

氏 名 井田 昌吾

学位の種類 博士 (医学)

学位記番号 博士甲第793号

学位授与の要件 学位規則第4条第1項

学位授与年月日 平成29年 9月13日

学位論文題目 Diverse metabolic effects of O-GlcNAcylation in the pancreas but limited effects in insulin-sensitive organs in mice

(O-GlcNAc 修飾はマウス膵  $\beta$  細胞においては糖代謝に多彩な影響を与えるが、インスリン感受性臓器においては影響を与えない)

審査委員 主査 教授 縣 保年

副査 教授 辻川 知之

副査 教授 小島 秀人

## 論文内容要旨

*整理番号	801	(ふりがな) 氏名	いだしょうこ 井田 昌吾
学位論文題目	<p>Diverse metabolic effects of O-GlcNAcylation in the pancreas but limited effects in insulin-sensitive organs in mice (O-GlcNAc 修飾はマウス膵β細胞においては糖代謝に多彩な影響を与えるが、インスリン感受性臓器においては影響を与えない)</p>		
【目的】			
<p>近年、糖尿病は世界的に増加しており、その病態解明と治療法の開発は喫緊の課題である。糖尿病発症やその病態生理に細胞機能を制御する翻訳後修飾異常の関与が示唆されている。そこで、我々は翻訳後修飾の一つである O-GlcNAc 修飾に着目した。O-GlcNAc 修飾とは細胞内に流入したブドウ糖の一部がヘキソサミン生合成経路に流入し、O-GlcNAc transferase (Ogt)により蛋白に付加される翻訳後修飾であり、細胞内栄養センサーと考えられている。近年過剰な O-GlcNAc 修飾が糖尿病合併症のみならず、インスリン分泌障害や抵抗性に関与するという報告が散見されるが、哺乳動物の個体レベルや糖代謝に関わる各臓器における O-GlcNAc 修飾の役割は十分には解明されていない。そこで我々は各臓器における O-GlcNAc 修飾の生理学的役割について検討することとした。</p>			
【方法】			
① 成体における O-GlcNAc 修飾が糖代謝に及ぼす影響の検討			
<p>全身での O-GlcNAc 修飾欠損は胎生致死をきたすことが報告されている。そこで、雌の Ogt-flox マウスと雄の R26-CreERT2 マウスを交配させ 10 週齢において腹腔内にタモキシフェン(TM)を投与することで全身の Ogt 欠損マウス(Ogt-KO)を作成し、成体における生理的役割を検討した。免疫組織染色で Ogt-flox と Ogt-KO の各臓器での O-GlcNAc 修飾、TM 投与後の体重、血糖、血中インスリン及び各代謝パラメータを評価した。</p>			
② インスリン感受性臓器における O-GlcNAc 修飾の糖代謝に及ぼす影響の検討			
<p>糖代謝関連臓器における O-GlcNAc 修飾の役割を検討した。雌の Ogt-flox マウスと雄の Alb-Cre, Mlclf-Cre, Adiponectin-Cre マウスを交配させ肝臓、骨格筋、脂肪細胞特異的 Ogt 欠損マウス(Ogt-LKO, Ogt-MKO, Ogt-FKO)を作成した。Western Blot 法で Ogt 及び O-GlcNAc 修飾蛋白を認識する RL2 抗体を用いて修飾蛋白量の減弱を確認した。それぞれの臓器特異的欠損マウスにおいて 10 週齢で体重、血糖、腹腔内ブドウ糖負荷試験、腹腔内インスリン負荷試験を行い、糖代謝を評価した。</p>			
③ 膵β細胞における O-GlcNAc 修飾の糖代謝に及ぼす影響の検討			
<p>雌の Ogt-flox マウスと雄の Pdx1-CreER マウスを交配させ膵β細胞特異的 Ogt 欠損マウス(Ogt-βKO)を作成した。Western Blot 法で Ogt 及び O-GlcNAc 修飾蛋白量の減弱を確認した。また表現系として TM 投与後の体重、血糖、血中インスリン、及び腹腔内ブドウ糖負荷試験を経時的に評価した。</p>			

(備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等を用いて印字すること。

2. ※印の欄には記入しないこと。

形態学的検討として、膵島面積/膵臓面積、膵島サイズ、電子顕微鏡を用いたインスリン顆粒の形態とインスリン量、さらに、Ki67染色及びTUNEL染色による膵島の増殖・アポトーシスの評価を行った。単離膵島の遺伝子発現をRT-qPCR法にて評価した。

#### 【結果】

##### ① 成体における O-GlcNAc 修飾の糖代謝に及ぼす影響の検討

Ogt-KO マウスは対照群と比較して TM 投与直後から徐々に体重減少を来した。同様に血糖、血中インスリンに関しても Ogt-KO マウスで TM 投与直後から低下を来した。最終的に TM 投与4週頃から死亡するマウスが出現し、TM 投与6週後には80%のマウスが死亡した。TM 投与4週後の血液検査では Ogt-KO マウスでやや摂食量が多いにもかかわらず、著明な低蛋白血症を来し、栄養失調を来していた。以上の結果から成体においても O-GlcNAc 修飾は生存に不可欠であることが判明した。

##### ② インスリン感受性臓器における O-GlcNAc 修飾の糖代謝に及ぼす影響の検討

Ogt-LKO、Ogt-MKO、Ogt-FKO はそれぞれ対照群である Ogt-flox マウスと比較し発育及び糖代謝に関して有意な差を認めなかった。このことからインスリン感受性臓器における O-GlcNAc 修飾は生理学的状況下においては糖代謝に大きな影響を与えないことが示唆された。

##### ③ 膵β細胞における O-GlcNAc 修飾の糖代謝に及ぼす影響の検討

Ogt-βKO マウスは対照群と比較して TM 投与後7週頃から有意な体重増加を来した。Ogt-βKO マウスは TM 投与後5-6週で有意な血糖低下を認め、その後9-10週にかけて著明な血糖上昇を来した。血中インスリン値は TM 投与後5-6週 Ogt-βKO マウスで有意な上昇を認め、TM 投与後10週でインスリン分泌の枯渇を示した。以上の結果から Ogt-βKO マウスは血糖・インスリン変化において2相性の変化を示した。そこで、TM 投与後5-6週の時期を early phase、9-10週の時期を late phase としそれぞれの時期において詳細に評価した。その結果、early phase においては腹腔内ブドウ糖負荷試験で Ogt-βKO マウスは有意な血糖の低下とインスリン分泌亢進を認め、単離膵島からのインスリン分泌も亢進していた。形態学的には膵島面積とサイズの増加及び膵島増殖が亢進していた。これらの結果から、early phase において O-GlcNAc 修飾欠損は膵島増大を伴うインスリン分泌の亢進とそれによる血糖低下をきたすことが判明した。一方、late phase の Ogt-βKO マウスでは膵島面積の減少、インスリン顆粒の減少及びアポトーシスが亢進しており、O-GlcNAc 修飾が膵島維持に重要な役割を果たしていることが判明した。

#### 【考察】

今回の検討で O-GlcNAc 修飾が成体維持に必須であること、O-GlcNAc 修飾はインスリン感受性臓器では糖代謝に影響を与えないが、膵β細胞ではインスリン分泌、膵島増殖や恒常性維持に重要であることを見出した。今回の膵β細胞に表現系を惹起した O-GlcNAc 修飾蛋白の同定とその解析が糖尿病病態の理解と治療に寄与する可能性が示唆された。

## 学位論文審査の結果の要旨

整理番号	801	氏名	井田 昌吾
論文審査委員			
<p>(学位論文審査の結果の要旨) (明朝体 11 ポイント、600 字以内で作成のこと。)</p> <p>2 型糖尿病はインスリン分泌不全とインスリン抵抗性の増大が病態の中核をなすが、分子機構には未知な部分も多く、病態解明により新たな治療標的の探索が望まれている。一方、蛋白の翻訳後修飾は細胞機能を制御する上で非常に重要な機構であり、その異常は糖尿病を含めた種々の疾患の発症・進展に寄与している。本研究では翻訳後修飾の 1 つで、細胞内の栄養センサーと考えられている O-GlcNAc 修飾に着目し、全身並びに糖代謝関連臓器での O-GlcNAc 修飾の糖代謝における生理学的役割を、臓器特異的 Ogt 遺伝子欠損マウスを用いて検討し、以下の点を明らかにした。</p> <ol style="list-style-type: none"><li>1) O-GlcNAc 修飾は個体発生のみならず個体の恒常性維持に必須である。</li><li>2) O-GlcNAc 修飾は肝臓、骨格筋、脂肪組織といったインスリン感受性臓器の糖代謝に大きな影響を与えない。</li><li>3) O-GlcNAc 修飾は膵β細胞ではインスリン分泌、細胞増殖ならびに恒常性維持に重要な役割を果たす。</li></ol> <p>本論文は、O-GlcNAc 修飾の糖代謝における生理学的役割に関して個体レベルで解析し、膵β細胞における O-GlcNAc 修飾の役割について新たな知見を与えたものであり、また最終試験として論文内容に関連した試問を実施したところ合格と判断されたので、博士(医学)の学位論文に値するものと認められた。</p> <p style="text-align: right;">(総字数 556 字)</p> <p style="text-align: right;">(平成 29 年 8 月 29 日)</p>			