HTRA1は前駆体TGF-β1（pro-TGF-β1）を小胞体で切断する事によりTGF-β1シグナルを調節する

志賀　篤
新潟大学大学院医歯学総合研究科
分子細胞医学専攻神経内科学分野
（指導：西澤正豊教授）

HTRA1 controls TGF-β1 Signaling Via Cleavage of pro-TGF-β1: Implication for Molecular Pathogenesis of CARASIL

Atsushi SHIGA

Department of Neurology, Brain Research Institute,
Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences
(Director: Prof. Masatoyo NISHIZAWA)

要　旨

脳小血管病は，高齢者において良く見られる疾患であるが，その分子病態機序は不明である．近年我々は，high-temperature requirement A serine peptidase 1（HTRA1）遺伝子の変異が，遺伝性脳小血管病であるcerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy（CARASIL：皮質下梗塞と白質脳症を伴う常染色体劣性遺伝性脳動脈硬化症）を引き起こす事を明らかとした．HTRA1はセリンプロテアーゼ活性を持ち，活性依存性にtransforming growth factor-β（TGF-β）シグナルを抑制する機能を持つ．これまでに我々は，疾患関連変異型HTRA1はTGF-βシグナルを抑制できず，加えてCARASIL患者の脳小血管において，TGF-βやTGF-βシグナルの亢進を示すEDA-Fibronectin，versicanが増加していることを明らかとした．これらの知見から，CARASILにおける脳小血管病変はTGF-βシグナルの亢進に起因すると結論した．しかし，HTRA1によるTGF-βシグナルの抑制機序は明らかではない．TGF-β活性の調節は次のように，主に細胞外で行われる．TGF-βは前駆体TGF-β（pro-TGF-β）として産生され，前駆体蛋白分解酵素であるfurinによってlatency-associated protein（LAP）と成熟型TGF-β（mature TGF-β）に分解され，不活性型である非共有結合性の複合体（latent型TGF-β）を形成する．latent型TGF-βは細胞外に分泌され，細胞外マトリックスに蓄積し，必要に応じてmatrix metalloproteinase等により活性化されることにより調節される．今回私は，ゲンタマイシン処理によりR370X変異を持つCARASIL患者由来繊維芽細胞の内在性HTRA1の発現を回復させることにより，HTRA1がmature TGF-βには作用せず，pro-TGF-βに作用することを示した．さらに，その場は細胞内，小胞体であり，

Reprint requests to: Atsushi SHIGA
Department of Neurology
Brain Research Institute Niigata University
1-757 Asahimachi-dori Chuo-ku,
Niigata 951-8585 Japan

別刷請求先：〒951-8585　新潟市中央区旭町通1-757
新潟大学脳研究所生命科学リソース研究センター
志賀　篤

HTRA1がpro-TGF-βと結合し，それを分解し，mature TGF-βの量を減少させる事を明らかとした．一方，疾患関連変異型HTRA1はpro-TGF-βとの結合能は保っているが，分解は出来なかった．今回我々が明らかとした，HTRA1による細胞内でのpro-TGF-βの分解を介したTGF-βシグナルの調節は，今まで知られているTGF-βシグナルの調節因子とは異なる，新しい調節機序である．

キーワード：CARASIL，HTRA1，TGF-β，脳小血管病

緒　言

脳小血管病は，高齢者において良く見られる疾患であり，認知力低下や脳梗塞を引き起こす[1]．しかしながら，脳小血管病の分子病態機序に関しては理解に乏しい．近年我々は，high-temperature requirement A serine peptidase 1（HTRA1）遺伝子の変異が，遺伝性脳小血管病であるcerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy（CARASIL：皮質下梗塞と白質脳症を伴う常染色体劣性遺伝性脳動脈硬化症）を引き起こす事を明らかとした[2]．CARASILは，本邦で疾患概念が確立された疾患であり，臨床的特徴として，①頭部MRIでびまん性の大脳白質病変，②変形性脊椎症および禿頭，③正常血圧，が挙げられる[3][4]．また病理学的所見として，①脳小血管の内膜肥厚，②脳小血管の中膜平滑筋細胞の変性，③大脳白質の髄鞘の脱落，が挙げられ，これらは孤発性脳小血管病の病理所見と類似する[4]-[6]．そのため，CARASILの病態機序の解明が孤発性脳小血管病の解明にも寄与すると期待されていた．

HTRA1はシャペロン活性とセリンプロテアーゼ活性を持つ分泌タンパクであり，プロテアーゼ活性依存性にTGF-βシグナルを抑制することが報告されている[7]-[9]．我々は，CARASIL関連変異型HTRA1ではプロテアーゼ活性が減少しており，TGF-βシグナルを抑制できないことを明らかとした[2]．さらに，CARASIL患者脳小血管においてTGF-βの増加，TGF-βシグナルにより誘導されるEDA-Fibronectin，versicanの増加を明らかとした[2]．これらの知見から，CARASILにおける脳小血管病変は，TGF-βシグナルの亢進に起因すると推察される．

TGF-β活性の調節は主に細胞外で行われる．TGF-βは，前駆体TGF-β（pro-TGF-β）として産生され，ゴルジ体において前駆タンパク質転換酵素であるfurinなどによって成熟化を受け，latency-associated protein（LAP）と成熟型TGF-β（mature TGF-β）に分解される．続いて，LAPがmature TGF-βの二量体を包み込む形で非共有結合性の不活性型の複合体（latent型TGF-β）を形成し，細胞外マトリックスに蓄積する．細胞外に蓄積したlatent型TGF-βは，matrix metalloproteinaseや細胞外環境が酸性に傾くことによりLAPが分解され，活性型TGF-βとなる[10]．この細胞外での活性化機序が，TGF-βシグナルの調節機序の主要な物とされる．

TGF-βの活性を調節する細胞外蛋白質としては，DecorinやEmilin1が知られている．Decorinは，mature TGF-βと結合しTGF-βシグナルを抑制する[11]．またEmilin1は，細胞外でpro-TGF-βと結合しTGF-βシグナルを抑制する[12]．HTRA1についてはmature TGF-βを基質とするという機序[13]，mature TGF-βと結合するが基質とはせずTGF-βファミリーの受容体に作用する機序が提唱され[14]，意見が分かれている．また，その抑制効果を表す場についても，細胞外からのmature TGF-βの刺激に対して抑制するという報告と[9]，抑制しないという報告があり[15]，その場，機序共に明らかではない．私は，HTRA1によるTGF-βシグナルの抑制機序を明らかにすることが，CARASILの分子病態機序を明らかとし，かつ弧発性の脳小血管病の理解に繋がると考え，今回，このHTRA1によるTGF-βシグナルの抑制機序について，詳細な検討を行った．

材料と方法

プラスミドの作製

全長型ヒトpro-TGF-β1発現プラスミド及びヒトHTRA1 cDNAは，それぞれORIGENE（Rockville, MD）およびOpen Biosystems（Huntsville, AL）より購入した．恒常的活性型pro-TGF-β1（C223S/C225S）及び変異型HTRA1（A252T, V297M, S328A）発現プラスミドは，GeneTailor site-directed mutagenesis system（Invitrogen, Carlsbad, CA）を用いて作製した．全長型ヒトfurin発現ベクターは，中山和久博士（京都大学大学院薬学研究科）より供与していただいた．(SBE)4-Lucレポータープラスミドは，Bert Vogelstein博士（Howard Hughes Medical Institute and Sidney Kimmel Comprehensive Cancer Center）より供与していただいた．全長型マウスsmad4発現ベクターは，片桐岳信博士（埼玉医科大学ゲノム医学研究センター）より供与していただいた．

細胞培養とトランスフェクション

HEK293T, C2C12細胞，およびCARASIL患者由来繊維芽細胞は10％FBSを含むDulbecco's modified Eagle Mediumを用いて，37℃，5％CO_2下にて培養した．トランスフェクションは，6well dishまたは24well dishで90～95％の細胞密度に対して，Lipofectamine 2000を用い行った（Invitrogen）．各wellの総DNA量が一定となるように，pcDNA-DEST40 vector（Invitrogen）にて調整した．

蛍光免疫染色

pro-TGF-β1及びV5抗原付きHTRA1発現プラスミドをトランスフェクションしたC2C12細胞を，4％パラホルムアルデヒドにて15分間固定し，0.2％Triton X-100にて15分間透過処理を行った．その後抗LAP抗体及び抗V5抗体（Invitrogen）で4℃，16時間染色し，CSU-10共焦点レーザー顕微鏡（横川電機）にて観察した．

ウェスタンブロッティング及び共免疫沈降解析

サンプルをLaemmli Buffer下で95℃，5分間処理後，ポリアクリルアミドゲルを用いたSDS-PAGEでタンパクを分離し，PVDFメンブレン（MILLIPORE）上に転写した．転写したメンブレンをBlocking Buffer（50mM Tris/HCl, 100mM NaCl, 0.1％Tween20, 5％skimmed milk）で室温，1時間処理し，その後一次抗体を4℃，16時間反応させた．反応後Blocking Bufferで洗浄し，二次抗体としてAnti-rabbit IgG（Sigma）又はAnti-mouse IgG（CHEMICON）を用い，室温，1時間反応させた．反応後，ECL plus Western Blotting System（Amersham Bioscience）を用いて検出した．V5抗原付きHTRA1は抗V5抗体（Invitrogen）にて検出した．pro-TGF-β1は抗LAP抗体（R&D Systems），成熟型TGF-β1は抗TGF-β1抗体（Promega, Madison, WI）にて検出した．SMAD2及びリン酸化SMAD2は，それぞれ抗SMAD2/3抗体（Cell Signaling）及び抗リン酸化SMAD2抗体（Cell Signaling）にて検出した．共免疫沈降に関しては，pro-TGF-β1及びV5抗原付きHTRA1発現プラスミドをトランスフェクションした細胞を細胞溶解液（25 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1％CHAPS）にて溶解し，冷却遠心機にて10000g, 10分遠心し上清を回収した．回収した上清に1μgの抗体及び50μlのprotein Gもしくはprotein Aアガロースビーズを加え，4℃にて1時間反応させた．反応後3000gで3分遠心し，アガロースビーズを回収，細胞溶解液にて4回洗浄後，Laemmli Bufferを加え，ウェスタンブロットにて解析した．

ルシフェラーゼアッセイ及び細胞混合試験

C2C12細胞にHTRA1発現プラスミド，pRL-TK renillaルシフェラーゼ発現プラスミド（内部コントロールレポーター），$(SBE)_4$-fireflyルシフェラーゼ発現プラスミド（TGF-β反応性レポーター），SMAD2, SMAD4, 恒常的活性型TGF-β1発現プラスミドをトランスフェクションした．トランスフェクションから48時間後，細胞を溶解し，Dual-Luciferase Reporter Assay System

（Promega）を用いて，SIRIUS Luminometer（Berthold Detection Systems GmbH）でルシフェラーゼ活性を測定した．各ルシフェラーゼ活性の値は，内部コントロールであるpRL-TK renillaのルシフェラーゼ活性で補正した．細胞混合試験においては，HEK293T細胞を用い，図中に記載したプラスミドをトランスフェクションし，24時間後にトリプシン処理を行い培養液中に細胞を浮遊させ，反応細胞群と刺激細胞群を混合し，24well dishに播種した．混合から24時間後に細胞を溶解し，ルシフェラーゼ活性を測定した．繊維芽細胞を用いたルシフェラーゼアッセイでは，500 μg/mlゲンタマイシンにて細胞を48時間培養後，実験に使用した．いずれの実験も3回繰り返して行った．

結　　果

HTRA1は細胞内でTGF-βシグナルを抑制する

HTRA1によるTGF-βシグナルの抑制機序を明らかとするため，まず私は，HTRA1がpro-TGF-βとmature TGF-βのどちらを介してTGF-βシグナルを抑制するのかを検討した．TGF-βはpro-TGF-bとして産生され，furinによりLAPとmature TGF-βに分解され，非共有結合性の複合体を形成する（latent型TGF-β）．このlatent型TGF-βは，通常は活性を持たない．したがって，野生型のpro-TGF-βを細胞に発現させただけではTGF-β活性を示さない．このため，シグナル活性の検討には223番目および225番目のシステインをセリンに置換した恒常的活性型pro-TGF-βを用いた[15]．恒常的活性型pro-TGF-βを細胞内に導入した場合と，mature TGF-βを培養液中に添加した場合での，HTRA1によるTGF-βシグナルの抑制効果を比較した．どちらの場合においてもTGF-βシグナルは良好に誘導された（**図1A**，レーン2，5）．しかし，HTRA1による抑制効果は恒常的活性型pro-TGF-βを細胞内に導入した場合にのみ認められた（**図1A**，レーン6）．この結果から，HTRA1がpro-TGF-βを介してTGF-βシグナルを抑制する可能性が示唆された．

次に私は，HTRA1によるTGF-βシグナルの抑制が，細胞内と細胞外のどちらで行われているのかを確かめるため，Zacchignaらが行った**図1B**の様な細胞混合実験を行った[12]．刺激細胞群と反応細胞群を用意し，2種類の細胞群を混合し，レポーターアッセイを行う物である．刺激細胞群にはpro-TGF-βを導入し（**図1C**中でSと表記），反応細胞群にはTGF-βシグナルのレポーターである（SBE)$_4$-fireflyルシフェラーゼを導入した（**図1C**中でRと表記），HTRA1を刺激細胞群もしくは反応細胞群のみで発現させ，どちらでTGF-βシグナルの抑制効果が認められるか検討した．HTRA1は分泌蛋白であるので，もしシグナル抑制の場が細胞外であればどちらでも，細胞内であれば刺激細胞群で発現させたときのみ，抑制されるはずである．結果は，HTRA1を刺激細胞群で発現させた場合にのみ，TGF-βシグナルの抑制効果が認められた（**図1C**，レーン3）．さらに，同条件下の細胞培養液をHepG2細胞に添加し，TGF-βシグナルの下流であるSmad2のリン酸化を確認した．Smad2のリン酸化も，HTRA1を刺激細胞群で発現させた細胞培養液でのみ，認めなかった（**図1D**）．これらの事から，HTRA1によるTGF-βシグナルの抑制は，pro-TGF-βを介して，細胞内で行われていることが示唆された．

内在性HTRA1によるTGF-βシグナルの検討

この現象がHTRA1の強制発現でのアーチファクトの可能性を排除するため，R370X変異を持つCARASIL患者由来繊維芽細胞を用い，内在性HTRA1のTGF-βシグナルへの抑制効果を検討した．これまで我々は，R370X変異を持つCARASIL患者由来繊維芽細胞では，未成熟停止コドンによるナンセンス変異依存性mRNA分解機構によって，HTRA1 mRNAが正常対照の約6％に著減しHTRA1タンパクの発現も認められないこと，しかしHTRA1 R370X変異体はプロテアーゼ活性を保っていること，を示している[2]．アミノグリコシド系抗生物質は，ナンセンス変異依存性mRNA分解機構を抑制させることにより，未成

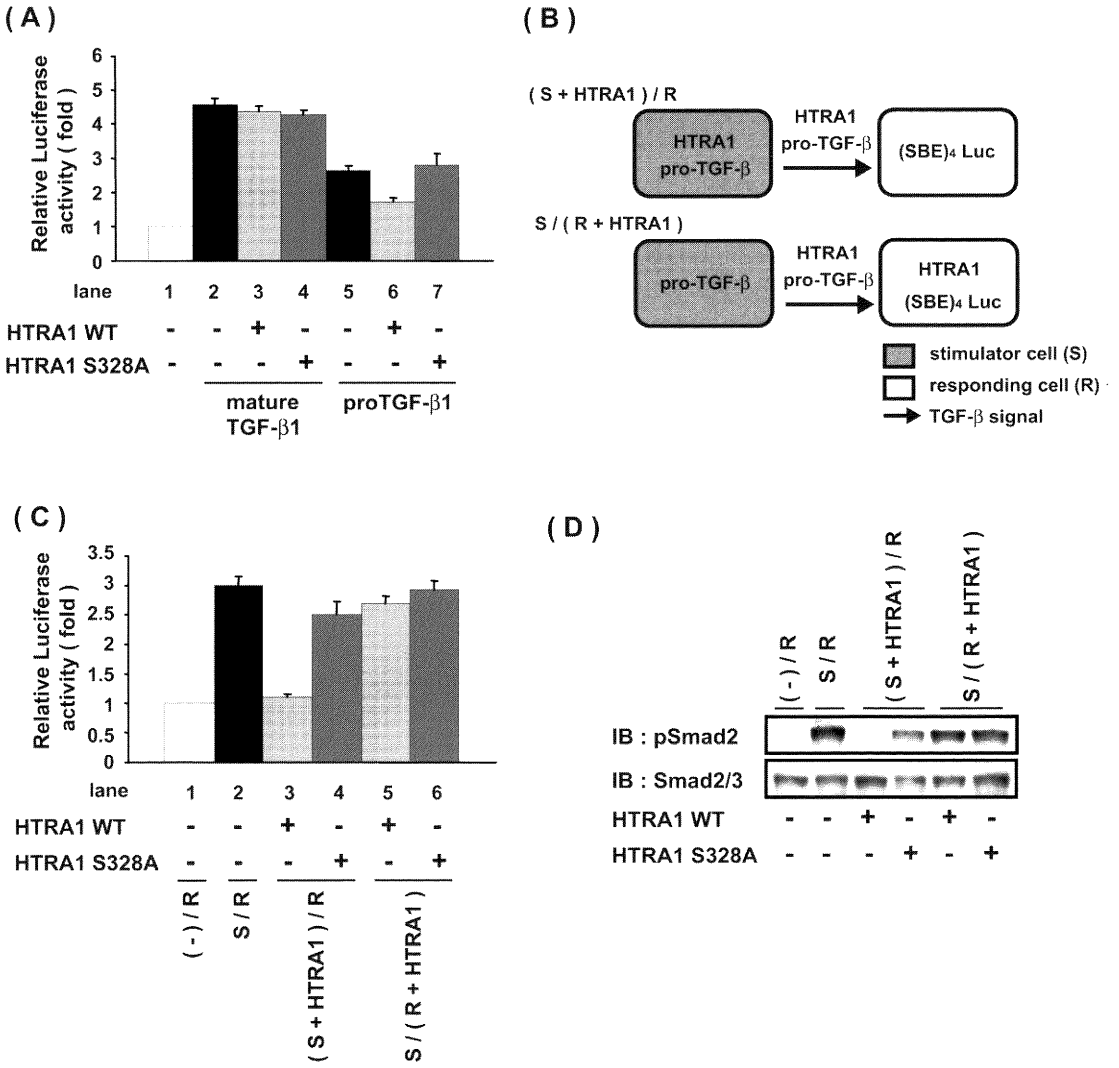


図 1　HTRA1 は TGF－β シグナルを細胞内で抑制する

A　：HTRA1 が pro－TGF－β と mature TGF－β のどちらを介して TGF－β シグナルを抑制するのかを検討．HTRA1 による抑制効果は恒常的活性型 pro－TGF－β をトランスフェクションした場合にのみ認められた（レーン 6）．HTRA1 S328A は，不活性型 HTRA1 であり，ネガティブコントロールである（レーン 4, 7）．

B　：細胞混合試験の模式図．S は pro－TGF－β をトランスフェクションした刺激細胞群，R は TGF－β シグナルのレポーターである $(SBE)_4$－firefly レポータープラスミドをトランスフェクションした反応細胞群を表す．HTRA1 を刺激細胞群もしくは反応細胞群のみで発現させ，どちらで TGF－β シグナルの抑制効果が認められるかを検討した．

C, D：細胞混合試験の結果．HTRA1 と pro－TGF－β を共発現させた場合にのみ，TGF－β シグナルの抑制効果を認めた（C，レーン 3）．同条件下の細胞培養液を HepG2 細胞に添加したところ，HTRA1 と pro－TGF－β を共発現させた場合の細胞培養液のみ，Smad2 のリン酸化を認めなかった（D）．

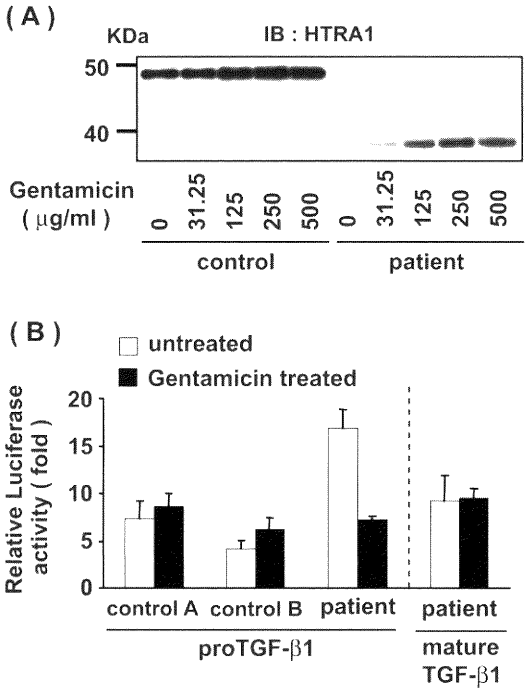


図2　内在性HTRA1によるTGF-βシグナル抑制機序の検討

A：ゲンタマイシン処理による内在性HTRA1発現の回復．HTRA1 R370X変異を持つCARASIL患者由来繊維芽細胞をゲンタマイシン処理し，培養上清を対象に抗HTRA1抗体にてウェスタンブロット解析を行った．ゲンタマイシン濃度依存性に内在性HTRA1発現の回復を認めた．

B：ゲンタマイシン処理によるTGF-βシグナルの改善．CARASIL患者由来繊維芽細胞（図中patientと記載）をゲンタマイシン処理しHTRA1タンパクの発現を回復させる事により，pro-TGF-βをトランスフェクションした場合のTGF-βシグナルの改善を認めた．一方，HTRA1タンパクの発現を回復させても，mature TGF-βを培養液中に添加した場合のTGF-βシグナルは改善されなかった．

熟停止コドンを含むmRNAの安定性を向上させタンパク量を増加させることが知られている[17)18)]．したがって，R370X変異を持つCARASIL患者由来繊維芽細胞をアミノグリコシド系抗生物質で処理する事により，活性のある内在性HTRA1の量を増加させることが可能であり，そのTGF-βシグナルへの効果を検討しうると考え，これを用いた．予想通り，アミノグリコシド系抗生物質であるゲンタマイシンで処理により，R370X変異を持つCARASIL患者由来繊維芽細胞のR370X HTRA1 mRNA量は未処理対照の約7倍，正常対照の約40％にまで回復し，タンパクの発現も回復した（**図2A**）．この条件下でTGF-βシグナルの抑制効果を検討したところ，pro-TGF-βをトランスフェクションした場合のTGF-βシグナルの改善を認めた（**図2B**）．一方，mature TGF-βを培養液中に添加した場合のTGF-βシグナルは改善されなかった（**図2B**）．これらの結果から，内在性のHTRA1がpro-TGF-βを介してTGF-βシグナルを抑制することが示唆された．

HTRA1はpro-TGF-βと結合，切断し，mature TGF-βの量を減少する

次に私は，細胞内でHTRA1とpro-TGF-βが結合するかを，HEK293T細胞にpro-TGF-βおよびV5抗原付きHTRA1を共発現させ，共免疫沈降法を用い検討した．その結果，HTRA1とpro-TGF-βの結合が示された（**図3A，B**）．また同細胞の蛍光免疫染色では，HTRA1とpro-TGF-βが細胞内で共局在していることが示された（**図3C**）．次に，HTRA1がpro-TGF-βを細胞内で切断するかどうかを検討した．同細胞からの抽出蛋白を抗LAP抗体（pro-TGF-βを検出）を用いたウェスタンブロッティング法にて解析した．細胞内に導入したHTRA1の量依存性に，20～30kDaのpro-TGF-β分解産物の増加が見られ，加えて培養液中のmature TGF-βの量の減少を認めた（**図3D，E**）．一方，不活性型HTRA1であるHTRA1 S328Aでは，分解産物を認めなかった（**図3D，E**）．

CARASILの病態とHTRA1によるpro-TGF-

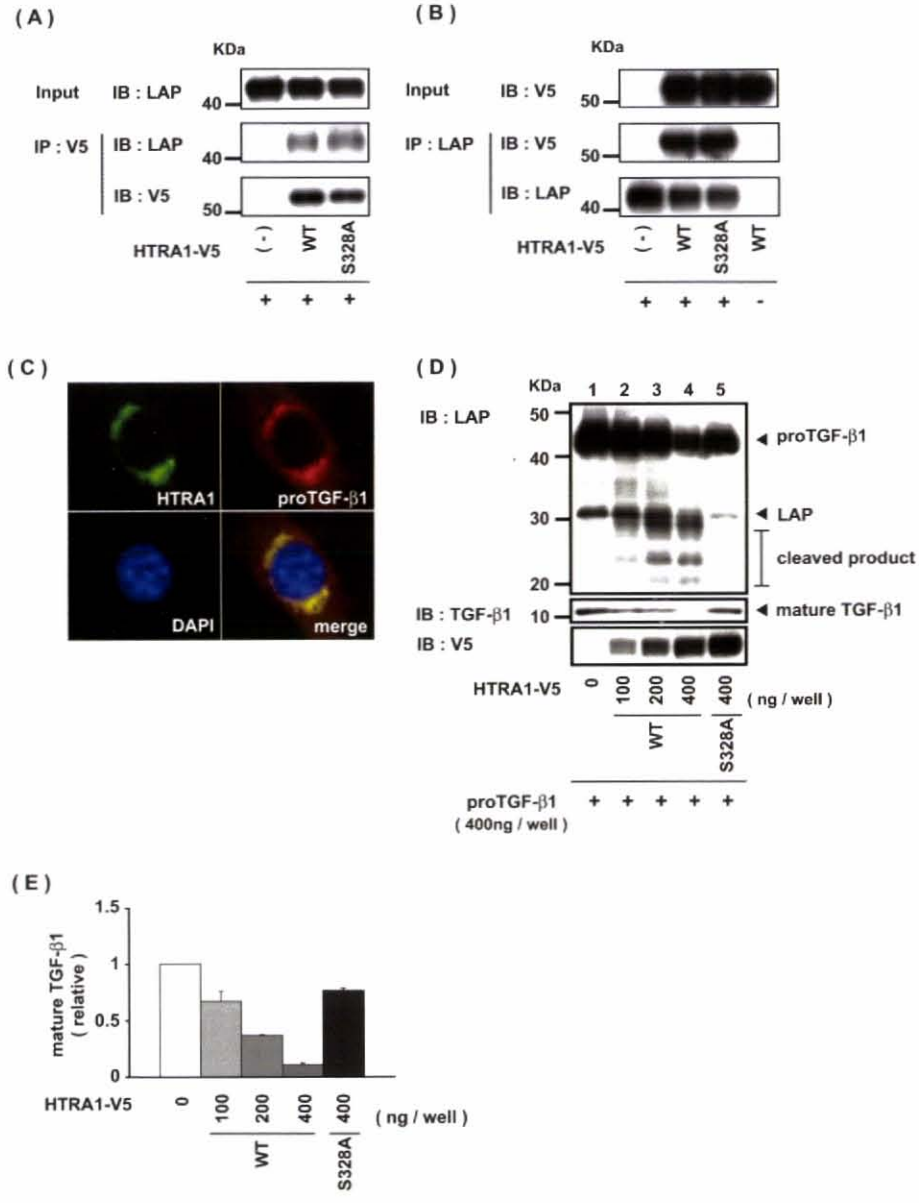


図 3　HTRA1 は pro－TGF－β と結合，切断し，mature TGF－β の量を減少させる

A, B：HTRA1 と pro－TGF－β との結合を共免疫沈降法を用いて検討．いずれの抗体を用いた共免疫沈降においても，HTRA1 と pro－TGF－β の結合を示す結果が得られた（A，B 中段）．Input（上段）は loading control，下段は免疫沈降が行われている事を示す．

C　：HTRA1 と pro－TGF－β の細胞内局在を免疫染色にて検討．HTRA1（緑）と pro－TGF－β（赤）の共局在（黄）が認められた．

D, E：HTRA1 は pro－TGF－β を細胞内で切断するかを検討．HTRA1 の量依存性に，20 ～ 30kDa の pro－TGF－β 分解産物の増加が見られた（D レーン 2－4）．また，HTRA1 の量依存性に培養液中の mature TGF－β の量の減少を認めた（D 中段，および E）．一方，不活性型 HTRA1 である HTRA1 S328A では，それらの結果は得られなかった（D レーン 5，および E）．

βの切断との関連を明らかとするため，疾患関連変異型HTRA1について，pro-TGF-βとの結合および切断の程度を同様に検討した．疾患関連変異型HTRA1とpro-TGF-βは共免疫沈降された（**図4A，B**）．一方，いずれの疾患関連変異型HTRA1においてもpro-TGF-βの分解産物を認めなかった（**図4C，D**）．加えて，培養液中のmature TGF-βの量の減少も認めなかった（**図4C，D**）．

HTRA1は小胞体でpro-TGF-βを切断する

HTRA1はN末端にシグナル配列を持つため，小胞体やゴルジ体を通り細胞外に分泌される[7)19)]．実際，GFPとの融合蛋白を用いた野生型HTRA1の共焦点レーザー顕微鏡による観察では，HTRA1の小胞体への局在が示された（**図5A**）．そこで私は，細胞内のどこでHTRA1によるpro-TGF-βの切断が起こるのかを検討した．小胞体からゴルジ体への輸送を阻害するbrefeldin A，及びゴルジ体から細胞膜への輸送を阻害するmonensin処理をした場合の，HTRA1によるpro-TGF-βの切断の有無を検討した．既報通り，furinでのpro-TGF-βの切断がbrefeldin A処理により阻害される事から，furinによるpro-TGF-βの切断がゴルジ体にて行われている事が確かめられた（**図5B**）[20)-22)]．一方，HTRA1によるpro-TGF-βの切断は，brefeldin A処理およびmonensin処理いずれにおいても阻害されなかった（**図5B**）．この結果から，HTRA1によるpro-TGF-βの切断は小胞体にて行われる事が示唆された．

考　　察

今回私は，HTRA1が小胞体にてpro-TGF-βを切断し，mature TGF-βの産生を抑えている事を明らかとした．**図6**にHTRA1によるTGF-βシグナルの抑制機序の模式図を示す．HTRA1によるpro-TGF-βの切断は小胞体にて行われるため，furinによるゴルジ体でのpro-TGF-βの成熟化よりも先行する．その結果，pro-TGF-βの成熟化を阻害し，mature TGF-βの産生量を減少させると結論した．このような細胞内でのTGF-βシグナルの抑制機序は，全く新しい機序である．細胞内での秩序だった成熟化がTGF-βファミリーにおいて重要であることは，TGF-βファミリーの一種であるBMP4において示されている．BMP4はゴルジ体にてfurinによる2段階の切断を受け，成熟化する[23)]．しかし，furinによる切断を阻害する変異を挿入し，この順序だった成熟化を阻害すると，proBMP4は分解を受け，最終的に成熟型BMP4の産生が減少する[23)]．我々はこの機序と同様に，HTRA1はTGF-βの細胞内の成熟化を阻害することを見いだした．

本研究の結果が，強制発現系の影響であることを除外するため，我々はR370X変異をもつ患者培養線維芽細胞を用いた実験を行い，内在性のHTRA1によってもpro-TGF-β由来のTGF-βシグナルを抑制しうることを示した．このことは，本現象がHTRA1の強制発現によるアーチファクトではないことを明確に示している．さらに強制発現系での結果と同様に，内在性のHTRA1でも細胞外からのmature TGF-β刺激によるTGF-βシグナルは抑制されなかった．これらの結果は，HTRA1によるTGF-βシグナルの抑制がpro-TGF-βを介する，という機序を支持する．Emilin1はHTRA1と同様に，pro-TGF-βに直接結合してその成熟化を抑制し，TGF-βシグナルを抑えるとされている．しかし，細胞混合試験によりその作用部位は細胞外と報告されており，HTRA1の反応する部位とは異なる[12)]．このような，同一シグナルに対する複数の抑制機序の存在は，組織毎，細胞毎にTGF-βファミリーシグナルが厳格に管理されている可能性を示唆している．

脳小血管は主として，アストロサイト，血管内皮細胞，平滑筋細胞もしくは周皮細胞により構成されている．これらの構成細胞の内，どの細胞がTGF-βを産生し，どの細胞がTGF-βシグナルに反応するのかについては，全く明らかになっていない．CARASIL患者の脳小血管の免疫組織化学による検討では，TGF-βは血管の中膜（平滑筋細胞層）にて増加し，またED-A fibronectinの産生は血管内皮細胞で亢進している[2)]．このこ

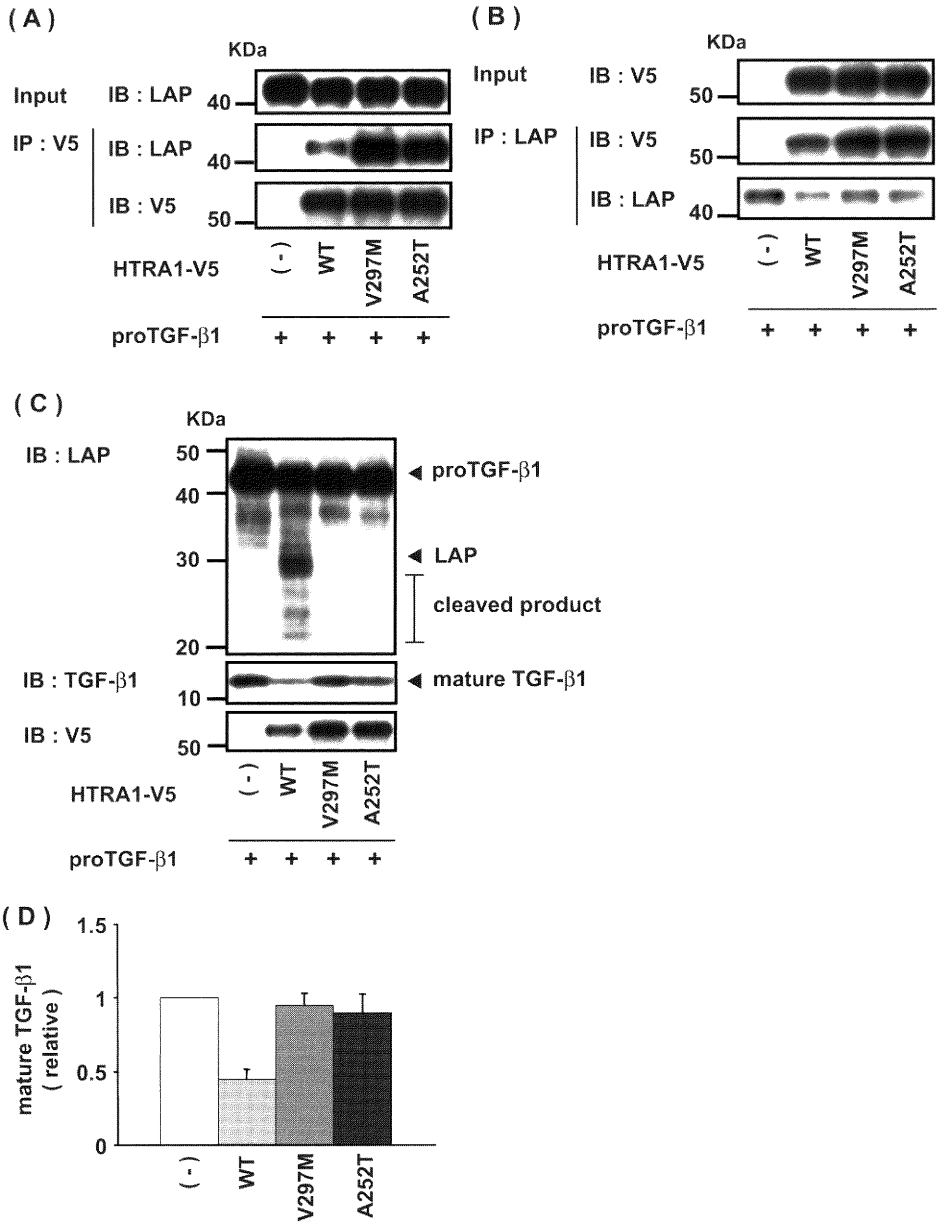


図 4　CARASIL 疾患関連変異型 HTRA1 は，pro－TGF－β と結合するが，切断しない

A, B：疾患関連変異型 HTRA1 と pro－TGF－β との結合を共免疫沈降法を用いて検討．いずれの抗体を用いた共免疫沈降においても，疾患関連変異型 HTRA1 と pro－TGF－β の結合を示す結果が得られた（A, B 中段）．Input（上段）は loading control，下段は免疫沈降が行われている事を示す．

C, D：疾患関連変異型 HTRA1 が pro－TGF－β を細胞内で切断するかを検討．野生型 HTRA1 を発現させた場合に見られる pro－TGF－β 分解産物は，疾患関連変異型 HTRA1（V297M, A252T）においては認められなかった（C）．加えて，疾患関連変異型 HTRA1 では培養液中の mature TGF－β の量の減少も認められなかった（C 中段，および D）．

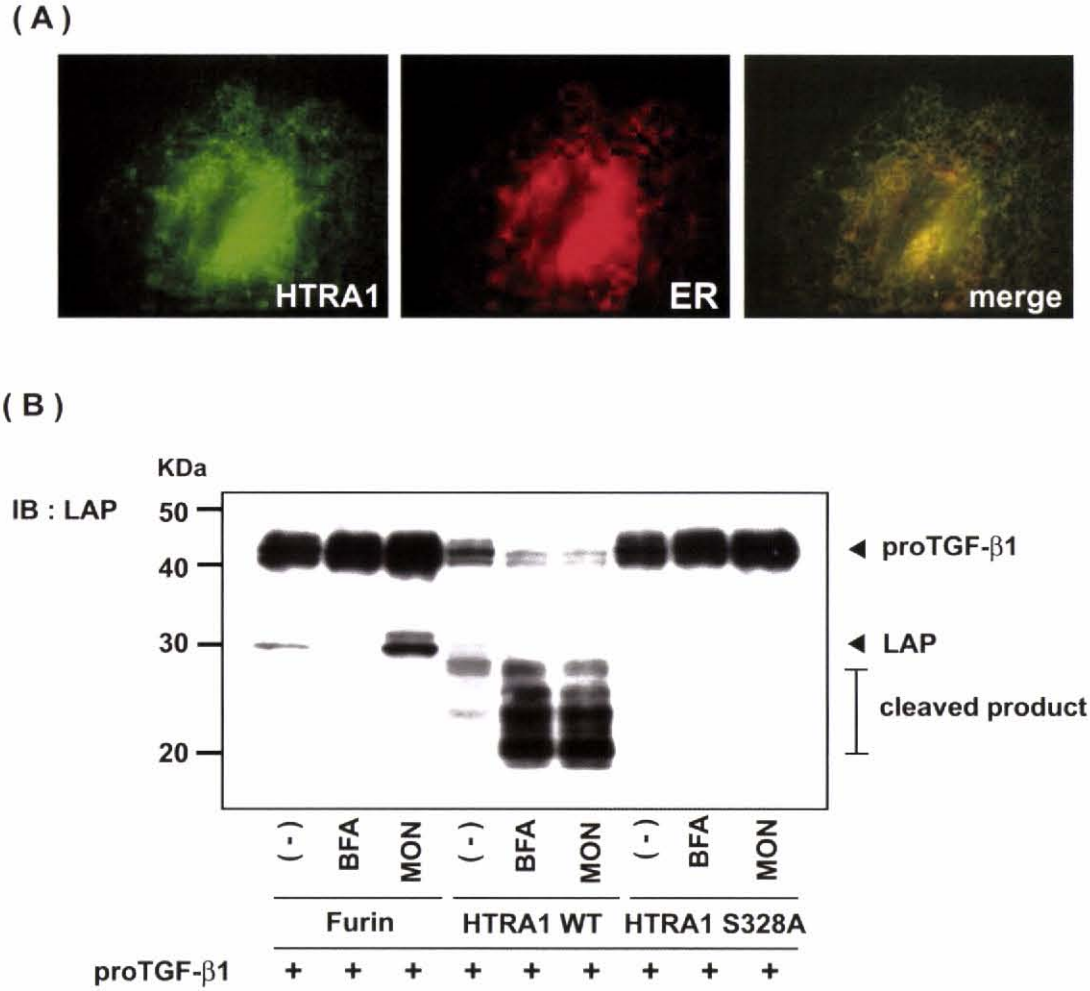


図5　HTRA1は小胞体でpro-TGF-βを切断する

A：共焦点レーザー顕微鏡によるHTRA1の細胞内局在の観察．HTRA1（緑）が細胞内では小胞体（ER，赤）に局在する．

B：細胞内のどこでpro-TGF-βの切断が起こるのかを検討．HEK293T細胞にpro-TGF-βおよびHTRA1を共発現させ，Bleferdin A（BFA）またはMonensin（MON）負荷下でのHTRA1によるpro-TGF-βの切断を検討した．Furinによるpro-TGF-βの切断は，BFA処理により阻害された．一方HTRA1によるpro-TGF-βの切断は，BFA処理およびMON処理のいずれにおいても阻害されなかった．

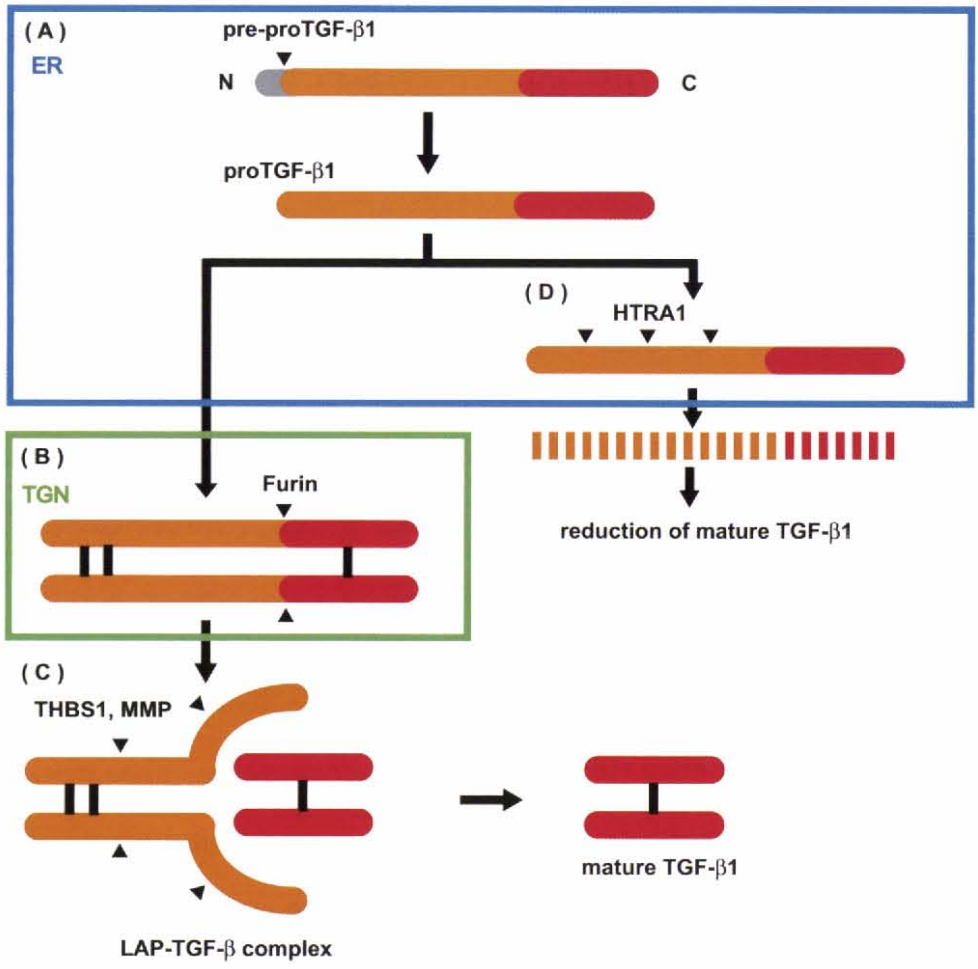


図 6　HTRA1 による TGF－β シグナルの抑制機序の模式図

A：TGF－β はシグナルペプチド（灰色）を持つ前駆体 TGF－β（pre－pro－TGF－β）として産生され，小胞体（ER）にてシグナルペプチドが分解され，前駆体 TGF－β（pro－TGF－β）となる．

B：pro－TGF－β は，トランスゴルジネットワーク（TGN）において前駆タンパク質転換酵素である furin などによって latency－associated protein（黄色）と成熟型 TGF－β（赤色）に分解され，不活性型である非共有結合性の複合体を形成する．

C：この複合体（LAP－TGF－β complex）は細胞外に分泌され，細胞外マトリックスに蓄積する．細胞外マトリックスに蓄積した複合体は，Thrombospondin－1（THBS－1）や matrix metalloproteinase（MMP）により LAP が分解され，活性型 TGF－β（mature TGF－β）となる．

D：HTRA1 は pro－TGF－β を小胞体にて分解し，正しい pro－TGF－β の成熟化を阻害することにより，mature TGF－β の産生の減少を引き起こす．

とは，平滑筋細胞が脳小血管でのTGF-β産生の主体であり，血管内皮細胞でTGF-βシグナルが亢進していることを示唆している．しかし，脳小血管でのHTRA1の発現分布やTGF-βの成熟化に関しては不明である．脳小血管は細胞外基質に乏しいため，TGF-βの成熟化は通常の組織とは異なる可能性がある．今回解明されたHTRA1によるTGF-βシグナル抑制機序が，脳の小血管環境ではどのように制御されているかについて，今後，モデルマウスや3次元培養などを用いて詳細に解析する必要がある．

結　　論

今回私は，HTRA1が小胞体にてpro-TGF-βを切断し，mature TGF-βの産生を抑えることで，TGF-βシグナルを抑制していることを明らかとした．CARASILにおけるTGF-βシグナルの異常がなぜ脳小血管に限局するのかは，いまだ明らかではない．HTRA1は脳小血管に発現しているので[24]，HTRA1が脳小血管で特異的にTGF-βファミリーシグナルの抑制を司っている可能性が挙げられる．今回私が明らかにした知見は，脳小血管における新しいTGF-βシグナルの制御機構の可能性を示し，CARASILおよび弧発性脳小血管病の分子病態機序の理解に寄与すると考える．

謝　辞

稿を終えるにあたり，御指導を賜りました新潟大学大学院医歯学総合研究科神経内科学分野 西澤 正豊 教授に深謝申し上げます．また，本研究にご協力頂きました新潟大学脳研究所生命科学リソース研究センター分子神経疾患資源解析学分野 小野寺 理 准教授，池内 健 先生に深謝致します．

参 考 文 献

1）Chui HC: Subcortical ischemic vascular dementia. Neurol Clin 25: 717-740, 2007.
2）Hara K, Shiga A, Fukutake T, Nozaki H, Miyashita A, Yokoseki A, Kawata H, Koyama A, Arima K, Takahashi T, Ikeda M, Shiota H, Tamura M, Shimoe Y, Hirayama M, Arisato T, Yanagawa S, Tanaka A, Nakano I, Ikeda S, Yoshida Y, Yamamoto T, Ikeuchi T, Kuwano R, Nishizawa M, Tsuji S and Onodera O: Association of HTRA1 mutations and familial ischemic cerebral small-vessel disease. N Engl J Med 360: 1729-1739, 2009.
3）Fukutake T and Hirayama K: Familial young-adult-onset arteriosclerotic leukoencephalopathy with alopecia and lumbago without arterial hypertension. Eur Neurol 35: 69-79, 1995.
4）Yanagawa S, Ito N, Arima K and Ikeda S: Cerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy. Neurology 58: 817-820, 2002.
5）Oide T, Nakayama H, Yanagawa S, Ito N, Ikeda S and Arima K: Extensive loss of arterial medial smooth muscle cells and mural extracellular matrix in cerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy（CARASIL）. Neuropathology 28: 132-142, 2008.
6）Tanoi Y, Okeda R and Budka H: Binswanger's encephalopathy, serial sections and morphometry of the cerebral arteries. Acta Neuropathol 100: 347-355, 2000.
7）Clausen T, Southan C and Ehrmann M: The HtrA family of proteases: implications for protein composition and cell fate. Mol Cell 10: 443-455, 2002.
8）Tocharus J, Tsuchiya A, Kajikawa M, Ueta Y, Oka C and Kawaichi M: Developmentally regulated expression of mouse HtrA3 and its role as an inhibitor of TGF-beta signaling. Dev Growth Differ 46: 257-274, 2004.
9）Oka C, Tsujimoto R, Kajikawa M, Koshiba-Takeuchi K, Ina J, Yano M, Tsuchiya A, Ueta Y, Soma A, Kanda H, Matsumoto M and Kawaichi M: HtrA1 serine protease inhibits signaling mediated by Tgfbeta family proteins. Development 131: 1041-1053, 2004.
10）Annes JP, Munger JS and Rifkin DB: Making sense of latent TGFbeta activation. J Cell Sci 116: 217-224, 2003.
11）Yamaguchi Y, Mann DM and Ruoslahti E:

Negative regulation of transforming growth factor-beta by the proteoglycan decorin. Nature. 346: 281-284, 1990.

12) Zacchigna L, Vecchione C, Notte A, Cordenonsi M, Dupont S, Maretto S, Cifelli G, Ferrari A, Maffei A, Fabbro C, Braghetta P, Marino G, Selvetella G, Aretini A, Colonnese C, Bettarini U, Russo G, Soligo S, Adorno M, Bonaldo P, Volpin D, Piccolo S, Lembo G and Bressan GM: Emilin1 links TGF-beta maturation to blood pressure homeostasis. Cell 124: 929-942, 2006.

13) Launay S, Maubert E, Lebeurrier N, Tennstaedt A, Campioni M, Docagne F, Gabriel C, Dauphinot L, Potier MC, Ehrmann M, Baldi A and Vivien D: HtrA1-dependent proteolysis of TGF-beta controls both neuronal maturation and developmental survival. Cell Death Differ 15: 1408-1416, 2008.

14) Canfield AE, Hadfield KD, Rock CF, Wylie EC and Wilkinson FL: HtrA1: a novel regulator of physiological and pathological matrix mineralization? Biochem Soc Trans 35: 669-671, 2007

15) Gilicze A, Kohalmi B, Pocza P, Keszei M, Jaeger J, Gorbe E, Papp Z, Toth S, Falus A and Wiener Z: HtrA1 is a novel mast cell serine protease of mice and men. Mol Immunol 44: 2961-2968, 2007.

16) Brunner AM, Marquardt H, Malacko AR, Lioubin MN and Purchio AF: Site-directed mutagenesis of cysteine residues in the pro region of the transforming growth factor beta 1 precursor. Expression and characterization of mutant proteins. J Biol Chem 264: 13660-13664, 1989.

17) Bedwell DM, Kaenjak A, Benos DJ, Bebok Z, Bubien JK, Hong J, Tousson A, Clancy JP and Sorscher EJ: Suppression of a CFTR premature stop mutation in a bronchial epithelial cell line. Nat Med 3: 1280-1284, 1997.

18) Correa-Cerro LS, Wassif CA, Waye JS, Krakowiak PA, Cozma D, Dobson NR, Levin SW, Anadiotis G, Steiner RD, Krajewska-Walasek M, Nowaczyk MJ and Porter FD: DHCR7 nonsense mutations and characterisation of mRNA nonsense mediated decay in Smith-Lemli-Opitz syndrome. J Med Genet 42: 350-357, 2005.

19) Hu SI, Carozza M, Klein M, Nantermet P, Luk D and Crowl RM: Human HtrA, an evolutionarily conserved serine protease identified as a differentially expressed gene product in osteoarthritic cartilage. J Biol Chem 273: 34406-34412, 1998.

20) Dubois CM, Blanchette F, Laprise MH, Leduc R, Grondin F and Seidah NG: Evidence that furin is an authentic transforming growth factor-beta1-converting enzyme. Am J Pathol 158: 305-316, 2001.

21) Dubois CM, Laprise MH, Blanchette F, Gentry LE and Leduc R: Processing of transforming growth factor beta 1 precursor by human furin convertase. J Biol Chem 270: 10618-10624, 1995.

22) Molloy SS, Thomas L, VanSlyke JK, Stenberg PE and Thomas G: Intracellular trafficking and activation of the furin proprotein convertase: localization to the TGN and recycling from the cell surface. EMBO J 13: 18-33, 1994.

23) Degnin C, Jean F, Thomas G and Christian JL: Cleavages within the prodomain direct intracellular trafficking and degradation of mature bone morphogenetic protein-4. Mol Biol Cell 15: 5012-5020, 2004.

24) Grau S, Baldi A, Bussani R, Tian X, Stefanescu R, Przybylski M, Richards P, Jones SA, Shridhar V, Clausen T and Ehrmann M: Implications of the serine protease HtrA1 in amyloid precursor protein processing. Proc Natl Acad Sci USA 102: 6021-6026, 2005.

（平成22年1月6日受付）