

核膜孔複合体構成因子の糖鎖修飾異常が誘導する 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

基礎生物学研究所 超階層生物学センター

バイオイメージング解析室 RMC 教授 亀井 保博

RMC 助教 加藤 輝

1. 研究の背景・目的

中皮腫は難治性の希少がんで、奏効率の高い治療薬がないこと、治療薬の選択肢が少ないことが問題である。中皮腫の約4割は、腫瘍抑制性のシグナル経路である Hippo 経路の構成因子 NF2, LATS2 キナーゼの不活化変異を有し、Hippo 経路が破綻していることが特徴的である。しかし、これを原因とする様々な細胞内シグナル伝達異常のうち、治療標的候補は転写因子 TEAD のみで、TEAD 阻害剤もその適応には至っておらず、新たな観点からの治療薬創出が求められている。

Hippo 経路の破綻はグルコース (Glc) の細胞内取り込みを促進し、細胞内代謝を改変する。最近申請者らは、Hippo 経路の破綻した中皮腫細胞株および、患者腫瘍組織において、Glc から生合成される単糖 GlcNAc が標的タンパク質に付加される翻訳後修飾 O-GlcNAc 修飾が顕著に亢進していることを見出した。さらに、その主たる標的タンパク質として複数の核膜孔複合体構成因子 (ヌクレオポリン) を同定した。核膜孔複合体は、核-細胞質間の物質輸送のゲート

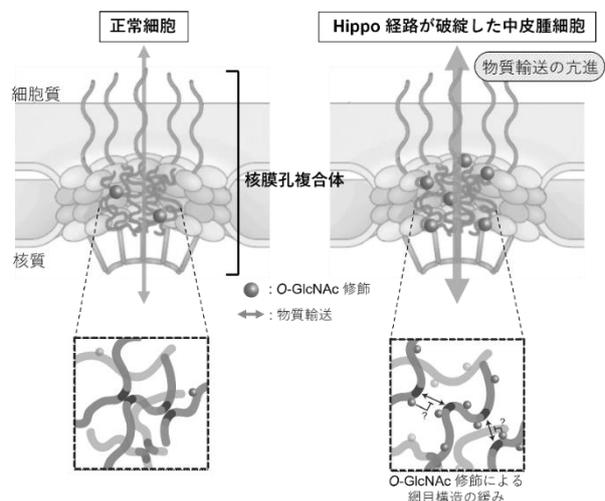


図1 O-GlcNAc 修飾による物質輸送の脱制御

キーパーとして機能する。近年、ヌクレオポリンの O-GlcNAc 修飾は、核膜孔の網目構造を緩め、物質輸送の亢進に寄与することが報告されたことから (文献 1)、申請者らは、Hippo 経路が破綻した中皮腫では、過剰な O-GlcNAc 修飾によって核-細胞質間の物質輸送が亢

進していると予測している（図1）。本研究では、がん細胞における核-細胞質間の物質送動態の統合的な理解を目指し、中皮腫におけるヌクレオポリンの過剰な *O*-GlcNAc 修飾と核輸送動態との関連、腫瘍進展との関連について解明することを目的とし、Hippo 経路の破綻した中皮腫に対する新規治療薬開発の足掛かりとすることとした。

2. 研究の対象ならびに方法

1) *O*-GlcNAc 修飾と核輸送速度についての解析

核輸送動態を解析するため、輸送動態を可視化し、輸送速度を定量化する実験系の構築を行った。まず、核外輸送動態の可視化のために、Optogenetics（光遺伝学）を利用した蛍光プローブを用いた。こ

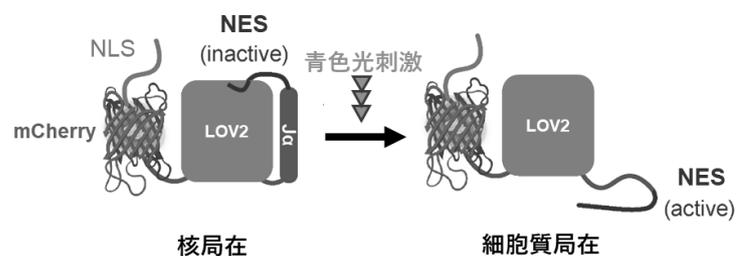


図2 核外輸送動態を可視化するための蛍光プローブ

のプローブは、核内輸送シグナル (NLS) を付加した蛍光タンパク質 mCherry と、核外輸送シグナル (NES) を付加した光受容体タンパク質フォトトロピンの LOV2-J α ドメインからなる（図2）。光刺激前、プローブは NLS が優位で核内に局在するが、光刺激によって立体構造が変化することで NES が優位となり、速やかに細胞質へと輸送される。光刺激前後の核内のプローブ蛍光輝度を経時的に測定し、その減衰曲線から近似式を算出し、核外輸送の速度定数を求めることが可能である。このプローブを中皮腫細胞に安定発現し、*O*-GlcNAc 修飾の有無で輸送速度に変化がみられるか解析した。

2) 核輸送異常をきたした中皮腫細胞に対する核輸送阻害剤の抗腫瘍効果の検討

核外輸送を担う代表的な核輸送受容体は XPO1/CRM1 である。また、核内輸送を担う代表的な受容体は、Importin α/β である。これらの阻害剤の細胞増殖能への影響について、生細胞モニタリング装置 IncucyteS3 または CM30 を利用して解析した。

3. 研究結果

1) *O*-GlcNAc 修飾と核輸送速度についての解析

O-GlcNAc 修飾が亢進している中皮腫細胞 Y-MESO-27 に、図2のプローブを安定発現させた細胞を準備した。この細胞に、DMSO を添加したコントロール細胞と、*O*-GlcNAc 修

飾阻害剤 OSMI-4 を添加した細胞を準備し、核輸送動態を解析した。その結果、コントロール細胞では、光刺激後、核外輸送が速やかにおこるのに対し、OSMI-4 添加細胞は核外輸送が遅くなる様子が可視化され (図 3,A)、定量的な解析によっても同様のことが示された (図 3, B)。さらに、OSMI-4 の添加によって細胞増殖も優位に抑制されることが明らかとなった。これらの結果から、O-GlcNAc 修飾の亢進によって核外輸送が活発になること、また、核外輸送が抑制されると、細胞増殖が抑制される可能性が示唆された。

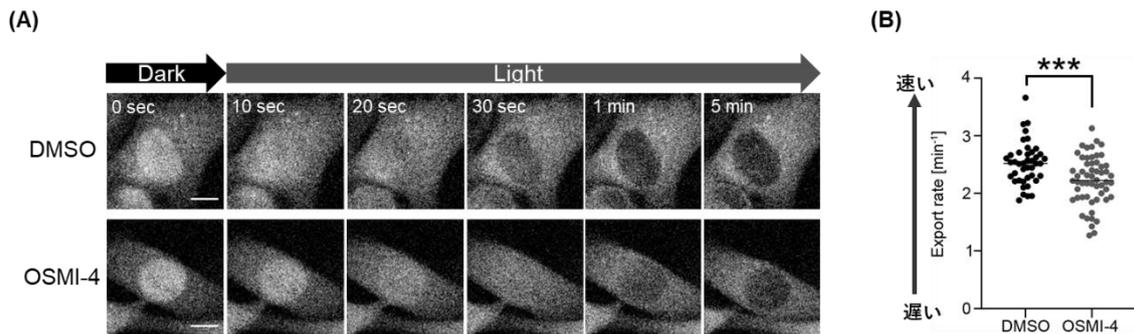


図3 O-GlcNAc 修飾の有無による核外輸送動態の変化

2) 核輸送異常をきたした中皮腫細胞に対する核輸送阻害剤の抗腫瘍効果の検討

核輸送が活発となった中皮腫細胞は、核輸送阻害に対して脆弱である可能性が高い。そこで、核輸送阻害剤の細胞増殖抑制効果を検討した。核外輸送受容体 XPO1/CRM1 の阻害剤である KPT-330 の細胞増殖能への影響を検討した結果、O-GlcNAc 修飾レベルの高い中皮腫細胞

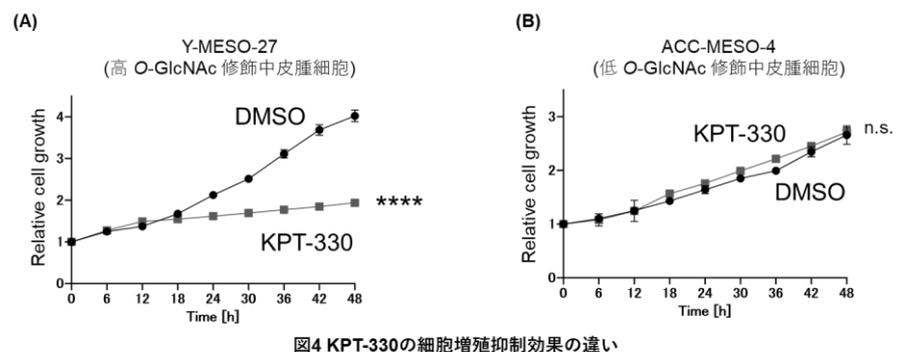


図4 KPT-330の細胞増殖抑制効果の違い

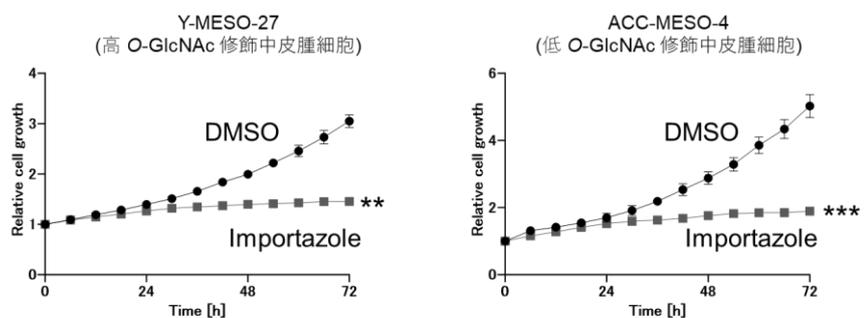


図5 Importazole の細胞増殖抑制効果

に対して高い感受性を示すのに対し（図 4,A）、*O*-GlcNAc 修飾レベルの低い中皮腫細胞に対しては細胞増殖抑制効果が得られなかった（図 4,B）。一方で、核内輸送受容体 Importin β の阻害剤である Importazole は、*O*-GlcNAc 修飾レベルに関わらず、有意な細胞増殖抑制効果が得られた（図 5）。

4. 考察

ヌクレオポリンは代表的な *O*-GlcNAc 修飾タンパクである。近年、ヌクレオポリンの *O*-GlcNAc 修飾が核輸送（核外輸送・核内輸送）の亢進に寄与することが報告された（文献 1）。中皮腫細胞において確立した核外輸送動態解析システムにより、この修飾が核外輸送を促進することを明らかにした。さらに、KPT-330 による核外輸送の阻害により細胞増殖抑制効果が得られることを明らかにした。これらのことは、*O*-GlcNAc 修飾が亢進した中皮腫に対して、KPT-330 の治療が有効であることを示している。実際に、KPT-330 は、難治性の B 細胞リンパ腫や多発性骨髄腫の治療薬として臨床応用されており（文献 2）、中皮腫においても治療薬として効果を発揮する可能性が高い。

中皮腫において、核外輸送が *O*-GlcNAc 修飾による制御を受けることを明らかにした一方で、核内輸送については現段階では明らかにできていない。しかし、申請者らは、核内輸送は *O*-GlcNAc 修飾による制御を受けないと考えている。なぜなら、核内輸送阻害剤 Importazole が、KPT-330 とは異なり、*O*-GlcNAc 修飾レベルに関わらず細胞増殖抑制能を発揮したためである。中皮腫細胞において *O*-GlcNAc 修飾が過剰となるヌクレオポリン（NUP214）が、核内輸送よりも核外輸送への寄与が大きいタンパク質であったことが原因かもしれない（文献 3）。

以上のように、中皮腫細胞では、*O*-GlcNAc 修飾の亢進による核外輸送の活性化および、*O*-GlcNAc 修飾の制御によらない核内輸送の活性化が生じていると考えられる。今後はこれらの異常を足掛かりとし、治療標的分子の同定を行っていく。

5. 文献

1. *O*-GlcNAc modification of nuclear pore complexes accelerates bidirectional transport.
Yoo TY, Mitchison TJ. *J Cell Biol.* 220(7):e202010141 (2021).
2. The nuclear export protein XPO1 - from biology to targeted therapy.
Azmi, A.S., M.H. Uddin, and R.M. Mohammad. *Nat Rev Clin Oncol* 18:152-169.(2021).
3. Nup214 is required for CRM1-dependent nuclear protein export in vivo.

Hutten, S., and R.H. Kehlenbach. *Mol Cell Biol* 26:6772-6785. (2006).

6. 論文発表

1) 論文

申請者を筆頭著者として論文投稿中である

2) 学会

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

O-GlcNAc 修飾が亢進したがんに対する核輸送阻害による治療の可能性

第 83 回日本癌学会学術総会 (2024.09.20)、ポスター、福岡

2. 向井智美, 佐藤龍洋, 亀井保博, 加藤輝, 三城恵美, 青木正博, 藪田紀一, 廣島健三, 関戸好孝

核輸送阻害剤は *O*-GlcNAc 修飾が亢進した中皮腫細胞に対して抗腫瘍効果を示す

第 5 回日本石綿・中皮腫学会学術集会 (2024.9.28)、口演、岡山

3. 向井智美, 佐藤龍洋, 亀井保博, 加藤輝, 三城恵美, 青木正博, 藪田紀一, 廣島健三, 関戸好孝

がん細胞における核輸送動態と腫瘍進展機構の解析

第 97 回日本生化学会大会 (2024.11.07)、口演/ポスター、神奈川

4. 向井智美, 佐藤龍洋, 亀井保博, 加藤輝, 三城恵美, 青木正博, 藪田紀一, 廣島健三, 関戸好孝

ヌクレオポリンの *O*-GlcNAc 修飾異常に伴う腫瘍進展機構の解明

第 47 回分子生物学会年会 (2024.11.27)、ポスター、福岡

5. 向井智美, 佐藤龍洋, 井田梨沙, 関戸好孝

XPO1 阻害剤は *O*-GlcNAc 修飾が亢進した中皮腫細胞に対して抗腫瘍効果を示す

第 29 回がん分子標的治療学会学術集会 (2025.7.3)、ポスター、北海道