

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- β 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見られ、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 *Prss11* 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、*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- 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 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- 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

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- 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- β 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- 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 *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- β 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- β 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

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 ヶ月の *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 ヶ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 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 $n = 1$)

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マウス脳組織におけるリン酸化 smad2/3 の検出

24 ヶ月齢の *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- β 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 をイムノプ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- β の定量

マウス脳脊髄液中、または血中の TGF- β 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- β 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- β 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- β 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、初めて効果を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- 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- β 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- 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を抑制した可能性を示唆している。

・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) 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。

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) 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- 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 *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- β

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- β

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- β 1 secreted from astrocytes impair mural cells in cerebral small arteries. 2014, 55th 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

