

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サ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

