

「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12年度 研究報告書

平成13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

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: Notch3 受容体の突然変異がその発現動態やシグナル伝達機能にどのような影響を与えるか検索するとともに発達期の脳組織中での Notch3 発現変動を免疫学的手法で解析した。また、本遺伝子と血管形成との関係を解析するためにノックアウトマウスの作成を試みた。培養細胞を用いた解析から Notch3 は遺伝子変異の有無にかかわらず活性型受容体が形成されることが判明した。リガンドにより誘導される転写調節活性はミスセンス変異により変動し、リガンドとの相互作用が変化していることが示唆された。胎生初期の脳中では Notch3 の発現は未熟な神経細胞やグリアにも認められるが、中期以降から成人にいたるまで動脈及び静脈の平滑筋層や外膜にのみに局在していた。この結果は Notch3 が血管細胞のみならずニューロンやグリアの発生・分化誘導に重要な因子であることを示している。一方、ノックアウトマウスに関しては相同組み換えが生じた ES 細胞クローンの分離に成功したが、この ES 細胞を用いて作成したキメラ胚は発生致死であった。

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

動脈硬化や血栓形成に代表される血管の老化は脳卒中や心筋梗塞などの血管性疾患の主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も深く関わっている。これら血管の疾患による死亡はこれまでに例のない高齢化社会を迎えて益々増加してくるものと想定される。そのため、これらの疾患の原因となる因子を解明して行くことが、今後の研究の根元的な課題となっている。このような血管機能の低下や異常の促進因子として従来高血圧、高脂血症な

ど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。

B. 研究方法

1. 本年度は Notch3 の遺伝子変異がプロセシング等の発現動態やその転写制御活性にどのような影響を与えるか解析した。CADASIL 患者で見い出された Notch3 のミスセンス突然変異(R90C, R133C, C185R, R213K)は野生型 Notch3 cDNA (HN3-WT)に *in vitro* 点突然変異法を用い導入し、発現ベクター(EF-1 α プロモーター)に挿入した。Notch3 蛋白質の発現やプロセシングは cDNA を HEK293 細胞(human embryonic kidney 293cells) 及び COS 細胞(Green Monkey COS-7 kidney cells)に導入した後、ウエスタンブロットにより解析した。Notch3 受容体活性の測定はレポーター遺伝子(HES 1-luciferase)とリガンド(Jagged 1 及び Delta-1)を用いて次の様に測定した。まず、HEK293 細胞に Notch3 cDNA とレポーター遺伝子を導入した後、リガンド安定発現株を加え混合培養した。1 日後、細胞を集めてルシフェラーゼ活性を測定して受容体活性とした。

2. Notch3 がどのような細胞の発生・分化に関与するか明らかにするために、発達期の脳組織中での発現変化を免疫組織学的に検討した。実験にはヒト剖検脳(早産児及び成人)を対象とした。ホルマリン固定パラフィン包埋切片は既報に従ってブロッキング処理し、Notch3 抗体(AbN2, AbC2)と反応させ後、免疫組織化学的染色(ABC 法)を行った。

3. Notch3 と血管形成や神経機能との関係を詳細に解析できるノックアウトマウスの作成を試みた。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 遺伝子を挿入して構築した。得られた組み換え体はマ

ウス ES 細胞株(TT2-F)に導入した後、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てクローン株を樹立した。各クローン株における遺伝子相同組み換えの有無はサザンブロット法で検索した。得られたポジティブクローン(2 株)は BALB/c または ICR マウス 8 細胞期胚に顕微注入した。1 日培養した後、杯盤胞期に達した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。

研究結果

1. 遺伝子変異による Notch 発現動態及び受容体活性の変化: Notch3 のプロセシングは細胞特異性を示し、HEK293 細胞では細胞外プロセシングのみが起こり、COS 細胞では細胞内プロセシングのみが検出された。ミスセンス変異を持つ Notch3 cDNA (R90C, R133C, C185R, R213K)を両細胞に導入した場合でもプロセシング産物のサイズ、量、局在性に変化は認められなかった。この結果はミスセンス変異が Notch3 受容体の細胞膜への移行、プロセシングに関与するプロテアーゼ活性や細胞内ドメインの膜結合状態に影響を与えないことを示しており、活性型受容体として細胞膜に存在していることが判明した。一方、リガンドによ

により誘導される Notch3 受容体活性に関しては、レポーター遺伝子の転写はミスセンス変異を持つ Notch3 で増加が認められ、この作用はリガンド特異的であった。従って、Notch3 の変異はリガンドとの相互作用やそれに誘導されるシグナル伝達に関与している可能性が考えられる。

2. Notch3 発現の加齢変化: 血管や神経細胞の発生への関与を明らかにするために発達期における脳組織中での Notch3 発現を検討した。Notch3 の発現は早産児から成人に至るまで動脈の中膜平滑筋層や外膜で認められ、静脈の中膜にも軽度の発現が検出された。また、在胎初期には皮質や白質の未熟な神経細胞やグリアにも観察されが、35週以降は発現が消失した。

3. ノックアウトマウスの作成: 相同組み換えが生じた ES 細胞を 8 細胞期胚に顕微注入してキメラマウスの作成を試みた。いずれのクローンを用いてもキメラマウスは得られず、ほとんどの胚は受精後 10 日以内に死亡していることが判明した。

D. 考察

血管の発生・分化あるいは新生・再生には種々の成長因子が関与するが、これらの成長因子どの様に発現調節されているか明らかでない。Notch3 は成熟個体において血管細胞にのみ発現することや細胞間相互作用を仲介する受容体膜蛋白質として細胞発生運命の決定に関与する点から判断して血管細胞の分化・再生を制御するマスター遺伝子の可能性が考えられる。従って、Notch3 の活性化機序や発現の加齢変化の解析は CADASIL 発症機序を解明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。今年度は培養細胞での Notch3 のプロセッシングや受容体活性と遺伝子変異との関係、脳組織中での発現の加齢変化を検討するとともに、ノックアウトの作成を試みた。

Notch 受容体の活性化には細胞外部位のプロセッシングによるヘテロ二量体の形成とリガンド結合後に起こる細胞内部位のプロセッシングが関与することが報告されている。Notch3 ではプロセッシングは細胞特異性を示し、ヘテロ二量体が形成されない特徴を示すことが判明した。また、ミスセンス変異の有無にかかわらず活性型受容体が検出され、Notch3 の発現動態に異常は認められなかった。一方、リガンドにより誘導される受容体活性はミスセンス変異により亢進し、その作用はリガンド特異性を示すことが明かとなった。この様なリガンドとの相互作用の変動は CADASIL 発症メカニズムに関与している可能性が考えられる。しかし、この様な受容体活性の異常が異なるミスセンス変異及び他の培養細胞を用いても認められるか今後詳細に検討する必要がある。

本研究から脳組織中での Notch3 の発現は胎生初期には ventricular zone や cortical plate へ移動中の未熟なニューロンやグリアで検出され、中期以降から成人にいたるまでは血管平滑筋層や外膜に局在することが明かとなった。観察された発現の特徴は Notch3 が神経細胞の発生・分化のみならず血管前駆細胞に発現して平滑筋の分化誘導や血管形成に重要な役割を果たしていることが示し、非常に興味深い結果である。また、Notch3 の発現分布は CADASIL の病理学的変性箇所と一致しており、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。今後は Notch3 を発現している細胞の性質や相互作用するリガンドの種類を特定して、個々の細胞分化・増殖のどの段階で Notch3 が関与するか明らかにすることが課題となる。

ノックアウトマウスに関しては ES 細胞から作成したキメラ胚は発生致死を起こすことが明かとなった。Notch1 や Notch2 のノックアウトマウスではヘテロ接合体には発生異常は認められないことから変異した Notch3 蛋白質が初期発生に影響を与えていることが考えられる。しかし、Notch3 の発現量の減少が原因である可能性も否定できないため、現在、組織特異的ノックアウトが可能な cre-lox システムを用いてターゲティングベクターの作成及び ES 細胞のクローニングを進めている。このような個体を用いた研究は脳血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

Notch3 は遺伝子変異の有無にかかわらず活性型受容体が形成されるが、リガンドによる転写調節活性は変動し、リガンドとの相互作用の異常が CADASIL の発症に関係していることが示唆された。Notch3 の発現は脳の発達初期には神経細胞やグリアに、中期以降から成人にいたるまでは動脈及び静脈の平滑筋層や外膜のみに検出された。この発現の特異性は Notch3 がニューロンやグリアのみならず血管細胞の発生・分化誘導に重要な因子であることを示している。ノックアウトマウスに関しては相同組み換えを生じた ES 細胞を分離したが、このクローンから作成したキメラ胚は発生

致死であった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ① Kotorii S, Takahashi K, Kamimura K, Nishio T, Arima K, Yamada H, Uyama E, Uchino M, Suenaga A, Matsumoto M, Kuchei G, Rouleau G A and Tabira T: Mutations of the Notch3 gene in non-Caucasian patients with suspected CADASIL syndrome. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 2001, in press.
- ② Kowalska A, Asada T, Arima K, Kumakiri C, Kozubski W, Takahashi K, Tabira T: Mutational analysis of the tau gene in patients with frontotemporal dementia. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 2001, in press.
- ③ Takahashi K, Kotorii S, Chui D-H, Shirotani K, Tabira T: Notch3 gene in CADASIL syndrome: mutation frequencies in Japanese and its expression and processing; in Tanaka C, Ihara Y, McGeer PL (eds): *Neuroscientific Basis of Dementia*, Basel, Birkhauser Verlag AG, 2000, pp209-216.
- ④ 小鳥居聡、高橋慶吉、田平 武: 我が国の CADASIL 家系解析. *Dementia Japan* 14: 123-128, 2000.
- ⑤ Arima K, Kowalska A, Hasegawa M, Mukoyama M, Watanabe R, Kawai M, Takahashi K, Iwatsubo T, Tabira T, Sunohara N: Two brothers with frontotemporal dementia and parkinsonism with an N279K mutation of the tau gene. *Neurology*, 54: 1787-1795. 2000.
- ⑥ Uyama E, Tokunaga M, Suenaga A, Kotorii S, Kamimura K, Takahashi K, Tabira T, Uchino M: Arg133Cys mutation of Notch3 in two unrelated

Japanese families with CADASIL. *Internal Medicine*, 39: 374-378.

- ⑦ 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: 3681-3686, 2000.
- ⑧ Uchiyama K, Ishikawa A, Hanaoka K: Expression of Lbx1 involved in the hypaxial musculature formation of the mouse embryo. *J Exp zool*, 286: 270-279, 2000.
- ⑨ Mohri K, Takano-Ohmura H, Nakashima H, Hayakawa K, Endo T, Hanaoka K, Obinata T: Expression of cofilin isoforms during development of mouse striated muscle. *J Muscle Res Cell Motil* 21:49-57, 2000

2. 学会発表

- ⑩ 三田 洋、高橋慶吉、原 斉、栄 信孝、小鳥居聡、田平 武：白質脳症を伴った家族性痴呆患者における Notch3 遺伝子変異の解析。第 19 回日本痴呆学会、9 月 28 日、2000、千葉
- ⑪ Kowalska A, Asada T, Arima K, Kumakiri C, Takahashi K, Tabira T: Prevalence of tau gene mutations in Japanese patients with frontotemporal dementia.. 第 19 回日本痴呆学会、9 月 28 日、2000、千葉
- ⑫ 曾彩玲、内山考司、花岡和則：マウス神経管中心部および脊髄神経節の発現する 7 回膜貫通型受容体様分子。第 33 回日本発生生物学会、2000、高知
- ⑬ 工藤寛枝、勝部孝則、早坂美智子、花岡和則、富樫 伸：キメラマウスを用いた cortactin の機能解析。第 33 回日本発生生物学会、2000、高知

G. 知的所有権の取得状況

該当なし

Notch3 発現の加齢変化とその受容体活性に及ぼす遺伝子変異の影響

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: Notch3 シグナル伝達機序と遺伝子変異との関係を解明するために、ミスセンス突然変異を持つ本受容体のプロセシング及びリガントにより誘導される転写調節活性を培養細胞中で検討した。また、発達期のヒト脳組織中における発現の変化を免疫組織学的手法で解析した。Notch3 の細胞外及び細胞内プロセシングは遺伝子変異に影響されず、活性型受容体が形成されることが判明した。転写調節活性の場合は変異による変動が認められ、リガントとの相互作用が変化していることが示唆された。一方、Notch3 発現は早産児から成人にいたるまで動脈中膜や外膜に認められ、静脈の中膜にも軽度の発現が検出された。早産児では未熟な神経細胞やグリアにも発現が観察されるが、在胎 35 週以降は発現が消失していた。この結果は Notch3 がニューロンやグリアのみならず血管細胞の発生・分化誘導に重要な因子であることを示している。

研究組織

三田 洋(神経研究所 疾病研究第6部
研究員)
一戸明子(武蔵病院 臨床検査部 研究員)

唯一の遺伝子として血管の機能維持や老化変性との関係が注目されている。

Notch 蛋白質は細胞間相互作用を仲介する1回膜貫通型受容体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シグナル伝達因子である。ヒトやマウスでは4種類の相同遺伝子が同定され、その蛋白質構造は非常によく保存された4種類の特異的ドメインから構成される。また、Notch 受容体は胎児初期の神経外胚葉上皮に発現が見い出されることから神経発生に関与することが明かとなっている。マウスやヒトの研究から、Notch1 及び Notch2 受容体の活性機構には2種類の分子内限定分解(プロセシング)が関与することが判明している。第一のプロセシングは細胞膜への移送中に細胞外部位で起こり、

A. 研究目的

血管や中枢神経の老化には高血圧、傷害等の物理的要因や成長因子、サイトカインなどの生理活性因子が密接に関係しているが、最近トランスジェニックマウス、遺伝性早老症や家族性痴呆症の解析から遺伝子の重要性が指摘されるようになった。特に Tournier-Lasserre らにより発見された CADASIL (cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy) 原因遺伝子 Notch3 は脳血管変性のみならず中枢神経細胞の変異を起こすことが示された

生じた N 末および C 末ポリペプチドはヘテロ 2 両体を形成して活性受容体となる。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、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。一方、Notch3 の場合はプロセッシングが細胞特異的であり、また産生した N 末及び C 末断片がヘテロ 2 両体を形成しないことが昨年度の研究から判明した。この結果は Notch3 の活性化機序が他の Notch 受容体と異なっていることを示唆する。更に CADASIL 患者に発見された全ての突然変異は Notch3 の細胞外 EGF (epidermal growth factor) 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る。そこで、本研究では Notch3 の活性化機序と遺伝子変異との関係を明らかにするために、プロセッシングやシグナル伝達活性に与える Notch3 ミスセンス変異の影響を培養細胞を用い検索した。更に、中枢神経組織中での発現の加齢変化を免疫学的、組織学的手法で解析して Notch3 がどのような細胞の発生・分化に関与するか検討した。

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(HN3-WT)。CADASIL 患者で見い出された 4 種類のミスセンス突然変異(R90C, R133C, C185R, R213K)は *in vitro* mutagenesis 法により導入した。これらの cDNA は発現ベクター(EF-1 α プロモータ

ー)に挿入して細胞に導入した。コントロール遺伝子として逆方向の cDNA を持つプラスミド(HN3-R)を用いた。

2. 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 HEK293 細胞(human embryonic kidney 293 cells) 及び COS 細胞(Green Monkey COS-7 kidney 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 cocktail) で可溶化した。COS 細胞の場合は Solution A に懸濁した後、テフロンホモゲナイザーを用いて細胞を破碎した。得られた懸濁液は 1000 x g、10 分間遠心して核及び未破壊細胞を除き、上清は更に 100,000 x g、1 時間遠心した。沈澱は 1% Triton X-100 を含む Solution A で可溶化して膜分画とし、上清は細胞質分画とした。各サンプルは SDS-PAGE にて蛋白質のサイズ分画した後、蛋白質をニトロセルロース膜に転写した。既報に従ってブロッキング処理を行った後、Notch3 特異的抗体 AbN2 及び AbC2 と反応させた。反応産物は化学蛍光法で検出した。

3. Notch3 受容体活性の測定：レポーター遺伝子としては Notch 受容体により転写制御されるプロモーター(HES 1, HES 5, Ga981)とその下流にルシフェラーゼ遺伝子を連結したプラスミドを用い、リガンドとしては pTracer 発現ベクターに組み込んだ Jagged 1 及び Delta-1(Del-1) cDNA を使用した(東京大学医学部 千葉 滋博士より供与)。リガンド DNA は HEK293 細胞に導入した後、Zeocin 選択培地中で

培養して安定発現株を分離した。シグナル伝達活性の測定は、先ず HEK293 細胞に Notch3 遺伝子及びレポーター遺伝子をリン酸カルシウム法で導入し、20 時間後にリガンド発現細胞株を加え 1 日混合培養を行った。細胞は 1% Triton X-100 を含むバッファーで可溶化してルシフェラーゼ活性をルミノメーターで測定した。

4. 免疫組織染色：組織染色にはヒト剖検脳(早産児及び成人)を対象とし、前頭葉のホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いた。切片は既報に従ってブロッキング処理し、AbN2 及び AbC2 抗体と反応させ後、免疫組織化学的染色(ABC 法)を行った。陽性細胞密度の程度を分類して発現変化を検索した。

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。

研究結果

1. Notch 受容体プロセッシングに対するミスセンス変異の影響：昨年度の研究で Notch3 のプロセッシングは細胞特異性を示すことを報告した。AbC2 を用いたウエスタンブロッティング(図 1)に示すように HEK293 細胞では細胞外プロセッシングのみが起こり、全長鎖 Notch3 蛋白質(N^{FL})と 90 kDa (p90)の C 末断片が検出される。しかし、N 末断片は認められず、プロセッシング後にヘテロ 2 両体は形成されないこと、N^{FL} 及び p90 は細胞膜に存在するこ

とが AbN2 抗体を用いた細胞表面のラベル実験より確認された (data not shown)。ミスセンス変異を持つ Notch3 cDNA (R90, R133C, C185R, R213K)を HEK293 細胞に導入した場合でも FL 及び p90 の発現量やサイズには変化が認められず、また新しいバンドも検出されなかった。従って、Notch3 の変異は細胞膜への移行及び活性型受容体の形成に影響を与えないことを示している。一方、図 2 に示すように COS 細胞では細胞内プロセッシングのみが起こり、細胞内ドメインの 80 kDa (pIC80)断片が検出される。pIC80 は膜分画に回収され、プロセッシング後も膜に結合した状態で存在すること明かとなった。しかし、ミスセンス変異を持つ Notch3 cDNA を導入した COS 細胞にも膜分画にのみ pIC80 が見い出され、その量は野生型と変わらなかった。この結果は Notch3 ミスセンス変異はプロセッシングに関与するプロテアーゼ活性や細胞内ドメインの膜結合状態に影響を与えないことを示唆する。

2. Notch3 受容体活性：Notch3 受容体活性に対するミスセンス変異の影響をリガンド (Jagged 1 及び Del 1)及びレポーター遺伝子(HES1-Luciferase)を用いて検討した。図 3 に示すように、野生型 Notch3 ではリガンドを作用させてもルシフェラーゼ活性はほとんど変化しないが、R133C 変異を持つ Notch3 の場合は Jagged 1 により約 30% の増加が認められた。この結果は CADASIL ミスセンス変異が Notch3 シグナル伝達活性を亢進すること、またその効果はリガンド特異性を示して非常に興味深い。しかし、この転写調節活性の変動は他のレポーター遺伝子(HES 5-

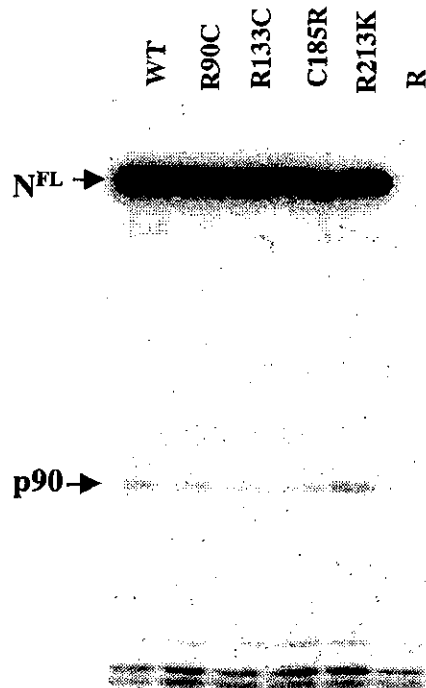


図 1. HEK293細胞中のNotch3プロセッシングに対するミスセンス変異の影響。用いたNotch3 cDNAはパネルの上に示す。ウエスタンブロットはAbC2抗体を使用した。NFLは全長鎖受容体を、p90はプロセッシング産物を示す。

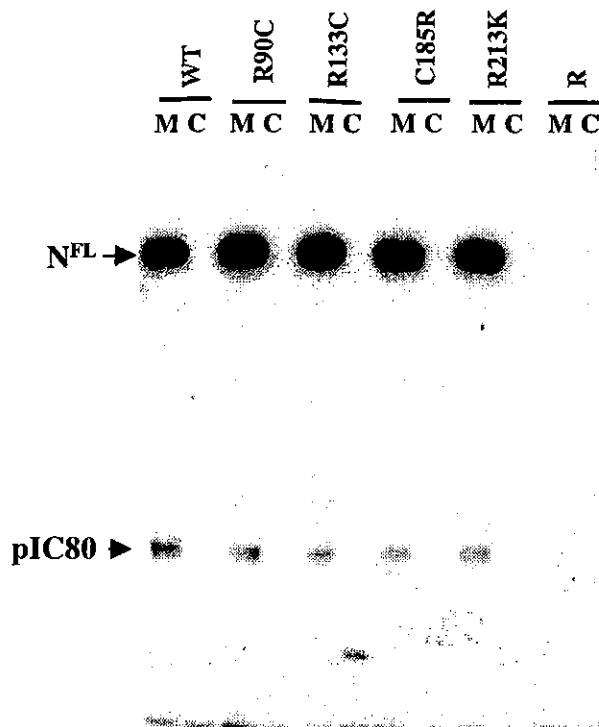


図 2. HEK293細胞中のNotch3プロセッシングに対するミスセンス変異の影響。用いたNotch3 cDNAはパネルの上に示す。ウエスタンブロットはAbC2抗体を使用した。NFLは全長鎖受容体を、pIC80はプロセッシング産物を示す。M:膜分画、C:細胞質分画

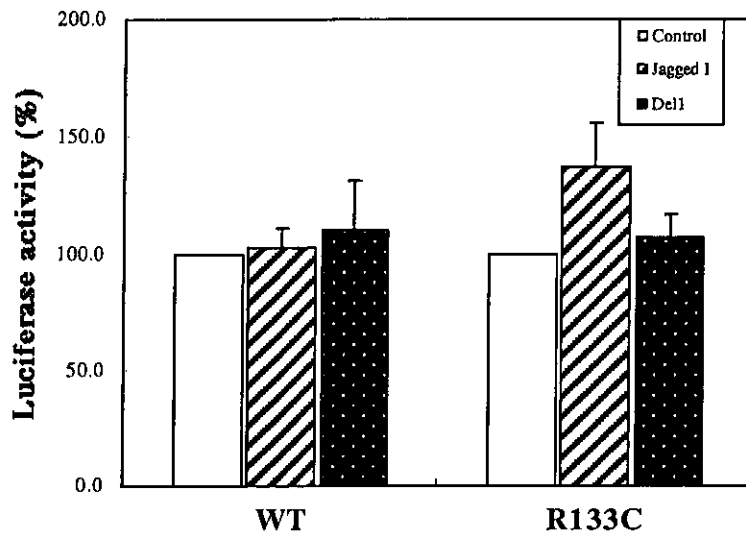


図3. Notch3受容体の転写制御活性に対するミスセンス変異の影響。
レポーター遺伝子としてHES1-luciferaseを用い、野生型及びR133Cミスセンス変異を持つNotch3受容体について解析した。

表 1. 発達期の脳組織におけるNotch3抗体陽性細胞密度

Age	Artery			Vein			Neuron	Glia
	Endothelial cells	Smooth muscle cells	Adventitia	Endothelial cells	Smooth muscle cells	Adventitia		
9-16 W	-	++	+	-	+	+/-	++	++
23-25 W	-	++	+	-	+	+/-	+/-	+
31-36 W	-	++	++	-	+	+	+/-	+/-
37-40 W	-	++	++	-	+	+	-	-
1-5 M	-	+	++	-	+	+	-	-
6-24 M	-	+	++	-	+	+	-	-
10-19 Y	-	+	++	-	+	+	-	-

陽性細胞密度は++ > + > +/-の順で示し、-は陽性細胞が検出されない場合を示す。

Luciferase や Ga981-Luciferase)では観察されなかった。おそらく用いた HEK293 細胞に存在する転写因子の特異性が原因と考えられる。

3. Notch3 発現の加齢変化: 表1はNotch3 抗体陽性細胞密度を示す。Notch3 の発現は早産児から成人に至まで動脈の中膜平滑筋層や外膜で認められ、静脈の中膜にも軽度の発現が検出された。この結果は Notch3 が血管前駆細胞に発現して血管形成や分化に極めて重要な因子であることを示している。更に、Notch3 の発現は皮質や白質の未熟な神経細胞やグリアにも観察された。しかし、成熟するにつれて徐々に低下し、在胎 35 週以降は発現が認められなかった。

D. 考察

Notch3 の発現は成人の動脈平滑筋層に限局しているため、血管細胞の分化・機能維持に重要な役割を果たしていることは間違いない。従って、Notch3 の発現動態の加齢変化や遺伝子変異に起因する機能異常の解析は CADASIL 発症機序を開明するうえで重要であるばかりでなく、血管細胞の分化・増殖、細胞死などのメカニズムの検索にも貴重な手掛かりとなる。今回我々は Notch3 のプロセッシングや受容体活性に対するミスセンス変異の効果を培養細胞を用いて解析した。また、発達期及び成人脳における Notch3 の発現を免疫組織学的に解析した。

Notch 蛋白質のプロセッシングは活性型受容体の形成やシグナルの細胞内伝達に必須であることが示唆されており、その異常によりシグナル伝達の亢進や抑制が起

ることが分かっている。ミスセンス変異を持つ Notch3 の場合、導入した培養細胞では野生型と同様のプロセッシングが認められ、活性型受容体分子が形成されていることが判明した。従って、プロセッシング異常が遺伝子変異のターゲットになっていないことを示唆する。一方、リガンドにより誘導される受容体活性はミスセンス変異(R133C)により増加することが明かとなった。この結果は Notch3 の変異がリガンドとの結合あるいはそれ以後に起こるシグナル伝達機構に関係していることを示唆し、CADASIL 発症機序を考える上で非常に重要な知見である。ところで、Notch の機能には他のシグナル伝達系を阻害して細胞分化を抑制する場合と Notch 伝達系自身に依存した細胞分化を誘導する作用が知られている。野生型 Notch3 ではリガンド分子を加えてもルシフェラーゼ活性に増加は認められていないことから、ミスセンス変異は他のシグナル伝達系の抑制の解除に関係している可能性も考えられる。今後は他のミスセンス変異や異なる細胞でもシグナル伝達活性に変化が見られるかどうか解析する必要がある。

Notch3 の発現は胎生初期の神経前駆細胞に検出されるため、ニューロンの発生・分化に関係していることが報告されている。しかし、その後の発現分布に関しては全く分かっていない。今回の研究では Notch3 は胎生初期には未熟な神経細胞のみならずグリアにも認められ、中期までに徐々に消失することが判明した。このことは Notch3 がニューロン及びグリアへの分化能を持つ前駆細胞に分布し、

分化が完成するととも発現が停止することを示し、非常に興味深い。一方、血管構造が明瞭となる中期以降にはNotch3は成人と同様に動脈平滑筋層や外膜層に見い出され、静脈の中膜にも発現が観察された。最近、血管内皮及び平滑筋細胞は同一前駆細胞から分化することが報告されている。従って、Notch3は血管前駆細胞にも発現し、平滑筋細胞への分化誘導・維持に関係している可能性が考えられる。

E. 結語

Notch3のミスセンス変異は活性型受容体の形成に影響を与えなかったが、転写調節活性を変動させた。Notch3発現は胎生初期には未熟な神経細胞のみならずグリアにも認められ、中期以降には動脈や静脈の平滑筋層や外膜層に見い出された。これらの結果はNotch3の変異がリガンドとの結合あるいはそれに起因するシグナル伝達を変化させること、Notch3はニューロンやグリアの前駆細胞のみならず血管前駆細胞にも発現して発生・分化誘導に関係していることを示している。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ① Kotorii S, Takahashi K, Kamimura K, Nishio T, Arima K, Yamada H, Uyama E, Uchino M, Suenaga A, Matsumoto M, Kuchei G, Rouleau G A and Tabira T: Mutations of the Notch3 gene in non-Caucasian patients with suspected CADASIL syndrome. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 2001, in press.
- ② Kowalska A, Asada T, Arima K, Kumakiri C, Kozubski W, Takahashi K, Tabira T: Mutational analysis of the tau gene in patients with frontotemporal dementia. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 2001, in press.
- ③ Takahashi K, Kotorii S, Chui D-H, Shirotani K, Tabira T: Notch3 gene in CADASIL syndrome: mutation frequencies in Japanese and its expression and processing; in Tanaka C, Ihara Y, McGeer PL (eds): *Neuroscientific Basis of Dementia*, Basel, Birkhauser Verlag AG, 2000, pp209-216.
- ④ 小鳥居聡、高橋慶吉、田平 武: 我が国のCADASIL家系解析. *Dementia Japan* 14: 123-128, 2000.
- ④ Arima K, Kowalska A, Hasegawa M, Mukoyama M, Watanabe R, Kawai M, Takahashi K, Iwatsubo T, Tabira T, Sunohara N: Two brothers with frontotemporal dementia and parkinsonism with an N279K mutation of the tau gene. *Neurology*, 54: 1787-1795. 2000.
- ⑥ 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: 3681-3686, 2000.
- ⑦ Uchiyama K, Ishikawa A, Hanaoka K: Expression of Lbx1 involved in the hypaxial musculature formation of the mouse embryo. *J Exp zool*, 286: 270-279, 2000

⑧Mohri K, Takano-Ohmura H, Nakashima H, Hayakawa K, Endo T, Hanaoka K, Obinata T: Expression of cofilin isoforms during development of mouse striated muscle. J Muscle Res Cell Motil 21:49-57, 2000

2. 学会発表

⑨三田 洋、高橋慶吉、原 斉、栄 信孝、小鳥居聡、田平 武：白質脳症を伴った家族性痴呆患者における Notch3 遺伝子変異の解析. 第 19 回日本痴呆学会、9 月 28 日、2000、千葉

⑩Kowalska A, Asada T, Arima K, Kumakiri C, Takahashi K, Tabira T: Prevalence of tau gene mutations in Japanese patients with frontotemporal dementia.第 19 回日本痴呆学会、9 月 28 日、2000、千葉

G. 知的所有権の取得状況

該当なし

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

分担研究報告書

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

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症(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。通常の方法でNotch3 遺伝子を改変した ES 細胞を用いて作成したキメラ胚は、発生致死である可能性を示唆することから、現在 cre-lox システムを用いた組織特異的ノックアウトの準備を進めている。

A. 研究目的

CADASIL(cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy)は、中年期以降に発症し、反復性卒中発作、片頭痛、仮性球麻痺、痴呆を呈する常染色体優生遺伝の脳血管障害性痴呆症である。1996年に、CADASILの原因遺伝子として19番染色体短腕(p13.1)にマップされるNotch3受容体遺伝子が同定され、現在までに25種類のミスセンス変異が欧米患者に発見されている。日本人患者にも欧米人と同様のミスセンス変異が見出さず、本遺伝子が高齢を越えて疾患原因となっていることが判明した。

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、CADASIL病態モデルマウスを作成することを目標

とする。これらのマウスは、血管細胞や神経細胞におけるNotch3の機能、血管・神経細胞の老化変性との関係を解明できるだけでなく、Notch3シグナル伝達系に関与する遺伝子群の探索や活性に影響を与える環境因子や薬品の検索に有用であり、加齢に伴う動脈硬化のメカニズム、変性や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ことが期待される。

B. 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で、ロットチェックした牛胎児血清20%含むEvans培地中で約2日毎に継代した。

2) 相同組み換え: マウス(Balb/c)ゲノムラ

表 1 Notch3 遺伝子を欠損した ES 細胞を用いたキメラ作成

ES 細胞 クローン	移植したキメラ胚数	誕生したマウス数	キメラマウス数
# 94	475	25	0
#122	450	30	1*

* 生後 1 週間で死亡



図 1 受精後 11 日目のキメラ胚
脱落膜の発達が不良であり、この段階で胚は母体により吸収されている。

**Targeting vector for knockout mouse
Mouse Notch3 genomic sequence (11.3 kb)**

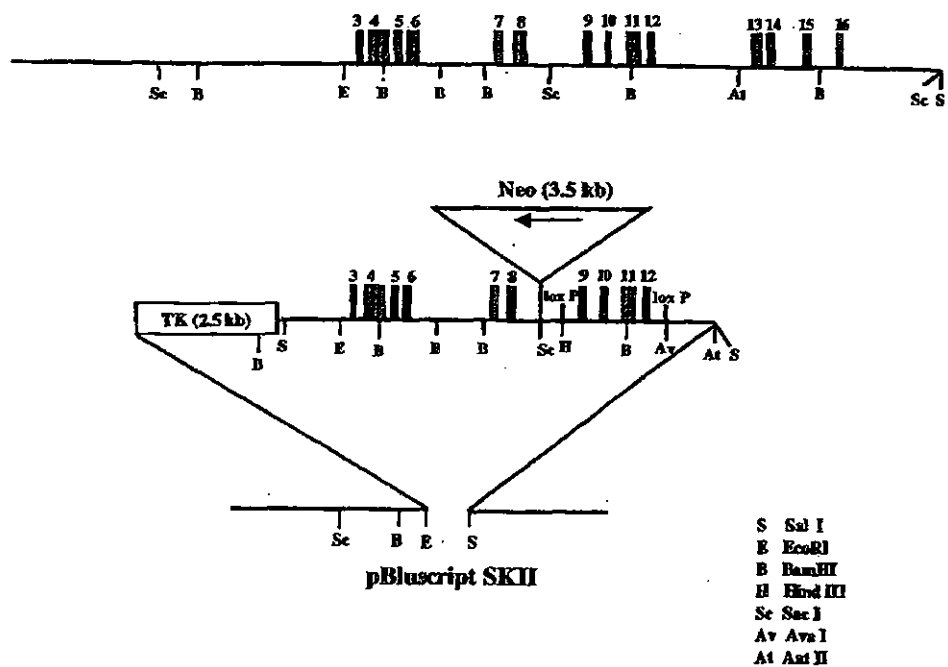


図 2 Notch3 組織特異的ノックアウトベクター

イブラリー(スファージ)よりヒト Notch3 cDNA をプローブとしてスクリーニングを行い、Exon3-Exon16 を含む断片を分離・同定した。この DNA の Exon4 の BamH I サイトに Neo 遺伝子を挿入し、また N 端に TK 遺伝子を連結しターゲッティングベクターとした。マウス TT2-F ES 細胞に電気穿孔法を用いてターゲッティングベクターを導入した。2 日間通常の培養を行った後、培地を選択培地(G418; 400g/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 を用いてサザンプロット法で確認した。その結果 2 株の positive なクローン(#94 と #122)を得た。

4)キメラマウスの作成; 上記の ES 細胞を BALB/c または ICR マウス 8 細胞期胚に顕微注入した。一日培養した後、胚盤胞期に達した胚を仮親マウス子宮内に移植した。

C. 研究結果

Notch3 受容体遺伝子座で相同組み換えが生じた ES 細胞クローン #94 および #122 を 8 細胞期胚に顕微注入し、キメラマウス作成を試みた。いずれの ES クローンをを用いても、多数のキメラ胚を仮親マウス子宮に移植したにもかかわらず、出生

したマウスの数が極端に少なく、キメラマウスは誕生してこなかった(表 1)。わずかに 1 匹のキメラ様のマウスが誕生したが、生後 1 週以内に死亡した。一部の移植胚については、発生途中で仮親マウス子宮を取り出し発生の様子を観察した。ほとんどの胚は受精後 10 日以内で死亡していることが観察された。

D. 考察

今回の実験により、Notch3 受容体遺伝子を欠損させた ES 細胞から作成したキメラ胚は発生途上で致死となっていることが示唆された。ターゲッティングベクターを導入していない ES-細胞株は、高いキメラマウス形成能を保持し、生殖細胞系列への分化能を有していることは確認されているので、Notch3 遺伝子の改変が発生致死の原因である可能性がある。この原因として、1) Notch3 遺伝子の発現量が半減することがマウスの初期発生の進行に致命的な影響を与える、2)今回用いたベクターは、exon4 にネオマイシン耐性遺伝子を挿入しているため、exon4 までの短いタンパクは合成されていると考えられ、このタンパクが初期発生に影響するなどの可能性が考えられる。いずれにせよ、本遺伝子の生体内における機能を解析し、CADASIL 発症のメカニズムを探るためには、本遺伝子を改変した成体のマウスを得る必要がある。そのために、Cre-loxP のシステムを利用した組織特異的、条件特異的ノックアウトマウ

スを作成することが必須と考え、現在そのためのベクターを構築中である(図2)。このベクターを相同組み換えで Notch3 遺伝子座に組み込んだマウスを作成するとともに、平滑筋で特異的に発現する α -アクチンプロモーターに連結した Cre-recombinase 遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウスを作成することにより、本遺伝子を欠損した成体マウスを得る予定であり、そのための実験に現在取り組んでいる。

E. 結語

Notch3 シグナル受容体遺伝子は、中枢神経や動脈の変性に関係することが明らかになったはじめての遺伝子であり、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。Notch3 ノックアウトマウスを手に入れることにより、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、血管・神経細胞の老化変性との関係などを解明することが可能になると考えられる。今回の実験で明らかになった問題点を克服し、一日も早く目的とするマウスを作成する作業を現在急いでいる。

F. 研究発表

論文発表

①Uchiyama K., Ishikawa A. and Hanaoka K. : Expression of Lbx1 involved in the hypaxial musculature formation of the mouse embryo. J Exp Zool 286:270-9, 2000

②Mohri K, Takano-Ohmuro H, Nakashima H, Hayakawa K, Endo T, Hanaoka K, Obinata T : Expression of cofilin Isoforms during development of Mouse Striated Muscle

J Muscle Res Cell Motil 21 : 49-57, 2000

学会発表

③曾彩玲, 内山孝司, 花岡和則 : マウス神経管中心部および脊髄神経節に発現する7回膜貫通型受容体様分子

第33回日本発生生物学会大会 高知 (2000)

④工藤寛枝, 勝部孝則, 早坂美智子, 花岡和則, 富樫伸 : キメラマウスを用いたcortactinの機能解析

第33回日本発生生物学会大会 高知 (2000)

G. 知的所有権の取得状況

なし