った。

MALDI-TOF/TOF を用いた網羅的リポドミクス: Ultraflex TOF/TOF (ブルカー・ダルトニクス社)を行った。Bligh-Dyer 法に準じ、試料から抽出した SL に、マトリックス溶液(2,5-ジヒドロ安息香酸)を加え混和後測定した。測定はリフレクターモードで行い、測定に用いた照射レーザーの波長は 337nm とした。C₁₆⁻、C₁₇⁻、C₁₈⁻、C₂₄⁻および C_{24:1}-Cer が存在する事を明らかにした。

本研究の最終成果物は、臨床診断に応用可能な SL バイオマーカーの確立であるので、その測定法は高感度、高選択かつ頑健でなければならない。申請者は、この目的を達成するため LC-MS/MS の MRM を用い高感度かつ頑健な分析系を開発した。

その診断結果の選択性を向上させるため複数の SL を組み合わせる必要があると考えている。試料から SL 抽出を行い、LC-MS/MS(ABI 4000, Applied Biosystems 社)により、C₁₆⁻、C₁₈⁻、C₂₄⁻セラミドおよび S1P の各標品を用いて分離定量を行う。LC は、脂質のテーリングの起こりにくい新規 C₁₈ カラムを用い、グラジエント条件で測定している。MS/MS 検出は、ESI(+)で MRM トランジクションを設定している。MS 分析の特長から C₁₆⁻、C₁₈⁻、C₂₄⁻のアシル鎖毎に Cer を分析できた。C₁₆⁻、C₁₇⁻、C₁₈⁻、C₂₄⁻および C_{24:1}-Cer の m/z は各々 538.52、552.54、566.55、650.65 および 648.63 であった。

共同研究者(村手隆および坂野喜子)は、ヒト白血病細胞株 HL60 等の血球系細胞および大腸がん細胞における SPHK1 の関与を明らかにし SPHK1 の関与を明らかとした。SL プロ

ファイルと分子生物学的データの検討から、Cer と S1P の量的比率(Cer/S1P 比)が、がん細胞の増殖、分化の予測に有用との知見を得た。

さらに、スフィンゴリン脂質(SL)リポドミクス手法のバイオマーカーの感度および再現性を向上させるため、超高分解能を有する四重極-飛行時間型質量分析計(Q-TOF/MS)を超高分離液体クロマトグラフィー(UPLC)と組み合わせた UPLC Q-TOF/MS(Waters 社)を導入した。ギ酸アンモニウムを含む水/メタノール溶液グラジエントを用い、ODS-C8 カラムによるハイスループット化あるいは Kinetex Core-Shell カラムによる理論段数の向上を行った。本法により従来の C18 カラムに比して測定時間を 70%短縮できた。本研究成果は、7th International Ceramide Conferences において「Simultaneous determination of ceramides by UPLC QToF MS using Kinetex Core-Shell Column」、日本薬学会第 134 年会において「UPLC Q-ToF/MS による新規セラミド分析系の開発」の演題にて発表した(表 1)。

表 1 Comparison of chromatographic parameters between Core-Shell column and the conventional C₁₈ column

Columns	Ceramides	t _r (min)	k	α	Rs	N	H	TF
UPLC column								
Kinetex Core-Shell C18	C ₁₆ -Cer	4.0	3.2	1.15	3.39	9444	1.59	1.88
	C ₁₇ -Cer	4.4	3.7	1.42	8.23	26471	0.57	1.25
	C ₁₈ -Cer	5.9	5.2	1.75	11.81	9396	1.60	1.40
	C ₂₄ -Cer	9.5	9.0	—	—	10046	1.50	1.38
Waters Acquity BEH C18	C ₁₆ -Cer	4.7	3.5	1.12	2.93	9514	1.58	1.07
	C ₁₇ -Cer	5.2	3.9	1.26	7.48	37232	0.40	1.23
	C ₁₈ -Cer	6.3	5.0	1.71	17.47	15395	0.97	1.03
	C ₂₄ -Cer	10.1	8.6	—	—	32172	0.47	1.10
Conventional LC								
Conventional column Cadenza CD-C18	C ₁₆ -Cer	20.3	3.47	1.11	4.03	36558	0.68	1.57
	C ₁₇ -Cer	22.0	3.85	1.17	5.92	42975	0.58	1.19
	C ₁₈ -Cer	25.0	4.51	1.91	25.60	28332	0.88	1.19
	C ₂₄ -Cer	43.7	8.64	—	—	40393	0.62	1.05
Wide pore Cadenza CW-C18	C ₁₆ -Cer	14.5	2.33	1.10	1.98	8645	2.89	1.56
	C ₁₇ -Cer	15.4	2.55	1.11	3.21	27654	0.90	1.53
	C ₁₈ -Cer	16.7	2.85	1.55	13.99	25579	0.98	1.53
	C ₂₄ -Cer	23.4	4.40	—	—	29321	0.85	1.16

t_r: retention time, k: retention factor (k = (t_r - t₀)/t₀), α: separation factor (α = k₂/k₁), Rs: resolution (Rs = 1.18(t_{r2} - t_{r1})/W_{0.5}(t_{r1} + W_{0.5}(t_{r2}))), N: number of theoretical plates (N = 5.55(t_r/W_{0.5})²), H: height equivalent of a theoretical plate (H = length of column/N), TF: tailing factor (TF = W_{0.5}/W_{0.1})

本 SL 測定法は、他のがん細胞あるいは皮膚科領域のバイオマーカーの研究にも応用できた。平成 27 年度は、さらに定量可能対象 SL を各種ジヒドロセラミドおよびグルコシルセラミドにまで拡大した。特定のアシル鎖を有する Cer、スフィンゴミエリン、スフィンゴシンあるいは S1P/Cer 比、Cer/グルコシル Cer 比の定量が可能となった。

慢性骨髄性白血病モデル細胞に対する抗がん剤の影響を検討した。マウス IL-3 存在下 Ba/F3 細胞あるいは IL-3 非存在下 Ba/F3-p210 細胞白血病の細胞障害メカニズム解明のため慢性骨髄性白血病治療薬ニロチニブ添加時の Cer 含量を測定した。IL-3 非存在下 Ba/F3-p210 細胞の Cer 含量はニロチニブ処理により増加していた(図 3)。

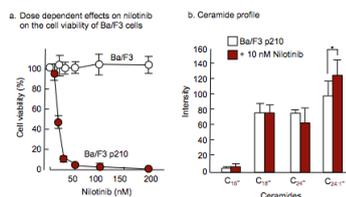


図 3 Effects of nilotinib on ceramide species in Ba/F3 p210

Cer が慢性骨髄性白血病患者における抗がん剤耐性化の新規バイオマーカーとなる可能性を示した。

従って、今後白血病患者の細胞内 SL を測定することにより、病態あるいは抗がん剤治療のステージにより変化する Cer が、de novo 合成由来 (C16-、C18-Cer) か、SM 由来 (C24-Cer) かといった、新しい分子レベルの情報を得ることが出来ると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

Mizutani N, Inoue M, Omori Y, Ito H, Tamiya-Koizumi K, Takagi A, Kojima T, Nakamura M, Iwaki S, Nakatochi M, Suzuki M, Nozawa Y, Murate T. Increased Acid Ceramidase Expression depends on Upregulation of Androgen-dependent Deubiquitinases, USP2, in a Human Prostate Cancer Cell Line, LNCaP. *J Biochem* 2015, in press.

Mizutani N, Omori Y, Tanaka K, Ito H, Takagi A, Kojima T, Nakatochi M, Ogiso H, Kawamoto Y, Nakamura M, Suzuki M, Kyogashima M, Koizumi K, Nozawa Y, Murate T. Increased SPHK2 transcription of human colon cancer cells in serum-depleted culture: the involvement of CREB transcription factor. *J Cell Biochem* 2015, doi: 10.1002/jcb.25173.

Tawada C, Kanoh H, Nakamura M, Fujisawa T, Banno Y, Seishima M. Interferon- γ 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.

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.

Kawahara S, Otsuji Y, Nakamura M, 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.

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; 151: 599-610. doi: 10.1093/jb/mvs037.

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; 151: 611-620. doi: 10.1093/jb/mvs033.

〔学会発表〕(計 16 件)

大森由佳里、水谷直貴、杉本元、小泉恵子、高木明、小嶋哲人、中村光浩、野澤義則、村手隆、レスベラトロールによる ASMase 発現増加に伴う細胞傷害性、第 15 回 Pharmaco-Hematology シンポジウム 2014.5.23-24 (名古屋)

水谷直貴、大森由佳里、杉本元、小泉恵子、高木明、小嶋哲人、中村光浩、野澤義則、村手隆、前立腺癌細胞株 LNCaP の酸性セラミダーゼ発現調節機構、第 15 回 Pharmaco-Hematology シンポジウム 2014.5.23-24 (名古屋)

西端友里、水谷直貴、西田弥生、梅津亮冨、加藤大和、鈴木俊之、上田夏実、中山蓉子、太和田知里、加納宏行、坂野喜子、清島真理子、村手隆、中村光浩、UPLC Q-ToF/MS による新規セラミド分析系の開発、日本薬学会第 134 年会 2014.3.27-30 (熊本)

水谷直貴、井上みなみ、西田弥生、大森由佳里、鈴木元、小泉恵子、高木明、小嶋哲人、岩城壮一郎、藤井聡、中村光浩、野澤義則、村手隆、ストレス刺激下でのフィンゴシンキナーゼ 2 の発現調節機構、第 36 回日本分子生物学会年会 2013.12.3-6 (神戸)

Mitsuhiro Nakamura, Yuri Nishibata, Ryogo Umetsu, Chisato Tawada, Hiriyuki Kanoh, Naoki Mizutani, Yayoi Nishida, Keiko

Tamiya-Koizumi, Yoshiko Banno, Mariko Seishima, Takashi Murate, Simultaneous determination of ceramides by UPLC QTOF MS using Kinetex Core-Shell Column, 7th International Ceramide Conferences 2013.10.20-24 (Montauk, NY)

Naoki Mizutani, Minami Inoue, Yayoi Nishida, Yukari Omori, Motoshi Suzuki, Keiko Koizumi, Akira Takagi, Tetsuhito Kojima, Souichiro Iwaki, Satoshi Fujii, Mitsuhiro Nakamura, Yoshiko Banno, Yoshinori Nozawa, Takashi Murate, Regulatory mechanism of SPHK2 expression in colon cancer cell line, 7th International Ceramide Conferences 2013.10.20-24 (Montauk, NY)

Yukari Omori, Naoki Mizutani, Minami Inoue, Yayoi Nishida, Motoshi Suzuki, Keiko Koizumi, Akira Takagi, Tetsuhito Kojima, Souichiro Iwaki, Satoshi Fujii, Mitsuhiro Nakamura, Yoshinori Nozawa, Takashi Murate, The mechanism of cytotoxicity by resveratrol against human leukemia cell lines, 7th International Ceramide Conferences 2013.10.20-24 (Montauk, NY)

Kanoh Hiroyuki, Tawada Chisato, Nakamura Mitsuhiro, Fujisawa Tomomi, Banno Yoshiko, Seishima Mariko, Decrease in ceramides with long-chain fatty acids in atopic dermatitis and psoriasis possibly by interferon-gamma, 22nd Congress of the European Academy of Dermatology and Venereology 2013.10.2-6 (Istanbul)

大森由佳里、水谷直貴、井上みなみ、西田弥生、鈴木元、小泉恵子、高木明、小嶋哲人、岩城壮一郎、藤井聡、中村光浩、野澤義則、村手隆、レスベラトロールによる白血病細胞株への細胞障害性機序の解析、第 86 回日本生化学会大会 2013.9.11-13 (横浜)

井上みなみ、水谷直貴、西田弥生、小泉恵子、鈴木元、岩城壮一郎、藤井聡、中村光浩、野澤義則、村手隆、前立腺癌細胞株 LNCaP の酸性セラミダーゼは脱ユビキチン化酵素 USP2 により発現調節される、第 86 回日本生化学会大会 2013.9.11-13 (横浜)

Chisato Tawada, Hiroyuki Tawada, Yoshiko Banno, Mitsuhiro Nakamura, Mariko Seishima, Ceramide profiles in stratum corneum of inflammatory skin diseases analyzed by MALDI-TOF-MS, 42nd Annual ESDR Meeting 2012.9.19-22 (Vienna, Italy)

Mitsuhiro Nakamura, Yuri Nishibata, Naoki Mizutani, Hiromi Ito, Mayuko Otsuka, Keiko Koizumi, Teruo Tsuchiya, Takashi Murate, Yoshiko Banno, Simultaneous determination of sphingolipid metabolites by LC/MS-IT-TOF using Kinetex Core-Shell HPLC column, 53rd International Conference on the Bioscience of Lipids, 2012.9.4-8 (Banff, Alberta, Canada)

Naoki Mizutani, Minami Inoue, Yayoi Nishida, Keiko Koizumi, Mitsuhiro Nakamura, Yoshiko Banno, Yoshinori Nozawa, Takashi Murate, c-Myb is the major regulator of sphingosine kinase 1 expression of friend cells: their role in terminal cell division, 53rd International Conference on the Bioscience of Lipids, 2012.9.4-8 (Banff, Alberta, Canada)

村手隆、水谷直貴、小泉恵子、田中広治、井上みなみ、西田弥生、中村光浩、坂野喜子、野澤義則、c-MYB はフレンド細胞における SPHK1 発現の主要な調節因子である：白血病細胞の終末分化におけるその役割、第 7 回スフィンゴセラピー研究会 2012.7.13-14 (石川)

Chisato Tawada, Hiroyuki Kanoh, Yoshiko Banno, Mitsuhiro Nakamura, Mariko Seishima, Analysis of ceramide profiles in stratum corneum of atopic dermatitis and psoriasis by MALDI-TOF-MS, 2nd Eastern Asia Dermatology Congress 2012.6.13-15 (China)

〔図書〕(計 0 件)
該当なし

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)
該当なし

取得状況(計 0 件)
該当なし

〔その他〕

該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

中村光浩 (NAKAMURA MITSUHIRO)

岐阜薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：30433204

(2)研究分担者

村手隆 (MURATE TAKASHI)

名古屋大学・医学部・教授

研究者番号：30239537

(3)研究分担者

坂野喜子 (BANNO YOSHIKO)

岐阜大学・医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：50116852

(3)連携研究者

該当なし