

令和元年5月11日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2018

課題番号：26290051

研究課題名(和文) CerS6経路およびセラミドホメオスタシスを標的とした癌治療法の開発

研究課題名(英文) Targeting ceramide synthase 6-dependent metastasis-prone phenotype in lung cancer cells

研究代表者

鈴木 元 (SUZUKI, Motoshi)

藤田医科大学・医学部・教授

研究者番号：80236017

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々はCERS6の発現ががん組織で亢進し、がんの浸潤の程度および予後と有意に相関していることを見出した。CERS6のノックダウンはin vitro細胞遊走能を低下させる。また、PKC およびRAC1陽性ラメリポディア形成が有意に低下させる。これらの表現型はCERS6によって産生されるC16:0セラミドの添加によって回復することより、がん細胞においてはCERS6がセラミド合成を介して腫瘍転移を促進している機序を示唆する。次に我々は、DMPCリポソームがCERS6依存的にアポトーシスを誘導すること、アポトーシス誘導の際には、アポトーシスシグナルであるセラミド産生を伴うことを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺癌は年間死亡者数が癌腫の中で一位であり、新規肺癌患者は世界で年間130万人に上る。発癌機序の解明と発癌機序に基づく治療法の開発を目指す本研究は大いに意義がある。さらに、CERS6下流経路阻害を利用した抗腫瘍薬について：従来の分子標的治療薬は主にキナーゼを標的とした阻害剤(抗体)である。本研究は、単に分子標的活性を阻害するという発想ではなく、CERS6を高発現して、アポトーシス中間体であるセラミドを産生しているという癌細胞の代謝特性を利用するという発想に基づく。このアプローチに学術的な特色・独創性がある。

研究成果の概要(英文)：We analyzed NSCLC specimens and cell lines and determined that ceramide synthase 6 (CERS6) is markedly overexpressed compared with controls. Elevated CERS6 expression was due in part to reduction of microRNA-101 (miR-101) and was associated with increased invasion and poor prognosis. CERS6 knockdown in NSCLC cells altered the ceramide profile, resulting in decreased cell migration and invasion in vitro, and decreased the frequency of RAC1-positive lamellipodia formation while CERS6 overexpression promoted it. Furthermore, combined treatment with 1-dimyristoylphosphatidylcholine liposome and the glucosylceramide synthase inhibitor D-PDMP induced cell death in association with ceramide accumulation and promoted cancer cell apoptosis and tumor regression in murine models. These results suggest that targeting this homeostasis has potential as a therapeutic strategy for CERS6-overexpressing NSCLC.

研究分野：腫瘍学

キーワード：肺癌 転移 セラミド 創薬 脂質

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

申請者らは、臨床検体と培養細胞双方から肺癌の組織型特徴的な遺伝子発現プロファイル、あるいは、幹細胞からプロジェニターに至るまでの系統特異的分化を担う因子に注目することから、肺癌発生と悪性化、転移に関係する遺伝子や経路を単離してきた。一連の研究で単離されてきた遺伝子や経路は、癌形質の理解に役立つばかりではなく、新規分子標的薬候補としても有用である。

これら研究中で我々は、特に、癌細胞特有の代謝制御機構に注目していた。肺癌検体 149 例を用いた脂質代謝制御タンパク質に注目した遺伝子発現解析により、各種代謝遺伝子群のうち、多くのスフィンゴ脂質代謝関連酵素群発現様式が正常と癌組織の間で異なっていることを発見し、肺癌ではスフィンゴ脂質代謝の亢進を想定していた。また、代謝亢進のボトルネックタンパク質として、EGFR 制御下に癌組織特異的発現するセラミド合成酵素 CERS6 を同定していた。CERS6 高発現患者群では高頻度に癌浸潤と予後不良を伴うなど、その発現量と臨床病態に高い関連性が観察されていた。

CERS6 ノックダウンは、スフィンゴ脂質代謝プロファイルの変化とマウスにおける腫瘍転移能の消失をきたす。CERS6 はセラミド合成酵素であり、セラミドと下流スフィンゴ脂質機能を通じて、様々な作用ポイント、例えば、糖脂質組成、膜流動性、アクチンストレスファイバー、細胞極性を変化させることより癌転移を促進する機序が考えられた。

2. 研究の目的

- 1) CERS6 による癌転移促進機構を明らかにする。
- 2) 癌転移抑制薬としての応用を目指し、CERS6 阻害剤を開発する。
- 3) 上述とは全く異なった戦略で、肺癌における CERS6 過剰発現を逆手にとった抗腫瘍薬の開発を行う。

3. 研究の方法

- 1) CERS6 による癌転移促進機構
  - A) 臨床検体 27 例を用いて、肺癌における CERS6 発現様式を調べた。
  - B) CERS6 発現調節機構を調べた。
  - C) CERS6 ノックダウン時に加えて、過剰発現時の細胞遊走能について調べた。
  - D) CERS6 ノックダウン時のセラミドプロファイル変化を調べた。
  - E) セラミド添加による、細胞遊走能のレスキュー実験を実施した。
  - F) CERS6 とその代謝産物セラミドが細胞遊走に必須な構造であるラメリポディアに及ぼす影響を調べた。
- 2) CERS6 阻害剤開発
 

各種低分子化合物ライブラリーを用いて CERS6 阻害剤スクリーニングを行った。
- 3) CERS6 過剰発現を逆手にとった抗腫瘍薬の開発
 

DMPC リポソームを用いて抗腫瘍効果の有無につき検討を行った。

  - A) DMPC リポソームによる細胞死と、CERS6 および細胞内セラミドレベルに関する解析を行った。
  - B) DMPC リポソームとグルコシルセラミド合成阻害剤 D-PDMP による相乗効果の有無につき解析した。

4. 研究成果

- 1) CERS6 による癌転移促進機構
  - A) 臨床検体 27 症例を用いて、肺癌における CERS6 発現様式を調べ、肺癌において高発現していることを明らかにした。一方、同一検体正常部における発現はほとんど観察されなかった（図 1）。
  - B) CERS6 発現調節機構を調べるため、miRNA 解析を行った。各種アルゴリズム及び、臨床検体データベース検索より、miRNA の一つ *miR-101* 発現が CERS6 発現と負の相関を示すことを見出した（図 2）。この関係は培養細胞においても観察された。ルシフェラーゼ発現を用いたレポーター実験により、*miR-101* が CERS6 の 3'UTR を直接標的としていることが明らかとなった。

Immunohistochemical expression of CERS6 in NSCLC and normal lung specimens

Lung Specimen(Lx)	Cancer	Normal lung		Score
		Type II pneumocyte	Pseudo-stratified ciliated epithelium	
AD (L1)	2	0	0	Score 0
AD (L2)	1	0	0	
AD (L3)	2	0	0	
AD (L4)	1	0	0	
AD (L5)	1	0	0	
AD (L6)	1	0	0	
AD (L7)	2	0	1	
AD (L8)	1	0	0	
AD (L9)	2	0	0	
AD (L10)	0	0	0	
AD (L11)	1	0	0	Score 1
AD (L12)	0	0	0	
AD (L13)	1	0	0	
AD (L14)	1	0	0	
SCC (L15)	2	0	0	
SCC (L16)	2	0	0	
SCC (L17)	2	0	0	
SCC (L18)	2	0	0	
SCC (L19)	0	0	0	
SCC (L20)	2	0	0	
SCC (L21)	2	0	1	Score 2
SCC (L22)	2	0	0	
SCC (L23)	2	0	0	
SCC (L24)	1	0	0	
SCC (L25)	2	0	0	
SCC (L26)	2	0	0	
SCC (L27)	1	0	0	

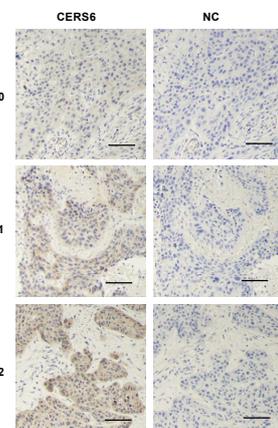


図 1 CERS6 の正常およびがん細胞における発現様式

- C) CERS6 高発現細胞に対してノックダウンを行うと、種々の配列を用いた RNAi 実験でい

ずれも細胞遊走能の低下を観察した (図 3A, B)。一方 CERS6 低発現細胞を用いた過剰発現細胞は逆に細胞遊走能の上昇を観察した。ノックダウン細胞をマウスに接種すると、肺転移能の低下を観察した。

C) CERS6 高発現細胞に対してノックダウンを行うと、種々の配列を用いた RNAi 実験でいずれも細胞遊走能の低下を観察した (図 3A, B)。一方 CERS6 低発現細胞を用いた過剰発現細胞は逆に細胞遊走能の上昇を観察した。ノックダウン細胞をマウスに接種すると、肺転移能の低下を観察した。

D) CERS6 ノックダウン時のセラミドプロファイル変化を調べたところ、CERS6 によって産生される C16 セラミドの低下が観察された。CERS 阻害薬によって細胞遊走能が低下した (図 4A, B)。

E、F) CERS6 ノックダウンの表現型はセラミド添加により解消した。細胞遊走能 (図 4C)、およびラメリポディア形成能 (図 4D) のレスキューが得られた。

## 2) CERS6 阻害剤開発

A) 2 千種類からなる低分子化合物ライブラリー (千葉大学) を用いて CERS6 阻害剤スクリーニングを行ったが有効な化合物を得ることはできなかった。

B) 2 万 7 千種類からなる低分子化合物ライブラリー (静岡県ファルマバレーセンター) を用いて CERS6 阻害剤スクリーニングを行った。いくつかの有力な候補が得られたため、詳細を引き続き検討中である。

3) CERS6 過剰発現を逆手にとった抗腫瘍薬の開発: DMPC リポソームを用いて抗腫瘍効果の有無につき検討を行った。A) 肺癌細胞は CERS6 発現が亢進する結果、脂質代謝機構の特異的变化を伴う。このアプローチでは、肺癌細胞が、一旦アポトーシス中間体であるセラミドを大量に産生し、下流物質に転換して癌特性を獲得しているという代謝特性を利用した。我々はセラミド前駆体 DMPC を含むリポソームに抗腫瘍効果があることを知っていた。この抗腫瘍効果は CERS6 依存的セラミド合成を必要とし、癌細胞に高い特異性があり、セラミドプロファイルの変化を伴っていた。DMPC が最終的に ceramide に代謝さ

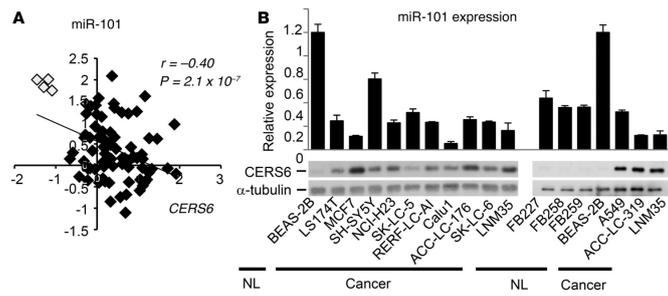


図 2 miR101によるCERS6発現制御

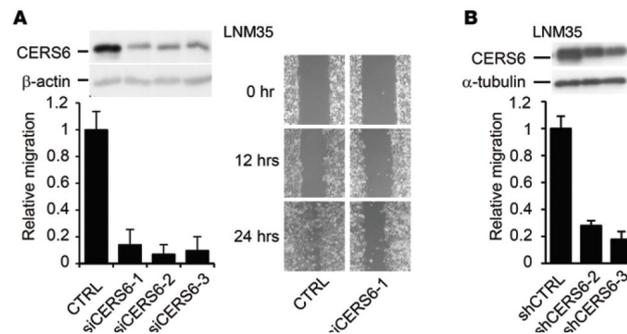


図 3 CERS6 ノックダウンによる細胞遊走能と転移能の低下

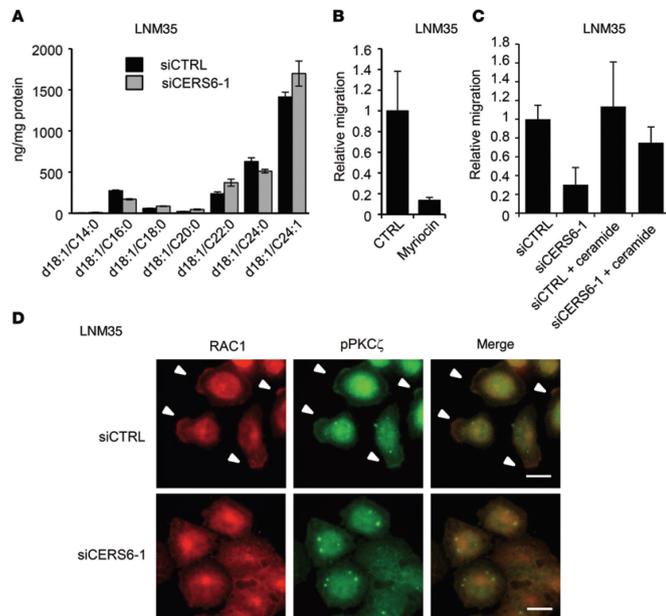


図 4 CERS6 ノックダウンによるセラミド量の変化とセラミド産生障害による細胞遊走能の低下、およびセラミドによる表現型のレスキュー実験

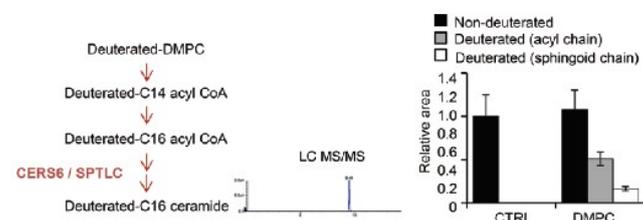


図 5 DMPC リポソームによる CERS6 依存的セラミド合成

れることはMSを用いて証明した(図5)。

B) DMPC リポソームとグルコシルセラミド合成阻害剤 D-PDMP による相乗効果の有無につき解析した。DMPC リポソームは D-PDMP により、細胞死の相乗効果を観察した。この細胞死はセラミド量変化とよく一致していた。さらに、効果はマウスを用いた実験でも検証された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 17 件)

1. Nishida Y, Mizutani N, Inoue M, Omori Y, Tamiya-Koizumi K, Takagi A, Kojima T, Suzuki M, Nozawa Y, Minami Y, Ohnishi K, Naoe T, Murate T. Phosphorylated Sp1 is the regulator of DNA-PKcs and DNA ligase IV transcription of daunorubicin-resistant leukemia cell lines. *Biochim Biophys Acta.* 1839: 265-274, 2014
2. Huang Q, Suzuki M, Zeng Y, Zhang H, Yang D, Lin H. Downregulation of POLD4 in Calu6 cells results in G1-S blockage through suppression of the Akt-Skp2-p27 pathway. *Bioorg Med Chem Lett.* 24:1780-1783, 2014
3. Arima C, Kajino T, Tamada Y, Imoto S, Shimada Y, Nakatochi M, Suzuki M, Isomura H, Yatabe Y, Yamaguchi T, Yanagisawa K, Miyano S, Takahashi T. Lung adenocarcinoma diversity definable by lung development-related miRNA expression profiles in association with clinicopathologic features. *Carcinogenesis.* 35:2224-2231, 2014
4. 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, and Murate M. Increased Acid Ceramidase Expression depends on Upregulation of Androgen-dependent Deubiquitinases, USP2, in a Human Prostate Cancer Cell Line, LNCaP. *J Biochem.* 158: 309-319 2015
5. Mizutani N, Omori Y, Tanaka K, Ito H, Takagi A, Kojima T, Nakatochi M, Ogiso H, Kawamoto Y, Nakamura M, Suzuki M, Kyogashima M, Tamiya-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.* 116: 2227-2238, 2015
6. Tai MC, Kajino T, Nakatochi M, Arima C, Shimada Y, Suzuki M, Miyoshi H, Yatabe Y, Yanagisawa K, Takahashi T. miR-342-3p regulates MYC transcriptional activity via direct repression of E2F1 in human lung cancer. *Carcinogenesis.* 36; 1464-1473, 2015.
7. Suzuki M, Cao K, Kato S, Komizu Y, Mizutani N, Tanaka K, Arima C, Tai MC, Yanagisawa K, Togawa N, Shiraishi T, Usami N, Taniguchi T, Fukui T, Yokoi K, Wakahara K, Hasegawa Y, Mizutani Y, Igarashi Y, Inokuchi J, Iwaki S, Fujii S, Satou A, Matsumoto Y, Ueoka R, Tamiya-Koizumi K, Murate T, Nakamura M, Kyogashima M, and Takahashi T. Targeting ceramide synthase 6-dependent metastasis-prone phenotype in lung cancer cells. Targeting CERS6-dependent Metastasis-prone Phenotype in Lung Cancer Cells, *J Clin Invest.* 126; 254-265, 2016. 報道: 中日新聞他
8. Yamaguchi T, Lu C, Ida L, Yanagisawa K, Usukura J, Cheng J, Hotta N, Shimada Y, Isomura H, Suzuki M, Fujimoto T, Takahashi T. ROR1 sustains caveolae and survival signaling as a scaffold of cavin-1 and caveolin-1. *Nat Commun.* 7, Article number:10060, doi:10.1038/ncomms10060, 2016. 報道: 朝日新聞他
9. Ida L, Yamaguchi T, Yanagisawa K, Kajino T, Shimada Y, Suzuki M, Takahashi T. ROR1, a target of NKX2-1/TTF-1 lineage-survival oncogene, inhibits ASK1-mediated pro-apoptotic signaling in lung adenocarcinoma. *Cancer Sci.*, 107; 155-161, 2016.
10. Mizutani N, Omori Y, Kawamoto Y, Sobue S, Ichihara M, Suzuki M, Kyogashima M, Nakamura M, Tamiya-Koizumi K, Nozawa Y, Murate T. Resveratrol-induced transcriptional up-regulation of ASMase (SMPD1) of human leukemia and cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 470; 851-856, 2016.
11. Sobue S, Mizutani N, Aoyama Y, Kawamoto Y, Suzuki M, Nozawa Y, Ichihara M, Murate T. Mechanism of paclitaxel resistance in a human prostate cancer cell line, PC3-PR, and its sensitization by cabazitaxel. *Biochem Biophys Res Commun.* 479; 808-813, 2016
12. Nishimoto N, Suzuki M, Izuta S. Effect of pH on the Misincorporation Rate of DNA Polymerase  $\eta$ . *Biol Pharm Bull.* 39; 953-958, 2016
13. Aoyama Y, Sobue S, Mizutani N, Inoue C, Kawamoto Y, Nishizawa Y, Ichihara M, Kyogashima M, Suzuki M, Nozawa Y, Murate T. Modulation of the sphingolipid rheostat is involved in paclitaxel resistance of the human prostate cancer cell line PC3-PR. *Biochem Biophys Res Commun.* 486; 551-557, 2017
14. Griesing S, Kajino T, Tai MC, Liu Z, Nakatochi M, Shimada Y, Suzuki M, Takahashi T.

- TTF-1-regulated miR-532-5p targets KRAS and MKL2 oncogenes and induces apoptosis in lung adenocarcinoma cells. *Cancer Sci.* 108:1394-1404, 2017
15. Liu Z, Yanagisawa K, Griesing S, Iwai M, Kano K, Hotta N, Kajino T, Suzuki M, Takahashi T. TTF-1/NKX2-1 binds to DDB1 and confers replication stress resistance to lung adenocarcinomas. *Oncogene.* 36; 3740-3748, 2017
  16. Mizutani N, Sobue S, Ichihara M, Aoyama Y, Hayakawa F, Nozawa Y, Suzuki M, Inoue C, Abe A, Nishizawa Y, Kawamoto Y, Murate T. BCL2 inhibitor ABT-199 and JNK inhibitor SP600125 exhibit synergistic cytotoxicity against imatinib-resistant Ph+ ALL cells. *Biochem Biophys Rep.* 15: 69-78, 2018
  17. Yamaguchi T, Hayashi M, Ida L, Yamamoto M, Lu C, Kajino T, Cheng J, Nakatochi M, Isomura H, Yamazaki M, Suzuki M, and Fujimoto T, Takahashi T. ROR1-CAVIN3 interaction required for caveolae-dependent endocytosis and pro-survival signaling in lung adenocarcinoma. *Oncogene*, in press

[学会発表] (計 15 件)

1. 鈴木元: 悪性腫瘍におけるスフィンゴ脂質代謝の果たす役割、第 15 回 Pharmaco-Hematology シンポジウム、名古屋、2014 年 5 月
2. Suzuki M, Murate T, Kyogashima M and Takahashi T: A pivotal role of CERS6 on the sphingolipid metabolic pathways and tumor metastasis in lung cancer. 第 73 回日本癌学会学術総会、シンポジウム、横浜、2014 年 9 月
3. 鈴木元: セラミド合成酵素 CerS6 の肺癌における役割とそれを利用した治療法の開発、国際高等研究所研究プロジェクト「分子科学的視点に立った医療・治療」、京都、2015 年 3 月
4. Suzuki M: Targeting the high expression levels of CerS6 in cancer. The first International Forum on Hybrid Liposomes, China, May 2015.
5. Targeting CERS6-dependent Sphingolipid Pathway in Lung Cancer Cells. Motoshi Suzuki, Takashi Murate, Mamoru Kyogashima and Takashi Takahashi. :第 74 回日本癌学会総会、2015 年 9 月、口演、名古屋
6. TTF-1/NKX2-1-induced miR-532-5p targets KRAS and MKL2 oncogenes and causes apoptosis in lung adenocarcinoma cells. Sebastian Griesing, Taisuke Kajino, Mei Chee Tai, Zhuoran Liu, Masahiro Nakatochi, Motoshi Suzuki, Takashi Takahashi 第 75 回日本癌学会総会、2016 年 10 月、口演、横浜
7. 鈴木元: セラミド合成酵素 CerS6 の肺癌における役割とそれを利用した治療法の開発、国際高等研究所研究プロジェクト「分子科学的視点に立った医療・治療」、京都、2016 年 2 月
8. Suzuki M, Murate T, Kyogashima M and Takahashi T: Sphingolipid metabolic pathways in lung cancer. 第 75 回日本癌学会学術総会、シンポジウム、横浜、2016 年 9 月
9. TTF-1/NKX2-1 binds to DDB1 and confers replication stress resistance to lung adenocarcinomas. Zhuoran Liu, Kiyoshi Yanagisawa, Sebastian Griesing, Mika Iwai, Taisuke Kajino, Motoshi Suzuki, Takashi Takahashi 第 75 回日本癌学会総会、2016 年 10 月、横浜
10. 鈴木元: 第 12 回スフィンゴセラピィ研究会 (STC) 「Targeting CERS6-dependent Sphingolipid Homeostasis in Lung Cancer Cells」、金沢、2017 年 7 月
11. Suzuki M: Targeting ceramide synthase 6-dependent metastasis-prone phenotype in lung cancer cells. 第 55 回日本生物物理学会年会 シンポジウム、熊本、2017 年 9 月
12. CERS6-dependent Sphingolipid Profile Regulates Lung Cancer Pathogenesis and Metastasis. Motoshi Suzuki, Takashi Murate, Mamoru Kyogashima, Yuji, Komizu, Yoko Matsumoto, Takashi Takahashi 第 76 回日本癌学会総会、2017 年 9 月、横浜
13. Suzuki M: CERS6-dependent Sphingolipid Profile Regulates Lung Cancer Pathogenesis and Metastasis, The 4th International Symposium of Gunma University Initiative for Advanced Research (GIAR), Gunma, Nov 7, 2017
14. Suzuki M: DNA polymerase delta and cancer. Fidelity, Mutations in Cancer Symposium, Seattle, Sep 2018
15. A metastasis protein CERS6 is transcriptionally regulated by miR-101 and YB-1. Hanxiao Shi, Toshiyuki Takeuchi, Atsuko Niimi, Yasuyoshi Mizutani, Takashi Murate, Takashi Takahashi, Motoshi Suzuki 第 76 回日本癌学会総会、2018 年 9 月、大阪

[図書] (計 2 件)

1. 鈴木元、高橋隆、CERS6 発現と転移能 がん分子標的治療 12 月号 (Vol.14 No.4) 103-107. 2016

2. 水谷泰嘉、鈴木元 がんと microRNA、がん生物学イラストレーテッド (羊土社), 2019 印刷中

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: がん転移抑制剤

発明者: 鈴木元、竹内俊幸、高橋隆、磯村久徳、小泉恵子、安藤隆幸

権利者: 学校法人藤田学園

種類: 知的財産権

番号: 2019-059018

出願年: 2019

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://info.fujita-hu.ac.jp/~motosuzu/index.html>

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名: 村手隆

ローマ字氏名: MURATE Takashi

所属研究機関名: 中部大学

部局名: 生命健康科学部

職名: 教授

研究者番号 (8 桁): 30239537

研究分担者氏名: 西田篤司

ローマ字氏名: NISHIDA Atsushi

所属研究機関名: 千葉大学

部局名: 大学院薬学研究院

職名: 教授

研究者番号 (8 桁): 80130029

### (2)研究協力者

なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。