

目次

表題-----	1
目次-----	2
本論文で用いた略語一覧-----	4
要旨-----	7
序論-----	10
第1章 細胞小器官標的型バクテリア性スフィンゴリエリナーゼ (bSMase) 及びバクテリア性セラミダーゼ (bCDase) 発現ベクターの開発と応用	
緒言-----	14
実験方法-----	16
1. 実験材料-----	16
2. 細胞培養-----	16
3. ベクター構築-----	16
4. SMase 活性測定-----	17
5. CDase 活性測定-----	17
6. ウェスタンブロッティング法-----	18
7. 免疫染色法-----	18
8. スフィンゴ脂質量の測定-----	18
9. 統計学的解析-----	19
実験結果-----	20
1. 細胞小器官標的型 bSMase 及び bCDase の活性測定-----	20
2. 細胞小器官標的型 bSMase 及び bCDase の細胞内局在-----	22
3. 細胞小器官標的型 bCDase または bSMase の細胞内スフィンゴ脂質量への影響-----	24
4. 細胞小器官標的型 bSMase 及び bCDase を用いた各セラミド分子種の変動-----	26
考察-----	29
小括-----	31
第2章 nCDase による外因性セラミドの細胞傷害性調節	
緒言-----	32
実験方法-----	33
1. 実験材料-----	33
2. 細胞培養-----	33
3. nCDase 安定発現細胞の樹立-----	33

4. ゴルジ体または細胞標的型 bCDase 及び bSMase 発現ベクターの作製-----	33
5. nCDase 活性測定-----	33
6. ウェスタンブロッティング法-----	34
7. 免疫染色法-----	34
8. 細胞生存率及びアポトーシス評価-----	34
9. 脂質量測定-----	34
10. 統計学的解析-----	35
実験結果-----	36
1. 大腸がん細胞株 HCT116 における nCDase の細胞内局在-----	36
2. nCDase による C ₆ -セラミドの細胞傷害性調節-----	38
3. nCDase と C ₆ -セラミドによるゴルジ体断片化との関連性-----	40
4. スフィンゴ脂質代謝における nCDase の役割-----	43
5. C ₆ -セラミド代謝及び細胞内取り込みに対する nCDase の関与-----	46
6. ゴルジ体におけるスフィンゴ脂質代謝に対する nCDase の関与-----	47
考察-----	48
小括-----	50
第3章 nCDase による内因性セラミド量の増加を介した細胞運動能の制御	
緒言-----	51
実験方法-----	52
1. 実験材料-----	52
2. 細胞培養-----	52
3. siRNA 及びプラスミドのトランスフェクション-----	52
4. 定量 RT-PCR-----	52
5. 葉状仮足形成数の解析-----	52
6. 脂質量測定-----	52
7. ウェスタンブロッティング法-----	53
8. 統計学的解析-----	53
実験結果-----	54
1. nCDase 抑制による細胞の運動能に対する効果-----	54
2. nCDase による葉状仮足形成促進作用-----	56
考察-----	57
小括-----	59
総括-----	60

謝辭-----	61
論文目錄-----	62
引用文献-----	63

本論文で用いた略語一覧

aCDase: acid ceramidase
ACER: alkaline ceramidase
ATCC: American Tissue Culture Collection
aSMase: acid sphingomyelinase
BCA: bicinchoninic acid
bCDase: bacterial ceramidase
bp: base pair
BSA: bovine serum albumin
bSMase: bacterial sphingomyelinase
Cer: ceramide
CerS: ceramide synthase
CERT: ceramide transport protein
CDase: ceramidase
cDNA: complementary DNA
C-terminal: carboxy terminal
C6-ceramide: N-hexanoyl-D-erythro-sphingosine
DSS: dextran sulfate sodium
DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO: dimethyl sulfoxide
DNA: deoxyribonucleic acid
ER: endoplasmic reticulum
GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HRP: horseradish peroxidase
iPM: inner plasma membrane
MEF: mouse embryonic fibroblast
MTT: methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide
nCDase: neutral ceramidase
nSMase: neutral sphingomyelinase
N-terminal: amino terminal
PARP: poly (ADP-ribose) polymerase 1
PBS: phosphate-buffered saline
PI3KC2 β : class II phosphatidylinositol 3-kinase β

PM: plasma membrane

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

RT-PCR: real-time polymerase chain reaction

SDS-PAGE: SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

SMS: sphingomyelin synthase

Sph: sphingosine

S1P: sphingosine-1-phosphate

TCGA: the cancer genome atlas

TGF- β : transforming growth factor- β

TNF- α : tumor necrosis factor- α

要旨

スフィンゴ脂質はスフィンゴイド塩基（スフィンゴシン及びジヒドロスフィンゴシン）から構成される脂質の総称であり、細胞増殖、血管形成、神経機能及び炎症の制御など当脂質群の多様な生物活性が注目されている。中でもセラミドはがんと密接に関わっており、細胞傷害性やがん転移抑制などの生理活性を示し、新たな抗腫瘍薬の創薬標的としての可能性が報告されている。一方で、セラミドの代謝物であるスフィンゴシン-1-リン酸は、細胞増殖及び運動能の促進作用を有しており、腫瘍性分子として考えられている。そして、スフィンゴ脂質の代謝が破綻することで、がんを含む様々な疾患が引き起こされることから、スフィンゴ脂質代謝を深く理解することは創薬活動を進めるうえで重要である。

セラミドはスフィンゴ脂質代謝の中心的分子であり、このセラミドの合成・代謝を担う代表的な酵素として、セラミドの加水分解を担うセラミダーゼ（CDase）、スフィンゴミエリンを分解してセラミドを生成するスフィンゴミエリナーゼ（SMase）、及びスフィンゴイド塩基をアシル化することでセラミド分子種を生成するセラミド合成酵素（CerS）が存在する。細胞内セラミド量は、これらの酵素によって調節されており、セラミド量制御を標的とした新たな抗がん剤の開発が期待されている。また、各細胞小器官には分子種の異なるセラミドが存在しており、細胞小器官特異的なセラミドの生理作用を発揮する。セラミドの代謝とその生理活性の作用機序は複雑であり、これらの分子メカニズムにおいて依然として不明な点が残されている。この全容解明には新たな分子生物学的ツールの開発や戦略的な研究の遂行が必要である。

CDaseには3つのタイプが存在し、触媒活性の至適 pH に応じて、酸性、中性及びアルカリ性に分類される。中性セラミダーゼ（nCDase）は、大腸組織において高発現しており、大腸がんとの関連性が報告されている。nCDase を欠損させることで細胞内セラミド量が増加してがんの増殖が抑制されることから、nCDase はがん治療薬の標的分子として注目されている。がん細胞におけるセラミドの生物活性を考慮すると、nCDase は特定の細胞小器官においてセラミドの抗腫瘍活性や抗転移活性を制御している可能性がある。

本研究では、nCDase を標的としたがん創薬基盤の構築を目指し、1) nCDase の細胞内局在に着目して、抗がん剤候補 C₆セラミド（膜透過性短鎖セラミド）の代謝及び抗腫瘍活性発現への nCDase の関与、並びに、2) がん転移に関わる運動性制御への nCDase の関与を明らかにした。

第1章 細胞小器官標的型 bSMase 及び bCDase 発現ベクターの開発と応用

細胞小器官特異的なセラミドの機能発現制御を検討するにあたり、まず細胞小器官特異的に各種スフィンゴ脂質の発現量を変化させる分子生物学的ツールとして、バクテリア性 SMase（bSMase）及びバクテリア性 CDase（bCDase）を哺乳動物細胞の細胞形質膜、ゴルジ体、小胞体、ミトコンドリア、細胞核及び細胞質で特異的に発現させることができるプラスミドベクターを構築し、これらの細胞小器官標的型酵素の発現による各種スフィンゴ脂質の変化量を解析した。

その結果、構築した細胞小器官標的型 bSMase 及び bCDase は、各細胞小器官において局在すること及び酵素活性を示すことが確認された。開発した細胞小器官標的型 bSMase 及び bCDase 発現ベクターを活用することで、がん細胞における nCDase の生物学的役割の解明（第 2 章）だけでなく、スフィンゴ脂質代謝酵素が活性化する環境下を模倣できる可能性があることから、今後のスフィンゴ脂質に関する研究において有用なツールになることが期待される。

第 2 章 nCDase による外因性セラミドの細胞傷害性調節

nCDase は大腸組織において高発現しており、大腸発がんモデルでは nCDase の欠損が細胞内セラミド量を増加させることでがんの増殖を抑制することが知られている。本章では、nCDase の大腸がん細胞の生存に対する役割を明らかにするために、nCDase を過剰発現させた大腸がん細胞株を樹立して、nCDase の細胞内局在及び生理機能を解析した。その結果、nCDase は細胞形質膜上だけでなく、ゴルジ体にも発現していることを新たに発見した。次に、抗がん剤候補 C₆-セラミドの細胞傷害性に対する nCDase の関与について検討した。これまでに、がん細胞に C₆-セラミドを外因性に処置すると、アポトーシス誘導（カスパーゼ 3 活性化及びゴルジ体断片化作用）による抗腫瘍活性が認められることが明らかにされてきた。本研究では、C₆-セラミドを nCDase 安定発現細胞に処置すると、アポトーシス誘導を介した細胞障害性が減弱した。また、C₆-セラミドはゴルジ体に移行してゴルジ体の断片化作用を示すことから、ゴルジ体に存在する nCDase との関連性が考えられた。この可能性を検証するために、第 1 章で開発したゴルジ体標的型 bCDase を細胞に強制発現させたところ、C₆-セラミドによるゴルジ体の断片化は抑えられた。一方で、細胞質標的型 bCDase を発現させた際には、C₆-セラミドによるゴルジ体の断片化作用は確認された。

以上より、ゴルジ体局在性 nCDase は C₆-セラミドの代謝分解に寄与し、その細胞傷害性を減弱させることが明らかになった。nCDase を阻害することで、抗がん剤候補 C₆-セラミドの細胞傷害性が増強されることを見いだした。

第 3 章 nCDase による内因性セラミド量の増加を介した細胞運動能の制御

がん細胞では細胞運動性が亢進しており、がん転移能を高める特徴を示す。セラミドは細胞形質膜の構成脂質であり、がん細胞の運動能及び転移能を抑えることから、細胞形質膜上における nCDase はがん細胞の運動性の制御に関与している可能性が考えられる。本研究では、この可能性を検証するため、SKOV3 卵巣がん細胞において nCDase をノックダウンした。その結果、細胞形質膜において、細胞運動性の指標である葉状仮足（細胞運動方向に形成される突起）の形成が抑制され、内因性の C_{24:1}-セラミド分子種が細胞内に蓄積した。これらの結果から、C_{24:1}-セラミド分子種は nCDase の基質であることが示唆された。次に、C_{24:1}-セラミド分子種を SKOV3 細胞に処置すると、葉状仮足の形成は抑制された。逆に、nCDase を安定的に強制発現させた細胞においては、葉状仮足の形成は空ベクターを処置した細胞に比して有意に促進した。以上の結果から、nCDase は細胞形質膜において C_{24:1}-セラミド分子種の分解を担い、細胞運動性を制御することを見いだした。したがって、nCDase

阻害剤はがん細胞の運動性を抑える新たな創薬戦略になる可能性がある。

本研究の結果より、セラミドの代謝制御を司る nCDase は、細胞形質膜だけでなくゴルジ体にも局在していることが明らかになった。ゴルジ体に局在する nCDase は、外因性に処置した C₆-セラミドの代謝分解を促進し、C₆-セラミドの抗がん作用（アポトーシス誘導を介した細胞傷害作用）を妨げることを見いだした。更に、細胞形質膜上に局在する nCDase 阻害は、内因性セラミドの蓄積を介して、がん細胞の運動能の制御に関わることが明らかとなった。これらの研究成果は、nCDase ががん治療薬の新たな創薬標的分子である可能性を示すものであり、セラミド代謝制御によるがん創薬の基盤構築につながると期待される。

序論

スフィンゴ脂質は、スフィンゴイド塩基とよばれる長鎖アミノアルコールを骨格としてもつ脂質群である。哺乳動物細胞におけるスフィンゴ脂質のスフィンゴイド塩基は、主にスフィンゴシンであり、そのアミノ基にアシル基がアミド結合するとセラミドとなる (図 1A)。スフィンゴ脂質は、細胞膜の構成成分だけでなく、アポトーシス、プログラム化ネクローシス、細胞運動、細胞増殖、オートファジーなどの細胞機能調節に関与している(1, 2)。中でもセラミドはがんと密接に関わっており、細胞傷害性やがん転移抑制などの生理活性を示すことから、新たな抗がん剤の創薬標的として注目されている。一方で、セラミドの代謝物であるスフィンゴシン-1-リン酸は、細胞増殖や遊走能を亢進する作用を有しており、腫瘍性分子として考えられている(3)。多様な生物活性を示すスフィンゴ脂質の特徴を解明するためには、スフィンゴ脂質代謝を深く理解する必要がある。また、スフィンゴ脂質代謝を理解することで、スフィンゴ脂質代謝と疾患の関連性や新薬創製にも貢献できることが期待される。

次に、セラミドとがんとの関連性について述べる。セラミドは、近年、腫瘍の増殖や転移を抑える抗腫瘍性脂質として認識されている。がん細胞において、セラミドは細胞内シグナル伝達分子としてアポトーシスまたはオートファジー性細胞死を誘導する(10-12)。また、代謝亢進によって細胞内のセラミド量が減少すると、フルオロウラシルなどの抗がん剤に対する抵抗性獲得にもつながる(13)。他にも、セラミドはがん細胞の運動能を低下させる働きを示すことから、がん転移の制御にも寄与することが示唆されている(14)。従って、セラミド代謝を創薬標的とした新たな抗がん剤の開発が注目されており、実際に、セラミドナノリポソーム製剤が、肝臓がんや再発・難治急性骨髄性白血病の治療薬として、現在臨床開発段階にある(15, 16)。

セラミドを中心としたスフィンゴ脂質の代謝経路を図 1B に示した。セラミド代謝酵素の 1 つであるセラミダーゼ (CDase) は、セラミドをスフィンゴシンと遊離脂肪酸に加水分解する酵素であり、細菌からヒトまで広く保存されている。セラミダーゼには 3 つのタイプが存在し、触媒活性の至適 pH に応じて、酸性、中性及びアルカリ性セラミダーゼに分類される (表 1) (17)。中性セラミダーゼ (nCDase) は、最適 pH6.5~7.5 を示す膜結合型タンパク質であり、当酵素は腎臓や肝臓に発現しており、特に小腸における発現量が高い(18)。がん研究において、nCDase はがんの発症進展や抗がん剤応答に関与することが知られている。nCDase をノックダウンすると、 β -カテニンの消失を誘導し、大腸がんの進行を抑制する(19, 20)。担がんモデルにおいて、nCDase 活性の抑制が腫瘍の増大を著しく軽減させた。加えて、野生型マウスに発がん誘導剤アゾキシメタンを投与すると、腫瘍が形成される。一方で、nCDase 欠損マウスでは腫瘍形成は野生型に比して有意に抑制された。すなわち、nCDase は大腸がんの発生・進展において重要な役割を果たしていることが示唆されている。しかしながら、がん細胞での nCDase の生物学意義について不明な点が多く残されている。

本研究では、nCDase を標的としたがん治療薬の創薬基盤を構築することを目指し、第一に、がん細胞における nCDase の細胞内局在を明らかにすると共に、抗がん剤候補 C₆-セラミドの代謝及び細

胞傷害性調節への nCDase の関与の有無を明確にすることを目的とした。更に、第二に、がん細胞の運動性に対する nCDase の関与の有無を明らかにすることを目的とした。これらを達成するために、第 1 章では、セラミドを各細胞小器官特異的に発現するバクテリア由来の SMase 及び CDase の発現ベクターを開発し、これらのツールを用いて細胞小器官毎におけるスフィンゴ脂質代謝の特徴を解析した。第 2 章では、第 1 章で開発したベクターを用いて、C₆-セラミドの細胞障害性におけるゴルジ体局在性 nCDase の役割を解析した。第 3 章では、がん細胞の運動能調節への細胞形質膜局在 nCDase の関与を解析した。

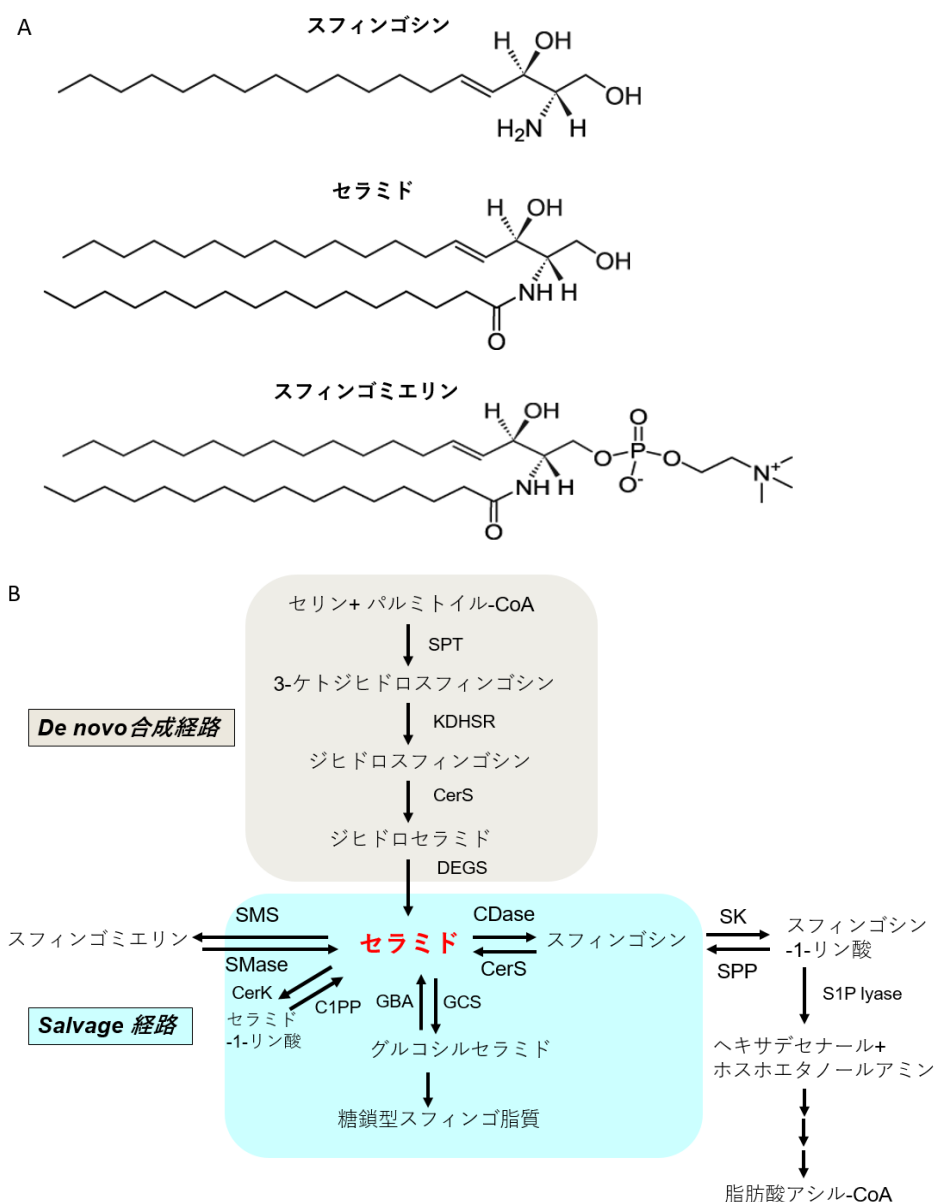


図1 スフィンゴ脂質の基本構造及び生合成経路.

A. スフィンゴシンのアミノ基にアシル基がアミド結合するとセラミドが産生される。セラミドにホスホコリンがエステル結合するとスフィンゴリエリンとなる。B. *De novo* 合成経路は小胞体においてセリンパルミトイル転移酵素 (SPT) の活性化によって開始され、段階的に3-ケトスフィンガニン還元酵素 (KDHSR)、セラミド合成酵素 (CerS) およびジヒドロセラミドデサチュラーゼ (DEGS) の触媒作用を介してセラミドが合成される。小胞体局在性セラミドはゴルジ体に輸送され、セラミドキナーゼ (CerK)、スフィンゴリエリン合成酵素 (SMS) またはグルコシルセラミド合成酵素 (GCS) の触媒作用をにより、それぞれにセラミド-1-リン酸、スフィンゴリエリンまたはグルコシルセラミドが生成される。逆にスフィンゴ脂質異化経路 (salvage 経路) において、セラミド-1-リン酸、スフィンゴリエリン及びグルコシルセラミドは、それぞれにセラミド-1-リン酸ホスファターゼ (C1PP)、スフィンゴリエリナーゼ (SMase) またはグルコシルセラミドホスホリダーゼ (GBA) の触媒作用によりセラミドへと代謝される。更に、セラミドはセラミダーゼ (CDase) によって加水分解され、スフィンゴシンが生成される。このスフィンゴシンは、CerS による再アシル化を介してセラミドへ、またはスフィンゴシンキナーゼ (SK) によるリン酸化を受けてスフィンゴシン-1-リン酸へと変換される。また、スフィンゴ脂質経路の出口として、スフィンゴシン-1-リン酸リアーゼ (S1P lyase) によって、スフィンゴシン-1-リン酸はヘキサデセナル及びホスホエタノールアミンと分解される。ヘキサデセナルはその後代謝されて、脂肪酸アシル CoA を形成する。

表1 セラミダーゼの分類、発現分布及び生理機能のまとめ.

Name	Gene symbol	Cellular localization	Tissue expression	Biological functions	Related diseases
Acid ceramidase	<i>ASAH1</i>	Lysosome	heart, kidney (<i>high</i>) placenta, lung, skeletal muscle (<i>low</i>)	apoptosis, cell cycle, differentiation, cell invasion, autophagy	Farber's disease melanoma head and neck cancer breast cancer prostate cancer type II diabetes Alzheimer's disease
Neutral ceramidase	<i>ASAH2</i>	PM	small intestine, colon (<i>high</i>) kidney, liver brain, lung, heart (<i>low</i>)	apoptosis, necroptosis, cell cycle	colon cancer ischemic injury IBD
Alkaline ceramidase 1	<i>ACER1</i>	ER	skin	skin homeostasis	unknown
Alkaline ceramidase 2	<i>ACER2</i>	Golgi	placenta (<i>high</i>) ubiquitous (<i>low</i>)	apoptosis, necrosis, cell adhesion	unknown
Alkaline ceramidase 3	<i>ACER3</i>	ER/Golgi	placenta (<i>high</i>) ubiquitous	apoptosis, cell proliferation	acute myeloid leukemia colon cancer colitis leukodystrophy

引用) Sakamoto W. et al., Adv. Biol. Regul. 2017, 63: 122-131.

第1章 細胞小器官標的型バクテリア性スフィンゴミエリナーゼ (bSMase) 及びバクテリア性セラミダーゼ (bCDase) 発現ベクターの開発と応用

緒言

スフィンゴ脂質は、細胞機能の制御や生体内のホメオスタシスの維持に関与しており、スフィンゴ脂質代謝の破綻はライソゾーム病、神経変性疾患、生活習慣病やがんなどの疾患の原因となる。スフィンゴ脂質代謝経路には、各細胞小器官に局在する酵素が関わっており、分子種の異なる多様なスフィンゴ脂質を形成している。また、セラミドのアシル鎖の炭素数および不飽和度が多様な分子種を生み出しており、このようなセラミド分子種の多様性の背景から、「Many Ceramides」仮説が提唱されている(21)。更に、セラミドの多様性は細胞小器官毎に異なり、様々な生理機能を制御していると推察されている。また、セラミド分子内の水酸基が SMS の触媒作用により修飾され、スフィンゴミエリンが生成されることから、スフィンゴミエリンの分子種もセラミドと同様に多様である。逆に、SMase の触媒作用を考慮すると、セラミド分子種のプールはスフィンゴミエリン分子種に依存する。

多様なセラミド分子種の生成は、6つの CerS アイソフォーム (CerS1-6) の基質特異性に起因している(22)。CerS は、アシル CoA とスフィンゴ塩基を基質としてセラミドを合成する酵素であり、生化学的な特徴としてそれぞれのアイソフォームのアシル CoA への基質親和性は異なる。この結果、アシル鎖に依存した多様なセラミド分子種が生成され、結果的にこれらの骨格を有するスフィンゴミエリンやスフィンゴ糖脂質にも多様な分子種が生成される。

次に、細胞小器官特異的に存在するセラミド及び異なるセラミド分子種の生理機能について述べる。バクテリア由来の SMase を乳がん細胞のミトコンドリアに発現させると、ミトコンドリア内にセラミドの蓄積が生じ、シトクローム c 放出及び細胞死を誘導する(23, 24)。また、培養細胞の培地中に SMase を添加すると、細胞外膜に存在するスフィンゴミエリンを加水分解して細胞骨格の再構成に影響を及ぼすが、細胞死は引き起こさないことが知られている(25)。このように細胞小器官特異的なセラミドの蓄積が多様な生理機能の引き金となっている。セラミド分子種の特異的生物活性に関して、これまでに C₁₆-及び C₂₄-セラミドは B 細胞受容体を介した細胞死に関与することが報告されている(26)。また、セラミド合成酵素 CerS1 の触媒作用により生成される C₁₈-セラミドはマイトファジーを促進して、細胞死を誘導することが示された(27)。更に、酸性 SMase により生成された C₁₆-セラミドは、TNF- α 刺激によるアポトーシスに寄与している(28)。このように、セラミド分子種による細胞機能調節も多様であり、各細胞小器官に生じるスフィンゴ脂質代謝の変動を理解することがセラミド生物学の全容解明に重要である。また、セラミドの抗腫瘍活性を考慮すると、セラミド代謝を制御することで、がん創薬の新たな治療戦略の構築につながることを期待される(29)。

本章では、細胞形質内膜、ゴルジ体、小胞体、ミトコンドリア、核及び細胞質の細胞小器官におけるスフィンゴ脂質の代謝・機能を解析するためのツールとして、細胞小器官特異的に発現するバク

テリア性 SMase 及び CDase ベクターを開発し、これらのツールを用いてスフィンゴ脂質量の変動を明らかにした。

実験方法

1. 実験材料

細胞培養培地、ウシ胎児血清、抗生物質及び anti-V5 tag 抗体は、Invitrogen 社から購入した。Anti-FLAG 抗体、Mito-Tracker (Invitrogen 社)、anti-giantin 抗体 (Covanve 社) 及び anti-calreticulin 抗体及び X-tremeGENE™ 9 DNA transfection reagent は Sigma-Aldrich 社から購入した。2次抗体には、anti-mouse IgG HRP-conjugated 抗体及び anti-rabbit IgG HRP-conjugated 抗体 (R&D Systems 社) を使用した。RBM 14-16 は Antonio Delagado 教授及び Gemma Fabrias 教授 (RUBAM、スペイン) より譲渡された。

2. 細胞培養

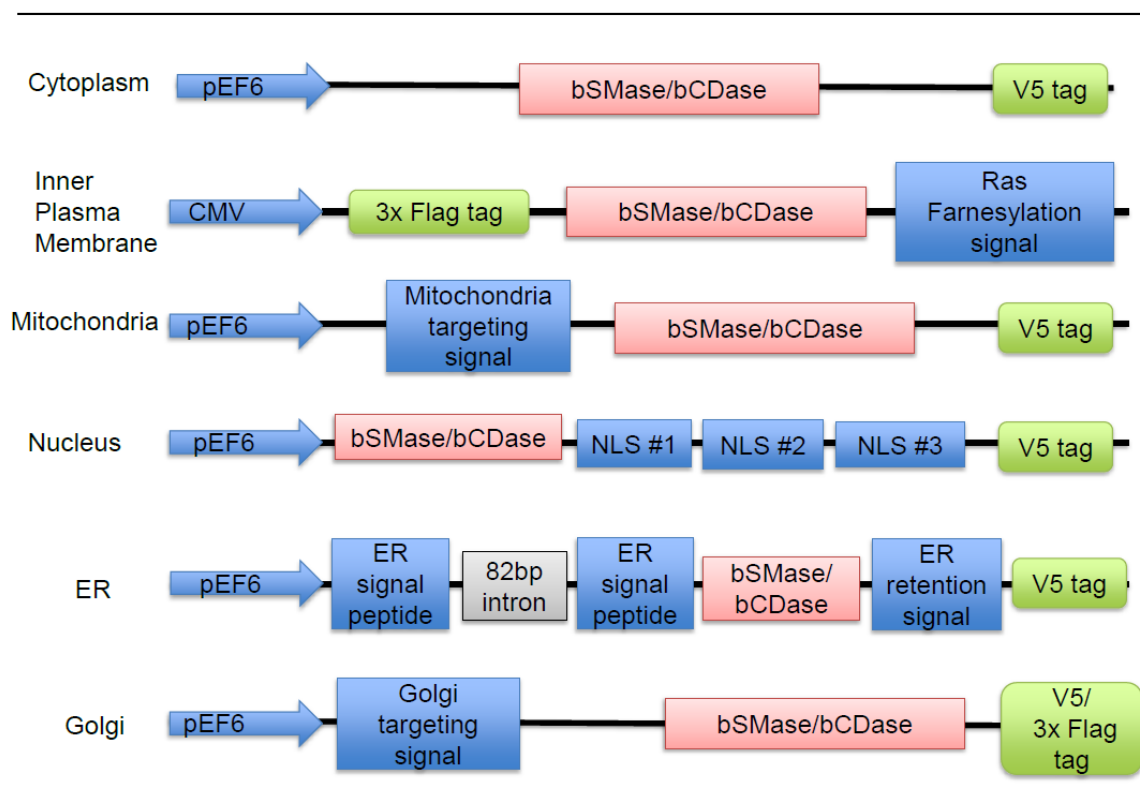
ヒト子宮頸がん細胞株 HeLa は、ATCC (Manassas, VA) より入手し、細胞を 10%ウシ胎児血清及び抗生物質を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) を用いて、37°C、CO₂ インキュベーター内において培養した。

3. ベクター構築

Bacillus cereus 菌 SMase 及び *Pseudomonas aeruginosa* 菌 CDase 遺伝子に細胞小器官特異的に発現するシグナル配列を付加し、これらを表 2 に示した。バクテリア由来 SMase (bSMase) は、Mg²⁺依存性の mammalian nSMase と類似の特徴を有することが知られている(30)。また、バクテリア由来 CDase (bCDase) は、触媒活性の至適 pH.8.0~9.0 であり、セラミドを加水分解して、スフィンゴシンを産生する触媒活性を有する(31)。

bSMase 及び bCDase の DNA 配列は以前に作製したものからクローニングした(32,33)。V5 または FLAG タグが融合された pCMV 及び pEF6 ベクターを使用し、ミトコンドリア、核、ER シグナル配列は pShooter targeting ベクター (Thermo Fisher 社、カタログ番号: V821, V822, V823) のものを採用した。細胞形質内膜、ゴルジ体の局在シグナル配列には、それぞれ Ras farnesylation signal (KLNPPDESGPGCMSCKCVLS)、ヒト β 1,4-galactosyltransferase (MARLREPLLSGSAAMPGASLQR-ARRLLVAVCALHLGVTLVYYLAGRDLSRLPQLVGVSTPLQGGNSNSAAAIGQSSGDLRTGGA) を使用した。各遺伝子は、pENTR-D/TOPO (Life Tech 社)に挿入してサブクローニングを行った。

表 2 細胞小器官標的型 bSMase 及び bCDase ベクターの設計.



Inner plasma membrane (iPM) 認識配列は、Ras farnesylation シグナル (KLNPPDESGPGCMSCKCVLS) 由来である。ミトコンドリア認識配列は、シトクローム c オキシダーゼのサブユニット VIII 由来である。核認識配列は、SV40 large T antigen 由来である。小胞体認識配列は、マウス Vh 鎖由来である。ゴルジ体認識配列は β -1,4-galactosyltransferase (MARLREPLLSGSAAMPGASLQRARLLVAVCALHLGVTLVYYLAGRDLSRLP-QLVGVSTPLQGGNSNSAAAIGQSSGDLRTGGA) 由来である(32, 33)。

引用) Sakamoto W. et al., J. Lipid Res. 2019, 60(11):1841-1850.

4. SMase 活性測定

SMase 活性測定には、 ^{14}C -methyl-スフィンゴミエリンを基質として使用した(34)。ウシ脳由来 SM (Avanti Polar Lipids) 及び ^{14}C -methyl-スフィンゴミエリンを混合し、溶媒を窒素ガスにて除去した。Buffer 溶液 (0.1% Triton X-100、25 mM MgCl_2 、50 mM Tris、pH 7.5) に 5 mol% スフィンゴミエリンを混合して、超音波処理することでミセル化基質を調製した。次に、細胞培養ディッシュに接着している細胞をスクレーパーを用いて回収し、氷冷 PBS で洗浄し、PBS (protease inhibitor cocktail 含有) で懸濁した後、超音波破砕機を用いて細胞を破砕した (10 秒程度)。細胞破砕液に基質を含む Buffer 溶液を加え、37°C、30 分間保温した。クエンチング溶液 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 2:1, v/v) を加えて反応を停止させた後、Bligh and Dyer 法にて脂質を抽出した。水相画分に含まれる ^{14}C -ホスホコリンの放射活性を、液体シンチレーションカウンターを用いて検出した。

5. CDase 活性測定

培養ディッシュに接着している細胞をスクレーパーを用いて回収し、氷冷 PBS で洗浄し、PBS (protease inhibitor cocktail 含有) で懸濁した後、超音波破碎機を用いて細胞を破碎した (10 秒程度)。その後、BCA キット法を用いてタンパク質量を測定した。96 ウェルプレートのウェル内にて、20 μ M RBM 14-16 基質と細胞破碎液を混合した。反応液の組成は、20 μ M RBM 14-16、0.3% TritonX-100、75 mM NaCl, and 12.5 mM phosphate buffer (pH 7.4)となるように調製した。反応液を 37°C、3 時間、遮光下で保温した。停止液 (methanol: sodium periodate, 1:1, v/v) を加えた後、100 mM glycine/NaOH を添加し、更に 1 時間保温した。CDase の加水分解によって産生された RBM14 を、NaIO₄による酸化開裂反応によってウンベリフェロンに変換し、ウンベリフェロンの蛍光強度を蛍光マイクロプレートリーダー (Ex 360 nm, Em 460 nm)を用いて測定した(35)。

6. ウェスタンブロッティング法

RIPA buffer (PMSF 及び protease inhibitor cocktail 含有, Santa Cruz Biotechnology 社) を用いて、細胞破碎液を調製した。また、BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific 社) を用いてタンパク質定量した。SDS-PAGE 後、PVDF 膜にウェット式法を使用してタンパク質を転写した。次に、5%スキムミルク PBS-T (0.1% Tween20 含有) 溶液を用いて PVDF 膜を室温で 1 時間ブロッキングした。ブロッキング液を除去した後、PBS-T 溶液を用いて 5 分×3 回洗浄した。5% BSA 含有 PBS-T で調製した anti-V5 tag 抗体液及び anti-FLAG 抗体液 (いずれも 1:1000 倍希釈) を 1 次抗体として、4°C、一晩振盪した。翌日、PBS-T 溶液を用いて 5 分×3 回洗浄した後、5% BSA 含有 PBS-T で調製した anti-mouse IgG HRP-conjugated 抗体または anti-rabbit IgG HRP-conjugated 抗体 (R&D Systems 社) を 2 次抗体 (1:5000 倍希釈) として、1 時間室温で振盪した。PBS-T 溶液を用いて 5 分×3 回洗浄した後、ECL 試薬 (Thermo Fisher Scientific 社) を添加し、暗室において感光フィルムによる目的タンパク質の検出を行った。

7. 免疫染色法

細胞を 4%パラホルムアルデヒド溶液にて 20 分間固定化した。PBS で洗浄した後、細胞を 0.1% Triton X-100 含有 PBS 溶液にて 5 分間処置し、細胞透過反応を行った。PBS で 5 分間×3 回洗浄した後、2%BSA 含有 PBS 溶液で 20 分間ブロッキングした後、ブロッキング液を用いて希釈した anti-V5 tag 抗体液 (1:250 倍希釈)、anti-FLAG 抗体液 (1:500 倍希釈)、anti-giantin 抗体液 (1:500 倍希釈) 及び anti-calreticulin 抗体液を 1 次抗体として、4°C、一晩反応させた。翌日、PBS で 5 分間×3 回洗浄した後、ブロッキング液を用いて希釈した 2 次抗体溶液 (1:1000 倍希釈) を室温で 1 時間反応させた。2 次抗体には、Goat anti-Mouse IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher 社) 及び Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 594 (Thermo Fisher 社) を使用した。PBS で 5 分間×3 回洗浄した後、核染色のための DAPI 溶液を滴下させた。共焦点顕微鏡 Leica SP8 confocal microscopy system (Leica Microsystems) を用いて細胞の観察を行っ

た。

8. スフィンゴ脂質量の測定

PBS で洗浄した後、細胞を回収した。その後、Bligh and Dyer 法にて脂質を抽出し、Thermo Finnigan TSQ700 triple quadrupole mass spectrometer にて測定した(37-39)。ヒートマップ解析には、MATLAB 2018a を利用した。

9. 統計学的解析

統計学解析は、GraphPad Prism 5 Software を用いて、Student's t-検定を実施した。また、3 群以上の解析においては、パラメトリックの Dunnett's 検定を実施した。生存曲線は、ノンパラメトリックの Wilcoxon 検定を実施した。

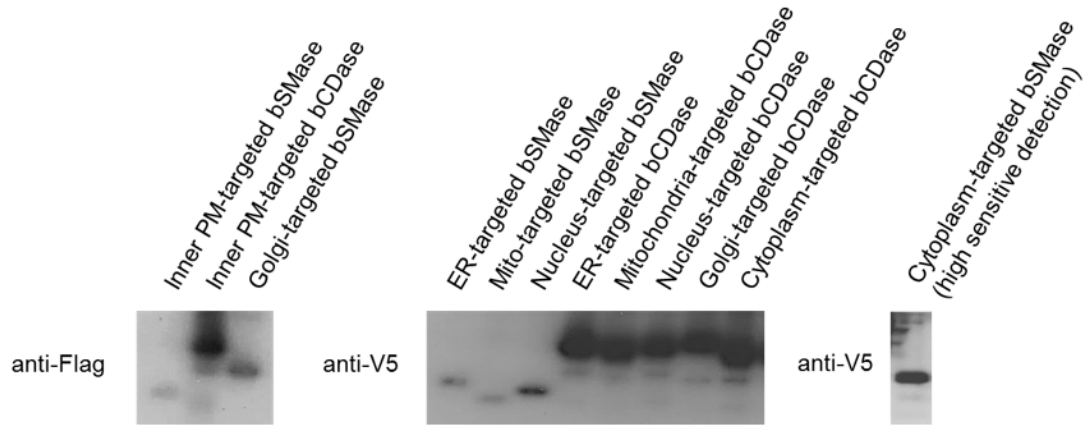
実験結果

1. 細胞小器官標的型 bSMase 及び bCDase の活性測定

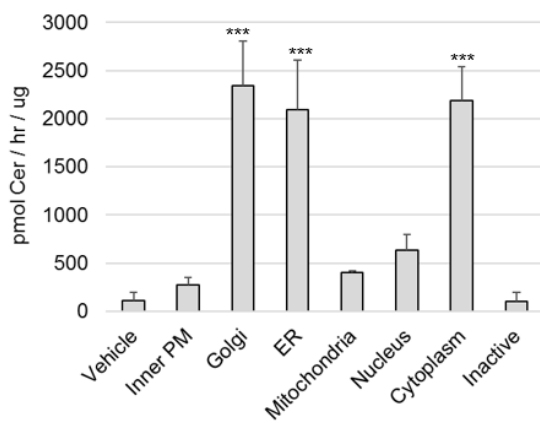
各細胞小器官特異的に発現するためのシグナル配列を付加した bSMase または bCDase ベクターをそれぞれ HeLa 細胞に導入し、20 時間後、細胞を回収して細胞破砕液を調製した。はじめに、ウェスタンブロッティング法にて細胞に過剰発現させた bSMase 及び bCDase 発現量を解析した。その結果、いずれのベクターを用いた場合においても、bSMase または bCDase タンパク質が発現していることを確認した (図 2A)。bCDase の発現量はいずれの細胞小器官標的型でも高かったが、bSMase 発現量は細胞小器官毎に異なり、細胞形質内膜及びミトコンドリア標的型 bSMase 発現量は他と比較して低下していた。

調製した細胞破砕液中の SMase 活性及び CDase 活性を測定した。細胞小器官標的型 bSMase タンパク質を発現させることで、コントロール群 (Vehicle) と比較して、いずれも SMase 活性が増加した (図 2B)。一方で、不活性型 bSMase (D322A/H323A) を発現させても、SMase の活性はコントロール群と同程度だった。同様に、各細胞小器官標的型 bCDase を導入した場合でも、それぞれにおいて CDase 活性の増加が認められた (図 2C)。不活性型 bCDase (Y484A) においては、CDase 活性の上昇は検出されなかった。SMase 活性の強度は、bSMase 発現量と概ね相関していた。

A.



B. SMase activity



C. CDase activity

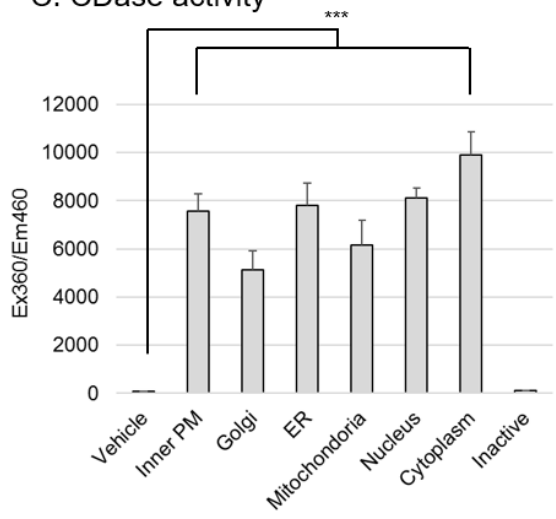


図2 細胞小器官標的型 bSMase または bCDase 発現細胞での酵素活性とタンパク質発現.

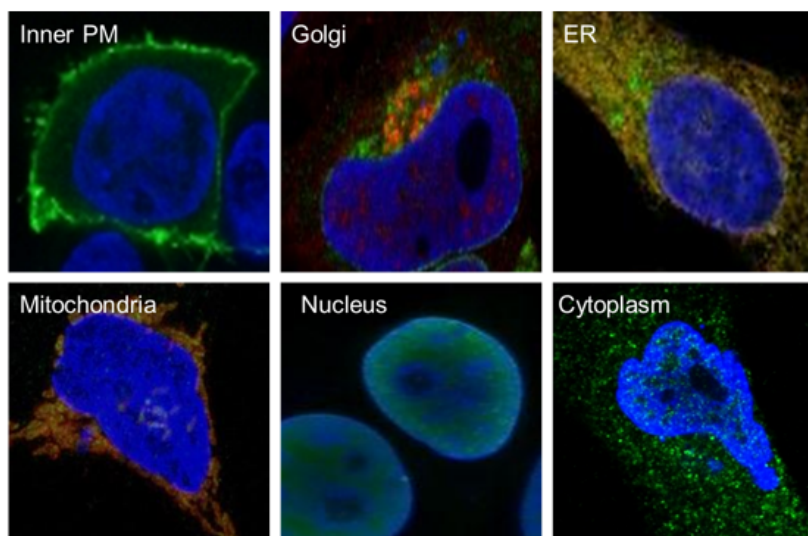
HeLa 細胞に細胞小器官標的型 bSMase または bCDase vectors を導入した 20 時間後に、細胞を回収して細胞破砕液を調製した A. ウェスタンブロッティング法にて、各々の細胞内 bSMase または bCDase 発現量を確認した。B. 細胞破砕液を用いて、細胞内 SMase 活性を測定した。C. 細胞破砕液を用いて、細胞内 CDase 活性を測定した。それぞれの値は、平均±SEM で示した (N=3)。***p<0.0005.

引用) Sakamoto W. et al., J. Lipid Res. 2019, 60(11):1841-1850.

2. 細胞小器官標的型 bSMase 及び bCDase の細胞内局在

各々bSMase または bCDase が、標的とする細胞小器官特異的に発現していることを確認するために、蛍光免疫染色を行った。bSMase 及び bCDase に付加した V5 タグまたは FLAG タグを緑色で示した(図3)。各細胞小器官マーカーとして、ゴルジ体(Golgi)には giantin、小胞体(ER)には calreticulin、ミトコンドリアには MitoTracker (1:100 倍希釈) を赤色で示した。細胞形質内膜 (iPM) に対するマーカーは使用していないが、細胞形質内膜標的型 bSMase 及び bCDase は細胞の形態に沿って発現していることを確認した。次に、赤色で示したゴルジ体、小胞体及びミトコンドリアに対するマーカーと、緑色で示したゴルジ体、小胞体及びミトコンドリア標的型 bSMase 及び bCDase がそれぞれ重なり合っていることを確認した (黄色)。核標的型 bSMase 及び bCDase は、核染色の DAPI (青色) と共局在していた。最後に、細胞質標的化型 bSMase 及び bCDase は細胞全体に発現しており(緑色)、細胞質に局在していた。なお、細胞質に対するマーカーは使用していない。したがって、作製した各細胞小器官標的型 bSMase 及び bCDase が標的とする細胞小器官毎に発現して活性を有していることが確認された。

A. organelle-targeted bSMase



B. organelle-targeted bCDase

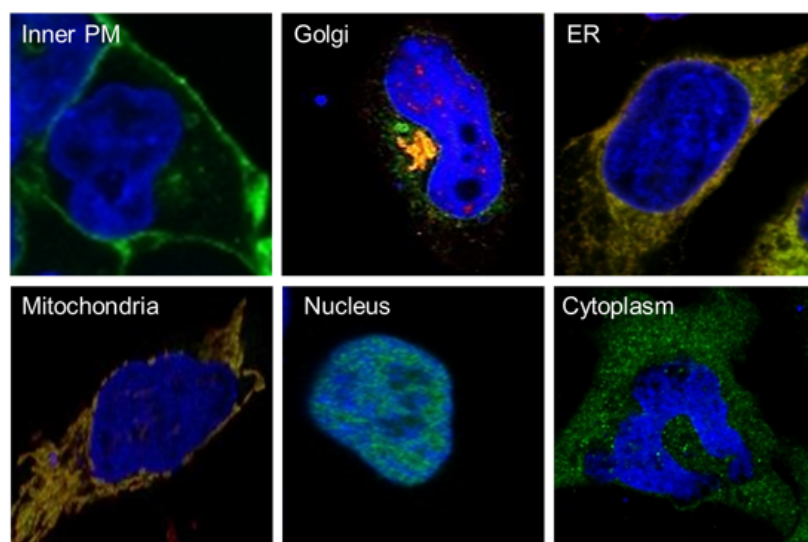


図3 細胞小器官標的型 bSMase 及び bCDase の局在.

HeLa 細胞に細胞小器官標的型 bSMase または bCDase vectors を導入した 20 時間後に、細胞を免疫染色し、共焦点顕微鏡を用いて観察した。緑色は各 bSMase または bCDase の細胞内局在、赤色は細胞小器官マーカー、青色は核を示している。A. 細胞小器官標的型 bSMase を細胞内に導入した結果を示した。B. 細胞小器官標的型 bCDase を細胞内に導入した結果を示した。

引用) Sakamoto W. et al., J. Lipid Res. 2019, 60(11):1841-1850.

3. 細胞小器官標的型 bCDase または bSMase の細胞内スフィンゴ脂質量への影響

細胞小器官標的型 bCDase または bSMase の発現によるスフィンゴ脂質代謝への影響を解析するために、質量分析法により細胞内スフィンゴシン、スフィンゴシン-1-リン酸、セラミド及びスフィンゴミエリン量を測定した。

・細胞形質内膜 (iPM)

bSMase の強制発現によって、セラミド量は増加したが、スフィンゴミエリン量に変化は認められなかった (図 4A)。また、同条件下にスフィンゴシン量及びスフィンゴシン-1-リン酸量にも大きな違いはなかった。次に、bCDase を発現させたが、スフィンゴシン、スフィンゴシン-1-リン酸、セラミド及びスフィンゴミエリン量の変動に対して影響を及ぼさなかった。更に、bCDase 及び bSMase を共発現させることで、bSMase の強制発現によって増加したセラミド量は bCDase の強制発現により減少し、逆にスフィンゴシン量は有意に増加した。一方で、スフィンゴシン-1-リン酸量及びスフィンゴミエリン量は有意に変動しなかった。

・ゴルジ体 (Golgi)

bSMase をゴルジ体に発現させることによって、スフィンゴミエリン量の減少作用と共にセラミド量の増加作用が確認された (図 4B)。一方で、bCDase の強制発現は、スフィンゴシン、スフィンゴシン-1-リン酸、セラミド及びスフィンゴミエリン量に対してほとんど影響を及ぼさなかった。しかしながら、bSMase 強制発現下において、bCDase を共発現させると、セラミド量は減少し、スフィンゴシン量は増加した。これらの結果から、ゴルジ体においてもスフィンゴミエリンが存在していること、セラミド量は基底値以下であると考えられた。

・小胞体 (ER)

bSMase を強制発現させることで、スフィンゴミエリン量は減少し、逆にセラミド量は増加した (図 4C)。bCDase のみの強制発現では、いずれの脂質量も変動しなかった。次に、bSMase 及び bCDase を共強制発現させると、セラミド量の減少が確認され、特にスフィンゴシン量は顕著に増加した。

・ミトコンドリア

bSMase を強制発現させると、セラミド量のみが増加した (図 4D)。一方で、bCDase 強制発現によるスフィンゴ脂質の変動は認められなかった。しかしながら、bSMase によるセラミド量を増加させた条件下において、bCDase によるセラミドからスフィンゴシンを産生する代謝反応を検出することが可能となった。ミトコンドリアにおける bSMase 発現量は、他の細胞小器官の結果と比較して少なく、bSMase によるスフィンゴ脂質代謝の変動が小さくなったと考えられる。

・核

bCDase の触媒活性によって、スフィンゴシン量の増加作用を示す傾向が認められた (図 4E)。bSMase により産生されたセラミドに対して bCDase は触媒作用を示し、スフィンゴシン量は更に増加した。したがって、核膜に存在するセラミド量は他の細胞小器官と比較して相対的に多く存在している可能性がある。

・細胞質

細胞質に bSMase を強制発現させると、セラミド量の顕著な増加作用が認められた(図 4F)。bSMase 及び bCDase を共発現させると、セラミド量の減少及びスフィンゴシン量の増加が確認された。

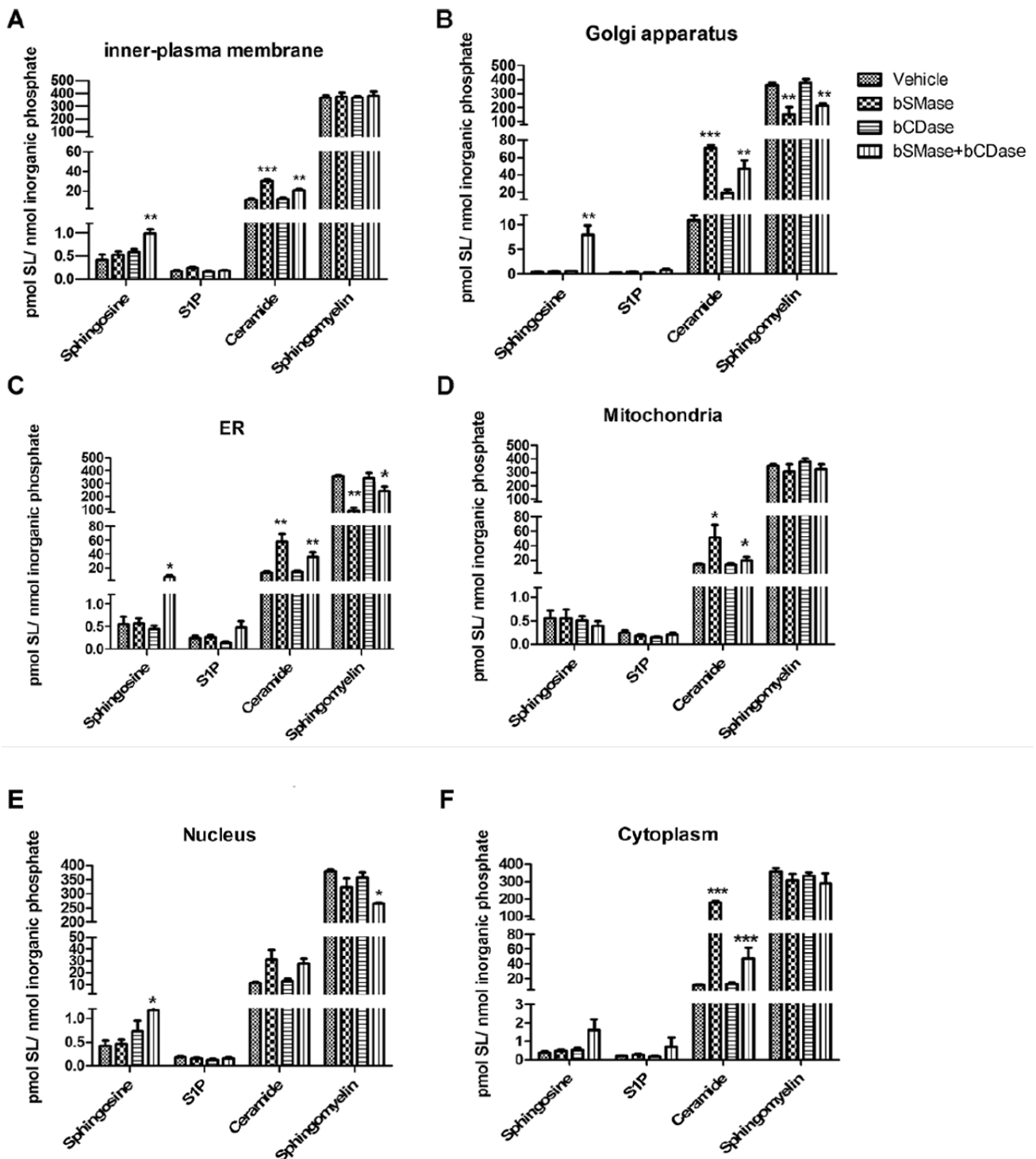


図 4 細胞小器官標的型 bSMase 及び bCDase によるスフィンゴ脂質変動の解析。

HeLa 細胞に細胞小器官標的型 bSMase または bCDase vectors を導入した 20 時間後に、細胞を回収した後、スフィンゴ脂質量を測定した。それぞれの値は、平均±SEM で示した (N=3)。***p<0.0005, **p<0.005, *p<0.05。引用) Sakamoto W. et al., J. Lipid Res. 2019, 60(11):1841-1850。

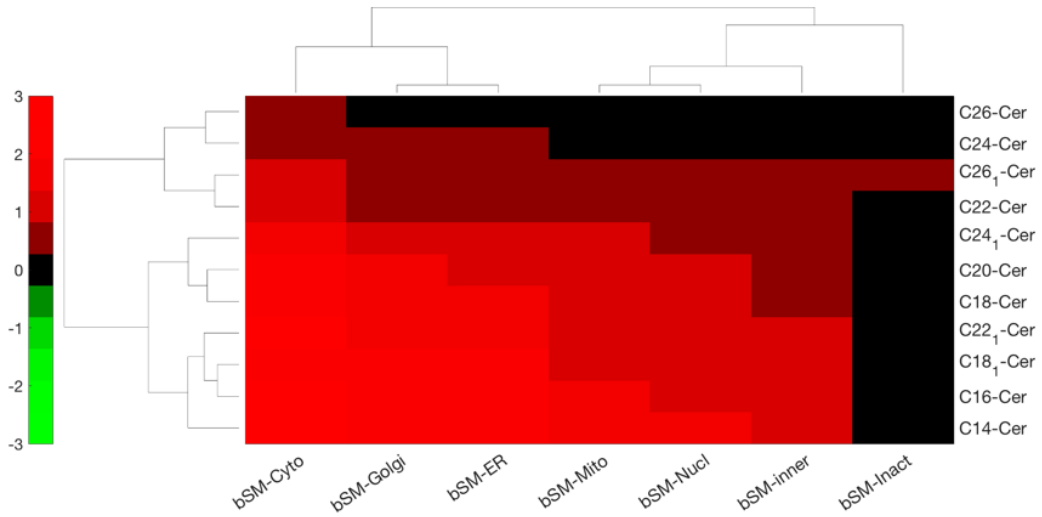
4. 細胞小器官標的型 bSMase 及び bCDase を用いた各セラミド分子種の変動

図 4 で示したように、セラミド全体量は bSMase によって増加したが、セラミドには様々な分子種が存在しており、分子種によって生理作用が異なることが知られている。そこで、セラミドの分子種毎における変動を解析するために、各セラミド分子種変動量のヒートマップを作成した (図 5)。その結果、細胞小器官標的型 bSMase 及び bCDase によるセラミド分子種の変動は、多様性を示した。細胞形質内膜標的型 bSMase の強制発現は C₁₄–C₁₈ の中鎖型セラミド量を増加させた (図 5A)。核またはミトコンドリア標的型 bSMase は、C₁₄–C₂₂ 及び C_{24:1}-セラミド量を増加させた。また、小胞体、ゴルジ体及び細胞質標的型 bSMase の強制発現においては、C₁₄–C₂₆ の長鎖型及び超長鎖型のセラミド分子種量が増加した。これらの結果から、各細胞小器官におけるスフィンゴリエリンの分子種の存在比が異なることが推測された。なお、スフィンゴ脂質の変動量の大きさは、各細胞小器官における bSMase 及び bCDase の発現量に依存するため、各群間の変動量を比較することは適切ではない。

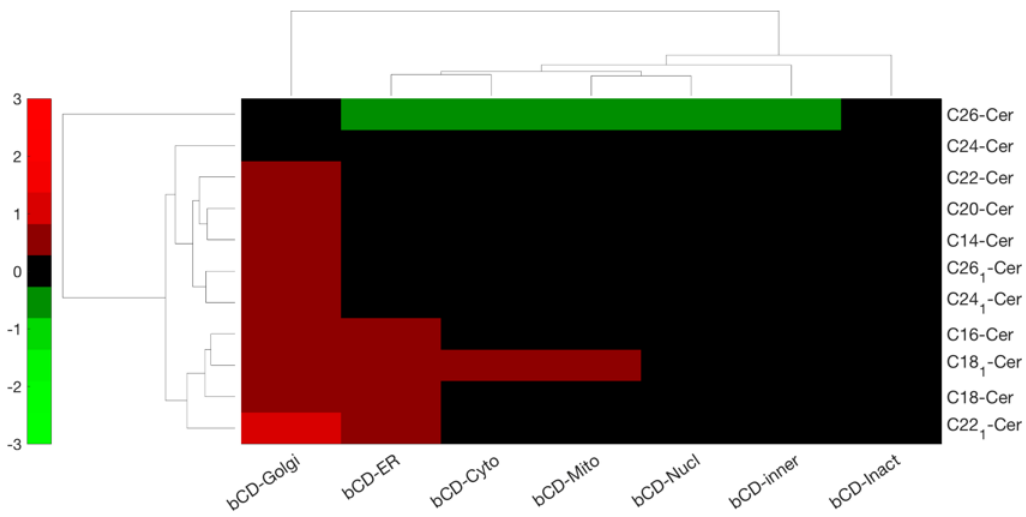
bCDase の活性化はセラミド全体量に対して大きな影響を及ぼさなかったように、各細胞小器官特異的に発現させた bCDase も各分子種のセラミド量に対して影響をほとんど示さなかった (図 5B)。次に、細胞小器官標的型 bSMase 及び bCDase を同時に共発現させた際の、各分子種のセラミド量を測定した (図 5C)。そして、bSMase 発現によるセラミドの増加量から bSMase 及び bCDase 発現によるセラミド量を引いた値、すなわち bSMase によって生み出されたセラミドに対して bCDase が触媒作用した量を図 5D に示した。その結果、細胞形質内膜においては、C₁₄–C₁₆ 分子種のセラミドが bCDase によって代謝されること、核またはミトコンドリアにおいては、C₁₄–C₁₆ 分子種のセラミドが、小胞体、ゴルジ体及び細胞質においては、C₁₄–C₂₄ 分子種のセラミドが bCDase によって代謝されることが判った。

以上より、bSMase 及び bCDase の両酵素を組み合わせることによって、各細胞小器官において存在するスフィンゴリエリン及びセラミドの量及び分子種の変化を捉えることが可能となった。

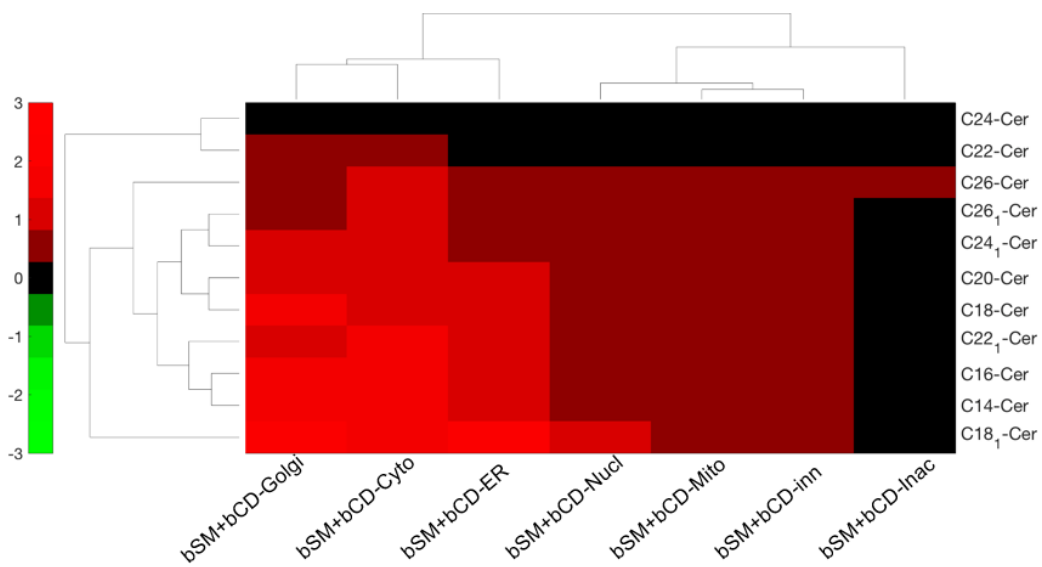
A.



B.



C.



D.

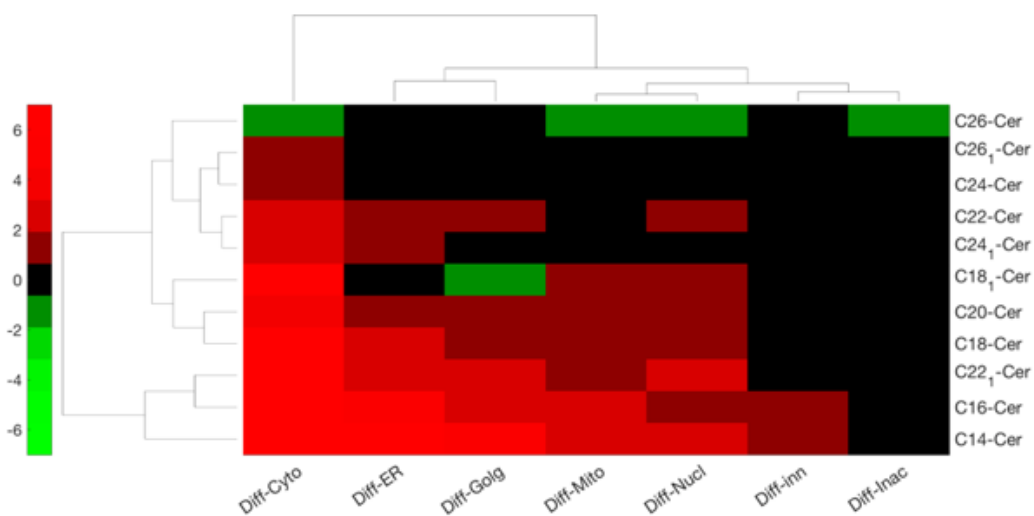


図5 細胞小器官標的型 bSMase 及び bCDase 発現によるセラミド分子種変動のヒートマップ解析.

HeLa 細胞に細胞小器官標的型 bSMase または bCDase vectors を導入した 20 時間後に、細胞を回収した後、セラミドの各分子種を測定した。変動量の相対値は、log 値で表示し、緑色は減少、赤色は増加を示した。A. bSMase 発現によるセラミド量の変化を示した。B. bCDase 発現によるセラミド量の変化を示した。C. bSMase 及び bCDase 共発現によるセラミド量の変化を示した。D. A で示した bSMase によるセラミド増加量から、C で示した bSMase 及び bCDase 共発現によるセラミド量の差を示した。

引用) Sakamoto W. et al., J. Lipid Res. 2019, 60(11):1841-1850.

考察

本研究では、異なる細胞小器官におけるセラミドをはじめとするスフィンゴ脂質量を人為的に変動させる分子生物学的ツールを開発した。その結果、bSMase を発現させることによってセラミドの産生が亢進し、産生されたセラミドは bCDase によって代謝される反応を捉えることができた。そして、bSMase によって産出されるセラミドの分子種は、細胞小器官毎で異なることが判明した。これらの結果は、「Many Ceramide」仮説(21)の形成を裏付ける結果であり、セラミドの生化学的な多種多様性は特異的なセラミド分子種、その細胞小器官における局在、セラミドを代謝する酵素によって生み出されると考えられる。また、各細胞小器官に存在するスフィンゴミエリンの分子種の比が異なる可能性は考えられるが、細胞小器官画分毎のスフィンゴミエリンの分子種を解析した事例はこれまでに知られていない。

細胞小器官標的型 bSMase 発現によるスフィンゴミエリンの変動について解析すると、細胞形質内膜、細胞質及びミトコンドリア標的型 bSMase 発現において、スフィンゴミエリンの変動を明確には捉えられなかった。一方で、ゴルジ体、小胞体及び核標的型 bSMase 発現条件下においては、スフィンゴミエリン量の減少作用を捉えられた。この違いは、図 1A に示したように bSMase 発現量の差に起因すると考えている。

次に、細胞小器官におけるスフィンゴ脂質の分子種について考察する。細胞形質内膜においては C₁₄–C₁₈ 分子種のスフィンゴ脂質が、核またはミトコンドリアにおいては、C₁₄–C₂₂ 及び C_{24:1}-スフィンゴ脂質が、小胞体、ゴルジ体及び細胞質においては、C₁₄–C₂₆ の長鎖型及び超長鎖型の分子種のスフィンゴ脂質の存在比が多い可能性が考えられた。同様に、bCDase によって代謝されるセラミドの分子種からも細胞小器官におけるスフィンゴ脂質の存在比の違いが推察される。

bCDase のみを細胞内に発現させてもセラミドの加水分解は促進されなかった。bSMase 及び bCDase を組み合わせることによって bSMase 由来のセラミドに対して bCDase は代謝作用を示した。bCDase 発現単独の効果が認められなかった要因の 1 つとして、セラミド量減少を打ち消すようなセラミド産生が相対的な反応として誘導されたのかもしれない。また、bCDase は bSMase の活性化から生成されたセラミドを分解する作用を有していることから、内在性 CDase は定常的なセラミド量を保つために機能している可能性も考えられる。セラミド代謝を詳細に解析するためには、ある分子種のセラミドを追跡できるようなプローブ等の開発が必要となってくる。

核特異的に bCDase を発現するとスフィンゴシン量の増加作用を示したが、セラミド量の減少は生じなかった。セラミド量の変化が捉えられなかったのは、セラミド量がスフィンゴシン量よりも 30–40 倍ほど多く存在していることに起因していると思われる。したがって、核に存在するセラミドに対して、bCDase は加水分解作用を示すことが判明した。次に、スフィンゴミエリンは最も存在量の多いスフィンゴ脂質であり、クロマチン集合やダイナミクスにおいて構造及び制御に関与していることが報告されている(40)。核標的型 bSMase によってセラミド量の増加を誘導し、核標的型 bCDase によって細胞内スフィンゴシン量が増加する傾向を示していることから、核標的型 bSMase

及び bCDase は、核におけるスフィンゴ脂質の生理機能の解明に役立つかもしれない。なぜなら、スフィンゴシンのリン酸化体スフィンゴシン-1-リン酸はヒストンのアセチル化を制御するという報告も存在する(41)。また、スフィンゴシンキナーゼ 2 の触媒作用により生み出されるスフィンゴシン-1-リン酸は、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) に直接結合して HDAC 活性を抑制し、細胞周期や炎症性遺伝子の発現量を制御している(41)。

以上の結果より、細胞小器官特異的に bSMase または bCDase を発現させることは人為的な手法ではあるが、スフィンゴ脂質代謝酵素が活性化する環境下を模倣できる可能性があることから、今後のスフィンゴ脂質に関する研究において有用なツールになることが期待される。

小括

1. 細胞形質内膜、小胞体、ゴルジ体、ミトコンドリア、核及び細胞質を含む細胞小器官特異的に発現する **bSMase** 及び **bCDase** ベクターを開発し、各細胞小器官特異的に発現すること及び酵素活性を有することを確認した。
2. 細胞小器官毎によって存在するスフィンゴ脂質の分子種の割合が異なっていることが考えられた。細胞形質内膜においては $C_{14}-C_{18}$ の分子種、核またはミトコンドリアでは $C_{14}-C_{22}$ 及び $C_{24:1}$ の分子種、小胞体、ゴルジ体及び細胞質においては、 $C_{14}-C_{26}$ の長鎖型及び超長鎖型のスフィンゴ脂質の存在比が多い可能性がある。

本研究により開発した細胞小器官特異的に発現する **bSMase** 及び **bCDase** は、スフィンゴ脂質の局在や分子種を解析するのに有用なツールになる可能性がある。これらのツールは、本研究の第 2 章で使用するとともに、今後、スフィンゴ脂質変動による生理機能の解明などの研究に活用できることが期待される。

第2章 nCDaseによる外因性セラミドの細胞傷害性調節

緒言

nCDase は、腎臓、肝臓、脳、肺、及び心臓組織で発現しており、特に小腸や大腸での発現量が高い(18, 44)。生化学的な解析から、nCDase は、C₁₆-セラミドまたは C₁₈-セラミドなどの長鎖型セラミドに対する基質特異性が高いことが示されている(45)。また、nCDase 欠損マウスは正常に生育するが、スフィンゴ脂質を正常に消化吸収することができなかったことから、消化管におけるスフィンゴ脂質代謝に nCDase が寄与している可能性がある(18)。

次に、nCDase の機能に関するこれまでの知見を述べる。紫外線照射、一酸化窒素、血清飢餓などの刺激によって nCDase 活性は抑制されることが知られている(46-48)。また、化学療法剤であるゲムシタビン処置によって、nCDase 発現量は減少し、セラミド量の蓄積及び細胞増殖抑制作用を引き起こす(49)。他にも、nCDase は、血清飢餓誘導によるプログラム化ネクロシス (ネクロプトーシス) から細胞を保護する役割を果たし、またオートファジーを介して損傷したミトコンドリアのクリアランスに nCDase が関与することが報告されている(50)。

nCDase は II 型細胞膜結合タンパク質であり、N 末のアンカー部位が切断されることによって細胞外へと分泌される(51)。nCDase は細胞形質膜に存在するセラミドを加水分解し、スフィンゴシンを産生することが推察される。しかしながら、ヒト胎児腎細胞 HEK293 における nCDase の細胞内局在は解析されているが、大腸がん細胞株における nCDase の細胞内局在に関する報告はない。

C₆-セラミドはがん細胞に対して強力な細胞障害性を示し、新規抗がん剤として臨床開発ステージにある化合物である (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04716452) (16)。一方、細胞内において、C₆-セラミドはスフィンゴシンに代謝分解されることが知られている。すなわち、この代謝分解が C₆-セラミドの抗腫瘍活性発現を制御すると推察される。しかしながら、この代謝分解への nCDase の関与は不明である。

本章では、大腸がんでの nCDase の細胞内局在及び生理作用に着目して、新規抗がん剤候補 C₆-セラミドの代謝・抗腫瘍活性発現への nCDase の寄与について明らかにした。

実験方法

1. 実験材料

細胞培養培地、ウシ胎児血清、抗生物質及び anti-V5 tag 抗体は、Invitrogen 社から購入した。また、免疫染色法には anti-V5-tag Rabbit 抗体 (Cell Signaling Technology 社) も使用した。Anti-GAPDH 抗体は Cell Signaling 社から、anti-giantin 抗体及び anti-GM130 抗体は、Covance 社及び BD Biosciences 社から購入した。C₆-セラミド及びスフィンゴシン-1-リン酸は Avanti 社から購入し、C₆-urea-セラミドは、Medical University of South Carolina より譲渡して頂いた。anti-GAPDH は

2. 細胞培養

ヒト大腸がん細胞株 HCT116 は、ATCC (Manassas, VA) より入手し、細胞を 10%ウシ胎児血清及び抗生物質を含む DMEM 培地を用いて、37°C、CO₂ インキュベーター内において培養した。

3. nCDase 安定発現細胞の樹立

5' -caccatggccaaacgcaccttctctaac-3' 及び 3' -aatagttacaactcaaaagccggggaag-5' primer を用いて、ヒト nCDase 遺伝子を増幅させた後、pENTR-D/TOPO (Life Technologies 社、CA) ベクターに挿入した。次に、Gateway LR Clonase II enzyme mix (Life Technologies 社) を用いて、増幅した nCDase 遺伝子を pLenti6.3/TO/V5-DEST (Life Technologies 社) に移し替え、nCDase 発現ベクターを構築した。不活性型 nCDase (S354A) 発現ベクターも同様に作製した。次に、 1×10^5 cells per 60 mm ディッシュに HCT116 細胞を播種した。翌日、X-tremeGENE 9 DNA Transfection 試薬 (Sigma-Aldrich 社) を用いて作製したプラスミドを細胞内に導入した。48 時間培養後、50 µg/mL ブラストサイジン (Invitrogen 社) を添加し、3 日間毎に培地交換を行い、10 日間ブラストサイジン含有培地にて細胞を培養することで、nCDase 安定発現細胞株を樹立した。

4. ゴルジ体または細胞質標的型 bCDase 及び bSMase 発現ベクターの作製

ゴルジ体を特異的に認識するシグナル配列を付加させた bCDase 及び bSMase 遺伝子を、それぞれ pCMV 及び pEF6 ベクターに挿入した (第 1 章を参照)。X-tremeGENE 9 DNA Transfection 試薬を用いて細胞内に作製したベクターを導入した。

5. nCDase 活性測定

基質には N-[12-[(7-Nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]dodecanoyl]derythro-sphingosine (NBD-C₁₂-セラミド) (Avanti Polar Lipids) を使用した。ミセル化 NBD-C₁₂-セラミド溶液を調製し、細胞破砕液と混合した。反応液の Buffer 組成は、100 mM Tris (pH 7.5)、0.3% Triton X-100 となるように調製した。遮光下で、37°C で 3 時間、保温させた後、Quench solution (chloroform/methanol, 1:1, v/v) を加えて、ボルテックスした。遠心 (3,000 rpm, 10 分間、室温) 後、下層有機溶媒画分を回収し、窒素ガスで有

機溶媒を揮発させた。メタノールを 100 μ L 加え、HPLC 機器に供した。nCDase 触媒活性によって C12-NBD ceramide が NBD-dodecanoic acid へと変換されるため、NBD-dodecanoic acid 量を HPLC 機器 (Agilent 社) を用いて測定した(52)。

6. ウェスタンブロッティング法

細胞を RIPA buffer (PMSF 及び protease inhibitor cocktail 含有) を用いて、細胞破砕液を調製した。また、BCA Protein Assay Kit を用いてタンパク質定量した。SDS-PAGE 後、PVDF 膜にタンパクウェット式法を使用してタンパク質を転写した。次に、5%スキムミルク PBS-T (0.1% Tween20 含有) 溶液を用いて PVDF 膜を室温で 1 時間ブロッキングした。ブロッキング液を除去した後、PBS-T 溶液を用いて 5 分 \times 3 回洗浄した。5% BSA 含有 PBS-T で調製した anti-V5 tag 抗体液 (1:1000 倍希釈)、anti-GAPDH 抗体液 (1:2000 倍希釈) を 1 次抗体として、4 $^{\circ}$ C、一晚反応させた。翌日、PBS-T 溶液を用いて 5 分 \times 3 回洗浄した後、5% BSA 含有 PBS-T で調製した anti-mouse IgG HRP-conjugated 抗体または anti-rabbit IgG HRP-conjugated 抗体 (R&D Systems 社) を 2 次抗体 (1:5000 倍希釈) として、1 時間室温で振盪した。PBS-T 溶液を用いて 5 分 \times 3 回洗浄した後 ECL 試薬を添加し、暗室において感光フィルムによる目的タンパク質の検出を行った。

7. 免疫染色法

細胞を 4%パラホルムアルデヒド溶液にて 20 分間固定化した。PBS で洗浄した後、細胞を 0.1% Triton X-100 含有 PBS 溶液にて 5 分間処置し、細胞透過反応を行った。PBS で 5 分間 \times 3 回洗浄した後、2%BSA 含有 PBS 溶液で 20 分間ブロッキングした後、ブロッキング液を用いて希釈した anti-V5 抗体液 (1:250 倍希釈)、anti-giantin 抗体液 (1:500 倍希釈) 及び anti-GM130 抗体液 (1:500 倍希釈) を 1 次抗体として、4 $^{\circ}$ C、一晚反応させた。翌日、PBS で 5 分間 \times 3 回洗浄した後、ブロッキング液を用いて希釈した Goat anti-Mouse IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher 社) 及び Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 594 (Thermo Fisher 社、いずれも 1:1000 倍希釈) 溶液を 2 次抗体として、室温で 1 時間反応させた。PBS で 5 分間 \times 3 回洗浄した後、核染色のための DAPI 溶液を滴下させた。共焦点顕微鏡 Leica SP8 confocal microscopy system (Leica Microsystems) を用いて細胞の観察を行った。

8. 細胞生存率及びアポトーシス評価

細胞生存率は、methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT, Sigma-Aldrich 社)を用いて測定した。細胞に 1 mg/mL MTT 溶液を加え、30 分間室温で保温した。培養上清を除去した後、染色された細胞に DMSO 溶液を加え、560 nm 波長にて吸光度を測定した (SpectraMax microplate reader, Molecular Devices 社)。アポトーシス評価は、Caspase-3 活性を指標に、Fluorometric Assay Kit (BioVision 社)を用いて評価した。

9. 脂質量測定

細胞培養上清または細胞を回収し、細胞を破碎した。Bligh and Dyer 法にて脂質を抽出し、質量分析法にて測定した (Thermo Finnigan TSQ700triple quadrupole mass spectrometer) (37)。

10. 統計学解析

統計学解析は、GraphPad Prism 5 Software を用いて、Student's t-検定を実施した。また、3 群以上の解析においては、パラメトリックの Dunnett's 検定を実施した。生存曲線には、ノンパラメトリックの Wilcoxon 検定を実施した。

実験結果

1. 大腸がん細胞株 HCT116 における nCDase の細胞内局在

大腸がん細胞株における nCDase の細胞内局在を解析するために、V5 タグを融合させた nCDase プラスミドを細胞内に導入し、安定発現細胞株を樹立した。安定発現細胞株を回収し、細胞破碎液を用いて、nCDase 活性を測定した。その結果、nCDase 発現細胞では、Mock 細胞 (LacZ 空ベクター導入) と比べて、nCDase 活性が増加していることを確認した (図 6A)。一方で、不活性化型 nCDase (S354A) では酵素活性の上昇は認められなかった。また、ウェスタンブロッティング法を用いた場合においても、nCDase が細胞内で過剰発現していることを確認した (図 6B)。次に、nCDase の細胞内の局在を解析するため、細胞を蛍光免疫染色し、共焦点顕微鏡を用いて観察した。その結果、V5-tagged nCDase は細胞形質膜上に局在していた (図 6C)。また、ゴルジ体マーカーである giantin と V5-tagged nCDase が共局在していることも明らかとなり、新たに nCDase はゴルジ体にも局在することが判明した。

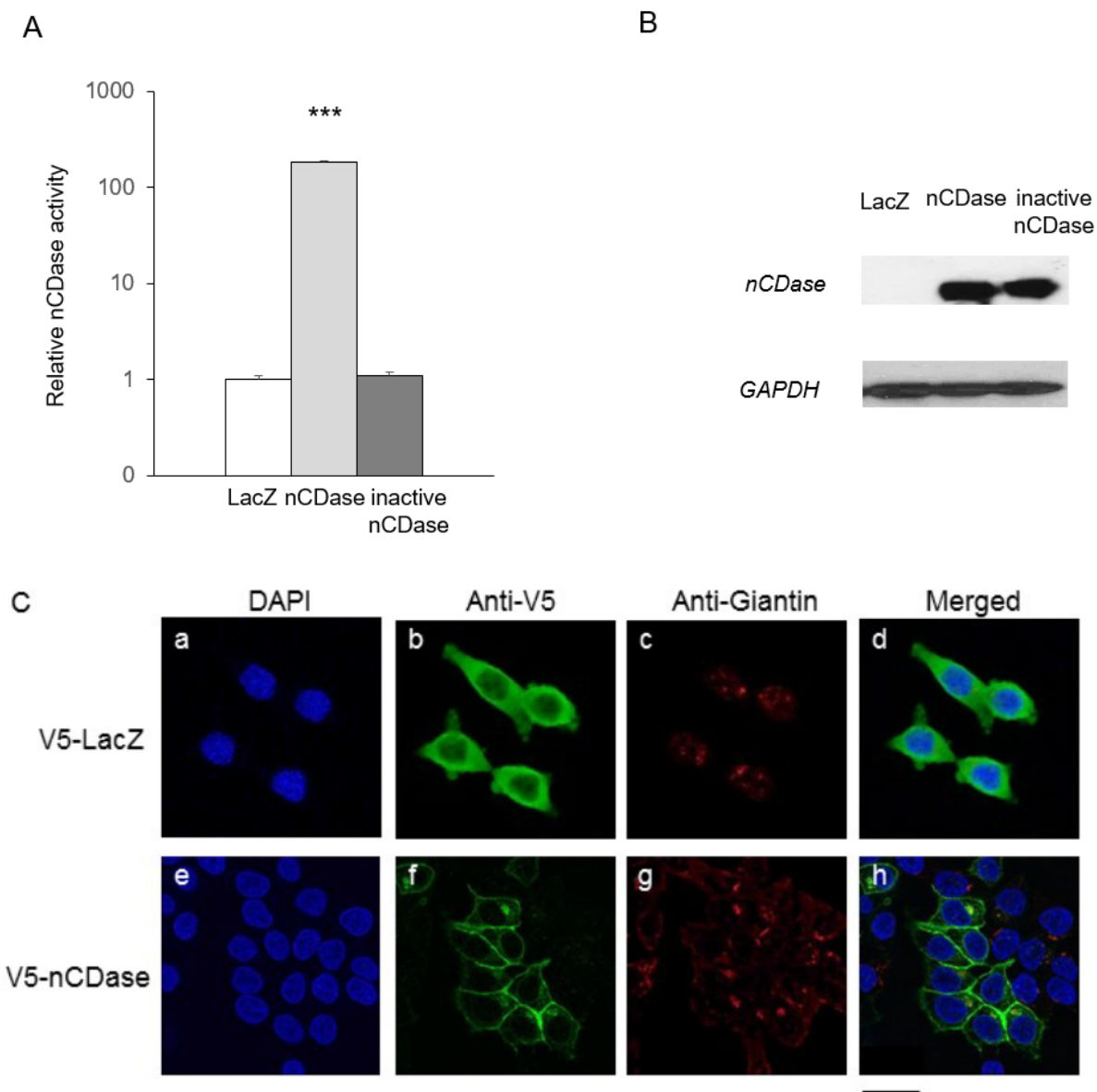


図6 V5-tagged nCDase 安定発現 HCT116 細胞における nCDase の細胞内局在.

LacZ ベクター、V5-tagged nCDase または不活性化型 V5-tagged nCDase (S354A) を HCT116 細胞に発現させた後、各安定発現細胞株を樹立した。A. これらの細胞内 nCDase 活性を測定するために、NBD- C_{12} -セラミドを基質として、3 時間反応させ、産生物を測定した。B. V5-tagged nCDase の発現量をウェスタンブロッティング法にて検出した。C. LacZ ベクター (a-d) 及び V5-tagged nCDase ベクター (e-h) を発現させた HCT116 細胞を、DAPI (青色)、anti-V5 抗体 (緑色) 及び anti-giantin 抗体(ゴルジ体マーカー、赤色)で免疫染色した後、共焦点顕微鏡で観察した。それぞれの値は、平均±SEM で示した (N=3)。スケールの大きさ: 25 μ m.***p<0.0005.

引用) Sakamoto W. et al., J. Lipid Res. 2018, 59(11): 2116-2125.

2. nCDase による C₆-セラミドの細胞障害性調節

C₆-セラミドはがん細胞に対して強力な細胞障害性を示し、新規抗がん剤として臨床開発ステージにある化合物である。そこで、C₆-セラミドの細胞障害性調節への nCDase の関与を探索するために、V5-tagged nCDase 安定発現細胞株、不活性型 V5-tagged nCDase 細胞株、Mock 細胞を用いた。これら細胞間において増殖速度に有意な違いは認められなかった (図 7A)。

C₆-セラミドの抗腫瘍活性発現への nCDase の関与を探索するため、V5-tagged nCDase 安定発現、不活性型 V5-tagged nCDase 発現または Mock 細胞 (LacZ 空ベクター導入) に 5 μM の C₆-セラミド溶液を処置し、細胞生存数を MTT アッセイにて評価した。その結果、V5-tagged nCDase を発現させると、C₆-セラミドによる細胞増殖抑制作用は減弱した (図 7A, B)。一方で、不活性型 V5-tagged nCDase を発現させた細胞では、C₆-セラミドによる細胞増殖抑制作用は減弱しなかった。更に、アポトーシスに対する nCDase の発現効果を調べるために、caspase-3 活性について評価した。Mock 細胞では、C₆-セラミド処理により caspase-3 の活性化は未処理に比して 1.5 倍上昇した。しかしながら、V5-tagged nCDase 安定発現細胞での caspase-3 の活性化は Mock 細胞に比して有意に低下した (図 7C)。一方で、不活性型 V5-tagged nCDase 安定発現細胞においては、Mock 細胞と同様に C₆-セラミドによる Caspase-3 の活性化が検出された。

以上の結果より、nCDase は、C₆-セラミドのアポトーシス誘導による細胞障害性を減弱すると考えられた。

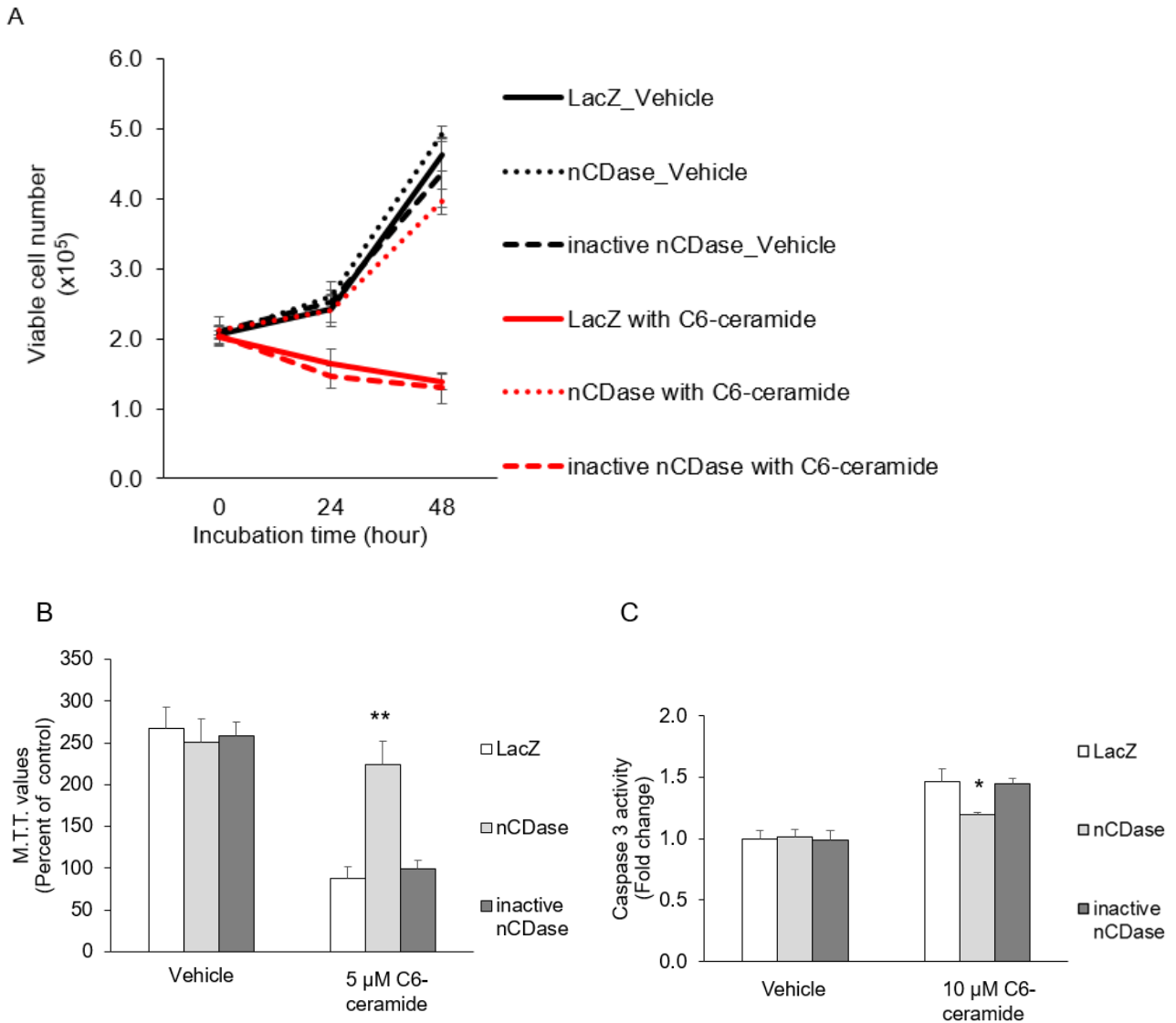


図7 C₆-セラミドの細胞障害性及びアポトーシス誘導に対する nCDase の影響.

HCT116 細胞に遺伝子導入 (LacZ 空ベクター、V5-tagged nCDase ベクターまたは不活性型 V5-tagged nCDase ベクター) した後、各安定発現細胞株を樹立した。5 μM C₆-セラミド存在下または非存在下に細胞を一定時間培養した。A. 24 または 48 時間後の生細胞数を測定した。また、48 時間後の細胞生存活性を MTT アッセイにて評価した (B)。C. Caspase-3 活性を指標としたアポトーシス誘導作用を評価した。それぞれの値は、平均±SEM で示した (N=3)。**p<0.005, *p<0.05。

引用) Sakamoto W. et al., J. Lipid Res. 2018, 59(11): 2116-2125.

3. nCDase と C₆-セラミドによるゴルジ体断片化との関連性

C₆-セラミドは、アポトーシス誘導作用だけでなくゴルジ体を断片化する作用をもつことで知られている化合物である(53)。nCDase はゴルジ体に局在することから、nCDase が C₆-セラミド刺激によるゴルジ体断片化に関わっているのかについて検討した。5 μM C₆-セラミドを細胞に 12 時間処置した後、細胞を固定し、免疫染色を行った。ゴルジ体のマーカーには GM130 を用いて、ゴルジ体の断片化を観察した。C₆-セラミドを処置すると、Mock 細胞内ではゴルジ体の断片化が観察された (図 8A, B)。対照的に、V5-tagged nCDase 安定発現細胞においては、C₆-セラミド処置によるゴルジ体の断片化は認められなかった (図 8E, F)。次に、nCDase 活性を阻害した場合に、C₆-セラミド誘導によるゴルジ体の断片化が減弱されるのか否かについて検討した。nCDase 阻害剤として、C₆-urea-セラミドを用いた(54, 55)。初めに、C₆-urea-セラミド自身にはゴルジ体の断片化作用を有していないことを確認した (図 8C, G)。次に、V5-tagged nCDase 安定発現細胞に C₆-urea-セラミドを処置し、1 時間後に C₆-セラミドを添加した。その結果、ゴルジ体の断片化が観察された (図 8D, H)。ゴルジ体の断片化作用を、GM130 染色強度を指標に定量した (図 8I)。先程と同様に、C₆-セラミドによるゴルジ体の断片化が V5-tagged nCDase の発現によって有意に抑えられ、この抑制作用は nCDase 阻害剤存在下に消失した。したがって、nCDase は C₆-セラミドによるゴルジ体の断片化作用を減弱することが明らかとなった。

更に、ゴルジ体に局在している nCDase に着目した解析を行うために、ゴルジ体特異的に発現するシグナル配列を付加させた bCDase (V5-Golgi-CDase) を細胞内に発現させた。また、対照群として、細胞質特異的に発現する CDase (V5-Cyto-CDase) を使用した。図 9 の赤色で示したとおり、V5-Golgi-CDase 及び V5-Cyto-CDase は、それぞれゴルジ体及び細胞質に発現していることを確認した (図 9C, E)。次に、Mock 細胞に C₆-セラミドを処置するとゴルジ体断片化が観察されたが、一方で、V5-Golgi-CDase を発現させた細胞においては、C₆-セラミドによるゴルジ体の断片化は認められなかった (図 9C, D)。更に、V5-Cyto-CDase を発現させた場合には、C₆-セラミドによるゴルジ体の断片化は検出された (図 9E, F)。C₆-セラミド誘導によるゴルジ体断片化作用を定量したものを図 9I に示した。これらの結果より、ゴルジ体での CDase 活性が、C₆-セラミド誘導性ゴルジ体断片化作用の減弱に関与しており、nCDase の新たな生理機能が見いだされた。

以上の結果を考え合わせると、ゴルジ体局在性 nCDase は、C₆-セラミドを代謝分解することで、そのゴルジ体断片化作用を減弱させると推察された。

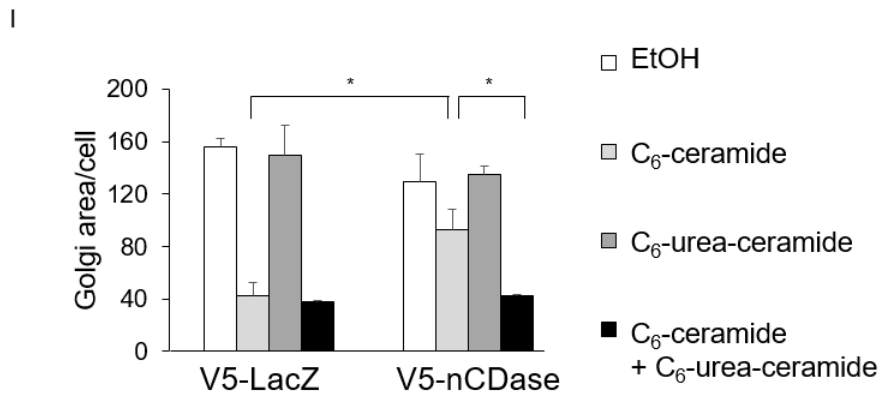
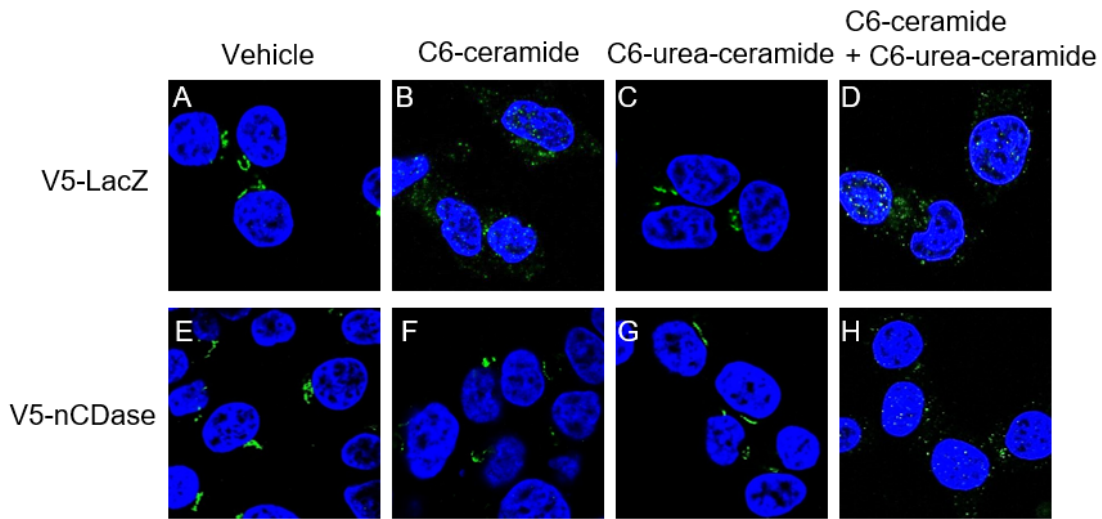


図8 nCDase 阻害剤の C₆-セラミド誘導によるゴルジ体断片化への影響.

A-H. 5 μ M C₆-セラミド及び nCDase 阻害剤を各細胞に 12 時間処置した後、共焦点顕微鏡を用いてゴルジ体（ゴルジ体マーカー GM130 を用いて染色、緑色）の断片化を観察した（核：青色、DAPI 染色）。I. GM130 染色量を指標にゴルジ体の断片化作用を定量した。それぞれの値は、平均 \pm SEM で示した（N=3）。*p<0.05. 引用) Sakamoto W. et al., J. Lipid Res. 2018, 59(11): 2116-2125.

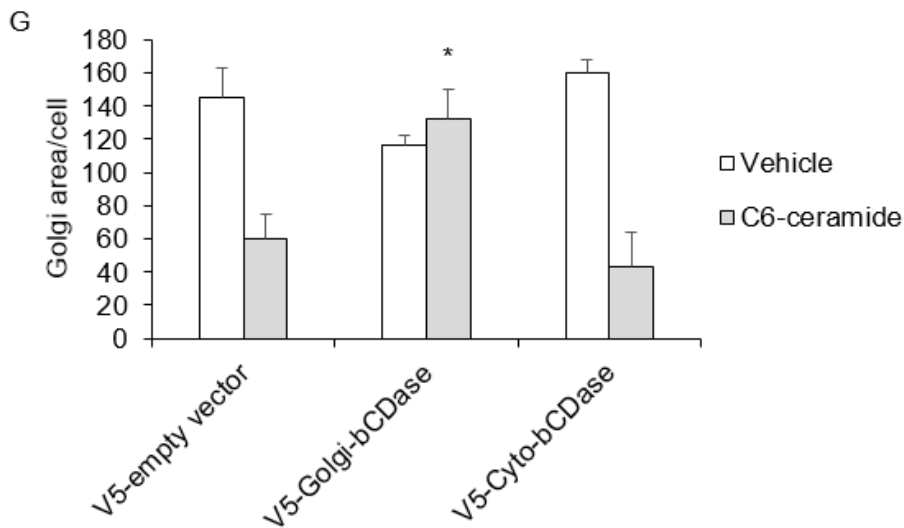
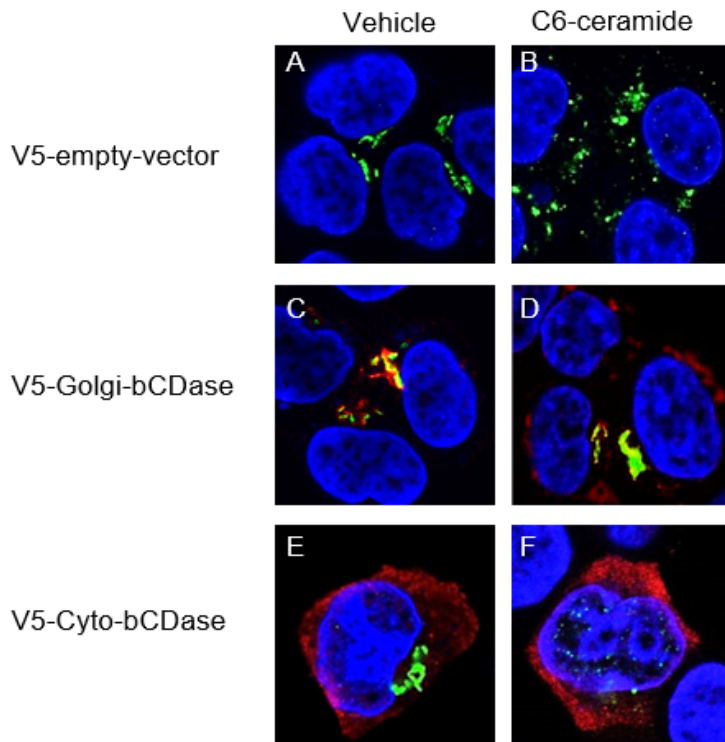


図9 ゴルジ体における CDase の機能的役割.

A–F. HCT116 細胞に V5-empty、Golgi-bCDase または Cyto-bCDase ベクターを一過的に発現させた後、5 μ M C₆-セラミドを 6 時間処置した。C₆-セラミド誘導によるゴルジ体の断片化を、共焦点顕微鏡を用いて観察した。ゴルジ体は GM130 (緑色)、bCDase は anti-V5 抗体 (赤色)、核は DAPI (青色) を用いて染色した。

G. GM130 染色量を指標にゴルジ体の断片化作用を定量した。それぞれの値は、平均 \pm SEM で示した (N=3)。*p<0.05.

引用) Sakamoto W. et al., J. Lipid Res. 2018, 59(11): 2116-2125.

4. スフィンゴ脂質代謝における nCDase の役割

スフィンゴ脂質の代謝経路には、nCDase を含めた多数の酵素が寄与している。nCDase の C₆-セラミド代謝への関与を探索するため、セラミド、スフィンゴシン及びスフィンゴシン-1-リン酸量を測定した。

V5-tagged nCDase 安定発現細胞内のスフィンゴ脂質量は、Mock 細胞 (LacZ 空ベクター導入) と比較して、大きな差はなかった (図 10A-C)。したがって、nCDase 活性は恒常的ではなく、ある条件下においてのみ、セラミドを加水分解している可能性が考えられた。または、nCDase は恒常的に稼働しているが、代替的な代謝経路によって、nCDase 活性化によるスフィンゴ脂質量の変動が捉えられなかったことも推察される。

C₆-セラミドは deacylation/reacylation を介して細胞内のセラミド量を増加させる作用を有することが知られている。そこで、C₆-セラミド存在下におけるスフィンゴ脂質代謝に対する nCDase 活性の影響について調べた。C₆-セラミドを細胞に処置するとスフィンゴシン量は増加したが、nCDase 安定発現細胞においては Mock 細胞よりもスフィンゴシン量の更なる増加作用が観察された (図 10A)。スフィンゴシン-1-リン酸量もスフィンゴシンと同様に、nCDase 安定発現細胞において、より増加した (図 10B)。一方で、C₆-セラミドによる細胞内のセラミド量は増加したが、Mock 細胞と nCDase 安定発現細胞との間にセラミド量の変動に大きな違いはなかった (図 10C)。

次に、nCDase 阻害剤 C₆-urea-セラミドを用いて、上述と同様に実験を行った。C₆-urea-セラミドを 12 時間細胞に処置したのみでは、スフィンゴ脂質量に変化はなかった。しかしながら、C₆-セラミド添加前に C₆-urea-セラミドを処置しておくこと、C₆-セラミド添加によるスフィンゴシン及びスフィンゴシン-1-リン酸量の増加は抑制された (図 10A, B)。一方で、C₆-セラミド及び C₆-urea-セラミドを併用した場合においても、セラミド量に変化はなかった。したがって、C₆-セラミドの代謝経路に nCDase が必要であることが考えられた。

更に nCDase 欠損マウス由来の繊維芽細胞 (MEFs) を用いて、C₆-セラミドのスフィンゴシンへの代謝への nCDase 活性の関与を探索した。nCDase 欠損 MEFs において、C₆-セラミドによるスフィンゴシンの増加量が nCDase 野生型 MEFs と比べて減少した (図 10D)。同様に、スフィンゴシン-1-リン酸量も nCDase を欠損させることによって低下した。対照的に、セラミド量に変化は認められなかった。これらの結果を考え合わせると、内因性 nCDase は C₆-セラミドのスフィンゴシンへの代謝に関与する可能性があることが判った。

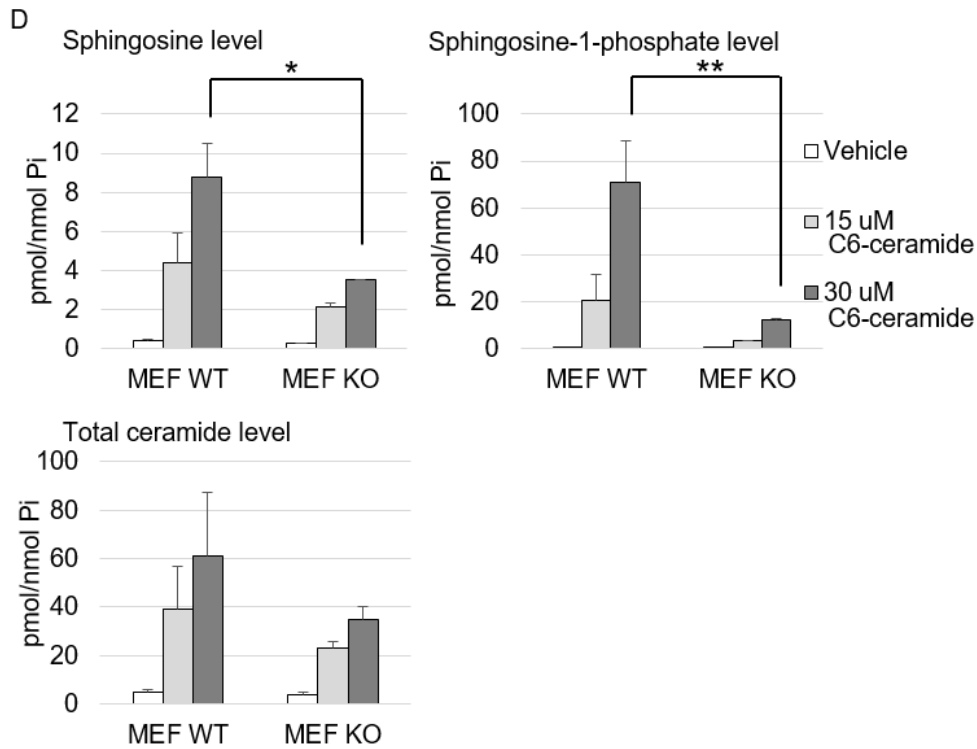
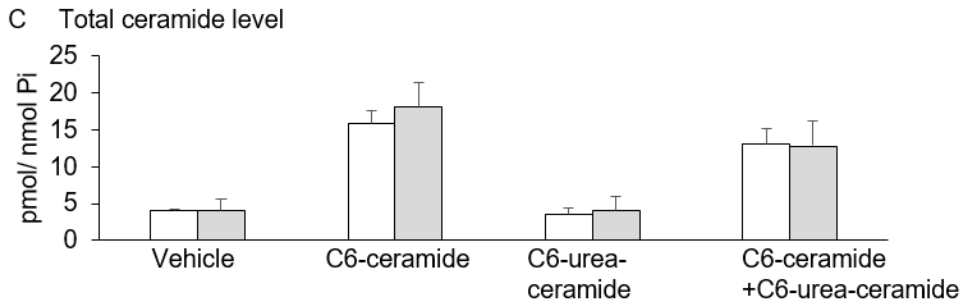
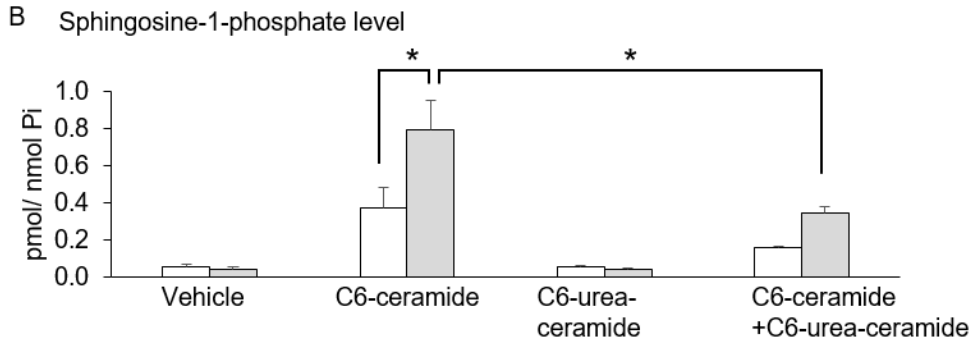
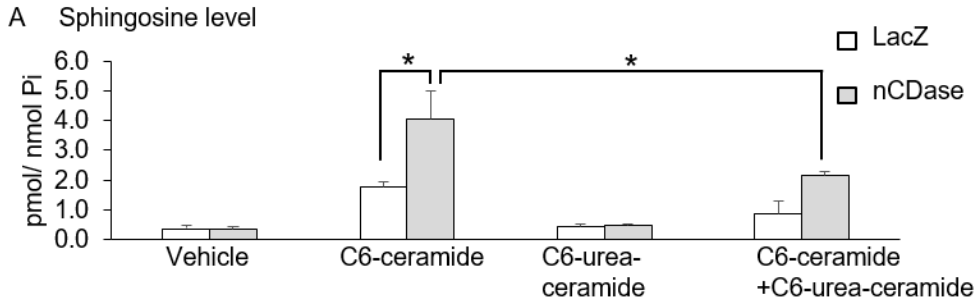


図 10 nCDase 活性のスフィンゴ脂質代謝に対する効果.

A-C. V5-tagged nCDase 安定発現細胞を 5 μ M C₆-urea-セラミド (nCDase 阻害剤) で 1 時間前処置した後、5 μ M C₆-セラミドを 12 時間作用させた。その後、脂質を抽出して、セラミド量、スフィンゴシン量及びスフィンゴシン-1-リン酸量を HPLC-ESI-MS 機器を用いて測定した。D. nCDase 野生型及び欠損型マウス由来の MEFs 細胞を用いて、スフィンゴ脂質量の変動を解析した。それぞれの値は、平均 \pm SEM で示した (N=3)。**p<0.005, *p<0.05.

引用) Sakamoto W. et al., J. Lipid Res. 2018, 59(11): 2116-2125.

5. C₆-セラミド代謝及び細胞内取り込みに対する nCDase の関与

C₆-セラミドの代謝量または細胞内取り込みに対する nCDase の関与を調べることを目的として、培地または細胞内に存在する C₆-セラミド量を経時的に測定した。その結果、培地中 C₆-セラミド量は Mock 細胞 (LacZ 空ベクター導入) 及び nCDase 安定発現細胞共に、時間依存的に同程度減少した (図 11A)。一方で、細胞内 C₆-セラミド量は投与 4 時間後まで時間依存的に増加した (図 11B)。nCDase 安定発現細胞において、Mock 細胞に比較して、細胞内 C₆-セラミド量は減少した。培地中 C₆-セラミド量では両細胞間での差はなかったことから、C₆-セラミドの細胞内取り込みには nCDase は影響を及ぼさず、細胞内における C₆-セラミドの代謝促進に nCDase が関与している可能性が考えられた。

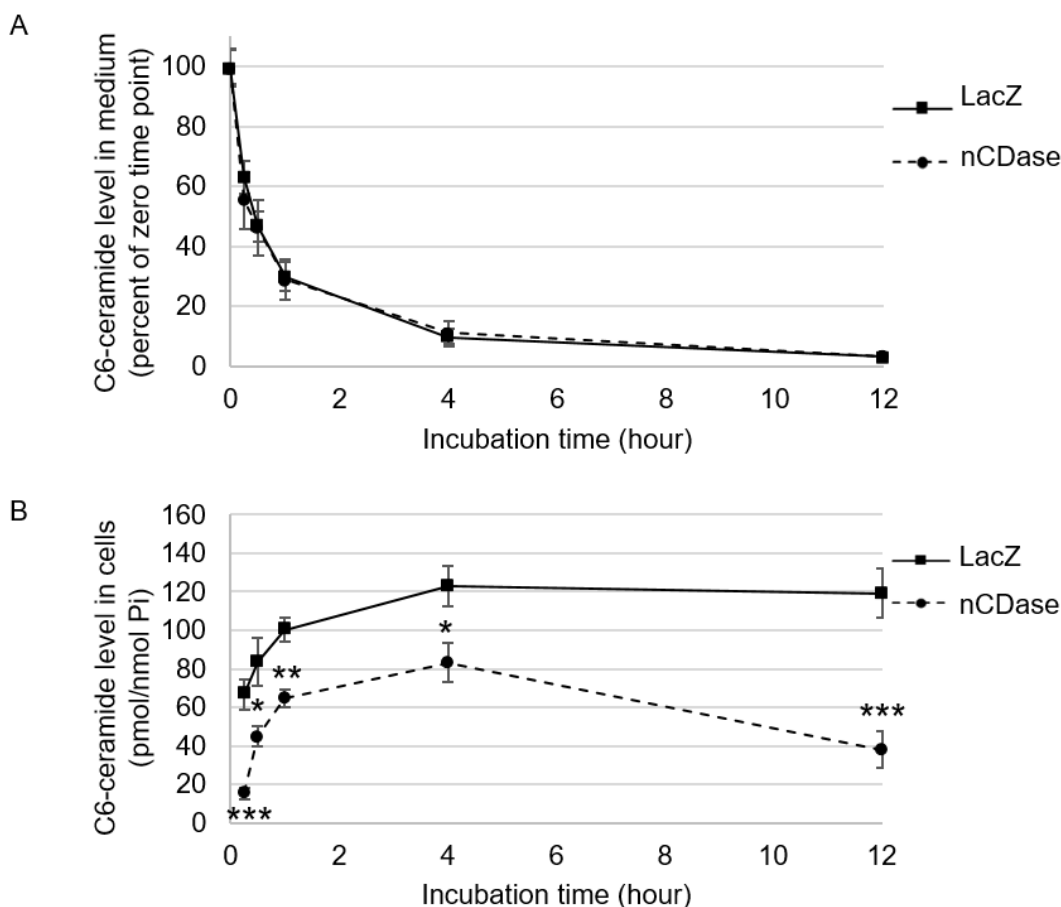


図 11 C₆-セラミド代謝及び細胞内取り込みに対する nCDase の関与.

A. LacZ (Mock) 及び nCDase 安定発現細胞に 5 μ M C₆-セラミドを処置した後、培地中に存在する C₆-セラミド量を経時的に測定した。B. C₆-セラミド添加後、細胞内に存在する C₆-セラミド量を測定した。それぞれの値は、平均 \pm SEM で示した (N=3)。**p<0.0005. **p<0.005, *p<0.05.

引用) Sakamoto W. et al., J. Lipid Res. 2018, 59(11): 2116-2125.

6. ゴルジ体におけるスフィンゴ脂質代謝に対する nCDase の関与

ゴルジ体における nCDase とスフィンゴ脂質変動量の関係性について検討するために、ゴルジ体特異的発現する bSMase を利用した。nCDase 安定発現 HCT116 にゴルジ体標的型 bSMase を発現させた後、細胞内におけるスフィンゴミエリン、セラミド、スフィンゴシン及びスフィンゴシン-1-リン酸量をそれぞれ測定した。その結果、HCT116 細胞にゴルジ体標的型 bSMase を発現させることでセラミド量の顕著な増加が認められた (図 12A)。次に、nCDase 安定発現 HCT116 においても SMase によるセラミド量の増加は認められた。また、有意差は認められなかったが、nCDase によるセラミド量の減少及びスフィンゴシン量の増加が確認できた。bSMase を介したスフィンゴミエリン量の変動に対する nCDase の影響の原因は不明である。nCDase が活性化されることによって、スフィンゴミエリン代謝経路に何かしらの影響を及ぼしたのかもしれない。

以上より、ゴルジ体標的型 bSMase を発現させることによって、ゴルジ体に存在するセラミド量が増加し、増加したセラミドに対して nCDase は加水分解作用を示すことが判明した。

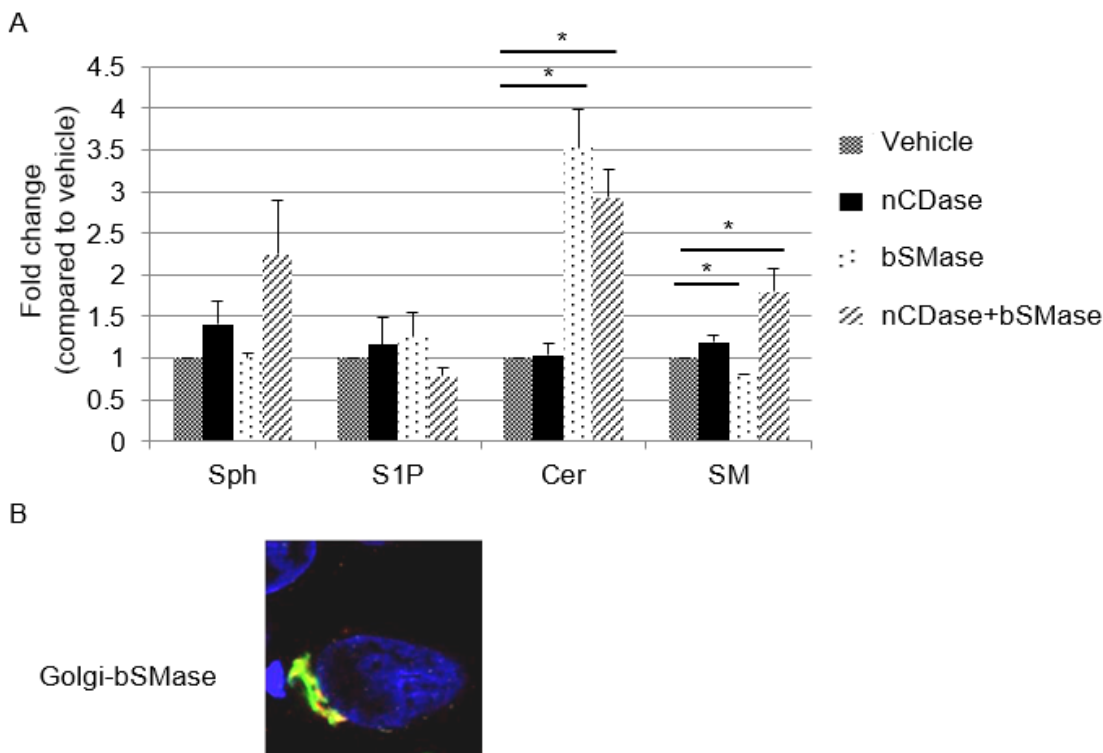


図 12 nCDase 及びゴルジ体標的型 bSMase 強制発現によるスフィンゴ脂質量の変動.

A. HCT116 細胞及び nCDase 安定発現 HCT116 細胞にゴルジ体標的型 bSMase を一過的に 24 時間発現させた後、細胞から脂質を抽出した。その後、細胞内におけるスフィンゴシン、スフィンゴシン-1-リン酸、セラミド及びスフィンゴミエリン量を解析した。それぞれの値は、平均±SEM で示した (N=3)。B. ゴルジ体標的型 bSMase を発現させた後、免疫染色法にて bSMase (赤色) がゴルジ体 (緑色) に発現していることを確認した。それぞれの値は、平均±SEM で示した (N=3)。*p<0.05。

引用) Sakamoto W. et al., J. Lipid Res. 2018, 59(11): 2116-2125.

考察

本研究結果から、nCDase は細胞形質膜上だけでなくゴルジ体にも局在することが初めて明らかになった。また、ゴルジ体に存在するセラミドの加水分解に nCDase が関与していること、並びに nCDase は C₆-セラミドを代謝することでその細胞傷害性を減弱することが明らかになった。ゴルジ体における nCDase の機能を解析するにあたり、第 1 章で作製した細胞小器官標的型 bCDase ベクターを活用することによって、本研究結果の裏付けに貢献した。nCDase を介したスフィンゴ脂質量の変化を捉えるためには、SMase 処置または C₆-セラミドなど外因的な刺激条件下において、初めて検出可能となった。実際に、HCT116 に V5-tagged nCDase を過剰発現させた場合に、スフィンゴシン、スフィンゴシン-1-リン酸及びセラミド量の基底値は Mock 細胞と比較して差は認められなかったものの、C₆-セラミドを細胞外から添加することによって、nCDase を介したスフィンゴシン及びスフィンゴシン-1-リン酸量の増加を確認することができた。

ゴルジ体はスフィンゴ脂質代謝の主要な細胞小器官であり、特にスフィンゴミエリン及び糖鎖型スフィンゴ脂質の *de novo* 合成の場である(56-58)。また、小胞体で合成されたセラミドはセラミド輸送体 (CERT) によってゴルジ体に輸送される(59, 60)。しかしながら、ゴルジ体におけるスフィンゴ脂質の加水分解経路についてはほとんど知られていない。

NBD-C₆-セラミドのような短鎖型のセラミドはゴルジ体に蓄積することから、C₆-セラミドに対する nCDase の作用は、細胞形質膜ではなくゴルジ体特異的に認められる現象であると思われる(53)。細胞形質膜上にも nCDase は局在するが、C₆-セラミドの取り込みに対して nCDase の発現は影響しなかったことから、ゴルジ体局在性 nCDase が C₆-セラミドの代謝に寄与していることが推察される。更に、C₆-セラミドはゴルジ体の断片化を誘導することからも、本研究で得られた結果はゴルジ体における nCDase の新たな役割を示すものである。ゴルジ体の断片化は初期のアポトーシスのマーカーとして知られており、C₆-セラミドはカスパーゼ 3 の活性化及びゴルジ体の断片化といったアポトーシス誘導を介した細胞傷害性を示す特徴をもつ(61)。したがって、nCDase を活性化させることによって、C₆-セラミドによる細胞傷害性から保護する作用を示すことが判った。これは、aCDase でも同様の現象が乳がん細胞において観察されており、aCDase 活性を阻害することで C₆-セラミドの抗増殖作用を相乗的に高めた(62)。一方で、aCDase を過剰発現させた精巣がん細胞においては、オートファジーが促進され、C₆-セラミドの細胞障害性に対して抵抗性を示すことも知られている(63)。

また、中性 SMase、ACER2 及び ACER3 の酵素もゴルジ体に局在していることが知られている(64-66)。これらの酵素と密接して、nCDase もまたセラミドからスフィンゴシン及び遊離脂肪酸への加水分解をゴルジ体で稼働している可能性が考えられた。加えて、細胞内セラミド量を増加させる刺激・曝露の環境下において、nCDase はゴルジ体の形態及び機能を維持する役割を果たしているようにも思われる。一方で、外因性 bSMase による細胞膜上で生み出されたセラミドは細胞形質膜上に局在する nCDase によって加水分解されることが知られており、nCDase の細胞形質膜及びゴルジ

体という異なる細胞小器官に局在することで、二重の役割・生化学的機能を果たしていることが明らかとなった(67)。

特定のがん腫において、nCDase の発現量が高いものは、C₆-セラミドを含む抗がん剤に対して抵抗性を示すかもしれない。そこで、パブリックデータベース TCGA を用いて、がん組織での nCDase 発現量と患者生存期間との関連性を解析した。まず、患者群を nCDase 高発現群 (全患者数の 50%) 及び低発現群 (全患者数の 50%) にグループ化した。乳がん及び子宮がんでは、nCDase の高発現患者で予後不良であることがは明らかになり、新たな乳がんや子宮がんのバイオマーカーになる可能性がある (p 値<0.05) (図 13)。したがって、nCDase 阻害剤は nCDase 高発現を示すがんに対して新規治療薬として有効であることが期待される。

以前に、Hannun 研究室では、大腸がんにおいて、nCDase は新たな抗がん剤の標的分子となりうることを報告した(20)。今後、がんだけでなく他のスフィンゴ脂質代謝と関連する疾患においても、nCDase 阻害剤は有用になる可能性がある。また、nCDase 以外だけでなくセラミド代謝を標的とした代謝制御剤もまた、がんなどの疾患の新規治療薬候補となると思われる。

以上の結果より、本章では、C₆-セラミドによる細胞傷害性に対してゴルジ体局在の nCDase が保護的役割を果たし、その作用機序解明に至った。そして、nCDase 阻害剤は、セラミド代謝制御による抗腫瘍効果を発揮する薬剤の候補として挙げられる。

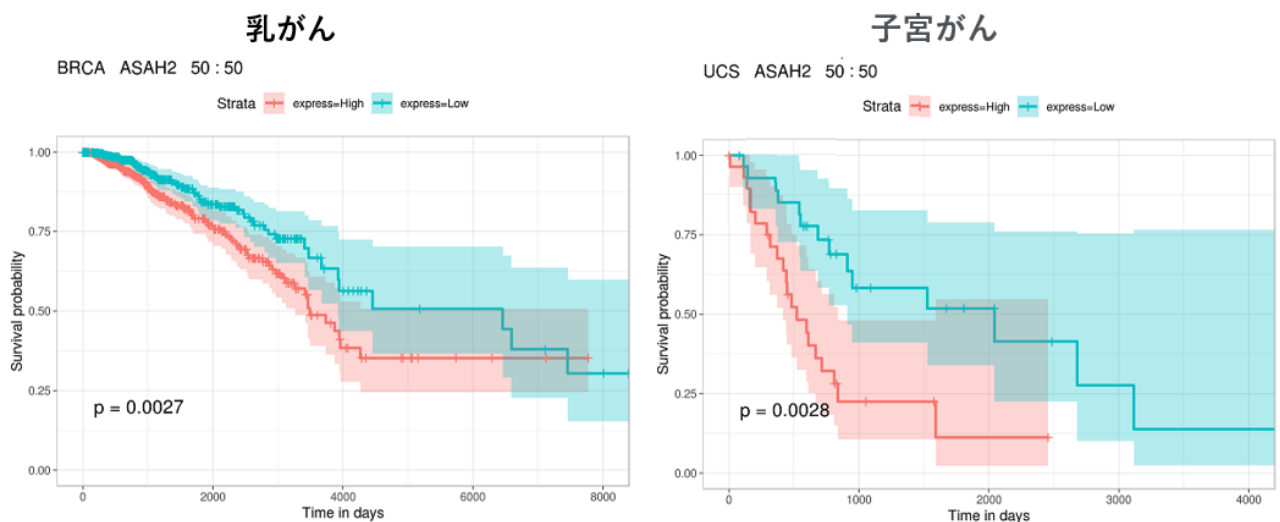


図 13 TCGA による nCDase 発現量と生存曲線の解析.

TCGA のデータベースを利用した cBioPortal サイト (<https://www.cbioportal.org/>) より、nCDase 遺伝子 (ASAH2) の高発現群 (全患者数の 50%) 及び低発現群 (全患者数の 50%) に分類し、各がん腫における生存曲線を比較した。Wilcoxon 検定にて、 $p < 0.05$ 以下のものを掲載した。

小括

1. V5-tagged nCDase 安定発現 HCT116 細胞において、nCDase は細胞形質膜及びゴルジ体に局在することが判明した。
2. nCDase は、C₆-セラミドのアポトーシス誘導作用（カスパーゼ 3 活性化、ゴルジ体断片化）及び細胞障害作用を妨げた。また、ゴルジ体標的型 bCDase の強制発現は、C₆-セラミドのゴルジ体断片化作用を減弱させた。

以上より、nCDase は細胞形質膜だけでなくゴルジ体にも局在しており、このゴルジ体局在性 nCDase の機能を新たに見いだした。nCDase を阻害することによって、C₆-セラミドの抗腫瘍効果を増強できる可能性があることから、nCDase はがん創薬における新たな治療標的分子になることが期待される。

第3章 nCDaseによる内因性セラミド量の増加を介した細胞運動能の制御

緒言

卵巣がんは、播種転移を示す悪性腫瘍であり、日本国内においては、卵巣がんの年間罹患者数は10,000人を超える（国立がん研究センター、がん登録・統計に基づく）。卵巣がんの治療薬には、パクリタキセルやカルボプラチンなどの化学療法が多くの症例で実施される。近年では、DNA相同組換え修復遺伝子 BRCA1/2 変異を有する遺伝性卵巣がんに対して、DNA一本鎖切断修復の主要酵素であるポリアデノシン 5' ニリン酸リボースポリメラーゼ (PARP) 阻害剤が分子標的薬として使用されており、高い有効性が確認されている(69)。一方で、予後不良を示す難治性卵巣がんに対する新たな治療薬開発のニーズは高く、卵巣がんの薬剤に対する抵抗性獲得や転移を引き起こすメカニズムを解明することが創薬基盤の構築に必要である。

細胞運動性と浸潤は、がん転移における重要な細胞機能である(70-72)。成長因子、ケモカイン、及びリゾ脂質などの多数のメディエーターが細胞運動に関わるシグナルを活性化し、細胞運動能の促進、並びに転移が誘導される。メディエーターの1種であるセラミドは、細胞運動性に対する負の制御因子としての役割をもつ(58, 73-76)。セラミドは、クラスII型ホスファチジルイノシトール-3キナーゼβ (PI3KC2β) を阻害することで卵巣がん細胞の運動性を抑制することから(14)、セラミドは抗運動性・抗転移性分子として提唱されている(77-79)。

セラミド代謝を介したがん転移を調節する作用機序として、上述の PI3KC2βの関与だけでなく、複数のセラミド代謝酵素も関連していることが知られている。セラミドからセラミド-1-リン酸を産生するセラミドキナーゼは、乳がん細胞の細胞運動を促進する(80)。セラミドとホスファチジルコリンを基質としてスフィンゴミエリンを合成する酵素 SGMS2 は、TGF-β/Smad シグナル経路を介した上皮間葉転移を促進し、がんの浸潤を進行させる(81, 82)。また、セラミド合成酵素 CerS6 を抑制すると、がん細胞の葉状仮足形成が抑えられ、肺への転移が減弱することも知られている(83)。このように、抗腫瘍性分子セラミドの代謝は、複雑なネットワークで制御されており、生体内におけるセラミド制御のメカニズムを解明することで新たながん治療薬の開発につながることを期待される。実際に、第2章で取り扱った C₆-セラミドのリポソーム化製剤は、悪性黒色腫や卵巣がんの転移を抑える新たな抗がん薬候補である(84)。

本章では、卵巣がん細胞を用いて運動性制御に対する nCDase の関与を、葉状仮足形成を指標にして探索した。

実験方法

1. 実験材料

細胞培養培地、ウシ胎児血清及び抗生物質は、Invitrogen 社から購入したものをを使用した。C₁₆-セラミド、C₁₈-セラミド、C₂₄-セラミド及び C_{24:1}-セラミドは Matreya 社より購入したものをを使用した。Anti-β-actin 抗体及び TRITC-conjugated phalloidin は Sigma 社から、RNAiMax、Lipofectamine 2000、TaqMan Universal Master Mix II 及び nCDase TaqMan probe は Thermo Fisher Scientific 社から、RNeasy mini kits、ReverTraAce kit 及び Hoechst 33342 は、それぞれ、Qiagen 社、TOYOBO 社及び同仁化学研究所から購入したものをを使用した。

2. 細胞培養

ヒト卵巣がん細胞株 SKOV3 は、JCRB 細胞バンク (Osaka, Japan) より入手し、10%ウシ胎児血清を含む DMEM 培地を用いて、37°C、CO₂ インキュベーター内において培養した。SKOV3 は、漿液性腺がん由来の細胞株である。

3. siRNA 及びプラスミドのトランスフェクション

細胞培養ディッシュに 2×10^4 cells で SKOV3 細胞を播種し、RNAiMax 試薬を用いて、nCDase siRNA (Life technologies 社) を細胞内に導入した。また、nCDase 過剰安定発現細胞を樹立するために、 5×10^4 cells 細胞をディッシュに播種し、Lipofectamine 2000 を用いて、2 μg プラスミドを培地中に添加した。その後、0.5 mg/ml G418 存在下に 3 週間培養し、nCDase 過剰安定発現細胞株を樹立した。

4. 定量 RT-PCR

細胞を冷 PBS で洗浄し、RNeasy mini kits を用いて細胞内 RNA を抽出した。cDNA を作製するために、ReverTraAce kit を用いて RNA から逆転写した。TaqMan Universal Master Mix II 及び nCDase 特異的 TaqMan probe を用いて、nCDase (ASAH2) 遺伝子発現量を測定した。

5. 葉状仮足形成の解析

SKOV3 細胞を、4%パラホルムアルデヒドを用いて 10 分間固定した。次に、0.1% TritonX-100 を用いて、10 分間細胞透過処理をした。続いて Hoechst 33342 及び TRITC-conjugated phalloidin で細胞を 5 分間染色した。葉状仮足形成を示す細胞数を、蛍光顕微鏡下 (1 サンプル > 200 細胞数) にカウントした。

6. 脂質量測定

第 2 章の実験方法 9 と同様の方法を用いて測定した。

7. ウェスタンブロッティング法

第 1 章の実験方法 5 と同様の方法で操作した。

8. 統計学的解析

統計学解析は、GraphPad Prism 5 Software を用いて、Student's t-検定を実施した。生存曲線には、ノンパラメトリックの Wilcoxon 検定を実施した。

実験結果

1. 細胞運動能に対する nCDase ノックダウンと外因性セラミドの影響

nCDase siRNA を SKOV3 細胞に処置した 48 時間後、葉状仮足形成を示す細胞数を測定した (図 14)。その結果、nCDase ノックダウン細胞群での葉状仮足形成を示す細胞数は control siRNA 群に比して有意に減少した (図 14A)。また、siRNA 処置による nCDase 発現のノックダウン効率は、30% 程度であった (図 14B)。

次に、nCDase ノックダウンによる細胞内セラミド量の変動を解析した (図 14C)。nCDase ノックダウンにより、C_{24:1}-セラミド量は有意に上昇したが、他のセラミド分子種は変化しなかった。したがって、C_{24:1}-セラミドは nCDase の基質である可能性がある。

次に、外因性 C_{24:1}-セラミドの葉状仮足形成への影響を探索するために、SKOV3 細胞を 5 μ M 各種セラミド分子種 (C₁₆-, C₁₈-, C₂₄-セラミド及び C_{24:1}-セラミド) 存在下に 6 時間培養した。その後、細胞表面上の葉状仮足形成を示す細胞数を測定した。図 14D に示したように、C₁₆-, C₂₄-及び C_{24:1}-セラミドは、いずれも葉状仮足の形成を抑制した。

したがって、nCDase 活性を抑制することで、C_{24:1}-セラミド量が上昇し、この C_{24:1}-セラミドが葉状仮足の形成を阻害すると推察された。

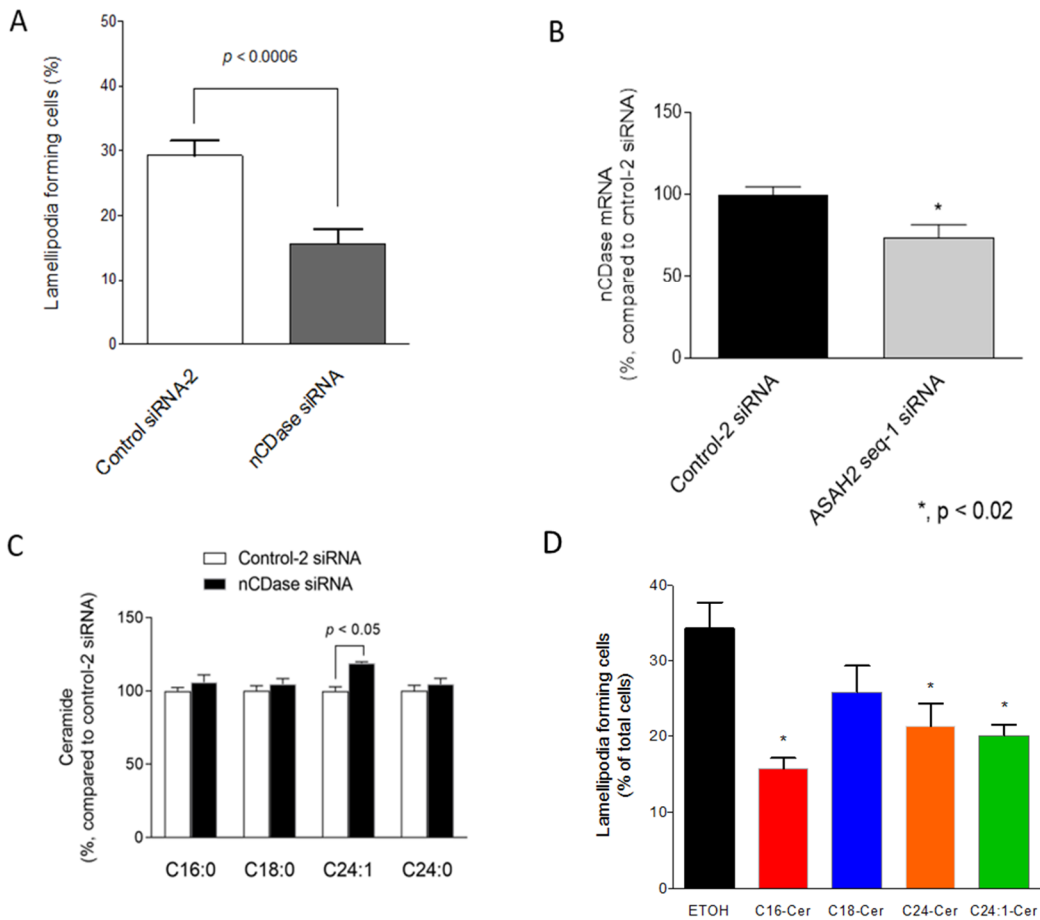


図 14 細胞運動能に対する nCDase ノックダウンと外因性セラミドの影響.

A. SKOV3 細胞に 5 nM siRNA を 48 時間処置した後、葉状仮足形成数を測定した。B. nCDase mRNA 量を指標に、nCDase siRNA のノックダウン効果を確認した。C. nCDase siRNA を 48 時間処置した後、細胞内セラミド量を測定した。D. SKOV3 細胞に各種 5 μ M セラミドを 6 時間処置した後、葉状仮足形成を示す細胞数を測定した。それぞれの値は、平均 \pm SEM で示した (N=4)。

引用) Zhang X. et al., FASEB J. 2021, 35(2): e21287.

2. nCDase 過剰発現の葉状仮足形成への影響

逆に nCDase 過剰発現の仮足形成への影響を探索した。まず、SKOV3 細胞に nCDase を過剰発現させ、nCDase 安定発現細胞株を樹立した。この細胞株での葉状仮足形成を示す細胞数を測定した。その結果、nCDase 安定発現細胞では葉状仮足形成を示す細胞数は Mock 細胞と比して有意に増加した(図 15A)。また、nCDase 安定発現細胞において、nCDase が発現していることを確認した(図 15B)。

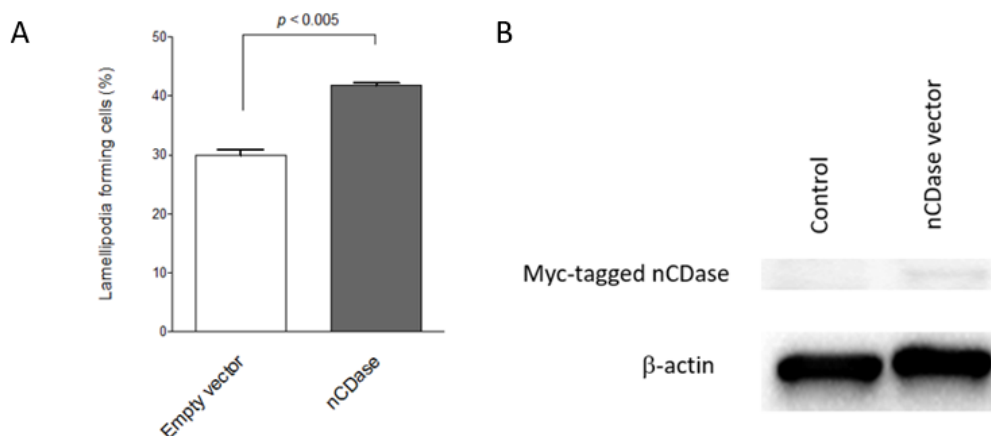


図 15 葉状仮足形成への nCDase 強制発現の影響

A. nCDase 安定発現 SKOV3 細胞株における葉状仮足形成を示す細胞数を測定した。それぞれの値は、平均±SEM で示した (N=3)。B. nCDase 安定発現細胞における nCDase 発現量をウェスタンブロッティング法にて確認した。

引用) Zhang X. et al., FASEB J. 2021, 35(2): e21287.

考察

本章では、nCDase は C_{24:1}-セラミドの代謝を介して、卵巣がん細胞の葉状仮足形成を制御していることが明らかになった。すなわち、nCDase は抗運動性・抗転移性分子セラミドの分解を担っており、がん細胞の運動性の亢進に寄与していることが示唆された。細胞の葉状仮足形成に寄与しているのは、ゴルジ体ではなく細胞形質膜上に局在している nCDase である可能性がある。葉状仮足の形成は細胞形質膜上で生じていることから、細胞形質膜局在性 nCDase の活性が同膜でのセラミド量を調節していると考えられる。

漿液性腺がん由来の細胞株 SKOV3 において、葉状仮足の形成は PI3KC2β 依存的であり、セラミドが PI3KC2β 活性を阻害することで葉状仮足の形成が抑えられる(14)。しかしながら、どのセラミド分子種が関与しているかは不明であった。当研究の結果から、少なくとも C₁₆-, C₂₄-セラミド及び C_{24:1}-セラミド分子種が PI3KC2β 依存的な葉状仮足形成を抑える分子種であることが判明した。更に、内在性 C_{24:1}-セラミド量は nCDase の活性に規定されることも明らかになった。

次に、パブリックデータベースを利用して、卵巣がんにおける nCDase の関連性について調査した。TCGA による卵巣がん組織における nCDase 発現量と患者生存期間について解析した。患者群を nCDase 高発現群（全患者数の 50%）及び低発現群（全患者数の 50%）にグループ化した結果を図 16 に示した。その結果、nCDase 発現量の違いによる生存曲線への影響は認められなかった。更に、TCGA のデータを基に作成されたパブリックデータベース GEPIA を用いて、卵巣がん組織と正常組織における nCDase 発現量を比較した結果、両者間において nCDase 発現量は同程度であった（図 17）。急性骨髄性白血病（LAML）と正常な血液を比較した場合に、正常組織における nCDase 発現量が高くなっているが、その要因は不明である。

現在、短鎖 C₆-セラミドのナノリポソーム化製剤が開発されており、新たながん治療薬候補として臨床試験が進んでいる(85)(86,87)。依然としてセラミドの腫瘍生物学には不明な点が多く残されているが、この全容解明はセラミドを基盤にしたがん創薬の更なる発展に繋がると期待される。

以上の結果より、nCDase を阻害することでがん細胞の運動能を抑えられる可能性があり、nCDase は新たな転移性がんの創薬標的になることが期待される。

OV ASAH2 50:50

卵巣がん

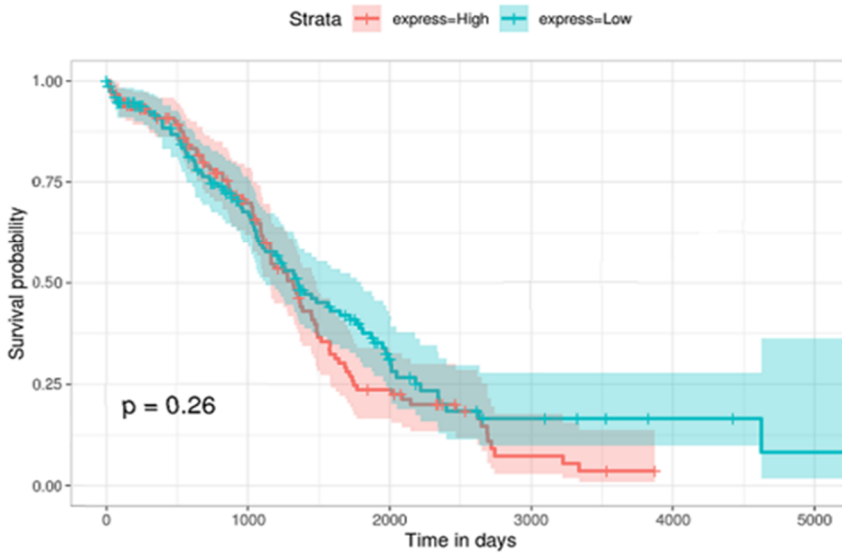


図 16 TCGA による nCDase 発現量と卵巣がん患者の生存期間との関連性.

TCGA のデータベースを利用した cBioPortal サイト (<https://www.cbioportal.org/>) より、卵巣がんにおける nCDase 遺伝子 (ASAH2) の高発現群 (全患者数の 50%) 及び低発現群 (全患者数の 50%) に分類し、生存曲線を作成した。

The gene expression profile across all tumor samples and paired normal tissues.(Bar plot)

The height of bar represents the median expression of certain tumor type or normal tissue.

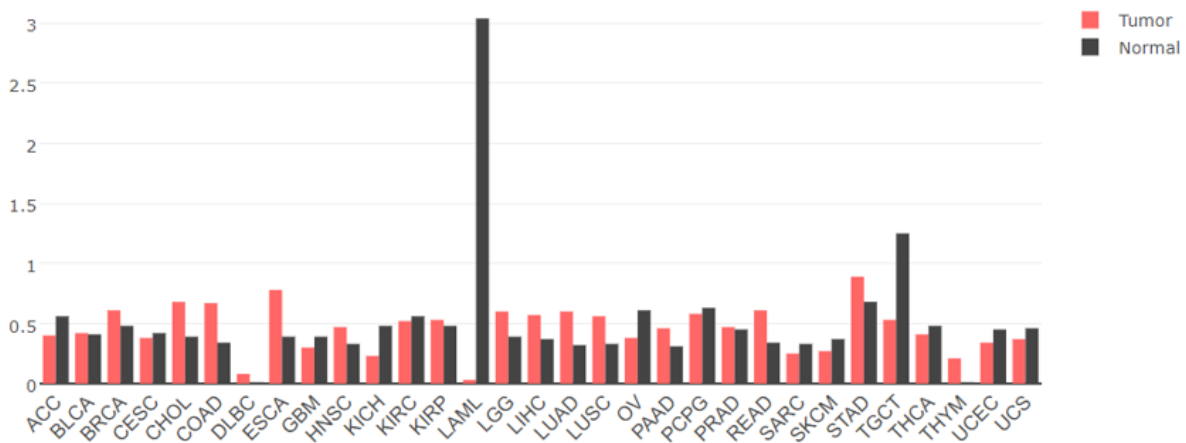


図 17 卵巣 (OV) の正常組織とがん組織における nCDase 発現量の比較.

TCGA のデータベースを基に作成されたデータベース GEPIA (<http://gepia.cancer-pku.cn/>) より、がん組織及び正常組織における nCDase 遺伝子 (ASAH2) の発現量を比較した。

小括

1. nCDase をノックダウンすると、卵巣がん細胞の葉状仮足形成が抑えられた。一方で、nCDase の強制発現により葉状仮足の形成は促進された。
2. nCDase をノックダウンすると、C_{24:1}-セラミド量が特異的に増加した。この C_{24:1}-セラミドを細胞に処置すると、葉状仮足形成は抑制された。

本研究により、nCDase 発現を制御することによって、C_{24:1}-セラミド代謝を介したがん細胞の葉状仮足形成に影響を及ぼすことが明らかになった。nCDase 阻害薬などのセラミド量を制御する薬物は、がん細胞の転移を抑制する作用を示す可能性がある。

総括

本研究の結果より、セラミドの代謝制御を司る nCDase は、細胞形質膜だけでなくゴルジ体にも局在していることが明らかになった。ゴルジ体に局在する nCDase は、外因性に処置した C₆-セラミドの代謝分解を促進し、C₆-セラミドの抗がん作用を妨げることを見いだした。更に、細胞形質膜上に局在する nCDase 阻害は、内因性セラミドの蓄積を介して、がん細胞の運動能の制御に関わる可能性が考えられた。これらの研究成果は、nCDase はがん治療薬の新たな創薬標的分子である可能性を示すものであり、セラミド代謝制御によるがん創薬の基盤構築につながると期待される。

謝辞

本論文をまとめるにあたり、御指導・御鞭撻を賜りました摂南大学・薬学部・薬効薬理学研究室 奈邊 健 教授及び 北谷 和之 准教授に、心から御礼申し上げます。また、多くのご助言を頂きました摂南大学・薬学部、伊藤 潔 教授、尾崎 清和 教授及び山岸 伸行 教授にも御礼申し上げます。

スフィンゴ脂質に関する研究に関しまして、留学先であります米国・ストニーブルック大学 Yusuf A. Hannun 教授 及び Lina Obeid 教授に御指導・御鞭撻を賜りました。厚く御礼申し上げます

また、実験手技、結果の考察につきまして、多くの御助言を頂きましたストニーブルック大学 Dr. Cungui Mao、Dr. Chiara Luberto、Dr. Daniel Canals、Dr. Christopher Clark、Dr. Michael Airola、Dr. Nicolas Coant、Dr. Monica Garcia-Barros、Dr. Justin Snider、Dr. Magali Trayssaca 及び Janet Allopenna に御礼申し上げます。

最後に、留学する機会を設けてくださった小野薬品工業株式会社に御礼申し上げます。

論文目録

1. “Ceramide synthase 2 - C_{24:1} - ceramide axis limits the metastatic potential of ovarian cancer cells”
Zhang X, **Sakamoto W**, Canals D, Ishibashi, M, Matsuda M, Nishida K, Toyoshima M, Shigeta S, Taniguchi M, Senkal CE, Okazaki T, Yaegashi N, Hannun YA, Nabe T, Kitatani K.
FASEB J. 2021, 35(2): e21287.
2. “Probing compartment-specific sphingolipids with targeted bacterial sphingomyelinases and ceramidases”
Sakamoto W, Canals D, Salamone S, Allopenna J, Clarke CL, Snider J, Obeid LM, Hannun YA.
J. Lipid Res. 2019, 60(11):1841-1850.
3. “Functions of neutral ceramidase in the Golgi apparatus”
Sakamoto W, Coant N, Canals D, Obeid LM, Hannun YA.
J. Lipid Res. 2018, 59(11): 2116-2125.

引用文献

1. Bartke, N., and Hannun, Y. A. (2009) Bioactive sphingolipids: metabolism and function. *J Lipid Res* **50 Suppl**, S91-96
2. Hannun, Y. A., and Obeid, L. M. (2008) Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 139-150
3. Huwiler, A., and Pfeilschifter, J. (2006) Altering the sphingosine-1-phosphate/ceramide balance: a promising approach for tumor therapy. *Curr Pharm Des* **12**, 4625-4635
4. Gangoiti, P., Camacho, L., Arana, L., Ouro, A., Granado, M. H., Brizuela, L., Casas, J., Fabriás, G., Abad, J. L., Delgado, A., and Gómez-Muñoz, A. (2010) Control of metabolism and signaling of simple bioactive sphingolipids: Implications in disease. *Prog Lipid Res* **49**, 316-334
5. Brinkmann, V. (2009) FTY720 (fingolimod) in Multiple Sclerosis: therapeutic effects in the immune and the central nervous system. *Br J Pharmacol* **158**, 1173-1182
6. Aburasayn, H., Al Batran, R., and Ussher, J. R. (2016) Targeting ceramide metabolism in obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **311**, E423-435
7. Filimoniuk, A., Blachnio-Zabielska, A., Imierska, M., Lebensztejn, D. M., and Daniluk, U. (2020) Sphingolipid Analysis Indicate Lactosylceramide as a Potential Biomarker of Inflammatory Bowel Disease in Children. *Biomolecules* **10**
8. El-Hindi, K., Brachtendorf, S., Hartel, J. C., Oertel, S., Birod, K., Trautmann, S., Thomas, D., Ulshöfer, T., Weigert, A., Utermöhlen, O., Krönke, M., and Grösch, S. (2020) Ceramide Synthase 5 Deficiency Aggravates Dextran Sodium Sulfate-Induced Colitis and Colon Carcinogenesis and Impairs T-Cell Activation. *Cancers (Basel)* **12**
9. Matsukawa, T., Izawa, K., Isobe, M., Takahashi, M., Maehara, A., Yamanishi, Y., Kaitani, A., Okumura, K., Teshima, T., Kitamura, T., and Kitaura, J. (2016) Ceramide-CD300f binding suppresses experimental colitis by inhibiting ATP-mediated mast cell activation. *Gut* **65**, 777-787
10. Kolesnick, R. (2002) The therapeutic potential of modulating the ceramide/sphingomyelin pathway. *J Clin Invest* **110**, 3-8
11. Huang, W. C., Chen, C. L., Lin, Y. S., and Lin, C. F. (2011) Apoptotic sphingolipid ceramide in cancer therapy. *J Lipids* **2011**, 565316
12. Pattingre, S., Bauvy, C., Levade, T., Levine, B., and Codogno, P. (2009) Ceramide-induced autophagy: to junk or to protect cells? *Autophagy* **5**, 558-560
13. Jung, J. H., Taniguchi, K., Lee, H. M., Lee, M. Y., Bandu, R., Komura, K., Lee, K. Y., Akao, Y., and Kim, K. P. (2020) Comparative lipidomics of 5-Fluorouracil-sensitive and -resistant colorectal cancer cells reveals altered sphingomyelin and ceramide controlled by acid sphingomyelinase (SMPD1). *Sci Rep* **10**, 6124

14. Kitatani, K., Usui, T., Sriraman, S. K., Toyoshima, M., Ishibashi, M., Shigeta, S., Nagase, S., Sakamoto, M., Ogiso, H., Okazaki, T., Hannun, Y. A., Torchilin, V. P., and Yaegashi, N. (2016) Ceramide limits phosphatidylinositol-3-kinase C2 β -controlled cell motility in ovarian cancer: potential of ceramide as a metastasis-suppressor lipid. *Oncogene* **35**, 2801-2812
15. Kester, M., Bassler, J., Fox, T. E., Carter, C. J., Davidson, J. A., and Parette, M. R. (2015) Preclinical development of a C6-ceramide NanoLiposome, a novel sphingolipid therapeutic. *Biol Chem* **396**, 737-747
16. Barth, B. M., Wang, W., Toran, P. T., Fox, T. E., Annageldiyev, C., Ondrasik, R. M., Keasey, N. R., Brown, T. J., Devine, V. G., Sullivan, E. C., Cote, A. L., Papakotsi, V., Tan, S. F., Shanmugavelandy, S. S., Deering, T. G., Needle, D. B., Stern, S. T., Zhu, J., Liao, J., Viny, A. D., Feith, D. J., Levine, R. L., Wang, H. G., Loughran, T. P., Jr., Sharma, A., Kester, M., and Claxton, D. F. (2019) Sphingolipid metabolism determines the therapeutic efficacy of nanoliposomal ceramide in acute myeloid leukemia. *Blood Adv* **3**, 2598-2603
17. Coant, N., Sakamoto, W., Mao, C., and Hannun, Y. A. (2017) Ceramidases, roles in sphingolipid metabolism and in health and disease. *Adv Biol Regul* **63**, 122-131
18. Kono, M., Dreier, J. L., Ellis, J. M., Allende, M. L., Kalkofen, D. N., Sanders, K. M., Bielawski, J., Bielawska, A., Hannun, Y. A., and Proia, R. L. (2006) Neutral ceramidase encoded by the Asah2 gene is essential for the intestinal degradation of sphingolipids. *J Biol Chem* **281**, 7324-7331
19. Coant, N., García-Barros, M., Zhang, Q., Obeid, L. M., and Hannun, Y. A. (2018) AKT as a key target for growth promoting functions of neutral ceramidase in colon cancer cells. *Oncogene* **37**, 3852-3863
20. García-Barros, M., Coant, N., Kawamori, T., Wada, M., Snider, A. J., Truman, J. P., Wu, B. X., Furuya, H., Clarke, C. J., Bialkowska, A. B., Ghaleb, A., Yang, V. W., Obeid, L. M., and Hannun, Y. A. (2016) Role of neutral ceramidase in colon cancer. *Faseb j* **30**, 4159-4171
21. Hannun, Y. A., and Obeid, L. M. (2011) Many ceramides. *J Biol Chem* **286**, 27855-27862
22. Levy, M., and Futerman, A. H. (2010) Mammalian ceramide synthases. *IUBMB Life* **62**, 347-356
23. Birbes, H., El Bawab, S., Hannun, Y. A., and Obeid, L. M. (2001) Selective hydrolysis of a mitochondrial pool of sphingomyelin induces apoptosis. *Faseb j* **15**, 2669-2679
24. Hernández-Corbacho, M. J., Salama, M. F., Canals, D., Senkal, C. E., and Obeid, L. M. (2017) Sphingolipids in mitochondria. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* **1862**, 56-68
25. Zeidan, Y. H., Jenkins, R. W., and Hannun, Y. A. (2008) Remodeling of cellular cytoskeleton by the acid sphingomyelinase/ceramide pathway. *J Cell Biol* **181**, 335-350
26. Kroesen, B. J., Jacobs, S., Pettus, B. J., Sietsma, H., Kok, J. W., Hannun, Y. A., and de Leij, L. F. (2003) BcR-induced apoptosis involves differential regulation of C16 and C24-ceramide formation and sphingolipid-dependent activation of the proteasome. *J Biol Chem* **278**, 14723-14731
27. Sentelle, R. D., Senkal, C. E., Jiang, W., Ponnusamy, S., Gencer, S., Selvam, S. P., Ramshesh, V. K.,

- Peterson, Y. K., Lemasters, J. J., Szulc, Z. M., Bielawski, J., and Ogretmen, B. (2012) Ceramide targets autophagosomes to mitochondria and induces lethal mitophagy. *Nat Chem Biol* **8**, 831-838
28. Osawa, Y., Uchinami, H., Bielawski, J., Schwabe, R. F., Hannun, Y. A., and Brenner, D. A. (2005) Roles for C16-ceramide and sphingosine 1-phosphate in regulating hepatocyte apoptosis in response to tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem* **280**, 27879-27887
29. Bras, J., Singleton, A., Cookson, M. R., and Hardy, J. (2008) Emerging pathways in genetic Parkinson's disease: Potential role of ceramide metabolism in Lewy body disease. *FEBS Journal* **275**, 5767-5773
30. Tomiuk, S., Hofmann, K., Nix, M., Zumbansen, M., and Stoffel, W. (1998) Cloned mammalian neutral sphingomyelinase: Functions in sphingolipid signaling? *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**, 3638-3643
31. Okino, N., Tani, M., Ito, M., and Imayama, S. (1998) Purification and Characterization of a Novel Ceramidase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 14368-14373
32. Zhang, P., Liu, B., Jenkins, G. M., Hannun, Y. A., and Obeid, L. M. (1997) Expression of neutral sphingomyelinase identifies a distinct pool of sphingomyelin involved in apoptosis. *J Biol Chem* **272**, 9609-9612
33. Wu, B. X., Snook, C. F., Tani, M., Büllsbach, E. E., and Hannun, Y. A. (2007) Large-scale purification and characterization of recombinant *Pseudomonas* ceramidase: regulation by calcium. *J Lipid Res* **48**, 600-608
34. Marchesini, N., Luberto, C., and Hannun, Y. A. (2003) Biochemical properties of mammalian neutral sphingomyelinase 2 and its role in sphingolipid metabolism. *J Biol Chem* **278**, 13775-13783
35. Casasampere, M., Camacho, L., Cingolani, F., Casas, J., Egado-Gabás, M., Abad, J. L., Bedía, C., Xu, R., Wang, K., Canals, D., Hannun, Y. A., Mao, C., and Fabrias, G. (2015) Activity of neutral and alkaline ceramidases on fluorogenic N-acylated coumarin-containing aminodiols. *J Lipid Res* **56**, 2019-2028
36. Gandy, K. A., Canals, D., Adada, M., Wada, M., Roddy, P., Snider, A. J., Hannun, Y. A., and Obeid, L. M. (2013) Sphingosine 1-phosphate induces filopodia formation through S1PR2 activation of ERM proteins. *Biochem J* **449**, 661-672
37. Bielawski, J., Pierce, J. S., Snider, J., Rembiesa, B., Szulc, Z. M., and Bielawska, A. (2010) Sphingolipid analysis by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). *Adv Exp Med Biol* **688**, 46-59
38. Bligh, E. G., and Dyer, W. J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* **37**, 911-917
39. Folch, J., Lees, M., and Sloane Stanley, G. H. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* **226**, 497-509

40. Albi, E., and Viola-Magni, M. P. (2003) Chromatin-associated sphingomyelin: metabolism in relation to cell function. *Cell Biochem Funct* **21**, 211-215
41. Fu, P., Ebenezer, D. L., Ha, A. W., Suryadevara, V., Harijith, A., and Natarajan, V. (2018) Nuclear lipid mediators: Role of nuclear sphingolipids and sphingosine-1-phosphate signaling in epigenetic regulation of inflammation and gene expression. *J Cell Biochem* **119**, 6337-6353
42. Turpin-Nolan, S. M., and Brüning, J. C. (2020) The role of ceramides in metabolic disorders: when size and localization matters. *Nat Rev Endocrinol* **16**, 224-233
43. Senchenkov, A., Litvak, D. A., and Cabot, M. C. (2001) Targeting ceramide metabolism--a strategy for overcoming drug resistance. *J Natl Cancer Inst* **93**, 347-357
44. Tani, M., Okino, N., Mori, K., Tanigawa, T., Izu, H., and Ito, M. (2000) Molecular cloning of the full-length cDNA encoding mouse neutral ceramidase. A novel but highly conserved gene family of neutral/alkaline ceramidases. *J Biol Chem* **275**, 11229-11234
45. Tada, S., Matsushita-Morita, M., Suzuki, S., Kusumoto, K., and Kashiwagi, Y. (2009) Characterization of a neutral ceramidase orthologue from *Aspergillus oryzae*. *FEMS Microbiol Lett* **298**, 157-165
46. Franzen, R., Pfeilschifter, J., and Huwiler, A. (2002) Nitric oxide induces neutral ceramidase degradation by the ubiquitin/proteasome complex in renal mesangial cell cultures. *FEBS Lett* **532**, 441-444
47. Franzen, R., Pautz, A., Bräutigam, L., Geisslinger, G., Pfeilschifter, J., and Huwiler, A. (2001) Interleukin-1beta induces chronic activation and de novo synthesis of neutral ceramidase in renal mesangial cells. *J Biol Chem* **276**, 35382-35389
48. Uchida, Y., Houben, E., Park, K., Douangpanya, S., Lee, Y. M., Wu, B. X., Hannun, Y. A., Radin, N. S., Elias, P. M., and Holleran, W. M. (2010) Hydrolytic pathway protects against ceramide-induced apoptosis in keratinocytes exposed to UVB. *J Invest Dermatol* **130**, 2472-2480
49. Wu, B. X., Zeidan, Y. H., and Hannun, Y. A. (2009) Downregulation of neutral ceramidase by gemcitabine: Implications for cell cycle regulation. *Biochim Biophys Acta* **1791**, 730-739
50. Sundaram, K., Mather, A. R., Marimuthu, S., Shah, P. P., Snider, A. J., Obeid, L. M., Hannun, Y. A., Beverly, L. J., and Siskind, L. J. (2016) Loss of neutral ceramidase protects cells from nutrient- and energy -deprivation-induced cell death. *Biochem J* **473**, 743-755
51. Tani, M., Igarashi, Y., and Ito, M. (2005) Involvement of neutral ceramidase in ceramide metabolism at the plasma membrane and in extracellular milieu. *J Biol Chem* **280**, 36592-36600
52. Snider, A. J., Wu, B. X., Jenkins, R. W., Sticca, J. A., Kawamori, T., Hannun, Y. A., and Obeid, L. M. (2012) Loss of neutral ceramidase increases inflammation in a mouse model of inflammatory bowel disease. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **99**, 124-130
53. Hu, W., Xu, R., Zhang, G., Jin, J., Szulc, Z. M., Bielawski, J., Hannun, Y. A., Obeid, L. M., and Mao,

- C. (2005) Golgi fragmentation is associated with ceramide-induced cellular effects. *Mol Biol Cell* **16**, 1555-1567
54. Novgorodov, S. A., Wu, B. X., Gudz, T. I., Bielawski, J., Ovchinnikova, T. V., Hannun, Y. A., and Obeid, L. M. (2011) Novel pathway of ceramide production in mitochondria: thioesterase and neutral ceramidase produce ceramide from sphingosine and acyl-CoA. *J Biol Chem* **286**, 25352-25362
55. Usta, J., El Bawab, S., Roddy, P., Szulc, Z. M., Yusuf, Hannun, A., and Bielawska, A. (2001) Structural requirements of ceramide and sphingosine based inhibitors of mitochondrial ceramidase. *Biochemistry* **40**, 9657-9668
56. Lipsky, N. G., and Pagano, R. E. (1985) A vital stain for the Golgi apparatus. *Science* **228**, 745-747
57. Gault, C. R., Obeid, L. M., and Hannun, Y. A. (2010) An overview of sphingolipid metabolism: from synthesis to breakdown. *Adv Exp Med Biol* **688**, 1-23
58. Kitatani, K., Idkowiak-Baldys, J., and Hannun, Y. A. (2008) The sphingolipid salvage pathway in ceramide metabolism and signaling. *Cell Signal* **20**, 1010-1018
59. Hanada, K., Kumagai, K., Yasuda, S., Miura, Y., Kawano, M., Fukasawa, M., and Nishijima, M. (2003) Molecular machinery for non-vesicular trafficking of ceramide. *Nature* **426**, 803-809
60. Hanada, K. (2006) Discovery of the molecular machinery CERT for endoplasmic reticulum-to-Golgi trafficking of ceramide. *Mol Cell Biochem* **286**, 23-31
61. Mukherjee, S., Chiu, R., Leung, S. M., and Shields, D. (2007) Fragmentation of the Golgi apparatus: an early apoptotic event independent of the cytoskeleton. *Traffic* **8**, 369-378
62. Flowers, M., Fabriás, G., Delgado, A., Casas, J., Abad, J. L., and Cabot, M. C. (2012) C6-ceramide and targeted inhibition of acid ceramidase induce synergistic decreases in breast cancer cell growth. *Breast Cancer Res Treat* **133**, 447-458
63. Turner, L. S., Cheng, J. C., Beckham, T. H., Keane, T. E., Norris, J. S., and Liu, X. (2011) Autophagy is increased in prostate cancer cells overexpressing acid ceramidase and enhances resistance to C6 ceramide. *Prostate Cancer Prostatic Dis* **14**, 30-37
64. Hofmann, K., Tomiuk, S., Wolff, G., and Stoffel, W. (2000) Cloning and characterization of the mammalian brain-specific, Mg²⁺-dependent neutral sphingomyelinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 5895-5900
65. Sun, W., Jin, J., Xu, R., Hu, W., Szulc, Z. M., Bielawski, J., Obeid, L. M., and Mao, C. (2010) Substrate specificity, membrane topology, and activity regulation of human alkaline ceramidase 2 (ACER2). *J Biol Chem* **285**, 8995-9007
66. Mao, C., Xu, R., Szulc, Z. M., Bielawska, A., Galadari, S. H., and Obeid, L. M. (2001) Cloning and characterization of a novel human alkaline ceramidase. A mammalian enzyme that hydrolyzes phytoceramide. *J Biol Chem* **276**, 26577-26588
67. Hwang, Y. H., Tani, M., Nakagawa, T., Okino, N., and Ito, M. (2005) Subcellular localization of

- human neutral ceramidase expressed in HEK293 cells. *Biochem Biophys Res Commun* **331**, 37-42
68. Kurman, R. J., and Shih Ie, M. (2011) Molecular pathogenesis and extraovarian origin of epithelial ovarian cancer--shifting the paradigm. *Hum Pathol* **42**, 918-931
 69. Dziadkowiec, K. N., Gąsiorowska, E., Nowak-Markwitz, E., and Jankowska, A. (2016) PARP inhibitors: review of mechanisms of action and BRCA1/2 mutation targeting. *Prz Menopauzalny* **15**, 215-219
 70. Yamazaki, D., Kurisu, S., and Takenawa, T. (2005) Regulation of cancer cell motility through actin reorganization. *Cancer Sci* **96**, 379-386
 71. Olson, M. F., and Sahai, E. (2009) The actin cytoskeleton in cancer cell motility. *Clin Exp Metastasis* **26**, 273-287
 72. Wells, A., Grahovac, J., Wheeler, S., Ma, B., and Lauffenburger, D. (2013) Targeting tumor cell motility as a strategy against invasion and metastasis. *Trends Pharmacol Sci* **34**, 283-289
 73. Hannun, Y. A. (1996) Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress. *Science* **274**, 1855-1859
 74. Ogretmen, B., and Hannun, Y. A. (2004) Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment. *Nat Rev Cancer* **4**, 604-616
 75. Kester, M., and Kolesnick, R. (2003) Sphingolipids as therapeutics. *Pharmacol Res* **47**, 365-371
 76. Morad, S. A., and Cabot, M. C. (2013) Ceramide-orchestrated signalling in cancer cells. *Nat Rev Cancer* **13**, 51-65
 77. Maffucci, T., Cooke, F. T., Foster, F. M., Traer, C. J., Fry, M. J., and Falasca, M. (2005) Class II phosphoinositide 3-kinase defines a novel signaling pathway in cell migration. *J Cell Biol* **169**, 789-799
 78. Gulluni, F., De Santis, M. C., Margaria, J. P., Martini, M., and Hirsch, E. (2019) Class II PI3K Functions in Cell Biology and Disease. *Trends Cell Biol* **29**, 339-359
 79. Zhang, Y., Wang, H., Chen, T., Wang, H., Liang, X., Zhang, Y., Duan, J., Qian, S., Qiao, K., Zhang, L., Liu, Y., and Wang, J. (2021) C24-Ceramide Drives Gallbladder Cancer Progression Through Directly Targeting Phosphatidylinositol 5-Phosphate 4-Kinase Type-2 Gamma to Facilitate Mammalian Target of Rapamycin Signaling Activation. *Hepatology* **73**, 692-712
 80. Schwalm, S., Erhardt, M., Römer, I., Pfeilschifter, J., Zangemeister-Wittke, U., and Huwiler, A. (2020) Ceramide Kinase Is Upregulated in Metastatic Breast Cancer Cells and Contributes to Migration and Invasion by Activation of PI 3-Kinase and Akt. *Int J Mol Sci* **21**
 81. Zheng, K., Chen, Z., Feng, H., Chen, Y., Zhang, C., Yu, J., Luo, Y., Zhao, L., Jiang, X., and Shi, F. (2019) Sphingomyelin synthase 2 promotes an aggressive breast cancer phenotype by disrupting the homeostasis of ceramide and sphingomyelin. *Cell Death Dis* **10**, 157
 82. Gencer, S., Oleinik, N., Kim, J., Panneer Selvam, S., De Palma, R., Dany, M., Nganga, R., Thomas,

- R. J., Senkal, C. E., Howe, P. H., and Ogretmen, B. (2017) TGF- β receptor I/II trafficking and signaling at primary cilia are inhibited by ceramide to attenuate cell migration and tumor metastasis. *Sci Signal* **10**
83. Suzuki, M., Cao, K., Kato, S., Mizutani, N., Tanaka, K., Arima, C., Tai, M. C., Nakatani, N., Yanagisawa, K., Takeuchi, T., Shi, H., Mizutani, Y., Niimi, A., Taniguchi, T., Fukui, T., Yokoi, K., Wakahara, K., Hasegawa, Y., Mizutani, Y., Iwaki, S., Fujii, S., Satou, A., Tamiya-Koizumi, K., Murate, T., Kyogashima, M., Tomida, S., and Takahashi, T. (2020) CERS6 required for cell migration and metastasis in lung cancer. *J Cell Mol Med* **24**, 11949-11959
84. Zhang, P., Fu, C., Hu, Y., Dong, C., Song, Y., and Song, E. (2015) C6-ceramide nanoliposome suppresses tumor metastasis by eliciting PI3K and PKC ζ tumor-suppressive activities and regulating integrin affinity modulation. *Sci Rep* **5**, 9275
85. van Vlerken, L. E., Duan, Z., Seiden, M. V., and Amiji, M. M. (2007) Modulation of intracellular ceramide using polymeric nanoparticles to overcome multidrug resistance in cancer. *Cancer Res* **67**, 4843-4850
86. Watters, R. J., Fox, T. E., Tan, S. F., Shanmugavelandy, S., Choby, J. E., Broeg, K., Liao, J., Kester, M., Cabot, M. C., Loughran, T. P., and Liu, X. (2013) Targeting glucosylceramide synthase synergizes with C6-ceramide nanoliposomes to induce apoptosis in natural killer cell leukemia. *Leuk Lymphoma* **54**, 1288-1296
87. Tagaram, H. R., Divittore, N. A., Barth, B. M., Kaiser, J. M., Avella, D., Kimchi, E. T., Jiang, Y., Isom, H. C., Kester, M., and Staveley-O'Carroll, K. F. (2011) Nanoliposomal ceramide prevents in vivo growth of hepatocellular carcinoma. *Gut* **60**, 695-701