

学位論文審査の要旨

申請者は、複数のスフィンゴ脂質代謝酵素の発現ベクターを開発し、酵素を発現した細胞内外のセラミド量変化を明らかにすると同時に、抗がん剤候補である C6-セラミド（膜透過性の短鎖セラミド）によるセラミド代謝の変化と抗腫瘍活性及びがん転移に関わる細胞の運動性について検討し、中性セラミダーゼがセラミド代謝制御を基盤としたがん治療薬の標的分子である可能性を示した。以下に本学位論文の審査結果を示す。

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る。セラミドはスフィンゴシンと脂肪酸がアミド結合した脂質の総称で、ヒトの主要なスフィンゴ脂質であるスフィンゴミエリンから、スフィンゴミエリナーゼによる加水分解でホスホリルコリンが除かれて合成される経路と、スフィンゴイド塩基をセラミド合成酵素がアシル化して合成する経路が存在する。生成したセラミドには、細胞増殖、血管形成、神経機能及び炎症の制御など多様な生物活性を有することが報告されており、種々のセラミダーゼによる加水分解を受けて代謝される。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する腫瘍性分子とも考えられ、スフィンゴ脂質代謝の破綻は、がんを含む様々な疾患を引き起こすと考えられている。本学位論文では、細胞傷害性とがん転移抑制に着目して、中性セラミダーゼの新たな抗がん薬の標的としての可能性について検討している。

申請者は、まず第 1 章において、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、細菌性の 2 種類の酵素、スフィンゴミエリナーゼとセラミダーゼ（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発現ベクターを構築し、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、それぞれの酵素は、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を確認した。細胞小器官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おり、細胞形質内膜においては C14-C18 の分子種、核またはミトコンドリアでは C14-C22 及び C24:1-の分子種、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スフィンゴ脂質の存在比が多い可能性を示した。以下に述べるように、開発した発現ベクターは、スフィンゴ脂質研究の有用なツールとしても活用した。

大腸発がんモデルでは中性セラミダーゼ（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。第2章において申請者は、大腸組織に高発現することが知られる 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。また、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抗がん剤候補 C6-セラミドの細胞障害性が、nCDase 安定発現細胞においては減弱されることを見出した。そこで、第1章で作製した細菌性酵素（bCDase）をゴルジ体標的型及び細胞質標的型に強制発現させたところ、ゴルジ体標的型 bCDase を発現させた細胞でのみ、C6-セラミドによるゴルジ体の断片化が抑えられたことから、ゴルジ体局在性 nCDase が 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を明らかにした。すなわち、ゴルジ体局在型 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。

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。第3章において申請者は、SKOV3 卵巣がん細胞の nCDase をロックダウンし、細胞膜局在性 nCDase ががん細胞の運動性の制御に関与している可能性を、細胞形質膜における葉状仮足（細胞運動方向に形成される突起）の形成を指標に検討した。その結果、葉状仮足の形成が抑制され、内因性の C24:1-セラミド分子種が細胞内に蓄積することを確認した。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された。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と考えられ、nCDase 阻害剤が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を示した。

以上、申請者は、細胞小器官特異的に発現可能な細菌性のスフィンゴミエリナーゼとセラミダーゼの発現ベクターを開発することによって、細胞内小器官のスフィンゴ脂質分子種の特徴を明らかにした。さらに、ヒト大腸がん細胞株においては、ゴルジ局在型中性セラミダーゼの阻害が抗がん剤候補である C6-セラミドの抗腫瘍効果を増強し、ヒト卵巣がん細胞株においては、細胞膜局在型中性セラミダーゼの阻害が転移抑制につながる可能性を示した。セラミド及び合成セラミド誘導体には多様な生理活性の可能性があり、本論文は、セラミド代謝酵素の創薬標的としての可能性を示したものとして意義がある。このような観点から、本論文は博士（薬学）の学位論文として十分にふさわしいものと認定した。