

令和元年6月20日現在

機関番号：13601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15255

研究課題名(和文) プロテオミクスを用いた腺粘液糖鎖による胃癌発生制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the regulatory mechanisms for gastric cancer development by gland mucin-specific glycans using proteomics

研究代表者

中山 淳(Nakayama, Jun)

信州大学・学術研究院医学系・教授

研究者番号：10221459

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：胃腺粘液は糖鎖の末端に1,4-N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)を有するユニークなO-グリカンを含んでおり、GlcNAcを欠損したA4gntノックアウト(KO)マウスはピロリ菌の感染なしに胃癌を発症する。本研究では、腫瘍抑制分子と考えられるGlcNAcが結合する糖蛋白質の同定を試み、TFF2、gastrokine 2、galectin 2、MUC1を新たに同定した。また、A4gnt KOマウスでは癌化関連シグナルであるSTAT3、AKT、ERK1/2のリン酸化の亢進が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胃粘膜下層に存在する腺粘液細胞は糖鎖の末端に1,4結合したN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)を有し、A4gnt KOマウスの胃粘膜では分化型胃癌が自然発症する。このことからGlcNAcは発癌シグナルを抑制している可能性がある。本研究では、GlcNAc結合糖蛋白質を同定し、癌化に関連するシグナル伝達分子の性状を明らかにした。今後、これらの知見を発展させることにより、新たな胃癌の予防、治療法の開発へ繋がることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Gastric gland mucin contains glycans carrying terminal 1,4-N-acetylglucosamine residues (GlcNAc). A4gnt knockout (KO) mice spontaneously develop gastric adenocarcinoma, indicating that GlcNAc prevents gastric adenocarcinoma development. In this study, we performed proteomic analysis of proteins containing GlcNAc that suppressed gastric cancer development. Mass spectrometric analysis of affinity purified proteins carrying GlcNAc identified mucin core proteins, MUC6 and MUC5AC and mucin-related proteins, TFF2, gastrokine 2, and galectin 2. Furthermore, we identified the transmembrane glycoprotein mucin 1 (MUC1) as the protein carrying GlcNAc. In addition, immunoblot and immunohistochemical analyses revealed that phosphorylation levels of STAT3, AKT, and ERK1/2 in gastric mucosa of A4gnt KO mice were significantly increased compared to those of wild type mice.

研究分野：実験病理学、人体病理、糖鎖生物学、組織細胞化学

キーワード：A4gntノックアウトマウス 糖鎖 プロテオミクス 分化型胃癌 膜結合型ムチン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (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、胃粘膜下層に存在する腺粘液細胞は糖鎖の末端に 1,4 結合した *N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) を有するユニークな *O*-グリカンが、その足場蛋白質である MUC6 に結合した腺粘液を分泌している。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)。続いて、4GnT をコードする *A4gnt* 遺伝子を欠損した *A4gnt* KO マウスを作成し、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ても胃幽門粘膜において向腫瘍性炎症を基盤に分化型腺癌を自然発症することを見出した (Karasawa et al, *J Clin Invest* 122:923-934, 2012)。また、我々は MUC6 陽性のヒト胃分化型癌において、GlcNAc の消失が予後不良因子であることを報告した (Shiratsu et al, *Cancer Sci* 105:126-133, 2014)。*A4gnt* KO マウスは 5 週齢での過形成を経て、30 週齢に胃分化型癌を発症する。このような早い段階から上皮細胞の増殖が亢進している理由として、GlcNAc が欠失することで上皮成長因子受容体などの発癌シグナルが加速されている可能性がある。実際、膜結合型ムチンの中には糖鎖構造に関連した発癌シグナルの制御が報告されている (Mori et al, *J Biol Chem* 290: 26125-26140, 2015)。

以上のことから GlcNAc 結合糖蛋白質を網羅的に解析することは、GlcNAc による胃癌の発癌制御機構を解明する上での最初の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

本研究の目的はこの新しい胃癌発症モデルの発癌機構を『GlcNAc の欠損と発癌シグナル伝達』という観点から解明し、新たな胃癌の予防・治療法の開発へ発展させることである。

胃癌発症のモデル動物は多数、報告されているが (Hayakawa et al, *Cancers (Basel)* 5:92-130, 2013)、我々が樹立した *A4gnt* KO マウスはたった 1 つの糖の欠損で胃分化型癌を発症する。本研究では GlcNAc の欠損が発癌シグナルへ繋がるという仮説のもと、GlcNAc 結合糖蛋白質をプロテオーム解析により網羅的に解析する。さらにシグナル伝達経路の解析を行い、胃発癌機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) プロテオミクスを用いた GlcNAc 結合糖蛋白質の解析

10 週齢の野生型マウス (n = 3) から胃を摘出し、大弯側で開き、胃粘膜を採取した。胃粘膜から蛋白質を抽出し、遠心後、蛋白質溶解液 (可溶性画分) を回収した。同様に 10 週齢の *A4gnt* KO マウス (n = 3) の胃粘膜から蛋白質溶解液を調製した。この可溶性画分からラテックスビーズまたはアガロースビーズに対して非特異的に結合するタンパク質を除去した。その後、溶解液に抗 GlcNAc 抗体ビーズ (HIK1083 ラテックスビーズ; 関東化学) または GSA-II レクチン (/ GlcNAc 結合レクチン) ビーズ (EY Laboratories) を添加し、4 でローテーション、洗浄後、結合画分を回収した。結合画分は抗 GlcNAc 抗体 (HIK1083; 関東化学) によるイムノプロット分析により GlcNAc の有無を確認後、酵素消化、消化ペプチドの回収、精製を行い、液体クロマトグラフィー質量分析システム (Waters nano ACQUITY UPLC, Xevo QTOF) により解析した。同定された蛋白質は免疫沈降、イムノプロット分析などにより GlcNAc の結合を確認した。

(2) 免疫沈降法による解析

MUC1 の免疫沈降には 10 週齢の野生型マウス (n = 3)、*A4gnt* KO マウス (n = 3) の胃粘膜から

抽出した蛋白質溶解液を使用した。抗 MUC1 抗体として Ab-5 (Thermo Scientific)を使用した。

(3) イムノプロット分析

5 週齢と 10 週齢の野生型マウス(n = 3)並びに *A4gnt* KO マウス(n = 3)の胃粘膜から抽出した蛋白質溶解液を使用した。癌化に関連するシグナル伝達分子のリン酸化は各分子(STAT3、AKT、ERK1/2)に対する抗体と抗リン酸化分子抗体を用いたイムノプロット分析により解析した。一次抗体は Cell Signaling Technology より購入した。二次抗体は HRP 標識抗ウサギまたはマウス免疫グロブリン(Dako)を使用した。GlcNAc に対する抗体は HIK1083、二次抗体は HRP 標識抗マウス IgM (Jackson) を使用した。

(4) 免疫組織化学による解析

頸椎脱臼により安楽死させた 5 週齢と 10 週齢の *A4gnt* KO マウス(n = 6)および野生型マウス(n = 6)から胃を摘出し、大弯側で開き、20%緩衝ホルマリンで固定した。パラフィン包埋ブロックを作製後、再薄切した。これら組織切片に対して、HE 染色、各抗体を用いた免疫染色を行った。リン酸化 ERK1/2、リン酸化 AKT、リン酸化 STAT3、GlcNAc、MUC1 に関しては上述の抗体を使用した。

4. 研究成果

(1) GlcNAc 結合糖蛋白質の解析結果

GSA-II レクチンビーズおよび HIK1083 ラテックスビーズ結合画分を使用して、HIK1083 抗体イムノプロット分析及び質量分析による蛋白質の同定を行った。図 1 に GSA-II レクチンビーズ結合画分による結果を示した。野生型マウス由来の高分子量領域に GlcNAc 糖蛋白質が検出された。質量分析によりムチン及びその関連蛋白質として以前に報告したように MUC6 と MUC5AC が同定された (Zhang et al, *J Histochem Cytochem* 49, 587-596, 2001)。

さらに、今回新たに TFF2、galectin-2、gastrokine-2 が同定された。TFF2 は最近、GlcNAc 結合レクチンとしての機能を有することが報告された (Hanish et al, *J Biol Chem* 289, 27363-27375, 2014)。一方、galectin-2 は -ガラクトシド構造に親和性をもつ動物レクチンであり、ブタ胃由来ムチンを用いた検討から、2 量体を形成した galectin-2 は -ガラクトシド構造をもつ糖鎖を介してムチンを架橋し、胃粘膜のバリア構造を強化している可能性が示されている (Tamura et al, *Biol Pharm Bull* 40, 1789-1795, 2017)。さらに、gastrokine-2 は胃癌で発現が減少する (Menhenitto et al, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 304, G109-G121, 2013)。

以上より、TFF2、galectin-2、gastrokine-2 はいずれも胃粘膜のバリア構造を強化している可能性が報告されているので、今後、これらの蛋白質における GlcNAc の結合について、免疫沈降やイムノプロット分析などを用いて解析を行う予定である。

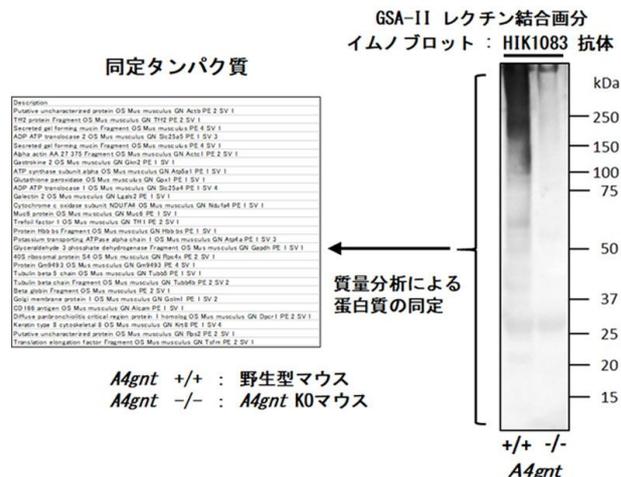


図1 GSA-II レクチン結合画分の同定蛋白質と HIK1083抗体によるイムノプロット分析

(2) MUC1 糖鎖への GlcNAc の結合

10 週齢マウス胃幽門部粘膜の GlcNAc 免疫染色から、*A4gnt* KO マウスでは GlcNAc が完全に消失する。一方、野生型マウスでは幽門腺細胞の細胞質のみならず腺管内腔側にも発現していることから、細胞膜における GlcNAc 糖蛋白質の存在が示唆された。また、内因性に 4GnT を発現している胃癌細胞株である NUGC4 細胞の膜画分を対象に HIK1083 抗体を用いたイムノ

プロット分析を行い、細胞膜に結合している GlcNAc 結合性糖蛋白質が検出された。一方、膜結合型ムチンである MUC1 は oncoprotein と呼ばれ、以前より腫瘍悪性化に関連することが報告されている (Nath et al, *Trends Mol Med* 20, 332-342, 2014)。また、MUC1 の O-グリカンの構造には 1 型コアと 2 型コアの非還元末端にガラクトースが存在し (Bäckström et al, *J Proteome Res* 8, 538-545, 2009) GlcNAc が結合し得ることから、MUC1 糖鎖への GlcNAc の結合について免疫沈降、イムノプロット分析により解析した。その結果、野生型マウス由来の胃粘膜溶解液において GlcNAc は MUC1 に結合していることが判明した(図 2)。また、野生型マウス由来の胃粘膜溶解液の GSA-II レクチンビーズおよび HIK1083 ラテックスビーズ結合画分において MUC1 が検出された。また免疫組織化学的に野生型マウスで MUC1 は表層粘液細胞と比べ、GlcNAc を発現する幽門腺細胞でより強く発現しており、GlcNAc と MUC1 の局在は一致した。

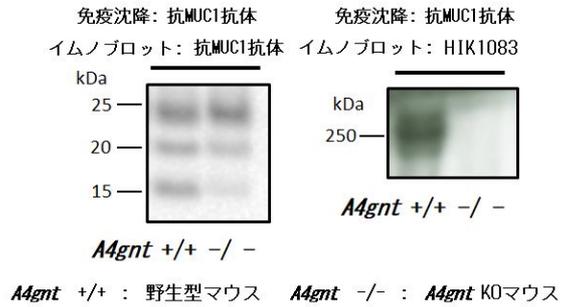


図2 抗MUC1抗体による免疫沈降物のHIK1083イムノプロット分析

(3) MUC1 下流のシグナル伝達分子リン酸化の亢進

MUC1に GlcNAcが結合していたことから、*A4gnt* KOマウスにおけるMUC1の下流シグナルへの影響を調べた。MUC1糖鎖から GlcNAcが欠損し、末端のガラクトースにガレクチンが結合

することにより、受容体型チロシンキナーゼ等との会合がocこり、ERK1/2、AKT、STAT3の活性化(リン酸化の亢進)へ繋がるのが想定される。実際、図3に示したように*A4gnt* KOマウス胃粘膜におけるERK1/2とAKTのリン酸化(pERK1/2、pAKT)は野生型マウスに比べて亢進していた。

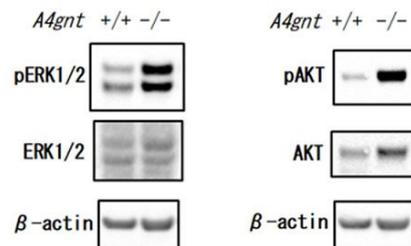


図3 野生型マウス (*A4gnt* +/+) と *A4gnt* KOマウス (*A4gnt* -/-) におけるERKとAKTのリン酸化レベルの比較 (10週齢)

(4) *A4gnt* KOマウス胃粘膜におけるSTAT3リン酸化の亢進

我々は以前に*A4gnt* KOマウスでは野生型マウスと比較してIL-11が著明に増加していることを報告した(Karasawa et al, *J Clin Invest* 122, 923-934, 2012)。そこで、IL-11経路の活性化によるSTAT3のリン酸化亢進について検討し、*A4gnt* KOマウス胃粘膜におけるSTAT3のリン酸化(pSTAT3)は野生型マウスに比べて亢進していることを明らかにした(図4)。

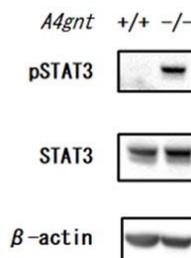


図4 野生型マウス (*A4gnt* +/+) と *A4gnt* KOマウス (*A4gnt* -/-) におけるSTAT3のリン酸化レベルの比較 (5週齢)

(5) 免疫組織化学的解析

リン酸化 ERK1/2 およびリン酸化 AKT

10 週齢 *A4gnt* KO マウス胃幽門部粘膜における ERK と AKT のリン酸化は野生型マウスに比べて亢進していた。また、リン酸化 ERK1/2 とリン酸化 AKT の発現パターンは類似しており、粘膜下層の上皮細胞に比べ、粘膜上層でより強く発現していた (図 5)。

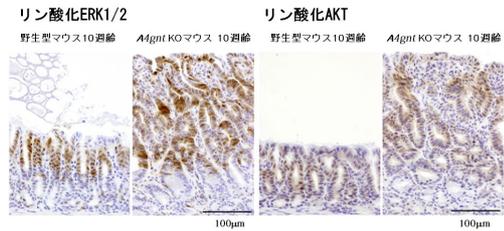


図5 野生型マウス、*A4gnt* KOマウス胃幽門部粘膜におけるリン酸化ERK1/2、リン酸化AKTの発現パターン

リン酸化 STAT3 および MUC1

5 週齢 *A4gnt* KO マウス胃幽門部粘膜における STAT3 のリン酸化および MUC1 の発現は野生型マウスに比べて亢進していた (図 6)。リン酸化 STAT3 は表層粘液細胞に比べ、腺粘液細胞でより強く染色され、また間質の単核球細胞にも染色された (図 6)。MUC1 は野生型マウスでは腺粘液細胞表層に局在し、*A4gnt* KO マウスでは腺粘液細胞から表層粘液細胞にかけて分布し、発現が上昇した。さらに、*A4gnt* KO マウスの腺粘液細胞で、リン酸化 STAT3 と MUC1 は共局在していた。

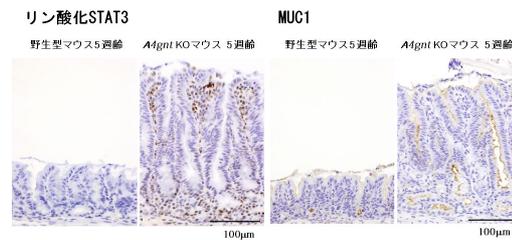


図6 野生型マウス、*A4gnt* KOマウス胃幽門部粘膜におけるリン酸化STAT3、MUC1の発現パターン

(6) 考察

本研究において、プロテオミクスの手法を用いて GlcNAc 糖蛋白質の網羅的解析を試みた。その結果、GlcNAc の結合が予想されるムチン並びにムチン関連蛋白質が同定されたことから、これら蛋白質における GlcNAc の欠失が胃発癌の要因になり得ると考えられた。特に、プロテオーム解析の研究過程で、膜結合型ムチンである MUC1 に GlcNAc が結合していることを見出したことの意義は大きい。なぜなら、MUC1 は野生型マウスの幽門腺細胞に発現しているものの、*A4gnt* KO マウスではその発現量が亢進し、さらに MUC1 陽性の異型細胞は胃粘膜の表層部へも進展する傾向が見られたからである。また、MUC1 から GlcNAc が欠損することにより、ERK1/2、AKT、STAT3 の活性化 (リン酸化の亢進) が示されたことも興味深い (図 3、4)。免疫組織化学的解析の結果から、pERK1/2、pAKT は胃粘膜の表層、pSTAT3 は胃粘膜の深層並びに間質の単核球に局在していた (図 5、6)。胃の上皮細胞において、pSTAT3 は MUC1 の局在と重なる部分が存在することから、STAT3 の活性化に MUC1 が関与していることが考えられる。MUC1 による STAT3 の活性化については乳がん細胞で報告されていることから (Ahmad et al. *Sci Signal* 4: ra9, 2011)、この STAT3 の活性化機構の解明は *A4gnt* KO マウスにおける発癌メカニズムを明らかにする上で重要と考えられる。*A4gnt* KO マウスで発生する胃癌の組織像は、ヒトの分化型胃癌と酷似していることから、*A4gnt* KO マウスは STAT3 の活性化メカニズムを含めて、発癌機構を解明するうえで極めて有用である。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

Kawakubo M, Komura H, Goso Y, Okumura M, Sato Y, Fujii C, Miyashita M, Arisaka N, Harumiya S, Yamanoi K, Yamada S, Kakuta S, Kawashima H, Fukuda MN, Fukuda M, Nakayama

J. Analysis of *A4gnt* knockout mice reveals an essential role for gastric sulfomucins in preventing gastritis cystica profunda. *J Histochem Cytochem*, in press, 査読有.

Yamanoi K, Nakayama J: Reduced GlcNAc glycosylation on gastric gland mucin is a biomarker of malignant potential for gastric cancer, Barrett's adenocarcinoma, and pancreatic cancer. *Histochem Cell Biol* 149, 569-575, 2018, 査読有.

Desamero MJ, Kakuta S, Chambers JK, Uchida K, Hachimura S, Takamoto M, Nakayama J, Nakayama H, Kyuwa S: Orally administered brown seaweed-derived α -glucan effectively restrained development of gastric dysplasia in *A4gnt* KO mice that spontaneously develop gastric adenocarcinoma. *Int Immunopharmacol* 60, 211-220, 2018, 査読有.

Ohya A, Yamanoi K, Shimojo H, Fujii C, Nakayama J: Gastric gland mucin-specific O-glycan expression decreases with tumor progression from precursor lesions to pancreatic cancer. *Cancer Sci* 108, 1897-1902, 2017, 査読有.

Kawakubo M, Horiuchi K, Komura H, Sato Y, Kato M, Ikeyama M, Fukushima M, Yamada S, Ishizone S, Matsumoto T, Ota H, Sagara J, Nakayama J: Cloning of *Helicobacter suis* cholesterol α -glucosyltransferase and production of an antibody capable of detecting it in formalin-fixed, paraffin-embedded gastric tissue sections. *Histochem Cell Biol* 148, 463-471, 2017, 査読有.

[学会発表] (2件)

Nakayama J: Preventive role of the gland mucin-specific GlcNAc in gastric cancer development. The 12th China-Japan Joint Seminar on Histochemistry and Cytochemistry. Zhangjiakou, China, 2017.

春宮 覚: タンパク質翻訳後修飾の解析 胃腺粘液糖タンパク質およびエラスチンの研究例 (招待講演) 第1回エラスチン・関連分子研究会学術集会, 東京, 2016.

[図書] (1件)

Nakayama J: Function of unique O-glycan structures in protecting gastric mucosa against *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer development. In *Glycosignals in Cancer: Mechanisms of Malignant Phenotypes* (edited by Furukawa K and Fukuda M), pp 111-124, 2016, Springer Japan, Tokyo.

[その他]

ホームページ: 信州大学医学部医学科・大学院総合医理工学研究科医学系専攻医学分野分子病理学教室

<http://www.shinshu-u.ac.jp/faculty/medicine/chair/i-2byori/index.html>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 春宮 覚

ローマ字氏名: HARUMIYA, Satoru

所属研究機関名: 信州大学

部局名: 医学部

職名: 助教(特定雇用)

研究者番号(8桁): 50301792

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。