

## 論文内容の要旨

申請者氏名 Ikawati Muthi

HtrA1 は分泌型セリンプロテアーゼで、種々の細胞外マトリックス蛋白質を分解すること、TGF- $\beta$ シグナルを阻害することが知られている。ヒトの HtrA1 遺伝子の両アリル機能欠損変異は常染色体劣性遺伝性の小脳動脈症の一つである CARASIL を引き起こす。CARASIL は脳血管の異常に起因する認知症を主徴とし、血管平滑筋細胞 (VSMC) の著しい消失と、内膜肥厚、内弾性板の断裂、細胞外マトリックス蛋白質の異常増減が特徴的である。申請者は、HtrA1 遺伝子欠損 (HtrA1 KO) マウスを解析し HtrA1 KO マウスが CARASIL のモデル動物となりうるかを検討した。

まず、申請者は HtrA1 KO マウスの脳血管が CARASIL と同様の異常を示すかどうかを検討したが、脳動脈に顕著な異常を認めず、脳白質のミエリン染色でも異常な脱髄を示さなかった。そこで、CARASIL では直径 100~1000 $\mu$ m の小動脈に特異的に異常が見られることに着目し、同様の大きさを持つマウス大動脈(500~1000 $\mu$ m)の解析を行った。16 週齢~60 週齢の大動脈の形態計測の結果、40 週齢より高齢の HtrA1 KO マウスでは野生型マウス (WT マウス) に比べ、血管断面積の増加が見られた。VSMC 数は 40 週齢までは HtrA1 KO マウスの方が有意に多かったがその後急速に減少し、60 週齢では HtrA1 KO マウスで有意に少ないことを見出した。CARASIL の脳血管では VSMC 数の著しい減少が全例に認められ、血管の異常は VSMC の異常に起因すると考えられている。VSMC は収縮型と合成型という 2 つの形質で存在しており、血管損傷など種々の外的ストレスに反応して脱分化を起こし収縮型から合成型に転換し、細胞増殖能、細胞遊走能が増加する。脱分化は正常な生体防御反応であるが、過剰に起こると VSMC は内弾性板を超えて内膜に移動して増殖し、内膜の肥厚をもたらす血管の狭窄の原因となる。申請者は VSMC の性質を詳細に検討するためにマウス大動脈から VSMC を単離し解析を行った。その結果、HtrA1 KO VSMC は WT VSMC に比べ収縮型マーカー(SMA)の発現が低下し、合成型マーカー (vimentin, osteopontin) の発現が上昇しており、増殖能および遊走能が増加していることを見出した。これらの結果より、HtrA1 KO VSMC は WT VSMC に比べより合成型にシフトしていると考えられた。また、申請者は HtrA1 KO VSMC で MMP9 の発現と活性が有意に増加していること、MMP9 の活性化は JNK インヒビターにより阻害され、同時に遊走能も阻害されることを見出した。さらに、HtrA1 KO VSMC は WT VSMC に比べ過酸化水素添加による酸化ストレスの誘導により Caspase-3 の活性化を伴うアポトーシスによる細胞死を起こしやすいことを示し、40 週齢以降の HtrA1 KO マウス大動脈で VSMC が急速に減少する原因としてストレスによるアポトーシスが関与している可能性を示唆した。最後に、40 週齢~52 週齢の高齢 HtrA1 KO マウスの大動脈において、血管壁の厚みの異常や、弾性繊維の断裂、コラーゲンの減少が、WT マウスに比べ著しいこと、また *in vivo* でも HtrA1 KO マウス大動脈の VSMC は合成型形質にシフトしていることを見出した。

高齢 HtrA1 KO マウスの大動脈で見られた異常は CARASIL の初期の病変を反映していると考えられ HtrA1 KO マウスの大動脈は CARASIL の病態モデルとなりうることを示された。また、HtrA1 が VSMC の収縮型形質の維持に機能しており、VSMC の合成型形質へのシフトが CARASIL の病態形成に重要であることを示した。

## 論文審査結果の要旨

申請者氏名 Ikawati Muthi

血管性認知症は、脳血管の異常に起因する脳梗塞、脳出血、大脳皮質の変性による認知症を主徴とし、アルツハイマー病に次ぐ第2の認知症の原因である。血管性認知症の約半数は脳小血管病であり、その約20%が遺伝性である。遺伝性脳小血管病の一つであるCARASILは常染色体劣性遺伝性で、若年性の①脳症(性格変化、認知症、運動麻痺)②禿頭③変形性脊椎症/椎間板ヘルニアによる腰痛の3つを主徴とする。近年、CARASILの原因がHtrA1遺伝子のプロテアーゼ活性を欠失または低下させる点突然変異であることが突き止められた。CARASILの病態については不明な部分が多いがその解明は血管性認知症の病態解明につながることを期待される。

申請者はヒトのCARASILの病態解明のためにHtrA1 KOマウスが有効なモデルとなるかどうかを検討した。しかし、HtrA1 KOマウスは高齢になってもCARASILに類似した症状は示さず、脳血管の組織学的解析においても明らかな異常は認めなかった。そこで、申請者は、CARASILでは小動脈のみに異常が認められることに着目しマウスで同様の太さを持つ大動脈の形態的計測を16週齢～60週齢のマウスについて詳細に行った。その結果、40週より高齢のHtrA1 KOマウスにおいて血管断面積の増加とVSMC数の有意な減少があることを見出した。次に申請者は、CARASILの血管の異常がVSMCの異常に起因することに着目し、マウスの大動脈からVSMCを単離し解析した。その結果、HtrA1 KO VSMCはWT VSMCに比べ収縮型形質から合成型形質にシフトしており細胞増殖能、細胞遊走能、およびMMP9活性が高いことを見出した。また、MMP9の活性化と遊走能は共にJNKのインヒビターにより阻害されたことより、HtrA1 KO VSMCではJNKシグナルの活性化によりMMP9の発現と活性が上昇し細胞遊走能の上昇につながっている可能性を示唆した。さらに、HtrA1 KO VSMCは酸化ストレスを与えるとWT VSMCに比べアポトーシスによる細胞死を起こしやすいことを見出し、高齢のHtrA1 KOマウスで見られたVSMC数の減少はストレス下での細胞死による可能性を示唆した。最後に申請者は、40週齢より高齢のHtrA1 KOマウスの大動脈でもVSMCは合成型形質にシフトしていること、また、血管壁の厚みの異常や弾性繊維の断裂、コラーゲンの減少などCARASILの初期と考えられる異常を示すことを見出した。VSMCの合成型形質への過剰なシフトは、動脈硬化や動脈瘤形成などの広範な心臓血管病変の鍵となる重要な現象と捉えられているが、CARASILにおいても病態形成に関与している可能性を示した。

以上のように、本論文はCARASILの病態形成メカニズムの一つを明らかにしHtrA1 KOマウスがCARASILのモデル動物となりうることを示したもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士(バイオサイエンス)の学位論文として価値あるものと認めた。