

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09075

研究課題名(和文) 胃分化型癌を抑制する糖転移酵素 A4GNTの発現機構

研究課題名(英文) Expression mechanism of glycosyltransferase a4Gnt that suppresses differentiated gastric cancer.

研究代表者

加藤 真良 (Kato, Masayoshi)

信州大学・学術研究院医学系・助教

研究者番号：70402104

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)：がんに対して抑制的に働くA4GNT遺伝子のプロモータに存在する CAAT-box 付近はこの遺伝子発現に必須であった。そこには一つの転写因子(未公表)が結合することを確かめたが、RNA干渉法によってこの転写因子の発現を抑制し、定量PCR法にて解析すると逆にA4GNT遺伝子の発現上昇がみられた。実際にヒトの胃幽門部粘膜下層を免疫組織学的に解析すると、A4GNTが発現する部位においてその転写因子の発現は抑制され、癌化でA4GNTの発現が消失した部位にその発現が促進されていた。これらのことからこの転写因子はA4GNT遺伝子を負に制御することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この度同定したA4GNT遺伝子のプロモータに結合する転写因子は、A4GNT遺伝子発現を負に制御する可能性があるものであった。このことを胃癌の予防や治療の観点で考えると、この転写因子を胃幽門部など特異的に局所的に発現抑制させることが発癌抑制につながる可能性は考えられる。しかしながら本研究の成果から現時点でその可能性については是非を問うには情報が不十分である。また、この転写因子でA4GNT遺伝子発現を解釈するならば、胃幽門部におけるその発現制御や機能制御についてより深く掘り下げた解析が要求される。

研究成果の概要(英文)：Around the CAAT-box present in the promoter of the A4GNT gene, which suppresses cancer, was essential for this gene expression. We confirmed that one transcription factor (unpublished) binds there, however, when we suppressed the expression of the transcription factor by RNAi method and analyzed it by quantitative PCR, we found that the expression of the A4GNT gene was increased. Immunohistochemical analysis of the submucosa of the pyloric region of the human stomach revealed that the expression of the transcription factor is suppressed at the site where A4GNT is expressed, and its expression is promoted at the site where A4GNT expression is lost due to cancerization. These findings suggest that the transcription factor negatively regulates the A4GNT gene.

研究分野：医化学

キーワード：胃がん A4GNT GlcNAc 遺伝子発現制御

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我が国では死因に占める悪性腫瘍の割合は非常に高い。胃癌はその死亡者数で上位であり、今日においても主要な悪性腫瘍の1つである。一方、胃粘膜下層に存在する幽門腺細胞や副細胞から分泌される腺粘液には、非還元末端に $\alpha 1,4$ 結合した α GlcNAc を有する極めて独特な O-グリカンが存在し、胃癌の原因の一つであるピロリ菌感染に防御的に作用する。 α GlcNAc の生合成を担う $\alpha 4$ GnT ($\alpha 1,4$ -N-アセチルグルコサミン転移酵素)の遺伝子欠損マウスの解析結果から、 $\alpha 4$ GnT が唯一の α GlcNAc 転移酵素であることに加え、 $\alpha 4$ GnT 欠損下では、ピロリ菌非依存に胃幽門部粘膜に、過形成や異形成を経て分化型胃癌を自然発症することが判明している。多くのヒト胃分化型癌で α GlcNAc、 $\alpha 4$ GnT の発現が抑制されていること、膵臓などにおける胃型腺癌(胃幽門型腺腫)で異所的に発現した α GlcNAc がその悪性化に伴って消失することも報告され、糖鎖末端の一修飾 α GlcNAc が密接に発癌に関わり、重要な役割を担っていることが示唆されていた。しかし、その α GlcNAc の作用機序や $\alpha 4$ GnT の発現制御機構は全く分かっておらず、これらを明らかにすることは胃癌や胃型腺癌の発症機序を明らかにするうえで大変重要であった。

2. 研究の目的

α GlcNAc は末端の一糖鎖構造であるが、これが消失しただけで胃癌の発症につながるという極めて特殊で重要な構造である。従って、 α GlcNAc の作用機序や生合成を担うタンパク質を理解することは胃癌発症機構を理解するうえでも極めて重要である。本研究は α GlcNAc の生合成に必須な酵素 $\alpha 4$ GnT の方に焦点を当て、その遺伝子発現機構を解析し、胃分化型癌や他器官の胃型腺癌での $\alpha 4$ GnT の発現抑制の仕組みを見出すことで、発癌機構の一端を明らかにすることを目的とした。得られる成果は、新たな胃癌や胃型腺癌の予防や治療の開発に直接つながるものとなることが期待された。 $\alpha 4$ GnT の発現機構の研究は世界的に全く手つかずの状態であり、学術的にも、糖鎖による発癌制御という概念は重要性が高いにもかかわらず、まだまだ注目されていないところに独自性があった。「粘液糖鎖シグナルと発癌制御機構」という新領域を開拓する可能性もあり、 $\alpha 4$ GnT の遺伝子発現機構の解析は創造性もある研究課題となると考え、研究を行った。

3. 研究の方法

Luciferase Gene Reporter Assay

pGL4.10 ベクター (Promega) に *A4GNT* 遺伝子の以下のような転写開始点上流に相当する塩基配列を組み込んだコンストラクトを *A4GNT* 発現が認められる NUGC4 細胞に導入し、48 時間後にレポーターアッセイ用の細胞溶解液 (Promega) を使って細胞を回収し、細胞抽出液を得た。これとレポーターアッセイ用基質 (Promega) を混合して発光させ、ルミノメーターでその発光量を計測して *A4GNT* 遺伝子発現量を定量した。

us0 (control)

us90 (5' 転写開始点上流 90 番目塩基~転写開始点-3')

us90m (5' 転写開始点上流 71 番目塩基~90 番目塩基-3' に 5' 転写開始点上流 70 塩基~転写開始点-3' を繋げたもの; us90 の 5' 転写開始点上流 90 番目塩基~71 番目塩基-3' の塩基配列が逆向きになっている)

定量 PCR

NUGC4 細胞に以下の siRNA を導入して HNF1A の発現量を低下させ、48 時間後に細胞から RNA を抽出した。その RNA を使い、逆転写を行って得られた DNA を鋳型にし、以下の 3 つのプライマーセットと定量 PCR 用サーマルサイクラー (Applied Biosystems 7300) を使ってサイバーグリーン法にて各遺伝子発現量を定量した。

siControl

5'-ACUACCGUUGUAUAGGUG

siHNF1A1

5'-CAGUGAGACUGCAGAAGUATT

siHNF1A2

5'-GGUCUUCACCUCAGACACUTT

GAPDH (コントロール)

forward: 5'-CACCACCAACTGCTTAGCACC

reverse: 5'-CAGTCTTCTGGGTGGCAGTGATG

α 4GnT

forward: 5'-GCTGCTTGAAGACACACCATTG

reverse: 5'-AGAGTACCGAGAAGCCTGCGC

HNF1A

forward: 5'-AGACCCTTCTGCAGGAGGAC

reverse: 5'-CCTGCATGGGTGAACTGCTG

免疫組織学的解析

ホルマリン固定され、パラフィン包埋された胃の組織切片を Hemo-De (ファルマ) で脱パラフィンしてエタノールで親水化した後、1mM EDTA(pH8.0)または 10mM クエン酸緩衝液(pH6.5)中で煮沸して抗原を賦活化させた。抗 HNF1A 抗体 (Atlas Antibodies)、抗 GlcNAc 抗体 (関東化学)、抗 MUC 6 抗体 (Santa Cruz) や抗 4GnT 抗体を 1 次抗体として、HRP(西洋ワサビペルオキシダーゼ)を結合した抗体を 2 次抗体 (ニチレイ) として使い、ジアミノベンジジン (DAB) にて陽性シグナルを検出した。

4. 研究成果

HNF1A は *A4GNT* 発現においては負の制御因子の可能性はある

A4GNT プロモーターの転写開始点上流 80 塩基付近に HNF1A が結合することをすでに確かめていたが、さらなる Luciferase Gene Reporter Assay により、この部分の塩基配列を逆にすると全く転写が起こらなくなることが分かった。このことからこの場所、この向きが *A4GNT* 発現に必須であることが示された。

次に RNA 干渉法により HNF1A の発現を抑制し、*A4GNT* 発現に及ぼす影響を定量 PCR 法で調べた。その結果、驚くことに HNF1A 発現が低下すると *A4GNT* 発現が上昇することがわかった。このことから HNF1A 存在下では *A4GNT* 発現が負に制御されることが示唆された。HNF1A はホモダイマーを形成して機能することが知られているが、ファミリーを形成するもう一つの蛋白質 HNF1B とヘテロダイマーを形成して機能することも知られている。*A4GNT* プロモーターの CAAT-box 付近の塩基配列は HNF1B の結合コンセンサス塩基配列と相同性が高く、*A4GNT* 発現の誘導には HNF1B の方が関わっている可能性がある。実際に NUGC4 細胞には HNF1A、HNF1B 双方発現していることを、NUGC4 細胞から抽出した RNA を逆転写し、得られた DNA を鋳型にして行った PCR (RT-PCR) 法で確かめた。今後は HNF1B について、*A4GNT* プロモーターに結合するのかを Electrophoresis Mobility Shift Assay (EMSA) などで確認する。加えて RNA 干渉法で HNF1B 発現を抑制させたときの *A4GNT* 発現に及ぼす影響も調べる必要がある。

A4GNT プロモーターの転写開始点上流の TATA-box より少し下流部に ETS ファミリー転写因子結合部位が存在するが、この部位への結合強度が上位の ETS ファミリー蛋白質のうち、ELF1、ELF5、ETV4 の NUGC4 細胞における発現が RT-PCR 法にて確認できた。今後これらの ETS ファミリー蛋白質についても *A4GNT* プロモーターへの結合性や *A4GNT* 発現に及ぼす影響を EMSA や RNA 干渉法などを用いて調べる。

EMSA により *A4GNT* プロモーターの転写開始点上流 71 番目から 90 番目の塩基配列に HNF1A が結合することを確かめていたので、末端をビオチン修飾されたこの部分の二本鎖 DNA (bio-us-71-90)、NUGC4 細胞核抽出液と、ストレプトアビジンビーズを使ってプルダウンアッセイも行った。これで bio-us-71-90 に結合してくる蛋白質の同定を質量分析法で試みたが、今のところ転写因子の検出はできておらず、hnRNP (ヘテロ核リボ核タンパク質) が検出されたのみであった。今後 HNF1A を検出できる条件を確立し、改めてその環境でプルダウンアッセイを行って HNF1A を含む複合体を形成する蛋白質や他の転写因子の探索を試みる。

幽門付近のヒト胃粘膜下層においては、4GnT、MUC6、そして GlcNAc が共局在するが、癌化すると 4GnT と GlcNAc が消失する。ここにおける HNF1A の局在について免疫組織学的手法にて検討したところ、正常部位では HNF1A の発現が 4GnT と GlcNAc の陽性部位で弱まっており、癌化している部分では 4GnT と GlcNAc が消失した部位含めて HNF1A の発現が上昇していた。このことは上述の *in vitro* の実験結果を反映するものであり、HNF1A が 4GnT を負に制御する可能性が強まった。

A4GNT 発現を調節する因子としてここまでのところ HNF1A が見出されたが、実験結果から負に制御する因子である可能性が示唆された。HNF1A は消化器系の臓器で広く発現しており、胃特異的に発現するわけではなく、これをもって *A4GNT* 発現調節を解釈することには無理があり、別の因子の寄与も十分に考えられる。*A4GNT* プロモーターには ETS ファミリー蛋白質結合配列も存在しており、ETS ファミリー蛋白質も遺伝子発現制御に参画する可能性がある。ETS ファミリー蛋白質は 30 種類以上存在するので、胃幽門部に特異的に機能するものがある可能性はある。上述のように *A4GNT* 発現が認められる NUGC4 細胞において ELF1、ELF5、ETV4 の発現が確認されたが、これらは胃特異的発現というわけではないので、別の ETS ファミリー蛋白質が遺伝子発現に正に寄与するのか今後検討したい。*A4GNT* プロモーターに結合する転写因子は

HNF1A のように胃特異的でないとしても、相互作用する複数の蛋白質の組み合わせが胃特異的で転写制御する可能性もあるので、EMSA で確認できた HNF1A が結合した場所以外の *A4GNT* プロモーター領域に結合した何かしらの因子の同定も試みたい。

ここまでの本研究の成果を胃癌の予防や治療の観点で考えると、HNF1A を特異的に局所的に発現抑制させることが発癌抑制につながるかと問われれば、現時点で回答を出すには情報が不十分である。HNF1A に限局して考慮しても胃幽門部における HNF1A の発現制御や機能制御についてより深く掘り下げた解析が要求される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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	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