

令和 4 年 10 月 17 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16226

研究課題名(和文)褐色脂肪組織におけるO-GlcNAc修飾の生理学的役割の解明と新規治療標的の探索

研究課題名(英文)Elucidation of the physiological role of O-GlcNAc modification in brown adipose tissue and search for novel therapeutic targets

研究代表者

大橋 夏子(Ohashi, Natsuko)

滋賀医科大学・医学部・特任助教

研究者番号：60816776

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)：肥満症や糖尿病において、翻訳後修飾を介した蛋白の機能異常が病態の発症や進展に深く関与しており、その翻訳後修飾の一つにO-GlcNAc修飾がある。

今回、脂肪組織特異的Ogt欠損マウス及び褐色脂肪組織特異的Ogt欠損マウスを作製し、高脂肪食負荷により食事誘導性肥満及び糖尿病モデルとして検討を行った。

その結果、脂肪組織におけるO-GlcNAc修飾の欠損によって白色脂肪は高度な萎縮を呈し、さらに高脂肪食摂餌下にて肥満抵抗性を示したことから、白色脂肪組織におけるO-GlcNAc修飾が、肥満形成過程において脂肪酸合成や脂肪細胞の機能的成熟に関して重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

O-GlcNAc修飾の異常は、糖尿病をはじめとする代謝異常や癌、アルツハイマー病などの疾患と密接に関連している。今回、白色脂肪組織のO-GlcNAc修飾は、肥満形成過程における脂肪酸合成や脂肪細胞の機能的成熟に関して重要な役割を果たしていることが明らかとなった。一方で、褐色脂肪組織のO-GlcNAc修飾に関しては、肥満形成過程においては糖代謝及び肥満に及ぼす影響は少ない結果となった。未だ解明すべき課題は残されているが、肥満や糖尿病状態における各脂肪組織のO-GlcNAc修飾の意義及び役割の一部が明らかとなったことから、今後の肥満・2型糖尿病の病態機序解明への寄与が期待される。

研究成果の概要(英文)：In obesity and diabetes mellitus, protein dysfunctions mediated by post-translational modifications are deeply involved in the pathogenesis and progression of the disease, and O-GlcNAc modification is one of the post-translational modifications.

In this study, we generated adipose tissue-specific Ogt-deficient mice and brown adipose tissue-specific Ogt-deficient mice, and examined them as models of diet-induced obesity and diabetes by loading them with a high-fat diet.

Loss of O-GlcNAc modification in WAT exhibited obesity resistance and impaired glucose tolerance because of lipatrophy under diet induced obesity, and the results suggest that O-GlcNAc modification in white adipose tissue plays an important role in fatty acid synthesis and functional maturation of adipocytes during obesogenesis.

研究分野：糖尿病・代謝

キーワード：褐色脂肪細胞 白色脂肪細胞 エネルギー代謝 糖代謝

1. 研究開始当初の背景

世界中で増加が憂慮されている肥満症や 2 型糖尿病は、克服すべき重大な臨床課題の一つであり、エネルギーの貯蔵を担う「白色脂肪細胞」とともに、ミトコンドリアを介した熱産生によりエネルギーを消費する「褐色脂肪細胞」も、それらの疾患の新たな治療標的として注目されている。肥満症や糖尿病において、リン酸化やメチル化などの翻訳後修飾を介した蛋白の機能異常が病態の発症や進展に深く関与しており、その生理学的意義の解明ならびにその異常と病態との関連を解明することが、新たな治療標的の探求には不可欠である。

我々が着目している *O*-GlcNAc 修飾は、細胞内に流入したグルコースの一部がヘキソサミン生合成経路に流入し産生される UDP-*N*-アセチルグルコサミン(UDP-GlcNAc)を基質とし、*O*-GlcNAc 転移酵素(OGT)によって蛋白の Ser、Thr 残基に付加され、*O*-GlcNAc 分解酵素(OGA)により除去される翻訳後修飾である。この経路には、グルコース以外にもアミノ酸の一種であるグルタミンや脂肪酸代謝産物であるアセチル CoA が関与していることから“細胞内栄養センサー”の役割を果たしていると考えられている(図1)。

しかしながら、全身 *Ogt* 欠損マウスは胚細胞期致死の表現形であることから、長らくの間、各臓器における *O*-GlcNAc 修飾の生理的役割はほとんど解明されていなかった。そこで我々は、脂肪組織における *O*-GlcNAc 修飾の機能解析には *Ogt* あるいは *Oga* 遺伝子に対する細胞特異的遺伝子欠損マウスを用いた検討が不可欠であると考え、モデルマウスを作製し検討を行うこととした。

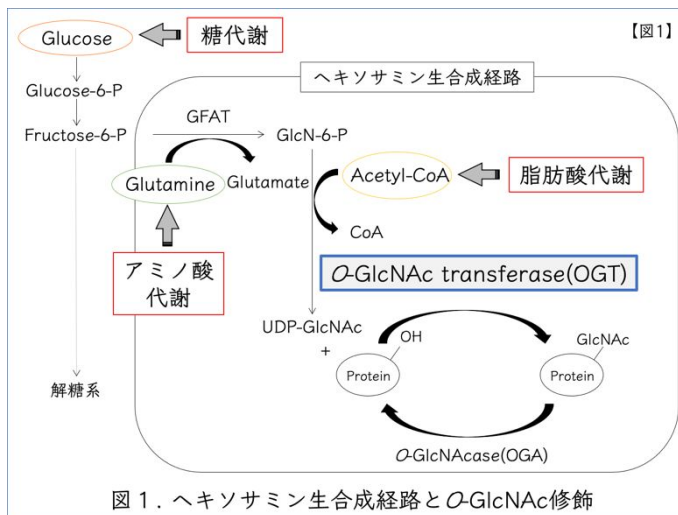


図1. ヘキソサミン生合成経路と *O*-GlcNAc 修飾

2. 研究の目的

本研究は、肥満や糖尿病状態における白色及び褐色脂肪機能と *O*-GlcNAc 修飾の関連を検討することで、病態機序の解明や治療標的の探索を目指したものである。褐色脂肪組織は非ふるえ熱産生のみならず、食事誘発性熱産生に寄与し、近年ヒトでもその存在が明らかとなっており、白色脂肪組織と同様、肥満症・2型糖尿病の治療標的臓器と考えられるようになってきている。我々は、褐色脂肪組織における *O*-GlcNAc 修飾が、寒冷環境における体温維持に不可欠であることを見出した(Ohashi et al. Diabetes 2017)が、本研究では、褐色脂肪組織における熱産生機構に *O*-GlcNAc 修飾がどのように関与しているのか、さらに、肥満や糖尿病状態における白色及び褐色脂肪機能と *O*-GlcNAc 修飾との関連を詳細に検討することで、*O*-GlcNAc 修飾を標的とした肥満・2型糖尿病の新規治療法の可能性を探索する。

3. 研究の方法

肥満及び糖尿病に関する検討として、細胞特異的遺伝子欠損マウスとして *Ogt*-flox マウスと Adiponectin-Cre マウス及び *Ucp1*-cre マウスをそれぞれ交配させ、脂肪組織特異的 *Ogt* 欠損マウスである *Ogt*-FKO マウスと褐色脂肪組織特異的 *Ogt* 欠損マウスである *Ogt*-BKO マウスを作製し、高脂肪食負荷により食事誘導性肥満及び糖尿病モデルとして検討を行った。また、より詳細な機序を検討するため、単離初代培養脂肪細胞を用いた検討を行った。これらの肥満形成過程における検討では、研究結果より白色脂肪組織の *Ogt* の影響が大きいため、白色脂肪での検討を中心に進めた(結果の詳細は、4. 研究成果の項で後述する)。また、褐色脂肪細胞における *O*-GlcNAc 修飾の生理的役割の解明に向け、タモキシフェン誘導性褐色脂肪細胞特異的 *Ogt* 欠損マウスや、*O*-GlcNAc 修飾の Gain-of-function が褐色脂肪細胞の機能維持に及ぼす影響の検討として褐色脂肪細胞特異的 OGA 欠損マウスの作製及び解析、メタボリックケージを用いた代謝解析を行った。

4. 研究成果

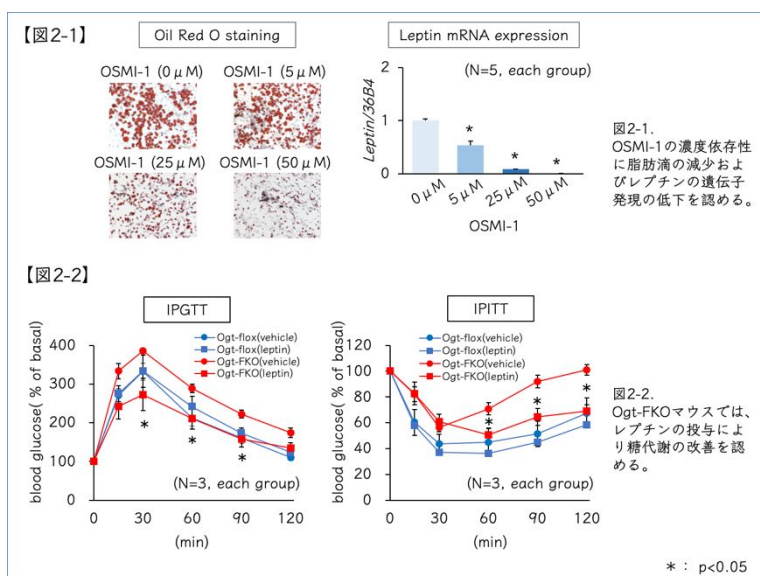
研究成果として、1) 肥満や糖尿病状態における白色及び褐色脂肪機能と *O*-GlcNAc 修飾との関連の検討、及び、2) 褐色脂肪組織での熱産生機構における *O*-GlcNAc 修飾の関与の検討、に関する結果を示す。

1-1) これまでの検討で、通常食摂取下では、*Ogt*-BKO マウスでは褐色脂肪の肥大化のみ見られ、*Ogt*-FKO マウスでは褐色脂肪の肥大化に加えて精巢上体脂肪および皮下脂肪の萎縮が見られることが明らかとなっていた。そこで高脂肪食を負荷すると、*Ogt*-BKO マウスでは通常食摂取時と同様に体重および白色脂肪組織重量に変化はなく、褐色脂肪組織のみ肥大化を呈したのに対し、*Ogt*-FKO マウスでは、食餌摂取量は対照マウスと有意な差は見られないにも関わらず体重増加が有意に抑制され、通常食摂取時よりも顕著に白色脂肪の萎縮を認めた。さらに、腹腔内ブドウ糖負荷試験 (IPGTT) および腹腔内インスリン負荷試験 (IPITT) では、*Ogt*-BKO マウスでは有意な変化を認めなかったのに対し、*Ogt*-FKO マウスでは白色脂肪重量が少なく低体重にもかかわらず、耐糖能の悪化とインスリン抵抗性の増悪がみられた。以上の結果から、肥満形成過程においては褐色よりも白色脂肪組織における *Ogt* の影響が大きいと考え、白色脂肪組織における検討を中心に進めることとした。

1-2) *Ogt*-FKO マウスにおいて、Glucose clamp 法による評価を行ったところ、glucose infusion rate が有意に低く、Euglycemic clamp では、インスリンによる肝臓の糖放出抑制が低下しており、インスリン抵抗性の増悪が示唆された。*Ogt*-FKO マウスの精巢上体脂肪および皮下脂肪では、脂肪滴の縮小、マッソントリクローム染色における高度な線維化及び1型コラーゲンの mRNA 発現の有意な増加を認めた。さらに、TNF- α 、MCP-1、IL-6、CD11c など炎症に関連する遺伝子発現が有意に増加しており、炎症による線維化が示唆された。続いて、脂肪合成に関連する遺伝子発現に関して検討すると、脂肪合成の重要なレギュレーターである SREBP-1c およびそのターゲットである FAS、SCD1、SCD2 の発現が、*Ogt*-FKO マウスで低下していた。一方、脂肪分化に関連する遺伝子発現については、対照マウスに比して有意な差を認めなかった。また、*Ogt*-FKO マウスでは血清アディポネクチンおよびレプチン濃度、さらに脂肪組織での各遺伝子発現が有意に低下しており、白色脂肪の高度な萎縮と矛盾しない結果と考えられた。

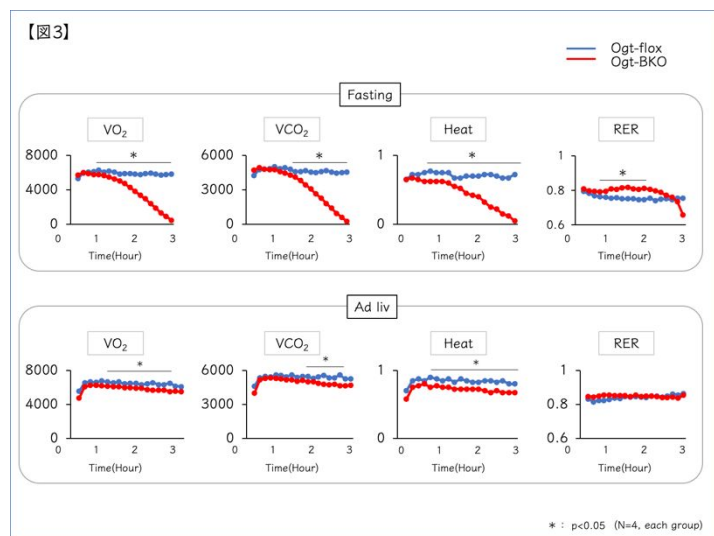
1-3) そこで、より詳細な機序を検討するため、マウスの単離初代培養白色脂肪細胞を用いた検討を行った。C57BL/6 マウスより採取した皮下脂肪を処理したのち培養し、*Ogt* 阻害薬である OSMI-1 を投与した状態で脂肪細胞への分化誘導を行った。その結果、OSMI-1 投与により脂肪滴の減少とレプチンの遺伝子発現の低下がみられ、この現象は OSMI-1 の濃度依存性に生じることが明らかとなった (図 2-1)。

続いて、*Ogt*-FKO マウスに IPGTT、IPITT を行う直前にレプチンを腹腔内投与し、糖代謝を評価した。すると、*Ogt*-FKO マウスでは、IPGTT、IPITT いずれにおいても、レプチンの投与により急性に糖代謝の改善が認められた (図 2-2)。このことから、*Ogt*-FKO マウスでは脂肪合成低下に伴うレプチン分泌の低下により、耐糖能の悪化を呈していることが示唆された。



以上の結果から、エネルギー過剰状態における肥満および糖代謝に関しては、褐色脂肪組織よりも白色脂肪組織における *Ogt* の意義が大きいと考えられた。通常の肥満形成過程においては、白色脂肪細胞の細胞数増加および細胞サイズの増大が生じるが、*Ogt*-FKO マウスでは脂肪組織の萎縮が生じており、その原因の一つとして脂肪合成の低下が明らかとなった。さらに、摂取エネルギーの増大に対して肥満抵抗性を示すにも関わらずインスリン抵抗性の増悪を認めており、脂肪組織の炎症や、アディポネクチン、レプチン分泌低下の関与が考えられた。特に、*Ogt*-FKO マウスにおいて、レプチンの補充により糖代謝が著明に改善したことから、糖代謝悪化に関するレプチンの関与は非常に大きいことが示唆された。今回の検討より、白色脂肪組織の *O*-GlcNAc 修飾は、肥満形成過程における脂肪酸合成や脂肪細胞の機能的成熟に関して重要な役割を果たしていることが明らかとなった。引き続き、標的蛋白の同定を目指してより詳細なメカニズムの追究を行っていく。

2-1) これまでの検討で、Ogt-BKO マウスの寒冷負荷不耐性はグルコースの投与によって緩和されることが明らかとなっていた。今回、4度下にて fasting と ad liv それぞれの状態でもタボリックケージを用いて代謝を解析した。すると fasting の状態と比較し、ad liv ではある程度の熱産生が可能となり、摂餌による寒冷負荷不耐性の緩和を認めた。呼吸商に関しては、fasting の状態では Ogt-BKO マウスにおいて有意に高値であり、熱産生の基質としてグルコースの利用亢進と矛盾しない結果と考えられた。



2-2) 先天的な Ogt 欠損に加え、タモキシフェン誘導性 Cre 発現マウスを使用し、成体での Ogt 発現の欠損が、先天的欠損マウスである Ogt-BKO マウスと同様に褐色脂肪細胞の機能障害を引き起こすかを検討した。いったん正常化した褐色脂肪細胞を持つ成体マウス (10 週齢) に対しタモキシフェンを投与しタモキシフェン誘導性褐色脂肪細胞特異的 Ogt 欠損マウス (Ogt-TBKO マウス) を作製した。すると、Ogt-BKO マウスと異なり、褐色脂肪重量に差は認めなかったが、Ogt-BKO マウスと同様に寒冷環境下において有意な体温低下を呈することが明らかとなった。このことから、O-GlcNAc 修飾が発生ではなく、完全分化後の褐色脂肪細胞の機能維持に不可欠である可能性が示唆された。

さらに、O-GlcNAc 修飾の Gain-of-function が褐色脂肪細胞の機能維持に及ぼす影響を検討するため、OGA-flox マウスと褐色脂肪細胞特異的 Cre 発現マウスとの交配により、褐色脂肪細胞特異的 OGA 欠損マウス (OGA-BKO マウス) を作製し、機能解析を行った。対照マウスと比して、体重及び随時血糖値、褐色脂肪、皮下脂肪、精巣上体脂肪、肝臓の各臓器重量、さらに腹腔内ブドウ糖及びインスリン負荷試験による糖代謝評価において有意な差は認めなかった。しかしながら、4度絶食下にてメタボリックケージを用いた解析では、対照マウスに比して寒冷負荷3時間以降では熱産生能が高いことが示された。このことから、OGAの欠損により寒冷負荷耐性の亢進が示唆された。

O-GlcNAc 修飾と病態との関連を明らかにすることで、糖尿病や肥満の予防と新規治療標的の開発に寄与することを目指して本研究を進めてきたが、病態モデルでは、当初検討していた褐色脂肪組織よりも白色脂肪組織における Ogt の意義及び関与が大きいことが明らかとなった。今回の研究成果として、白色脂肪組織の O-GlcNAc 修飾は、肥満形成過程における脂肪酸合成や脂肪細胞の機能的成熟に関して重要な役割を果たしていることが明らかとなったが、引き続き、標的蛋白の同定を目指してより詳細なメカニズムの追究を行っていく。

一方で、褐色脂肪組織における O-GlcNAc 修飾に関しては、新たなモデルマウスを作製しアプローチを進めている段階であり、現時点では未だ検討及び解明すべき課題が多々残されている。褐色脂肪組織における新規機能制御機構の解明に寄与することを目指し、上記事項を含め現在も検討を行っており、今後も継続予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 大橋夏子、森野勝太郎、前川聡	4. 巻 274
2. 論文標題 褐色脂肪細胞におけるO-GlcNAc修飾の役割	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 983-988
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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2件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大橋 夏子
2. 発表標題 The role of O-GlcNAcylation in brown and white adipose tissue
3. 学会等名 第63回日本糖尿病学会年次学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大橋 夏子
2. 発表標題 褐色脂肪組織におけるO-GlcNAc修飾は 寒冷環境での熱産生に重要である
3. 学会等名 第36回内分泌代謝学サマーセミナー（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

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