

令和元年6月17日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09296

研究課題名(和文) 糖尿病によるO-GlcNAc修飾の増加が胃及び大腸癌発症に与える影響の検討

研究課題名(英文) Effect of elevated O-GlcNAc modification on onset of gastric and colon cancer

研究代表者

樋口 和秀 (Higuchi, Kazuhide)

大阪医科大学・医学部・教授

研究者番号：20218697

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：野生型とO-GlcNAc転移酵素高発現マウス(Ogt-Tg)において化学的に大腸癌を誘発させ、発症状況を比較検討した結果、Ogt-Tgでは有意に癌化した腫瘍の数が減少した。その原因として炎症のマスター遺伝子であるNF- κ BのO-GlcNAc修飾の増加の関与が考えられた。また、胃癌細胞株を用いて、胃癌の増殖、転移に関与している転写因子であるFOX-M1のO-GlcNAc修飾について検討した結果、O-GlcNAc修飾がFOX-M1の分解を抑制していることが分かった。その原因として、FOX-M1のユビキチン化に関与するGSK3 β やFBXL2のO-GlcNAc修飾の関与が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

翻訳後修飾は、生体の機能に重要な役割を演じている。O-GlcNAc修飾はその一つでセリン・スレオニン残基のリン酸化と競合することにより多くの細胞内シグナルを制御している。胃癌、大腸癌は、糖尿病が危険因子になっているが、糖尿病が癌に影響を与える原因の一つとして糖尿病で増加するとされているO-GlcNAc修飾の関与が指摘されている。本研究では、癌に関わるO-GlcNAc修飾のターゲット分子としてNF- κ B、GSK3 β 、FBXL2を同定したが、さらにその詳細を解明することにより、O-GlcNAc修飾をターゲットとした新規癌治療薬の開発に結び付く可能性が期待される。

研究成果の概要(英文)：Colon cancer was chemically induced in wild type and O-GlcNAc transferase transgenic mice (Ogt-Tg) to examine the effect of O-GlcNAc modification on cancer onset. As a result, the tumor formation was significantly reduced in Ogt-Tg. We found that elevated O-GlcNAc modification of NF- κ B was involved in the reduction. Furthermore, using a gastric cancer cell line, we studied the effect of O-GlcNAc modification on FOX-M1, a transcription factor which was involved in proliferation or metastasis on gastric cancer, showing that O-GlcNAc modification inhibited the degradation of FOXM1. We found that the inhibition was due to O-GlcNAc modification of GSK3 β or FBXL2, which were involved in the ubiquitination of FOXM1.

研究分野：消化器内科学

キーワード：O-GlcNAc修飾 胃癌 大腸癌 NF- κ B GSK3 β FBXL2 ユビキチン化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

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しつつある。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 倍ほど癌リスクが高くなっている。糖尿病により癌罹患リスクの上昇の原因は、インスリン抵抗性に伴うインスリン血症や高血糖による酸化ストレスなどが挙げられるが、その詳細は不明である。

糖鎖はタンパク質の主要な翻訳後修飾分子の一つであり、様々なタンパク質の機能を制御している。タンパク質の 50%以上は糖鎖修飾を受けており、翻訳後修飾反応の中で最も頻度が高い。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。糖鎖修飾にはアスパラギンの側鎖の中のアミド窒素原子に結合する N 結合型 (N 型) とセリンあるいはスレオニン側鎖の酸素原子に結合する O 結合型 (O 型) があるが、O 型糖鎖の中で近年、O 結合型 β-N-アセチルグルコサミン (O-GlcNAc) による修飾 (O-GlcNAc 修飾) が注目されている。O-GlcNAc 修飾のタンパク質への修飾部位がセリン、スレオニンであることからセリン、スレオニンキナーゼのリン酸化部位と競合し、リン酸化の調節、細胞内シグナル伝達、あるいは核内での転写の制御に重要な役割を演じていることが報告されている。

2. 研究の目的

近年、糖尿病患者で癌の罹患率が有意に増加していることが臨床研究で明らかになってきている。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、大腸癌に焦点を絞り、糖尿病で起こる糖鎖修飾、特に O-GlcNAc 修飾の変化がいかんにしてそれらの癌の発症、増殖、浸潤、転移に関わるのかそのメカニズムを分子レベルで解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 糖尿病で発現・活性が増加する N-アセチルグルコサミン (O-GlcNAc) 転移酵素 (以下、OGT と略す) の高発現マウス (Ogt-Tg) に対して、DMH/DSS による大腸癌の化学発癌モデルを用いて、O-GlcNAc 修飾の変化という周囲環境が癌の発症に与える影響を比較検討した。

(2) MKN45 等の胃癌細胞株を用いて、FOXM1 という胃癌発症、増殖に関与している転写因子に注目し、そのユビキチン化に関わる GSK3β と FBXL2 を中心に FOXM1 の分解系における O-GlcNAc 修飾の関与について研究を行った。

4. 研究成果

(1) 糖尿病が胃癌、大腸癌の罹患率や悪性度に影響するメカニズムを明らかにするため、糖尿病で増加する O-GlcNAc 修飾との関わりを検討した。大腸癌については、大腸癌の化学発癌モデルである DMH/DSS モデルを用い、野生型と O-GlcNAc 転移酵素高発現マウス (Ogt-Tg) の発癌状況を比較検討した。その結果、Ogt-Tg では消化管上皮において有意に癌化した腫瘍形成の数が減少した (図 1)。

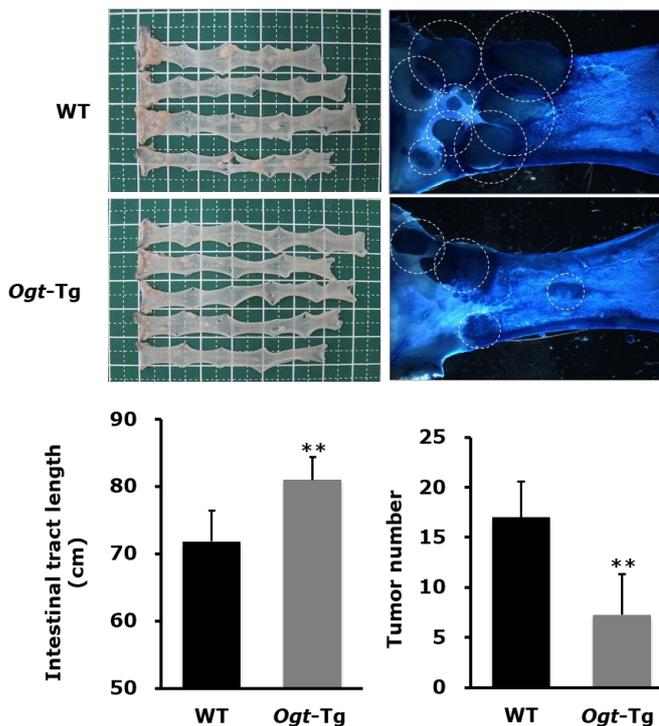


図 1、(上段左)腫瘍形成した大腸写真

(上段右)腫瘍・実体顕微鏡像 (×10, 直腸、メチレンブルー染色) 白い白線に囲まれた部分が癌部である。

(下段左)腸管長

(下段右)腫瘍数

そのメカニズムを追究し、炎症のマスター遺伝子である NF-κB の O-GlcNAc 修飾が増加することにより、リン酸化が起こりにくくなり (図 2) 活性化しないため、発癌に絡む炎症が抑えられ発癌が抑制されることを証明した。

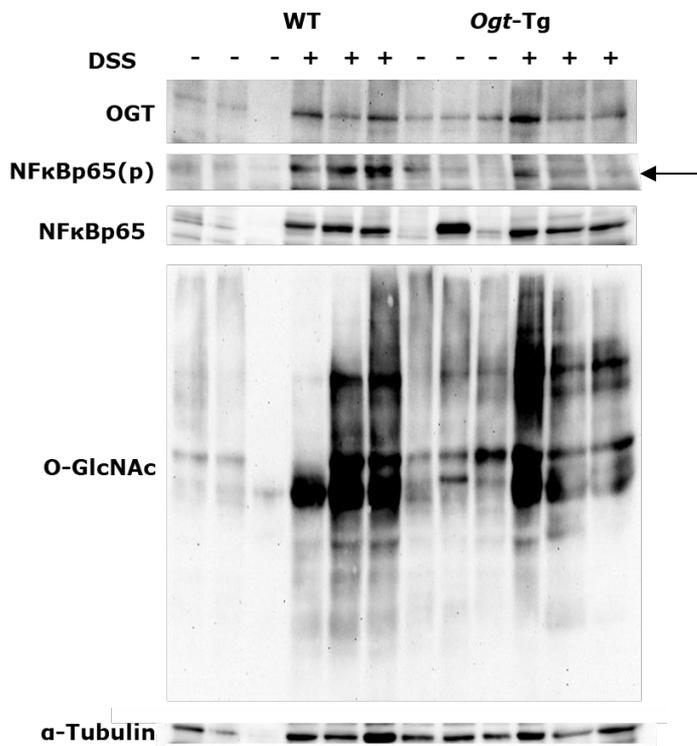


図2、O-GlcNAc 修飾の亢進による NF-κBp65 のリン酸化の減少

(2) O-GlcNAc 修飾が FOXM1 の発現に影響すると考え研究を進めた結果、O-GlcNAc 修飾が FOXM1 の転写を亢進しているのではなく分解を抑制していることが分かった。そこで、FOXM1 の分解に関わっている GSK3β と FBXL2 に注目して実験を進めた。その結果、GSK3β が O-GlcNAc 修飾を受けることにより FOXM1 のユビキチン化が抑制され安定化させていることを見出した (Inoue et al, Biochem Biophys Res Commun) (図3)。

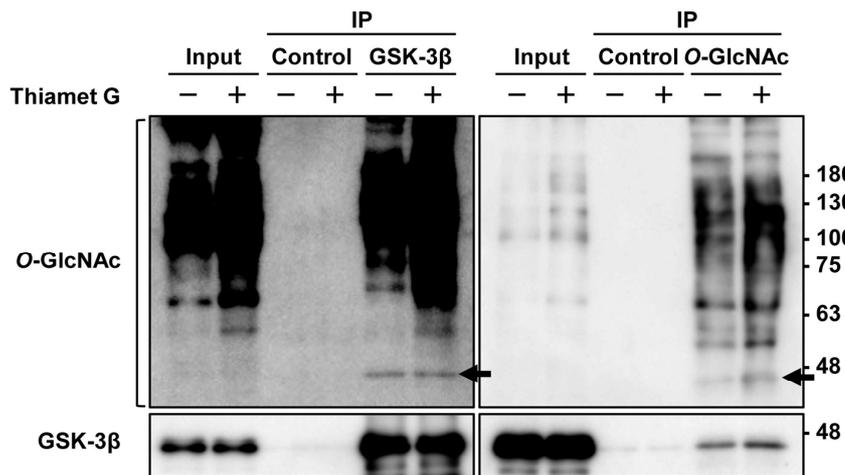


図3、MKN45 という胃癌細胞株における GSK-3β の O-GlcNAc 修飾

さらに、FBXL2 も O-GlcNAc 修飾されることにより FOXM1 のユビキチン化が抑制され、FOXM1 が安定化することを見出した (論文準備中、図4)。これらのことより、O-GlcNAc 修飾は FOXM1 のユビキチン化に関する少なくとも2分子に対して起こり、FOXM1 を安定化させ胃がんの増殖性や悪性度に影響することが判明した。

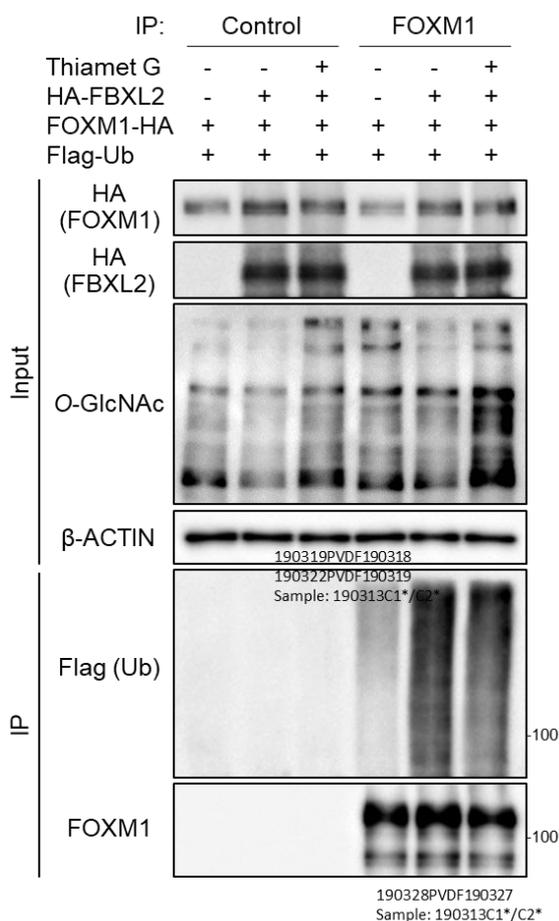


図4、O-GlcNAc 修飾に起因する FBXL2 による FOXM1 のユビキチン化の減少

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

- [1] K. Moriwaki, Y. Ayani, H. Kuwabara, T. Terada, R. Kawata, M. Asahi, TRKB tyrosine kinase receptor is a potential therapeutic target for poorly differentiated oral squamous cell carcinoma, *Oncotarget*, 9 (2018) 25225-25243. (査読有)
- [2] K. Kanbara, Y. Otsuki, M. Watanabe, S. Yokoe, Y. Mori, M. Asahi, M. Neo, GABAB receptor regulates proliferation in the high-grade chondrosarcoma cell line OUMS-27 via apoptotic pathways, *BMC Cancer*, 18 (2018) 263. (査読有)
- [3] Y. Inoue, K. Moriwaki, Y. Ueda, T. Takeuchi, K. Higuchi, M. Asahi, Elevated O-GlcNAcylation stabilizes FOXM1 by its reduced degradation through GSK-3beta inactivation in a human gastric carcinoma cell line, MKN45 cells, *Biochem Biophys Res Commun*, 495 (2018) 1681-1687. (査読有)
- [4] Y. Hirata, T. Nakagawa, K. Moriwaki, E. Koubayashi, K. Kakimoto, T. Takeuchi, T. Inoue, K. Higuchi, M. Asahi, Augmented O-GlcNAcylation alleviates inflammation-mediated colon carcinogenesis via suppression of acute inflammation, *J Clin Biochem Nutr*, 62 (2018) 221-229. (査読有)
- [5] K. Moriwaki, M. Asahi, Augmented TME O-GlcNAcylation Promotes Tumor Proliferation through the Inhibition of p38 MAPK, *Mol Cancer Res*, 15 (2017) 1287-1298. (査読有)
- [6] E. Ishimura, T. Nakagawa, K. Moriwaki, S. Hirano, Y. Matsumori, M. Asahi, Augmented O-GlcNAcylation of AMP-activated kinase promotes the proliferation of LoVo cells, a colon cancer cell line, *Cancer Sci*, 108 (2017) 2373-2382. (査読有)

〔学会発表〕(計 7 件)

- 1、 Kazumasa Moriwaki, Yasuhiro Ueda, Kazuhide Higuchi, and Michio Asahi Elevated O-GlcNAcylation stabilizes FoxM1 protein via suppression of its proteasomal degradation
第 77 回 日本癌学会学術総会(2019)
- 2、 Kazumasa Moriwaki , Yasuhiro Ueda , Kazuhide Higuchi , and Michio Asahi O-GlcNAcylation stabilizes FOXM1 protein Via suppression-of its poly-ubiquitination
第 92 回 日本薬理学会年会(2019)

3、森脇一将, 井上陽介, 樋口和秀, 朝日通雄

O - GlcNAcylation promotes cell proliferation through the increase of FoxM1 expression in gastric cancer cells

日本薬理学会学術総会 (2017)

4、中川孝俊, 平田好正, 森脇一将, 光林栄子, 柿本一誠, 竹内利久, 井上拓也, 樋口和秀, 朝日通雄

Augmented O-GlcNAcylation Alleviates Inflammation-mediated Colon Carcinogenesis via Suppression of Acute Inflammation

第 132 回日本薬理学会近畿部会(2017)

5、森脇一将, 井上陽介, 上田康裕, 樋口和秀, 朝日通雄

O-GlcNAc 糖鎖修飾の上昇は転写因子 FOXM1 の分解を阻害することで癌細胞の増殖を促進する

2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (国際学会)

6、Yosuke Inoue, Kazumasa Moriwaki, Kazuhide Higuchi, and Michio Asahi
Relationship Between Gastric Cancer and O-GlcNAcylation

DDW2016 (国際学会)

7、平田好正, 井上拓也, 柿本一城, 江戸川祥子, 岡田俊彦, 竹内利寿, 中川孝俊, 朝日通雄, 樋口和秀

The role of protein O-GlcNAcylation in colonic inflammatory carcinogenesis.

DDW2016 (国際学会)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

大阪医科大学第 2 内科

<http://www.osaka-med-ninaika.jp/index.html>

大阪医科大学生命科学講座薬理学教室

<https://www.osaka-med.ac.jp/deps/pha/index.htm>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：朝日 通雄

ローマ字氏名：Michio, Asahi

所属研究機関名：大阪医科大学

部局名：医学部薬理学教室

職名：教授

研究者番号 (8 桁)：10397614

(2)研究協力者

研究協力者氏名：竹内 利寿

ローマ字氏名：Toshihisa, Takeuchi

研究協力者氏名：井上 拓也

ローマ字氏名：Takuya, Inoue

研究協力者氏名：中川 孝俊

ローマ字氏名：Takatoshi, Nakagawa

研究協力者氏名：森脇 一将

ローマ字氏名：Kazumasa, Moriwaki

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。