

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791069

研究課題名（和文） 糖鎖改変マウスを用いた新しい皮膚癌発症機序の解明

研究課題名（英文） Investigating the role of sugar chain in skin cancer by analyzing transgenic mouse

研究代表者

寺尾 美香（TERAO MIKA）

大阪大学・大学院医学系研究科・特任研究員（常勤）

研究者番号：40570669

研究成果の概要（和文）：

N-アセチルグルコサミン糖転移酵素-V (GnT-V)は β 1,6結合で二本鎖 *N*-glycan に *N*-アセチルグルコサミンを結合させる糖転移酵素であり、発がん時やがんの転移時にその発現が上昇する。今回我々は、GnT-V トランスジェニックマウス (Tg マウス) を作製し、皮膚を解析した。Tg マウス皮膚では上皮-間葉系転換 (EMT) 様変化が見られ、表皮角化細胞の細胞遊走能が亢進していた。さらに EMT 時にみられる転写因子の上昇がみられ、創傷治癒が促進していた。Tg マウスでみられる EMT 様変化と細胞遊走能の亢進は、がんの浸潤・転移にも関与していることが推測される。

研究成果の概要（英文）：

N-Acetylglucosaminyltransferase-V (GnT-V) catalyzes the β 1,6 branching of *N*-acetylglucosamine on *N*-glycans. GnT-V expression is elevated during malignant transformation in various types of cancer. To characterize the biological significance of GnT-V, we established GnT-V transgenic (Tg) mice. Cultured keratinocytes derived from these mice showed enhanced migration, which was associated with changes in E-cadherin localization, and epithelial-mesenchymal transition (EMT). Further, EMT-associated factors snail, twist, and, N-cadherin were upregulated, and cutaneous wound healing was accelerated *in vivo*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：糖転移酵素、創傷治癒、上皮-間葉系転換、有棘細胞がん、表皮角化細胞

1. 研究開始当初の背景

糖鎖研究が、この数年で急速に進歩し、様々な分野に応用されつつある。今日まで 200 以上存在するという糖転移酵素（糖鎖を合成

する酵素群）の中で、*N*-アセチルグルコサミン糖転移酵素-V (GnT-V) はゴルジに運ばれてきた糖タンパク質に修飾を行う N 型糖鎖の糖転移酵素の一つであり、二本鎖 N 型鎖のマンノ

ースに GlcNAc を β 1-6 結合させる。臨床的には GnT-V を発現している胃がんや大腸がんは転移しやすく予後不良であり、また、GnT-V ノックアウトマウスではがん転移が抑制されることより GnT-V は糖転移酵素の中でもがんの転移に関係が深い分子と考えられている。

2. 研究の目的

本研究では皮膚癌や創傷治癒における GnT-V の役割を明らかにすることを目的とする。

(1) GnT-V 過剰発現マウス (GnT-V Tg マウス) を作成し、皮膚を中心に解析を行う。

(2) 大阪大学皮膚科学教室に保存されている皮膚がん (有棘細胞癌や基底細胞癌) における GnT-V の発現について調べる。

3. 研究の方法

(1) β アクチンプロモータ下に GnT-V を過剰発現したマウス (GnT-V Tg マウス) より皮膚や表皮角化細胞を採取し解析する。さらに、GnT-V Tg マウスにさまざまな刺激を加えたのちの変化を野生型マウスと比較し解析する。

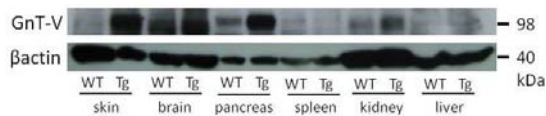
(2) 大阪大学皮膚科学教室に保存されている皮膚がん (有棘細胞癌や基底細胞癌) における GnT-V の発現を免疫組織化学的染色で検討し、臨床 Staging や浸潤度との関連性を検索する。

4. 研究成果

(1) GnT-V Tg マウスの作成

β アクチンプロモーター下に GnT-V を過剰発現するマウスを作製した。作製されたマウスは皮膚をはじめとした各臓器において GnT-V の過剰発現および活性の上昇が確認された。

(ウエスタンブロッティング : GnT-V)



(GnT-V 活性測定)

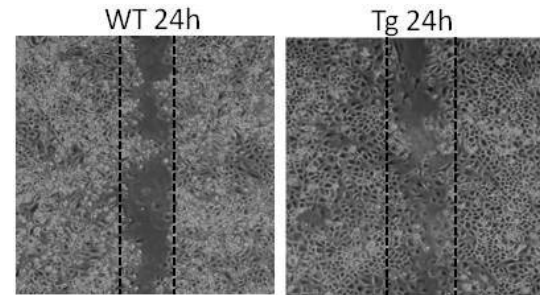
Tissue	GnT-V Activity (pmol / h / mg protein)	
	WT	Tg
skin	83.3 ± 34.6	492 ± 121
liver	21.3 ± 12.1	46.9 ± 35.8
pancreas	25.4 ± 10.1	1054 ± 127
spleen	77.0 ± 11.2	27.0 ± 6.70
kidney	57.3 ± 10.0	174.1 ± 75.1
brain	71.5 ± 40.6	86.5 ± 12.1

無刺激状態では GnT-V Tg マウス皮膚に明ら

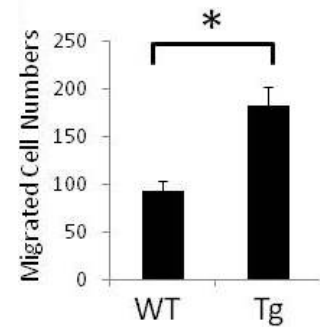
かな変化はみられず、自然発がんもみられなかった。

(2) GnT-V Tg マウス表皮角化細胞の遊走能が亢進していた。

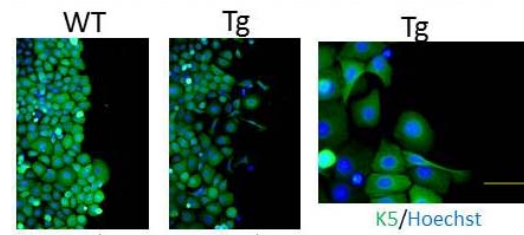
GnT-V Tg マウスより表皮角化細胞を遊離し、遊走能をスクラッチアッセイで検討したところ、GnT-V Tg マウスにおいて著明な細胞遊走能の亢進がみられた (下図)。



さらに、GnT-V Tg マウス表皮角化細胞には野生型マウス表皮角化細胞に比べて、紡錘状に変化した細胞が多くみられた (下図)。これらの細胞は表皮角化細胞のマーカーであるケラチン5 (K5)

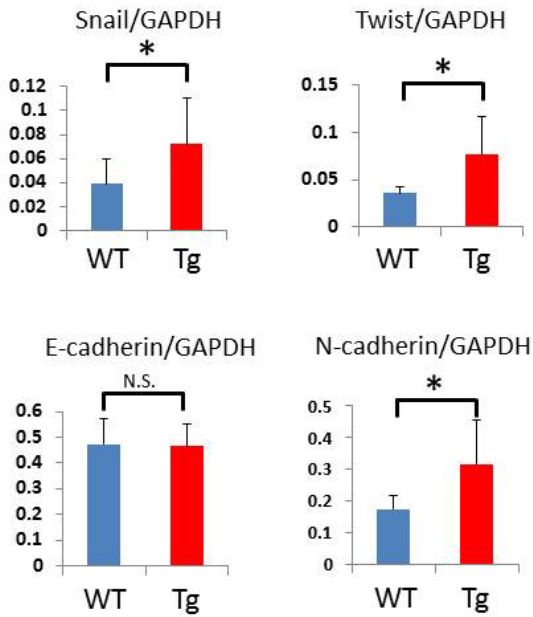


を発現していることより、表皮角化細胞が紡錘状に変化したことがわかる。



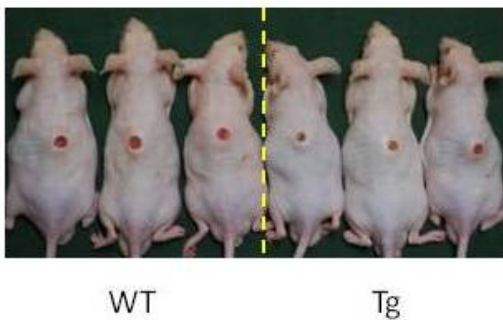
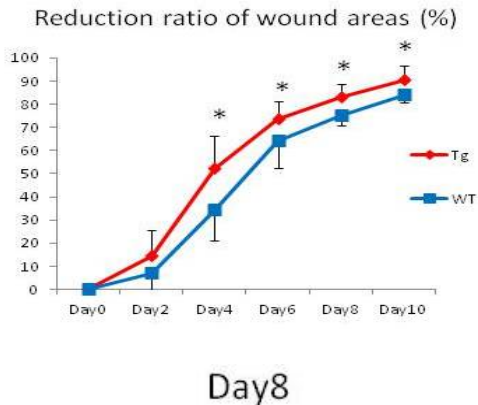
(3) GnT-V Tg マウス皮膚において EMT 関連遺伝子の発現が上昇していた。

GnT-V Tg マウス表皮角化細胞で細胞遊走能が亢進していることより、GnT-V Tg マウスにおいて EMT 変化が起きているのではないかと考えた。GnT-V Tg マウスより採取した表皮組織における EMT 関連遺伝子を検索したところ図に示すように野生型マウスと比較して GnT-V Tg マウスでは発現上昇がみられた。



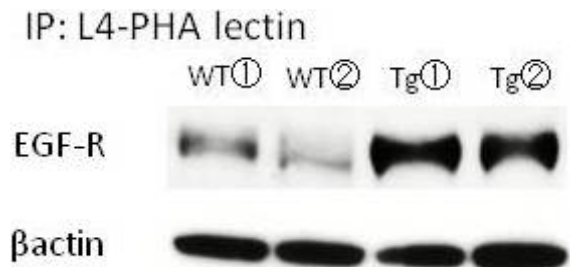
(4) GnT-V Tg マウスにおいて創傷治癒が促進していた。

GnT-V Tg マウスにおいて EMT 様変化がみられたことより、創傷治癒が促進している可能性が考えられた。マウス背部に創傷を作成し、治癒能を測定したところ、下図のグラフに示すように、GnT-V Tg マウスにおいて、有意に創傷治癒の促進がみられた。さらに、写真は 8 日目の創傷部位を示すが、GnT-V Tg マウスの創傷面積が野生型マウスに比べて小さいことがわかる。

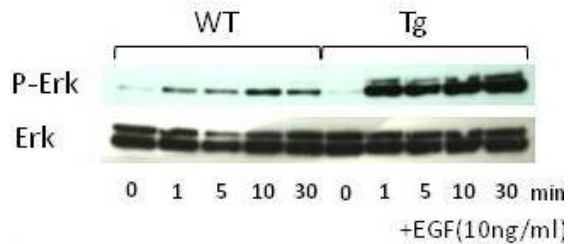


(5) GnT-V Tg マウス表皮角化細胞において EGFR シグナルが亢進していた。

最後に GnT-V Tg マウスが EMT 様変化を引き起こす原因について検索した。表皮角化細胞における EMT 変化に EGFR シグナルが重要であることが報告されている。まず、EGFR が GnT-V による糖鎖修飾を受けているのかを検索するために、GnT-V により形成された糖鎖を認識する L4PHA レクチンで免疫沈降したのちに、EGFR をウエスタンブロッティングで確認したところ、下図のように GnT-V Tg マウスの表皮角化細胞は野生型マウスに比べて GnT-V による糖鎖修飾が多くなされていることがわかった。



次に、EGFR シグナルを検索するために GnT-V Tg マウスと野生型マウスから表皮角化細胞を単離し、EGF 刺激に対する反応を下流の Erk のリン酸化で検索したところ、GnT-V Tg マウス表皮角化細胞では下図のように EGF 刺激に対する反応が顕著に亢進していることがわかった。



以上の結果より、我々は GnT-V を過剰発現したマウス皮膚において EGF シグナルを介した EMT 様変化がみられることを見出した。

(6) 皮膚がんサンプルにおける GnT-V 発現の検討

最後に皮膚がん(有棘細胞がん、日光角化症、ボーエン病)における GnT-V の発現を免疫組織化学的染色で検討した。GnT-V は正常皮膚組織にはほとんど発現しておらず、日光角化症、ボーエン病においてもその発現はみられ

なかった。有棘細胞がんでは分化傾向の高いものにおいては発現していなかったが、未分化で浸潤傾向の強いものの一部において、GnT-V の発現が上昇していることが確認された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

(1) Terao M, Ishikawa A, Nakahara S, Kimura A, Kato A, Moriwaki K, Kamada Y, Murota H, Taniguchi N, Katayama I, Miyoshi E. (2011) Enhanced Epithelial-Mesenchymal Transition-like Phenotype in N-Acetylglucosaminyltransferase V Transgenic Mouse Skin Promotes Wound Healing. *J Biol Chem*. Aug 12;286(32):28303-11. 査読あり

(2) Terao M, Murota H, Kimura A, Kato A, Ishikawa A, Igawa K, Miyoshi E, Katayama I. (2011) 11β -hydroxysteroid dehydrogenase-1 is a novel regulator of skin homeostasis and a candidate target for promoting tissue repair. *PLoS One*. Sep;6(9): e25039 査読あり

(3) Kawamoto S, Moriwaki K, Nakagawa T, Terao M, Shinzaki S, Yamane-Ohnuki N, Satoh M, Mehta AS, Block TM, Miyoshi E. Overexpression of $\alpha 1,6$ -fucosyltransferase in hepatoma enhances expression of Golgi phosphoprotein 2 in a fucosylation-independent manner. *Int J Oncol*. 2011 Jul;39(1):203-8. 査読あり

[学会発表] (計 7 件)

(1) Mika Terao, Hiroyuki Murota, Akihiro Kimura, Arisa Kato, Ken Igawa, Ichiro Katayama (2011) Selective inhibition of 11β -hydroxysteroid dehydrogenase 1 enhances cutaneous wound healing in ob/ob mice 第36回日本研究皮膚科学会, 京都, 日本, 2011年12月10日

(2) Akihiro Kimura, Mika Terao, Arisa Kato, Hiroyuki Murota, Eiji Miyoshi, Ichiro Katayama (2011)

Glycosylation of GnT-V enhances the proliferation of keratinocytes in hyperproliferative conditions through up-regulation of HB-EGF signaling 第36回日本研究皮膚科学会, 京都, 日本, 2011年12月9日

(3) Arisa Kato, Mika Terao, Akihiro Kimura, Hiroyuki Murota, Eiji Miyoshi, Ichiro Katayama (2011) A secreted type of GnT-V suppress inflammatory phase reaction in wound healing 第36回日本研究皮膚科学会, 京都, 日本, 2011年12月10日

(4) Akihiro Kimura, Mika Terao, Arisa Kato, Hiroyuki Murota, Eiji Miyoshi, Ichiro Katayama (2011) Involvement of N-acetylglucosaminyltransferase V (GnT-V) in homeostasis of epidermis through up-regulation of HB-EGF signaling, 41th European Society for Investigative Dermatology, バルセロナ, スペイン, 2011年9月8日

(5) Mika Terao 11β -HSD as a novel regulator of epidermal differentiation: Considering the possible involvement in aberrant keratinizing disorders 第35回日本研究皮膚科学会, 和歌山, 日本, 2010年12月4日

(6) Akiko Ishikawa, Mika Terao Epithelial-mesenchymal transition (EMT)-like phenotype was observed in GnT-V transgenic mouse skin 第35回日本研究皮膚科学会, 和歌山, 日本, 2010年12月3日

(7) Akihiro Kimura, Mika Terao Reduced proliferation and activation of dermal fibroblasts in soluble GnT-V transgenic mice 第35回日本研究皮膚科学会, 和歌山, 日本, 2010年12月3日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺尾 美香 (TERAO MIKA)

大阪大学・大学院医学系研究科・特任研究員 (常勤)

研究者番号: 40570669