

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成26年 2月10日現在

機関番号：13101
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2011 ~ 2012
課題番号：23790983
研究課題名（和文） 新規 HTRA1 点変異ヘテロ接合体における脳小血管病の病態機序の解明
研究課題名（英文） Molecular mechanism for a cerebral small vessel disease caused by heterozygosity for novel mutations in HTRA1 gene
研究代表者 野崎 洋明 (NOZAKI HIROAKI) 新潟大学・医歯学系・助教 研究者番号：20547567

## 研究成果の概要（和文）：

High temperature requirement serine peptidase A1 (HTRA1) 遺伝子変異のホモ接合体は、そのプロテアーゼ活性の低下によって、cerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy を引き起こす。我々は、70歳未満で発症した脳小血管病患者のうち、Notch-3の変異が否定された41例を対象として、HTRA1の塩基配列解析を行ったところ、4例(9.8%)で既報のないHTRA1遺伝子のミスセンス変異をヘテロ接合体で見出した。これまでの報告で、ほとんどタンパクを産生できないナンセンス変異型HTRA1であっても、そのヘテロ接合体は脳小血管病を発症しないことがわかっている。本研究では、ヘテロ接合体で発症する変異型HTRA1が、正常アレル由来の野生型HTRA1のプロテアーゼ活性を阻害することを明らかにした。

## 研究成果の概要（英文）：

Homozygous mutations in the high temperature requirement serine peptidase A1 (HTRA1) gene cause cerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CARASIL) by decrease of its protease activity. We analyzed HTRA1 ORF sequences in 41 patients with CARASIL-like syndrome ≤70 years of age carrying no notch3 mutations and found 4 patients (9.8%) carrying heterozygous novel mutations in the HTRA1 gene. Although two nonsense mutations in the HTRA1 gene, which result in null expression, have been reported in CARASIL patients, no one carrying the heterozygous nonsense mutation presented CARASIL-like syndrome. In this study, we elucidated inhibitory effect of novel mutated HTRA1s on protease activity of wild type HTRA1.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯学系

科研費の分科・細目：神経内科学

キーワード：HTRA1, CARASIL, cerebral small vessel disease, dominant negative

## 1. 研究開始当初の背景

脳小血管病は、主に脳の細動脈や毛細血管に異常をおこす病態の総称であり、高齢者に高率に合併する (Pantoni L. Lancet Neurol. 2010.)。高血圧、大酒などが危険因子になり、

ラクナ梗塞、脳内出血、大脳白質病変を併発して認知機能や運動機能を障害するため、寝たきりの主要な原因の一つになっている。この病態を適切に管理し、進行を予防することは、未曾有の高齢化社会を迎える本邦におい

て、重要な課題である。しかし、脳小血管の障害をおこす分子病態についての知見はほとんど得られておらず、降圧療法もその効果は限定的であり、真に有効な介入方法はみつかっていない。脳小血管病に対する有効な分子標的治療を開発するためには、その分子病態の詳細を明らかにする必要がある。

遺伝性疾患の病態研究は、孤発性疾患の病態解明に有用である。申請者らは、脳小血管病の病態解明と治療法の開発を目標として、遺伝性脳小血管病のなかでも常染色体劣性遺伝形式をとる cerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CARASIL) に注目して研究を行ってきた。CARASIL は高血圧、糖尿病、アルコール多飲といった脳小血管病の危険因子は伴わず、40歳までに認知機能障害を発症し、禿頭と腰痛を合併することを特徴とする。CARASIL 患者の脳小血管は線維性内膜肥厚、中膜平滑筋の消失、血管内腔の拡張をおこし、髄鞘の脱落による大脳白質病変とラクナ梗塞を呈する (Arima K et al. Neuropathology 2003)。これらの血管と脳実質の病理変化は、代表的な孤発性脳小血管病である Binswanger 型脳梗塞患者の病理所見と共通しており、CARASIL の分子病態を明らかにすることが孤発性脳小血管病の解明に寄与することと期待されている。

申請者らは、CARASIL がセリンプロテアーゼをコードする high temperature requirement serine peptidase A1 (HTRA1) 遺伝子の点変異によって発症することを、世界に先駆けて発見し、報告した (Hara K et al. N Engl J Med 2009)。申請者らは、これまでに CARASIL 患者で HTRA1 遺伝子のナンセンス変異 (p.Arg302X, p.Arg370X) とプロテアーゼドメイン内に位置するミスセンス変異 (p.Ala252Thr, p.Val297Met) をホモ接合体で見出している。さらに、ナンセンス変異型 HTRA1 ではナンセンス依存性 mRNA 分解機構により HTRA1 の発現量が著しく減少すること、ミスセンス変異型 HTRA1 ではプロテアーゼ活性が低下することを明らかにした。これらの結果は、HTRA1 のプロテアーゼ活性低下によって脳小血管病が引き起こされることを示している。

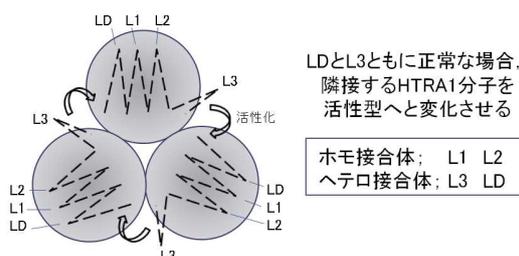
申請者は、脳小血管病における HTRA1 遺伝子変異の頻度を調査するため、70歳未満で広汎な大脳白質病変とラクナ梗塞を呈し、最も頻度の高い遺伝性脳小血管病である cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL) の原因となる Notch3 遺伝子の変

異が否定された 41 症例について、HTRA1 遺伝子の塩基配列解析を行ったところ、4例 (9.8%) にプロテアーゼドメイン内の新規 HTRA1 ミスセンス変異をヘテロ接合体で見出した (p.Gly283Glu, p.Pro285Leu, p.Arg302Gln, p.Thr319Ile)。同変異は認知機能が正常な高齢者 300 例には認めず、蛋白の機能を予測するソフトである PolyPhen2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>) による in silico 解析で病原性を有すると判定された。以上の結果から、ヘテロ接合体で認められた変異は病的意義を有すると考えた。これまでの報告で、ほとんどタンパクを産生できないナンセンス変異型 HTRA1 であっても、そのヘテロ接合体は脳小血管病を発症しないことがわかっている。このことから、HTRA1 変異のヘテロ接合体の発症機序を検討する場合、変異型 HTRA1 のプロテアーゼ活性低下以外の機序を検討する必要があった。

HTRA1 変異ヘテロ接合体の発症機序として、変異型 HTRA1 が dominant negative 効果を持つ可能性を考えた。HTRA1 のプロテアーゼドメインは 158-373 番目のアミノ酸残基で構成され、LD, L1, L2, L3 と呼称される 4 つのループを形成する (図 1)。HTRA1 は 3 ヶ所の stacking site (Tyr169, Phe171, Phe278) によって 3 量体を形成した後、基質が結合することによって活性化した L3 (301-314 アミノ酸残基) が隣接する HTRA1 の LD (285-289 アミノ酸残基) に作用する。その結果、隣接する HTRA1 のプロテアーゼドメインの構造変化がおこり、プロテアーゼ活性を獲得していく (Clausen T, et al. Nat Rev Mol Cell Biol. 2011)。既知のホモ接合体で発症する変異 (p.Ala252Thr, p.Val297Met) は L3 や LD から離れた部位に位置するのに対し、新たに見いだしたヘテロ接合体で発症する変異 (p.Gly283Glu, p.Cys285Leu, p.Arg302Gln, p.Thr319Ile) は L3 と LD、あるいはその近傍に位置していたため、新規変異が dominant negative 効果を持つことが予想された。本研究では、変異型 HTRA1 の dominant negative 効果に注目して、HTRA1 変異ヘテロ接合体の発症機序を明らかにすることを目的とした。

図 1

▶ HTRA1は3量体を形成し、L3が隣接するLDの構造変化をおこすことで、活性型へと変化させる



## 2. 研究の目的

変異型 HTRA1 のヘテロ接合体で発症する脳小血管病の病態機序を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### HTRA1 変異ヘテロ接合体の確認

新たに見いだした脳小血管病を呈する HTRA1 変異ヘテロ接合体患者において、対立アレルの発現の有無を検討した。すでに、エクソンの一部の欠失や、エクソンの点変異、エクソン-イントロン結合部位には異常がないことを確認していたが、プロモーター領域の変異、イントロンの挿入配列や、エクソン全部を含む欠失は確認できていなかった。このような変異の場合、多くは発現量の低下、もしくはフレームシフト変異を起こし、ナンセンス依存性 mRNA 分解機構により mRNA の発現が低下する。このことを用い、患者での対立アレルの発現を検討し、真にヘテロ変異であることを証明した。患者の末梢血より、PAX gene Blood RNA Kit にて mRNA を精製する。精製した mRNA を鋳型として、High capacity cDNA Reverse Transcription Kit を用いて cDNA を合成した。得られた cDNA をダイレクトシーケンス法で解析し、野生型 HTRA1 と変異型 HTRA1 の mRNA がそれぞれ発現していることを確認した。

### 変異型 HTRA1 のプロテアーゼ活性の解析

Free style 293 細胞に遺伝子導入を行い、C 末端に his tag と myc tag を付けた野生型と変異型 HTRA1 を発現した。HTRA1 は分泌タンパクであるため、遺伝子導入後に細胞培養液を回収し、his trap column を用いて HTRA1 を精製した。

FTC でラベルされた  $\beta$  カゼインを器質として HTRA1 蛋白と混合し、器質が切断された際に発生する蛍光値を測定した。プロテアーゼ活性を欠く人工変異 HTRA1 p. Ser328Ala を陰性コントロールとして使用し、疾患関連変異として、ホモ接合体で発症する変異型 HTRA1 (p. Ala252Thr, p. Val297Met) を用いた。

### 変異型 HTRA1 による dominant negative 効果の検討

同様の方法で、野生型 HTRA1 と変異型 HTRA1 を共発現させた細胞培養液を用いて HTRA1 蛋白の精製を行った。変異型と野生型を共発現したタンパクを、陰性コントロールの p. Ser328Ala と野生型を共発現したタンパクと比較して、プロテアーゼ活性の低下があるかどうかを検討した。

## 4. 研究成果

### HTRA1 変異ヘテロ接合体の確認

新たに見いだした HTRA1 変異ヘテロ接合体患者のうち、p. Gly283Glu, p. Arg302Gln を有

する患者の末梢血を用いて解析を行ったところ、正常アレル由来の mRNA は変異由来の mRNA と同程度に発現していた。

### 変異型 HTRA1 のプロテアーゼ活性の解析

変異型 HTRA1 は野生型に比して、プロテアーゼ活性が低下していた (WT;  $3.05 \pm 0.06 \times 10^4$ , p. Ala252Thr;  $2.39 \pm 0.03 \times 10^4$ , p. Arg274Gln;  $0.78 \pm 0.04 \times 10^4$ , p. Val297Met;  $1.40 \pm 0.06 \times 10^4$ , p. Gly283Glu;  $0.82 \pm 0.07 \times 10^4$ , p. Pro285Leu;  $0.71 \pm 0.04 \times 10^4$ , p. Arg302Gln;  $0.64 \pm 0.04 \times 10^4$ , p. Thr319Ile;  $0.63 \pm 0.04 \times 10^4$ , p. Ser328Ala;  $0.55 \pm 0.04 \times 10^4$ , \*\*\* $p < 0.001$ )。このうち、ヘテロ接合体で発症する変異では、陰性コントロールと同程度の顕著な低下を認めた。この結果は、変異型 HTRA1 がプロテアーゼ活性を喪失していることを示している。

### 変異型 HTRA1 による dominant negative 効果の検討

陰性コントロールの 328 変異と野生型を混合した蛋白に比して、ヘテロ接合体で発症する変異型 HTRA1 と野生型を混合した蛋白では、有意な低下を認めた (p. Gly283Glu/WT:  $10.0 \pm 0.4$ ,  $p < 0.001$ , p. Pro285Leu/WT:  $11.9 \pm 0.5$ ,  $p < 0.001$ , p. Arg302Gln/WT:  $15.2 \pm 0.4$ ,  $p < 0.001$ , p. Thr319Ile/WT:  $10.1 \pm 0.4$ ,  $p < 0.001$ , p. Ser328Ala/WT:  $21.2 \pm 0.6$ , p. Ser328Ala/Ser328Ala:  $4.5 \pm 0.2$ , 単位は  $\times 10^3$  AU)。この結果は、ヘテロ接合体で発症する変異型 HTRA1 が野生型 HTRA1 のプロテアーゼ活性に対して、dominant negative に作用することを示している。

## まとめ

脳小血管病の分子病態はいまだ不明である。これまでの報告で、HTRA1 遺伝子変異は常染色体劣性遺伝性の脳小血管病である CARASIL を引き起こすことがわかっている。さらに、本研究により、dominant negative 効果を持つ変異型 HTRA1 は、ヘテロ接合体であっても脳小血管病を引き起こすことが明らかになった。このことは、HTRA1 遺伝子変異に関連した脳小血管病患者が多数潜在することを意味しており、この知見は高齢者の寝たきりの主因である脳小血管病の病態および治療研究に寄与するところが大きい。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Nozaki H, Nishizawa M, Onodera O. Hereditary cerebral small-vessel disease. Nihon Rinsho. 71(3):545-554, 2013. 査読なし

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23631251>

- ② Nozaki H. Consideration of the pathogenesis of CARASIL. Rinsho Shinkeigaku. 52(11):1360-1362, 2012.  
査読なし  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23196618>

〔学会発表〕（計 2 件）

- ① 野崎洋明, 加藤泰介, 二本松萌, 齋藤洋兵, 小山哲秀, 志賀篤, 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. 第 54 回神経学会学術大会, 2013 年 5 月 31 日, 東京
- ② 野崎洋明, 二本松萌, 齋藤洋兵, 針生真弥, 水野敏樹, 水田依久子, 志賀篤, 小山哲秀, 加藤泰介, 野田智子, 垣内無一, 伊藤彰一, 西澤正豊, 小野寺理. HTRA1 ミスセンス変異はヘテロ接合体でも脳小血管病を引き起こす. 第 53 回神経学会学術大会, 2012 年 5 月 23 日, 東京

〔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・医歯学系・助教  
研究者番号：20547567

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし