

認め、本邦で頻度の高い脳小血管病 Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy (CADASIL)の原因遺伝子である *Notch-3* の変異が否定された 41 例を対象として、*HTRA1* の塩基配列解析を行ったところ、4 例(9.8%)で新規の *HTRA1* 変異をヘテロ接合体で見出した。これらの変異は、非認知症コントロール 300 例では認めなかった。次に、新たに見出した変異型 *HTRA1* の精製蛋白を作成し、プロテアーゼ活性を測定したところ、ホモ接合体で発症する変異型 *HTRA1* に比して、著明な活性の低下を認めた。このことから、*HTRA1* 変異はそのプロテアーゼ活性依存性に脳小血管病の危険因子になると考えられる。

A. 研究目的

①CARASIL の MRI 画像 に関する研究

CARASIL は常染色体劣性遺伝性の脳小血管病である。CARASIL の頭部 MRI 画像所見として、広汎な大脳白質に加えて、側頭葉前部、外包に T2 強調画像で高信号を呈することが報告されている。これらの所見は、常染色体優性遺伝性の脳小血管病である CADASIL と類似している。しかし、遺伝子検査によって、診断が確定された CARASIL 症例について、まとまった MRI 所見の報告はない。

本研究では、遺伝子検査で診断が確定された CARASIL 症例の頭部 MRI 画像の特徴を抽出し、CADASIL との相違点を示すことを目的とした。

②HTRA1 変異ヘテロ接合体と脳小血管病の関連に関する研究

Cerebral Autosomal Recessive Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy (CARASIL) は *High Temperature Requirement Serine Peptidase A1 (HTRA1)* 遺伝子変異のホモ接合体によって発症する脳小血管病である。CARASIL は、セリンプロテアーゼである *HTRA1* の機能喪失によって引き起こされる。これまでの CARASIL 患者の家系では両親の発症は確認されておらず、片側アレルにのみ *HTRA1* 遺伝子の変異を有するヘテロ接合体の病的意義は不明であった。

本研究では、脳小血管病における *HTRA1* 遺伝子変異のヘテロ接合体の頻度と病的意義を明らかにすることを目的として、脳小血管病症例の *HTRA1* 遺伝子について塩基配列解析を行い、さらに精製 *HTRA1* 蛋白を用いた酵素活性の検討を加えた。

B. 研究方法

①CARASIL の MRI 画像 に関する研究

広汎な大脳白質病変を呈し、遺伝子検査によって CARASIL と確定診断した 5 家系 5 例の頭部 MRI 画像を収集し、T2 強調画像および FLAIR 画像での異常信号と萎縮について解析を行った。また、過去の MRI 画像が入手可能であった 2 例について、経時的な画像変化を解析した。

②HTRA1 変異ヘテロ接合体と脳小血管病の関連に関する研究

広汎な皮質下梗塞と大脳白質病変を呈し、本邦で頻度の高い脳小血管病である Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy (CADASIL)の原因遺伝子 *Notch-3* の変異が否定された 41 例について、ダイレクトシーケンス法による *HTRA1* 遺伝子の塩基配列解析を行った。FreeStyle293 Expression System を用いて見出した変異の精製蛋白を作成し、FTC で標識したカゼインを器質として、その酵素活性を測定した。

(倫理面への配慮)

患者 DNA は、十分なインフォームドコンセントを行い、同意書を作成した上で、末梢血リンパ球から抽出しており、倫理面の問題は無い。

C. 研究結果

①CARASIL の MRI 画像 に関する研究

CARASIL 症例では、径 3mm 以下の空洞形成を伴う大脳深部白質病変および前頭葉前部、側頭葉前部、外包病変、微小出血を全例に認めた。

CARASIL 症例では、認知機能障害に先行して一様に広汎な白質病変が形成されていた。

進行期の CARASIL 症例で認める中脳大脳脚や橋背側～中小脳脚の病変は、CADASIL での報告がなく、CARASIL の画像診断の hallmark になる可能性がある。

②HTRA1 変異ヘテロ接合体と脳小血管病の関連に関する研究

70 歳未満で、多発性皮質下梗塞と広汎な大脳白質病変を呈する 41 例のうち、4 例 (9.8%) で新規の *HTRA1* 変異を片側アレルにのみ、つまりヘテロ接合体で見出した。これらの変異は、非認知症コントロール 300 例では認めなかった。新規変異を有する症例は、CARASIL に類似した臨床像を呈しており、新規変異型 *HTRA1* 蛋白は、既報のホモ接合体で発症する変異と比較して、顕著なプロテアーゼ活性の低下を認めた。以上の結果から、新規 *HTRA1* 変異のヘテロ接合体は、プロテアーゼ活性依存性に脳小血管病の発症危険因子となると考えられる。

D. 研究発表

1. 論文発表

1. Nozaki H, Nishizawa M, Onodera O. Dementia: progress in diagnosis and treatment; Topics, V. Recent topics; 4. Detection of novel dementia-related genes; 2) Dysregulation of TGF-beta family signaling and hereditary cerebral small vessel disease: insight into molecular pathogenesis of CARASIL. *Nihon Naika Gakkai Zasshi*. 2011 Aug 10;100(8):2207-2213.
2. Atsushi Shiga, Hiroaki Nozaki, Akio Yokoseki, Megumi Nihonmatsu, Hirotohi Kawata, Taisuke Kato, Akihide Koyama, Kunimasa Arima, Mari Ikeda, Shinichi Katada, Yasuko Toyoshima, Hitoshi Takahashi, Akira Tanaka, Imaharu Nakano, Takeshi Ikeuchi, Masatoyo Nishizawa, Osamu Onodera. Cerebral small-vessel disease protein HTR

A1 controls the amount of TGF- β 1 via cleavage of proTGF- β 1. *Human Molecular Genetics* 2011;20(9):1800-1810.

3. 野崎洋明, 西澤正豊, 小野寺理. CARASIL の臨床・病理像と病態機序 (解説) *Annual Review 神経* 2011:251-259.
4. Shiga A, Nozaki H, Nishizawa M, Onodera O. Molecular pathogenesis of cerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy. *Brain Nerve*. 2010; 62(6):595-599.
5. 野崎洋明, 志賀篤, 西澤正豊, 小野寺理. CARASIL の分子病態機序. *神経内科* 2010;72(4): 408-412.

2. 学会発表

1. Megumi Nihonmatsu, Atsushi Shiga, Hiroaki Nozaki, Masatoyo Nishizawa, Osamu Onodera. TGF- β pathway is specifically activated in hereditary cerebral small-vessel disease. 第 32 回日本生化学会年会
2. 野崎洋明, 福武敏夫, 下江豊, 平山幹夫, 柳川宗平, 西本祥仁, 柴田護, 鈴木則宏, 西澤正豊, 小野寺理. CARASIL の MRI 画像 第 52 回日本神経学会学術大会
3. Hiroaki Nozaki, Atsushi Shiga, Megumi Nihonmatsu, Akihide Koyama, Masatoyo Nishizawa, Osamu Onodera. HTRA1 controls BMP-2/4 signaling via cleavage of proBMP-2/4: implication for molecular pathogenesis of hereditary cerebral small vessel disease. the 48th Annual Meeting Neuroscience
4. Hiroaki Nozaki, Atsushi Shiga, Hirotohi Kawata, Kunimasa Arima, Kenju Hara, Toshio Fukutake, Akio Yokoseki, Akihide Koyama, Toshiaki Takahashi, Mari Ikeda, Akira Tanaka, Imaharu Nakano, Shu-ichi Ikeda, Tadashi Yamamoto, Takeshi Ikeuchi, Masatoyo Nishizawa, Shoji Tsuji, Osamu Onodera. the 62nd AAN Annual Meeting

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

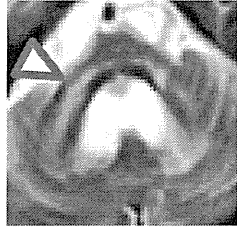
F. 健康危険情報

(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。)

なし

CARASILのMRI画像

橋から中小脳脚



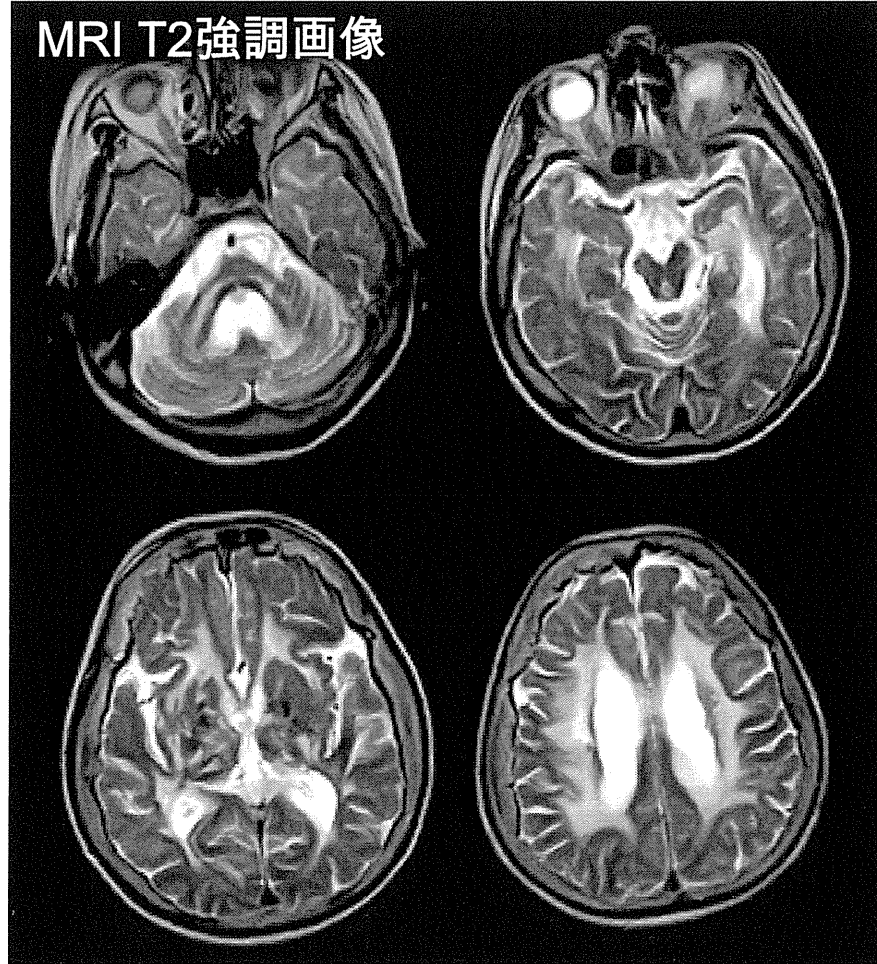
前頭葉前部



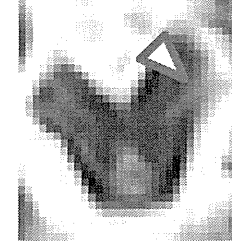
外包



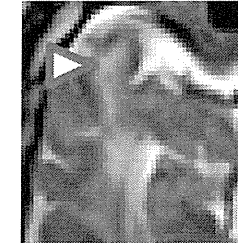
MRI T2強調画像



中脳大脳脚



側頭葉前部



側脳室周囲



HTRA1変異ヘテロ接合体と脳小血管病の関連

- 正常なHTRA1

■ 正常なプロテアーゼ活性

- 遺伝子変異のあるHTRA1

□ 軽度のプロテアーゼ活性低下

■ 高度のプロテアーゼ活性低下

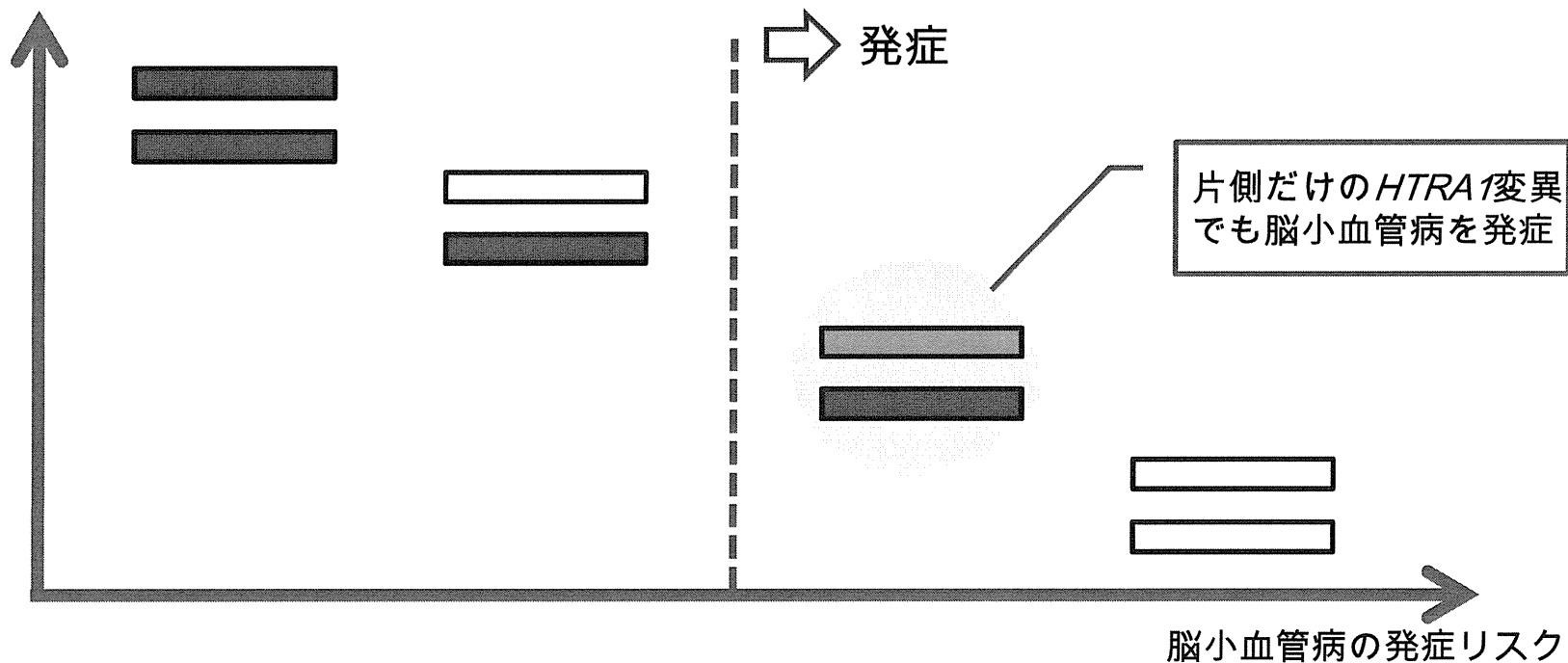
- ヒトでは遺伝子は1対存在する

■ ■ 正常なヒト

■ ■ 遺伝子変異のあるヒト

- 24 -

HTRA1のプロテアーゼ活性



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

2光子励起レーザー顕微鏡を用いた脳微小循環障害の観察

研究代表者 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

研究要旨:慢性・急性の虚血脳における微小循環動態を、2光子励起レーザー顕微鏡を用い観察した。急性虚血脳では、再灌流後に白血球のrolling・adhesion、血小板血栓の形成が認められた。一方、慢性低灌流脳では遷延性に白血球のrolling・adhesionが認められたが血栓形成は認めなかった。

A. 研究目的

遺伝性脳小血管症の病態解明には、脳小血管の循環動態をin vivoで評価することが有用である。急性虚血後の脳微小循環動態の変化は報告があるが、慢性脳虚血では未解明である。そこで、一過性全脳虚血モデルと慢性脳低灌流モデルを作成し、微小循環動態を2光子励起レーザー顕微鏡を用いて観察した。2光子励起レーザー顕微鏡は、従来の共焦点レーザー顕微鏡に比して、生体組織の断層イメージを、より深部まで詳細に観察することが可能であり、in vivo imagingの方法として最適と考えられる。

B. 研究方法

Actin promoter 領域にGFPを遺伝子導入したマウス(Green mouse)を用いて、慢性・急性脳虚血モデルを各々作成した。Green mouseでは、白血球、血小板、内皮細胞はGFP陽性細胞として観察可能、またTexas Red標識dextranを静脈内投与することにより、赤血球はTexas Red欠損影として観察可能である。この赤血球の移動をline scanningすることにより、

血流速度velocityを測定することが可能である。

急性脳虚血(一過性全脳虚血)モデル

両側総頸動脈に交連した絹糸を牽引することにより段階的に脳低灌流状態を作成した。左大脳を開頭し、閉塞前、左総頸動脈閉塞、右総頸動脈閉塞、両側総頸動脈再開通までの状態を2光子励起レーザー顕微鏡を用いて連続的に観察した。

慢性脳低灌流モデル

両側総頸動脈の外側からマイクロコイル(内径0.18 mm)を装着、または結紮して狭窄性病変を作成し、各種の組み合わせ(両側頸動脈コイル狭窄群、左頸動脈結紮群、左頸動脈結紮+右頸動脈コイル狭窄群)で脳血流の低下程度をコントロールした。左大脳を開頭し狭窄性病変を作成後30分から一週間まで、2光子励起レーザー顕微鏡で観察を行った。

C. 研究結果

急性虚血脳

左総頸動脈閉塞に伴い、velocityはほぼ半分程度まで低下した。さらに、右総頸動脈閉塞を加えることにより、velocityは著明に低下したが、完全に停止することはなかった。

Velocityの低下した状態でも白血球のrollingやadhesion、血小板血栓などの形成は認められなかった。10分程度でほぼ血流は停止したが、再開通に伴い脳血流は再開するが、velocityは前値の50%程度の回復に留まった。

再開通後の観察では、細動脈レベルでは、明らかな異常所見を認めなかったが、細静脈レベルでは著明な白血球のrolling・adhesionが認められた。また、再開通早期に、細静脈レベルで血小板血栓の急激な形成が認められた(図1)。

図1:再灌流後の細静脈。再灌流後に血小板血栓の急激な形成を認める。



慢性虚血脳

偽手術群と比較して、velocityは両側頸動脈コイル狭窄群と左頸動脈結紮群では約33%まで低下し、左頸動脈結紮+右頸動脈コイル狭窄群では、約21%まで低下を認めた。血管壁での白血球のrollingやadhesionは、中等度

に血流の低下した両側頸動脈コイル狭窄群と左頸動脈結紮群で高頻度に確認された(図2)。この状態は一週間後でも遷延性に認められ、動脈・静脈いずれにも存在したが特に静脈で顕著であった。

図2:虚血前(左)に比較し慢性虚血脳(右)では白血球のrolling, adhesionを認めた。



D. 考察

急性虚血脳では、再灌流に伴い白血球のrolling・adhesionが認められ、また血小板血栓の形成が認められた。一方、慢性虚血脳では、遷延性に白血球のrolling・adhesionが認められたが、著明な血小板血栓の形成などは認められなかった。慢性虚血脳では微小循環障害は存在するものの、梗塞に至るような高度の微小循環不全は認めない。

E. 結論

慢性脳虚血の微小循環の変化をin vivoで明らかにした。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ・ 冨本秀和:皮質下血管性認知症の診断と治療。臨床神経学201050(8):539-546
- ・ 冨本秀和:慢性脳虚血と認知症:慢性脳低灌

流モデルを用いた解析。老年期認知症研究会誌2010 17:53-56

- ・ 冨本秀和:皮質下血管性認知症、認知症疾患における位置づけ。臨床神経学、印刷中

2. 学会発表

- ・ 矢田健一郎、溝口明、冨本秀和:二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。日本神経学会総会、平成22年

- ・ 矢田健一郎、溝口明、新堂晃大、冨本秀和:2光子励起レーザー顕微鏡を用いた頸動脈閉塞症の微小循環動態の解析。日本脳卒中学会、平成23年

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得;なし。
2. 実用新案登録;なし。
3. その他;特記すべきものなし。

脳小血管における循環不全: 急性 vs 慢性虚血

一過性全脳虚血モデル

慢性脳低灌流モデル

二光子励起レーザー顕微鏡による脳微小循環障害の観察

Scale処理による大脳深部
白質の微小循環の可視化

急性虚血脳

血流速度の低下
白血球のrolling, adhesion
血栓形成

慢性虚血脳

血流速度の低下
白血球のrolling, adhesion

慢性虚血脳では白質に著しい微小循環不全を示すが、血栓形成は認めない

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

血液脳関門の研究(モデル動物)

分担研究者 伊藤 史子 東京薬科大学生命科学研究室(平成 23 年度)

筑波大学大学院人間総合科学研究科実験病理学研究室(平成 22 年度)

研究要旨

TGF- β シグナルは細胞膜上の I 型受容体(ALK1, ALK5)のバランスにより血管の機能を調節している。生体において TGF- β シグナルの役割を明らかにする目的で、血管内皮細胞特異的に TGF- β シグナルを欠損させたマウスを作製してその分子メカニズムの解明を行った。TGF- β /ALK5 シグナルは血管だけでなくリンパ管の成熟に必須のシグナルであるとともに、血流から受けるシェアストレスにより血管を安定化させていることを見出した。さらに TGF- β /ALK1 シグナルは低酸素条件下で強く誘導され、ALK1 によって誘導される Id-1 の血管新生促進メカニズムを解明した。

A. 研究目的

TGF- β シグナルは、血管内皮細胞上の I 型 II 型受容体を介して血管新生を正負両面から調節している。TGF- β シグナルは培養細胞を用いた知見と遺伝子改変マウスを用いた結果に矛盾が生じることがあり、その詳細な役割を解明するためには生体および、生体に近い条件下でその分子メカニズムを明らかにする必要がある。

B. 研究方法

血管内皮細胞特異的 TGF- β シグナル(ALK5, TRII, Smad2/Smad3 ダブルシグナル)欠損マウス(Tie2-Cre マウスとの交配)を作製し、血管構造を比較することで TGF- β シグナルの重要性について検討した。作成下マウスより血管内皮細胞を樹立し、より生体に近い条件下で TGF- β シグナルに対する反応性を検討するために、ずり応力(シェアストレス)および低酸素条件下に注目した。その過程において TGF- β シグナルが microRNA(miRNA)の発現制御にかかわる

ことが示唆されたため、血管内皮細胞における miRNA の重要性を Dicer1^{f/f}; Tie2-Cre マウスを用いて解析を行った。

さらに、血管新生を促進するシグナル TGF- β /ALK1 シグナルについても検討するために、ALK1 標的である Id-1 に注目してその結合タンパク質を Yeast two hybrid 法を用いて多数同定した。

(倫理面への配慮)

動物実験及び組換え DNA 実験は、国立大学大学法人筑波大学動物実験取扱規定及び国立大学法人筑波大学法人遺伝子組換え実験取扱規定、東京薬科大学動物実験取り扱い規定および東京薬科大学遺伝子組換え実験取り扱い規定に従い、適切に研究を行った。

C. 研究結果

TGF- β I 型及び II 型受容体を血管内皮細胞特異的に欠損させたマウス(ALK5^{FF}; Tie2-Cre, T β RI^{FF}; Tie2-Cre)では血管内皮細胞特異的 Smad2/3 欠損マウス(Smad2^{FF};

Smad3^{-/-}; Tie2-Cre(CDKO))マウスと同様の表現系を示した。興味深いことに、ALK5^{F/F}; Tie2-Cre, TβRI^{F/F}; Tie2-Cre マウスは CDKO マウスよりも約半日長生きして胎生 14 日ごろまでに死亡しており、Smad2/3 の代償シグナルの存在が示唆された。

血管内皮細胞を低酸素(1%酸素)条件下で刺激したとこと、TGF-β/ALK1 シグナルおよび BMP シグナルの増強が見られた。しかしながら Smad のタンパク濃度にはし変化が見られなかった。低酸素では血管新生を促進するシグナルが優位になる可能性が示唆された。

血管内皮細胞を動脈圧のシェアストレスを 24 時間与えたところ、シェアストレスに依存して Smad2/3 のリン酸化が増加し TGF-β シグナルの標的分子の誘導を mRNA レベルで確認した。さらに、シェアストレスによって誘導される miRNA の中には、ALK1 に対するものが存在し、血管の安定を導く新たな可能性が示唆された。そこで、血管内皮細胞特異的に Dicer を欠損させたマウスを作製し解析した。Dicer は miRNA の成熟に必須の酵素であり、Dicer が欠損すると miRNA の成熟が起こらない。Dicer^{ff}; Tie2-Cre マウスは胎生 14.5 日までに死亡したが、血管構造には異常が見られず、miRNA が血管新生においては重要ではない可能性が示唆された。

TGF-β/ALK1 シグナルは Id-1 を誘導して血管新生を促進する。Yeast Two Hybrid 法により Id-1 の新規標的分子 E2-2 および CGI-128 を同定した。E2-2 は血管新生を抑制する分子であり、Id-1 はその作用を抑制して血管新生を促進することを見出した。さらに、CGI-128 は DUF (Domain un function) ドメインを有する新規のタンパ

ク質であり、DUF ドメインを介して Id-1 の HLH ドメインと結合することを発見した。

D. 研究発表

1. 論文発表

1. Yang W[#], **Itoh F[#]**, Ohya H, Kishimoto F, Tanaka A, Nakano N, Itoh S & Kato M. ([#]equally contributed) Interference of E2-2-mediated effect in endothelial cells by FAM96B through its limited expression of E2-2. *Cancer Sci*, (2011) *in press*
2. Itoh S & **Itoh F**. Inhibitory machinery for the TGF-β family signaling pathway. *Growth Factors*, 5, 163-173 (2011) review
3. Nakano N, Itoh S, Watanabe Y, Maeyama K, **Itoh F** & Kato M. Requirement of TCF7L2 for TGF-β-independent transcriptional activation of the TMEPAI gene. *J. Biol. Chem.*, 285, 38023-38033 (2010)
4. Ishitobi H, Matsumoto K, Azami T, **Itoh F**, Itoh S, Takahashi S & Ema M. *Flk1-GFP* BAC Tg mice: an animal model for the study of blood vessel development. *Exp. Anim.*, 59, 615-622 (2010)
5. Tanaka A, **Itoh F**, Nishiyama K, Takezawa T, Kurihara H, Itoh S & Kato M. Inhibition of endothelial cell activation by bHLH protein E2-2 and its impairment of angiogenesis. *Blood*, 115, 4138-4147 (2010)

2. 学会発表

1. **Itoh F**, Matsumura Y, Takagi T, Itoh S, Watanabe T, Kato M. Dicer-dependent miRNA pathway is important for early hematopoiesis but not for angiogenesis. 第 19 回血管生物医学学会学術集会 (2011)
2. **Itoh F**. JSPS-NOW Joint Seminar; Involvement of TGF-β/Smad pathway in

lymphangiogenesis. (2011) Tokyo, Japan
(招待講演)

3. **Itoh F.** TGF- β /Smad pathway is involved in vessel integrity. TGF- β meeting Uppsala, Sweden (2011)
4. 伊東史子、伊東進. 血管・リンパ管安定性維持における TGF- β シグナルの役割解明 第18回血管生物医学会学術集会 (2010)
5. **Itoh F.**: Involvement of TGF- β /Smad signaling in Angiogenesis and lymphangiogenesis. TGF- β meeting. Leiden, the Netherlands. (2010)
6. **Itoh F.**, Itoh S, Adachi T & Kato M: Vascular endothelial cell-specific Smad2 and Smad3 signaling is required for blood vessel integrity. The 59th Fujiwara International Seminar. Tomakomai, Japan (2010)
7. **Itoh F.**, Itoh S, Adachi T, Festing M, Weinstein M & Kato M: Impairment of vascular stability by endothelial specific ablation for Smad2 and Smad3 genes the 16th International Vascular Biology Meeting. Los Angeles, California, U.S. (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

(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。)

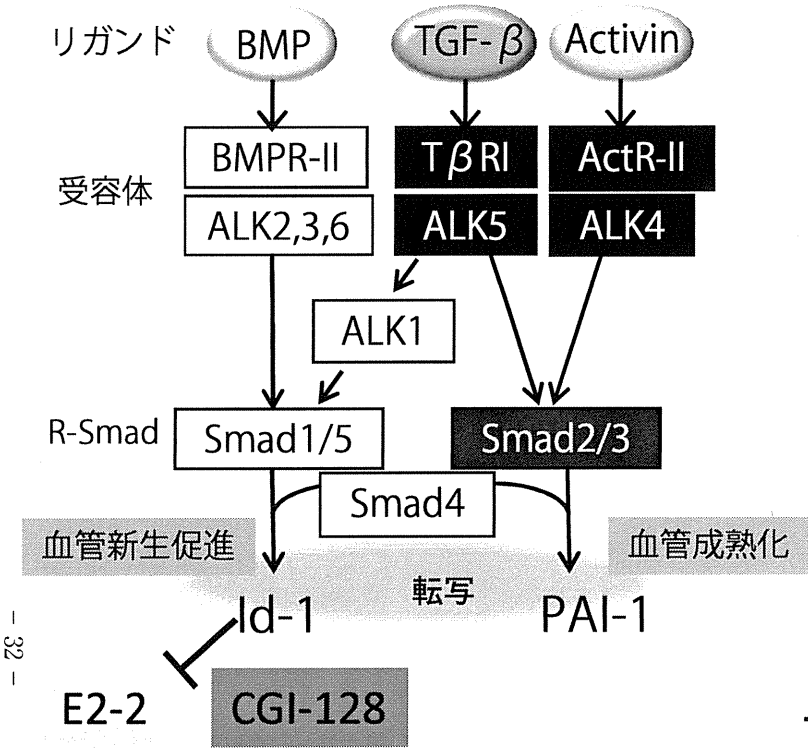


図1 TGF- β ファミリーシグナルの概略図
 TGF- β シグナルは細胞膜上のI型(ALK5), II型受容体による、Smad2, Smad3のリン酸化を介して伝達される。しかし、Smad2, Smad3はアクチビンシグナルの伝達も担っている。

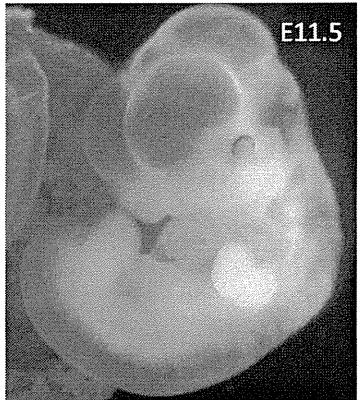


図2 血管内皮細胞特異的TGF- β シグナル欠損マウス胎仔の表現系
Smad2^{fl/fl}; Smad3^{-/-}; Tie2-Cre

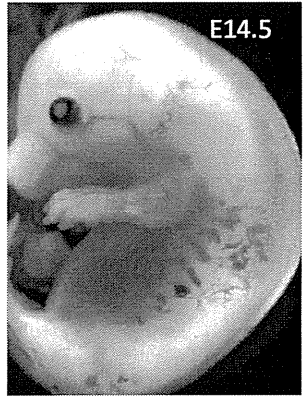
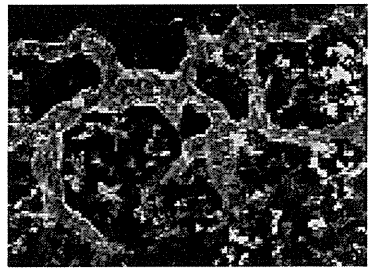


図3 リンパ管内皮細胞特異的TGF- β シグナルマウス胎仔の表現系とリンパ管の構造
 リンパ管の構造が非常にごつごつしているのがわかる。同様の血管構造が図2の胎仔でも確認できた



Lyve-1(リンパ管マーカー)

- 32 -

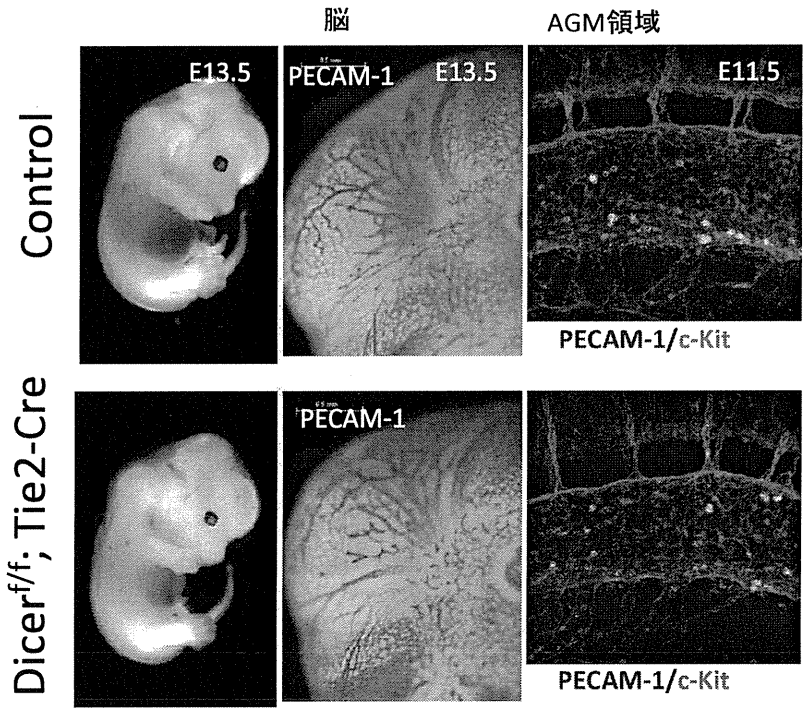


図4 血管内皮細胞特異的Dicer欠損マウス胎仔の表現系

胎生13.5日のマウスを比較すると肝臓が未熟であり、全体に青白く、血管構造または血球分化の異常が疑われた。血管内皮細胞のマーカーであるPECAM-1で脳を染色したところ、血管構造に異常はみられなかった。また胎生11.5日のAGM領域とPECAM-1と造血幹細胞のマーカーであるc-Kitで染色したが、やはり野生型と比較してDicer^{fl/fl};Tie2-Cre胎仔には異常が見られなかった。

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

TGF- β 1 負荷 BBB 障害モデル及び脳虚血再還流モデルの作成と BBB 保護薬の薬効検定

分担研究者	丹羽正美	長崎大学大学院医歯薬学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研究科神経薬理学分野
	巽 理恵	長崎大学大学院医歯薬学研究科神経薬理学分野
	宗 剛平	長崎大学大学院医歯薬学研究科脳神経外科
	竹下朝規	長崎大学大学院医歯薬学研究科脳神経外科
	永田 泉	長崎大学大学院医歯薬学研究科脳神経外科

研究要旨

Neurovascular Unit (NVU) の構成単位である血液脳関門 (Blood-brain barrier, BBB) は虚血性脳血管病変における神経細胞救済のための標的システムである。BBB の機能維持 (BBB 保護) は、脳保護 (神経細胞保護) に繋がると考えられる。我々は血液脳関門 *in vitro* 再構成モデル (BBB キット™、ファーマコセル株式会社) を用いて、脳虚血再還流モデルの作成と BBB 保護薬の検討を行ってきた。また、遺伝性脳小血管病 (CARASIL) の病態に関与すると推測されている TGF- β が BBB の機能を障害することを確認した。今回我々は、この BBB キットを用いて、TGF- β 及び脳虚血再還流による BBB 障害に対する、抗血小板薬であるホスホジエステラーゼ 3 型阻害薬 cilostazol と、アンジオテンシン II 受容体拮抗薬 (ARB) candesartan の BBB 保護効果を検討した。

A. 研究目的

遺伝性脳小血管病 (CARASIL) の脳小血管異常による多発性脳梗塞と白質脳症は、虚血再還流障害による神経細胞死を引き起こし血管認知症の原因となる。血液脳関門 (BBB) の保護が神経細胞を救済するため、BBB 保護薬の探索が必要である。本研究では、BBB 保護薬の薬効スクリーニングのための再現性のある *in vitro* 実験系の確立を目指した。さらに、薬効スクリーニング系としての有用性の確認のために、本実験系を用いてアンジオテンシン II 受容体拮抗薬 (ARB) candesartan の BBB 保護効果を検証した。また、CARASIL の病態に関与すると推測されている TGF- β による BBB 機能障害に対する保護薬の検討も行った。

B. 研究方法

①脳虚血再還流 BBB モデルの作成手順：(1) 虚血開始前の BBB キットの電気抵抗 (TEER) を測定する。(2) Normoxia 群は血清なしの

DMEM (glucose 4.5g/L) に交換する。Hypoxia 群は血清なしの DMEM (glucose free) で 1 回洗浄後、DMEM (glucose free) に交換する。(3) 酸素吸着剤 (Anaero Pack®) により低酸素負荷を行う。(4) CO₂ インキュベーターで 6 時間 (hr) インキュベートする。Normoxia 群はそのままインキュベーターへ。(5) インキュベーターから BBB キットを取り出し、培養液 2 に交換する。(6) TEER (経内皮電気抵抗) の測定 (7) 24~30 時間インキュベート (8) TEER の測定

薬物負荷：candesartan (1 nM, 10 nM, 100 nM) は虚血再酸素実験開始前 2 日間作用させ、3 日目に虚血再酸素実験を開始し、虚血は 6 時間、その後再酸素負荷とし 30 時間まで評価した。

②TGF- β 負荷における BBB 保護薬の検討：BBB キット作製 4 日後に経内皮電気抵抗 (TEER) を測定し、十分なバリアー機能が形成されたことを確認し、TGF- β (1 ng/ml) を上部チャンバー (管腔側) に添加した。その後、最長 48 時間まで TEER を測定した。

Cilostazol (1~30 μ M) および, candesartan (10 nM, 100 nM) は TGF- β と同時に添加した。

C. 研究結果

(1) 脳虚血再還流 BBB モデルの評価: TEER は、再酸素後 24 時間で 80%に低下し、タイトジャンクション (TJs) タンパクの claudin-5 と occludin の顕微鏡的免疫蛍光細胞像検査で、TJs 機能低下を示す蛍光強度の低下、細胞楕円状化、Zipper 様細胞境界蛍光像が観察された。BBB 機能障害が発症していることが確認された。再酸素負荷後、上部チャンパー(管腔側)の adrenomedullin 濃度は、再酸素初期の 1 時間後に有意に増加し、3 時間後さらに有意に増加した。NO₂ と NO₃ 量は、再酸素後 2 4 時間で有意に増加していた。さらに、この虚血再酸素条件による BBB-TJs 機能障害は、100 μ M edaravone で回復した。以上から、この虚血 (+無グルコース) 再酸素負荷の実験条件は、*in vivo* 虚血再還流障害を *in vitro* で再現しているものと思われる。

(2) BBB 保護薬としての ARB の薬効検定: 10 nM candesartan 処置で、6 hr 虚血再酸素後 24 時間で TEER の低下が回復した。TJs タンパクの顕微鏡的免疫蛍光細胞像の乱れも解消された。candesartan 処置群のいずれの濃度でも、管腔側の NO₂+ NO₃ 濃度および adrenomedullin 濃度には有意な変化はなかった。AT1 受容体タンパク量には変化がみられなかった。Candesartan に、マイルドな虚血再還流障害による BBB 機能障害を防止する効果があることが示唆される。

(3) TGF- β 負荷における BBB 保護薬の検討: TGF- β の添加 3 時間後には、非添加群と比べ有意に TEER が低下し、少なくとも 48 時間後までは TEER の低下が継続した。cilostazol の処置により、TGF- β による TEER の低下は改善され、24 時間後までその効果は持続した。candesartan 処置群では、添加後 24、48 時間後に TGF- β による TEER 低下を改善させる傾向は見られたものの、有意な効果は見られなかった。Cilostazol には、TGF- β 処置による BBB 機能障害を防止する効果があることが示唆される

D. 研究発表

- 論文発表 ①Toth A, Veszelka S, Nakagawa S, Niwa M, Deli MA: Patented *in vitro* blood-brain barrier models in CNS drug discovery. Recent Patents on CNS Drug Discovery 6: 107-118, 2011 (doi:10.2174/157488911795933910) ②Yang WM, Jung KJ, Lee MO, Lee YS, Lee YH, Nakagawa S, Niwa M, Cho SS, Kim DW: Transient expression of iron transport proteins in the capillary of the developing rat brain. Cell Mol Neurobiol 31:93-99, 2011 (doi:10.1007/s10571-010-9558-0) ③Ta-tsumi R, Suzuki Y, Sumi T, Sone M, Suemori H, and Nakatsuji N: Simple and highly efficient method for production of endothelial cells from human embryonic stem cells. Cell Transplantation 20:1423-30, 2011 (doi:10.3727/096368910X547444) ④Sakurai-Yamashita Y, Harada N, and Niwa M: Lercanidipine rescues hippocampal pyramidal neurons from mild ischemia-induced delayed neuronal death in SHRSP. Cell Mol Neurobiol 31: 561-567, 2011 (doi:10.1007/s10571-011-9649-6) ⑤Deli MA, Veszelka S, Csiszara B, Totha A, Kittelb A, Csetec M, Siposc A, Szalaic A, Fulopd L, Penked B, Abrahama C, Niwa M: Protection of the blood-brain barrier by pentosan against amyloid-induced toxicity. Journal of Alzheimers Disease 22:777-794, 2010 (doi:10.3233/JAD-2010-100759) ⑥Kumagai K, Shirabe S, Miyata N, Murata M, Yamauchi A, Kataoka Y, Niwa M: Sodium pentosan polysulfate brought about cartilage improvement in knee osteoarthritis - An open clinical trial-. BMC Clinical Pharmacology 10:7, 2010 (doi:10.1186/1472-6904-10-7) ⑦Morofuji 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 MolNeurobiol 30: 727-735, 2010 (doi:10.1007/s10571-010-9497-9) ⑧ Miyata N, Kumagai K, Osaki M, Murata M, Tomita M, Hozumi A, Nozaki Y, Niwa M: Pentosan reduces osteonecrosis of femoral head in SHRSP.

CliExpHypertens32(8):511-516, 2010 (doi:10.3109/10641963.2010.496511) ⑨ Yamashita Y, Nabika T, Niwa M: Blood pressure-independent factors determine the susceptibility to delayed neuronal death in the stroke-prone spontaneously hypertensive rats. CellMolNeurobiol 30: 283-287, 2010 (doi:10.1007/s10571-009-9450-y) ⑩ 中川慎介, 田中邦彦, 田川泰, 丹羽正美: 血液脳関門再構成モデルと機能解明への活用. 分子脳血管病 9(3):17-25, 2010

2. 学会発表 ① Takeshita T et al. Cilostazol rescues AGE-related ischemic BBB damage. 14th Intern Symp Signal Transduction in the BBB, Istanbul Sep7-9, 2011 ② So T et al. The effect of candesartan on blood-brain barrier. 13th Intern Symp Signal Transduction in the BBB, Zurich Sep2-4, 2010 ③ Tatsumi R et al. Tight junction protein expression and barrier properties of human embryonic stem cells (hES) cell-derived endothelial cells. Ibid. ④ Yamada N et al. Comparison between in vitro-BBB effects of HGF and TGF- β . Ibid. ⑤ Nakagawa S et al. An *in vitro* monkey BBB model. Ibid. ⑥ Nakagawa S, Maria Deli, Thuy DHD, Sagara M, Yamada N, Tanaka K, Niwa M: Development of in vitro monkey BBB model. 第83回日本薬理学会年会, 大阪, 2010, J PharmacolSci 112 (Suppl 1): 91, 2010 ⑦ Nakagawa S, Maria Deli, Thuy DHD, Sagara M, Yamada N, Tanaka K, Niwa M: Development of ready-to use 24-well type BBB Kit. 同, J PharmacolSci 112 (Suppl 1): 189, 2010

E. 知的財産権の出願・登録状況 (予定含む)

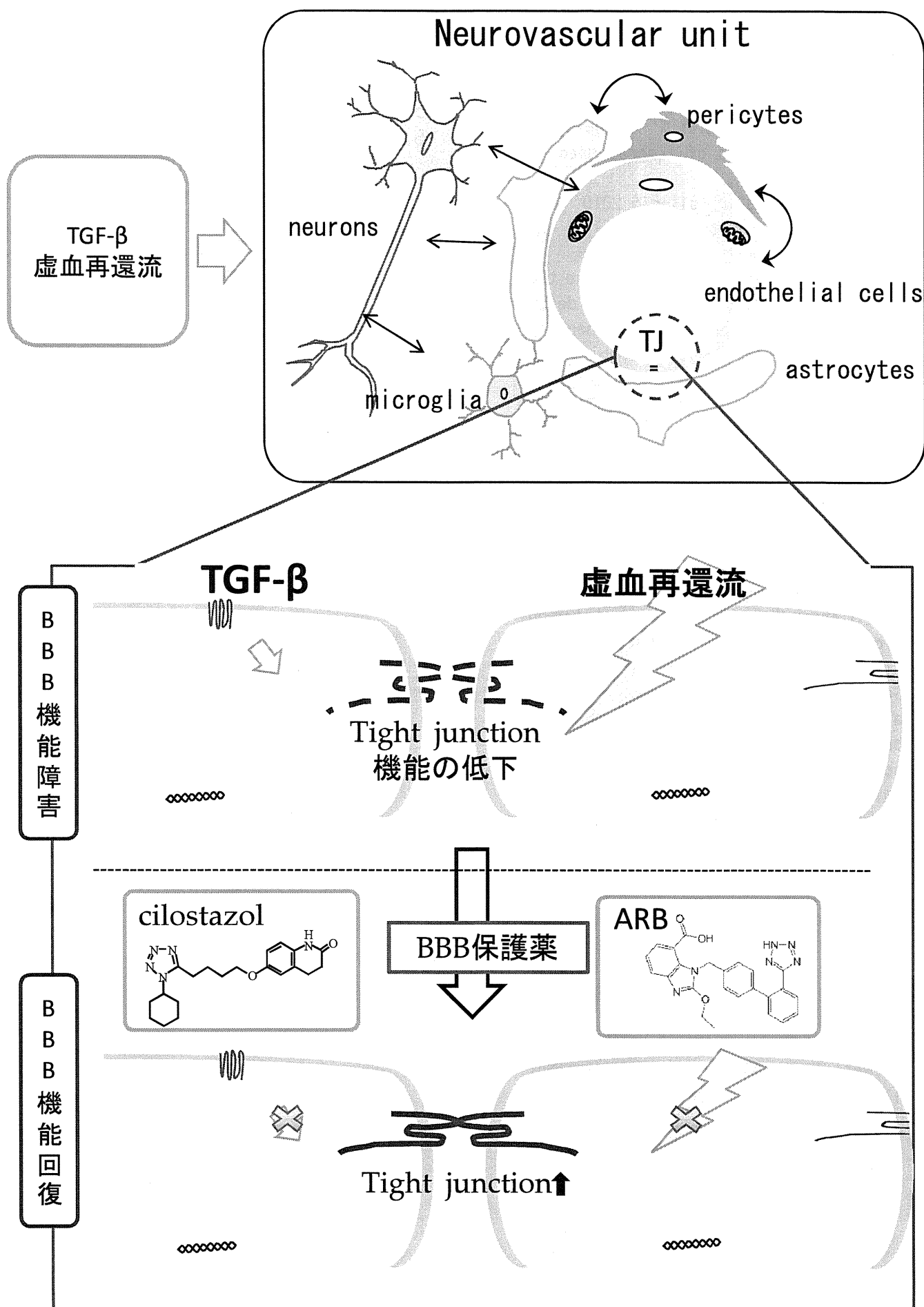
(特許取得・実用新案登録・その他)

なし

F. 健康危険情報

(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。) なし

図3 cilostazolとARBのBBB保護作用



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

CARASIL 原因遺伝子; Htra1 遺伝子欠損マウスと CARASIL 剖検脳の脳血管病理解析に関する研究

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	加藤泰介	新潟大学脳研究所神経内科
	関根有美	新潟大学脳研究所神経内科
	廣川祥子	新潟大学脳研究所動物資源開発研究分野
	野崎洋明	新潟大学脳研究所神経内科

研究要旨

CARASIL は禿頭・変形性脊椎症・脳症を三大兆候とする遺伝性脳小血管病の一つである。我々のグループは、劣性遺伝性形式を示す遺伝性脳小血管症 (CARASIL) の原因遺伝子 High temperature requirement A1 (Htra1) を発見した (Hara K et al., N Eng J Med 2009)。CARASIL の病変は、脳の細小血管を主体とした動脈硬化を示し、一般の高齢者における脳血管の変化に極めて近い。これは大血管を侵す CADASIL とは異なる特徴であり、CARASIL の病態機序を解明することが、瀰漫性虚血性病変を示す脳血管性痴呆の治療に有用であることを示唆している。CARASIL 患者の脳血管では血管平滑筋細胞の消失をはじめ、弾性板解裂、内膜肥厚化、血管腔拡大などの病理学的所見が存在する。このような背景から、我々は Htra1 遺伝子欠損マウス (Htra1-KO マウス) を作成し、疾患モデルへの応用を検討することを計画した。Htra1-KO マウスの CARASIL モデルとしての有用性を検討する目的で、Htra1-KO マウスの脳血管病理解析を実施した。4, 8, 16, 20 ヶ月齢のマウスを用いた解析により、Htra1-KO マウスは加齢依存的 (16 ヶ月齢以降) に CARASIL 病態の一つである血管平滑筋細胞の変性を示すことが分かった。また脳実質内の細小血管におけるペリサイトに関しても coverage (被覆率) の評価を行った。その結果、ペリサイト coverage の低下が高齢期の Htra1-KO マウス脳血管で見つかった。また、CARASIL 患者剖検脳の病理解析では虚血、炎症性病変が脳内に高度に認められた。さらに、CARASIL 患者脳内には血漿成分を含有した活性化アストロサイトが高頻度に存在し、血液脳関門の破綻が示唆された。また、in situ hybridization による Htra1 発現細胞の詳細な解析の結果、脳内では neuro-vascular-unit の構成細胞の一つであるアストロサイトに発現が認められた。

以上のことから、CARASIL ではアストロサイトにおける Htra1 の機能喪失による neurovascular-unit の異常により血管平滑筋/ペリサイトの脱落を首座とする血管変性を招いている可能性が示唆された。また、CARASIL の主症状の一つである白質障害は、血管平滑筋/ペリサイトの脱落による血液脳関門の破綻が強く関与しているものと予想される。

A. 研究目的

脳小血管病は脳血管を病変の首座とし、平滑筋細胞消失、内膜肥厚、弾性板解裂といった変性をきたす。また大脳白質に虚血性変化に類似した脱髄 (leukoaraiosis) を示す。本症はアルツハイマーと並ぶ、認知症の大きな原因で考えられているが、発症原因は不明である。遺伝性脳小血管病; CARASIL は孤発性の脳小血管病に病態が酷似し、CARASIL の発症メカニズムの解明は、孤発性脳小血管病研

究に大きく寄与することが予想される。

本研究は、主に CARASIL 原因遺伝子; Htra1 の KO マウスを研究対象とし、Htra1 の機能喪失がどのように CARASIL 病態を発症させるのかを明らかにすることが目的である。

B. 研究方法

・ Htra1-KO マウス脳病理解析

マウスの月齢に沿って、4, 8, 16, 23 ヶ

月齢の固定脳をサンプリングした。脳血管構造の病理解析を elastica van gieson (EV) 染色を用いておこなった。また、血管平滑筋細胞を α smooth muscle actin (α SMA) の免疫染色によって解析した。①血管壁面積に対する血管平滑筋細胞の占有比 ② α SMA 染色強度 ③血管平滑筋細胞数という3点を指標に血管平滑筋細胞変性を半定量的に評価した。

ペリサイトは、細小血管内皮細胞を lectin によって、ペリサイトをマーカータンパク質である aminopeptidase-N によって二重染色を施した組織切片から共焦点画像を取得し、imaris を用いて作製した 3D 画像内の lectin 陽性の細小血管の面積に対する aminopeptidase-N の面積比を求め、ペリサイト coverage (被覆率) を算出、比較した。

・ HtrA1 in-situ-hybridization 解析

脳内 HtrA1 発現細胞の解析は、HtrA1 anti-sense RNA probe による in situ hybridization と免疫染色を組み合わせて行った。各細胞マーカーとして、神経細胞: NeuN, アストロサイト: GFAP, ミクログリア: Iba-1, 血管内皮細胞: CD31, 血管平滑筋細胞: α SMA を用いた。

・ CARASIL 剖検脳病理解析

CARASIL 死後脳の病理解析は HtrA1 遺伝子変異 (C1108T) を持つ患者剖検脳を用いて行った。一般病理解析は HE, EV 染色を用いて行った。炎症性病変解析は、脳血管壁、脳実質内浸潤性炎症系細胞の各マーカータンパク質の免疫染色により行った。

(倫理面への配慮)

CARASIL 患者剖検脳は、病理解析前にご家族に研究についての同意を得た。また個人情報保護に努め行った。

C. 研究結果

加齢に沿った病理解析の結果、16, 23 ヶ月齢の HtrA1-KO マウスでは血管壁の薄化、血管腔の拡大所見が見られた。また α SMA 免疫染色では、23 ヶ月齢の HtrA1-KO マウスの脳軟膜血管における平滑筋細胞の変性/委縮が認められた。ペリサイト coverage では、n=3 の解析では有意差は得られなかったものの低下傾向を示していた。

In situ hybridization による発現細胞解析の結果 HtrA1 は脳内グリアの一つであるアストロサイトに発現していることが分かった。

さらに高齢期の HtrA1-KO マウスでは、まれに著明な脊椎変形を示す個体が現れたため、骨形態病理解析を行ったところ、これらのマウスでは著しい骨密度の低下が起こっていることが分かった。この表現系も CARASIL における変形性脊椎症を表出している可能性が示唆された。

CARASIL 剖検脳病理解析では、層状壊死やマクロファージ、T 細胞などの炎症系細胞の浸潤といった虚血、炎症性病変が高度に見とめられた。さらに、脳内の多くのアストロサイトが細胞内部に血漿タンパク質である fibrinogen をため込んだ活性型アストロサイトの形態を示しており、血液脳関門の破綻が示唆された。

D. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

(発表誌名・巻号・頁・発行年等も記入)

E. 知的財産権の出願・登録状況 (予定含む)

なし A

(特許取得・実用新案登録・その他)

なし

F. 健康危険情報

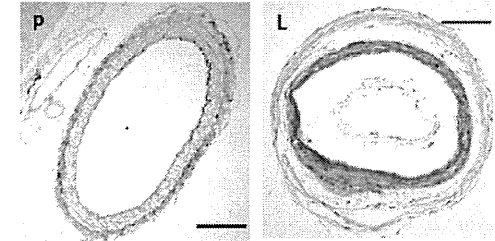
なし

CARASILの病態機序

HtrA1機能喪失



TGFβシグナル↑



脳血管のTGFβ染色
左: Control, 右: CARASIL



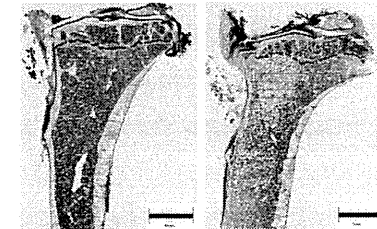
脳血管変性



23カ月齢マウスのαSMA染色
左: WT, 右: KO



骨粗鬆化



23カ月齢マウスの頸椎写真
左: WT, 右: KO

TGFβシグナル阻害薬
(ARB)