

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860208

研究課題名(和文) TGF β シグナルの亢進は脳小血管病を引き起こすか？研究課題名(英文) Impact of the excess TGF β signaling on blood vessel integrity in the brain

研究代表者

加藤 泰介 (Kato, Taisuke)

新潟大学・脳研究所・特別研究員

研究者番号：30598496

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、TGF β シグナルの亢進が、脳小血管病態を引き起こすか否かを明らかにすることである。本研究により、TGF β 1過剰発現マウスの脳小血管は脳小血管病患者に類似した構造学的変化を呈することが明らかとなった。加えて、遺伝性脳小血管病の一つであるCARASILの原因遺伝子：HTRA1のノックアウトマウスの脳小血管では、TGF β をTGF β 1と結合し、シグナルを調節するLTBPの上昇が認められた。これらの結果は、HTRA1喪失下に、脳小血管でTGF β 1シグナルが亢進する分子メカニズムを、初めて明らかとしただけでなく、TGF β 1シグナルの亢進が実際に脳小血管病類似の症状を惹起することを証明した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to clarify whether the excessive TGF β signaling induces the pathology of cerebral small vessel diseases (CSVD). We found that transgenic mice that overproduce a TGF β 1 (TGF β 1 Tg) display structural alterations and loss of smooth muscle cells on the vessel walls resembling that of patients with CSVD. On the capillaries in parenchyma, decrease in pericyte coverage was seen in the brain of TGF β 1 Tg mice. In addition, we found the accumulations of LTBP in cerebral arteries of mice deficient for HTRA1 (high temperature requirement A1) which is the causative gene for CARASIL, one of the inherited CSVD. LTBP covalently bind to TGF β s and regulate its signaling. These results not only elucidated the molecular mechanisms by which loss of HTRA1 function leads to enhancement of TGF β signaling, but also demonstrated excessive TGF β signaling results in the manifestation of CSVD pathology in vivo.

研究分野：分子神経生物学

キーワード：TGF β small vessel disease CARASIL HTRA1 smooth muscle cell pericyte

1. 研究開始当初の背景

脳小血管病は、脳の軟膜動脈、細動脈、毛細血管に血管変性病態の首座を置く疾患であり、脳血管性認知症の原因の一つである。最大の危険因子は高血圧であり、内膜肥厚、内弾性板多層化などの非アテローム性の動脈硬化変・血管平滑筋細胞の消失を病理所見とする。脳血管性認知症は、認知症の約20%を占め、アルツハイマーに次ぐ患者数が存在する。脳血管性認知症の半数を占める脳小血管病は、認知症の大きな原因の一つとして挙げられている。脳小血管病は人口の高齢化に伴い増加傾向にあるため、今後高齢化が急速に本邦においては、適切な予防・治療法が開発されなければ、患者数の急激な増加を招くことが想定され、その病態解明、予防・治療法の開発は急務となっている。しかしながら、脳小血管病の大多数を占める孤発性の脳小血管病の病態メカニズムは、ほとんど解明されていない。

孤発性脳小血管病は、高血圧に加え糖尿病、アルコール多飲など複数の危険因子をもち、加えて遺伝的背景、加齢などの因子が絡みあった疾患であるため、共通した病態メカニズムの解明が困難である。Cerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CARASIL)は、ラクナ梗塞・大脳白質病変などの画像所見のみならず、内膜肥厚・内弾性板多層化・血管平滑筋細胞の消失などの病理所見も孤発性脳小血管病と酷似した病態を示し、両者には共通した病態背景の存在が疑われている。従って、CARASILの発症メカニズムの解明は、孤発性脳小血管病の解明に大きく寄与するものと考えられる。申請者の研究室はCARASILの原因遺伝子としてセリンプロテアーゼである High Temperature requirement serine peptidase A1 (HTRA1)を同定した (Hara K and Shiga A, et al., N Engl J Med. 2009)。CARASIL患者で同定された変異により、HTRA1はmRNA分解を介した発現の低下もしくは、プロテアーゼ活性の低下を招くことから、CARASILの病態背景にはHTRA1の機能喪失が関与していると考えられる。申請者は、これまでに遺伝性脳小血管病: CARASILのモデルとして、HTRA1ノックアウトマウスの脳小血管の解析を進めてきた。その結果、HTRA1ノックアウトマウスは加齢依存的に、血管平滑筋細胞の変性・血管拡張性変化を示すことを明らかとしてきた。さらに、毛細血管でも血管平滑筋細胞に替わり、血管を囲む周皮細胞にも変性が起こることを突き止め、HTRA1機能喪失が実際に生体レベルで、脳小血管病態を惹起することを明らかとした。CARASIL発症病態メカニズムとして、疑われている分子メカニズムがTGFファミリーシグナルの異常である。TGFシグナルは血管内皮細胞、血管平滑筋細胞の分化・増殖調節に関わっており、TGFファミリーシグナルの異常は、血液脳関門の障害や遺伝性

脳血管奇形症である脳海綿状血管腫を引き起こすことが知られている。これらの事実は、TGFファミリーシグナルと脳小血管の制御機構に密接な関連があることを示している。申請者の研究室では、CARASIL患者変異によって、HTRA1がTGFシグナル調節を失うことを明らかとし、CARASIL患者の脳小血管では、TGFの蓄積、さらにTGF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報告している (Hara K and Shiga A et al., N Engl J Med. 2009)。これらのことから、CARASILの病態背景にTGFファミリーシグナル亢進が存在することが疑われるが、これまでの事実は間接的な証明であり、HTRA1機能喪失がTGFファミリーシグナルの異常を介して脳小血管病病態を引き起こすかどうかの直接的な証明はなされていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、TGFシグナルの亢進が、脳小血管病態を引き起こすか否かを明らかにすることである。TGFの脳小血管病への関与は、これまでのヒト剖検脳の研究から指摘があったが、申請者の研究室が遺伝性脳小血管病: CARASILの原因遺伝子としてプロテアーゼであるHTRA1を発見し、TGFがCARASIL患者脳血管に蓄積を認めたことから、TGFが本症の、ひいては、病態の酷似する孤発性脳小血管病の病態背景に存在する可能性が飛躍的に高まっている。申請者はTGF1過剰発現マウスを用いて、TGFシグナルが脳小血管病病態発症に関与することを直接的に明らかにするとともに、生理的な内在性HTRA1喪失時に起こるTGFシグナル制御機構への影響を検討することとした。

3. 研究の方法

・マウス

1) TGFシグナルの亢進が脳小血管病病態を引き起こすかどうかを検証するために、我々はアストロサイト特異的に活性型TGF1を過剰発現するマウス; TGF1 Tgマウスを導入した。

2) CARASIL原因遺伝子; HTRA1の喪失下でTGFシグナルに与える影響を検証するために、HTRA1遺伝子欠損マウス (HTRA1 KOマウス)を使用した。

・血管平滑筋細胞の形態学的解析

孤発性脳小血管病、並びにCARASILで共通する最も主たる病理学的変化は血管平滑筋細胞の変性、消失である。TGF1 Tgマウスの血管平滑筋細胞を解析するため、軟膜血管の血管平滑筋細胞をsmooth muscle actinで染色し、画像解析ソフト imarisを用いて解析した。

・周皮細胞の毛細血管被覆率解析

毛細血管は、血管平滑筋細胞に代わり周皮細胞

胞によって取り囲まれている。HTRA1 KO マウスでは周皮細胞に変性が認められることから、TGF β 1 Tg マウスの周皮細胞においても検討を進めた。解析は構造学的変化を解析した。周皮細胞を CD13 により染色し、同時に血管内皮細胞をレクチンにより染色することにより、毛細血管を描出した。共焦点レーザー顕微鏡により毛細血管・周皮細胞の3次元画像を取得し、毛細血管体積に対する周皮細胞の体積を imaris を用いて算出し、周皮細胞被覆率を求めた。この値を genotype 間で比較し TGF β 1 Tg マウスの周皮細胞の変性レベルを解析した。

・HTRA1 KO マウス脳血管の質量分析解析

内在性 HTRA1 の喪失による TGF β シグナルカスケードに与える影響を検討するために、HTRA1 KO マウスと野生型マウスの脳軟膜血管を Laser capture microdissection (LCM) によって回収し、そこに含まれるタンパク分子の量的変化を質量分析によって解析した。

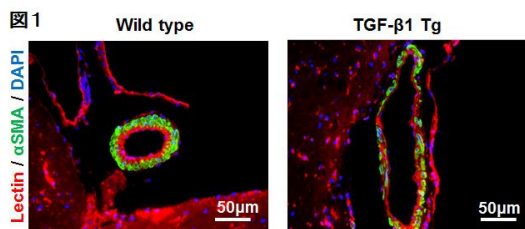
・組織免疫染色と画像解析

質量分析によって HTRA1 KO マウスで変動が認められたタンパクの中で TGF β シグナルに関与することが知られるタンパクの組織免疫染色を行った。得られた染色陽性領域の面積を imaris によって定量し、genotype 間で比較した。

4. 研究成果

・脳血管の構造解析

TGF β 1 Tg マウスの軟膜血管は血管壁の薄化、血管腔の拡大を示すことが明らかとなった。孤発性脳小血管病並びに CARASIL においても同様の血管構造所見が示されており、ヒト病態に類似するものであることから、ヒト農相血管病患者の病態にも TGF β シグナルの異常が背景に存在することを疑わせるものであった(図1)。また、HTRA1 KO マウスでも、非常に酷似した脳血管構造変化が現れることを、すでに突き止めており、CARASIL 患者についても、HTRA1 機能不全による脳血管構造異常は TGF β シグナルの変化を介して引き起こされていることが、強く示唆されるものであった。



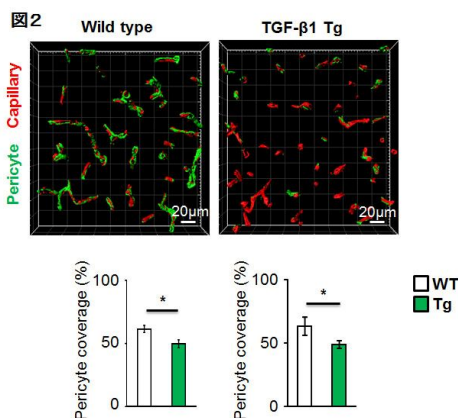
・血管平滑筋細胞の解析

TGF β 1 Tg マウスは、24 ヶ月の高齢期において、血管平滑筋細胞の、細胞体の委縮、部分的な血管壁からの脱落を示すことが今回の研究によって明らかとなった。さらに、この

変化は加齢に依存しており、この点も HTRA1 KO マウスの血管異常変化とヒト脳症血管病に共通していた。この結果は、TGF β シグナルの過剰が血管平滑筋細胞変性を惹起するという証明を世界で初めて生体内で証明する結果であった。この血管平滑筋細胞の変性は孤発性脳小血管病並びに CARASIL が共通にもつ、血管機能低下に直接つながる異常であると考えられており、TGF β シグナル異常が血管機能異常を引き起こす原因となり得る重要な所見であった(図1)。

・脳毛細血管における周皮細胞形態解析

脳毛細血管の周皮細胞 (pericyte) の被覆率を、三次元的に再構成した免疫染色画像と画像解析ソフト imaris でを用いて、定量比較した。その結果、TGF β 1 Tg マウスの周皮細胞被覆率は、野生型と比して有意な低下を示し、周皮細胞においても異常が観察された。同様の所見が HTRA1 KO マウスにおいても示されており、CARASIL の毛細血管レベルでの構造異常も、TGF β シグナルの異常が背景となって引き起こされている可能性が強く示唆された(図2)。



・HTRA1 KO マウス脳血管の質量分析解析

LCM によって回収された HTRA1 KO マウスと野生型マウス軟膜血管サンプルの質量分析解析を行い、半定量的に HTRA1 KO マウスで増加を認めるタンパク分子の同定を行った。その結果、HTRA1 KO マウスでは細胞外マトリクスを構成する分子群に増加が認められた。同時に HTRA1 KO マウスでは TGF β を細胞外マトリクスに係留し、シグナルを調節する LTBP に増加が認められた。

・LTBP 組織免疫染色

質量分析で同定された LTBP の組織免疫染色を行い、陽性領域の定量を imaris を用いて行った。その結果、HTRA1 KO マウスの脳血管では LTBP の著名な蓄積を認めた。さらに、この蓄積は血管構造変化の起こる時期よりも早い月齢から蓄積を認め、HTRA1 KO マウスの血管構造変化の結果ではなく、原因に関する所見であることが予想された(図3)。LTBP は、TGF β を細胞外マトリクスにアンカリングする機能を有しており、LTBP の蓄積は、TGF β 活性化シグナルが入力された時、過剰

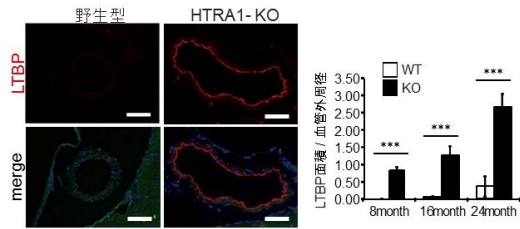


図3 HTRA1 KOマウス脳血管におけるLTBPの蓄積
24ヶ月齢の野生型、HTRA1 KOマウス脳軟膜血管のLTBP免疫染色画像。

な TGF / LTBP 複合体の遊離を促し、過剰なシグナルを惹起することが予想され、HTRA1 喪失下における TGF 過剰シグナルにつながる分子メカニズムを生体内で示唆するデータとなった。

以上の結果より、TGF シグナルの過剰が実際に脳小血管病病態を惹起することを世界で初めて実証した。また、これまで生体内で不明であった CARASIL 原因遺伝子; HTRA1 の機能喪失がどのように TGF シグナル亢進につながるかの分子メカニズムの一端を明らかとするものである。これらの結果は、CARASIL 並びに孤発性脳小血管病の治療戦略を立てる上での基礎的データとして、貴重なものとなった。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

Taisuke Kato, Yumi Sekine, Hiroaki Nozaki, Sachiko Hirokawa, Natsumi Fujita, Toshiya Sato, Masatoyo Nishizawa, Osamu Onodera. Impact of the excess TGF- signaling on blood vessel integrity in the brain: TGF- シグナル亢進による脳血管に与える影響. 第 38 回日本神経科学大会. 2015 年 7 月 28 日~7 月 31 日. シンポジウム発表. 神戸国際会議場・展示場 (兵庫県神戸市)

〔図書〕(計 0 件)

〔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

加藤 泰介 (Kato Taisuke)
新潟大学・脳研究所・特別研究員
研究者番号：30598496

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：