

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- β シグナルに注目した CARASIL の画期的治療方法の開発

平成 24 年度～26 年度 総合研究報告書

研究代表者 野崎 洋明

平成 27(2015)年 3 月

目 次

・ 総合研究報告	
TGF- β 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	
・ 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 6
・ 研究成果の刊行物・別刷	----- 7

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)))
総合研究報告書

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

Cerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CARASIL) は常染色体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 *HTRA1* (*high temperature requirement serine peptidase A1*) 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 AT1 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 AT1 受容体拮抗薬 candesartan の治療効果を検討した。その結果、16 ヶ月齢から 24 ヶ月齢まで 8 ヶ月間の内服投与により、同マウスにおける脳小血管病変の進行が有意に抑制されることが明らかになった。

研究分担者

佐藤 俊哉 新潟大学脳研究所・助教
(H26.11.1 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

成人期に進行性の白質病変に伴う脳症を発症する。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を見出しており(投稿準備中)、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。

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発症する、常染色体劣性遺伝性の脳小血管病である (Hara K et al. N Eng J Med 2009)。CARASIL 患者の脳小血管では強い壁細胞の変性がおこり、若年

CARASIL では、*HTRA1* 蛋白の機能低下によって生じる TGF- β の過剰分泌と 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と考えられている。そのため、TGF- β シグナルを抑制する作用を持つ薬剤

が治療薬になる可能性がある。すでに降圧薬として臨床応用されている AT1 受容体拮抗薬は TGF- β シグナルを抑制する作用があり、TGF- β シグナルの亢進によって引き起こされる Marfan 症候群に合併する大動脈瘤に奏功する (Habashi JP, et al. Science 2006)。本研究では、*HTRA1* オルソログである *Prss11* を欠損した CARASIL モデルマウスを用いて、脳内移行が良好で TGF- β シグナルの阻害作用を有する AT1 受容体拮抗薬 candesartan (Lanz TV, et al. J Clin Invest. 2010) の脳小血管における壁細胞変性に対する治療効果を検討した。本モデルマウスは 16 ヶ月齢以降に CARASIL 患者と同様の脳小血管の壁細胞変性をおこす、理想的な疾患モデル動物である。本研究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。

研究方法

Candesartan は TGF- β シグナルの抑制だけではなく、血圧降下作用も有している。そのため、candesartan の効果が TGF- β シグナルを介したものであるかどうかを検討するためには、TGF- β シグナルを抑制する作用を持たず、candesartan と同等の血圧低下作用を有する薬剤を投与した群を対照にする必要がある。そこで、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、candesartan 3.0 mg/kg/day, amlodipine 10.0 mg/kg/day をそれぞれ内服した群を用意した (15 – 17 mmHg の血圧降下作用)。さらに 24 ヶ月齢の野生型マウスと *Prss11* 欠損マウスの非内服群も用意した。これら 4 群のマウスに

ついて、脳小血管の壁細胞変性を表す定量的指標を使用して、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, およびリガンドである TGF- β の半定量的、あるいは定量的評価を行った。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, 1 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、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) 免疫組織化学染色によるリン酸化 smad2/3 の検出

Prss11 欠損マウス, 野生型マウス脳のパラフィン切片を用いて, リン酸化 smad2/3 の免疫組織染色を行った. それぞれのリン酸化 smad2/3 陽性細胞数を比較し, *Prss11* 欠損マウス脳内における TGF- β シグナルレベルの変動を検討した.

2) 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.

3) 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 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- 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

免疫組織化学染色、イムノプロットングのいずれの評価方法においても、*Prss11* 欠損マウ

ス、野生型マウス間の脳内リン酸化 smad2/3 レベルに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.

7) Konno T, Tada M, Tada M, Koyama A, Nozaki H, et al. Haploinsufficiency of CSF-1R and clinicopathologic characterization in patients with HDLS. Neurology 2014; 82:139-148.

8) 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.

9) 野崎洋明, 西澤正豊, 小野寺理 . 遺伝性脳小血管病研究の現況と展望 . 日本臨床 2013;71:545-554.

10) 野崎洋明 Consideration of the pathogenesis of CARASIL. 臨床神経学 2012;7:1360-1362.

11) 関根有美, 野崎洋明, 西澤正豊, 小野寺理 . 脳小血管病と遺伝性脳小血管病 . 循環器内科 2012;71:140-144.

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 .

3) 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.

4) 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

5) Taisuke Kato, Yumi Sekine, Atsushi Shiga, Megumi Nihonmatsu, Hiroaki Nozaki, Sachiko Hirokawa, Toshiya Sato, Yasuko Toyoshima, Minesuke Yokoyama, Shoji Tsuji, Masatoyo Nishizawa, Osamu Onodera. High-temperature requirement A serine peptidase 1, the causative gene for hereditary cerebral small vessel disease is expressed only in astrocyte. 2012, the 50th Society for Neuroscience Annual Meeting.

6) Taisuke Kato, Yumi Sekine, Hiroaki Nozaki, Sachiko Hirokawa, Toshiya Sato, Atsushi Shiga, Yasuko Toyoshima, Hitoshi Takahashi, Masatoyo Nishizawa, Osamu Onodera. Histopathological characterization of CARASIL responsible gene; HTRA1 deficient mouse. 2012年, 第2回新潟大学脳研究所共同研究拠点国際シンポジウム

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

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
Konno T, Tada M, Tada M, Koyama A, Nozaki H, Onodera O, et al.	Haploinsufficiency of CSF-1R and clinicopathologic characterization in patients with HDLS	Neurology	82	139-148	2014
関根有美, 野崎洋明, 西澤正豊, 小野寺理	COL4A1-related disorder	日本臨床	別冊	314-318	2013
野崎洋明, 西澤正豊, 小野寺理	遺伝性脳小血管病研究の現況と展望	日本臨床	71	545-554	2013
野崎洋明	Consideration of the pathogenesis of CARASIL	臨床神経学	7	1360-1362	2012