

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名	上村 昌寛
学位	博士 (医学)
学位記番号	新大院博 (医) 第 787 号
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
博士論文名	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 peptidase 1 (HTRA1) 変異の病的意義の検討
論文審査委員	主査 教授 五十嵐 博中 副査 准教授 武井 延之 副査 教授 小野寺 理

博士論文の要旨

背景と目的

High-temperature requirement A serine peptidase 1 (HTRA1) 変異のホモもしくは複合ヘテロ接合体は HTRA1 のプロテアーゼ活性低下による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て HTRA1 変異のヘテロ接合体が複数例報告された。HTRA 1 は 3 量体形成後に分子間のクロストークを行うことによってプロテアーゼ機能を獲得するという特徴を有する。申請者らの研究グループは、ヘテロ接合性に認められた HTRA1 変異による脳小血管病の発症機序として、HTRA1 の 3 量体形成不全もしくは 3 量体形成後のクロストークの障害による優性阻害効果を提唱している。しかし、既報の変異型 HTRA1 のうち、優性阻害効果を含めた機能解析が行われているものは少ない。本研究では、既報の変異型 HTRA1 の機能解析を行うことにより、その病的意義を明らかにし、本仮説を検証することを目的とした。

方法

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した (S121R、A123S、R133G、R166C、R166L、A173P、A173T、S284G、S284R、P285Q、F286V、G295R、A321T、L364P、D450H)。まず、精製したそれぞれの HTRA1 蛋白を、fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled casein を基質とし、経時的に 90 分間蛍光値を測定して、プロテアーゼ活性を解析した。次に、優性阻害効果を確認するために、WT HTRA1 と変異型 HTRA1 を混合した精製 HTRA1 蛋白について、同様の方法で蛍光値を測定した。さらに、HTRA1 蛋白の多量体形成をゲル濾過クロマトグラフィーにより評価した。最後に、優性阻害効果が症候性脳小血管病の発症に与える影響について後方視的に検討を行った。臨床情報の収集は、文献を渉猟し、75 歳未満で撮影された頭部 MRI が確認できた 26 例を対象とした。症候性脳小血管病を頭部 MRI の白質病変が Fazekas 分類の Grade 3 かつ III に相当し、かつ、認知機能障害または歩行障害を合併している状態と定義した。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について比較検討を行った。

結果

15 種の変異型 HTRA 1 のプロテアーゼ活性を測定した結果、11 種 (S121R、R166C、R166L、A173P、173T、S284R、P285Q、F286V、G295R、A321T、L364P) で、野生型 HTRA1 と比較して有意な低下を認めた。続いて、野生型 HTRA1 と変異型 HTRA1 の混合蛋白のプロテアーゼ活性を測定した結果、5 種 (R166L/WT、A173P/WT、A173T/WT、S284R/WT、G295R/WT) で優性阻害効果を認めた。続いて、ゲル濾過クロマトグラフィーで 3 量体形成能を解析したところ、優性阻害効果を認める 5 種の変異のうち、4 種 (R166L、A173P、A173T、G295R) で 3 量体の形成不全を認めた。最後に優性阻害効果を認めた 8 変異 17 例と優性阻害効果を認めない 9 変異 9 例の臨床像を比較したところ、優性阻害効果を認める群で症候性脳小血管病の頻度が有意に高かった (76.5% vs 33.3%、 $p < 0.046$)。

考察

本研究により、新たに 5 種の優性阻害効果を持つ *HTRA1* 変異を同定した。それらの変異のうち、4 種 (R166L、A173P、A173T、G295R) で 3 量体の形成不全を認めた。残る 1 種 (S284R) は 3 量体形成後のクロストークに重要な LD ドメイン (283-291 アミノ酸残基) の変異であった。以上の結果は、変異型 *HTRA1* の 3 量体形成不全もしくは 3 量体形成後のクロストークの障害によって優性阻害効果がおこるとする申請者らの仮説を支持するものである。さらに、優性阻害効果を認める *HTRA1* 変異のヘテロ接合体症例は、優性阻害効果を認めない群と比較して、症候性脳小血管病の頻度が有意に高いことを明らかにした。このことから、優性阻害効果を持つ変異は、脳小血管病の病態進行に対して、より高い病的意義を持つ可能性があると考えた。脳小血管病は孤発例において頻度の高い疾患であるため、ヘテロ接合体で同定された *HTRA1* 変異の病原性の解釈は慎重であるべきである。本研究で用いた生化学的な解析はこの病的意義の検討に有用である。

結語

優性阻害効果を示す *HTRA1* 変異は 3 量体を形成しない変異、または 3 量体形成後のクロストークに重要なドメインの変異であり、ヘテロ接合体で症候性脳小血管病の発症に寄与する。

審査結果の要旨

High-temperature requirement A serine peptidase 1 (HTRA1) 変異のホモもしくは複合ヘテロ接合体は *HTRA1* のプロテアーゼ活性低下による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て *HTRA1* 変異のヘテロ接合体が複数例報告された。*HTRA 1* は 3 量体形成後に分子間のクロストークを行うことによってプロテアーゼ機能を獲得するという特徴を有する。申請者らの研究グループは、ヘテロ接合性に認められた *HTRA1* 変異による脳小血管病の発症機序として、*HTRA1* の 3 量体形成不全もしくは 3 量体形成後のクロストークの障害による優性阻害効果を提唱している。しかし、既報の変異型 *HTRA1* のうち、優性阻害効果を含めた機能解析が行われているものは少ない。申請者は、既報の変異型 *HTRA1* の機能解析を行うことにより、その病的意義を明らかにし、本仮説を検証することを目的とし、優性阻害効果を呈する遺伝子変異および呈さない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した比較検討を行った。

5 種の変異型 *HTRA 1* のプロテアーゼ活性を測定した結果、11 種で、野生型 *HTRA1* と比較して

有意な低下を認めた。続いて、野生型 *HTRA1* と変異型 *HTRA1* の混合蛋白のプロテアーゼ活性を測定した結果、5 種で優性阻害効果を認めた。続いて、ゲル濾過クロマトグラフィーで 3 量体形成能を解析したところ、優性阻害効果を認める 5 種の変異のうち、4 種で 3 量体の形成不全を認めた。最後に優性阻害効果を認めた 8 変異 17 例と優性阻害効果を認めない 9 変異 9 例の臨床像を比較したところ、優性阻害効果を認める群で症候性脳小血管病の頻度が有意に高かった。

本研究により、新たに 5 種の優性阻害効果を持つ *HTRA1* 変異を同定した。それらの変異のうち、4 種で 3 量体の形成不全を認めた。残る 1 種 (S284R) は 3 量体形成後のクロストークに重要な LD ドメイン (283-291 アミノ酸残基) の変異であった。以上の結果は、変異型 *HTRA1* の 3 量体形成不全もしくは 3 量体形成後のクロストークの障害によって優性阻害効果がおこるとする申請者らの仮説を支持するものである。さらに、優性阻害効果を認める *HTRA1* 変異のヘテロ接合体症例は、優性阻害効果を認めない群と比較して、症候性脳小血管病の頻度が有意に高いことを明らかにした。本研究で用いた生化学的な解析は遺伝性脳症血管病の新たな entity を明らかにした物であり、科学的・臨床的な価値は大きいと認められる。このことにより、博士課程論文として妥当であると判断した。