

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461296

研究課題名(和文) ヒトNotch3遺伝子導入ショウジョウバエを用いた脳小血管病の研究

研究課題名(英文) Investigation of cerebral small vessel diseases using Notch3 transgenic *Drosophila*

研究代表者

水田 依久子 (Mizuta, Ikuko)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80397760

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、遺伝性脳小血管病CADASILの原因遺伝子Notch3に着目した脳小血管病ショウジョウバエモデルの作製を目的とした。ハエNotchとヒトNotch3は相同遺伝子である。ハエNotchを過剰発現すると複眼の構造が乱れるが、ヒトNotch3単独の過剰発現による影響は殆どみられなかった。そこで、ヒトNotch3の変異が存在する領域以外をハエのNOTCHと入れ替えたキメラ遺伝子を導入し、Notch3と結合するJAG1と共に過剰発現したところ、変異型、正常型とも複眼構造の異常を認めた。この結果は、疾患モデル構築への第一歩となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to make *Drosophila* (fruit fly) model of cerebral small vessel diseases by overexpression of Notch3. Notch3 is a homologous gene of fly Notch, and the causative gene for CADASIL, the most common hereditary cerebral small vessel disease. It is known that excess Notch signaling causes rough eye phenotype in *Drosophila*. However, overexpression of Notch3 showed little effect, suggesting Notch3 had no signaling function in fly. To address this issue, we made constructs of chimeric Notch3 and chimeric JAG1, a ligand of Notch3. CADASIL mutations localize in EGF-like repeats of Notch3. Chimeric Notch3 was prepared by exchange between regions excluding EGF-like repeats of human Notch3 and those of *Drosophila* Notch. Chimeric JAG1 was prepared in the similar way. The co-overexpression of chimeric Notch3 and chimeric JAG1 resulted in the rough eye phenotype. Use of the chimeric proteins may be initial step to make the disease model of fly.

研究分野：遺伝性神経疾患の研究

キーワード：脳小血管病 ショウジョウバエ Notch

1. 研究開始当初の背景

(1) 脳小血管病は、脳梗塞・認知症・加齢性変化と関連する疾患概念で、臨床的には多発性ラクナ梗塞、皮質下脳血管性認知症、アミロイドアンギオパチーなどの疾患の総称である。脳小血管病の主病変は径 40-900 μm の脳実質内小血管であり、血管壁の肥厚や血管平滑筋の脱落がみられる。病態メカニズムに関しては血管への異常蛋白沈着が目玉されているが、まだ不明な点が多い。

(2) 脳小血管病の発症には、加齢、高血圧、高脂血症、糖尿病などの血管危険因子と小血管自身の因子が関与すると考えられる。血管危険因子に対しては治療法が確立しているが、小血管自体の因子に対しては、病態解明および治療法開発が必要である。血管危険因子が無くとも発症する遺伝性脳小血管病は、原因遺伝子変異により小血管自体が障害されると考えられる。最も頻度の高い遺伝性脳小血管病 CADASIL は *Notch3* 遺伝子変異を原因とし、小血管の平滑筋細胞基底膜に GOM と呼ばれる蛋白凝集体を特徴とする。

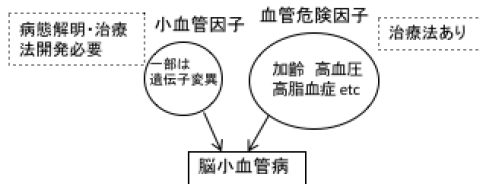


図1 脳小血管病発症の概念図

(3) *Notch3* は細胞膜貫通型の受容体蛋白であり、細胞外ドメインと細胞内ドメインから成る。CADASIL の変異は細胞外ドメインの EGF-like repeats に存在する。*Notch3* のリガンドの Jagged1 (JAG1) も細胞膜貫通型蛋白であり、通常は *Notch3* 細胞外ドメインが JAG1 に結合後 JAG1 細胞側にとりこまれる。*Notch* シグナルは、*Notch3* 細胞内ドメインが核内に移行し、他の転写因子と結合して標的遺伝子の転写を刺激することによる。

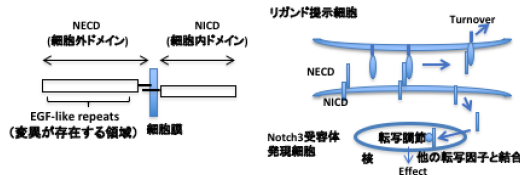


図2 *Notch3* 蛋白構造とシグナル

(4) ショウジョウバエはライフサイクルが短く、ヒトの疾患遺伝子の 75% にハエの相同遺伝子が存在していること、遺伝学的研究手法が確立していることなどから、重要な疾患モデル動物として位置づけられている。他の異常蛋白凝集疾患のハエモデルは既に研究報

告があるが、脳小血管病に関するハエモデルはまだ報告が無い。*Notch3* は *Notch* family のひとつであり、ヒトでは *Notch3* 以外に *Notch1*, *Notch2*, *Notch4* が存在する。一方、ハエでは *Notch* 遺伝子は一つしか存在しない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、CADASIL に着目した脳小血管病モデルショウジョウバエを作製し、病態解明と治療薬スクリーニングの系を確立することである。

3. 研究の方法

pUAST ベクターにヒト *Notch3* coding sequence の正常型もしくは p.C185R 変異型をクローニングし、microinjection 法により、*Notch3* 導入ショウジョウバエ系統を作製する。*Notch3* 上流には GAL4 結合配列 UAS が存在し、組織特異的に GAL4 を発現するドライバー系統と交配させて目的の組織(複眼、翅など)に過剰発現させることができる。また、ハエ *Notch* をロックダウンする系統へのレスキュー効果を解析することもできる。得られた表現型を *Notch3* の正常型と変異型と比較する。

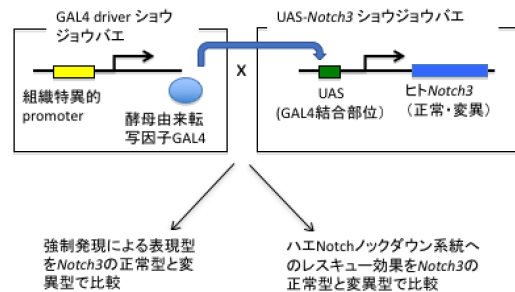


図3 ショウジョウバエによる実験計画

4. 研究成果

(1) ヒト *Notch3* 正常型・変異型導入ショウジョウバエ系統を作製した。PCR によりゲノムレベルでヒト *Notch3* 配列挿入を確認した。*HSP70-GAL4* ドライバーにより *Notch3* の発現を誘導した個体の頭部から蛋白を抽出し Western Blot により *Notch3* 蛋白の発現を確認した。

(2) *GMR-GAL4*, *eyeless-GAL4* ドライバーを用いて複眼原基で *Notch3* を強制発現させたが、正常型、変異型のいずれも表現型の変化は殆ど見られなかった。また、*en-GAL4*, *dpp-GAL4*, *C96-GAL4* ドライバーを用いて翅原基での強制発現を行ったが、正常型、変異型のいずれも翅の表現型に変化は見られなかった。

(3) ハエ *Notch* の RNAi 系統 (NIR) と *C96-GAL4* ドライバーを用いて翅原基の *Notch* をロックダウンすると、以前から報告のあるように太い翅脈ときれこみの入った翅の表

現型が得られた。これに、ハエ Notch の全長アミノ酸 coding sequence をもつ系統を用いてハエ Notch を強発現すると、翅脈の太さは残るが翅の切れ込みは大幅に軽減し、レスキュー効果を認めた。しかしながら、ヒト Notch3 の強制発現によるレスキュー効果は認められなかった。

(4) ハエ Notch 全長の UAS 系統と *GMR-GAL4* を交配すると、rough eye と表現される複眼構造の異常が見られた。すなわち、過剰な Notch シグナルが走れば、rough eye が認められるはずである。

(5) 以上の(1)~(4)の結果から、ヒト Notch3 はショウジョウバエの生体内では Notch シグナルを走らせることができないと考察した。理由に関しては、ハエとヒトの Notch アミノ酸配列の違いによる可能性が高いと考えられる。Notch3 正常型と変異型のハエでの表現型を比較するためには、正常型 Notch3 がハエの生体内でシグナルを走らせる条件を見出すことが必要である。そこで、新たな方法として、ハエ Notch の EGF-like repeats domain 部分をヒト Notch3 の EGF-like repeats domain (正常型、変異型) と入れ替えたキメラ蛋白をコードする遺伝子導入系統の作製を行うことにした。また、リガンド側にも同様の問題が起こることを想定して、Notch3 のリガンド JAG1 のハエの相同蛋白である Serrate の DSL ドメインと EGF-like repeats domain (いずれも Notch 受容体との結合に必要な領域) を JAG1 のそれと入れ替えたキメラ JAG1 導入系統も作製した。キメラ遺伝子の作製には主に In Fusion 法を用いた。

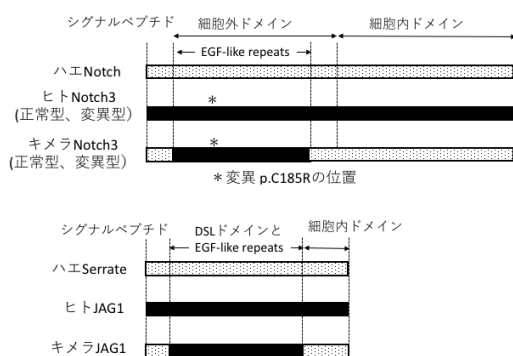


図4 キメラ Notch3・JAG1 の模式図

(6) 複数の UAS-キメラ Notch3 系統を作製し、*GMR-GAL4* ドライバーと交配したが、正常型、変異型とも複眼にはわずかな rough eye を認めるのみであった。ネガティブコントロールの UAS-*GFP* と *GMR-GAL4* の交配でも同程度のわずかな rough eye が見られたので、キメラ Notch3 単独の強制発現ではハエの生体内で Notch シグナルを走らせることはできないと

考察した。これに対し、殆どのキメラ JAG1 系統は系統は *GMR-GAL4* との交配による強制発現で著明な rough eye を生じた。しかしながら、キメラ JAG1 の1系統のみ、単独の強制発現では有意な rough eye を生じなかった。この弱いキメラ JAG1 系統とキメラ Notch3 の交配により、二つのキメラ蛋白を同時に強制発現すると、両者が結合してハエ生体内で Notch シグナルが走るのではないかと仮定した。

予想通り、キメラ Notch3 とキメラ JAG1 を同時に *GMR-GAL4* ドライバーを用いて強制発現させると、明らかな rough eye を生じた。この結果は Notch3 の正常型、変異型いずれにも見られた。ただし、rough eye の程度には個体差があり、殆ど異常のない個体の割合は正常型 Notch3 がの方が約 54% に対し変異型 Notch3 は約 24% と、変異型の方が rough eye の割合は高い傾向が見られた。

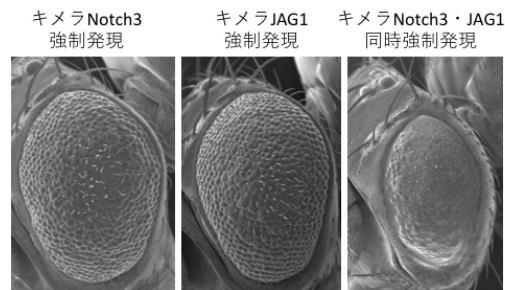


図5 キメラ Notch3 とキメラ JAG1 の同時強制発現による rough eye

(7) CADASIL の病態メカニズムに関しては、変異型の細胞外ドメインの蓄積が引き金となる Notch3 細胞外ドメインカスケード仮説が主流となっている。この説は Joutel らのグループの精力的な研究成果により支持されており、それによると TIMP3 (Tissue inhibitor of metalloproteinase 3) などの細胞外基質蛋白が雪だるま式に N3ECD の凝集にたまり、血管病理を引き起こすと考えられる (Monet-Lepretre et al., Brain 2013)。

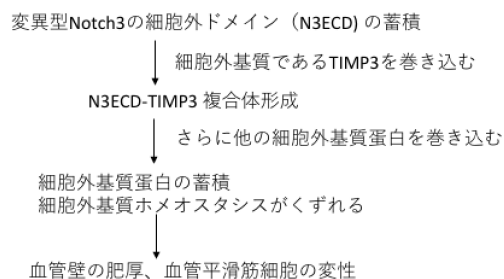


図6 CADASIL における Notch3 細胞外ドメインカスケード仮説

殆どの変異型 Notch3 はシグナル伝達は正常であるという報告が多いが、シグナル伝達が低下するという loss of function 説もある。

本研究ではキメラ Notch3 とキメラ JAG1 を用いてようやくハエ生体内で Notch シグナルを走らせることができたが、正常型、変異型いずれも過剰 Notch シグナルによる表現型を示したことから、loss of function 説は否定的だと考えられる。また、変異型キメラ Notch3 の方が rough eye を示す個体の割合が高かったことは、もしキメラ Notch3 の発現レベルが正常型と変異型の系統間で差がなければ、変異型 Notch3 のほうがシグナル伝達が強いと考えられる。これは、最近、マウス CADASIL モデルで Notch3 シグナルが上昇しているという報告 (Baron-Menguy, Hypertension 2017) を支持する可能性がある。

(8) 本研究では、当初の実験デザインを大幅に見直す必要が生じたが、ショウジョウバエ生体内でヒト Notch3 がシグナル伝達を行うことのできる実験系を構築することができた。しかしながら、Notch3 変異蛋白の組織への蓄積に関しては未解析であり、脳小血管病モデルとしての評価のためにはさらなる解析と検討が必要である。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

Ikuko Mizuta, Yumiko Azuma, Hideki Yoshida, Masamitsu Yamaguchi, Toshiki Mizuno. Constructing CADASIL model using transgenic Drosophila bearing chimeric forms of NOTCH3 and JAG1. 第 59 回日本神経学会学術大会 2018 年

水田依久子, 東裕美子, 吉田英樹, 山口政光, 水野敏樹. キメラ NOTCH3 導入ショウジョウバエを用いた遺伝性脳小血管病 CADASIL 病態解明へのアプローチ. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)

Ikuko Mizuta, Yumiko Azuma, Narumi Toda, Hideki Yoshida, Masamitsu Yamaguchi, Toshiki Mizuno. Strategy to elucidate pathogenesis of CADASIL using Drosophila models of human NOTCH3. 第 39 回日本分子生物学会 2016 年

Ikuko Mizuta, Yumiko Azuma, Narumi Toda, Hideki Yoshida, Masamitsu Yamaguchi, Toshiki Mizuno. Strategy to elucidate pathogenesis of CADASIL using Drosophila models of human NOTCH3. 第 57 回日本神経学会学術大会 2016 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

特に無し

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

水田 依久子 (MIZUTA, Ikuko)  
京都府立医科大学・医学研究科・助教  
研究者番号: 80397760

##### (2) 研究分担者

山口 政光 (YAMAGUCHI, Masamitsu)  
京都工芸繊維大学・応用生物学系・教授  
研究者番号: 00182460

##### (3) 研究分担者

水野 敏樹 (MIZUNO, Toshiki)  
京都府立医科大学・医学研究科・教授  
研究者番号: 30264782