

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 11 日現在

機関番号：83903

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22500327

研究課題名（和文） 家族性脳血管性認知症 CADASIL における血管変性メカニズムの解析

研究課題名（英文） Analysis of the vascular degeneration mechanism in familial vascular dementia CADASIL

研究代表者

渡邊 淳（WATANABE ATSUSHI）

独立行政法人 国立長寿医療研究センター

研究者番号：90321843

研究成果の概要（和文）：

家族性脳血管性認知症 CADASIL (cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy) において、これまで変異 Notch3 の重合しやすい特徴が発症機序に関係している可能性を報告した。本研究では、変異 Notch3 を発現する細胞を用い、変異 Notch3 の重合を減少させる低分子化合物のスクリーニングを行った。また、変異型 Notch3 ノックインマウスを用い、変異 Notch3 が引き起こす形態変化や分子の変化を解析した。

研究成果の概要（英文）：

We previously reported that the aggregate-prone property of mutant Notch3 might contribute to a pathogenic mechanism underlying familial vascular dementia CADASIL (cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy). In this study, we searched for low-molecular compounds that decrease the amount of mutant Notch3 aggregates using the mutant Notch3 inducible stable cell lines. Furthermore, we analyzed the morphological and molecular changes by mutant Notch3 using the knock-in mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経解剖学・神経病理学

キーワード：認知症, 脳神経疾患, プロテオーム

1. 研究開始当初の背景

脳血管性認知症はその原因として脳出血や脳梗塞による脳の血流障害などがあげられているが、その詳細な分子メカニズムは全く分かっていない。その中で家族性脳血管性認知症の CADASIL (Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy) は原因遺伝子として Notch3 が同定されているが、いかにして血管平滑筋細胞周辺への Notch3 の蓄積や平滑筋細胞の変性・消失が引き起こされるかについては不明である。これまで、我々はテトラサイクリンで野生型及び変異型 Notch3 を誘導する HEK293 細胞系を作製し、変異 Notch3 による細胞への影響を調べたところ、変異 Notch3 は野生型 Notch3 に比べて重合しやすく、小胞体内にとどまっていることを明らかとした。また、野生型は速やかに分解されるのに対し、変異 Notch3 のターンオーバーは非常に遅いことも判明した。さらに、変異 Notch3 の発現は野生型の発現に比べて、細胞の増殖を低下させた。その上、変異 Notch3 を発現する細胞は、プロテアソーム阻害剤に感受性が高く、細胞死が起こりやすいことが判明した。これらの知見は小胞体内に変異 Notch3 の重合体が長期間とどまることで、細胞の増殖を低下させ、他のストレスに対して脆弱になることを示唆することが考えられた。

2. 研究の目的

脳血管性認知症において原因遺伝子 Notch3 が同定されている家族性脳血管性認知症 CADASIL に着目し、Notch3 が血管の変性にもどのように関わるか検討を行い、血管変性メカニズムの解明を試みる。特に変異 Notch3

の重合しやすい特徴が、CADASIL の発症機序に関係している可能性があるため、変異 Notch3 を発現する細胞さらには変異 Notch3 のノックインマウスを用い、分子レベルでの解明を試みる。

3. 研究の方法

(1) テトラサイクリンで野生型及び変異型 (R133C 及び C185R) Notch3 を誘導する HEK293 細胞系を用い、変異 Notch3 重合体の分解を促進する化合物のスクリーニングを行った。Notch3 発現細胞は各々テトラサイクリンで 24 時間培養した後、各々の細胞はそれぞれ各種低分子化合物及び化合物なし (control) の標準培地で 2 日間培養を行い、Notch3 抗体を用いたウエスタンブロットと免疫細胞化学的解析によって化合物の効果を検討した。

(2) 変異型 Notch3(C225Y)ノックインマウスを作製し、解析に用いた。対照群としては野生型マウスを用いた。1 日齢、1 週齢、2 週齢、8 週齢、12 月齢、18 月齢、24 月齢の各マウスについて、脳内に発現される Notch3 をウエスタンブロット法で検討した。脳小血管を中心とした病理変化の解析には、12 月齢、18 月齢、24 月齢のマウスを用いた。

(3) 1 年齢の野生型及び変異型 Notch3 ノックインマウス脳を用い、それぞれプロテアーゼ阻害剤を含む PBS 中でホモジェナイズし、ガラスビーズカラムを用い微小血管を精製した。集められた血管は RIPA バッファー等で可溶化した。超遠心機を用い可溶性画分と不溶性画分に分け、不溶性画分に関しては、サルコシル、SDS 等の界面活性剤、尿素、ギ酸等を用いさらに可溶化を試みた。遠心機を用い可溶性画分と不溶性画分に分け、可溶化

できたすべての画分は、電気泳動で蛋白質の分離を行い、ゲルを CBB または銀染色による蛋白染色を行い、変異型と野生型で蛋白質の分布に違いがないか網羅的に解析した。また、1 年齢の野生型及び変異型 Notch3 ノックインマウス脳を用い、マイクロアレイによって、野生型と比較して変異型で発現量が変化する遺伝子を抽出した。これらによって変異型ノックインマウスでは野生型に比べて Notch3 を含め分子に変動がみられないか解析を試みた。

4. 研究成果

(1) 野生型 Notch3 は化合物なしでも Notch3 重合体がすぐに消失するのに対し、変異型は Notch3 重合体が分解されにくかった。そこで、変異型 Notch3 を誘導した後、各種低分子化合物を添加し、その効果を検討した結果、現在までに amyloid β ($A\beta$) のフィブリル形成を阻害する化合物である 4,5-dianilinophthalimide (DAPH) や staurosporine aglycone (SA) 等が Notch3 の重合体の分解に効果があった。今回見つけた化合物は細胞増殖を若干抑える作用もあるため、その効果についてはさらに検討する必要がある。今後さらに各種低分子化合物を用いてスクリーニングを行うことによって、より効果的な薬剤を見つけることが課題である。本研究で用いた変異 Notch3 を発現する細胞を用いたスクリーニング法は CADASIL の治療薬開発に有用であると思われる。

(2) 変異型 Notch3 ノックインマウスを用い、変異 Notch3 が引き起こす形態変化や分子レベルでの変化を解析した。その結果、変異型 Notch3 ノックインマウス脳では野生型と比較して、幼若期、老齢期で Notch3 蛋白質の増加が見られた。また、CADASIL の病理変化

は末梢の血管にもみられることから、尾の動脈を観察したところ、平滑筋細胞層の形態的变化、および Notch3 蛋白質の蓄積が認められた。さらに、慢性ストレスを負荷したノックインマウスでは、若年でも脳と尾の動脈における VSMCs マーカー蛋白質の減少と、尾動脈における平滑筋細胞層の構造変化が認められた。このことから、変異遺伝子と環境要因の相互作用により疾患の発症が促進される可能性が考えられた。今回構築した CADASIL モデルマウスを、病理学的、生化学的、分子生物学的にさらに詳細に解析することで、CADASIL の発症機序の解明のみならず、大脳細動脈病変や皮質下性認知症などの脳血管障害の病態解明に貢献できると思われる。

(3) 変異型 Notch3 ノックインマウス脳では幼若期、老齢期で Notch3 蛋白質の増加が見られたが、当初計画していた 1 年齢の野生型及び変異型 Notch3 ノックインマウス脳の網羅的なプロテオーム解析では顕著な違いが見られなかったことから、マイクロアレイによって、野生型と比較して変異型で発現量が変化する遺伝子を検索した。マイクロアレイによって違いが見られた遺伝子の一つとして Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II α (CaMKII α) が抽出された。そこで、ウエスタンブロットによって蛋白質レベルでの変化を解析したところ、トータルの CaMKII α についてはそれほど違いが見られなかったが、老齢ノックインマウス脳でリン酸化 CaMKII α が増加していることが確認された。変異 Notch3 ノックインマウスでは平滑筋細胞層の形態的变化が観察されていることから、今回同定した遺伝子もしくは蛋白質をさらに詳細に解析することで、CADASIL の発症機序の解明に貢献できると思われる。

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 2 件)

① Yamamoto Y, Craggs LJ, Watanabe A, Booth T, Attems J, Low RW, Oakley AE, Kalaria RN. Brain Microvascular Accumulation and Distribution of the NOTCH3 Ectodomain and Granular Osmiophilic Material in CADASIL. J Neuropathol Exp Neurol. 査読有, 72 巻, 2013, 416-431.

DOI:10.1097/NEN.0b013e31829020b5

② Takahashi K, Adachi K, Kunimoto S, Wakita H, Takeda K, and Watanabe A.

Potent inhibitors of amyloid β fibrillization, 4,5-dianilinophthalimide and staurosporine aglycone, enhance degradation of preformed aggregates of mutant Notch3.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 査読有, 402 巻, 2010, 54-58.

DOI:10.1016/j.bbrc.2010.09.105

[学会発表] (計 6 件)

① 渡邊 淳、國本正子、高橋慶吉

変異型 Notch3 ノックインマウスの生化学的解析

第 31 回日本認知症学会学術集会 2012 年 10 月 27 日 つくば

② 渡邊 淳、足立香代、新飯田俊平、丸山和佳子、脇田英明

血管性認知症モデル動物のプロテオーム解析

第 30 回日本認知症学会学術集会 2011 年 11 月 11-12 日 東京

③ 國本正子、高橋慶吉、足立香代、松崎三記子、武田和也、脇田英明、Rajesh N Kalaria、丸山和佳子、渡邊 淳

変異型 Notch3 ノックインマウスを用いた慢

性ストレス暴露による CADASIL モデルマウスの構築

第 35 回日本神経科学大会 2011 年 9 月 18-21 日 横浜

④ Watanabe A

The molecular pathology of the CADASIL

BMB2010 第 33 回日本分子生物学会年会、第 83 回日本生化学会年会、合同大会 2010 年 12 月 9 日 神戸

⑤ 渡邊 淳、足立香代、國本正子、武田和也、脇田英明、丸山和佳子、高橋慶吉

ヒト変異 Notch3 重合体の分解促進剤のスクリーニング

第 29 回日本認知症学会学術集会 2010 年 11 月 5 日 名古屋

⑥ Watanabe A, Kunimoto S, Adachi K, Takeda K, Niida S, Wakita H, Kalaria RN, and Takahashi K.

Proteomic analysis of the mutant

Notch3-expressing cells and the microvessels of CADASIL brain

International conference on Alzheimer's disease (ICAD) 2010 年 7 月 11 日 Honolulu

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 淳 (WATANABE ATSUSHI)

独立行政法人・国立長寿医療研究センター
共同利用推進室・室長

研究者番号：90321843

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし