

# 核膜孔複合体構成因子の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、アスベスト曝露から 30~40 年の潜伏期間を経て発症する難治性の希少がんである。早期診断が困難で、診断時には既に根治的な手術が難しい。薬物療法としては、シスプラチン、ペメトレキセドの併用療法、さらに近年では抗 PD1 抗体ニボルマブが使用されているが患者の予後は未だ不良で、効果的な分子標的治療法も確立されていない。これまでに当研究室では、日本人の悪性中皮腫患者におけるゲノム異常の解析を行い、腫瘍抑制性のシグナル経路である Hippo 経路の構成因子 NF2 や LATS2 キナーゼの不活化変異を見出した。これらの変異による Hippo 経路の破綻が下流の転写共役因子 YAP/TAZ の活性化を引き起こし、腫瘍進展を促進することを明らかにしている。しかし、YAP/TAZ を標的とした薬剤は臨床応用に至っておらず、新たな観点からの治療薬の探索が望まれている。

翻訳後修飾のひとつである O-GlcNAc (O 結合型-β-N-アセチルグルコサミン) 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に酵素付化される (図 1)。様々ながんでは O-GlcNAc 修飾が亢進することが報告されており、治療標的、バイオマーカーとしての可能性が注目されている。細胞質や核内に局在する様々なタンパク質が修飾標的となり、腫瘍進展に寄与することが明らかとなっている一方で、O-GlcNAc 修飾自体は正常細胞の生存にも必須であるため、O-GlcNAc 修飾阻害剤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、腫瘍進展メカニズムを明らかにした上で治療標的を決定することが重要と考える。

これまでに申請者は、Hippo 経路の破綻した複数の悪性中皮腫細胞株において、O-GlcNAc 修飾の亢進が認められること、また、これらの細胞において、O-GlcNAc 修飾

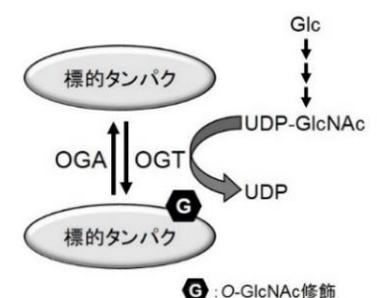


図1 標的タンパクのO-GlcNAc修飾

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細胞増殖が抑制されることを見出している。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。さらに、質量分析を用いて修飾標的たんぱく質の同定を試みた。その結果、複数の候補タンパクが得られたが、Hippo 経路の破綻による修飾レベルに対する影響が特に大きかったのは、核膜孔複合体構成因子であった。

本研究では、Hippo 経路の破綻した悪性中皮腫における核膜孔複合体構成因子の O-GlcNAc 修飾亢進が、どのようなメカニズムで腫瘍進展に寄与するのかを解析し、新規の治療標的を見出すことを目的とした。

## 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

Hippo 経路の破綻による O-GlcNAc 修飾の亢進が、どのようなメカニズムで起きているかを明らかにするため、不死化中皮細胞株 MeT-5A および O-GlcNAc 修飾の亢進がみられる Hippo 経路の破綻した悪性中皮腫細胞株 Y-MESO-27, MSTO-211H を用いて、O-GlcNAc 修飾に関わるタンパク質の発現量を Real-Time PCR およびウエスタンブロッティングによって解析した。また、Y-MESO-27 を用いて、Hippo 経路下流の転写共役因子 YAP/TAZ をノックダウンし、同様の解析を行った。

### (2) 核膜孔複合体構成因子の O-GlcNAc 修飾部位について

これまでに、Hippo 経路の破綻した悪性中皮腫細胞株において、核膜孔複合体構成因子 NUP214 の C 末端側の FG-repeats 領域が O-GlcNAc 修飾を受けることを明らかにしていた。その他にも、同じく核膜孔複合体構成因子である NUP62 の O-GlcNAc 修飾が亢進しており、実際に NUP62 が悪性中皮腫細胞において O-GlcNAc 修飾を受けるかを検証した。さらに、NUP62 の O-GlcNAc 修飾部位の同定するため、NUP62 全長を 3 つに断片化したコンストラクトを作製し、免疫沈降とウエスタンブロッティングによって修飾部位を同定した。

### (3) 腫瘍進展の分子メカニズムと治療標的の検討

近年、核膜孔複合体構成因子の FG-repeats 領域の O-GlcNAc 修飾が亢進すると、核輸

送が活発になることが報告された。悪性中皮腫では核膜孔複合体構成因子の *O*-GlcNAc 修飾の亢進によって、核輸送が活性化している可能性が高い。そこで核輸送受容体である CRM1 (Exportin-1) のカーゴタンパク質の局在を *O*-GlcNAc 修飾の有無で比較検討する系の構築を試みた。

#### (4) 阻害剤等を用いた抗腫瘍効果の検討

既に、CRM1 のノックダウンによって Y-MESO-27, MSTO-211H の細胞増殖が抑制されることを明らかにしている。そこで、ノックダウン細胞を用いてマウスに皮下移植を行い、腫瘍形成能をモニタリングした。さらに、Y-MESO-27 をマウスに皮下移植し、CRM1 の阻害剤を経口投与することで、抗腫瘍効果が得られるか検討した。

### 3. 研究結果

#### (1) Hippo 経路の破綻と *O*-GlcNAc 修飾亢進の関連

これまでに YAP/TAZ の標的遺伝子として、グルコーストランスポーター GLUT1/3、OGT が報告されている。MeT-5A, Y-MESO-27, MSTO-211H を用いてこれらの発現量を検討した結果、YAP/TAZ が活性化している Y-MESO-27, MSTO-211H では MeT-5A と比較すると GLUT1/3 の発現量が上昇していることが明らかとなった。Y-MESO-27 を用いて、YAP/TAZ のノックダウンを行い、同様の解析を行った結果、GLUT1 の発現量の減少 (図 2)、およびグルコース (2DG) の取り込み量の減少がみられた (図 3)。

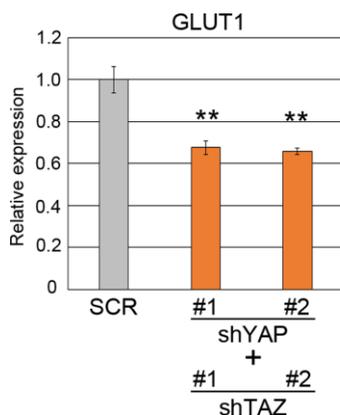


図2 Y-MESO-27における YAP/TAZ ノックダウン時の GLUT1 mRNA 発現量

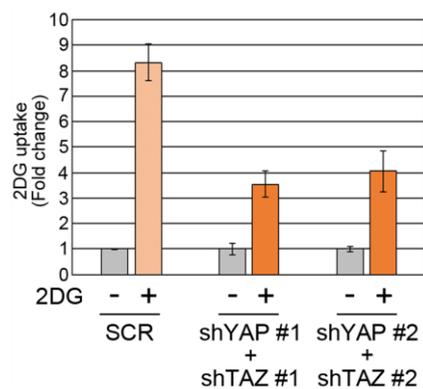


図3 Y-MESO-27における YAP/TAZ ノックダウン時の グルコース (2DG) 取り込み量

#### (2) 核膜孔複合体構成因子の *O*-GlcNAc 修飾部位について

NUP62 全長と 3 断片の免疫沈降およびウエスタンブロッティングの結果、NUP62 の N

末端側に位置する FG-repeats 領域が O-GlcNAc 修飾を受ける事が明らかとなった。

### (3) 腫瘍進展の分子メカニズムと治療標的の検討

種々の核輸送受容体のうち、既に一部のがんで治療標的とされている CRM1 に着目した。Y-MESO-27 において CRM1 のカーゴタンパク質である p53, Survivin について内在性タンパクの局在を観察した。しかし、CRM1 阻害剤を添加してもこれらの局在が変化しなかった。

### (4) 阻害剤等を用いた抗腫瘍効果の検討

Y-MESO-27 を用いて CRM1 のノックダウンを行い、マウスに皮下移植し経時的にモニタリングした結果、コントロール細胞もしくは、ノックダウン効率の悪い細胞では腫瘍形成されるのに対し、ノックダウン効率の良い細胞では腫瘍形成されなかった (図 4, 5)。

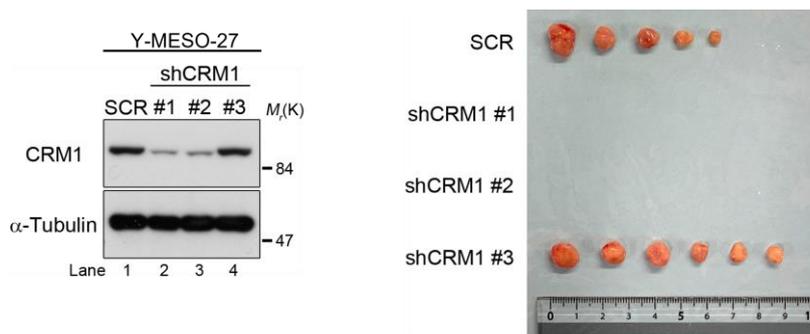


図4 CRM1 のノックダウン効率の検証

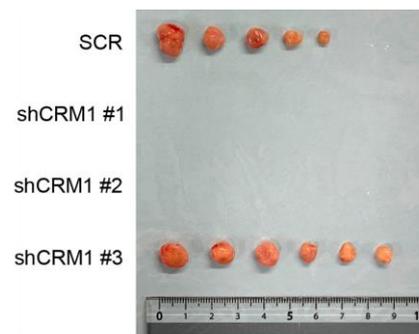


図5 CRM1 ノックダウン細胞の皮下移植後 55 日目の抽出サンプル

## 4. 考察

申請者は、これまでに 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、今回そのグローバルな O-GlcNAc 修飾亢進のメカニズムについて検討した。これまでに、いくつかのがん細胞において YAP/TAZ 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 Y-MESO-27, MSTO-211H においても、これらの発現量が MeT-5A と比較して優位に増加し、反対に Y-MESO-27 においては YAP/TAZ の抑制によって GLUT1 の発現が減少した。このことから、Hippo 経路の破綻による YAP/TAZ の活性化によって GLUT1 の発現量が増加し、グルコースの取り込みが活性化した結果、O-GlcNAc 修飾が亢進したと考えられる。

核膜孔複合体構成因子は代表的な O-GlcNAc 修飾タンパクである。近年、FG-repeats 領

域の *O*-GlcNAc 修飾が核輸送の亢進に寄与することが報告され (文献 1)、悪性中皮腫における NUP62, NUP214 の FG-repeats 領域の *O*-GlcNAc 修飾の亢進が核輸送の活性化を誘導することが考えられた。これを実験的に証明する系の構築を試みたが、今回の方法では検出に至らず、現在他の方法で検証中である。

がん細胞では核輸送が活発で、核輸送の阻害に対して脆弱である (文献 2, 3)。様々な核輸送阻害剤が開発されているが、唯一 CRM1 阻害剤 Selinexor のみが実臨床で使用されている。そこで、*O*-GlcNAc 修飾の亢進した悪性中皮腫においても CRM1 の阻害による抗腫瘍効果が得られるかを検討することとした。既に培養細胞レベルでは CRM1 のノックダウンによって細胞増殖が抑制されることを明らかとしており、今回新たに CRM1 ノックダウン細胞をヌードマウスに皮下移植すると造腫瘍能が抑制されることを明らかにした。現在、ヌードマウスに Y-MESO-27 を皮下移植し、Selinexor の経口投与によって抗腫瘍効果が得られるか検証中である。

今後は悪性中皮腫における NUP62, NUP214 の *O*-GlcNAc 修飾による核輸送についてさらに検証し、より詳細に腫瘍進展メカニズムを解析する。

## 5. 文献

1. *O*-GlcNAc modification of nuclear pore complexes accelerates bidirectional transport.  
Yoo TY, Mitchison TJ. J Cell Biol. Jul 5;220(7):e202010141 (2021).
2. Inhibition of the nuclear transporter, Kpnbeta1, results in prolonged mitotic arrest and activation of the intrinsic apoptotic pathway in cervical cancer cells.  
Angus, L., van der Watt, P. J. & Leaner, V. D. Carcinogenesis 35, 1121–1131 (2014).
3. Hyper- dependence of breast cancer cell types on the nuclear transporter Importin  $\beta$ 1.  
Kuusisto, H. V. & Jans, D. A. Biochim. Biophys. Acta 1853, 1870–1878 (2015).

## 6. 論文発表

1. 向井智美、佐藤龍洋、三城恵美、青木正博、藪田紀一、関戸好孝  
悪性中皮腫における *O*-GlcNAc 修飾異常を介した腫瘍進展メカニズムの解明  
第 44 回日本分子生物学会年会 (2021.12.1~3)、ポスター発表、神奈川・オンライン