

機関番号：83903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21790639

研究課題名(和文) 慢性ストレスによる、脳血管性認知症発症促進機構の解析

研究課題名(英文) Analyses on the acceleration mechanism of vascular dementia by chronic stress

研究代表者

國本 正子 (KUNIMOTO SHOHKO)

独立行政法人国立長寿医療研究センター 加齢健康脳科学研究部 流動研究員

研究者番号：30350135

研究成果の概要(和文)：脳血管性認知症は、アルツハイマー型認知症とならぶ老年性認知症の二大原因の一つであるが、原因や症状が多岐にわたるため、その発症機序の解析はあまり行われていない。本課題では、この脳血管性認知症の発症促進要因の一つとして、環境要因、特に現代社会において人が必ず直面するストレスに注目し、家族性脳血管性認知症(CADASIL)型の変異遺伝子を発現するマウスを用いて、ストレスと CADASIL 発症との関連を解析した。

研究成果の概要(英文)：CADASIL is the most common hereditary small vessel disease that is characterized by recurrent subcortical ischemic strokes and ultimately vascular dementia. It is linked to dominant mutations in the human NOTCH3 gene, which is primarily expressed in vascular smooth muscle cells (VSMCs) of the vessel wall. Pathogenic mechanisms remain unclear by the lack of a good animal model. Here, we generated a knock-in (KI) mouse model for one of the CADASIL mutations and investigated this mouse to elucidate whether the pathological hallmarks of CADASIL are observed with mutant Notch3. Further, we examined the effect of chronic intermittent restraint stress on the pathogenesis of CADASIL using this mouse.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：ストレス、脳血管性認知症、CADASIL、動物モデル

様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

脳血管性認知症およびアルツハイマー病(AD)などの認知症は、現在深刻な社会問題となっている。とりわけ我が国における脳血管性認知症患者の割合は高く、予防・治療法の開発は急務である。脳血管性認知症の発症機序は、血管機能の破綻による梗塞・出血と、それに起因する脳深部灌流障害による神経細胞死であると考えられているが、血管障害を引き起こす詳細なメカニズムは明らかにされていない。その中で、家族性脳血管性認知症 (CADASIL; cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy) は、原因遺伝子として Notch3 が同定されている脳血管性認知症の一種であり (Joutel A *et al*, Nature 1996)、AD での家族性アルツハイマー病研究と同様、CADASIL の解析は血管変性や脳血管性認知症の発症機序を解明する糸口になると期待されている。

CADASIL の病理学的特徴としては、脳実質小動脈の中膜筋層平滑筋細胞の変性・消失と外膜の線維性の肥厚、GOM 顆粒(Granular Osmiophilic Material)や Notch3 細胞外ドメインの血管平滑筋細胞への蓄積などがあるが、これらの病理学的特徴を呈するまでの詳細なメカニズムは不明である。そのため、その発症機序の解明には、動物モデルや細胞モデルの確立が重要な課題となっており、これまでに変異 Notch3 を導入したマウスや培養細胞を用いた解析が国内外で数例報告されている。しかしながら、その一部は CADASIL 様の病理学的特徴を示さないという問題がある。また、CADASIL 変異型 Notch3 をもつにもかかわらず、症状が進行しない人の例もみられる。これらの背景から、CADASIL をはじめ、異常タンパク質の凝集や沈着が誘

導される後期発症型の疾患発症には、原因遺伝子変異にくわえ、さらに付加的な要因が必要であると考えられる。認知機能障害を示す AD モデルマウスにおいて、飼育環境をよくすることによって著しく病変が改善されるという報告 (Lazarov O *et al*, Cell 2005) から、環境要因の制御が認知症の予防や症状改善につながることを示唆されている。

申請者はこれまで、ストレスに対する応答の個体差がどのようなメカニズムで生じ、疾患誘導に関与するのか解明したいと考え研究を行ってきた。そのなかで、家族性アルツハイマー病の遺伝的脆弱性をもつマウスに慢性ストレスを負荷することで、認知機能関連脳領域における変性神経細胞の増加や、海馬歯状回における新生細胞の分化遅滞が若年期から促進されることを見いだした[平成 18,19 年度 科学研究費補助金 若手研究 (B)採択課題;Experimental Neurology (2010) 221, 175-185]。この研究経緯から、CADASIL 変異型 Notch3 をもつ個体においても、Notch3 分子の蓄積や平滑筋細胞の変性・消失などといった CADASIL 患者でみられる特徴が、慢性ストレスという環境要因を加えることにより促進されると考えた。

2. 研究の目的

ストレスによる CADASIL 促進を評価するために、まず対照群として、(1)平常時 (ストレス負荷なし) における CADASIL 変異型 Notch3 ノックインマウス (KI) と野生型 (WT) マウス組織 (脳および精製血管) の組織学的・生化学的解析を行い、CADASIL 変異型遺伝子の発現が CADASIL 発症に及ぼす影響を若年期から老年期にいたるまで調べる。所属研究部で作製された KI マウスは、予試験的ではあるが、組織学的解析により 2 年齢以降から CADASIL 様の病理学的特徴の一部を示すこ

とがすでに確認されている。この経年変化をより詳細に解析する。つづいて(2)KI マウスおよび WT マウスに慢性ストレスを負荷し、(1)の結果と比較しながら、CADASIL 様の症状が若年から慢性ストレスによって誘導・促進されるか検証する。同時に、(3)WT マウスと KI マウスの平常時群、ストレス負荷群それぞれの脳組織、精製脳血管からタンパク質を抽出し、質量分析機器を用いた発現タンパク質の網羅的な解析を行い、(1)(2)の組織学的解析の結果と比較しながら、CADASIL 発症に関わる分子候補を同定する。同定された分子については、形態学的に発現部位の特定を行う。一連の解析は、CADASIL 患者脳組織の特徴（同一所属研究室内研究員により解析中）と比較し、実際の CADASIL 症状を反映する動物モデルとしての有効性を検証しながらすすめる。

上記の解析により、申請者がすでに確立している慢性ストレスモデルを応用することで、CADASIL の特徴を早期に呈する動物モデルを作製し、その経年変化の解析から CADASIL の発症機序の解明、およびストレスが脳血管性認知症発症に及ぼす影響を解明する。その結果をまとめて学会発表や論文により公開し、脳血管性認知症の予防・治療に応用可能な情報として提供する。

3. 研究の方法

(1)平常時マウス組織の組織学的・生化学的解析

CADASIL の原因遺伝子である Notch3 に変異を導入したノックインマウス(KI)と野生型(WT)マウス組織（脳および脳由来精製血管、尾）の組織学的・生化学的解析を行い、CADASIL 型変異遺伝子の発現が CADASIL 発症に及ぼす影響を若年期から老年期にいたるまで調べた。脳由来の血管は、ガラスビーズを用いた方法により精製した。主な検討項

目として、CADASIL 患者脳でこれまでに見いだされている特徴のなかから、血管平滑筋細胞への Notch3 細胞外ドメインの蓄積、 α -アクチン陽性血管の減少、コラーゲン分子による血管肥厚などについて調べた。Notch3 細胞外ドメインの蓄積に関しては、解析対象ドメインに対する抗体が市販されていなかったため、独自に抗体作製を試みた。抗原は昆虫細胞を用いた系により調製した。

(2)慢性ストレス負荷後のマウス組織の組織学的・生化学的解析

KI マウスおよび WT マウスに、慢性ストレスを負荷し、(1)の結果と比較しながら、上記の解析項目、および Notch3 分子の蓄積や平滑筋細胞の変性・消失などといった CADASIL 様の症状が若年から誘導・促進されるか検証した。ストレスサーとして、申請者が以前確立した慢性不連続性拘束ストレスシステムを用いた。このシステムでは、拘束チューブ内にマウスを1日6時間拘束するストレスを、週末をのぞいて3週間続けることで、一種類のストレスサーでもマウスが馴化することなく、効率よく脳組織内に変化を誘導することができる。

(3)マイクロアレイを用いた発現遺伝子、および質量分析器を用いた発現タンパク質の網羅的な解析

(1)(2)の系に用いる組織学的解析用の試料とともに、KI マウスと WT の平常時、およびストレス負荷時の組織を生化学的解析用に採取し、脳組織、精製脳血管からタンパク質を抽出し、質量分析器を用いた発現タンパク質の網羅的な解析を行った。また、平常時の WT および KI マウス脳から RNA を抽出し、Notch3 遺伝子変異による、発現遺伝子変化の網羅的な解析を行った。

(4)同定された分子の発現部位特定

(3)により同定された分子について、CADASIL 患者脳組織の生化学的・組織学的特徴（同一所属研究室内研究員解析中）との比較から疾患発症との関連が重要と予想されるものを順に抽出し、形態学的に発現部位の特定を行った。

4. 研究成果

(1)平常時マウス組織の組織学的・生化学的解析

①生化学的解析：ウェスタンブロット解析から、KI 脳及び脳由来精製血管では、若年から WT と比較して Notch3 全長タンパク質の量が多く、特に老齢マウスでは、KI のみ Notch3 タンパク質の蓄積が確認された。Notch3 細胞外ドメインの蓄積に関しては、解析対象ドメインに対する有効な抗体が研究開始時市販されていなかったため、昆虫細胞を用いた系により抗原を調製し、独自に抗体作製を試みたが、目的の抗体作製には至らなかった。この原因として、予測はされていたが、Notch3 の細胞外ドメインには疎水性領域が多く含まれることが考えられる。代替法として、その後市販される Notch3 抗体をほぼすべて購入し、解析に用いることができるか随時検証した。

②組織学的解析：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、2 年齢 KI 尾の動脈において、WT と比較して Notch3 タンパク質の蓄積、 α -アクチン染色性の低下および平滑筋細胞層の形態的变化が観察されたが、コラーゲン分子による血管肥厚はみられなかった。脳においては、KI と WT で顕著な組織学的染色性の差はみられなかった。

(2)慢性ストレス負荷後のマウス組織の組織学的・生化学的解析

慢性ストレスを負荷した KI マウスでは、若年でも尾の動脈における血管平滑筋細胞マーカータンパク質の減少と、尾動脈における平滑筋細胞層の構造変化が認められた。

(3)マイクロアレイを用いた発現遺伝子、および質量分析器を用いた発現タンパク質の網羅的な解析

マイクロアレイ解析や質量分析から、Notch3 遺伝子変異により、WT と KI で発現変化のみられる遺伝子およびタンパク質が数種同定された。

(4)同定された分子の発現部位特定と発現量の解析

(3)により同定された分子について、疾患発症との関連が重要と予想されるものを順に抽出し、脳および脳由来精製血管を用いて発現部位、および発現量の検証を行ったところ、KI マウスで WT と異なるパターンを示すタンパク質が同定された。

以上の結果から、本課題では、CADASIL 変異型 Notch3 ノックインマウスが CADASIL 様特徴を示すことを確認し、その組織学的、生化学的解析から、Notch3 変異により発現変化するタンパク質を同定した。さらに、慢性ストレスを負荷した KI マウスでは、若年でも老齢 KI でみられた CADASIL 様特徴を示したことから、変異遺伝子と環境要因の相互作用により脳血管性認知症の発症が促進される可能性が示唆された。今回構築した CADASIL モデルマウスを、病理学的、生化学的、分子生物学的手法により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。

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

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

Biochemical and Biophysical Research Communications (2010) 402, 54-58 (査読有)

2. Takahashi K, Adachi K, Yoshizaki K, Kunimoto S, Kalaria N R, Watanabe A

Mutations in NOTCH3 cause the formation and retention of aggregates in the endoplasmic reticulum, leading to impaired cell proliferation.

Human Molecular Genetics (2010) 19, 79-8 (査読有)

3. Kunimoto S, Nakamura S, Wada K, Inoue T
Chronic stress-mutated presenilin 1 gene interaction perturbs neurogenesis and accelerates neurodegeneration.

Experimental Neurology (2010) 221, 175-185 (査読有)

[学会発表] (計 4 件)

1. 國本正子、渡邊淳、足立香代、松崎三記子、武田和也、脇田英明、Rajech N Kalaria、丸山和佳子、高橋慶吉「CADASIL モデルとしての変異 NOTCH3 ノックインマウスの作製と解析」

第 33 回日本神経科学大会 (2010 年 9 月 2 日-9 月 4 日、神戸)

2. 渡邊淳、國本正子、足立香代、武田和也、新飯田俊平、脇田英明、Rajech N. Kalaria、高橋慶吉 “Proteomic analysis of the mutant Notch3-expressing cells and the microvessels of CADASIL brain”
ICAD 10 - Alzheimer’s Association International Conference on Alzheimer’s Disease 2010(2010 年 7 月 10 日-7 月 15 日、ホノルル)

3. 渡邊淳、足立香代、國本正子、武田和也、脇田英明、高橋慶吉「変異 Notch3 による重合体の形成と細胞増殖の低下」
第 28 回日本認知症学会学術集会 (2009 年 11 月 20 日-11 月 22 日、仙台)

4. 國本正子、足立香代、吉崎嘉一、武田和也、脇田英明、高橋慶吉、渡邊淳「家族性脳血管性認知症 (CADASIL) モデル動物の作製と病態解析」
第 28 回日本認知症学会学術集会 (2009 年 11 月 20 日-11 月 22 日、仙台)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

國本 正子 (KUNIMOTO SHOHKO)

独立行政法人 国立長寿医療研究センター 加齢健康脳科学研究部 流動研究員
研究者番号：30350135

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：