

脈病変の関係

ASPECTS-DWI	No. of patients	Major arterial lesion (+)
11	11	5 (45%)
10	9	2 (22%)
9	28	17 (61%)
8	13	10 (77%)
≤7	24	24 (100%)

(2) NIHSS score および ASPECTS-DWI と MRA 所見との関連

NIHSS score ≥ 21 の症例は全例に主幹動脈病変を認めた。逆に NIHSS score が 1-5 の症例は 24% に認められ、NIHSS score の増加に伴い主幹動脈病変が多く認められた。このことから NIHSS score が高くなると主幹動脈病変の合併率が高いことが示された。

また ASPECTS-DWI と主幹動脈病変との関係は、ASPECTS-DWI が 7 以下の症例はすべて MRA で主幹動脈病変を認めたが、ASPECTS-DWI が 11 の症例にも 45% に MRA で主幹動脈病変を認めた。この原因として発症から DWI 撮像までの時間が短い場合には、たとえ主幹動脈病変を認めてもまだ細胞性浮腫が生じていないため DWI で高信号を指摘できない¹⁵⁾ことや、また主幹動脈病変を認めても側副血行路が発達し

ている場合には DWI での異常が見られないことなどが考えられた。さらに CDM 陽性と DPM とを比較すると CDM 陽性群 9 例のうち 4 例が DPM を認めず、CDM と DPM には解離が認められた。また CDM 陽性群は感度 (sensitivity) 56%、特異度 (specificity) 88%、陽性的中率 (Positive Predictive Value) 83%、尤度比 (likelihood ratio) 1.96 であった。

E. 結論

- ① 超急性期脳梗塞症例での CDM は t-PA 適応判定および予後の評価に有用と考えられる。
- ② CDM 所見と MRA 所見 (頭蓋内主幹動脈病変の有無) を組み合わせることにより、超急性期脳梗塞症例での t-PA 静注療法適応判定をより正確に行うことが可能であった。

G. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表

出口一郎、棚橋紀夫、脳梗塞超急性期における Clinical-diffusion mismatch の意義に関する研究。35 回日本脳卒中学会総会、島根、2009 年 3 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし

厚生労働科学研究費補助金（循環器疾患等生活習慣病対策総合研究事業）
（分担）研究報告書

急性心筋梗塞、脳卒中の急性期医療におけるデータベースを用いた
医療提供の在り方に関する研究

研究分担者 横山広行 国立循環器病センター 心臓血管内科 緊急治療科医長

研究要旨

広く多施設で悉皆的な疾病登録システムとして、データベースを構築するには、施設内にある既存の情報管理システムと連動した情報抽出方法を開発する必要がある。

A. 研究目的

急性心筋梗塞の治療プロセスや超急性期医療体制を評価するには疾病の重症度、治療成績の全国規模での登録が必須である。本研究では全国規模での疾病登録システムとしてデータベース構築するために、多くの施設で現実可能な方策を立案する。

B. 研究方法

医療機関の情報管理におけるIT化の進歩と、電子カルテ・オーダーリング等の施設内情報管理システムの運用が広まっている。分担研究として初年度は、国立循環器病センター内の共通基盤として施設内サーバーを用いた院内症例登録システムを構築し現実的活用性を検討する。

（倫理面への配慮）

日常診療で収集される情報を、後ろ向きに抽出、セキュリティを厳重に管理して非連結匿名化したデータセットとして取り扱う。

C. 研究結果

初年度は、施設内で利用されるオーダーリングや患者基本情報管理システム、病名管理システムなど既存の上位システムと連動した情報抽出と、指定フォーマットによる取込みを実施するデータ登録システムの開発、試行を開始した

D. 考察

今後、日本中の多くの施設での登録が実現可能なシステムを提言するためには、

各施設で利用されるオーダーリング、患者基本情報管理システム、ICD名称での病名管理システムなどの既存上位システムと連動した情報抽出システムの開発が必要である。

E. 結論

他施設での疾病登録システムには、インターネットを用いたweb登録や統一フォーマットで作成した入力ソフトの配布などの方法があるが、より広く、悉皆的な情報抽出と登録を実施するには、施設内の既存システムと連動した情報抽出方法の開発が必要である。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表
2. 学会発表

Yokoyama H, et al. The Gender Difference of In-Hospital Mortality among Patients with Acute Myocardial Infarction in Japan. 第73回日本循環器学会総会2009 大阪.

Yokoyama H, et al. International Comparison of Clinical Use of Inotrope and Vasodilator Therapy for Acute Decompensated Heart Failure. ESC Heart Failure Congress 2008. Milan.

H. 知的財産権の出願・登録状況
院内疾病登録システムを開発中

1. 特許取得 なし。
2. 実用新案登録 なし。
3. その他 特記すべき事項なし。

厚生労働科学研究費補助金（循環器疾患等生活習慣病対策総合研究事業）
（分担）研究報告書

データベースを用いた脳梗塞超急性期医療の推進に関する研究
研究分担者 鈴木 明文 秋田県立脳血管研究センター 副センター長
研究協力者 吉岡 正太郎 秋田県立脳血管研究センター 脳卒中診療部
佐々木 正弘 大館市立総合病院 脳神経外科部長

研究要旨：脳梗塞超急性期のrt-PA（アルテプラゼ）静注による血栓溶解療法について、発症から3時間以上を経過して病院へ到着する等の理由で適応外になる患者が多い現状から国民への啓発活動と病院前医療活動の推進について研究した。

A. 研究目的

2005年10月11日我が国でも脳梗塞超急性期治療としてrt-PA（アルテプラゼ）静注による血栓溶解療法（rt-PA静注療法）が承認され、3000例以上を目標に全例の使用成績調査が行われ、中間集計から2年間で8334例に使用されたと推定されている。発症から3時間以上を経過して病院へ到着する等の理由でrt-PA静注療法の適応外になる患者が多い現状である。国民への啓発と病院前医療活動の整備が重要であるが、この点に関して脳卒中死亡率トップの秋田県における取り組みを調査した。

B. 研究方法

県民の啓発活動に関して秋田県内で開催した脳卒中に関する県民講座の実績を調査した。病院前医療活動に関して救急隊員への脳卒中病院前救護に関する研修コース開催の実績を調査した。

（倫理面への配慮）

調査にあたっては個人情報保護を厳守した。

C. 研究結果

1. 県民講習会の開催

2008年1月から2009年3月の間に秋田県立脳血管研究センター（秋田脳研）主催の県民講座を4回、秋田県の事業として開催した県民講座7回、日本脳卒中協会が開催した県民講座2回、計13回の県民講座が開催された。内容は脳卒中の病態、最新の治療法、治療成績を解説し、病因を説明して危険因子への対応、予防法を示した。さらに、万が一脳卒中らしいと判断したらすぐ病院へ搬送したらすぐ病院へ搬送してもらうよう啓発した。脳卒中らしいと判断する方法としてシンシナティエの脳卒中スケール(CPSS)を教えた。講習の重点は「予防」と「脳卒中と判断する方法」におき、rt-PA静注療法の時間制限を説明して病院への迅速な受診を強調して教えた。休曜午後3回、平日午後10回、全て異なる地域で開催した。受講は計約1800名であった。

2. 救急隊員の脳卒中病院前救護の研修

秋田県では県医師会が主催し日本臨床救急医学会監修のPSLS(Prehospital Stroke Life Support)を開催した。まず救急救命士20名を教育しインストラクターとした。2008年1月から2009年3月までに4回開催し救急救命士を含む救急隊員112名が受講した。内容は秋田県の実情に合わせた実践的なものとし、最後に同時に脳卒中初期診療を研修している医師・看護師との合同研修を行って、お互いの理解を図った。

D. 考察

秋田県では2008年からrt-PA静注療法の普及に向けて県民への啓発、脳卒中病院前救護の質の向上を目指して活動を始めた。この成果は今後の研究の継続で評価していく。県民への啓発に関しては講座形式で詳しく解説し教示することは必要ではあるが、受講者数を考慮すると広く繰り返し周知を図るマスメディアを利用した方法が望ましい。病院前医療活動の充実は今後も研修を継続することにより推進出来るが、rt-PA静注療法に関する病院情報の開示、救急隊と病院救急部門との患者情報の伝達方法に関するコンセンサス作りが必要になる。そのためには県MC協議会、県内病院救急部門への働きかけが必須である。

E. 結論

脳梗塞超急性期医療を推進するため秋田県では県民の啓発、病院前救護活動の充実について活動が始まった。今後の成果によりこれら活動の有効性を評価しなければならないが、今後は病院側の整備を具体的に図る必要がある。

G. 研究発表

論文発表

鈴木明文：急性期脳血管障害の治療。急性期外科治療。内科101：882-886, 2008.

鈴木明文：SICUやSUなどの脳卒中専門の治療病棟の有効性。EBNURSING 8：48-55, 2008.

平成 20 年度厚生労働科学研究費補助金（循環器疾患等生活習慣病対策総合研究事業）
分担研究報告書

急性心筋梗塞、脳卒中の急性期医療におけるデータベースを用いた
医療提供の在り方に関する研究

脳卒中データベースと電子化された脳卒中地域連携パスとの情報共有に関する研究

分担研究者 中川原譲二 中村記念病院脳神経外科部長

研究要旨

当院で現在運用されている『脳卒中データベース』と『脳卒中地域連携パス』を対象として、情報入力の時間的流れや入力項目について検証したところ、両者はほとんど独立して運用されていることが明らかとなった。その原因として、第一に両者に共通する入力項目が少ないこと、第二に入力対象数が大きく解離していること、第三に両者の入力時期が解離していることが上げられる。しかし今後は、急性期病院と回復期病院や維持期施設との連携だけでなく、在宅医療との連携にも『脳卒中地域連携パス』が活用される可能性が高く、対象患者数の大幅な増加が見込まれたため、質量ともにより多くの情報共有が容易に行なえる新たなシステムの開発が必要になる可能性も考えられる。

A. 研究目的

現在、(社)日本脳卒中協会脳卒中データバンク部門で運用されている『脳卒中データベース』(ファイルメーカーで作成された電子ファイル)は、脳卒中の急性期医療に関する患者情報の登録がほぼ標準化されており、全国 150 施設以上の急性期施設で使用されている。当院では 2000 年 1 月から院内での運用が開始されている。一方、地域完結的な脳卒中医療を提供するためには、急性期病院と回復期病院や維持期施設、さらに在宅医療などとの後方連携が重要であり、患者の治療計画や診療情報の共有を目的とする『脳卒中地域連携パス』が必要とされ、2008 年 4 月から札幌市でも電子化さ

れた脳卒中地域連携パス(エクセルのマクロで作成された電子ファイル)の運用が開始されている。今後、『脳卒中データベース』と電子化された『脳卒中地域連携パス』との情報共有を進めることが重要と考えられるため、両者における情報の互換性等について分析し、今後の情報共有の方向性について検討した。

B. 研究方法

当院で現在運用が開始されている『脳卒中データベース』と『脳卒中地域連携パス』を対象として、情報入力の時間的流れや入力項目について検証した。『脳卒中データベース』については、運用実績と入力作業と

確定作業の現況、『脳卒中データベース』への入力項目のうち札幌地区で運用されている『脳卒中地域連携パス』に転用できる項目についての検討、『脳卒中データベース』に入力された情報が実際に『脳卒中地域連携パス』の入力に二次利用されているかどうか、などについて調べた。『脳卒中地域連携パス』についても、運用実績、入力業務の流れ、入力項目などについて調べた。

また、両者の運用上の特徴、適応基準の違いなどに関して、その背景などを検討した。

(倫理面への配慮)

本研究では、個人情報機密は守られることとし、得られた結果は、医学的な目的以外には用いないこととした。

C. 研究結果

『脳卒中データベース』については、当院では2000年1月から全ての急性期脳卒中患者が院内LANを介して登録され、2008年11月の時点ですでに8000例以上が登録され、データ入力が確定している。データの入力業務はすべて担当医が行ない、通常退院時またはそれ以後に行なわれていた。データの確定業務は診療情報管理士が行ない、入力業務の遅れについては、診療情報管理士が督促業務をおこなっていた。

『脳卒中データベース』から札幌地区で運用されている『脳卒中地域連携パス』に転用できる項目は、患者基本情報と脳卒中発症日時、病型分類、脳卒中既往歴、脳卒中家族歴、飲酒歴、喫煙歴、基礎疾患の有無、既往歴・現病歴、入院時と退院時の神経学的重症度(NIHSS)、発症前・入院時・退院時 modified Rankin Scale (mRS)、退院処方などであったが、『脳卒中データベー

ス』から『脳卒中地域連携パス』への入力項目の二次利用は、ほとんど行われていなかった。その理由として、『脳卒中地域連携パス』は、入院中に転院の打診資料として用いられることから『脳卒中地域連携パス』への入力が『脳卒中データベース』への入力よりも早く行なわれるためとが考えられた。

『脳卒中地域連携パス』への入力対象患者は、『脳卒中データベース』とは異なり、転院予定患者のみとされ、当院の脳卒中の診療実績(60%が自宅退院、10%が死亡退院)から見て、その数は比較的少数に限られていた。入力の督促は転院調整を行なうMSWが行なっていた。

『脳卒中地域連携パス』では医師以外の多くの職種からの情報入力が必要であり、入力内容として、看護師による患者の機能障害の評価(modified FIMによる16項目)、リハビリテーション担当職員(PT, OT, ST)による上肢・下肢・体幹の運動機能、言語機能、嚥下機能の評価、MSWによる身体障害・介護認定の必要度と実施状況、家庭環境、活用できる社会資源などの項目、薬剤師による退院時処方情報が必須であり、『究極の診療情報提供書』として活用されていたが、これらはいずれも『脳卒中データベース』では取り上げられていない項目であった。

D. 考察

札幌市では、迅速な脳卒中救急医療を提供するために、地域の急性期施設群(約15施設)で構成される札幌市脳卒中救急医療協議会を組織し、夜間・休日4施設による輪番制を実施しているが、今後は『脳卒中

データベース』を各施設において運用することを旨とし、地域での脳卒中データベースの構築を計画している。これによって地域における前方連携の実態把握と体制整備が容易になると考えられる。一方、地域完結的な脳卒中医療を提供するために、急性期施設群（約 15 施設）と回復期・維持期施設群（約 50 施設）で構成される札幌市脳卒中地域連携パスネット協議会のもと『脳卒中地域連携パス』の運用が開始され、患者の治療計画や診療情報の共有による地域連携の進展が図られている。こうした地域における医療提供の構造改革に伴い、脳卒中患者の情報インフラとしての『脳卒中データベース』と電子化された『脳卒中地域連携パス』の普及を図り、次いで両システム間の情報共有を進展させることは、今後ますます重要な課題になると考えられる。

『脳卒中データベース』と電子化された『脳卒中地域連携パス』の両者が運用されている当院において、両者の情報共有に関して実態調査を行なったところ、両者はほとんど独立して運用されていることが明らかとなった。その原因としては、第一に両者に共通する入力項目が少ないことが上げられる。共通する入力項目のほとんどが医師・薬剤師による入力項目に限られていたためである。第二に入力対象数が大きく解離していることが上げられる。脳卒中データベースが全ての急性期脳卒中患者が入力対象となるのに対して、脳卒中地域連携パスは転院予定患者のみを対象としていたためである。第三に両者の入力時期が解離していることが上げられる。脳卒中データベースへの入力業務は退院時またはそれ以後に行なわれ、脳卒中地域連携パスへの入力

業務は転院の打診段階で行なわれていたためである。このように、現在のところ、『脳卒中データベース』と電子化された『脳卒中地域連携パス』の情報共有は、運用上の制約から必ずしも進展を期待できない。

しかしながら、『脳卒中地域連携パス』の本来の導入目的が、患者の治療計画や診療情報を地域で共有することであるならば、今後は、急性期病院と回復期病院や維持期施設との連携だけでなく、在宅医療との連携にも活用される可能性が高く、『脳卒中地域連携パス』の対象患者数の大幅な増加が見込まれる。また、『脳卒中データベース』の情報以外にも画像や証明書などに関する原本情報についても施設間共有の要望が高まる可能性があり、質量ともにより多くの情報共有が容易に行なえる新たなシステムの開発が必要になる可能性も考えられる。

現在、札幌市脳卒中地域連携パスネット協議会では、『脳卒中地域連携パス』では不十分な情報を補完する『脳卒中ケアデータベース (DASCH: 仮称)』(ファイルメーカーで作成された電子ファイル: Database of Stroke care in Hokkaido) を試作し、脳卒中地域連携パスのオプションとして、また『脳卒中データベース』との情報共有を目指して、試験的に運用することを計画している。

E. 結論

当院では『脳卒中データベース』と『脳卒中地域連携パス』は、ほとんど独立して運用されていた。その原因として、第一に両者に共通する入力項目が少ないこと、第二に入力対象数が大きく解離していること、第三に両者の入力時期が解離していること

が上げられる。しかし今後は、在宅医療との連携にも『脳卒中地域連携パス』が活用される可能性が高く、対象患者数の大幅な増加が見込まれたため、質量ともにより多くの情報共有が容易に行なえる新たなシステムの開発が必要になる可能性がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

中川原譲二：脳卒中 札幌市における脳卒中診療ネットワーク. 治療 90: 926-930, 2008

中川原譲二：脳卒中（脳梗塞）罹患後の管理. 日本医事新報 4392: 42-45, 2008

中川原譲二：脳血流測定 2 SPECT, PET. 必携 脳卒中ハンドブック. 診断と治療社, 東京, pp44-50, 2008

2. 学会発表

中川原譲二：血栓溶解療法の現状と今後の課題(ランチョンセミナー)
第 13 回日本脳神経外科救急学会
平成 20 年 1 月 18 日～19 日 東京

中川原譲二：脳卒中救急医療の最前線(ランチョンセミナー)

第 33 回日本脳卒中学会総会
平成 20 年 3 月 20 日～22 日 京都

中川原譲二：DPC システムと地域医療連携(ランチョンセミナー)

第 24 回日本放射線技師総合学会
平成 20 年 7 月 10 日～12 日 札幌

中川原譲二：血栓溶解療法の現状と課題(シンポジウム).

第 31 回日本血栓止血学会学術集会
平成 20 年 11 月 21 日 東京

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（循環器疾患等生活習慣病対策総合研究事業）

（分担）研究報告書

脳卒中地域連携バスの運用後の脳梗塞患者の転帰調査

研究分担者 橋本洋一郎 熊本市立市民病院神経内科部長

研究要旨：脳卒中地域連携バスの運用後の脳梗塞患者の転帰調査を郵送で行ったが、回収率が約70%であった。脳卒中データベース、脳卒中リハデータベースの連結の中で脳卒中地域連携バスの運用可能システム構築が必要である。

研究分担者氏名・所属研究機関名及び所属研究機関における職名

（分担研究報告書の場合は、省略）

A. 研究目的

脳卒中データベースの次の課題として、脳卒中リハビリテーションデータベースとの連結、さらに脳卒中地域連携クリティカルバス（以後、バス）との連結がある。本年度は、電子化されていない当地域の脳卒中地域連携バスの運用における脳梗塞症例の転帰調査を行い、その問題点について検討した。

B. 研究方法

脳卒中地域連携バスの運用を開始した2007年4月より9月30までに当科に入院した107名の脳梗塞のうちで当科入院中に死亡した6例を除いた101例に2008年11月に郵送によるアンケート調査を行った。

（倫理面への配慮

入院時点でアンケート調査を行うことについての文書での同意を得た。

C. 研究結果

入院した107例の脳梗塞患者（平均 mRS 2.4 ± 2.3 ）の平均在院日数は 15.5 ± 8.5 日（中央値 14 日）で、6例死亡、47例が自宅退院、54例が転院となった。2008年11月時点の返答があったのは70名で、回収率は69.31%であった。1年後のADLについてmRSで示すと、mRS0-6の患者数は70名についてmRS0:23名、mRS1:11名、mRS2:5名、mRS3:7名、mRS4:6名、mRS5:5名、mRS6(死亡):13名であった。

D. 考察

脳卒中地域連携バスが電子化されていない状態で、転帰調査を行う場合には患者・家族への郵送によるアンケート調査、あるいはリハ病院からの転帰報告に頼らなければならないが、その回収率が低いことが問題である。さらに多大な労力を必要とする。

E. 結論

脳卒中データベース、脳卒中リハビリテーションはデータベース、さらに脳卒中地域連携バスが一体化したものの策定が望まれる。

F. 健康危険情報

（分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入）

G. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

橋本洋一郎：脳卒中医療における連気鋭の考え方。第34回日本脳卒中学会総会 3: 20-22, 2009（松江）

（発表誌名巻号・頁・発行年等も記入）

H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト (参考)

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
	該当無し						

雑誌

発表者氏名	論文タイトル	発表誌	巻号	ページ	出版年
Nagai A, Terashima M, Abdullah Md Sheikh, Notsu Y, Shimode K, Yamaguchi S, Kobayashi S, Seung U. Kim, Masuda	Involvement of cystatinC in pathophysiology of CNS diseases.	J. Frontiers in Bioscience,	13	3470-3479	2008
Bokura H, Yamaguchi S, Iijima K, Nagai A, Oguro, H.	Metabolicsyndrome is associated with silent ischemic brain lesions.	Stroke	39-5	1607-1609,	2008
Umegae N, Nagai A, Terashima M, Watanabe T, Shimode K, Kobayashi S, Kim SU, Masuda J, Yamaguchi S..	Cystatin C expression in ischemic white matter lesions	Acta Neurologica Scandinavica	118(1)	60-67	2008
Goto H, Shimada Y, Hikiami H, Kobayashi S, Yamaguchi S, Matsui R, Shimode K, Mitsuma T, Shintani T, Ninomiya H, Niizawa A, Nagasaka K, Shibahara N, Terasawa K.	Effect of Keishibukuryogan on silent brain infarction over 3 years.	Kampo Medicine	59(3):	471-476,	2008

発表者氏名	論文タイトル	発表誌	巻号	ページ	出版年
権哲峰、卜蔵浩和、飯島献一、小黒浩明、山口修平	健常成人の脳萎縮に対する無症候性脳梗塞、高血圧の影響	日本老年医学会雑誌	45(2):	175-181,	2008
山口修平、小黒浩明、卜蔵浩和、長井 篤	脳血管障害の治療の進歩	神経治療学	25(4)	379-382	2008
峰松一夫	脳血管疾患克服への将来戦略—内科—	医療	62(3)	145-147	2008
中島隆宏、豊田一則、古賀政利、松岡秀樹、長束一行、成富博章、峰松一夫	超急性期虚血性脳血管障害に対するrt-PA静注療法：効果と限界。	脳卒中	30(5)	768-771	2008
中島隆宏、峰松一夫	超急性期脳梗塞治療の現場—t-PAによる血栓溶解療法の実際と問題点。	内科	101(5)	827-832	2008
中島隆宏、峰松一夫	脳卒中救急医療における救急隊の役割。	総合臨床	58	249-253	2008
棚橋紀夫	脳梗塞の病態と治療戦略	心臓	41(2)	239-244	2009
棚橋紀夫	組織プラスミノーゲンアクチベーター(t-PA)静注療法—現状と将来展望	Brain and Nerve	61(1)	41-52	2009
棚橋紀夫	虚血性脳卒中における抗血小板療法の現状と将来	脳卒中	30(6)	834-840	2008
棚橋紀夫	脳梗塞急性期の治療(2)血栓溶解療法	神経治療学	25(5)	529-536	2008

Involvement of cystatin C in pathophysiology of CNS diseases

Atsushi Nagai¹, Masaharu Terashima², Abdullah Md Sheikh¹, Yoshitomo Notsu¹, Koichi Shimode³, Shuhei Yamaguchi³, Shotai Kobayashi⁴, Seung U. Kim⁵, Junichi Masuda¹

¹Department of Laboratory Medicine, ²Department of Biochemistry and Molecular Medicine, ³Department of Internal Medicine III, and ⁴University Hospital, Shimane University Faculty of Medicine, Izumo, Japan, ⁵Division of Neurology, UBC Hospital, University of British Columbia, Vancouver, Canada

TABLE OF CONTENTS

1. Abstract
2. Cystatin C-type cerebral amyloid angiopathy
3. Amyloid fibril formation by cystatin C
4. Concentration in CSF
5. Involvement in AD
6. Involvement in neuronal cell death
7. Conclusions
8. Acknowledgments
9. References

1. ABSTRACT

Cystatin C Leu68Gln variant is known to induce amyloid deposition in cerebral arterioles, resulting in Icelandic type cerebral amyloid angiopathy (CAA). Wild-type cystatin C is also observed in solitary CAA involving amyloid β protein (A β), and accelerates the amyloidogenicity of A β *in vitro*. In neurological inflammatory diseases and leptomeningeal metastasis, low cystatin C levels are accompanied with high activities of cathepsins in the cerebrospinal fluid. Among the cells in CNS, astrocytes appear to secrete cystatin C in response to various proteases and cytokines. Co-localization of A β and cystatin C in the brains of Alzheimer's disease (AD) led to the hypothesis that cystatin C is involved in the disease process. We demonstrated that cystatin C microinjection into rat hippocampus induced neuronal cell death in dentate gyrus. Furthermore, apoptotic cell death was observed in neuronal cells treated with cystatin C *in vitro*. Up-regulation of cystatin C was observed in glial cells with neuronal cell death *in vivo*. These findings indicate the involvement of cystatin C in the process of neuronal cell death.

2. CYSTATIN C-TYPE CEREBRAL AMYLOID ANGIOPATHY

The deposition of abnormal fibrillar protein aggregates (so-called amyloid) in the walls of arteries, arterioles, and sometimes capillaries and veins of the central nervous system (CNS) is known as cerebral amyloid angiopathy (CAA). The most prevalent form of CAA is the β -amyloid (A β) type that frequently accompanies Alzheimer's disease (AD). In AD, both parenchymal amyloid and vascular deposition are seen. Mutated cystatin C deposition was also observed in hereditary CAA with amyloidosis, Icelandic type (HCHWA-I) (1). The common features in CAA are vasculopathies associated with amyloid infiltration, such as clusters of multiple arteriole lamina, glomerular formation, obliterative intimal changes and double-barreling, especially in cortical arterioles and leptomeningeal vessels (2). CAA often leads to recurrent brain hemorrhage or infarction in cortical and subcortical regions.

Patients with HCHWA-I have been extensively studied by molecular biological methods, and the deposited

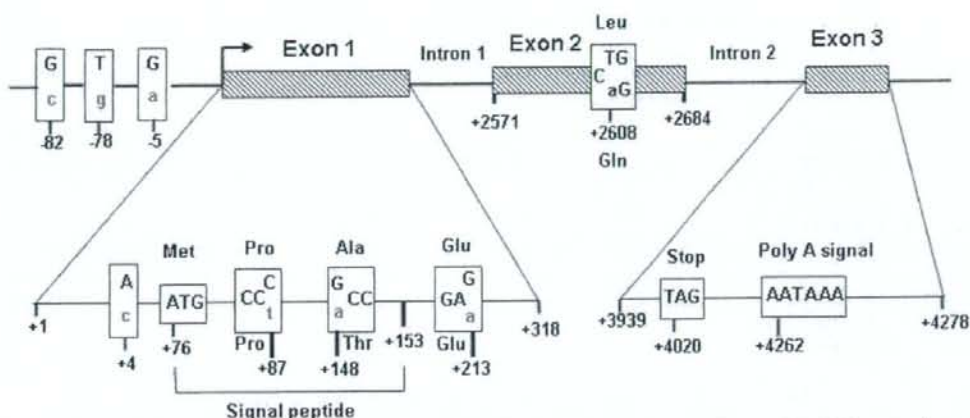


Figure 1. Cystatin C gene structure and sequence variations. The genetic mutation A for T at position 2608 causes the amino acid substitution of Leu (CTG) for Gln (CAG), as is seen in HCHWA-I. Only G/A at position +148 among seven polymorphs causes an amino acid mutation, Ala/Thr, which is at position 73, and may be associated with AD.

amyloid was shown to be composed of the Leu68Gln variant of cystatin C (Figure 1), which is directly associated with recurrent young-onset cortical hemorrhage or subcortical infarction, leading to death. Cystatin C isolated from the leptomeninges was found to be truncated, lacking the first 10 N-terminal amino acids (3, 4). Sporadic CAA with the same mutation of HCHWA-I was also identified in a Croatian patient (5). We also reported a familial CAA case showing deposition of A β and cystatin C, but mutation of the cystatin C gene was not identified (6).

On the other hand, wild-type cystatin C has been found even in the sporadic type of CAA, with A β deposition, in a ratio of about 1:100 (6). Immunohistochemical studies revealed that cystatin C was also co-localized with A β in the outer lamina of amyloid-laden vascular walls in patients with AD, Down's syndrome, hereditary cerebral amyloid angiopathy with amyloidosis, Dutch type (HCHWA-D), and elderly patients (7-10). The co-localization of both proteins in CAA was associated with fatal subcortical hemorrhage (9). A further study analyzing biopsy cases showed that severe cystatin C immunoreactivity was a risk factor for the occurrence and enlargement of cerebral hemorrhage, with loss of vascular smooth muscle (11).

In human and mouse atheroma, increased expression of cysteine and aspartic proteases correlated with decreased cystatin C (12, 13). Decrease of cystatin C in the lesions was closely related to the incidence of collagen and elastic lamina degradation in the vessel walls, leading to aneurysms (14, 15). Thus, it is postulated that cystatin C is an intrinsic factor that influences the stability of CAA and the occurrence of stroke.

3. AMYLOID FIBRIL FORMATION BY CYSTATIN C

As has been clearly shown in the case of transthyretin, many different point mutations can lead to

amyloid formation. Therefore, there is a tendency to explain amyloidogenesis in terms of reduced stability of the proteins (16, 17). However, an early study suggested that cystatin C and its L68Q variant in HCHWA-I exhibit similar patterns (18).

Amino-terminally truncated cystatin C lacking the first 10 amino-acid residues is deposited as amyloid in CAA in patients with HCHWA-I (4), but full-length cystatin C was detected in patients with non-hereditary CAA (19). The cleavage is thought to be a secondary event in amyloid formation (20). The amino acid substitution does not affect the activity of cystatin C as a cysteine protease inhibitor. However, replacement of Leu68 in the hydrophobic core of cystatin C with Gln may induce conformational changes in cystatin C, leading to dimerization and further amyloid fibril formation (21).

The Leu68Gln mutation causes cystatin C to be more unfolded than the wild-type when exposed to denaturing agents, low pH or high temperature *in vitro*. In fact, cystatin C monomer and dimer were detected in the serum and cerebrospinal fluid (CSF) of HCHWA-I patients, whereas only monomer was detected in control subjects (22). Even wild-type cystatin C has amyloidogenic properties, which might be significant in relation to the deposition of cystatin C with A β in CAA or in amyloid plaques in AD patients. Crystal structure analysis revealed that the protein refolds to produce very tight 2-fold symmetric dimers, retaining the secondary structure of the monomeric form (23). The dimerization occurs through 3-dimensional domain swapping, which could lead to infinite linear polymerization and amyloid fibril formation (24).

Not only the HCHWA-I variant, but also the wild-type cystatin C formed dimers in a concentration-dependent manner (25). Analysis of intracellular accumulation of cystatin C revealed that insoluble variant cystatin C existed in the endoplasmic reticulum (ER) in cystatin C-transfected Chinese hamster ovary cells (26). A

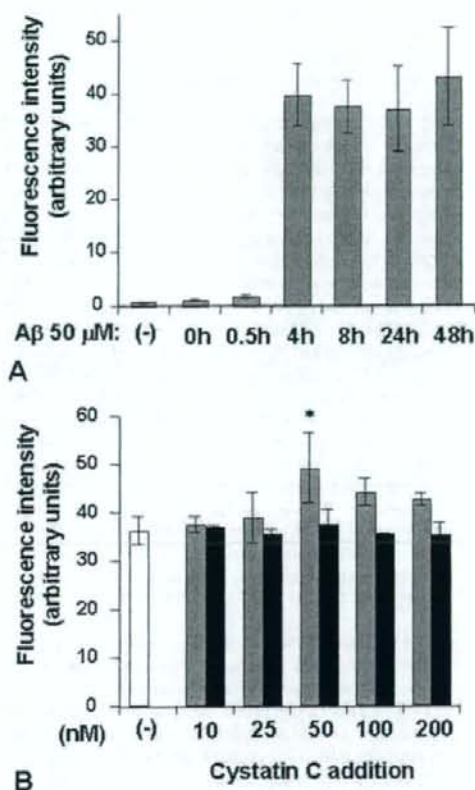


Figure 2. Effect of cystatin C on amyloid β ($A\beta$) fibril formation. (A) $A\beta$ ($50 \mu\text{M}$) was incubated at 37°C for the indicated time, and $A\beta$ fibril formation was analyzed by fluorescence spectroscopy, using thioflavin T. The data are expressed as fluorescence intensity. Amyloid fibril formation peaked at 4 h and was maintained up to 48 h. (B) To determine the effect of cystatin C on the $A\beta$ fibril formation, $50 \mu\text{M}$ $A\beta$ was incubated alone (empty bar), or with the indicated dose of recombinant cystatin C (gray bar) or truncated cystatin C (black bar) for 48 h. The data presented here are the means \pm SEM of 3 similar experiments. Statistical significance of differences was assessed using one-way ANOVA, followed by the Bonferroni post hoc multiple comparison test. The criterion of statistical significance was $p < 0.05$, and significant differences compared with $A\beta$ alone are indicated with an asterisk.

common mechanism observed in the formation process of amyloid fibrils is disturbed protein secretion pathways through the ER. Altered regulatory mechanisms in the protein quality control system of ER may lead to amyloidogenesis of cystatin C, transthyretin and $A\beta$. Although cystatin C and $A\beta$ were determined to be colocalized intracellularly in cystatin C and $A\beta$ co-

transfected cells, the effect of cystatin C on $A\beta$ fibril formation is unclear. It was reported that binding of cystatin C to $A\beta_{1-40}$ or $A\beta_{1-42}$ inhibited $A\beta$ amyloid fibril formation (27). We evaluated the involvement of cystatin C in $A\beta_{1-42}$ amyloid fibril formation with fluorescence spectroscopy using thioflavin T. Recombinant wild-type cystatin C and N-terminally 10-amino-acid-truncated cystatin C (truncated cystatin C), which lacks cathepsin B and L inhibitory activity, were produced for the study (28). After 48 h incubation of $A\beta$ without cystatin C, amyloid fibril extension was significantly increased at 48 h (Figure 2A). Furthermore, 50 nM full-length cystatin C, but not the truncated form, significantly increased fibril formation (Figure 2B). Taken together, our results suggested that the interaction between $A\beta$ and the N-terminal region of cystatin C may have a pivotal role in the fibril formation. Disagreement between our findings and previous work (27) may have been due to the difference in cystatin C concentration used in fibril formation assay. We used a relatively low concentration (50 nM) of cystatin C, which is similar to the physiological concentration in human CSF, and found that this promoted fibril formation, whereas a higher concentration (50 to $200 \mu\text{g/ml}$; about 4 to $16 \mu\text{M}$) of cystatin C inhibited $A\beta$ fibril formation (27). The mechanisms of the effects of cystatin C on fibril formation remain to be elucidated.

4. CONCENTRATION IN CSF

Cystatin plays a defensive role in extracellular fluids by protecting organs from the cysteine proteases produced by invading pathogens, and also endogenous cysteine proteases that escape from lysosomes (29). In CSF, these proteolytic enzymes are believed to play crucial roles in the initiation and progression of inflammatory neurological diseases (INDs). Cystatin C might play a critical role, because it is the dominant cysteine protease inhibitor in the CSF, and cystatin C levels in CSF are 5.5 times higher than those in plasma (30).

Cystatin C has been demonstrated to have a protective effect against numerous cysteine proteases in serum during systemic and local inflammation (31), in synovial fluid in inflammatory joint diseases (32), in the saliva in periodontal diseases (33) and in the sputum in bronchiectasis (34). Cathepsin B activity is blocked by cystatin C released from leukocytes or macrophages in human sputum and respiratory system (34, 35). The altered balance of these enzymes may also contribute to connective tissue remodeling or inflammatory processes in CNS diseases.

We have established a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method to measure the concentration of cystatin C in the CSF, and used it to measure the levels in various CNS diseases. We found that the concentration of cystatin C in the CSF was decreased, and cathepsin B activity was increased, in INDs such as Guillain-Barré syndrome, chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy and multiple sclerosis (36). Furthermore, cystatin C was greatly decreased, and cathepsin B activity was remarkably elevated, in patients

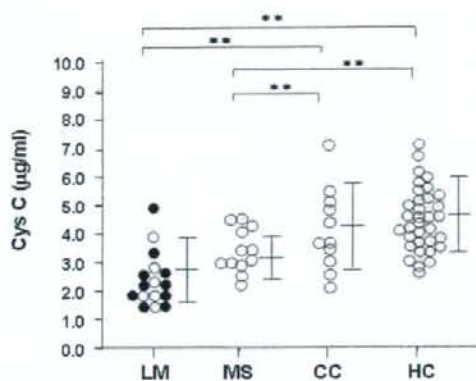


Figure 3. Cystatin C (cysC) concentration in the CSF. Cystatin C was measured with a sol particle homogenous immunoassay using colloidal gold particles coated with anti-cystatin C antibody, as recommended by the supplier, Alfresa Pharma Co. (Japan). CSF samples were collected from patients with leptomeningeal metastasis (LM: $n = 16$), multiple sclerosis (MS: $n = 12$), cancer without CNS infiltration (CC: $n = 11$) and healthy controls (HC: $n = 34$) after informed consent had been obtained. Cystatin C levels in LM and MS patients were significantly decreased compared with CC and HC, respectively. In LM patients, closed circles indicate patients with metastasis from solid tumor and open circles indicate patients with leukemia or lymphoma. ** $p < 0.05$.

with leptomeningeal metastasis from solid tumors and leukemia/lymphoma (37). Infiltrated inflammatory cells in INDs and cancer cells in leptomeningeal metastasis secrete cysteine proteases such as cathepsin B, which might lead to low levels of cystatin C through consumption by the proteases and degradation.

Recently, the level of cystatin C in serum was shown to be strongly dependent on the glomerular filtration rate (GFR) because of the low molecular weight and the stable production rate in serum (38-40). It is currently considered to be a more accurate marker of renal function than serum creatinine (41-43). A fully automated immunoassay for measuring serum cystatin C has been established (44-46). We confirmed that the system is also reliable for measuring the level in CSF, and the results were found to be similar to those obtained with the conventional ELISA system in patients with INDs or leptomeningeal metastasis (Figure 3). The measurement is helpful for diagnosing those diseases, and its relevance to other diseases of CNS is being evaluated.

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS), which is the most common motor neuron disease, may be one of the CNS diseases in which cystatin C plays a role. Cystatin C is localized in Bunina bodies, which are a specific neuropathologic feature of ALS, being contained in degenerating motor neurons (47, 48). Proteomic profiling of CSF in ALS patients indicated that cystatin C is one of the decreased biomarkers (49). In our analysis of CSF

samples, some ALS patients showed high levels of cathepsin B activity, which resulted in a significant increase in the value for all ALS, whereas no significant decrease in cystatin C levels was detected (Figure 4).

Northern blot analysis revealed that the cystatin C gene is ubiquitously expressed in human tissues, and its expression is highest in seminal vesicles (50). Several factors that influence the production and secretion of cystatin C were investigated. Dexamethasone increased cystatin C production in HeLa cells (51) and transforming growth factor β increased the secretion of cystatin C from smooth muscle cells and mouse embryo cells (15), whereas the secretion of cystatin C was decreased in monocytes and macrophages activated with lipopolysaccharide and interferon- γ (52). In the CNS, although cystatin C was expressed in neurons, astrocytes and choroid plexus (53, 54), the regulatory mechanisms remain to be elucidated. It was reported that, among CNS neoplastic tissues, astrocytomas frequently produce and secrete cystatin C (55). We stimulated human-derived astrocytes with various cytokines and proteases, and analyzed the expression levels of cystatin C (Figure 5). Cystatin C production and secretion in astrocytes were remarkably induced by a serine protease, thrombin, but not by IL-1 β , TNF- α or IFN- γ . Thus, in the inflammatory milieu, thrombin could regulate the cystatin C level in CSF through the astrocyte response.

In HCHWA-I, the concentration of cystatin C in CSF is known to be lower by one-third than in normal subjects, but the mechanism seems to be different from that of the decrease observed in the INDs, leptomeningeal metastasis and ALS. Deposited cystatin C in HCHWA-I mainly consisted of variant forms, with only a small fraction of the wild-type cystatin C (56). The secretory mechanism of mutated cystatin C is the same as that of wild-type cystatin C in gene-transfected cultured cell lines, but it was demonstrated that secreted variant cystatin C is more rapidly degraded than wild-type cystatin C in stably transfected cell lines (25). The variant cystatin C readily dimerizes, which results in complete loss of its activity as a cysteine protease inhibitor. Decreased cystatin C level is a hallmark of HCHWA-I, probably resulting in increased protease activities in the CSF, which would affect the stability to remodeling or rupture of amyloid-laden vessels. The mechanism of low concentration of cystatin C detected in the CSF of sporadic CAA cases should be elucidated in the future (57, 58).

5. INVOLVEMENT IN AD

Neuropathological features of AD are the extracellular accumulation of A β as senile plaques and intraneuronal neurofibrillary tangles, major component of which is highly phosphorylated tau protein. Increasing evidence suggests that accumulation of A β in the cortex may be responsible for the neurodegeneration in AD. Immunohistochemical detection of cystatin C co-localized with A β in senile plaques led to the hypothesis that cystatin C might be involved in the progression of AD (59), since it is a lysosomal protease inhibitor, and lysosomal systems, such as cathepsins B and D, are upregulated at early and

Involvement of cystatin C in CNS diseases

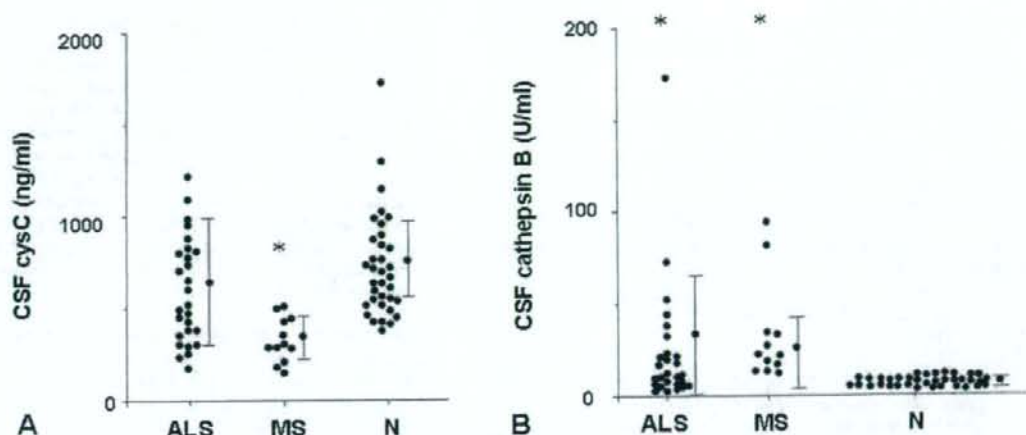


Figure 4. Cystatin C (cysC) concentration and cathepsin B activity in the CSF of patients with amyotrophic lateral sclerosis (ALS; $n = 26$), MS ($n = 12$) and healthy controls ($n = 34$). Cystatin C levels were measured with an established ELISA method. CSF samples were collected after informed consent had been obtained, and were stored frozen until measurement. (A) Cystatin C levels in MS patients were reduced compared with those of ALS patients and normal controls. (B) Cathepsin B activity was measured with a quantitative fluorometric assay (84). Cathepsin B activities in the CSF of ALS and MS patients were increased compared with the control. * $p < 0.05$.

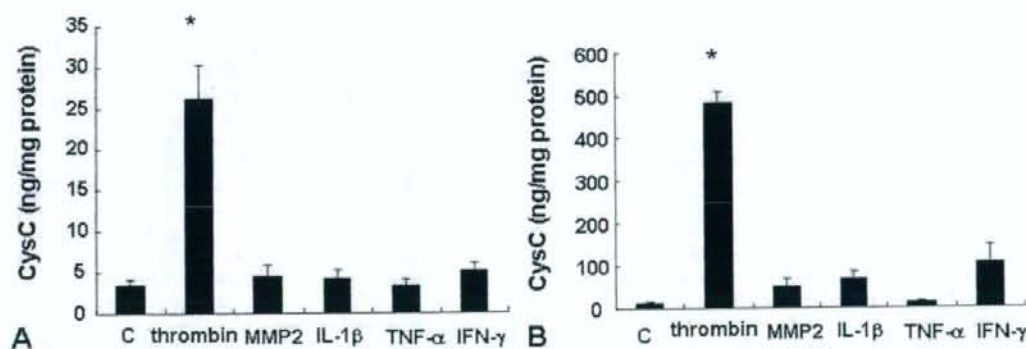


Figure 5. Effect of proteases and proinflammatory cytokines on cystatin C (cysC) protein expression in human astrocytes. Human astrocytes were incubated with medium containing 5 U/ml of thrombin, 0.5 μ g/ml of MMP-2, 10 ng/ml of IL-1 β , 10 ng/ml of TNF- α or 10 ng/ml of IFN- γ for 6 h and, cystatin C production was measured after 48 h. The amounts of cystatin C in culture supernatants (A) or cell lysates (B) were determined using an established ELISA method and corrected for cell protein levels. Values are the mean \pm SEM ($n = 3$). * $p < 0.05$.

late stages of AD (60, 61). *In vivo* experiments confirmed that lysosomal inhibitors led to increased β -amyloid precursor protein immunoreactivity in hippocampus (62) or hyperphosphorylated tau protein in hippocampal slice cultures (61). However, the mechanisms involved are poorly understood.

To investigate the relationship between the development of AD and cystatin C, genetic studies were conducted. The cystatin C gene (CST3) is polymorphic; G/A variation at position 73 leads to replacement of alanine with threonine as the penultimate amino acid of the signal

peptide (see Figure 1) (64). The CST3-A allele that induces the Ala substitution was shown to be a risk factor for early-onset AD (65). Other studies demonstrated an association between homozygosity for the -82C/+4C/+148A haplotype and late-onset AD (66, 67). The apolipoprotein E (Apo) allele $\epsilon 4$ has been confirmed to be a risk factor for late-onset AD. A synergistic association between CST3 and Apo $\epsilon 4$ alleles was found in two studies (65, 68), whereas another study missed the synergistic relationship, finding that the two alleles were independent risk factors for AD (67).

The relationship between CST3 polymorphism and AD occurrence remains controversial, since recent

Involvement of cystatin C in CNS diseases

studies have found no association between CST3 polymorphism and AD (69, 70). A more thorough analysis seems to be necessary.

6. INVOLVEMENT IN NEURONAL CELL DEATH

Cystatin C has been reported to regulate cancer cell migration and metastasis in concert with cathepsins (71). Furthermore, a glycosylated form of cystatin C is necessary for proliferation of fibroblast growth factor 2 (FGF-2)-responsive neural stem cells (72). These findings indicate that cystatin C might be involved in many physiological events, perhaps including embryo implantation and placentation, by regulating cysteine proteases (73).

Altered expression of cystatin C is also seen in other CNS diseases. After stroke/ischemia, cystatin C protein expression was increased in hippocampal neurons (74). Treatment of cultured PC12 cells with 6-hydroxydopamine (6-OHDA), which is a selective neurotoxin used to induce apoptosis in catecholamine-containing neurons, increased cathepsin B, cathepsin D and cystatin C immunoreactivity in terminal dUDP nick end labeling (TUNEL)-positive cells (75). Since lysosomal function is essential for neurons and other post-mitotic cells to prevent accumulation of potentially deleterious proteins and metabolites, cystatin C is likely to be important for neuronal cell survival/death. A previous report showing that cystatin C was up-regulated in oxidative stress-induced apoptosis of cultured rat CNS neurons (76) supports the hypothesis that cystatin C is involved in neuronal cell death via apoptosis in the CNS. Although cystatin C prevents degeneration of rat dopaminergic neurons *in vitro* and *in vivo*, it remains to be elucidated whether or not cystatin C is neuroprotective under pathological conditions.

When we microinjected cystatin C unilaterally into rat hippocampus, neuronal degeneration was observed in the granule cell layer of the dentate hilus. Co-administration of cathepsin B with cystatin C significantly ameliorated the cystatin C-induced neuronal loss, indicating that the mechanism of action of cystatin C in this case may not involve amyloidogenicity (77). This is consistent with previous reports, showing that lysosomal protease inhibitors induce brain aging-related materials, such as meganeurites and tangle-like structures, by inactivating cathepsins in a rat hippocampal slice culture system (51, 78). In AD pathology, cystatin C expression is elevated in pyramidal neurons in cortical layers III and IV, which are the neurons most susceptible to cell death (79). As described in Chapter 5, cystatin C may play a role in the neurodegenerative process in AD in association with abnormal protease activity in cortical neurons.

Next, we examined the effect of cystatin C on neuronal cell death in mixed cultures of human neurons and astrocytes or human-derived neuron/neuronal cell line. The A1 neuronal cell line used here is a well-established neuronal hybridoma of human fetal cerebral neurons with neuroblastoma cells, SK-SH-SY5Y, and has been confirmed to possess the characteristics of human CNS

neurons (80). Cystatin C significantly increased active caspase-3 immunoreactivity in neurons of mixed cultures, increased TUNEL (+) cells and also induced DNA ladder formation in A1 cell cultures; these features are characteristic of neuronal apoptosis (81). In the present study, we quantified gene expression of proapoptotic and anti-apoptotic molecules in A1 cell cultures by means of a real-time quantitative PCR method. Cystatin C increased the proapoptotic factor bax at 8 h and decreased the anti-apoptotic factors bcl-2 and bik (Figure 6). These results are consistent with the idea that neuronal cell death in human neurons and A1 human hybrid neurons occurs through an apoptotic pathway.

Another perspective has emerged on neuronal cell death induced by cystatin C. In the acute phase of status epilepticus in mouse, cystatin C expression was mainly detected in astrocytes and microglia in the hippocampus, accompanied with neuronal cell death, whereas acute neuronal death was reduced in cystatin C^{-/-} mouse (82). Rat facial nerve axotomy increased cystatin C expression in the microglia surrounding the damaged facial nerve nucleus (83). These findings clearly indicate that cystatin C secreted from glial cells should be considered as a cause of neurodegeneration in the local disease environment.

7. CONCLUSIONS

In this review, we have highlighted the roles of cystatin C in the pathophysiology of CNS diseases, especially from the viewpoints of amyloidogenicity and inhibitory activity towards major cysteine proteases. A Leu68Gln variant of cystatin C causes extensive CAA, designated as HCHWA-1. Wild-type cystatin C augments the amyloidogenicity of A β *in vitro*, even at physiological concentrations. Co-deposition of wild-type cystatin C sometimes occurs with A β -type CAA, and increases the severity of CAA. Co-localization of cystatin C with A β in CAA and senile plaques suggests a relationship of cystatin C with AD, and indeed, a close relationship between them has been demonstrated by means of genetic and pathological studies. We showed that 50 nM cystatin C promoted A β fibril formation *in vitro*, suggesting the possible involvement of cystatin C in pathological fibril formation. The concentration of cystatin C in CSF may be regulated in balance with cysteine proteases, such as cathepsins B, H and L. Our recent findings have demonstrated that the concentration of cystatin C is decreased in the CSF of INDs and leptomenigeal metastasis, concomitantly with increased activity of cathepsin B, indicating that disturbance of cystatin C levels in the CNS could be involved in the disease processes. Thus, the evaluation of cystatin C levels is expected to be helpful to understand the disease status, and possibly also in the diagnosis of CNS diseases.

Cystatin C is related with neuronal cell survival and is upregulated during neuronal apoptosis. Cystatin C microinjection augmented neuronal cell death in rat hippocampus, possibly through cysteine protease-inhibitory action and/or by activation of glial cells. While cystatin C

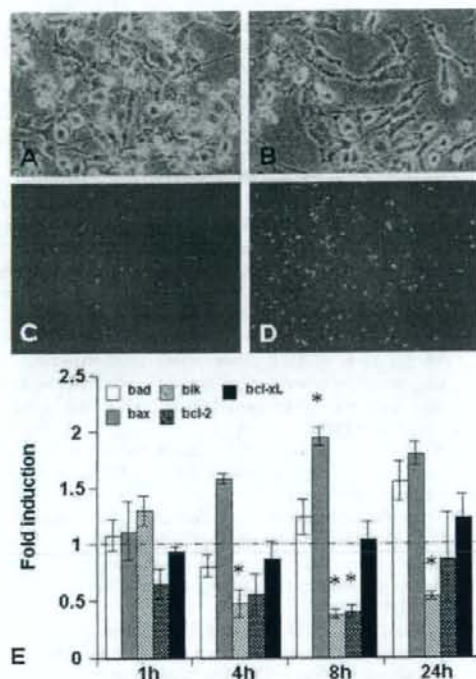


Figure 6. Effects of cystatin C on human-derived A1 hybrid neurons. A1 cells were induced to differentiate with retinoic acid, and treated with 40 nM cystatin C. After 24 h, many of the treated A1 cells (B) appeared to have lost their neurites and to be undergoing cell death, or tended to float compared with untreated A1 cells (A). When a Caspa Tag Caspase-3/7 *in situ* assay kit (Chemicon International, Temecula, CA) was used for detection of activated caspases 3 and 7, many cystatin C-treated cells (D) were positive, whereas few untreated cells were positive (C). (E) Expression of apoptotic genes after treatment with cystatin C. After stimulation for the indicated time, total RNA was isolated, reverse-transcribed and subjected to quantitative real-time PCR to analyze the expression of the bcl gene family. Cystatin C significantly increased the expression of proapoptotic bax mRNA, and inhibited that of antiapoptotic bcl-2 and proapoptotic bik mRNAs. The effects of cystatin C on bcl family gene expression was best observed at 8 h. The data presented here are the mean \pm SEM of fold induction relative to the unstimulated control, from three independent experiments. Statistical significance of differences was assessed using one-way ANOVA, followed by the Bonferroni post hoc multiple comparison test. The criterion of statistical significance was $p < 0.05$, and an asterisk indicates a significant difference from the unstimulated control.

is involved in neural stem cell differentiation and cell survival, our studies using human-derived neuronal cells have revealed that cystatin C itself may induce apoptotic cell death, though the mechanism remains to be elucidated.

Much recent research indicates that cystatin C is involved in various CNS disease processes, and the mechanisms of these effects will be the targets of future studies.

8. ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr. Anders Grubb for providing anti-cystatin C monoclonal antibody.

9. REFERENCES

- Gudmundsson, G., J. Hallgrímsson, J. TA & O. Bjarnason: Hereditary cerebral haemorrhage with amyloidosis. *Brain*, 95, 387-404 (1972)
- Mandybur, T. I.: Cerebral amyloid angiopathy: the vascular pathology and complications. *J Neuropathol Exp Neurol*, 45, 79-90 (1986)
- Cohen, D. H., H. Feiner, O. Jansson & B. Frangione: Amyloid fibril in hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis (HCHWA) is related to the gastroenteropancreatic neuroendocrine protein, gamma trace. *J Exp Med*, 158, 623-8 (1983)
- Ghisso, J., B. Pons-Estel & B. Frangione: Hereditary cerebral amyloid angiopathy: the amyloid fibrils contain a protein which is a variant of cystatin C, an inhibitor of lysosomal cysteine proteases. *Biochem Biophys Res Commun*, 136, 548-54 (1986)
- Graffagnino, C., M. H. Herbstreith, D. E. Schmechel, E. Levy, A. D. Roses & M. J. Alberts: Cystatin C mutation in an elderly man with sporadic amyloid angiopathy and intracerebral hemorrhage. *Stroke*, 26, 2190-3 (1995)
- Nagai, A., S. Kobayashi, K. Shimode, K. Imaoka, N. Umegae, S. Fujihara & M. Nakamura: No mutations in cystatin C gene in cerebral amyloid angiopathy with cystatin C deposition. *Mol Chem Neuropathol*, 33, 63-78 (1998)
- Haan, J., M. L. Maat-Schieman, S. G. van Duinen, O. Jansson, L. Thorsteinnsson & R. A. Roos: Co-localization of beta/A4 and cystatin C in cortical blood vessels in Dutch, but not in Icelandic hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis. *Acta Neurol Scand*, 89, 367-71 (1994)
- Itoh, Y., M. Yamada, M. Hayakawa, E. Otomo & T. Miyatake: Cerebral amyloid angiopathy: a significant cause of cerebellar as well as lobar cerebral hemorrhage in the elderly. *J Neurol Sci*, 116, 135-41 (1993)
- Maruyama, K., S. Ikeda, T. Ishihara, D. Allsop & N. Yanagisawa: Immunohistochemical characterization of cerebrovascular amyloid in 46 autopsied cases using antibodies to beta protein and cystatin C. *Stroke*, 21, 397-403 (1990)
- Vinters, H. V., G. S. Nishimura, D. L. Secor & W. M. Pardridge: Immunoreactive A4 and gamma-trace peptide colocalization in amyloidotic arteriolar lesions in brains of patients with Alzheimer's disease. *Am J Pathol*, 137, 233-40 (1990)
- Izumihara, A., T. Ishihara, Y. Hoshii & H. Ito: Cerebral amyloid angiopathy associated with hemorrhage: immunohistochemical study of 41 biopsy cases. *Neurol Med Chir (Tokyo)*, 41, 471-7; discussion 477-8 (2001)
- Jorrsjo, S., D. M. Wuttge, A. Sirsjo, C. Whatling, A. Hamsten, S. Stemme & P. Eriksson: Differential expression

Involvement of cystatin C in CNS diseases

- of cysteine and aspartic proteases during progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Am J Pathol*, 161, 939-45 (2002)
13. Sukhova, G. K., G. P. Shi, D. I. Simon, H. A. Chapman & P. Libby: Expression of the elastolytic cathepsins S and K in human atheroma and regulation of their production in smooth muscle cells. *J Clin Invest*, 102, 576-83 (1998)
14. Abdul-Hussien, H., R. G. Soekhoe, E. Weber, J. H. von der Thusen, R. Kleemann, A. Mulder, J. H. van Bockel, R. Hanemaaijer & J. H. Lindeman: Collagen degradation in the abdominal aneurysm: a conspiracy of matrix metalloproteinase and cysteine collagenases. *Am J Pathol*, 170, 809-17 (2007)
15. Shi, G. P., G. K. Sukhova, A. Grubb, A. Ducharme, L. H. Rhode, R. T. Lee, P. M. Ridker, P. Libby & H. A. Chapman: Cystatin C deficiency in human atherosclerosis and aortic aneurysms. *J Clin Invest*, 104, 1191-7 (1999)
16. Hurle, M. R., L. R. Helms, L. Li, W. Chan & R. Wetzel: A role for destabilizing amino acid replacements in light-chain amyloidosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 5446-50 (1994)
17. McCutchen, S. L., Z. Lai, G. J. Mirov, J. W. Kelly & W. Colon: Comparison of lethal and nonlethal transthyretin variants and their relationship to amyloid disease. *Biochemistry*, 34, 13527-36 (1995)
18. Abrahamson, M. & A. Grubb: Increased body temperature accelerates aggregation of the Leu-68-->Gln mutant cystatin C, the amyloid-forming protein in hereditary cystatin C amyloid angiopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 1416-20 (1994)
19. Maruyama, K., F. Kametani, S. Ikeda, T. Ishihara & N. Yanagisawa: Characterization of amyloid fibril protein from a case of cerebral amyloid angiopathy showing immunohistochemical reactivity for both beta protein and cystatin C. *Neurosci Lett*, 144, 38-42 (1992)
20. Gerhartz, B. & M. Abrahamson: Physico-chemical properties of the N-terminally truncated L68Q cystatin C found in amyloid deposits of brain haemorrhage patients. *Biol Chem*, 383, 301-5 (2002)
21. Levy, E., M. Jaskolski & A. Grubb: The role of cystatin C in cerebral amyloid angiopathy and stroke: cell biology and animal models. *Brain Pathol*, 16, 60-70 (2006)
22. Bjarnadottir, M., C. Nilsson, V. Lindstrom, A. Westman, P. Davidsson, F. Thormodsson, H. Blomdal, G. Gudmundsson & A. Grubb: The cerebral hemorrhage-producing cystatin C variant (L68Q) in extracellular fluids. *Amyloid*, 8, 1-10 (2001)
23. Janowski, R., M. Kozak, E. Jankowska, Z. Grzonka, A. Grubb, M. Abrahamson & M. Jaskolski: Human cystatin C, an amyloidogenic protein, dimerizes through three-dimensional domain swapping. *Nat Struct Biol*, 8, 316-20 (2001)
24. Jaskolski, M.: 3D domain swapping, protein oligomerization, and amyloid formation. *Acta Biochim Pol*, 48, 807-27 (2001)
25. Wei, L., Y. Berman, E. M. Castano, M. Cadene, R. C. Beavis, L. Devi & E. Levy: Instability of the amyloidogenic cystatin C variant of hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis, Icelandic type. *J Biol Chem*, 273, 11806-14 (1998)
26. Benedikz, E., G. S. Merz, V. Schwenk, T. E. Johansen, H. M. Wisniewski & J. I. Rushbrook: Cellular processing of the amyloidogenic cystatin C variant of hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis, Icelandic type. *Amyloid*, 6, 172-82 (1999)
27. Sastre, M., M. Calero, M. Pawlik, P. M. Mathews, A. Kumar, V. Danilov, S. D. Schmidt, R. A. Nixon, B. Frangione & E. Levy: Binding of cystatin C to Alzheimer's amyloid beta inhibits *in vitro* amyloid fibril formation. *Neurobiol Aging*, 25, 1033-43 (2004)
28. Abrahamson, M., R. W. Mason, H. Hansson, D. J. Buttle, A. Grubb & K. Ohlsson: Human cystatin C: role of the N-terminal segment in the inhibition of human cysteine proteinases and in its inactivation by leucocyte elastase. *Biochem J*, 273 (Pt 3), 621-6 (1991)
29. Barrett, A. J., H. Fritz, A. Grubb, S. Isemura, M. Jarvinen, N. Katunuma, W. Machleidt, W. Muller-Esterl, M. Sasaki & V. Turk: Nomenclature and classification of the proteins homologous with the cysteine-proteinase inhibitor chicken cystatin [letter]. *Biochemical Journal*, 236, 312 (1986)
30. Grubb, A.: Diagnostic value of analysis of cystatin C and protein HC in biological fluids. *Clinical Nephrology*, 38, S20-7 (1992)
31. Assfalg-Machleidt, I., A. Billing, D. Frohlich, D. Nast-Kolb, T. Joka, M. Jochum & W. Machleidt: The role of the kininogens as cysteine proteinase inhibitors in local and systemic inflammation. *Agents Actions Suppl*, 38 (Pt 1), 312-21 (1992)
32. Lenarcic, B., D. Gabrijelcic, B. Rozman, M. Drobnic-Kosorok & V. Turk: Human cathepsin B and cysteine proteinase inhibitors (CPIs) in inflammatory and metabolic joint diseases. *Biol Chem Hoppe Seyler*, 369 Suppl, 257-61 (1988)
33. Lah, T. T., J. Babnik, E. Schiffmann, V. Turk & U. Skaleric: Cysteine proteinases and inhibitors in inflammation: their role in periodontal disease. *J Periodontol*, 64, 485-91 (1993)
34. Buttle, D. J., D. Burnett & M. Abrahamson: Levels of neutrophil elastase and cathepsin B activities, and cystatins in human sputum: relationship to inflammation. *Scand J Clin Lab Invest*, 50, 509-16 (1990)
35. Chapman, H. A., Jr., J. J. Reilly, Jr., R. Yee & A. Grubb: Identification of cystatin C, a cysteine proteinase inhibitor, as a major secretory product of human alveolar macrophages *in vitro*. *Am Rev Respir Dis*, 141, 698-705 (1990)
36. Nagai, A., Y. Murakawa, M. Terashima, K. Shimode, N. Umegae, H. Takeuchi & S. Kobayashi: Cystatin C and cathepsin B in CSF from patients with inflammatory neurologic diseases. *Neurology*, 55, 1828-32 (2000)
37. Nagai, A., M. Terashima, T. Harada, K. Shimode, H. Takeuchi, Y. Murakawa, M. Nagasaki, A. Nakano & S. Kobayashi: Cathepsin B and H activities and cystatin C concentrations in cerebrospinal fluid from patients with leptomeningeal metastasis. *Clin Chim Acta*, 329, 53-60 (2003)
38. Grubb, A., O. Simonsen, G. Sturfelt, L. Truedsson & H. Thysell: Serum concentration of cystatin C, factor D and beta 2-microglobulin as a measure of glomerular filtration rate. *Acta Med Scand*, 218, 499-503 (1985)
39. Kyhse-Andersen, J., C. Schmidt, G. Nordin, B. Andersson, P. Nilsson-Ehle, V. Lindstrom & A. Grubb: Serum cystatin C, determined by a rapid, automated