

O-GlcNAc 修飾を介した悪性中皮腫進展メカニズムの解明

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、発見時には腫瘍が胸膜や腹膜の表面にびまん性に広がっている場合が多く、根治的な外科的手術が困難な病気である。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)化が亢進することが報告されており、診断マーカーや治療標的としての可能性が注目されつつある。O-GlcNAc 化は、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、翻訳後修飾のひとつである (図 1)。細胞質や核内に局在する様々なタンパク質が標的となり、例

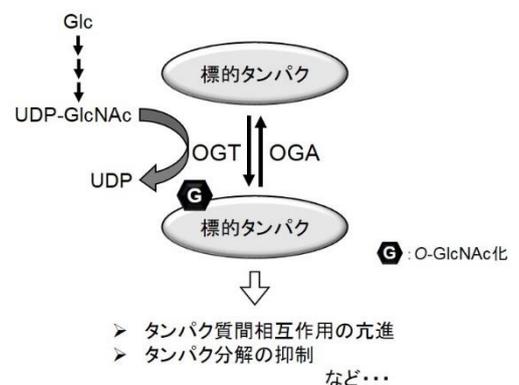


図1 標的タンパクのO-GlcNAc化とその機能

えば細胞のがん化に関わる p53, pRb, c-Myc, NF-κB などが O-GlcNAc 化されることが明らかとなっている。これらの O-GlcNAc 化は、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、がん化の促進に機能することが知られている。しかしその一方で、O-GlcNAc 化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。よって、悪性化に関わる O-GlcNAc 化タンパクを同定し、その制御機構を明らかにすることが重要である。

本研究では、悪性中皮腫における O-GlcNAc 化について、その修飾標的タンパク同定し、悪性中皮腫の進展に与える影響を明らかにすることで、治療戦略の可能性を追求する。

2. 研究の対象ならびに方法

(1) 様々な悪性中皮腫細胞株における O-GlcNAc 修飾レベルの検討

これまでに当研究室では、日本人の悪性中皮腫患者より細胞株を多数樹立している。これ

らの細胞株パネルにおける *O*-GlcNAc 修飾レベルを、抗 *O*-GlcNAc 抗体を用いたウエスタンブロッティングによって検出した。

(2) 悪性中皮腫に対する *O*-GlcNAc 修飾阻害効果の検討

悪性中皮腫細胞株パネルに OGT 阻害剤を添加、または OGT のノックダウンを行い、細胞増殖能への影響を CCK-8 (Dojindo) や生細胞解析システムを用いて評価した。

(3) 悪性中皮腫細胞株における *O*-GlcNAc 修飾タンパクの同定

悪性中皮腫細胞株に *O*-GlcNAc 修飾促進剤を添加し、一時的に *O*-GlcNAc 修飾を亢進させた。この細胞可溶化後を抗 *O*-GlcNAc 抗体を用いて免疫沈降を行い、得られた沈降物を精製し、質量分析を用いて標的タンパクを同定した。

(4) 同定された修飾タンパクの修飾部位決定

(3)で同定した修飾タンパクについて、FLAG タグを付与した断片化コンストラクトを作成した。悪性中皮腫細胞に発現させ、抗 FLAG 抗体による免疫沈降と抗 *O*-GlcNAc 抗体によるブロッティングを行い、修飾部位の絞り込みを行った。

3. 研究結果

(1) 様々な悪性中皮腫細胞株における *O*-GlcNAc 修飾レベルの検討

様々な遺伝的背景をもつ複数の悪性中皮腫細胞株および不死化中皮細胞における、*O*-GlcNAc 修飾レベルの解析の結果、Hippo 経路の破綻した細胞株において、ある特定のタンパクの *O*-GlcNAc 修飾の亢進がみられた (図2 矢印)。

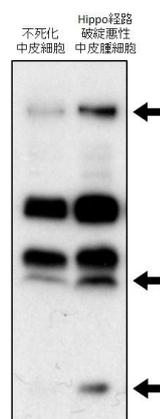


図2 不死化中皮細胞とHippo経路の破綻した悪性中皮腫細胞における*O*-GlcNAc修飾レベルの比較

各細胞を可溶化後、抗*O*-GlcNAc抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。矢印の部分で中皮腫特異的に*O*-GlcNAc修飾の亢進がみられる。

(2) 悪性中皮腫に対する *O*-GlcNAc 修飾阻害効果の検討

O-GlcNAc 修飾が亢進している悪性中皮腫細胞株、および不死化中皮細胞に、O-GlcNAc 修飾阻害剤 (OSMI-1) を添加し、細胞増殖能を測定した。その結果、いずれの細胞においても阻害剤濃度依存的に細胞増殖が抑制された(図 3)。さらに、OGT のノックダウンによる O-GlcNAc 修飾阻害を行った結果、同様に細胞増殖が抑制された。

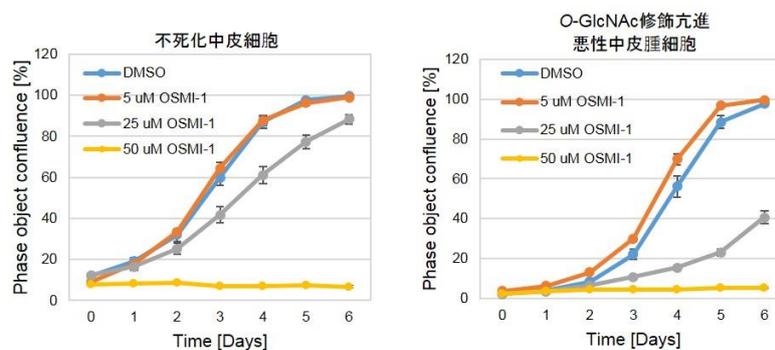


図3 O-GlcNAc修飾阻害剤添加による、細胞増殖能の検討

不死化中皮細胞とO-GlcNAc修飾が亢進した悪性中皮腫細胞に、O-GlcNAc修飾阻害剤であるOSMI-1を様々な濃度で添加した。それぞれの細胞増殖の様子を生細胞解析システム (IncuCyte S3)を用いてモニタリングし、細胞密度をグラフ化した。

(3) 悪性中皮腫細胞株における O-GlcNAc 修飾タンパクの同定

(1)の研究結果を受け、免疫沈降と MS 解析により悪性中皮腫で亢進した O-GlcNAc 修飾の標的タンパクの同定を行った。さまざまな候補タンパクが得られたが、興味深いことに核膜孔複合体を構成する因子が多く同定された。同定された候補タンパクが実際に細胞内で O-GlcNAc 修飾を受けるか確認するため、FLAG タグを付与したコンストラクトを作製し、中皮腫細胞に発現させ、抗 FLAG 抗体による免疫沈降および抗 O-GlcNAc 抗体による検出を行った。その結果、いずれの候補タンパクも細胞内で O-GlcNAc 修飾を受けることが明らかとなった。

(4) 同定された修飾タンパクの修飾部位決定

(3)で同定された候補タンパクのうち、核膜孔複合体構成因子のひとつに着目した。FLAG タグを付与した断片化コンストラクトを作製し、どの領域が O-GlcNAc 修飾を受けるか検討した結果、C 末端領域が強く O-GlcNAc 修飾を受けることが明らかとなった。

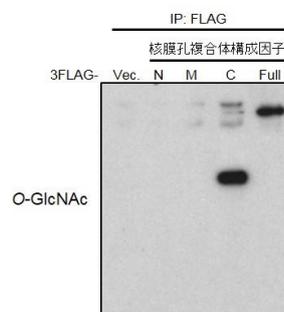


図4 断片化した核膜孔複合体構成因子のO-GlcNAc修飾領域決定

ある核膜孔複合体構成因子を3断片にし(N, M, C)、FLAGタグを付与したコンストラクトを作製した。全長コンストラクト(Full)と共に中皮腫細胞に発現させ、抗FLAG抗体で免疫沈降後、抗O-GlcNAc抗体を用いてプロットングを行った。

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見られ、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)。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。この O-GlcNAc 修飾が治療標的となりうるか、O-GlcNAc 修飾阻害剤を用いた細胞増殖能の検討を行った結果、阻害剤によって細胞増殖は有意に抑制された。しかし、正常細胞の細胞増殖も抑制されることが明らかとなった。悪性中皮腫特異的に O-GlcNAc 修飾される標的タンパクの同定を行ったところ、核膜孔複合体構成因子が多く同定された。今後は、核膜孔複合体構成因子の O-GlcNAc 修飾がどのようなメカニズムで腫瘍進展を誘導するか、さらに詳細に検討していく。同時に、Hippo 経路と O-GlcNAc 修飾の関連についても検討する。

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.

6. 論文発表

1. 向井智美、松下明弘、佐藤龍洋他、悪性中皮腫における Hippo 経路の破綻による腫瘍進展機構、第 41 回日本分子生物学会年会、ワークショップ口頭発表、2018. 横浜
2. Mukai S, Sato T, Mishiro-Sato E et al., LATS2 inhibits O-GlcNAcylation in malignant

mesothelioma cells. 第 77 回日本癌学会学術総会、ポスター発表, 2018. 大阪

3. 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、ポスター発表予定, 2019. 京都