

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09053

研究課題名（和文）新奇糖鎖を欠損した胃癌自然発症マウスにおける胃癌発生機構

研究課題名（英文）Mechanism of gastric cancer naturally development in novel glycan deficient mice

研究代表者

春宮 覚（Harumiya, Satoru）

信州大学・医学部・特任准教授

研究者番号：50301792

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）：A4gntノックアウト(KO)マウスの胃癌発生機構を明らかにするため、IL-11シグナルの活性化制御について検討した。A4gnt KOマウス胃粘膜ではJAK2 STAT3経路の活性化とgp130の発現亢進が確認された。野生型マウス胃粘膜とAGS細胞を使用した解析から GlcNAcがIL-11受容体およびgp130に結合することによりIL-11/IL-11受容体/gp130複合体が形成されず、STAT3の活性化を抑制していることが示唆された。これらの結果からA4gnt KOマウスではIL-11 JAK2 STAT3経路の活性が亢進することにより、胃癌が自然発生する可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

GlcNAcの欠損による胃分化型癌の発生機構として、発癌シグナルであるIL-11 JAK2 STAT3経路が活性化されることを明らかにした。たった1つの糖の欠損という僅かな変化が原因で胃に生じる顕著な表現型が癌関連シグナルの活性化によるという事実は、糖鎖病理学領域における新知見であり、学術的意義がある。また、これらの結果から GlcNAcによる癌関連シグナルの抑制は、新たな胃癌の予防、治療法開発への研究基盤になることが期待できる。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the mechanism of gastric carcinogenesis in A4gnt knockout (KO) mice, the regulation of IL-11 signaling activation was investigated. Activation of the JAK2 STAT3 pathway and increased gp130 expression were observed in the gastric mucosa of A4gnt KO mice. Analysis of wild-type mouse gastric mucosa and AGS cells suggested that GlcNAc binds to IL-11 receptors and gp130, thus preventing the formation of the IL-11/IL-11 receptor/gp130 complex and suppressing STAT3 activation. These results suggest that the gastric tumorigenesis naturally development in A4gnt KO mice can be caused by enhanced activity of IL-11 JAK2 STAT3 signaling pathway.

研究分野：生化学 糖鎖生物学

キーワード：胃癌 糖鎖 糖転移酵素 遺伝子改変マウス

## 様式 C-19、F-19-1 (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の死亡者数で第三位であり、今日においても主要な悪性疾患の一つである。一方、正常胃粘膜下層から分泌される胃腺粘液には、ムチンコア蛋白質の糖鎖末端に 1,4 結合した *N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) を有する特徴的な *O*-グリカンが含まれている。我々はその生合成を担う 1,4-*N*-アセチルグルコサミン転移酵素 (4GnT) の cDNA を単離し (Nakayama et al, *Proc Natl Acad Sci USA* 96:8991-8996, 1999)、GlcNAc が胃癌の原因となるピロリ菌から胃粘膜を防御していることを報告した (Kawakubo et al, *Science* 305:1003-1006, 2004)。さらに GlcNAc の役割を個体レベルで解明するため、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、その表現型を解析した。このマウスの胃粘膜では GlcNAc が完全に消失し、ピロリ菌が感染していなくても胃幽門粘膜において慢性炎症を基盤に分化型腺癌が自然発症した。さらにこの過程でインターロイキン-11 (IL-11) mRNA の発現が亢進することを見出した (Karasawa et al, *J Clin Invest* 122:923-934, 2012)。IL-11 は IL-6 ファミリーに属するサイトカインである。IL-11 は IL-11 受容体 (IL-11RA) と結合した後、gp130 をリクルートして複合体を形成することにより、JAK-STAT 経路および RAS-ERK 経路を活性化する (Ernst et al, *Clin Cancer Res* 20(22):5579-5588, 2014)。胃癌と大腸癌のモデルマウスにおいて IL-11 シグナルが阻害されると STAT3 の活性化が抑えられ、さらに腫瘍細胞の増殖能と浸潤能が低下することから (Putoczki et al, *Cancer Cell* 24:257-271, 2013)、IL-11 は消化管癌の進行において重要な役割を担っている。このようなことから当初、我々は *A4gnt* KO マウス胃粘膜における IL-11 発現亢進が胃癌の発生と深く関係しているとの作業仮説を立てた。実際に最近、*A4gnt* KO マウス胃粘膜において STAT3 が活性化されていること、さらに *A4gnt*/*Il11* ダブルノックアウト (DKO) マウス胃粘膜では *A4gnt* KO マウス胃粘膜と比較して STAT3 のリン酸化が減弱し、病変粘膜の厚さも有意に減じたことから、GlcNAc が IL-11 gp130 STAT3 経路を介する発がんシグナルを抑制することで胃分化型癌の発生を制御している可能性を見出した (KAKEN 19H03441)。

以上の結果をもとにして、IL-11 を中心とするがん関連シグナルの活性化機構を明らかにすることは、GlcNAc による胃癌の発生制御機構を解明する上で重要なステップとなることから、本研究を開始した。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は IL-11 IL-11 受容体 (IL-11R) gp130 JAK STAT3 経路に着目して、GlcNAc 欠損による STAT3 をはじめとするがん関連シグナルの活性化機構を解明し、*A4gnt* KO マウスに自然発生する胃分化型癌の発生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 (Karasawa et al, *J Clin Invest* 122:923-934, 2012)。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 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。

##### イムノプロット分析

5、10、20、50 週齢の野生型マウスと *A4gnt* KO マウス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 Janus kinase 2 (JAK2) のリン酸化 (p) の程度 (n=6)、gp130 の週齢毎の発現変化 (n=4) を解析した。一次抗体として p-JAK2 (#3771)、JAK2 (#3230) (何れも Cell Signaling Technology より購入)、抗 gp130 抗体 (sc-655, ab202850) (Santa Cruz および Abcam より購入)、抗 IL-11RA 抗体 (bs-6759R; Bioss)、抗  $\beta$ -actin 抗体 (富士フィルム和光純薬) を

使用した。二次抗体は HRP 標識抗ウサギ免疫グロブリン抗体 (P0448; Dako) または HRP 標識抗マウス免疫グロブリン抗体 (P0447; Dako) を使用した。また、検出されたバンドは ATTO CoolSaver を使用して定量した。

#### GSA- レクチンアガロース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を抽出し、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蛋白質を除去した後、GSA- レクチンアガロースビーズ (A-2402-2; EY Laboratories) を添加した。4 でローテーション、洗浄した後、ビーズ結合画分を回収し、抗 GlcNAc 抗体 (HIK1083 抗体; 関東化学) と抗 IL-11RA 抗体 (bs-6759R; Bioss) 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。

#### 統計解析

マン・ホイットニ検定により検定し、*P* 値が 0.05 未満の場合に有意差ありと判定した。

### (2) AGS 細胞を用いた解析

#### 細胞溶解液の調製

中分化型胃癌細胞株 AGS に Tet-On システムを用いて 4GnT を発現させ、GlcNAc の産生を調節できる細胞 (以下 AGS-A 細胞 (Fujii et al, Cancer Sci 113, 3852-3863, 2022)) を使用して解析した。AGS-A 細胞にドキシサイクリンを添加して培養した細胞の溶解液を使用した。コントロールとしてドキシサイクリン非存在下で培養した細胞を用いた。

#### イムノプロット分析

蛋白質溶解液を対象に、イムノプロット法により STAT3 のリン酸化 (p) の変化を解析した。一次抗体として p-STAT3 (#9145)、STAT3 (#9139) (何れも Cell Signaling Technology より購入) を使用した。その後、(1) と同様の方法で解析を行った。

#### GSA- レクチンアガロースビーズ結合画分を対象としたイムノプロット分析

細胞溶解液を調製した。その後、(1) と同様の方法で解析を行った。

#### 統計解析

多重比較検定はダネット法により検定し、*P* 値が 0.05 未満の場合に有意差ありと判定した。

## 4. 研究成果

### (1) 遺伝子改変マウスを用いた解析

#### *A4gnt* KO マウス胃粘膜における JAK2 の活性化

STAT3 の活性化 (リン酸化) に重要な JAK2 の活性化 (リン酸化) について、週齢毎にイムノプロット法を用いて定量解析した。JAK2 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)。一方、STAT3 のリン酸化は野生型マウスと比較し、*A4gnt* KO マウスの胃粘膜で高く、特に 5 週齢と 10 週齢では有意に亢進していることから (KAKEN 19H03441) JAK2 の活性化は STAT3 活性化の経時変化と相関していることが示された。

#### *A4gnt* KO マウス胃粘膜における gp130 の発現変化

*A4gnt* KO マウス胃粘膜では野生型マウスと比較し IL-11 シグナルが活性化されていることから gp130 の蛋白質レベルでの発現変化を定量解析した。gp130 の発現は野生マウスと比較して *A4gnt* KO マウスで高く、50 週齢までの経時変化

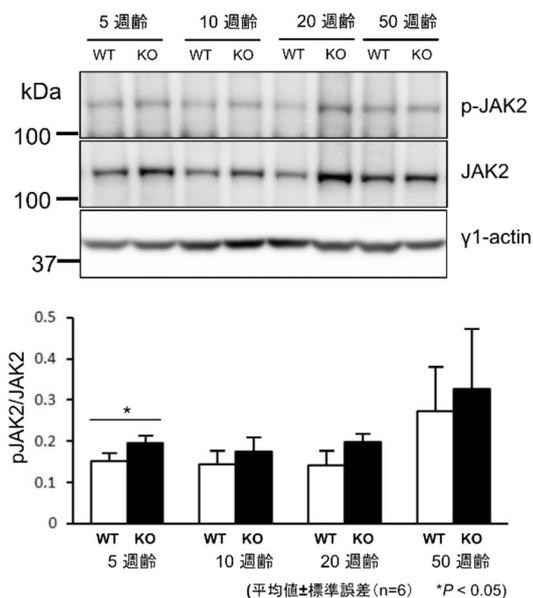


図1 野生型マウス (WT) と *A4gnt* KO マウス (KO) の胃粘膜における JAK2 のリン酸化

では5週齢、10週齢、50週齢において有意に高値であった(図2)。

#### gp130 への GlcNAc 結合の解析

*A4gnt* KO マウスの胃粘膜で産生される IL-11 は、IL-11RA と結合し、さらに gp130 と会合することで gp130 同士の二量体が形成される。その後、JAK を介して STAT3 が活性化される。野生型マウスの胃粘膜では、gp130 に GlcNAc が結合することで、立体障害により gp130 の二量体形成が阻害される。その結果、STAT3 のリン酸化が抑制され、発癌を免れている可能性が考えられる。この作業仮説を検証するため、gp130 に GlcNAc が結合し得るか否かを検討した。10週齢の野生型マウス(WT)並びに *A4gnt* KO マウス(KO) 胃粘膜から調製した蛋白質溶解液の GSA-レクチンアガロースビーズ結合画分を対象に、抗 gp130 抗体を用いたイムノプロット分析を行った。その結果、野生型マウスでのみ gp130 が検出され、さらにこのバンドは抗 GlcNAc 抗体とも反応したことから、gp130 に GlcNAc が結合していることが示された(図3)。また、COS-7 細胞を用いた gp130 遺伝子と *A4gnt* 遺伝子の一過性発現では gp130 の N-グリカンに GlcNAc が結合することを確認している(未発表データ)。

#### (2) 胃分化型癌細胞株 AGS を用いた解析

我々はこれまでに野生型マウス胃粘膜では GlcNAc が IL-11RA と結合することで STAT3 の活性化を抑制していることを示した(KAKEN 19H03441)。そこで、次に IL-11 による STAT3 のリン酸化が GlcNAc により抑制されるか否かを細胞レベルで検証するため、AGS-A 細胞を対象に解析した。

##### ① GlcNAc による STAT3 リン酸化抑制

AGS-A 細胞にドキシサイクリン(Dox) を添加した後、IL-11 を作用させて STAT3 リン酸化の変化を調べた(図4)。IL-11 による STAT3 リン酸化は、ドキシサイクリン添加により GlcNAc が産生されたことで減弱した。

##### ② AGS-A 細胞 IL-11RA への GlcNAc の結合

IL-11 による STAT3 リン酸化は GlcNAc の産生により減弱したことから、AGS-A 細胞に発現する IL-11RA の GlcNAc 修飾について解析した。AGS-A 細胞の蛋白質溶解液を調製し、GSA-レクチンアガロースビーズを用いてプルダウンを行い、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プロット分析を行った(図5)。ドキシサイクリン(Dox) の添加により GlcNAc は IL-11RA に相当する分子量 51~53kDa に検出され、さらにこのバンドは抗 IL-11RA 抗体と反応した。以上の結果から AGS-A 細胞の IL-11RA は、GlcNAc 修飾を受

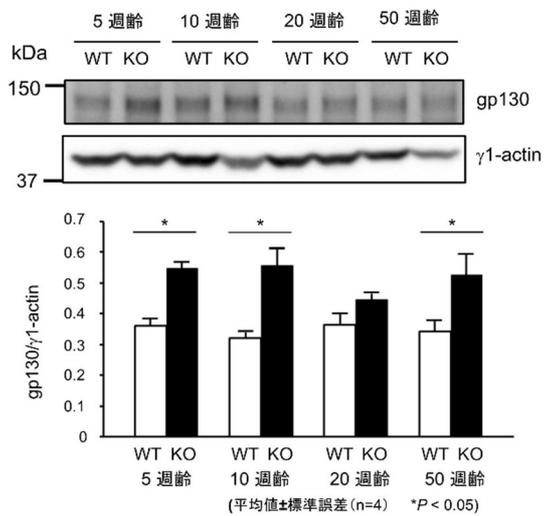


図2 野生型マウス(WT)と*A4gnt* KOマウス(KO)の胃粘膜におけるgp130の発現

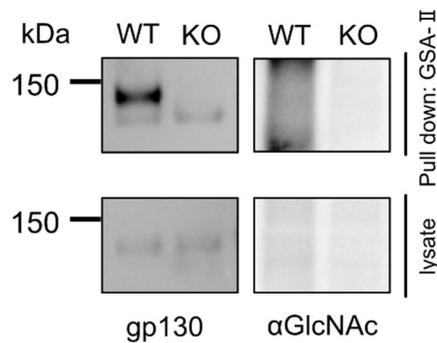


図3 αGlcNAcのgp130への結合の検証

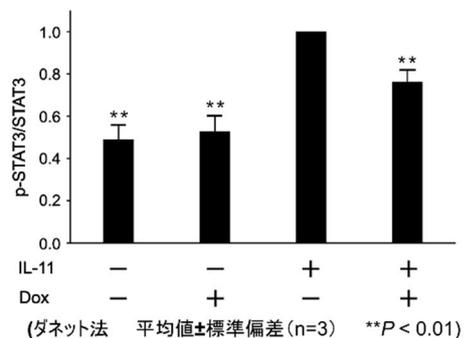
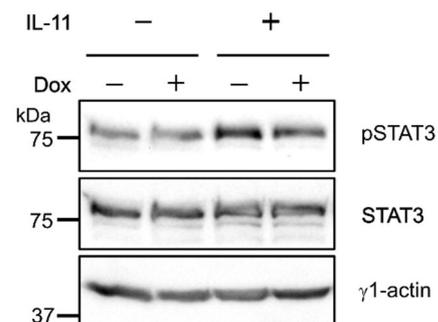


図4 αGlcNAcはIL-11によるSTAT3活性化を抑制する

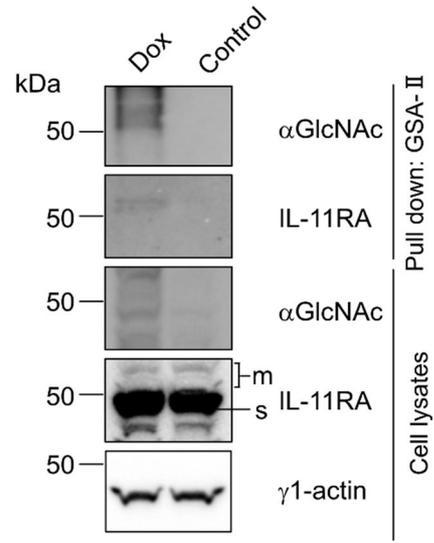
けていると考えられる。

(3) まとめ

*A4gnt* KO マウス胃粘膜における JAK2 の活性は野生型マウスと比較して高く、50 週齢までの経時変化では、特に 5 週齢において有意に高値であった。この経時変化は STAT3 の活性の経時変化と相関することから、STAT3 の活性化は JAK2/STAT3 経路を介していると考えられる。

一方、野生型マウス胃粘膜および AGS-A 細胞を用いた解析から、GlcNAc が IL-11RA および gp130 に結合することにより立体障害が生じ、その結果、IL-11/IL-11RA/gp130 複合体が形成されず、STAT3 の活性化を抑制していることが示唆された。

これらの結果から、*A4gnt* KO マウスでは IL-11/IL-11RA/gp130 JAK2 STAT3 経路の活性が亢進することにより、胃癌が自然発生する可能性が示された。



IL-11RA; s, 可溶性; m, 膜結合同型

図5 αGlcNAcのAGS-A細胞 IL-11RAへの結合の検証

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Chifumi Fujii, Satoru Harumiya, Yoshiko Sato, Masatomo Kawakubo, Hisanori Matoba, Jun Nakayama	4. 巻 113
2. 論文標題 1,4-Linked N-acetylglucosamine suppresses gastric cancer development by inhibiting Mucin-1-mediated signaling.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3852-3863
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15530	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 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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤井千文、結城淳子、五十嵐悠真、春宮覚、山ノ井一裕、川久保雅友、中山淳
2. 発表標題 胃腺粘液特異的糖鎖 GlcNAcはがん細胞の浸潤能を制御する
3. 学会等名 第31回日本がん転移学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤井千文、佐藤佳子、春宮覚、川久保雅友、中山淳
2. 発表標題 胃腺粘液特異的糖鎖 GlcNAc結合新規タンパク質の同定と胃がん細胞における役割
3. 学会等名 第30回日本がん転移学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤井千文、春宮覚、佐藤佳子、的場久典、川久保雅友、中山淳
2. 発表標題 MUC1への GlcNAc結合による胃がん悪性化制御機構
3. 学会等名 第82回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hitomi Komura, Chifumi Fujii, Satoru Harumiya, Hisanori Matoba and Masatomo Kawakubo
2. 発表標題 Expression pattern of GlcNAc and its related molecules in fetal mouse gastric mucosa
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会
4. 発表年 2023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	中山 淳 (Nakayama Jun)  (10221459)	信州大学・学術研究院医学系・教授  (13601)	

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