

令和 4 年 9 月 3 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03441

研究課題名（和文）GlcNAcによる胃分化型癌の制御機構

研究課題名（英文）Regulatory mechanism of gastric differentiated type adenocarcinoma by alphaGlcNAc

研究代表者

中山 淳（Nakayama, Jun）

信州大学・学術研究院医学系・教授

研究者番号：10221459

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：GlcNAcによる胃分化型癌発生の制御機構におけるIL-11とMUC1の関与について検討した。IL-11については、野生型マウスのIL-11受容体にGlcNAcが結合し、またA4gnt KOマウスでは野生型マウスと比較してSTAT3のリン酸化が亢進していることを提示した。また、ヒト胃分化型癌の8%の症例で癌細胞におけるGlcNAc陰性かつリン酸化STAT3陽性を確認した。一方、MUC1についてはA4gnt KOマウスの癌化にMUC1が積極的に関与している可能性を示す知見は得られなかった。以上より、胃分化型癌発生制御機構の一つにIL-11を介するSTAT3のリン酸化抑制が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により胃腺粘液におけるGlcNAcの消失はIL-11シグナルの活性化を促進することで分化型胃癌の発生に結びつく可能性が示された。糖鎖による胃癌抑制機構についての知見は未だ乏しいことから、本研究成果は糖鎖病理学分野においての学術的意義がある。またA4gnt KOマウスの胃分化型癌発生にはSTAT3の活性化が関連することが示唆され、さらにヒト胃分化型癌でも癌細胞におけるGlcNAc陰性かつリン酸化STAT3陽性例が確認できた。この結果は、分化型胃癌の治療戦略として、IL-11/STAT3経路の阻害が有効である可能性を示している。

研究成果の概要（英文）：This study investigated the involvement of IL-11 and MUC1 signalings in the regulation of pathogenesis in differentiated-type gastric adenocarcinoma by GlcNAc. With regard to IL-11 signaling, GlcNAc bound to the IL-11 receptor (IL-11RA) in wild-type mice and phosphorylation of STAT3 was enhanced in A4gnt KO mice compared to wild-type mice. In addition, GlcNAc-negative and phosphorylated STAT3-positive cancer cells were observed in 8% of human differentiated-type gastric adenocarcinoma. On the other hand, analysis of A4gnt KO mice did not reveal significant findings suggesting a possible involvement of MUC1. These results combined together indicate that IL-11-mediated inhibition of STAT3 phosphorylation is one of the regulatory mechanisms of pathogenesis in gastric carcinoma.

研究分野：人体病理学

キーワード：糖鎖 胃癌 炎症 遺伝子改変マウス ヒト分化型胃癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

胃癌は我が国における悪性腫瘍による死亡者数の上位を占めることから、今日においても主要な悪性疾患の一つである。一方、胃粘膜に存在する粘液細胞は粘膜上層の表層粘液細胞と粘膜下層の腺粘液細胞からなっており、腺粘液細胞は糖鎖の末端に 1,4結合型*N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc)を有する*O*-結合型糖鎖がその足場蛋白質であるMUC6に結合した腺粘液を分泌している。我々は GlcNAcの生合成に係わる 1,4-*N*-アセチルグルコサミン転移酵素 (4GnT)の cDNAを単離し⁽¹⁾、GlcNAcが生体に自然に備わった抗菌剤としてピロリ菌感染から胃粘膜を防御していることを示した⁽²⁾。さらに 4GnTをコードする*A4gnt*遺伝子を欠損した*A4gnt*ノックアウト (KO)マウスを作出し、このマウスの胃粘膜では GlcNAcが完全に消失すると共に、ピロリ菌が感染していなくても胃幽門粘膜では向腫瘍性炎症を基盤に分化型腺癌が自然発生、さらに発癌の過程でIL-11 mRNAの発現が亢進していることを明らかにした⁽³⁾。これらの結果は GlcNAcが2つの異なるメカニズムで胃癌の発症を予防する重要な生体分子であることを示している。最近、我々は野生型マウスの胃粘膜では、MUC1のN末端に GlcNAcが結合していることを見出し (科研費挑戦的萌芽研究 (課題番号16K15255):研究代表者 中山 淳) *A4gnt* KOマウスの癌化にMUC1における GlcNAcの欠失が関与する可能性を示した。

2. 研究の目的

本研究の目的は*A4gnt* KOマウスとヒト胃癌の病理検体を対象に、IL-11とMUC1に着目して GlcNAcによる胃分化型癌発生の制御機構を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子改変マウスを用いた解析

遺伝子改変マウス

A4gnt KO マウスと野生型マウスを使用した⁽³⁾。本研究におけるマウスの使用は信州大学動物実験委員会医学系動物実験小委員会にて承認を受けた (no.300078)。

マウス胃粘膜の採取と保存

マウスより胃を摘出した後、幽門部側より大弯に沿って切り、PBS (pH 7.4)で洗浄した。その後、胃粘膜を筋層から剥離、液体窒素を用いて凍結、解析時まで-80 に保存した。

イムノプロット法

5週齢、10週齢、20週齢、50週齢の野生型マウス (n = 6) と *A4gnt* KO マウス (n = 6) の胃粘膜から調製した蛋白質溶解液を対象に、イムノプロット法により STAT3、AKT および ERK1/2 のリン酸化 (p)の程度を解析した。一次抗体として p-STAT3 (#9145)、STAT3 (#9139)、p-AKT (#4060)、AKT (#4691)、p-p44/42 MAPK (p-ERK1/2) (#4370)、p44/42 MAPK (ERK1/2) (#9102) (何れも Cell Signaling Technology より購入)を使用した。

免疫沈降-イムノプロット法

IL-11 受容体 (IL-11RA)と MUC1 の免疫沈降には 10週齢の野生型マウスと *A4gnt* KO マウスの胃粘膜から抽出した蛋白質溶解液を使用した。免疫沈降用の抗体として、抗 IL-11RA 抗体は 4D12 (Santa Cruz)を、MUC1 の C ドメインに対する抗体として Ab-5 (#HM-1630-PABX; Thermo Scientific)を使用した。イムノプロット用の抗体として、IL-11RA に対する抗体は 4D12 と IL-

11RA ポリクローナル抗体 (bs-6759R; Bioss)を、GlcNAc に対する抗体は HIK1083 (関東化学) を使用した。また、 β -actin に対する抗体は 013-24553 (WAKO)を用いた。一方、MUC1 のリン酸化については抗 p-tyrosine 抗体 P-Tyr-100 (#9411; Cell Signaling Technology)を使用した。

GSA-II レクチンビーズ結合画分のイムノプロット分析

10 週齢の野生型マウス並びに *A4gnt* KO マウスの胃粘膜から蛋白質溶解液を調製した。この可溶性画分からアガロースビーズに対して非特異的に結合するタンパク質を除去した後、溶解液に GSA-II レクチンビーズ (A-2402-2; EY Laboratories)を添加した。4 分でローテーション、洗浄した後、ビーズ結合画分を回収し、HIK1083 抗体と抗 IL-11RA 抗体 (bs-6759R)を用いて、それぞれ GlcNAc と IL-11RA に対するイムノプロット分析を行った。

病理組織学的解析

頸椎脱臼により安楽死させた 5 週齢、10 週齢、20 週齢、50 週齢の野生型マウス (n = 6)および *A4gnt* KO マウス (n = 6)から胃を摘出し、大弯側で開き、10%中性緩衝ホルマリン (pH 7.4) で固定した。パラフィン包埋ブロックから 3 μ m の組織切片を作製し、HE 染色並びに免疫染色を行った。一次抗体として、p-ERK1/2、p-AKT、p-STAT3、MUC1-C に対する抗体は 3 (1) あるいは 3 (1) に記載したものを使用した。また、IL-11RA に対する抗体は bs-6759R (Bioss)を使用した。抗原賦活化は、IL-11RA 以外は 10 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) + 1 mM EDTA を用いたマイクロフエーブ処理を、IL-11RA は 10 mM クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0)を用いたマイクロフエーブ処理を行った。

A4gnt/*Il11* ダブルノックアウト(DKO)マウス胃粘膜の病理組織学的解析

10 週齢の *A4gnt* /*Il11* DKO マウス (n = 9)と *A4gnt* KO マウス (n = 18) (東京大学大学院農学生命科学研究科 角田 茂准教授より恵与)の胃のホルマリン固定パラフィン包埋ブロックから 3 μ m の組織切片を作製した後、3 (1) と同様、HE 染色と p-STAT3 に対する免疫染色を行った。

統計解析

統計解析は Mann-Whitney U-test を用いて行い、*P* 値が 0.05 未満の場合に有為差ありと判定した。

(2) ヒト分化型早期胃癌を用いた病理組織学的解析

症例

内視鏡的切除された分化型早期胃癌 53症例の病理組織標本を解析対象とした。本研究におけるヒト検体の使用については、信州大学医学部医倫理委員会の承認を受けた (no.5103)。

病理組織学的解析

上記の病理組織標本に対して、(1) と同様、HIK1083 抗体と抗 p-STAT3 抗体 (#9145)を用いた免疫染色を行った。

統計解析

統計解析は 2x2 Chi square test を用い、*P* 値が 0.05 未満の場合に有為差ありと判定した。

4 . 研究結果

(1) 遺伝子改変マウスを用いた解析

A4gnt KO マウスの胃粘膜では IL-11 シグナルが活性化している

A4gnt KO マウス胃粘膜では野生型マウスと比較し IL-11 mRNA の発現レベルが亢進していることから⁽³⁾、IL-11 シグナルの下流で活性化される STAT3、AKT、ERK に関して⁽⁴⁾、週齢(wk)毎の活

性化(リン酸化)をイムノプロット法により定量解析した。STAT3 のリン酸化は野生マウスと比較して *A4gnt* KO マウスで高く、また 50 週齢までの経時的変化では、5 週齢と 10 週齢において野生型マウスと比較し、*A4gnt* KO マウスで有意に高値であった (図 1)。また、免疫組織化学的に IL-11RA は幽門腺細胞に、p-STAT3 は幽門腺細胞と間質の単核球に発現していた (図 2)。次に AKT のリン酸化は 10 週

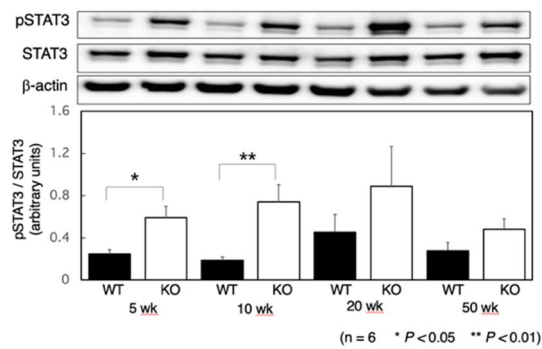


図1 野生型マウス(WT)と*A4gnt* KOマウス(KO)の胃粘膜におけるSTAT3のリン酸化

齢以降で亢進し、免疫組織化学的に p-AKT は表層粘液細胞に発現していた。ERK のリン酸化の経時的変化は、5~50 週齢の *A4gnt* KO マウスで野生型マウスと比較して亢進していた。免疫組織化学的に p-ERK は表層粘液細胞に局在していたが、その分布は不均一であった。一方、免疫組織化学的に MUC1-C は野生型マウスの幽門腺に局限していたが、*A4gnt* KO マウスの胃幽門粘膜では加齢とともに腺管下層から上層に拡大した。しかしながら、MUC1-C の核における局在は確認できなかった。また、免疫沈降-イムノプロット法による解析でも *A4gnt* KO マウスの胃粘膜における MUC1 の C 末端サブユニットのリン酸化は確認できなかった。

以上の結果より *A4gnt* KO マウスの胃粘膜では IL-11 シグナルが活性化していることが明らかになった。*A4gnt* KO マウスでは CCL2 mRNA と HGF mRNA の発現が亢進していることから⁽³⁾、p-STAT3 陽性の幽門腺細胞から CCL2 が分泌され⁽⁵⁾、単核球がリクルート、その単核球も M2 型マクロファージの特徴である p-STAT3 を発現していることから⁽⁶⁾、そこから HGF 等の細胞増殖因子が放出、これらが上皮の c-MET 等の受容体と作用することで AKT と ERK のリン酸化が生じ⁽⁷⁾、上皮の増殖亢進や生存に繋がっている可能性があると考えられる。この点を検証するため、更なる解析が必要である。なお、MUC1 については、免疫組織化学的解析並びに免疫沈降-イムノプロット法による解析の何れにおいても、*A4gnt* KO マウスの胃発癌に MUC1 が積極的に関与している可能性を示唆する知見は得られなかったことから、以降 MUC1 の解析は行わなかった。

A4gnt/*Il11* DKO マウスの胃粘膜では p-STAT3 の発現が減弱する

A4gnt KO マウス胃粘膜における STAT3 活性化の要因が IL-11 そのものであるか否かを検討するため、*A4gnt* KO マウスと *A4gnt*/*Il11* DKO マウスの胃粘膜における p-STAT3 の発現を免疫組織化学的に解析した (図 2)。*A4gnt*/*Il11* DKO マウスにおいて p-STAT3 の発現は *A4gnt* KO マウスと比較し減弱したが、完全には陰性化しなかった。また、*A4gnt*/*Il11* DKO マウスの胃粘膜病変は *A4gnt* KO マウスと比較して有意に厚さが減じた ($P < 0.05$)。異型度も減弱したが、病変は残存した。

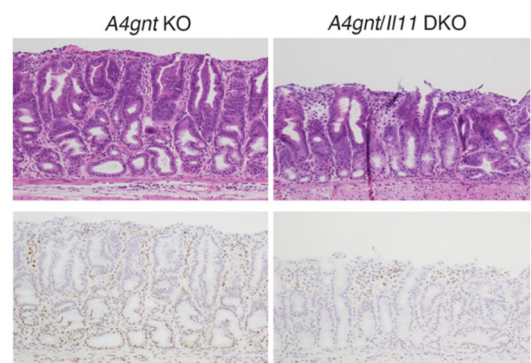


図2 *A4gnt* KOマウスと*A4gnt*/*Il11* DKOマウス(何れも10週齢)の胃幽門粘膜におけるp-STAT3の発現

以上の結果より、*A4gnt* KO マウスにおける STAT3 活性化の主要因は IL-11 であるものの、IL-11 を介さない STAT3 活性化経路の存在も示唆された。

GlcNAc は IL-11RA を糖鎖修飾することで STAT3 の活性化を抑制している可能性がある

IL-11 は IL-11RA と結合した後、IL-11RA が gp130 と結合し、IL-11/IL-11RA/gp130 複合体が形成される^(4,5)。さらにこれら複合体が会合し、6 量体を形成することで、下流の JAK/STAT3 経路が活性化させる。IL-11RA には 2 か所に *N*-グリカン結合部位 (ヒトでは *N*-グリカンに加えて

0-グリカンも結合している)があり⁽⁸⁾、また免疫組織化学的にも4(1)に示したように *A4gnt* KOマウスの幽門腺細胞にはIL-11RAが発現していたことから、IL-11RAにおける

GlcNAc修飾の有無を解析した。10週齢の野生型ならびに *A4gnt* KOマウスの胃粘膜溶解液中のGSA-II結合画分を対象に、抗GlcNAc抗体および抗IL-11RA抗体を用いたイムノブロット分析を行った(図3A)。

GlcNAcは野生型マウス由来GSA-II結合画分のIL-11RAに相当する分子量51kDaに検出され、さらにこのバンドは抗IL-11RA抗体と反応した。一方、10週齢の野生型ならびに *A4gnt* KOマウスの胃粘膜溶解液の抗IL-11RA抗体免疫沈降物を対象として、抗GlcNAc抗体および抗IL-11RA抗体を用いたイムノブロット分析を行った(図3B)。その結果、野生型マウス由来のIL-11RAにGlcNAcが検出されたことから、IL-11RAはGlcNAc修飾を受けていることが示された。

以上の結果から、野生型マウスにおいてGlcNAcはIL-11RAと結合していることが示された。この結果は野生型マウスにおいてIL11RAがgp130あるいはIL-11と会合される際にGlcNAcが結合していることで立体障害を受けている可能性を示している。

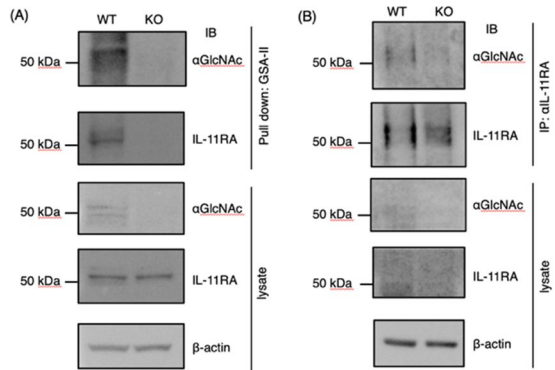


図3 αGlcNAcのIL-11RAへの結合

(2) ヒト分化型胃癌の8%は、癌細胞においてGlcNAc陰性かつp-STAT3陽性である

ヒト分化型胃癌において、癌細胞におけるGlcNAcの消失とp-STAT3の発現との関連を解析するため、37例のヒト分化型早期胃癌の組織切片に対してGlcNAcとp-STAT3の免疫染色を行った。

GlcNAcは35.1%に陽性、p-STAT3は81.0%に陽性であり、*A4gnt* KOマウスの表現型を示すGlcNAc陰性かつp-STAT3陽性例は8%に認められた(図4)。

しかし、GlcNAc陰性とp-STAT3陽性との間に統計学的有意差は得られなかった($P = 0.69$)。

以上の結果から、GlcNAcによる分化型胃癌制御機構の一つとして、STAT3の活性化抑制が示された。

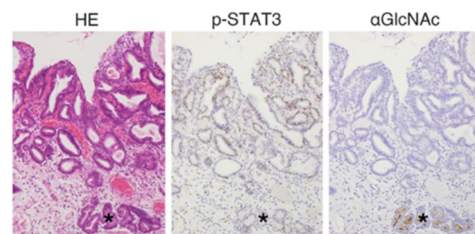


図4 ヒト分化型胃癌(粘膜内癌)におけるp-STAT3とαGlcNAcの発現
*: 非腫瘍性幽門腺

<引用文献>

- (1) Nakayama et al, *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 8991-8996, 1999
- (2) Kawakubo et al, *Science* 305, 1003-1006, 2004
- (3) Karasawa et al, *J Clin Invest* 122, 923-934, 2012
- (4) Giraladez et al, *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 18, 787-803, 2021
- (5) Ernst et al, *Semin Immunol* 26, 29-37, 2014
- (6) Komohara and Takeya, *Cancer Sci* 105, 1-8, 2014
- (7) Organ and Tsao, *Ther Adv Med Oncol* 3, S7-S19, 2011
- (8) Agthe et al, *Cell Physiol Biochem* 45, 2071-2085, 2018

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Matoba H, Takamoto M, Fujii C, Kawakubo M, Kasuga E, Matsumura T, Natori T, Misawa K, Taniguchi S, Nakayama J	4. 巻 190
2. 論文標題 Cecal tumorigenesis in aryl hydrocarbon receptor-deficient mice depends on cecum-specific mitogen-activated protein kinase pathway activation and inflammation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 American Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 453-468
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ajpath.2019.10.005	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 Yamada S, Yamanoi K, Sato Y, Nakayama J	4. 巻 77
2. 論文標題 Diffuse MIST1 expression and decreased 1,4-linked N-acetylglucosamine (GlcNAc) glycosylation on MUC6 are distinct hallmarks for gastric neoplasms showing oxyntic gland differentiation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Histopathology	6. 最初と最後の頁 413-422
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/his.14165	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 Okumura M, Yamanoi K, Uehara T, Nakayama J	4. 巻 111
2. 論文標題 Decreased alpha-1,4-linked N-acetylglucosamine glycosylation in biliary tract cancer progression from biliary intraepithelial neoplasia to invasive adenocarcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 629-4635
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14677	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 -
1. 著者名 Kobayashi J, Kawakubo M, Fujii C, Arisaka N, Miyashita M, Sato Y, Komura H, Matoba H, Nakayama J	4. 巻 118
2. 論文標題 Cholestenone functions as an antibiotic against Helicobacter pylori by inhibiting biosynthesis of the cell wall component CGL	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America	6. 最初と最後の頁 e2016469118
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas	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 Yuki A, Fujii C, Yamanoi K, Matoba H, Harumiya S, Kawakubo M, Nakayama J	4. 巻 113
2. 論文標題 Glycosylation of MUC6 by 1,4-linked N-acetylglucosamine enhances suppression of pancreatic cancer malignancy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 576-586
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15209	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 -

1. 著者名 Matoba H, Ikeyama M, Kobayashi N, Takemura H, Hanaoka T, Sato Y, Nakayama J	4. 巻 72
2. 論文標題 Mucin distribution in bronchiolar adenoma/ciliated mucinodular papillary tumor reveals organoid differentiation simulating the normal lung	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pathology International	6. 最初と最後の頁 300-306
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pin.13220	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 Yamanoi K, Fujii C, Yuzuriha H, Kumazawa M, Shimoda M, Emoto K, Asamura H, Nakayama J	4. 巻 157
2. 論文標題 MUC6 expression is a preferable prognostic marker for invasive mucinous adenocarcinoma of the lung	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Histochemistry and Cell Biology	6. 最初と最後の頁 671-681
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00418-022-02093-1	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 抗ピロリ菌活性を有するコレステロール類似物質	発明者 中山 淳、川久保雅友	権利者 国立大学法人信州大学
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2021/3143	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

信州大学医学部医学科・大学院総合医理工学研究科医学系専攻医学分野 分子病理学教室
<http://www.shinshu-u.ac.jp/faculty/medicine/chair/i-2byori/index.html>

Cholestenone shows antibiotic properties against H. pylori
<https://www.eurekalert.org/news-releases/713799>

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
研究協力者	川久保 雅友 (Kawakubo Masatomo)		
研究協力者	藤井 千文 (Fujii Chifumi)		
研究協力者	春宮 覚 (Harumiya Satoru)		
研究協力者	小村 仁美 (Komura Hitomi)		
研究協力者	的場 久典 (Matoba Hisanori)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------