

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24689045

研究課題名(和文) 微小環境から見た皮膚がんの発症、進展に関わる糖鎖機能の解析

研究課題名(英文) Investigating the role of sugar chain in microenvironment of skin cancer

研究代表者

寺尾 美香(terao, mika)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・特任研究員

研究者番号：40570669

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

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 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、がん微小環境(とくにマクロファージ)におけるGnT-Vの役割をGnT-Vノックアウトマウス(KOマウス)を用いて検討した。KOマウス由来骨髄マクロファージはM2分化に抵抗性であったこと、KOマウスではブレオマイシン誘導性皮膚硬化が低下し、M2マクロファージの浸潤が低下していたことより、GnT-VはマクロファージのM2分化に関与していることが推測された。

研究成果の概要(英文)：N-Acetylglucosaminyltransferase-V (GnT-V) expression is elevated during malignant transformation in various types of cancer. To characterize the biological function of GnT-V in macrophages, we analyzed the role of GnT-V using GnT-V knockout (KO) mice. In bone marrow-derived macrophages (BMDMs), IL-4-induced expressions of M2 macrophage markers were reduced in KO mice. In addition, KO mice were resistant to BLM-induced skin sclerosis with reduced number of CD163+ M2 macrophages. These results suggest the importance of GnT-V in differentiation of M2 macrophages in the skin.

研究分野：医歯薬学

キーワード：糖転移酵素 症 GnT-V M1マクロファージ M2マクロファージ 皮膚がん 悪性黒色腫 皮膚硬化 強皮

1. 研究開始当初の背景

細胞膜に局在するタンパク質や脂質のほとんどは糖鎖修飾をうけ糖脂質、糖タンパク質、プロテオグリカンとして細胞表面に存在する。糖鎖は「第3の生命鎖」とも呼ばれ、核酸・タンパク質の研究に続き、近年研究が進んでいる分野である。とくにある種の癌では糖鎖構造の変化がみられることより、臨床的には癌マーカーや癌ワクチンとしての応用がなされている。

今日まで 200 以上存在するという糖転移酵素(糖鎖を生合成する酵素群)の中で、*N*-アセチルグルコサミン転移酵素-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 81-6 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。

申請者らは GnT-V 過剰発現マウスを作成し皮膚を解析することにより、GnT-V 過剰発現表皮角化細胞は遊走能が亢進し、EGFR シグナルを介した epithelial-mesenchymal transition (EMT) 様変化を引き起こすことを報告した (Terao M, Miyoshi E et al. *J Biol Chem.* 2011 286(32): 28303-11.) 我々の報告は *in vivo* において GnT-V ががんの浸潤・転移、あるいはがん幹細胞に関与する EMT の誘導を示唆する初めての報告である。

2. 研究の目的

(1) 皮膚がんの臨床サンプルにおける GnT-V の発現とがんの進行度の関連性

を解析する。

(2) がん微小環境における GnT-V の発現の意義をマクロファージを中心に解析する。

3. 研究の方法

(1) 皮膚がん臨床サンプルにおける GnT-V の検討

当研究室保存の有棘細胞がんの臨床サンプルを用いて免疫組織化学的に GnT-V の発現を評価し、臨床病期との相関を検討する。

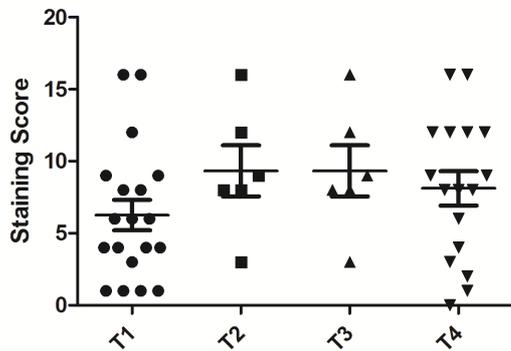
(2) がん微小環境における GnT-V 発現の意義

がん微小環境において重要な役割をたすと考えられるマクロファージにおける GnT-V の役割を GnT-V ノックアウトマウス (GnT-V KO) を用いて検討する。*in vitro* では野生型および GnT-V KO マウス骨髄よりマクロファージを単離・培養し M1 および M2 マクロファージへの分化能を検討する。*in vivo* では M2 マクロファージがその病態形成に重要とされている強皮症モデル (プレオマイシン誘導性皮膚硬化モデル) と B6F1 メラノーマ移植実験を野生型および GnT-V KO を用いて検討する。

4. 研究成果

(1) 皮膚がん臨床サンプルにおける GnT-V の検討

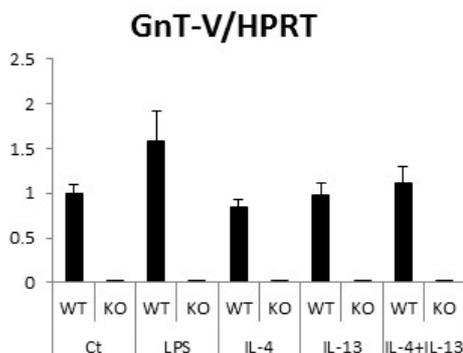
有棘細胞がんの皮膚サンプルにおける GnT-V の発現と臨床病期、転移病変の有無を検討した。例の有棘細胞がん (T1 19 例、T2 6 例、T3 6 例、T4 17 例) の検討を行った。各グループ間における GnT-V 発現スコアに有意な差はみられなかった。



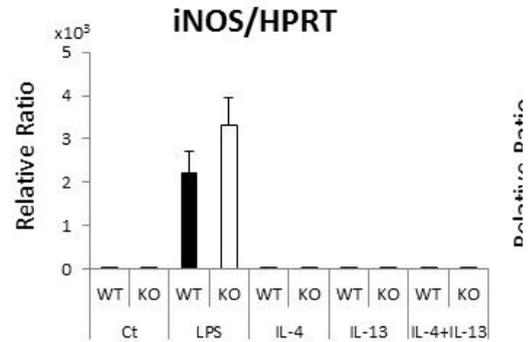
(2) GnT-V はマクロファージの M2 分化に関与した

近年、腫瘍の浸潤に M2 マクロファージの形質をもつ tumor associated macrophage (TAM) の重要性が指摘されている。そこで、GnT-V KO マウス骨髄細胞よりマクロファージを誘導 (bone marrow derived macrophage: BMDM) し、M1、M2 刺激による各々のマーカー発現を検討した。

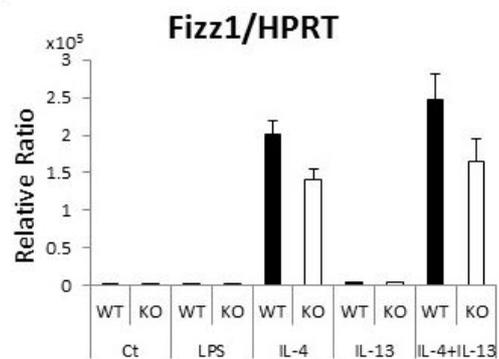
まず、M1 誘導指摘 (LPS)、M2 誘導刺激 (IL-4、IL-13) に伴う GnT-V の発現を検討したが各刺激による GnT-V の発現に大きな差はみられなかった。



次に、LPS 刺激により BMDM を M1 マクロファージに分化させたのちに M1 マクロファージのマーカーである iNOS 発現を検討した。結果、GnT-V KO マウス由来 BMDM で有意に iNOS 発現が上昇していた。



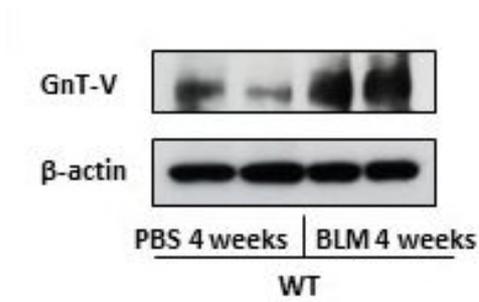
IL-4、IL-13 刺激により BMDM を M2 マクロファージに分化させたのちに M2 マクロファージのマーカーである Fizz1 発現を検討した。結果、GnT-V KO マウス由来 BMDM で有意に Fizz1 発現が低下していた。図には示していないが、Ym1 においても同様の結果がみられた。



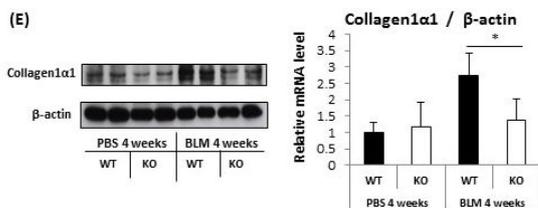
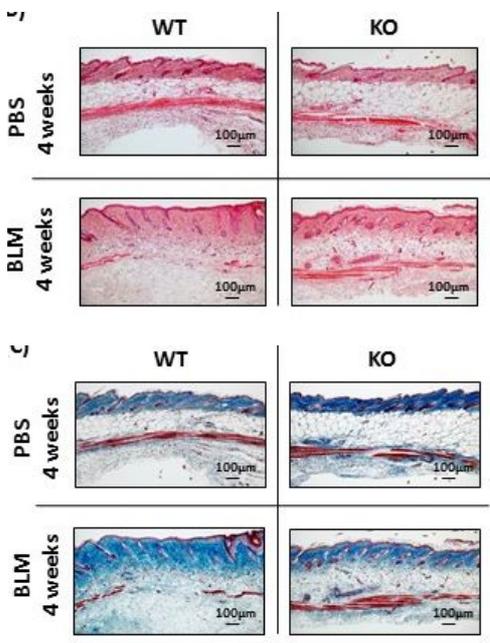
以上の結果より BMDM における GnT-V は M2 分化に重要な役割を果たしていることが考えられた。

(3) GnT-V KO マウスはブレオマイシン (bleomycin: BLM) 誘導性皮膚硬化に抵抗性を示した。

in vivo において GnT-V のマクロファージにおける役割を解析した。まず、BLM 誘導性皮膚硬化時の GnT-V の発現を検討したところ、コントロール群 (PBS) に比べ BLM 群で GnT-V の発現上昇がみられた。

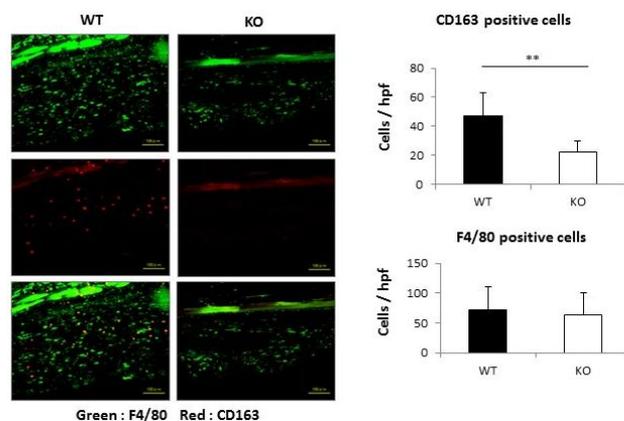


野生型マウスと GnT-V KO マウスの BLM 誘導性皮膚硬化を比較したところ、下記 HE 染色、マッソントリクローム染色で示すように、GnT-V KO マウスは BLM 誘導性皮膚硬化に抵抗性であり、コラーゲン発現量も有意に低下していた。



さらに、浸潤細胞を検討したところ、GnT-V KO マウスにおいて F4/80 陽性のマクロファージ、CD163 陽性の M2 マクロファージ数が有意に低下していたことより、M2 マクロファージの低下が、BLM

誘導性皮膚硬化の抵抗性に関与している可能性が考えられた。



(4) メラノーマの微小環境における GnT-V の役割の検討

がん微小環境における GnT-V の役割を検討するために、野生型マウスおよび GnT-V KO マウスに B6F1 メラノーマ細胞 (500000 個) を皮内注射し、大きさ、組織学的検討を行った。しかし、野生型マウスと GnT-V KO マウスでメラノーマの大きさに差は見られなかった。

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 11 件)

(1) Terao M, Tani M, Itoi S, Yoshimura T, Hamasaki T, Murota H, Katayama I. 11β-hydroxysteroid dehydrogenase 1 specific inhibitor increased dermal collagen content and promotes fibroblast proliferation. PLoS One. 2014 Mar 25;9(3):e93051.

(2) Terao M, Itoi S, Murota H, Katayama I. Expression profiles of cortisol-inactivating enzyme, 11β-hydroxysteroid dehydrogenase-2, in human epidermal tumors and its

- role in keratinocyte proliferation. *Exp Dermatol.* 2013 Feb;22(2):98-101.
- (3) Itoi S, Terao M, Murota H, Katayama I. 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase 1 contributes to the pro-inflammatory response of keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013 Oct 18;440(2):265-70.
- (4) Murota H, Itoi S, Terao M, Matsui S, Kawai H, Satou Y, Suda K, Katayama I. Topical cholesterol treatment ameliorates hapten-evoked cutaneous hypersensitivity by sustaining expression of 11 β -HSD1 in epidermis. *Exp Dermatol.*
- (5) Tamiya H, Terao M, Takiuchi T, Nakahara M, Sasaki Y, Katayama I, Yoshikawa H, Iwai K. IFN- γ or IFN- α ameliorates chronic proliferative dermatitis by inducing expression of linear ubiquitin chain assembly complex. *J Immunol.* 2014 Apr 15;192(8):3793-804.
- (6) Nakajima K, Terao M, Takaishi M, Kataoka S, Goto-Inoue N, Setou M, Horie K, Sakamoto F, Ito M, Azukizawa H, Kitaba S, Murota H, Itami S, Katayama I, Takeda J, Sano S. Barrier abnormality due to ceramide deficiency leads to psoriasiform inflammation in a mouse model. *J Invest Dermatol.* 2013 Nov;133(11):2555-65.
- (7) Nakano-Tahara M, Terao M, Nishioka M, Kitaba S, Murota H, Katayama I. T Helper 2 Polarization in Senile Erythroderma with Elevated Levels of TARC and IgE. *Dermatology.* 2015;230(1):62-9.
- (8) Yang L, Serada S, Fujimoto M, Terao M, Kotobuki Y, Kitaba S, Matsui S, Kudo A, Naka T, Murota H, Katayama I. Periostin facilitates skin sclerosis via PI3K/Akt dependent mechanism in a mouse model of scleroderma. *PLoS One.* 2012;7(7):e41994.
- (9) Murota H, Izumi M, Abd El-Latif MI, Nishioka M, Terao M, Tani M, Matsui S, Sano S, Katayama I. Artemin causes hypersensitivity to warm sensation, mimicking warmth-provoked pruritus in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2012 Sep;130(3):671-682.
- (10) Kimura A, Terao M, Kato A, Hanafusa T, Murota H, Katayama I, Miyoshi E. Upregulation of N-acetylglucosaminyltransferase-V by heparin-binding EGF-like growth factor induces keratinocyte proliferation and epidermal hyperplasia. *Exp Dermatol.* 2012 Jul;21(7):515-9.
- (11) Kanai C, Terao M, Tanemura A, Miyoshi Y, Ozono K, Katayama I. Generalized lichen nitidus in Russell-Silver syndrome. *Pediatr Dermatol.* 2013 Jan-Feb;30(1):150-1.
- { 学会発表 }(計 7 件)
- (1) Terao M, Kato A, Yutani M, Murota H, Miyoshi E, Katayama I : Oligosaccharide modification by N-acetylglucosaminyltransferase-V promotes skin sclerosis by inducing macrophages to shift toward M2. 2013 International Investigative

Dermatology Meeting, May8-11, 2013
Edinburgh, Scotland

(2) Terao M, Murota H, Katayama I:

Expression profiles of cortisol

inactivating enzyme,

11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1
and 2 in human epidermal tumors and
its role in keratinocyte proliferation.

1st Dermatoendocrinology Meeting,

May 7, 2013 Edinburgh, Scotland

(3) 油谷美寿季、寺尾美香、加藤亜里沙、
室田浩之、片山一朗、三善英知:

Oligosaccharide modification by
N-acetylglucosaminyltransferase-V

promotes skin sclerosis by inducing
macrophages to shift toward M2 第8

6回日本生化学学会、横浜
(2013.9.11-13)

(4) Mika Terao, Saori Itoi, Shun Kitaba,
Hiroyuki Murota, Ichiro Katayama:

Local cortisol activation by
11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1 in

keratinocytes down regulates skin
inflammation. The 39th Annual

Meeting of the Japanese Society for
Investigative Dermatology Osaka,

Japan (2014. 12.12-13)

(5) Sayaka Matsumura, Mika Terao,
Hiroyuki Murota, Ichiro Katayama:

Th2 cytokines enhance TrkA
expression and upregulate

proliferation and downregulate
differentiation of keratinocytes. The

39th Annual Meeting of the Japanese
Society for Investigative Dermatology

Osaka, Japan (2014. 12.12-13)

(6) Mizuki Yutani, Mika Terao, Arisa
Kato, Hiroyuki Murota, Eiji Miyoshi,

Ichiro Katayama: Oligosaccharide
modification by GnT-V augments

oxazolone-induced atopic
dermatitis-like symptoms. The 39th

Annual Meeting of the Japanese
Society for Investigative Dermatology

Osaka, Japan (2014. 12.12-13)

(7) Mika Terao, Saori Itoi, Hiroyuki
Murota, Ichiro Katayama: Activation of

local cortisol by 11 β -HSD1 in
keratinocytes is important in

suppressing local inflammation.

International Symposium on Atopic
Dermatitis/8th Georg Rajka

Symposium May 21st -23rd 2014
Nottingham, UK

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

研究者番号 : 40570669

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし