

「血管および中枢神経の老化過程における Notch3  
シグナル受容体機能の遺伝的・生物学的解析」

(H11-長寿-012)

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）  
平成11年度 研究報告書

平成12年4月

主任研究者  
高橋 慶吉

(国立精神・神経センター神経研究所)

「血管および中枢神経の老化過程における Notch3  
シグナル受容体機能の遺伝的・生物学的解析」

(H11-長寿-012)

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）  
平成11年度 研究報告書

平成12年4月

主任研究者

高橋 慶吉

(国立精神・神経センター神経研究所)

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）  
総括研究報告書

血管および中枢神経の老化過程における Notch3 シグナル受容体機能の  
遺伝的・生物学的解析

主任研究者 高橋慶吉  
国立精神・神経センター 神経研究所疾病研究第6部 室長

研究要旨：本年度は Notch3 の発現動態及び脳内の発現分布を免疫学的に検討するとともにノックアウトマウスの作成を行った。培養細胞を用いた発現の解析から Notch3 は 250 kDa の単一膜蛋白質として細胞膜に存在し、細胞外部位のプロセッシングは認められなかった。細胞内部位のプロセッシングは細胞特異的に起こり、他の Notch 蛋白(Notch1 および Notch2)と異なるメカニズムで活性化されることが判明した。脳内では Notch3 は動脈壁の平滑筋層に分布し、その発現の特異性は CADASIL 患者に共通に認められる脳血管の病変部位と一致していた。一方、ノックアウトマウスに関してはターゲティングベクターの構築および ES 細胞への導入を完了し、相同組み換えが生じた細胞クローンの分離に成功した。引き続きキメラマウスの作成を試みており、このモデル動物は Notch3 の成熟個体における役割および加齢との関係を解明する有効な手段となる。

研究組織

分担研究者

花岡和則（北里大学理学部教授）

A. 研究目的

生体機能を考える上で脳血管系は最も重要な器官であり、その機能の低下や異常は中高齢者における主な死因であるばかりでなく、老年期痴呆症などの精神機能の障害に深く関わっている。わが国はこれまでに例のない高齢化社会を迎えつつあり、脳血管変性疾患の予防・治療法を確立することの重要性はこれまで以上に高まっている。このような背景から血管変性の分子機構を解明する研究の重要性が強調されている。従来、脳動脈変性には高血圧、高脂血症など

の卒中危険因子が注目されて来たが、最近になり遺伝要因が重要な役割を演じていることが示唆されている。しかし、関与する遺伝子やその詳細な分子機構は未だ解明されておらず、特に加齢と遺伝子との関係は全く不明である。

本研究では最近発見された家族性脳梗塞症 CADASIL(cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy)の原因遺伝子 Notch3 シグナル受容体に焦点を絞り、本遺伝子の異常が神経細胞や血管系の機能維持や老化過程にどのような影響をあたえているか分子生物学的・発生工学的手法を用いて解明し、脳血管障害の発症メカニズムや加齢による変性機序を明らかにすることを目的とする。

また、これらの結果を基礎に、脳血管障害の予防・治療法の開発ならびに血管変性に関与する未知遺伝子や危険因子の検索を目指したものである。

## B. 研究方法

本研究では Notch3 シグナル伝達系を十分に再現できる培養細胞株の樹立および Notch3 の発現・機能変化と血管や神経の変性との関係を詳細に解析できるモデル動物の作成が鍵となる。特に細胞老化は徐々に進行するので、正常および変異遺伝子を過剰発現して Notch3 の機能亢進させたマウスや培養細胞と遺伝子を破壊して発現を減少・消失させた場合と比較して Notch3 と老化との関係を解析することを計画した。

1. 培養細胞およびヒト脳における Notch3 の発現の解析: 全長鎖ヒト Notch3 cDNA は胎児脳 cDNA ライブラリーより分離した。また、細胞外部位(EGF-repeat と Lin/Notch repeat)を欠損した短縮型遺伝子並びに細胞内ドメイン(ICD)のみを持つ cDNA は全長鎖 cDNA を鋳型として PCR 増幅して構築した。これらの cDNA は遺伝子発現ベクター(EF-1 $\alpha$ プロモーター)に挿入した後、細胞 (COS 細胞、293 細胞)にリン酸-カルシウム法を用いて導入した。培養細胞中での Notch3 の発現はウエスタンブロット法により解析した。用いた抗体(4種類)は GST (glutathione-S-transferase)との融合蛋白質を家兎に免疫し、得られた抗血清よりアフィニティー精製した。一方、脳に於ける Notch3 の発現は 4%パラホルムアルデヒド固定した剖検脳より凍結切片を調整し、既法に従って上記抗体を用い免疫染色した。

2. 遺伝子操作マウスの作成: 平成 11 年度は作成が難しく時間がかかるノックアウトマウスから作成を開始した。ターゲティングベクターはマウスゲノムライブラリーより分離した Notch3 遺伝子の Exon4 に Neo 遺伝子を挿入した後、TK 遺伝子を持つベクターに連結して構築した。得られた組み換え体は電気穿孔法を用いてマウス ES 細胞株(TT2-F)に導入した。ES 細胞は G418 及びガンシクロヴィアを含む二重選択培地で培養を続け、クローン株を樹立した。これらの ES 細胞で相同組み換えが生じているか否かは、各 ES 細胞株から抽出した DNA についてサザンブロット法で検索した。

## 倫理面に対する配慮

本研究では遺伝子を導入した培養細胞やマウスの作成を行ったが、遺伝子の構築および遺伝子導入した培養細胞の樹立に関する実験は国立精神・神経センター神経研究所、組換え DNA 安全委員会の承認(P2 および EK1 の規制レベル)を得た。また、遺伝子操作マウスの作成に関しては北里大学、組換え DNA 安全委員会の許可を得るとともにマウスの処置については動物愛護精神にのっとり慎重に行った。

## C. 研究結果

1. 培養細胞における Notch3 の発現: 遺伝子導入した培養細胞(293 細胞と COS 細胞)では Notch3 受容体は 250 kDa の単一蛋白質として細胞膜に発現していることが判明した。この 250 kDa 蛋白は N 末および C 末端エピトープから作成された全ての抗体で検出されることから全長鎖蛋白質である

ことが明らかとなった。しかし、Notch3 の場合は Notch 受容体ホモログ (Notch1 および Notch2) で見い出されているような細胞外部位のプロセッシングは見い出せなかった。また、細胞内部位のプロセッシングは COS 細胞でのみ認められ、細胞特異的であることが示唆された。

2. Notch3 抗体による脳の免疫組織染色: 抗 Notch3 抗体により大脳白質、皮質および髄膜の血管壁が染色された。抗体に対する反応産物は主に上皮細胞層と基底膜層の間に見い出されことから Notch3 は血管平滑筋に発現していることが判明した。また、肥厚した血管壁には強い Notch3 の免疫反応が検出され、Notch3 は血管細胞の増殖に関係していることが示唆された。しかし、Notch1 や Notch2 とは異なりニューロンやグリア細胞は Notch3 抗体により染色されなかった。従って、Notch3 の発現は CADASIL 患者で見い出された血管変性と一致している。

3. ノックアウトマウスの作成: ターゲティングベクターを導入した ES 細胞を二重選択培地でクローニングを行い、多数の耐性株を分離した。そのうち約 100 株についてサザンブロット法により相同組み換え体の検索を行った結果、2 クローンが相同組み換えを生じていることが判明した。これらのクローンはマウス 8 細胞期胚へ顕微注入し、キメラマウスの作成中である。

#### D. 考察

Notch ファミリーは細胞間相互作用を仲介する受容体膜蛋白質 (Notch シグナル伝達系) として胚初期発生や形態形成過程での細胞発生運命の決定に関与していることが

既に明らかにされている。さらに、Notch3 が中年期に発症する家族性脳梗塞症 CADASIL の原因遺伝子であることは Notch3 シグナル伝達系が成熟個体においても重要な役割を果たしていることを示している。従って、成熟個体中での Notch3 の機能や発現動態の解明は CADASIL 発症機序を明らかにするうえで重要であるばかりでなく、神経細胞や血管細胞の加齢、障害修復過程における機能維持メカニズムの検索にも貴重な手掛かりを与えることは間違いない。今回我々は培養細胞での Notch3 発現の特異性と脳における発現分布を特異的抗体を用いて免疫学的に検討するとともに、遺伝子操作マウス (ノックアウト) の作成を行った。

マウスやヒトの研究から、Notch1 や Notch2 受容体の活性化機構には 2 箇所のプロセッシングが関与することが判明している。細胞内ゴルジ野で起こる第一のプロセッシングは細胞外部位を切断し、生じた N 末および C 末ポリペプチドはジスルフィド架橋されたヘテロ二量体として細胞膜上に移送される。第二のプロセッシングはリガンド結合後に細胞内部位で起り、細胞質内に遊離した Notch 細胞内ドメインは核へ移行し特異的遺伝子の発現制御に関与する。このようなプロセッシングは Notch 蛋白の細胞内輸送、リガンドとの結合、シグナル伝達に必須であることが指摘されている。しかし、Notch3 の場合には細胞外部位のプロセッシングは認められず、細胞内部位のプロセッシングは細胞特異性を示した。この結果は Notch3 のプロセッシングに関与するプロテアーゼ、リガンドとの結合様式等の活性化機序が他の Notch 蛋白とかな

り異なることを示唆する。従って、Notch3 シグナル系は発現の組織特異性による機能制御の他にプロセッシング酵素の細胞特異的差異より制御されている可能性を示し、非常に興味深い現象である。今後は切断部位の決定、プロテアーゼの同定、リガンド結合様式と酵素の活性化との関係を明らかにすることが必要である。

Notch3 は脳内では血管壁に局在しており、主に血管平滑筋細胞で発現していることが判明した。CADASIL 患者では脳管中膜層の崩壊と平滑筋細胞周囲に granular osmiophilic material (GOM)の沈着が報告されている。Notch3 の発現分布はこの様な CADASIL の病理学的特徴と一致しており、その発症機序には Notch3 シグナル伝達系の変異に起因する血管平滑筋細胞の機能異常（過増殖、細胞死）が関係している可能性が考えられる。従って、血管平滑筋細胞における Notch3 発現、シグナル伝達の活性化機構の解析が今後に残された課題となる。

ノックアウトマウスに関しては既に相同組み換えを生じた ES 細胞の分離に成功し、キメラマウスの作成に取りかかっている。このような個体を用いた研究は脳管症の発症機序や血管の老化過程を解明する上で必要不可欠であるばかりでなく、治療・予防法開発にも貴重な知見を提供する。

#### E. 結語

CADASIL 病因遺伝子 Notch3 の発現及び脳内分布を検討するとともに Notch3 遺伝子ノックアウトマウスの作成を行った。Notch3 は 250 kDa の単一膜蛋白質として細胞膜に発現し、その活性化に関するプロ

セッシングは他の Notch 蛋白と異なっていた。また、Notch3 は脳内では主に動脈壁の平滑筋層に分布し、この様な発現パターンは CADASIL の病理学的特徴である血管変性と一致していた。一方、ノックアウトマウスの作成は既に相同組み換えを生じた ES 細胞の分離に成功し、現在キメラマウスの作成中である。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- ① Shirota K, Takahashi K, Araki W, Maruyama K, Tabira T: Mutational analysis of intrinsic regions of presenilin 2 that determine its endoproteolytic cleavage and pathological function. *J. Biol. Chem.* 275: 3681-3686, 2000.
- ② Kamimura K, Takahashi K, Uyama E, Tokunaga T, Kotorii S, Uchino M, Tabira T: Identification of Notch3 mutation in a Japanese CADASIL family. *Alzheim. Dis. Assoc. Dis.* 13:1-4 1999.
- ③ 高橋慶吉 Notch シグナル伝達と CADASIL. *Dementia Japan* 13:81-88, 1999.
- ④ Chui D-H, Tanahashi H, Ozawa K, Ikeda S, Checler F, Ueda O, Suzuki H, Araki W, Inoue H, Shirota K, Takahashi K, Gallyas F, Tabira T: Transgenic mice with Alzheimer presenilin 1 mutations show accelerated neurodegeneration without amyloid plaque formation. *Nature Med.* 5: 560-564, 1999.
- ⑤ Shirota K, Takahashi K, Tabira T: Effects of presenilin N-terminal fragment on production of amyloid  $\beta$  peptide and

accumulation of endogenous presenilins.  
Neurosci. Lett. 262: 37-40, 1999.

- ⑥ Iijima M, Tabira T, Poorkaj P, Shellenberg GD, Trojanowski JQ, Lee BM-Y, Schmidt ML, Takahashi K, Nabika T, Matsumoto T, Yamashita Y, Yoshioka S, Ishino H: A distinct familial presenile dementia with a novel missense mutation in the tau gene. NeuroRep. 10:1-5, 1999.
- ⑦ Kameya S, Miyagoe Y, Nonaka I, Ikemoto T, Endo M, Hanaoka K, Nabeshima Y, Takeda S: alpha 1-syntrophin gene disruption results in the absence of neuronal-type nitric-oxide synthase at the sarcolemma but does not induce muscle degeneration. J. Biol. Chem. 274: 2193-2200, 1999.
- ⑧ Uchiyama K, Ohtuka R and Hanaoka K: cHox11L2, a Hox11 related gene, is expressed in the peripheral nervous system and subpopulation of spinal cord during chick development. Neurosci. Lett. 273: 97-100, 1999.
- ⑨ Uchiyama K, Ishikawa A and Hanaoka K: Expression of Lbx1 involved in the hypaxial musculature formation of the mouse embryo. J. Exp. Zool. 286: 270-279, 2000.

## 2. 学会発表

- ⑩ Takahashi K, Tabira T: The role of the Notch3 gene in CADASIL syndrome. International Symposium on Dementia from Molecular Biology to Therapeutics, September 11-13, 1999, Kobe
- ⑪ Kowalska A, Arima K, Asada T, Takahashi K, Tabira T: Tau gene mutation at codon 279 (N279K) in two Japanese brothers with

frontotemporal dementia and parkinsonism. International Symposium on Dementia from Molecular Biology to Therapeutics, September 11-13, 1999, Kobe

- ⑫ 小鳥居聡、高橋慶吉、田平武 西尾健資、有馬邦正、宇山英一郎、末永章人: 白質脳症を伴った家族性痴呆症患者における Notch3 遺伝子変異の解析. 第 40 回日本神経学会総会、5 月 19 日、1999、東京
- ⑬ 小鳥居聡、高橋慶吉、上村光平、宇山英一郎、内野誠、末永章人、山田治来、田平武: CADASIL 様症状を呈する家族性白質脳症家系における Notch3 遺伝子変異解析. 第 18 回日本痴呆学会、10 月 8 日、1999、熊本

G. 知的所有権の取得状況  
該当なし

厚生省科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

分担研究報告書

## 培養細胞および脳における Notch3 発現の特異性

主任研究者 高橋慶吉

国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第6部 室長

研究要旨: CADASIL 病因遺伝子 Notch3 の成熟個体における機能および遺伝子変異と発症機序を解明するために、培養細胞での発現及び脳内分布を検討した。Notch3 は 250 kDa の単一膜蛋白質として細胞膜上に存在することが判明した。他の Notch 蛋白質に見られた細胞外部位のプロセッシングは検出されず、細胞内部位のプロセッシングは細胞特異的であり、その活性化機序が異なっていることが明らかとなった。正常脳では Notch3 は動脈壁の平滑筋層に分布し、この発現パターンは CADASIL の患者にみられる主要な病変部位と一致していることが分かった。

研究組織

崔 得華（神経研究所 疾病研究第6部  
研究員）

城谷圭朗（ 同上 ）

### A. 研究目的

CADASIL (cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy)は臨床的には中年期以降に発症し、反復性卒中発作、前兆をともなう片頭痛、仮性球麻痺、皮質下痴呆を呈する常染色体優生遺伝様式を示す家族性脳梗塞性痴呆症である。病理学的には大脳白質の多発性脳梗塞と好酸性・PAS (periodic acid Schiff) 陽性顆粒沈着を特徴とする細・小動脈中膜変性を認め、脳動脈粥状硬化やアミロイド沈着を認めない特徴を示す。また、患者は一般に高血圧等の卒中危険因子を持たず、血管変性や白質病変の形成メカニズムが従来

の脳血管障害性痴呆症とは異なることが判明している。最近、本疾患原因遺伝子として 19 番染色体短腕(p13.1)にある Notch3 受容体遺伝子が同定され、現在までに28種類のミスセンス変異が欧米人および日本人家系に発見された。本遺伝子は脳血管障害性痴呆症の原因遺伝子として明らかにされた唯一のものである。

Notch ファミリーは細胞間相互作用を仲介する受容体膜蛋白質(Notch シグナル伝達系)として胚初期発生や形態形成過程で細胞の発生運命決定に重要な役割を果たしている。ヒトやマウスでは4種類の Notch 相同遺伝子が同定され、それらの蛋白質構造は無脊椎動物から脊椎動物まで非常によく保存されている。Notch3 は 2307 個のアミノ酸からなる膜蛋白質で、細胞外部分にはリガンドと結合する 34 個の EGF (epidermal growth factor)-like repeat と全ての Notch 蛋白質に共通に見られる



相同性の高い3個の Notch/Lin-12 repeat (L/N) が存在し、細胞内部位には転写因子が結合する6個の Ankyrin/Cdc10 repeat および蛋白分解に関係した PEST 配列が存在する。マウスやヒトの研究から、Notch (Notch1, Notch2)受容体の活性化と情報伝達には2種類のプロセッシングが関与することが判明している。第一のプロセッシングは細胞内ゴルジ野で furin 様 システインプロテアーゼが関与し、L/N repeat と膜貫通ドメイン(TM)間で起こる。生じたN末およびC末ポリペプチドはジスルフィド架橋され、ヘテロ二量体として細胞膜上に移送される。第二のプロセッシングはリガンド結合後に TM-Ankyrin/Cdc10 repeats 間で起り、細胞質に遊離した細胞内ドメイン(ICD)は核へ移行して特異的遺伝子の発現制御に関与する。最近、家族性アルツハイマー病遺伝子プレセニリンが Notch1 の細胞内プロセッシングに関与していることが報告された。しかし、Notch3 の活性化や情報伝達にどのようなプロセッシングが関係しているか全く不明である

CADASIL 患者に発見された全ての突然変異は Notch3 の細胞外 EGF repeat 領域に集中し、システインの増減に関係している。従って、Notch3 受容体とリガンドとの結合異常が病因と考えられているが、そのメカニズムは明らかではない。そこで、本研究では Notch3 の成熟個体での役割およびシグナル伝達機構を明らかにするために、まず、遺伝子導入した培養細胞やヒト組織中での発現を免疫学的、組織学的手法で解析した。

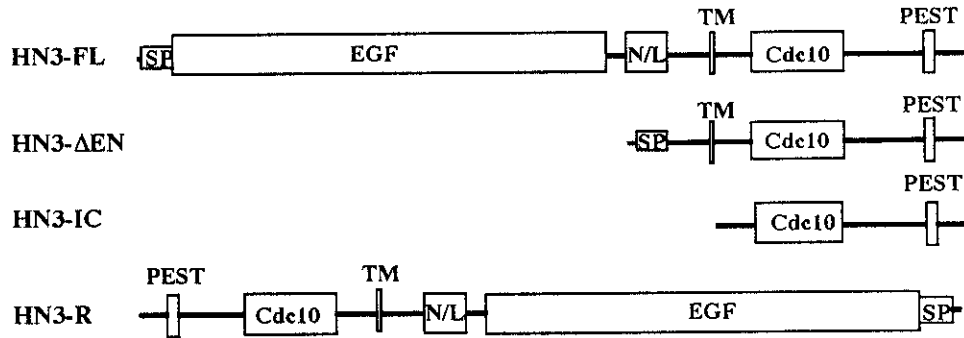
## B. 研究方法

1. 導入遺伝子の構築: ヒト Notch3 cDNA は PCR 増幅したエクソンをプローブに用いて胎児脳 cDNA ライブラリーより単離した。細胞外ドメイン EGF-like repeat と L/N repeat を欠失した短縮型 cDNA (HN3- $\Delta$ EN) および細胞内ドメインのみを持つ cDNA (HN3-IC) は全長鎖 cDNA (HN3-FL) を鋳型として PCR 増幅により作成した (図 1, A)。HN3- $\Delta$ EN には別に PCR 増幅したシグナルペプチド部位を連結した。これらの cDNA は発現ベクター (EF-1 $\alpha$  プロモーター) に挿入して細胞に導入した。

2. 抗体の作成: Notch3 は非常に大きな膜蛋白質であるため、細胞外部位および細胞内部位各々2ヵ所について抗体を作成した (図 1, B)。まず、細胞外部位 (アミノ酸番号 42-180 および 1497-1624) と細胞内部位 (2056-2142 および 2261-2321) に相当する各領域の DNA 断片を全長鎖 cDNA を鋳型として PCR 増幅した後、GST (glutathione s-transferase) 遺伝子の 3' 側に連結した。この組み換え体は大腸菌に導入し、発現した GST 融合蛋白質を分離して抗原として兎に免疫した。得られた抗血清は GST 融合蛋白質アフィニティカラムで精製してそれぞれ抗 Notch3 N1, N2, C1 および C2 抗体とした。

3. ウエスタンブロット解析: 発現ベクターに組み込んだ Notch3 cDNA は COS 細胞 (Green Monkey COS-7 kidney cells) および 293 細胞 (human embryonic kidney 293 cells) にリン酸カルシウム法で導入した。48 時間後に細胞を集め 1% Triton X-100 を含む Solution A (0.1 M Tris-HCl, pH 7.4, 0.15 M NaCl, protease inhibitor

### A) Notch3 constructs



### B) Antibodies

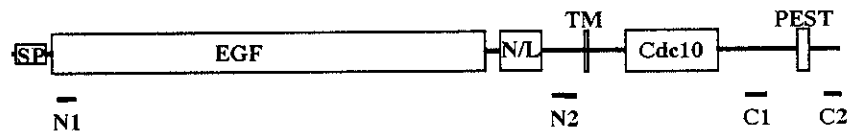


図1. 細胞に導入した cDNA の構造(A)と抗体作成に用いたエピトープ領域(B)  
HN3-R は逆方向の Notch3 cDNA を含む。

cocktail) で可溶化後、SDS-PAGE にて蛋白質のサイズ分画した。蛋白質はニトロセルロース膜に転写し、既報に従ってブロッキング処理を行った後、抗体と反応させた。反応産物は化学蛍光法で検出した。

4. 免疫組織染色：組織染色には検常人脳組織を用いた。脳組織は剖検時に 1 cm の小ブロックにカットして 4 %パラホルムアルデヒド液中 24 時間固定した後、20 % ショ糖液にて 4°C で保存した。固定した脳組織はミクロトームで切片にした後、既報に従ってブロッキング処理し、抗体と反応させた。免疫反応産物は蛍光標識した抗兔抗体で染色後、コンフォーカル顕微鏡で検索した。

倫理面に対する配慮

本研究において行った遺伝子の構築およ

び遺伝子導入した培養細胞の樹立に関する実験は国立精神・神経センター神経研究所、組換え DNA 安全委員会の承認(P2 および EK1 の規制レベル)を得た。

### C. 研究結果

1. Notch3 蛋白質の検出: Notch3 のプロセッシングおよび抗体の特異性を検討するために cDNA を導入した 293 細胞の抽出蛋白質についてウエスタン解析を行った。図 2 に示すように、HN3-FL を導入した細胞では 250 kDa のバンドが全ての抗体により検出された。このバンドは予想される Notch3 蛋白質のサイズよりも大きい。cDNA を導入した細胞でのみ見出されること、N 末端および C 末端に対する全ての抗体に反応することから全長鎖 Notch3 蛋白質に由来すること明らか

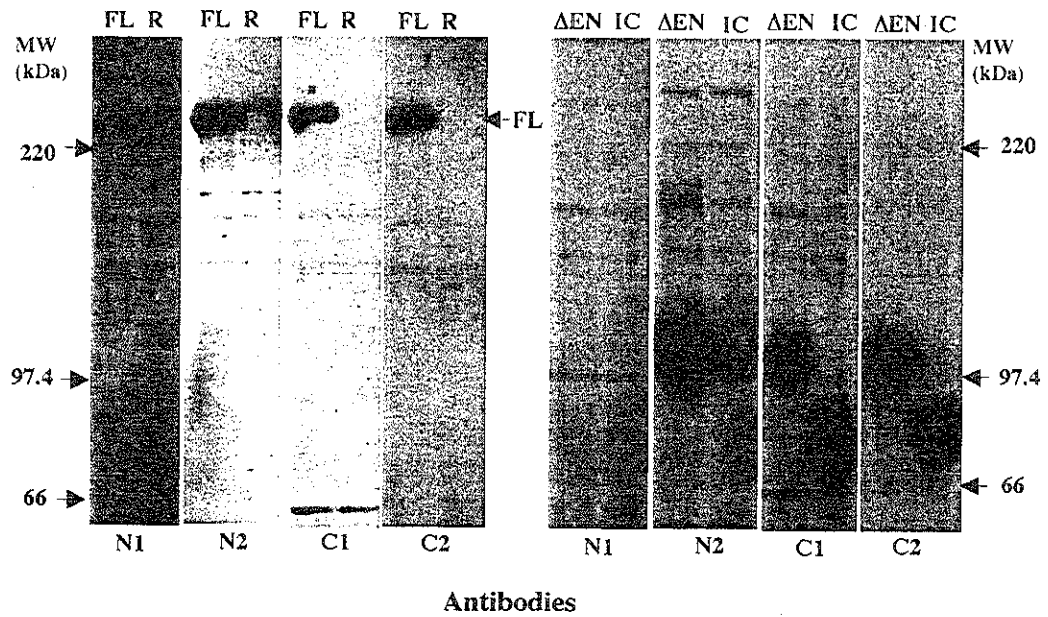


図 2. Notch3 cDNA を導入した 293 細胞抽出蛋白質のウエスタンブロット解析。  
導入した cDNA および用いた抗体の種類はそれぞれパネルの上下に示す。  
FL:全長鎖蛋白

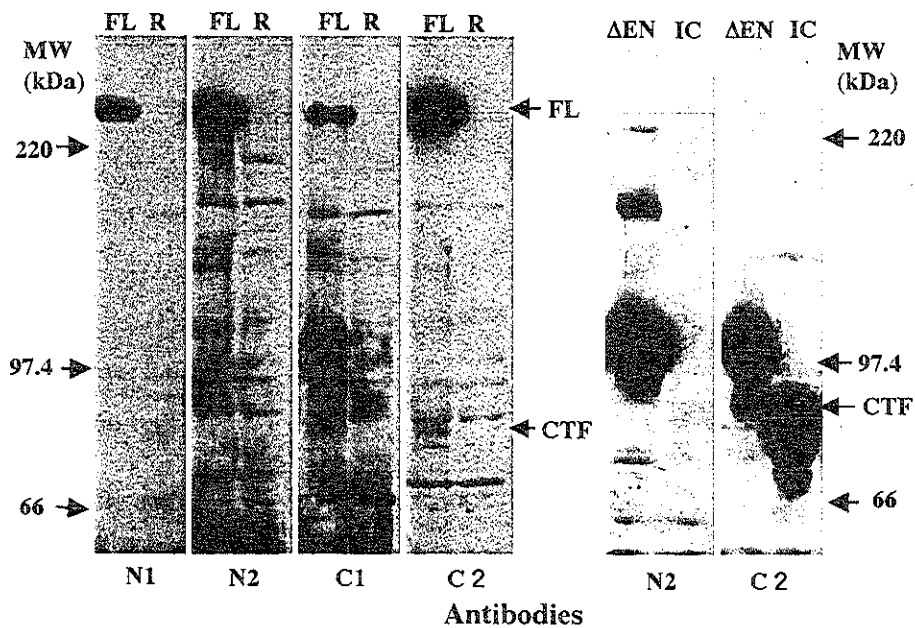


図 3. Notch3 cDNA を導入した COS 細胞抽出蛋白質のウエスタンブロット解析。  
導入した cDNA および用いた抗体の種類はそれぞれパネルの上下に示す。  
FL:全長鎖蛋白, CTF: 80 kDa の細胞内ドメイン

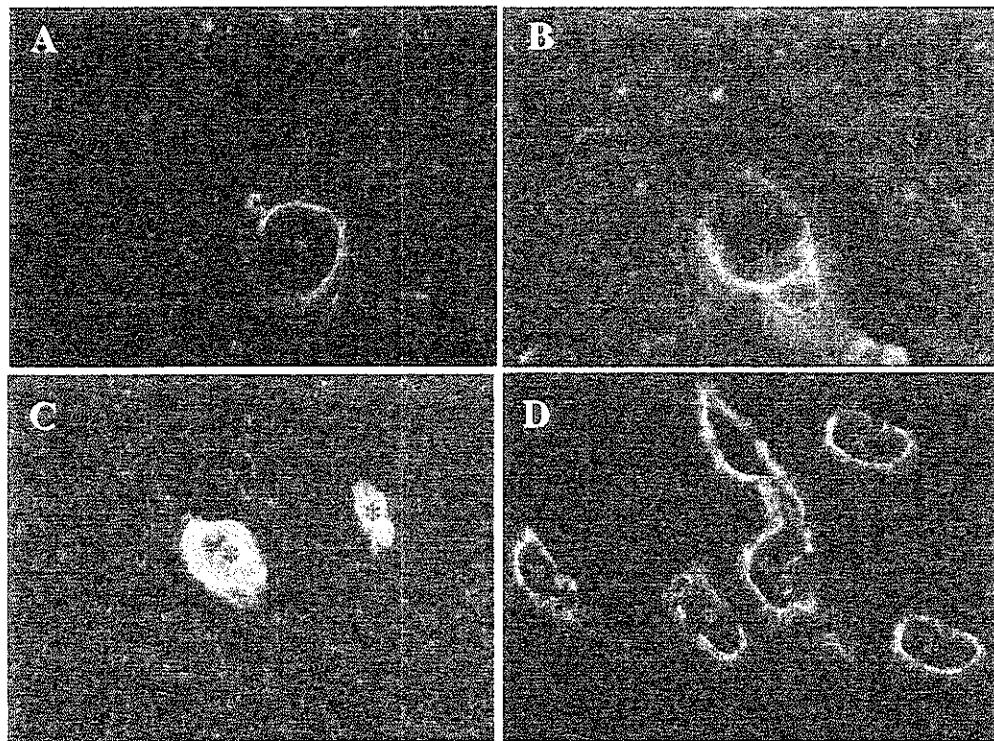


図 4. 抗 Notch3 抗体を用いた脳免疫組織染色

A: N2 抗体で染色した白質, B: C1 抗体で染色した皮質

C: C2 抗体で染色した皮質, D: C2 抗体で染色した髄質

矢印は染色されない血管、星印は染色された血管を示す。

となった。HN3- $\Delta$ EN を導入した細胞では 110 kDa のバンドが N2, C1 および C2 抗体により検出されたが、予想されたようにこのバンドは N1 抗体とは反応しなかった。HN3-IC を導入した細胞では 80 kDa のバンドが C 末端部位に対して作成した C1 および C2 抗体のみにより検出された。しかし、これら 3 種類の蛋白質を除いて、遺伝子導入細胞でのみ検出されるバンドは見い出せなかった。これらの結果は Notch3 の細胞外ならびに細胞内部位のプロセッシングが 293 細胞で起らないこと、Notch3 抗体は特異性の高いものであることを示している。一方、HN3-FL を導入した COS 細胞では、250 kDa のバンドの他に 80 kDa のバンドが C1 および C2

抗体で検出されたが、細胞外プロセッシング産物は認められなかった (図 3)。この 80 kDa 蛋白質は HN3- $\Delta$ EN を導入した細胞でも検出され、移動度が ICD と一致していることから細胞内部位のプロセッシング産物であることが明らかとなった。従って、Notch3 は単一膜蛋白質として細胞膜上に発現し、細胞内プロセッシングによる活性化機序は細胞特異的である。

2. 抗 Notch3 抗体による脳免疫組織染色: 脳における Notch3 の発現分布を明らかにするために組織学的検索を行った。図 4 に示すように、大脳白質、皮質および髄膜とも血管壁が染色された。陽性反応産物は主に内皮細胞層と基底膜層の間

に見い出され、Notch3 は血管平滑筋細胞で発現していることが判明した。また、肥厚した血管壁には強いNotch3の免疫反応が検出され、Notch3 は血管細胞の増殖に関係していることが示唆された。しかし、Notch1 や Notch2 とは異なりニューロンやグリア細胞はNotch3抗体により染色されなかった。

#### D. 考察

CADASIL 原因遺伝子である Notch3 の発見は Notch3 シグナル伝達系が成熟個体においても重要な役割を果していることを示している。従って、成熟個体中での Notch3 の機能や発現動態の解明は CADASIL 発症機序を明らかにするうえで重要であるばかりでなく、神経細胞や血管細胞の分化・増殖、細胞死など恒常性維持メカニズムの検索にも貴重な手掛かりを与えることは間違いない。今回我々は Notch3 の培養細胞での発現と脳における分布を特異的抗体を用いて免疫学的に検討した。

Notch3 cDNA を導入した培養細胞では細胞外部位のプロセッシングは観察されず、Notch3 は 250 kDa バンドの単一膜蛋白質として細胞膜に発現していることが判明した。Notch1 や Notch2 で報告された細胞外プロセッシングの切断箇所は R(X)RR や KR, RK などのアミノ酸配列を示し、furin プロテアーゼの認識配列と一致する。また、形成されたヘテロ 2 量体は構築はリガンドとの結合に必須であることが指摘されている。Notch3 では同様なアミノ酸配列(RARR)が L/N repeat と TM ドメイン間に見い出されるが、この配

列は furin プロテアーゼの認識配列となっていない可能性が考えられる。従って、Notch3 受容体の形成機構やリガンドとの結合様式は他の Notch 受容体とかなり異なっていることが考えられる。一方、細胞内部位のプロセッシングに関しては、Notch1 や Notch2 では EGF repeat と L/N repeat を欠失した短縮型蛋白のみに認められ、その切断部位は細胞膜内に存在することが報告されている。しかし、Notch3 の場合には細胞内部位のプロセッシングは細胞特異性を示し、更に短縮型のみならず全長鎖蛋白でも見い出された。従って、プロセッシングの関与するプロテアーゼが Notch 蛋白質間でかなり異なることが考えられる。このような活性化メカニズム差異は Notch シグナル伝達系の組織特異性に関係している可能性があり、非常に興味深い。今後は切断箇所の検索、関与するプロテアーゼの同定、リガンド結合との関係を明らかにすることが必要である。

CADASIL 患者では脳血管中膜層の崩壊と PAS 陽性顆粒の沈着を特徴とする血管変性が共通に認められ、最近の電子顕微鏡による検索では平滑筋細胞周囲に granular osmiophilic material (GOM) の沈着が報告されている。Notch3 抗体を用いた検索から Notch3 の発現が脳内では血管壁に局在しており、主に血管平滑筋細胞に検出されることが判明した。このような Notch3 の発現分布は CADASIL の主要な病変箇所と一致していることになる。従って、CADASIL 発症機序は Notch3 シグナル伝達系の変異に起因する血管平滑筋細胞の機能異常(過増殖、細胞死)が

関係していると考えられる。

## E. 結語

CADASIL 病因遺伝子 Notch3 の発現及び脳内分布を検討した。Notch3 は 250 kDa の単一膜蛋白質として細胞膜に存在し、他の Notch 蛋白で見いだされた細胞外部位のプロセッシングは起らない。細胞内部位のプロセッシングは細胞特異的であった。Notch3 は脳内では動脈壁に検出され、主に平滑筋層に分布していた。これらの結果は Notch3 の活性化・シグナル伝達機構が他の Notch 蛋白と異なること、脳内発現パターンが CADASIL の病理学的特徴である血管変性と一致していることを示している。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- ① Shirotani K, Takahashi K, Araki W, Maruyama K, Tabira T: Mutational analysis of intrinsic regions of presenilin 2 that determine its endoproteolytic cleavage and pathological function. *J. Biol. Chem.* 275, 2000 in press.
- ② Kamimura K, Takahashi K, Uyama E, Tokunaga T, Kotorii S, Uchino M, Tabira T: Identification of Notch3 mutation in a Japanese CADASIL family. *Alzheim. Dis. Assoc. Dis.* 13:1-4 1999.
- ③ 高橋慶吉: Notch シグナル伝達と CADASIL. *Dementia Japan* 13:81-88, 1999.
- ④ Chui D-H, Tanahashi H, Ozawa K, Ikeda S, Checler F, Ueda O, Suzuki H, Araki W,

Inoue H, Shirotani K, Takahashi K, Gallyas F, Tabira T: Transgenic mice with Alzheimer presenilin 1 mutations show accelerated neurogeneration without amyloid plaque formation. *Nature Med.* 5: 560-564, 1999.

- ⑤ Shirotani K, Takahashi K, Tabira T: Effects of presenilin N-terminal fragment on production of amyloid  $\beta$  peptide and accumulation of endogenous presenilins. *Neurosci. Lett.* 262: 37-40, 1999.
- ⑥ Iijima M, Tabira T, Poorkaj P, Shellenberg GD, Trojanowski JQ, Lee BM-Y, Schmidt ML, Takahashi K, Nabika T, Matsumoto T, Yamashita Y, Yoshioka S, Ishino H: A distinct familial presenile dementia with a novel missense mutation in the tau gene. *NeuroRep.* 10:1-5, 1999.
2. 学会発表
- ⑦ Takahashi K, Tabira T: The role of the Notch3 gene in CADASIL syndrome. International Symposium on Dementia from Molecular Biology to Therapeutics, September 11-13, 1999, Kobe
- ⑧ Kowalska A, Arima K, Asada T, Takahashi K and Tabira T: Tau gene mutation at codon 279 (N279K) in two Japanese brothers with frontotemporal dementia and parkinsonism. International Symposium on Dementia from Molecular Biology to Therapeutics, September 11-13, 1999, Kobe
- ⑨ 小鳥居聡、高橋慶吉、田平武 西尾健資、有馬邦正、宇山英一郎、末永章人:

白質脳症を伴った家族性痴呆症患者における Notch3 遺伝子変異の解析. 第 40 回日本神経学会総会、5月19日、1999、東京

- ⑩小鳥居聡、高橋慶吉、上村光平、宇山英一郎、内野誠、末永章人、山田治来、田平武: CADASIL 様症状を呈する家族性白質脳症家系における Notch3 遺伝子変異解析. 第 18 回日本痴呆学会、10月8日、1999、熊本

G. 知的所有権の取得状況

該当なし

CADASIL モデルマウス（Notch3 シグナル受容体遺伝子欠損マウス）  
の作成に関する研究

（分担研究者）花岡和則 北里大学理学部分子発生学講座 教授

研究要旨：Notch3 遺伝子欠損マウスを作成することにより、家族性脳血管性痴呆（CADASIL）のモデルマウスを作成することを目標に研究を進めている。ジーンターゲットング法により Notch3 遺伝子座で相同組み換えが生じた ES 細胞を分離し、サザンブロットにより確認した。

A. 研究目的

加齢に起因する脳血管や中枢神経の変性は脳血管性痴呆症やアルツハイマー病等の老年期痴呆症の原因であり、その過程には遺伝的要因が重要な役割を果たしている。従って、血管や神経細胞の生存および機能維持に関与する遺伝子の解析は、老化変性或細胞死の機序を解明する最も有効な手段となる。

最近、家族性脳血管性痴呆症 CADASIL (cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy) の病因遺伝子であることが判明した Notch3 シグナル受容体は、中枢神経や動脈変性に関係することが初めて示された遺伝子であり、血管細胞の恒常性維持や老化過程に関する分子・細胞レベルの解析の突破口として期待されている。

本研究では、Notch3 遺伝子を欠失したノックアウトマウスを作成し、血管細胞や神経細胞における Notch3 の機能、加齢に伴う発現変動や遺伝子変異に起因する活性変化を明らかにするとともに血管・神経細胞の老化変性との関係を解明することを目的とする。さらに、作成したマウスを用いて Notch3 シグナル伝達系に関与する遺伝子群

の探索および活性に影響を与える環境因子や薬品の検索により、老化の進行に対する影響を明らかにする予定である。これらの研究成果は加齢に伴う動脈硬化のメカニズム、変性或神経細胞死に関与する未知遺伝子や危険因子の研究などに貴重な手がかりをあたえるばかりでなく我が国に多い脳血管性痴呆症およびアルツハイマー病発症機序の解明に新しい方向を提供するものと期待される。

A. 研究方法

1. ES 細胞株：実験に用いた TT2-F 胚幹細胞株は、マイトマイシン処理したフィーダー細胞上、ロットチェックした牛胎児血清 20% 含む Evans 培地中で、1~2 日毎に継代した。

2. Targeting vector: マウス (balb/c) ゲノムライブラリー（入フェージ）よりヒト Notch3 cDNA をプローブとしてスクリーニングを行いポジティブクローン 4 個を分離した。これらのクローンをシーケンシングして Exon3-Exon16 を含む 1 個を選びだした。この DNA を Sac I-Sal I 消化して pUC18 の Sall サイトにサブクローンし、さらに Exon4 の BamHI サイトに Neo



遺伝子を挿入した。得られた組み換え体 DNA は SalI 消化後、TK 遺伝子を含むベクターの SalI サイトに挿入した。

3. 相同組み換え体の分離: マウス ES 細胞へのターゲティングベクター導入には、電気穿孔法を用いた。トリプシン処理で解離した E14 ES 細胞 ( $10^7$  Cell) を 0.5ml のカルシウム、マグネシウムを除いたハンクス生理食塩水に懸濁し、ベクター DNA 12.5  $\mu$ g を加えた後、ジーンパルサー (バイオラド製) を用いて 200V, 500  $\mu$ F の条件で高圧電気パルス処理を施した。2 日間通常の培養を行った後、培地を選択培地 (G418, 400  $\mu$ g/ml; gancyclovir,  $2 \times 10^{-6}$  M) に変更し、さらに培養を続けた。ネオマイシン及びガンシクロヴィアによる二重選択培養下で生き残った ES 細胞のコロニーを取り出し更に培養を続け、クローン株として樹立した。これらの ES 細胞株で相同組み換えが生じているか否かは、各 ES 細胞株から抽出した DNA を用いてサザンブロット法で確認した。

4: キメラマウスの作成: 相同組み換えが生じたことが確認できた ES 細胞を BALB/c または ICR マウス 8 細胞期胚に顕微注入し、仮親マウス子宮内に移植した。

#### 倫理面に対する配慮

本研究では Notch3 ノックアウトマウスの作成を行ったが、実験遂行にあたり北里大学、組換え DNA 安全委員会の許可を得るとともにマウスの処置については動物愛護精神にのっとり慎重に行った。

#### C. 研究結果

ターゲティングベクターを TT2-F ES 細胞株に導入した後、G418 および gancyclovir を含む二重選択培地下でクローニングし、多数の耐性株を分離した。そのうちの約 100 株について、相同組み換え体の有無をサザ

ンブロット法で検索した (図 2)。各細胞株から抽出した DNA を BamHI で digestion した。図 1 に示したように相同組み換え体では 4.0kb, endogenous な Notch3 遺伝子では 3.4kb, targeting vector では 2.8kb の DNA 断片がそれぞれ生じる No.84, No.94, No.122 の 3 個のクローンで 4.0kb のバンドが検出された (図 2)。確認のためにさらに NcoI digestion した DNA のサザン解析を行ったところ、No.84 は false positive であることが判明した。従って No.94 および No.122 の 2 株の ES 細胞で相同組み換えが生じていることが確定した。現在さらに相同組み換え体を検索すると同時に No.94, No.122 両クローンについてはマウス 8 細胞期胚へ顕微注入し、キメラマウス作成に取り組んでいる。

#### D. 考察

Notch3 遺伝子ノックアウトマウスの作成についてはほぼ予定通り進行しており、近い将来 Notch3 遺伝子ホモ欠失マウスを手にすることができると思われる。

Notch は細胞間相互作用を仲介する受容体膜蛋白質 (Notch シグナル伝達系) として胚初期発生や形態形成過程で細胞の発生運命の決定に関与していることが知られている。さらに FAD 原因遺伝子プレセニリンが Notch 受容体の活性調節因子であることが示されて成熟神経細胞の生存・機能との関係でも注目されている。また、主任研究者 高橋らにより Ntoch3 が成人脳の小動脈中膜層に特異的に発現していることが明らかにされ、本遺伝子が成熟個体における血管の増殖や機能維持に関与していることが示唆された。今後は Notch3 の機能、血管・神経細胞の老化変性に於ける役割および遺伝子変異と細胞死との関係等の解明が研究の焦点となると思われる。本研究では、これらの

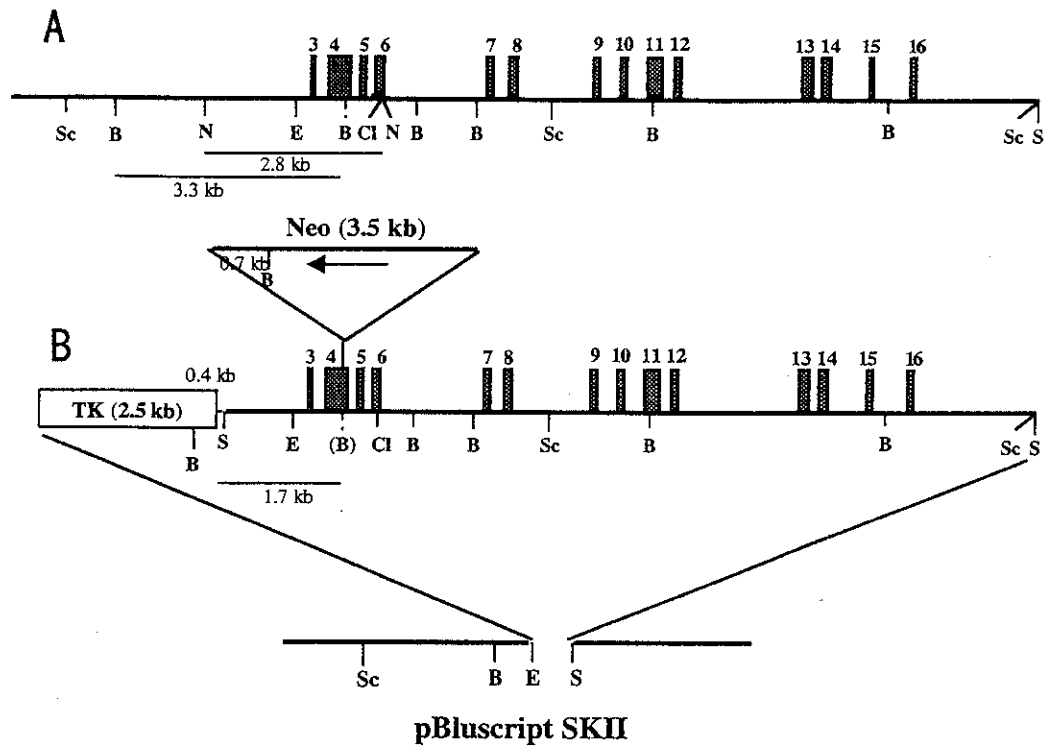


図1 Notch3 ターゲッティングベクター

A Notch3 遺伝子の模式図 B Notch3 ターゲッティングベクター  
 制限酵素切断部位 S:Sal I, E:EcoR I, B:BamH I, Cl:Cla I, Sc:Sac I

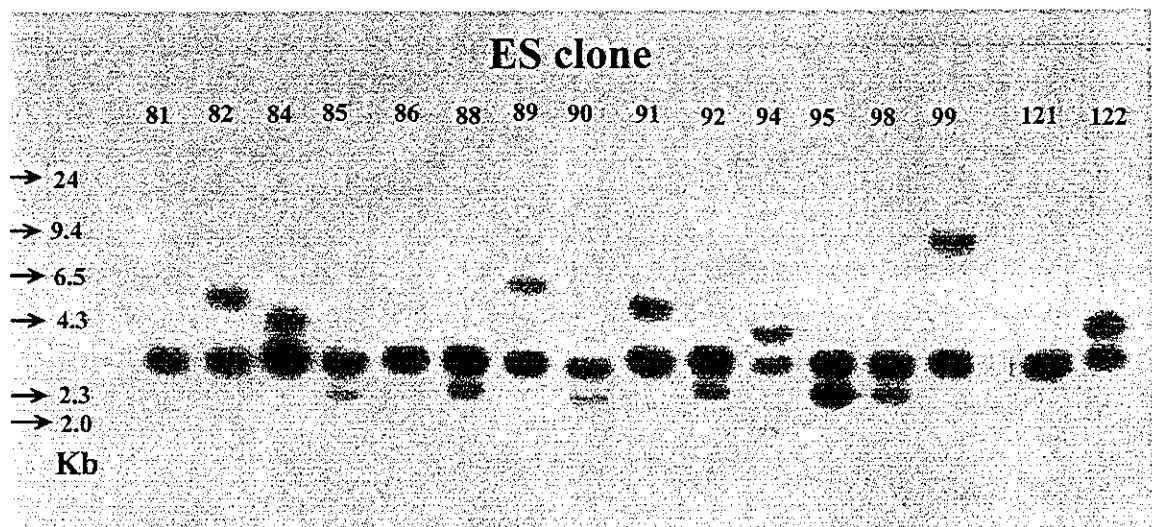


図2 サザンブロットによる Notch3 相同組み換え体の検索

各 ES クローンより抽出した DNA を BamH I で切断した。

4.0 Kb : 相同組み換え体 3.4Kb : 内在性 notch3 2.3Kb vector DNA

ES clone No 94 と No 122 で相同組み換えが生じている。

研究の展開の鍵となる Notch3 ノックアウトマウス作成に焦点を絞り研究に取り組む予定である。

#### E. 結語

Notch3 の発現・機能変化と血管や神経の老化変性との関係を詳細に解析できるモデル動物であると同時に CADASIL モデルマウスとして興味深い Notch3 ノックアウトマウス作成を試みた。相同組み換え体 ES 細胞を分離することに成功し、現在キメラマウス作成に取り組んでいる。

#### F. 研究発表

##### 論文発表

- ①Kameya S, Miyagoe Y, Nonaka I, Ikemoto T, Endo M, Hanaoka K, Nabeshima Y, Takeda S: alpha 1-syntrophin gene disruption results in the absence of neuronal-type nitric-oxide synthase at the sarcolemma but does not induce muscle degeneration. J. Biol. Chem. 274: 2193-2200, 1999.
- ②Uchiyama K, Ohtuka R and Hanaoka K: cHox11L2, a Hox11 related gene, is expressed in the peripheral nervous system and subpopulation of spinal cord during chick development. Neurosci. Lett. 273: 97-100, 1999.
- ③Uchiyama K, Ishikawa A and Hanaoka K: Expression of Lbx1 involved in the hypaxial musculature formation of the mouse embryo. J. Exp. Zool. 286: 270-279, 2000.

#### G. 知的所有権の取得状況

該当なし