

令和 2 年 7 月 10 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08678

研究課題名(和文) 癌微小環境における細胞内シグナル制御因子O-GlcNAc糖鎖修飾の癌増殖への影響

研究課題名(英文) Role of TME O-GlcNAcylation in cancer proliferation

研究代表者

森脇 一将 (Moriwaki, Kazumasa)

大阪医科大学・医学部・助教

研究者番号：00467656

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：グルコース代謝物を基質とした翻訳後修飾であり癌細胞内で亢進して癌の進展に働くO-GlcNAc修飾は、癌の治療標的として期待されているが、癌微小環境内のO-GlcNAc修飾の役割は知見に乏しい。本研究では、全身でO-GlcNAc修飾が亢進するOgt-TgマウスにB16悪性黒色腫細胞を移植し、癌微小環境内O-GlcNAc修飾の機能を解析した。その結果、癌微小環境でのO-GlcNAc修飾の亢進状態は、腫瘍攻撃性M1様マクロファージの腫瘍内浸潤および炎症性サイトカイン産生を低下させて腫瘍細胞内のp38活性を低下させる結果、増殖シグナルへの抑制機構が低下して腫瘍細胞の増殖が亢進する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

O-GlcNAc修飾は、癌の治療標的として期待されてきたが、癌微小環境におけるO-GlcNAc修飾の機能は知見に乏しく、糖尿病患者では癌が進行しやすいと言われてO-GlcNAc修飾の関与も示唆されてきたが、その分子機序の全容は分かっていなかった。本研究により、癌微小環境におけるO-GlcNAc修飾の亢進が、腫瘍攻撃性の免疫細胞の機能を低下させることにより癌の増殖を促進していることが示唆され、癌の進展、および、糖尿病における癌の進展促進に働くその分子機序の一端を見出すことができた。

研究成果の概要(英文)：Elevated O-GlcNAcylation is a dynamic post-translational modification to play a crucial role in various cancer phenotypes and cancer progression. This suggests that it may be a potential new therapeutic target for cancer therapy. However, the role of O-GlcNAcylation in tumor progression, especially, in tumor microenvironment (TME) is not fully elucidated. Here, we examined the function of elevated TME O-GlcNAcylation using a subcutaneous mice model of B16 melanoma cells in Ogt-transgenic (Ogt-Tg) mice. In this model system, elevated O-GlcNAcylation decreased infiltration of M1-like (F4/80+iNOS+) cells into B16 tumors and production of pro-inflammatory cytokine in Ogt-Tg mice compared with wild-type mice. In the tumors excised from Ogt-Tg mice, NF- $\kappa$ B and p38 activity was significantly reduced, while ERK signaling was increased. These data suggest that O-GlcNAcylation in the TME may reduce production of pro-inflammatory cytokines and promote tumor growth through suppression of p38 MAPK.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：O-GlcNAc修飾 炎症性サイトカイン 癌

## 1. 研究開始当初の背景

O-GlcNAc (O-linked N-acetyl glucosamine) 糖鎖修飾は、グルコース代謝物を基質として細胞質と核内蛋白質の側鎖 Ser/Thr の水酸基に単糖 O-GlcNAc を付加し、蛋白質リン酸化と協調して細胞内シグナルを可逆的に制御している。リン酸化が多数の酵素で担われているのに対し、O-GlcNAc 修飾は唯一の付加酵素 OGT (O-GlcNAc transferase) と脱離酵素 OGA (O-GlcNAcase) により担われ、それにもかかわらず幅広い分子を標的としている。癌細胞では、グルコースの取り込み・代謝が亢進しているためその結果、細胞内分子の O-GlcNAc 修飾が亢進しており、これが癌細胞の特性形成に働いて癌の成長を促進していると考えられ、癌細胞内で亢進する O-GlcNAc 修飾は、あらゆる癌の治療標的として期待されている。また、高血糖状態は、癌細胞のグルコース代謝を加速させて O-GlcNAc 修飾を増幅することから癌細胞に好ましい環境と考えられ、実際に糖尿病患者では癌が進行しやすいと言われており、糖尿病と癌の関連性を繋ぐ因子としても O-GlcNAc 修飾が注目されている。しかしながら、多くの研究が癌細胞内での O-GlcNAc 修飾の機能を対象としている一方、癌周囲の微小環境における O-GlcNAc 修飾の役割に目を向けると圧倒的に知見に乏しく、その癌細胞への影響は不明な点が多い。我々は、癌微小環境における O-GlcNAc 修飾の亢進が癌の成長に及ぼす影響を解析するために、O-GlcNAc 修飾が全身で亢進する *Ogt*-Tg マウスへの B16 悪性黒色腫細胞の皮下移植実験を行い、野生型マウスと比較して *Ogt*-Tg マウスでは有意に腫瘍細胞の成長が早いことを見出した。

## 2. 研究の目的

*Ogt*-Tg マウスにおける移植癌細胞の成長促進機構を解析して、癌微小環境における O-GlcNAc 修飾が癌細胞に及ぼす役割を明らかにする。

## 3. 研究の方法

野生型マウスと *Ogt*-Tg マウスに同系 (C57BL/6) 由来の腫瘍細胞株 B16 悪性黒色腫を皮下移植し、得られる腫瘍内のシグナル変化やサイトカイン産生、浸潤細胞の同定など Western blot や免疫染色により比較することで、癌微小環境における O-GlcNAc 修飾の亢進が癌の促進および癌微小環境へ与える影響を解析する。

## 4. 研究成果

B16 細胞を皮下移植後 10 日後に腫瘍を取り出して腫瘍サイズを解析すると、野生型マウスと比較して *Ogt*-Tg/+ マウスでは腫瘍サイズが有意に大きく、Western blot 解析では、RAF や MEK1/2、ERK1/2、Akt など主要な細胞増殖・生存シグナルの亢進が認められた。一方、環境ストレスや炎症性サイトカイン、増殖因子、細胞外基質など種々の癌微小環境からの刺激に応答する p38 の活性を解析すると、*Ogt*-Tg/+ マウス移植腫瘍では有意にその活性が低いことが Western blot および免疫染色解析 (図 1) により明らかになった。p38 は活性化すると細胞周期の停止に働き、また、MEK1/2 や ERK1/2 に対して負のフィードバック作用を示すことから、*Ogt*-Tg/+ マウス移植腫瘍における p38 の機能の低下は、上述した腫瘍増殖・生存シグナルの亢進に寄与していると考えられた。

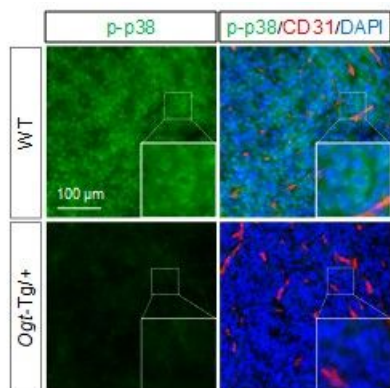


図 1. *Ogt*-Tg/+ マウスで成長した B16 腫瘍では p38 のリン酸化レベルが有意に低下している。

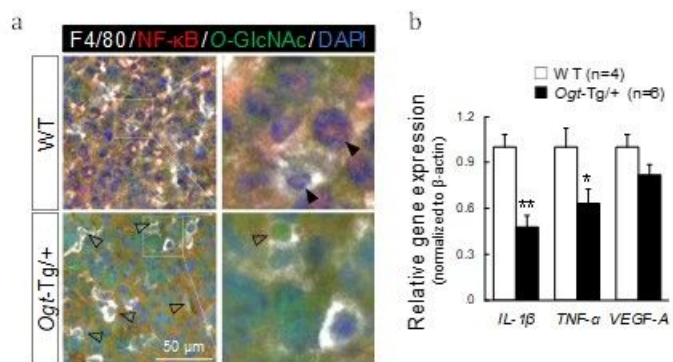


図 2. a) *Ogt*-Tg/+ マウスで成長した B16 腫瘍内に認める F4/80 陽性細胞では NF-κB の核移行が減少している。b) *Ogt*-Tg/+ マウスで成長した B16 腫瘍では炎症性サイトカイン IL-1β や TNF-α の発現が低下している。

次に、p38 を動かす上流シグナルを解析するために、炎症において中心的な役割を果たしている転写因子 NF- $\kappa$ B の活性および炎症性サイトカインの分泌状態を検証した。その結果、Western blot 解析により、*Ogt-Tg/+*マウス移植腫瘍では NF- $\kappa$ B のリン酸化 (Ser536) レベルが低下していることが分かった。また、*Ogt-Tg/+*マウス移植腫瘍では、免疫染色により F4/80 陽性細胞において NF- $\kappa$ B の核移行が低下していること (図 2a)、real-time PCR 解析により炎症性サイトカイン IL-1 と TNF- $\alpha$  の発現が有意に低下していることが明らかとなった。チオグリコール酸誘導炎症性腹腔マクロファージを用いた解析でも、同様の結果を得た。

そこで、免疫染色により腫瘍への浸潤細胞のポピュレーションを野生型マウスと *Ogt-Tg/+*マウス間で比較解析したところ、T 細胞や B 細胞、癌関連線維芽細胞の浸潤に差はなかったが、F4/80 陽性細胞の浸潤が、*Ogt-Tg/+*マウスにおいて低下していた。また、F4/80 細胞をより詳しく分類すると、浸潤細胞は iNOS 陽性・Arginase-1 陰性を示した (図 3)。

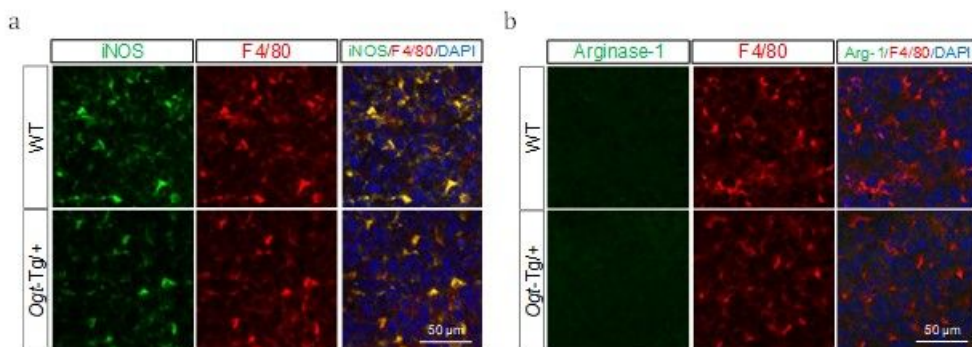


図 3. B16腫瘍内のF4/80陽性細胞はiNOS陽性でありArginase-1は陰性である。

以上の結果から、*Ogt-Tg/+*マウスでは、腫瘍攻撃性の M1 様マクロファージの腫瘍への浸潤および炎症性サイトカインの産生が低下することにより、癌細胞内では p38 の活性が低下して MEK/ERK 経路の増殖シグナルへの負のフィードバックが弱まったために、腫瘍の増殖促進につながったと示唆され、本研究により、癌微小環境における O-GlcNAc 修飾が、癌細胞の進展促進に働く分子機序の一端が見出された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Moriwaki K, Asahi M.	4. 巻 15(9)
2. 論文標題 Augmented TME O-GlcNAcylation Promotes Tumor Proliferation through the Inhibition of p38 MAPK.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Mol Cancer Res.	6. 最初と最後の頁 1287-1298
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/1541-7786.MCR-16-0499	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hirata Y, Nakagawa T, Moriwaki K, Koubayashi E, Kakimoto K, Takeuchi T, Inoue T, Higuchi K, Asahi M	4. 巻 3
2. 論文標題 Augmented O-GlcNAcylation alleviates inflammation-mediated colon carcinogenesis via suppression of acute inflammation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Clin. Biochem. Nutr.	6. 最初と最後の頁 221-229
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3164/jcbn.17-106	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Moriwaki K, Asahi M.
2. 発表標題 Augmented O-GlcNAcylation in the tumor microenvironment promotes B16 melanoma cell progression through the suppression of p38 MAPK.
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Moriwaki K, Asahi M.
2. 発表標題 Elevated O-GlcNAcylation in the tumor microenvironment promotes B16 melanoma cell proliferation through the suppression of p38 MAPK.
3. 学会等名 18th World Congress of basic and clinical pharmacology（国際学会）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	朝日 通雄  (Asahi Michio)  (10397614)	大阪医科大学・医学部・教授    (34401)	