
厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

遺伝性脳小血管病の病態機序の
解明と治療法の開発

平成 22 年度 総括・分担研究報告書

Annual Report of the Research Committee for Hereditary
Cerebral Small Vessel Disease

Health and Labour Sciences Research Grants
The Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan

主任研究者 小野寺 理

平成23 (2011) 年 3 月

目次

I. 総括研究報告書

遺伝性脳小血管病の病態機序の解明と治療法の開発	主任研究者 小野寺 理	1
-------------------------	-------------	---

II. 分担研究報告

1. 本邦における CADASIL の新しい診断基準の妥当性について	7
------------------------------------	---

分担研究者	水野敏樹（京都府立医科大学神経内科）
研究協力者	細見明子、水田依久子、富井康弘、中川正法（京都府立医科大学神経内科）

2. CARASIL の MRI 画像に関する研究	10
---------------------------	----

分担研究者	西澤正豊（新潟大学脳研究所神経内科）
研究協力者	野崎洋明（新潟大学脳研究所神経内科）
	福武敏夫（亀田メディカルセンター）
	下江 豊（鹿島労災病院）
	平山幹夫（春日井市民病院）
	柳川宗平（飯田市立病院）
	西本祥仁、鈴木規宏（慶應義塾大学神経内科）
	小野寺 理（新潟大学脳研究所生命科学リソースセンター）

3. CADASIL の病態解明（認知症の特徴と病理所見の解析）	
----------------------------------	--

分担研究者	内野 誠（熊本大学大学院 生命科学研究部 神経内科学分野）
研究協力者	平野照之、植田明彦（熊本大学大学院 生命科学研究部 神経内科学分野）

4. 劣性遺伝性家族性脳小血管病の原因遺伝子 <i>HTRA1</i> 変異のヘテロ接合体と脳小血管病の関連に関する研究	16
--	----

分担研究者	小野寺理（新潟大学脳研究所生命科学リソースセンター）
研究協力者	二本松萌、野崎洋明、志賀篤、西澤正豊（新潟大学脳研究所神経内科）
	水野敏樹（京都府立医科大学医学研究科神経内科学）
	伊藤彰一（千葉大学医学部附属病院神経内科）
	野田智子（名古屋医療センター神経内科）

5. 二光子レーザー顕微鏡を用いた両側総頸動脈閉塞症における脳微小循環の解析 …… 19
 分担研究者 富本秀和（三重大学 神経病態内科学）
 研究協力者 矢田健一郎（三重大学 神経病態内科学）
6. 血液脳関門の研究（モデル動物）
 分担研究者 伊東史子（筑波大学大学院人間総合科学研究科・実験病理学）… 22
7. 脳虚血再還流 BBB モデルの作成と BBB 保護薬としての ARB の薬効検定 …… 25
 分担研究者 丹羽正美（長崎大学大学院医歯薬学研究科神経薬理学分野）
 研究協力者 中川慎介（長崎大学大学院医歯薬学研究科神経薬理学分野）
 宗 剛平、永田 泉（長崎大学大学院医歯薬学研究科脳神経外科）
8. CARASIL 原因遺伝子；HtrA1 遺伝子欠損マウスと CARASIL 剖検脳の脳血管病理解析に
 関する研究 …… 28
 分担研究者 佐藤俊哉（新潟大学脳研究所動物資源解析学分野）
 研究協力者 加藤泰介（新潟大学医学部臓器連関研究センター）
 二本松萌、野崎洋明、志賀 篤、西澤正豊（新潟大学脳研究所神経
 内科）
 廣川祥子（新潟大学脳研究所動物資源解析学分野）
 辻 省次（東京大学神経内科）
 遠藤直人（新潟大学医学部臓器連関研究センター、新潟大学整形
 外科）
 小野寺理（新潟大学脳研究所生命科学リソース研究センター）

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

I 総括研究報告

総括研究報告書

遺伝性脳小血管病の病態機序の解明と治療法の開発 (22141101)

主任研究者 小野寺理 (新潟大学脳研究所生命科学リソース研究センター)

1. 本研究班の目的

脳は血液脳関門という特殊な構造を持つ。この構造は脳小血管を中心とする neurovascular unit により構成されている。近年の画像診断の発達により、この脳小血管に首座をもつ病態が高頻度で指摘されるようになった (leukoaraiosis:LA)。LA は大脳白質を中心とする変化で、認知症、脳梗塞、出血性脳梗塞の発症に密接に関わっている。病態機序として、小血管の閉塞性の病態機序、血液脳関門の機能異常、等が唱えられているがまだ不明である。診断基準が確立されておらず、有効な治療方法も確立されていない。希に、家族性に LA を起こす遺伝性脳小血管病が報告されている。遺伝性脳小血管病には、常染色体性優生遺伝形式をとる Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL)や、劣性遺伝形式をとる Cerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CARASIL)等が知られている。いずれも 20 代から 40 代で脳梗塞様症状等で発症し、認知症を来す。本邦では CADASIL が 60 家系以上、CARASIL が 10 家系前後、報告されている。しかしその正確な疾患頻度、病像は不明であった。本年、我々は CARASIL の原因遺伝子を同定し TGF- β ファミリーのシグナル伝達の更新が、その背景にあることを明らかにした。本発見により、脳小血管病を TGF- β ファミリーシグナルの面から解明する糸口を得た。本研究班では本邦における、遺伝性脳小血管病の頻度、および症状を明らかとし、“TGF- β ファミリーのシグナル異常に伴う脳小血管病 CARASIL”の病態解明を手がかりに、これらの遺伝子変異が、血液脳関門や、脳小血管に与える影響を検討する。疾患関連血液脳関門培養細胞モデルを構築し、候補薬剤の検討を行う。さらに、本症の早期診断法の確立、バイオマーカーの確立を目指す。

2. 研究計画および方法

① 遺伝性脳小血管病の実態調査 (水野 小野寺)

本邦における遺伝性脳小血管病患者の実態調査と生体資料収集を行い遺伝子検査による確定診断を行う(水野, 小野寺)。CADASIL の診断においては、遺伝子検査と皮膚小血管の組織所見が重要であり。そのため、遺伝子、血清、髄液、皮膚、臨床症状、MRI 画像の情報を得、本邦における遺伝性小血管病の包括的データベースの構築を行う。さらに、どのような行政サ

一ビスが必要とされているかを明らかにする。CADASIL60例、CARASIL20例の集積を目標とするが、同様の画像、臨床変化を示す孤発性のLA症例で疑わしい症例の集積も同様に行う。未解明の65歳未満発症LA症例200例の集積を目標とする。本年度すでにCARASIL疑い30例の臨床情報、DNAの集積を終了し、かつ脳外科、神経内科教育病院に対して、該当疾患罹患患者の調査への協力をお願いした。

② 遺伝性脳小血管病の病態機序の解明（富本 西澤 伊東 小野寺 佐藤）

CARASILではセリンプロテアーゼの異常により結果としてTGF- β ファミリーシグナルの亢進を引き起こす。本研究班では、これらのシグナル伝達の関与をモデルマウスで検討する。申請者はCARASILのモデルマウスを保有している。さらに理化学研究所の山田らが開発した、アストロサイトでTGF- β ファミリー受容体の一つであるBMP受容体1Aを欠失させた、血液脳関門の脆弱マウスを使用する(Mol. Cell. Neurosci. 38, 417-430 2008)。また伊東らの開発した、血管内皮特異的にTGF- β ファミリーシグナルを抑制した遺伝子改変マウスを用いる。これらの脳小血管病モデルマウスにて脳小血管病を引き起こす遺伝子の機能、およびその遺伝子の下流のシグナル伝達を検討する(伊東)。また複数の遺伝子改変モデル動物を掛け合わせ、相加。もしくは相乗的な効果が得られないか検討する(佐藤)。さらに、本邦で開発された脳卒中易発症高血圧自然発症ラット(SHRSP)を用い血液脳関門の異常を、疾患関連遺伝子、およびシグナル異常の面から検討を加える(富本)。これらの解析に必要とされる共焦点顕微鏡、遺伝子定量装置、動物用MRIは当施設が保有しており使用できる環境にある。

③ 疾患関連血液脳関門培養細胞モデルの開発（丹羽 小野寺）

丹羽らの開発した血液脳関門を再現したBBBキットを用い、CADASIL、CARASILの遺伝子変異を導入、もしくは下流のシグナル伝達を modulation し、疾患関連血液脳関門モデル細胞培養系を確立する。具体的には疾患関連遺伝子変異を導入する。TGF- β ファミリーシグナルを亢進、もしくは低下させる。Notchシグナルを変動させ、血液脳関門機能を検討する。

3. 2年目の成果の概要

本班では、本症の暫定診断基準を作成した。水野らは、その妥当性を従来のDavousらのCADASIL診断基準(D基準)と対比した。D基準はprobable 31%、possible 35%に対して、本診断基準ではprobable 62%、possible 35%と感度が上昇した。小野寺、水野、西澤らは既報の遺伝性

脳小血管病が否定されたサンプルにて、HTRA1 遺伝子異常を検討し、高率に遺伝子異常が見いだされること、またそれらの変異型 HTRA1 のプロテアーゼ活性が低下していることを確認した。小野寺、佐藤は HTRA1 の遺伝子欠損マウスの網羅的発現解析により、TGF- β ファミリー遺伝子ネットワークの発現が脳内で亢進していることを確認した。また同マウスの C57BL/6J 系統へのバッククロスを N9 まで進めた。内野らは 6 例 6 家系の CADASIL 患者を診断し、13 例の CADASIL 疑い例の皮膚生検を行い、凍結切片による診断の有効性を確認し、皮質性認知症の特徴を有することを明らかにした。丹羽らは脳虚血再還流血液脳関門 (BBB) モデルを作成した。このシステムを用いアンジオテンシン II 受容体拮抗薬 (ARB) の BBB 保護効果を明らかにした。冨本らは、血流の低下後に、血行を再建しても微小循環が回復しない no reflow 現象の発症機序に焦点をあて、二光子励起レーザー顕微鏡で微小循環を観察し、原因として血球の rolling、adhesion の関与を見いだした。伊東らは TGF- β シグナルを完全に消失した血管内皮細胞を検討し、同細胞はシェアストレスに応答せず、TGF- β シグナルがシェアストレスを介し血管の恒常性を維持している事を示した。これらの成果により、臨床面から本症の特徴が明らかになり、また薬剤スクリーニングの系、有効薬剤の候補が得られている。病態面からも、TGF- β シグナルと脳微小循環の解明が順調に進んでいる。

II 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)

分担研究年度終了報告書

遺伝性脳小血管症の病態機序の解明と治療法の開発

本邦における CADASIL の新しい診断基準の妥当性について

分担研究者	水野敏樹	京都府立医科大学神経内科
研究協力者	細見明子	京都府立医科大学神経内科
	水田依久子	京都府立医科大学神経内科
	富井康弘	京都府立医科大学神経内科
	中川正法	京都府立医科大学神経内科

研究要旨

従来用いられていた Davous により CADASIL の診断基準と遺伝性脳小血管症の病態機序の解明と治療法の開発班で作成した新しい診断基準の妥当性を既に CADASIL と診断した 26 名で検討した。Davous らの基準は本邦 CADASIL 例では高齢発症、脳卒中危険因子の合併のため probable と possible を合わせてもその感度は 65.4% と低かった。一方本邦の実態に即して作成した厚労基準は感度 97% であり、この基準を用いて幅広くスクリーニングすべきである。

A. 研究目的

CADASIL の確定診断は *NOTCH3* 遺伝子変異または電顕による Granular Osmiophilic Material の存在によりなされている。Davous により提唱された CADASIL の診断基準を用いると本邦の発症例は欧米症例と比べて臨床徴候の違いから見落とされる症例があり、本邦の実態に即した診断基準が必要であった。今回厚生労働省遺伝性脳小血管症の病態機序の解明と治療法の開発班で新しい診断基準(厚労基準)を作成したので、その妥当性を Davous による診断基準と対比して検討した。

B. 研究方法

対象は CADASIL と診断した 22 家系 26 名(男性 12 名、女性 14 名、平均年齢 53.4 ± 10.3 歳)。これらの症例の臨床症状から後ろ向きに二つの診断基準の感度を求めた。統計学的解析は Mann-Whitney または χ^2 検定を用いた。

(倫理面への配慮)

京都府立医科大学倫理委員会の承認を得た遺伝性神経疾患に対する遺伝子解析の方法に従って説明し、同意を得た上で行った。

C. 研究結果

Davous 基準各項目の感度は 50 歳以下の若年発症 54%、持続的な神経症状を伴う脳卒中様発作 62%、片頭痛 52%、うつ症状 23%、認知症 50%、脳卒中危険因子を有さない 42%、常染色体優性遺伝形式 73%、皮質病変を欠く MRI での白質病変 100% で、診断基準の感度は除外例 31%、probable 31%、possible 35% となり、probable と possible を合わせても 65.4% であった。(表 1)

厚労基準各項目の感度は 55 歳以下の発症 71%、皮質下性認知症、錐体路徴候もしくは偽性球麻痺 69%、神経症状を伴う脳卒中様発作 65%、うつ症状 23%、片頭痛 52%、常染色体優性遺伝形式 81%、MRI/CT で側頭極を含む大脳白質病変 62% で、遺伝子検査を行う前の感度は probable 62%、possible 35% で、probable と

possible を合わせると 97%であった。(表 2)

D. 研究発表

1. 論文発表

Kuriyama N, Nagakane Y, Hosomi A, Ohara T, Kasai T, Harada S, Takeda K, Yamada K, Ozasa K, Tokuda T, Watanabe Y, Mizuno T, Nakagawa M.. Evaluation of factors associated with elevated levels of platelet-derived microparticles in the acute phase of cerebral infarction.. Clin Appl Thromb Hemost. 2010 Feb;16(1):26-32.

Chena C-H, Mizuno T, Elston R, Kariuki MM., Hall K, Unverzagt F, Hendrie H, Gatere S, Kioy P, Patel NB., Friedland RP., Kalaria RN.. A comparative study to screen dementia and APOE genotypes in an ageing East African population.. Neurobiol Aging. 2010 May;31(5):732-40.

Kuriyama N, Mizuno T, Niwa F, Watanabe Y, Nakagawa M.. Autonomic nervous dysfunction during acute cerebral infarction. Neurol Res. 2009 Sep 1. [Epub ahead of print]

2. 学会発表

Mizuno T, Mizuta I, Saigo K, Hosomi A, Kasai T, Nagakane Y, Makino M, Nakagawa M. Hereditary

cerebral small vessel diseases in Japan: CADASIL and NOTCH3 non-related CADASIL-like syndrome. 14th Congress of the European Federation of Neurological Societies, Geneva, 2010.9.25-28

藤原 康弘、田邑 愛子、細見 明子、笠井 高士、永金 義成、近藤 正樹、栗山 長門、水野 敏樹、中川 正法 CADASIL 症例における脳血管と末梢血管の血管反応性. 第 35 回日本脳卒中学会総会 盛岡 2010.4.15-17

水野 敏樹、細見 明子、田邑 愛子、山田 丈弘、笠井 高士、藤原 康弘、永金 義成、近藤 正樹、栗山 長門、中川 正法 Davous による CADASIL 診断基準の妥当性について 第 35 回日本脳卒中学会総会 盛岡 2010.4.15-17

栗山 長門、水野 敏樹、笠井 高士、田邑 愛子、渡邊 明子、山田 恵、渡邊 能行、中川 正法 深部白質病変進行のリスク因子としての TGF-β1 値の検討 第 35 回日本脳卒中学会総会 盛岡 2010.4.15-17

E. 知的財産権の出願・登録状況

なし

F. 健康危険情報

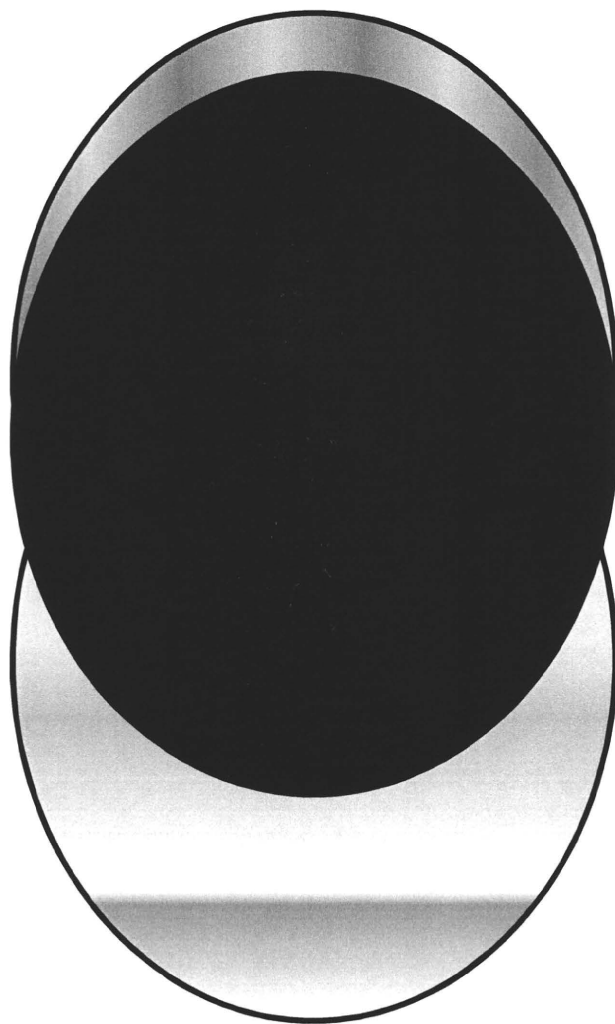
なし

表 1 Davous による診断基準

	Definite	Probable	Possible
発症年齢	53.8%		26.9%
脳卒中様発作	61.5%		38.0%
片頭痛発作	52.2%		
うつ症状	23.1%		23.1%
認知症	50.0%		50.0%
脳卒中危険因子	42.3%		57.6%
遺伝形式	73.0%		15.4%
白質病変	100%		100%
除外基準	30.8%		
感度	30.8%	30.8%	34.6%
	30.8%	65.4%	

表 2 遺伝性脳小血管病の病態機序の解明と治療法の開発基準

	各項目	Definite	Probable	Possible
発症年齢			70.8%	96.2%
皮質下性認知症	69.2%		84.6%	92.3%
錐体路徴候, 偽性球麻痺				
脳卒中様発作	65.4%			
片頭痛発作	52.2%			
うつ症状	23.1%			
遺伝形式		80.8%		92.3%
白質病変		61.5%		100%
除外基準		0%		
感度		61.5%	61.5%	34.7%
		61.5%	96.2%	



- 遺伝子診断で確定したCADASIL 26例
- Davousらの基準で診断できたCADASIL: 17例 (感度65.4%)
- ◐ 厚労基準で診断できたCADASIL: 25例 (感度96.2%)

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)

分担研究年度終了報告書

遺伝性脳小血管症の病態機序の解明と治療法の開発

CARASIL の MRI 画像 に関する研究

分担研究者	西澤 正豊	新潟大学脳研究所神経内科
研究協力者	野崎 洋明	新潟大学脳研究所神経内科
	福武 敏夫	亀田メディカルセンター
	下江 豊	鹿島労災病院
	平山 幹夫	春日井市民病院
	柳川 宗平	飯田市立病院
	西本 祥仁	慶應義塾大学神経内科
	鈴木 規宏	慶應義塾大学神経内科
	小野寺 理	新潟大学脳研究所生命科学リソースセンター

研究要旨

本研究では、遺伝子検査で Cerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CARASIL) と確定診断した症例の頭部 MRI 画像の信号異常と萎縮を解析し、その特徴の抽出および常染色体優性遺伝性の脳小血管病である Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL) との比較を行った。CARASIL 症例では、径 3mm 以下の空洞形成を伴う大脳深部白質病変および前頭葉前部、側頭葉前部、外包病変、微小出血を全例に認めた。CARASIL 症例では、一様に広汎な白質病変が、認知機能障害に先行して形成されており、病期の進行とともに、白質および脳幹が萎縮する傾向を認めた。また、進行期の CARASIL 症例で認める中脳大脳脚や橋背側～中小脳脚の病変は、CADASIL での報告がなく、CARASIL の画像診断の hallmark になる可能性があると考えた。

A. 研究目的

CARASIL は常染色体劣性遺伝性の脳小血管病である。CARASIL の頭部 MRI 画像所見として、広汎な大脳白質に加えて、側頭葉前部、外包に T2 強調画像で高信号を呈することが報告されている。これらの所見は、常染色体優性遺伝性の脳小血管病である CADASIL と類似している。しかし、遺伝子検査によって、診断が確定された CARASIL 症例について、まとまった MRI 所見の報告はない。

本研究では、遺伝子検査で診断が確定された CARASIL 症例の頭部 MRI 画像の特徴を抽出し、CADASIL との相違点を示すことを目的とした。

B. 研究方法

広汎な大脳白質病変を呈し、遺伝子検査に

よって CARASIL と確定診断した 5 家系 5 例の頭部 MRI 画像を収集し、T2 強調画像および FLAIR 画像での異常信号と萎縮について解析を行った。また、過去の MRI 画像が入手可能であった 2 例について、経時的な画像変化を解析した。

(倫理面への配慮)

患者 DNA は、十分なインフォームドコンセントを行い、同意書を作成した上で、末梢血リンパ球から抽出しており、倫理面の問題はない。

C. 研究結果

CARASIL 症例では、径 3mm 以下の空洞形成を伴う大脳深部白質病変および前頭葉前部、側頭葉前部、外包病変、微小出血を全例に認めた。

CARASIL 症例では、一様に広汎な白質病

変が認知機能障害に先行して形成されていた。

進行期の CARASIL 症例で認める中脳大脳脚や橋背側～中小脳脚の病変は、CADASIL での報告がなく、CARASIL の画像診断の hallmark になる可能性がある。

D. 研究発表

1. 論文発表

未発表

2. 学会発表

第 52 回日本神経学会学術大会 で発表予定

E. 知的財産権の出願・登録状況(予定含む)

(特許取得・実用新案登録・その他)

なし

F. 健康危険情報

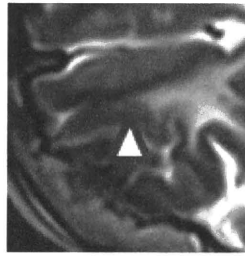
なし

CARASILのMRI画像

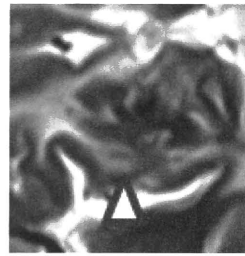
橋から中脳脚



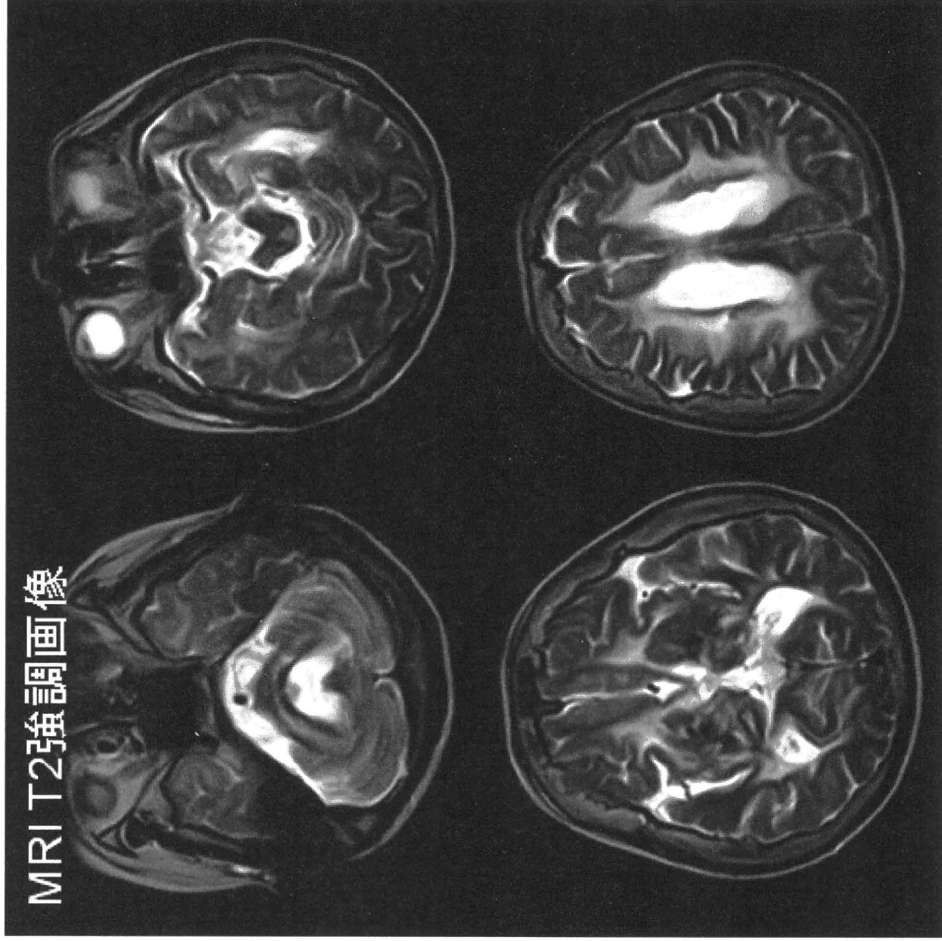
前頭葉前部



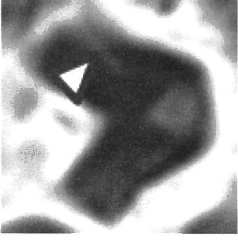
外包



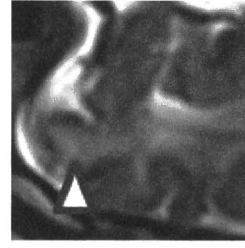
MRI T2強調画像



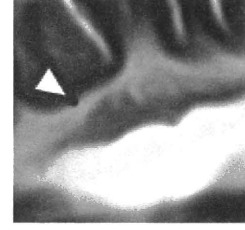
中脳大脳脚



側頭葉前部



側脳室周囲



厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)

分担研究年度終了報告書

遺伝性脳小血管症の病態機序の解明と治療法の開発

CADASIL の病態解明(認知症の特徴と病理所見の解析)

分担研究者	内野 誠	熊本大学大学院	生命科学研究部	神経内科学分野
研究協力者	平野 照之		同上	
	植田 明彦		同上	

研究要旨

本邦での CADASIL 報告例は増加しているものの、その病態は解明されておらず根治療法もない。我々は、これまで蓄積された CADASIL 症例の臨床像および病理所見を解析し、CADASIL の病態解明の手がかりを探った。CADASIL の 4 大症状の一つである認知症は、皮質下性のみならず皮質性の特徴を有することが明らかとなった。CADASIL の新たな診断ツールとして、皮膚組織を用いた光学顕微鏡での basophilic submicron granule (BSG) が有用であった。BSG は電子顕微鏡での granular osmiophilic material (GOM) に相当し、どの施設でも検査可能な方法である。また、BSG (GOM) の組織化学的解析によって CADASIL 病態解明の突破口が開けるものと考えられた。

A. 研究目的

CADASIL の臨床像と病理所見を解析し、その病態を明らかにする。

B. 研究方法

a. 臨床像: 認知症の特徴

自験例 11 例(うち剖検 1 例)を対象とし、認知機能障害の特徴(皮質性、皮質下性)を解析した。また、剖検例の脳病理所見から病巣分布と症候の関連を検討した。

b. Basophilic Submicron Granules (BSG)を用いた病理診断

BSG による診断精度について 2010 年 1 月から 12 月までの連続 13 例を対象に前向きに検討した。BSG は、電子顕微鏡での CADASIL 病理所見 Granular Osmiophilic Material (GOM) を光学顕微鏡で簡易に観察する方法として、我々が開発し報告した方法である。

c. BSG (GOM) の組織化学的検討

BSG の染色性から GOM の性質を組織化学的

手法(トルイジン青染色の大野法)で検討した。

C. 研究結果

a. 臨床像: 認知症の特徴

11 例中 5 例が認知症と診断された。2 例は白質病変が軽度の病初期に一過性の皮質症状(失語、失行、失認、半側空間無視)を認めた。また、白質病変の進行した末期の 2 例で持続性の皮質症状(失認; 構成失行、半側空間無視)を認めた。CADASIL では、血管性と考えられる一過性の皮質症状のみでなく、末期には皮質性認知症を呈すると考えられた。

剖検脳の肉眼所見では、半側空間無視や構成失行を説明づける皮質病巣はみられなかった。

考察: 過去の臨床調査で、CADASIL の認知症はラクナ梗塞および大脳萎縮との関係が示唆されている。CADASIL のラクナ梗塞は、皮質下白質に形成され、皮質に形成されることは、ほとんどない。また Binswanger 病と異なり、皮質直下の白質に梗塞は形成されるが、皮質直下白質の梗

塞により皮質症状を呈するといった報告はない。一方、大脳萎縮に関連した病理変化として、神経細胞のアポトーシスが CADASIL 剖検例で確認されている。本検討で認めた皮質性認知症は、剖検組織においても構成失行や半側空間無視などの皮質症状を説明づけるような皮質梗塞は検出されなかったことから、皮質性認知症はラクナ梗塞による血管性の要因ではなく、血管性以外の何らかの要因が存在するものと考えられた。

b. BSG を用いた病理診断

感度は 100%、特異度は 88%であった。偽陽性例が 1 例あったが、皮膚組織を上腕ではなく、腹壁から採取したため、観察に適した径 50~100 μm の細動脈を検出できなかった。

考察:本方法は、特殊な抗体が必要なく、どの施設でも可能である。CADASIL 病理診断のスクリーニングとして、広く臨床応用可能と考えられた。

c. BSG(GOM)の組織化学的検討

トルイジン青染色の大野法を用いて検討した。細胞核は pH 4, pH 7 の緩衝液中でもトルイジン青で染色された。一方、BSG は pH 7 で染色されるが、pH 4 では染色されなかった。このような性質は、システインが増加する変異、システインが減る変異、システインの増減がない変異、のいずれの組織においても確認され、CADASIL における BSG(GOM)の普遍的な性質と考えられた。

考察: GOM はすべての CADASIL 症例で観察され、CADASIL の遺伝子変異が存在する Notch3 細胞外ドメインで構成されると報告されており、GOM の性質を解明することは、CADASIL の病態解明にとって重要である。しかし、GOM は電子顕微鏡でしか観察できないと認識されていたため、GOM の研究は電子顕微鏡による形態学的な検討にとどまっており、さらに GOM と遺伝子変異により形成される Notch3 細胞外ドメインの不对のシステイン残基との関係を結びつけるような生化学的な検討はこれまでなされてこなかった。今

回、我々は GOM を光学顕微鏡で観察する方法を開発したことで、GOM の研究を電子顕微鏡レベルではなく、光学顕微鏡レベルで進めることが可能となった。これにより GOM の性質が既存の組織化学の手法で生化学的に検討できるようになった。本方法により遺伝子解析により得られた情報と病理学的研究を結びつけることができ、CADASIL の病態解明の突破口と成り得るものと考えられる。

D. 研究発表

1. 論文発表

Ueda A, Hirano T, Takahashi K, Kurisaki R, Hino H, Uyama E, Uchino M. Detection of granular osmiophilic material of cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy by light microscopy in frozen sections. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 2009; 35: 618-622

2. 学会発表

第 29 回 日本認知症学会学術集会

CADASIL における認知症の特徴について
内野 誠、植田明彦、中間達也、米持康寛、平原智雄、栗崎玲一、石崎雅俊、小阪嵩幸、岡本定久、平野照之

第 51 回 日本神経学会学術集会

皮膚凍結切片を用いた CADASIL の病理学的診断: Basophilic Submicron Granules
植田明彦、平野照之、栗崎玲一、日野洋健、池野幸一、宇山英一郎、内野 誠

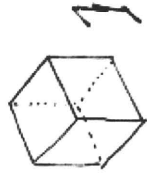
E. 知的財産権の出願・登録状況(予定含む)

特記事項なし

F. 健康危険情報

特記事項なし

CADASILの認知症の特徴



皮質下性認知症

ラクナ梗塞による血管性認知症

+

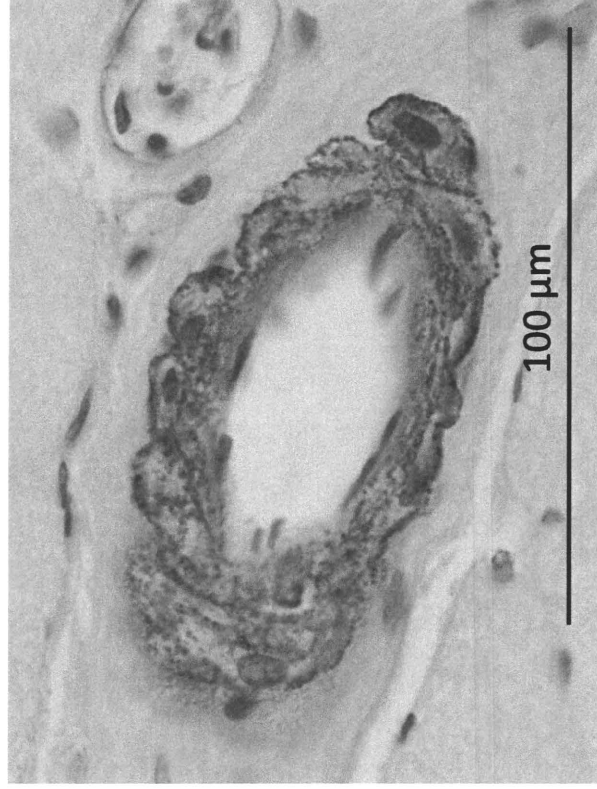
皮質性認知症



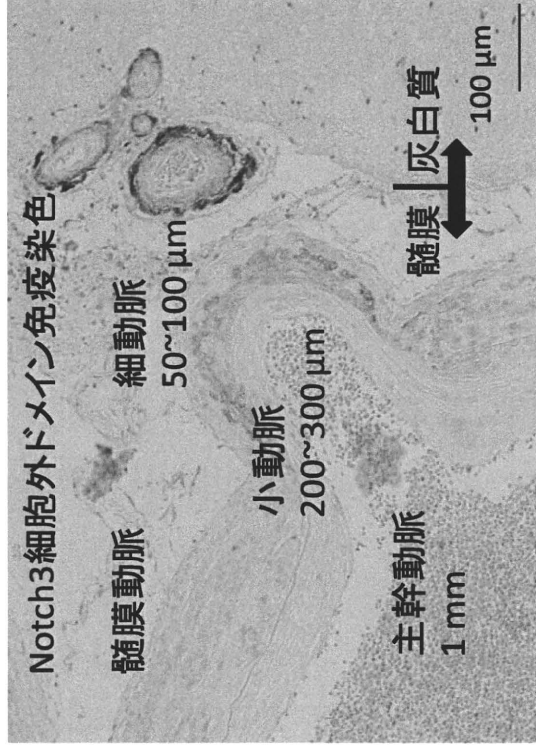
Patient with CADASIL
Notch3 R133C mutation

CADASILの皮膚凍結切片

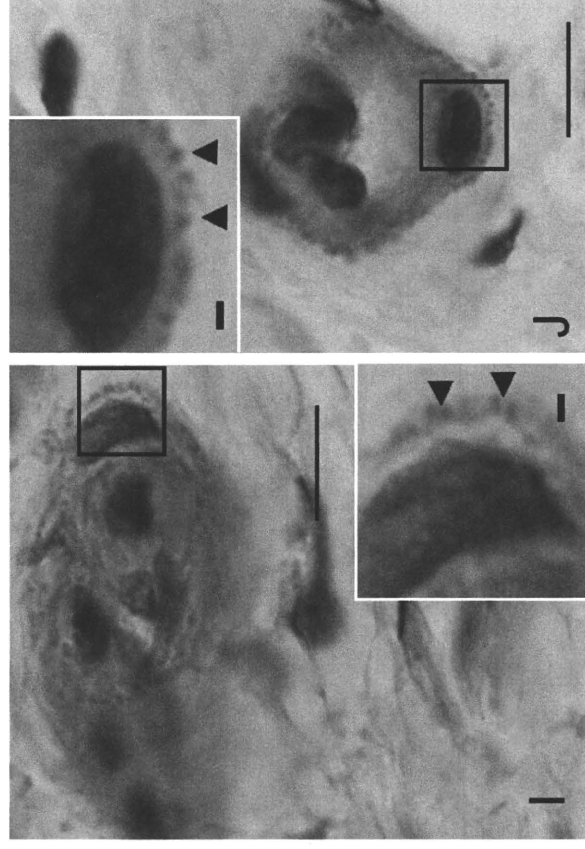
Notch3細胞外ドメイン免疫染色



髄膜の細動脈の障害



GOMの光学顕微鏡所見：皮膚凍結切片
Basophilic Submicron Granules (BSG)



(Ueda A, et al. *Neuropathol and Applied Neurobiol* 2009)

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)

分担研究年度終了報告書

遺伝性脳小血管症の病態機序の解明と治療法の開発

劣性遺伝性家族性脳小血管病の原因遺伝子 *HTRA1* 変異のヘテロ接合体と脳小血管病の関連に関する研究

分担研究者	小野寺 理	新潟大学脳研究所生命科学リソースセンター
研究協力者	二本松 萌	新潟大学脳研究所神経内科
	野崎 洋明	新潟大学脳研究所神経内科
	志賀 篤	新潟大学脳研究所神経内科
	水野 敏樹	京都府立医科大学医学研究科神経内科学
	伊藤 彰一	千葉大学医学部附属病院神経内科
	野田 智子	名古屋医療センター神経内科
	西澤 正豊	新潟大学脳研究所神経内科

研究要旨

Cerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CARASIL)は、high-temperature requirement A serine peptidase 1 (*HTRA1*) 遺伝子変異のホモ接合体によって引き起こされる脳小血管病である。その病態機序としては、*HTRA1* のプロテアーゼ活性の喪失が想定されている。本研究では、脳小血管病における *HTRA1* 遺伝子変異の頻度を調べるため、頭部画像検査で広範な大脳白質病変を認めた46例について *HTRA1* 遺伝子 ORF の塩基配列解析を行った。その結果、5例(10.9%)でセリンプロテアーゼドメイン内に新規ミスセンス変異(p.Gly283Glu, p.Pro285Leu, p.Arg302Gln, p.Thr319Ile, p.Ala321Thr)をヘテロ接合体で見出した。さらに、これらの変異型 *HTRA1* では、プロテアーゼ活性が低下していることを明らかにした。これらの結果から、*HTRA1* 遺伝子のヘテロ接合体変異が脳小血管病の発症に密接に関与していることが示唆された。

A. 研究目的

Cerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CARASIL)は、①若年成人発症、②頭部MRIでの広範な大脳白質病変、③変形性脊椎症、④禿頭を特徴とする常染色体劣性の脳小血管病である。CARASILは、high-temperature requirement A serine peptidase 1 (*HTRA1*)遺伝子変異のホモ接合体によって発症する。その病態機序として、変異

型 *HTRA1* のプロテアーゼ活性の喪失が想定されている。

HTRA1 は多量体を形成して、酵素活性や基質特異性を獲得することが想定されている。このことは、*HTRA1* 変異のホモ接合体のみではなく、ヘテロ接合体も病原性を持つ可能性を示唆している。しかし、これまでに報告されている CARASIL 家系内のヘテロ接合体者の頭部画像検査は施行されておらず、脳小血管病に対するヘテロ接合体の病的意義は明らかになっていない。

本研究では、脳小血管病における *HTRA1* 遺伝子変異の頻度と病的意義を明らかにすることを目的とした。

(倫理面への配慮)

患者 DNA は、十分なインフォームドコンセントを行い、同意書を作成した上で、末梢血リンパ球から抽出しており、倫理面の問題はない。

B. 研究方法

頭部画像検査で広範な大脳白質病変を認め、最も頻度の高い遺伝性脳小血管病である CADASIL(cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy) のホットスポット (Notch3 エクソン3とエクソン4)の変異が否定された46例を対象とし、*HTRA1* 遺伝子の塩基配列解析を行った。見出した新規変異型 *HTRA1* に関しては、精製タンパク質を作成し、カゼインを基質としたプロテアーゼ活性の検討を行った。

C. 研究結果

46例中、5例(10.9%)で *HTRA1* 遺伝子のセリンプロテアーゼドメイン内に新規のミスセンス変異 (p.Gly283Glu, p.Pro285Leu, p.Arg302Gln, p.Thr319Ile, p.Ala321Thr)をヘテロ接合体で見出した。これらの変異は、いずれもコントロール400例では見出せなかった。また、新規ミスセンス変異 *HTRA1* では、カゼインを基質としたプロテアーゼ活性が低下していた。これらの結果は、*HTRA1* 遺伝子変異のヘテロ接合体が脳小血管病の発症に密接に関与していることを示唆している。

D. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

E. 知的財産権の出願・登録状況(予定含む)

なし

F. 健康危険情報

なし

劣性遺伝性家族性脳小血管病の原因遺伝子HTRA1変異のヘテロ接合体と 脳小血管病の関連に関する研究

対象とした症例

- ・頭部画像検査で広範な大脳白質病変を認める46例(図1)
- ・常染色体優性遺伝性の脳症血管病CADASILが否定される
- ・男性 23例, 女性 23例

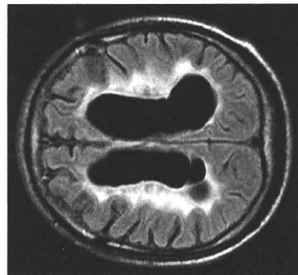


図1: 頭部MRI画像
高度な大脳白質病変を認める

方法

- ・CARASILの原因遺伝子HTRA1の塩基配列解析

結果

- ・46例中5例(10.9%)で新規ミスセンス変異を認めた(表1)
- 平均発症年齢 44.8歳
- 5例とも男性
- 脳小血管病の危険因子を有する
- ・新規変異型HTRA1ではプロテアーゼ活性が低下している

表1: HTRA1新規ミスセンス変異が見出された5症例

患者番号	1	2	3	4	5
性別	M	M	M	M	M
HTRA1変異	c.848G>A c.848G>A c.854C>T c.854C>T	c.854C>T c.854C>T	c.905G>A c.905G>A	c.956C>T c.956C>T	c.961G>A c.961G>A
HTRA1変異	p.G1V283Glu p.G1V283Glu	p.Pro285Leu p.Pro285Leu	p.Arg302Gln p.Arg302Gln	p.Trp319Ile p.Trp319Ile	p.Ala321Thr p.Ala321Thr
両親いずれかの脳梗塞既往	+	-	+	-	+
危険因子	アルコール多飲	高血圧	アルコール多飲	高血圧	高血圧 喫煙 40本/日 X 40年 高脂血症 X 40年
検査時年齢(歳)	49	49	57	57	52
検査時年齢(歳)	49	49	57	57	52
発症年齢(歳)	48	32	40	53	51
発症年齢(歳)	48	32	40	53	51
罹病期間(年)	1	17	17	4	1
罹病期間(年)	1	17	17	4	1
認知機能検査	正常	正常	正常	正常	正常
認知機能検査	正常	正常	正常	正常	正常
進行障害	48	32	40	53	52
進行障害	48	32	40	53	52
発症年齢(歳)	不明	20	20	不明	-
発症年齢(歳)	不明	20	20	不明	-
発症年齢(歳)	48	36	57	不明	-
発症年齢(歳)	49	36	57	不明	-
発症年齢(歳)	49	36	57	不明	-
発症年齢(歳)	49	36	57	不明	-
脳梗塞	書	書	書	書	書
脳梗塞	書	書	書	書	書
脳梗塞	書	書	書	書	書
脳梗塞	書	書	書	書	書
脳梗塞	書	書	書	書	書