

Title	Dysregulation of TGF- $\beta$ 1 receptor activation leads to abnormal lung development and emphysema-like phenotype in core fucose-deficient mice
Author(s)	井上, 慎也
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	<a href="http://hdl.handle.net/11094/46143">http://hdl.handle.net/11094/46143</a>
DOI	
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	井上慎也
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 20541 号
学位授与年月日	平成 18 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文名	Dysregulation of TGF- $\beta$ 1 receptor activation leads to abnormal lung development and emphysema-like phenotype in core fucose-deficient mice (コアフコース欠失マウスにおいては、TGF- $\beta$ 1 受容体の活性化制御障害により、肺の発育異常が起こり、肺気腫様変化を来す。)
論文審査委員	(主査) 教授 谷口 直之 (副査) 教授 中村 敏一 教授 辻本 賀英

## 論文内容の要旨

## 〔 目 的 〕

$\alpha$ 1,6-フコース転移酵素 (Fut8) は、GDP-フコースからフコースをアスパラギン結合型糖鎖の還元末端の *N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) に転移する酵素である。糖タンパク質のコアフコシル化 ( $\alpha$ 1,6-フコシル化) は、哺乳類の組織で広く認められるが、その生理的な意義は明らかではない。今回我々はコアフコースの生理機能を調べるために、Fut8 のノックアウト (-/-) マウスを産生した。

## 〔 方法ならびに成績 〕

マウス 129SvJ のゲノムライブラリーから Fut8 の翻訳開始部位を含む 13.9 kb をクローニングし、ターゲッティングベクターを構築し、ジーンターゲッティングにより、Fut8 のノックアウトマウスを産生した。Fut8 (-/-) マウスでは、コアフコース構造が認められず、Fut8 が唯一のコアフコシル化を担う酵素であることが確認された。Fut8 (-/-) マウスはメンデルの法則に従い、約 1/4 の割合で外観上は健康状態で誕生するが、day3 までにその約 7 割が死亡し、生き残ったものも重篤な成長遅延を呈した。組織病理学的な検索を行うと、Fut8 (-/-) マウスの肺は空気含量が増大し、肺胞道が拡大するなどの気腫様変化を来していた。その程度は成長に伴い顕著になっていた。コンプライアンスを測定すると、Fut8 (-/-) マウスでは上昇がみられ、生理学的にも確認された。また、Fut8 (-/-) マウスでは分時換気量が増加していたが、低酸素状態や高炭酸ガス状態での分時換気量の変化が乏しかった。生化学的な分析を行うと、Fut8 (-/-) マウスの肺では、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP)-2,8,14 の発現に変化はみられなかったが、McolB (ヒトの MMP-1 に相当)、MMP-12,13 の発現が亢進し、MMP-9 の発現も増加していた。逆にエラスチンの発現は低下していた。また、エラスチン染色によって elastic fiber の破碎も認められ、マクロファージのマーカーである CD68 の発現の亢進もみられた。これらのことから、Fut8 (-/-) マウスの肺気腫は肺胞上皮細胞の分化障害だけではなく、肺の破壊や、エラスチンなどの細胞外マトリックス (ECM) プロテインのダウンレギュレーションに大いに関係があると考えられる。これらの変化は、MMP 発現をダウンレギュレートし、ECM プロテイン構成分子を誘導することによって ECM ホメオスタシスを制御する多面的要素である TGF- $\beta$ 1 のシ

グナリングの欠落とも矛盾しなかった。Fut8 (-/-) マウスに TGF- $\beta$ 1 受容体の活性化やシグナリングの著しい制御障害があることは、TGF- $\beta$ 1 バインディングアッセイや Smad2 のリン酸化の解析で確認された。また、Fut8 (-/-) 細胞でみられる、これらの TGF- $\beta$ 1 の障害が、Fut8 を再導入することによりレスキューされた。さらに、Fut8 (-/-) マウスに多量の TGF- $\beta$ 1 を投与すると、肺の、MMP 発現は低下し、Fut8 (-/-) マウスの肺気腫はレスキューされた。

#### [ 総 括 ]

コアフコース欠失マウスにみられる誕生後早期の死亡や著しい成長遅延は、肺気腫だけによるものではなく、TGF- $\beta$ 1 などの受容体を介したシグナリングの制御障害によるものと考えられる。しかし、TGF- $\beta$ 1 受容体のコアフコースの欠失は、発達においても破壊的な進行においても肺気腫の形成にきわめて重要であり、ヒトの肺気腫の原因になり得るかもしれないと考える。

#### 論文審査の結果の要旨

全タンパク質の半数以上には糖鎖が付加されており、糖鎖付加によって初めて機能を持つようになることは決して少なくない。 $\alpha$ 1,6-フコース転移酵素 (Fut8) は、GDP-フコースからフコースをアスパラギン結合型糖鎖の還元末端の *N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) に転移する酵素である。糖タンパク質のコアフコシル化 ( $\alpha$ 1,6-フコシル化) は、哺乳類の組織で広く認められるが、その生理的な意義は明らかではない。今回我々はコアフコースの生理機能を調べるために、Fut8 のノックアウト (-/-) マウスを産生した。マウス 129SvJ のゲノムライブラリーから Fut8 の翻訳開始部位を含む 13.9 kb をクローニングし、ターゲティングベクターを構築し、ジーンターゲティングにより、Fut8 のノックアウトマウスを産生した。Fut8 (-/-) マウスでは、コアフコース構造が認められず、Fut8 が唯一のコアフコシル化を担う酵素であることが確認された。Fut8 (-/-) マウスはメンデルの法則に従い約 1/4 の割合で誕生し、外観上は異常なく誕生するが、day3 までにその約 7 割が死亡し、生き残ったものも重篤な成長遅延を呈した。組織病理学的な検索を行うと、Fut8 (-/-) マウスの肺は空気含量が増大し、肺泡道が拡大するなどの気腫様変化を来していた。その程度は成長に伴い顕著になっていた。コンプライアンスを測定すると Fut8 (-/-) マウスでは上昇がみられ、生理学的にも確認された。また、Fut8 (-/-) マウスでは分時換気量が増加していたが、低酸素状態や高炭酸ガス状態での分時換気量の変化が乏しかった。生化学的な分析を行うと、Fut8 (-/-) マウスの肺では、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP)-2,8,14 の発現に変化はみられなかったが、McolB (ヒトの MMP-1 に相当)、MMP-12,13 の発現が亢進し、MMP-9 の発現も増加していた。逆にエラスチンの発現は低下していた。また、エラスチン染色によって弾性線維の破碎も認められ、マクロファージのマーカーである CD68 の発現の亢進もみられた。これらのことから、Fut8 (-/-) マウスの肺気腫は肺胞上皮細胞の分化障害だけではなく、肺の破壊や、エラスチンなどの細胞外マトリックス (ECM) プロテインのダウンレギュレーションに大いに関係があると考えられる。Fut8 (-/-) マウスにて TGF- $\beta$ 1 がその受容体との結合に障害があることや、シグナリングに障害があることは、TGF- $\beta$ 1 バインディングアッセイや Smad2 のリン酸化の解析で確認された。また、Fut8 (-/-) 細胞でみられる、これらの TGF- $\beta$ 1 の障害が、Fut8 を再導入することにより回復した。さらに、Fut8 (-/-) マウスに多量の TGF- $\beta$ 1 を投与すると、肺の MMP 発現は低下し、Fut8 (-/-) マウスの肺気腫は回復した。コアフコース欠失マウスにみられる誕生後早期の死亡や著しい成長遅延は、肺気腫だけによるものではなく、TGF- $\beta$ 1 などの受容体を介したシグナリングの制御障害によるものと考えられる。しかし、TGF- $\beta$ 1 受容体のコアフコースの欠失は、発達においても破壊的な進行においても肺気腫の形成にきわめて重要であり、ヒトの肺気腫の原因になり得るかもしれないと考える。以上のとおり、糖転移酵素の欠損のために、その targeting タンパクを明らかにし疾患の原因になりうることを解明した初めての研究であり、博士 (医学) の学位授与に値すると考えられる。