

厚生科学研究費補助金

長寿科学総合研究事業

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

平成 13 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 高橋慶吉

平成 14 (2001)年 4 月

目次

I. 総括研究報告	
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-----	1
高橋慶吉	
II. 分担研究報告	
1. Notch3 受容体活性に及ぼす遺伝子変異の影響-----	7
と血管平滑筋細胞中での発現動態の解析 高橋慶吉	
2. 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-----	15
花岡和則	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----	20
IV. 研究成果の刊行物・別冊-----	21

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 室長

国立精神・神経センター 神経研究所疾病研究第6部

研究要旨：Notch3 安定発現細胞株を用いリガントにより誘導される細胞内部位のプロセッシングおよびシグナル伝達活性に対する Notch3 ミスセンス変異の影響を検討するとともに Notch3 の発現細胞である血管平滑筋初代培養細胞中での本受容体のプロセッシングを解析した。また、本遺伝子と血管形成との関係を解析するために遺伝子欠損マウスの作成を試みた。培養細胞シグナル伝達系の解析から Notch3 は遺伝子変異の有無にかかわらずヘテロ 2 量体の活性型分子が形成されることが判明した。リガントに誘導される細胞内プロセッシングや転写調節活性も Notch3 ミスセンス変異に影響されず、変異 Notch3 とリガントとの相互作用は異常ないことが示唆された。血管平滑筋培養細胞ではヘテロ 2 量体の Notch3 活性型分子が認められたが、発現量が少なくシグナル伝達活性は検出出来なかった。一方、遺伝子欠損マウスに関しては ES 細胞への遺伝子導入、相同組み換え体細胞の選別、キメラマウスの作成を完了し、現在交配を行ってヘテロマウスの作成やその経過の観察中である。

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

血管性痴呆は我が国に於ける老年期痴呆の 2 大原因の一つであり、患者数は 10 万人以上に達する。その発症原因として従来、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、高血圧、高脂血症の治療・改善の進展にもかかわらず

血管性痴呆患者は増加傾向にある。さらに、血圧が正常であっても脳硬塞症等による痴呆を起こす者が相対的に増加してきており、遺伝要因の関与や生活習慣の変化による新規危険因子の出現等を反映した発病形態に変わりつつある。今後高齢化が進むにしたがい血管性痴呆患者数は著しく増加することが予想され、このような背景から血管の老化・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。しかし、その詳細な分子機構、関与する遺伝子や危険因子等は未だ解明

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

1. Notch3 シグナル伝達を再現できる培養細胞系を開発し、遺伝子変異が Notch3 のプロセッシングや転写制御にどのような影響を与えるか解析した。野生型(WT)および変異 (R90C, R133C, C185R, R213K) Notch3 cDNA は *in vitro* 変異法より構築し、末端に HA エピトープタグを連結した後、発現ベクター(EF-1 α プロモーター)挿入した。安定発現細胞株は発現ベクターに組み込んだ Notch3 cDNA を HEK293 細胞 (human embryonic kidney cells) に導入した後、ハイグロマイシン B を含む選択培地で分離した。コントロール細胞(C)として逆方向の cDNA(HN3-R) を導入したものをを用いた。リガンド安定発現株は pTraser 発現ベクターに組み込んだ Jagged 1 (Jag-1) および Delta-1 (Del-1)

cDNA (東京大学医学部 千葉 滋博士より供与) を使用し、HEK293 細胞に導入した後、Zeocin 選択培地を用い分離した。コントロール細胞(V)としてベクターのみを導入したものを作成した。Notch3 のプロセッシングは Notch3 安定発現細胞にリガンド発現細胞を加えて混合培養を行った後、抗 HA 抗体および Notch3 C 末抗体(AbC2)を用いる免疫沈降-ウエスタンプロット法で検索した。シグナル伝達活性は先ず Notch3 発現細胞にレポーター遺伝子(Ga981-luciferase) 導入した後、リガンド発現細胞株(2×10^5)を加え 6 時間混合培養を行った。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。

2. 血管平滑筋培養細胞における Notch3 の発現とそのプロセッシングを解析した。大動脈平滑筋細胞 (AoSM 細) を S³⁵ 標識アミノ酸で 6 時間ラベルした。細胞に RIPA buffer を加えて可溶化し、Notch3 抗体 AbN2 と AbC2 により免疫沈降を行った。抗体に結合した蛋白質は SDS 電気泳動により分離した後、標識された Notch3 蛋白質をフルオログラフィーで検出した。

3. 遺伝子欠損マウスの作成：血管形成や神経機能との関係を解析するために Notch3 遺伝子欠損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。得られたターゲティングベクターはマウス ES 細胞株(TT2-F)に電気穿孔法を用いて導入した後、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 細胞期胚に顕微注射した。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。誕生したキメラマウスは ICR と交配させた。

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, Notch3 シグナル伝達活性に対する遺伝子変異影響: Notch 受容体のシグナル伝達活性機構には少なくとも2種類のプロセシング(分子内限定分解)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、生じた N 末(NTF)および C 末(CTF)ポリペプチドはヘテロ 2 量体を形成して活性化型受容体となる。第二のプロセ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。

本研究で樹立した野生型 Notch3 安定発現細胞では細胞外プロセシングによる NTF (230 kDa)と CTF (92 kDa)両分子が検出され、更にリガンド発現細胞との混合培養により CTF はさらに限定分解を受けて新たに 85 kDa の ICD が出現することが判明した。ICD は混合培養後 1 時間目で見出され、3 - 6 時間後にピークに達した。また、ICD の増加量に平行して、CTF 量は減少しており、前駆体-産物の関係があることが明らかとなった。さらにレポーター遺伝子(Ga981-Luciferase)を用いて測定した Notch3 シグナル活性はリガンド添加によりルシフェラーゼ活性が 40-60% 増加し、活性化型受容体分子が細胞表面に発現していることが確認された。一方、変異 Notch3 発現細胞の場合、野生型と同様にリガンド添加により ICD プロセシングが誘導され、Notch3 シグナル活性にはミスセンス変異の影響は観察されなかった。これらの結果は Notch3 の CADASIL 変異はリガントにより誘導されるシグナル伝達活性に影響を与えないことを示し、CADASIL 発症メカニズムを考える上で重要な知見である。また、本研究で開発された培養細胞を用いる Notch3 シグナル伝達系は *in vivo* 状態を反映するものであることが明らかにされた。

2. 血管平滑筋細胞における Notch3 の発現: 免疫組織学的検索から Notch3 発現は血管平滑筋細胞に局在していることが明らかとなっている。そこで平滑筋細胞で発現している Notch3 を蛋白質化学的に解析した。大動脈平滑筋細胞では発現

量が著しく少ないが、Notch3 は全長鎖、NTF および CTF のサイズを持つ 290 kDa、230 kDa および 92 kDa の蛋白質が特異的抗体により検出された。この結果は、血管平滑筋細胞では Notch3 のプロセシングが起こり、活性型が発現していること示している。

3. 遺伝子欠損マウスの作成： ES 細胞へのターゲティングベクターの導入および相同組み換え体細胞の選別を行い 9 個のポジティブクローンを得、さらに、組み換え体 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完了した。現在これらのマウスの交配を行ってヘテロの作成やその経過の観察中である。

D. 考察

CADASIL 患者に見出された Notch3 の変異は全てリガントに結合する細胞外部位に集中しているため、リガントとの相互作用の異常やその結果起こるシグナル伝達の変動が発症メカニズムとして考えられてきた。しかし、培養細胞を用いる Notch3 シグナル伝達系の解析から、Notch3 の CADASIL 変異はリガントにより誘導される細胞内プロセシングおよび転写調節に影響を与えないことが判明した。この結果は変異 Notch3 でも細胞表面に活性型受容体分子が形成されること、リガントとの相互作用は正常であることを示している。従って、Notch3 のリガントとの結合異常が CADASIL 発症の鍵ではない可能性があり、非常に重要な知見である。その発症メカニズムとしては変異 Notch3 に特異的相互作用する異種リガンドやリガント以外の蛋白質の存在、

変異 Notch3 自体が他の細胞に対し生理活性を持つ等の可能性が考えられる。最近、Notch 受容体の多数のリガンドが同定され、また、リガントとの結合能を修飾する Fringe 遺伝子が発見されている。今後はこれらの蛋白質を検索する必要があり、本研究で樹立された *in vivo* Notch3 シグナル伝達系は非常に有効な解析手段となる。一方、血管平滑筋初代細胞では Notch3 の全長鎖、NTF および CTF が検出され、活性型受容体が存在していることが示唆された。しかし、リガント発現細胞との混合培養を行っても ICD は検出されなかった。おそらく Notch3 発現量が少ないことが原因と考えられる。

Notch3 遺伝子欠損マウスに関する昨年度までの研究では、Notch3 受容体遺伝子を欠損させた ES 細胞から作成した多数のキメラ胚は発生途上ですべて致死となり、ノックアウトマウス作成には至らなかった。本年度、もう一度最初から実験系を構築して再度ノックアウト作成に取り組んだ。まず、ES 細胞クローン株の生殖細胞キメラ形成能を確認したうえでターゲティングベクターを導入した。その結果、現在までにキメリズムの高いキメラマウスを得ることに成功した。したがって、これらのキメラマウスから Notch3 遺伝子欠損マウスが誕生する可能性はきわめて高いと期待される。

Notch3 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ことが必須であり、今回得られたキメラマウスの交配実験に現在取り組んでいる。

E. 結語

Notch3 の CADASIL ミスセンス変異はリガンドにより誘導される細胞内部位のプロセッシングや転写調節活性に影響を与えなかった。この結果は変異 Notch3 も活性型受容体を形成していることを示し、リガンドとの結合異常が CADASIL 発症のターゲットではないことが考えられる。また、樹立した *in vivo* Notch3 シグナル伝達系は新規リガンドや受容体と結合する分子の検索に利用可能である。一方、血管平滑筋初代培養細胞では活性型 Notch3 の発現が検出され、血管平滑筋細胞の分化・増殖との関係が示唆された。

遺伝子欠損マウスに関しては ES 細胞への遺伝子導入、相同組み換え体細胞の選別、キメラマウスの作成を完了し、現在交配を行ってヘテロおよびホモマウスの作成やその経過の観察中である。

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, Kuchi G, Rouleau G A and Tabira T: Mutations of the Notch3 gene in non-Caucasian patients with suspected CADASIL syndrome. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 21: 185-193, 2001,
- 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.* 21: 450-455, 2001,
- ③ Chui D-H, Dobo E, Makifuchi T, Akiyama H, Kawakatsu S, Petit A, Checler F, Araki W, Takahashi K, Tabira T: Apoptotic neurons in Alzheimer's disease frequently show intracellular A β 42 labeling. *J. Alzheim. Dis.* 3: 231-239, 2001.
- ④ 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.* 21: 450-455, 2001
- ⑤ 山田治来、安田雄、小鳥居聡、高橋慶吉、田平武、砂田芳秀：Notch3 遺伝子に新たなミスセンス変異を認めた CADASIL の 1 例—禿頭と腰椎椎間板ヘルニアの合併について—。 *臨床神経学* 41: 144-146, 2001.
- ⑥ 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*. pp 209-216, Basel, Birkhauser Verlag AG, 2000 .
- ⑦ Uchiyama K, Ishikawa A. and Hanaoka K: Expression of Lbx1 involved in the hypaxial musculature formation of the mouse embryo. *J Exp Zool* 286: 270-9, 2000
- ⑧ Mohri K, Takano-Ohmuro H, Nakashima H, Hayakawa K, Endo T, Hanaoka K, and Obinata T: Expression of cofilin Isoforms during development of Mouse Striated

Muscle J. Muscle. Res. Cell. Motil. 21,;
49-57, 2000

G. 研究成果による特許権等の知的財
産権の出願・登録状況

該当なし

H. 健康危険情報

該当なし

Notch3 受容体活性に及ぼす遺伝子変異の影響と血管平滑筋細胞中での発現動態の解析

主任研究者 高橋慶吉 室長
国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第6部

研究要旨: Notch3 安定発現細胞株 (HEK293 細胞) を樹立して CADASIL 突然変異による Notch3 受容体のプロセッシングおよびリガントにより誘導されるシグナル伝達活性の変動を検討した。また、Notch3 の発現細胞である血管平滑筋細胞中での本受容体のプロセッシングを解析した。安定発現株では Notch3 は細胞外プロセッシングを受けヘテロ 2 量体として形質膜に発現し、リガントと反応後に細胞内プロセッシングが起こり細胞内ドメインが遊離することが判明した。しかし、これらの 2 種類のプロセッシングは遺伝子変異に影響されず、さらにシグナル伝達にも明らかな変動は認められなかった。一方、血管平滑筋初代培養細胞では Notch3 は 290 kDa の蛋白質として合成され、細胞外プロセッシングにより N 末断片 (220 kDa) と C 末断片 (92 kDa) からなるヘテロ 2 量体が形成されることが判明した。この結果は血管平滑筋細胞には活性型 Notch3 が存在することを示唆する。

A. 研究目的

CADASIL (cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy) は常染色体優生遺伝様式を示す家族性脳梗塞性痴呆症で、1991 年に Tournier-Lasserre により提唱された新しい疾患単位である。本症の原因遺伝子として染色体 19 番短腕 (p13.1) にマップされた Notch3 シグナル受容体遺伝子が同定され、現在までに約 40 種類以上のミスセンス変異が CADASIL 家系で発見されている。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ため、脳動脈変性に関する分子・細胞レベルの研究の糸口として注目されている。

Notch 蛋白質は細胞間相互作用を仲介する膜貫通型受容体として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 種類の特異的機能ドメインから構成される。細胞外部分にはリガントと結合する 34 個の EGF (epidermal growth factor)-like repeats と Notch 蛋白質に共通に見られる相同性の高い 3 個の Notch/Lin-12 repeats (LN) 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 repeats および蛋白分解に関係した PEST 配列が存在する。最近までの研究から Notch 受容体のシグナル伝達活性機構には少なく

との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、生じたN末(NTF)およびC末(CTF)ポリペプチドはヘテロ2量体を形成して活性受容体となる。第二のプロセ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。CADASIL患者に発見された全ての突然変異はNotch3の細胞外EGF-like 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、安定発現細胞株を用い本受容体のプロセ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検索した。更に、Notch3の発現が局在している血管平滑筋細胞での受容体のプロセシング機構についても解析した。

B. 研究方法

1. 導入遺伝子の構築：ヒトNotch3 cDNAは胎児脳cDNAライブラリーより単離した(HN3-WT)。CADASIL患者で見いだされた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C末端にPCR法でHAエピトプタグを連結した後、発現ベクター(EF-1 α プロモーター)挿入して細胞に導入した。

2. Notch3およびリガンド安定発現細胞株の分離：発現ベクターに組み込んだ

Notch3 cDNAはHEK293細胞(human embryonic kidney cells)にリン酸カルシウム法で導入した。24時間後に細胞を集め、ハイグロマイシンB(100 μ g/ml)を含むDMEM培地に播種した(1×10^3 個)。1週間後にハイグロマイシン抵抗性細胞コロニーを分離して、Notch3の発現をウエスタンブロットにより確認した。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。リガンド安定発現株の作成にはpTracer発現ベクターに組み込んだJagged1(Jag-1)および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)。ベクターDNAは制限酵素ScaIおよびPvuIでlinearにした後、リン酸-カルシウム法でHEK293細胞に導入した。24時間培養したのち、Zeocin選択培地を用い上記の方法で安定発現株を分離した。コントロール細胞としてベクターのみを導入したものを作成した。

3. Notch3のシグナル活性とプロセシングの解析：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(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た。シグナル伝達活性の測定は、先ず12ウェルプレートに播種したNotch3安定発現細胞(2×10^5)に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(2×10^5)を加え6時間混合培養を行った。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。細胞内ドメインのプロセシングではNotch3安定発現細胞(2×10^5)にリガンド

発現細胞株(2×10^5)を加え混合培養を行った。細胞は一定時間ごとに収穫し、Lysis buffer (20 mM Tris-HCl, pH8.0, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, protease inhibitor cocktail)で可溶化した。各可溶化サンプルは5倍量のRIPA buffer (20 mM Tris-HCl, pH8.0, 150 mM NaCl, 0.5% Sodium deoxycholate, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, protease inhibitor cocktail)を加え、抗 HA 抗体およびプロテイン G アガロースによる免疫沈降を行った。HA 抗体に結合した蛋白質は 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、既報に従って Notch3 抗体 AbC2 と反応させた。反応産物は化学蛍光法で検出した。

4. 血管平滑筋初代培養細胞の放射標識：
 1×10^6 個の大動脈平滑筋細胞 (AoSM 細胞、クロノテック社)をメチオニンおよびシステインを含まない SmBM 培地中で6ウエルプレートに播種し、 S^{35} -ProMix (Amersham) 200 μ Ci を加えて6時間インキュベーションした。細胞は RIPA buffer を加えて可溶化し、Notch3 抗体 AbN2 と AbC2 により免疫沈降した。サンプルは SDS 電気泳動を行い、標識された Notch3 蛋白質をフルオログラフィーで検出した。

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 EK2 の規制レベル)を得た。

C. 研究結果

1. 培養細胞を用いた Notch3 シグナル伝達系の構築：昨年度の transient 発現系による研究では Notch3 のプロセッシングは細胞外のみで起こるが NTF が検出されず、さらに全長鎖蛋白質が細胞表面に出現する特異性を示すことを報告した。しかし、安定発現細胞の場合、細胞外部位のプロセッシングにより産生される NTF (230 kDa)と CTF (92 kDa)両分子がそれぞれ N 末特異的抗体(AbN1 および AbN2)と C 末特異的抗体(AbC1 および AbC2)により検出された。このプロセッシングされた Notch3 がシグナル活性を示すか明らかにするために、Notch3 安定発現細胞とリガンド発現細胞(Jagged-1)の混合培養を行った。図1は抗 HA 抗体免疫沈降後、AbC2 を用いたウエスタンブロッティングの結果を示す。Notch3 CTF はさらに限定分解を受けて新たに 85 kDa の ICD が出現した。一方、コントロール細胞(Notch3-R 導入細胞)との混合培養では ICD は全く検出されず、リガンドによる誘導される特異的なプロセッシングであることが判明した。この ICD は混合培養後1時間目で見出され、3-6時間後にピークに達した。また、ICD の増加量に平行して、CTF 量は減少しており、前駆体-産物の関係があることが判明した。この前駆体-産物の関係は S^{35} を用いる metabolic labeling 法でも確認された。これらの結果は Notch3 安定発現細胞では NTF および CTF より形成された活性型 Notch3 分子が細胞表面に存在していることを示している。

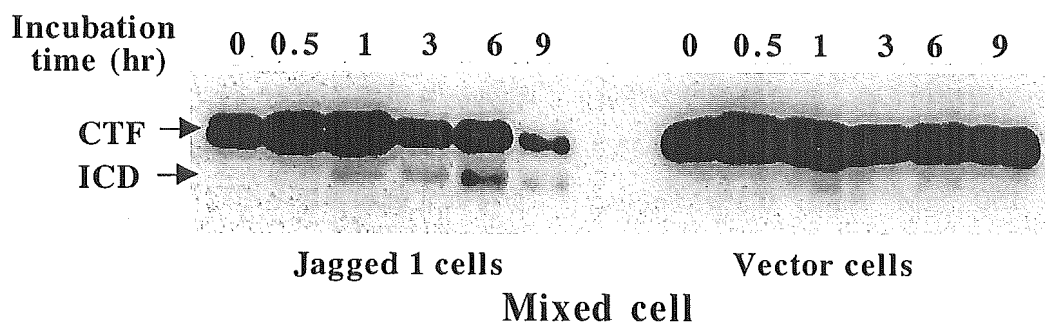


図 1. リガンドにより誘導される Notch3 CTF のプロセッシングの時間経過。
 野生型 Notch3 発現細胞にリガンド発現細胞(Jagged 1)およびコントロール細胞(vector)を加え、表示した時間混合培養を行なった。
 CTF : C 末断片、ICD : 細胞内ドメイン

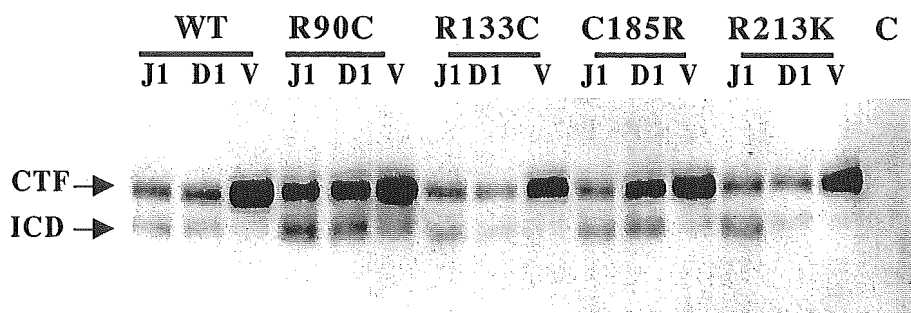


図 2. Notch3 ICD のプロセッシングに対する CADASIL ミスセンス変異の影響。
 野生型(WT)および変異 Notch3 発現細胞(R90C, R133C, C185R, R213K)に
 リガンド発現細胞(J1, D1)を加え、6 時間混合培養を行った。
 V: ベクターを導入したコントロール細胞、C : HN3-R を導入した細胞

2. ICD プロセッシングに対する Notch3 ミスセンス変異の影響: 変異 Notch3 安定発現細胞とリガンド発現細胞(Jagged 1 および Delta 1) の混合培養を行い、ICD の変化を野生型 Notch3 と比較した(図 2)。野生型と同様にリガンド発現細胞添加により変異 Notch3 発現細胞でも ICD が検出されたが、その量に著明な差は認められなかった。また、異なる変異 Notch3 発現細胞株でもリガンドで誘導される ICD のプロセッシングが見出された。従って、Notch3 の CADASIL 変異はリガントとの結合に影響を与えないと考えられる。

3. 変異 Notch3 のシグナル伝達活性: Notch3 シグナル活性に対するミスセンス変異の影響をレポーター遺伝子(Ga981-Luciferase)を用いて検討した(図 3)。野生型 Notch3 発現細胞では Jagged 1 および Delta 1 のリガンド添加によりルシフェラーゼ活性が 40-60% 増加した。変異を持つ Notch3 の場合でもリガンドによるルシフェラーゼ活性の増加が見出され、野生株との著明な差は認められなかった。

4. 血管平滑筋細胞における Notch3 の発現: 免疫組織学的検索から Notch3 発現は血管平滑筋細胞に局在していることが明らかとなっている。そこで平滑筋細胞で発現している Notch3 が活性型か否か明らかにするために、そのプロセッシングについて初代培養細胞を用いて検討した。大動脈平滑筋細胞では Notch3 の発現量が少なく通常のウエスタンブロット法では Notch3 蛋白質は全く検出出来なかった。一方、 S^{35} アミノ酸による metabolic labeling と N 末および C 末抗体による免疫沈降法を用いた検索では、図 4 に示す

ように 290 kDa のバンドが N 末抗体 (AbN2) と C 末 (AbC2) 両分子により検出され、そのサイズは安定発現細胞で見出された全長鎖 Notch3 蛋白質と一致していた。また、NTF および CTF のサイズを持つ 230 kDa および 92 kDa のバンドがそれぞれ AbN2 および AbC2 のみ検出された。従って、血管平滑筋細胞では Notch3 のプロセッシングが起り、活性型が発現していることが判明した。

D. 考察

CADASIL 患者に見出された Notch3 の変異は全てリガントに結合する細胞外部位に集中しているため、リガントとの相互作用の変化やその結果起こるシグナル伝達の異常が発症メカニズムとして考えられてきた。今回我々は Notch3 安定発現細胞を用いるシグナル伝達活性測定系を開発して、活性型 Notch3 の構造や伝達活性に対するミスセンス変異の効果を解析した。また、血管平滑筋細胞における活性型 Notch3 の発現を検討した。

細胞外および細胞内のプロセッシングは活性型 Notch 受容体の形成やシグナルの細胞内伝達に必須であり、その異常はシグナル伝達の亢進や抑制に関係していることが分かっている。CADASIL 変異を持つ Notch3 の場合、リガンド添加により野生型と同様の細胞内プロセッシングが認められ、さらに、レポーター遺伝子の転写も Notch3 のミスセンス変異に影響されないことが判明した。これらの結果は変異 Notch3 でも細胞表面に活性型受容体分子が形成されること、リガントとの相互作用に異常が認められないことを示して

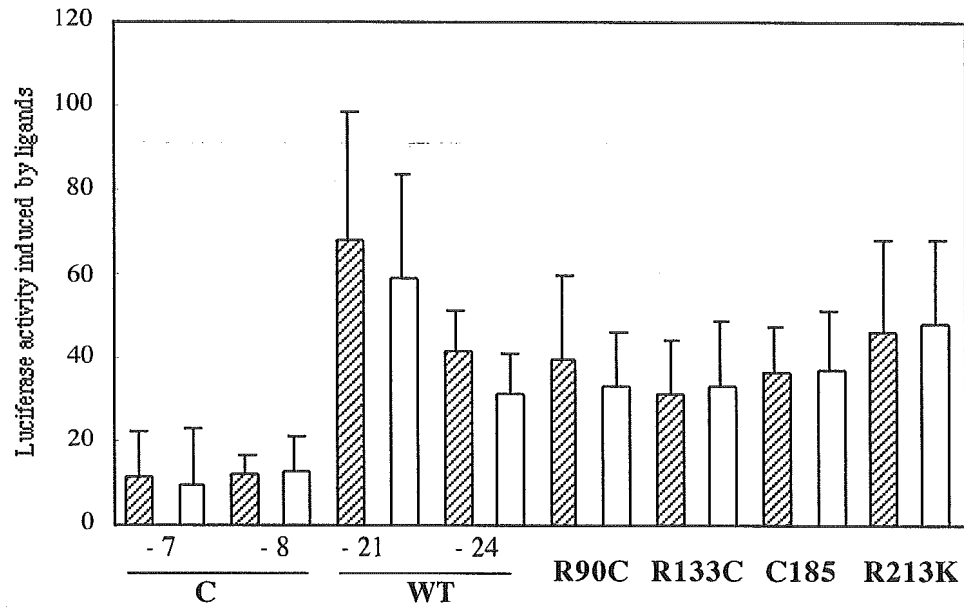


図 3. リガンドで誘導される Notch3 シグナル伝達活性に対する CADASIL ミスセンス変異の影響。

レポーター遺伝子を導入した Notch3 発現細胞に Jagged 1(斜線)および Delta 1(白)発現細胞を加え混合培養を行った。6 時間後に細胞を集め、ルシフェラーゼ活性を測定した

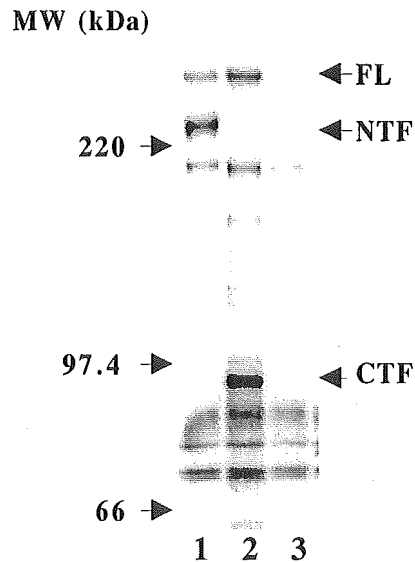


図 4. 血管平滑筋初代培養細胞での Notch3 の発現とプロセッシング
大動脈平滑筋細胞を S35 アミノ酸で 6 時間ラベルした後、N 末 AbN2(レーン 1)、C 末抗体 AbC2(レーン 2)および rabbit IgG を用いて免疫沈降を行った。

いる。さらに、Notch3 のリガンドとの結合異常以外に CADASIL 発症のメカニズムが存在することが考えられ、非常に重要な知見である。この様な発症メカニズムとしては変異 Notch3 に特異的相互作用する異種リガンドやリガンド以外の蛋白質の存在する可能性、変異 Notch3 自体が他の細胞に対し生理活性を持つ等の可能性が考えられる。最近、Notch 受容体の多数のリガンドが同定され、また、リガンドとの結合能を修飾する Fringe 遺伝子が発見されている。今後はこれらの蛋白質を検索する必要があり、本研究で樹立された in vivo Notch3 シグナル伝達系は非常に有効な解析手段となる。

血管平滑筋初代細胞では Notch3 の全長鎖、NTF および CTF が検出され、活性型受容体が存在していることが示唆された。しかし、リガンド発現細胞との混合培養を行っても ICD は検出されなかった。おそらく Notch3 発現量が少ないことが原因と考えられる。現在、血管平滑筋細胞への Notch3 遺伝子導入を行っており、ICD プロセッシングやシグナル活性に対するミスセンス変異の影響を解析する計画である。

E. 結語

Notch3 の CADASIL ミスセンス変異はリガンドにより誘導される細胞内部位のプロセッシングや転写調節活性に影響を与えなかった。この結果は変異 Notch3 も活性型受容体を形成していることを示し、リガンドとの結合異常が CADASIL 発症のターゲットではないことが考えられる。また、樹立した in vivo Notch3 シグナル伝

達系は新規リガンドや受容体と結合する分子の検索に利用可能である。一方、血管平滑筋初代培養細胞では活性型 Notch3 の発現が検出され、血管平滑筋細胞の分化・増殖との関係が示唆された。

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, Kuchi G, Rouleau G A and Tabira T: Mutations of the Notch3 gene in non-Caucasian patients with suspected CADASIL syndrome. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 21: 185-193, 2001,
- 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.* 21: 450-455, 2001,
- ③ Chui D-H, Dobo E, Makifuchi T, Akiyama H, Kawakatsu S, Petit A, Checler F, Araki W, Takahashi K, Tabira T: Apoptotic neurons in Alzheimer's disease frequently show intracellular A β 42 labeling. *J. Alzheim. Dis.* 3: 231-239, 2001.
- ④ 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.* 21: 450-455, 2001
- ⑤ 山田治来、安田雄、小鳥居聡、高橋慶

吉、田平武、砂田芳秀 : Notch3 遺伝子
に新たなミスセンス変異を認めた
CADASIL の 1 例—禿頭と腰椎椎間板
ヘルニアの合併について— 臨床神経
学 41: 144-146, 2001.

⑥ 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. pp 209-216, Basel, Brirkhauser
Verlag AG, 2000 .

G. 研究成果による特許権等の知的財
産権の出願・登録状況
該当なし

H. 健康危険情報
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 教授

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きた。昨年までの研究で、Notch3 遺伝子座で相同組み換えが生じた ES 細胞株を用いて作成したキメラ胚は全く正常な発生が認められなかったが、本年度実験系を再構築してやり直したところ、キメラ率の高いキメラマウスを作成することができ、現在ノックアウトマウス作成の最後の段階に達している。

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。 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、 現在までに多数のミスセンス変異が欧米および国内の患者に発見されている。

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、 CADASIL 病態モデルマウスを作成することを目標としている。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 および TT2-XY 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。これらの細胞株をフィーダー細胞上に薄く蒔き、 数日培養後、 増殖中のコロニーを細いガラス管で採取にクローン細胞株として樹立した。

2)相同組み換え：マウス(Balb/c)ゲノムライブラリー(λ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 BamHI 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

用いてターゲティングベクターを導入した。ES 細胞株は TT2XY を使用し、 2×10^7 cells / 0.5ml HBS に $10 \mu\text{g}$ のノックアウトベクターを加え、 $250 \text{ V} \cdot 950$ という条件でエレクトロポレーションを行った。その後、フィーダー細胞上に播き、ES 用培地で培養した。 $(37^\circ\text{C} \cdot 5\% \text{ CO}_2)$ 2 日間通常の培養を行った後、培地を選択培地 (G418; 400 g/ml 、gancyclovir; $2 \times 10^{-6} \text{ M}$) に変更し、さらに培養を続けた。その後、8 日間にわたって毎日培地交換を行った。この条件下で生き残り増殖している ES 細胞のコロニーを顕微鏡下で採取し、フィーダー細胞上に移した後、ES 細胞株としてクローニングした。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 を用いてサザンロット法で確認した。

3) ゲノム DNA の精製及びゲノミックサザンハイブリダイゼーション：ES 細胞からのゲノム DNA の抽出は、PUREGENE のプロトコールに従って行った。ゲノミックサザンハイブリダイゼーションは以下の方法で行った。ゲノム DNA を BamH I または Nco I で消化し、 0.8% アガロースゲルで電気泳動後、ナイロンフィルター (Hybond-XL, amersham) に転写した。プローブ用プラスミドを EcoR I と BamH I で消化して得られた 0.7 kbp の断片を鋳型とし、 ^{32}P で標識した。これをプローブとしてハイブリダイゼーションを行っ

た。

4) キメラマウスの作成：自然交配させた後、妊娠 2.5 日目のマウスから 8 細胞期胚を得た。相同組換え体であると同定された ES 細胞をマニピュレーターを用いて 8 細胞期胚へ導入した。一日培養した後、胚盤胞期に達した胚を偽妊娠 2.5 日目の ICR マウス (アルビノ) の子宮に移植した。誕生したキメラマウスは ICR と交配させた。

倫理面に対する配慮

本研究で行った遺伝子の構築および遺伝子操作マウスの作成に関しては、北里大学、組み換え 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の精神にのっとり慎重に行った。

C. 研究結果

昨年度報告したように、Notch3 受容体遺伝子座で相同組み換えが生じた TT2-F 由来 ES 細胞クローン #94 および #122 を用いて作成したキメラ胚は、ほとんどの胚で受精後 10 日以内に死亡していることが観察された。その原因は不明であるが、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。

そこで、本年度は、実験系を最初から再構築してノックアウトマウスを作成する作業を再度開始した。まず最初に、昨年度までに用いた TT2-F (性染色体の核型が XO 型) ES 細胞株に加えて TT2-XY ES 細胞株 (XY 型) を培養し、各々から 20 株のリクローン化された細胞株

を分離した。それぞれの細胞株を用いてキメラマウスを作成した。調べた細胞株のうち、TT2-XY ES 細胞由来の細胞株が高いキメラ形成能を有し、生殖細胞キメラマウスに分化できることを確認した。以後は、この生殖細胞への分化が確認された ES 細胞株 TT2-XY-9 を主として用いて実験を行った。TT2-XY-9 ES 細胞に Notch3 ノックアウトベクターを導入した後、二重選択培養下で生き残ってきた 152 個の ES 細胞株をクローニングした。そのうち 70 個の細胞株から DNA を抽出し、ゲノミックサザンハイブリダイゼーションで解析した。抽出した DNA を BamH I 消化したときと Nco I で消化したときの結果が一致したことから、70 株のうちの 9 株が相同組換え体であることがわかった (図 2 上)。また、TT2-F ES 細胞株に由来する細胞株でも同様に実験を行い、1 株の相同組み換え体を分離した。

これらの細胞株を順次 8-細胞期胚へ注入した後、仮親マウスへ移植した。現在、まだ、このキメラマウス作成の作業は続行中であるが、すでにキメリズムの高い生殖細胞への分化が十分期待できるキメラマウスが続々と誕生しつつある (図 3)

D. 考察

昨年度までの研究では、Notch3 受容体遺伝子を欠損させた ES 細胞から作成した多数のキメラ胚は発生途上ですべて致死となり、ノックアウトマウス作成には至らなかった。本年度、もう一度最初から実験系を構築して再度ノックアウト作成に取り組んだ。生殖細胞系列キメ

ラマウスに分化することが確認されている TT2-F および TT2-XY ES 細胞株をリクローニングし、各々のクローン株の生殖細胞キメラ形成能を確認したうえでターゲティングベクターを導入した。その結果、現在までにキメリズムの高いキメラマウスを得ることに成功した。本実験に用いた TT2-XY ES 細胞株は、キメリズムの高い個体からは、非常に高い確率で生殖細胞に伝達されることを過去の実験で繰り返し確認している。したがって、これらのキメラマウスから Notch3 ノックアウトマウスが誕生する可能性はきわめて高いと期待される。

Notch3 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ことが必須であり、今回得られたキメラマウスの交配実験に現在取り組んでいる。

E. 結語

実験を最初からやり直すことにより実験。現在、目的とするノックアウトマウスを一日も早く作成するための作業を急いでいる。

F. 研究発表

- ①Uchiyama K., Ishikawa A. and Hanaoka K.(2000)Expression of Lbx1 involved in the hypaxial musculature formation of the mouse embryo. J Exp Zool 286 No3: 270-9
- ②Mohri K, Takano-Ohmuro H,Nakashima H, Hayakawa K,Endo T, Hanaoka K, Obinata T (2000) Expression of cofilin Isoforms during development of Mouse Striated Muscle J Muscle Res Cell Motil 21 49-57

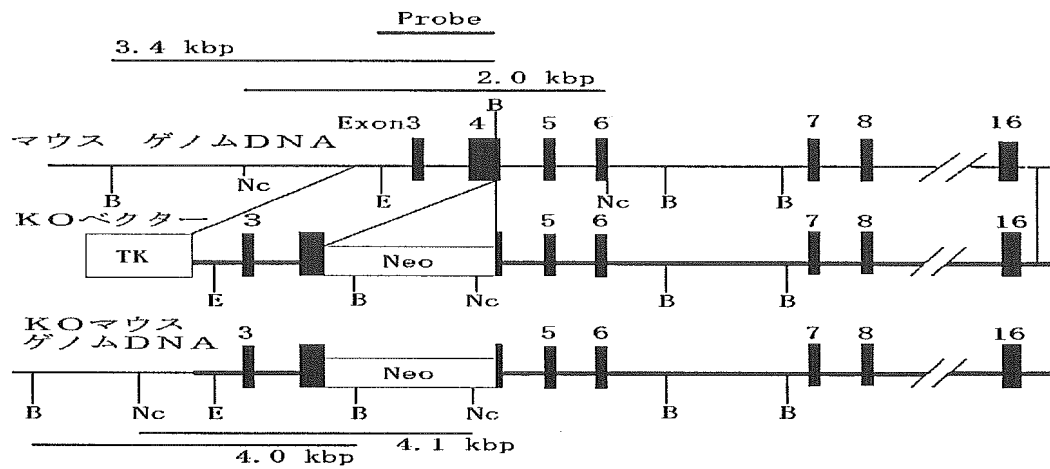


図.1. Notch3 ノックアウトベクターの構造

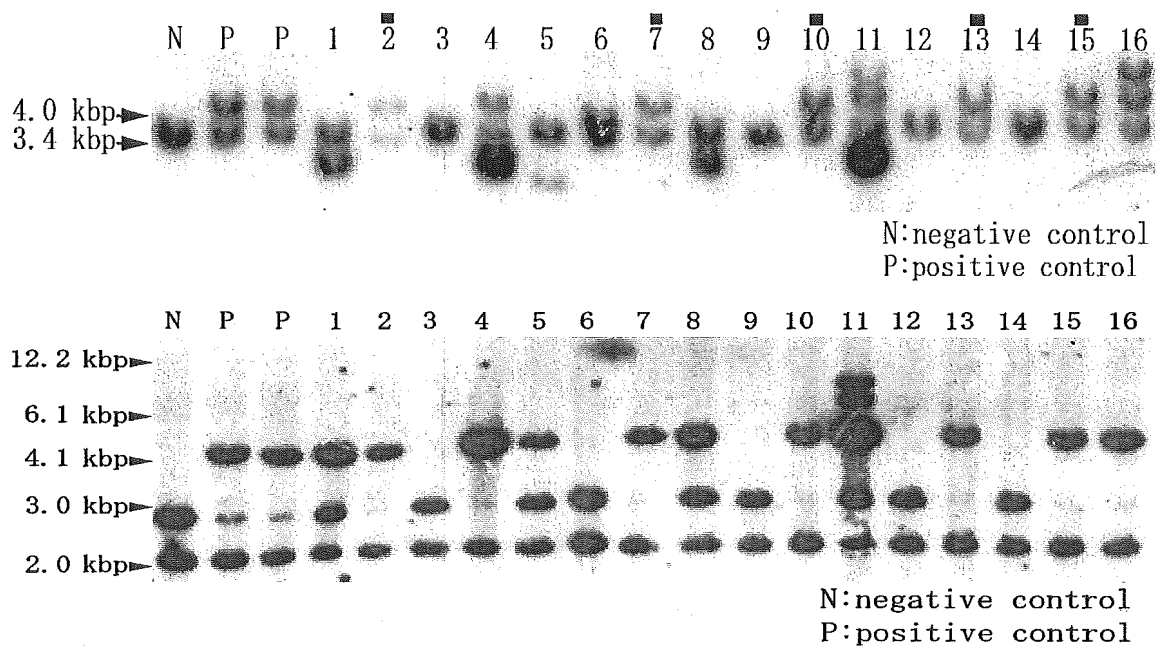


図.2. サザンブロット解析による相同組換え体の同定

(上 : BamH I 消化 下 : Nco I 消化) #2,7,10,13,15 : 相同組み換え体