

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 β (TGF- β) 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- β 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- β シグナルを抑制するアンジオテンシン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ジオテンシン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- β 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 β (TGF- β) 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- β シグナルの亢進によって引き起こされる Marfan 症候群は、TGF- β シグナルを抑制するアンジオテンシン 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- β シグナルの阻害作用を有するアンジオテンシン 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- β 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- β 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

CARASIL 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 α -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 α -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。

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 (小野寺理)

1) イムノプ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 のレベルをイムノプ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 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- 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。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- β 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- β 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

CARASIL 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。

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（小野寺）

1) イムノプロットングによるリン酸化 smad2/3 の検出

イムノプロットングにより TGF 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 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 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- β 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) 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 8th International Congress on Vascular Dementia.
- 2) 野崎洋明, 斎藤洋兵, 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

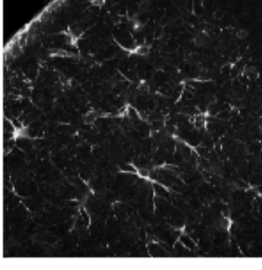
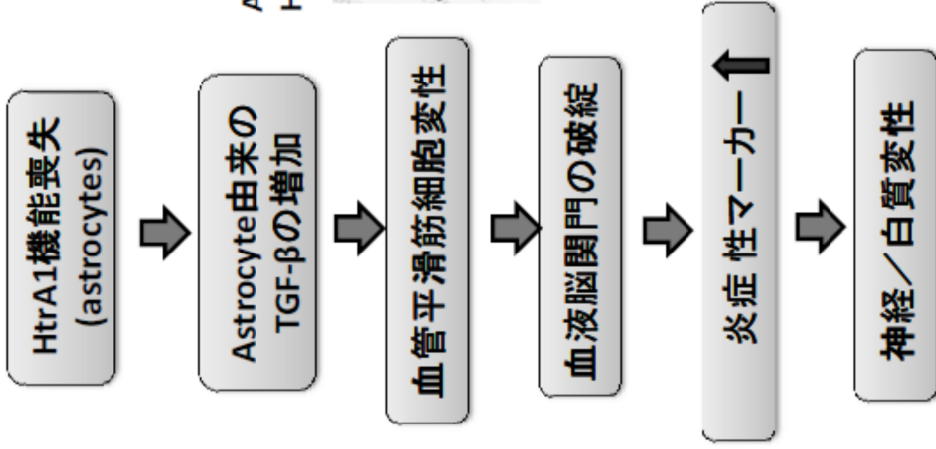
実用新案登録

なし

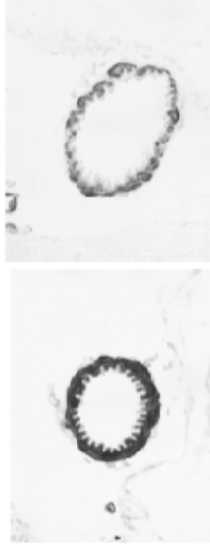
その他

なし

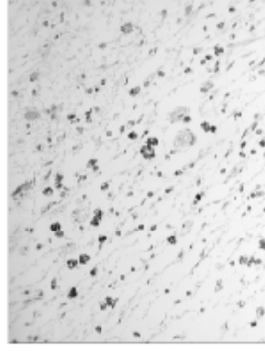
CARASILの病態機序



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



23か月齢マウスの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