

別紙 1

博士論文要旨

論文題目 : スフィンゴ脂質代謝酵素中性セラミダーゼの機能と
創薬標的としての可能性

申請者 坂本 渉

研究分野 腫瘍生物学

紹介教授 奈邊 健

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 はがん細胞の運動能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 C24:1-セラミド分子種が細胞内に蓄積した。これらの結果から、C24:1-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、C24:1-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 C24:1-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。