

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

「ロ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, リンパ球トラフィキング, 血管新生や炎症等の細胞学的お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 ファゴフォアが形成され、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-dihydrosphingosine(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, 頭頚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 はヒトロ腔扁平上皮癌 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ロ腔 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-erythero-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 safingol 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 のヒトロ腔 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。 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。

細胞と培養方法

実験には 3 種類のヒトロ腔 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-gulutamine, 100 µg/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin を含む Dulbecco 変法 Eagle 培地 (DMEM: Nissui, Tokyo) を用い, 37℃, 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 後に位相差顕微鏡 (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 ニッケーター(TOMY, Tokyo)を用いて細胞を粉砕後,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℃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℃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 µl 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-tetrazoliumbromide (MTT) 液 10 µl を各 well に加え, さらに 37° で4時間培養 し, 0.04NHCl を含む isopropanol を 100 µl 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 して 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 1×10⁵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 ×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 µl の binding buffer (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂, pH 7.4) に 5 µl の FITC-annexin V と 1 µl 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× 10⁵ 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. ヒトロ腔 SCC 細胞における SphK1 の発現

3 種類のヒトロ腔 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 種類のヒトロ腔 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 がヒトロ腔 SCC 細胞の細胞生存と細胞形態に及ぼす影響

PF-543 がヒトロ腔 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 種類のヒトロ腔 SCC 細 胞は 25μM 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 種類のヒトロ腔

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 µM 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 でネクロー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)。

っぎに、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 μ M 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 safingol 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(sonepcizumab)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 SphK 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 例のヒトロ腔 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、ヒトロ腔 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 ロ腔 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 µM 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 µM 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、ヒトロ腔 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 種類のヒトロ腔 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 種類すべてのヒトロ腔 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い出 した。すなわち, SphK1 の発現がヒトロ腔 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, ヒトロ腔 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。Scarlatti 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 vaulole 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腺癌細胞 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⁾がヒトロ腔 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 置したヒトロ腔 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、ヒトロ腔 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、アポトーシスが増強されることより、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)。ヒトロ腔 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

- ヒトロ腔 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 細胞ではネクローシスの増強を, 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ーシスを増強した。
- HSC-3 細胞において、PF-543 により誘導されたネクロー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, ネクローシス, 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,田熊一敵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

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

- 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.
- 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.
- 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 electronmicroscopy 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 apopotosis 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-phopshate 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.
- 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.ロ科誌,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 sonepcizumab 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 safingol 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. ヒトロ腔 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 がヒトロ腔 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 μM 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 がヒトロ腔 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. ヒトロ腔 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. ヒトロ腔 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. ヒトロ腔 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 wortmannnin (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 µM の wortmannnin (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 µM 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 µM 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 スが増強される, あるいはアポトーシスが増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。 図1A



図1B











図6A

Control PF-543 DAPI 10 µm 10 µm 10 µm 10 µm 10 µm

merge

LC3

10 µm

図6B

図6C

Control

10 µm

10 µm

PF-543

DAPI

LC3

10 µm

Autophagy inhibitors