

氏名	井上陽介
(いのうえようすけ)	(いのうえ ようすけ)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲第 号
学位審査年月日	平成30年7月11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	Elevated <i>O</i> -GlcNAcylation stabilizes FOXM1 by its reduced degradation via GSK-3 $\beta$ inactivation in a human gastric carcinoma cell line, MKN45 cells (ヒト胃癌細胞株 MKN45 において <i>O</i> -GlcNAc 修飾の増加は GSK-3 $\beta$ の不活性化を介して FOXM1 の分解を抑制し FOXM1 の発現を安定化する)
論文審査委員	(主) 教授 高 井 真 司 教授 矢 野 貴 人 教授 富 永 和 作

### 学位論文内容の要旨

#### 《背景》

近年、糖尿病患者で癌の罹患率が非糖尿病患者と比較し有意に高いことが報告されている。我々は、そのメカニズムとして糖尿病患者の生体内において亢進していると報告のある糖鎖修飾の1つである *O*-GlcNAc 修飾に着目し、この修飾過程が癌の増殖・浸潤に関与しているのではないかと推察した。*O*-GlcNAc 修飾とはタンパクの Ser/Thr 残基に N-アセチルグルコサミン(*O*-GlcNAc)が結合する現象を指す。細胞内に取り込まれたグルコースはヘキソサミン合成経路を経て UDP-GlcNAc に代謝される。これを基質にして *O*-GlcNAc transferase(OGT)によって多くのタンパク質が *O*-GlcNAc 修飾される。この修飾は *O*-GlcNAcase(OGA)によって解除され、両者の働きにより、生体

内での修飾過程が制御されている。*O*-GlcNAc 修飾はタンパク質のリン酸化の調節など多岐にわたる細胞内シグナル伝達を調節する重要な役割を担うとの報告がある。また、*O*-GlcNAc 修飾は細胞内の糖濃度に依存して標的タンパク質の機能を制御しており、多種の癌細胞で *O*-GlcNAc 修飾を受けるタンパク質の増加が確認されている。このことから、*O*-GlcNAc 修飾は癌細胞特異的な代謝やシグナル伝達を制御しているのではないかと予測されるが、その分子機序の全容は明らかになっていない。

#### 《目的》

胃癌細胞の増殖過程における *O*-GlcNAc 修飾の役割を分子レベルで明らかにすることを目的に研究を行った。

#### 《方法》

転写因子である Forkhead box M1 (FOXO1)は胃癌を含めた多種の癌細胞で、その増殖能を調節する因子として知られている。ヒト胃癌細胞株(MKN45)を高糖濃度培養液で培養し、ThiametG(OGA 阻害剤)で処理することで、胃癌細胞内のタンパク質の *O*-GlcNAc 修飾が変化することを確認した後、FOXO1 発現量や細胞増殖能に変化が生じるのかについて検討した。その際に、細胞内での FOXO1 の局在変化についても免疫染色を用いて検討した。また同時に *O*-GlcNAc 修飾の変化が FOXO1 発現量に影響を与える機序を検討する目的で、FOXO1 の proteasomal degradation に関する因子として知られる GSK-3 $\beta$  と *O*-GlcNAc 修飾との関係について免疫沈降法等を用いて検討した。

#### 《結果》

高糖濃度環境での培養および ThiametG 処置を行うと、ヒト胃癌細胞内の *O*-GlcNAc 修飾タンパク量は増加し、その際に FOXO1 は核内移行して高発現しており、細胞増殖能が亢進していた。また *O*-GlcNAc 修飾タンパク量の増加状態では

FOX M1 のユビキチン化が減少しており、FOX M1 の proteasomal degradation 関連因子である GSK-3 $\beta$  の不活性型（リン酸化型）が増加していた。さらに、GSK-3 $\beta$  阻害剤によって CHX による FOX M1 タンパク質の減少が阻害された。また、GSK-3 $\beta$  は直接 O-GlcNAc 修飾を受けるタンパクである事がわかった。

#### 《考察》

本研究で、高糖濃度環境での培養および ThiametG 処置によって GSK3 $\beta$  のリン酸化型が増加し、FOX M1 のユビキチン化が阻害されることが判明した。FOX M1 は多種の癌で発現亢進することが知られており、このことから糖尿病患者における癌増殖・進展との関連性を示唆するものと考えられた。本結果からは、FOX M1 は O-GlcNAc 修飾を受ける標的因子ではなく、O-GlcNAc 修飾が GSK-3 $\beta$  のリン酸化を調節することで、間接的に FOX M1 の発現を調節しているものと考えられた。GSK-3 $\beta$  は O-GlcNAc 修飾がなされることで、Serine 9 がリン酸化され、不活性型 pSer9-GSK-3 $\beta$  へと変化すると考えられたが、その際に GSK-3 $\beta$  をリン酸化する分子である AKT がどのように関連するのかについては本研究結果からは不明である。また FOX M1 の proteasomal degradation 関連因子として報告のある FBXW7 E3 ubiquitin ligase など GSK-3 $\beta$  以外の関連因子に関しても、O-GlcNAc 修飾が如何に関与しているかの検討については今後の課題と考える。Wnt シグナルが GSK-3 $\beta$  をブロックし FOX M1 や  $\beta$ -catenin の発現を調節することで、癌形質や癌の進展を促進させるといった報告もある。O-GlcNAc 修飾が如何にこの経路に関与しているかも含めさらなる研究の必要性があると思われた。

#### 《結論》

高糖濃度環境において胃癌細胞の増殖能は亢進しており、FOX M1 はその一因である可能性があると推察された。そのメカニズムとして FOX M1 の proteasomal degradation が O-GlcNAc 修飾によって阻害されている可能性が示唆された。この過程には GSK-3 $\beta$

が O-GlcNAc 修飾されることによって直接活性が抑えられる、あるいは、O-GlcNAc 修飾によりリン酸化が促進されるためではないかと推察された。これらのメカニズムは、高血糖環境における生体内の癌細胞増殖を調節する機構の一つである可能性が考えられた。

## 論文審査結果の要旨

糖尿病患者における癌の発生・増殖・転移などのリスク上昇は、両疾患が特に先進国において国民的疾患であることから、日本に限らず世界的な問題となっている。しかしながら、糖尿病によって癌のリスクが如何なる機序により上昇するのか、その分子機構の全容は明らかになっておらず、早急な対策が望まれている。

申請者は、糖尿病と癌において著明に上昇し、両者の病態形成に密接に働いている *O*-GlcNAc 糖鎖修飾と呼ばれる細胞内シグナル伝達に必須のタンパク質の翻訳後修飾機構に注目して、高血糖状態が胃癌細胞の増殖を如何に促進するのか、ヒト胃癌細胞株(MKN45)を用いて解析した。その結果、*O*-GlcNAc 糖鎖修飾を亢進させると、癌細胞増殖と転移の主要な役割を担うとされる転写因子 FOXM1 のタンパク量が増加して、細胞増殖も亢進することが判明した。しかし、FOXM1 は *O*-GlcNAc 修飾を受けておらず、FOXM1 をリン酸化し、その結果としてプロテアソームでのタンパク分解を促進する GSK-3 $\beta$  が *O*-GlcNAc 修飾されていたことも判明した。*O*-GlcNAc 修飾の亢進が、GSK-3 $\beta$  のリン酸化（不活化）を促進することから、FOXM1 のユビキチン化とそのタンパク分解を阻害することを示し、GSK-3 $\beta$  の阻害剤により FOXM1 タンパク質の分解が抑制されることを示した。

以上の解析結果から、申請者は糖尿病患者においてその病態形成に働き、癌を特徴付けている *O*-GlcNAc 修飾の亢進が、癌細胞増殖の主要な転写因子である FOXM1 のタンパク分解を阻害することで、FOXM1 の働きを維持させていることを明らかにした。このことから、この機序が糖尿病患者で認められる胃癌を含めた多くの癌の種々のリスク上昇に働いている可能性を示唆するものと考えられた。

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

495(2): 1681-1687, 2018