

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293200

研究課題名(和文) 脳小血管病の解明と治療方法の確立：CARASILの病態機序からのアプローチ

研究課題名(英文) Approach to cerebral small vessel disease: lesson from CARASIL.

## 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) 14,400,000円

研究成果の概要(和文)：近年、脳の小血管を主体とする疾患が脳小血管病として注目を集めている。本症は高齢者に高頻度で認められ、血管性認知症、さらに変性疾患にも寄与すると考えられてきている。私たちは、人で遺伝性に、脳の小血管を侵す疾病CARASILの病態機序を明らかにし本症ではHTRA1の酵素活性が低下し、TGF- $\beta$ ファミリーシグナルの亢進により引き起こされることを示してきた。本研究ではHTRA1の遺伝子欠損マウスの小血管にて壁細胞の変性と内膜の肥厚を示し、その生化学的特徴を明らかとした。

研究成果の概要(英文)：Cerebral small-vessel disease (CSVD) is a neurological disorder involving white matter lesions. CSVD is frequently observed in an elderly population and causes cognitive impairment and motor dysfunction. However little is known about a molecular pathogenesis for CSVD. Cerebral autosomal-recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CARASIL), an autosomal-recessive inherited cerebral small vessel disease (CSVD), involves severe leukoaraiosis, multiple lacunar infarcts, early-onset alopecia, and spondylosis deformans without hypertension. High-temperature requirement serine peptidase A1 (HTRA1) gene mutations cause CARASIL by decreasing HTRA1 protease activity. We have investigated the HTRA1 deficit mouse. We found that these mice showed mural cell and internal elastic membrane degeneration. We found fibronectin and protein X accumulates at the internal membrane. The pathological findings of the mouse resemble those of CARASIL as well as sporadic CSVD.

研究分野：神経内科学

キーワード：脳血管

### 1. 研究開始当初の背景

近年脳の小血管を病変の首座とする疾患群が脳小血管病として注目を集めている。この背景には、高齢化と MRI の普及により、脳小血管病が高頻度で指摘されるようになったこと、さらに、脳小血管病変は神経変性に深く関わっていることが明らかとなってきたことがある。脳小血管病は、認知症、脳梗塞、出血性脳梗塞の発症にも密接に関わっている。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。

病態機序については、従来大血管由来の Stroke と同様の閉塞機転が唱えられてきた。しかし、小血管病の危険因子は大血管病と異なること、シロスタゾールを除いて、通常の抗血小板治療による効果が立証されていないこと、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と、等より血管閉塞機転に変わる機序が想定されてきた。その機序として脳の小血管の機能障害が想定されている。脳小血管の機能の一つは血液脳関門である。血液脳関門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。もう一つは、近年特にアミロイドアンギオパチーや Alzheimer 病との関連で注目を集めている老廃物のドレナージ機構である。小血管は脳内の老廃物を排出する役割を担っているとするものである。これらの機能につき、我々が開発した脳小血管病モデルマウスについて検討を加え、平滑筋細胞、周皮細胞の障害が、脳小血管機能にどのような影響を与えるかを明らかとする。

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。申請者は脳小血管病の病態機序を解明する手がかりとして、遺伝性脳小血管病に注目した。遺伝性脳小血管病の中で Cerebral

autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CARASIL) は、病理学的に孤発性の脳小血管病と酷似しており、その病態機序の解明が孤発性の脳小血管病の解明にも繋がると期待されていた。申請者は 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- $\beta$  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。患者の脳小血管では、TGF- $\beta$  の発現が亢進し、さらに TGF- $\beta$  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蓄積を認めた。本成果により、ヒトの脳小血管病の病態機序を TGF- $\beta$  シグナルから検討することの妥当性が得られた。Htra1 の TGF- $\beta$  シグナル抑制機序について、TGF- $\beta$  の前駆体を細胞内で分解することにより抑制していることを示した。

### 2. 研究の目的

近年、脳の小血管を主体とする疾患が脳小血管病として注目を集めている、本症は高齢者に高頻度で認められ、血管性認知症、さらに変性疾患にも寄与すると考えられてきている。私たちは、人で遺伝性に、脳の小血管を侵す疾病 CARASIL の病態機序を明らかにし TGF- $\beta$  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、その亢進機序を解明してきた。本研究では独自に開発した CARASIL の病態モデルマウス（小血管での平滑筋細胞が変性し収縮能が減少する）を用い TGF- $\beta$  ファミリーシグナルの脳小血管病変への関与を明らかとし、TGF- $\beta$  シグナル抑制機構による、脳小血管病の改善を動物レベルで試みる。さらに、平滑筋細胞の機能異常と脳小血管機能との関連を明らかにする。

### 3. 研究の方法

HTRA1-KO マウスは lexicon

pharmaceuticals より購入した。C57BL/6JJcl 系統に 10 回以上戻し交配をかけ、遺伝子背景を均一にし、実験に用いた。野生型, HTRA1-KO マウス脳より, mirVana miRNA Isolation Kit (Thermo Fisher)を用いて RNA 抽出を行い, SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher)を用いて, cDNA 合成を行った。合成された cDNA 中の HTRA1 mRNA 量を SYBR® Premix Ex Taq™ (Takara)と PCR Thermal Cycler Dice (Takara)システムを用いて, リアルタイム定量 PCR 法によって定量した。リファレンス遺伝子は Mouse Housekeeping Gene Primer Set (Takara)を用いて, 12 種の中から最適な 2 つをリファレンス遺伝子選定ソフト; Genorm を用いて設定した。発現量は Ct 法によって算出した。

マウスは 24 ヶ月齢の野生型の C57BL/6 JJcl 系統マウス (n=3) と HTRA1-KO マウス (n=3) を吸入麻酔薬ハロタン (武田薬品工業) で麻酔した後, 開腹開胸し, ヘパリン添加 Hank 's balanced Salt Solution (gibco) を用いて灌流し脱血した。次に, 固定液 (4% パラホルムアルデヒド, 0.1% グルタルアルデヒド) で還流固定した。摘出した脳組織を同じ固定液で 1 晩固定し, 脳底部くも膜下血管を含む 2 mm<sup>3</sup> の組織ブロックを切り出した後, PBS で 3 日間洗った。固定後の組織は DMFA (N, N-ジメチルホルムアミド)の上昇系列で脱水し, LR-Whit 樹脂に置換後, -25℃で 24 時間紫外線重合させた。重合し包埋された試料はトリミング後, ウルトラマイクロトーム (Leica EM UC7) で超薄切切片を作製した。ウランとクエン酸鉛で電子染色を行い, 電子顕微鏡 (Hitachi HT7700, 75kV) で観察した。

また, 24 ヶ月齢 HTRA1-KO マウスの脳パラフィン切片を用いて蛍光免疫染色を行なった。切片はキシレンとエタノールで脱パラフィン後, 抗原賦活化処理を行った。ブロッ

キング剤は 10 % BSA, 0.1 % Triton X-100 を PBS で希釈して調製し, 切片を覆うようにのせて, 室温で 1 時間反応させた。抗体はブロッキング剤で希釈し, 1 次抗体 [rabbit anti-fibronectin antibody (Abcam, 1:250), rabbit anti-protein X (Santa Cruz biotech, 1:20)]は 4℃で 1 晩反応させた。2 次抗体 (anti-rabbit IgG antibody Alexa Fluor568) は室温で 1 時間反応させた。Fibronectin と lectin の 2 重染色では, 加熱処理によって抗原不活化を行い, 2 次抗体反応時に lectin [DyLight 594 labeled Lycopersicon Esculentum (Tomato) Lectin, 1:500]を加えた。また, fibronectin と PROTEIN X の 2 重染色では, 共に rabbit 抗体であることから, 1 次抗体を Zenon® Antibody Labeling Kits で直接蛍光ラベルを行い, 染色を行った。対照として 24 ヶ月齢野生型マウスを同様の条件で染色した。

ヒトホルマリン固定パラフィン切片の PROTEIN X 免疫組織染色は, 2 次抗体に peroxidase goat anti-rabbit IgG antibody (Vector, 1:200)を用いて, VECTASTAIN Elite ABC Kit (Vector) による 3, 3'-diaminobenzidine (DAB)検出を行った。

Laser capture micro-dissection (LCM)には LEICA7000DMB(Leica)を使用した。LCM 用脳組織は 25 ヶ月齢野生型マウスと HTRA1-KO マウスを用いた。Hank 's balanced Salt Solution を還流脱血後, 低容量の 4%パラホルムアルデヒドの還流により軽い固定を行った。脳切片はクライオスタットを用いて 8 μm の切片を作成し, エタノールによる脱水系列を用いて LCM 用スライドガラスに接着させた。切片をヘマトキシリンを用いて染色し, 組織部位の同定を行った。作成した切片より脳底部くも膜下血管を 1 個体あたり 80 個切り出し, 50 μl の 10 mM Tris, 1 mM EDTA, 0.002 % Zwittergent 溶液が入った回収用エッペンに採取した。野

生型, KO マウス共に, 2 個体より血管を採取した.

数値データの統計処理は, IBM SPSS Statistics を用いて行った. 2 群間比較は, unpaired two tailed t-test によって行った.

#### 4. 研究成果

HTRA1 欠損による血管への影響を詳細に検討するため, 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, 同領域の肥厚を認めた.

次に, 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. このうち細胞外マトリックスに属し, 動脈病変との関連性が指摘されている fibronectin および PROTEIN X に着目し, 免疫組織化学法にて検討した. HTRA1-KO マウスでは, 全周性に fibronectin および PROTEIN X 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.

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. Fibronectin に関しては, すでに我々が CARASIL 脳血管内膜肥厚部で蓄積していることを示している. そこで PROTEIN X について, CARASIL 2 症例 (p.R302Ter) 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 の陽性所見を認めた. 一方で, control 症例では, この

ような PROTEIN X の染色性を認めなかった.

次に fibronectin 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, fibronectin は内皮細胞の反管腔側に隣接していた. さらに, PROTEIN X と fibronectin の 2 重染色を行った. その結果, PROTEIN X と fibronectin の局在の一致を認めた.

CARASIL 患者の脳小血管の内膜では肥厚と内弾性板の多層化, 開裂を認める. 本研究にて, HTRA1-KO マウスのくも膜下血管において, 同様の変化を見出した. さらに肥厚部に fibronectin と PROTEIN X が蓄積していること明らかとした. すでに CARASIL 患者の脳小血管の内膜には fibronectin が蓄積していることは示されていたが, さらに PROTEIN X が蓄積している事を明らかとした. これらの結果から, HTRA1-KO マウスは, 形態学的にも生化学的にも CARASIL 患者と同様の脳小血管の内膜変化を呈することを示した. この所見は孤発性脳小血管病の小血管病変にも類似しており, 脳小血管病を解明する上で有用なモデル動物と考えた.

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件) 全て査読有り

1. 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. pii: 10.1212/WNL.0000000000002694.
2. Watanabe Y, Kitamura K, Nakamura K, Sanpei K, Wakasugi M,

Yokoseki A, Onodera O, Ikeuchi T, Kuwano R, Momotsu T, Narita I, Endo N. Elevated C-Reactive Protein Is Associated with Cognitive Decline in Outpatients of a General Hospital: The Project in Sado for Total Health (PROST). *Dement Geriatr Cogn Dis Extra*. 2016 19;6(1):10-9.

3. Watanabe Y, Kitamura K, Nakamura K, Sanpei K, Wakasugi M, Yokoseki A, Onodera O, Ikeuchi T, Kuwano R, Momotsu T, Narita I, Endo N. Elevated C-Reactive Protein Is Associated with Cognitive Decline in Outpatients of a General Hospital: The Project in Sado for Total Health (PROST). *Dement Geriatr Cogn Dis Extra*. 2016 19;6(1):10-9. doi: 10.1159/000442585. eCollection 2016 Jan-Apr.

4. Nozaki H, Sekine Y, Fukutake T, Nishimoto Y, Shimoe Y, Shirata A, Yanagawa S, Hirayama M, Tamura M, Nishizawa M, Onodera O. Characteristic features and progression of abnormalities on MRI for CARASIL. *Neurology*. 2015 4;85(5):459-63.

5. Nozaki H, Nishizawa M, Onodera O. Features of cerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy. *Stroke*. 2014;45(11):3447-53.

6. Onodera O, Nozaki H, Fukutake T. CARASIL. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Wallace SE, Amemiya A, Bean LJH, Bird TD, Fong CT, Mefford HC, Smith RJH, Stephens K, editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 2016.

[学会発表](計2件)

1. Hiroaki Nozaki, Taisuke Kato,

Megumi Nihonmatsu, Yohei Saito, Ikuko Mizuta, Tomoko Noda, Ryoko Koike, Kazuhide Miyazaki, Muichi Kaito, Shoichi Ito, Masahiro Makino, Akihide Koyama Atsushi Shiga, Masahiro Uemura, Yumi Sekine, Ayuka Murakami, Suzuko Moritani, Kenju Hara, Akio Yokoseki, Ryozo Kuwano, Naoto Endo, Takeshi Momotsu, Mari Yoshida, Masatoyo Nishizawa, Toshiki Mizuno, Osamu Onodera. Dominant-Negative HTRA1 Mutations in Cerebral Small Vessel Disease. 9th International Congress on Vascular Dementia – ICVD 2015, which will be held in Ljubljana, Slovenia, 16-18 October, 2015.

2. Masahiro Uemura, Hiroaki Nozaki, Yumi Sekine, Ikuko Mizuta, Tomoko Noda, Kazuhide Miyazaki, Muichi Kaito, Yoshinori Nishimoto, Yutaka Shimoe, Akiko Shirata, Kiyomi Yamane, Sohei Yanagawa, Mikio Hirayama, Masato Tamura, Toshiki Mizuno, Masatoyo Nishizawa, and Osamu Onodera. Characteristic brain MRI features in HTRA1 mutation heterozygotes. 9th International Congress on Vascular Dementia – ICVD 2015, which will be held in Ljubljana, Slovenia, 16-18 October, 2015.

## 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)

北里大学・医学部・教授

研究者番号 : 90359703

豊島 靖子 (TOYOSHIMA Yasuko)

新潟大学・脳研究所・准教授

研究者番号：20334675

小山 哲秀 (KOYAMA Akihide)

新潟大学・研究推進機構・助教

研究者番号：90622209