

1 脳小血管病患者でヘテロ接合性に認められた *high-temperature requirement A serine*
2 *peptidase 1 (HTRA1)* 変異の病的意義の検討

3

4

5 Association of heterozygous mutations in *high temperature requirement A serine*
6 *peptidase 1* and cerebral small vessel disease

7

8 著者 上村昌寛

9 所属 新潟大学脳研究所神経内科

10 主任教授 小野寺理

11 Author: Masahiro Uemura

12 Affiliation: Department of Neurology, Brain Research Institute,
13 Niigata University

14 Chief professor: Osamu Onodera

15

16 キーワード: 脳小血管病、HTRA1、ヘテロ接合体変異、優性阻害効果

17

18 別刷請求先: 〒951-8585 新潟県新潟市中央区旭町通1番町757
19 新潟大学脳研究所神経内科学分野 上村昌寛

20

21 抄録 918 字

22 本文 7181 字

23 参考文献 21 個 5675 字

24 合計文字数 13757 字(7.7 頁相当)

25 *1 頁につき和文 1800 字で合計 10 頁以内

26 図 3 個

27 表 2 個

28 フォント 指定なし

29

30

31

32

1 抄録

2

3 *High-temperature requirement A serine peptidase 1 (HTRA1)* 変異のホモもしくは複
4 合ヘテロ接合体は遺伝性脳小血管病をおこす。一方、近年、脳小血管病患者におい
5 て *HTRA1* 変異のヘテロ接合体が複数例報告された。*HTRA1*はセリンプロテアーゼで
6 あり、3量体となる事でその活性を調節している。筆者らは、*HTRA1*変異ヘテロ接合体
7 で認められた *HTRA1* 変異の病態機序として、変異型 *HTRA1* が優性阻害効果
8 (dominant negative effects: DN)を示すことを提唱してきた。本研究では、既報の変異
9 型 *HTRA1* の DN の有無を解析し、本仮説を検証した。

10 まず、既報の 15 種(S121R、A123S、R133G、R166C、R166L、A173P、A173T、
11 S284G、S284R、P285Q、F286V、G295R、A321T、L364P、D450H)の変異型
12 *HTRA1*の精製蛋白を作成し、カゼインを基質としてプロテアーゼ活性を測定した。そ
13 の結果、11種(S121R、R166C、R166L、A173P、173T、S284R、P285Q、
14 F286V、G295R、A321T、L364P)で、野生型 *HTRA1*と比較して有意な低下を認め
15 た。次に、野生型 *HTRA1*と変異型 *HTRA1*を混合しプロテアーゼ活性を測定したとこ
16 ろ、5種(R166L、A173P、A173T、S284R、G295R)でDNを認めた。さらに、ゲル濾
17 過クロマトグラフィーにて3量体形成能を解析したところ、DNを認める5種の変異のう
18 ち、4種(R166L、A173P、A173T、G295R)で3量体の形成不全を認めた。最後に
19 DNを認めたヘテロ接合体変異例17例とDNを認めないヘテロ接合体変異例9例の
20 臨床像を比較したところ、DNを認める群で症候性脳小血管病の頻度が有意に高かつ
21 た(76.5% vs 33.3%、 $p < 0.046$)。以上の結果から、DNを認める変異型 *HTRA1*は、ヘ
22 テロ接合体で症候性脳小血管病の発症に寄与するという仮説が支持された。

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

1 序文

2 脳小血管病は脳内小血管の障害により、ラクナ梗塞、脳出血、認知症や歩行障害な
3 どを起こす病態である¹⁾。脳小血管病は高血圧や加齢が危険因子となり、初老期以降
4 に高頻度に見られる。多くは非遺伝性であるが、遺伝性脳小血管病として cerebral
5 autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy
6 (CADASIL)²⁾、cerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and
7 leukoencephalopathy (CARASIL)³⁾などがある。

8 CARASIL は *high-temperature requirement A serine peptidase 1 (HTRA1)* の変異に
9 よって起こる常染色体劣性遺伝性の脳小血管病である。若年成人期に白質病変を伴
10 う認知症を発症し、脊椎症や禿頭を合併する³⁾。HTRA1 は血管、骨、皮膚組織などに
11 広く発現しているセリンプロテアーゼであり、様々な細胞外マトリックス蛋白やシグナル
12 関連分子を切断することにより、組織の恒常性維持に重要な役割を担っている^{4,5)}。
13 CARASIL では HTRA1 のプロテアーゼ活性の喪失により、脳小血管病を発症する³⁾。

14 CARASIL は *HTRA1* のホモ、もしくは複合ヘテロ接合体変異によって起こるが、近年、
15 *HTRA1* 変異をヘテロ接合体で有し、中年期以降に脳小血管病を呈する症例が複数
16 報告された⁶⁻⁹⁾(図1)。しかし、脳小血管病症例でヘテロ接合体性に認められた *HTRA1* 変異
17 の病的意義について議論が続いている^{6,7)}。これらの変異は、1例を除いて⁹⁾、ミスセン
18 ス変異であった^{6-8,10)}。実際、ナンセンス変異をホモ接合体で有する CARASIL 患者の
19 ほかの家系では、ヘテロ接合体変異を有する発端者の両親は脳小血管病を発症して
20 いない^{3,11-16)}。これらのナンセンス変異ではナンセンス変異依存性 mRNA 分解機構に
21 より変異アレルからの蛋白発現は、ほぼ皆無となる。この事実は HTRA1 の活性の
22 50%低下は、脳小血管病発症の十分条件にはならないことを示唆している。この事か
23 ら、*HTRA1* 変異ヘテロ接合体では、残存活性が50%以下となる事が推察される。

24 筆者らの研究グループは、*HTRA1* 変異ヘテロ接合体で認められた変異型 HTRA1
25 による脳小血管病の発症機序として、変異型 HTRA1 の優性阻害効果(dominant
26 negative effects: DN)を提唱している⁷⁾。HTRA1 は3量体を形成し、LDドメイン
27 (283-291 アミノ酸残基)とL3ドメイン(301-319 アミノ酸残基)を介し、隣接する HTRA1
28 を活性化する¹⁷⁾。これまで筆者らは、複数の重度の脳小血管病患者に、*HTRA1* 変異
29 をヘテロ接合体性に見だし、これらの変異が DN を持ち残存活性が50%以下となるこ
30 とを示した⁷⁾。その機序として、3量体形成ができない、もしくは、変異がLDドメインまた
31 はL3ドメインにあることを報告した⁷⁾。本研究では、ヘテロ接合体で報告された、他の
32 *HTRA1* 変異について、筆者らの仮説を検証することを目的とした。

1

2 材料と方法

3 解析の対象とした *HTRA1* 遺伝子変異

4 脳小血管病患者で報告されている 15 種類の *HTRA1* ミスセンス変異を解析の対象と
5 した(S121R、A123S、R133G、R166C、R166L、A173P、A173T、S284G、
6 S284R、P285Q、F286V、G295R、A321T、L364P、D450H)^{6, 8, 10-12, 16, 18, 19)}(表1)。
7 これらの変異のうち、10 種類はヘテロ接合体変異(S121R、A123S、R133G、R166L、
8 A173P、S284G、S284R、P285Q、F286V、D450H)⁶⁾、3 種類はホモ接合体または
9 複合ヘテロ接合体変異(A173T、A321T、L364P)^{11, 16, 19)}、2種類はホモ・ヘテロ接合
10 体変異の双方(R166C、G295R)^{8, 10, 12, 18)}で報告されていた。

11

12 *HTRA1* 遺伝子ヘテロ接合体変異を有する脳小血管病患者の臨床情報の収集と解析

13 文献検索により、前述の *HTRA1* ミスセンス変異を有する既報 19 例に本邦の優性阻
14 害変異をヘテロ接合体で有する既報 8 例の臨床情報を加え、後方視的に解析を行っ
15 た。これらのうち、75 歳未満で、頭部 magnetic resonance imaging (MRI) 所見が確認で
16 きた 26 例について、DN が症候性脳小血管病の発症に与える影響を検討した^{6-8, 10, 11)}。
17 白質病変の重症度については、頭部 MRI で認められる白質病変の半定量的な分類
18 方法である Fazekas 分類で Grade 3 かつ III の場合を重度白質病変と定義した。重度
19 白質病変に加え、認知機能障害または歩行障害を認める症例を、症候性脳小血管病
20 と定義した。症例を優性阻害変異の有無で 2 群に分け、症候性脳小血管病の頻度
21 について比較検討を行った。

22

23 *HTRA1* プロテアーゼ活性の測定

24 まず、野生型 (WT) *HTRA1* cDNA を pcDNA3.1/myc-His ベクター (Invitrogen) にクロー
25 ニングした。このコンストラクトをテンプレートとして、Gene Art Site directed
26 Mutagenesis Kit (ThermoFisher Scientific, A13282) を使用して、C 末端に myc-His6 を
27 付加した変異型 *HTRA1* を発現するベクターを作製した。それぞれのベクターは
28 Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit (Invitrogen) を用いて濃度測定を行った⁷⁾。

29 次に、作成した *HTRA1* 発現ベクター 30 μ g を 293fectin Transfection Reagent
30 (Invitrogen, 12347-019) を用いて FreeStyle 293 細胞 (Invitrogen, R370-07) にトラ
31 ンスフェクションした。72 時間後に細胞培養液を回収し、HisTrap FF crude column
32 (GE Healthcare, 17528601) を用いて *HTRA1* 蛋白の精製を行った。精製蛋白はイミ

1 ダゾール含有バッファー (20 mM phosphate、500 mM NaCl、500 mM imidazole、pH 7.4)
2 で溶出した後、Slide A Lyser Dialysis Cassettes (Invitrogen、0087722) を用いてイミダ
3 ザール非含有バッファー (100 mM Tris-HCl、150 mM NaCl、pH 8.0) に置換した。

4 精製したそれぞれの HTRA1 蛋白 $1.0 \mu\text{g}$ について、fluorescein isothiocyanate
5 (FITC)-labeled casein (Invitrogen、0023267) $1.0 \mu\text{g}$ を基質として、 37°C 、10 分間のプ
6 レインキュベーションの後に FilterMax F5 Multi-Mode Microplate Readers (Molecular
7 Devices、5008528 A) を用いて、経時的に 90 分間蛍光値を測定して、プロテアーゼ
8 活性を解析した。この際、WT と HTRA1 のプロテアーゼ活性を喪失した活性中心の変
9 異である S328A をそれぞれ陽性と陰性コントロールとして用いた⁷⁾。

10

11 変異型 HTRA1 による DN の評価

12 既報に従い、DN の評価は、精製 WT HTRA1 と精製変異型 HTRA1 の混合ではなく、
13 WT HTRA1 と変異型 HTRA1 を共発現したサンプルの精製によって得られた混合
14 HTRA1 蛋白を用いて行った⁷⁾。まず、PCR により WT HTRA1 cDNA の C 末端に His6
15 タグ-停止コドンが付加し、pcDNA3.1/myc-His ベクターにクローニングした。次に WT
16 HTRA1 C 末 His6 発現ベクターと変異型 HTRA1 C 末 myc-His6 発現ベクターを 15
17 μg ずつ (合計 $30 \mu\text{g}$) 293fectin Transfection Reagent を用いて FreeStyle 293 細胞に
18 トランスフェクションし、WT HTRA1 と変異型 HTRA1 を共発現した。72 時間後に培養
19 液を回収し、前述と同様の方法で HTRA1 蛋白を精製した。WT HTRA1 と変異型
20 HTRA1 の混合した精製 HTRA1 蛋白 $1.0 \mu\text{g}$ について、FITC-labeled casein $1.0 \mu\text{g}$
21 を基質として、前述と同様の方法を用いて蛍光値の測定を行った。この際、既報にて
22 DN を認めない HTRA1 A252T と WT HTRA1 の混合蛋白 (A252T/WT) を陰性コント
23 ロールに、DN を認める HTRA1 G283E と WT HTRA1 の混合蛋白 (G283E/WT) を陽
24 性コントロールに用いた⁷⁾。またプロテアーゼ活性を喪失しているが、3量体を形成し、
25 さらに L3 と LD ドメインの変異でもない人工変異体 S328A と WT HTRA1 の混合蛋白
26 (S328A/WT) を DN の基準として用いた⁷⁾。この混合蛋白よりも有意に低い値を示す変
27 異型 HTRA1 と WT HTRA1 の混合蛋白を DN ありと判定した⁷⁾。

28

29 HTRA1 蛋白の多量体形成の評価

30 HTRA1 蛋白の多量体形成は Tris-buffered saline (100 mM Tris-HCl [pH 8.0]、150
31 mM NaCl) で平衡化した Superdex 200 10/300 GL column (GE Healthcare) を使用し、
32 AKTA FPLC workstation (Amersham Biosciences) によるゲル濾過クロマトグラフィー

1 で評価した。それぞれの変異型 HTRA1 蛋白を $0.5 \mu\text{g/mL}$ に調整し、 37°C 、30 分間で
2 プレインキュベーションした後に $500 \mu\text{L}$ 注入して解析した。解析したデータを元にし
3 て、キャリブレーション曲線を作成した。この実験では、既報に従い、3 量体形成を認
4 める S328A と 3 量体形成が阻害されている人工変異体 Y169E/F171E をコントロール
5 として用いた⁷⁾。

6

7 統計学的解析

8 統計解析は R 3.2.2 を使用した。One-way analysis of variance (ANOVA) を実施した
9 後に、post hoc 解析として Dunnett の検定を行った。また臨床症状の比較検討には
10 Fisher's exact test を使用した。P-value < 0.05 を統計学的有意差ありと判定した。

11

12 結果

13 変異型 HTRA1 のプロテアーゼ活性解析

14 15 種類の変異型 HTRA1 (S121R、A123S、R133G、R166C、R166L、A173P、
15 A173T、S284G、S284R、P285Q、F286V、G295R、A321T、L364P、D450H)
16 のプロテアーゼ活性を解析した (図 2A)。その結果、WT と比較して、2 変異 (A123S と
17 R133G) で有意に高く、2 変異 (S284G と D450H) は有意差がなく、11 変異 (S121R、
18 R166C、R166L、A173P、A173T、S284R、P285Q、F286V、G295R、A321T、L364P) は有
19 意に低下していた。以後の実験では、WT に比してプロテアーゼ活性が高い A123S と
20 R133G 変異を除外した 13 変異を解析対象とした。

21

22 変異型 HTRA1 の DN の解析

23 次に、13 種類の変異型 HTRA1 (S121R、A123S、R133G、R166C、R166L、
24 A173P、A173T、S284R、P285Q、F286V、G295R、A321T、L364P) について、
25 WT HTRA1 のプロテアーゼ活性に対する DN を既報に準じて検討した (図 2B、C)⁷⁾。
26 その結果、5 変異 (R166L/WT、A173P/WT、A173T/WT、S284R/WT、
27 G295R/WT) で WT HTRA1 との混合蛋白のプロテアーゼ活性が S328A/WT よりも有
28 意に低下しており、DN を認めた (図 2B、C)。その他、1 変異 (R166C/WT) は
29 S328A/WT と有意差がなく、7 変異 (S121R/WT、S284G/WT、P285Q/WT、
30 F286V/WT、A321T/WT、L364P/WT、D450H/WT) では S328A/WT よりも有意に
31 上昇していたため、これら 8 変異については DN なしと判定した。

32

1 変異型 HTRA1 の多量体構造の評価

2 続いて、DN を検討した 13 変異について、多量体の形成をゲル濾過クロマトグラフィー
3 で評価した(図 3)。3 量体となる S328A では約 295 kDa に、単量体となる
4 Y169E/F171E では約 95 kDa にピークを認めた(図 3A)。DN を認めた 5 変異中 4 変
5 異(R166L、A173P、A173T、G295R)に加え、R166C で約 95 kDa にピークを認め
6 た。DN を認めた 5 変異のうち、変異が LD ドメインに位置する S284R は約 295 kDa に
7 ピークを認めた(図 3B)。

8

9 *HTRA1* 優性阻害変異のヘテロ接合体と脳小血管病の重症度の関連

10 *HTRA1* 変異をヘテロ接合体で有する脳小血管病患者 26 例の臨床像を、自験例と、
11 文献例を合わせて検討した^{6-8, 10, 11})。DN を有する 8 変異 17 症例 (R166L、A173P、
12 G283E、S284R、P285L、G295R、R302Q、T319I)と DN を認めなかった 9 変異 9
13 症例(S121R、A123S、R133G、R166C、S284G、P285Q、F286V、A321T、
14 D450H)の 2 群に分けて症候性脳小血管病の頻度を比較した。その結果、症候性脳
15 小血管病の頻度は DN を有する群で有意に高かった(76.5% vs 33.3%、 $p = 0.046$)。

16

17 考察

18 本研究では、脳小血管病患者でヘテロ接合性に報告された 15 種の *HTRA1* 変異に
19 ついて解析を行った。その結果、新たに 5 種の DN をもつ変異を同定し、それらの変異
20 が 3 量体を形成しないもの(R166L、A173P、A173T、G295R)と LD ドメインに位置
21 するもの(S284R)に分類できることを示した。前者は *HTRA1* の 3 量体形成に影響し、
22 後者は 3 量体形成後の活性化機序に影響し、変異型 *HTRA1* のプロテアーゼ活性だ
23 けでなく、正常アレル由来の *HTRA1* のプロテアーゼの活性も阻害すると推察される。
24 この結果は、筆者らのグループが提唱している、3 量体を形成しない変異、もしくは LD
25 あるいは L3 ドメインの変異により、DN を示すという仮説を支持した⁷⁾。最後に、脳小血
26 管病症例を DN の有無によって 2 群に分けて臨床像を比較し、DN を認める症例では
27 症候性脳小血管病を呈する頻度が有意に高いことを示した。このことから、DN を持つ
28 変異は、脳小血管病に対して、より病的意義を持つと推察した。

29 一方、WT と比較して、活性の低下を認めなかった 4 変異 A123S、R133G、S284G、
30 D450H に関しては、ホモ接合体の CARASIL の報告も無く、病的意義は無いと考える
31 ⁶⁾。これらは何れも *in silico* 解析では病原性が疑われていた稀な変異である。このよう
32 な新規変異に関する病原性については、従来いわれているように、*in silico* 解析のみ

1 では不十分で、家系内解析や、症例の集積、さらに生化学的解析が必須であることを
2 示す²⁰⁾。特に脳小血管病は、初老期ではありふれた病態であり、ヘテロ接合体での病的
3 的意義の解釈は、より慎重であるべきである。

4 また、HTRA1 のプロテアーゼ活性低下を示すが DN を示さなかった 6 変異 (S121R、
5 R166C、173T、P285Q、F286V、A321T、L364P) については、ヘテロ接合体の状態で、
6 脳小血管病の発症に寄与する可能性は否定できない。これらは、ホモ接合体であれ
7 ば CARASIL を来しうると考えられ、実際 R166C と A173T 変異のホモ接合体では
8 CARASIL の報告がある^{16, 18)}。しかし、40 歳代で重度白質病変を伴う歩行障害を呈し
9 た F286V ヘテロ接合体症例を除き⁶⁾、重度白質病変を伴わないか、症状が無く、さら
10 に各変異について各々一例の報告しか無い⁶⁾。これらの変異型 HTRA1 の病的意義に
11 ついては、さらなる症例の集積、家系解析を行う必要がある。

12 DN を持つ *HTRA1* 変異のヘテロ接合体でも、全例が症候性脳小血管病を呈しては
13 いなかった。これまでに、筆者らは高血圧、喫煙、大酒などの血管病危険因子が病態
14 を修飾する可能性を指摘してきた⁷⁾。また、HTRA1 の転写調節領域における一塩基多
15 型が *HTRA1* の発現量に関与していることが報告されている²¹⁾。この様な環境、遺伝子
16 による修飾が、脳小血管病の病態に寄与している可能性もあり、今後これらの解析が
17 必要である。

18 結語

19 DN を示す *HTRA1* 変異は、3 量体を形成しない変異、または LD もしくは L3 ドメインの
20 変異であり、ヘテロ接合体でも症候性脳小血管病の発症に寄与する。
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32

文献

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32

- 1) Pantoni L: Cerebral small vessel disease: from pathogenesis and clinical characteristics to therapeutic challenges. *Lancet Neurol* 9:689-701, 2010.
- 2) Joutel A, Corpechot C, Ducros A, Vahedi K, Chabriat H, Mouton P, Alamowitch S, Domenga V, Cecillion M, Marechal E, Maciazek J, Vayssiere C, Cruaud C, Cabanis EA, Ruchoux MM, Weissenbach J, Bach JF, Bousser MG and Tournier-Lasserre E: Notch3 mutations in CADASIL, a hereditary adult-onset condition causing stroke and dementia. *Nature* 383:707-710, 1996.
- 3) 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.
- 4) Oka C, Tsujimoto R, Kajikawa M, Koshiha-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.
- 5) Shiga A, Nozaki H, Yokoseki A, Nihonmatsu M, Kawata H, Kato T, Koyama A, Arima K, Ikeda M, Katada S, Toyoshima Y, Takahashi H, Tanaka A, Nakano I, Ikeuchi T, Nishizawa M and Onodera O: Cerebral small-vessel disease protein HTRA1 controls the amount of TGF-beta1 via cleavage of proTGF-beta1. *Human molecular genetics* 20:1800-1810, 2011.
- 6) Verdura E, Herve D, Scharrer E, Amador Mdel M, Guyant-Marechal L, Philippi A, Corlobe A, Bergametti F, Gazal S, Prieto-Morin C, Beaufort N, Le Bail B, Viakhireva I, Dichgans M, Chabriat H, Haffner C and Tournier-Lasserre E: Heterozygous HTRA1 mutations are associated with autosomal dominant cerebral small vessel disease. *Brain*

- 1 138:2347-2358, 2015.
- 2 7) Nozaki H, Kato T, Nihonmatsu M, Saito Y, Mizuta I, Noda T, Koike R,
3 Miyazaki K, Kaito M, Ito S, Makino M, Koyama A, Shiga A, Uemura M,
4 Sekine Y, Murakami A, Moritani S, Hara K, Yokoseki A, Kuwano R, Endo
5 N, Momotsu T, Yoshida M, Nishizawa M, Mizuno T and Onodera O:
6 Distinct molecular mechanisms of HTRA1 mutants in manifesting
7 heterozygotes with CARASIL. *Neurology* 86:1964-1974, 2016.
- 8 8) Di Donato I, Bianchi S, Gallus GN, Cerase A, Taglia I, Pescini F,
9 Nannucci S, Battisti C, Inzitari D, Pantoni L, Zini A, Federico A and
10 Dotti MT: Heterozygous mutations of HTRA1 gene in patients with
11 familial cerebral small vessel disease. *CNS Neurosci Ther*, 2017.
- 12 9) Tateoka T, Onda H, Hirota K, Kasuya H, Shinohara T, Kinouchi H and
13 Akagawa H: Unusual case of cerebral small vessel disease with a
14 heterozygous nonsense mutation in HTRA1. *J Neurol Sci* 362:144-146,
15 2016.
- 16 10) Bougea A, Velonakis G, Spantideas N, Anagnostou E, Paraskevas G,
17 Kapaki E and Kararizou E: The first Greek case of heterozygous cerebral
18 autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and
19 leukoencephalopathy: An atypical clinico-radiological presentation.
20 *Neuroradiol J*:1971400917700168, 2017.
- 21 11) Bianchi S, Di Palma C, Gallus GN, Taglia I, Poggiani A, Rosini F, Rufa A,
22 Muresanu DF, Cerase A, Dotti MT and Federico A: Two novel HTRA1
23 mutations in a European CARASIL patient. *Neurology* 82:898-900, 2014.
- 24 12) Mendioroz M, Fernandez-Cadenas I, Del Rio-Espinola A, Rovira A, Sole
25 E, Fernandez-Figueras MT, Garcia-Patos V, Sastre-Garriga J,
26 Domingues-Montanari S, Alvarez-Sabin J and Montaner J: A missense
27 HTRA1 mutation expands CARASIL syndrome to the Caucasian
28 population. *Neurology* 75:2033-2035, 2010.
- 29 13) Preethish-Kumar V, Nozaki H, Tiwari S, Vengalil S, Bhat M, Prasad C,
30 Onodera O, Uemura M, Doniparthi S, Saini J, Nashi S, Polavarapu K and
31 Nalini A: CARASIL families from India with 3 novel null mutations in the
32 HTRA1 gene. *Neurology* 89:2392-2394, 2017.

- 1 14) Cai B, Zeng J, Lin Y, Lin Y, Lin W, Lin W, Li Z and Wang N: A frameshift
2 mutation in HTRA1 expands CARASIL syndrome and peripheral small
3 arterial disease to the Chinese population. *Neurol Sci* 36:1387-1391,
4 2015.
- 5 15) Bayrakli F, Balaban H, Gurelik M, Hizmetli S and Topaktas S: Mutation
6 in the HTRA1 gene in a patient with degenerated spine as a component of
7 CARASIL syndrome. *Turk Neurosurg* 24:67-69, 2014.
- 8 16) Khaleeli Z, Jaunmuktane Z, Beaufort N, Houlden H, Haffner C, Brandner
9 S, Dichgans M and Werring D: A novel HTRA1 exon 2 mutation causes
10 loss of protease activity in a Pakistani CARASIL patient. *J Neurol*
11 262:1369-1372, 2015.
- 12 17) Truebestein L, Tennstaedt A, Monig T, Krojer T, Canellas F, Kaiser M,
13 Clausen T and Ehrmann M: Substrate-induced remodeling of the active
14 site regulates human HTRA1 activity. *Nat Struct Mol Biol* 18:386-388,
15 2011.
- 16 18) Menezes Cordeiro I, Nzwalo H, Sa F, Ferreira RB, Alonso I, Afonso L and
17 Basilio C: Shifting the CARASIL paradigm: report of a non-Asian family
18 and literature review. *Stroke* 46:1110-1112, 2015.
- 19 19) Wang XL, Li CF, Guo HW and Cao BZ: A novel mutation in the HTRA1
20 gene identified in Chinese CARASIL pedigree. *CNS Neurosci Ther*
21 18:867-869, 2012.
- 22 20) Miosge LA, Field MA, Sontani Y, Cho V, Johnson S, Palkova A,
23 Balakishnan B, Liang R, Zhang Y, Lyon S, Beutler B, Whittle B, Bertram
24 EM, Enders A, Goodnow CC and Andrews TD: Comparison of predicted
25 and actual consequences of missense mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A*
26 112:E5189-5198, 2015.
- 27 21) Iejima D, Itabashi T, Kawamura Y, Noda T, Yuasa S, Fukuda K, Oka C
28 and Iwata T: HTRA1 (high temperature requirement A serine peptidase
29 1) gene is transcriptionally regulated by insertion/deletion nucleotides
30 located at the 3' end of the ARMS2 (age-related maculopathy
31 susceptibility 2) gene in patients with age-related macular degeneration. *J*
32 *Biol Chem* 290:2784-2797, 2015.

1 図1 *HTRA1* ヘテロ接合体変異で報告された症例

2 略語; SP: signal peptide、IGFBP: insulin-like growth factor binding proteins、KM:
3 Kazal type serine protease inhibitor motif、Protease: trypsin-like domain、PDZ:
4 PDZ domain
5 青字の変異はヘテロ接合体において明らかな脳小血管病の発症例が確認されてい
6 ない。

7

8 図2 変異型 *HTRA1* の機能解析

9 (A) *HTRA1* 変異を組み込んだ発現ベクターを FreeStyle293 にトランスフェクションした
10 後に回収した培養液より変異 *HTRA1* 蛋白を精製した。プロテアーゼ活性は精製
11 *HTRA1* 蛋白 1.0 μ g と fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled casein 1.0 μ g を基
12 質として経時的に蛍光値を測定することにより解析した。この実験では、野生型(WT)
13 *HTRA1* を陽性コントロールとし、人工的にプロテアーゼ活性に変異を加えた S328A を
14 陰性コントロールとして使用した。プロテアーゼ活性は、WTと比較して、2変異(A123S
15 と R133G)で有意に高く、(S284G と D450H)は WT と同等であり、残りの 11 変異
16 (S121R、R166C、R166L、A173P、173T、S284R、P285Q、F286V、G295R、
17 A321T、L364P)は有意に低下していた。(B、C) WT を組み込んだ発現ベクターと
18 *HTRA1* 変異を組み込んだ発現ベクターを FreeStyle293 に等量ずつトランスフェクシ
19 ョンした後、回収した培養液から混合変異 *HTRA1* 蛋白を精製した。プロテアーゼ活性
20 は FITC-labeled casein を基質として測定した。S328A/WT を基準とし、これより低いも
21 のを優性阻害効果ありと判定した。この実験では G283E/WT を陽性コントロールに、
22 A252T/WT を陰性コントロールとした。13 変異の中で 7 変異 (S121R/WT、
23 S284G/WT、P285Q/WT、F286V/WT、A321T/WT、L364P/WT、D450H/WT)
24 は S328A/WT よりも有意に上昇していた。1 変異(R166C)は S328A/WT と有意差を認
25 めなかった。5 変異(R166L、A173P、A173T、S284R、G295R) は S328A/WT より
26 も有意に低下していた。

27 * $p < 0.05$ 、*** $p < 0.0001$

28

29 図3 変異型 *HTRA1* の3量体形成能

30 (A) *HTRA1* 蛋白の多量体形成は平衡化した Superdex 200 10/300 GL column (GE
31 Healthcare) を使用し、AKTA FPLC workstation (Amersham Biosciences) によるゲ
32 ル濾過クロマトグラフィーで評価した。分子量は標準蛋白である thyroglobulin (669

1 kDa)、ferritin (440 kDa)、aldolase (158 kDa)、conalbumin (75 kDa)、ovalbumin (44 kDa)
2 でキャリブレーション曲線を作成して推定した。空隙容積(void volume:Vo)は dextran
3 2000 を使用して決定した。Voと標準蛋白はそれぞれグラフ上部の矢頭で示している。
4 S328A は 3 量体のコントロールとして使用した。一方、3 量体形成能が障害されている
5 Y169E/F171E は単量体のコントロールとして使用した。ゲル濾過クロマトグラフィー後
6 に、キャリブレーション曲線を作成したところ S328A では約 295 kDa に、Y169E/F171E
7 では約 95 kDa に曲線のピークを認めた。(B) ホモ接合体もしくは複合型ヘテロ接合体
8 で認められた 5 変異のうち、3 変異 (R166C、A173T、G295R) で約 95 kDa に曲線のピ
9 ークを認めた。(C) ヘテロ接合体のみで報告されている残る 8 変異のうち、2変異
10 (R166L、A173P) で約 95 kDa に曲線のピークを認めた。優性阻害効果を認めた
11 S284R は約 295 kDa に曲線のピークを認めた。

表 1 *HTRA1* ヘテロ接合体ミスセンス変異で報告された症例

No	AA/ c.DNA	多量体 構造	プロテアーゼ 活性	DN	症例 (n)	重度白質 病変 (n)	症候性 脳小血管病 (n)	文献
1	S121R c.361A>C	Trimer	低下	-	1	0	0	6
2	A123S c.367G>T	N.A	増加	-	1	0	0	6
3	R133G c.397C>G	N.A	増加	-	1	0	0	6
4	R166C c.496C>T	Monomer	低下	-	1	1	1	10
5	R166L c.496G>T	Monomer	低下	+	3	2	2	6
6	A173P c.517G>C	Monomer	低下	+	1	1	1	6
7	G283E c.848G>A	No Peak	低下	+	1	1	1	7
8	S284G c.517G>A	Trimer	同等	-	1	1	0	6
9	S284R c.852C>A	Trimer	低下	+	1	1	0	6
10	P285Q c.854C>A	Trimer	低下	-	1	0	0	6
11	P285L c.854C>T	Trimer	低下	+	2	2	2	7
12	F286V c.856T>G	Trimer	低下	-	1	1	1	6
13	G295R c.883G>A	Monomer	低下	+	4	2	2	8

14	R302Q c.905G>A	Trimer	低下	+	4	4	4	7
15	T319I c.956C>T	No Peak	低下	+	1	1	1	7
16	A321T c.961G>A	Trimer	低下	-	1	0	0	11
17	D450H c.1348G>C	Trimer	同等	-	1	1	1	6

略語; AA = Amino Acids、DN = dominant negative effects、N.A = Not available。重度白質病変は Fazekas grade 3 かつ III と定義。症候性脳小血管病は重度白質病変に加え認知機能障害または歩行障害を認める症例と定義。

表 2 優性阻害効果の有無と臨床症状との解析

	DN (+) n = 17 (65.4 %)	DN (-) n = 9 (34.6 %)	p-value
重度白質 病変	14 (82.4 %)	4 (44.4 %)	0.078
症候性 脳小血管病	13 (76.5 %)	3 (33.3 %)	0.046

略語; DN = dominant negative effect。

図1 報告されているHTRA1へテロ接合体変異

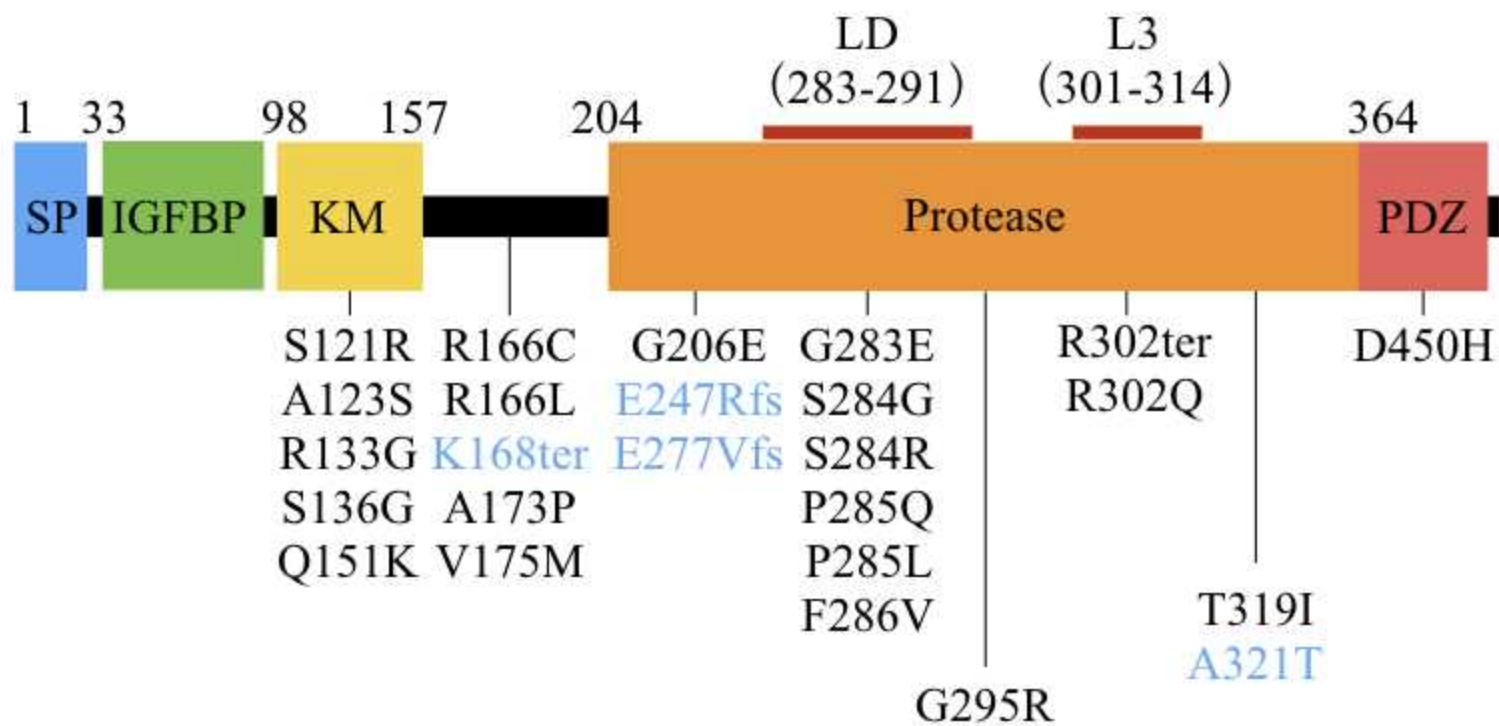


図2 変異型HTRA1の機能解析

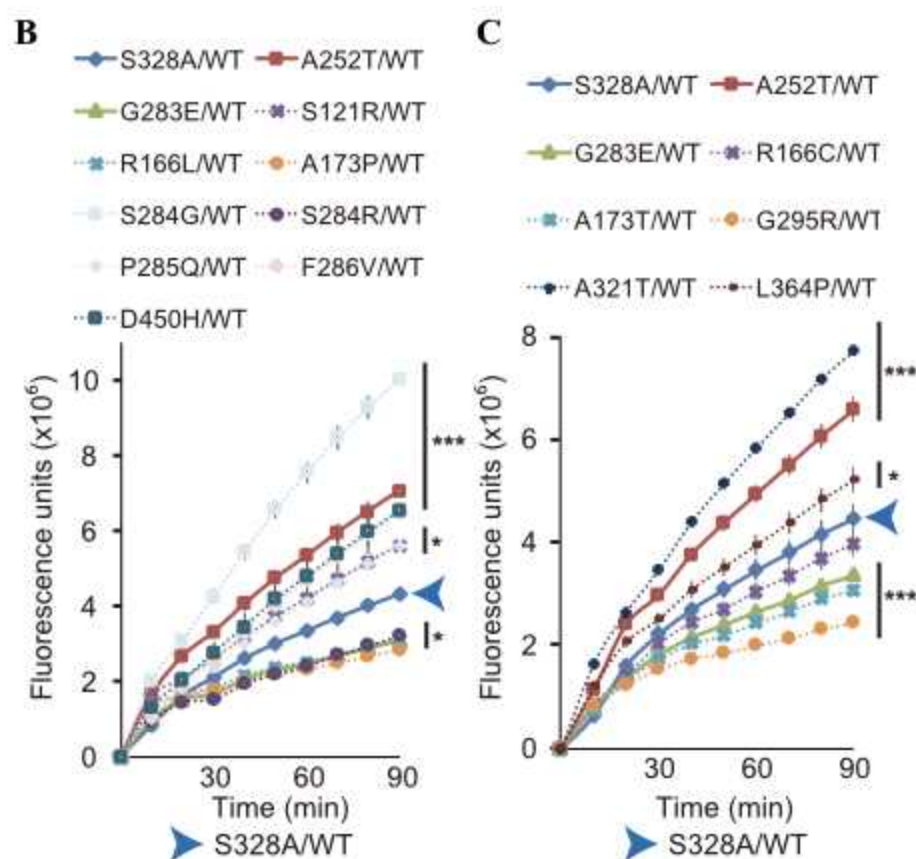
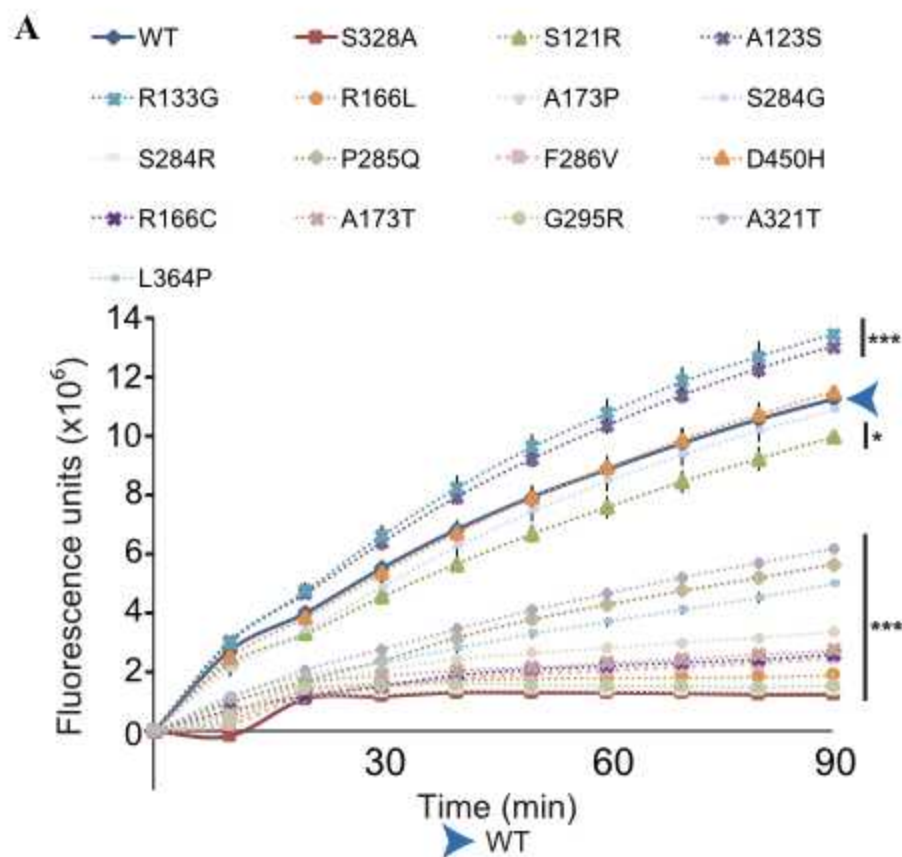


図3 変異型HTRA1の3量体形成能

