

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07762

研究課題名(和文)細胞内分子の可逆的糖鎖修飾システムを標的とする新規癌診断と治療の開発

研究課題名(英文)Development of novel diagnosis and therapy in cancer targeting reversible system of intracellular glycosylation

研究代表者

竹内 利寿(Toshihisa, Takeuchi)

大阪医科薬科大学・医学部・准教授

研究者番号：30445986

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：O-GlcNAc修飾は、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進展に働くが、その機能の全容は分かっていない。本研究では、O-GlcNAc修飾の亢進が、癌で過剰発現して癌進展に働く転写因子FOXM1の発現を増加させることを示した。胃癌細胞株において、O-GlcNAc脱離酵素OGAを阻害しO-GlcNAc修飾を亢進させると、細胞増殖が促進し、抗腫瘍薬の効果が減弱した。一方、O-GlcNAc付加酵素OGTの阻害により、細胞増殖が低下し、抗腫瘍薬の効果が増強した。以上から、癌細胞の増殖能及び抗腫瘍薬への耐性を高めるOGTやFOXM1は癌治療の標的とな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

癌で上昇するO-GlcNAc修飾は、癌の治療標的として期待されてきたが、O-GlcNAcの標的分子が多岐に渡り、その機能の全容は分かっていなかった。本研究により、O-GlcNAc修飾が、癌の予後不良マーカーとして注目されているFOXM1の発現を制御して癌の進展に強く影響していること、また、抗腫瘍薬の効果を左右していることが明らかになった。これらの結果は、癌の特性を知り、新しい癌治療の可能性を追求する上で役立つものと期待される。

研究成果の概要(英文)：O-GlcNAcylation mediates translational modification through glucose metabolite and is upregulated in cancer cells to promote cancer progression. Many of its target molecules are known and the diverse functions are not fully understood. In this study, we showed that elevated O-GlcNAcylation upregulates expression levels of FOXM1, which is a critical oncogenic transcription factor and its overexpression is associated with poor prognosis of various cancers, via decrease of its ubiquitination. In NUGC-3 human gastric cancer cells, elevated O-GlcNAcylation by OGA (O-GlcNAcase) inhibitor promoted cell proliferation and resistance to some anticancer drugs. On the contrary, downregulated O-GlcNAcylation by OGT (O-GlcNAc transferase) inhibitor reduced cell proliferation and increased sensitivity to them. These data indicate that elevated O-GlcNAcylation promotes cancer cell proliferation and drug resistance via upregulation of FOXM1, and OGT and FOXM1 are potential targets for cancer therapy.

研究分野：消化器内科学

キーワード：O-GlcNAc修飾 FOXM1 FBXL2

## 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のタンパク質の側鎖 Ser/Thr の水酸基に単糖 O-GlcNAc を付加し、タンパク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 と脱離酵素 OGA により担われ、それにも関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と代謝が亢進しているため、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を増幅することから、治療標的分子として注目されている。しかしながら、O-GlcNAc 修飾の標的分子、および、その制御機構の全容は理解されておらず、また、O-GlcNAc 修飾の関連分子を標的とした癌治療の可能性は十分に検討されていない。我々は、O-GlcNAc 修飾による癌細胞の調節機構を解析する中で、細胞内の O-GlcNAc 修飾を亢進させると、癌の予後不良マーカーの1つである転写因子 FOXM1 の発現量が増加することを見出した。

## 2. 研究の目的

胃癌を例に O-GlcNAc 修飾、および、その制御下にある FOXM1 を標的とした診断および癌治療の可能性を追求する。

## 3. 研究の方法

ヒト胃癌細胞の培養系を用いて、OGT 阻害剤や OGA 阻害剤を用いて細胞質内の O-GlcNAc 修飾レベルを調整し、O-GlcNAc 修飾の標的タンパク質の挙動、癌細胞の挙動、それらの関連性、そして、抗腫瘍薬の効果を検証する。また、O-GlcNAc 修飾の標的タンパク質の発現を、分子生物学手法や阻害剤などを用いて変化させて、関連分子の挙動、癌細胞の挙動、抗腫瘍薬の効果を検証する。

## 4. 研究成果

複数のヒト胃癌細胞株を用いて、OGA 阻害剤により O-GlcNAc 修飾を亢進させると、FOXM1 の発現が上昇することを確認し、それは、FOXM1 のユビキチン化が減少してタンパク質分解を免れている結果であることを明らかにした。しかし、免疫沈降法により FOXM1 の O-GlcNAc 修飾の検出を試みたところ検出されなかったことから、FOXM1 は、間接的に O-GlcNAc 修飾の制御を受けていると考えられた。

そこで、FOXM1 のユビキチン化に働く関連分子が O-GlcNAc 修飾の標的となり得るのか、免疫沈降法により解析したところ、FOXM1 をリン酸化してその後のユビキチン化を亢進させる GSK-3 とユビキチン化酵素 FBXL2、さらに、脱ユビキチン化酵素 USP22 も O-GlcNAc 化されることが分かった。O-GlcNAc 修飾が亢進すると、GSK-3 は不活性型が増加し、FBXL2 はそれ自身のユビキチン化と分解が亢進して発現が減少すること、一方、USP22 は発現量および FOXM1 との結合が増加することが明らかとなった。

0-GlcNAc 修飾は、幅広く分子を標的とするため、本当に FBXL2 と USP22 により FOXM1 の発現および機能が制御され得るのかを明らかにするために、doxycycline (DOX) による両分子の発現誘導 NUGC-3 胃癌細胞株を作製し、検証した。その結果、FBXL2 の発現誘導により FOXM1 が減少し、USP22 の発現を誘導すると FOXM1 が増加することが確認された。また、FBXL2 を誘導すると、細胞増殖が抑制されることが分かった。さらに、高グルコース処置すると癌細胞の増殖が亢進するが、その時 FBXL2 の発現を誘導すると、細胞増殖の亢進が抑制されることが分かった (図 1)。FBXL2 の siRNA による発現抑制実験においても同様な結果が得られた。以上から、0-GlcNAc 修飾の制御下、FBXL2 と USP22 がバランスをとりながら、FOXM1 の発現を調整していること、癌細胞では、細胞内へのグルコースの取り込みが亢進して 0-GlcNAc 修飾レベルが高値となる結果、バランスが USP22 に傾き、FOXM1 の発現上昇につながると考えられた (図 2)。

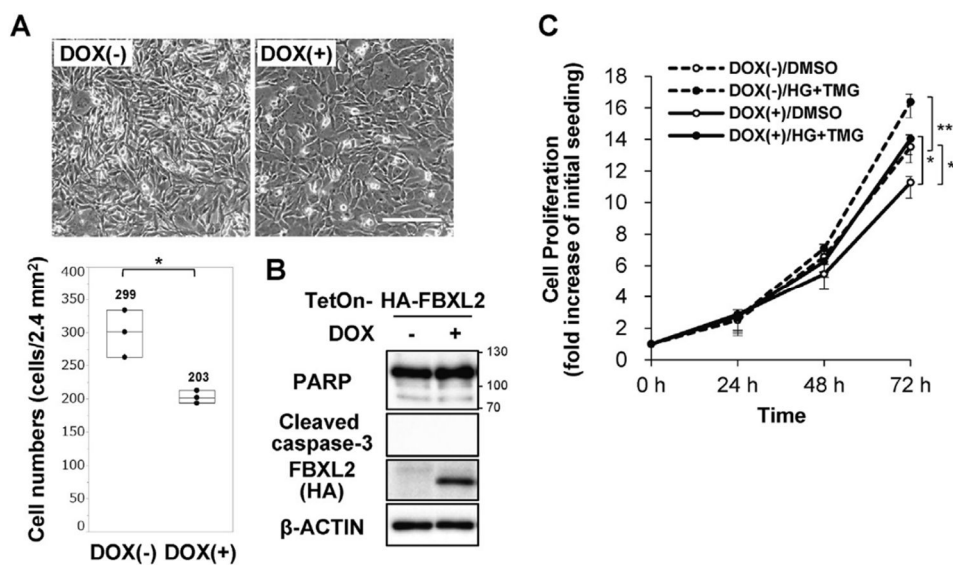
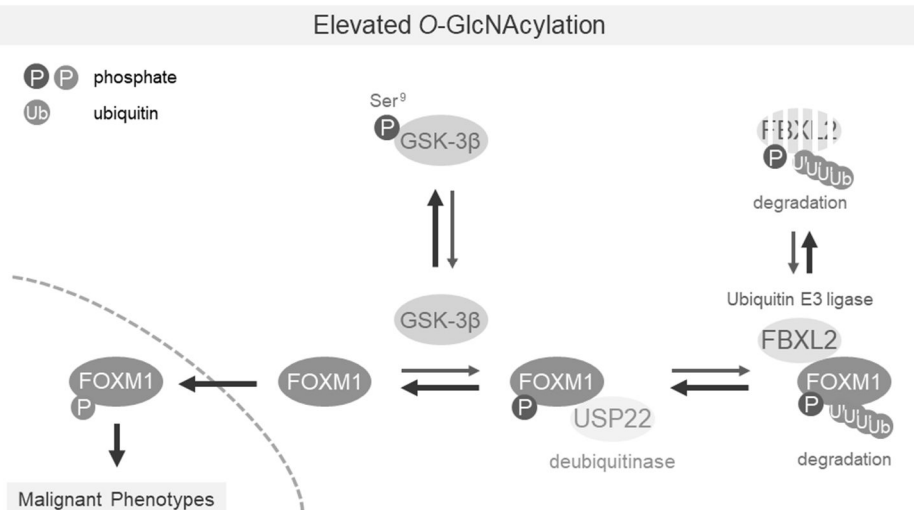


図 1) FBXL2 の発現誘導による細胞増殖の抑制。

図 2) 0-GlcNAc 修飾の亢進による FOXM1 の発現調節機構。



また、FBXL2 をユビキチン化して分解を促進する FBX03 を阻害すると、FBXL2 の発現が上昇に伴って FOXM1 の発現が減少し、癌細胞の増殖が抑制されたことから、FOXM1 の発現制御によって癌細胞の増殖がコントロールされていることが確認された。

最後に、各種阻害剤や抗癌薬の癌細胞への薬効効果試験を行った。FBXL2 もしくは USP22 発現誘導 NUGC-3 細胞を、平面培養 (2D) もしくは、スフェロイド培養 (3D) を行い、DOX

による発現誘導下における、FOXM1 と FBXO3 の阻害剤の効果を検証した(図3)。その結果、USP22 の発現が高ければ、阻害剤による増殖の抑制効果が減弱することが分かった。また、FOXM1 阻害剤は、より生体に近い 3D 培養した癌細胞に効果が高いことが分かった。次に、NUGC-3 細胞の平面培養下、単独では、効果が少ない条件で OGT 阻害剤、OGA 阻害剤、FOXM1 阻害剤を併用して、抗癌剤を処置したところ、OGA 阻害剤の併用時では、抗癌剤シスプラチンおよびイリノテカンの効果が減弱し、OGT 阻害剤及び FOXM1 阻害剤の併用時では、同薬剤に対する効果が増強した(図4)。

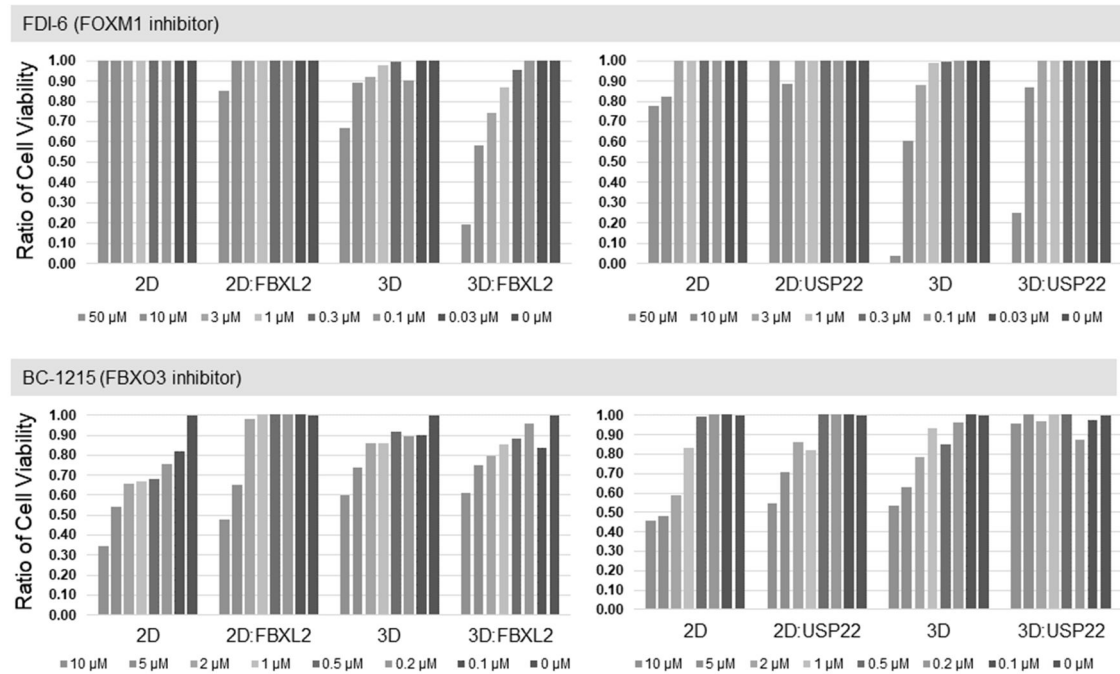
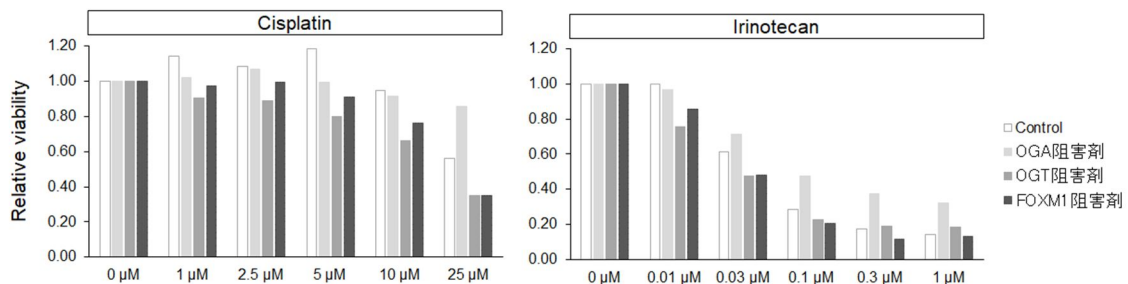


図3) FOXM1 阻害剤および FBXO3 阻害剤の癌細胞増殖抑制効果。

図4) 各種阻害剤を併用時における抗癌薬の効果。



以上の結果から、O-GlcNAc 修飾の亢進は、癌の進展を促進するが、その一部は FOXM1 を介すると考えられ、新規癌治療標的の1つとして OGT や FOXM1 が候補になると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Ueda Y, Moriwaki K, Takeuchi T, Higuchi K, Asahi M.	4. 巻 521
2. 論文標題 O-GlcNAcylation-mediated Degradation of FBXL2 Stabilizes FOXM1 to Induce Cancer Progression.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 632-638
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2019.10.164	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Moriwaki K, Ueda Y, Takeuchi T, Higuchi K, Asahi M
2. 発表標題 O-GlcNAcylation-mediated regulation of FOXM1 expression through its ubiquitination in a human gastric adenocarcinoma cell line, NUGC-3.
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Moriwaki K, Ueda Y, Higuchi K, Asahi M.
2. 発表標題 O-GlcNAcylation-mediated degradation of FBXL2 stabilizes FOXM1 oncogenic transcription factor to promote cancer progression.
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Moriwaki K, Ueda Y, Higuchi K, Asahi M.
2. 発表標題 Elevated O-GlcNAcylation increases FOXM1 via suppression of FBXL2-mediated its poly-ubiquitination.
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ueda Y, Moriwaki K, Sugawara N, Fukumoto M, Harada S, Ota K, Kojima Y, Takeuchi T, Higuchi K, Asahi M.
2. 発表標題 O-GlcNAcylation increases FOXM1 protein via suppression of its poly-ubiquitination and subsequent proteasomal degradation.
3. 学会等名 Digestive Disease Week 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019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	森脇 一将  (Kazumasa Moriwaki)  (00467656)	大阪医科薬科大学・医学部・講師    (34401)	

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
---------	---------