

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	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- β が過剰になることによる、TGF- β 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- 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。*Htra1* 欠損マウス脳内の TGF β 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 β 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- β 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- 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 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- 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.

B. 研究方法

- 1) イムノプ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 のレベルをイムノプ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 β 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) イムノプロットティングによるリン酸化 smad2/3 の検出

イムノプロットティングにより TGF β 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は差は見られなかった.

- 2) TGF β 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.

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プ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はリン酸化 smad レベルに差を見出すことは出来なかった. イムノプ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 β 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 β ファミリー分子そのものの定量により TGF β 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 β 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 β 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 β 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 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

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 8th 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

様式