

糖鎖修飾異常による悪性中皮腫進展機構の解明

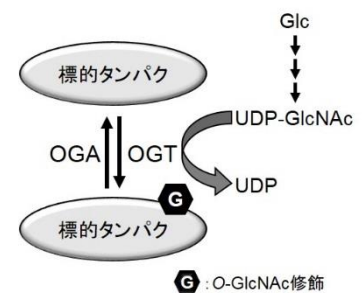
愛知県がんセンター研究所

分子腫瘍学分野 研究員 向井 智美

1. 研究の背景・目的

悪性中皮腫はアスベストの曝露によって引き起こされる、極めて高悪性度の腫瘍である。早期発見が難しく、根治的な外科的手術が困難な病気である。しかし、効果的な治療法がいまだに開発されておらず、病態の解明、および治療法・診断法の開発が急務である。

近年、様々ながんにおいて、*O*-GlcNAc (*O* 結合型- β -N-アセチルグルコサミン) 修飾が亢進することが報告されており (de Queiroz et al., *Front Oncol.*, 2014)、治療標的としての可能性が注目されている。*O*-GlcNAc 修飾は、グルコース (Glc) から生合成された糖供与体 (UDP-GlcNAc) が、OGT (*O*-GlcNAc 転移酵素) によって標的タンパクの Ser/Thr 残基に酵素付化される、糖鎖修飾のひとつである (図 1)。例えば、細胞のがん化に関わる p53, pRb, c-Myc, NF- κ B などが *O*-GlcNAc 修飾されると、タンパク質間相互作用の亢進、タンパク分解の抑制などを引き起こし、がん化の促進に寄与することが知られている。しかしその一方で、*O*-GlcNAc 修飾は正常細胞の生存にも必須である場合が多く、*O*-GlcNAc 阻害薬などを用いた治療は高リスクである。従って、がんの悪性化に関わる *O*-GlcNAc 修飾タンパクを同定し、その制御機構を明らかにすることが重要である。

図1 標的タンパクの*O*-GlcNAc修飾

悪性中皮腫における *O*-GlcNAc 修飾レベルや標的タンパクについては全く報告がないものの、申請者のこれまでの研究により、Hippo 経路の破綻した複数の悪性中皮腫細胞株において、ある特定タンパクの *O*-GlcNAc 修飾の亢進が認められた。さらにこれらの細胞において、*O*-GlcNAc 修飾阻害剤による抗腫瘍活性を検討したところ、阻害剤の濃度依存的に、悪性中皮腫細胞の細胞増殖が抑制された。これらの結果は、Hippo 経路の破綻した悪性中皮腫において、*O*-GlcNAc 修飾の抑制が新規治療戦略に応用可能であることを強く示唆している。そこで本研究では、悪性中皮腫における腫瘍進展を促進させる *O*-GlcNAc 修飾タンパクの同定および腫瘍進展メカニズムの解明を軸に、同定した *O*-GlcNAc 修飾タンパクの治療標的としての有用性を明らかにすることを目的とした。

2. 研究の対象ならびに方法

(1) Hippo 経路の破綻と O-GlcNAc 修飾亢進の関連

LATS1, LATS2 のノックダウンによって Hippo 経路を破綻させた不死化中皮細胞において、O-GlcNAc 修飾の亢進がみられるか否かをウエスタンブロッティングによって検証した。また、Hippo 経路の破綻によって転写共役因子として機能する YAP を不死化中皮細胞に強制発現させ、O-GlcNAc 修飾の亢進がみられるか否かをウエスタンブロッティングによって検証した。さらに、Hippo 経路の破綻した悪性中皮腫細胞株において、グルコーストランスポーターの転写亢進がみられるか否かを Real-Time PCR を用いて検証した。

(2) O-GlcNAc 修飾標的タンパクの決定

これまでに、Hippo 経路の破綻した悪性中皮腫細胞株における O-GlcNAc 修飾タンパクの同定を試み、その候補タンパクとして、核膜孔複合体構成因子である NUP214 に着目していた。実際に NUP214 が悪性中皮腫細胞において O-GlcNAc 修飾を受けるかを検証する一環として、Hippo 経路の破綻した悪性中皮腫細胞において NUP214 をノックダウンした際に、O-GlcNAc 修飾も減少するか否か、ウエスタンブロッティングによって検出した。

さらに、NUP214 の O-GlcNAc 修飾部位の同定を試みた。NUP214 の C 末端領域が O-GlcNAc 修飾されることを明らかにしていたため、その領域の中でも特に核外輸送に重要とされる FG-region の Ser/Thr 残基を Ala 置換した変異体を作製し、免疫沈降とウエスタンブロッティングによって O-GlcNAc 修飾の有無を検証した。

(3) 腫瘍進展の分子メカニズムの解明

(2) で作製した Ala 変異体を用いて、既知の結合タンパクである Exportin-1 との結合能を野生型と比較した。

(4) 阻害剤等を用いた抗腫瘍効果の検討

悪性中皮腫細胞株パネルを用いて Exportin-1 のノックダウンおよび阻害剤を用い、細胞生存能、増殖能への影響を CCK-8 (Dojindo) や生細胞解析システムを用いて評価した。

3. 研究結果

(1) Hippo 経路の破綻と O-GlcNAc 修飾亢進の関連

不死化中皮細胞 (MeT5A)において、*LATS1*, *LATS2* をノックダウンした結果、192kDa 付近のタンパクの O-GlcNAc 修飾が顕著に亢進した(図 2)。さらに、野生型 YAP (YAP-WT)、および活性化型 YAP (YAP-2A)を MeT5A に過剰発現させた結果、192kDa 付近のタンパクの O-GlcNAc 修飾が顕著に亢進した(図 3)。

MeT5A、Hippo 経路の破綻した悪性中皮腫細胞株 (Y-MESO-27, MSTO-211H)、Hippo 経路が正常な悪性中皮腫細胞株 (ACC-MESO-1)、それぞれにおける GLUT1, GLUT3 の発現量を Real-Time PCR によって検討した結果、Y-MESO-27, MSTO-211H において GLUT1, GLUT3 の発現量が増加していることが明らかとなった(図 4)。

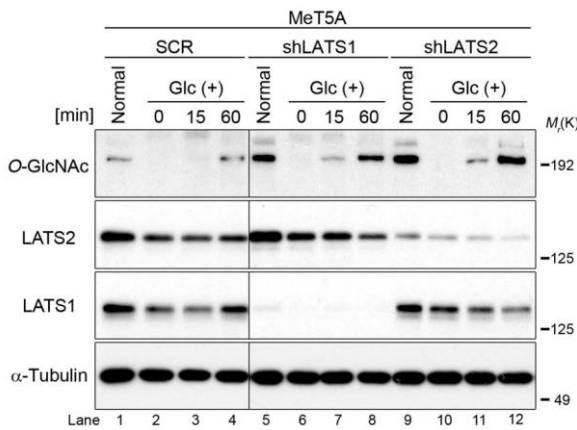


図2 *LATS1*, *LATS2* ノックダウン細胞における O-GlcNAc 修飾レベルの検討

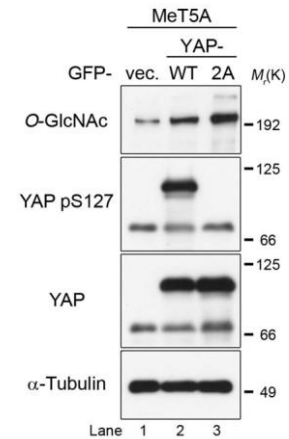


図3 YAP 過剰発現細胞における O-GlcNAc 修飾レベルの検討

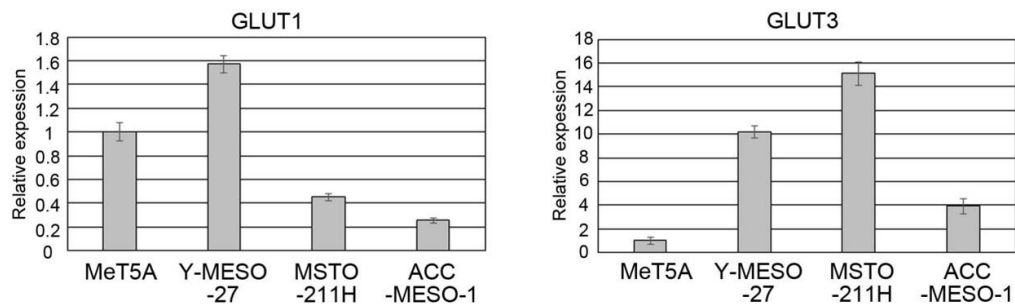


図4 各細胞における GLUT1, GLUT3 の発現量

(2) O-GlcNAc 修飾標的タンパクの決定

およそ 192kDa の O-GlcNAc 修飾標的タンパクとして候補に挙げていた NUP214 のノックダウンを Y-MESO-27 を用いて行った。その結果、同部位の O-GlcNAc 修飾がノックダウン効率に応じて減少した(図 5)。

さらに、NUP214 の核外輸送機能に重要な FG-region に存在する 26 か所の Ser/Thr を Ala 置換した変異体 (NUP214-FG-A) を作製した。免疫沈降とウェスタンブロッティングによる検証の結果、野生型に比べて O-GlcNAc 修飾が減少した(図 6 矢印)。

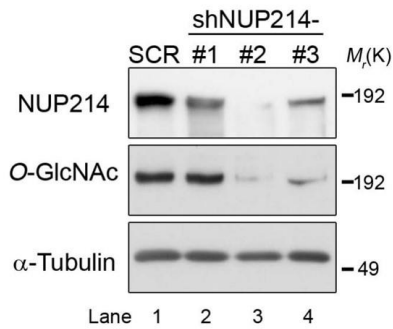


図5 NUP214ノックダウン細胞における O-GlcNAc修飾レベルの検討

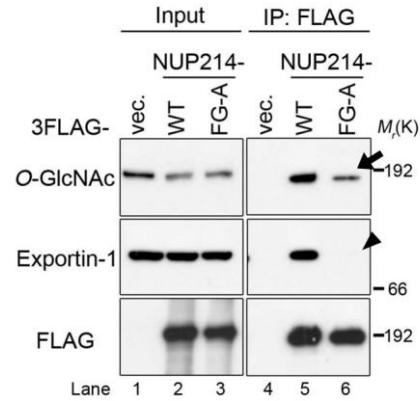


図6 NUP214 FG-regionのO-GlcNAc修飾レベルの検討、およびExportin-1との結合能の検討

(3) 腫瘍進展の分子メカニズムの解明

NUP214-FG-A と Exportin-1 の結合を免疫沈降実験により検討したところ、NUP214-WT と比較して結合能が減少した(図 6 矢じり)。

(4) 阻害剤を用いた抗腫瘍効果の検討

MeT5A, Y-MESO-27, MSTO-211H, ACC-MESO-1 を用いて、Exportin-1 のノックダウンを行い、細胞生存能を測定した。その結果、Y-MESO-27, MSTO-211H において細胞生存能が顕著に抑制された(図 7)。さらに、Exportin-1 の阻害剤を用いた結果、同様の結果が得られた。生細胞解析システムを用いた細胞増殖能の検討についても同様の結果が得られた。

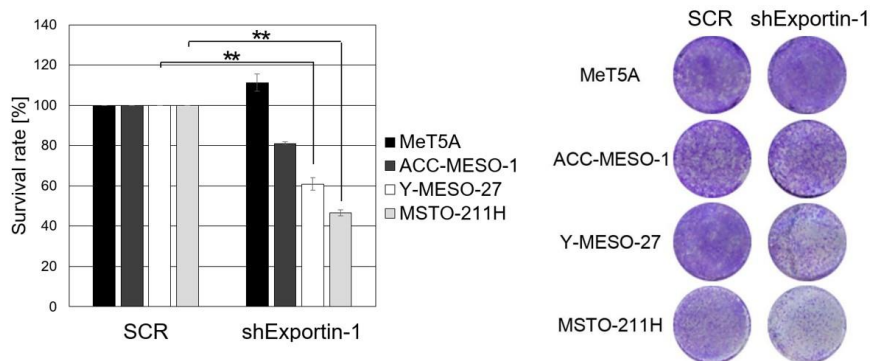


図7 各細胞におけるExportin-1ノックダウン時の細胞生存能の検討

4. 考察

これまでに当研究室では、日本人の悪性中皮腫患者より独自に中皮腫細胞株を多数樹立しており、これらの細胞株および、日本人患者組織サンプルを用いた Exome Seq. などから、悪性中皮腫患者には特徴的な遺伝子変異があることを明らかにしてきた。特に、腫瘍抑制性のシグナル経路である Hippo pathway の構成因子である、NF2 や LATS2 キナーゼの不活化変異は高頻度にみられ、Hippo pathway の破綻が悪性中皮腫の進展に大きく寄与することを報告している (Sekido et al., 1995; Murakami et al., 2011; Matsushita, Sato, Mukai et al., 2019)。

申請者は今回新たに、Hippo 経路の破綻した悪性中皮腫細胞株において O-GlcNAc 修飾が亢進することを見出した。特に NUP214 の O-GlcNAc 修飾が顕著であり、Hippo 経路構成因子のノックダウンや過剰発現によってその修飾レベルが変動することから、Hippo 経路依存的に修飾が制御される可能性が示唆された。

これまでに、いくつかのがん細胞において YAP の標的遺伝子としてグルコーストランスポーターである GLUT1 や GLUT3 が報告されている (Wang et al., 2015; Peng C et al., 2017)。Hippo 経路の破綻した悪性中皮腫においてもこれらの発現が増加したことから、Hippo 経路の破綻によってグルコースの取り込みが活性化し、O-GlcNAc 修飾が亢進したと考えられる。

NUP214 は核膜孔複合体構成因子のひとつで、細胞質側に局在する。核外輸送に機能し、核外輸送受容体である Exportin-1 との結合が必要とされている。その結合部位は NUP214 の C 末端に位置する FG-region であることから、悪性中皮腫細胞における NUP214 FG-region の O-GlcNAc 修飾の有無を検討した。その結果、この部位は O-GlcNAc 修飾を受け、さらに、この修飾が Exportin-1 との結合を亢進させる可能性が示唆された。Exportin-1 の cargo タンパクの多くは、核内で機能するがん抑制遺伝子であるため、近年多発性骨髄腫において Exportin-1 阻害剤投与による治療が行われている。O-GlcNAc 修飾が亢進している悪性中皮腫においても Exportin-1 の阻害による細胞増殖抑制がみられたことから、この阻害剤が治療に有効である可能性が示唆された。今後は NUP214 の O-GlcNAc 修飾による核外輸送の亢進メカニズムをさらに検証し、Exportin-1 の阻害による抗腫瘍効果についてもさらなる検討をすすめることとする。

5. 文献

1. Sekido Y, Pass HI, Bader S, Mew DJ, Christman MF, Gazdar AF, Minna JD. Neurofibromatosis type 2 (NF2) gene is somatically mutated in mesothelioma but not in lung cancer. Cancer Res. 1995 Mar 15;55(6):1227-31.

2. Murakami H, Mizuno T, Taniguchi T, Fujii M, Ishiguro F, Fukui T, Akatsuka S, Horio Y, Hida T, Kondo Y, Toyokuni S, Osada H, Sekido Y. LATS2 is a tumor suppressor gene of malignant mesothelioma. *Cancer Res.* 2011 Feb 1;71(3):873-83.
3. Matsushita A, Sato T, Mukai S, Fujishita T, Mishiro-Sato E, Okuda M, Aoki M, Hasegawa Y, Sekido Y. TAZ activation by Hippo pathway dysregulation induces cytokine gene expression and promotes mesothelial cell transformation. *Oncogene.* 2019 Mar;38(11):1966-1978.
4. Wang W, Xiao ZD, Li X, Aziz KE, Gan B, Johnson RL, Chen J. AMPK modulates Hippo pathway activity to regulate energy homeostasis. *Nat Cell Biol.* 2015 Apr;17(4):490-499
5. Peng C, Zhu Y, Zhang W, Liao Q, Chen Y, Zhao X, Guo Q, Shen P, Zhen B, Qian X, Yang D, Zhang JS, Xiao D, Qin W, Pei H. Regulation of the Hippo-YAP pathway by glucose sensor O-GlcNAcylation. *Mol Cell.* 2017 Nov 2;68(3):591-604

6. 論文発表

1. Mukai S, Sato T, Mishiro-Sato E et al., *O-GlcNAcylation promotes malignant mesothelioma tumor progression.* 第78回日本癌学会学術総会、ポスター発表, 2019. 京都