

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 8 月 2 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860717

研究課題名(和文) プロテオミクスと組織化学を駆使したCADASILの原因物質の同定

研究課題名(英文) Detection of key molecules of CADASIL using proteomics and histochemical analysis

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) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：CADASILの病態生理の手がかりを解明するためにプロテオミクス解析および組織化学解析を行った。脳動脈の中膜顆粒変性をレーザーマイクロダイセクションで採取して、LC-MS/MSを用いて、その構成蛋白を解析した結果、病態生理に関係する蛋白質を検出した。また、Granular Osmiophilic Material(GOM)の化学的性質を組織化学的手法で解析した結果、GOMに酵素活性を見出した。両解析手法を組み合わせることでCADASILの病態生理に迫る結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：We detected key molecules of CADASIL using proteomics and histochemical analysis. We analyzed coexistence proteins of Notch3 ectodomain, using brain samples of two CADASIL cases. We cut small arteries of brain sections on the glass by Laser microdissection. We analyzed coexistence proteins, using LC-MS/MS. In this study, we detected some key molecules that are associated with vascular remodeling. In addition, we analyzed chemical features of Granular Osmiophilic Material (GOM), using histochemical analysis on the slide glass under light microscopy. We detected some enzymatic activity of GOM. These key molecules may be important to reveal the pathogenesis of CADASIL.

研究分野：神経内科

キーワード：CADASIL Notch3 プロテオミクス GOM 組織化学解析

1. 研究開始当初の背景

Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy (CADASIL)は、単一遺伝子異常による常染色体優性遺伝性脳血管障害であり、片頭痛やラクナ梗塞の病態解明にとって重要な疾患である。1996年に原因遺伝子が血管平滑筋に発現し、動脈の分化に關与する *NOTCH3* と同定され (Joutel, et al. Nature 1996)、その臨床像、画像、病理の特徴が明らかにされつつあるが、その病態は未だ解明されていない。

CADASIL は Notch3 細胞外ドメインのアミノ酸の1置換により10~30歳代で片頭痛、40~50歳代でラクナ梗塞を繰り返し、60歳代で脳血管性認知症に至る (Chabriat, et al. Lancet 1995)。画像で広汎な大脳白質病変を認め、多発性ラクナ梗塞が穿通動脈領域に加え、半卵円中心にも形成され、病理学的には、髄膜の小動脈にびまん性の中膜変性を認め、その下流にある髄質動脈や皮質下動脈に血管障害を来す。血管変性部位には Notch3 細胞外ドメインの蓄積がみられる。

CADASIL の病態に関しては、これまでの遺伝子解析で、遺伝子変異により Notch3 の細胞外ドメインに不対のシステイン残基が形成され、蛋白解析により切断された Notch3 細胞外ドメインが蓄積することが明らかにされている (Joutel, et al. J. Clin. Invest 2000)。病理解析では、本疾患特異的な Granular Osmiophilic Material (GOM) を認め、Notch3 細胞外ドメインが GOM の主な構成成分であることが明らかにされている (Ishiko, et al. Acta Neuropathol 2006)。GOM の蓄積が血管変性に關与していると推定されているが、その血管変性の機序は未解明である。

本研究において、我々は GOM の生化学的性質に注目した。GOM は Notch3 細胞外ドメインで構成され、Notch3 の変異部位を含む構造物である。従って、GOM の生化学的性質は遺伝子変異により新たに形成された変異 Notch3 蛋白の生化学的性質を反映している可能性がある。GOM の生化学的性質を病理組織切片上で組織化学的手法により解析することができれば、Notch3 の変異部位に加わった生化学的性質を推測することができ、CADASIL の病態解明の手がかりになるのではないかと考えた。従来、GOM は電子顕微鏡下で観察され、1 μm 未満の顆粒状物質であるため、光学顕微鏡では観察できない所見とされていたが、我々は独自に GOM を光学顕微鏡で観察する方法を開発した (Ueda, et al. Neuropathol and Applied Neurobiol 2009)。本研究では、光学顕微鏡下の GOM 観察方法を活用して、GOM の生化学的性質を組織化学的手法により解析した。

近年の蛋白解析技術の進歩により、網羅的な蛋白解析が可能になっており、本技術を

CADASIL の病態解析に導入した。過去の蛋白解析においては CADASIL の NOTCH3 細胞外ドメイン蓄積と関連性を示す蛋白質として、Tissue inhibitor of metalloproteinases 3 (TIMP3) が同定されている (Monet-Leprêtre, et al. Brain 2013)。本検討では、病理組織上の構造物をプレパラート上で切除する手法であるレーザーマイクロダイセクションと液体クロマトグラフィーで断片化ペプチドを分離して、アミノ酸配列を解読して、蛋白質を同定する手法である LC-MS/MS を用いて、網羅的蛋白解析を行った。CADASIL では脳の髄膜動脈の中膜血管平滑筋層が変性消失し、Notch3 細胞外ドメインの蓄積が生じる。本研究では Notch3 が蓄積して、脳血管が変性した脳髄膜動脈中膜の共存蛋白を網羅的に解析し、他疾患の共存蛋白と比較することで、CADASIL に特徴的な蛋白発現について検討した。

2. 研究の目的

本研究ではプロテオミクス解析および組織化学的手法を用いて、脳動脈の中膜顆粒状変性の共存蛋白を解析するとともに GOM の生化学的性質を組織化学的手法により解析することで CADASIL の病態発現の機序解明の手がかりを見出す事を目的とした。

3. 研究の方法

プロテオミクス解析

CADASIL 剖検例の2例 (*NOTCH3* R133C 変異 62歳男性、*NOTCH3* R449C 変異 62歳男性) の脳組織を用いた。ホルマリン固定した脳組織をパラフィン包埋して、3 μm の厚さの切片を作成した。本切片を膜でコーティングしたスライドガラスに貼付けた。本切片を顕微鏡下で観察しながら、解析の対象である径 100 μm の脳動脈を選択して、レーザーマイクロダイセクションで脳動脈を採取した。採取した組織を LC-MS/MS で解析した。比較対照として、非 CADASIL 症例の剖検脳組織でも同様の解析を行った。両者の検出蛋白を比較することで CADASIL に特徴的な病態関連蛋白質の状況を調べた。

組織化学解析

CADASIL 剖検例の2例 (*NOTCH3* R133C 変異 62歳男性、*NOTCH3* R449C 変異 62歳男性) の骨格筋組織を用いて、組織化学解析を行った。非 CADASIL 症例としては、CADASIL が疑われたものの、組織解析により NOTCH3 の蓄積を認めず、CADASIL が否定的であった症例を用いた。未固定の骨格筋組織を 10 μm の厚さにクリオスタットで切り、未固定の状態ですライドガラスに貼付けた。抗 Notch3 細胞外ドメイン抗体 (1G5) の免疫組織染色を行い、光学顕微鏡にて、GOM の形態を観察した。次に組織化学染色を行い、GOM を染色して可視化

し、GOMの生化学的性質を解析した。

4. 研究成果

蛋白解析

CADASIL 例において、1326 ペプチド (205 種類の蛋白質) が検出された。一方、非 CADASIL 例 5 例において、2655 ペプチド (320 種類の蛋白質) が検出された。両者のペプチド数を比較したところ、CADASIL 例において、非 CADASIL 例と比較して、CADASIL 例に有意に多い蛋白質が複数検出された。そのなかでも CADASIL の病理変化に関連性が強い蛋白質に注目して、CADASIL 例の病理組織で局在を確認したところ、脳血管に選択的に染色される蛋白質が確認された。一方、非 CADASIL では CADASIL 関連蛋白質は検出されず、組織での染色性もなかった。本蛋白質は細胞外マトリックス関連蛋白質であり、肥厚した新生内膜や変性が軽度の血管に高頻度に見られた。以上の所見から、本蛋白質は、CADASIL の初期の病態に関連する可能性が推測された。

組織化学解析

組織化学的手法による GOM の生化学的解析においては、GOM に酵素活性が検出された。アミン酸化酵素染色で GOM の形態に一致して、染色性が得られた。基質としてはセロトニンの類似物質で安定な塩酸トリプタミンを使用した。アミン酸化酵素活性により産生された過酸化水素は西洋わさびペルオキシダーゼ (HRP) を用いて、発症させて検出した。光学顕微鏡での観察において、Notch3 細胞外ドメインによる染色性の特徴に一致した顆粒状の染色性が観察された。また、本染色を電子顕微鏡で観察したところ、GOM の形態と局在に一致した染色性が得られた。本染色方法では、GOM に加えて、血管平滑筋細胞内にも染色性があり、ミトコンドリアの形態に一致していた。

今後の課題としては、本染色方法は骨格筋以外の組織で行うと周囲の染色性が強く、観察に耐えない。特に脳組織では脳実質内の血管以外の組織の染色性が強い。本染色方法の今後の研究に活用するためには最良の染色条件を模索する必要がある。特に染色時間、基質や受容体の濃度、溶媒の pH などの条件設定が必要である。

本研究で得られた GOM の染色性については Notch3 の変異部位の性質を反映している可能性を考えられる。しかし、今回得られた GOM の染色性については、変異とは関係なく Notch3 細胞外ドメインの EGF ドメインが本来有している性質や Notch3 細胞外ドメインと共存する共存蛋白や共局在する物質の性質を反映している可能性もあり、今後の検証が必要であると考えられた。

本研究において、脳動脈の中膜の顆粒状変性のプロテオミクス解析による共存蛋白の解析と GOM の組織化学解析を組み合わせるこ

とで CADASIL の病態発現の機序の手がかりが得られた。

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)

Kobatachi J, Sato S, Okumura K, Miyashita F, Ueda A, Ando Y, Toyoda K: Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy without anterior temporal pole involvement: A case report. J Stroke Cerebrovasc Dis. 2014; 23: e241-2. 査読有り

Nishida Y, Ueda A, Ando Y, Ichikawa T. Skin-biopsy-based diagnosis of CADASIL with atypical MRI findings. Intern Med 2014; 54: 537-538 査読あり

Ueda A, Ueda M, Nagatoshi A, Hirano T, Ito T, Arai N, Uyama E, Mori K, Nakamura M, Shinriki S, Iketa K, Ando Y. Genotypic and phenotypic spectrum of CADASIL in Japan: the experience at a referral center in Kumamoto University from 1997 to 2014. J Neurol 2015 *in press*. 査読有り

〔学会発表〕(計 3 件)

植田明彦、平野照之、奥村幸祐、永利聡仁、植田光晴、渡邊聖樹、中島誠、安東由喜雄: 症候性の頭蓋内主幹動脈病変を合併した CADASIL 症例の検討. 第 55 回日本神経学会学術大会 May 23, 2014, 福岡

植田明彦、安東由喜雄: HDLS との鑑別に有用な CADASIL の新たな診断法. 第 55 回日本神経学会学術大会 公募シンポジウム May 21, 2014, 福岡

植田明彦、永利聡仁、植田光晴、平野照之、栗崎玲一、渡邊聖樹、中島誠、安東由喜雄: 当院で診断された CADASIL 発端者 46 例の臨床的特徴. 第 40 回日本脳卒中学会総会 一般演題 Mar 27, 2015, 広島

〔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：
出願年月日：
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 神経内
科学分野 助教
研究者番号：30613525