

氏名	平田好正
(ふりがな)	(ひらた よしまさ)
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1月24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	Augmented <i>O</i> -GlcNAcylation Alleviates Inflammation-mediated Colon Carcinogenesis via Suppression of Acute Inflammation ( <i>O</i> -GlcNAc 修飾は急性期の炎症を沈静化し炎症性 大腸発癌を抑制する)
論文審査委員	(主) 教授 矢野 貴人 教授 田中 慶太郎 教授 富永 和作

## 学位論文内容の要旨

### 【緒言】

タンパク質 *O*-linked *N*-acetylglucosamine 化 (以下、*O*-GlcNAc 修飾) は翻訳後修飾でありタンパク質の機能制御機構の一つである。様々な組織での癌の増殖および進展に関連していると考えられているが、発癌と *O*-GlcNAc 修飾に関しては不明な点が多い。NF- $\kappa$ B は炎症や発癌に寄与する転写因子であるが、*O*-GlcNAc 修飾の標的タンパク質でもあり、それによって発癌や炎症を促進するのか抑制するのか、現在も一定の見解は得られていない。*O*-GlcNAc 修飾と大腸癌発癌との関連を明らかにするために、*O*-GlcNAc 転移酵素 (OGT) トランスジェニックマウス (*Ogt*-Tg) を用いて、1,2-dimethylhydrazine (DMH) と Dextran sodium sulfates (DSS) による炎症性腸疾患関連大腸発癌モデルを作製し、発癌と *O*-GlcNAc 修飾の関係について検討した。

## 【方法】

8週齢の *Ogt*<sup>Tg</sup> と C57BL/6 野生型マウス (WT) を用いて DSS/DMH 誘発大腸癌発癌モデルを作製した。具体的には、DMH の皮下注射を 20 mg/kg で第 0 週の 1 日目、3 日目、5 日目に行い、2% DSS を DMH 投与から 8—15 日目 (第 1 週) および 29—36 日目 (第 4 週) に経口投与した。第 2 週、第 3 週、および第 5 週以降は、自由飲水とし第 11 週目に全大腸を摘出した。評価は、経時的なマウスの体重変化、摘出大腸での腸管長を測定し、0.2%メチレンブルー染色による腫瘍個数を計測した。大腸組織における各種蛋白質発現に関しては、Western blot 法にて *O*-GlcNAc 修飾、OGT、リン酸化 NF- $\kappa$ B、そして total NF- $\kappa$ B を定量した。遺伝子発現に関しては、real-time RT-PCR 法にて IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  の mRNA 発現を測定した。急性期の炎症モデルには、2.2% DSS を 1 週間経口投与させた後、2 日後に、組織炎症関連分子の解析を行った。

## 【結果】

腫瘍結節の個数は *Ogt*<sup>Tg</sup> では WT と比較し減少傾向であり、体重減少と大腸腸管長の短縮に関しても、*Ogt*<sup>Tg</sup> は WT と比較して軽度であった。Western blot 法で解析すると、OGT 発現量と *O*-GlcNAc 修飾は増加し、NF- $\kappa$ B のリン酸化は抑制されていた。炎症性サイトカインである IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  の mRNA 発現量は、*Ogt*<sup>Tg</sup> では WT 群と比較し低値を示した。HE 染色による組織学的検討では、WT の DMH/DSS 群での腫瘍結節内には、顕著な免疫系担当細胞の浸潤がみられたが、*Ogt*<sup>Tg</sup> 群ではそれらが減少していた。以上より、*Ogt*<sup>Tg</sup> では NF- $\kappa$ B の *O*-GlcNAc 修飾を介して、リン酸化による活性化を抑制し組織炎症を抑制することによって炎症を鎮静化し、結果として大腸癌発癌が抑制されたのではないかと推察された。

次に、このことを改めて検証するために、急性大腸炎モデルを作成し解析した。その結果、*Ogt*<sup>Tg</sup> では WT と比較し、統計学的な有意差は認めなかったものの、体重減少は緩やかであり、大腸腸管長の短縮も軽度であった。real-time RT-PCR 法では、DSS 腸炎では TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  全てに関し発現上昇が認められたが、中でも、IL-1 $\beta$  は WT に比べ

*Ogt-Tg* で有意な低下が見られた。タンパク質の解析では、DSS 投与前には OGT 発現量とタンパク質 *O*-GlcNAc 修飾の程度は、*Ogt-Tg* では WT よりも有意に高度であった。DSS 飲水後は両群で OGT 発現量とタンパク質 *O*-GlcNAc 修飾の増加が認められた。DSS 処理前後の NF- $\kappa$ B のリン酸化は、*Ogt-Tg* で有意に抑制されていることが認められた。HE 染色で組織学的検討を行った結果、粘膜層および粘膜下層への炎症細胞浸潤に関しては両群で有意差が見られなかったが、WT において粘膜層の脱離などより強い組織損傷が観察された。

### 【考察】

*Ogt-Tg* では DSS/DMH 投与による炎症性発癌が有意に抑制され、その際、NF- $\kappa$ B のリン酸化が有意に低下していた。炎症性発癌の過程で、OGT が炎症のマスター分子である NF- $\kappa$ B を *O*-GlcNAc 修飾することにより不活化し、NF- $\kappa$ B を介する初期の炎症が抑制されることがその原因であることが示唆された。OGT の発現、それに続くタンパク質 *O*-GlcNAc 修飾は癌の増殖・進展のみならず、その発生にも寄与していることが示唆されると同時に、OGT/*O*-GlcNAc 修飾経路が新たな炎症性発癌治療の標的となる可能性が示唆された。

(様式 甲 6)

## 論文審査結果の要旨

大腸癌は世界的に増加しており、大腸癌による死亡率は男性では第 3 位、女性では第 1 位と大きな社会的問題になっている。一方、*O*-linked *N*-acetylglucosamine 化はタンパク質の翻訳後修飾（以下、*O*-GlcNAc 修飾）であり、タンパク質の機能制御機構の一つである。*O*-GlcNAc 修飾は大腸を含め様々な組織での癌の増殖に関連していると考えられている。しかし、発癌、特に炎症をその引き金とする発癌と *O*-GlcNAc 修飾との関連性についてはこれまで不明であり、本研究において、*O*-GlcNAc 転移酵素 (OGT) トランスジェニックマウス (*Ogt*-Tg) を用いて、1,2-dimethylhydrazine と Dextran sodium sulfate (DSS) による炎症関連大腸発癌モデルを作成し、炎症性大腸癌発癌と *O*-GlcNAc 修飾の関係について検討した。*Ogt*-Tg は野生型のマウス (WT) と比較し、腫瘍個数は少ない傾向であり、体重減少と大腸腸管長の短縮も軽度であった。Western blot 法にて大腸粘膜組織の解析を行った所、*Ogt*-Tg では炎症のマスタータンパク質 NF- $\kappa$ B のリン酸化が有意に抑制されていた。real-time RT-PCR 法による mRNA の解析では、*Ogt*-Tg では DSS による TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  発現の上昇が WT に比べ抑制されていた。さらに、我々は DSS 単独投与による炎症性腸疾患モデルを作成することにより、*O*-GlcNAc 修飾の炎症抑制作用について検討した。統計学的な有意差は認めなかったが、*Ogt*-Tg では WT に比べ、DSS 腸炎が軽度であり、NF- $\kappa$ B のリン酸化は有意に抑制され、*O*-GlcNAc 修飾による急性炎症抑制作用が示唆された。本研究により、我々は *O*-GlcNAc 修飾が NF- $\kappa$ B を介した初期炎症を抑制することにより、炎症性大腸癌発癌を抑制している可能性を示すことが出来た。OGT の活性調節を介した *O*-GlcNAc 修飾の制御は、炎症性大腸癌や炎症性腸疾患の新たな治療標的となりうる可能性が示唆された。

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)

Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition in press