

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22390174

研究課題名(和文)脳小血管障害の病態機序の解明：CARASILの病態機序からのアプローチ

研究課題名(英文)Molecular pathogenesis of cerebral small vessel disease.

研究代表者

小野寺 理 (Onodera, Osamu)

新潟大学・脳研究所・教授

研究者番号：20303167

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,500,000円、(間接経費) 4,350,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、本研究において、遺伝性の脳血管障害の原因遺伝子として我々が単離したらHtra1の欠損マウスを用い、本マウスにおいてサイトカインであるTGF- β シグナルの亢進の有無、微小循環系の形態変化、血液脳関門機能の変化、血液脳関門構成タンパク質に及ぼす影響を検討した。まず、その形態変化を免疫組織科学的に検討した。その結果、脳の小血管の平滑筋細胞層の変質を認め、結果として血管の収縮性の低下、内径の拡張を見いだした。本研究によりCARASILのモデルマウスの作成に成功し、また孤発性の脳小血管病に類似の病理像を得た。本モデルマウスの病態解明は孤発性の脳小血管病、さらに血管性認知症の解明にも寄与する。

研究成果の概要(英文)：Cerebral small-vessel disease is a common disorder in elderly populations; however, its molecular basis is not well understood. We recently demonstrated that mutations in the high-temperature requirement A (HTRA) serine peptidase 1 (HTRA1) gene cause a hereditary cerebral small-vessel disease, cerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CARASIL). HTRA1 belongs to the HTRA protein family, whose members have dual activities as chaperones and serine proteases and also repress transforming growth factor-beta (TGF-beta) family signaling. We investigated the molecular pathogenesis of CARASIL in HTRA1 null mouse. By immunohistochemical analysis we have found the alteration in cerebral small vessels in the model. This model mouse could be useful for the investigation of the pathogenesis of cerebral small vessel disease.

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 血液脳関門 脳小血管 HTRA1 平滑筋細胞 周皮細胞 血管性認知症

1. 研究開始当初の背景

近年、脳の白質を主体とする病態 (leukoaraiosis: LA) が高齢者を中心に高頻度で指摘され注目を集めている。LA は脳の小血管を病態の首座として、大脳白質に、虚血性変化と類似した病巣を示す。本症は、認知症、脳梗塞、出血性脳梗塞の発症に密接に関わっており、特に、血管性認知症への関与が注目されている。しかし、進行が穏やかで、かつ臨床症状が多彩で、また画像所見以外のマーカーに乏しいため、その実態が明らかではなく、治療方法も確立されていない。

LA は小血管を病態の首座とする。その病態機序として、大血管による脳血管障害と同様に、血管の閉塞機転が唱えられてきた。しかし、高血圧を除き、LA と大血管による脳血管障害では危険因子が異なる。また、大血管による脳血管障害に対し有効な予防的介入は、LA の予防に対しては無効である。さらに病理学的には小血管の閉塞性変化より、むしろ平滑筋細胞層の消失と内径の拡大が唱えられている。これらの事実は LA の病態機序が、血管の閉塞機転ではないことを示唆していた。近年、血管の閉塞機転に変わる病態機序として、脳の小血管の重要な機能である血液脳関門 (blood brain barrier: BBB) の異常が唱えられるようになった。

BBB は一層の血管内皮細胞による小血管を中心とし、その周囲を周皮細胞とアストロサイトが取り囲み形成される (neurovasculature unit: NVU)。この構造は、脳への選択的な物質輸送を可能とし、神経機能の維持に大きな役割を担っている。BBB は薬物動態面から研究が行われてきたが、疾患との関連については研究が進んでいない。申請者は BBB 機構と疾患との関係を検討する手がかりとして、遺伝性脳小血管病に注目した。非遺伝性の病態の解明に遺伝性疾患の病態解明が寄与してきたことは、枚挙にいとまがない。遺伝性脳小血管病の中で Cerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CARASIL) は、病理学的に孤発性 LA の脳小血管病理像と酷似しており、その病態機序の解明が孤発性 LA の解明にも繋がると期待されていた。申請者は本年 CARASIL の原因遺伝子 HtrA1 を単離し、セリンプロテアーゼである HtrA1 の機能低下により TGF- β ファミリーシグナルが亢進することが本症の病態機序であることを報告した (N Engl J Med. 2009;360:1729-39.) (図 1)。患者の脳小血管では、TGF- β の発現が亢進し、さらに TGF- β シグナルの下流であるフィブロネクチンやプロテオグリカンの一種であるパーシカンの蓄積を認めた (N Engl J Med. 2009;360:1729-39.)。本成果により、ヒトの脳小血管の病態機序を TGF- β ファミリーシ

グナルから検討することの妥当性が得られた。

脳の小血管に対する TGF- β ファミリーシグナルの影響としては、Stanford 大学の Coray らの先行研究がある (Nature. 1997; 389:603-6, Am J Pathol. 2000; 156:139-50.)。彼らは、アストロサイト特異的に TGF- β を強制発現させた遺伝子改変マウスを用い、脳の小血管にアミロイドと未特定蛋白の蓄積がおこることを示した。この変化は、一部のアルツハイマー型認知症で認められる脳の小血管の病理変化とも類似していた。彼らは、これらのことから、TGF- β シグナルの亢進がアルツハイマー病の病態機序に関与する可能性を推察した。以前より、一部のアルツハイマー型認知症で白質障害が高頻度で合併すること、一部の老人斑が小血管を中心として形成されること、老人斑にアルブミンなどの血清由来蛋白の混入があることより、アルツハイマー型認知症でも BBB の機能異常が推察されており、その背景として TGF- β シグナルの異常が推察された。

一方、TGF- β ファミリーシグナルと BBB 機能との関連について、既報を図 2 に模式図として示す。TGF- β ファミリーシグナルは受容体 ALK5 を介し伝えられる。しかし血管内皮細胞では、加えて ALK1 を介する。そのため血管内皮細胞は TGF- β シグナルによって、ALK5 刺激では BBB の透過性亢進に、ALK1 刺激では BBB の透過性の低下に働くことが推察されている。さらに山田らはアストロサイトで TGF- β ファミリーの一つである BMP の受容体 ALK3 を欠失させることにより、血液脳関門の透過性の亢進が引き起こされることを示し、TGF- β ファミリーシグナルが BBB の機能維持に重要であることを示している (Mol Cell Neurosci. 2008;38:417-30)。これらの事実は、TGF- β ファミリーシグナルの亢進と脳小血管、BBB の選択的透過性の制御機構に密接な関連があることを示している。

2. 研究の目的

本研究申請は、BBB の制御機構と病態との関連を、TGF- β ファミリーシグナルを中心としたサイトカインシグナルを切り口として明らかにしようとする物である。TGF- β ファミリー蛋白は、NVU において、周皮細胞やアストロサイトから分泌されると考える。しかし、細胞外環境刺激に応じてその分泌を制御する機構、血管内皮細胞、周皮細胞、アストロサイト間でのサイトカインシグナルのクロストークについては明確になっていない。本研究では、遺伝性脳小血管病である CARASIL の病態をモデルとして、この NVU でのサイトカイン分泌制御機構とその細胞間クロストークを明らかとし、TGF- β ファミリーシグナルと BBB 機能さらに LA の病態との関連を明らかにすることを目的とする。

研究期間内に具体的目標として、孤発性 LA 患者剖検脳での TGF- β ファミリーシグナル亢進の有無、CARASIL モデルマウスでの BBB 機能異常の有無、NVU 構成細胞における TGF- β ファミリーシグナル制御機構を明らかにする。

3. 研究の方法

申請者が保有している CARASIL モデルマウス (HtrA1 欠損マウス) を用い、本マウスにおいて TGF- β シグナルの亢進の有無、NVU の形態変化、BBB 機能の変化、BBB 構成タンパク質 (claudin, occludin 等) に及ぼす影響を検討した。手法としては、ウェスタンブロット法、定量 PCR 法、免疫組織化学法、電子顕微鏡を用いた TGF- β ファミリーシグナルの亢進に関しては、モデルマウス脳より抽出した mRNA をもちい、TGF- β ファミリーシグナル array を用い網羅的に解析した。解析は、全体での解析と、初代培養系を用い、アストロサイト、血管内皮細胞、周皮細胞にて検討した。脳における血液脳関門機能の測定法として、エヴァンスブルーを静注し、その脳内漏出率を測定した。さらに、本マウスにおいて TGF- β シグナルの亢進の有無、NVU の形態変化、BBB 機能の変化、BBB 構成タンパク質に及ぼす影響をウェスタンブロット法、定量 PCR 法、免疫組織化学法、電子顕微鏡にて検討した。

4. 研究成果

我々は、本研究において、遺伝性の脳血管障害の原因遺伝子として我々が単離したら HtrA1 の欠損マウスを用い、本マウスにおいてサイトカインである TGF- β シグナルの亢進の有無、微小循環系の形態変化、血液脳関門機能の変化、血液脳関門構成タンパク質に及ぼす影響を検討した。まず、その形態変化を免疫組織科学的に検討した。その結果、脳の小血管の平滑筋細胞層の変質を認め、結果として血管の収縮性の低下、内径の拡張を見いだした。本研究により CARASIL のモデルマウスの作成に成功し、また孤発性の脳小血管病に類似の病理像を得た。本モデルマウスの病態解明は孤発性の脳小血管病、さらに血管性認知症の解明にも寄与する。

脳は血液脳関門という特徴的な機構を持つ。血液脳関門は、脳への薬物輸送の面から注目されてきた領域である。しかし、その研究の難しさから、今まで、疾病との関連については十分に把握されていなかった。血液脳関門の破綻は主に脳の白質の障害を起こす。血液脳関門機能は、脳の小血管が担うが、私たちは、人で遺伝性に、脳の小血管を侵す遺伝性疾患 CARASIL の病態機序を明らかにし、炎症性サイトカインである TGF- β ファミリーシグナルの亢進がその背景にあることを示した。本研究では CARASIL の病態をモデルとして、TGF- β ファミリーシグナルの脳小血管、血液脳関門機能への役割を解明し、血液脳関

門機能と神経疾患との関連を明らかにすることである。CARASIL は脳の小血管の平滑筋細胞層の消失と内膜の肥厚を伴い、病理像は、孤発性脳小血管病と類似し、共通の病態機序があることが推察されていた。我々は、本研究において、遺伝性の脳血管障害の原因遺伝子として我々が単離したら HtrA1 の欠損マウスを用い、本マウスにおいてサイトカインである TGF- β シグナルの亢進の有無、微小循環系の形態変化、血液脳関門機能の変化、血液脳関門構成タンパク質に及ぼす影響を検討した。まず、その形態変化を免疫組織科学的に検討した。その結果、脳の小血管の平滑筋細胞層の変質を認め、結果として血管の収縮性の低下、内径の拡張を見いだした。本研究により CARASIL のモデルマウスの作成に成功し、また孤発性の脳小血管病に類似の病理像を得た。本モデルマウスの病態解明は孤発性の脳小血管病、さらに血管性認知症の解明にも寄与する。

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 10 件)

欧文 査読有り 邦文 査読無し

1. Nishimoto Y, Shibata M, Nihonmatsu M, Nozaki H, Shiga A, Shirata A, Yamane K, Kosakai A, Takahashi K, Nishizawa M, Onodera O, Suzuki N. A novel mutation in the HTRA1 gene causes CARASIL without alopecia. *Neurology*. 76(15) 2011 1353-5.
2. Nishimoto Y, Shibata M, Onodera O, Suzuki N. Neurological picture. Neuroaxonal integrity evaluated by MR spectroscopy in a case of CARASIL. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 82(8)2011 860-1
3. Shiga A, Nozaki H, Yokoseki A, Nihonmatsu M, Kawata H, Kato T, Koyama A, Arima K, Ikeda M, Katada S, Toyoshima Y, Takahashi H, Tanaka A, Nakano I, Ikeuchi T, Nishizawa M, Onodera O. Cerebral small-vessel disease protein HTRA1 controls the amount of TGF- β 1 via cleavage of proTGF- β 1. *Hum Mol Genet*. 20(9) 2011 1800-10
4. 加藤泰介, 西澤正豊, 小野寺理 認知症学 下-その解明と治療の最新知見- 臨床編 血管性認知症とその類縁疾患 CADASIL(皮質下梗塞および白質脳症を伴う常染色体優性脳動脈症)と CARASIL(皮質下梗塞と白質脳症を伴

う脳常染色体劣性動脈症) 日本臨床増刊 認知症学(下) 2011 320-324

5. 野崎洋明, 西澤正豊, 小野寺理 【認知症:診断と治療の進歩】トピックス 新規の認知症関連遺伝子の発見 TGF-ファミリーシグナルの異常と遺伝性脳小血管病 CARASIL の分子病態の解析から 日本内科学会雑誌 100 巻 8 号 2011 2207-2213
6. 小野寺理 脳小血管病とは何か 臨床神経学 51 巻 6 号 2011 399-405
7. 小野寺理 【血管性認知症のニューホライズン】 遺伝性脳小血管病の病態機序から脳小血管病を探る Dementia Japan 25 巻 1 号 2011 24-31
8. 今野卓哉, 小野寺理 臨床トピックス 遺伝性脳小血管病 医学のあゆみ 235 巻 6 号 2010 745-748
9. 野崎洋明, 志賀篤, 西澤正豊, 小野寺理 CARASIL の分子病態機序 神経内科 72 巻 4 号 2010 408-412
10. 志賀篤, 野崎洋明, 西澤正豊, 小野寺理 CARASIL の分子病態学 BRAIN and NERVE: 神経研究の進歩 62 巻 6 号 2010 595-599

〔学会発表〕(計 10 件)

1. 野崎洋明 MRI features of cerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy. AAN 65th Annual meeting. 2013 年 3 月 16-23 日 San diego.USA
2. 小野寺理 CARASIL の分子病態機序 第 31 回日本認知症学会学術集会 2012 年 10 月 26 日 つくば
3. 小野寺理 脳小血管病とは何か 第 134 回日本神経学会東海北陸地方会 2012 年 10 月 20 日 金沢
4. 野崎洋明 CARASIL の病態機序への考察 第 53 回日本神経学会学術大会 2012 年 5 月 25 日 東京
5. 小野寺理 Molecular pathogenesis of cerebral small vessel disease-lesson from CARASIL .Stroke 2012 ,Tokyo 2012 年 4 月 29 日
6. 小野寺理 TGF- ファミリーシグナルの異常と脳小血管病 第 52 回日本神経学会学術大会 2011 年 5 月 19 日 名古屋

7. 小野寺理 Novel molecular mechanism for hereditary cerebral small-vessel disease BMB2010 Dec 9, 2010 神戸
8. 二本松萌, 志賀篤, 野崎洋明, 西澤正豊, 小野寺理 TGF- 経路は遺伝性脳小血管病で特異的に活性化される (TGF- pathway is specifically activated in hereditary cerebral small-vessel disease) 日本生化学会大会・日本分子生物学会年会合同大会 83 回・33 回 12 月 7-10 日, 2010 神戸
9. H.NOZAKI, A.SHIGA, M.NIHONMATSU, A.KOYAMA, *O.ONODERA, M.NISHIZAWA; HTRA1 controls BMP2/4 signaling via cleavage of proBMP2/4: Implication for molecular pathogenesis of hereditary cerebral small vessel disease NEUROSCIENCE 2010 Nov 14, 2010 San Diego.USA
10. 小野寺理 遺伝性血管性認知症 第 29 回日本認知症学会 2010 年 11 月 5 日 名古屋

〔図書〕(計 2 件)

1. 野崎洋明, 西澤正豊, 小野寺理 中外医学社 Annual Review 神経 2011 巻 CARASIL の臨床・病理像と病態機序 2011 251-259
2. Onodera O, Nozaki H, Fukutake T. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, Stephens K, Adam MP, Seattle (WA): University of Washington, Seattle; CARASIL. GeneReviews™ 2010 Internet.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小野寺 理 (ONODERA Osamu)

新潟大学・脳研究所・教授

研究者番号：20303167

(2) 研究分担者

佐藤 俊哉 (SATO Toshiya)

新潟大学・脳研究所・助教

研究者番号：90359703

野崎 洋明 (NOZAKI Hiroaki)

新潟大学・医学部・助教

研究者番号：20547567

豊島 靖子 (TOYOSHIMA Yasuko)

新潟大学・脳研究所・准教授

研究者番号：20334675

(3) 連携研究者

()

研究者番号：