

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15064

研究課題名(和文) Notchシグナルとヘキソサミン経路を介した血液脳関門の制御

研究課題名(英文) Roles of Notch signaling and hexosamine pathway on regulation of blood brain barrier

研究代表者

岡島 徹也 (OKAJIMA, Tetsuya)

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：20420383

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：細胞外O-GlcNAcはO-GlcNAc転移酵素EOGTにより触媒され、EOGTによるNotch受容体のO-GlcNAc修飾がDLL4を介したNotchシグナルを制御する。本研究では、Notchシグナル精密制御の血液脳関門に代表される血管バリア機能における役割を検討した。Eogt欠損マウスの解析より、ビオチン誘導体の血管外漏出とフィブロネクチンの沈着が認められた。また、血管内皮特異的Eogt欠損マウスでも同様な結果が得られた。N-カドヘリンに加えて、タイトジャンクション構成因子の発現低下が認められ、EOGT依存的なNotchシグナルを介する血管バリア機能の新たな制御機構の存在が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Notch receptors are modified with unique post-translational modifications on epidermal growth (EGF)-like repeats. Previous studies elucidated the presence of O-GlcNAc modification and O-GlcNAc transferase, EOGT. O-GlcNAc modification by EOGT regulates DLL4-mediated Notch1 activation. In this study, we investigated roles of O-GlcNAc-mediated Notch regulation on integrity of blood vessels, which is pivotal for blood brain barrier. In Eogt-deficient mice, extravasation of biotin derivatives and deposition of fibrinogen were detected. Similar phenotype was observed in endothelial deletion of EOGT. In addition to N-cadherin, expression of components of tight junction were decreased, suggesting that EOGT-dependent Notch signaling represents a novel mechanism for regulation of blood vessels integrity.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：Notch O-GlcNAc 血管integrity

1. 研究開始当初の背景

Notch シグナルは、細胞間の相互作用を制御する主要なシグナル伝達経路の1つであり、発生プロセスを制御する重要な経路である。一方で、成体においても Notch シグナルは、恒常性維持に関与すると考えられており、例えば、虚血後の血管新生に Notch シグナルが関与することが報告された。その中で、Notch シグナル強度の微妙な調節機構が、血管系の恒常性維持機構に重要な役割を果たすことが示唆されたが、調節機構の詳細は、これからの解析が待たれる状況であった。

成体における Notch シグナルの調節機構の1つとして、研究代表者はヘキサミン合成経路によるグルコース代謝を見出した。細胞外環境の栄養状態に反映して、細胞内の UDP-GlcNAc プールが制御されるが、UDP-GlcNAc の量的変化は、タンパク質のセリン・スレオニン残基の O-GlcNAc 修飾レベルの変化に反映される。その結果、タンパク質機能が調節され、細胞機能が制御される。O-GlcNAc は、その発見以来、細胞内に特異的な翻訳後修飾とされていた。しかしながら、最近、研究代表者の研究グループが、O-GlcNAc 転移酵素 EOGT による O-GlcNAc による糖修飾が、細胞外環境にも存在することを報告した (堺谷ら *Nat. Commun.* 2011)。さらに、Notch 受容体の細胞外 O-GlcNAc がヘキサミン合成経路により制御を受け、Notch シグナル制御に関与することを見出した。これらの研究より、ヘキサミン経路を介した Notch 受容体の O-GlcNAc 修飾が Notch シグナル制御に関与する可能性が示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、*Eogt* 変異マウスにおける脳血管系の恒常性維持機構の異常を明らかにすることで、作用機構の分子メカニズムに基づく血液脳関門の制御に道筋をつけることを目的とした。

3. 研究の方法

血管内皮細胞特異的に *Eogt* 変異を導入するために、Tie2-Cre マウスと *Eogt^{flxed}* マウスと交配させ、血管内皮特異的 *Eogt* 変異マウス (*Tie2-Cre Eogt^{flxed}*) を作出した。*Eogt* 遺伝子発現の消失は、in situ ハイブリダイゼーションにより確認した。脳血管内皮細胞における遺伝子発現の解析には、CD31 抗体を用いて血管内皮細胞を含む血管断片を単離後、定量的 RT-PCR にて定量した。脳血管の integrity の解析には、Sulfo-NHS-LC-biotin を灌流後、作成した切片をアビジン-CF488A により染色した。もしくは、エンバンスブルーの灌流実験を行い、その自家蛍光を検出した。血管の染色には、Isolectin B4 (IB4) を用いた、レクチン染色を行なった。

4. 研究成果

野生型マウスと *Eogt* 欠損マウスから脳血管内皮細胞を含む血管断片を単離し、定量的 RT-PCR により、Notch シグナル関連遺伝子の遺伝子発現を解析した。4 種類の NOTCH 受容体 (NOTCH1-4) と JAGGED1 (JAG1) の遺伝子発現には変化が認められなかったのに対して、NOTCH 受容体リガンドの1つである Delta-like 4 (DLL4) の遺伝子発現の低下が検出されたことから、Notch シグナルの低下との因果関係が確認できた。さらに、HES1 や HEY1 などの Notch シグナルの標的遺伝子の発現減少も認められた。さらに、これまでに Notch シグナルによる制御が報告されている N-カドヘリンの発現低下も認められた。これらの結果より、EOGT による NOTCH 受容体の O-GlcNAc 修飾は、脳血管内皮細胞における Notch シグナルの活性化に寄与することが明らかになった (図 1)。

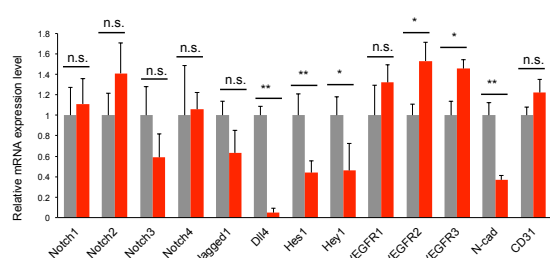


図1 P15の *Eogt* 変異マウスにおける脳血管内皮細胞における遺伝子発現変化 コントロール (グレイ) に比べて *Eogt* 変異体 (赤) では、*Dll4* や *Hes1*、*Hey1* の発現レベルの低下が認められる。

EOGTの血管バリア機能における役割を明らかにするために、生後15日目 (P15) の *Eogt* ホモ欠損 (*Eogt*^{-/-}) マウスにエバンスブルーの灌流を行い、血管の integrity を解析した。*Eogt*^{-/-}マウスでは、エバンスブルーの脳実質への漏出が認められ、血管バリア機能の異常が示唆された。

さらに、定量的な解析のために、Sulfo-NHS-LC-biotin を灌流後、網膜血管におけるトレーサーの漏出を検証した。*Eogt*^{-/-}マウスと、*Rbpj* ヘテロ欠損マウス、*Notch1* ヘテロ欠損マウスにおいて、血管外へのトレーサーの漏出が認められた。また、フィブリノーゲンの血管への沈着が認められた (図2)。

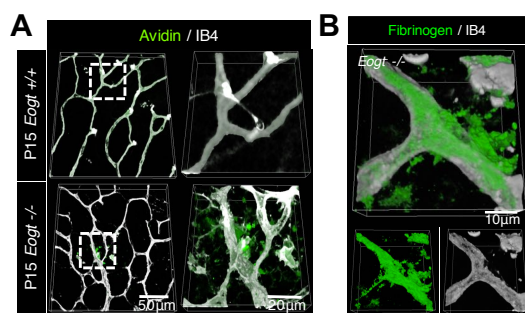


図2 *Eogt* 変異マウスにおける血管バリア機能の異常 A. *Eogt* 変異マウスにおけるビオチン誘導体の血管外への漏出。アビジン (緑)、IB4 (白) を示す。 B. フィブリノーゲンの血管壁への沈着と血管外への漏出。フィブリノーゲン (緑)、IB4 (白) を示す。

次に、*Rbpj* ヘテロもしくは、*Notch1* ヘテロのバックグラウンドで *Eogt* を欠損させた2重変異マウスを作成した。これらのマウスにおいては、*Rbpj* や *Notch1* 単独の変異マウスと比較して、表現型が増強した。このように、EOGTと各種Notchシグナル構成因子との間で、遺伝学的相互作用が認められたことから、EOGTの血管 integrity における役割には、

Notchシグナルが関与することが明らかになった。

さらに、血管内皮特異的な *Eogt* 欠損マウスを用いて同様な解析を行なった。*Eogt*^{-/-}マウス同様に、トレーサーの血管外漏出が認められたことから、血管内皮細胞におけるEOGT発現が、血管バリア機能に必要であることが明らかになった (図3)。

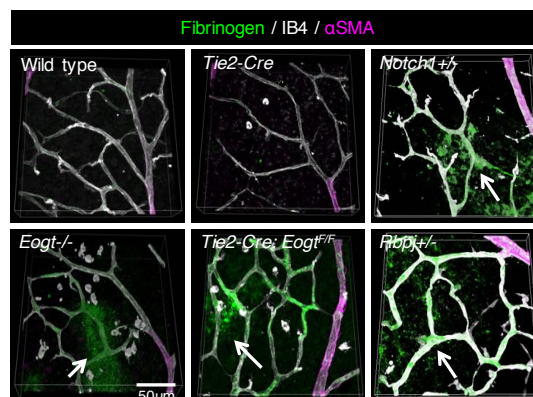


図3 各種 Notch シグナル関連遺伝子の変異マウスにおける血管バリア機能の異常 フィブリノーゲン (緑)、αSMA (赤)、IB4 (白) をしめす。

タイトジャンクション形成におけるEOGTの役割を解析するために、OccludinとClaudin5の遺伝子発現の解析を行なった。RT-PCRの結果、脳血管内皮において、Occludinの発現レベルは変化しないものの、Claudin5の発現の低下が観察された。Claudin5のプロモーター解析からは、RBPJの結合予想部位は存在しなかった。従って、Notchシグナルで制御される転写因子などによる間接的な制御が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

1) Sawaguchi S, Varshney S, Ogawa M, Sakaidani Y, Yagi H, Takeshita K, Murohara T, Kato K, Sundaram S, Stanley P and Okajima T. O-GlcNAc on NOTCH1 EGF Repeats Regulates Ligand-Induced Notch Signaling and Vascular Development in Mammals. *eLife* 6: e24419. (2017) doi: 10.7554/eLife.24419 査読有

2) Ogawa M, Sawaguchi S, Kamemura K, Okajima T. Intracellular and extracellular O-linked N-acetylglucosamine in the nervous system. *Exp. Neurol.* 274:166-174 (2015) 査読有

3) Ogawa M, Sawaguchi S, Furukawa K, Okajima T. N-acetylglucosamine modification in the lumen of the endoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta. Gen. Subj.* 1850:1319-1324 (2015) 査読有

[学会発表] (計12件)

1) 小川光貴、古川鋼一、岡島徹也. 新しい細胞外 O-GlcNAc 修飾の分子機能 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) 2017 年

2) 平泉 光佑、澤口 翔伍、岡島 徹也. 脳血管内皮細胞分化における Notch 受容体 O-GlcNAc 修飾の役割 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) 2017 年

3) 澤口 翔伍、小川 光貴、矢木 宏和、加藤 晃一、岡島 徹也. 細胞外 O-GlcNAc の修飾に関わる EOGT 変異マウスの表現型解析 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) 2017 年

4) 張 璞、大川 裕樹、加藤 彰、小峯 起、百田 洋之、Robiul Bhuiyan、大海 雄介、古川 圭子、若林 俊彦、岡島 徹也、山中 宏二、古川 鋼一 ガングリオンド GD3 によるグリオーマの腫瘍微小環境の制御機構 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) 2017 年

5) 澤口翔伍、小川光貴、矢木宏和、加藤晃一、岡島徹也. Extracellular O-GlcNAc regulates Delta-like 4 mediated Notch signaling and vascular development in mammals. 第 89 回日本生化学会大会 2016 年

6) 岡島徹也、小川光貴、澤口翔伍 細胞外 O-GlcNAc が制御する Notch 受容体リガンド相互作用 日本糖質学会年会 2016 年 09 月 01 日~03 日 高知市文化プラザ かるぽーと (高知県高知市)

7) Mitsutaka Ogawa, Shogo Sawaguchi, Pawel Bieniasz-Krzywiec, Hirokazu Yagi, Koichi Kato, Jiro Usukura, Koichi Furukawa, Tetsuya Okajima. Biological roles of extracellular O-GlcNAc in Notch signaling, vascular development, and blood retinal barrier maintenance 生化学会中部支部例会シンポジウム 2015 年 05 月 25 日 信州大学 (長野県松本市)

8) Mitsutaka Ogawa, Shogo Sawaguchi, Pawel Bieniasz-Krzywiec, Hirokazu Yagi, Koichi Kato, Jiro Usukura, Koichi Furukawa, Tetsuya Okajima. Biological roles of extracellular O-GlcNAc in Notch signaling, vascular development, and blood brain barrier maintenance. 第 38 回日本神経科学大会 2015 年 07 月 28 日~31 日 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)

9) 小川光貴、澤口翔伍、Bieniasz-krzywiec Pawl, 矢木宏和、加藤晃一、臼倉治郎、古川鋼一、岡島徹也. Extracellular O-GlcNAc modification regulates Notch signaling and blood0retina barrier maintenance. BMB2015 2015 年 12 月 01 日~04 日 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)

10) Mitsutaka Ogawa, Pawel Bieniasz-Krzywiec, Hirokazu Yagi, Koichi Kato, Jiro Usukura, Koichi Furukawa, Tetsuya Okajima. Analysis of the biological roles of extracellular O-GlcNAc using EOGT-deficient mice. Society for Glycobiology 2015 Annual Meeting. 2015 年 12 月 01 日~04 日. サンフランシスコ (アメリカ)

11) Shogo Sawaguchi, Mitsutaka Ogawa, Hirokazu Yagi, Koichi Kato, Jiro Usukura, Koichi Furukawa, and Tetsuya Okajima. Phenotypic analysis of mice mutant for EOGT involved in extracellular O-GlcNAc modification. BMB2015 2015 年 12 月 01 日~04 日 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)

12) 岡島徹也、澤口翔伍、古川鋼一、小川光貴 細胞外 O-GlcNAc : 生物学と疾患との関連 BMB2015 2015 年 12 月 01 日~04 日 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)

[図書] (計1件)

1) 谷口直之、顧 建国、中田 博、岡島徹也、古川鋼一、小川光貴、秋元義弘、木 下タロウ、北川裕之、菅原一幸、山本一夫、山田修平、宮城妙子 北島 健、木 全弘治、松野健治、岡 昌吾、深瀬浩一、門松健治、川島博人、鈴木 匡、加藤 晃一 宮本寛子ら エヌ・ディー・エス糖鎖の新機能開発・応用ハンドブックー創薬・医療から食品開発まで (2015) 678 (23-26)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

<https://www.med.nagoya->

u. ac. jp/medical_J/laboratory/basic-
med/bio-chem/mol-cellular/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡島 徹也 (OKAJIMA Tetsuya)
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：20420383

(2) 研究分担者

小川 光貴 (OGAWA Mitsutaka)
名古屋大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：70727429

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()