

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08344

研究課題名（和文）糖転移酵素による糖尿病合併癌の制御メカニズムの解明と治療戦略の構築

研究課題名（英文）Elucidation of glycosyltransferase-mediated regulatory mechanism of diabetes-cancer relationship and therapeutic strategy

研究代表者

樋口 和秀 (Higuchi, Kazuhide)

大阪医科薬科大学・医学部・名誉教授

研究者番号：20218697

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：糖尿病で亢進する糖鎖修飾であるO-GlcNAc修飾やコアフコース修飾が癌の増殖や転移へ与える影響について検討した。癌周囲環境のO-GlcNAc修飾の亢進が癌の転移を促進し、コアフコース修飾の亢進が癌の増殖を促進することが明らかになった。糖尿病が癌の予後増悪の一因となっているが、これらの糖鎖修飾の亢進が関与していることが予想されるため、糖尿病患者に合併した癌治療のターゲット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

糖鎖修飾であるO-GlcNAc修飾やコアフコース修飾は糖尿病で亢進することが知られている。糖尿病は、独立した癌のリスクや予後増悪因子であるが、O-GlcNAc修飾やコアフコース修飾の亢進がそのメカニズムの一端を担っていると考えられる。糖尿病担癌患者の治療戦略の一つとして、O-GlcNAc修飾やコアフコース修飾を標的とした糖鎖改変治療が有望である可能性が示唆された。

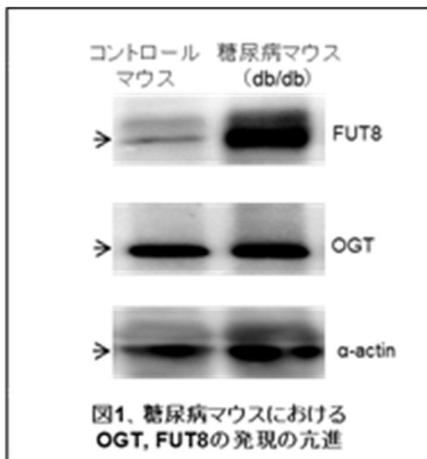
研究成果の概要（英文）：We examined the effect of O-GlcNAc or core-fucose modification that is known to increase in patients with diabetes on cancer cell proliferation or metastasis. We found that augmented O-GlcNAcylation in cancer microenvironment promoted cancer metastasis and augmented core-fucosylation in the microenvironment promoted cancer growth. Since the fact that diabetes is one of the poor prognostic factors may be partly due to augmentation of O-GlcNAcylation or core-fucosylation, those modifications could become drug targets for cancer patients with diabetes.

研究分野：消化器内科学

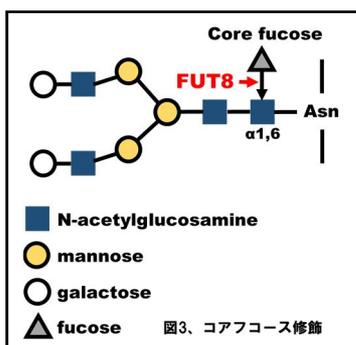
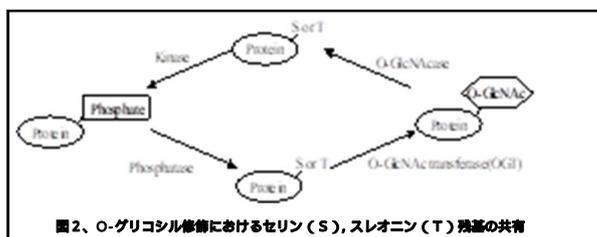
キーワード：糖転移酵素 O-GlcNAc修飾 コアフコース修飾 糖尿病合併癌

### 1. 研究開始当初の背景

我が国は、他の国々と同じように、癌が死因の第1位である。近年、糖尿病と癌罹患リスクとの関連が取りざたされており、臨床的に大きな問題となりつつあるが、癌死亡の増加は糖尿病患者の増加も関連していると思われる。統計データによると、消化器系癌では、糖尿病で胃癌が1.2倍、大腸癌1.3倍、膵臓癌1.8倍ほど癌リスクが高くなっている。にもかかわらず、糖尿病により癌罹患リスクの上昇の原因の追究は十分とは言えない。糖尿病という病態が癌細胞に与える影響は多岐に渡ると考えられるため、タンパク質1分子で説明することはできないだろう。そこで注目したのがタンパク質の50%以上を修飾して翻訳後修飾の中で最も頻度が高く、様々なタンパク質の機能を制御していることが知られている糖鎖修飾である。多くの生命科学の領域で、糖鎖が重要な機能をもっていることが明らかになり、癌、感染症、アレルギー、生活習慣病、神経変性疾患、筋肉変性疾患、糖鎖不全症といった病態で、その成因、診断や治療に直接あるいは間接的に糖鎖の関与が指摘されている。糖鎖修飾は、糖転移酵素により酵素的に行われるが、糖尿病で高発現してくる糖転移酵素も存在し、N-アセチルグルコサミン転移酵素(OGT)や1,6-フコース転移酵素(FUT8)がそれに相当する(図1)。OGTはタンパク質のセリン、スレオニン残基にN-アセチルグルコサミンを転移(O-GlcNAc修飾)し、リン酸化と競合することにより細胞内シグナル伝達に大きく関わっている。FUT8は糖鎖の根元にあるN-アセチルグルコサミンにフコースを転移する糖転移酵素であるが、FUT8の欠損により成長障害、肺気腫、精神障害などの多岐に渡る障害が生じることから、コアフコース修飾は様々な生体機能に関わっている。抗体のADCC活性に関わっていることが知られているが、最近、このコアフコース修飾が、癌免疫に関わっているPD1のT細胞表面における発現に深く関わっていることが分かってきた(Okada M. et al, Cell Rep. 2017)。これらから、OGTやFUT8は癌細胞に与える影響も多大であると推測できるため、これらの酵素から起こるO-GlcNAc修飾(図2)とコアフコース修飾(図3)について研究を進めていく。申請者らはOGTによるO-GlcNAc修飾の亢進が癌細胞の増殖に与える影響について精力的に研究した。そして、悪性黒色腫の細胞株を野生型とOgt過剰発現マウス(Ogt-Tg)に移植し経時的に腫瘍サイズを比較検討する実験を行い、Ogt-Tgに移植した方が癌の増殖がはるかに亢進していることを見出した(図4、Moriwaki K, Asahi M, Mol. Cancer Res, 2017)。また、Ogt-Tgを用いた研究で、O-GlcNAc修飾は炎症のマスター遺伝子であるNF- $\kappa$ Bの活性化を抑制するため、大腸の炎症性発癌には強力な抑制因子であることも見出した(Hirata, Y. et al, J Clin Biochem Nutr, 2018)。それらの結果より、予想以上にOGTの過剰発現(O-GlcNAc修飾の亢進)が癌の発症、増殖に大きな影響を与えていることが明らかとなった。



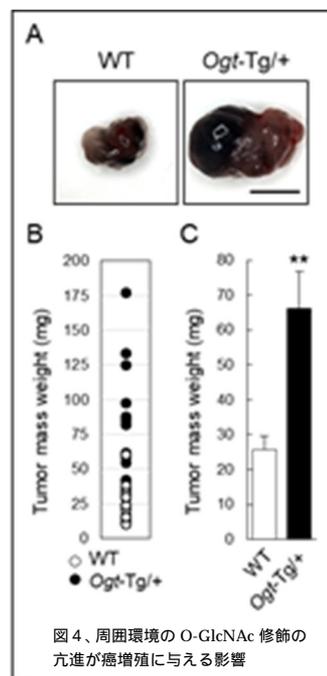
糖鎖修飾は、糖転移酵素により酵素的に行われるが、糖尿病で高発現してくる糖転移酵素も存在し、N-アセチルグルコサミン転移酵素(OGT)や1,6-フコース転移酵素(FUT8)がそれに相当する(図1)。OGTはタンパク質のセリン、スレオニン残基にN-アセチルグルコサミンを転移(O-GlcNAc修飾)し、リン酸化と競合することにより細胞内シグナル伝達に大きく関わっている。FUT8は糖鎖の根元にあるN-アセチルグルコサミンにフコースを転移する糖転移酵素であるが、FUT8の欠損により成長障害、肺気腫、精神障害などの多岐に渡る障害が生じることから、コアフコース修飾は様々な生体機能に関わっている。抗体のADCC活性に関わっていることが知られているが、最近、このコアフコース修飾が、癌免疫に関わっているPD1のT細胞表面における発現に深く関わっていることが分かってきた(Okada M. et al, Cell Rep. 2017)。これらから、OGTやFUT8は癌細胞に与える影響も多大であると推測できるため、これらの酵素から起こるO-GlcNAc修飾(図2)とコアフコース修飾(図3)について研究を進めていく。申請者らはOGTによるO-GlcNAc修飾の亢進が癌細胞の増殖に与える影響について精力的に研究した。そして、悪性黒色腫の細胞株を野生型とOgt過剰発現マウス(Ogt-Tg)に移植し経時的に腫瘍サイズを比較検討する実験を行い、Ogt-Tgに移植した方が癌の増殖がはるかに亢進していることを見出した(図4、Moriwaki K, Asahi M, Mol. Cancer Res, 2017)。また、Ogt-Tgを用いた研究で、O-GlcNAc修飾は炎症のマスター遺伝子であるNF- $\kappa$ Bの活性化を抑制するため、大腸の炎症性発癌には強力な抑制因子であることも見出した(Hirata, Y. et al, J Clin Biochem Nutr, 2018)。それらの結果より、予想以上にOGTの過剰発現(O-GlcNAc修飾の亢進)が癌の発症、増殖に大きな影響を与えていることが明らかとなった。



細胞内シグナル伝達に大きく関わっている。FUT8は糖鎖の根元にあるN-アセチルグルコサミンにフコースを転移する糖転移酵素であるが、FUT8の欠損により成長障害、肺気腫、精神障害などの多岐に渡る障害が生じることから、コアフコース修飾は様々な生体機能に関わっている。抗体のADCC活性に関わっていることが知られているが、最近、このコアフコース修飾が、癌免疫に関わっているPD1のT細胞表面における発現に深く関わっていることが分かってきた(Okada M. et al, Cell Rep. 2017)。これらから、OGTやFUT8は癌細胞に与える影響も多大であると推測できるため、これらの酵素から起こるO-GlcNAc修飾(図2)とコアフコース修飾(図3)について研究を進めていく。申請者らはOGTによるO-GlcNAc修飾の亢進が癌細胞の増殖に与える影響について精力的に研究した。そして、悪性黒色腫の細胞株を野生型とOgt過剰発現マウス(Ogt-Tg)に移植し経時的に腫瘍サイズを比較検討する実験を行い、Ogt-Tgに移植した方が癌の増殖がはるかに亢進していることを見出した(図4、Moriwaki K, Asahi M, Mol. Cancer Res, 2017)。また、Ogt-Tgを用いた研究で、O-GlcNAc修飾は炎症のマスター遺伝子であるNF- $\kappa$ Bの活性化を抑制するため、大腸の炎症性発癌には強力な抑制因子であることも見出した(Hirata, Y. et al, J Clin Biochem Nutr, 2018)。それらの結果より、予想以上にOGTの過剰発現(O-GlcNAc修飾の亢進)が癌の発症、増殖に大きな影響を与えていることが明らかとなった。

### 2. 研究の目的

本研究は、糖尿病で罹患率が高くなる消化器癌の中で、胃癌、大腸癌、膵癌に焦点を絞り、糖尿病で起こる糖鎖修飾の変化がそれらの癌の発症、増殖、浸潤、転移に関わるメカニズムを分子レベルで解明することを目的とした。糖尿病で発現・活性が増加する糖転移酵素であるN-アセチルグルコサミン(O-GlcNAc)転移酵素(以下、OGTと略す)と1,6-フコース転移酵素(以下、FUT8と略す)の過剰発現マウス(以下Ogt-Tg, Fut8-Tgと略す)対



して、胃癌自然発症マウスとの交配、炎症性発癌物質 DMH/DSS の暴露（大腸癌）膵臓癌細胞の移植といった様々な方法により、癌周囲環境の糖鎖の変化が癌の発症、増殖、浸潤、転移に与える影響を野生型マウスと比較検討し、その分子メカニズムを解明した。そして、糖尿病担癌患者の糖鎖改変による治療の可能性を考察した。

### 3. 研究の方法

#### 1) 癌周囲環境の O-GlcNAc 修飾が、癌の転移に与える影響の検討

癌周囲環境の O-GlcNAc 修飾と癌の増殖についてはすでに報告している (Moriwaki K, Asahi M, Mol. Cancer Res, 2017 等) が、本研究では癌の転移との関連性を検討する。C57BL/6 マウス由来の膵臓癌細胞株 Panc2 を Ogt-Tg, Fut8-Tg の皮下に移植し、癌の増殖率を WT への移植と比較検討する。コアフコース修飾が胃癌、大腸癌の発症、膵臓癌の増殖に影響しなかった場合、Fut8-Tg では脂肪肝が普通食で自然発症することが報告されているので、高脂肪食や発癌物質投与で肝臓癌モデルの作製を試み、確立できれば、糖尿病でリスクが 2.5 倍になると言われている肝臓癌のマウスモデルに対するコアフコース修飾の影響を上記の方法で検討した。

#### 2) 癌周囲環境のコアフコース修飾が癌の増殖に与える影響の検討

悪性黒色腫細胞株 B16-BL6 を用いて、Fut8-Tg への癌移植実験を行った。Fut8-Tg に B16-BL6 を移植し、移植後 6, 10, 12, 14 日の腫瘍サイズを測定し、野生型マウスと比較検討した。

### 4. 研究成果

糖尿病で発現・活性が上昇する糖転移酵素である N-アセチルグルコサミン (O-GlcNAc) 転移酵素 (OGT) と 1,6-フコース転移酵素 (FUT8) の高発現マウス (Ogt-Tg, Fut8-Tg) を用いて実験を行った。

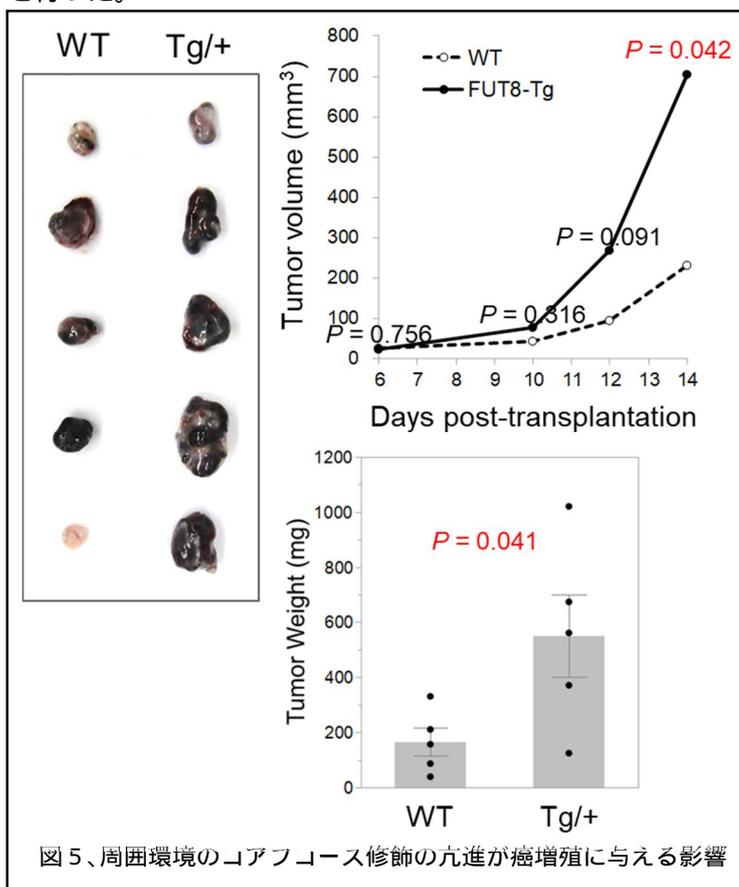


図5、周囲環境のコアフコース修飾の亢進が癌増殖に与える影響

析では、野生型マウスに比べて、FUT8-Tg 由来組織では、明らかにコアフコース修飾が亢進していたため、癌微小環境におけるコアフコース修飾の亢進が、移植 B16-BL6 による癌増殖を促進したと考えられた。

以上のデータより、癌周囲環境の O-GlcNAc 修飾やコアフコース修飾が亢進すれば、癌の増殖や転移が亢進することが分かった。これらの糖鎖修飾が、糖尿病患者で増加することから、治療ターゲットになる可能性が示唆された。

1) Ogt-Tg を用いて、癌周囲組織の O-GlcNAc 修飾が転移へ与える影響について検討した。ルシフェラーゼ恒常発現癌細胞をマウスに移植した後に、マウスの癌の増殖、転移を経時的に観察することにより転移の程度を比較した。その結果、Ogt-Tg マウスに移植した癌細胞の方が、肝臓、脾臓などの多臓器に転移しやすいことが分かった。癌周囲環境の O-GlcNAc 修飾の亢進が、膵臓の周囲臓器への転移を促進している可能性が考えられた。

2) 悪性黒色腫細胞株 B16-BL6 を用いて、Fut8-Tg への癌移植実験を行った。Fut8-Tg に B16-BL6 を移植し、移植後 6, 10, 12, 14 日の腫瘍サイズを測定し、野生型マウスと比較検討した (図 3)。その結果、野生型マウスと比較して、FUT8-Tg において、移植 B16-BL6 細胞による腫瘍が 12 日、14 日後で有意に大きくなっていることが分かった。生体組織を用いたウェスタンブロット法による解

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 Naka, Y., Okada, T., Nakagawa, T., Kobayashi, E., Kawasaki, Y., Tanaka, Y., Tawa, H., Hirata, Y., Kawakami, K., Kakimoto, K., Inoue, T., Takeuchi, T., Fukunishi, S., Hirose, Y., Uchiyama, K., Asahi, M., and Higuchi, K.	4. 巻 20
2. 論文標題 Enhancement of O-linked N-acetylglucosamine modification promotes metastasis in patients with colorectal cancer and concurrent type 2 diabetes mellitus.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncology Letter	6. 最初と最後の頁 1171-1178
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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0件

〔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)	大阪医科薬科大学・医学部・教授  (34401)	
研究分担者	三善 英知 (Miyoshi Eiji)  (20322183)	大阪大学・大学院医学系研究科・教授  (14401)	

	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	森脇 一将 (Moriwaki Kazumasa)		

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