

201317108A

---

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- $\beta$  シグナルに注目した CARASIL の  
画期的治療方法の開発

平成 25 年度 総括・分担研究報告書

---

Annual Report of the Research Committee for a novel treatment with a focus  
on TGF- $\beta$  signaling for 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26 (2014) 年 3 月

## 目次

### I. 総括研究報告

- TGF- $\beta$  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カンデサルタンの治療効果に関する研究 …… 11  
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 関根有美(新潟大学脳研究所神経内科学分野)
2. CARASIL モデルマウスにおける TGF- $\beta$  シグナルの評価方法と分子病態に関する研究 … 15  
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 加藤泰介(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- $\beta$ 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みられ、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。CARASIL は high temperature requirement serine peptidase A1 (*HTRA1*) の変異に起因する transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) シグナルの亢進によっておこる。治療法はまだ発見されていない。

CARASIL と同様に TGF- $\beta$  シグナルの亢進によっておこる、Marfan 症候群に合併する大動脈瘤には、TGF- $\beta$  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。前年度は、*Htra1* 欠損マウスに対する薬剤の至適投与量と、同マウスの脳小血管における病理変化の定量化について、検討を行った。本年度は、前年度に検討した手法に加えて、脳小血管の病理変化を定量化する新たな方法を確立し、これらの指標を用いて、candesartan の長期内服投与の効果を検討した。さらに、前年度に引き続き、TGF- $\beta$  シグナルの評価方法についても検討を行った。

#### 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

A1 (*HTRA1*) の変異によって発症する、劣性遺伝性の血管平滑筋変性を主体とする脳小血管病であり、*HTRA1* の機能低下による transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) シグナルの亢進によって引き起こされる (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、欧米や中国からも症例が報告されている (Mendioroz M, et al. Neurology 2010, Wang XL, et al. CNS Neurosci Ther 2012, Bianchi S, et al. Neurology 2014, Bayrakli F, et al. Turk Neurosurg. 2014)。さ

#### 研究目的

Cerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CARASIL) は high temperature requirement serine peptidase

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呈すること、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、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- $\beta$  シグナルの亢進によって引き起こされる Marfan 症候群は、TGF- $\beta$  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、22 ヶ月齢以降の *Htra1* 欠損マウスの脳小血管では、CARASIL 患者と同様に血管平滑筋の変性がおこることをすでに明らかにした(未発表データ)。この病態は CARASIL に類似しており、*Htra1* 欠損マウスは理想的な疾患モデル動物である。本研究では、同マウスを用いて、脳内移行が良好で TGF- $\beta$  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。

薬剤の治療効果を判定するためには、薬剤の投与方法と用量を設定し、病理変化を反映する定量的な指標を検討する必要がある。薬剤の投与方法については、血管平滑筋の変性がまだおこっていない、16 ヶ月齢の *Htra1* 欠損マウスに candesartan の経口投与を開始し、8 ヶ月間の薬剤投与を行った後、24 ヶ月齢での脳血管病変を評価することとした。Candesartan の用量は、既報を参考に 3.0

mg/kg/day に設定した。Candesartan は降圧効果を有するため、対照薬剤として candesartan と異なる機序で降圧効果を示す amlodipine を選択し、candesartan と同等の降圧効果を示すように用量を 10.0 mg/kg/day に設定した。また、前年度の研究で、*Htra1* 欠損マウスの毛細血管でペリサイト被覆率が有意に低下すること、毛細血管径が有意に拡張することを明らかにし、病理変化の指標として、ペリサイト被覆率と血管径を設定した。本年度は、新たに血管平滑筋の変性を定量化する指標について検討し、ペリサイト被覆率と血管平滑筋変性を評価することによって、薬剤の効果判定を行うことを目的とした。また、*Htra1* 欠損マウスにおいて、TGF- $\beta$  シグナルの慢性的な亢進がみられるかどうかについても検討を行った。

## 研究方法

CARASIL のモデル動物である *Htra1* 欠損マウスを用いて、16 ヶ月齢から 24 ヶ月齢まで、placebo, candesartan 3.0 mg/kg/day, amlodipine 10.0 mg/kg/day をそれぞれ内服投与した群を用意し、脳小血管の血管平滑筋細胞とペリサイトの変性を定量化した指標を使用して、薬剤の治療効果を検討した。また、分子病態を評価するために、TGF- $\beta$  シグナルの second messenger であるリン酸化 smad2/3 の評価を行った。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した。

### 個々の研究方法

①CARASIL モデルマウスの脳小血管病理と candesartan の治療効果に関する研究 (佐藤俊哉)

1) *Htra1* 欠損マウスの平滑筋細胞変性の定量的評価

24 ヶ月齢の *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、パラフィン切片を作製した。血管平滑筋細胞マーカーの  $\alpha$ -smooth muscle actin と血管内皮細胞マーカーの lectin を用いて 2 重免疫染色を施した。蛍光顕微鏡を用いて、脳軟膜動脈を撮影した。画像解析ソフト Imaris を用いて、個々の血管平滑筋細胞の面積を定量的に解析した。

2) candesartan の長期投与実験

16 ヶ月齢の *Htra1* 欠損マウスに対し、内服投与を開始した。飲水に candesartan を溶解して、3 mg/kg/day に調節した。非内服群と、Ca 拮抗薬の amlodipine を 10mg/kg/day で投与した群を対照にした。投与開始 8 ヶ月後に、固定脳を取り出し、矢状断方向に半割して、floating 切片とパラフィン切片を作製した。

a) ペリサイト被覆率の定量

ペリサイトマーカーとして CD13, 血管内皮細胞マーカーとして lectin を使用し、floating 切片に対して 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、降圧薬を内服した群と同月齢の非内服群で比較した。

b) 血管平滑筋細胞変性の定量

血管平滑筋マーカーの  $\alpha$ -smooth muscle actin と血管内皮細胞マーカーの

lectin を用いて、パラフィン切片に 2 重免疫染色を施した。蛍光顕微鏡を用いて、脳軟膜動脈を撮影し、画像解析ソフト Imaris を用いて、個々の血管平滑筋細胞の面積を定量的に解析した。

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

1) イムノブロットングによるリン酸化 smad2/3 の検出

*Htra1* 欠損マウス、野生型マウス脳内のリン酸化 smad2/3 のレベルをイムノブロットングにより検出し、比較検討を行った。サンプルは大脳皮質、線条体、海馬を解剖しサンプルとした。

2) マウス脳脊髄液、血漿サンプリング

マウス脳脊髄液中、または血中の TGF  $\beta$  の定量のため *Htra1* 欠損マウス、野生型マウスよりサンプルを回収した。脳脊髄液はガラスキャピラリーを用いて大槽腔よりサンプリングを行った。血漿は心採血より回収した血液に抗凝固剤 (EDTA) を加え、遠心により調整した。

3) マウス血管内皮細胞、アストロサイト初代培養

2~4 ヶ月齢のマウス脳よりマウス脳毛細血管を調整し、puromycin による脳血管内皮細胞選択培養により、純正血管内皮培養を行った。アストロサイトは生後 3 日齢の新生仔マウス大脳皮質から trypsin 細胞分散によって調整した。両細胞とも 80~90 コンフルエントの時点で順化培地を回収した。

(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。

## 研究結果と考察

### ・研究班全体としての研究成果

本年度の研究結果から、Candesartan の経口投与が *Htra1* 欠損マウスにおける脳小血管の血管平滑筋とペリサイトの変性を抑制することが明らかになった。薬剤投与によって、こうした形態変化だけではなく、血管の機能も保持することが明らかになれば、非常に有用な治療候補薬となりうる。血管の機能については、血管径の計測によって評価することが可能であり、来年度はこの指標を用いて解析を行う。Candesartan はすでに臨床現場で頻用されている薬剤であり、CARASIL モデルマウスに対する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。

Candesartan は TGF- $\beta$  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。しかし、本年度の研究結果からは、candesartan 群だけでなく、対照薬剤の amlodipine 投与群でも *Htra1* 欠損マウスにおける脳小血管変性の抑制効果を認めた。このことは、両薬剤が TGF- $\beta$  シグナルを抑制することによってではなく、降圧作用によって、脳小血管変性の抑制効果を示した可能性を示唆している。この検証のため、来年度は新たな TGF- $\beta$  シグナルの検出方法を用いて、薬剤が効果を示す分子病態機序についても明らかにする方針である。

### ・個々の研究成果

①CARASIL モデルマウスの脳小血管病理と candesartan の治療効果に関する研究 (佐藤俊哉)

1) *Htra1* 欠損マウスの平滑筋細胞変性の定量的評価

*Htra1* 欠損マウスの脳軟膜動脈の血管平滑筋細胞は野生型マウスに比して萎縮し、部分的に脱落する箇所も認めた。個々の平滑筋細胞の面積を定量的に解析すると、*Htra1* 欠損マウスの平滑筋細胞面積は、野生型マウスに比べて有意に低値であった。これらの結果から、血管平滑筋細胞面積は平滑筋細胞の変性を反映する有用な定量的指標であることを示している。

2) Candesartan の長期投与実験

Placebo 投与群に比べて、candesartan 投与群、amlodipine 投与群のいずれにおいても、ペリサイト被覆率、血管平滑筋細胞面積ともに、有意に高値であった。このことは、candesartan と amlodipine のいずれも脳小血管の変性を抑制することを示している。

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

1) イムノブロットティングによるリン酸化 smad2/3 の検出

イムノブロットティングにより TGF  $\beta$  シグナル下流カスケードである、脳内リン酸化 smad2/3 レベルを *Htra1* 欠損マウス、野生型マウス間で比較した結果、大脳皮質、線条体、海馬いずれの領域でも *Htra1* 欠損マウスと野生型マウスの間に有意差は見られなかった。有意差を認めなかった原因として、マクロに脳をサンプリングしたために、血管における TGF  $\beta$  シグナルの変化が埋没してしまった可能性が考えられた。

2) TGF  $\beta$  定量を目的とした生体試料サンプリ

## ング

HTRA1 喪失下における HTRA1 プロテアーゼの基質である TGF- $\beta$  ファミリーの定量のため、血管変性所見を示す、高齢期 (24 ヶ月齢) Htra1 欠損マウスと対象野生型マウスより脳脊髄液と血漿をサンプリングした。サンプルは Htra1 欠損マウス n=5、野生型マウス n=4 のサンプリングを終えた。また in situ hybridization により HTRA1 の発現が in vivo にて観察された脳アストロサイトと脳血管内皮細胞の初代培養系を確立し、両細胞の順化培地を回収した。また、両細胞より調整した mRNA を用いた定量 RT-PCR 解析の結果、両細胞とも高レベルの HTRA1 の発現が in vitro でも確認された。

## 結論

Candesartan と amlodipine は、CARASIL モデルマウスにおける脳小血管の変性を抑制する。

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治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- $\beta$  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あり、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) Konno T, Tada M, Tada M, Koyama A, Nozaki H, et al. Haplo-insufficiency of CSF-1R and clinicopathologic characterization in patients with HDLS. Neurology 2014; 82:139-148.
- 2) 関根有美, 野崎洋明, 西澤正豊, 小野寺理. COL4A1-related disorder 日本臨床 2013, 別冊 140-144.
- 3) 野崎洋明, 西澤正豊, 小野寺理. 脳小血管病研究の現況と展望. 日本臨床 2013;71:545-554.

### 2. 学会発表

- 1) Hiroaki Nozaki, Yumi Sekine, Yoshinori Nishimoto, Yutaka Shimoe, Akiko Shirata, Sohei Yanagawa, Mikio Hirayama, Imaharu Nakano, Masatoyo Nishizawa, Osamu Onodera. MRI features of cerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy. 2013, the 8<sup>th</sup> International Congress on Vascular Dementia.
- 2) 野崎洋明, 齋藤洋兵, 二本松萌, 小山哲秀, 加藤泰介, 西澤正豊, 小野寺理. Dominant negative 効果をもつ変異型 HTRA1 はヘテロ接合体でも脳小血管病を引き起こす. 2013 年, 第 54 回日本神経学会学術大会

## 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

## 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



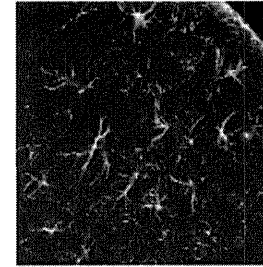
血液脳関門の破綻



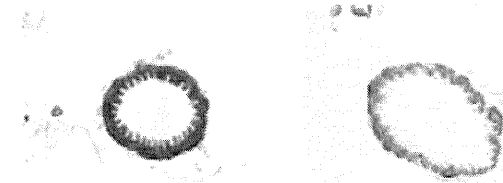
炎症性マーカー↑



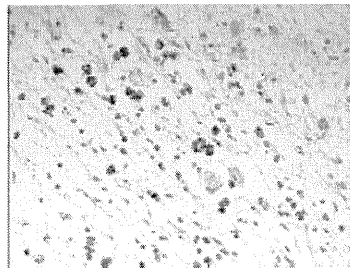
神経/白質変性



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

## 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- $\beta$  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カンデサルタンの治療効果に関する研究

|       |       |                 |
|-------|-------|-----------------|
| 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 | 関根 有美 | 新潟大学脳研究所神経内科学分野 |

研究要旨

Cerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CARASIL)は、high temperature requirement serine peptidase A1 (HTRA1)遺伝子の変異によっておこる劣性遺伝性の脳小血管病である。CARASIL 患者では、HTRA1 の機能不全による TGF- $\beta$  シグナルの亢進がおこり、その結果として、脳小動脈の血管平滑筋細胞やペリサイトの変性が生じ、血管が虚脱して拡張すると推測される。前年度は、CARASIL のモデル動物である *Htra1* 欠損マウスで、脳小動脈のペリサイトの被覆率が低下し、血管径が拡大することを示した。本年度は、新たに脳小動脈の血管平滑筋の変性を定量化する方法を確立した。また、これらの指標を用いて、*Htra1* 欠損マウスの脳血管病変に対する、TGF- $\beta$  シグナル阻害効果をもつカンデサルタンの治療効果を検討した。

A. 研究目的

Cerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CARASIL) は high temperature requirement serine peptidase A1 (HTRA1)遺伝子の変異によっておこる、劣性遺伝性脳小血管病の一つである(Hara K, et al. N Eng J Med 2009)。CARASIL 患者の脳軟膜動脈や穿通枝動脈は、血管平滑筋細胞が高度に変性して血管壁が土管様に変化し、その結果として生じる脳血流の調節障害が脳症の原因になる。有効な治療方法はまだない。

CARASIL の脳血管病変の形成に、HTRA1 機能不全によって生じる TGF- $\beta$  シグナルの慢性的な亢進が関与することが想定されている(Shiga A, et al. Hum Mol Genet 2011)。同じく TGF- $\beta$  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スアルタンとイルベサルタンによる TGF- $\beta$  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, Brooke BS, et al. N Engl J Med 2008)。また、多発性硬化症の実験的自己免

疫性脳脊髄炎モデルマウスにおいて、アンギオテンシン受容体拮抗薬のカンデサルタンによる TGF- $\beta$  シグナル阻害効果と炎症抑制効果が報告されている (Lanz TV, et al. J Clin Invest 2010)。本研究では、高齢期に脳小動脈の血管平滑筋変性を呈する *Htra1* 欠損マウスを疾患モデル動物として、脳内移行性が良好なアンギオテンシン受容体拮抗薬であるカンデサルタンの治療効果を検討することを目的としている。

前年度の研究では、*Htra1* 欠損マウスの脳小血管病理についての検討を行った。穿通枝動脈よりもさらに小径の毛細血管では、血管平滑筋細胞と同じ壁細胞に属するペリサイトに取り囲まれ、ペリサイトにより血流や血管径の調節を受けている (Winkler EA, et al. Nat Neurosci 2011)。そこで、*Htra1* 欠損マウスの毛細血管におけるペリサイトの障害の有無を検討したところ、大脳皮質・海馬・線条体の 3 部位のペリサイト被覆率が低下し、毛細血管径が拡張していた。

また、前年度の研究で、至適薬剤投与量についての検討も行った。本研究では、カンデサルタンの効果が TGF- $\beta$  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り、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、同等の降圧作用を持ち、TGF- $\beta$  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。本研究では既報 (Lanz TV, et al. J Clin Invest 2010) を参考にカンデサルタンの投与量を 3mg/kg/day とし、同等の降圧作用を示すように、Ca チャネル阻害によって降圧作用を示すアムロジピンの投与量を 10 mg/kg/day に設定した。

本年度の研究では、*HtrA1* 欠損マウスの脳軟膜動脈の平滑筋細胞変性について、定量的に評価する方法を検討した。さらに、これまでに本研究で確立した脳小動脈変性の指標を用いて、カンデサルタンの治療効果を検討した。

## B. 研究方法

### 1) *HtrA1* 欠損マウスの平滑筋細胞変性の定量的評価

22 ヶ月齢以上の高齢の *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、パラフィン切片を作製した。血管平滑筋細胞マーカーの  $\alpha$ -smooth muscle actin と血管内皮細胞マーカーの lectin を用いて 2 重免疫染色を施した。蛍光顕微鏡を用いて、脳軟膜動脈を撮影した。画像解析ソフト Imaris を用いて、個々の血管平滑筋細胞の面積を定量的に解析した。

### 2) カンデサルタンの長期投与実験

月齢 16 ヶ月の *HtrA1* 欠損マウスに対し、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、飲水にカンデサルタンを溶解して、3 mg/kg/day に調節した。非内服群と、Ca 拮抗薬のアムロジピンを 10mg/kg/day で投与した群を対照にした。投与開始 8 ヶ月後に、マウスから固定脳を取り出し、矢状断方向に半割して、floating 切片とパラフィン切片を作製した。

#### a) ペリサイト被覆率の定量

ペリサイトマーカーとして CD13、血管内皮細胞マーカーとして lectin を使用し、floating 切片に対して 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、降圧薬を内服したマウスと同月齢の非内服マウスで比較した。

#### b) 血管平滑筋細胞変性の定量

血管平滑筋マーカーの  $\alpha$ -smooth muscle actin と血管内皮細胞マーカーの lectin を用いて、パラフィン切片に 2 重免疫染色を施した。蛍光顕微鏡を用いて、脳軟膜動脈を撮影し、画像解析ソフト Imaris を用いて、個々の血管平滑筋細胞の面積を定量的に解析した。

## (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

1) *HtrA1* 欠損マウスの脳軟膜動脈の血管平滑筋細胞は萎縮し、部分的に脱落する箇所も認められた。個々の平滑筋細胞の面積を定量的に解析すると、*HtrA1* 欠損マウスの平滑筋細胞面積は、野生型マウスに比べて有意に低値であった。

2) 非内服群に比べて、カンデサルタン投与群、アムロジピン投与群のいずれにおいても、ペリサイト被覆率、血管平滑筋細胞面積ともに、有意に高値であった。

## D. 考察

本年度の研究結果から、高齢 *HtrA1* 欠損マウスでは軟膜動脈の血管平滑筋変性がおこっており、平滑筋細胞面積を計測することで、変性所見が定量可能であることが明らかになった。また、カンデサルタンおよびアムロジピンを長期投与することによって、*HtrA1* 欠損マウスの血管平滑筋細胞とペリサイトの変性を抑制できることが明らかになった。来年度(最終年度)は、動脈の機能障害を予防する効果があるかどうかについても、血管径を指標にして検討を行う。また、両薬剤の

効果が, TGFβ シグナル抑制作用を介したものであるかどうかについても, 更なる検討が必要である.

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

E. 結論

*HtrA1* 欠損マウスでは, 脳小動脈の血管平滑筋細胞とペリサイトが変性する.

カンデサルタンおよびアムロジピンの長期内服投与により, *HtrA1* 欠損マウスの血管平滑筋細胞とペリサイトの変性を予防できる.

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) 関根有美, 加藤泰介, 野崎洋明, 廣川祥子, 佐藤俊哉, 志賀篤, 横山峯介, 西澤正豊, 小野寺理. 周皮細胞被覆率の解析による脳血管障害評価法の検討. 2013, 第 54 回日本神経学会学術大会.

2) Yumi Sekine, Taisuke Kato, Hiroaki Nozaki, Sachiko Hirokawa, Toshiya Sato, Atsushi Shiga, Minesuke Yokoyama, Masatoyo Nishizawa, Osamu Onodera. Hyperglycemia decreases the pericyte coverage of brain capillary endothelium. 2013, The 8<sup>th</sup> international congress on vascular dementia & the first cognitive impairment European meeting.

3) Taisuke Kato, Yumi Sekine, Hiroaki Nozaki, Sachiko Hirokawa, Toshiya Sato, Minesuke Yokoyama, Masatoyo Nishizawa, Osamu Onodera. Hyperglycemia decreases the pericyte coverage of brain capillary endothelium. 2013, the 51th 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

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- $\beta$  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- $\beta$  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 | 加藤泰介 | 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 cerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CARASIL)の原因遺伝子である。CARASIL は *HTRA1* 遺伝子変異による *HTRA1* のプロテアーゼ機能喪失によっておこる。実際に、高齢の *Htra1* 欠損マウスでは、CARASIL 患者と同様の脳小血管における血管平滑筋細胞の変性を認める。

CARASIL の脳小血管における血管変性の背景には、*HTRA1* の基質である TGF- $\beta$  が過剰になることによる、TGF- $\beta$  シグナルの亢進があると考えられている。本研究の目的は、生体脳において *HTRA1* 機能の喪失が実際に TGF- $\beta$  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。*Htra1* 欠損マウス脳内の TGF $\beta$  受容体下流の smad リン酸化シグナルレベルの検出をイムノブロットングによって行い、野生型と比較を行った。また、*HTRA1* 機能喪失下における、*HTRA1* プロテアーゼの基質である TGF $\beta$  の量自体の変動を捉える目的で、*Htra1* 欠損マウス、野生型マウスより脳脊髄液、血漿を、さらに *HTRA1* 発現細胞であるアストロサイト、血管内皮細胞を *Htra1* 欠損マウス、野生型マウスより確立し、順化培地 (conditioned medium) のサンプリングを終えた。

## A. 研究目的

脳血管性痴呆は、アルツハイマー病とともに頻度の高い痴呆性疾患であり、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。脳血管性痴呆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。

Cerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CARASIL)は劣性遺

伝性形式を示す遺伝性脳小血管病である。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。CARASIL の原因遺伝子は *HTRA1* である。CARASIL は *HTRA1* 遺伝子変異による *HTRA1* の機能喪失によっておこる。

セリンプロテアーゼである *HTRA1* は、TGF- $\beta$  を基質としている。*HTRA1* 機能を喪失した CARASIL 患者の脳血管では TGF- $\beta$  タンパク質の異常蓄積や TGF- $\beta$  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- $\beta$  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- $\beta$  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* 欠損マウス脳内において, *Htra1* の喪失が, 実際に生体レベルで TGF- $\beta$  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。

## B. 研究方法

### 1) イムノブロットティングによるリン酸化 smad2/3 の検出

*HtrA1* 欠損マウス, 野生型マウス脳内のリン酸化 smad のレベルをイムノブロットティングにより検出し, 比較検討を行った。サンプルは大脳皮質, 線条体, 海馬を解剖しサンプルとした。

### 2) マウス脳脊髄液, 血漿サンプリング

マウス脳脊髄液中, または血中の TGF $\beta$  の定量のため *HtrA1* 欠損マウス, 野生型マウスよりサンプルを回収した。脳脊髄液はガラスキャピラリーを用いて大槽腔よりサンプリングを行った。血漿は心採血より回収した血液に抗凝固剤 (EDTA) を加え, 遠心により調整した。

### 3) マウス血管内皮細胞, アストロサイト初代培養

2~4 ヶ月齢のマウス脳よりマウス脳毛細血管を調整し, puromycin による脳血管内皮細胞選択培養により, 純正血管内皮培養を行った。アストロサイトは生後 3 日齢の新生仔マウス大脳皮質から trypsin 細胞分散によって調整した。両細胞とも 80~90 コンフルエントの時点で順化培地を回収した。

#### (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

### 1) イムノブロットティングによるリン酸化 smad2/3 の検出

イムノブロットティングにより TGF $\beta$  シグナル下流カスケードである, 脳内リン酸化 smad2/3 レベルを *HtrA1* 欠損マウス, 野生型マウス間で比較した結果, 大脳皮質, 線条体, 海馬いづれの領域でも *HtrA1* 欠損マウスと野生型マウスの間に差は見られなかった。

### 2) TGF $\beta$ 定量を目的とした生体試料サンプリング

HTRA1 喪失下における HTRA1 プロテアーゼの基質である TGF $\beta$  ファミリーの定量のため, 血管変性所見を示す, 高齢期 (24 ヶ月齢) *HtrA1* 欠損マウスと対象野生型マウスより脳脊髄液と血漿をサンプリングした。サンプルは *HtrA1* 欠損マウス n=5, 野生型マウス n=4 のサンプリングを終えた。また in situ hybridization により HTRA1 の発現が in vivo にて観察された脳アストロサイトと脳血管内皮細胞の初代培養系を確立し, 両細胞の順化培地を回収した。また, 両細胞より調整した mRNA を用いた定量 RT-PCR 解析の結果, 両細胞とも高レベルの HTRA1 の発現が in vitro でも確認された。

## D. 考察

昨年度行ったリン酸化 smad2/3 の免疫染色による比較では, *HtrA1* 欠損マウス脳内でリン酸化 smad2/3 の陽性細胞数に増加が見られたものの, 個体差が大きく統計学的な差を検出することが困難であった。そこで, 今年度は, より定量性に優れたイムノブロットティングによる比較を行った。しかしながら, *HtrA1* 欠損マウスと野生型の間にリン酸化 smad レベルに差を見出すことは出来なかった。イムノブロットティングではマクロに脳をサンプリングするために, HTRA1 制御下にある TGF $\beta$  シグナルの特異的シグナルが埋没してしまったことが, 大きな理由であると考えられる。

そこで, シグナルカスケードではなく, HTRA1 の分解制御を受ける TGF $\beta$  ファミリー分子そのものの定量により TGF $\beta$  量の亢進を示す方向に切り替えを行った。分泌タンパク質である HTRA1 は血管内皮細胞とアストロサイトに発現が見られることから, 両細胞に接して循環する脳脊髄液と血液中の TGF $\beta$  を標的とし, *HtrA1* 欠損マウスと野生型マウスよりサンプリングを行った。また, より直接的な量的変動を捉えるために, HTRA1 発現細胞である血管内皮細胞とアストロサイトの初代培養系を確立した。両細胞より分泌される TGF $\beta$  への影響を定量するため, 順化培地をサンプリングした。これまでの緩慢な持続的シグナルを in vivo で検出する, リン酸化レベルの検出よりも, 直接的に基質である TGF $\beta$  を定量する本手法によ



り, HTRA1 喪失による影響をより鋭敏に捉えることが出来ると考えられる. 回収されたサンプルは高感度にサイトカイン量を定量可能な luminex multiplex array にて解析を進める予定である.

#### E. 結論

変動の少ない持続的な入力をシグナルカスケードでは十分に捉えられないことから, 基質であるリガンドそのものの定量を目的とする実験手法に切り替えを行った. これにより, HTRA1 プロテアーゼ喪失による真の TGFβ 量の変動を直接的に捉えることが可能であると考えられる.

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Konno T, Tada M, Onodera O, et al. Haploinsufficiency of CSF-1R and clinicopathologic characterization in patients with HDLS. *Neurology* 2014; 82:139-148.

2) 関根有美, 野崎洋明, 西澤正豊, 小野寺理. COL4A1-related disorder 日本臨床 2013, 別冊 140-144.

3) 野崎洋明, 西澤正豊, 小野寺理. 脳小血管病研究の現況と展望. 日本臨床 2013;71:545-554.

##### 2. 学会発表

1) Hiroaki Nozaki, Yumi Sekine, Yoshinori Nishimoto, Yutaka Shimoe, Akiko Shirata, Sohei Yanagawa, Mikio Hirayama, Imaharu Nakano, Masatoyo Nishizawa, Osamu Onodera. MRI features of cerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy. 2013, the 8<sup>th</sup> International Congress on Vascular

Dementia.

2) 野崎洋明, 齋藤洋兵, 二本松萌, 小山哲秀, 加藤泰介, 西澤正豊, 小野寺理. Dominant negative 効果をもつ変異型 HTRA1 はヘテロ接合体でも脳小血管病を引き起こす. 2013 年, 第 54 回日本神経学会学術大会

3) 関根有美, 加藤泰介, 野崎洋明, 廣川祥子, 佐藤俊哉, 志賀篤, 横山峯介, 西澤正豊, 小野寺理. 周皮細胞被覆率の解析による脳血管障害評価法の検討. 2013, 第 54 回日本神経学会学術大会.

4) Yumi Sekine, Taisuke Kato, Hiroaki Nozaki, Sachiko Hirokawa, Toshiya Sato, Atsushi Shiga, Minesuke Yokoyama, Masatoyo Nishizawa, Osamu Onodera. Hyperglycemia decreases the pericyte coverage of brain capillary endothelium. 2013, The 8<sup>th</sup> international congress on vascular dementia & the first cognitive impairment European meeting.

5) Taisuke Kato, Yumi Sekine, Hiroaki Nozaki, Sachiko Hirokawa, Toshiya Sato, Minesuke Yokoyama, Masatoyo Nishizawa, Osamu Onodera. Hyperglycemia decreases the pericyte coverage of brain capillary endothelium. 2013, the 51th 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

# 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  |
|---|---|-----------|----|---------|------|
| Konno T, Tada M, Tada M, Koyama A, Nozaki H, et al. | Haploinsufficiency of CSF-1R and clinicopathologic characterization in patients with HDLS | Neurology | 82 | 139-148 | 2014 |
| 関根有美、野崎洋明、西澤正豊、小野寺理                                 | COL4A1-related disorder   | 日本臨床      | 別冊 | 314-318 | 2013 |
| 野崎洋明、西澤正豊、小野寺理                                      | 遺伝性脳小血管病研究の現況と展望  | 日本臨床      | 71 | 545-554 | 2013 |

