

平成30年6月19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：26461276

研究課題名(和文) transendocytosis障害による脳小血管病発症機序の解明と治療法開発

研究課題名(英文) Pathomechanism of cerebral small vessel disease due to disturbance of transendocytosis

研究代表者

水野 敏樹 (Mizuno, Toshiki)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30264782

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Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Sub-cortical Infarcts and Leukoencephalopathy (CADASIL)の原因蛋白であるNOTCH3細胞外ドメイン断片のtransendocytosisを定量化を目的とした。Jagged1を発現するCos7細胞を作成し、野生型と変異型NOTCH3細胞外断片を加え、endocytosisの有無を検討した。野生型NOTCH3細胞外ドメイン断片はJagged1発現細胞内に取り込まれていたが、変異型R332C細胞外ドメイン断片は取り込まれていないことを示した。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to clarify the pathomechanism of Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Sub-cortical Infarcts and Leukoencephalopathy (CADASIL). We hypothesized that endocytosis into ligand expressing cell might be disturbed after activation of notch signaling in CADASIL. We analyzed the endocytosis of fragment of NOTCH3 extracellular domain into transient Jagged1 expressing cell. The fragment of wild NOTCH3 extracellular domain was found in the Jagged1 expressing cell. In contrast, the fragment of mutant NOTCH3 extracellular domain was not found in the Jagged1 expressing cell. These results supported that endocytosis into ligand expressing cell is disturbed in CADASIL.

研究分野：神経内科学

キーワード：CADASIL 遺伝性脳小血管病 NOTCH3 transendocytosis

1. 研究開始当初の背景

Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Sub-cortical Infarcts and Leukoencephalopathy (CADASIL) は NOTCH3 が原因遺伝子である遺伝性脳小血管病だが、その発症機序はまだ十分に解明されていない。NOTCH3 は一回細胞貫通型蛋白の NOTCH family の一つで、細胞間シグナルに関わり、神経血管系の組織発生・幹細胞分化を制御し、成人では主として血管平滑筋に発現、血管系の維持制御に関わることが明らかにされている。NOTCH3 の構造は細胞外に受容体として働く Epidermal growth factor like repeat (EGFR) を有し、DSL (Delta, Serrate, Lag-2) リガンドと結合する。Notch シグナルはこれまでリガンドと細胞外受容体が結合すると、酵素学的に ADAM10 により細胞外ドメインが切断、続いて γ セクレターゼにより細胞内ドメインが切り出され、核内へ移行し遺伝子発現を調節していると想定されてきた。しかし 2007 年 Notch シグナルは、Notch 細胞外ドメイン (NECD) がリガンドと結合し、リガンド発現細胞による endocytosis で NECD が引き延ばされることを契機に ADAM10 で切断され、さらに γ セクレターゼで切断後 NICD が核へ移行することで活性化し、一方切断された NECD はリガンドと共にリガンド発現細胞内へ endocytosis され、lysosome で分解されることが示された。この現象は transendocytosis と命名されている。

CADASIL の遺伝子変異は大多数が EGFR をコードする NOTCH3 exon2-24 のシステイン残基に関わるミスセンス変異であり exon3,4 に変異が集中している。CADASIL の発症機序はミスセンス変異により EGFR 内の偶数個システイン残基が奇数個となり、3 対のシステイン残基の S-S 結合が崩れ、EGFR の高次構造が変化すると想定されてきた。一方 CADASIL 脳血管には NECD が蓄積することから、変異型 NECD 中の奇数個となったシステイン残基同士が共有結合により異常蛋白凝集を生じ、その結果血管平滑筋細胞を障害すると現在考えられている。変異型 NECD の異常蛋白凝集が細胞外基質を増加させることは報告されたが、何故変異型 NECD のみが細胞外で異常蛋白凝集が生じるかについては現在も不明である。申請者らは transendocytosis に着目し、細胞実験で野生型 NOTCH3 がリガンド細胞内へ transendocytosis を生じるが、CADASIL 変異型 NOTCH3 では障害されていることを報告し、変異型 NECD がシグナル伝達後 endocytosis されずに細胞外で蓄積することが CADASIL 発症機序である可能性を提唱した (Exp Neurol 233:p303,2012)。

2. 研究の目的

本研究ではこの知見に基づき、endocytosis 阻害因子の除去、endocytosis の強化が CADASIL の根本治療となると考え、まずそのために transendocytosis の状況を可視化して定量的に把握し、治療法の評価を可能とする系の作成を目的とした。

3. 研究の方法

①HEK293 以外の NOTCH3 発現培養細胞系樹立
これまで用いてきた FLP-In-T-REX を用いた NOTCH3 全長を発現する HEK293 細胞株では transendocytosis の可視化が困難であったため、lipofectamine を用いた GFP 導入効率が高安定していた MDCK 細胞株、CaCO2 細胞株、HepG2 細胞株へ NOTCH3 全長の導入を試みた。

②FLP-In-T-REX を用いた Jagged 発現細胞株の樹立

リガンドである Jagged 発現細胞の endocytosis を評価するため、FLP-In-T-REX を用いて、Jagged1C 末端に myc-His-tag を付けたものと付けない 2 種類のプラスミドを HEK293 へそれぞれ transfect して恒常的 Jagged1 発現細胞株を作成した。

③一時的な Jagged 発現細胞株の作成

同様のプラスミドを一時的に HEK293、大腸上皮細胞である A431、Cos7 細胞へ導入して、Jagged1 を一時的に発現する細胞を作成した。

④NOTCH3 細胞外ドメイン断片の作成

C 末側に近く 5 回の EGF リピート (EGF7-11) 含む野生型と変異型 (R332C と C388Y) NOTCH3 細胞外断片を含むプラスミドを作成し、HEK293F へ transfect して培養液中に分泌される蛋白を回収した。

⑤NOTCH3 細胞外ドメイン断片の取り込み

A. 市販されている NOTCH3 細胞外ドメイン断片である Recombinant Human Notch3 Fc chimera protein (R&D systems) に予め 2 次抗体 Alexa488 を 4°C で加えて 1 時間反応させ、その後 Jagged1 発現細胞培地に加えて 37°C で 1 時間培養した。培養後細胞固定して Jagged1、EEA-1、Lamp1、Notch3 で免疫染色を行った。
B. ④で作成した野生型と変異型 (R332C と C388Y) NOTCH3 細胞外断片を同様に加えて培養を行い、培養後細胞固定して Jagged1、EEA-1、Lamp1、Notch3 で免疫染色を行った。

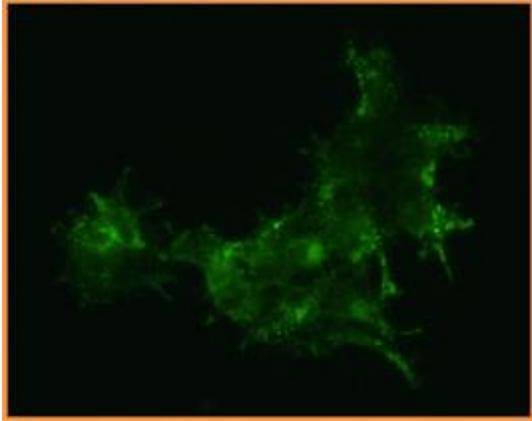
また細胞から回収した蛋白質で Western blot を行った。

4. 研究成果

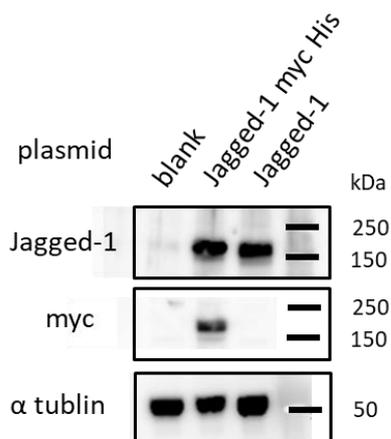
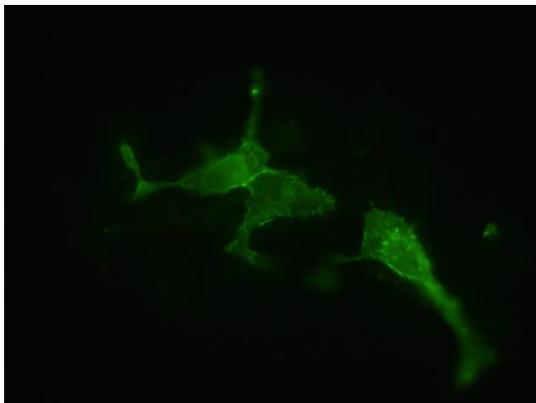
①HEK293 以外の NOTCH3 発現培養細胞系樹立
NOTCH3 全長を導入すると十分な細胞増殖が得られず、断念した。

②FLP-In-T-REX を用いた Jagged 発現細胞株の樹立

FLP-In-T-REX を用いた恒常的 Jagged1 発現細胞株では Jagged1 の発現を細胞質内にドット状に認め、細胞膜表面への輸送が十分なされないため、実験に用いることを断念した。このドット状の所見は LAMP-1 や EEA-1 とは共在しておらず、ライソゾーム内に凝集しているとは考えにくかった



③一時的な Jagged 発現細胞株の作成
コメント

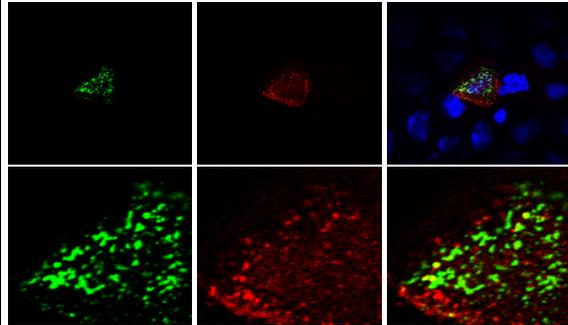


④NOTCH 3 細胞外ドメイン断片の作成
HEK293F へ transfect して培養液中に分泌

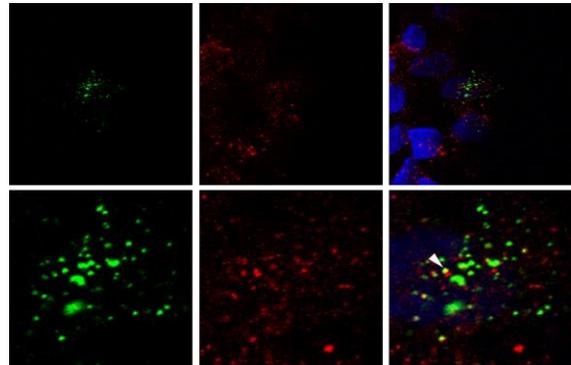
される蛋白を回収して western blot を行い、回収した N3 細胞外ドメインを確認した。

⑤NOTCH 3 細胞外ドメイン断片の取り込み

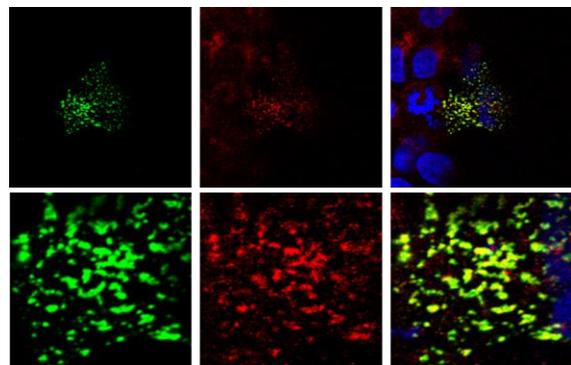
A. Recombinant Human Notch3 Fc chimera protein+Alexa488 (N3Fc-488) を Jagged1 を発現する Cos7 に加えて培養して、NOTCH3 細胞外ドメイン断片の endocytosis を確認した。



N3Fc-488 は初期エンドゾームのマーカである EEA1 とは共局在しなかった。

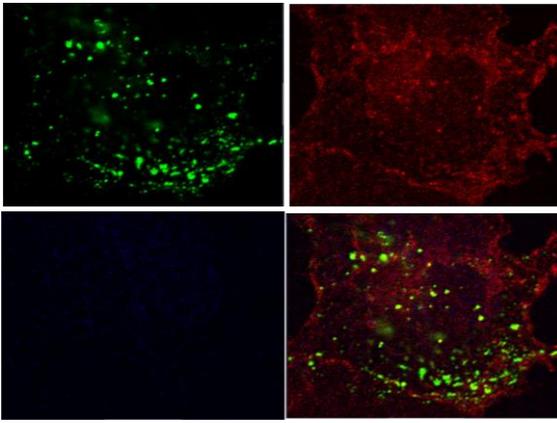


一方 N3Fc-488 は後期エンドゾームからライソゾームのマーカである LAMP1 とは共局在を認めた。

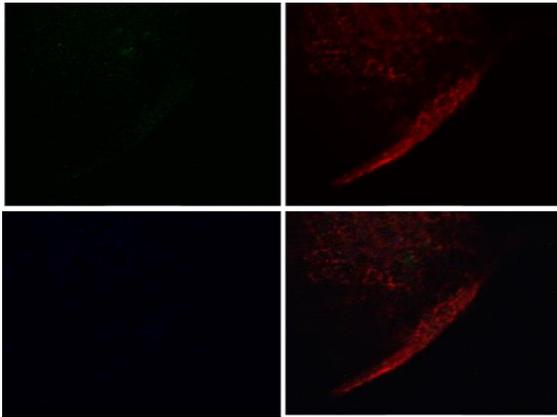


B. 野生型と変異型 (R332C と C388Y) NOTCH3 細胞外断片を Jagged1 を発現する Cos7 に加えて培養して、NOTCH3 細胞外ドメイン断片の endocytosis の有無を確認した。

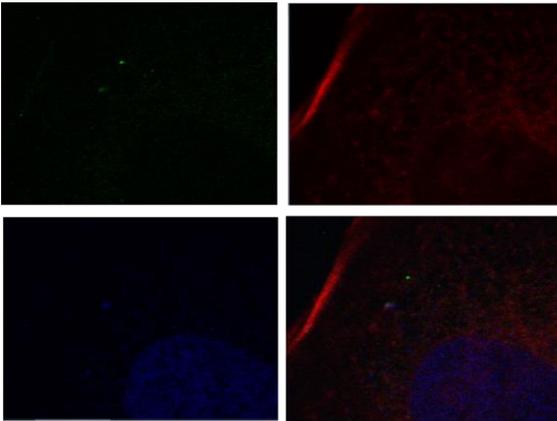
野生型 NOTCH 3 細胞外ドメイン断片は Jagged1 発現細胞内に取り込まれていることを確認した。



一方変異型 R332C 細胞外ドメイン断片は Jagged1 発現細胞内に取り込まれていなかった。



また変異型 C388Y 細胞外ドメイン断片も Jagged1 発現細胞内に取り込まれていなかった。



以上の結果から野生型に比して変異型 NOTCH3 細胞外ドメインは endocytosis が障害されていることが示唆された。

今後 endocytosis の生じる表面での接着からライソゾームへの移行過程を可視化して、野生型と変異型 NOTCH3 の endocytosis の挙動の違いを明らかにして、transendocytosis の定量化を目指す。

5. 主な発表論文 (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 6 件)

- ① **【CADASIL と CARASIL】** CADASIL の臨床像と遺伝子異常 渡邊 明子, 水田 依久子, 水野 敏樹 神経内科 87 巻 6 号 Page630-637(2017)
- ② Suda S Okubo S, Ueda M, Sowa K, Abe A, Aoki J, Muraga K, Suzuki K, Sakamoto Y, Mizuta I, Mizuno T, Kimura K. A Japanese CADASIL kindred with a novel two-base NOTCH3 mutation. Eur J Neurol. 2016 May;23(5):e32-4
- ③ Tojima M, Saito S, Yamamoto Y, Mizuno T, Ihara M, Fukuda H. Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy with a Novel NOTCH3 Cys323Trp Mutation Presenting Border-Zone Infarcts: A Case Report and Literature. Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases. Vol. 25 (8) e128-130, 2016
- ④ Ando T, Goto Y, Mano K, Ueda A, Ando Y, Mizuta I, Mizuno T. CADASIL Presenting as Acute Bilateral Multiple Subcortical Infarcts without a Characteristic Temporal Pole or Any External Capsule Lesions. Internal Medicine. Intern Med. 2016; 55(19): 2873-2876
- ⑤ 水野敏樹 皮質下性認知症の現代的捉え方 遺伝性脳小血管病からの解析. BRAIN and NERVE, 67(4):403-412, 2015
- ⑥ 向井麻央 水野敏樹. 脳卒中臨床の最新の話 題 遺伝性脳小血管病 (CADASIL, CALASIL) 医学のあゆみ 254 巻 1 号 Page113-117, 2015

[学会発表] (計 5 件)

- ① Ikuko Mizuta, Mao Mukai, Akiko Watanabe, Ai Hamano, Tomoyuki Ohara, Tomokatsu Yoshida, Toshiki Mizuno Consideration of Issues Related to Pre-and Post-Genetic Test for CADASIL VAS-COG2015 2015.09. Tokyo, Japan
- ② Mao Mukai, Daisuke N, Yukie Kushimura, Yu-ichi Noto, Tomoyuki Ohara, Ikuko Mizuta, Toshiki Mizuno. A Case Report of CADASIL with a Homozygous NOTCH3 Mutation Arg544Cys VAS-COG2015 2015.09. Tokyo, Japan
- ③ Toshiki Mizuno, Ikuko Mizuta, Akiko Watanabe, Ai Hamano, Mao Mukai, Masaki Kondo, Masanori Nakagawa, Hidekazu

Tomimoto, Makoto Uchino, Osamu Onodera.
Validation of Japanese Diagnostic Criteria
for Cerebral Autosomal Dominant
Arteriopathy with Subcortical Infarcts and
Leukocencephalopathy. VAS-COG2015
2015.09. Tokyo, Japan

④ Yumi Yamamoto, Katsutoshi Kojima,
Daisuke Taura, Masakatsu Sone, Naohiro
Egawa, Kayoko Tsukita, Takako Enami,
Hidekazu Tomimoto, Toshiki Mizuno,
Ryosuke Takahashi, Masafumi Ihara,
Haruhisa Inoue. PATIENT-DERIVED IPS
CELLS FOR UNRAVELING THE
MOLECULAR PATHOGENESIS OF
CADASIL VAS-COG2015 2015.09. Tokyo,
Japan

⑤ 水野敏樹 遺伝性血管性認知症からみた
認知症の分子機構 第 33 回日本認知症
学会学術集会 2014 年 11 月 29 日 横浜

[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]

ホームページ

(<http://www.neurology-kpum.com/>)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

田中 雅樹 (Tanaka Masaki)

京都府立医科大学・医学研究科・教授

研究者番号：80264753

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

(4) 研究協力者

向井麻央 (Mukai Mao)

京都府立医科大学・医学研究科・大学院
生