



Title	口腔扁平上皮癌細胞におけるsphingosine kinase 1阻害薬によるオートファジー誘導に関する研究
Author(s)	亀山, 裕泰
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/61677
rights	© The Authors 2017. This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

学 位 論 文

「口腔扁平上皮癌細胞における
sphingosine kinase 1 阻害薬による
オートファジー誘導に関する研究」

大阪大学大学院歯学研究科
統合機能口腔科学専攻 顎口腔病因病態制御学講座
口腔外科学第二教室

亀山 裕泰

緒 言

スフィンゴ脂質はスフィンゴ塩基を基本構造にもつ脂質の総称で、多くは細胞膜に存在しており、細胞構造の支持、防御障壁、細胞外タンパク質の接着といった形質膜上の構成分子としてのみならず、細胞死、増殖、分化などを制御する細胞内シグナル分子として機能している。代表的なスフィンゴ脂質として、スフィンゴシン sphingosine, セラミド ceramide, 複合スフィンゴ糖脂質, スフィンゴシン-1-リン酸 sphingosine-1-phosphate (S1P), セラミド-1-リン酸, スフィンゴミエリン sphingomyelin などがある。恒常的に生成されるセラミドは、細胞膜のスフィンゴミエリンからスフィンゴミエリナーゼ sphingomyelinase (SMase) の作用やデヒドロセラミド dehydroceramide を経由する *de novo* 合成経路により生成され、スフィンゴ糖脂質やスフィンゴミエリン合成の基質として用いられる。また、セラミドからセラミダーゼ ceramidase の作用により生成するスフィンゴシンは、スフィンゴ脂質の異化代謝の中心的分子であり、スフィンゴシンキナーゼ sphingosine kinase (SphK) の働きにより S1P へと変換される (図 1A) ^{1,2)}。なお、ヒトでは 2 種のアイソザイム SphK1 および SphK2 の存在が明らかにされている。

S1P は当初スフィンゴシンが代謝される過程の中間産物と考えられていたが、細胞増殖を制御し、プログラム細胞死を抑制する作用が明らか

にされ、シグナル伝達物質として注目を集めるようになった。そして、S1Pは細胞内シグナル伝達経路を介してだけでなく、オートクライン経路を含む2経路で働くことも明らかとなった。細胞内でS1Pは細胞の増殖と細胞の生存に働き、一方、細胞外に放出されたS1PはGタンパク共役型受容体である5種類のS1P受容体(S1PRs)に結合し、Rac, phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), adenylyl cyclase-cyclic AMP (AC), extracellular signal-regulated kinase (ERK), phospholipase C (PLC), Rho, Jun amino terminal kinase (JNK)などを介して、その多彩な生理機能を発揮する¹⁾。S1Pは細胞内外のシグナル分子として、細胞増殖や細胞生存、リンパ球トラフィッキング、血管新生や炎症等の細胞学的小よび生理学的な反応を司っている(図1B)³⁾。さらに、発癌や癌の進展および癌細胞における薬剤耐性や放射線耐性に関与することが報告され^{4,5)}、アポトーシスの阻害や細胞増殖、形質転換、血管新生、炎症等の増強によって、癌を増悪させることが示されている^{4,6,7)}。

S1P産生酵素の1つであるSphK1は主に細胞質基質に局在し、S1Pの主要な産生酵素として機能しており、上皮成長因子(EGF)やインスリン様成長因子1、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)などによって活性化される⁸⁾。さらに、活性化に伴いリン酸化され、細胞膜近傍へのトランスロケーションを生じる。SphK1は癌遺伝子の1つと考えられており、頭頸部癌を含む多くの癌において高発現していることが報告されている^{4,9-15)}。また、SphK1の薬物による阻害やSphK1遺伝子のノック

ダウンによって、様々な種類の癌の増殖を抑制することも知られている⁴⁾。頭頸部癌においても SphK1 は発癌や浸潤、転移、放射線増感作用に重要な役割を果たすとされ¹⁶⁻¹⁹⁾、癌治療における分子標的と考えられている。一方で、SphK2 の頭頸部癌での働きはまだ明らかにされていない。

オートファジーは細胞内でのタンパク分解系で、細胞順応における細胞構造のリモデリングや、劣化した細胞の細胞質成分のリサイクリングなどの生理反応に関与することが明らかにされている²⁰⁻²²⁾。オートファジー経路では、PI3K, Akt, mammalian target of rapamycin (mTOR) が主要な因子として働く²³⁾。正常時は増殖因子からのシグナルが mTOR に収束されて、細胞増殖、タンパク合成、オートファジーの抑制が行われているが、薬物や栄養欠乏によってこのシグナル伝達経路が遮断されるとオートファジーが誘導される。まず、細胞質において二重膜構造のファゴソームが形成され、これが延長するとともに microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) が動員されてオートファゴソームが形成され、その後リソソームと結合してオートリソソームとなり、内包物が分解されて細胞内で再利用される²⁴⁾。これらの過程により、オートファジーは栄養欠乏時の細胞生存に働いていると考えられている。一方で、近年オートファジーを伴う細胞死 autophagic cell death の存在が明らかにされている²⁵⁻²⁷⁾。したがって、オートファジーが細胞生存と細胞死のいずれにも関わるという新たな概念から、癌細胞におけるオートファジーの役割の解明は新たな癌治療戦略に大きく

貢献することとして注目されている。

L-Threo-dihydrospingosine (safingol) は発癌プロモーターであるホルボールエステルの受容体である protein kinase C (PKC) の阻害薬として開発された薬物で、頭頸部癌を含む固形癌に対して、シスプラチンとの併用による臨床研究では phase I の段階にある²⁸⁻³⁰⁾。Safingol はヒト口腔扁平上皮癌 squamous cell carcinoma (SCC) 細胞において、カスパーゼ非依存的にアポトーシスを誘導し、ミトコンドリアから細胞質へ放出された endonuclease G (endoG) が核に移行して DNA を切断すること^{31,32)}、ミトコンドリアの膜電位の低下には活性酸素種 reactive oxygen species (ROS) が関与することが明らかとされている^{33,34)}。また、safingol がヒト乳腺癌細胞、ヒト大腸腺癌細胞およびヒト口腔 SCC 細胞において、オートファジーを誘導することが報告されている^{33,35)}。さらに、safingol は、SphK1 阻害薬として作用することが見い出され、臨床研究が進められている³⁶⁻³⁸⁾。

Safingol に加えて、従来より SphK1 阻害作用をもつ薬物として *N,N*-dimethyl-D-erythro-sphingosine (DMS) などが知られていたが^{30,39)}、SphK1 に対して選択性の高い阻害薬として、2012 年に PF-543 が発表された⁴⁰⁾。これまで、PF-543 の細胞増殖抑制効果については不明であったが、最近、大腸癌に対する、PF-543 のネクローシス誘導作用が報告された⁴¹⁾。SphK は口腔癌の増殖や転移においても重要な役割を果たし、その阻害が抗腫瘍効果に繋がる可能性がある。そこで、本研

究では、PKC ならびに SphK1 阻害作用のある safinol での口腔癌細胞に対する先行研究を踏まえて、SphK1 阻害薬として開発された PF-543 のヒト口腔 SCC 細胞に対する抗腫瘍効果とまだ明らかにされていないオートファジー誘導能について検討を行った。

実験材料と方法

1. 試薬

SphK1 阻害薬として PF-543 は Merck KGaA (Darmstadt, Germany) より購入した。オートファジー阻害薬として wortmannin, 3-methyladenine (3-MA), bafilomycin A1 は Sigma- Aldrich (St. Louis, MO, USA) より購入した。抗酸化薬として *N*-acetyl-L-cysteine (NAC) は Wako (Osaka) より購入した。

2. 細胞と培養方法

実験には 3 種類のヒト口腔 SCC 細胞由来の細胞株 Ca9-22 細胞, HSC-3 細胞, SAS 細胞を用いた⁴²⁻⁴⁴⁾。Ca9-22 細胞は Japanese Collection of Research Bioresources (Tokyo) から購入した。HSC-3 細胞および SAS 細胞は Riken Bioresource Center (Tsukuba) から購入した。各細胞株は, 5% 牛胎児血清 (FBS), 4 mM L-glutamine, 100 µg/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin を含む Dulbecco 変法 Eagle 培地 (DMEM : Nissui, Tokyo) を用い, 37°C, 5% CO₂ 培養器中で培養した。また, 培養細胞の形態は, PF-543 で処置し, 72 時間培養した後位相差顕微鏡 (OLYMPUS, Tokyo) を用いて観察した。

3. イムノブロット法

細胞を PBS で洗浄後, 20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 1% protease inhibitor cocktail 含有のバッファーに溶解した。氷上でソニケーター (TOMY, Tokyo) を用いて細胞を粉碎後, 4°C, 15,000×g で 5 分間遠心し, 上清を回収した。タンパク質の定量には DC protein assay Kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を用いた。検体を 0.125 M Tris-HCl, 4% SDS, 25% glycerol, 0.5% bromophenol blue, pH 6.8 を含む sample buffer に溶解し, 100°C で 5 分間熱処理後, SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を行った。泳動後, タンパク質をセミドライ式ブロッティング装置 (Bio-Rad Laboratories) を用いて polyvinylidene difluoride (PVDF) メンブレン (Millipore, Bedford, MA, USA) に転写し, PBS で 5% スキムミルクを調製し, 1 時間ブロッキングを行った。β-actin および LC3 に対する一次抗体は MBL (Nagoya) より購入し, SphK1 に対する一次抗体は Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA) より購入した。それぞれ 1 : 1,000 に希釈し, 4°C で一夜反応させた。二次抗体として, ペルオキシダーゼ標識した抗マウス IgG 抗体, もしくは抗ラビット IgG 抗体 (Cell Signaling Technology) を室温で 2 時間反応させた後, ECL Western Blotting Analysis System (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) を用いて検出し, バンドの濃さを ImageJ (National Institutes of Health,

Bethesda, MD, USA) にて数値化した⁴⁵⁾。

4. 細胞生存率の測定

96 well カルチャープレート (Corning, Corning, NY, USA) に 5% FBS 含有 DMEM 培地 100 μ l に 1 well あたり 2.5×10^3 個に調製した細胞を播種し, 24 時間培養した後に各種薬物を処置した。実験終了後に 5 mg/ml の 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium-bromide (MTT) 液 10 μ l を各 well に加え, さらに 37°C で 4 時間培養し, 0.04N HCl を含む isopropanol を 100 μ l 加え, 生成物を溶解するため室温, 暗所にて一夜放置した。その後, Benchmark plus microplate spectrometer (Bio-Rad Laboratories) を用い, 対照波長を 630 nm とし 570 nm の波長で吸光度を測定した。

5. フローサイトメトリー解析

6 well カルチャープレート (Corning) に 5% FBS 含有 DMEM 培地に 1 well あたり 1×10^5 個に調製した細胞を播種した後に 24 時間培養し, 各種薬物を処置した。実験終了後に, 細胞を 0.25% trypsin, 0.02% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) を含む phosphate buffer saline (PBS) で処理して回収した。細胞上清も含めて単一とし, 1000 \times g で 5 分間遠心分離し, 全細胞を回収した。FITC Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit with FITC annexin V and PI, for Flow Cytometry

(Molecular Probes, Eugene, OR, USA) を用い, 100 μ l の binding buffer (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂, pH 7.4) に 5 μ l の FITC-annexin V と 1 μ l の調製済み propidium iodide (PI) を加え, 室温で 15 分間処理した。その後, フローサイトメーター (FACSCalibur : Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) を用いてフローサイトメトリー解析を行った。annexin V (−) PI (−) の生細胞, annexin V (+) PI (−) の早期アポトーシス細胞, annexin V (+) PI (+) の後期アポトーシス細胞, annexin V (−) PI (+) のネクローシス細胞の 4 区画に分け, CELLQuest Pro (Becton Dickinson) を用いて解析した。

6. 共焦点レーザー顕微鏡による観察

カバーガラス (MATSUNAMI, Osaka) を敷いた 6 well カルチャープレート (Corning) に 5% FBS 含有 DMEM 培地に 1 well あたり 1×10^5 個に調製した細胞を播種し, 24 時間培養した後に各種薬物を処置した。その後培地を除去し, 細胞を PBS で洗浄し, 4% パラホルムアルデヒド (Wako) により室温で 15 分間固定した。PBS で洗浄後, 一次抗体として抗 LC3 マウスモノクローナル抗体 (1 : 500) を室温で 1 時間反応させた。PBS で洗浄後, 二次抗体として Alexa Fluor 488 goat anti-mouse antibody (1 : 500) (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) を室温で 1 時間反応させた。ProLong Gold

Antifade Reagent with DAPI (Life Technologies Corporation) で封入し、共焦点レーザー顕微鏡 (Leica TCS SP8: Leica Microsystems, Mannheim, Germany) にて拡大率 630 倍で観察した。

7. 有意差検定

実験結果は平均値±標準偏差と表記し、Student-*t* 検定を用いて統計学的に比較した。 $p < 0.05$ を有意差有りと判断した。なお、解析には Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA) を用いた。

結 果

1. ヒト口腔 SCC 細胞における SphK1 の発現

3 種類のヒト口腔 SCC 細胞（Ca9-22 細胞，HSC-3 細胞，SAS 細胞）での SphK1 の発現を，抗 SphK1 抗体を用いたイムノブロット法にて検出した（図 2A）。各々のタンパクのバンド強度を ImageJ を用いて定量化した（図 2B）。3 種類のヒト口腔 SCC 細胞すべてにおいて SphK1 の発現を認めたが，SAS 細胞では低発現であった。

2. PF-543 がヒト口腔 SCC 細胞の細胞生存と細胞形態に及ぼす影響

PF-543 がヒト口腔 SCC 細胞の細胞生存に及ぼす影響を検討した（図 3）。3 種類の細胞を 1–50 μM の PF-543 存在下で 24，48，72 時間培養し，MTT 法により細胞生存率を測定した。3 種類すべての細胞において，細胞生存率は PF-543 の濃度依存的および処置時間依存的に減少し，Ca9-22 細胞においては，25 μM PF-543 の 72 時間処置により，非処置対照群の 53.8%まで低下した（図 3A）。また，3 種類のヒト口腔 SCC 細胞は 25 μM PF-543 の 72 時間処置により，その細胞形態は変化し，浮遊細胞の増加を認めた（図 4）。

3. PF-543 による細胞死の誘導

PF-543 による細胞死の形態を明らかにするため，3 種類のヒト口腔

SCC 細胞を 25 μ M PF-543 で 72 時間処置した後に annexin V と PI で染色し、フローサイトメトリー解析を行った (図 5A)。Ca9-22 細胞では annexin V (-) PI (-) である生細胞の割合が処置群において 54.7% と非処置群より減少し、annexin V (-) PI (+) のネクローシス細胞の割合は 30.4% と増加した (図 5B 左)。HSC-3 細胞では生細胞の割合は処置群において 50.1% と非処置群より減少し、ネクローシス細胞の割合は 29.4% と増加した。また、annexin V (+) PI (+) である後期アポトーシス細胞は 16.7% と増加した (図 5B 中)。SAS 細胞では生細胞の割合は処置群において 77.0% であり、ネクローシス細胞の割合に有意な変化は認められなかった (図 5B 右)。SAS 細胞の PF-543 処置群における生細胞の割合が、他の 2 細胞株と比べて高値であった。また、Ca9-22 細胞および HSC-3 細胞では annexin V (+) PI (-) の前期アポトーシス細胞の増加はみられなかった。

4. Safingol および PF-543 がオートファジーに及ぼす影響

LC3 はオートファゴソームに局在するタンパク質であり、オートファジーの誘導が形態学的に判別できる利点から現在オートファジーのマーカーとして広く用いられている⁴⁶⁾。オートファジーが誘導される場合、形成されるオートファゴソームへ LC3 が集積し、LC3-I から LC3-II への変換が見られる⁴⁶⁾。LC3 抗体を用いた蛍光免疫化学シグナルを共焦点レーザー顕微鏡にて観察したところ、無処置細胞コントロールでは LC3

は細胞質にびまん性に存在していたが、25 μ M PF-543 で 72 時間処置した Ca9-22 細胞, HSC-3 細胞, SAS 細胞では, 細胞質内で点状あるいは顆粒状に集積しており, より明瞭に検出された (図 6A-C)。また, PF-543 存在下で 3 種類の細胞を 72 時間処置したところ, すべての細胞で LC3-II の発現増強を認めた (図 7)。

5. オートファジー阻害薬が PF-543 誘導細胞死に及ぼす影響

オートファジー阻害薬として, wortmannin, 3-MA, bafilomycin A1 を用いた。wortmannin と 3-MA は, phosphatidylinositol-3-kinase class III の阻害薬であり, オートファジーのシグナル経路の上位で阻害作用を発現し, 一方, リソソーム H^+ -ATPase の阻害薬である bafilomycin A1 は, リソソーム内の酸性環境の破綻によってリソソームプロテアーゼの活性阻害をもたらし, オートファゴソーム形成後の過程を阻害することが示されている²⁴⁾。本項では, PF-543 でネクロシスだけでなく後期アポトーシスも誘導される HSC-3 細胞に着目して, オートファジー阻害薬が PF-543 によるオートファジーと細胞死に及ぼす影響について検討した。まず, PF-543 による LC3-II の発現増強に対する影響をイムノブロット法により解析した (図 8)。PF-543 処置による LC3-II の発現増強は, wortmannin あるいは 3-MA との併用によって, 低下した (図 8A, B)。一方, bafilomycin A1 との併用では, 形成されたオートファゴソームが維持され, PF-543 単独と比較して, LC3-II の発現はむしろ増強し

た (図 8C)。

つぎに、細胞死に対する影響をフローサイトメトリー解析により検出した (図 9)。PF-543 単独と比較して、wortmannin および 3-MA の併用により、後期アポトーシスおよびネクローシス細胞の割合が増加した (図 9A)。両阻害薬ともに併用にて生細胞の割合の減少、すなわち細胞傷害性の増強がみられた。一方、PF-543 と bafilomycin A1 の併用においては、生細胞には大きな変動はなかったが、ネクローシス細胞の割合は PF-543 単独で 29.4%であったものが 11.1%にまで減少し、逆に後期アポトーシス細胞の割合は、それぞれ 16.7%、28.4%で増加していた。(図 9B)。

6. 抗酸化薬 NAC が PF-543 誘導細胞死に及ぼす影響

Safingol によるアポトーシスならびにオートファジーでは ROS 産生の関与が認められている^{33,34)}。HSC-3 細胞を 5 mM 抗酸化薬 *N*-acetylcystein (NAC)⁴⁷⁾で 1 時間前処置したのちに 25 μM PF-543 で 72 時間処置し、フローサイトメトリー解析を行った。Annexin V(-) PI (-) の生細胞の割合は、PF-543 単独処置群では 28.4%まで減少し、NAC の併用により 47.7%まで増加した。また、annexin V (-) PI (+) のネクローシス細胞の割合は PF-543 単独処置群では 58.3%であったが、NAC 併用により 38.5%にまで減少した (図 10)。

考 察

従来 DMS ならびに safinol が SphK1 阻害薬として S1P シグナルを抑制する薬物として用いられてきたが、近年、S1P が全身で極めて多様な生理作用を持つこと、癌、動脈硬化、糖尿病や骨粗鬆症など多くの疾患の病態に S1P が関わるということが明らかとされ³⁶⁾、SphK1 ならびに S1P を標的とする選択性の高い新たな薬物の開発が進められている。このような背景のもと、S1P 受容体アンタゴニストとして開発された FTY720 (fingolimod) が既に多発性硬化症の治療薬として臨床応用されている⁴⁸⁾。また、抗 S1P 抗体である LT1009 (sonpcizumab) は、転移性腎細胞癌に対する治療薬として現在臨床研究の phaseII の段階にある⁴⁹⁾。PF-543 は SphK1 阻害薬として新規に開発された薬物で、既存の SphK1 阻害薬と比較して SphK1 に対して 1000 倍程の親和性を有し、強力に S1P 合成を阻害する SphK1 選択性の高い競合的阻害薬である⁴⁰⁾。しかしながら、抗腫瘍効果については、Ju ら⁴¹⁾のヒト大腸腺癌細胞を用いた報告が唯一のものである。

PF-543 が効果を発現するために必要な SphK1 は、胃癌、乳癌、肺癌、大腸癌、神経膠腫、非ホジキンリンパ腫、頭頸部癌など非常に多くの癌において高発現していることが報告されている^{4,9-15)}。Maria ら¹⁵⁾はヒト SCC における SphK1 の発現を、組織マイクロアレイおよび RT-PCR 法により検討している。153 例のヒト口腔 SCC 検体および 13 例の口腔

非悪性組織検体を用いた組織マイクロアレイにおいては、ヒト口腔 SCC 検体で SphK1 の発現が高値であることを示している。また、4 例のヒト口腔 SCC 検体での RT-PCR 法により、各検体の腫瘍部および隣接する正常上皮部における SphK1 の mRNA レベルを比較し、腫瘍部における発現上昇を報告している。Ju ら⁴¹⁾は SphK1 を発現するヒト大腸腺癌細胞において、0.1–50 μ M の PF-543 が、濃度と処置時間依存的に細胞生存率を低下させ、10 μ M で 96 時間処置した場合、MTT 法で対照細胞の 40% 程度まで低下したと報告している。また Ju ら⁴¹⁾は、SphK1 の発現程度の異なる複数のヒト大腸腺癌細胞において、PF-543 は SphK1 高発現の細胞において効果が強いことを示している。

本研究では、ヒト口腔 SCC 細胞株の中から由来及び性状の異なる細胞株として、高分化型で原発腫瘍組織から採取された Ca9-22 細胞、低分化型で転移リンパ節組織から採取された HSC-3 細胞、低分化型で原発腫瘍組織から採取された SAS 細胞を用いた。まず初めに、Ca9-22 細胞、HSC-3 細胞、SAS 細胞における SphK1 発現をイムノブロット法で確認した。3 種類のヒト口腔 SCC 細胞すべてにおいて SphK1 が発現していたが、SAS 細胞では発現は低く、SphK1 の発現は細胞株間で差異がみられた。つぎに、MTT 法で PF-543 処置細胞の細胞生存率の低下を検討したところ、3 種類すべてのヒト口腔 SCC 細胞で濃度および処置時間依存的な細胞生存率の低下が見られたが、SphK1 発現の差異と細胞傷害効果の間に関連性は認められなかった。

本研究ではさらに、PF-543 による細胞死の形態についてフローサイトメトリー解析にて検討した。生細胞，前期アポトーシス細胞，後期アポトーシス細胞，ネクローシス細胞に分けて計測したところ，MTT 法とは異なり，SphK1 低発現の SAS 細胞と比べて，高発現の Ca9-22 細胞および HSC-3 細胞では生細胞の割合はより減少していることを見出した。すなわち，SphK1 の発現がヒト口腔 SCC 細胞においても，PF-543 の細胞傷害性と密接に関連することが示唆された。MTT 法は，ミトコンドリアの還元能を基に細胞生存活性を評価する方法であり，細胞株間のミトコンドリア活性の差異が結果に影響を及ぼす可能性がある。一方，annexin V と PI を用いた細胞死の検出は，annexin V と細胞膜の phosphatidylserine との結合および PI と細胞内の DNA との結合を基に細胞死を評価しており，細胞そのものの代謝活性の差に影響を受けない。本研究では細胞株間におけるミトコンドリア活性やミトコンドリア数の差異に関する検討は行っていない。薬物処置によってミトコンドリアに何らかの変化が生じたことで，細胞株間における PF-543 の細胞傷害作用の差異がマスクされたことが考えられる。PF-543 処置によるミトコンドリアへの影響についても今後明らかにする必要があると考えている。

Ca9-22 細胞と HSC-3 細胞において，PF-543 で増加する細胞死はネクローシスの割合が高く，ヒト大腸腺癌細胞と同様にネクローシスが主体であると考えられた。しかしながら，ヒト口腔 SCC 細胞ではヒト大腸腺癌細胞と違って，ネクローシスだけでなくアポトーシスも誘導され

た。したがって本研究により、SphK が関与する細胞死は癌種と細胞株によって異なる可能性が示された。

スフィンゴ脂質の中には、セラミド, dihydroceramide, S1P のようにオートファジーを誘導するものが知られる。Scarlati ら⁵⁰⁾は、ヒト大腸腺癌細胞をセラミドで処置することで autophagic vacuole が集積すること、本現象に protein kinase B の阻害と Beclin-1 の発現亢進が関与することを報告している。また、SphK1 を過剰発現させたヒト乳癌細胞ではオートファジーの誘導が認められている⁵¹⁾。さらに、safingol に関しては、Coward ら²⁸⁾が PKC と PI3K 経路の阻害により固形腫瘍細胞においてオートファジーが誘導されること、Masui ら³⁵⁾がヒト口腔 SCC 細胞におけるオートファジー誘導をそれぞれ報告している。

PF-543 によるオートファジー誘導について未だ報告はないことより、本研究では PF-543 のオートファジーへの影響を検討した。PF-543 を処置したヒト口腔 SCC 細胞において、細胞質における LC3 の顆粒状集積を認め、LC3-I から LC3-II へのバンドシフトを認めたことから、オートファジーが誘導されるものと考えられた。

さらに、PF-543 による LC3-I から LC3-II へのバンドシフトに対するオートファジー阻害薬の効果を検討した。なお、wortmannin と 3-MA は classIII PI3K の阻害によりオートファジーの経路を LC3-II の形成前で阻害すること²⁴⁾、bafilomycin A1 はリソソーム阻害によりオートリソソームの段階で阻害することが知られている²⁴⁾。PF-543 処置による

LC3-II 形成は wortmannin および 3-MA によって阻害された。一方, bafilomycin A1 は単独で LC3-II のタンパク質量を増加しており, さらに併用群ではそれが増強していた。本現象は bafilomycin A1 が生成された LC3-II の分解を阻止することに起因するものと考えられた。いずれにせよ, 本研究において PF-543 によるオートファジー誘導に対して, オートファジー阻害薬が影響することが示された。

SphK 阻害薬に関して, Cingolani ら⁵²⁾は, ヒト胃腺癌細胞において SphK1 と SphK2 を阻害する SKI-II 処置がオートファジーを誘導することを報告している。また, その誘導メカニズムとして, SphK 阻害作用による, S1P レベルの低下に加えて, *de novo* 合成経路のセラミド合成酵素 dehydroceramide desaturase を阻害することにより, デヒドロセラミドや代謝産物のレベル上昇を引き起こし, これらのスフィンゴ脂質によってオートファジーが誘導されることを示している。これらの知見より細胞増殖に影響を及ぼす PF-543 についても SphK1 阻害によるスフィンゴ脂質のレベル上昇を介してオートファジーを誘導する可能性が考えられる。ただし, 本研究では表現型として細胞に変化が現れる薬剤処置 72 時間後に細胞を固定しオートファジー誘導の有無を検討しており, PF-543 の直接的な作用以外の影響も考えられる。予備検討で, 薬剤処置 6 時間後の細胞を固定した検体でも LC3-II の発現増強を示唆する結果も得ており, 今後さらなる検討を必要とする。

近年, シグナル分子機構によって制御される細胞死として, アポトー

シス、ネクロプトーシス、パイロトーシス、フェロトーシス、オートファジー細胞死などが提唱されている。オートファジーを伴う細胞死において、オートファジーは細胞生存に働くこと、逆に細胞死に関わることが報告されている²⁵⁻²⁷⁾。当教室ではこれまでに、ヒト口腔 SCC 由来の SAS 細胞において safingol がミトコンドリアからアポトーシス誘導因子である endoG を遊離し、これが核内に移行して DNA の断片化を引き起こすことを見い出している^{31,32)}。また、safingol によるオートファジー誘導を 3-MA で阻害すると、アポトーシスが增強されることより、オートファジーが細胞死ではなく細胞生存に働くことを明らかにしている³⁵⁾。一方、PF-543 については、ヒト大腸腺癌細胞ではアポトーシスではなくネクローシスが誘導されることが報告されている⁴¹⁾。このネクローシスの発現機序については、他の細胞系で示されたストレス誘導性にミトコンドリアへ移行した p53 が、cycliphilin D との複合体形成を介した、mitochondrial membrane potential (MMP) の低下と、それに引き続く LDH の放出であることが考えられている^{53,54)}。

本研究では、HSC-3 細胞において PF-543 がアポトーシス、ネクローシスおよびオートファジーを誘導すること、この過程に ROS が関与することを明らかとした (図 13)。ヒト口腔 SCC 細胞において PF-543 によって増加する後期アポトーシス細胞およびネクローシス細胞は、wortmannin および 3-MA の併用によって顕著に増加することから、PF-543 により誘導されたオートファジーは細胞生存に寄与しているこ

とが示唆される。すなわち、wortmannin および 3-MA の 2 つのオートファジー阻害薬が PF-543 誘導オートファジーによるアポトーシスとネクローシスの抑制作用と拮抗したことが考えられる。一方、bafilomycin A1 の併用では、ネクローシス細胞が減少し、後期アポトーシス細胞が増加するという wortmannin および 3-MA による効果とは異なるものであった。詳細な分子機序については未だ不明であるが、bafilomycin A1 では、PF-543 誘導オートファジーによるアポトーシスの抑制作用に強く拮抗したため、(1) アポトーシスが促進して、ネクローシスが減少したこと、あるいは (2) ネクローシスをアポトーシスに移行させたことが考えられる。

Safingol によるミトコンドリアを介する細胞死においては、ROS が関与することが示されている^{33,34)}。また、SphK1 の欠失が癌細胞における ROS の産生と doxorubicin による DNA 損傷を亢進することが報告されている⁵⁵⁾。本研究では、PF-543 による細胞死における ROS の関与を抗酸化薬である NAC を用いて検討し、NAC の前処置は、PF-543 によるネクローシスを抑制することを見い出した。以上のことより、PF-543 による細胞傷害性の過程においても ROS 産生が関与していることが考えられた。

以上、本研究では、SphK1 阻害薬として開発された PF-543 が、口腔 SCC 細胞において、細胞死としてアポトーシス、ネクローシスを惹起すること、オートファジーを誘導すること、さらに、抗腫瘍作用を示すこ

とを明らかとした。先行研究で、**SphK1** 阻害作用の関与を示した **safingol** は、既に既存の抗癌薬との併用効果が明らかにされている^{30,37,56})。したがって、今後 **PF-543** についても既存の抗癌薬との併用効果に関する検討を実施したいと考えている。本研究を含め、**SphK1** ならびに **SphK2** の阻害薬に関する研究は世界各国で進められており、今後の **SphK** をターゲットとした分子標的治療のさらなる理解と発展ならびに **S1P** シグナルによるオートファジーの細胞死制御機序の解明を通して、副作用の少ないより効率的な口腔癌の薬物治療が拓かれることを期待したい。

結 語

- 1) ヒト口腔 SCC 細胞である Ca9-22 細胞, HSC-3 細胞および SAS 細胞において PF-543 は, 細胞生存率を低下させた。
- 2) Ca9-22 細胞, HSC-3 細胞および SAS 細胞における PF-543 による細胞傷害作用にはオートファジー誘導を伴った。また, Ca9-22 細胞および HSC-3 細胞ではネクロシスの増強を, 一方 SAS 細胞ではアポトーシスの増強を認めた。
- 3) HSC-3 細胞において PF-543 とオートファジー阻害薬の併用は, アポトーシスあるいはネクロシスを増強した。
- 4) HSC-3 細胞において, PF-543 により誘導されたネクロシスは抗酸化薬の併用により軽減した。

以上の成績より, SphK1 阻害薬 PF-543 による細胞傷害性にはオートファジーの誘導を伴い, 誘導されたオートファジーは細胞生存に寄与することが示唆された。また, HSC-3 細胞では, PF-543 によってアポトーシス, ネクロシス, オートファジーが誘導されるが, オートファジーの阻害によって細胞死形態に変化が生じた。このような知見は未だ認められておらず, 本解析系は PF-543 の口腔癌に対する抗腫瘍活性および細胞死誘導作用機序を解明するうえで有用と考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり，本研究を行う機会を与えていただき，御懇篤なるご指導と御高閲を賜りました大阪大学歯学研究科顎口腔病因病態制御学講座口腔外科学第二教室，由良義明名誉教授，大阪大学歯学研究科顎口腔病因病態制御学講座薬理学教室，田熊一徹教授ならびに本研究計画の立案と実施に際し，終始御指導を賜りました大阪大学歯学研究科顎口腔病因病態制御学講座口腔外科学第二教室，濱田正和助教に謹んで感謝の意を表します。また，本研究に対して様々な御援助，御協力をいただきました口腔外科学第二教室の教室員の皆様に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Spiegel, S. and Milstien, S. (2003): Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**, 397–407.
- 2) Tamashiro, P., Furuya, H., Shimizu, Y., Iino, K. and Kawamori, T. (2013): The Impact of Sphingosine Kinase-1 in Head and Neck Cancer. *Biomolecules*, **3**, 481–513.
- 3) Fyrst, H. and Saba, J. D. (2010): An update on sphingosine-1-phosphate and other sphingolipid mediators. *Nat Chem Biol*, **6**, 489–497.
- 4) Pyne, N. J. and Pyne, S. (2010): Sphingosine 1-phosphate and cancer. *Nat Rev Cancer*, **10**, 489–503.
- 5) Kumar, A. and Saba, J. D. (2009): Lyase to live by: sphingosine phosphate lyase as a therapeutic target. *Expert Opin Ther Targets*, **13**, 1013–1025.
- 6) Ogretmen, B. and Hannun, Y. A. (2004): Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment. *Nat Rev Cancer*, **4**, 604–616.
- 7) Liang, J., Nagahashi, M., Kim, E. Y., Harikumar, K. B., Yamada, A., Huang, W. C., Hait, N. C., Allegood, J. C., Price, M. M., Avni, D., et al. (2013): Sphingosine-1-phosphate links persistent

- STAT3 activation, chronic intestinal inflammation and development of colitis-associated cancer. *Cancer Cell*, **23**, 107–120.
- 8) Alvarez, S. E., Milstien, S. and Spiegel, S. (2007): Autocrine and paracrine roles of sphingosine-1-phosphate. *Trends Endocrinol Metab*, **18**, 300–307.
- 9) Li, W., Yu, C.-P., Xia, J., Zhang, L., Weng, G.-X., Zheng, H., Kong, Q., Hu, L., Zeng, M.-S., Zeng, Y., et al. (2009): Sphingosine kinase 1 is associated with gastric cancer progression and poor survival of patients. *Clin Cancer Res*, **15**, 1393–1399.
- 10) Ruckhäberle, E., Rody, A., Engels, K., Gaetje, R., Von Minckwitz, G., Schiffmann, S., Grösch, S., Geisslinger, G., Holtrich, U., Karn, T., et al. (2008): Microarray analysis of altered sphingolipid metabolism reveals prognostic significance of sphingosine kinase 1 in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, **112**, 41–52.
- 11) Johnson, K. R., Johnson, K. Y., Crellin, H. G., Ogretmen, B., Boylan, A. M., Harley, R. A. and Obeid, L. M. (2005): Immunohistochemical Distribution of Sphingosine Kinase 1 in Normal and Tumor Lung Tissue. *J Histochem Cytochem*, **53**, 1159–1166.

- 12) Kawamori, T., Kaneshiro, T., Okumura, M., Maalouf, S., Uflacker, A., Bielawski, J., Hannun, Y. A. and Obeid, L. M. (2009): Role for sphingosine kinase 1 in colon carcinogenesis. *FASEB J*, **23**, 405–414.
- 13) Li, J., Guan, H. Y., Gong, L. Y., Song, L. B., Zhang, N., Wu, J., Yuan, J., Zheng, Y. J., Huang, Z. S. and Li, M. (2008): Clinical significance of sphingosine kinase-1 expression in human astrocytomas progression and overall patient survival. *Clin Cancer Res*, **14**, 6996–7003.
- 14) Bayerl, M. G., Bruggeman, R. D., Conroy, E. J., Hengst, J. A., King, T. S., Jimenez, M., Claxton, D. F. and Yun, J. K. (2008): Sphingosine kinase 1 protein and mRNA are overexpressed in non-Hodgkin lymphomas and are attractive targets for novel pharmacological interventions. *Leuk Lymphoma*, **49**, 948–954.
- 15) Facchinetti, M. M., Gandini, N. A., Fermento, M. E., Sterin-Speziale, N. B., Ji, Y., Patel, V., Gutkind, J. S., Rivadulla, M. G. and Curino, A. C. (2010): The expression of sphingosine kinase-1 in head and neck carcinoma. *Cells Tissues Organs*, **192**, 314–324.
- 16) Tamashiro, P. M., Furuya, H., Shimizu, Y. and Kawamori, T. (2014): Sphingosine kinase 1 mediates head & neck squamous

cell carcinoma invasion through sphingosine 1-phosphate receptor 1. *Cancer Cell Int*, **14**, 76.

- 17) Sinha, U. K., Schorn, V. J., Hochstim, C., Chinn, S. B., Zhu, S. and Masood, R. (2011): Increased radiation sensitivity of head and neck squamous cell carcinoma with sphingosine kinase 1 inhibition. *Head Neck*, **33**, 178–188.
- 18) Shirai, K., Kaneshiro, T., Wada, M., Furuya, H., Bielawski, J., Hannun, Y. A., Obeid, L. M., Ogretmen, B. and Kawamori, T. (2011): A role of sphingosine kinase 1 in head and neck carcinogenesis. *Cancer Prev Res*, **4**, 454–462.
- 19) Sheu, J. J.-C., Lee, C.-C., Hua, C.-H., Li, C.-I., Lai, M.-T., Lee, S.-C., Cheng, J., Chen, C.-M., Chan, C., Chao, S. C.-C., et al. (2014): LRIG1 modulates aggressiveness of head and neck cancers by regulating EGFR-MAPK-SPHK1 signaling and extracellular matrix remodeling. *Oncogene*, **33**, 1375–1384.
- 20) Klionsky, D. J. (2008): Autophagy revisited: A conversation with Christian de Duve. *Autophagy*, **4**, 740–743.
- 21) Yang, Z. and Klionsky, D. J. (2009): An overview of the molecular mechanism of autophagy. *Curr Top Microbiol Immunol*, **335**, 1–32.
- 22) Eskelinen, E. L., Reggiori, F., Baba, M., Kovács, A. L. and Seglen,

- P. O. (2011): Seeing is believing: The impact of electron microscopy on autophagy research. *Autophagy*, **7**, 935–956.
- 23) Jin, M. and Klionsky, D. J. (2014): Regulation of autophagy: Modulation of the size and number of autophagosomes. *FEBS Lett*, **588**, 2457–2463.
- 24) Klionsky, D. J., Abeliovich, H., Agostinis, P., Agrawal, D. K., Aliev, G., Askew, D. S., Baba, M., Baehrecke, E. H., Bahr, B. A., Ballabio, A., et al. (2008): Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy*, **4**, 151–175.
- 25) Kondo, Y. and Kondo, S. (2006): Autophagy and cancer therapy. *Autophagy*, **2**, 85–90.
- 26) Eisenberg-Lerner, A., Bialik, S., Simon, H.-U. and Kimchi, A. (2009): Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. *Cell Death Differ*, **16**, 966–975.
- 27) Carew, J. S., Kelly, K. R. and Nawrocki, S. T. (2012): Autophagy as a target for cancer therapy: new developments. *Cancer Manag Res*, **4**, 357–365.
- 28) Coward, J., Ambrosini, G., Musi, E., Truman, J. P., Haimovitz-Friedman, A., Allegood, J. C., Wang, E., Merrill, A. H. and Schwartz, G. K. (2009): Safingol (L-threo-sphinganine)

- induces autophagy in solid tumor cells through inhibition of PKC and the PI3-kinase pathway. *Autophagy*, **5**, 184–193.
- 29) Hoffmann, T. K., Leenen, K., Hafner, D., Balz, V., Gerharz, C. D., Grund, A., Ballo, H., Hauser, U. and Bier, H. (2002): Antitumor activity of protein kinase C inhibitors and cisplatin in human head and neck squamous cell carcinoma lines. *Anticancer Drugs*, **13**, 93–100.
- 30) Dickson, M. A., Carvajal, R. D., Merrill Jr, A. H., Gonen, M., Cane, L. M. and Schwartz, G. K. (2011): A Phase I Clinical Trial of Safingol in Combination with Cisplatin in Advanced Solid Tumors. *Clin Cancer Res Clin Cancer Res April*, **15**, 2484–2492.
- 31) Hamada, M., Sumi, T., Iwai, S., Nakazawa, M. and Yura, Y. (2006): Induction of endonuclease G-mediated apoptosis in human oral squamous cell carcinoma cells by protein kinase C inhibitor safingol. *Apoptosis*, **11**, 47–56.
- 32) Noda, T., Iwai, S., Hamada, M., Fujita, Y. and Yura, Y. (2009): Induction of apoptosis of detached oral squamous cell carcinoma cells by safingol. Possible role of Bim, focal adhesion kinase and endonuclease G. *Apoptosis*, **14**, 287–297.
- 33) Ling, L.-U., Tan, K.-B., Lin, H. and Chiu, G. N. C. (2011): The role of reactive oxygen species and autophagy in

- safingol-induced cell death. *Cell Death Dis*, **2**, e129.
- 34) Hamada, M., Wakabayashi, K., Masui, A., Iwai, S., Imai, T. and Yura, Y. (2014): Involvement of hydrogen peroxide in safingol-induced endonuclease G-mediated apoptosis of squamous cell carcinoma cells. *Int J Mol Sci*, **15**, 2660–2671.
- 35) Masui, A., Hamada, M., Kameyama, H., Wakabayashi, K., Takasu, A., Imai, T., Iwai, S. and Yura, Y. (2016): Autophagy as a survival mechanism for squamous cell carcinoma cells in endonuclease G-mediated apoptosis. *PLoS One*, **11**, e0162786.
- 36) Maceyka, M., Harikumar, K. B., Milstien, S. and Spiegel, S. (2012): Sphingosine-1-phosphate signaling and its role in disease. *Trends Cell Biol*, **22**, 50–60.
- 37) Matula, K., Collie-Duguid, E., Murray, G., Parikh, K., Grabsch, H., Tan, P., Lalwani, S., Garau, R., Ong, Y., Bain, G., et al. (2015): Regulation of cellular sphingosine-1-phosphate by sphingosine kinase 1 and sphingosine-1-phosphate lyase determines chemotherapy resistance in gastroesophageal cancer. *BMC Cancer*, **15**, 762.
- 38) Tsukamoto, S., Kumazoe, M., Huang, Y., Lesnick, C., Kay, N. E., Shanafelt, T. D. and Tachibana, H. (2016): SphK1 inhibitor potentiates the anti-cancer effect of EGCG on leukaemia cells.

Br J Haematol, in press.

- 39) Yatomi, Y., Ruan, F., Megidish, T., Toyokuni, T., Hakomori, S. I. and Igarashi, Y. (1996): N,N-dimethylsphingosine inhibition of sphingosine kinase and sphingosine 1-phosphate activity in human platelets. *Biochemistry*, **35**, 626–633.
- 40) Schnute, M. E., McReynolds, M. D., Kasten, T., Yates, M., Jerome, G., Rains, J. W., Hall, T., Chrencik, J., Kraus, M., Cronin, C. N., et al. (2012): Modulation of cellular S1P levels with a novel, potent and specific inhibitor of sphingosine kinase-1. *Biochem J*, **444**, 79–88.
- 41) Ju, T., Gao, D. and Fang, Z.-Y. (2016): Targeting colorectal cancer cells by a novel sphingosine kinase 1 inhibitor PF-543. *Biochem Biophys Res Commun*, **470**, 728–734.
- 42) 堀越勝, 木村義孝, 名倉英明, 小野富昭, 伊藤秀夫. (1974): 人の歯肉癌由来の細胞株の樹立 (第1報). 日口外誌, **20**, 100–106, 昭和49年.
- 43) 百瀬文雄, 平田章二, 新井田俊雄. (1986): 3つの口腔扁平上皮癌由来細胞の性状について. 口科誌, **35**, 485–496, 昭和61年.
- 44) 高橋喜久雄, 金沢春幸, 秋山行弘. (1989): ヒト舌癌原発巣より得られた低分化型扁平上皮癌細胞株(SAS)の樹立. 口科誌, **38**, 20–28, 平成元年.

- 45) Schneider, C. A., Rasband, W. S. and Eliceiri, K. W. (2012): NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*, **9**, 671–675.
- 46) Kabeya, Y. (2000): LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J*, **19**, 5720–5728.
- 47) Aruoma, O. I., Halliwell, B., Hoey, B. M. and Butler, J. (1989): The antioxidant action of N-acetylcysteine: Its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide and hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med*, **6**, 593–597.
- 48) Brinkmann, V., Billich, A., Baumruker, T., Heining, P., Schmouder, R., Francis, G., Aradhye, S. and Burtin, P. (2010): Fingolimod (FTY720): discovery and development of an oral drug to treat multiple sclerosis. *Nat Rev Drug Discov*, **9**, 883–897.
- 49) Pal, S. K., Drabkin, H. A., Reeves, J. A., Hainsworth, J. D., Hazel, S. E., Paggiarino, D. A., Wojciak, J., Woodnutt, G. and Bhatt, R. S. (2016): A phase 2 study of the sphingosine-1-phosphate antibody sonenpcizumab in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Cancer*, in press.
- 50) Scarlatti, F., Bauvy, C., Ventruti, A., Sala, G., Cluzeaud, F., Vandewalle, A., Ghidoni, R. and Codogno, P. (2004):

Ceramide-mediated macroautophagy involves inhibition of protein kinase B and up-regulation of beclin 1. *J Biol Chem*, **279**, 18384–18391.

- 51) Lavieu, G., Scarlatti, F., Sala, G., Carpentier, S., Levade, T., Ghidoni, R., Botti, J. and Codogno, P. (2006): Regulation of autophagy by sphingosine kinase 1 and its role in cell survival during nutrient starvation. *J Biol Chem*, **281**, 8518–8527.
- 52) Cingolani, F., Casasampere, M., Sanllehi, P., Casas, J., Bujons, J. and Fabrias, G. (2014): Inhibition of dihydroceramide desaturase activity by the sphingosine kinase inhibitor SKI II. *J Lipid Res*, **55**, 1711–1720.
- 53) Du, H., Guo, L., Fang, F., Chen, D., A Sosunov, A., M McKhann, G., Yan, Y., Wang, C., Zhang, H., Molkentin, J. D., et al. (2008): Cyclophilin D deficiency attenuates mitochondrial and neuronal perturbation and ameliorates learning and memory in Alzheimer's disease. *Nat Med*, **14**, 1097–1105.
- 54) Vaseva, A. V., Marchenko, N. D., Ji, K., Tsirka, S. E., Holzmann, S. and Moll, U. M. (2012): P53 opens the mitochondrial permeability transition pore to trigger necrosis. *Cell*, **149**, 1536–1548.
- 55) Huwiler, A., Kotelevets, N., Xin, C., Pastukhov, O., Pfeilschifter,

J. and Zangemeister-Wittke, U. (2011): Loss of sphingosine kinase-1 in carcinoma cells increases formation of reactive oxygen species and sensitivity to doxorubicin-induced DNA damage. *Br J Pharmacol*, **162**, 532–543.

- 56) Schwartz, G. K., Ward, D., Saltz, L., Casper, E. S., Spiess, T., Mullen, E., Woodworth, J., Venuti, R., Zervos, P., Storniolo, A. M., et al. (1997): A pilot clinical/pharmacological study of the protein kinase C-specific inhibitor safinol alone and in combination with doxorubicin. *Clin Cancer Res*, **3**, 537–543.

図の説明

図 1. スフィンゴ脂質の代謝経路および S1P シグナル経路

代表的なスフィンゴ脂質として、スフィンゴシン、セラミド、スフィンゴシン 1-リン酸(S1P)、セラミド 1-リン酸、スフィンゴミエリンなどがある。細胞膜のスフィンゴミエリンからスフィンゴミエリナーゼの働きで生成されたセラミドあるいは *de novo* 合成経路で palmitoyl Co-A と serine からデヒドロセラミドを経由して生成されたセラミドはセラミダーゼの働きでスフィンゴシンとなり、スフィンゴシンから S1P が生成される (A)。S1P は細胞内シグナル伝達経路を介して働くだけでなく、オートクライン経路との 2 経路で働く。細胞内で増殖と生存に働くとともに、細胞外に放出された S1P は G タンパク共役型受容体である 5 種類の S1PRs に結合し、Rac, PI3K, AC, ERK, PLC, Rho, JNKなどを介して、その多彩な細胞応答をもたらす (B)。

SphK (sphingosine kinase), SGPP (S1P phosphatase), S1PRs (S1P receptors), PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase), AC (adenylyl cyclase-cyclic AMP), ERK (extracellular signal-regulated kinase), PLC (phospholipase C), JNK (Jun amino terminal kinase)

図 2. ヒト口腔 SCC 細胞における SphK1 の発現

Ca9-22 細胞, HSC-3 細胞および SAS 細胞での SphK1 の発現を, 抗 SphK1 抗体を用いて検出した (A)。また, バンドシグナルの強度を画像処理ソフト ImageJ を用いて数値化した (B)。(n=3)

図 3. PF-543 がヒト口腔 SCC 細胞の細胞生存率におよぼす影響

Ca9-22 細胞 (A), HSC-3 細胞 (B), SAS 細胞 (C)を 1, 5, 10, 25, 50 μ M の PF-543 存在下で 24, 48, 72 時間培養し, MTT 法を用いて細胞生存率を測定した。(n=3)。

図 4. PF-543 がヒト口腔 SCC 細胞の形態に及ぼす影響

Ca9-22 細胞, HSC-3 細胞および SAS 細胞を PF-543 で処置し, 72 時間培養した後に位相差顕微鏡にて細胞形態を観察した。図はそれぞれ典型的な 50 倍および 200 倍の観察像を示す。

図 5. ヒト口腔 SCC 細胞において PF-543 が細胞死形態に及ぼす影響

25 μ M の PF-543 にて処置した Ca9-22 細胞, HSC-3 細胞および SAS 細胞を 72 時間培養した後に, フローサイトメトリー解析を行った (A)。Annexin V (-) PI (-) の生細胞 (□), annexin V (+) PI (-) の早期アポトーシス細胞 (■), annexin V (+) PI (+) の後期アポトーシス細胞 (▣), annexin V (-) PI (+) のネクローシス細胞 (▤) の

4 区画に分け解析し、各区画の割合を求めてグラフ化した (B)。(* $p < 0.05$ vs. control, $n=3$)

図 6. ヒト口腔 SCC 細胞において PF-543 が LC3 の局在に及ぼす影響

25 μM の PF-543 にて Ca9-22 細胞 (A), HSC-3 細胞 (B) および SAS 細胞 (C) を 72 時間処置した後に、細胞を固定して抗体反応を行い LC3 抗体の蛍光シグナルを共焦点レーザー顕微鏡にて検出した。図はそれぞれ典型的な観察像を示す。

図 7. ヒト口腔 SCC 細胞において PF-543 が LC3 の発現に及ぼす影響

25 μM の PF-543 にて Ca9-22 細胞, HSC-3 細胞および SAS 細胞を 72 時間処置した後に、イムノブロット法にて LC3 のバンドシグナルを検出した (A)。また、バンドシグナルの強度を画像処理ソフト ImageJ を用いて数値化した (B)。(* $p < 0.05$ vs. control, $n=3$)

図 8. HSC-3 細胞における PF-543 による LC3 発現に、オートファジー阻害薬が及ぼす影響

HSC-3 細胞を 2.5 μM の wortmannin (A), 1 mM の 3-MA (B), 0.25 nM の bafilomycin A1 (C) にてそれぞれ 1 時間前処置した後に、25 μM の PF-543 にて 72 時間処置し、イムノブロット法にて LC3 を検出した。

図 9. HSC-3 細胞における PF-543 誘導細胞傷害に, オートファジー阻害薬が及ぼす影響

HSC-3 細胞を 2.5 μ M の wortmannin (A), 1 mM の 3-MA (A), 0.25 nM の bafilomycin A1 (B) にてそれぞれ 1 時間前処置した後に, 25 μ M の PF-543 にて 72 時間処置し, フローサイトメトリー解析を行った。Annexin V (–) PI (–) の生細胞 (□), annexin V (+) PI (–) の早期アポトーシス細胞 (■), annexin V (+) PI (+) の後期アポトーシス細胞 (▒), annexin V (–) PI (+) のネクローシス細胞 (▓) の 4 区画に分けて解析し, 各区画の割合を求めてグラフ化した。
(* $p < 0.05$ vs. control, † $p < 0.05$ vs. PF-543 only, n=3)

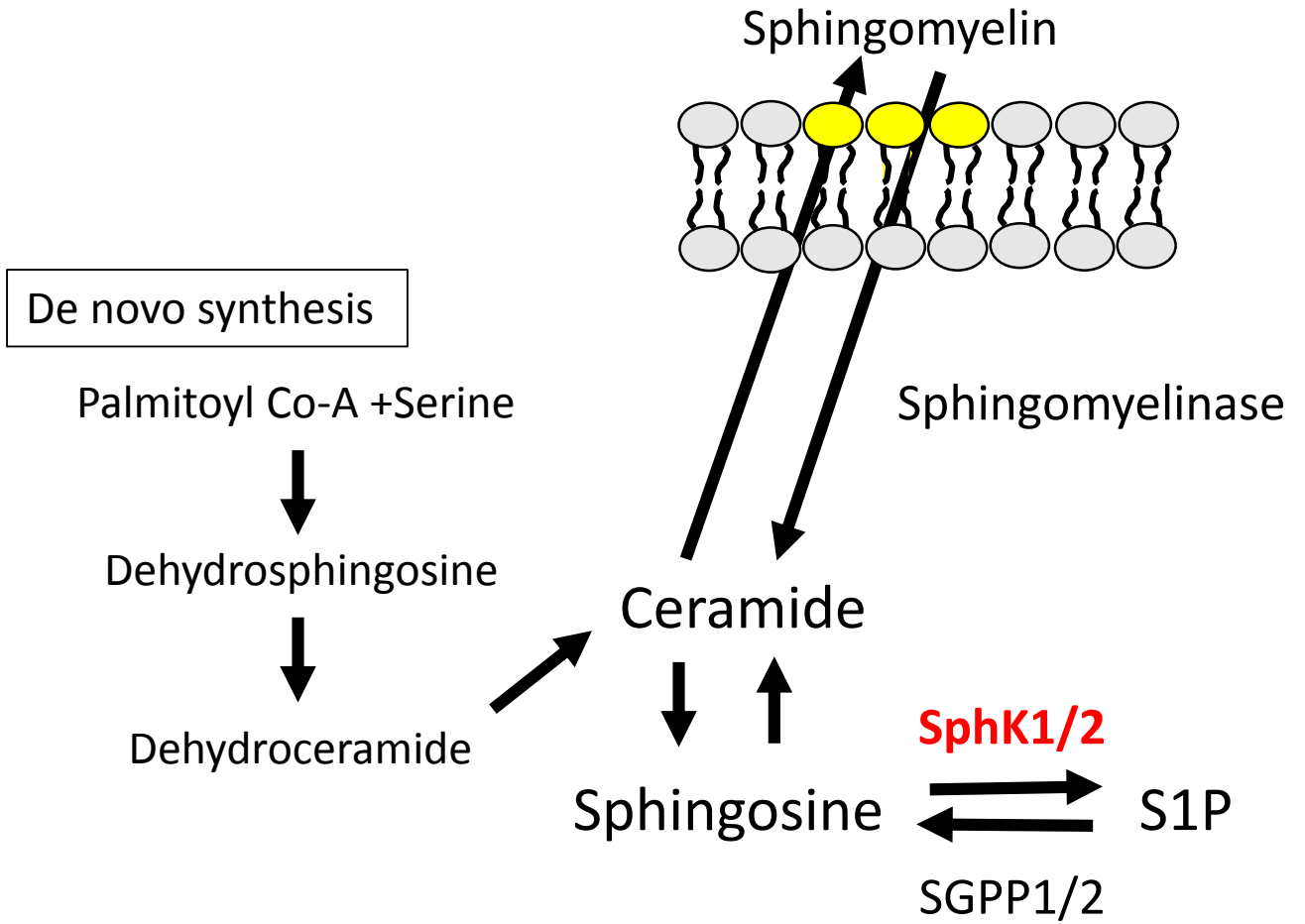
図 10. 抗酸化薬 NAC が PF-543 による細胞死に及ぼす影響

HSC-3 細胞を, 5 mM の NAC にて 1 時間前処置した後に, 25 μ M の PF-543 にて 72 時間処置し, フローサイトメトリー解析を行った。Annexin V (–) PI (–) の生細胞 (□), annexin V (+) PI (–) の早期アポトーシス細胞 (■), annexin V (+) PI (+) の後期アポトーシス細胞 (▒), annexin V (–) PI (+) のネクローシス細胞 (▓) の 4 区画に分けて解析し, 各区画の割合を求めてグラフ化した。(* $p < 0.05$ vs. control, † $p < 0.05$ vs. PF-543 only, n=3)

図 11. SphK1 阻害薬 PF-543 の口腔 SCC 細胞に対する効果

PF-543 が SphK1 を阻害すると，アポトーシス，ネクローシスならびにオートファジーが誘導される。この過程で ROS が関与する可能性がある。オートファジーはアポトーシスとネクローシスによる細胞死に対して抑制的に働き，オートファジー阻害薬でアポトーシスとネクローシスが增強される，あるいはアポトーシスが增強されネクローシスが低下することが実験結果より示唆される。

☒ 1A



☒ 1B

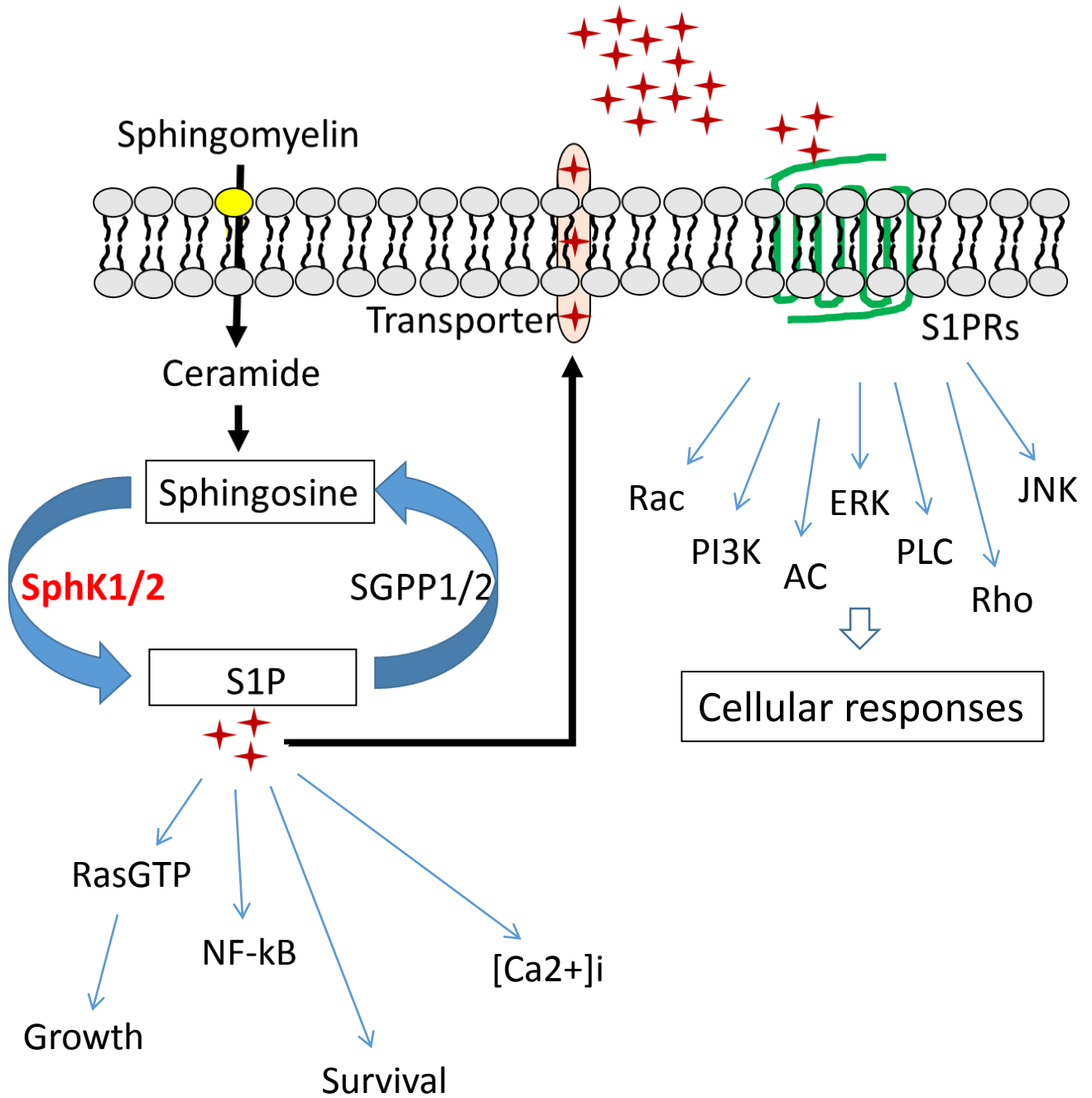
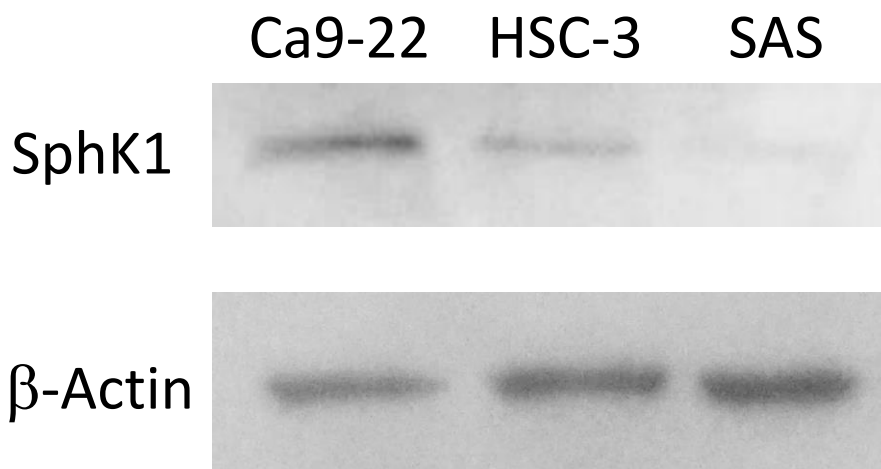
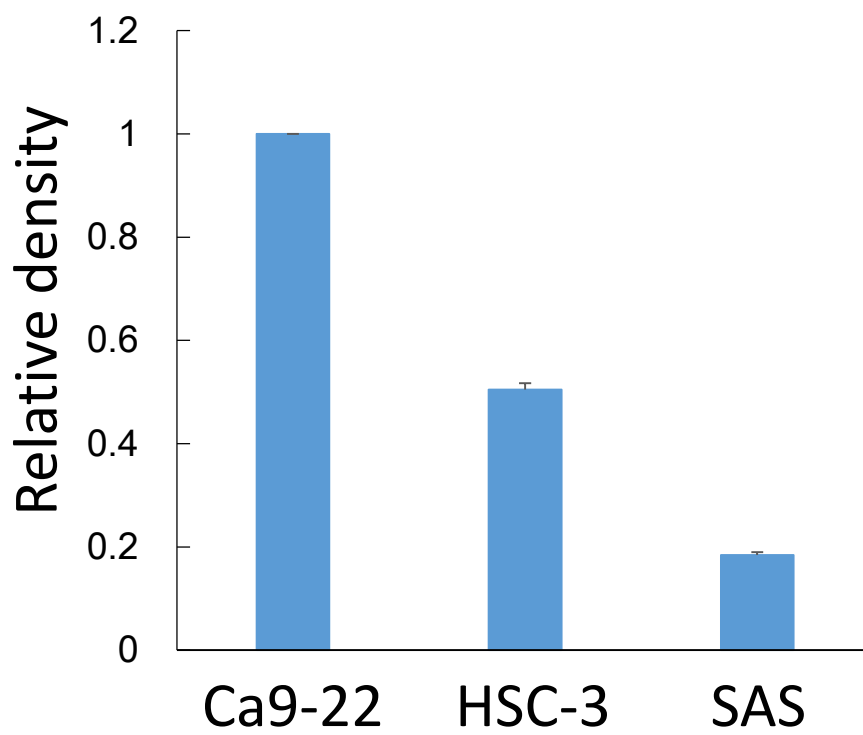


图2

A

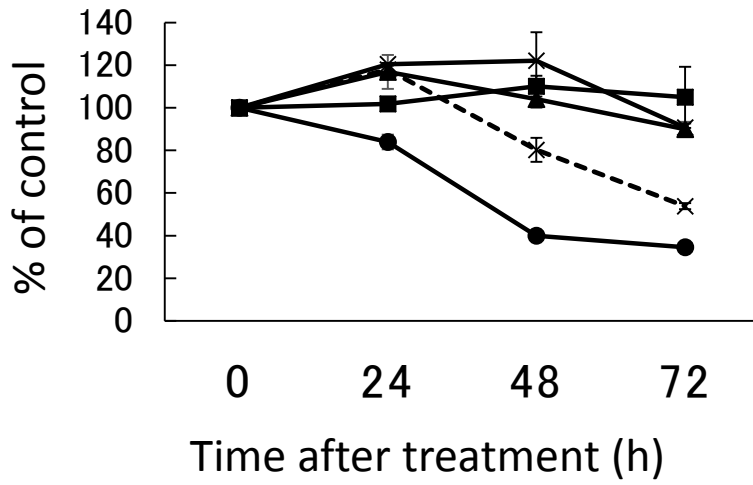


B

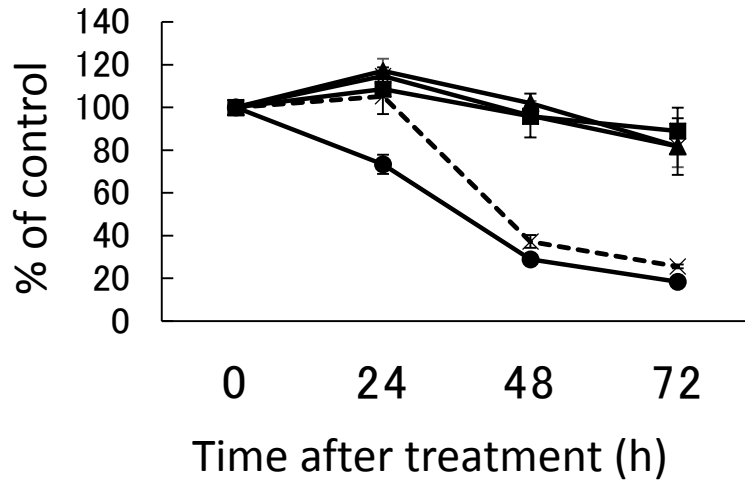


3

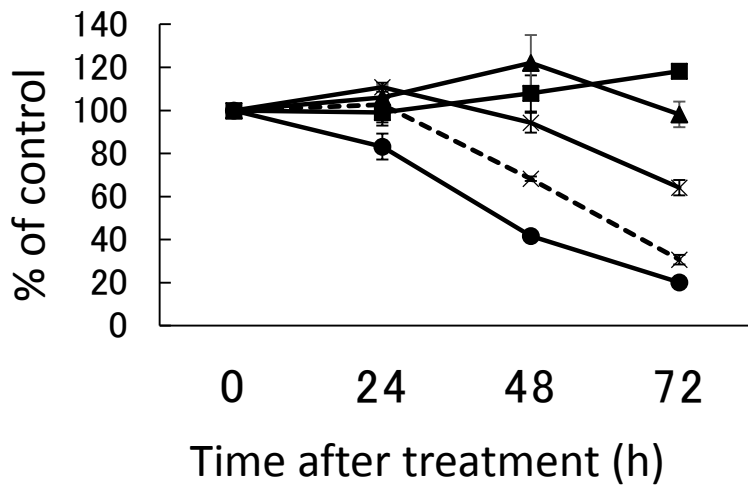
A



B

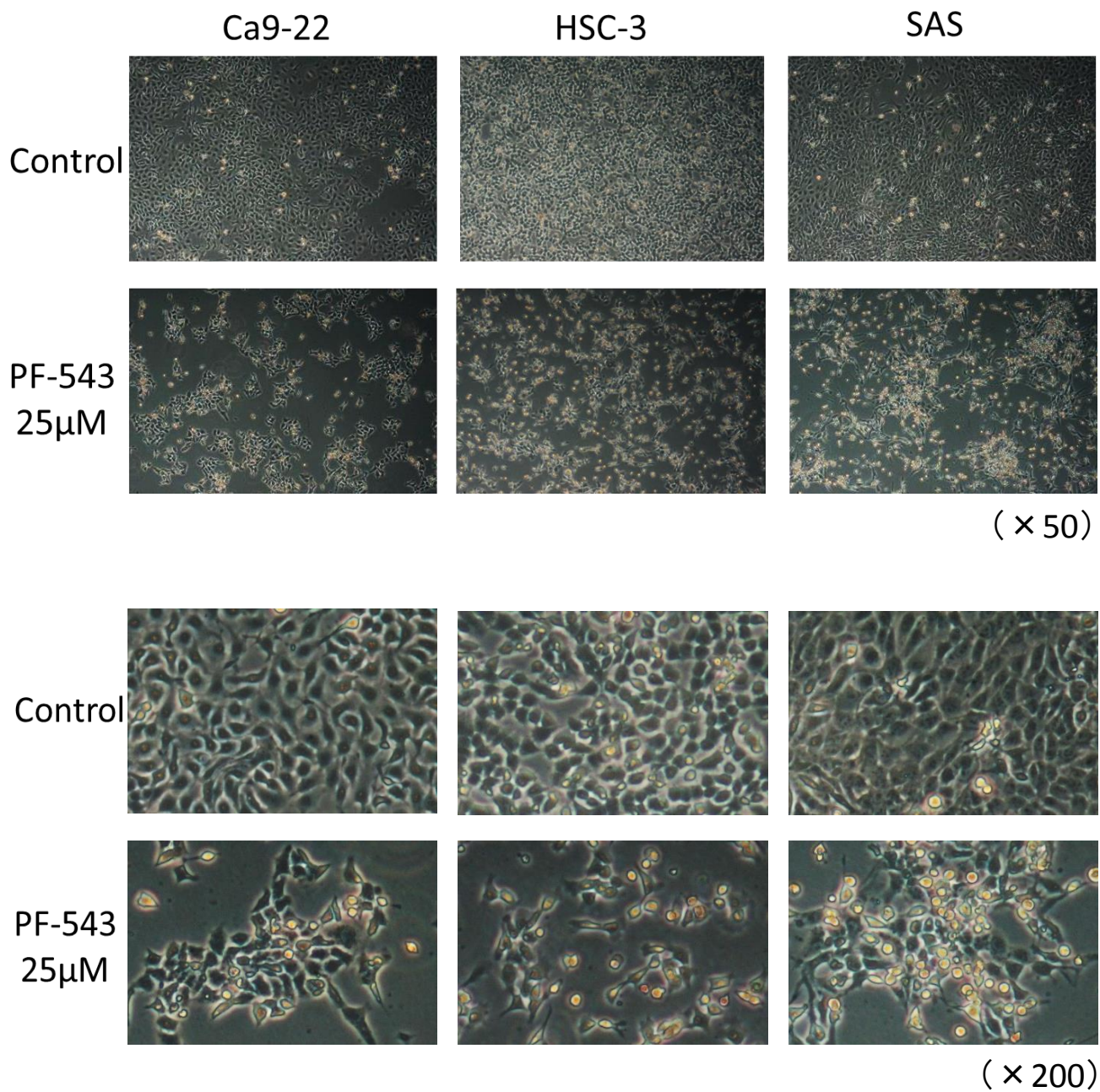


C

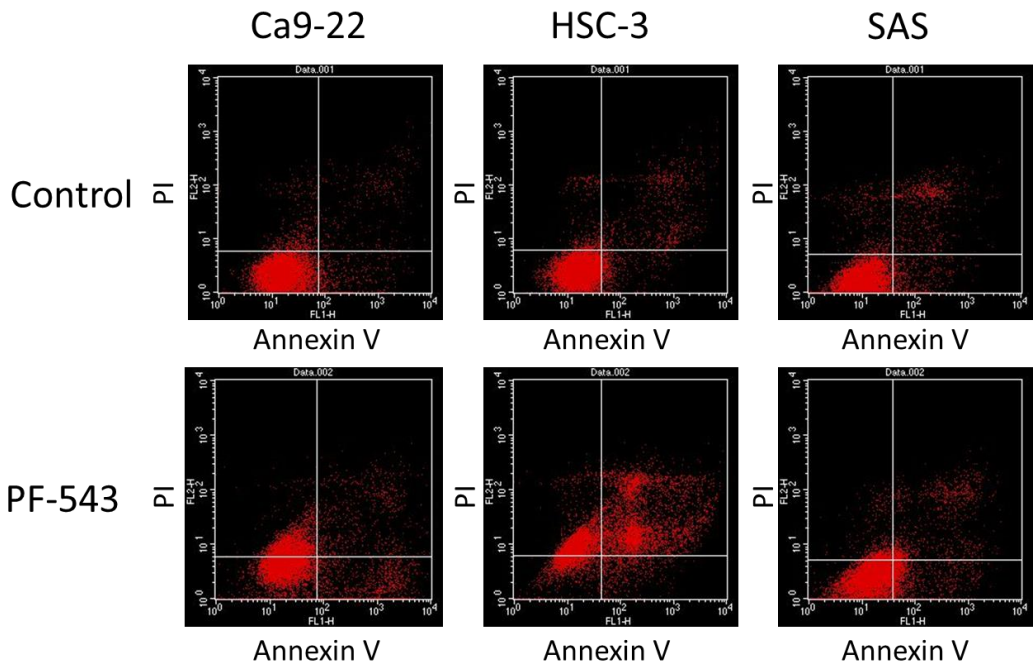


■ 1 μM ▲ 5 μM × 10 μM * 25 μM ● 50 μM

図4



A



B

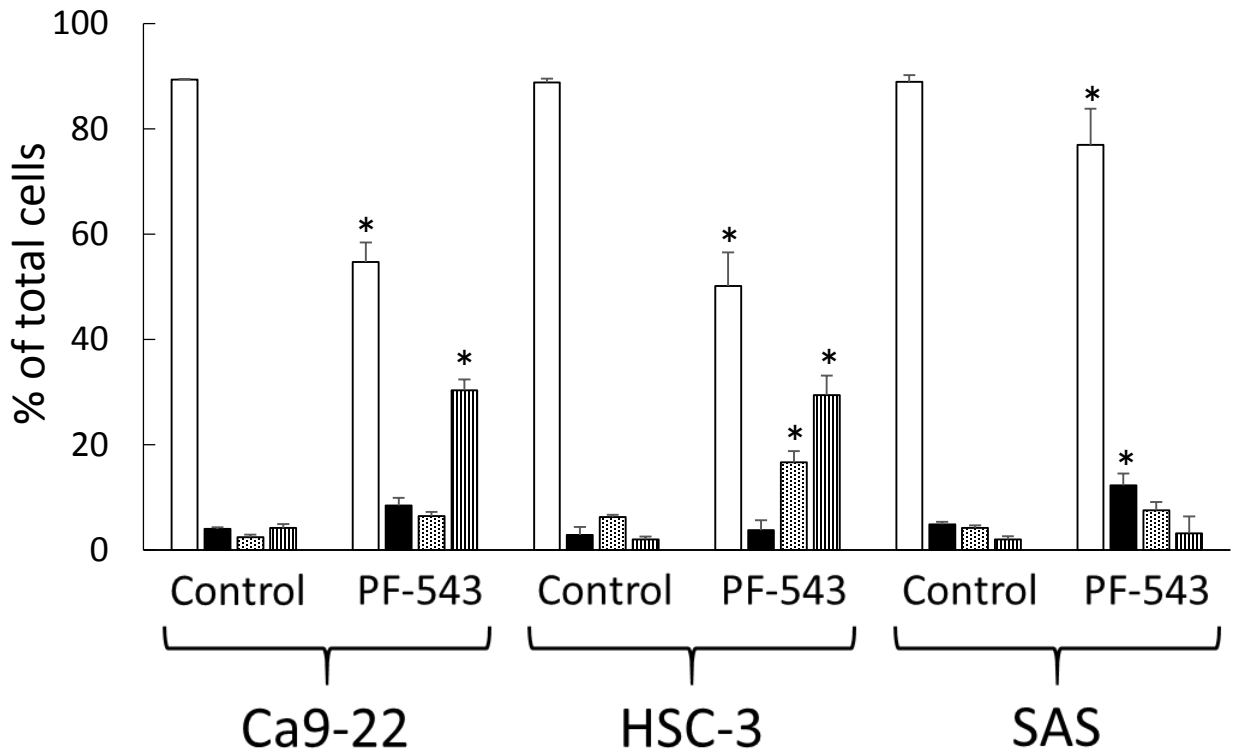
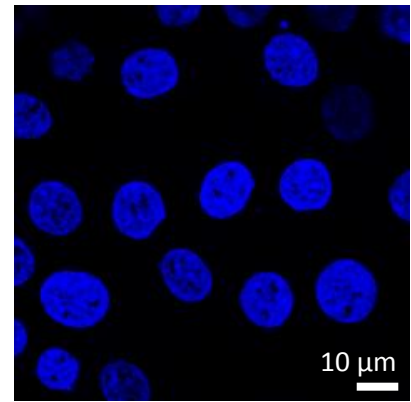
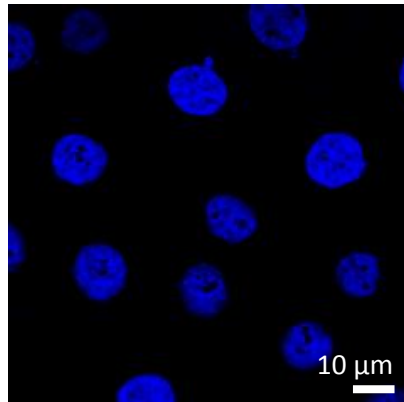


Figure 6A

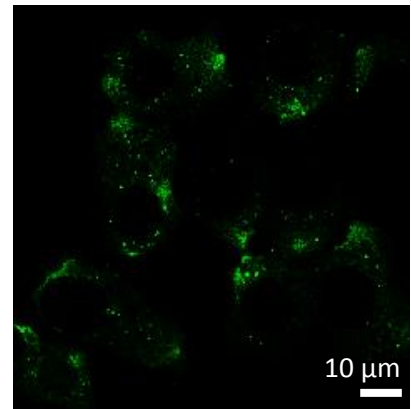
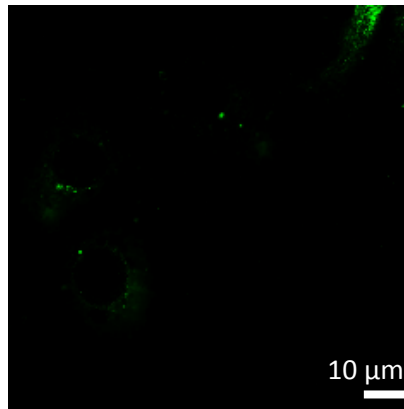
Control

PF-543

DAPI



LC3



merge

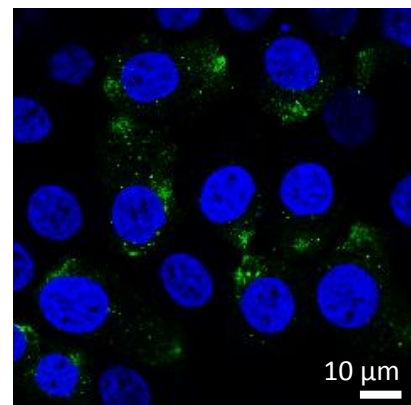
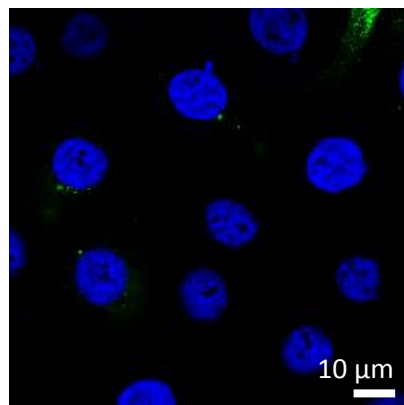


Figure 6B

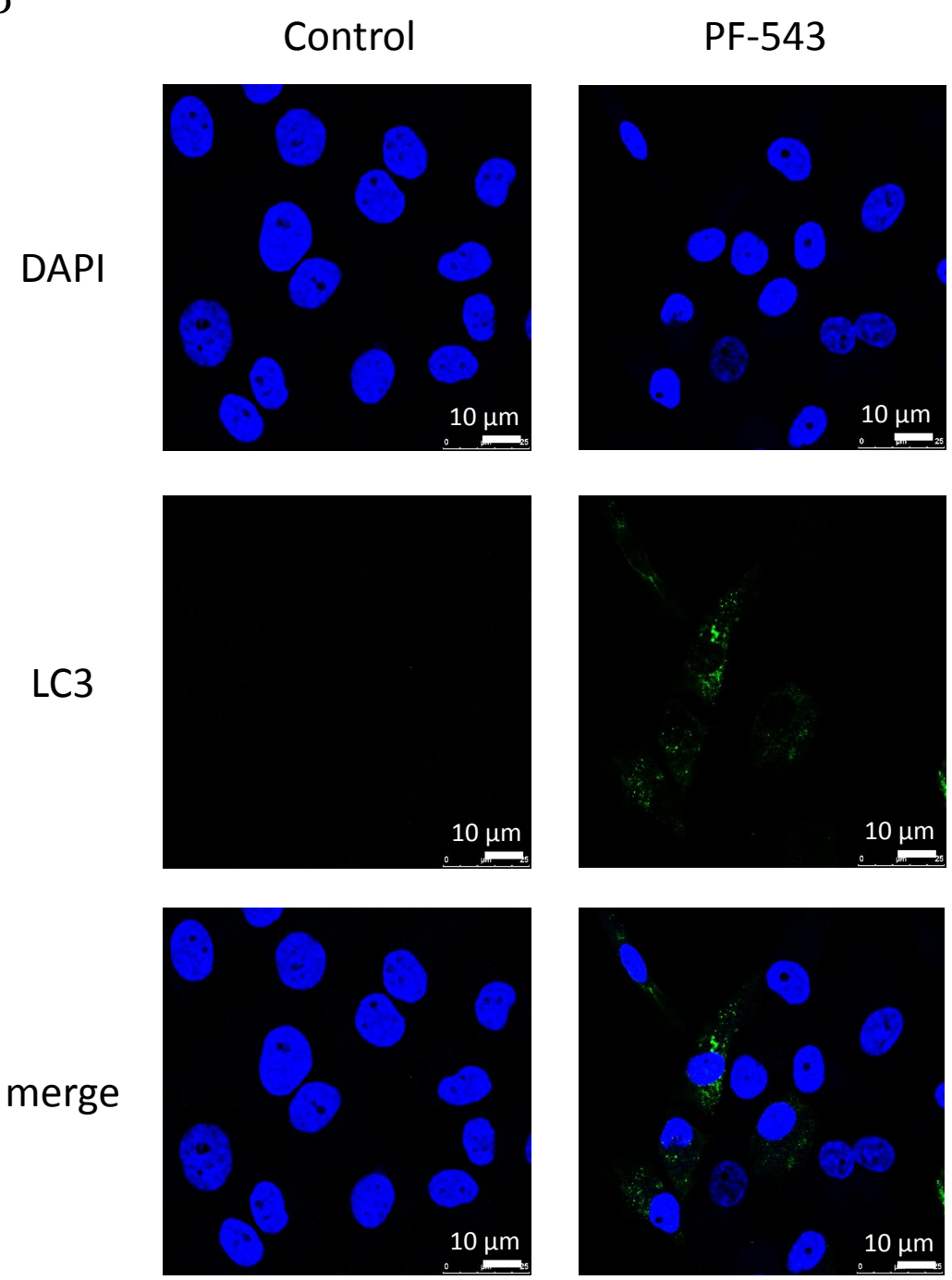


图6C

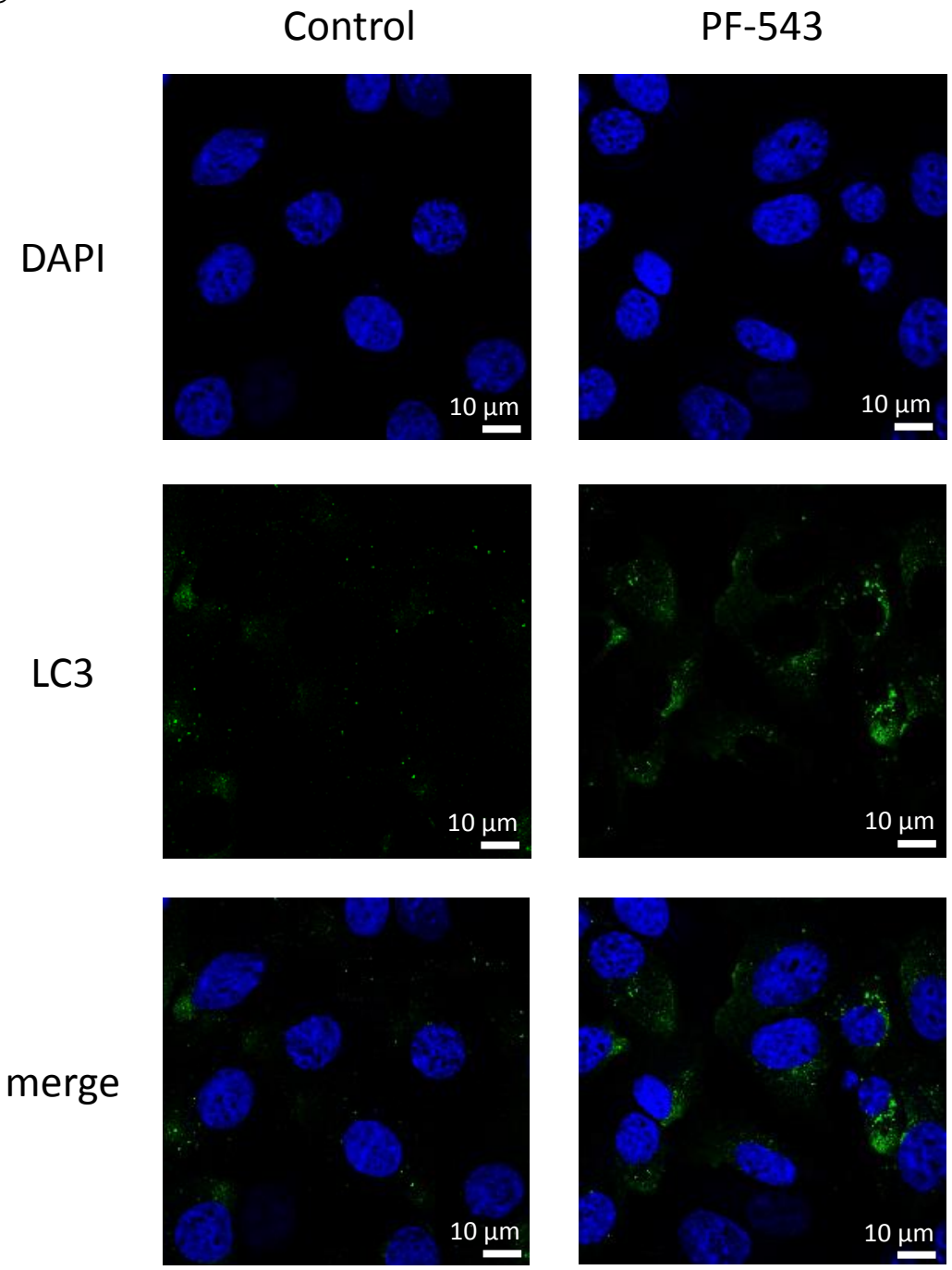
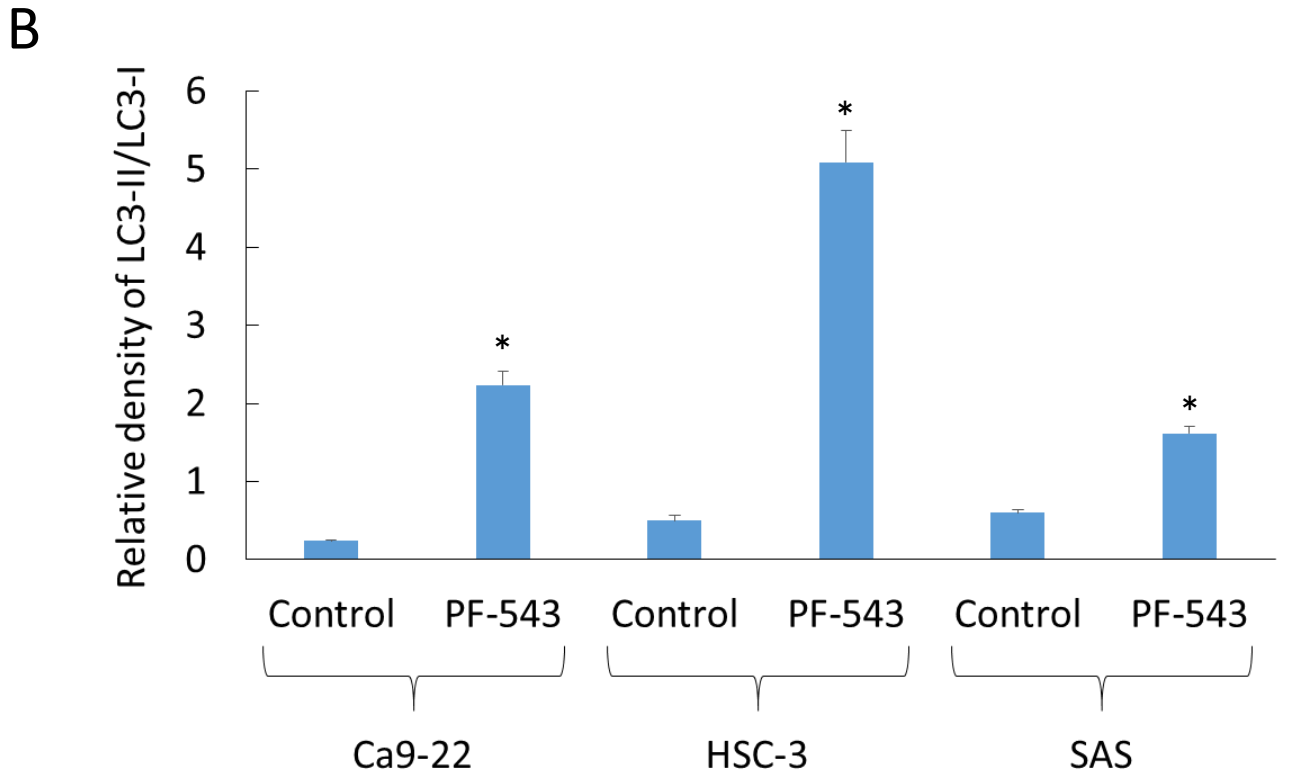
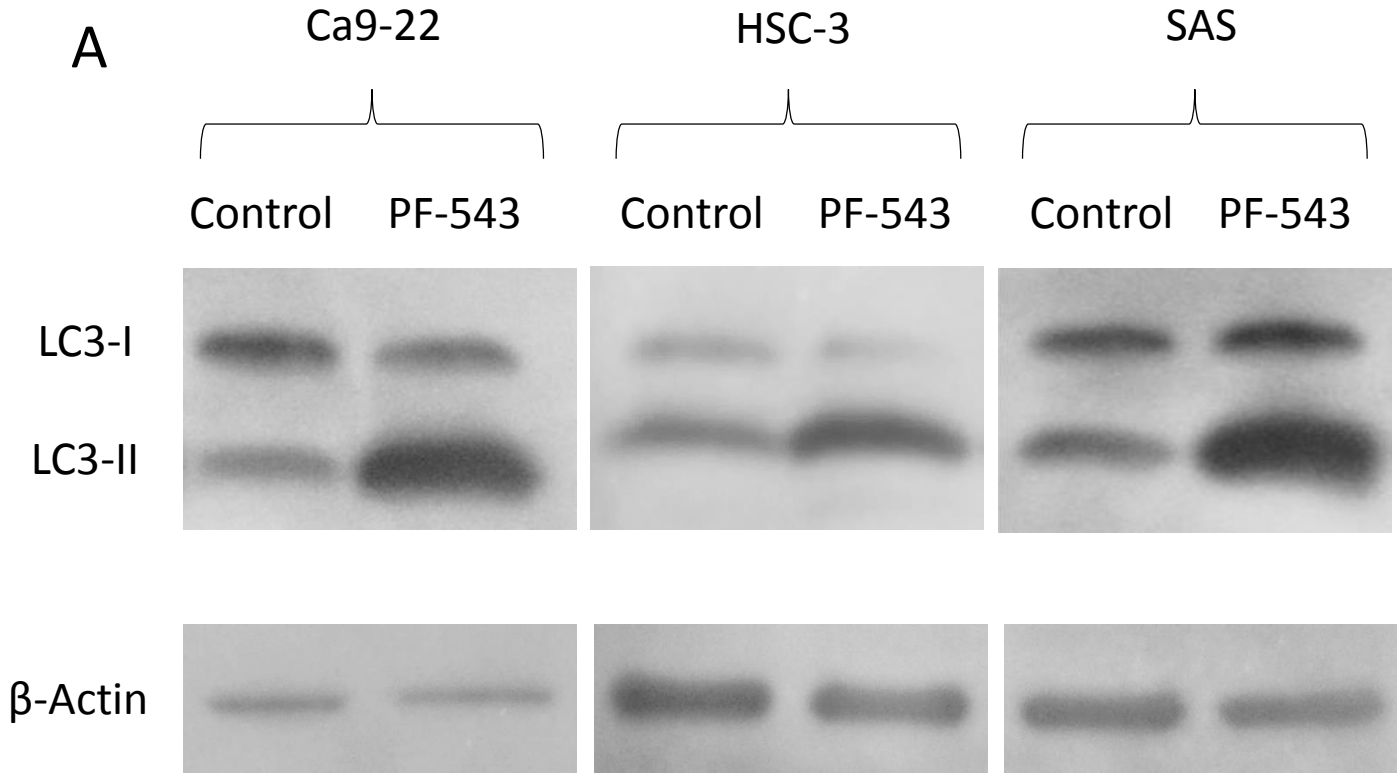
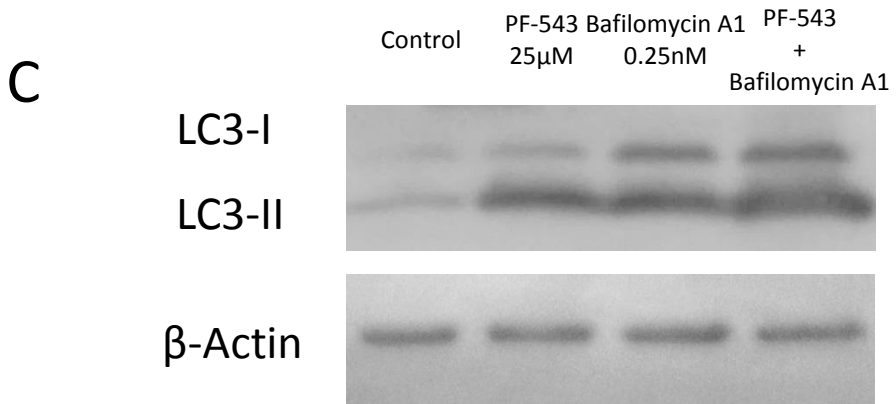
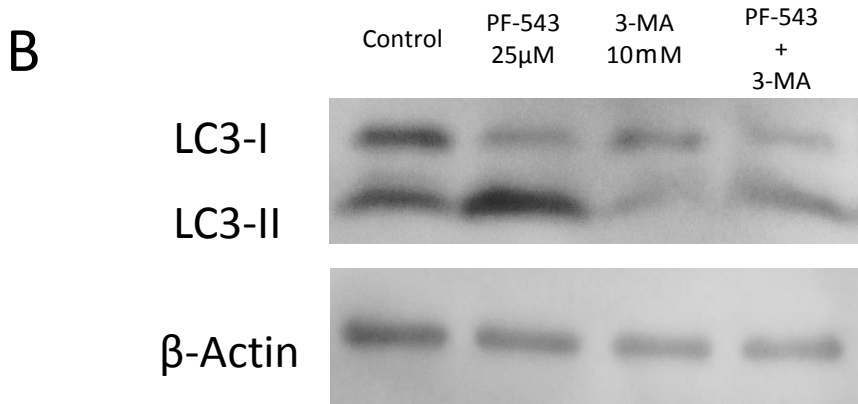
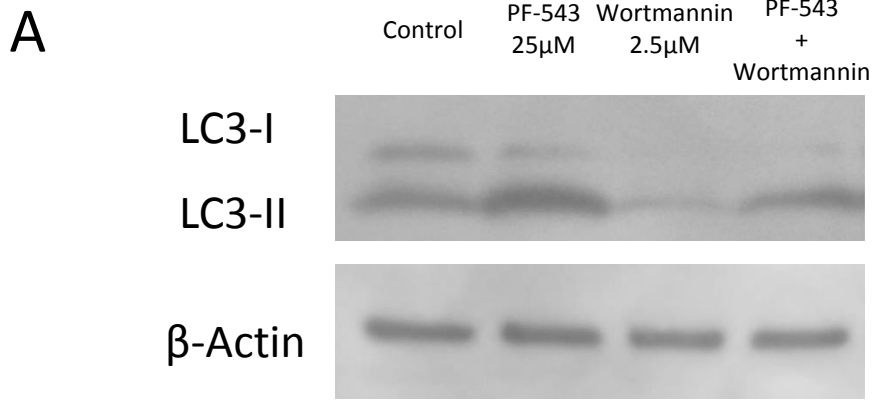


Figure 7





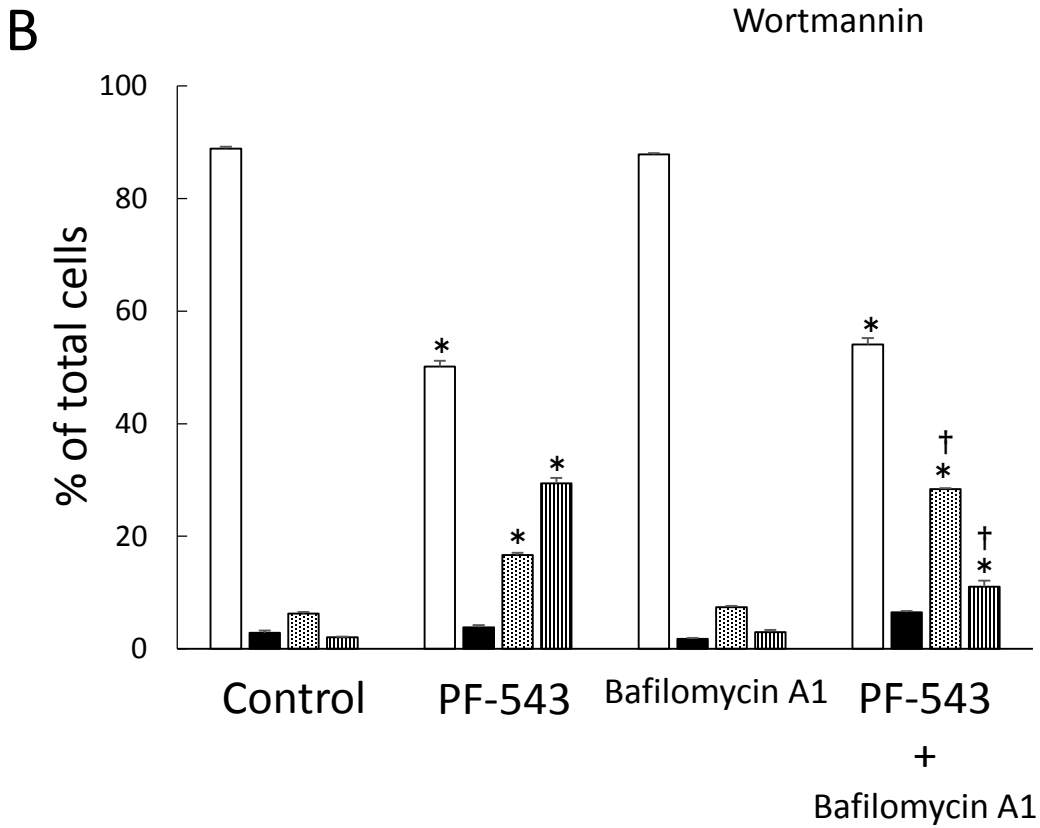
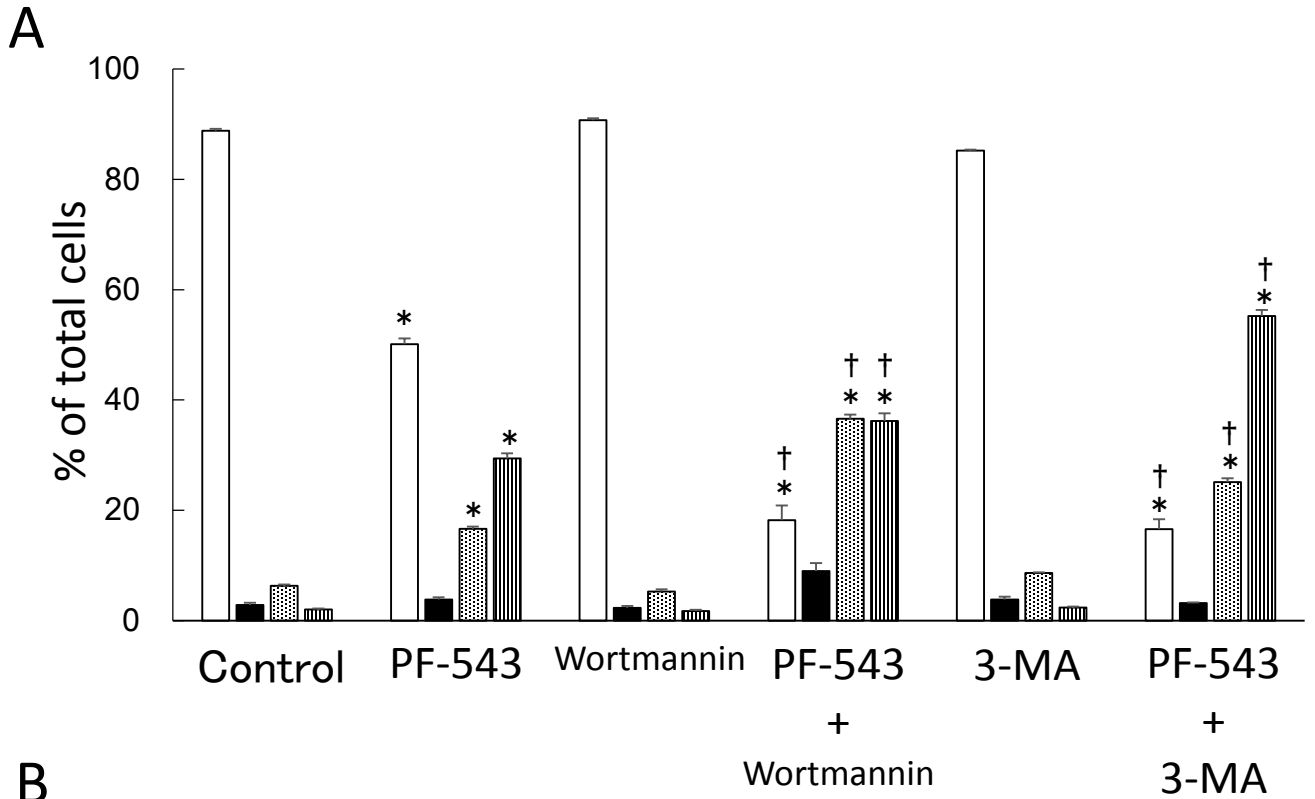


Figure 10

