

令和元年6月25日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H02656

研究課題名(和文)脳小血管の動的機能に注目した脳血管性認知症克服への戦略

研究課題名(英文) Strategies for overcoming vascular dementia focusing on dynamic functions of cerebral small vessels.

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) 35,900,000円

研究成果の概要(和文)：認知症の克服は喫緊の課題であり、脳血管性認知症は主因の一つである。この病変として、脳の小血管が注目され脳小血管病と称される。この病態として、近年、神経活動依存性血流調節機構の障害が唱えられている。しかし、その分子病態は不明である。我々は遺伝性脳小血管病の原因遺伝子HTRA1を単離し、本症が組織増殖因子シグナルの亢進によることを明らかとした。さらに、非遺伝性の脳小血管病類似の平滑筋・周皮細胞の変性を伴うマウスにて脳小血管病の分子病態、特に、組織増殖因子シグナルによる小血管障害機構を明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

認知症の主因である脳血管性認知症の治療方法を見出すために、その機序を明らかとした点は大きい。また脳小血管病に関する研究領域を開拓し、今後の認知症治療研究への新たな方法を見出した。さらに小血管を保護するシーズを見出した。この成果により、現在、ヒトでの臨床応用を見据え、シーズの最適化を行うに至っている。

研究成果の概要(英文)：Overcoming dementia is an urgent task, and vascular dementia is one of the leading causes. Recently, a cerebral small vessel is noted and is called cerebral small vessel disease. Disorders of neural activity-dependent blood supply regulatory mechanisms have been advocated as the pathological condition. However, its molecular mechanism has not been well characterized. We isolated the causative gene for hereditary cerebral small vessel disease, HTRA1, and clarified that this disease is due to an increase in tissue growth factor signal. Furthermore, we defined the molecular pathogenesis of cerebral small vessel disease in mice with degeneration of smooth muscle and pericytes similar to sporadic cerebrovascular disease.

研究分野：神経内科学

キーワード：認知症 脳血管障害

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

認知症の克服は喫緊の課題である。認知症の主因として脳血管性認知症がある。脳血管は大血管と小血管に大別され、従来、脳血管性認知症は大血管の障害による末梢の循環不全という観点で論じられてきた。しかし、遺伝性の脳小血管病の解明によって、脳の小血管には大血管とは異なる病態があることが示され、脳小血管病と称されるようになった。小血管は、大血管とは組織学的に異なり、また特徴的な機能を持つ。しかし、その分子病態は解明されていない。一方、脳小血管病は、近年では、アルツハイマー病とも病態面で深く関わるとされている (Gorelick et al. *Stroke* 2011;42:2672-2713)。アルツハイマー病の抜本的な治療方法が見出せない現在、脳小血管保護からの認知症へのアプローチは、脳血管性認知症だけでなくアルツハイマー病の新たな治療戦略として期待される。

脳小血管病による認知症の克服には、脳小血管の特殊性と病態を理解する必要がある。従来、本症は、皮質の梗塞では同領域の機能喪失、白質の梗塞では皮質間の連絡障害というように、小血管閉塞による梗塞巣の機能障害として理解されてきた。しかし、脳小血管そのものの機能障害という観点を取り残されていた。脳小血管の機能としては血液脳関門に焦点が当てられてきた。しかし、近年、リンパ系としての役割や神経活動依存性の血流調節機構等、新たな機能が注目されている。特に後者は、神経活動に応じた効率よい血流の再分布を可能とし、膨大なエネルギーを必要とする脳活動を維持している。この機能の障害は、従来の記憶の量の評価のような静的な方法では計れず、むしろ、様々な脳活動をどれだけ迅速に遂行、切り替えるか、という動的な機能を評価する必要がある。この点で、脳血管性認知症は、新たな概念の創出を要求されている。神経活動依存性の血流を調節する細胞については、毛細血管レベルの周皮細胞 (Carherine et al. *Nature* 2014;508:55-60)、もしくは細動脈から毛細血管分岐部に位置する平滑筋細胞 (Robert A et al. *Neuron* 2015;87:95-110) が提唱されている。実際、脳小血管病理では、最終像として硝子化、動脈硬化性変化を認めるが、早期変化としては、内膜の肥厚、平滑筋細胞の変性、内弾性板の異常、これらが eaten-pipe (一様ではない変性像) 様になっていることが特徴である (Okeda et al. *Neuropathology* 2004;24: 21-29)。この事から早期から血流調節機構の障害が疑われる。

脳小血管病を理解し、その分子病態を解明するためには、脳小血管病の血管病理像を反映したモデル動物を用い神経活動依存性の血流調節を検討する必要がある。しかし、今までの脳小血管病のモデル動物は、主として大血管の狭窄モデルであり、小血管の血管病理を反映していなかった。我々は 2009 年、単一遺伝子異常による脳小血管病 Cerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CARASIL) の原因遺伝子として high temperature requirement A serine peptidase 1 (HTRA1) を同定した (Hara, Onodera et al. *N Engl J Med.* 2009;360:1729-39.)。さらに、本年、我々や Verdura らのグループは HTRA1 遺伝子変異の一部が優性遺伝性に脳小血管病を引き起こし、その頻度は若年性孤発性脳小血管病患者の 5-10% に至ることを明らかとした (Nozaki, Onodera et al. *ICVD2015*, Verdura et al. *Brain* 2015;138:2347-58)。この事実は、HTRA1 関連脳小血管病の裾野が広い可能性を示唆する。本疾患の分子病態として、我々は transforming growth factor (TGF)- $\beta$  シグナルが亢進していることを示してきた (Hara, Onodera et al. *N Engl J Med.* 2009;360:1729-39., Shiga, Onodera et al. *Hum Mol Genet* 2011;1800-1810., Nozaki, Onodera et al. *Stroke* 2014;45:3447-3453.)。TGF- $\beta$  シグナルの亢進は、従来から高血圧性や糖尿病性の血管病変でもその関与が疑われてきたシグナルである。また、CARASIL は、内膜の肥厚、中膜の変性像という孤発性の脳小血管病に類似した血管病理像を示す。そこで、脳小血管病の小血管病変を示す動物モデルとして、CARASIL の原因遺伝子である HTRA1 の遺伝子欠損マウスの解析により、脳小血管病について次の 2 点、脳小血管病の分子病態機序と、脳小血管病における活動依存性血流調節機構の異常を明らかに出来ると着想した。また HTRA1 欠損による分子病態として、我々を初めとするグループは TGF- $\beta$  シグナルが亢進するとしてきた。しかし Dichgans らのグループは TGF- $\beta$  シグナルが抑制されると報告した (Beaufort et al. *PNAS* 2014;111:16496-501)。この議論にも決着を付けたいと考えた。

### 2. 研究の目的

次の仮説を検証する。“内皮細胞から分泌される物質が内膜に蓄積し、その過剰な細胞外基質に TGF- $\beta$  が過剰に蓄積する。この結果、炎症などの刺激により放出される TGF- $\beta$  が過剰となり、平滑筋の変化、具体的には収縮関連タンパクの減少による収縮性の低下、変性を引き起こし、神経活動依存性の脳血流調節を障害し、高次脳機能障害に繋がる”。

具体的には小血管病変病理の分子病態機序の解明、小血管病変への TGF- $\beta$  シグナルの寄与の立証、モデルマウスでの小血管の立体的、動的機能の解析の 3 点について明らかとする。小血管病変病理の分子病態機序の解明については、小血管病理の経時変化、内膜への TGF- $\beta$  の蓄積、中膜変性の背景にある収縮関連蛋白の変化、周皮細胞の異常、内弾性板異常のメカニズム、ヒト孤発性脳血管病脳での類似変化の有無について検討する。血管病変への TGF- $\beta$  シグナルの寄与の立証については、TGF- $\beta$  過剰発現マウスの小血管病変の検討、TGF- $\beta$  の遊離の証明と小血

管中膜構造への影響, TGF- $\beta$  シグナルの抑制による脳小血管病変への治療効果の検討, 小血管構成細胞での TGF- $\beta$  ファミリーシグナル受容体の質的・量的多様性の解析を行う. 小血管の立体・動的機能の解析では, 神経活動依存性血流調節力を検討し, 脳全体の小血管病変の全体像を透明化技術により明らかとする.

本モデルマウスの血管病変の分子病態を組織学, 生化学的に検討し, 次にその増悪, 改善因子を TGF- $\beta$  シグナルとの関連で検討する. それにより “内皮細胞から分泌される fibronectin が内膜に蓄積され, その過剰な細胞外基質に LTBP と TGF- $\beta$  が過剰に蓄積する. この結果, 炎症などの刺激により, 一時的に過剰な TGF- $\beta$  が放出され, 平滑筋の変化, 具体的には収縮関連タンパクの減少による収縮性の低下を引き起こす. これにより, 神経活動依存性の脳血流調節が障害される” という仮説を証明する.

### 3. 研究の方法

研究計画の内容は, 小血管病変病理の分子病態機序の解明, 小血管病変への TGF- $\beta$  シグナルの寄与の立証について遂行する. 定量的解析の方法としては, 各細胞レベルでの挙動をみるため, 蛋白質は免疫蛍光染色, 免疫電子顕微鏡を用い, 定量的解析には画像解析ソフト Imaris を使用する. mRNA の解析には, 定量 PCR 法に加えて, 近年開発された定量的 in situ hybridization 法, Laser micro-dissection 法, droplet digital PCR 法を用いる.

#### 1. 小血管病変病理の分子病態機序の解明

- (ア) 小血管病理変化の経時的検討. 内膜の肥厚に関しては fibronectin と LTBP, 中膜は  $\alpha$  smooth muscle actin, 内弾性板は elastin について解析する.
- (イ) 内膜肥厚部への TGF- $\beta$  の蓄積の検討. TGF- $\beta$  および他の TGF- $\beta$  ファミリーシグナル関連蛋白の蓄積を検討する.
- (ウ) 中膜変性の分子病態の解明. 質量分析法, 網羅的な mRNA 解析, 定量 PCR 法により検討する.
- (エ) 周皮細胞異常の検討. 周皮細胞と内皮細胞の関連を定量的に解析する.
- (オ) 内弾性板異常のメカニズムの解明. 脳小血管病では内弾性板の異常が指摘されている. しかし, 何故, 内弾性板に異常が起こるか, その機序は不明であった. 内弾性板は elastin の線維形成について免疫組織化学的に解析を加える.
- (カ) ヒト孤発性脳血管病での LTBP 蓄積の検討. 孤発性の脳小血管病脳にて同様に免疫組織化学法にて検証する.

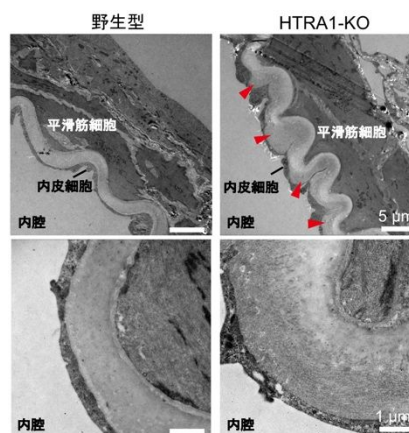
#### 2. 小血管病変への TGF- シグナルの寄与の立証

- (ア) TGF- 過剰発現マウスを用いた検討. アストロサイトから活性化 TGF- を分泌するマウス (Wyss-Coray et al., Am J Path, 2010;156(1), 139-150) で同様の変化が得られると推定し, このマウスをさらに解析し, 中膜の変性の背景にある収縮性蛋白質の変化, 周皮細胞と内皮細胞との接合の減弱の有無 (周皮細胞の毛細血管被覆率) を検討する.
- (イ) TGF- シグナルの抑制による脳小血管病変への治療効果の検討. モデルマウスの病態に TGF- シグナルが関与していることをさらに立証するために, 抑制効果を持つ薬剤の効果を検討する.
- (ウ) 小血管構成細胞での TGF- ファミリーシグナル受容体の解析. TGF- ファミリーシグナルは複数の受容体をもち, その複合体, 量的多様性によりシグナルに影響を与えている. しかし, 脳小血管構造の構成細胞において, これらの受容体がどのようになっているのか, 未だ検討されていない. 正常状態, および病的な状態で, TGF- ファミリーシグナル受容体の量比に変化がないか検討する.

### 4. 研究成果

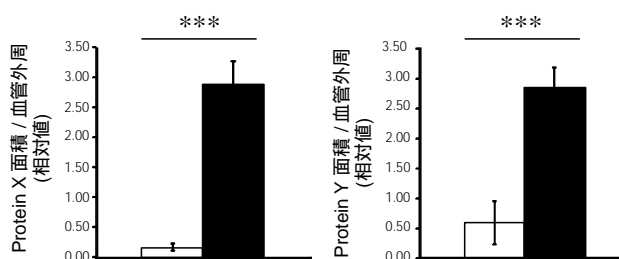
電子顕微鏡を用いて脳底部のくも膜下血管の微細構造を観察した. 野生型マウスでは, 血管内皮細胞と平滑筋細胞との間に, やや電子密度の低い部位として, ほぼ均一に, 弾性板が帯状に観察された. 一方, HTRA1-KO マウスでは, 同領域が肥厚し, 管腔側に電子密度の高い帯状の層を全周性に認めた. この電子密度の高い部分と低い部分との境界は不明瞭であった. 同部の厚さは, 野生型の弾性板と比較し, 肥厚していた (右図).

次に, くも膜下血管弾性板の肥厚部の蓄積蛋白を同定する目的で, LCM 法により, くも膜下血管を切り出し, 質量分析法による解析を行なった. その結果, HTRA1-KO マウス脳血管のみで同定された分子もしく

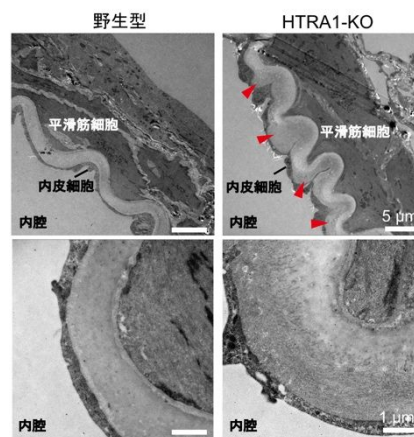


は、KO マウスで野生型と比較して 2 倍以上に上昇している分子を 18 種類同定した。

次に同定した蛋白質の内、2 種 (Protein X, Protein Y) について免疫組織化学法にて検討した。HTRA1-KO マウスでは、全周性にこれらの蓄積を認めた。一方、野生型マウスではこれらの蓄積は、ほとんど見られなかった。この蓄積の程度を定量的に解析し KO マウスでは野生型と比較して、増加していた (右図)。



次に、CARASIL 患者脳血管でのこれらの蛋白質の蓄積の有無に関して検討を加えた。CARASIL 2 症例とコントロール 2 症例の剖検脳パラフィン切片にて行った。免疫組織染色解析の結果、CARASIL では 2 症例共に、脳表のくも膜下動脈の血管内膜下に、Protein X, Protein Y の陽性所見を認めた。一方で、control 症例では、このような染色性を認めなかった。これらと血管内皮細胞との 2 重染色を行った。血管内皮細胞のマーカーとして、lectin を用いた。その結果、Protein X は内皮細胞の反管腔側に隣接していた。さらに、Protein X, Protein Y の 2 重染色を行った。その結果、Protein X, Protein Y の局在の一致を認めた。さらに、戻し電子顕微鏡観察法にて Protein X の蓄積部位を検討した。その結果、Protein X は電子密度の濃い、肥厚部の管腔側に存在した (右図)。



血管病変の分子病態機序を明確とするために、TGF- $\beta$  の阻害剤の投与による、血管病変の変化を検討し、一部の阻害剤が脳小血管病変に対し保護的に働くことを見出した。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

- 1 Ito J, Nozaki H, Toyoshima Y, Abe T, Sato A, Hashidate H, Igarashi S, Onodera O, Takahashi H, Kakita A. Histopathologic features of an autopsied patient with cerebral small vessel disease and a heterozygous HTRA1 mutation. *Neuropathology*. 2018 May 25. doi: 10.1111/neup.12473.
- 2 Preethish-Kumar V, Nozaki H, Tiwari S, Vengalil S, Bhat M, Prasad C, Onodera O, Uemura M, Doniparthi S, Saini J, Nashi S, Polavarapu K, Nalini A. CARASIL families from India with 3 novel null mutations in the HTRA1 gene. *Neurology*. 2017 Dec 5;89(23):2392-2394. doi: 10.1212/WNL.0000000000004710.
- 3 Ibrahim M, Nozaki H, Lee A, Onodera O, Reichwein R, Wicklund M, El-Ghanem M. A CARASIL Patient from Americas with Novel Mutation and Atypical Features: Case Presentation and Literature Review. *Cerebrovasc Dis*. 2017;44(3-4):135-140. doi: 10.1159/000477358. Epub 2017 Jun 21.
- 4 Nozaki H, Kato T, Nihonmatsu M, Saito Y, Mizuta I, Noda T, Koike R, Miyazaki K, Kaito M, Ito S, Makino M, Koyama A, Shiga A, Uemura M, Sekine Y, Murakami A, Moritani S, Hara K, Yokoseki A, Kuwano R, Endo N, Momotsu T, Yoshida M, Nishizawa M, Mizuno T, Onodera O. Distinct molecular mechanisms of HTRA1 mutants in manifesting heterozygotes with CARASIL. *Neurology*. 2016 May 24;86(21):1964-74. doi: 10.1212/WNL.0000000000002694.

〔学会発表〕(計 24 件)

1. 小野寺理 HTRA1 活性低下による脳小血管病 *Stroke* 2019(招待講演) 2019 年
2. 小野寺理 脳小血管病の分子病態:CARASIL からのアプローチ 第 36 回日本認知症学会学術集会(招待講演) 2017 年
3. Hiroaki Nozaki, Taisuke Kato, Megumi Nihonmatsu, Yohei Saito, Osamu Onodera, et al. Distinct Molecular Mechanisms of Htra1 Mutants in Manifesting Heterozygotes With Carasil. International stroke conference 2017(国際学会)

〔図書〕(計 1 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ <https://www.neurology-bri.jp/study/carasil/>

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：豊島 靖子

ローマ字氏名：Toyoshima Yasuko

所属研究機関名：新潟大学

部局名：脳研究所

職名：准教授

研究者番号（8桁）：20334675

研究分担者氏名：野崎 洋明

ローマ字氏名：Nozaki Hiroaki

所属研究機関名：新潟大学

部局名：医歯学系

職名：助教

研究者番号（8桁）：20547567

研究分担者氏名：加藤 泰介

ローマ字氏名：Kato Taisuke

所属研究機関名：新潟大学

部局名：脳研究所

職名：特別研究員

研究者番号（8桁）：30598496

研究分担者氏名：小山 哲秀

ローマ字氏名：Koyama Akihide

所属研究機関名：新潟大学

部局名：医歯学系

職名：助教

研究者番号（8桁）：90622209

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。