

---

厚生労働科学研究費補助金  
難治性疾患克服研究事業

遺伝性脳小血管病の病態機序の  
解明と治療法の開発班

平成 21 年度 総括・分担研究報告書

---

Annual Report of the Research Committee for Hereditary  
Cerebral Small Vessel Disease

Health and Labour Sciences Research Grants  
The Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan

主任研究者 小野寺 理

平成22(2010)年3月

## 目次

### I. 総括研究報告書

|                         |             |   |
|-------------------------|-------------|---|
| 遺伝性脳小血管病の病態機序の解明と治療法の開発 | 主任研究者 小野寺 理 | 1 |
|-------------------------|-------------|---|

### II. 分担研究報告

|   |   |    |
|---|---|----|
| 1. CADASIL と NOTCH3 非関連遺伝性脳小血管病               |   | 7  |
| 分担研究者   | 水野 敏樹 (京都府立医科大学神経内科)  |    |
| 研究協力者   | 細見明子, 西郷和洋, 藤原康弘 (京都府立医科大学神経内科) 富本秀和<br>(三重大学神経内科) 中川正法 (京都府立医科大学神経内科)  |    |
| 2. 遺伝性脳小血管病 CARASIL の病態機序に関する研究               |   | 10 |
| 分担研究者   | 小野寺理 (新潟大学脳研究所生命科学リソース研究センター<br>脳疾患リソース解析部門分子神経疾患資源解析学分野)   |    |
| 研究協力者   | 西澤正豊 (新潟大学脳研究所臨床神経科学部門神経内科学分野)<br>中野今治 (自治医科大学神経内科学部門) 有馬 邦正 ( 国立精神<br>神経センター病院) 山本 格 (新潟大学腎研究施設構造病理学分野)                |    |
| 3. 血液脳関門の基礎的研究                                |   | 13 |
| 分担研究者   | 山田 真久 (理化学研究所脳科学総合研究センター)   |    |
| 4. 血液脳関門 <i>in vitro</i> 再構成モデル (BBB キット) の開発 |   | 16 |
| 分担研究者   | 丹羽 正美 (長崎大学大学院医歯薬学総合研究科神経薬理学分野)   |    |
| 研究協力者   | 中川 慎介 (長崎大学大学院医歯薬学総合研究科神経薬理学分野)   |    |
| 5. CADASIL の分子病態に関する研究                        |   | 19 |
| 分担研究者   | 脇田 英明 (国立長寿医療センター研究所 血管性認知症研究部)   |    |
| 研究協力者   | 渡邊淳, 國本正子 (国立長寿医療センター研究所血管性<br>認知症研究部) 吉崎嘉一 (東北大学大学院医学系研究科 形態形成<br>解析分野) 足立香代, 武田和也, 高橋慶吉 (国立長寿医療センター<br>研究所 血管性認知症研究部) |    |

|   |                              |
|---|------------------------------|
| 6. 「2光子励起レーザー顕微鏡を用いたマウス脳低灌流状態における血行動態の評価」に関する研究 | 22                           |
| 分担研究者   | 富本 秀和（三重大学大学院医学系研究科・神経病態内科学） |
| 研究協力者   | 矢田健一郎（三重大学大学院医学系研究科・神経病態内科学） |
| 7. プロテオミクスによるバイオマーカー発見のための標準的試料調製法の確立           | 25                           |
| 分担研究者   | 吉田 豊（新潟大学腎研究施設構造病理学分野）       |
| 研究協力者   | 山本 格（新潟大学腎研究施設構造病理学分野）       |
| 8. Htra1 遺伝子欠損マウスの作成と疾患モデルへの展開                  | 29                           |
| 分担研究者   | 佐藤 俊哉（新潟大学脳研究所動物資源開発研究分野）    |
| 研究協力者   | 廣川 祥子（新潟大学脳研究所動物資源開発研究分野）    |

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

# I 総括研究報告

## 総括研究報告書

### 遺伝性脳小血管病の病態機序の解明と治療法の開発 (21210301)

主任研究者 小野寺理 (新潟大学脳研究所生命科学リソース研究センター)

#### 1. 本研究班の目的

脳は血液脳関門という特殊な構造を持つ。この構造は脳小血管を中心とする neurovascular unit により構成されている。近年の画像診断の発達により、この脳小血管に首座をもつ病態が高頻度で指摘されるようになった(leukoaraiosis:LA)。LAは大脳白質を中心とする変化で、認知症、脳梗塞、出血性脳梗塞の発症に密接に関わっている。病態機序として、小血管の閉塞性の病態機序、血液脳関門の機能異常、等が唱えられているがまだ不明である。診断基準が確立されておらず、有効な治療方法も確立されていない。希に、家族性にLAを起こす遺伝性脳小血管病が報告されている。遺伝性脳小血管病には、常染色体性優生遺伝形式をとる Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL)や、劣性遺伝形式をとる Cerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CARASIL)等が知られている。いずれも20代から40代で脳梗塞様症状等で発症し、認知症を来す。本邦ではCADASILが60家系以上、CARASILが10家系前後、報告されている。しかしその正確な疾患頻度、病像は不明であった。本年、我々はCARASILの原因遺伝子を同定しTGF- $\beta$ ファミリーのシグナル伝達の更新が、その背景にあることを明らかにした。本発見により、脳小血管病をTGF- $\beta$ ファミリーシグナルの面から解明する糸口を得た。本研究班では本邦における、遺伝性脳小血管病の頻度、および症状を明らかとし、“TGF- $\beta$ ファミリーのシグナル異常に伴う脳小血管病 CARASIL”の病態解明を手がかりに、これらの遺伝子変異が、血液脳関門や、脳小血管に与える影響を検討する。疾患関連血液脳関門培養細胞モデルを構築し、候補薬剤の検討を行う。さらに、本症の早期診断法の確立、バイオマーカーの確立を目指す。

#### 2. 研究計画および方法

##### ① 遺伝性脳小血管病の実態調査 (水野 小野寺)

本邦における遺伝性脳小血管病患者の実態調査と生体資料収集を行い遺伝子検査による確定診断を行う(水野, 小野寺)。CADASILの診断においては、遺伝子検査と皮膚小血管の組織所見が重要であり、そのため、遺伝子、血清、髄液、皮膚、臨床症状、MRI画像の情

報を得、本邦における遺伝性小血管病の包括的データベースの構築を行う。さらにどのような行政サービスが必要とされているかを明らかにする..

② 遺伝性脳小血管病の病態機序の解明 (脇田 富本 山田 西澤 小野寺 佐藤)  
CADASIL は Notch3 受容体の変異で引き起こされる疾病である。本症は疾患関連変異型 Notch3 受容体の蓄積によると推定されている。しかし、疾患関連変異型 Notch3 受容体による Notch シグナル異常の関与も推定されている。一方 CARASIL ではセリンプロテアーゼの異常により結果として TGF- $\beta$  ファミリーシグナルの亢進を引き起こす。本研究班では、これらのシグナル伝達の関与をモデルマウスで検討する。脇田はすでに CADASIL モデルマウスを保有しており、かつマウスでの低灌流モデルを開発している。また申請者は CARASIL のモデルマウスを保有している。さらに山田はアストロサイトで TGF- $\beta$  ファミリー受容体の一つである BMP 受容体 1A を欠失させることにより、血液脳関門の脆弱性が引き起こされることを示し、TGF- $\beta$  ファミリーシグナルが血液脳関門に重要であることを示している。これらの脳小血管病モデルマウスにて脳小血管病を引き起こす遺伝子の機能、およびその遺伝子の下流のシグナル伝達を検討する。さらに、本邦で開発された脳卒中易発症高血圧自然発症ラット (SHRSP) を用い血液脳関門の異常を、疾患関連遺伝子、およびシグナル異常の面から検討を加える (富本)。

③ 疾患関連血液脳関門培養細胞モデルの開発 (丹羽 脇田 山田 小野寺)  
丹羽らの開発した血液脳関門を再現した BBB キットを用い、TGF- $\beta$  ファミリーシグナルの亢進による血液脳関門機能を検討する。

### 3. 1年目の成果の概要

本年度は Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL)の遺伝子診断が除外された、若年性ビンスワンガー病患者 36 名 (遺伝性、非遺伝性問わず) を集積し Cerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CARASIL)の原因遺伝子 HTRA1 の変異の有無を検索した。その結果、新たなアミノ酸置換を伴うミスセンス変異のホモ接合体を 1 例見いだした。同変異は正常高齢者 400 染色体では認められず、また、非発症者の同胞ではヘテロ接合体であり、本遺伝子変異が、本例の発症に寄与していると判断した。本変異は HTRA1 のプロテアーゼドメインに位置するが、TGF- $\beta$  ファミリーシグナルの抑制作用は、今までの報告例よりも弱い。また臨床的には CARASIL の三徴である、白質脳症、変形性腰椎症、

禿頭のうち、禿頭を欠く。我々はすでに禿頭を欠く例を報告しており、これらの結果から CARASIL の診断には禿頭は必須ではないと判断した。この結果をふまえ、また、今までの CARASIL の遺伝子診断例、および、本邦の CADASIL の遺伝子診断例より、CADASIL および CARASIL の診断基準を設定した。今後、この診断基準に基づき、全国調査を行い、臨床的に若年性ビンスワンガー病（脳小血管病）を疑われる症例の中での、HTRA1, Notch3 変異の頻度を明らかとする。基礎的には、本症の機序として TGF- $\beta$  ファミリーシグナルの亢進がその背景にあることを、申請者らは示した。しかし TGF- $\beta$  が血液脳関門にどのような影響を与えるかは明らかになっていない。本研究班の丹羽らは初代培養系を用いた脳血管関門の *in vitro* モデルを用いて、TGF- $\beta$  によって血液脳関門の透過性が増すことを示した。これはサイトカインシグナルが血液脳関門の制御に密接に関わっていることを示している。また山田らは、ノックアウトマウスを用いて、TGF- $\beta$  ファミリーシグナルの受容体が血液脳関門の機能維持に重要な役割を果たしていることを示した。これらの基礎的な成果は、サイトカインによる血液脳関門の機能制御を明らかにした点で重要である。

## Ⅱ 分担研究報告



厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)

分担研究年度終了報告書

遺伝性脳小血管症の病態機序の解明と治療法の開発

CADASIL と NOTCH3 非関連遺伝性脳小血管病

|       |      |              |
|-------|------|--------------|
| 分担研究者 | 水野敏樹 | 京都府立医科大学神経内科 |
| 研究協力者 | 細見明子 | 京都府立医科大学神経内科 |
|       | 西郷和洋 | 京都府立医科大学神経内科 |
|       | 藤原康弘 | 京都府立医科大学神経内科 |
|       | 富本秀和 | 三重大学神経内科     |
|       | 中川正法 | 京都府立医科大学神経内科 |

研究要旨

本邦での脳小血管病家系を *NOTCH3* 異常が同定された CADASIL (NOTCH-C) と、*NOTCH3* 異常を認めなかった遺伝性脳小血管病(非 NOTCH-S)に分け、その臨床症状・画像・生検所見について比較検討した。Notch3-C 15家系 18名、常優が疑われた非NOTCH-S 10家系 10名と遺伝形式確定が難しかった非NOTCH-S 6家系 6名に分け解析した。NOTCH-C は発症年齢が最も若く、片頭痛発作が多く、MRI 側頭極病変が多かった。非 NOTCH-S はパーキンソニズム・仮性球麻痺を多く認め、高血圧合併の頻度が高かった。

A. 研究目的

遺伝性脳小血管病は常染色体優性遺伝(常優)する疾患としては CADASIL が最もよく知られ本邦でも既に 70 家系以上報告されているが、原因遺伝子とされる *NOTCH3* の異常を認めない遺伝性脳小血管病も多く報告されており、その位置付けには混乱がある。本研究では本邦での脳小血管病家系を、*NOTCH3* 異常が同定された CADASIL (NOTCH-C) と、*NOTCH3* 異常を認めなかった遺伝性脳小血管病(非 NOTCH-S)に分け、その臨床症状、画像・生検所見について比較検討した。

B. 研究方法

対象は脳卒中の家族内発症を認め、皮質下梗塞と白質病変を有する 31 家系 34 名(男性 15 名、女性 19 名、平均年齢 54.0 歳)。対象者末梢血リンパ球 DNA を用いて PCR により *NOTCH3* exons 1 から 23 を増幅、一部 DHPLC 法によりスクリーニング後塩基配列を決定した。*NOTCH3* 異

常を認めた群と認めなかった群の臨床症状、画像所見について比較検討した。統計学的解析は Mann-Whitney または  $\chi^2$  乗検定を用いた。

(倫理面への配慮)

京都府立医科大学倫理委員会の承認を得た遺伝性神経疾患に対する遺伝子解析の方法に従って説明し、同意を得た上で行った。

B. 研究結果

Notch3 に異常を認め CADASIL (NOTCH-C) と確定したのは 15 家系 18 名であった。

非 NOTCH-S は常染色体優性遺伝(常優)が疑われた 10 家系 10 名と遺伝形式確定が難しく家族内に脳卒中発症者(家族内)がいる 6 家系 6 名に分けて解析した。三群の臨床症状は、発症年齢は NOTCH-C が最も若く、片頭痛発作は NOTCH-C で多い傾向であったが、統計学的には有意ではなかった。パーキンソニズム・仮性球麻痺については非 NOTCH-S で有意に多く認め、重症例が多いと考えられた。認知症の頻度は三群間で有意な差を認めなかったが、MMSE 値は非

NOTCH-S で有意に低下していた。脳卒中危険因子・検査所見を比較すると、非 NOTCH-C では有意に高血圧合併の頻度が高かった。MRI 所見では側頭極病変が非 NOTCH-S では統計学的に有意に低くかった。

#### D. 研究発表

##### 1. 論文発表

Cognitive Impairment and Cerebral Hypoperfusion in a Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy With Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy Patient Improved During Administration of Lomerizine. Mizuno T, Kondo M, Ishigami N, et al. Clinical Neuropharmacology 2009; 32(2):113-6.

Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy, first reported case from Sri Lanka with review of literature from the Indian Subcontinent. De Silva KR, Gamage R, Mizuno T. et al. Journal of Clinical Neuroscience 16 (2009), p1492-1493.

塩酸ロメリジン投与により認知機能と脳血流の改善を3年間認めた Cerebral Autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy の1例. 石神紀子 水野敏樹 近藤正樹ら. 神経治療 26 : 167-172, 2009

##### 2. 学会発表

Reactivity of cerebral blood vessel in CADASIL monitoring by Iodine-123- iodoamphetamine single photon emission computed tomography. Mizuno T, Nagakane Y, Hosomi A, et al. The 4<sup>th</sup> Congress of the international Society for Vascular Behavioural and Cognitive Disorders (VAS-COG), Singapore, 2009.1.14-16.

CADASIL における脳血管反応性. 水野敏樹 永金義成 細見明子ら. 第 34 回日本脳卒中学会総会 松江 2009.3.20-22

CADASIL における脳血管反応性. 藤原康弘 水野敏樹 永金義成ら. 第 50 回日本神経学会総会 仙台 2009.5.20-22

CADASIL に対する lomerizine HCl の有効性の検討. 石神紀子, 水野敏樹, 諫山玲名ら. 第 27 回日

本神経治療学会総会 2009.6.11- 12 熊本.

CADASIL における血管内皮機能の評価. 藤原康弘 水野敏樹 永金義成ら. 第 28 回日本認知症学会 仙台 2009.11.21

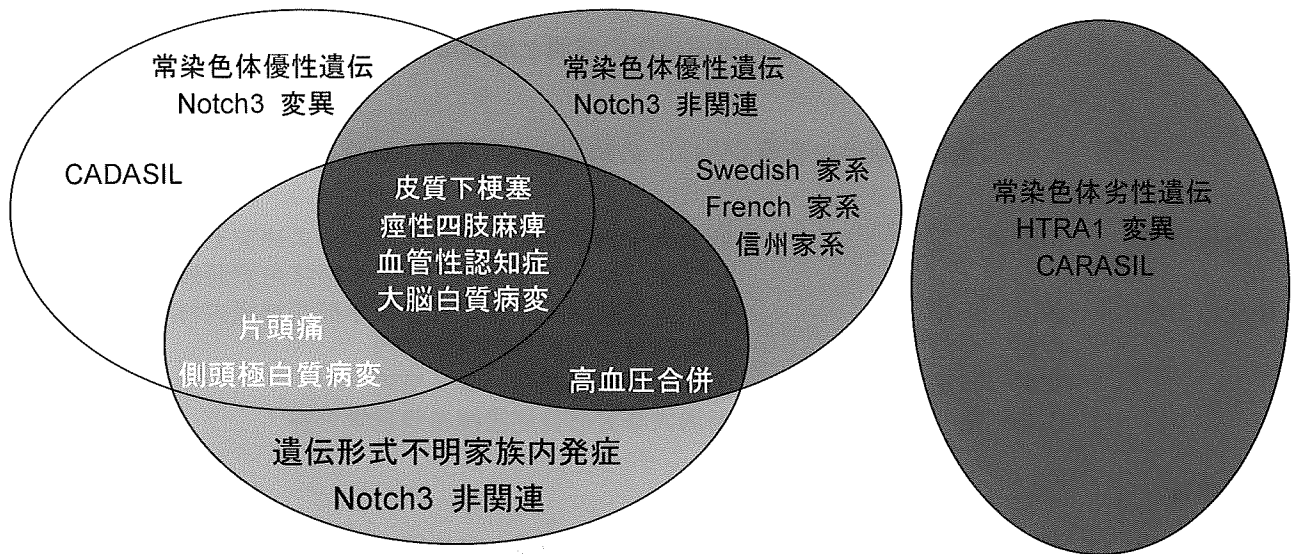
#### E. 知的財産権の出願・登録状況

なし

#### F. 健康危険情報

なし

### 遺伝性脳小血管病



厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)

分担研究年度終了報告書

遺伝性脳小血管病の病態機序の解明と治療法の開発班

遺伝性脳小血管病 CARASIL の病態機序に関する研究

|       |                                 |   |
|-------|---------------------------------|---|
| 分担研究者 | 小野寺 理                           | 新潟大学脳研究所生命科学リソース研究センター<br>脳疾患リソース解析部門分子神経疾患資源解析学分野                            |
| 研究協力者 | 西澤 正豊<br>中野 今治<br>有馬 邦正<br>山本 格 | 新潟大学脳研究所臨床神経科学部門神経内科学分野<br>自治医科大学神経内科学部門<br>国立精神・神経センター病院<br>新潟大学腎研究施設構造病理学分野 |

研究要旨

CARASIL は、脳選択的に小血管異常が生じ、多発性脳梗塞と白質脳症を呈する常染色体劣性遺伝性疾患である。われわれは、これまでにセリンプロテアーゼをコードする *HtrA1* 遺伝子のミスセンスおよびナンセンス変異によって CARASIL が引き起こされることを見出し、ミスセンス変異型 *HtrA1* ではプロテアーゼ活性が低下していることを明らかにした。*HtrA1* の機能として、血管新生やリモデリングに重要な役割を持つ TGF- $\beta$  ファミリーシグナルをプロテアーゼ活性依存性に抑制することが知られており、CARASIL では TGF- $\beta$  ファミリーシグナルの調節障害が存在することが推察された。本研究では、レポーターアッセイによって、CARASIL 疾患関連ミスセンス変異型 *HtrA1* が TGF- $\beta$  ファミリーシグナルを抑制できないことを示した。さらに、患者脳の免疫組織学的解析及び *in situ hybridization* によって、患者の脳小動脈病変に TGF- $\beta$  1 シグナルの亢進が関与していることを明らかにした。

A. 研究目的

CARASIL の病態における TGF- $\beta$  ファミリーシグナルの関与を明らかにする。

B. 研究方法

CARASIL 疾患関連ミスセンス変異型 *HtrA1* (V297M、A252T) による TGF- $\beta$  ファミリーシグナルの抑制作用を、TGF- $\beta$  ファミリーである TGF- $\beta$  1, BMP2, BMP4 をリガンドとして、C2C12 マウス筋芽細胞を用いたレポーターアッセイにて検討した。また、患者剖検脳を用いて、抗 TGF- $\beta$  1 抗体、抗 ED-A fibronectin (EDA-FBN) 抗体、抗 versican 抗体による免疫組織学的解析と *in situ hybridization* による EDA-FBN mRNA の検出を行った。

(倫理面への配慮)

本研究で対象とするヒト由来資料については、資料、DNA の保存・管理、その後の解析について患者および患者の親族に説明し、研究目的に使用することへの同意を得ている。また個人のプライバシーに関しては十分に保護する。

C. 研究結果

野生型 *HtrA1* は TGF- $\beta$  ファミリーシグナルによるプロモーターの活性化を抑制するが、疾患関連ミスセンス変異型 *HtrA1* は抑制しなかった。免疫組織学的解析では、患者の脳小動脈の中膜における TGF- $\beta$  1 の発現増加と、肥厚した内膜における EDA-FBN と versican の沈着を認めた。また、EDA-FBN mRNA を血管内皮細胞で検出した。

D. 研究発表

1. 論文発表

Hara K, Shiga A. et al. Association of HTRA1 Mutations and Familial Ischemic Cerebral Small-Vessel Disease *New England Journal of Medicine* 2009;360:

1729-39

2. 学会発表

2009年9月 第54回人類遺伝学会

“遺伝性脳小血管病 CARASIL は TGF- $\beta$  ファミリーシグナルの亢進により引き起こされる”

E. 知的財産権の出願・登録状況（予定含む）

（特許取得・実用新案登録・その他）

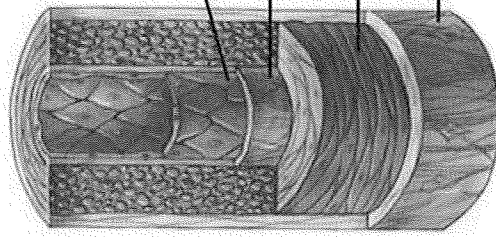
なし

F. 健康危険情報

なし

# CARASILの病態機序仮説

動脈の構造



患者脳小血管

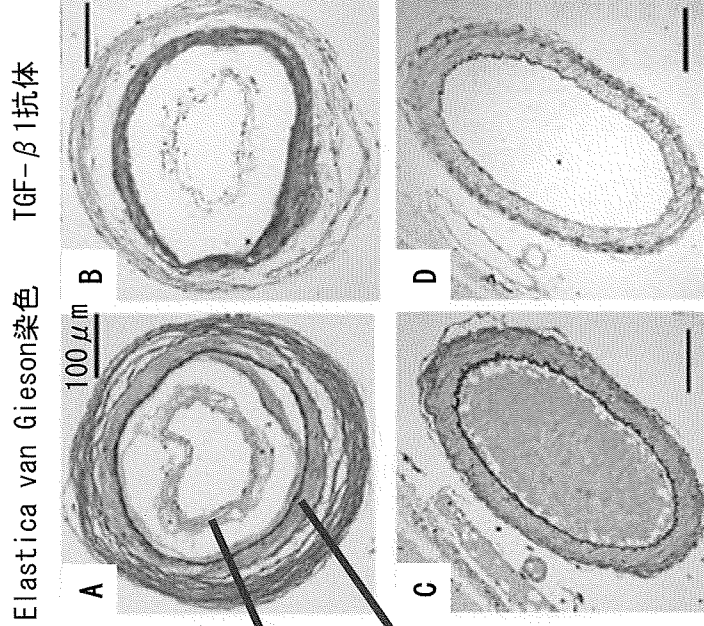
内膜

内弾性板

中膜

外膜

対照脳小血管



Elastica van Gieson染色 TGF-β 1抗体

HTRA1のプロテアーゼ活性低下

TGF-β シグナルの亢進

細胞外マトリックス蛋白の増加

血管内膜の肥厚

Hara K, Shiga A. et al. *N Engl J Med* 2009

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)

分担研究年度終了報告書

遺伝性脳小血管症の病態機序の解明と治療法の開発

血液脳関門の基礎的研究

分担研究者 山田 真久 理化学研究所脳科学総合研究センター

研究要旨

遺伝性脳小血管病の病態機序解明を目指し、TGF- $\beta$  ファミリーのシグナル伝達の機能亢進メカニズムについての検討を行なう。分担者である山田は、アストロサイトで TGF- $\beta$  ファミリー受容体の一つである BMP 受容体 1A を欠失させることにより、血液脳関門の脆弱性が引き起こされることを示し、TGF- $\beta$  ファミリーシグナルが血液脳関門の維持に重要であることを示している。本研究班では、これらの脳小血管に異常を示すマウス個体を用い、脳小血管病を引き起こす遺伝子の機能、および下流のシグナル伝達が血液脳関門の機能維持への役割を検討する。

A. 研究目的

遺伝性脳小血管病は、血液脳関門の破綻とともに TGF- $\beta$  ファミリーシグナルの細胞内シグナル亢進が指摘されている。これまでに、脳循環低下という血管内皮細胞に加わる機械的な圧力の低下が、TGF- $\beta$  ファミリーの液生因子発現を促進すること、または遺伝的に血管周囲に TGF- $\beta$  蛋白質が蓄積することなど血液脳関門の破綻を誘導する機序には諸説がある。山田はアストロサイトで TGF- $\beta$  ファミリーの一つである BMP の受容体 BMP type IA(BMPRIA)を欠失させることにより、血液脳関門の脆弱性が引き起こされることを示した。当初、BMP 受容体を介したシグナルは、他の TGF- $\beta$  受容体ファミリーと同様に Smad を活性化する事が考えられたため、アストロサイトにおける BMPRIA 欠損マウスでは Smad の活性化が起こらないと想定された。

山田はこの Smad の活性化機序に関してさらに検討をすすめたところ、予想に反し脳血管周囲のアストロサイトにおいて強く Smad の核移行を認めた。山田は、このアストロサイトにおけるパラドキシカルなシグナル亢進機構が、アストロサイトの BMPRIA 受容体により活性化される非 Smad シグナルカスケードによる干渉であることを明らかにした。脳組織の炎症により活性化される BMP シグナルは、脳組織炎症反応機構の一端であると考えられた。山田は、

炎症反応における BMP シグナルの時系列的機能変化をマウス個体にて検討し、脳血管周囲の組織再生機能を検討した。

B. 研究方法

BMP の type I 受容体はセリン/スレオニンキナーゼによって Smad の C 末端側ドメインをリン酸化する。このリン酸化された Smads が核内へ移行することにより、様々な細胞分化に関連した遺伝子発現を誘導している。脳組織の炎症に伴い発現する BMP4 に親和性の高い type I 受容体は BMPRIA と BMPRIIB の2種類が脳内にて発現している。そこで、我々は Bmpr1a 遺伝子と Bmpr1b 遺伝子のそれぞれの遺伝子をマウス脳損傷部位にて破壊し、比較することで、BMP シグナルがグリアの炎症反応に及ぼす機能を解析することが可能と考えた。

C. 研究結果

Bmpr1a 遺伝子欠損によって、損傷部位アストロサイトの増殖が抑制され、神経細胞の生存が減少する結果となった。一方、成熟 BMPRIIB 受容体遺伝子欠損マウスは、脳損傷により活性化アストロサイトの増加と、神経細胞の生存促進を示す結果となった。驚いた事に、アスト

ロサイトの増殖は BMPtypeI 受容体の違いより制御され、神経細胞の生存は、アストロサイトの増殖と良く相関していることが分かった。

山田は、BMPRIA 分子と BMPRIB 分子が活性化させる細胞内分子の違いを見ることが、活性化アストロサイトの増殖と分化に果たす BMP の機能を探ることになると考えた。BMPRIA 分子は細胞内でアポトーシス阻害タンパクの一つである XIAP と直接結合することが知られている。XIAP が活性化する細胞内分子には、extracellular signal-regulated kinase (ERK) と mitogen-activated protein kinases (MAPKs)が知られており、共に細胞増殖を促進する因子であることが分かっている。また、ERK キナーゼの活性化は Smad の核移行を抑制することが知られている。従って、それぞれの BMP 受容体に結合し、活性化される細胞内分子が細胞分化を促進する Smad 分子の核移行へ与える影響を検討したところ、BMPRIA は XIAP と結合能を有していたが、BMPRIB は XIAP と結合能を有していなかった。この XIAP は炎症アストロサイトのみならず、一過性に産生されることから、炎症組織での BMP 受容体シグナルを制御し、Smad の核移行を抑制的に制御している分子機能があることが示された。以上の解析から、異なる BMP 受容体のシグナルが、血管周囲の神経組織修復に関与することが示された。

脳血管周囲組織の損傷は、脳血流の低下などの血流による物理的影響が引き金と考えられる。我々は、脳循環低下モデルマウス (M5 ムスカリン性アセチルコリン受容体遺伝子欠損マウス)を用いて血液脳関門の破綻を解析したが、脳組織への血液の浸潤は検出できなかった。従って、血液脳関門が破綻に至る機序解明には、まだ複数の因子が関与していることが推測された。一方で、TGF- $\beta$  ファミリーのシグナル伝達の機能亢進は、血液脳関門を破綻させ、血管周囲組織に炎症を引き起こす。脳血管組織の炎症には、脳組織を構成するアストロサイトの関与が重要であると考えられる。通常、脳組織では、BMP 蛋白質に産生は低く、炎症に伴う反応として産生される。BMP シグナルによる細胞間相互作用が、脳血管周囲の炎症を制御するならば、不適切な BMP シグナル作用は、脳血管周囲の炎症を持続させる可能性が考えられた。

#### D. 研究発表

##### 1. 論文発表

Kitamura, N., Araya, R., Kudoh, M., Kishida, H., Kimura, T., Miyuki, M., Takashima, A., Sakamaki, Y., Hashikawa, T., Ito, S., Ohtsuki, S., Terasaki, T., Wess, J. & Yamada, M.

Beneficial effects of estrogen in a mouse model of cerebrovascular insufficiency.

PLoS One. v4(4),e5159, 2009

##### 2. 学会発表(シンポジウム)

Yamada, M., Kitamura, N., Sato, Y., Furuichi, T. & Mishina, Y.

BMPR1A and BMPR1B differentially regulate gliosis.

52nd Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry. Ikaho, Japan. June (2009).

##### 3. 総説発表

山田真久、北村尚士

脳の血の巡りが脳機能の男女差を生む〜認知機能に対するエストロゲンの効果の違いに新視点

生物と化学 vol.48, No1 ,p10-12 (2010)

#### E. 知的財産権の出願・登録状況(予定含む)

(特許取得・実用新案登録・その他)

なし

#### F. 健康危険情報

特になし



# BMP 受容体シグナリングと血液脳関門の開閉

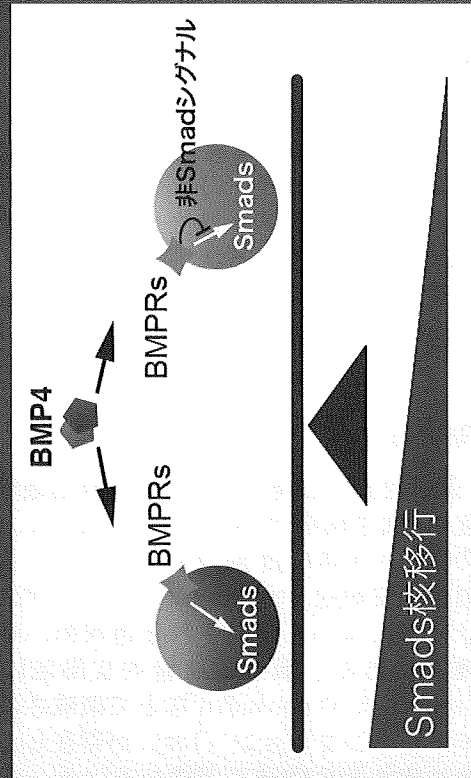
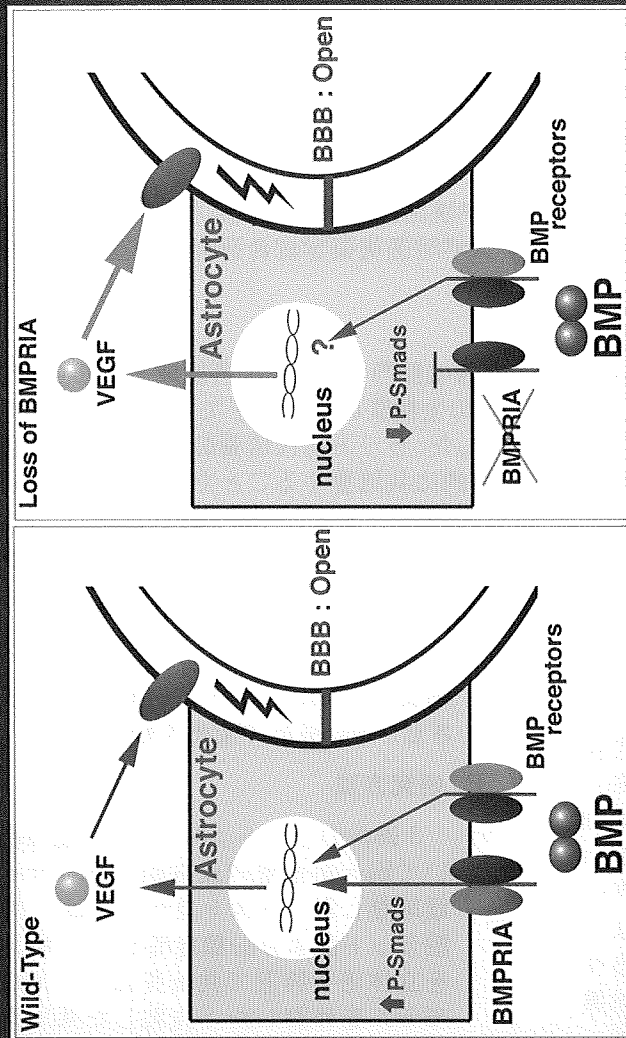
BMP 受容体A1遺伝子の破壊により血液脳関門から血液が神経組織へ浸潤する結果が示された (Araya et al., Molecular and Cellular Neuroscience 2008)



予想に反し、受容体遺伝子の破壊により、BMPシグナルの亢進が示された



炎症アストロサイト内の細胞内シグナルの制御機構が明らかになった (Kitamura et al., in preparation)



厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)

分担研究年度終了報告書

遺伝性脳小血管症の病態機序の解明と治療法の開発

血液脳関門 *in vitro* 再構成モデル (BBB キット) の開発

分担研究者 丹羽 正美  
研究協力者 中川 慎介

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科神経薬理学分野  
長崎大学大学院医歯薬学総合研究科神経薬理学分野

## 研究要旨

遺伝性脳小血管症の病態機序の解明に貢献する、血液脳関門 *in vitro* 再構成モデル(BBB キット) を考案し、常染色体劣性遺伝性脳動脈症 (CARASIL) の主病変の責任分子である TGF- $\beta$  の担当細胞である脳ペリサイトの BBB 機能への関与を明らかにした。ラット初代培養の脳毛細血管内皮細胞、ペリサイト、アストロサイトの 3 種類の細胞を立体的に共培養することで薬物の脳内移行性を調節する主要因であるタイトジャンクション、P-glycoprotein および MRP などの輸送担体が機能的に発現していることを明らかにし、世界で初めて、生体と同じように 3 種類の細胞から構成される BBB モデル (BBB キット) を完成した。

### A. 研究目的

遺伝性脳小血管症における神経細胞障害発症に、血液脳関門 (Blood-brain barrier, BBB) の機能が密接に関与している。BBB は、脳毛細血管内皮細胞、ペリサイト、およびアストロサイトによって構成される選択的バリアー機構である。脳毛細血管内皮細胞には、claudin-5 や occludin などで構成されるタイトジャンクション (TJs) が存在し、効果的に細胞間隙輸送を閉鎖している。また、ZO-1 や ZO-2 などの裏打ちタンパク質は、TJs タンパクとアクチン細胞骨格とを連結し、細胞間隙輸送を制御している。選択的なトランスポーターやイオンチャネルなどが管腔側と基底膜側細胞膜に非対称的に分布しており、物質輸送を制御している。このような BBB の特異な機能は、その構成細胞間のクロストークにより構築維持されており、正常時および病態時において、BBB 構成細胞と神経細胞は連携した反応を示し、これらの細胞が一環とした機能単位を構成している (neurovascular unit)。

本研究では、1) 病態探索と BBB 保護薬や神経 - BBB 系に対する総合的な保護作用という視点での治療薬の開発のために、生体の BBB 機能を再現した BBB *in vitro* 再構成モデル (BBB キット) の開発を試みた。2) 更に、

完成した BBB キットに過剰な TGF- $\beta$  を作用させ、BBB 機能の変化を観察した。

### B. 研究方法

3 週齢のラットより、密度勾配遠心法を用いて脳毛細血管内皮細胞とペリサイトを単離培養した。アストロサイトは、生後 2 日齢ラット脳より分離培養した。3 種類の細胞を立体培養装置で共培養し、7 種類の BBB モデルを作製した。作製した共培養モデルは、経内皮電気抵抗 (TEER) と sodium fluorescein (Na-F, MW: 376Da) の透過性を用いて TJs 機能を検定し、TJs 蛋白質 (claudin-5、ZO-1、occludin) の発現を Western blotting および蛍光免疫染色で評価した。モデルの中で、最も TJs 機能の高いモデル (EPA 型 BBB キット) を用いてトランスポーター (P-gp、MRP1、GLUT-1) の発現を免疫染色で確認し、P-gp 機能を rhodamin 123 の輸送で検討した。更に、EPA 型 BBB キットを用いた既存薬物 19 種類の透過係数をマウスでの *in vivo* の透過係数と比較した。

### C. 研究結果

1) 7 種類の BBB モデルの中で、脳毛細血管内皮細胞とアストロサイト、およびペリサイトの 3 種細胞の共培養系 (EPA 型) が最も

TJ機能が亢進していた (TEERの上昇、透過性の減少)。また、この BBB キットでは TJs 蛋白質である claudin-5、ZO-1 の発現上昇、ならびに細胞間接着部位への集積がみられた。本 BBB モデルでは、トランスポーター (P-gp、MRP1、GLUT-1) も発現しており、P-gp の輸送方向性は脳側から血液側への輸送が有意であった。EPA 型 BBB キットで得られた既存薬物 19 種類の透過係数と *in vivo* で得られた透過係数の相関係数は  $R^2=0.89$  であった。2) TGF- $\beta$  1 (0.1, 1.0, 10 ng/ml) を EPA 型 BBB キットの管腔側 (血液側) と基底膜側 (脳側) に注入したところ、TEER が著明に減少した。

#### D. 研究発表

1. 論文発表 ①Morofuji Y, Nakagawa S, So G, Hiu T, Horai S, Hayashi K, Tanaka K, Suyama K, Deli MA, Nagata I, Niwa M: Pitavastatin Strengthens the Barrier Integrity in Primary Cultures of Rat Brain Endothelial Cells. *Cell Mol Neurobiol*(in press) 2010 ②Miyata N, Kumagai K, Osaki M, Murata M, Tomita M, Hozumi A, Nozaki Y, Niwa M: Pentosan reduces osteonecrosis of femoral head in SHRSP. *Cli Exp Hypertens* (in press) 2010 ③Sakurai-Yamashita Y, Nabika T, Niwa M: Blood pressure-independent factors determine the susceptibility to delayed neuronal death in the stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Cell Mol Neurobiol* (in press) 2010 ④Hirakawa C, Tanaka K, Takaya Y, Nakagawa S, Kataoka Y, Tagawa Y, Niwa M: Development of a novel cell-based assay to evaluate the malignant potential of cancer *in vitro*. *Anticancer Res* 29:2541-2546, 2009 ⑤Nakagawa S, Deli MA, Kawaguchi H, Shimizudani T, Shimono T, Kittel A, Tanaka K, Niwa M: A new blood-brain barrier model using primary rat brain endothelial cells, pericytes and astrocytes. *NeurochemInt* 54:253-263, 2009 ⑥Nishioku T, Dohgu S, Takata F, Eto T, Ishikaw N, Kodama KB, Nakagawa S, Yamauchi A and Kataoka Y: Detachment of brain pericytes from the basal lamina is

involved in disruption of the blood-brain barrier caused by lipopolysaccharide-induced sepsis in mice. *Cell Mol Neurobiol* 29:209-316, 2009 ⑦中川慎介、丹羽正美. 血液脳関門 (BBB). *日本薬理学雑誌* 133:170-172, 2009

2. 学会発表 ①Tanaka K et al. Evaluation of the brain metastatic potencies of lung cancer cells with BBB Kit. 8<sup>th</sup> Cerebral Vascular Biology International Conference (CVB2009), Sendai, June 28-July 02, 2009 ②Morofuji Y et al. Effect of statins on the blood-brain barrier *in vitro*. CVB2009 ③Horai S et al. Cilostazol enhances barrier function of rat brain microvascular cells *in vitro*. CVB2009 ④Tanaka K et al. Evaluation of the brain metastatic potency of cancer cells with BBB kit. 12<sup>th</sup> International Symposium Signalling at Blood-Brain and Blood-Retinal Barriers. London, Sept 9-11, 2009 ⑤Nakagawa S et al. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) enhances blood-brain barrier (BBB) functions of rat brain microvascular endothelial cells *in vitro*. 9<sup>th</sup> International Symposium on VIP, PACAP and Related Peptides, Kagoshima, Oct 5-8, 2009

#### E. 知的財産権の出願・登録状況 (予定含む)

(特許取得・実用新案登録・その他)

#### F. 健康危険情報

(国民の生命・健康に重大な影響を及ぼす情報として厚生労働省に報告すべきものについて把握した過程、内容、理由を記載する。またその情報源の詳細。)

# 血液脳関門 in vitro 再構成モデル(BBBキット)

