

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19494

研究課題名(和文) 遺伝性脳血管障害に対する新規治療ターゲットの同定と根治的治療の開発

研究課題名(英文) Detection of target to treat patients with CADASIL with existent medicine

研究代表者

植田 明彦 (Ueda, Akihiko)

熊本大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30613525

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：CADASILに特異的な病理所見であるgranular osmiophilic material (GOM)の酵素活性を組織化学染色法で検出する方法を開発した。遺伝子変異により形成される不对のシステイン残基とEGF like domainの分子構造は、アミノ酸化酵素の分子構造と類似していることから、GOMにはアミノ酸化酵素活性があるという仮説を立てた。GOMをアミノ酸化酵素活性染色法により検出する方法を検討した。その結果、GOMを検出するアミノ酸化酵素活性染色法を確立できた。本染色法はGOMの酵素活性の解析やGOMの酵素活性を標的とした候補薬剤の選出に活用できる。

研究成果の概要(英文)：We developed enzymatic histochemistry to detect granular osmiophilic material (GOM) deposits, which are specific pathologic findings of cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL). Structures of mutated Notch3 proteins are similar to those of monoamine oxidase. We hypothesized that GOM deposits may have amine oxidase activity. We performed enzymatic histochemical staining to detect GOM deposits using unfixed frozen sections of skeletal muscles samples obtained from patients with CADASIL. In this study, we revealed that GOM deposits were detected by enzymatic histochemical staining of amine oxidase activity. This method was useful to observe GOM deposits by light microscopy. It may be available to analyze enzymatic activity of GOM deposits and to select existent medicine that inhibits enzymatic activity of GOM deposits.

研究分野：神経内科

キーワード：CADASIL GOM 酵素組織化学染色

1. 研究開始当初の背景

白質脳症を伴う常染色体優性遺伝性脳動脈症 cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL) は片頭痛、脳梗塞、認知症、気分障害をきたす常染色体優性の遺伝性脳血管障害である。遺伝子変異により Notch3 の EGF domain に不對のシステイン残基が形成される。この不對のシステイン残基が病原性に関与しているが、その病態発現のメカニズムは未解明である。

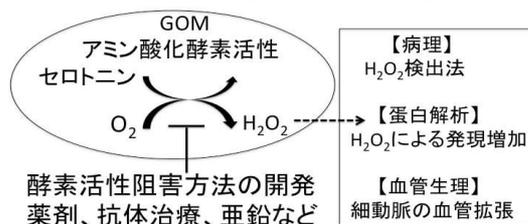
Granular osmiophilic material (GOM) は CADASIL に特異的な病理所見である。電子顕微鏡下で 1 μm 未満の顆粒状物質として、観察される。Notch3 の細胞外ドメインで構成されることや GOM の蓄積量と血管平滑筋細胞の変性が相関することから、GOM に何らかの病原性があると推測されているが、その病原性に関しては解明されていない。

GOM は電子顕微鏡所見であることから、GOM の生化学的性質は未解明であり、GOM の解析は、電子顕微鏡での形態学的解析に留まっている。光学顕微鏡下での観察では、Notch3 細胞外ドメインの免疫染色で顆粒状の陽性像を示す。しかし、GOM の組織化学染色法は明らかにされておらず、免疫染色以外の光学顕微鏡下での観察法は確立されていない。そこで GOM の化学的性質を明らかにするには、GOM の組織化学染色法を開発して、光学顕微鏡下での GOM の観察法を確立する必要がある。

CADASIL の遺伝子変異には hot spots があり、変異により不對のシステイン残基が形成されることがこれまでの遺伝子解析や分子構造解析で明らかにされている。一般に不對のシステイン残基は重金属や脂肪酸など様々な物質と結合する。しかし、CADASIL において、遺伝子変異により形成される不對のシステイン残基に何が結合して、GOM の病原性にどのような役割を果たしているか明らかにされていない。

Notch3 の EGF like domain の蛋白構造や遺伝子変異により形成される不對のシステイン残基がモノアミン酸化酵素の蛋白構造に類似していることに我々は注目した。Notch3 の蓄積物である GOM にアミン酸化酵素活性があり、それが CADASIL での GOM の病原性に関係している可能性を考えた。以上より、GOM の病原性は、GOM にモノアミン酸化酵素様の酵素活性が形成されると仮説を立てた。

変異 Notch3 細胞外ドメインの蓄積 Granular Osmiophilic Material (GOM)



本研究では本仮説を検証するため、既知のアミン酸化酵素活性染色法を改良して、GOM を検出する手法を開発することとした。

2. 研究の目的

1) GOM の酵素活性を検出するアミン酸化酵素染色法を開発して、GOM にアミン酸化酵素活性があることを明らかにすること。

2) CADASIL のモデルマウスを用い、モデルマウスで形成される GOM がアミン酸化酵素活性を示すかを明らかにすること。

3. 研究の方法

1) アミン酸化酵素活性染色法の開発

CADASIL の剖検例 (R133C, R449C) の骨格筋組織を用いて、GOM の組織化学染色法の染色条件を検討した。塩酸トリプタミン 30 mg を 50 ml の PBS に溶解したものを A 液とした。DAB 30 mg とアジ化ナトリウム 65 mg を 50 ml の PBS に溶解したものを B 液とした。

A 液 10 ml + B 液 10 ml + PBS 10 ml に 50 μl の HRP 標識の rabbit 抗体 anti-mouse IgG を混和したものをアミン酸化酵素染色液とした。

Trans-2-Phenylcyclopropylamine (PCPA) 30 mg を 50 ml の PBS に溶解したものを C 液とした。《PCPA はアミン酸化酵素阻害薬》

2) モデル動物の GOM のアミン酸化酵素染色

CADASIL R170C knock-in モデルマウスを用いて、モデルマウスに形成された GOM がアミン酸化酵素活性の染色法で検出できるか検討した。月齢 12 ヶ月の本モデルマウスの全身の各臓器の組織を未固定で急速凍結して、10 μm 厚の切片を作成した。GOM の酵素活性を前述のアミン酸化酵素活性染色法で測定した。GOM の検出法には Notch3 細胞外ドメイン抗体を用いた免疫染色法を用いた。

4. 研究成果

1) アミン酸化酵素染色法の開発

染色時間 3 時間では、標本の染色性を認めなかった。12 時間で骨格筋内の血管が選択的に染色された。しかし、24 時間では背景の染色性が強く、アミン酸化酵素阻害薬を混和した染色液でも、非特異的な染色性を示した。

本非特異的な染色性は DAB の自動酸化や DAB 自体が基質として作用している可能性が考えられたため、A 液の DAB を 30 mg から 5 mg へ減量し、本液を A' 液とした。

A' 液では背景の非特異的な染色性が減少した。A' 液を用いたアミン酸化酵素染色では PCPA を用いると染色性が完全に消失した。

《最終的な染色条件》

A' 液 DAB 5 mg + NaN₃ 65 mg / 50 ml PBS
B 液 塩酸トリプタミン 30 mg / 50 ml PBS
C 液 アミン酸化酵素阻害薬 30 mg / 50 ml PBS

《アミン酸化酵素染色液と染色時間》

A'液 10 ml + B液 10 ml + PBS 10 ml + HRP
50 μl、24時間 37℃ で遮光して染色

本染色液を用いた組織化学染色により、CADASIL 症例の骨格筋の細動脈を評価した。細動脈の血管壁に 1 μm の顆粒状物質が無数に検出された。この顆粒状物質は血管平滑筋細胞の基底膜上に沿って観察され、GOM の光学顕微鏡所見に一致していた。

次に CADASIL 症例の脳組織を用いて、本組織化学染色を行った。脳髄膜の中膜の PAS 陽性の顆粒状変性は Notch3 細胞外ドメインで濃染するが、アミン酸化酵素活性の組織化学染色では全く染色されなかった。一方、脳髄膜の細動脈の肥厚した内膜や皮質下白質の毛細血管ではアミン酸化酵素活性陽性顆粒が観察され、Notch3 の免疫染色像に一致していた。

2) 月齢 12 ヶ月のモデルマウスの骨格筋組織では GOM のごく一部がアミン酸化酵素陽性顆粒として観察されたが、大多数の GOM はアミン酸化酵素染色で検出されなかった。腎では輸入細動脈に強いアミン酸化酵素染色性を示したが、顆粒状物質は検出できなかった。脳組織では、脳実質内動脈がびまん性にアミン酸化酵素染色性を示したが、顆粒状物質は検出できなかった。尾組織では尾骨周囲の細動脈には染色性がなかったが、尾の骨格筋間の細動脈で、一部の血管が本染色で濃染色性を示した。

尾の骨格筋間の細動脈が過形成しており、その血管が本染色液で濃染した。中膜の血管平滑筋細胞への濃染色性に加えて、肥厚した内膜に顆粒状の染色性を認めた。Notch3 の免疫染色では、同血管の中膜および肥厚した内膜に顆粒状の染色性を認めた。

《本検討の問題点と今後の課題》

本研究では光学顕微鏡観察において、GOM の一部がアミン酸化酵素染色法で検出されることを示した。一方、脳髄膜の中膜の PAS 陽性の顆粒状変性はアミン酸化酵素活性を示さなかった。

本検討は光学顕微鏡観察での検討であるため、今後、電子顕微鏡観察でのアミン酸化酵素活性と Notch3 の免疫電顕法による 2 重染色で共局在を確認する必要がある。

GOM のアミン酸化酵素活性の起源は以下の 3 点が考えられる。

- 1) Notch3 の変異部位の翻訳後修飾
- 2) 蓄積した Notch3 自体の性質
- 3) 共存蛋白質の性質

本検討では GOM のアミン酸化酵素活性が、上記の 3 点のいずれに由来するのか解明されていない。

近年、プロテオミクス解析により、GOM に共局在する蛋白質として、TIMP3 やビトロネクチンなどが報告されている。我々の解析に

おいて、TIMP3 に加え、Serum amyloid P component (SAP) が GOM に共局在することが示されている。

今後、共存蛋白質である TIMP3 や SAP、その他の蛋白質との関係と GOM のアミン酸化酵素染色性との関係を明らかにする必要がある。

《本研究の今後の展望》

本染色方法により GOM にアミン酸化酵素活性があることが示された。GOM の内部の詳細な分子構造や共存蛋白質との関係は未解明であるものの、GOM の本酵素活性を標的とした治療戦略を立てることができる。本染色を用いて、既存の薬剤から GOM の酵素活性を阻害する薬剤を選出するために活用でき、分子機構と臨床研究との橋渡しをする解析法として重要であると考えられた。

《参考文献》

新酵素組織化学、小川和男、竹内忠男編集、朝倉書店、1982、東京

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Takashi Ando, Yuji Goto, Kazuo Mano, Akihiko Ueda, Yukio Ando, Ikuko Mizuta, Toshiki Mizuno. CADASIL presenting as acute bilateral multiple subcortical infarcts without a characteristic temporal pole or any external capsule lesions. Internal Med, 査読有、Vol. 55, No. 19, 2016, pp. 2873-2876.
DOI: 10.2169/internalmedicine.55.7123

Akihito Nagatoshi, Mitsuharu Ueda, Akihiko Ueda, Masayoshi Tasaki, Yasuteru Inoue, Yihong Ma, Mayumi Mizukami, Takayuki Kosaka, Takayuki Kawano, Takaaki Ito, Yukio Ando. Serum amyloid P component: a novel potential player in vessel degeneration in CADASIL. J Neurol Sci, 査読有 2017 in press.

〔学会発表〕(計 3 件)

遺伝性脳血管障害 CADASIL の特異的病理所見 GOM の組織化学的検討
植田明彦、植田光晴、永利聡仁、馬翊竝、小阪崇幸、安東由喜雄
第 57 回日本神経病理学会総会学術研究会
Jun 2, 2015, 弘前

Diagnostic value of skin biopsy immunostaining with Notch3 antibody for CADASIL. 植田明彦、植田光晴、永利聡仁、中島誠、平野照之、安東由喜雄
第 57 回日本神経学会学術大会 May 18, 2016, 神戸

当院で診断した CADASIL 症例の遺伝子変異と臨床像の解析：熊本大学における 18 年間の CADASIL の診療経験
植田明彦、植田光晴、永利聡仁、中島誠、平野照之、安東由喜雄
第 41 回日本脳卒中学会総会 April 15, 2016, 札幌

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

植田明彦 (UEDA Akihiko)
熊本大学・大学院生命科学研究部・助教
研究者番号：30613525