

201224/22A

厚生労働科学研究費補助金
障害者対策総合研究事業（神経・筋疾患分野）

TGF- β シグナルに注目した CARASIL の
画期的治療方法の開発

平成 24 年度 総括・分担研究報告書

Annual Report of the Research Committee for a TGF- β signaling-focused
Treatment of Cerebral Autosomal Recessive Arteriopathy with Subcortical
Infarcts and Leukoencephalopathy

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

研究代表者 野崎 洋明

平成25 (2013) 年 3 月

目次

I. 総括研究報告

- TGF- β シグナルに注目した CARASIL の画期的治療方法の開発 …………… 1
研究代表者 野崎 洋明

II. 分担研究報告

1. CARASIL モデルマウスの脳小血管病理と至適薬剤投与量に関する研究 …………… 9

分担研究者 佐藤俊哉(新潟大学脳研究所動物実験施設)
研究協力者 加藤泰介(新潟大学超域学術院)
廣川祥子(新潟大学脳研究所動物実験施設)

2. CARASIL モデルマウスにおける TGF- β シグナルの評価方法と分子病態に関する研究 …13

分担研究者 小野寺理(新潟大学脳研究所分子神経疾患資源解析学分野)
研究協力者 関根有美(新潟大学脳研究所神経内科学分野)

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

TGF- β シグナルに注目した CARASIL の画期的治療方法の開発

主任研究者 野崎 洋明 (新潟大学医学部保健学科 助教)

研究要旨

脳血管障害のなかでも、病変の首座が小血管にある病型は脳小血管病と呼称される。脳小血管病は高齢者に高頻度に見られ、認知症や歩行障害を引き起こす。世界一の高齢化社会を迎える本邦において、病態解明と予防方法の確立が喫緊の課題である。

Cerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CARASIL) は劣性遺伝性の脳小血管病であり、重度の認知症と歩行障害を呈する。治療法はまだ発見されていない。CARASIL は high temperature requirement serine peptidase A1 (*HTRA1*) の変異に起因する transforming growth factor β (TGF- β) シグナルの亢進によっておこる。同様に TGF- β シグナルの亢進によっておこる Marfan 症候群は、TGF- β シグナルを抑制するアンギオテンシンⅠ型受容体拮抗薬が奏功する。

本研究では、CARASIL のモデル動物である *Htra1* 欠損マウスを用いて、脳内移行が良好なアンギオテンシンⅠ型受容体拮抗薬 candesartan の治療効果を検討する。本年度は、*Htra1* 欠損マウスの脳小血管の病理変化、TGF- β シグナルの評価方法、薬剤至適投与量について検討を行った。動物実験の内容は、新潟大学当該委員会で十分吟味する。申請者は国際的に有名な Gene reviews に CARASIL の疾患概念を記載しており、国際的イニシアチブを取っている。また、本研究は、希少疾患の克服に向けた、厚生行政の目的と合致する。

研究分担者

佐藤俊哉 新潟大学脳研究所・実験動物学
助教

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
教授

遺伝性の脳小血管病であり、HTRA1 のプロテアーゼ機能低下による transforming growth factor β (TGF- β) シグナルの亢進により引き起こされる (Hara K et al. N Eng J Med 2009)。CARASIL は本邦で発見された希少疾患であるが、創始者効果を認めず、近年、中国やスペインでも報告されている (Mendioroz M, et al. Neurology 2010, Wang XL, et al. CNS Neurosci Ther 2012)。さらに、申請者は、同遺伝子変異のヘテロ接合体でも脳小血管病をきたすこと、それは HTRA1 のプロテアーゼ残存活性と関連することを見出した (投稿準備中)。このことから、

研究目的

Cerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CARASIL) は high temperature requirement serine peptidase A1 (*HTRA1*) の変異によって発症する劣性

従来の想定より多くの CARASIL 患者がいる可能性がある。しかし有効な治療方法は開発されていない。

CARASILと同様にTGF- β シグナルの亢進にて引き起こされる Marfan 症候群に合併する動脈瘤は、TGF- β シグナルを抑制するアンギオテンシン I 型受容体拮抗薬が奏功する (Habashi JP, et al. Science 2006)。申請者はすでに *Htra1* 欠損マウスでTGF- β シグナルの亢進と脳小血管での血管平滑筋の変性を明らかにしている(未発表データ)。この病態は CARASIL に類似しており、理想的なモデル動物である。本研究では、CARASIL モデルマウスを用いて、脳内移行が良好でTGF- β シグナルの阻害作用を有するアンギオテンシン I 型受容体拮抗薬 candesartan (Lanz TV., et al. J Clin Invest. 2010)の効果を検討する。本申請は分子病態から脳小血管病の治療に迫る物であり、新規性と国際的な優位性がある。また、candesartan は高血圧患者に対して頻りに臨床使用されており、有効性が確認できれば、速やかな臨床応用が期待できる。

研究方法

本研究の目的は、CARASIL のモデルである *Htra1* 欠損マウスを用いて、TGF- β シグナルの抑制効果を持つアンギオテンシン I 型受容体拮抗薬、特に血液脳関門を通過する candesartan の治療効果を検証することにある。同マウスは15ヵ月齢よりCARASILと同様の血管平滑筋の脱落を認める。よって、24ヵ月齢マウスを解析することとし、研究期間を3年に設定した。分担研究者の佐藤俊哉はマウスの管理と解析を、小野寺理は分子生物学的解析を担当する。*Htra1* 欠損マウスはすでに作成しており、安定した供給が可能である。マ

ウスの飼育と処置、免疫組織学的検査、mRNA の解析に必要な研究フィールドはすでに確保できている。

・個々の研究方法

①CARASIL モデルマウスの脳小血管病理と至適薬剤投与量に関する研究 (佐藤)

1) 脳の毛細血管のペリサイトの障害の有無の検索

22ヵ月齢以上の高齢の *Htra1* 欠損マウス(n=4)と野生型マウス(n=4)から固定脳を取り出し、ペリサイトマーカーを CD13、血管内皮細胞マーカーを lectin として、2重免疫染色を行った。共焦点顕微鏡で大脳皮質・海馬・線条体の毛細血管を撮影し、画像解析ソフト Imaris で解析を行った。血管内皮細胞の体積を分母、それを取り巻く周皮細胞の体積を分子とし、その比をペリサイト被覆率として算出し、*Htra1* 欠損マウスと野生型マウスで比較した。

2) TGF- β シグナル阻害薬であるカンデサルタンの長期投与実験

月齢4ヵ月と16ヵ月の *Htra1* 欠損マウスと野生型マウスに対し、内服投与を開始した。カンデサルタンは既報と同様に濃度が 1 mg/kg/day になるように調節した (Lanz TV, et al. J Clin Invest 2010)。降圧作用による効果ではないことを示すために、作用機序の異なる Ca チャネル拮抗薬のアムロジピンを対照とし、同程度の降圧作用となるように濃度を調節した。

②CARASIL モデルマウスにおけるTGF- β シグナルの評価方法と分子病態に関する研究 (小野寺)

1) 免疫組織化学染色によるリン酸化 smad2/3 の検出

TGF- β シグナルレベルは、マウス脳スライスを用いたリン酸化 smad2/3 染色によって検討した。*Htra1* 欠損マウス、野生型マウス脳それぞれのリン酸化 smad2/3

陽性細胞数を比較し, *Htra1* 欠損マウス脳内における TGF- β シグナルレベルの変動を検討した.

2) マイクロアレイ解析

マイクロアレイ解析は Affymetrix 社の GeneAtlas system を用いて行った. アレイストリップは Affymetrix MG-430 PM Array Strip を使用した. マウス脳小血管の精製は, 血管内皮細胞の表面抗原である PECAM1 抗体を用いた毛細血管の pull-down 法によって行った. 血管精製度は, 神経細胞, グリア細胞, 血管壁細胞マーカーの定量 RT-PCR によって確認を行った.

(倫理面への配慮)

動物の愛護及び管理に関する法律に基づいて行うとともに, 新潟大学の動物実験規則および組換え DNA 実験安全管理規則に従い, 学長許可を受けて実施した.

研究結果と考察

・研究班全体としての研究成果

Candesartan は, *Htra1* 欠損マウスにおける TGF- β シグナルの亢進を抑制することによって, 脳小血管の病理変化を軽減することが想定される. この検証のためには, 脳小血管の形態変化, TGF- β シグナルの検出方法, candesartan と同等の降圧効果を持つ対照薬の選定が必要になる. 本年度の研究では, これらを明らかにした. 今後は, これらを基礎データとして, candesartan 長期投与群と対照薬長期投与群において, 脳小血管の形態変化と TGF- β シグナルの評価を行っていく方針である. Candesartan はすでに臨床現場で頻用されている薬剤であり, 今後, 本研究班の知見により, candesartan の治療効果が明らかになれば, 速やかな臨床応用が期待できる.

・個々の研究成果

①CARASIL モデルマウスの脳小血管病理と至適薬剤投与量に関する研究 (佐藤)

ペリサイト被覆率は大脳皮質, 海馬, 線条体の3部位で, *Htra1* 欠損マウスのほうが, 野生型マウスに比べて有意に低下していた. また, 毛細血管径は大脳皮質, 海馬, 線条体の3部位において, *Htra1* 欠損マウスのほうが野生型マウスに比べて有意に拡張していた. この結果は, CARASIL の脳症の発症には毛細血管の機能異常が関わっている可能性を示唆する.

カンデサルタンの降圧作用は 1.0 mg/kg/day でおよそ 13 mm Hg, 3.0 mg/kg/day で 17 mm Hg であった. 薬剤コントロールとして用いたアムロジピン 10 mg/kg/day でおよそ 15 mm Hg であった. 両薬剤とも体重減少などの長期投与によるマウスへの毒性効果は認められなかった. これらの結果から, カンデサルタンは 1.0mg/kg/day と 3.0mg/kg/day, 対照となるアムロジピンは 10mg/kg/day での投与を行う.

②CARASIL モデルマウスにおける TGF- β シグナルの評価方法と分子病態に関する研究 (小野寺)

組織免疫染色の結果, *Htra1* 欠損マウス脳内ではリン酸化 smad2/3 陽性細胞数の増加が認められ, TGF- β シグナルの亢進が示された. これまでに, 脳内ではアストロサイトが *Htra1* を発現していること(未発表), HTRA1 は細胞内で TGF- β を切断して分泌量を調節していること(Shiga A, et al. Hum Mol Genet 2011)を確認している. これらの結果は, *Htra1* 欠損マウスにおける TGF- β シグナルの亢進は, アストロサイトから分泌される TGF- β タンパク質の増加による機序であることを示唆する.

Htra1 欠損マウスと野生型マウスの脳より調整した毛細血管由来の mRNA を用いたマイクロアレイ解析の結果, *Htra1* 欠損マウスの脳血管では ICAM-1 をはじめとするいくつかの炎症性マーカー遺伝子の発現の増加が認めら

れた。Htra1 欠損マウス脳血管での炎症性マーカー遺伝子発現の亢進は血管での炎症反応を引き起こすことを示唆しており、CARASIL の病態には炎症機転が関与していることが疑われる。

結論

本年度の研究成果により、CARASIL モデルマウスにおける脳小血管の病理変化と TGF- β シグナルの異常が明確になった。さらに、candesartan および対照である amlodipine の投与量を決定できた。また、CARASIL の病態に慢性炎症が関与していることが推察された。今後は、candesartan 長期投与マウスの解析を順次進め、脳小血管の病理変化と TGF- β シグナルおよび炎症性マーカーの面から治療効果を判定する。

本研究により、CARASIL モデルマウスに対する candesartan の有用性が確立されれば、本薬剤を用いた臨床試験を開始することが可能になる。さらに確立した疾患モデルマウスの成果を国内研究者と共有することにより、本疾患、及び脳小血管病の研究の進展が期待される。これは希少疾患の克服を目指し、認知症に関する対策を進めている厚生行政の目的と合致する。間接的な効果として、本研究の成果は、希少疾患である CARASIL の治療だけでなく、より患者数の多い孤発性の脳小血管病の治療にも応用できる可能性がある。高血圧は脳小血管病の最大の危険因子であり、高血圧を有する患者の血中では TGF- β が増加している (Cambien F, et al. Hypertension 1996)。この研究をさらに発展させて、高血圧患者群を対象とした大規模な前方視的臨床試験によって、candesartan 内服が脳小血管病への進展、ひいては高齢者における認知症や歩行障害の予防に有用であることを示せる可能性が有り、大

きな波及効果が推定される。これらは、未曾有の高齢化社会を迎える本邦において、いかにして認知症と寝たきりを予防するかという厚生労働行政の課題に対して、非常に有用な知見となり得る。

研究発表

1. 論文発表

- 1) Nozaki H, Nishizawa M, Onodera O. Hereditary cerebral small-vessel disease. Nippon Rinsho 2012; 71(3):545-554.
- 2) Nozaki Hiroaki. Consideration of the pathogenesis of CARASIL. Rinsho Shinkeigaku 2012;7(11):1360-1362.

2. 学会発表

- 1) Taisuke Kato, Yumi Sekine, Atsushi Shiga, Megumi Nihonmatsu, Hiroaki Nozaki, Sachiko Hirokawa, Toshiya Sato, Yasuko Toyoshima, Minesuke Yokoyama, Shoji Tsuji, Masatoyo Nishizawa, Osamu Onodera. High-temperature requirement A serine peptidase 1, the causative gene for hereditary cerebral small vessel disease is expressed only in astrocyte. 2012, the 50th Society for Neuroscience Annual Meeting.
- 2) Taisuke Kato, Yumi Sekine, Hiroaki Nozaki, Sachiko Hirokawa, Toshiya Sato, Atsushi Shiga, Yasuko Toyoshima, Hitoshi Takahashi, Masatoyo Nishizawa, Osamu Onodera. Histopathological characterization of CARASIL responsible gene; HTRA1 deficient mouse. 2012 年, 第 2 回新潟大学脳研究所共同研究拠点国際シンポジウム
- 3) 関根有美, 加藤泰介, 野崎洋明, 廣川祥子, 佐藤俊哉, 志賀篤, 辻省次, 横山峯介, 西澤正豊, 小野寺理. Htra1 遺伝子欠損マウスの脳血管病理像. 2012 年, 新潟大学脳研究所夏季セミナー

知的所有権の取得状況

なし

特許取得

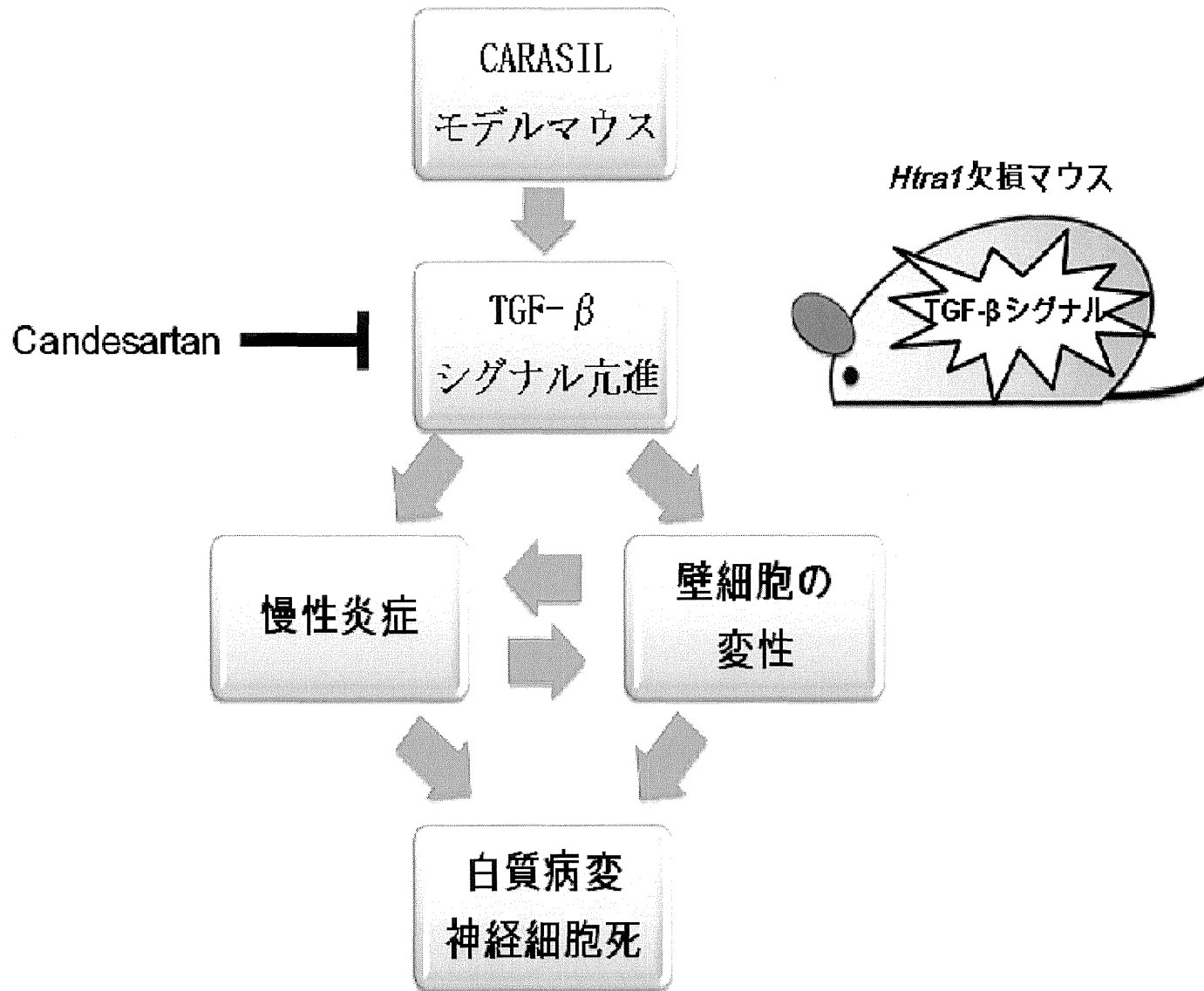
なし

実用新案登録

なし

その他

なし



II 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金(障害者対策総合研究事業(神経・筋疾患分野))

分担研究報告書

TGF- β シグナルに注目した CARASIL の画期的治療方法の開発

CARASIL モデルマウスの脳小血管病理と至適薬剤投与量に関する研究

分担研究者	佐藤 俊哉	新潟大学脳研究所動物実験施設
研究協力者	加藤 泰介	新潟大学超域学術院
	廣川 祥子	新潟大学脳研究所動物実験施設

研究要旨

High temperature requirement A1 (*HTRA1*) は遺伝性脳小血管病の一つである CARASIL の原因遺伝子であり、*HTRA1* 遺伝子変異によるプロテアーゼ機能喪失/低下がこの疾患の発症原因である。CARASIL では、脳小血管での血管平滑筋細胞の変性がおこるが、毛細血管レベルでのペリサイトに関する知見は乏しい。そこで我々は、CARASIL のモデル動物である *Htra1* を欠損したマウスにおけるペリサイトの異常を組織病理学的に検索した。

また、CARASIL は *HTRA1* 機能喪失による TGF- β のシグナル亢進が発症背景に存在することが強く示唆されている。この知見をもとに、我々は TGF- β シグナル阻害効果をもつアンギオテンシン受容体拮抗薬カンデサルタンを *Htra1* ノックアウトマウスに長期投与することによって、*Htra1* ノックアウトマウスが示す脳血管の異常を抑制できるかどうかの解析を進めている。本研究では、このカンデサルタンの対照に用いるアムロジピンの至適投与量についても検討を加えた。

A. 研究目的

High temperature requirement A1 (*HTRA1*) は遺伝性脳小血管病の一つである CARASIL の原因遺伝子であり、*HTRA1* 遺伝子変異によるプロテアーゼ機能喪失/低下がこの疾患の発症原因である(Hara K, et al. N Eng J Med 2009)。

CARASIL 患者では脳軟髄膜動脈、髄質動脈、穿通枝動脈において、血管平滑筋細胞の消失が認められ、その結果として生じる脳血流の調節障害が脳症の原因となることが推察されている。実際に CARASIL の原因遺伝子である *Htra1* のノックアウトマウスは高齢期において血管平滑筋細胞の異常を示す。しかし、実際に脳内を網目状に走行し栄養する脳血管の本体は、さらに小径の毛細血管である。このレベルの血管内皮細胞は、

血管平滑筋細胞と起源を同じくするペリサイトによって取り囲まれ、ペリサイトによる血流の調節を受けている(Winkler EA, et al. Nat Neurosci 2011)。血管平滑筋と同様に CARASIL ではペリサイトも異常を起こす可能性があるが、この点に関しての知見はまだ報告されていない。そこで本研究では CARASIL モデルである *Htra1* ノックアウトマウスにおけるペリサイトの障害の有無を探索することを目的とした。

また、本研究では *Htra1* ノックアウトマウスに対する TGF- β シグナル阻害薬カンデサルタンと対照として使用するアムロジピンの投与量についても検討を行った。CARASIL の発症メカニズムとし

て、HTRA1 機能喪失によって起こる TGF- β シグナルの亢進が強く示唆される (Shiga A, et al. Hum Mol Genet 2011)。同じ TGF- β シグナルの亢進によって血管病変がおこる Marfan 症候群では、すでにアンギオテンシン受容体拮抗薬であるロサルタンやカンデサルタンによる TGF- β シグナル阻害効果と治療効果が報告されている (Chiu HH, et al. Mayo Clin Proc 2013, Lanz TV, et al. J Clin Invest 2010, Brooke BS, et al. N Engl J Med 2008)。また、我々は脳内での *Htra1* が主にアストロサイトで発現していることを確認している (未発表)。本研究では、血液脳関門の透過性が確認されているカンデサルタンの長期投与によって、*Htra1* ノックアウトマウスの脳血管異常の抑制が可能かどうかを検証する。その際、カンデサルタンの効果が TGF- β シグナル阻害作用によるものであることを示す必要がある。カンデサルタンは降圧剤として使用されている薬剤であるため、降圧作用によらない治療効果であることを示すためには、同様の降圧作用を持ち、TGF- β シグナル阻害効果を持たない薬の投与群を対照にする必要がある。そのため、本研究ではカンデサルタンと同等の降圧作用を示すように、Ca チャネル阻害剤であるアムロジピンの用量を検討した。

B. 研究方法

1) 脳の毛細血管のペリサイトの障害の有無の検索

22 ヶ月齢以上の高齢の *Htra1* ノックアウトマウス (n=4) と野生型マウス (n=4) から固定脳を取り出し、floating 切片を作製した。ペリサイトマーカーを CD13、血管内皮細胞マーカーを lectin として、2 重免疫染色を施した。共焦点顕微鏡で大脳皮質・海馬・線条体の毛細血管を撮影し、画像解析ソフト Imaris で解析を行った。血管内皮細胞の体積を分母、それを取り巻く周皮細胞の体積を分子とし、その比をペリサイト被覆率として算出し、ノックアウトマウスと野生型マウスと比較した。

2) TGF- β シグナル阻害薬であるカンデサルタンの長期投与実験

月齢 4 ヶ月と 16 ヶ月の *Htra1* ノックアウトマウスと野生型マウスに対し、内服投与を開始した。マウスの体重を 30g、一日飲水量を 5ml として、飲水にカンデサルタンを溶解して、既報と同様に濃度が 1 mg/kg/day になるように調節した (Lanz TV, et al. J Clin Invest 2010)。また、カンデサルタンの効果が用量依存性に現れるか確認するため、3 mg/kg/day でも内服投与を行った。降圧作用による効果ではないことを示すために、作用機序の異なる Ca チャネル拮抗薬のアムロジピンを対照とし、同程度の降圧作用となる投与量を検討した。

(倫理面への配慮)

動物の愛護及び管理に関する法律に基づいて行うとともに、新潟大学の動物実験規則および組換え DNA 実験安全管理規則に従い、学長許可を受けて実施した。

C. 研究結果

ペリサイト被覆率は大脳皮質、海馬、線条体の 3 部位で、*Htra1* ノックアウトマウスのほうが、野生型マウスに比べて有意に低下していた。また、毛細血管径は大脳皮質、海馬、線条体の 3 部位において、*Htra1* ノックアウトマウスのほうが野生型マウスに比べて有意に拡張していた。

カンデサルタンの降圧作用は 1.0 mg/kg/day でおよそ 13 mm Hg、3.0 mg/kg/day で 17 mm Hg であった。薬剤コントロールとして用いたアムロジピン 10 mg/kg/day でおよそ 15 mm Hg であった。両薬剤とも、体重減少などの長期投与によるマウスへの毒性効果は認められなかった。

D. 考察

Htra1 ノックアウトマウスで見られたペリサイトの異常は CARASIL における脳症の発症には、毛細血管の機能異常が関わっている可能性を示唆する。

E. 結論

遺伝性脳小血管病 CARASIL の原因遺伝子 HTRA1 の機能喪失は、血管平滑筋細胞の変性のみならず、毛細血管レベルでのペリサイトの異常を引き起こす。

対照群におけるアムロジピン至適用量は
10mg/kg/day である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

Taisuke Kato, Yumi Sekine, Hiroaki Nozaki,
Sachiko Hirokawa , Toshiya Sato, Atsushi Shiga,
Yasuko Toyoshima, Hitoshi Takahashi, Masatoyo
Nishizawa, Osamu Onodera. Histopathological
characterization of CARASIL responsible gene;
HTRA1 deficient mouse. 2012 年, 第 2 回新潟大
学脳研究所共同研究拠点国際シンポジウム

関根有美, 加藤泰介, 野崎洋明, 廣川祥子, 佐
藤俊哉, 志賀篤, 辻省次, 横山峯介, 西澤正豊,
小野寺理. Htra1 遺伝子欠損マウスの脳血管病
理像. 2012 年, 新潟大学脳研究所夏季セミナー

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

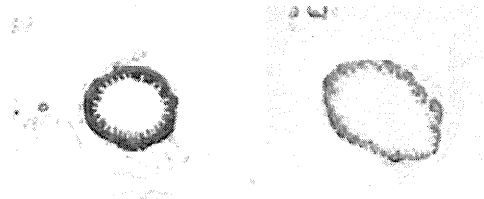
なし

CARASILの病態機序

HtrA1機能喪失

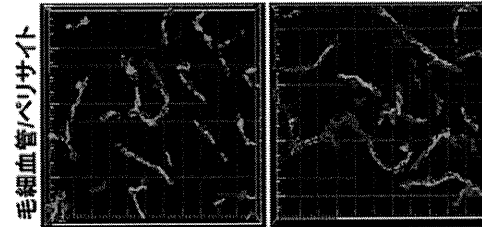


血管平滑筋変性



23カ月齢マウスの α SMA染色
左:野生型マウス
右:HTRA1欠損マウス

ペリサイト障害



23カ月齢マウス
左:野生型マウス
右:HTRA1欠損マウス
毛細血管(黒)/ペリサイト(グレー)

厚生労働科学研究費補助金(障害者対策総合研究事業(神経・筋疾患分野))

分担研究報告書

TGF- β シグナルに注目した CARASIL の画期的治療方法の開発

CARASIL モデルマウスにおける TGF- β シグナルの評価方法と分子病態に関する研究

分担研究者	小野寺理	新潟大学脳研究所分子神経疾患資源解析学分野
研究協力者	関根有美	新潟大学脳研究所神経内科学分野

研究要旨

High temperature requirement A1 (*HTRA1*) は遺伝性脳小血管病の一つである CARASIL の原因遺伝子であり、*HTRA1* 遺伝子変異によるプロテアーゼ機能喪失/低下がこの疾患の発症原因である(N Eng J Med 2009)。本研究は、CARASIL の発症背景には *HTRA1* の基質である TGF- β シグナルの亢進があると考えられており、CARASIL 患者死後脳研究では TGF- β シグナルの下流遺伝子産物の増加が、脳血管において認められる。本研究では生体脳において、*HTRA1* 機能の喪失が実際に TGF- β シグナルの亢進を引き起こすことを実証することを目的とし、*Htra1* ノックアウトマウス脳内での TGF- β シグナルレベルを表す smad2/3 のリン酸化の検出を行い、野生型マウスとの比較検討を行った。

また、高齢期において CARASIL に類似した脳血管変性を示す *Htra1* ノックアウトマウスの脳血管での変化を網羅的に捉える目的で、高齢期マウスより脳血管の精製を行い、mRNA レベルでの遺伝子発現変化の変動をマイクロアレイによって解析を行った。

A. 研究目的

脳血管性認知症は、アルツハイマー病とともに頻度の高い認知症であり、今後高齢化社会が進む中で、その対策は、さらに重要となってくると考えられる。脳血管性認知症の臨床病型としては、広範虚血型、多発脳梗塞型、限局性脳梗塞型があり、各病型で危険因子や病態機序が異なることが知られているが、本邦では広範虚血型、いわゆる Binswanger 型白質脳症が多い。また高齢者には、高血圧や糖尿病、高脂血症などの危険因子がなくても、大脳白質の瀰漫性虚血性病変を認める例が多くあり、その病態機序の解明が待たれている。

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 *HTRA1* を同定した (NEJM)。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。

セリンプロテアーゼである *HTRA1* は、TGF- β を基質とし、*HTRA1* 機能を喪失した CARASIL 患者の脳血管では TGF- β タンパク質の異常蓄積や TGF- β シグナルの下流遺伝子産物の発現の増強が確認されている。TGF- β ファミリーは血管の発達・機能維持に深く関わっていることが知られており、TGF- β シグナルの亢進が CARASIL 病態発症に関与していることが強く疑われる。本研究の目的は、*Htra1* ノックアウトマウス脳内において、*Htra1* の喪失が、実際に生体レベルで TGF- β シグナルの亢進を引き起こすことを実証することである。

また、CARASIL に類似した脳血管異常を示す *Htra1* ノックアウトマウス脳血管におけるイベントを網羅的に捉える目的で、精製脳血管のマイクロアレイにより mRNA 発現解析を行った。

B. 研究方法

1) 免疫組織化学染色によるリン酸化 smad2/3 の検出

TGF- β シグナルレベルは、マウス脳スライスを用いたリン酸化 smad2/3 染色によって検討した。*Htra1* ノックアウト、野生型マウス脳それぞれのリン酸化 smad2/3 陽性細胞数を比較し、*Htra1* ノックアウトマウス脳内における TGF- β シグナルレベルの変動を検討した。

2) マイクロアレイ解析

マイクロアレイ解析は Affymetrix 社の GeneAtlas system を用いて行った。アレイストリップは Affymetrix MG-430 PM Array Strip を使用した。

マウス脳小血管の精製は、血管内皮細胞の表面抗原である PECAM1 抗体を用いた毛細血管の pull-down 法によって行った。血管精製度は、神経細胞、グリア細胞、血管壁細胞マーカーの定量 RT-PCR によって確認を行った。

(倫理面への配慮)

動物の愛護及び管理に関する法律に基づいて行うとともに、新潟大学の動物実験規則および組換え DNA 実験安全管理規則に従い、学長許可を受けて実施した。

C. 研究結果

1) 免疫組織化学染色によるリン酸化 smad2/3 の検出

組織免疫染色の結果、*Htra1* ノックアウトマウス脳内では、リン酸化 smad2/3 陽性細胞数の増加が認められ、*Htra1* ノックアウトマウス脳内では TGF- β シグナルの亢進していることが示唆された。核の形態より、リン酸化 smad2/3 陽性細胞はグリア系の細胞であると推測された。各種細胞マーカーとの 2 重染色により、smad2/3 シグナルが亢進している細胞の同定を、現在進めている。

2) マイクロアレイ解析

Htra1 ノックアウト・野生型マウスの脳より調整した毛細血管由来の mRNA を用いたマイクロアレイ解析の結果、*Htra1* ノックアウトマウスの脳血管では ICAM-1 をはじめとするいくつか

の炎症性マーカー遺伝子の発現の増加が認められた。今後、頭数を追加し再検を進めるとともに、定量 RT-PCR による確認と、in situ hybridization による遺伝子発現変動細胞の同定を試みる予定である。

D. 考察

Htra1 ノックアウトマウスで見られたリン酸化 smad2/3 陽性細胞数の増加は、*Htra1* 喪失によって、基質である TGF- β タンパク質が増加したためであると考えられる。これまでの in situ hybridization 解析の結果、脳内ではアストロサイトが *Htra1* を発現していることが確認されていることからアストロサイト由来の TGF- β タンパク質によるシグナルの増加が疑われる。

マイクロアレイ解析によって明らかとなった *Htra1* ノックアウトマウス脳血管での炎症性マーカー遺伝子発現の亢進は、*Htra1* の欠失は血管での炎症系の亢進を引き起こすことを示唆しており、CARASIL の病態には炎症機転が一部関与している可能性がある。

E. 結論

遺伝性脳小血管病 CARASIL の病態背景には TGF- β シグナルの亢進が関与することを、*Htra1* ノックアウトマウスの解析により生体レベルで示唆することができた。また、その結果、脳血管が変性し、慢性炎症が駆動されるカスケードが存在する可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) Taisuke Kato, Yumi Sekine, Atsushi Shiga, Megumi Nihonmatsu, Hiroaki Nozaki, Sachiko Hirokawa, Toshiya Sato, Yasuko Toyoshima, Minesuke Yokoyama, Shoji Tsuji, Masatoyo Nishizawa, Osamu Onodera. High-temperature requirement A serine peptidase 1, the causative gene for hereditary cerebral small vessel disease is expressed only in astrocyte. 2012, the 50th Society for

Neuroscience Annual Meeting.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

CARASILの病態機序

HtrA1機能喪失
(astrocytes)



Astrocyte由来の
TGF-βの増加



血管平滑筋細胞変性



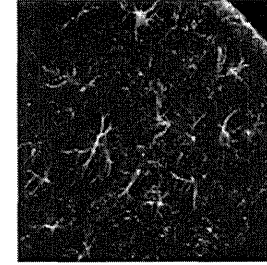
血液脳関門の破綻



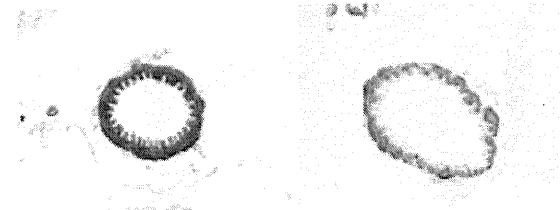
炎症性マーカー ↑



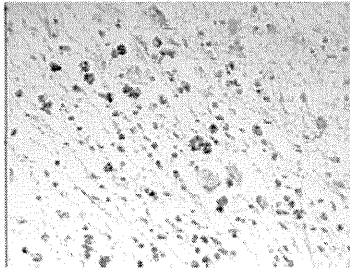
神経/白質変性



AstrocyteにおけるHtrA1 mRNAの発現
HtrA1(グレー)/GFAP(白)/DAPI(黒)



23カ月齢マウスのαSMA染色
左:野生型マウス
右:HtrA1欠損マウス



CARASIL剖検脳における
浸潤性T細胞

Ⅲ 研究成果の刊行に 関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

野崎洋明

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nozaki H, Nishizawa M, Onodera O	Hereditary cerebral small-vessel disease	Nippon Rinsho	71(3)	545-554	2012
Nozaki Hiroaki	Consideration of the pathogenesis of CARASIL	Rinsho Shinkeigaku	7(11)	1360-1362	2012