

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 12 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2010~2012

課題番号：22591595

研究課題名（和文） TGF β 1 シグナルによる脳小血管病変発症・脳腎連関の分子機構解明研究課題名（英文） Pathomechanism of cerebral small vessel induced by TGF β 1 signalling

研究代表者 水野 敏樹 (Mizuno Toshiki)

京都府立医科大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：30264782

研究成果の概要（和文）：

【目的】脳小血管病変は高血圧を背景に穿通枝においてヒアリン化を伴う細動脈硬化により引き起こされる。一方脳小血管病変に慢性腎臓病の合併頻度が高いことから脳腎連関が注目されている。遺伝性脳小血管病である CARASIL は HtrA serine peptidase 1 変異により TGF β 1 シグナル活性が亢進、血管内皮細胞の変性を生じることが明らかにされ、その脳小血管の病理像は高血圧性細動脈硬化に類似していることが報告された。一方 TGF β 1 と動脈硬化の関連については、TGF β 1 は高血圧の促進因子であるとされるが、動脈硬化に対しては抑制因子とする報告もあり、その役割にはまだ一定の結論が得られていない。そこで我々は片腎摘出と食塩負荷による高血圧モデルラットを用いて高血圧による腎および脳小血管病への TGF β 1 の関与を検討した。

【方法】片腎摘出1週後のラットに deoxycorticosterone (DOCA) と 1%食塩水を4週間投与した (DOCA-salt)。1週ごとに tail-cuff 法にて収縮期血圧 (SBP) を測定した。大腿動脈に挿入したカニューレから観血的に覚醒下平均動脈圧 (MAP) を測定後、腎臓、胸部大動脈、頸動脈、脳組織を摘出し、また脳組織からデキストラン法で脳小血管を分離し抽出し、各臓器・血管における TGF β 1 発現を ELISA 法、Western blotting 法にて検討した

【成績】DOCA-salt において経時的に SBP、MAP が有意に上昇した。DOCA-salt 群の3週目では4週目に対して腎臓 (0.06 ± 0.005 ng/mg vs. 0.16 ± 0.012 ng/mg)、胸部大動脈組織 (0.59 ± 0.07 ng/mg vs. 2.64 ± 0.45 ng/mg) において TGF β 1 量が増加していた。頸動脈と脳では3週目には (0.019 ± 0.004 ng/mg vs. 0.022 ± 0.003 ng/mg) と有意な変化は認められなかったが、4週目には 0.039 ± 0.011 ng/mg と有意に上昇したが、胸部大動脈と比較するとその増加は小さかった。【結論】高血圧モデルラットにおいて TGF β 1 は腎・大動脈で先行して発現が増加し、その後頸動脈・脳で増加を認める。

研究成果の概要（英文）：

<Objects>

CARASIL is caused by the mutation in the serine protease *HTRA1*, which regulates transforming growth factor- β (TGF- β 1) signaling. The pathological feature of CARASIL is arteriosclerosis with intimal thickening and dense collagen fibers, loss of vascular smooth-muscle cells, and hyaline degeneration of the tunica media in cerebral small arteries, which resembles nonhereditary cerebral small-vessel disease. While TGF- β 1 plays a key role in the maintenance of normal blood vessel wall structure, the contribution of TGF- β to the development of atherosclerosis is obscure. We examined TGF- β 1 in rat removing unilateral kidney and overloading deoxycorticosterone (DOCA) and salt to clarify a role of TGF- β 1 in the hypertensive brain and kidney.

<Method>

After unilateral kidney was removed, DOCA and 1% NaCl were administered to a rat for 3 or 4 weeks (DOCA-salt). Systolic blood pressure (SBP) and heart rates (HR) in the rat were measured once a week by tail cuff method. After measuring mean arterial blood pressure (MAP) and HR by a cannula from inguinal artery invasively, kidney, aorta, cerebral artery and brain were removed. TGF- β 1 in each organ was measured by ELISA and western blotting.

<Results>

SBP and MAP in the rat with DOCA-salt significantly increased during the course. TGF- β 1 increased from 0.06 ± 0.005 ng/mg to 0.16 ± 0.012 ng/mg in the kidney, from 0.59 ± 0.07 ng/mg to 2.64 ± 0.45 ng/mg in the aorta after 3 weeks. While TGF- β 1 did not change significantly from 0.019 ± 0.004 ng/mg to 0.022 ± 0.003 ng/mg after 3 weeks, but it increased significantly after 4 weeks in the cervical artery and the brain.

<Conclusion>

The increase of the TGF- β 1 in the kidney and the aorta precedes the increase of the TGF- β 1 in the cervical artery and the brain.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 22 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
平成 23 年度	600,000	180,000	780,000
平成 24 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：(1) TGF- β (2) 脳小血管病変 (3) 脳腎連関
(4) 高血圧モデルラット

1. 研究開始当初の背景

脳小血管病変は高血圧を背景に中大脳動脈・脳底動脈から分枝する穿通枝において、強いヒアリン化を伴う細動脈硬化により引き起こされる。一方脳小血管病変に CKD の合併頻度が高いことから脳腎連関が注目され、未知の脳腎関連分子の存在が推定されている。申請者らは遺伝性脳血管障害である **CADASIL/CARASIL** の診断・病態解析・治療法開発にこれまで取り組んできた。本邦に頻度が高く、常染色体劣性遺伝形式をとる **CARASIL** は 2009 年 *HtraA serine peptidase 1 (HTRA1)* のナンセンス変異またはミスセンス変異により TGF β 1 ファミリーのシグナル活性が亢進し、血管内皮細胞の変性を生じることが明らかにされた（TGF β には 1-3 のアイソフォームがあり、そのシグナル経路は共通しており HTRA1 により制御され、TGF β 1 過剰発現遺伝子改変マウス (Tg^{TGF β 1}mice) の表現型から臓器の線維化に参与していることが明らかになっている。原らは HTRA1 の変異により TGF β の下流にある SMAD の磷酸化、細胞外マトリックスの fibronectin や versican の発現亢進が生じていることを示した。彼らは HTRA1 活性低下により生じた TGF β シグナル亢進が **CARASIL** における血管病変の原因であると推定している。また **CARASIL** の剖検例において脳小血管に高血圧性細動脈硬化と同じく強いヒアリン化を生じていることから **CARASIL** が孤発性高血圧による脳小血管病変のモデルになりうることを提唱している。一方これまでの TGF β 1 と動脈硬化の関連についての研究では、レニンアンギオテンシン系により発現が亢進する TGF β 1 は高血圧の促進因子であるとされるが、動脈硬化に対しては抑制因子とする報告が多く、TGF β 1 の役割にはまだ一定の結論が得られていない。

2. 研究の目的

我々は①高血圧患者における TGF β シグナル亢進が脳小血管病変の原因である、②脳腎連関の未知の分子が TGF β であるという仮説を立て、本研究では①高血圧により脳と腎臓のどちらで TGF β シグナル亢進が先に生じているのか、②亢進した TGF β シグナルにより脳小血管病変を生じる機序を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

片腎摘出 1 週後のラットに deoxycorticosterone (DOCA) と 1% 食塩水を 4 週間投与した (DOCA-salt)。1 週ごとに tail-cuff 法にて収縮期血圧 (SBP) と心拍数 (HR) を測定した。飼育期間終了時に大腿動脈に挿入したカニューレから観血的に覚醒下平均動脈圧 (MAP) と HR を測定後、腎臓、胸部大動脈、頸動脈、脳組織を摘出し、各臓器における TGF- β 1 発現を ELISA 法、Western blotting 法にて検討した。

4. 研究成果

DOCA-salt において経時的に SBP、MAP が上昇し、3 週、4 週後は SBP200mmHg 以上の有意な上昇を認めた (0 週目 SBP vs. 3 週目 SBP; 111 ± 2.3 mmHg vs. 202 ± 2.5 mmHg; $p < 0.0001$)。

DOCA-salt では投与 2 週目より生存率が低下し始め、3 週では約 50%、4 週目では 25% 程度であった。死因の大半が脳出血であり、穿通枝動脈からの出血による第三脳室、側脳室への穿破が多く認められた。

ELISA 法による TGF β 1 値は DOCA-salt 群の 3 週目では腎臓 (0 週目 vs. 3 週目; 0.03 ± 0.02 ng/mg protein vs. 0.24 ± 0.06 ng/mg protein; $P < 0.0001$)、胸部大動脈組

織 (0 週目 vs. 3 週目; 0.31 ± 0.05 ng/mg protein vs. 0.81 ± 0.16 ng/mg protein: $P < 0.001$) と TGF- β 1 量が増加していた。頸動脈と脳 (0 週目 vs. 3 週目; 0.02 ± 0.004 ng/mg protein vs. 0.03 ± 0.01 ng/mg protein: $P = 0.55$) では 3 週目には有意な変化は認められなかった。DOCA-salt 群の 4 週目では頸動脈と脳組織(4 週目; 0.02 ± 0.002 ng/mg protein vs. 0.039 ± 0.022 ng/mg protein: $P = 0.55$) と TGF- β 1 発現が増大した。(表 1)同様の TGF- β 1 発現の増加は腎、大動脈, 頸動脈, 脳において western blotting 法でも確認した。(表 2)

脳血管 (>100microm を含む) では TGF- β 1 発現は 3 週目がピークで、脳微小血管 (<100microm) では 3 週目から有意な低下を認めた。

DOCA-salt の脳切片を HE 染色にて観察した所、大脳皮質に比べ白質周囲での障害が大きく、海馬における錐体神経細胞の脱落が顕著に認められた。また白質において血液脳関門を構築するアストロサイトからの突起は退縮し変形を認めた。

以上の結果より高血圧モデルラットにおいて TGF β 1 は腎・大動脈で先行して発現が増加し、頸動脈・脳でも増加を認めることを明らかにした。

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 (3) 件 うち査読付論文 計 (1) 件

- 1 中川正法, 水野敏樹. 認知症と血管性要因. 老年期認知症研究会誌 16: 80-82, 2010 (査読なし)
- 2 水野敏樹. 【心と身体健康 最近の話題】 認知症の早期発見と予防. 京都府立

医科大学雑誌 119(6): 425-435, 2010.
(査読なし)

- 3 Kuriyama N, Mizuno T, Ohshima Y, Yamada K, Ozaki E, Shigeta M, Mitani S, Kondo M, Matsumoto S, Takeda K, Nakagawa M, Watanabe Y. Intracranial deep white matter lesions (DWLs) are associated with chronic kidney disease (CKD) and cognitive impairment: A 5-year follow-up magnetic resonance imaging (MRI) study. Arch Gerontol Geriatr 56(1): 55-60, 2013.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.archger.2011.11.009> (査読あり)

【学会発表】 計 (2) 件うち招待講演 計 (0) 件

1. 栗山 長門^{1,2}, 水野 敏樹², 笠井 高士², 田邑 愛子², 渡邊 明子², 山田 恵³, 渡邊 能行², 中川 正法²

深部白質病変進行のリスク因子としての TGF- β 1 値の検討
第 35 回日本脳卒中学会総会 盛岡 2010.4.15-17

2. 高血圧モデルラットにおける TGF β 1 発現

水野敏樹 王 佳虹 鳥羽裕恵 中野亜里沙 東條千里 野田和揮 小原 幸 中川正法 中田徹男

第 52 神経病理学会総会学術研究会 京都 2011.6.2-4

6. 研究組織

(1) 研究代表者 水野 敏樹 (Mizuno Toshiki)

京都府立医科大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号: 30264782

(2) 研究分担者 中田 徹男 (Nakata Tetsuo)

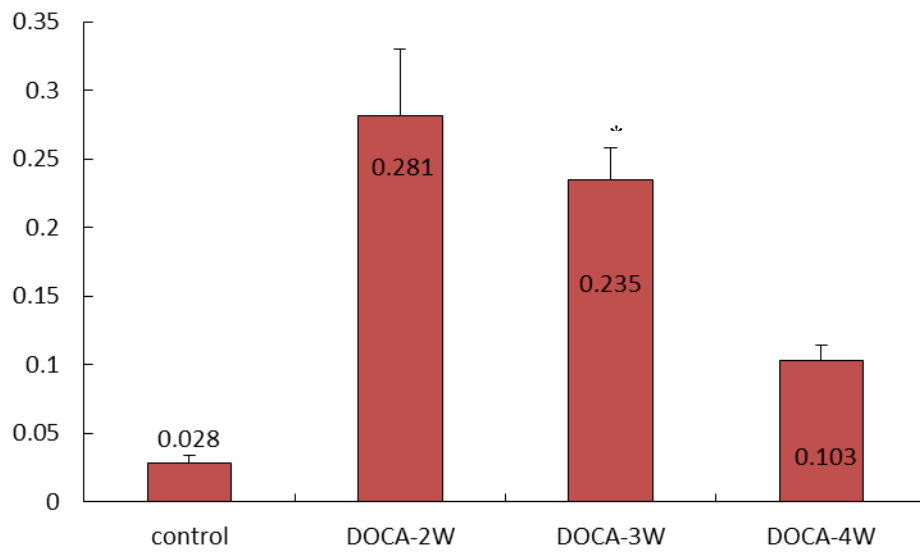
京都薬科大学・薬学部・教授

研究者番号: 30237292

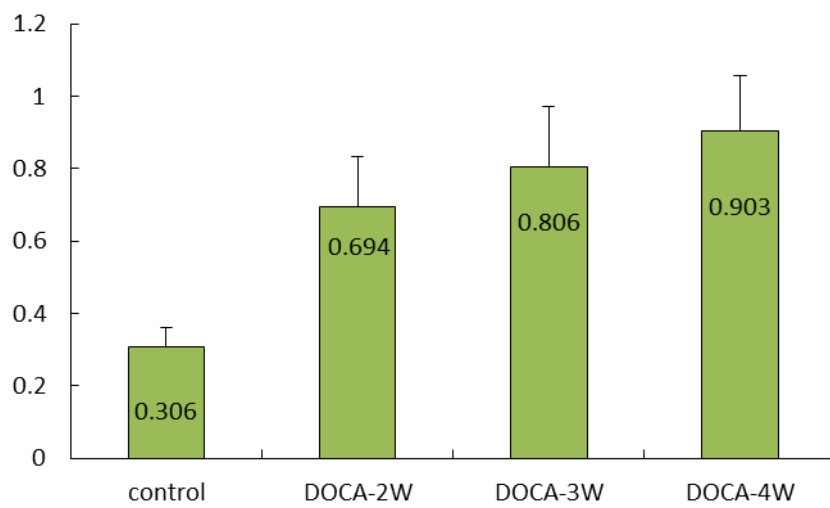
表 1 TGF- β 発現 (腎・胸部大動脈・脳) の経時的な変化 (ELISA 法による

測定 (単位: pg/ μ g protein)

腎臓



胸部大動脈



脳

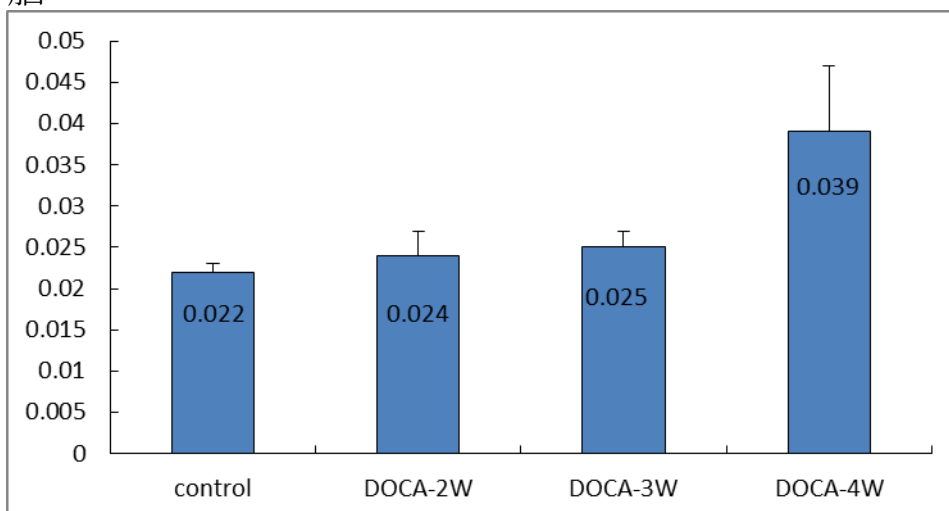
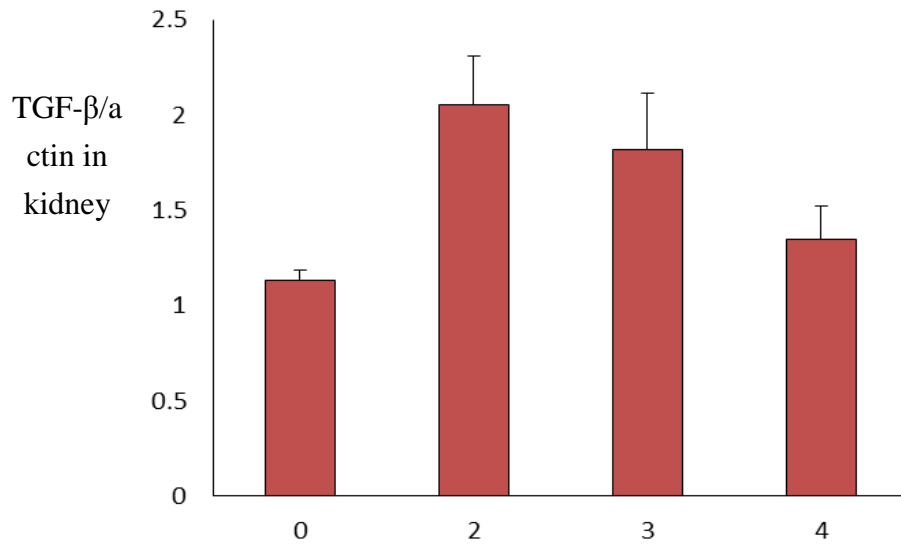
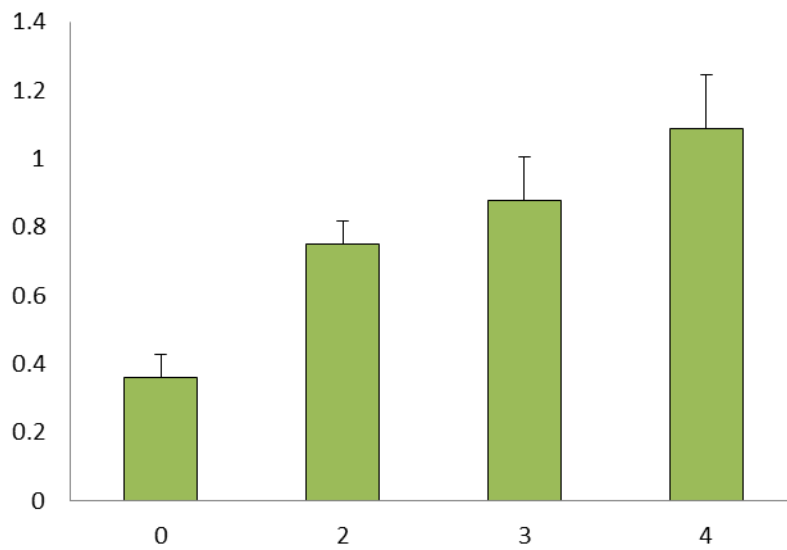


表2 TGF- β 発現（腎・胸部大動脈・脳）の経時的な変化（Western blot 法による測定（単位：pg/ μ g protein））

腎臓



胸部大動脈



脳

