

氏 名	上田 康裕
(ふりがな)	(うえだ やすひろ)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲 第 1119 号
学位審査年月日	令和2年1月15日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題名	<i>O</i> -GlcNAcylation-mediated degradation of FBXL2 stabilizes FOXM1 to induce cancer progression ( <i>O</i> -GlcNAc 修飾は FBXL2 の分解を介して FOXM1 を安定化することで癌の進展に働く)
論文審査委員	(主) 教授 高井 真司 教授 矢野 貴人 教授 廣瀬 善信

## 学位論文内容の要旨

### 《背景と目的》

癌は、代謝異常疾患であり、その代謝異常が癌の特性獲得に大きく寄与している。特に、グルコースの代謝異常は Warburg 効果と呼ばれ、癌細胞は、酸素存在下でもグルコースの取り込みを促進し解糖系を亢進させることにより、ATP とバイオマスを産生して細胞増殖など活発な細胞活動を可能にしている。また、グルコース代謝が亢進する結果、その代謝物である uridine diphospho-N-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc) が増加して、これが細胞質核内タンパク質のセリン/スレオニン残基のヒドロキシル基に付加され、*O*-GlcNAc 修飾が亢進する。この反応は、唯一の付加酵素と脱離酵素である *O*-GlcNAc transferase (OGT) と *O*-GlcNAcase (OGA) によって触媒され、可逆的にリン酸化反応と直接もしくは間接的に拮抗する、極めて重要な細胞内シグナル伝達制御機構である。

*O*-GlcNAc 修飾の亢進は、癌細胞の基本的特性の1つであり、癌細胞のエネルギー代謝、エピジェネティクス、腫瘍化、細胞増殖や生存、浸潤や転移などあらゆる癌進展過程の促進に働く。今日、癌の進展に関わる、*O*-GlcNAc 修飾の標的分子が多数報告されているが、*O*-GlcNAc 修飾による癌進展の調節機構は未だに不明な点が多い。最近、申請者の所属するグループは、*O*-GlcNAc 修飾の亢進が、glycogen synthase kinase (GSK)-3β の *O*-GlcNAc 化と不活性化を誘導し、結果的に癌の進展促進に働く転写因子 forkhead box M1 (FOXM1) の分解を抑制してその発現を上昇させることを報告した。FOXM1 は、様々な癌種において発現が上昇し、細胞増殖や浸潤、転移、血管新生及び薬剤耐性など幅広く癌の進展促進に働き、実際、FOXM1 の高発現癌は予後不良である。しかし、*O*-GlcNAc 修飾の亢進による FOXM1 の発現上昇機序の全容は不明である。そこで本研究では、その分子機序を明らかにすることを目的とし、FOXM1 の翻訳後修飾によるタンパク質発現調節、中でもユビキチン (Ub) 化に着目して、*O*-GlcNAc 修飾標的分子の探索を行った。

#### 《方 法》

HEK293 細胞及びヒト胃癌細胞株 (MKN45、NUGC-3、NUGC-4) は、10%ウシ胎仔血清含有 DMEM 培地及び RPMI1640 培地を用いて培養した。

F-box/LRR-repeat protein 2 (FBXL2) と F-box/WD repeat-containing protein 7 (FBXW7) 及び FOXM1 の N 末端に HA タグを付加した pCAG プラスミド発現ベクター、また、Flag タグを付加した Ub の pDNA3.1 プラスミド発現ベクターを作製し、HEK293 細胞にリン酸カルシウム法によって遺伝子導入して各種免疫沈降解析を行った。

*O*-GlcNAc 修飾の亢進は、OGA 阻害剤 Thiamet G (TMG) (5–10μM) の 24–72 時間処置により誘導し、プロテアソーム阻害には MG132 (5μM) を、タンパク質安定性解析にはタンパク質合成阻害剤 cycloheximide (CHX) (25 μg/ml) を使用した。

また、FBXL2 の機能解析には、FBXL2 の Tet-on 発現誘導 NUGC-3 細胞株を樹立し、その発現誘導には doxycycline (DOX) (1 μg/ml) を用いた。

各種遺伝子発現やタンパク質発現・機能解析は、real-time PCR、Western blotting 及び

蛍光免疫染色により行った。細胞増殖解析には、WST-8 試薬を使用して細胞生存性を吸光度によって評価した。

#### 《結果と考察》

3 種類のヒト胃癌細胞株において、TMG 処置による O-GlcNAc 修飾の亢進と FOXM1 の発現上昇を観察して、これが特殊な一細胞株に限った現象ではないことを確認した。NUGC-3 細胞を用いた FOXM1 のタンパク質安定性解析の結果、MG132 と同様に TMG の処置によって FOXM1 の分解が抑制された。また、HEK293 細胞を用いた免疫沈降解析の結果、TMG 処置によって FOXM1 の Ub 化が抑制され、細胞増殖の亢進を認めた。これらは、FOXM1 がユビキチンプロテアソーム系 (ubiquitin proteasom system, UPS) によって分解され、O-GlcNAc 修飾の亢進はその分解を阻害し、癌の増殖促進に働くことを示唆している。

次に、O-GlcNAc 修飾の亢進が FOXM1 の Ub 化を抑制する分子機序を明らかにするため、FOXM1 の Ub 化酵素である FBXL2 と FBXW7 への TMG 処置効果を解析した。その結果、HEK293 細胞において、TMG 処置によって FBXL2 による Ub 化 FOXM1 の上昇及び FBXL2 と FOXM1 の結合が抑制された。また、Tet-on 誘導 FBXL2 発現 NUGC-3 細胞では、TMG 処置により DOX 処置による FBXL2 の発現誘導及び FBXL2 誘導に伴う FOXM1 の減少が抑制され、さらに、FBXL2 のタンパク質安定性解析の結果、TMG 処置によって FBXL2 の分解が亢進した。このとき、FBXL2 の mRNA 発現量は変化しなかったことから、O-GlcNAc 修飾の亢進により FBXL2 タンパク質の分解が亢進する結果、FOXM1 が安定化して増加している可能性が考えられた。一方、FBXW7 については、TMG 処置による発現低下を認めなかった。

以上の結果は、TMG 処置によって FBXL2 の分解が亢進することを示しているが、O-GlcNAc 修飾との直接の関連性は不明である。そこで、免疫沈降法により FBXL2 への O-GlcNAc 修飾の有無を検討した結果、FBXL2 が O-GlcNAc 修飾されていること、また、TMG 処置によって FBXL2 の O-GlcNAc 修飾及び Ub 化が有意に増加することが明らかと

なった。

最後に、NUGC-3細胞において、FBXL2が細胞増殖に及ぼす影響及びそれに対するTMG処置の影響を解析した。その結果、FBXL2の発現誘導によって細胞増殖が低下し、また、TMGと高濃度グルコースの処置によってその低下が阻害された。

#### 《結 論》

本研究により、O-GlcNAc修飾の新規標的分子としてFBXL2が同定された。また、O-GlcNAc修飾の亢進が、FBXL2のUb化と分解を促進してFOXM1のUPSでの分解を抑えることで、FOXM1の発現上昇に働くことが示唆された。これは、O-GlcNAc修飾の亢進による癌の進展機構の一端を説明するものである。

## 論文審査結果の要旨

癌は代謝異常疾患であり、中でも癌細胞によるグルコース取り込みの上昇は、癌細胞内においてグルコース代謝物 UDP-GlcNAc を基質とする可逆的な翻訳後修飾である、*O*-GlcNAc 修飾を亢進させる。*O*-GlcNAc 修飾の亢進は、癌細胞の基本的特徴の1つであり、その標的分子の細胞内シグナル伝達を制御して癌細胞の挙動に影響し、癌の進展を促進している。しかし、その分子機構の全容は分かっていない。

申請者は、*O*-GlcNAc 修飾の亢進による癌の進展機構を明らかにすることを目的とし、多くの癌種で発現が上昇して癌の進展を促進する転写因子 FOXM1 が、*O*-GlcNAc 修飾の亢進に伴って上昇する分子機序をユビキチンプロテアソーム系 (UPS) に注目して解析した。その結果、FBXL2 E3 ligase の発現に伴いユビキチン化 FOXM1 が上昇し、それが *O*-GlcNAc 脱離酵素 OGA の阻害剤 Thiamet G (TMG) によって阻害されること、また、TMG 処置により FBXL2 と FOXM1 の結合が阻害されることを示した。次に、NUGC-3 ヒト胃癌細胞株を用いた Tet-on システムによる FBXL2 の誘導実験により、FBXL2 の発現に伴い FOXM1 が減少し、その減少が TMG 処置により阻害されること、またこのとき、TMG 処置により FBXL2 の発現が抑制されることを示した。また、FBXL2 のタンパク質安定性解析により、TMG 処置によって FBXL2 の分解が亢進することを示した。さらに、*O*-GlcNAc 修飾の新規標的として FBXL2 を同定し、*O*-GlcNAc 化 FBXL2 の上昇に伴って FBXL2 のユビキチン化が亢進することを示した。最後に、FBXL2 の発現誘導による NUGC-3 細胞の増殖抑制が、TMG と高濃度グルコースの処置によって阻害されることを示した。

以上の解析から、申請者は、UPS による分解過程において、*O*-GlcNAc 修飾の亢進が、FBXL2 を介する FOXM1 のユビキチン化を阻害することを明らかにした。また、*O*-GlcNAc 修飾の亢進が、FBXL2 による FOXM1 抑制機構を阻害することで、癌細胞の増殖に対して促進的に働くことを示唆している。これらの研究成果は、これまで不明であった *O*-GlcNAc 修飾の亢進による癌の進展機構の一端を示すものであり、*O*-GlcNAc 修飾を標的とする新規治療の理論的根拠を提供できる可能性もあり、大変意義深いものと考えられ

る。

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 条第 1 項に定めるところの博士（医学）の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Biochemical and Biophysical Research Communications  
521(3): 632-638, 2020 Jan  
doi: 10.1016/j.bbrc.2019.10.164.