

氏 名 中本 明紀子

学 位 の 種 類 博士 (医学)

学 位 記 番 号 博士第979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 令和5年9月13日

学 位 論 文 題 目 0-GlcNAc modification is essential for physiological
adipose expansion induced by high-fat feeding
(0-GlcNAc 修飾は高脂肪食による生理的な脂肪組織増大に
必須である)

審 査 委 員 主査 教授 向所 賢一
副査 教授 等 誠司
副査 教授 渡邊 嘉之

論文内容要旨

※整理番号	989	(ふりがな) 氏名	なかもと あきこ 中本 明紀子
博士論文題目	O-GlcNAc modification is essential for physiological adipose expansion induced by high-fat feeding (O-GlcNAc修飾は高脂肪食による生理的な脂肪組織増大に必須である)		
<p>【目的】 細胞内タンパク質に対するO-GlcNAc修飾は、解糖系の側副路であるヘキソサミン生合成経路で生じるUDP-GlcNAcを基質として、O-GlcNAc transferase(Ogt)により付加される蛋白翻訳後修飾であり、細胞内栄養センサーとされている。脂肪組織は、体重増加の過程で細胞の肥大化に伴い代謝が劇的に変化する臓器であるが、O-GlcNAc修飾が果たす役割の詳細は未だ明らかになっていない。そこで本研究では、体重増加過程の白色脂肪組織におけるO-GlcNAc修飾の生理的な役割について検討を行うことを目的とした。</p> <p>【方法】 1) 脂肪組織特異的Ogt遺伝子欠損マウス(Ogt-FKO)を用いて、O-GlcNAc修飾の成長や糖代謝における役割を検討 Ogt-floxマウスとAdipoq-Creマウスを交配してOgt-FKOマウスを作製し、8週齢から高脂肪食摂餌により肥満を誘導した。体重推移、24週齢での白色脂肪組織重量測定、体組成評価、代謝ケージを用いた代謝評価、組織学的評価、RT-qPCR法及びWestern blotによる遺伝子、蛋白発現評価を行った。また腹腔内ブドウ糖負荷試験(IPGTT)、腹腔内インスリン負荷試験(IPITT)、正常血糖高インスリンクランプ法により糖代謝の評価を行った。 2) 初代培養白色脂肪細胞を用いて、O-GlcNAc修飾が脂肪増大に与える影響を検討 6~8週齢のC57BL/6マウスより採取した皮下脂肪から間質血管細胞群を単離して培養したのち脂肪細胞への分化誘導を行い、その過程でOgt阻害薬であるOSMI-1を投与した。分化した成熟脂肪細胞を用いて、遺伝子、蛋白発現、Oil red O染色による脂肪滴貯留評価を行った。6~8週齢のOgt-FKOマウスおよびOgt-floxマウスからも皮下脂肪を採取して培養、分化誘導を行い、上記と同様の方法により両群を比較した。 3) 3T3-L1細胞を用いて、過栄養と炎症の関連を検討 3T3-L1細胞に対し、生体における過栄養状態を模倣するためオレイン酸を付加した培地にて分化誘導を行い、その過程でOSMI-1を投与した。分化した成熟脂肪細胞を用いて、遺伝子、蛋白発現評価、脂肪滴貯留の評価、培地中の遊離脂肪酸濃度測定を行った。 4) 条件培地とRAW264.7細胞を用いて、遊離脂肪酸放出と炎症の関連を検討 マウスマクロファージ株RAW264.7細胞を培養しconfluentに達した状態で、通常培地、パルミチン酸を含む培地、条件培地(オレイン酸付加し、OSMI-1投与/非投与下で分化誘導を行った3T3-L1細胞由来培地)の4種類の培地に変更し、24時間培養した上で細胞を回収し、炎症関連遺伝子発現を4群で比較した。</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で印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

(続紙)

【結果】

1) 脂肪組織特異的Ogt遺伝子欠損マウス(Ogt-FKO)を用いて、O-GlcNAc修飾の成長や糖代謝における役割を検討

Ogt-FKOマウスはOgt-floxに比して、有意に体重増加が抑制された。その結果、Ogt-FKOマウスでは白色脂肪組織重量がOgt-floxに比して少なかった。糖代謝では、Ogt-FKOマウスで全身性のインスリン抵抗性増悪がみられた。Ogt-FKOマウスの白色脂肪組織では顕著な線維化がみられ、炎症関連遺伝子(TNF- α 、IL-6、MCP-1、F4/80)発現が有意に増加していた。さらにOgt-FKOマウスではde novo脂肪合成関連遺伝子(SREBP-1c、FAS)発現が低下していた。この結果から、生体においてO-GlcNAc修飾が脂肪組織の生理的増大に寄与しており、糖代謝や炎症にも関与することが示唆された。

2) 初代培養白色脂肪細胞を用いて、O-GlcNAc修飾が脂肪増大に与える影響を検討

初代培養脂肪細胞にOgt阻害薬を孵置すると、脂肪滴減少、de novo脂肪合成関連遺伝子発現の低下、レプチン遺伝子発現低下がみられたが、炎症関連遺伝子発現には差がなかった。Ogt-FKOマウス由来の初代培養脂肪細胞でもOgt阻害薬と同様の結果がみられた。これらの結果から、Ogt活性がde novo脂肪合成に加え、脂肪分化にも関与することが示唆された。

3) 3T3-L1細胞を用いて、過栄養と炎症の関連を検討

オレイン酸付加培地での培養により、脂肪蓄積増加、レプチン遺伝子発現増加させたのち、Ogt阻害薬を孵置すると、培地への遊離脂肪酸放出が増加した。

4) 条件培地とマウスマクロファージ株RAW264.7細胞を用いて、遊離脂肪酸放出と炎症の関連を検討

Ogt阻害薬を附置した3T3-L1細胞由来の培地を用いてRAW264.7細胞を培養することで、通常培地と比較して炎症関連遺伝子の発現が有意に増加した。この結果により、脂肪細胞におけるOgt活性の低下が遊離脂肪酸放出増加を介してマクロファージを刺激し、炎症を惹起することが示唆された。

【考察】

本研究では、脂肪組織におけるO-GlcNAc修飾が、過栄養に応じた脂肪蓄積に重要な役割を果たすこと、de novo脂肪合成とレプチン増加に重要であること、Ogt活性の欠如は脂肪組織の炎症を悪化させることが示された。これらの結果は、O-GlcNAc修飾が過栄養に適応し、脂肪増大を維持するために重要な役割を果たしていることを示唆する。本研究の限界としては、脂肪増大に関与するOgtの直接的な標的を同定できていない点が挙げられる。

【結論】

O-GlcNAc修飾は、白色脂肪組織におけるde novo脂肪合成を介した生理的な脂肪増大に極めて重要な役割を担っている。

博士論文審査の結果の要旨

整理番号	989	氏名	中本 明紀子
論文審査委員	主査	向所 賢一	
	副査	等 誠司	
	副査	渡邊 嘉之	
(博士論文審査の結果の要旨)			
<p>本論文では、脂肪組織特異的O-GlcNAc transferase (OGT) 遺伝子欠損マウス (Ogt-FKO) を用いて、成長や糖代謝におけるO-GlcNAc修飾の役割を検討した。さらに、初代培養白色脂肪細胞、3T3-L1細胞、条件培地とマウスマクロファージ細胞株であるRAW264.7細胞に対してOgt阻害薬であるOSMI-1の投与実験を行うことにより、Ogt活性の欠如により脂肪組織の炎症が悪化するメカニズムについて検討を行い、以下の点を明らかにした。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 生体においてO-GlcNAc修飾が脂肪組織の生理的増大や糖代謝及び炎症に関与していること。 2) Ogt活性がde novo脂肪合成に加え、脂肪分化にも関与すること。 3) O-GlcNAc修飾がレプチン増加に重要であること。 4) 脂肪細胞におけるOgt活性の低下が遊離脂肪酸放出増加を介してマクロファージを刺激し、炎症を惹起すること。 <p>本論文は、O-GlcNAc修飾が過栄養に適応し、白色脂肪組織におけるde novo脂肪合成を介した生理的な脂肪増大にきわめて重要な役割を担っていること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>			
(総字数 556 字)			
(2023年8月25日)			