

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K17779

研究課題名(和文) 胃癌抑制分子 GlcNAcを生合成する糖転移酵素 4GnTの発現制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the expression mechanism of the glycosyltransferase alpha4GnT that biosynthesizes the gastric adenocarcinoma suppressor alphaGlcNAc

研究代表者

小村 仁美 (Komura, Hitomi)

信州大学・医学部・特任助教

研究者番号：30616032

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：当研究室では、胃粘膜液中で GlcNAcを有するO-グリカンを生合成する糖転移酵素ヒト 4GnTを単離し、その遺伝子欠損マウスであるA4gnt欠損マウスを作製した。全ての変異マウスで胃の幽門部に分化型腺癌が発症したことから、GlcNAcは分化型腺癌の抑制因子と考えられたが、その詳細な機構は不明である。A4gnt欠損マウスは、3週齢で胃の幽門部が過形成を引き起こすため、発癌機構解明のためには、胎児期の胃の解析が必要であると考えた。野生型マウス胎児期における 4GnTおよび関連分子の発現および局在を明らかにし、A4gnt欠損マウスでの結果と比較することで、発癌との因果関係を検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胃癌は分化型腺癌と未分化型腺癌に大別され、分化型腺癌は年齢とともにその罹患率が増加する。全てのA4gnt欠損マウスは、胃の幽門部に分化型腺癌が自然発症することから、分化型腺癌の有用なモデル動物であると考えられる。本研究は、野生型マウス胎児期の 4GnTおよびその関連分子の発現および局在を明らかにし、A4gnt欠損マウスにおけるその変化の様子を観察し、胃の分化型腺癌発症との因果関係を明らかにする。その結果は、腺癌に特化した胃癌発症メカニズムを理解し、胃癌に対する新しい予防法および治療法の確立に大きな道筋を開くものである。

研究成果の概要(英文)：Previously, we identified human 1, 4-N-acetylglucosaminyltransferase (4GnT) that biosynthesizes O-glycans carrying terminal 1, 4-linked N-acetylglucosamine residues (GlcNAc) in gastric mucosa, and engineered A4gnt $-/-$ mice. A4gnt $-/-$ mice showed complete lack of GlcNAc expression in gastric gland mucin. Surprisingly, all the mutant mice developed gastric differentiated-type adenocarcinoma. This result suggests that GlcNAc serves as a tumor suppressor for differentiated-type adenocarcinoma, but its detailed mechanism is unknown. 3-week-old A4gnt $-/-$ mice develop gastric hyperplasia, so we considered that it is necessary to analyze the embryonic stomach in order to elucidate the carcinogenic mechanism. Therefore, we clarified the expression and localization of 4GnT and related molecules in the embryonic stomach of wild-type mice, and compared the results with that of A4gnt $-/-$ mice to investigate the causal relationship with carcinogenesis.

研究分野：分子生物学

キーワード：胃癌 分化型腺癌 GlcNAc 4GnT A4gnt欠損マウス マウス胎児

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

胃の胃粘膜液では、非還元末端に α 1,4 結合した *N*-アセチルグルコサミン残基 α 1, 4-linked *N*-acetylglucosamine residues (α GlcNAc) を有する糖鎖 *O*-グリカンがムコチンコアタンパク質 MUC6 上に付加されている。当研究室では、*O*-グリカン合成を担うヒト α 1,4-*N*-アセチルグルコサミン転移酵素 α 1, 4-*N*-acetylglucosaminyltransferase (α 4GnT)を発現クローニング法によって単離した。また、*A4gnt* 欠損マウスを作製し、 α GlcNAc に対する免疫染色および質量分析を行ったところ、このマウスの胃粘膜液と十二指腸粘膜では α GlcNAc が完全に消失していることを確認した (Karasawa et al. *J Clin Invest.* 2012)。このことから、 α 4GnT は α GlcNAc の生合成に関わる唯一の糖転移酵素であることが証明された。そして、驚くべきことに、全ての変異マウスは胃の幽門部に分化型腺癌が発生した。 α GlcNAc は分化型腺癌の発生を予防する抑制因子と考えられるが、その詳細なメカニズムは明らかになっていない。ヒトの胃腺癌においては MUC6 を発現した 48 例中 85.4%の症例で α GlcNAc が有意に減少していることも示されており (Karasawa et al. *J Clin Invest.* 2012)、 α GlcNAc は、ヒトにおいても分化型腺癌の発生を抑制していることが明らかとなっている。このため、*A4gnt* 欠損マウスを解析することは、マウスの分化型腺癌の発症メカニズムの解明に必要であるだけでなく、ヒトでも同様に発癌することが考えられた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、*A4gnt* 欠損マウスの胃での病理学的変化を引き起こす因子を明らかにし、ヒトにおける分化型腺癌発症との関連を調べることにある。*A4gnt* 欠損マウスは、その胃幽門粘膜において、5 週齢で過形成、10 週齢で軽度異形成、20 週齢で高度異形成、そして 30 週齢で分化型腺癌が自然発生する (Karasawa et al. *J Clin Invest.* 2012)。このように、*A4gnt* 欠損マウスは生後早くから特徴的な病理学的変化が観察されるが、この変化を引き起こす要因を明らかにするために、過形成が観察される以前の胎児期の胃を解析する必要があると考え、行った。

3. 研究の方法

(1) TaqMan リアルタイム PCR 法を用いた実験系を確立し、野生型および *A4gnt* 欠損マウス胎児胃における mRNA の定量的解析を行った。現在までに、 α 4GnT および、 α GlcNAc が結合するムコチンコアタンパク質 MUC6 や、胃で発現するもう 1 種類のムコチンコアタンパク質 MUC5AC、また、MUC6 や MUC5AC と結合し、癌との関連が報告されている TFF2 (Trefoil factor family2) や TFF1 の mRNA の発現量の変化を明らかにした。具体的には、野生型および *A4gnt* 欠損マウスの発情前期の雌マウスを雄マウスと掛け合わせ、妊娠マウスを得た。E12.5 (embryonic day) から E19.5 までのマウス胎児から胃を取り出し、RNA を安定化する薬剤である RNeasy (Invitrogen) に浸透させ、RNeasy (QIAGEN) により mRNA を精製した。逆転写を行った後で TaqMan プローブを用いたリアルタイム PCR を行い、mRNA 発現量を測定した。各胎生日齢につき 5-8 匹ずつの胎児胃を使用し、実験を行った。

(2) 野生型および *A4gnt* 欠損マウス胎児胃に関して、 α GlcNAc の特異抗体である HIK1083 抗体、TFF1 もしくは TFF2 の特異抗体を使用して、免疫蛍光組織染色法を行った。それぞれの分子が、タンパク質レベルで発生・分化段階のどの時期、どの部分に局在するかを明らかにした。E12.5 から E19.5 までの胎児胃を 4% PFA で 24 時間固定し、スクロース置換後に凍結包埋した。薄切後の切片を各種抗体で免疫蛍光組織染色し、共焦点顕微鏡で観察した。また、HE (hematoxylin eosin) 染色により、胎児期において病理学的な変化が見られるかの観察も行った。

4. 研究成果

(1) TaqMan リアルタイム PCR 法により、野生型マウス胎児胃の α 4GnT は、E13.5 から mRNA が発現し始め、E19.5 にかけて増加することが明らかとなった。MUC6 は、野生型では、E15.5 から発現し始めるが、*A4gnt* 欠損マウスでは、野生型より早い E13.5 からわずかな発現上昇が見られた。そして、E18.5 以降で野生型と比較して発現量が顕著に減少し始め、E19.5 では約 60%の発現量が減少した。TFF1、TFF2 は、野生型では E15.5 から発現が上昇し始め、E18.5 から急激に発現量が増加した。しかしながら、*A4gnt* 欠損マウスでは、野生型のような急激な発現上昇は見られず、驚くべきことに、E19.5 では約 94%もの mRNA の発現量減少が見られた。なお、これらの実験では、グラフの数値は、GAPDH を内部標準として使用し、E19.5 野生型マウス胎児胃の値を 1 とした場合の各胎生日齢での mRNA 発現量を比較した。これらの結果から、*A4gnt* 欠損マウスでは、MUC6、TFF1、TFF2 は共に、野生型と比較して E18.5 以降で mRNA 発現が大幅に減少するという知見が得られた。

(2) 次に、 α GlcNAc の特異抗体である HIK1083 抗体および TFF1 と TFF2 特異抗体を用いて、野生型マウスおよび *A4gnt* 欠損マウスの免疫蛍光組織染色を行った。その結果、 α GlcNAc は、野生型マウスでは E15.5 でわずかな局在が確認され、E16.5 以降では腺底部への明らかな局在を認めた。胎生日齢が進んで行くにつれ、タンパク質発現量は増加する様子が観察された。(1) で示したように、TaqMan リアルタイム法により、mRNA 発現は E13.5 以降に起こることが明らか

になっており、免疫蛍光組織染色法でタンパク質局在として確認出来るまでに少しの時間を要することが分かった。TFF1 は、E14.5 からすでにタンパク質の発現が見られ、*A4gnt* 欠損マウスでも同様であった。また、その局在部位にも変化は見られなかった。Tff2 は、TFF1 と同様に、E14.5 からタンパク質の局在が見られ、*A4gnt* 欠損マウスでも変わらなかった。しかしながら、UEAI (*Ulex europaeus* agglutinin I lectin) により表層粘液細胞を染色したところ、hindstomach での胃底腺における TFF2 の局在は消失し、幽門腺付近にのみ局在が観察されるという驚くべき結果が得られた。このことから、*A4gnt* 欠損マウスの生後 5 週齢での過形成は Tff2 の局在変化が関与している可能性を考え、今後の研究を進める予定である。当研究室でも結合が確認されている分子 X が、TFF2 発現を調節するという報告があり、今後は、この分子 X と TFF2 の関係に着目して研究を行う。免疫蛍光組織染色法により、共同在の様子も観察する予定である。また、*A4gnt* 欠損マウスで Tff1 と MUC6 の mRNA 発現量が減少していることに関しても、胃癌発症との関連を調べる。現在、MUC6 特異抗体を作製中であり、この抗体を用いて免疫蛍光組織染色を行うことで、さらなる知見が得られると考えている。HE 染色により、胎児胃の外観を野生型と *A4gnt* 欠損マウスで比較したが、増殖に大きな差は見られなかった。しかしながら、胎児胃の増殖に関して、定量的な解析は行っておらず、妊娠マウスに BrdU (5'-Bromo-2-deoxyuridine) を注射して 2 時間後の胎児胃を固定して、BrdU 取り込み細胞の定量により、野生型と *A4gnt* 欠損マウスの増殖に差が無いかの確認を行う。また、胃で発現するその他の粘膜分子である MUC5AC の免疫染色も行う予定である。今後は、*A4gnt* 欠損マウスでの変化が発癌にどのように関与するかに焦点を当て、研究を行う。また、ヒト分化型胃癌の病理標本を用いて、*A4gnt* 欠損マウスに見られた発現量や局在の変化がヒトにも観察されるか、また、その同様な変化の見られる標本の割合はどれほどかを明らかにして、医療の進歩に貢献したいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Kobayashi Junichi, Kawakubo Masatomo, Fujii Chifumi, Arisaka Nobuhiko, Miyashita Masaki, Sato Yoshiko, Komura Hitomi, Matoba Hisanori, Nakayama Jun	4. 巻 118
2. 論文標題 Cholestenone functions as an antibiotic against Helicobacter pylori by inhibiting biosynthesis of the cell wall component CGL	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2016469118
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2016469118	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawakubo Masatomo, Komura Hitomi, Goso Yukinobu, Okumura Motohiro, Sato Yoshiko, Fujii Chifumi, Miyashita Masaki, Arisaka Nobuhiko, Harumiya Satoru, Yamanoi Kazuhiro, Yamada Shigenori, Kakuta Shigeru, Kawashima Hiroto, Fukuda Michiko N., Fukuda Minoru, Nakayama Jun	4. 巻 67
2. 論文標題 Analysis of A4gnt Knockout Mice Reveals an Essential Role for Gastric Sulfomucins in Preventing Gastritis Cystica Profunda	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Histochemistry & Cytochemistry	6. 最初と最後の頁 759 ~ 770
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1369/0022155419860134	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Komura Hitomi, Kakio Shota, Sasahara Tomoya, Arai Yoshie, Takino Naomi, Sato Michio, Satomura Kaori, Ohnishi Takayuki, Nabeshima Yo-ichi, Muramatsu Shin-ichi, Kii Isao, Hoshi Minako	4. 巻 13
2. 論文標題 Alzheimer A Assemblies Accumulate in Excitatory Neurons upon Proteasome Inhibition and Kill Nearby NAK 3 Neurons by Secretion	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 452 ~ 477
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2019.01.018	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 Kawakubo Masatomo, Horiuchi Kazuki, Komura Hitomi, Sato Yoshiko, Kato Masayoshi, Ikeyama Meguru, Fukushima Mana, Yamada Shigenori, Ishizone Satoshi, Matsumoto Takehisa, Ota Hiroyoshi, Sagara Junji, Nakayama Jun	4. 巻 148
2. 論文標題 Cloning of Helicobacter suis cholesterol -glucosyltransferase and production of an antibody capable of detecting it in formalin-fixed, paraffin-embedded gastric tissue sections	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Histochemistry and Cell Biology	6. 最初と最後の頁 463 ~ 471
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00418-017-1582-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

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 分子病理学教室ホームページ
<http://www.shinshu-u.ac.jp/faculty/medicine/chair/i-2byori/index.html>

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

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