

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

上 村 昌 寛

新潟大学脳研究所神経内科

(主任：小野寺理教授)

Association of Heterozygous Mutations in *high temperature requirement A serine peptidase 1*
and Cerebral Small Vessel Disease

Masahiro UEMURA

Department of Neurology, Brain Research Institute, Niigata University

(Director: Prof. Osamu ONODERA)

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。*HTRA1* はセリンプロテアーゼであり、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 (dominant negative effects: DN) を示すことを提唱してきた。本研究では、既報の変異型 *HTRA1* の DN の有無を解析し、本仮説を検証した。

まず、既報の15種 (S121R, A123S, R133G, R166C, R166L, A173P, A173T, S284G, S284R, P285Q, F286V, G295R, A321T, L364P, D450H) の変異型 *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。その結果、11種 (S121R, R166C, R166L, A173P, A173T, 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。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ろ、5種 (R166L, A173P, A173T, S284R, G295R) で DN を認めた。さらに、ゲル濾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種の変異のうち、4種 (R166L, A173P, A173T, G295R) で3量体の形成不全を認めた。最後に 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った (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。

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

Reprint requests to: Masahiro UEMURA
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
新潟大学脳研究所神経内科学分野

上 村 昌 寛

緒 言

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 autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL)²⁾, cerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CARASIL)³⁾ などがある。

CARASIL は *high-temperature requirement A serine peptidase 1 (HTRA1)* の変異に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クス蛋白やシグナル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⁾。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⁾。

CARASIL は HTRA1 のホモ、もしくは複合ヘテロ接合体変異によっておこるが、近年、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に認めた HTRA1 変異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 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。このことから、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。

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 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 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 (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 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 変異をヘテロ接合体に

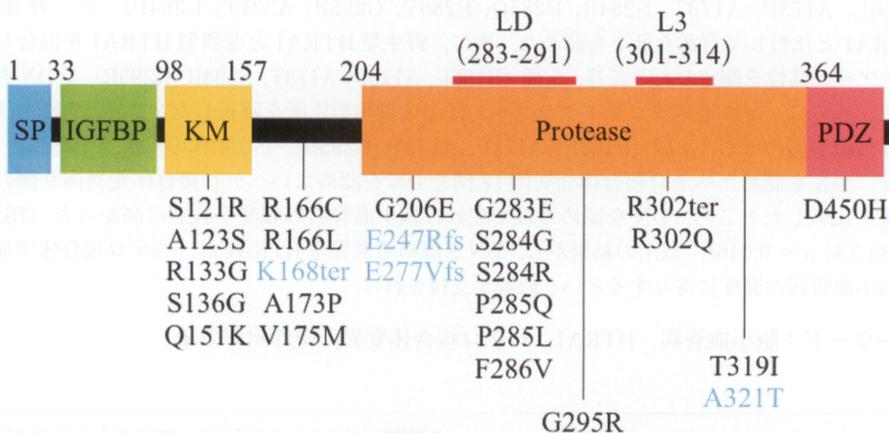


図1 HTRA1 ヘテロ接合体変異で報告された症例

略語; SP: signal peptide, IGFBP: insulin-like growth factor binding proteins, KM: Kazal type serine protease inhibitor motif, Protease: trypsin-like domain, PDZ: PDZ domain

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ない。

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 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。

材料と方法

解析の対象とした HTRA1 遺伝子変異

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)^{6) 8) 10) -12) 16) 18) 19)} (表 1)。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, A173P, S284G, S284R, P285Q, F286V, D450H)⁶⁾、3 種類はホモ接合体または複合ヘテロ接合体変異 (A173T, A321T, L364P)^{11) 16) 19)}、2 種類はホモ・ヘテロ接合体変異の双方 (R166C, G295R)^{8) 10) 12) 18)} で報告されていた。

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

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た。これらのうち、75 歳未満で、頭部 magnetic resonance imaging (MRI) 所見が確認できた 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)}。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。

HTRA1 プロテアーゼ活性の測定

まず、野生型 (WT) HTRA1 cDNA を pcDNA3.1/myc-His ベクター (Invitrogen) にクローニングした。このコンストラクトをテンプレートとして、Gene Art Site directed Mutagenesis Kit (Thermo Fisher Scientific, A13282) を使用して、C 末端に myc-His6 を付加した変異型 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 Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit (Invitrogen) を用いて濃度測定を行った⁷⁾。

次に、作成した HTRA1 発現ベクター 30 µg を 293fectin Transfection Reagent (Invitrogen, 12347-019) を用いて FreeStyle 293 細胞 (Invitrogen, R370-07) にトラ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 (GE Healthcare, 17528601) を用いて HTRA1 蛋白の精製を行った。精製蛋白はイミダゾール含有バッファー (20 mM phosphate, 500 mM NaCl, 500 mM imidazole, pH 7.4) で溶出した後、Slide A Lyser Dialysis Cassettes (Invitrogen, 0087722) を用いてイミダゾ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。

精製したそれぞれの HTRA1 蛋白 1.0 µg について、fluorescein isothiocyanate (FITC) -labeled casein (Invitrogen, 0023267) 1.0 µg を基質として、37°C、10 分間のプレインキュベーションの後、FilterMax F5 Multi-Mode Microplate Readers (Molecular 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⁾。

変異型 HTRA1 による DN の評価

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、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 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 タグ-停止コドン を付加

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.

し、pcDNA3.1/myc-His ベクターにクローニングした。次に WT 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 μg ずつ (合計 30 μg) 293fectin Transfection Reagent を用いて FreeStyle 293 細胞に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 HTRA1 の混合した精製 HTRA1 蛋白 1.0 μg について、FITC-labeled casein 1.0 μg 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 DN を認めない HTRA1 A252T と WT HTRA1 の混合蛋白 (A252T/WT) を陰性コントロールに、DN を認める HTRA1 G283E と WT HTRA1 の混合蛋白 (G283E/WT) を陽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、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 (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異型 HTRA1 と WT HTRA1 の混合蛋白を DN ありと判定した⁷⁾。

HTRA1 蛋白の多量体形成の評価

HTRA1 蛋白の多量体形成は Tris-buffered saline (100 mM Tris-HCl [pH 8.0], 150 mM NaCl) で平衡化した Superdex 200 10/300 GL column (GE Healthcare) を使用し、AKTA FPLC workstation (Amersham Biosciences) によるゲル

濾過クロマトグラフィーで評価した。それぞれの変異型 HTRA1 蛋白を 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に調整し、37°C、30 分間でプレインキュベーションした後に 500 μL 注入して解析した。解析したデータを元にして、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 をコントロールとして用いた⁷⁾。

統計学的解析

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 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。

結 果

変異型 HTRA1 のプロテアーゼ活性解析

15 種類の変異型 HTRA1 (S121R, A123S, R133G, R166C, R166L, A173P, A173T, S284G, S284R, P285Q, F286V, G295R, A321T, L364P, D450H) 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 R133G) で有意に高く、2 変異 (S284G と D450H) は有意差がなく、11 変異 (S121R, R166C, R166L, A173P, A173T, S284R, P285Q, F286V, G295R, A321T, L364P) は有意に低下していた。以後の実験では、WT に比してプロテア

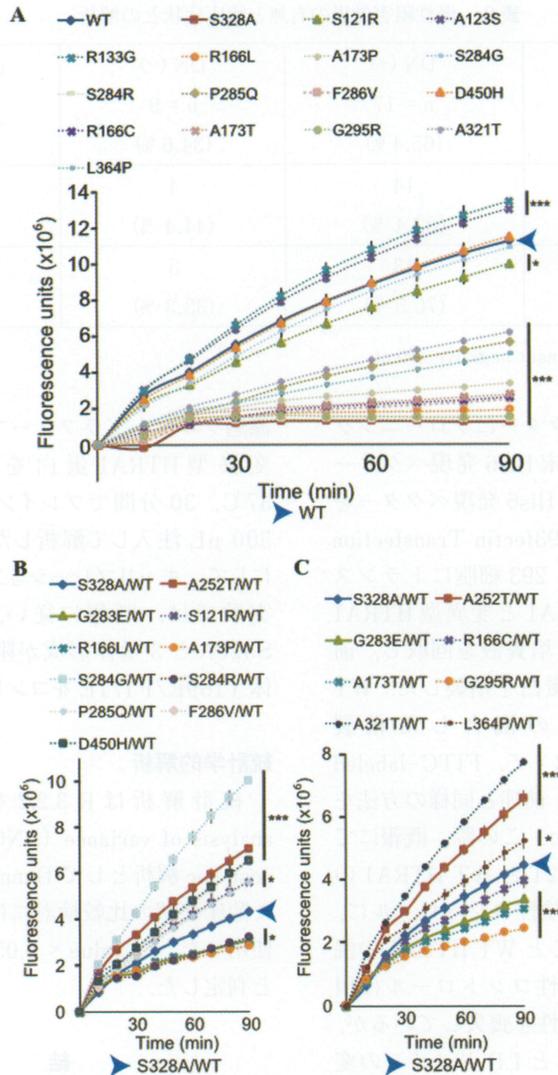


図2 変異型 HTRA1 の機能解析

(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 HTRA1 蛋白 1.0 μg と fluorescein isothiocyanate (FITC) - labeled casein 1.0 μg を基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) 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 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 (S121R, R166C, R166L, A173P, A173T, S284R, P285Q, F286V, G295R, 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 *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、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, S284G/WT, P285Q/WT, F286V/WT, A321T/WT, L364P/WT, D450H/WT) は S328A/WT よりも有意に上昇していた。1 変異 (R166C) は S328A/WT と有意差を認めなかった。5 変異 (R166L, A173P, A173T, S284R, G295R) は S328A/WT よりも有意に低下していた。

* $p < 0.05$, *** $p < 0.0001$

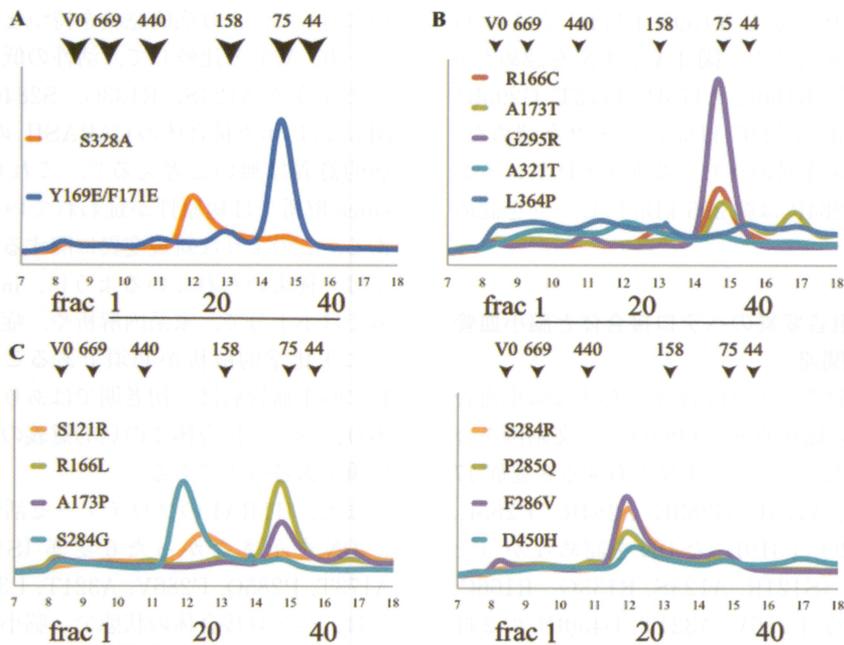


図3 変異型 HTRA1 の 3 量体形成能

(A) HTRA1 蛋白の多量体形成は平衡化した Superdex 200 10/300 GL column (GE Healthcare) を使用し, AKTA FPLC workstation (Amersham Biosciences) によるゲ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 kDa), ferritin (440 kDa), aldolase (158 kDa), conalbumin (75 kDa), ovalbumin (44 kDa) 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: V_0) は dextran 2000 を使用して決定した. V_0 と標準蛋白はそれぞれグラフ上部の矢頭で示している. 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 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 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 (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 S284R は約 295 kDa に曲線のピークを認めた.

ーゼ活性が高い A123S と R133G 変異を除外した 13 変異を解析対象とした.

変異型 HTRA1 の DN の解析

次に, 13 種類の変異型 HTRA1 (S121R, A123S, R133G, R166C, R166L, A173P, A173T, S284R, P285Q, F286V, G295R, A321T, L364P) について, 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⁾. その結果, 5 変異 (R166L/WT, A173P/WT, A173T/WT, S284R/WT, 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 S328A/WT と有意差がなく, 7 変異 (S121R/WT, S284G/WT, P285Q/WT, F286V/WT, A321T/WT, L364P/WT, D450H/WT) では S328A/WT よりも有意に上昇していたため, これら 8 変異については DN なしと判定した.

変異型 HTRA1 の多量体構造の評価

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変異(R166L, A173P, A173T, G295R)に加え、R166Cで約95 kDaにピークを認めた。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にピークを認めた(図3B)。

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

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、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, G283E, S284R, P285L, G295R, R302Q, T319I)とDNを認めなかった9変異9症例(S121R, A123S, R133G, R166C, S284G, P285Q, F286V, A321T, 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%, $p = 0.046$)。

考 察

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、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。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。

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, 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意義の解釈は、より慎重であるべきである。

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, R166C, A173T, P285Q, F286V, A321T, L364P)については、ヘテロ接合体の状態では、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。

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⁾。このような環境、遺伝子による修飾が、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必要である。

結 語

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。

文 献

- 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, Boussier 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, 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.
- 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* 138: 2347-2358, 2015.
- 7) Nozaki H, Kato T, Nihonmatsu M, Saito Y, Mizuta I, Noda T, Koike R, Miyazaki K, Kaito M, Ito S, Makino M, Koyama A, Shiga A, Uemura M, Sekine Y, Murakami A, Moritani S, Hara K, Yokoseki A, Kuwano R, Endo N, Momotsu T, Yoshida M, Nishizawa M, Mizuno T and Onodera O: Distinct molecular mechanisms of HTRA1 mutants in manifesting heterozygotes with CARASIL. *Neurology* 86: 1964-1974, 2016.
- 8) Di Donato I, Bianchi S, Gallus GN, Cerase A, Taglia I, Pescini F, Nannucci S, Battisti C, Inzitari D, Pantoni L, Zini A, Federico A and Dotti MT: Heterozygous mutations of HTRA1 gene in patients with familial cerebral small vessel disease. *CNS Neurosci Ther*, 2017.
- 9) Tateoka T, Onda H, Hirota K, Kasuya H, Shinohara T, Kinouchi H and Akagawa H: Unusual case of cerebral small vessel disease with a heterozygous nonsense mutation in HTRA1. *J Neurol Sci* 362: 144-146, 2016.
- 10) Bougea A, Velonakis G, Spantideas N, Anagnostou E, Paraskevas G, Kapaki E and Kararizou E: The first Greek case of heterozygous cerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy: An atypical clinico-radiological presentation. *Neuroradiol J*: 1971400917700168, 2017.
- 11) Bianchi S, Di Palma C, Gallus GN, Taglia I, Poggiani A, Rosini F, Rufa A, Muresanu DF, Cerase A, Dotti MT and Federico A: Two novel HTRA1 mutations in a European CARASIL patient. *Neurology* 82: 898-900, 2014.
- 12) Mendioroz M, Fernandez-Cadenas I, Del Rio-Espinola A, Rovira A, Sole E, Fernandez-Figueras MT, Garcia-Patos V, Sastre-Garriga J, Domingues-Montanari S, Alvarez-Sabin J

- and Montaner J: A missense HTRA1 mutation expands CARASIL syndrome to the Caucasian population. *Neurology* 75: 2033-2035, 2010.
- 13) Preethish-Kumar V, Nozaki H, Tiwari S, Vengalil S, Bhat M, Prasad C, Onodera O, Uemura M, Doniparthi S, Saini J, Nashi S, Polavarapu K and Nalini A: CARASIL families from India with 3 novel null mutations in the HTRA1 gene. *Neurology* 89: 2392-2394, 2017.
- 14) Cai B, Zeng J, Lin Y, Lin Y, Lin W, Lin W, Li Z and Wang N: A frameshift mutation in HTRA1 expands CARASIL syndrome and peripheral small arterial disease to the Chinese population. *Neurol Sci* 36: 1387-1391, 2015.
- 15) Bayrakli F, Balaban H, Gurelik M, Hizmetli S and Topaktas S: Mutation in the HTRA1 gene in a patient with degenerated spine as a component of CARASIL syndrome. *Turk Neurosurg* 24: 67-69, 2014.
- 16) Khaleeli Z, Jaunmuktane Z, Beaufort N, Houlden H, Haffner C, Brandner S, Dichgans M and Werring D: A novel HTRA1 exon 2 mutation causes loss of protease activity in a Pakistani CARASIL patient. *J Neurol* 262: 1369-1372, 2015.
- 17) Truebestein L, Tennstaedt A, Monig T, Krojer T, Canellas F, Kaiser M, Clausen T and Ehrmann M: Substrate-induced remodeling of the active site regulates human HTRA1 activity. *Nat Struct Mol Biol* 18: 386-388, 2011.
- 18) Menezes Cordeiro I, Nzwalo H, Sa F, Ferreira RB, Alonso I, Afonso L and Basilio C: Shifting the CARASIL paradigm: report of a non-Asian family and literature review. *Stroke* 46: 1110-1112, 2015.
- 19) Wang XL, Li CF, Guo HW and Cao BZ: A novel mutation in the HTRA1 gene identified in Chinese CARASIL pedigree. *CNS Neurosci Ther* 18: 867-869, 2012.
- 20) Miosge LA, Field MA, Sontani Y, Cho V, Johnson S, Palkova A, Balakishnan B, Liang R, Zhang Y, Lyon S, Beutler B, Whittle B, Bertram EM, Enders A, Goodnow CC and Andrews TD: Comparison of predicted and actual consequences of missense mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112: E5189-5198, 2015.
- 21) Iejima D, Itabashi T, Kawamura Y, Noda T, Yuasa S, Fukuda K, Oka C and Iwata T: HTRA1 (high temperature requirement A serine peptidase 1) gene is transcriptionally regulated by insertion/deletion nucleotides located at the 3' end of the ARMS2 (age-related maculopathy susceptibility 2) gene in patients with age-related macular degeneration. *J Biol Chem* 290: 2784-2797, 2015.

(平成30年1月16日受付)