

201419091A

厚生労働科学研究費補助金

障害者対策総合研究事業

(障害者対策総合研究開発事業(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 26 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 野崎 洋明

平成 27(2015)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	-----	6
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	-----	9
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	-----	12
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	13

厚生労働科学研究費補助金  
(障害者対策総合研究事業(障害者対策総合研究開発事業(神経・筋疾患分野)))  
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

研究代表者; 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 *Prss11* 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、*Prss11* 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 北里大学実験動物学・教授  
小野寺 理 新潟大学脳研究所・教授

*temperature requirement serine peptidase A1*) 遺伝子の変異によって発症する、劣性遺伝性の壁細胞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 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

研究目的

CARASIL (cerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy) は HTRA1 (high

報告されている (Nozaki H, et al. Stroke 2014). さらに, 申請者は, 同遺伝子変異のヘテロ接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, 16 ヶ月齢以降の *Prss11* 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, *Prss11* 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 *Prss11* 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, 前年度までの研究で, 壁細胞変性を反映する指標として, 血管平滑筋細胞面積とペリサイト被覆率が有用であることを明らかにした. 本年度は, これらの薬剤投与方法と壁細胞変性の指標を用いて, *Prss11* 欠損マウスの脳小血管変性に対する, candesartan 長期内服による治療効果を検討することを目的とした. また, *Prss11* 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 *Prss11* 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, およびリガンドで TGF- $\beta$  の定量評価を行った. 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

① 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) マウスの処理

月齢 16 カ月の *Prss11* 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 として、飲水に candesartan を溶解して、3 mg/kg/day に調節した。非内服群と、Ca チャンネル拮抗薬である 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、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。野生型マウスについては、24 カ月齢の固定脳を取り出し、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。

### 2) 血管平滑筋細胞面積の評価

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、パラフィン切片に対して 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。(野生型  $n = 8$ , *Prss11* 欠損マウス非内服群  $n = 7$ , *Prss11* 欠損マウス candesartan 内服群  $n = 4$ , *Prss11* 欠損マウス amlodipine 内服群  $n = 4$ )

### 3) ペリサイト被覆率の評価

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。共焦点顕微鏡で脳皮質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た。(野生型  $n = 4$ , *Prss11* 欠損マウス非内服群  $n = 4$ , *Prss11* 欠損マウス candesartan 内服群  $n = 2$ , *Prss11* 欠損マウス

amlodipine 内服群  $n = 1$ )

### 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マウス脳組織におけるリン酸化 smad2/3 の検出

24 カ月齢の *Prss11* 欠損マウス、野生型マウスの大脳皮質、線条体、海馬を解剖しサンプルとした。TGF- $\beta$  シグナルのセカンドメッセンジャーであるリン酸化 smad2/3 をイムノブロットングにより検出し、量について比較検討を行った。

#### 2) マウス脳脊髄液、血漿のサンプリングと TGF- $\beta$ の定量

マウス脳脊髄液中、または血中の TGF- $\beta$  の定量のため *Prss11* 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 (*Prss11* 欠損マウス  $n=5$ , 野生型マウス  $n=4$ )。ルミネックス法によって、サンプル中に含まれる TGF- $\beta$  の定量を行った。

#### 3) マウス血管内皮細胞、アストロサイト初代培養の確立と TGF- $\beta$ の定量

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。ELISA によって、サンプル中に含まれる TGF- $\beta$  の定量を行った。

(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

本年度の研究結果から、candesartan の長期経口投与が *Prss11* 欠損マウスにおける脳小血管の壁細胞変性を抑制することが明らかになった。これは、脳小血管の変性を治療するという新たなアプローチによって、初めて効果が実証されたケースである。同薬は降圧薬としてすでに臨床現場で頻用されている薬剤であり、CARASIL においても速やかな臨床応用が期待できる。

申請者は、candesartan が 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を想定していた。しかし、本研究では、candesartan 群だけでなく、対照薬剤の amlodipine 投与群でも *Prss11* 欠損マウスにおける脳小血管変性の抑制効果を認めた。また、*Prss11* 欠損マウスの生体内における TGF- $\beta$  シグナルは、野生型マウスと *Prss11* 欠損マウスの間に有意差を認めなかった。このことは、candesartan 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を抑制した可能性を示唆している。

### ・個々の研究成果

#### ① 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) 壁細胞変性に対する薬剤の効果

血管平滑筋細胞面積については、非内服群

に比して、candesartan 投与群、amlodipine 投与群ともに、有意に高値であった。Candesartan 投与群と amlodipine 投与群の間には、平滑筋細胞面積に有意差は認めなかった。ペリサイト被覆率については、非内服群に比して、candesartan 投与群、アムロジピン投与群のいずれにおいても、高値を示す傾向があった。

#### 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 (小野寺)

##### 1) マウス脳組織のリン酸化 smad2/3

イムノブロットングにより 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 *Prss11* 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有意差は見られなかった。

##### 2) マウス脳脊髄液、血漿に含まれる TGF- $\beta$

脳脊髄液、血漿のいずれのサンプルにおいても、*Prss11* 欠損マウス、野生型マウス間で有意差は見られなかった。

##### 3) マウス血管内皮細胞、アストロサイト初代培養から分泌される TGF- $\beta$

血管内皮細胞の初代培養では、*Prss11* 欠損マウス、野生型マウスの間に有意差は見られなかった。アストロサイト初代培養では、ELISA による検出感度未満であった。

## 結論

Candesartan は CARASIL モデルマウスにおける脳小血管変性を抑制する。

## 研究発表

### 1. 論文発表

1) Onodera O, Sekine Y, Kato T, Koyama A, Nozaki H, Nishizawa M. Emerging molecular mechanism for cerebral small vessel disease: Lessons from hereditary small vessel disease. *Neurol Clin Neurosci* 2015;3:7-13.

2) Nozaki H, Nishizawa M, Onodera O. Features of cerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy. Stroke 2014;45:3447-3453.

3) 上村昌寛, 野崎洋明, 西澤正豊, 小野寺理. CADASIL と CARASIL について. 日本臨床 2014;72:619-623.

4) 野崎洋明, 西澤正豊, 小野寺理. CARASIL の新しいトピックス. 分子脳血管病 2014;13:179-181.

5) 関根有美, 野崎洋明, 西澤正豊, 小野寺理. CADASIL, CARASIL の分子病態機序. 日本臨床 2014;72:148-151.

6) 手塚敏之, 西澤正豊, 野崎洋明, 小野寺理. CADASIL, CARASIL の病態機序. 血管医学 2014;15:51-58.

## 2. 学会発表

1) 野崎洋明, 加藤泰介, 斎藤洋兵, 小山哲秀, 西澤正豊, 小野寺理. HTRA1 遺伝子変

異のヘテロ接合体は, 優性阻害効果によって脳小血管病を引き起こす. 2014年11月, 第33回日本認知症学会学術集会

2) Yumi Sekine, Taisuke Kato, Hiroaki Nozaki, Sachiko Hirokawa, Toshiya Sato, Atsushi Shiga, Toshikuni Sasaoka, Masatoyo Nishizawa, Osamu Onodera. Excess TGF- $\beta$ 1 secreted from astrocytes impair mural cells in cerebral small arteries. 2014, 55<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society of Neurology.

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

厚生労働科学研究費補助金  
(障害者対策総合研究事業(障害者対策総合研究開発事業(神経・筋疾患分野)))  
分担研究報告書

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

分担研究者	佐藤 俊哉	北里大学実験動物学・教授
研究協力者	関根 有美	新潟大学脳研究所・医員

### 研究要旨

CARASIL (cerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy) は *HTRA1* (*high temperature requirement serine peptidase A1*) 遺伝子の変異によっておこる常染色体劣性遺伝性の脳小血管病である。CARASIL 患者では、*HTRA1* の機能不全によって TGF- $\beta$  の過剰な産生が生じ、その結果として、脳小血管の壁細胞に変性がおこると考えられている。そのため、TGF- $\beta$  の産生を抑制する AT1 受容体拮抗薬が CARASIL の治療薬となる可能性がある。本研究は、CARASIL のモデル動物である *Prss11* 欠損マウスを用いて、脳小血管の壁細胞変性に対する AT1 受容体拮抗薬 candesartan の効果を検討することを目的とした。

前年度までに、薬剤の投与方法、壁細胞の変性を反映する定量的指標について検討を行い、研究のプロトコルを確定した。最終年度である本年度は、確定したプロトコルによって *Prss11* 欠損マウスの脳小血管における壁細胞変性を評価し、candesartan の長期投与が変性を抑制することを明らかにした。

### A. 研究目的

CARASIL (cerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy) は *HTRA1* (*high temperature requirement serine peptidase A1*) 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 患者の脳小血管は、壁細胞が高度に変性して土管様に変化し、その結果として生じる脳血流障害が脳症を引き起こすと考えられている (Oide T, et al. Neuropathology)。有効な治療方法はまだない。

降圧薬の一つである CARASIL では、*HTRA1* 機能不全によって生じる TGF- $\beta$  の過剰な産生と TGF- $\beta$  シグナルの慢性的な亢進が脳小血管の変性を引き起こす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、AT1 受容体拮抗薬である

losartan と irbesartan による TGF- $\beta$  シグナル抑制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、実験的自己免疫性脳脊髄炎モデルマウスにおいても、AT1 受容体拮抗薬の candesartan による TGF- $\beta$  シグナル抑制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、高齢期に脳小血管の壁細胞変性を呈する *Prss11* 欠損マウスを用いて、脳内移行性が良好な AT1 受容体拮抗薬である candesartan の壁細胞変性に対する治療効果を検討することを目的としている。

前年度までの研究では、薬剤投与方法と脳小血管の壁細胞変性を評価する指標について、検討を行った。その結果、薬剤については 16 カ月齢の *Prss11* 欠損マウスに対して、candesartan 3 mg/kg/day の経口投与を開始し、24 カ月齢で組織を評価することとした。本研究では、



candesartan の効果が降圧作用ではなく TGF- $\beta$  シグナル阻害作用によるものであることを想定している。そのため、薬剤コントロールとして、candesartan 3 mg/kg/day と同等の降圧作用を示す Ca チャネル阻害薬 amlodipine 10 mg/kg/day の経口投与を設定した。また、壁細胞変性を評価する指標として、血管平滑筋細胞面積とペリサイト被覆率を用いることとした。本年度の研究では、これまでに確立した薬剤投与方法と脳小血管変性の指標を用いて、candesartan の治療効果を検討した。

## B. 研究方法

### 1) マウスの処理

月齢 16 カ月の *Prss11* 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 として、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。野生型マウスについては、24 カ月齢の固定脳を取り出し、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。

### 2) 血管平滑筋細胞面積の評価

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、パラフィン切片に対して 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。(野生型  $n = 8$ , *Prss11* 欠損マウス非内服群  $n = 7$ , *Prss11* 欠損マウス candesartan 内服群  $n = 4$ , *Prss11* 欠損マウス amlodipine 内服群  $n = 4$ )

### 3) ペリサイト被覆率の評価

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た。(野生型  $n = 4$ , *Prss11* 欠損マウス非内服群  $n = 4$ , *Prss11* 欠損マウス candesartan 内服群  $n = 2$ ,

*Prss11* 欠損マウス amlodipine 内服群  $n = 1$ )

(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) 壁細胞変性に対する薬剤の効果

血管平滑筋細胞面積については、非内服群に比して、candesartan 投与群、amlodipine 投与群ともに、有意に高値であった。Candesartan 投与群と amlodipine 投与群の間には、平滑筋細胞面積に有意差は認めなかった。ペリサイト被覆率については、非内服群に比して、candesartan 投与群、アムロジピン投与群のいずれにおいても、高値を示す傾向があった。

## D. 考察

本年度の研究結果から、candesartan および amlodipine の長期投与によって、*Prss11* 欠損マウスにおける脳小血管の変性を抑制できることが明らかになった。いずれの薬剤もすでに高血圧患者に臨床応用されており、CARASIL 患者に対する速やかな臨床応用が可能である。薬剤の作用機序については、candesartan だけでなく、amlodipine による治療効果を認めたことから、当初想定していた TGF- $\beta$  を介した作用ではなく、降圧作用によるものである可能性がある。この点は、マウス脳小血管における TGF- $\beta$  の量を評価することによって、明らかにできると考える。

本研究によって、脳小血管の変性を評価する指標として、血管平滑筋細胞面積とペリサイト被覆率が有用であることが明らかになった。これまで、脳小血管の変性を評価するための standard な方法はなかった。本研究で開発したこれらの指標は今後の脳小血管研究にも応用できるものであり、発展性があると考えられる。

## E. 結論

Candesartan は CARASIL モデルマウスにおける脳小血管変性を抑制する。

## 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) Yumi Sekine, Taisuke Kato, Hiroaki Nozaki, Sachiko Hirokawa , Toshiya Sato, Atsushi Shiga, Toshikuni Sasaoka, Masatoyo Nishizawa, Osamu Onodera. Excess TGF- $\beta$ 1 secreted from astrocytes impair mural cells in cerebral small arteries. 2014, 55<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society of Neurology.

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

厚生労働科学研究費補助金  
(障害者対策総合研究事業(障害者対策総合研究開発事業(神経・筋疾患分野)))  
分担研究報告書

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・教授  
研究協力者 加藤 泰介 新潟大学脳研究所・特任助教

研究要旨

遺伝性脳小血管病の一つである CARASIL (cerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy)では脳小血管に特異的な壁細胞の変性がおこる。CARASIL の原因遺伝子は *HTRA1* (*High temperature requirement serine peptidase A1*) であり、同遺伝子変異による *HTRA1* のプロテアーゼ機能喪失によっておこる。実際に、*Htra1* オルソログである *Prss11* を欠損したマウスでは、高齢期に CARASIL 患者と同様の脳小血管における壁細胞変性を認める。

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。本年度は、*Prss11* 欠損マウス脳における TGF- $\beta$  シグナルをイムノブロットングによって評価し、野生型と比較を行った。また、*Prss11* 欠損マウスより脳脊髄液、血漿を採取し、さらに PRSS11 発現細胞であるアストロサイト、血管内皮細胞を確立し、順化培地 (conditioned medium) のサンプリングを行った。これらのサンプルについて TGF- $\beta$  の定量を試みた。

A. 研究目的

脳血管性認知症は、アルツハイマー病に次いで頻度の高い認知症である。その臨床病型には、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。このうち、本邦では広範虚血型の頻度が多いと考えられている。この病型では、脳の小血管に壁細胞変性がみられるが、その病態機序は明らかになっていない。

CARASIL (cerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy) は常染色体劣性遺伝形式の広範虚血型脳血管性認知症である。CARASIL 患者では脳の小血管に特異的な壁細胞変性を呈する。この所見は孤発性の広範

虚血型脳血管性認知症の脳血管でみられる病理変化に類似しており、CARASIL と孤発性の広範虚血型脳血管性認知症の間に共通の病態が存在することを示唆している (Oide T, et al. Neuropathology)。

CARASIL は *HTRA1* (*High temperature requirement serine peptidase A1*) 遺伝子異常により *HTRA1* 蛋白のプロテアーゼ機能が失われる結果、発症する (Hara K, et al. N Eng J Med 2009)。*HTRA1* は血管の恒常性維持に重要な役割をもつ TGF- $\beta$  を基質とし、そのシグナルを制御している。CARASIL 患者の脳小血管では TGF- $\beta$  の異常蓄積や TGF- $\beta$  シグナルの増強が確認されており (Shiga A, et al. Hum Mol Genet 2011)、TGF- $\beta$  シグナル

の慢性的な亢進が CARASIL における脳小血管病変の発症に関与していることが疑われる。しかし、その因果関係を検討するためには剖検例の解析では不十分であり、モデル動物の解析が必要になる。

*HtrA1* オルソログである *Prss11* を欠損したマウスでは、高齢期に CARASIL 患者と同様の脳小血管における壁細胞変性を認める。これは理想的な CARASIL のモデル動物といえる。本研究の目的は、*Prss11* 欠損マウス脳内において、TGF- $\beta$  シグナルの亢進がおこるかどうかを検証することである。昨年度行ったリン酸化 smad2/3 の免疫染色による比較では、*Prss11* 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、本年度は、より定量性に優れたイムノブロットングによる smad2/3 の比較を行い、あわせてマウスの脳脊髄液、血漿およびマウスの血管内皮細胞、アストロサイトの初代培養を用いて TGF- $\beta$  の定量化も試みた。

## B. 研究方法

### 1) イムノブロットングによるマウス脳組織におけるリン酸化 smad2/3 の検出

24 カ月齢の *Prss11* 欠損マウス、野生型マウスの大脳皮質、線条体、海馬を解剖しサンプルとした。TGF- $\beta$  シグナルのセカンドメッセンジャーであるリン酸化 smad2/3 をイムノブロットングにより検出し、量について比較検討を行った。

### 2) マウス脳脊髄液、血漿のサンプリングと TGF- $\beta$ の定量

マウス脳脊髄液中、または血中の TGF- $\beta$  の定量のため *Prss11* 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 (*Prss11* 欠損マウス  $n=5$ 、野生型マウス  $n=4$ )。ルミネックス法によって、サンプル中に含まれる TGF- $\beta$  の定量を行った。

### 3) マウス血管内皮細胞、アストロサイト初代培養の確立と TGF- $\beta$ の定量

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。ELISA によって、サンプル中に含まれる TGF- $\beta$  の定量を行った。

(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) マウス脳組織のリン酸化 smad2/3

イムノブロットングにより 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 *Prss11* 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有意差は見られなかった。

### 2) マウス脳脊髄液、血漿に含まれる TGF- $\beta$

脳脊髄液、血漿のいずれのサンプルにおいても、*Prss11* 欠損マウス、野生型マウス間で有意差は見られなかった。

### 3) マウス血管内皮細胞、アストロサイト初代培養から分泌される TGF- $\beta$

血管内皮細胞の初代培養では、*Prss11* 欠損マウス、野生型マウスの間に有意差は見られなかった。アストロサイト初代培養では、ELISA による検出感度未満であった。

## D. 考察

本年度の研究では、マウス脳組織におけるリン酸化 smad2/3 のイムノブロットング、マウス脳脊髄液と血漿の TGF- $\beta$  量、マウス血管内皮細胞とアストロサイト初代培養における TGF- $\beta$  分泌量について解析を行ったが、いずれの実験でも、野生型と *Prss11* 欠損マウスの間に有意差は認めなかった。これらの結果からは、生体内の脳小血管という限局された微小環境条件においてのみ TGF- $\beta$  分泌量

が増加する, 特定のストレス下においてのみ TGF- $\beta$  分泌量が増加する, *Prss11* 欠損マウスでは TGF- $\beta$  分泌量の増加がおこらない, などの可能性などが考えられる. これらを明らかにするためには, 生体内の TGF- $\beta$  分泌量あるいは TGF- $\beta$  シグナルを高感度に検出できる手法を開発する必要がある.

#### E. 結論

*Prss11* 欠損マウスの生体内で TGF- $\beta$  シグナルの亢進がおこっていることを示すデータは得られなかった.

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Onodera O, Sekine Y, Kato T, Koyama A, Nozaki H, Nishizawa M. Emerging molecular mechanism for cerebral small vessel disease: Lessons from hereditary small vessel disease. *Neurol Clin Neurosci* 2015;3:7-13.

2) Nozaki H, Nishizawa M, Onodera O. Features of cerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy. *Stroke* 2014;45:3447-3453.

3) 上村昌寛, 野崎洋明, 西澤正豊, 小野寺理. CADASIL と CARASIL について. *日本臨床* 2014;72:619-623.

4) 野崎洋明, 西澤正豊, 小野寺理. CARASIL の新しいトピックス. *分子脳血管病*

2014;13:179-181.

5) 関根有美, 野崎洋明, 西澤正豊, 小野寺理. CADASIL, CARASIL の分子病態機序. *日本臨床* 2014;72:148-151.

6) 手塚敏之, 西澤正豊, 野崎洋明, 小野寺理. CADASIL, CARASIL の病態機序. *血管医学* 2014;15:51-58.

#### 2. 学会発表

1) 野崎洋明, 加藤泰介, 斎藤洋兵, 小山哲秀, 西澤正豊, 小野寺理. HTRA1 遺伝子変異のヘテロ接合体は, 優性阻害効果によって脳小血管病を引き起こす. 2014 年 11 月, 第 33 回日本認知症学会学術集会

2) Yumi Sekine, Taisuke Kato, Hiroaki Nozaki, Sachiko Hirokawa, Toshiya Sato, Atsushi Shiga, Toshikuni Sasaoka, Masatoyo Nishizawa, Osamu Onodera. Excess TGF- $\beta$ 1 secreted from astrocytes impair mural cells in cerebral small arteries. 2014, 55<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society of Neurology.

#### 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

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Onodera O, Sekine Y, Kato T, Koyama A, Nozaki H, Nishizawa M	Emerging molecular mechanism for cerebral small vessel disease: Lessons from hereditary small vessel disease	Neurol Clin Neurosci	3	7-13	2015
Nozaki H, Nishizawa M, Onodera O	Features of cerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy	Stroke	45	3447-3453	2014
上村昌寛, 野崎洋明, 西澤正豊, 小野寺理	CADASILとCARASILについて	日本臨床	72	619-623	2014
野崎洋明, 西澤正豊, 小野寺理	CARASILの新しいトピックス	分子脳血管病	13	179-181	2014
関根有美, 野崎洋明, 西澤正豊, 小野寺理	CADASIL, CARASILの 分子病態機序	日本臨床	72	148-151	2014
手塚敏之, 西澤正豊, 野崎洋明, 小野寺理	CADASIL, CARASILの 病態機序	血管医学	15	51-58	2014

## REVIEW ARTICLE

**Emerging molecular mechanism for cerebral small vessel disease: Lessons from hereditary small vessel disease**Osamu Onodera,<sup>1</sup> Yumi Sekine,<sup>2</sup> Taisuke Kato,<sup>2</sup> Akihide Koyama,<sup>3</sup> Hiroaki Nozaki<sup>4</sup> and Masatoyo Nishizawa<sup>2</sup><sup>1</sup>Department of Molecular Neuroscience, Resource Branch for Brain Disease Research, Center for Bioresource-based Research, <sup>2</sup>Department of Neurology, Clinical Neuroscience Branch, Brain Research Institute, <sup>3</sup>Center for Transdisciplinary Research, and <sup>4</sup>School of Health Sciences, Faculty of Medicine, Niigata University, Niigata, Japan**Key words**capillary, pericyte, platelet-derived growth factor- $\beta$ , small vessel disease, transforming growth factor- $\beta$ .

Accepted for publication 25 September 2014.

**Correspondence**Osamu Onodera  
Department of Molecular Neuroscience,  
Resource Branch for Brain Disease Research,  
Center for Bioresource-based Research,  
Niigata University, 1-757 Asahimachi-dori,  
Chuo-ku, Niigata-City, Niigata 951-8585,  
Japan. Email: onodera@bri.niigata-u.ac.jp**Abstract**

Cerebral small vessel disease is a common disorder in the elderly. The findings of hereditary small vessel disease studies clearly show that small vessel diseases have a distinct molecular pathway that is different from that in large vessels. However, the anatomical and functional heterogeneity of the cerebral small vessel system makes it difficult to understand the concept and molecular mechanism for small vessel disease. The purpose of this review is to explain the heterogeneity of small vessels and the importance of the components of the capillary system in the pathogenesis of cerebral small vessel disease. Although traditional investigations have focused more attention on the arteriole, the most functional part of small arteries is the capillary. Therefore, the capillary might play an important role in the pathogenesis of small vessel disease. In the capillary, pericytes and astrocytes are unique components with marked diversity. However, the molecular signature and function of pericytes remain unknown. Furthermore, the morphology and molecular signature of astrocytes in the cortex and white matter are quite different. Therefore, the mechanism of small vessel disease is not simple, and must be investigated considering the diversities of small vessels. In the capillary, cross-talk between cell components exists. Among these cell signaling pathways, recent findings on the gene responsible for hereditary small vessel disease show that transforming growth factor- $\beta$  and platelet-derived growth factor- $\beta$  could contribute to the molecular pathogenesis of small vessel disease. These findings provide useful information for the development of a new therapeutic strategy for small vessel disease.

**Introduction**

The vessel system in the brain is fundamental for maintaining brain function. Among the components of the vessel system, the small vessels play an important role in maintaining the function. Diseases that mainly involve small vessels are known as cerebral small vessel disease (SVD). SVD is a common disorder in elderly populations, and contributes to dementia, gait disturbance and stroke.<sup>1</sup> The concept of SVD changes our understanding of cerebral vascular disease in that the molecular pathogenesis of SVD is different from that of large vessel disease, which is mainly caused by arteriosclerosis. With advances in molecular genetics, the genes that cause cerebral SVD have been identified. Study findings have clearly shown that SVD has a distinct molecular pathway that does not involve large vessels. However, little is known about the molecular basis of SVD.<sup>2</sup>

The concept of cerebral SVD is still obscure. Although small vessels are anatomically and functionally different, we are still not sure which type of small vessel contributes to the pathogenesis of cerebral SVD. Furthermore, although a blood–brain barrier and perivascular drainage of interstitial fluid from the brain parenchyma have been proposed as a function in the small vessels in the brain, the precise functions and involved components of small vessels are not fully understood.<sup>3,4</sup> To understand cerebral SVD, the function and precise structure of the small vessels in the brain must be clarified. Capillaries and surrounding astrocytes are unique, and play an important role in the function of small vessels. However, previous studies on cerebral small vessels have mainly focused on the arterioles, which are larger than capillaries.<sup>1</sup> The purpose of the present review is to explain the heterogeneity of the cerebral small vessel system, and the importance of mural cells in the pathogenesis of cerebral SVD, based on the

findings from studies about the molecular pathogenesis of hereditary SVD.

## Heterogeneity of small vessels

A characteristic feature of the brain arteries is that they mainly lose their external elastic membrane.<sup>5</sup> This feature of the cerebral arteries might contribute to the high frequency of brain vessel aneurysms.<sup>6</sup> Among the small vessels in the brain, there are at least three different types of vessels: pial artery, arteriole and capillary.<sup>7</sup> The pial artery is composed of the following cells and connective tissue layers (starting from the luminal side): endothelial cells, basement membrane, internal elastic membrane, smooth muscle cells, basement membrane, leptomeningeal cells and connective tissue.<sup>7</sup> These small arteries have anastomoses.<sup>8</sup> The anatomical differences among these three vessels include the absence or presence of the internal elastic membrane, smooth muscle cells and perivascular space. The elastic membrane is absent in the arterioles, and smooth muscle cells and the perivascular space are both absent in the capillaries.

There are two types of arterioles, according to their anatomical position in the cerebrum. One is the superficial perforating artery arising from the pial artery (smaller than large arteries), and the other is the deep perforating artery arising from the anterior, middle and posterior cerebral arteries (large arteries). Superficial perforating arteries are further divided into four types by the depth of the vessels from the cerebral surface. Two types of superficial perforating arteries irrigate the different layers in the cortex, and the others irrigate the corticomedullary junction and white matter.<sup>9,10</sup> In the cortex, small arteries are more abundant than in white matter, and make anastomoses.

The superficial perforating artery that branches into the periventricular area and irrigates the white matter is known as the medullary artery. The medullary artery is divided into two types by its shape after penetrating the cortex. After penetrating the cortex, one artery extends straightly through the white matter and the other bends at a right angle at the subcortical area to access the deep white matter. The arteries make anastomoses around the ventricular wall.<sup>11</sup> The superficial perforating arteries coil, loop and spiral within wide adventitial spaces at the corticomedullary junction; the function of these structures is unknown.<sup>11</sup> These arteries have thick adventitial sheaths and large perivascular spaces in the white matter not in the cortex.<sup>11</sup> Meanwhile, the deep perforating artery branches out directly from the large artery, and most of the arteries reach the basal ganglia and thalamus.<sup>12</sup> In addition, some of these arteries have a dual leptomeningeal cell layer, resulting in a relatively large perivascular space.<sup>7</sup> This unique structure might appear as a relatively large perivascular space on T2-weighted magnetic resonance imaging (MRI).

Another important characteristic of the small vessels is their regulation by the neuron.<sup>13,14</sup> The pial artery is densely innervated by the peripheral nervous system. In contrast, small cortical arteries (arteriole or capillary) are innervated by interneurons in the cortex or subcortical pathway neurons. It is not known if these neuronal regulations also exist

in small arteries in the subcortical area; however, the small vessels in the white matter might be less tightly regulated by the nervous system.

## Diversities of capillaries

The most important function of capillaries in the small vessel system is as a blood–brain barrier.<sup>4</sup> The non-fenestrated endothelial cells and tight junction compose this system. The endothelial cells are enveloped with pericytes and astrocyte end-feet. This structure is sometimes called a neurovascular unit; however, the contribution of the nervous system to capillaries in the subcortical area is not clear.<sup>13</sup> In the present review, these components will be described as a capillary unit, including capillaries, astrocytes and pericytes. In a capillary unit, the endothelial cell plays several important roles for barrier function: forming a tight junction, selective transport system and endocytosis.<sup>4,15</sup> To maintain these characteristic features, the endothelial cells in capillary express several unique molecules, which are not observed in the endothelial cells in arterioles; for example, claudin and occludin in tight junctions, glucose transporter 1 for selective transportation and caveolin 1 for selective transcytosis.<sup>4</sup> In addition, a recent study showed extravasation of clots in the capillary to the brain parenchyma by the endothelial cells, suggesting that the function and characteristics of endothelial cells in the capillary might be different from those in the arteriole.<sup>16</sup> Furthermore, it is not known if all the endothelial cells in the central nervous system are identical regardless of their location. Endothelial cells are tightly associated with pericytes, which are mural cells in the capillary, by autocrine and paracrine signaling.<sup>17,18</sup> If the characteristics and function of pericytes vary according to their location, the same might also be true for endothelial cells.<sup>19</sup>

In capillaries, smooth muscle cells are absent, and pericytes cover some extent of the abluminal side of endothelial cells. Compared with other species, the small vessels in the human cortex are covered by a larger number of pericytes.<sup>20</sup> Recent findings show that pericytes play an important role in maintaining the blood–brain barrier function.<sup>15,17,20–23</sup> In addition, a decrease in the number of pericytes causes neurodegeneration through a non-ischemic or hypo-oxygenic pathway.<sup>24</sup> Pericytes are cells attached to the abluminal side of endothelial cells in the capillary and covering the basement membrane along with endothelial cells. There are several molecular signatures that can distinguish most of the pericytes from other cells; however, none of the single molecular markers can distinguish all of the pericytes from other brain cells.<sup>20,21</sup> The lineage of the pericytes in the central nervous system is different in each part of brain.<sup>17,20,25</sup> The embryonic sources of pericytes include neuroectoderm-derived neural crest cells, which give rise to pericytes in the forebrain, and mesoderm-derived mesenchymal stem cells, which give rise to pericytes in the midbrain, brain stem and spinal cord.

This complex is enveloped by astrocytes. Although the contribution of the astrocytes to maintain the barrier function is not fully understood, the astrocytes might contribute to the direction of the selective transportation between the



luminal side and the brain parenchyma.<sup>26,27</sup> The astrocyte also has marked heterogeneities, including protoplasmic and fibrous astrocytes.<sup>26,28–31</sup> The protoplasmic astrocyte is predominantly found in the cortex, and has many branching processes with end-feet that envelop the synapse and capillaries. Furthermore, some of the branches extend to the surface of the cerebrum. In contrast, the fibrous astrocyte is found in white matter, and has a few unbranched processes with end-feet that envelop Ranvier nodes and capillaries. Although the lineage differences of each astrocyte in the cerebrum is still obscure, the astrocytes in the spinal cord have a distinct lineage depending on the anatomical position in the spinal cord.<sup>28,32</sup>

Small arteries have marked anatomical and functional diversities. Most prominently, small vessels in the cortex and white matter are different in many aspects. The difference is not simply explained by the difference of the circulation dynamics or number of capillaries. The regulations by the nervous system and the type of cells that compose the capillaries are fundamentally different between small vessels in the cortex and white matter. These results indicate that small vessels do not have a single architecture. We should to pay more attention to the heterogeneities of cerebral small vessels when we study the molecular pathogenesis of SVD.

### Which type of small vessel is responsible for the clinical features of SVD?

MRI has shown several aspects of SVD, white matter hyperintensity, lacunar infarction, microbleeds, cortical subarachnoid hemorrhage, cortical microinfarction and cortical thinning.<sup>2,33</sup> Among these features, which feature is mostly responsible for the clinical symptoms of SVD? The most prominent feature of SVD on MRI is white matter hyperintensity (WMHI). Indeed, several hereditary SVD show diffuse WMHI; thus, there is no doubt that WMHI is a result of small vessel alterations. The lower density of capillaries in white matter might explain the vulnerability of the white matter in SVD.<sup>11</sup> As the medullary artery is severely affected in sporadic SVD, Okeda *et al.* proposed the earthen pipe hypothesis for the molecular pathogenesis of SVD.<sup>34,35</sup> They speculated that the hypoperfusion resulting from a loss of autoregulation of small vessels contributes to the white matter pathology in SVD.

Although the autoregulation disturbance hypothesis might explain a part of the molecular pathogenesis of white matter injury, the loss of the smooth muscle cell layer cannot simply explain the entire feature of SVD. The pathological findings of idiopathic basal ganglia calcification do not support this hypothesis. Patients with idiopathic basal ganglia calcification present massive calcifications in the perforating arteriole, specifically, in a portion of the media intima.<sup>36–38</sup> In the small vessels of patients with this disease, the contracting property of the arteriole should be completely diminished. However, WMHI is not an early finding in these patients.<sup>39–41</sup> The difference between this small vessel pathology and the other SVD is that the affected area is calcified and protected from the bloodstream. Therefore, an additional

mechanism should exist to explain the molecular pathogenesis of WMHI. In addition, accumulating evidence shows that WMHI is not strongly correlated with the clinical symptoms in hereditary SVD.<sup>42–46</sup> This feature markedly precedes the onset of the neurological symptoms. Thus, the significance of WMHI on development of clinical manifestations in SVD should be carefully assessed.<sup>47,48</sup>

The capillary, which plays the most important role in the small vessel system, could contribute to the clinical manifestations in SVD.<sup>49</sup> Capillary alterations can cause cognitive impairment and movement dysfunction through different mechanisms: (i) dysfunction of the barrier function; (ii) dysregulation of microcirculation dependent on neuronal activity; and (iii) failure of interstitial fluid draining.<sup>17,50,51</sup> Previous studies have attempted to explain the selective vulnerability for white matter, as changes in the white matter are mostly prominent in SVD. However, if WMHI is just a consequence of the dysfunction of the small vessel system, we might lose track of the true pathogenesis that contributes to the neurological manifestations of SVD. Further studies should focus on the alteration of the microcirculation system, including the capillary and surrounding cells, to understand the pathogenesis of SVD.

### Which component of small vessels is important for the pathogenesis of SVD?

The degeneration of the smooth muscle cells and the splitting of the internal elastic membrane are characteristic features in sporadic and some hereditary small vessels. The splitting of the internal elastic fiber might cause the transition of smooth muscle cells and their migration and proliferation to the media intima, not apoptosis.<sup>52</sup> Furthermore, the disturbance of elastic fiber by reducing the amounts of component protein, elastin, does not cause SVD.<sup>52–55</sup> In contrast, patients with the mutation in actin, which is mainly expressed in the smooth muscle cells, resemble those of sporadic SVD.<sup>56</sup> Therefore, the degeneration of smooth muscle cells might contribute to the pathogenesis of SVD.

However, the capillary, a functional small vessel, does not have smooth muscle cells. The capillary has several unique structures that distinguish it from other vessels and small vessels in other organs. These unique structures might explain why these disorders specifically affect the brain. Thus, whether the components of the capillary unit are important for pathogenesis of SVD will be addressed in the present review.

One of the components of the cells in the capillary unit is the pericyte. Pericytes are cells that share the basement membrane with endothelial cells. However, the lack of markers to identify pericytes makes it difficult to investigate the involvement of these cells in the human brain.<sup>15,17,20</sup> The involvement of pericytes in SVD is well characterized in diabetic retinopathy. In this disorder, pericyte apoptosis is an early manifestation. The absence of pericytes is recognized as a “pericyte ghost”, which represents the trace of the pericyte as a space between the basement membrane.<sup>57</sup> In contrast, in brain parenchyma, it would be difficult to recognize these traces. Therefore, there is a limitation to recognizing

pericyte alterations in the human brain. However, the importance of pericytes for maintaining the neuron and the blood–brain barrier has recently been recognized.<sup>15,17,20</sup> The involvement of pericytes has been observed in patients and a mouse model of cerebral autosomal-dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy, a hereditary SVD,<sup>58,59</sup> or idiopathic basal ganglia calcification.<sup>22,23,36,39,60</sup> Thus, it would be interesting to investigate the contribution of pericytes in cerebral SVD.

The other unique component in the capillary unit is the astrocyte. The morphology and molecular signature of astrocytes is different between those in the cortex and white matter.<sup>26,28–31</sup> Fibrous astrocytes are plentiful in the white matter, and have cylindrical processes with dense glial filaments stained with glial fibrillary acidic protein. Protoplasmic astrocytes are popular in the gray matter, and have more irregular processes and few glial filaments. Protoplasmic astrocytes contact and sheathe synapses and blood vessels. Therefore, there is a possibility that an alteration on a specific type of astrocyte results in the vulnerability of specific areas in the brain. For example, the mutation of the glial fibrillary acidic protein, which is a fundamental skeletal protein in the astrocyte and more popular in the fibrous astrocytes than protoplasmic astrocytes, causes demyelination in the white matter. Although in the patients with a mutation in the *GFAP* gene, the astrocytes in white matter are predominantly affected, the clinical manifestations of the patients are quite different from the SVD. Thus, it might be difficult to consider that the astrocyte takes a primary role in the pathogenesis of SVD.

Finally, the perivascular space, known as the Virchow–Robin space, is a unique structure in the small vessel systems in the brain. Several hypotheses for the significance of the space between the adventia and parenchyma (glia limitans) in the brain have been provided.<sup>61</sup> One of the hypotheses is that the space functions as a pathway for drainage of fluid or proteins from the brain parenchyma.<sup>3,62</sup> Weller *et al.* use the term, “protein elimination-failure angiopathy,” for the disorder caused by the impairment of drainage pathway by small vessels.<sup>3</sup> Cerebral amyloid angiopathy, which predominantly involves the cortical and pial arteries, has been considered part of the elimination failure disorders.<sup>3</sup> The disease has been classified into two types depending on the presence or absence of amyloid accumulation in capillaries.<sup>7,63,64</sup> In cerebral amyloid angiopathy, amyloid deposit in the internal space of the mural cells results in the disappearance of smooth muscle cells. In addition, WMHI is well observed in patients with Alzheimer’s disease. Although the elimination failure hypothesis is promising, more evidence should be accumulated to prove that the perivascular space functions as a drainage system in the brain.

### Alteration of the signaling pathway between the cell components of the microcirculation system causes SVD

The identification of the gene responsible for hereditary SVD provides the molecular pathway for SVD. Several molecular mechanisms have been identified in SVD: (i) the

alteration of structural proteins in the small vessel system,<sup>65</sup> (ii) accumulation of the abnormal proteins or dysfunctional metabolism in the small vessel system,<sup>66,67</sup> and (iii) alteration of the cell signaling pathway in the small vessel system. The present review will focus on the contribution of the cell signaling pathway on the pathogenesis of SVD.

We recently identified the causative genes for hereditary SVD, cerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CARASIL).<sup>68</sup> Mutations in the high-temperature requirement A (HTRA) serine peptidase 1 (HTRA1) gene cause the disease. Disorganization of the internal elastic membrane and loss of vascular smooth muscle cells were observed in small cerebral arteries in CARASIL.<sup>69</sup> These pathological findings resemble those observed in patients with non-hereditary cerebral SVD.<sup>34,35</sup> HTRA1 has a serine protease activity, and decreases transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) family signaling.<sup>70</sup> CARASIL-associated mutant HTRA1 show decreased protease activity and fail to decrease TGF- $\beta$  family signaling.<sup>68,71</sup> Furthermore, the fibronectin containing extra type III domain A and versican, which are induced by increased TGF- $\beta$  signaling, accumulate and TGF- $\beta$ 1 is increased in the media intima of small cerebral arteries of patients with CARASIL.<sup>68,71</sup> These findings show that increased TGF- $\beta$  signaling plays a pivotal role in the pathogenesis of SVD in CARASIL. HTRA1 decreases TGF- $\beta$ 1 signaling by interfering with the maturation of proTGF- $\beta$ 1 in the intracellular space. HTRA1 cleaves the pro-domain of proTGF- $\beta$ 1, and cleaved proTGF- $\beta$ 1 is degraded.<sup>71</sup> Consequently, the amount of mature TGF- $\beta$ 1 is reduced. The intracellular cleavage of proTGF- $\beta$ 1 is a novel mechanism to regulate the amount of TGF- $\beta$ 1.<sup>71,72</sup> The relationship between the dysregulation of TGF- $\beta$  signaling and the loss of smooth muscle cells in small cerebral vessels might show an emerging molecular mechanism for cerebral SVD. TGF- $\beta$  is a well-known cytokine that is secreted from endothelial cells, pericytes and astrocytes.<sup>15,17</sup> The receptors for TGF- $\beta$  are also expressed in these cells. Therefore, TGF- $\beta$  signaling could affect autocrine or paracrine signaling. Although it is still not clear in which cell HTRA1 is expressed, the endothelial cell is a possible candidate and regulates TGF- $\beta$  signaling.<sup>73,74</sup>

Another component of the cell signaling pathway, which functions between endothelial cells and pericytes, is the platelet-derived growth factor- $\beta$  (PDGF $\beta$ ).<sup>15,17</sup> The decreased PDGF $\beta$  or receptor for PDGF $\beta$  decreases the number of pericytes, and results in the dysfunction of the blood–brain barrier accompanied with neurodegeneration.<sup>22–24</sup> Mutations in PDGF $\beta$  or receptor for PDGF $\beta$  cause idiopathic basal ganglia calcification.<sup>39,60</sup> Although the neuropathological findings with these mutations have not been reported, neuropathological findings in patients with idiopathic basal ganglia calcification showed calcium deposition in pericytes.<sup>38</sup> The mural cells have the capacity to transition into several characteristic states. For example, smooth muscle cells transition from the contracting type to the non-contracting type as well as the osteogenic type, depending on the balance of the signaling pathway.<sup>74,75</sup> It would be interesting to investigate the transition of pericytes to osteogenic pericyte as a result of decreased PDGF- $\beta$  signaling.

## Conclusion

Small cerebral vessels are a lost world in the brain architecture. In the pharmacological field, the role of the small vessels in the brain in relation to the function of the blood–brain barrier and the molecules in the tight junction has been investigated. Indeed, the tight junction plays an important role in maintaining the barrier function; however, recent advances in small vessel research show that selective endocytosis in the capillary also plays an important role in the barrier function.<sup>15</sup> Furthermore, the capillary unit also functions in the draining of interstitial fluid.<sup>3</sup> The fine regulation of microcirculation in the cortex might also be important to maintain brain function.<sup>13,14,51</sup> The pericytes, astrocytes and neuronal regulation could take an important role for these functions. To clarify the pathogenesis of SVD, further research on the anatomical and functional heterogeneity in the small vessels and surrounding cells is required. Furthermore, additional insight on how the cell signaling pathway maintains the small vessel units will provide useful information for the development of a new therapeutic strategy to prevent the progression of SVD.

## Acknowledgments

This work was supported through a Grant-in-Aid for Scientific Research (B) from the Japan Society for the Promotion of Science; Grant-in-Aid for the Research Committee for Hereditary Cerebral Small Vessel Disease from the Ministry of Health, Labor and Welfare, Japan; and a Grant-in-Aid for JSPS Fellows from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan. The authors declare no conflict of interest.

## References

- Pantoni L. Cerebral small vessel disease: from pathogenesis and clinical characteristics to therapeutic challenges. *Lancet Neurol.* 2010; **9**: 689–701.
- Wardlaw JM, Smith C, Dichgans M. Mechanisms of sporadic cerebral small vessel disease: insights from neuroimaging. *Lancet Neurol.* 2013; **12**: 483–97.
- Carare RO, Hawkes CA, Jeffrey M, Kalaria RN, Weller RO. Cerebral amyloid angiopathy, prion angiopathy, CADASIL and the spectrum of protein elimination failure angiopathies (PEFA) in neurodegenerative disease with a focus on therapy. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 2013; **39**: 593–611.
- Daneman R. The blood–brain barrier in health and disease. *Ann. Neurol.* 2012; **72**: 648–72.
- Wilkinson IM. The vertebral artery. Extracranial and intracranial structure. *Arch. Neurol.* 1972; **27**: 392–6.
- Fujimoto K. “Medial defects” in the prenatal human cerebral arteries: an electron microscopic study. *Stroke* 1996; **27**: 706–8.
- Weller RO, Boche D, Nicoll JA. Microvasculature changes and cerebral amyloid angiopathy in Alzheimer’s disease and their potential impact on therapy. *Acta Neuropathol.* 2009; **118**: 87–102.
- Nonaka H, Akima M, Nagayama T, Hatori T, Zhang Z, Ihara F. Microvasculature of the human cerebral meninges. *Neuropathology* 2003; **23**: 129–35.
- Reina-De La Torre F, Rodriguez-Baeza A, Sahuquillo-Barris J. Morphological characteristics and distribution pattern of the arterial vessels in human cerebral cortex: a scanning electron microscope study. *Anat. Rec.* 1998; **251**: 87–96.
- Akima M. A morphological study on the microcirculation of the central nervous system. Selective vulnerability to hypoxia. *Neuropathology* 1993; **13**: 99–112.
- Nonaka H, Akima M, Hatori T, Nagayama T, Zhang Z, Ihara F. Microvasculature of the human cerebral white matter: arteries of the deep white matter. *Neuropathology* 2003; **23**: 111–8.
- Nonaka H, Akima M, Nagayama T, Hatori T, Zhang Z. The fundamental architecture of the microvasculature of the basal ganglia and changes in senility. *Neuropathology* 1998; **18**: 47–54.
- Hamel E. Perivascular nerves and the regulation of cerebrovascular tone. *J. Appl. Physiol.* 2006; **100**: 1059–64.
- Iadecola C. Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer’s disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 2004; **5**: 347–60.
- Armulik A, Genové G, Betsholtz C. Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. *Dev. Cell* 2011; **21**: 193–215.
- Lam CK, Yoo T, Hiner B, Liu Z, Grutzendler J. Embolus extravasation is an alternative mechanism for cerebral microvascular recanalization. *Nature* 2010; **465**: 478–82.
- Winkler EA, Bell RD, Zlokovic BV. Central nervous system pericytes in health and disease. *Nat. Neurosci.* 2011; **14**: 1398–405.
- Gaengel K, Genové G, Armulik A, Betsholtz C. Endothelial-mural cell signaling in vascular development and angiogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2009; **29**: 630–8.
- Cleaver O, Melton DA. Endothelial signaling during development. *Nat. Med.* 2003; **9**: 661–8.
- Sá-Pereira I, Brites D, Brito MA. Neurovascular unit: a focus on pericytes. *Mol. Neurobiol.* 2012; **45**: 327–47.
- Krueger M, Bechmann I. CNS pericytes: concepts, misconceptions, and a way out. *Glia* 2010; **58**: 1–10.
- Daneman R, Zhou L, Kebede AA, Barres BA. Pericytes are required for blood–brain barrier integrity during embryogenesis. *Nature* 2010; **468**: 562–6.
- Armulik A, Genové G, Mäe M et al. Pericytes regulate the blood–brain barrier. *Nature* 2010; **468**: 557–61.
- Bell RD, Winkler EA, Sagare AP et al. Pericytes control key neurovascular functions and neuronal phenotype in the adult brain and during brain aging. *Neuron* 2010; **68**: 409–27.
- Korn J, Christ B, Kurz H. Neuroectodermal origin of brain pericytes and vascular smooth muscle cells. *J. Comp. Neurol.* 2002; **442**: 78–88.
- Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 2010; **119**: 7–35.
- Wolburg H, Noell S, Mack A, Wolburg-Buchholz K, Fallier-Becker P. Brain endothelial cells and the gliovascular complex. *Cell Tissue Res.* 2009; **335**: 75–96.
- Molofsky AV, Krenick R, Ullian E et al. Astrocytes and disease: a neurodevelopmental perspective. *Genes Dev.* 2012; **26**: 891–907.
- Oberheim NA, Goldman SA, Nedergaard M. Heterogeneity of astrocytic form and function. *Methods Mol. Biol.* 2012; **814**: 23–45.
- Zhang Y, Ben A. Barres. Astrocyte heterogeneity: an underappreciated topic in neurobiology. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2010; **20**: 588–94.
- Matyash V, Kettenmann H. Heterogeneity in astrocyte morphology and physiology. *Brain Res. Rev.* 2010; **63**: 2–10.
- Hochstim C, Deneen B, Lukaszewicz A, Zhou Q, Anderson DJ. Identification of positionally distinct astrocyte subtypes whose

- identities are specified by a homeodomain code. *Cell* 2008; **133**: 510–22.
- 33 Gouw AA, Seewann A, van der Flier WM *et al.* Heterogeneity of small vessel disease: a systematic review of MRI and histopathology correlations. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* 2010; **82**: 126–35.
  - 34 Okeda R, Murayama S, Sawabe M, Kuroiwa T. Pathology of the cerebral artery in Binswanger's disease in the aged: observation by serial sections and morphometry of the cerebral arteries. *Neuropathology* 2004; **24**: 21–9.
  - 35 Tanoi Y, Okeda R, Budka H. Binswanger's encephalopathy: serial sections and morphometry of the cerebral arteries. *Acta Neuropathol.* 2000; **100**: 347–55.
  - 36 Kobayashi S, Yamadori I, Miki H, Ohmori M. Idiopathic nonarteriosclerotic cerebral calcification (Fahr's disease): an electron microscopic study. *Acta Neuropathol.* 1987; **73**: 62–6.
  - 37 Kozik M, Kulczycki J. Laser-spectrographic analysis of the cation content in Fahr's syndrome. *Arch. Psychiat. Nervenkr.* 1978; **225**: 135–42.
  - 38 Duckett S, Galle P, Escourolle R, Poirier J, Hauw JJ. Presence of zinc, aluminum, magnesium in striopallidodentate (SPD) calcifications (Fahr's disease): electron probe study. *Acta Neuropathol.* 1977; **38**: 7–10.
  - 39 Westenberger A, a-Murias MGI, Domingo A *et al.* Mutations in the gene encoding PDGF-B cause brain calcifications in humans and mice. *Nat. Genet.* 2013; **45**: 1077–82.
  - 40 Wang C, Li Y, Shi L *et al.* Mutations in SLC20A2 link familial idiopathic basal ganglia calcification with phosphate homeostasis. *Nat. Genet.* 2012; **44**: 254–6.
  - 41 Manyam BV. What is and what is not "Fahr's disease". *Parkinsonism Relat. Disord.* 2005; **11**: 73–80.
  - 42 Viswanathan A, Godin O, Jouvent E *et al.* Impact of MRI markers in subcortical vascular dementia: a multi-modal analysis in CADASIL. *Neurobiol. Aging* 2010; **31**: 1629–36.
  - 43 Liem MK, van der Grond J, Haan J *et al.* Lacunar infarcts are the main correlate with cognitive dysfunction in CADASIL. *Stroke* 2007; **38**: 923–8.
  - 44 Fukutake T. Cerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CARASIL): from discovery to gene identification. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* 2011; **20**: 85–93.
  - 45 Nishimoto Y, Shibata M, Nihonmatsu M *et al.* A novel mutation in the HTRA1 gene causes CARASIL without alopecia. *Neurology* 2011; **76**: 1353–5.
  - 46 Yanagawa S, Ito N, Arima K, Ikeda S-I. Cerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy. *Neurology* 2002; **58**: 817–20.
  - 47 Debette S, Markus HS. The clinical importance of white matter hyperintensities on brain magnetic resonance imaging: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2010; **341**: c3666.
  - 48 Sonnen JA, Larson EB, Crane PK *et al.* Pathological correlates of dementia in a longitudinal, population-based sample of aging. *Ann. Neurol.* 2007; **62**: 406–13.
  - 49 Brown WR, Moody DM, Thore CR, Challa VR, Anstrom JA. Vascular dementia in leukoaraiosis may be a consequence of capillary loss not only in the lesions, but in normal-appearing white matter and cortex as well. *J. Neurol. Sci.* 2007; **257**: 62–6.
  - 50 Iadecola C. The overlap between neurodegenerative and vascular factors in the pathogenesis of dementia. *Acta Neuropathol.* 2010; **120**: 287–96.
  - 51 Itoh Y, Suzuki N. Control of brain capillary blood flow. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2012; **32**: 1167–76.
  - 52 Brooke BS, Bayes-Genis A, Li DY. New insights into elastin and vascular disease. *Trends Cardiovasc. Med.* 2003; **13**: 176–81.
  - 53 Wint DP, Butman JA, Masdeu JC *et al.* Intracranial arteries in individuals with the elastin gene hemideletion of williams syndrome. *Am. J. Neuroradiol.* 2014; **35**: 90–94.
  - 54 Faury G, Pezet M, Knutsen RH *et al.* Developmental adaptation of the mouse cardiovascular system to elastin haploinsufficiency. *J. Clin. Invest.* 2003; **112**: 1419–28.
  - 55 Li DY, Brooke B, Davis EC *et al.* Elastin is an essential determinant of arterial morphogenesis. *Nature* 1998; **393**: 276–80.
  - 56 Munot P, Saunders DE, Milewicz DM *et al.* A novel distinctive cerebrovascular phenotype is associated with heterozygous Arg179 ACTA2 mutations. *Brain* 2012; **135**: 2506–14.
  - 57 Engerman RL, Kern TS. Progression of incipient diabetic retinopathy during good glycemic control. *Diabetes* 1987; **36**: 808–12.
  - 58 Joutel A, Monet-Lepretre M, Gosele C *et al.* Cerebrovascular dysfunction and microcirculation rarefaction precede white matter lesions in a mouse genetic model of cerebral ischemic small vessel disease. *J. Clin. Invest.* 2010; **120**: 433–45.
  - 59 Dziejulska D, Lewandowska E. Pericytes as a new target for pathological processes in CADASIL. *Neuropathology* 2012; **32**: 515–21.
  - 60 Nicolas G, Pottier C, Maltête D *et al.* Mutation of the PDGFRB gene as a cause of idiopathic basal ganglia calcification. *Neurology* 2013; **80**: 181–7.
  - 61 Owens T, Bechmann I, Engelhardt B. Perivascular spaces and the two steps to neuroinflammation. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2008; **67**: 1113–21.
  - 62 Weller RO, Galea I, Carare RO, Minagar A. Pathophysiology of the lymphatic drainage of the central nervous system: implications for pathogenesis and therapy of multiple sclerosis. *Pathophysiology* 2010; **17**: 295–306.
  - 63 Thal DR, Capetillo-Zarate E, Larionov S, Staufenbiel M, Zurbrugg S, Beckmann N. Capillary cerebral amyloid angiopathy is associated with vessel occlusion and cerebral blood flow disturbances. *Neurobiol. Aging* 2009; **30**: 1936–48.
  - 64 Thal DR, Griffin WS, de Vos RA, Ghebremedhin E. Cerebral amyloid angiopathy and its relationship to Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 2008; **115**: 599–609.
  - 65 Kuo DS, Labelle-Dumais C, Gould DB. COL4A1 and COL4A2 mutations and disease: insights into pathogenic mechanisms and potential therapeutic targets. *Hum. Mol. Genet.* 2012; **21**: R97–110.
  - 66 Zarate YA, Hopkin RJ. Fabry's disease. *Lancet* 2008; **372**: 1427–35.
  - 67 Monet-Lepretre M, Haddad I, Baron-Menguy C *et al.* Abnormal recruitment of extracellular matrix proteins by excess Notch3ECD: a new pathomechanism in CADASIL. *Brain* 2013; **136**: 1830–45.
  - 68 Hara K, Shiga A, Fukutake T *et al.* Association of HTRA1 mutations and familial ischemic cerebral small-vessel disease. *N. Engl. J. Med.* 2009; **360**: 1729–39.
  - 69 Oide T, Nakayama H, Yanagawa S, Ito N, Ikeda S-I, Arima K. Extensive loss of arterial medial smooth muscle cells and mural extracellular matrix in cerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CARASIL). *Neuropathology* 2008; **28**: 132–42.
  - 70 Oka C, Tsujimoto R, Kajikawa M *et al.* Htra1 serine protease inhibits signaling mediated by TGF- $\beta$  family proteins. *Development* 2004; **131**: 1041–53.
  - 71 Shiga A, Nozaki H, Yokoseki A *et al.* Cerebral small-vessel disease protein HTRA1 controls the amount of TGF- $\beta$ 1 via cleavage of proTGF- $\beta$ 1. *Hum. Mol. Genet.* 2011; **20**: 1800–10.