OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	The biological significance of core fucose in macrophages
Author(s)	中山, 小太郎純友
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/72298
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（中山　小太郎純友）	
論文題名	The biological significance of core fucose in macrophages （マクロファージにおけるコアフコースの生物学的重要性）

論文内容の要旨

【　背　景　・　目　的　】

フコシル化とはフコースによる糖鎖修飾で，がんや炎症に大きく関わることが知られている（*J. Biochemistry*, 143, 2008)。α-1,6フコース転移酵素（FUT8）によって生合成される*N*型糖鎖の還元末端のフコースをコアフコースと呼ばれ，細胞表面の多くの膜受容体の糖鎖にはコアフコースが付加されている。コアフコースの有無は膜受容体のシグナル伝達を制御し，先行研究では炎症性腸疾患モデルにおいて，T細胞受容体のコアフコースが疾患発症に重要な役割を持つことがわかった（*Gastroenterology*, 150, 2016)。しかしながら，炎症性腸疾患の発症には自然免疫の重要性も知られており，コアフコースと自然免疫系との関連を示す報告はこれまでほとんどない。そこで本研究では，自然免疫を担うマクロファージにおけるコアフコースの生物学的意義を知るため，FUT8欠損（$Fut8^{-/-}$）マウスおよび細胞を用いて，コアフコースの機能を検討した。

【　方　法　・　結　果　】

Ⅰ．　Toll様受容体（TLR; Toll-like receptor）4のリガンドであるリポ多糖（LPS; lipopolysaccharide）で刺激すると，$Fut8^{-/-}$マウスより採取したマクロファージの炎症性サイトカインのmRNA発現レベルが，野生型（$Fut8^{+/+}$）マウスに比して低下傾向であった。また，CRISPR/Cas9 systemを用いて作製したマウスマクロファージ様細胞株 $Fut8^{-/-}$ RAW264.7細胞でも，同じくLPS刺激に対してサイトカイン産生は低下した。これらは，LPS刺激に対するTLR4のシグナル伝達にコアフコースが重要であることを示す。

Ⅱ．　ウエスタンブロットを用いてTLR4の下流シグナルを解析すると，$Fut8^{-/-}$ RAW264.7細胞でERKおよびAktのリン酸化が抑制されていることがわかった。しかしながら，フローサイトメトリーでの解析では，TLR4自体の発現低下は認めなかった。一方，TLR4と共受容体として作用するCD14の遺伝子発現および細胞表面での発現量が$Fut8^{-/-}$ RAW264.7細胞で著しく低下していた。CD14の影響を調べるため，同じくCD14を必要とするTLR2を刺激すると，$Fut8^{+/+}$ RAW264.7細胞に比して$Fut8^{-/-}$ RAW264.7細胞で炎症性サイトカインの発現低下が見られた。以上の結果は，マクロファージにおけるコアフコースの欠損がCD14依存性のTLRシグナルを減弱させることを示唆している。

Ⅲ．　主に自然免疫系を惹起するデキストラン硫酸ナトリウム（DSS）腸炎マウスモデルを用いて，コアフコースの影響を検討した。腸粘膜のDSS感受性の影響を除くため，$Fut8^{+/+}$ マウスに，$Fut8^{+/+}$ および $Fut8^{-/-}$ 骨髄細胞を移植して解析したところ，組織学的には差が見られなかったものの$Fut8^{-/-}$ 骨髄細胞移植マウスで体重減少の抑制が見られた。また，腸組織のサイトカインmRNAレベルも低下傾向であった。

【　考　察　】

本研究では，コアフコースとマクロファージのTLR4およびTLR2シグナルの関連を明らかにした。最近，コアフコースがマウス繊維芽細胞におけるCD14依存性のTLR4/MD2複合体エンドサイトーシスにおいて重要な役割を担うことが報告されている（*Glycobiology*, 27, 2017)。本論文の実験結果では，非刺激状態の$Fut8^{-/-}$ RAW264.7細胞でCD14の発現が，mRNAレベルで低下していた。このメカニズムは明らかにできなかったが，肝クッパー細胞でSTAT3シグナルがCD14発現を増強することが報告されているため（*Cell Metab.*,16, 2012)，RAW264.7細胞におけるEGF受容体の

コアフコース欠損が，STAT3を介してCD14発現を減弱させているのではないかと推察している。先行研究で，*Fut8*$^{+/+}$マウスおよび *Fut8*$^{-/-}$マウスのDSS腸炎モデルでは，腸管炎症レベルと体重減少に差がないと報告されている（*Gastroenterology*, 143, 2016)。これに対して，本論文で示した骨髄移植モデルでマウスの体重減少が見られたことは，骨髄から分化した免疫細胞のコアフコースの有無が，より強く腸炎発症に関与しているのではないかと考えている。

【　総　括　】

Fut8$^{-/-}$ マウスおよび細胞を用いた検討で，コアフコースがマウスのマクロファージにおけるCD14依存性TLR4およびTLR2シグナル伝達に必須であることを示した。本研究では，マクロファージを用いて，自然免疫におけるコアフコースの重要性を初めて証明した。

様式７

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　中山　小太郎純友　）		
	（職）	氏　名
論文審査担当者	主査　教授	三善　英知
	副査　教授	山本　浩文
	副査　教授	尾路　祐介

論文審査の結果の要旨

本研究は，マクロファージとコアフコースの関係性を検討した，糖鎖生物学の基礎的研究である。マクロファージにおける論文の概要は以下の通りである。

フコシル化とはフコースによる糖鎖修飾で，がんや炎症に大きく関わることが知られている。α-1,6フコース転移酵素（FUT8）によって生合成されるN型糖鎖の還元末端のフコースをコアフコースと呼ばれ，細胞表面の多くの膜受容体の糖鎖にはコアフコースが付加されている。コアフコースの有無は膜受容体のシグナル伝達を制御し，先行研究では炎症性腸疾患モデルにおいて，T細胞受容体のコアフコースが疾患発症に重要な役割を持つことがわかった。しかしながら，炎症性腸疾患の発症には自然免疫の重要性も知られており，コアフコースと自然免疫系との関連を示す報告はこれまでほとんどない。本研究では，自然免疫を担うマクロファージにおけるコアフコースの生物学的意義を知るため，FUT8欠損（*Fut8*$^{-/-}$）マウスおよび細胞を用いて，コアフコースの機能を検討した。

Ⅰ．Toll様受容体（TLR; Toll-like receptor）4のリガンドであるリポ多糖（LPS; lipopolysaccharide）で刺激すると，*Fut8*$^{-/-}$マウスより採取したマクロファージの炎症性サイトカインのmRNA発現レベルが，野生型（*FUT8*$^{+/+}$）マウスに比して低下傾向であった。また，CRISPR/Cas9 systemを用いて作製したマウスマクロファージ様細胞株*Fut8*$^{-/-}$ RAW264.7細胞でも，同じくLPS刺激に対してサイトカイン産生は低下した。これらは，TLRのシグナル伝達にコアフコースが重要であることを示す。

Ⅱ．　TLR4の下流シグナルを解析すると，*Fut8*$^{-/-}$ RAW264.7細胞でERKおよびAktのリン酸化が抑制されていることがわかった。そのメカニズムを解析した結果，TLR4自体の発現低下は認めなかったが，TLR4と共受容体として作用するCD14の遺伝子発現が*Fut8*$^{-/-}$ RAW264.7細胞で著しく低下していた。同じくCD14を必要とするTLR2のシグナルも*Fut8*$^{-/-}$ RAW264.7細胞で低下していた。以上の結果は，マクロファージにおけるコアフコースの欠損がCD14依存性のTLRシグナルを減弱させることを示唆している。

Ⅲ．主に自然免疫系を惹起するデキストラン硫酸ナトリウム（DSS）腸炎マウスモデルを用いて，コアフコースの影響を検討した。腸粘膜のDSS感受性の影響を除くため，*Fut8*$^{+/+}$マウスに，*Fut8*$^{+/+}$および*Fut8*$^{-/-}$骨髄細胞を移植して解析したところ，組織学的には差が見られなかったものの*Fut8*$^{-/-}$骨髄細胞移植マウスで体重減少の抑制が見られた。また，腸粘膜のサイトカインmRNAレベルも低下傾向であった。

Fut8$^{-/-}$マウスおよび細胞を用いた検討で，コアフコースがマクロファージにおけるCD14依存性TLR4およびTLR2シグナル伝達に必須であることを明らかにした。本研究では，マクロファージを用いて，自然免疫におけるコアフコースの重要性を初めて証明した。　以上のように本研究の科学的価値は高く，学位授与に値する内容であると認める。