

機関番号：13101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21890079

研究課題名（和文） HTRA1 による TGF- β ファミリーシグナルの伝達抑制機構の解明研究課題名（英文） A novel mechanism for inhibition of TGF- β family signaling by HTRA1

研究代表者 野崎 洋明 (NOZAKI HIROAKI)

新潟大学医歯学総合病院・助教

研究者番号：20547567

研究成果の概要（和文）：セリンプロテアーゼの一種である HTRA1 は TGF- β ファミリーである TGF- β や BMP のシグナルを抑制するが、その機序は不明である。TGF- β や BMP は前駆体として産生され、トランスゴルジネットワークで furin による切断を受けて成熟型になる。本研究では、HTRA1 が小胞体内で前駆体を切断することによって、furin による切断を阻害する結果、成熟型の量が減少し、シグナルが減弱することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：HTRA1, a serine protease, decreases the signaling of TGF- β family members such as TGF- β and BMPs, but the mechanism remains unknown. TGF- β and BMPs are synthesized as a proprotein and cleaved into mature form by furin in the trans-Golgi network. This study elucidated that HTRA1 cleaves the proprotein in the endoplasmic reticulum, resulting in reduced mature form and decreased the signaling by interfering with furin-dependent cleavage of TGF- β family members.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 21 年度	1,050,000	315,000	1,365,000
平成 22 年度	950,000	285,000	1,235,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：神経内科学

キーワード：CARASIL, TGF- β , BMP-2, BMP-4, small vessel disease

1. 研究開始当初の背景

脳血管性認知症とは、脳血管障害に関連し

て出現した認知症を総称したものであり、本邦の認知症において頻度の高い疾患である。

脳血管性認知症は、小血管病変に由来する Small vessel disease (SVD) と大血管病変に由来する Large vessel disease に大別される。特に SVD に伴う大脳白質病変は、高齢者に高頻度で指摘され、病変の程度と認知機能の低下が相関することが報告されている (Longstreth WT et al. *Stroke* 1996)。このことから、脳血管性認知症の予防および治療のためには SVD の病態機序の解明が不可欠であるが、その詳細は明らかになっていない。

孤発性疾患の病態機序を解析する手法として、遺伝性疾患からのアプローチが有効であることが多い。遺伝性の SVD として、常染色体優性遺伝形式をとる Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL) や常染色体劣性遺伝形式をとる Cerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CARASIL) が知られている。いずれも 40 歳未満で認知症を発症し、SVD を来す。このうち CARASIL は血管内膜の著明な肥厚や血管平滑筋の減少を呈し、これらの病理変化が孤発性の SVD に類似しているため、その病態機序の解明が孤発性の SVD の病態機序の解明に寄与することが期待されていた疾患であった (Oide T et al. *Neuropathology* 2008)。本年、申請者らは CARASIL の原因遺伝子を世界に先駆けて単離し報告した (Hara K et al. *NEJM* 2009)。

単離した遺伝子 HTRA1 はセリンプロテアーゼの一種であり、HTRA1 がプロテアーゼ活性依存性に TGF- β ファミリーである TGF- β , BMP-2, BMP-4 のシグナルを抑制することが報告されていた (Oka C et al. *Development* 2004)。申請者らは、CARASIL 患者で見いだされたミスセンス変異型 HTRA1 では、セリンプロテアーゼ活性が低下しており、TGF- β ファ

ミリーのシグナルを抑制できないことを示した。また、CARASIL 患者の脳小血管で TGF- β シグナルの慢性的な亢進がおこっていることを示し、HTRA1 機能低下による TGF- β ファミリーシグナルの抑制不全が本症の病態機序であると結論した (Hara K et al. *NEJM* 2009)。

本症の治療を考えるにおいて、HTRA1 の TGF- β ファミリーシグナルの抑制機序を明らかにすることは重要である。もし細胞外にて効果を示すのであれば、HTRA1 の補充療法が現実的であり、一方細胞内で効果を示すのであれば、直接 TGF- β ファミリーシグナルを制御する必要がある。

2. 研究の目的

HTRA1 による TGF- β ファミリーシグナルの抑制機序を明確にする。

3. 研究の方法

(1) HTRA1 が TGF- β , BMP-2, BMP-4 の前駆体タンパクのプロセッシングに与える影響の検討

全長型ヒト HTRA1 cDNA, ヒト TGF- β 1 前駆体, BMP-2 前駆体, BMP-4 前駆体発現ベクターを作成する。作成したヒト HTRA1 発現ベクターと TGF- β , BMP-2, もしくは BMP-4 発現ベクターを HEK293T 細胞に共発現する。細胞からタンパク質を抽出し、抗前駆体抗体、抗成熟型抗体を用いた Western Blotting 法によって検出する。陰性コントロールとして、人工的なプロテアーゼ活性喪失変異型 HTRA1 である p. Ser328A1a を使用する。

(2) HTRA1 が TGF- β , BMP-2, BMP-4 と反応する細胞内の場の検討

ヒト HTRA1 発現ベクターと TGF- β 前駆体, BMP-2 前駆体, もしくは BMP-4 前駆体発現ベ

クターを HEK293T 細胞に共発現する。TGF- β ファミリー前駆体は通常 furin によりトランスゴルジネットワーク以降でプロセッシングを受ける。もし HTRA1 がこの正常なプロセッシングに影響するのであれば、furin によるプロセッシングより前に、その反応の場がある可能性がある。そこで小胞体-ゴルジ装置間の輸送阻害剤である Brefeldin や Monensin で処理し、HTRA1 による TGF- β ファミリー前駆体タンパクのプロセッシングが行われるかを検討する。

次に、HTRA1 および TGF- β ファミリー前駆体タンパクの細胞内局在を、生細胞で確認するために、C 末端に GFP を付けた HTRA1 と TGF- β 1 を作成して HEK293T 細胞に共発現し、共焦点レーザー顕微鏡で局在を観察する。

さらに、HTRA1 が TGF- β ファミリー前駆体タンパクを小胞体で切断することを確認するために、ヒト HTRA1 発現ベクターと TGF- β 前駆体、BMP-2 前駆体、もしくは BMP-4 前駆体発現ベクターを共発現した HEK293T 細胞を小胞体関連分解の阻害剤である MG-132 あるいは Epoxomicin で添加し、Western Blotting 法によって解析する。

(3) HTRA1 が TGF- β , BMP-2, BMP-4 の成熟型タンパクの分泌量に与える影響の検討

HTRA1 が TGF- β ファミリー前駆体を基質とすることが判明した場合は、それが成熟型に及ぼす影響を検討する。最も考えやすいのが Htra1 による切断により、成熟型 TGF- β ファミリータンパクの量が減少する機序であり、それを検討する。HEK293T 細胞に HTRA1 発現ベクターと TGF- β 前駆体、BMP-2 前駆体、もしくは BMP-4 前駆体発現ベクターを共発現し、細胞外に分泌される成熟型 TGF- β , BMP-2, もしくは BMP-4 を定量する。方法としては、Western blotting 法による半定量的な方法と、

ELISA 法による定量的な方法を用いる。

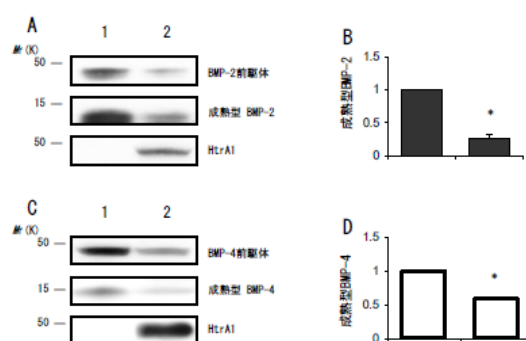
4. 研究成果

(1) 研究の主な結果

① HTRA1 が TGF- β ファミリーの前駆体タンパクのプロセッシングに与える影響の検討

野生型 HTRA1 の発現によって、TGF- β , BMP-2, BMP-4 それぞれの細胞内の前駆体と成熟型タンパクが減少した。

図 1 細胞内の BMP-2/4



(A) (B) 細胞内 BMP-2 のウェスタンブロット解析

(A) HEK293T 細胞に次の発現ベクターを導入した：Mock (1200ng) もしくは Htra1 WT (1200ng) のいずれかに加えて、BMP-2 前駆体 (50ng)。ベクター導入から 24 時間後に細胞を回収し、細胞溶解液をウェスタンブロットで解析した。上段は 45kDa の BMP-2 前駆体、中段は 12kDa の成熟型 BMP-2、下段は Htra1 の免疫ブロットを示す。(B) 成熟型 BMP-2 のウェスタンブロット解析の定量解析を示す。縦軸は D レーン 1 に対する arbitrary unit の比で表す。データは平均 ± 標準誤差 (n=3)。群間比較は、等分散を仮定しない t 検定にて行った *P < 0.01。

(C) (D) 細胞内 BMP-4 のウェスタンブロット解析

(C) HEK293T 細胞に次の発現ベクターを導入した：Mock (1400ng) もしくは Htra1

WT (1400ng) のいずれかに加えて、BMP-4前駆体 (40ng). ベクター導入から24時間後に細胞を回収し、細胞溶解液をウェスタンブロットで解析した. 上段は47kDaのBMP-4前駆体, 中段は14kDaの成熟型BMP-4, 下段はHtrA1の免疫ブロットを示す. (D)成熟型BMP-4のウェスタンブロット解析の定量解析を示す. 縦軸はFレーン1に対するarbitrary unitの比で表す. データは平均±標準誤差 (n=3). 群間比較は, 等分散を仮定しないt検定にて行った *P<0.01.

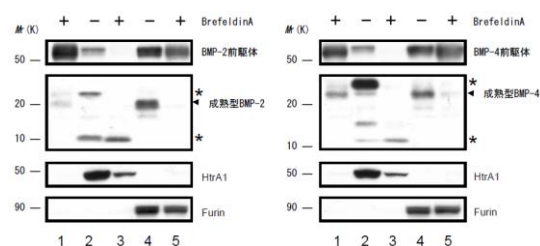
②HTRA1 が TGF-β ファミリーと反応する細胞内の場の検討

小胞体-ゴルジ装置間の輸送阻害剤で処理すると, Furin による TGF-β ファミリー前駆体の切断は阻害されたが, HTRA1 による TGF-β ファミリー前駆体の切断は阻害されなかった.

共焦点レーザー顕微鏡による観察では HTRA1 および TGF-β 1 は小胞体に局在していた.

小胞体関連分解の阻害剤処理によって, HTRA1 による TGF-β ファミリー前駆体の切断断片は増加した.

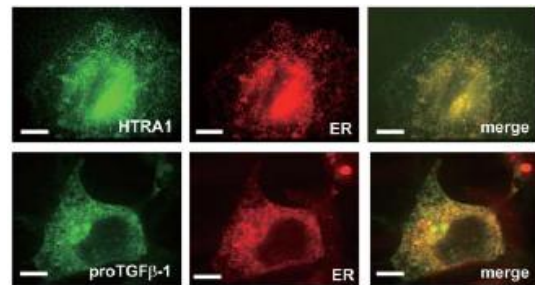
図 2 細胞内タンパク輸送阻害時の HtrA1 の BMP-2/4 前駆体への効果



HEK293T細胞に次の発現ベクターを導入した; BMP-2前駆体C末FLAG (50ng) もしくはBMP-4前駆体C末FLAG (40ng) に加え, レーン1: Mock (800ng), レーン2, 3: HtrA1 WT (800ng), レーン4, 5: furin (800ng). ベクタ

一導入から6時間後にBrefeldinAを培養液に添加し (2 μg/ml), 24時間後に回収した細胞溶解液を用いて, ウェスタンブロット解析を行った. 上段は, Aでは53kDaのBMP-2前駆体, Bでは55kDaのBMP-4前駆体, 下段はHtrA1と furinの免疫ブロットを示す. 中段では, Aでは20kDaの成熟型BMP-2 (矢頭)に加えて, 22kDaと10kDaの異常C末断片 (★) を認め, Bでは22kDaの成熟型BMP-4 (矢頭)に加えて, 24kDaと10kDaの異常C末断片 (★) を認める.

図 3 HTRA1 および TGF-β の細胞内局在

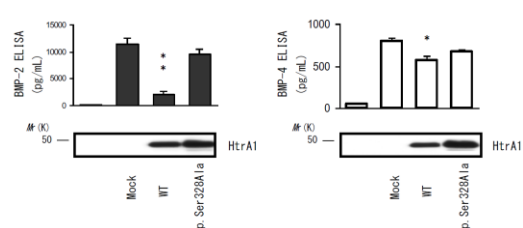


HEK293T細胞にEGFP-HtrA1 WT (2000ng)あるいはEGFP-TGF-β前駆体発現ベクターを導入. 24時間後にER-Trackerで30分処理し, 4% パラホルムアルデヒドで固定後, 共焦点レーザー顕微鏡で観察. 左 (GFP), 中央 (ER-Tracker), 右 (Merge) 画像を示す. スケールは5 μm.

③HTRA1 が TGF-β, BMP-2, BMP-4 の成熟型タンパクの分泌量に与える影響の検討

HTRA1 の発現によって, 細胞外に分泌される TGF-β 1, BMP-2, BMP-4 それぞれの成熟型タンパクは減少した.

図 4 HtrA1 発現量による分泌型 BMP-2/4 量の検討



HEK293T 細胞に次の発現ベクターを導入した： HtrA1 WT (0ng, 400ng, 800ng, 1200ng) に加えて, BMP-2 前駆体 (50ng) もしくは BMP-4 前駆体 (40ng). 導入ベクターの DNA 量が等しくなるように Mock (pcDNA-DEST40) で補正した. ベクター導入から 24 時間後に培養液中の BMP-2 もしくは BMP-4 を ELISA にて定量した. 縦軸の単位は pg/mL. データは平均±標準誤差 (n=3). 群間比較は, ANOVA の後, Bonferroni 法にて行った * P<0.01, ** P<0.001. 下段は HtrA1 の免疫プロットを示す.

(2) 研究の位置づけと今後の展望

TGF- β ファミリーである TGF- β や BMP は前駆体として産生され, トランスゴルジネットワークで furin によるプロセッシングを受けて成熟型になる. 分泌された成熟型蛋白は細胞表面の受容体に結合し, シグナルを伝達する. セリンプロテアーゼの一種である HTRA1 は TGF- β や BMP シグナルを抑制するが, その機序は不明である. 本研究では, HTRA1 が小胞体内で前駆体を切断し, furin による前駆体のプロセッシングを阻害する結果, 分泌される成熟型が減少することでシグナルが抑制されることを示している. この HTRA1 による TGF- β ファミリー前駆体の切断は, これまでに知られていなかった新たな TGF- β 制御機構であると考えられる.

本研究の結果から, HTRA1 は細胞外ではなく, 細胞内小器官である小胞体で TGF- β ファミリーシグナルを制御していることが明らかになった. このことから, CARASIL の治療を考えた場合, HTRA1 を補充するよりも, 直接 TGF- β ファミリーシグナルを制御する方法が望ましいと考えられる. 今後は, HTRA1 ノックアウトマウスにおいて, その表現型と TGF- β ファミリーシグナルの変化を解析し,

抗 TGF- β 抗体などを用いた治療効果の検討につなげていきたい.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Shiga A, Nozaki H, Onodera O et al. Cerebral small-vessel disease protein HTRA1 controls the amount of TGF- β 1 via cleavage of proTGF- β 1. Hum Mol Genetics 20(9):1800-1810, 2011

2. 野崎洋明: High Temperature Requirement Protein A1 による Bone Morphogenetic Protein-2/4 シグナル伝達の阻害機序 新潟医学会雑誌 1(124) :16-28, 2010

[学会発表] (計 2 件)

1. Nozaki H. HTRA1 controls BMP-2/4 signaling via cleavage of proBMP-2/4: implication for molecular pathogenesis of hereditary cerebral small vessel disease. 48th Annual Meeting Neuroscience 2010

2. Nihonmatsu M. The molecular mechanism of regulation of TGF- β 1 signaling by HTRA1: implication for pathogenesis of CARASIL (Hereditary cerebral small vessel disease) 第 32 回日本分子生物学会年会 2009

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野崎洋明 (NOZAKI HIROAKI)
新潟大学医歯学総合病院・助教
研究者番号: 20547567

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし