

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- 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・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- 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。本年度は、*Prss11* 欠損マウス脳における TGF- β シグナルをイムノプロットティ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- β 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- β 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- β の異常蓄積や TGF- β シグナルの増強が確認されており (Shiga A, et al. Hum Mol Genet 2011)、TGF- β 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- β 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プロットングによる 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- β の定量化も試みた。

B. 研究方法

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。

C. 研究結果

1) マウス脳組織のリン酸化 smad2/3

イムノプロットングにより 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。

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 のイムノプロットング、マウス脳脊髄液と血漿の TGF- β 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- β 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- β 分泌量

が増加する, 特定のストレス下においてのみ TGF- β 分泌量が増加する, *Prss11* 欠損マウスでは TGF- β 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- β 分泌量あるいは TGF- β 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- β 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, 齋藤洋兵, 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.

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