

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- β 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- β 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- β の過剰な産生と TGF- β 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- β 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- β 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- β 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 ヶ月齢の *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 ヶ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- β 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 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 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 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 $n = 1$)

(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- β 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- β 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

様式

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

様式