

対象研究テーマ：in vitro がん幹細胞モデル系の開発に関する研究

研究期間：2012年4月1日～2013年3月31日

研究題目：Rb遺伝子欠損マウスでの腺癌発症機構におけるスフィンゴ脂質代謝調節を介した細胞周期制御の解明

研究代表者：金沢医科大学血液免疫内科学 教授 岡崎俊朗

研究成果の概要：

Rb遺伝子欠損マウスにおいて効率的に甲状腺癌が発症するモデルを作成でき、マウス腫瘍発生モデルとして、このマウスの系にSMS1欠損マウスを掛け合わせることが可能となった。セラミドの増加は、細胞周期上の重要因子であるP21のCDK2との結合や、CDK2の脱リン酸化を促進することが知られているため、Rb遺伝子欠損マウスの系を用いて、SMS欠損によるセラミド、SM制御がRb欠損によるE2Fの活性化の下流シグナルであるサイクリンA、EやCDK2にどのように影響するかについて検討し、悪性腫瘍の細胞周期調節破綻に基づく細胞増生に対するスフィンゴ脂質代謝調節の意義について研究した。

研究分野：脂質生物学 脂質腫瘍学

キーワード：スフィンゴ脂質 発癌機構

### 1. 研究開始当初の背景

スフィンゴ脂質セラミドが細胞死誘導脂質として、細胞膜の解剖学的成分として機能するのみでなく細胞機能を制御するメディエーターであることを報告した(Okazaki T. et al. *J. Biol. Chem.*, 264: 19076-19080, 1989)。スフィンゴ脂質セラミドの調節機構として産生系であるスフィンゴミエリン(SM)加水分解酵素スフィンゴミエリナーゼ(SMase)そして代謝系であるSM産生酵素(SMS)とグルコシルセラミド産生酵素(GCS)が知られており、これらを介したセラミド・シグナル制御機構を“セラミド・バイオスタット”と呼んでいる。様々な細胞死誘導刺激によってSMaseの活性化とSMSの抑制が誘導され、セラミドが増加することで細胞死が惹き起こされることが知られ、申請者は、初めてSMSの遺伝子クローニングに成功した(Okazaki T. et al. *J. Biol. Chem.*, 279, 18688-93, 2004)。これまで、SMSの機能制御の解析により腫瘍細胞の生死におけるセラミドの意義を明らかにする研究を進めて来たが、最近、膜マイクロドメインでのSMの機能制御が細

胞増殖を調整することが明らかにされ、セラミドのみならずSMの制御機構としてSMSが注目されている。

### 2. 研究の目的

Rb遺伝子欠損マウスにおいて効率的に甲状腺癌が発症するモデルを作成でき、マウス腫瘍発生モデルとして、このマウスの系にSMS1欠損マウスを掛け合わせることが可能となった。セラミドの増加は、細胞周期上の重要因子であるP21のCDK2との結合や、CDK2の脱リン酸化を促進することが知られている(Exp Cell Res. 2000 Dec 15;261(2):303-11)。したがって、このRb遺伝子欠損マウスの系を用いて、SMS欠損によるセラミド、SM制御がRb欠損によるE2Fの活性化の下流シグナルであるサイクリンA、EやCDK2にどのように影響するかについて検討し、悪性腫瘍の細胞周期調節破綻に基づく細胞増生に対するスフィンゴ脂質代謝調節の意義について研究する。

### 3. 研究の方法

(1) SMS1-KOマウスとRb-KOのダブルKOマウスの作成とRb欠損腺癌発症における

SMS欠損によるセラミド産生増強の影響を腺癌細胞のサイズ、マウス生存率によって検討  
 高橋らは、Rb ヘテロ型マウスに生じる甲状腺C細胞腺腫が、野生型 N-ras 遺伝子座の欠落によって、高度に悪性化するという観察 (Takahashi et al., *Nature Genetics* 38: 118-123 2006)をヒントに、Rb 不活性化によって誘導される腫瘍の悪性化が、細胞老化とDNA 損傷応答によって拮抗されることを見いだした (Shamma et al., *Cancer Cell* 15: 255-269, 2009)。Rb ヘテロ型 p16/Ink4a ホモ型マウス、Rbヘテロ型 ATM ホモ型欠損マウスともに、やはり悪性度の高い甲状腺C細胞腺がんを生じる(Shamma ら投稿準備中)。昨年、マウス Rb 遺伝子 cDNA 内にネオマイシン耐性遺伝子(neo)を挿入した Rb ノックアウトマウスを作成して、ホモ型欠損が高頻度に甲状腺腺癌を発症することを確認した。岡崎らのグループは、スフィンゴミエリン (SM) を産生しない変異細胞株 WR19L 細胞を用いてスフィンゴミエリン産生酵素 (SMS) 1, 2 を遺伝子クローニングし、SMS 遺伝子 1, 2 を欠損した SMS1,2-KO マウスを作成した。SMS 1, 2 KO マウスと Rb 欠損マウスの交配によるダブル KO マウスの作製が、金沢大学がん研究所学際科学実験センター実験動物施設角間分室で、高橋の管理の下に進行中である。甲状腺腺癌発生に与える SMS 欠損の影響に対する検討は、ダブル KO マウスの全生存率と甲状腺、脾臓、胸腺、骨髄などの腫瘍細胞増生の解析と免疫担当 M1 マクロファージの活性化や腫瘍関連 M2 マクロファージ (TAM) の抑制を FACS にて測定することで試行する。

(2) Rb 欠損細胞株と Rb-KO マウス由来 ME F における SMS 制御による Rb の下流シグナルである細胞周期関連分子の制御の検討  
 (i) Rb 欠損株甲状腺C細胞や ME F において Rb 関連シグナル分子である CDK 2 の活性化をヒストン H1 を基質にしたキナーゼアッセイ法で、サイクリン A, E の変化をウエスタンブロットニング方で検討する。  
 (ii) siRNA にて阻害した SMS が Rb 欠損細胞株または SMS-KO とのダブル KO マウス由来 ME F で CDK 2, サイクリン A, E の活性化を抑制するかについて検討する。

#### 4. 研究成果

SMS 1-KO マウスと Rb-KO のダブル KO マウスの作成と Rb 欠損腺癌発症における

SMS 欠損によるセラミド産生増強の影響を腺癌細胞のサイズ、マウス生存率によって検討するために、ダブル KO マウスの作成を行っているが、現時点では KO マウスの作成が十分でなく、更なる検討のために SMS 1 fl/fl マウスを作成し、現在順調に育成されている。Rb 欠損細胞株と Rb-KO マウス由来 ME F における SMS 制御による Rb の下流シグナルである細胞周期関連分子の制御の検討については、それぞれで、G1/O における細胞周期の停滞が生じており、CDK 2, サイクリン A, E の制御について解析が進行している。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

1. Masato Yano, Tadashi Yamamoto<sup>1</sup>, Naotaka Nishimura, Tomomi Gotoh, Ken Watanabe, Kazutaka Ikeda, Yohei Garan, Ryo Taguchi, Koichi Node, Toshiro Okazaki and Yuichi Oike. Increased Oxidative Stress Impairs Adipose Tissue Function in Sphingomyelin Synthase 1 Null Mice. *Plos One* 7, in press 2013
2. Elodie Lafont, Kazuyuki Kitatani, Toshiro Okazaki and Bruno, Ségui Sphingomyelin Biosynthesis Modulates Cancer Cell Death and Growth *Topics in Anti-Cancer Research*, 454-481, 2012
3. Takafumi Kawanami, Toshioki Sawaki, Tomoyuki Sakai, Miyuki Miki, Haruka Iwao, Akio Nakajima, Takuji Nakamura, Tomomi Sato, Yoshimasa Fujita, Masao Tanaka, Yasufumi Masaki, Toshihiro Fukushima, Yuko Hirose, Makoto Taniguchi, Naotoshi Sugimoto, Toshiro Okazaki, Hisanori Umehara. Skewed Production of IL-6 and TGF $\beta$  by Cultured Salivary Gland Epithelial Cells from Patients with Sjögren's Syndrome *Plos One* 7, Issue 10, e45689, October 2012
4. Zama K., Mitsutake S., Watanabe K, Okazaki T., Igarashi Y., A sensitive cell-based method to screen for selective inhibitors of SMS1 or SMS2 using HPLC and a fluorescent substrate *Chem. Physic. Lipids*: 167(7), 760-768, 2012
5. Makoto Taniguchi, Kazuyuki Kitatani, Tadakazu Kondo, Mayumi Hashimoto,

- Satoshi Asano, Akira Hayashi, Susumu Mitsutake, Yasuyuki Igarashi, Hisanori Umehara, Hiroyuki Takeya, Junzo Kigawa, and **Toshiro Okazaki**. Regulation of autophagy and its associated cell death by sphingolipid rheostat: reciprocal role of ceramide and sphingosine-1-phosphate in the mTOR pathway *J. Biol. Chem.*, 287(47): 39898-39910, 2012
6. N. Sugimoto, O. Shido, K. Matsuzaki, T. Ohno-Shosaku, Y. Hitomi, M. Tanaka, T. Sawaki, Y. Fujita, T. Kawanami, Y. Masaki, **T. Okazaki**, H. Nakamura, S. Koizumi, A. Yachie, H. Umehara. Cellular heat acclimation regulates cell growth, cell morphology, mitogen-activated protein kinase activation, and expression of aquaporins in mouse fibroblast cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 30(2): 450-7, 2012
  7. Mei-Hong Lu, Makoto Takemoto, Ken Watanabe, Huan Luo, Masataka Nishimura, Masato Yano, Hidekazu Tomimoto, **Toshiro Okazaki**, Yuichi Oike and Wen-Jie. Song Deficiency of sphingomyelin synthase-1 but not sphingomyelin synthase-2 causes hearing impairments in mice. *J. Physiology* 2012 May 28. [Epub ahead of print]
  8. Elodie Lafont, Romain Dupont, Nathalie Andrieu-Abadie, **Toshiro Okazaki**, Klaus Schulze-Osthoff, Thierry Levade, Hervé Benoist and Bruno Ségui Ordering of ceramide formation and caspase-9 activation in CD95L-induced Jurkat leukemia T cell apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta-Lipid* 1821(4): 684-93, 2012
  9. L. Dong, K. Watanabe, M. Itoh, C-R. Huan, X-P. Tong, T. Nakamura, M. Miki, H. Iwao, A. Nakajima, T. Sakai, T. Kawanami, T. Sawaki, Y. Masaki, T. Fukushima, Y. Fujita, M. Tanaka, M. Yano, **T. Okazaki** and H. Umehara CD4+ T cell dysfunctions through the impaired lipid rafts ameliorate concanavalin A-induced hepatitis in sphingomyelin synthase 1-knockout mice. *Inter Immunol.* 24: 327-337, 2012
  10. S. Asano, K. Kitatani, M. Taniguchi, M. Hashimoto, K. Zama, S. Mitsutake, Y. Igarashi, M. Takeya, R. Kigawa, A. Hayashi, H. Umehara and **T. Okazaki** Regulation of Cell Migration by Sphingomyelin Synthases: Sphingomyelin in Lipid Rafts Decreases Responsiveness to Signaling by the CXCL12/CXCR4 Pathway. *Molecular and Cell Biology*, 32(16):3242-52, 2012
- [学会発表] (計 5 件)
1. **Okazaki T.**, Mutual function of S1P with ceramide in autophagic cell death through mTOR, Niseko, Hokkaido Japan, 4-9 August, 2013 (invited)
  2. **Okazaki T.**, The mechanisms to overcome cell resistance by sphingolipids, Golf of Seilh, Toulouse France, 6-7 May, 2013 (invited)
  3. **Okazaki T.**, Thrombocytopenia caused by sphingomyelin synthase 1 (SMS1) deficiency in mice, EMBO Molecular Medicine Workshop, Ramot, Sea of Galilee Israel, 16 - 21 October, 2012 (invited)
  4. **Okazaki T.**, Sphingosine-1-phosphate/S1P3 counteracts ceramide-induced autophagy-associated cell death through mTOR pathway in leukemia cells ICBL, Banff Canada, Sept 2012
  5. **Okazaki T.** Hot Topics in Sphingolipid metabolism, Renaissance. Gordon Conference, Glycolipid and sphingolipid, II Ciocco Resort Lucca (Barga), Italy April 22-27, 2012 (discussion leader)

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

金沢医科大学血液免疫内科学・教授

岡崎俊朗

### (2) 研究分担者

金沢医科大学血液免疫内科・大学院生

Lusi Oka Wardhani

### (3) 本研究所担当者

腫瘍分子生物学・教授 高橋智聡