

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：33919

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06670

研究課題名(和文)ヘパラン硫酸の生合成に関与するEXTL3の脳およびT細胞における新規機能の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the novel functions of EXTL3 involved in the biosynthesis of heparan sulfate in brains and T cells

研究代表者

山田 修平 (Yamada, Shuhei)

名城大学・薬学部・教授

研究者番号：70240017

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ヘパラン硫酸生合成酵素の1つであるEXTL3の生物学的機能を明らかにしようとしている。脳のグルタミン酸作動性神経特異的なExtl3ノックアウトマウスの作製に成功した。外見上、行動上の特徴として、これまでのところ、目立った異常は検出されていない。より高次の機能への影響があるか、他の酵素による補填があるのかもしれない。T細胞特異的なExtl3ノックアウトマウスの作製にも成功した。脾臓を用いてT細胞の分化の度合いを調べたところ、未分化の傾向があることを見出した。EXTL3変異患者由来の各グリコサミノグリカン鎖の含有量、二糖組成を調べた。患者のヘパラン硫酸は、健康人のものと比較して減少していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヘパラン硫酸は生体内に普遍的に存在し、細胞の増殖や分化など、非常に基本的な機能に関わっている。ヘパラン硫酸を欠損すると致死となるため、極めて重要な分子である。したがって、ヘパラン硫酸の各臓器における役割の解明は、科学の発展に大いに貢献することができるため、本研究の学術的な意義は極めて大きい。また、EXTL3を欠損した遺伝病の患者の報告例はまだ少ないが、今後さらに見つかることが予想される。本研究は、そのような難治性の希少疾患の発症メカニズムの解明や治療法の開発につながる可能性があり、社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is elucidation of the biological roles of EXTL3, a biosynthetic enzyme of heparan sulfate. Brain glutamatergic nerve-specific Extl3-deficient mice were successfully generated and their behavioral as well as physical phenotypes were investigated. So far, typical abnormalities have not been observed. It may be involved in the higher functions in brain. Other enzymes may compensate the enzymatic activity of Extl3. T cell-specific Extl3-deficient mice were also successfully generated. Using the splenish cells, differentiation of T cells was examined, and it turned out to tend to be immature. Cells of a patient with mutation in EXTL3 were cultured and the amount as well as the disaccharide compositions of glycosaminoglycans from them were examined. Heparan sulfate from the patient was reduced compared with that from a healthy subject.

研究分野：生物系薬学

キーワード：ヘパラン硫酸 EXTL3 ノックアウトマウス 脳 T細胞

1. 研究開始当初の背景

がん抑制遺伝子である EXT (extosin) のファミリー分子である extosin-like 3 (EXTL3) 遺伝子にコードされるタンパク質は、ヘパラン硫酸の生合成における鍵酵素の1つである。ヘパラン硫酸は動物の細胞表面や細胞外マトリックスに普遍的に存在する硫酸化多糖で、細胞増殖因子、サイトカイン、モルフォジェンなどの細胞内へのシグナル伝達を調節し、発生や細胞増殖等、生命の基本的な機能において、重要な役割を果たしている。マウスにおいてヘパラン硫酸を先天的に欠損させると、胎生 8.5 日目に致死となる(Lin et al., Dev. Biol., 2000)。ヘパラン硫酸の糖鎖骨格を合成する酵素は EXT1 と EXT2 のヘテロダイマーであり、これらの欠損が原因で遺伝性多発性外骨腫を発症することが知られている。EXTL3 の欠損が遺伝性多発性外骨腫を発症するという報告はないものの、EXTL3 もヘパラン硫酸生合成酵素の一つであり、マウスにおいては、その欠損によって胎生致死となる。つまり、EXTL3 もヘパラン硫酸の生合成に不可欠であることが示唆されている。しかし、致死となる時期は EXT1 や EXT2 より若干遅く(胎生 9 日目) 詳細な違いは不明である。また EXTL3 は、膵臓の β 細胞の再生に関わる因子として発見された REG1 の受容体としての機能が推定されている(Kobayashi et al., J. Biol. Chem., 2000)。ヘパラン硫酸合成のための糖転移酵素として機能するのであれば、ゴルジ体に存在するべきであるが、EXTL3 はゴルジ体のみならず、細胞表面にも存在している。また、REG1 は様々な臓器で合成される分子であるため、近年、REG1 の他の機能も注目されている。例えば、分化、炎症、がん化などと REG1 との関連が報告され、特に、脳神経系において、神経突起の伸長を促進する活性があり(Acquatella-Tran Van Ba et al., J. Biol. Chem., 2012)。この機能発現のためにも細胞表面の EXTL3 が受容体として機能していることが明らかになっている。さらに、最近、EXTL3 の先天的欠損による遺伝病が連続して見つかри、EXTL3 の欠損によって、骨異形成症や神経-免疫-骨格異形成症(neuro-immuno-skeletal dysplasia)を発症することが報告されている(Guo et al., J. Hum. Genet., 2017、Volpi et al., J. Exp. Med., 2017、Oud et al., Am. J. Hum. Genet., 2017)。これらの疾患がヘパラン硫酸多糖の合成不全を原因とするのか、EXTL3 のもつ他の機能とも関与しているのか不明である。この解明が本研究の長期的目標であるが、まずは、脳および血球系(T 細胞) において、EXTL3 の果たす役割を詳細に調べることを本研究課題の目標とする。

2. 研究の目的

EXTL3 のもつ生物学的機能を明らかにすることが目的である。EXTL3 はヘパラン硫酸生合成酵素の1つと考えられているが、同じくヘパラン硫酸の糖鎖骨格の形成に関わる EXT1/EXT2 とは若干性質が異なる。つまり、細胞内での局在部位やノックアウトマウスの致死となる時期、ヘテロ接合体での表現型、生合成過程での硫酸化修飾に与える影響などが異なっている。そこで、特定の臓器(脳と T 細胞) に注目し、これらの臓器での特異的な欠損を利用することにより、EXTL3 の果たす生物学的意義を解明しようとしている。

3. 研究の方法

【実験 1】脳での EXTL3 の機能解析：脳での EXTL3 の機能を調べるため、大脳や海馬に多く存在することが知られている興奮性グルタミン酸神経に特異的に発現している CaMKII α のプロモーターの下流に Cre 遺伝子を導入したマウスと、EXTL3 の Flox マウスを交配することにより、これらの神経細胞で特異的に EXTL3 を欠損したマウスを作製する。

得られたマウスの外見上の特徴、行動上の特徴を観察する。また、異なる発生段階で脳を摘出し、脳をさらに細かく分け、各部位でのヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸の構造を解析し、ヘテロあるいは野生型の同腹子と比較する。具体的には、各グリコサミノグリカン鎖の含有量、二糖組成、鎖長を調べる。EXTL3 の欠損により、ヘパラン硫酸の生合成が 4 番目までの糖で停止している可能性が考えられるので、組織からコアタンパク質との結合部分のオリゴ糖を単離し、構造を調べる。また、発生段階の異なる脳を用いて、脳内でのヘパラン硫酸と EXTL3 の分布を、各成分に特異的な抗体を利用して免疫組織染色により調べ、大脳や海馬の発生や機能への影響を探索する。マウスの行動についても、Y-迷路試験、新奇物体認識試験等を実施し、短期および物体認知記憶などの脳機能を調べる。

【実験 2】血球系 (T 細胞) での EXTL3 の機能解析：血球系 (T 細胞) で特異的に EXTL3 をノックアウトしたマウスを作製する。得られたマウスの外見上の特徴、行動上の特徴を観察する。また、血球を採取し、【実験 1】と同様の方法でヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸の構造を解析し、ヘテロあるいは野生型の同腹子と比較する。なお、コンドロイチン硫酸は、ヘパラン硫酸の生合成の変化によって、その合成が影響を受ける場合が多いことがよく知られている。

【実験 3】EXTL3 変異患者由来のヘパラン硫酸の解析：EXTL3 変異患者由来の細胞を培養し、各グリコサミノグリカン鎖を精製し、その含有量、二糖組成、鎖長を調べる。EXTL3 の欠損により、ヘパラン硫酸の合成がどの段階で停止しているのかを明らかにし、ヘパラン硫酸の欠損の程度を調べることによって、疾患発症における EXTL3 の影響を検証する。

4 . 研究成果

EXTL3 のもつ生物学的機能を明らかにするため、特定の臓器 (脳と T 細胞) に注目し、これらの臓器での特異的な欠損を利用することにより、EXTL3 の果たす生物学的意義を解明しようとしている。

脳のグルタミン酸作動性神経に特異的に Extl3 を欠損させたコンディショナルノックアウトマウスの作製に成功した。このマウスを用いて、外見上の特徴の観察、行動上の特徴の観察を行った。行動観察に関しては、オープンフィールドテスト、Y 迷路試験、複数の試験を行った。オープンフィールドテストは複数回繰り返し行っているが、これまでのところ、同腹子の野生型マウスと比較して、目立った異常は検出されていない。外見上の特徴も特に目立ったものは、今のところ見出されていない。Y 迷路試験など認知機能に関する試験でも、目立った異常は検出されていない。より高次の機能への影響があるか、他の酵素による補填があるのかもしれない。新奇物体認識試験等を実施中であり、短期および物体認知記憶などの脳機能を調べている。今後も引き続き様々な観察を続ける予定である。これまでの研究の途中経過は国内の学会で発表している。

T 細胞に特異的に Extl3 を欠損させたコンディショナルノックアウトマウスの作製に成功した。このマウスを用いて、外見上の特徴を観察、脾臓を用いた T 細胞の分化・成熟の度合いを調べた。これまでのところ、外見上の特徴は特に目立ったものはなかった。FACS での解析において、T 細胞の成熟度に若干未分化の傾向があることを見出したので、再現性の確認と詳細な解析を続けている。これらの研究成果の一部は、国内学会において発表した。

EXTL3 変異患者由来の細胞を培養し、各グリコサミノグリカン鎖を精製し、その含有量、二糖組成を調べた。患者の細胞に由来するヘパラン硫酸は、その含有量が、健常人のものと比較して減少していた。細胞表面の HS を FACS で解析し、発現量の減少を確認している。

HS 鎖の本数の解析も行い、減少していることを見出している。鎖長もゲル濾過クロマトグラフィーで調べ、短縮化の傾向が見られた。引き続き、詳細な解析を行っている。これらの研究成果の一部は、国内および国際学会において、発表した。

また、これら EXTL3 の研究に関して、国際学会に基調講演の演者として招待され、発表した。ただし実際には渡航できなかったため、ZOOM で講演した。さらに、EXTL3 についてまとめた総説論文を、単著で、国際学術雑誌に発表した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Shuhei Yamada	4. 巻 25
2. 論文標題 Specific functions of Exostosin-like 3 (EXTL3) gene products	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cellular & Molecular Biology Letters	6. 最初と最後の頁 39
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s11658-020-00231-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Shuhei Yamada, Shuji Mizumoto	4. 巻 32
2. 論文標題 Congenital disorders caused by defects in catabolism of glycosaminoglycans	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Trends in Glycoscience and Glycotechnology	6. 最初と最後の頁 E127 - E133
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4052/tigg.1968.1E	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Shuji Mizumoto, Shuhei Yamada	4. 巻 32
2. 論文標題 Congenital Disorders Caused by Defects in Anabolism of Glycosaminoglycans	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Trends in Glycoscience and Glycotechnology	6. 最初と最後の頁 E45, E51
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4052/tigg.1759.1E	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Shuhei Yamada	4. 巻 31
2. 論文標題 Importance of the Fine Structure of Glycosaminoglycans	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Trends in Glycoscience and Glycotechnology	6. 最初と最後の頁 SE44, SE45
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4052/tigg.1920.2SE	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Iwao Takahashi, Shuhei Yamada, Koji Nata	4. 巻 470
2. 論文標題 Effects of heparan sulfate proteoglycan syndecan-4 on the insulin secretory response in a mouse pancreatic -cell line, MIN6	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mol. Cell. Endocrinol.	6. 最初と最後の頁 142 - 150
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mce.2017.10.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計13件(うち招待講演 2件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 樋口直美、三宅晃代、水本秀二、山下匡、菅原明、山田修平
2. 発表標題 免疫細胞(T細胞)特異的EXTL3欠損マウスの解析
3. 学会等名 第52回日本結合組織学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shuhei Yamada
2. 発表標題 Congenital disorders caused by defects in biosynthesis of glycosaminoglycans
3. 学会等名 Pan Pacific Connective Tissue Societies Symposium 2020 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大橋里帆、水本秀二、山下匡、菅原明、山田修平
2. 発表標題 Cre/LoxPシステムを利用したT細胞特異的Extl3欠損マウスの作製とその解析
3. 学会等名 糖鎖科学中部拠点 第16回若手の力 フォーラム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山田夏実, 水本秀二, 衣斐大祐, 菅原明, 山田 修平
2. 発表標題 脳のグルタミン酸作動性神経特異的 EXTL3 欠損マウスの解析
3. 学会等名 第38回日本糖質学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三宅晃代, 水本秀二, 山下匡, 菅原明, 山田修平
2. 発表標題 免疫細胞(T細胞)特異的 EXTL3 欠損マウスの解析
3. 学会等名 第38回日本糖質学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤亨, 水本秀二, 大橋博文, 逆井悦子, Nursel H Elcioglu, 三宅紀子, 松本直通, 池川 志郎, 山田 修平
2. 発表標題 脊椎骨端骨幹端異形成症患者のリンパ芽球様細胞株の産生するヘパラン硫酸の解析
3. 学会等名 第38回日本糖質学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toru Sato, Shuji Mizumoto, Hirofumi Ohashi, Etsuko Sakasai, Nursel H Elcioglu, Noriko Miyake, Naomichi Matsumoto, Shiro Ikegawa, Shuhei Yamada
2. 発表標題 Analysis of heparan sulfate produced by lymphoblastoid cell lines in patients with spondylo-epi-metaphyseal dysplasia
3. 学会等名 11th international Conference on Proteoglyans (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Long Guo, Nursel H Elcioglu, Shuji Mizumoto, Zheng Wang, Bilge Noyan, Hatice M Albayrak, Shuhei Yamada, Naomichi Matsumoto, Noriko Miyake, Gen Nishimura, Shiro Ikegawa
2. 発表標題 ヘパラン硫酸生成酵素であるEXTL3の変異は免疫異常を伴う新たなタイプの脊椎骨端骨幹端異形成症を引き起こす
3. 学会等名 日本生化学会中部支部第82回例会・シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 篠田はるか、持永磨奈美、伊藤有沙、水本秀二、逆井悦子、大橋博文、山田修平
2. 発表標題 リンパ芽球様細胞株の産生するグリコサミノグリカンの解析
3. 学会等名 第64回日本薬学会東海支部 総会・大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shuhei Yamada, Shuji Mizumoto, Hirofumi Ohashi, Etsuko Sakasai, Nursel H Elcioglu, Noriko Miyake, Naomichi Matsumoto, Daisuke Ibi, Akira Sugawara, Shiro Ikegawa
2. 発表標題 Structural studies on heparan sulfate produced by the lymphoblastoid cell lines prepared from a patient with a mutation in EXTL3 and embryonic cells from Extl3-deficient mice
3. 学会等名 Gordon Research Conference on Proteoglycans 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 水本秀二、Long Guo, Nursel H Elcioglu, Zheng Wang, Bilge Noyan, Hatice M Albayrak, 松本直通、三宅紀子、西村 玄、山田修平、池川志郎
2. 発表標題 免疫異常を伴う脊椎骨端骨幹端異形成症はヘパラン硫酸の生合成を担うEXTL3の変異により引き起こされる
3. 学会等名 第37回日本糖質学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 水本秀二、Long Guo, Nursel H Elcioglu, Zheng Wang, Bilge Noyan, Hatice M Albayrak, 松本直通、三宅紀子、西村 玄、山田修平、池川志郎
2. 発表標題 へパラン硫酸の生合成を担うEXTL3の変異は免疫不全を伴う脊椎骨端骨幹端異形成症を引き起こす
3. 学会等名 糖鎖科学中部拠点 第15回若手のカフォーラム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山田修平
2. 発表標題 グリコサミノグリカン生合成酵素の欠損による遺伝病の研究
3. 学会等名 第28回プロテオグリカンフォーラム（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

名城大学病態生化学研究室 http://www-yaku.meijo-u.ac.jp/Research/Laboratory/pathobio/index.html 名城大学薬学部病態生化学研究室ホームページ http://www-yaku.meijo-u.ac.jp/Research/Laboratory/pathobio/index.html

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