

201128087A

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23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24(2012)年3月

目次

I. 総括研究報告

- 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 症例の特徴と新診断基準の妥当性について 9
- 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、濱野 愛、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. CADASIL の病態解明（臨床像と画像の重症度） 12
- 分担研究者 平野照之（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 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）
3. HTRA1 変異ヘテロ接合体と脳小血管病の関連に関する研究 15
- 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 齋藤洋兵、二本松 萌、野崎洋明（新潟大学脳研究所神経内科）
小山哲秀（新潟大学超域学術院）
水野敏樹（京都府立医科大学神経内科）
野田智子（名古屋医療センター神経内科）
垣内無一（金沢医科大学神経内科）
伊藤彰一（千葉大学神経内科）
小野寺 理（新潟大学脳研究所生命科学研究センター）
4. 2光子励起レーザー顕微鏡を用いた脳微小循環障害の解析に関する研究 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）
5. 血液脳関門の研究（モデル動物）に関する研究 22
- 分担研究者 伊東史子（東京薬科大学生命科学研究部心血管医科学研究室）

6. TGF- β 1 負荷 BBB 障害モデル及び糖尿病性脳虚血再還流モデルの作成と BBB 保護薬の薬効検定 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、巽 理恵（長崎大学大学院医歯薬学研究科神経薬理学分野）
竹下朝規、永田 泉（長崎大学大学院医歯薬学研究科脳神経外科）

7. 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開発研究分野）
研究協力者 加藤泰介、関根有美、野崎洋明（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開発研究分野）

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

I 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)

総合研究報告書 概要版

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

新潟大学脳研究所生命科学リソース研究センター 分子神経疾患資源解析学 教授

研究要旨

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。この脳小血管に首座をもつ病態が leukoaraiosis: LA である。LA は、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が、病態機序は不明であり、診断基準、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。しかし、その疾患頻度、病像は未だ不明である。本研究班では遺伝性脳小血管病の実態を明らかにし、治療方法の確立を目的とした。その結果、新規 CARASIL、CADASIL 家系をそれぞれ同定した。また、今回本邦の実態に即した診断基準を作製しその妥当性を示した。また本症の組織学的診断法として、光学顕微鏡での basophilic submicron granule (BSG) の存在を明らかとした。BSG は CADASIL の、より汎用性の高い確定診断を可能とする。病態解明では、培養細胞モデル、動物モデルを用い、TGF- β シグナルが、血液脳関門の機能維持に重要であること、さらに微小循環動態を明らかとした。特に HTRA1 のノックアウトマウスにて、CARASIL と同様の平滑筋細胞の脱落を見いだした。以上、臨床面、および病態解析面から、顕著な業績を得た。

研究分担者

西澤正豊 新潟大学脳研究所 神経内科
教授

水野敏樹 京都府立医科大学 神経内科学
准教授

富本秀和 三重大学大学院医学系研究科神
経病態内科学・神経内科学 教授

伊東史子 東京薬科大学心血管医科学研究
室・実験病理・病理学 准教授

丹羽正美 長崎大学大学院医歯薬学総合研
究科神経薬理学分野・薬理学 教授

佐藤俊哉 新潟大学脳研究所・実験動物学

助教

内野 誠 熊本大学大学院生命科学研究部・
神経内科学分野・神経内科 教授

平野照之 熊本大学大学院生命科学研究部・
神経内科学分野・神経内科 講師

研究協力者

有馬 邦正 国立精神・神経センター病院
部長

福武 敏夫 亀田メディカルセンター
神経内科 部長

中野 今治 自治医科大学神経内科 教授

研究目的

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、常染色体優性遺伝形式をとる 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。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。

研究方法

1) 遺伝性脳小血管病の実態調査 (水野内野 平野 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った(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、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った。

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した。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した(伊東)。さらに、脳小血管病の異常を、二光子励起レーザー顕微鏡にて検討を加えた(富本)。

3) 疾患関連血液脳関門培養細胞モデルの開発 (丹羽) 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 の下流のシグナル伝達について検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は遺伝子解析を必要とするため、ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針に沿って実施した。全国共同研究推進に当たり、共同研究機関、対象の拡大について承認を得て行った。疫学研究に関する倫理指針、ならびに臨床研究に関する倫理指針の各指針

に則り、本研究を進めた。本研究で対象とするヒト由来資料については、資料、DNAの保存・管理、その後の解析について患者および患者の親族に説明し、研究目的に使用することへの同意を得た。組み換えDNA実験、動物実験は、法令を遵守し、本学の承認を得、規定のP1もしくはP2実験室にて行った。

研究結果と考察

水野らは、Davousらの設定したCADASILの診断基準と、本研究班で作成した新しい診断基準の妥当性について検討した。Davousらの基準は本邦CADASIL例ではprobableとpossibleを合わせてもその感度は65.4%と低かった。一方新基準は感度97%であり、本診断基準の有用性が示された。

内野、平野らは、1) 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。2) 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)が有用であること。3) CADASILにおける側脳室周囲の白質病変は危険因子の存在により形成され、臨床像の重症度と関係していると考えられた(図1)。

小野寺、佐藤、西澤らは、CARASILのモデルマウスである、HtrA1欠損マウスを解析し、本マウスは高齢期(20ヵ月年齢以降)にCARASILや孤発性の脳小血管病に類似した脳小血管の血管平滑筋の変性、血管腔の拡張を示すことを見いだした。この変性は少なくとも8ヵ月年齢までには見られず、加齢依存的であり、加齢性の脳小血管病の理想的なモデルと考えられる。また本モデルマウスの網羅的発現解析によりTGF- β シグナルの亢進がある

事を見いだした。

本症の原因遺伝子であるHtrA1はセリンプロテアーゼでありTGF- β ファミリーシグナルを抑制する。そのため本モデルマウス(HtrA1欠損マウス)の病態機序の背景にはTGF- β シグナルの亢進が推定される。今後、HtrA1欠損マウスのTGF- β ファミリータンパク質の蓄積やシグナル異常について免疫組織学的・生化学的に解析することにより、脳小血管病の病態機序を分子レベルで解明することが可能となる。また、TGF- β の活性制御にかかわるフィブリリン1やTGF- β 受容体の先天性異常によって発症するマルファン症候群はTGF- β シグナルが亢進しており、TGF- β シグナル阻害剤であるアンジオテンシン受容体阻害薬(ARB)で改善する。本報告を応用し、本モデルマウスの表現型をTGF- β シグナル阻害薬であるARBによって防げるかどうかの解析を予定している。これにより、有効な治療方法がない脳小血管病に対して、明確な分子病態機序に基づいた治療介入方法が確立される可能性がある。TGF- β シグナルの亢進は、高血圧時に認められるとされ、また、孤発性脳小血管病の最大の危険因子も高血圧とされる。この事実から孤発性脳小血管病の背景にTGF- β シグナルの亢進が関与していることが推察され、本モデルマウスによる成果を、孤発性脳小血管病にも応用できる可能性がある。

伊東らは、血管内細胞でのTGF- β シグナルについて検討した。TGF- β シグナルは細胞膜上のI型受容体(ALK1, ALK5)のバランスにより血管の機能を調節している。血管内皮細胞特異的にTGF- β シグナルを欠損させたマウスを作製してその分子メカニズムの解明を行った。TGF- β /ALK5シグナルは血管だけでなくリンパ

管の成熟に必須のシグナルであるとともに、血流から受けるシェアストレスにより血管を安定化させていることを見いだした(図 2)。さらに TGF- β /ALK1 シグナルは低酸素条件で強く誘導されることを見いだした。

丹羽らは独自に開発した BBB モデルにて次の 3 点を検討した。①脳虚血再還流により BBB 機能障害、タイトジャンクション蛋白の低下を見いだした。再酸素負荷後、上部チャンパー(管腔側)の adrenomedullin 濃度、NO₂、NO₃ 量は増加していた。さらに、この機能障害は、edaravone で回復した。次に BBB 保護薬としての ARB の薬効を検定し、candesartan に、マイルドな虚血再還流障害による BBB 機能障害を防止する効果があることを示した。最後に、TGF- β 負荷における BBB 保護薬の検討を行った。TGF- β 負荷により BBB 機能が低下することを示した。これは cilostazol の処置により、改善された。一方 candesartan 処置群では、添加後 24、48 時間後に TGF- β による BBB 機能の低下を改善させる傾向は見られたものの、有意な効果は見られなかった。

富本らは、慢性・急性の虚血脳における微小循環動態を、2光子励起レーザー顕微鏡を用い観察した。急性虚血脳では、再灌流後に白血球の rolling adhesion、血小板血栓の形成が認められた。一方、慢性低灌流脳では遷延性に白血球の rolling adhesion が認められたが血栓形成を認めなかった。慢性低灌流と、急性低灌流時の微小循環動態の相違を明らかとした。

結論

患者実態調査に関しては、検査協力機関からの書類申請を得て、協力機関での倫理委員

会での承認が終了し、生体資料の収集を行った。その結果、新規 CARASIL、CADASIL 家系をそれぞれ同定した。また、従来用いられてきた、CADASIL に関する Davous の診断基準は適当でなく、今回本邦の実態に即した診断基準を作製した。また CARASIL の診断基準も、判明した禿頭を伴わない症例の結果を含め、新たに作成した。両疾患の診断基準の正当性を既報患者に基づき、後ろ向きに評価した。その結果、本研究班で新たに作成した診断基準は、診断基準として妥当であることが示された。今後、本診断基準を用いて両疾患の正確な有病率を明らかにすることが必要である。また本症の組織学的診断法として、光学顕微鏡での BSG の存在を明らかとした。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。BSG を用いた組織化学的解析は、CADASIL の、より汎用性の高い確定診断を可能とする。

病態解明では、培養細胞モデル、動物モデルを用い、TGF- β シグナルが、血液脳関門の機能維持に重要であること、さらに微小循環動態を明らかとした。まず、血液脳関門 in vitro 再構成モデル(BBB キット TM、ファーマコセル株式会社)を用いて、脳虚血再還流モデルの作成と BBB 保護薬の検討を行い、遺伝性脳小血管病(CARASIL)の病態に関与すると推測されている TGF- β が BBB の機能を障害することを確認した。さらに、この BBB キットを用いて、TGF- β 及び脳虚血再還流による BBB 障害に対する、抗血小板薬であるホスホジエステラーゼ 3 型阻害薬 cilostazol と、アンジオテンシン I 型受容体拮抗薬(ARB) candesartan の BBB 保護効果を検討し、cilostazol に TGF- β 処置による BBB 機能障害を防止する

効果があることを示した。また TGF- β の受容体である ALK1 によって誘導される Id-1 が血管新生を促進するメカニズムを解明した。さらに HTRA1 のノックアウトマウスにて、CARASIL と同様の平滑筋細胞の脱落を見いだした。また微小循環の検討では、慢性虚血脳では、急性虚血脳と異なり、遷延性に白血球の rolling・adhesion を認めるが、著明な血小板血栓の形成などを認められないことを示し、慢性脳虚血の微小循環の変化を *in vivo* で明らかにした。

以上、臨床面、および病態解析面から、顕著な業績を得た。

研究発表

論文発表(英語査読論文のみ)

Fujiwara Y, Mizuno T, Okuyama C, Nagakane Y, Watanabe-Hosomi A, Kondo M, Kuriyama N, Tokuda T, Matsushima S, Tsunehiko N, Nakagawa M. Simultaneous impairment of intracranial and peripheral artery vasoreactivity in CADASIL patients. *Cerebrovasc Dis* 2012;33:128-134. [Epub ahead of print]

Watanabe-Hosomi A, Watanabe Y, Tanaka M, Nakagawa M, Mizuno T. Transendocytosis is impaired in CADASIL-mutant NOTCH3. *Exp Neurol*. 2011 Oct 28. [Epub ahead of print]

Yang W#, Itoh F#, Ohya H, Kishimoto F, Tanaka A, Nakano N, Itoh S & Kato M. (#equally contributed) Interference of E2-2-mediated effect in endothelial cells by FAM96B through its limited expression of E2-2. *Cancer Sci.*, (2011) in press

Itoh S & Itoh F. Inhibitory machinery for the TGF- β family signaling pathway. *Growth Factors*, 5, 163-173 (2011) review

Toth A, Veszeka S, Nakagawa S, Niwa M, Deli MA: Patented *in vitro* blood-brain barrier models in CNS drug discovery. *Recent Patents on CNS Drug Discovery* 6: 107-118, 2011

Yang WM, Jung KJ, Lee MO, Lee YS, Lee YH, Nakagawa S, Niwa M, Cho SS, Kim DW: Transient expression of iron transport proteins in the capillary of the developing rat brain. *CellMolNeurobiol* 31: 93-99, 2011

Tatsumi R, Suzuki Y, Sumi T, Sone M, Suemori H, and Nakatsuji N: Simple and highly efficient method for production of endothelial cells from human embryonic stem cells. *Cell Transplantation* 20: 1423-30, 2011

Sakurai-Yamashita Y, Harada N, and Niwa M: Lercanidipine rescues hippocampus pyramidal neurons from mild ischemia-induced delayed neuronal death in SHRSP. *Cell Mol Neurobiol* 31: 561-567, 2011

Nishimoto Y, Shibata M, Nihonmatsu M, Nozaki H, Shiga A, Shirata A, Yamane K, Kosakai A, Takahashi K, Nishizawa M, Onodera O, Suzuki N. A novel mutation in the HTRA1 gene causes CARASIL without alopecia. *Neurology*. 2011 Apr 12;76(15):1353-5.

Nishimoto Y, Shibata M, Onodera O, Suzuki N. Neurological picture. Neuroaxonal integrity evaluated by MR spectroscopy in a case of CARASIL. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2011 Aug;82(8):860-1. 3:

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, Onodera O. Cerebral small-vessel disease protein HTRA1 controls the amount of TGF- β 1 via cleavage of proTGF- β 1. Hum Mol Genet. 2011 May 1;20(9):1800-10.

学会発表 (国際学会のみ)

Mizuno T, Watanabe-Hosomi A, Watanabe Y, Tanaka M, Nakagawa M. Transendocytosis is impaired in CADASIL. 5th Congress of the international society for Vacular Behavioural and Cognitive Disorders. 2011.09.11-14. Lille.

Itoh F. JSPS-NOW Joint Seminar; Involvement of TGF- β /Smad pathway in lymphangiogenesis. (2011) Tokyo, Japan

Itoh F. TGF- β /Smad pathway is involved in vessel integrity. TGF- β meeting Uppsala, Sweden (2011)

Takeshita T et al. Cilostazol rescues AGE-related ischemic BBB damage. 14th Intern Symp Signal Trans-duction in the BBB, Istanbul Sep7-9, 2011

知的所有権の取得状況

なし

特許取得

なし

実用新案登録

なし

その他

なし

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)

平成 23 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 症例の特徴と新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
	濱野 愛	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

遺伝性脳小血管病の病態機序の解明と治療法の開発班で作成した CADASIL 診断基準を用いてスクリーニングされ遺伝子診断された 37 名で発症年齢、臨床症状に影響を与える因子を検討した。発症年齢、臨床症状に遺伝子変異は明らかな影響を与えていなかった。脳梗塞危険因子の合併例 24 名と非合併例 13 名を比較すると、脳梗塞発症、運動麻痺、血管性パーキンソニズム、認知機能障害について有意差を認め、脳梗塞危険因子の合併は発症年齢には影響を与えないが、臨床症状への関連を認めた。

A. 研究目的

平成 22 年度作成された厚生労働省遺伝性脳小血管病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)に基づいて、当科で遺伝子診断により CADASIL を確定した 37 例では臨床症状の発症年齢に大きな幅を認めた。英国 CADASIL 例の解析でも高血圧と喫煙が脳梗塞発症に影響することが報告されており、当科解析例で遺伝子変異または脳卒中危険因子が臨床症状に影響しているかを検討した。

B. 研究方法

対象は CADASIL と診断した 33 家系 37 名(男性 21 名、女性 16 名、診断時平均年齢 52.1 歳(37-74 歳)。各遺伝子変異で臨床症状を比較、または高血圧、糖尿病、脂質代謝異常、喫煙をいずれかを有する危険因子陽性群 24 例といずれも有さない陰性群 13 例の臨床症状を比較検討した。統計学的解析は Mann-Whitney または χ^2 乗検定を用いた。

(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

15 種類の遺伝子変異(R75P:5 例, C106R:2 例, R110C:1 例, R141C:10 例, C146W:1 例, R169C:2 例, S180C:1 例, R182C:7 例, C233S:1 例, C245Y:1 例, C260F:1 例, C329Y:1 例, R332C:1 例, C542R:1 例, R607C:2 例)を同定した。C146W, R182C, C329Y, R332C, R607C 変異は 30 歳代で発症しているが、同一の遺伝子変異でも R141C は脳梗塞発症年齢が 40 歳から 74 歳までの幅を認め、臨床症状に一定の傾向を認めなかった。

脳梗塞危険因子陽性群と陰性群では年齢に有意差を認めなかったが、男女比、脳梗塞発症、運動麻痺、血管性パーキンソニズム、認知機能障害について有意差を認めた。(表 1)

D. 考察

本邦例では片頭痛以外の発症年齢は37歳から74歳と幅広く、40歳代にピークがあるが、約20%は60歳以上である。今回の解析からはこの発症年齢、臨床症状に最も影響する因子としては脳梗塞危険因子の合併と考えられた。遺伝子変異別の解析では症例が少ないため、まだ十分な結論を述べるのは難しいが、複数例ある変異で見える限り変異による発症年齢への影響は明らかではなかった。

E. 結論

脳卒中危険因子は男性が有する率が高く、危険因子を有する場合脳梗塞発症、運動麻痺を生じる率が高く、その後の脳血管性パーキンソン病、認知機能障害の発症につながると考えられた。

F 研究発表

1. 論文発表

Fujiwara Y, Mizuno T, Okuyama C, Nagakane Y, Watanabe-Hosomi A, Kondo M, Kuriyama N, Tokuda T, Matsushima S, Tsunehiko N, Nakagawa M. Simultaneous impairment of intracranial and peripheral artery vasoreactivity in CADASIL patients. *Cerebrovasc Dis* 2012;33:128-134.

Watanabe-Hosomi A, Watanabe Y, Tanaka M, Nakagawa M, Mizuno T. Transendocytosis is impaired in CADASIL-mutant NOTCH3. *Exp Neurol*. 233: p303-311, 2012

瀬尾和弥 栗山長門 奥田求己 久保秀一 松井知之 増田隆司 工藤有里子 武澤信夫 長谷齊 水野敏樹 中川正法 パーキンソン病患者の歩行障害に対する3次元動作解析の試み. *総合リハビリテーション* Vol. 39 (1) p57-62, 2011

2. 学会発表

Transendocytosis is impaired in CADASIL.

Mizuno T, Watanabe-Hosomi A, Watanabe Y, Tanaka M, Nakagawa M. 5th Congress of the international society for Vascular Behavioural and Cognitive Disorders. 2011.09.11-14. Lille.

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

水野敏樹 細見明子 近藤正樹 石神紀子 藤原康弘 奥山智緒 中川正法. CADASIL に対する lomerizine HCl の検討. 第29回日本神経治療学会 2011. 11.17-18.

水野敏樹、水田依久子 細見明子、富井康宏、近藤正樹、中川正法. 高齢発症 CADASIL の検討. 第30回日本認知症学会学術集会 東京 2011.11.11-13

細見明子 渡邊義久 水野敏樹 田中雅樹 中川正法. CADASIL 変異を導入した Notch3 安定発現細胞の作成と Notch3 タンパク質分解の検討. 第30回日本認知症学会学術集会 東京 2011.11.11-13

水野敏樹 王 佳虹 鳥羽裕恵 中野亜里沙 東條千里 野田和揮 小原 幸 中川正法 中田徹男. 高血圧モデルラットにおける TGF β 1 発現. 第52 神経病理学会総会学術研究会 京都 2011.6.2-4

水野 敏樹、富井 康宏、水田 依久子、細見 明子、小野寺理、中川 正法. 本邦における CADASIL の新しい診断基準の妥当性について. 第52回日本神経学会総会 2011.5.18-20 名古屋

細見明子 渡邊義久 水野敏樹 田中雅樹 中川正法. CADASIL 変異を導入した Notch3 安定発現細胞の作成と Notch3 タンパク質分解の検討. 第52回日本神経学会総会 2011.5.18-20 名古屋

水野 敏樹、細見 明子、田邑 愛子、山田 丈弘、富井 康宏、近藤 正樹、山田 恵、中川 正法 高齢発症CADASIL8例の検討. 第36回日本脳卒中学会総会 京都 2011.8.01.

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

	危険因子陽性群	危険因子陰性群
発症年齢(歳)	50.3±10.4	44.8±8.1
男性比(%)	68.2	30.8
片頭痛(%)	57.9	61.5
脳梗塞(%)	77.2	38.4
脳出血または microbleeds(%)	27.3	7.7
運動麻痺(%)	81.8	27.3
血管性パーキンソン症候群(%)	63.6	7.7
うつ症状(%)	36.4	15.4
認知症(%)	81.8	38.5

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)

平成 23 年度 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(臨床像と画像の重症度)

分担研究者 平野 照之 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 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

研究要旨

CADASIL の抽出には、前頭極や側頭極などの特異的な白質病変の検出が重要である。しかし、特異的な白質病変の出現前に発症した例では、診断に苦慮することがある。これは危険因子の存在により脳梗塞発症年齢が低下することが一因と考えられる。危険因子を有する患者は脳梗塞を繰り返し、側脳室周囲の白質病変も形成され、予後不良である。一方、危険因子の乏しい患者では、側脳室周囲の白質病変が形成されず、神経症候も軽度に留まり、予後良好である。CADASIL の診断基準では、特異的な白質病変を重要視しつつ、危険因子を有し、予後不良な患者を見逃さない抽出方法を含んだ内容にすべきであると考えられた。

A. 研究目的

- a. 特異的な白質病変が出現する前に脳梗塞を発症した患者の臨床像を明らかにすること。
- b. 側脳室周囲の白質病変と危険因子、予後との関係を明らかにすること。

B. 研究方法

- a. 1998 年から 2011 年までに確定診断した CADASIL 自験 16 例 14 家系、罹病期間 10.9 年を対象とした。特異的な白質病変が出現する前に発症した患者の臨床的特徴を調査した。
- b. Shinohara らの側脳室周囲の白質病変のグレードを用いて評価し、PVH grade I – II 群と PVH grade III – IV 群に分け、危険因子と予後の関係を評価した。

C. 研究結果

- a. 発端者 14 例中 10 例は初診時に特異的な白質病変を認めていた。初診時に特異的な白質病変を認めなかった例は 4 例あった。2 例は 40 代の脳梗塞発症、1 例は重度の片麻痺性片頭痛、1 例は血

管性パーキンゾニズムと血管性認知症として外来通院中であった。4 例とも危険因子を有していた。

片麻痺性片頭痛で発症した 47 歳女性は危険因子(糖尿病、喫煙)を有し、初発症状は、右側の拍動性頭痛と左半側空間無視であり、数回同様のエピソードがあった。53 歳時に歩行障害で再度受診した際、MRI で特異的な白質病変を認め、診断に至った。

発症時に特異的な白質病変がなかった 59 歳の男性は、喫煙歴および家族歴あり。40 歳でラクナ梗塞を発症し、55 歳、56 歳で脳梗塞再発、MRI にて多発性脳梗塞を認めた。58 歳で一過性皮質症状があり、脳塞栓症として抗凝固療法が開始された。翌年 59 歳で脳出血を発症、抗凝固療法は中止。Notch3 免疫染色陽性で CADASIL と診断された。

考察: 重度の片頭痛は CADASIL 臨床像の特徴のひとつであり、イギリスの実態調査では 10% に観察される。特異的な白質病変によらない CADASIL 抽出の手がかりになりうる。また、危険因子を有する例は脳梗塞発症年齢が低下し、特異的な白質病変の出現前に脳梗塞を発症するた

め、診断に苦慮することがある。このような症例では、常染色体優性の家族歴、若年発症の脳梗塞であることが診断の手かかりとなる。CADASIL と認識されずに再発を繰り返し、抗血栓療法が強化されると出血合併症を生じることもあり、注意が必要である。CADASIL の診断基準では、Clinical probable 改訂して、特異的は白質病変がある場合には、その他の疾患を除外でき、1~3 の1項目以上を満たせば、抽出可能である。特異的な白質病変がない場合には、若年発症の脳梗塞、常染色体優性の濃厚な家族歴から抽出しうると考えられた。

b. PVH grade I-II 群 7 例平均年齢 51 歳、危険因子は 1 例のみで、mRS 0-1 が 5 例であった。mRS 2 以上の 2 例はいずれも脳出血合併例であった。PVH grade III-IV 群は 8 例、平均年齢 56 歳、危険因子は 7 例に認め、mRS 0-1 は 4 例であった。

考察：側脳室周囲白質病変の重症度は、危険因子や ADL の重症度に関係した。ADL に関しては、ラクナ梗塞が関与していると報告されており、側脳室周囲の白質病変が重度であれば、ラクナ梗塞を発症しやすいことを反映しているのかもしれない。

D. 研究発表

1. 論文発表

A. Ueda, T. Hirano, K. Takahashi, R. Kurisaki, H. Hino, E. Uyama, M. Uchino. 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 52 回 日本神経学会学術集会 シンポジウム 皮質下性血管障害の病態と治療—CADASIL 内野 誠

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

第 52 回 日本神経学会学術集会

皮膚・骨格筋凍結切片を用いた CADASIL の診断と研究への試み
植田明彦、平野照之、内野 誠

第 36 回 日本脳卒中学会総会

CADASIL における表在および側脳室周囲白質病変の重症度と臨床像の検討
植田明彦、平野照之、栗崎玲一、日野洋健、宇山英一郎、内野 誠

第 194 回 日本神経学会九州地方会

白質病変の左右差を認めたホモ接合性の R75P 変異 CADASIL の 1 例
植田明彦、平野照之、米持康寛、前田 寧、日野洋健、植田光晴、内野 誠

7th WORLD STROKE CONGRESS

The pathologic findings of cortical microbleeds in a case of CADASIL
Akihiko Ueda, Teruyuki Hirano, Naoko Udaka, Toshinori Hirai, Takaaki Ito, Makoto Uchino

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定含む)

特記事項なし

E. 知的財産権の出願・登録状況(予定含む)

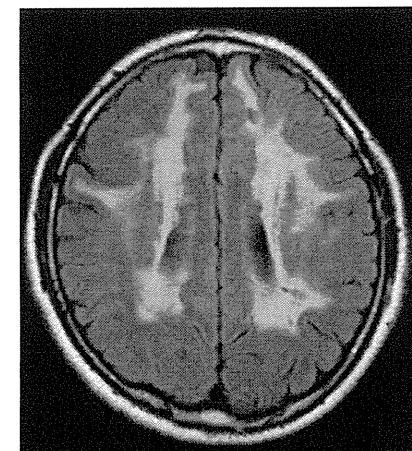
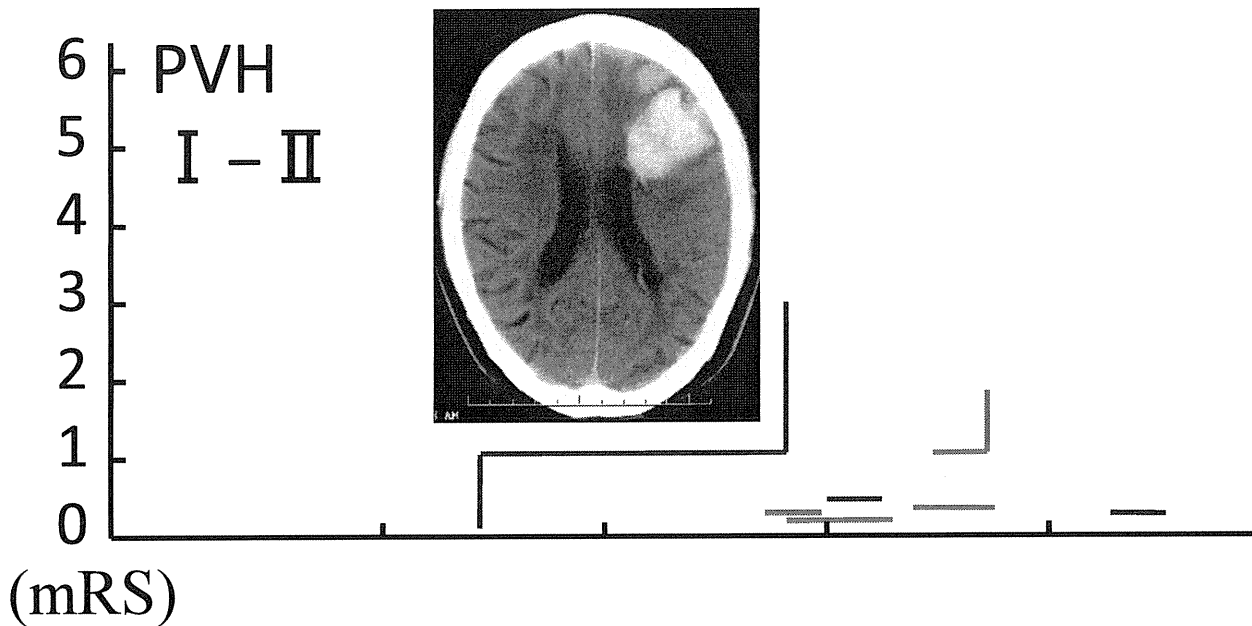
(特許取得・実用新案登録・その他)

特記事項なし

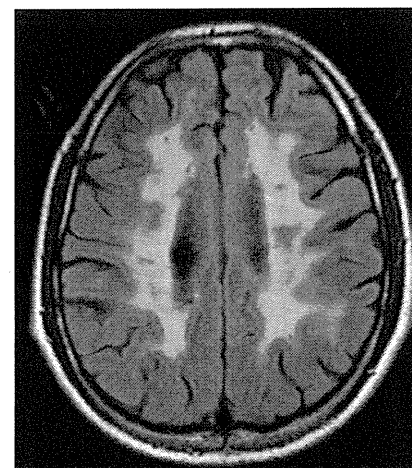
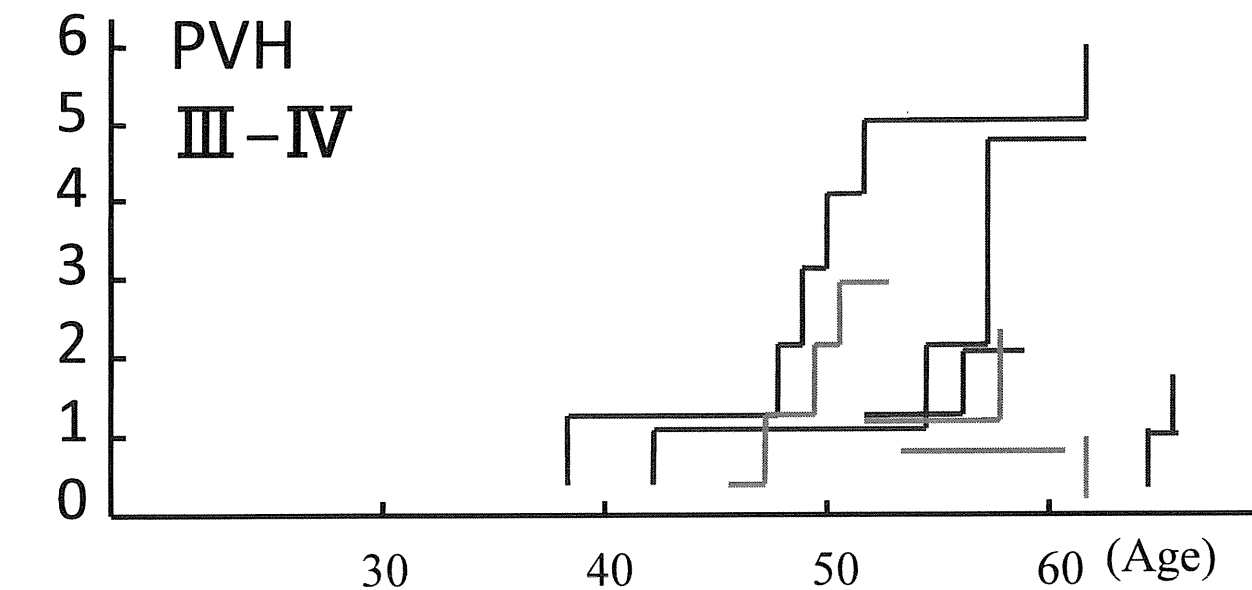
F. 健康危険情報

(国民の生命・健康に重大な影響を及ぼす情報として厚生労働省に報告すべきものについて把握した過程、内容、理由を記載する。またその情報源の詳細。)

側脳室周囲白質病変とADLとの関係



61歳 M R141C
認知症なし
危険因子なし



63歳 M R75P
認知症あり
危険因子あり

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

遺伝性脳小血管病の病態機序の解明と治療法の開発

“HTRA1 変異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	西澤 正豊	新潟大学脳研究所神経内科
研究協力者	齋藤 洋兵	新潟大学脳研究所神経内科
	二本松 萌	新潟大学脳研究所神経内科
	小山 哲秀	新潟大学超域学術院
	野崎 洋明	新潟大学脳研究所神経内科
	水野 敏樹	京都府立医科大学神経内科
	野田 智子	名古屋医療センター神経内科
	垣内 無一	金沢医科大学神経内科
	伊藤 彰一	千葉大学神経内科
	小野寺 理	新潟大学脳研究所生命科学リソース研究センター

研究要旨

High Temperature Requirement Serine Peptidase A1 (HTRA1) 変異のホモ接合体は、そのプロテアーゼ活性の低下によって、遺伝性脳小血管病である Cerebral Autosomal Recessive Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy (CARASIL) を引き起こす。しかし、同変異のヘテロ接合体の病的意義はこれまで不明であった。今回、70 歳未満で、多発性皮質下梗塞と広汎な大脳白質病変を認め、本邦で頻度の高い脳小血管病 Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy (CADASIL) の原因遺伝子である *Notch-3* の変異が否定された 41 例を対象として、*HTRA1* の塩基配列解析を行ったところ、4 例 (9.8%) で新規の *HTRA1* 変異をヘテロ接合体で見出した。これらの変異は、非認知症コントロール 300 例では認めなかった。次に、新たに見出した変異型 *HTRA1* の精製蛋白を作成し、プロテアーゼ活性を測定したところ、ホモ接合体で発症する変異型 *HTRA1* に比して、著明な活性の低下を認めた。このことから、*HTRA1* 変異はそのプロテアーゼ活性依存性に脳小血管病の危険因子になると考えられる。

A. 研究目的

Cerebral Autosomal Recessive Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy (CARASIL) は *High Temperature Requirement Serine Peptidase A1 (HTRA1)* 遺伝子変異のホモ接合体によって発症する脳小血管病である。CARASIL は、セリンプロテアーゼである *HTRA1* の機能喪失によって引き起こされる。これまでの CARASIL 患者の家系では両親の発症は確認されておらず、片側アレルにのみ *HTRA1* 遺伝子の変異を有するヘテロ接合体の病的意義は不明であった。

本研究では、脳小血管病における *HTRA1* 遺伝子変異のヘテロ接合体の頻度と病的意義を明らかにすることを目的として、脳小血管病症例の *HTRA1* 遺伝子について塩基配列解析を行い、さらに精製 *HTRA1* 蛋白を用いた酵素活性の検討を加えた。

B. 研究方法

広汎な皮質下梗塞と大脳白質病変を呈し、本邦で頻度の高い脳小血管病である Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy (CADASIL) の原因遺伝子 *Notch-3* の変異が

否定された 41 例について、ダイレクトシーケンス法による *HTRA1* 遺伝子の塩基配列解析を行った。FreeStyle293 Expression System を用いて見出した変異の精製蛋白を作成し、FTC で標識したカゼインを器質として、その酵素活性を測定した。

(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、倫理面の問題は無い。

C. 研究結果

70 歳未満で、多発性皮質下梗塞と広汎な大脳白質病変を呈する 41 例のうち、4 例(9.8%)で新規の *HTRA1* 変異を片側アレルにのみ、つまりヘテロ接合体で見出した。これらの変異は、非認知症コントロール 300 例では認めなかった。新規変異を有する症例は、CARASIL に類似した臨床像を呈しており、新規変異型 *HTRA1* 蛋白は、既報のホモ接合体で発症する変異と比較して、顕著なプロテアーゼ活性の低下を認めた。以上の結果から、新規 *HTRA1* 変異のヘテロ接合体は、プロテアーゼ活性依存性に脳小血管病の発症危険因子となると考えられる。

D. 研究発表

1. 論文発表

1. Nozaki H, Nishizawa M, Onodera O. Dementia: progress in diagnosis and treatment; Topics, V. Recent topics; 4. Detection of novel dementia-related genes; 2) Dysregulation of TGF-beta family signaling and hereditary cerebral small vessel disease: insight into molecular pathogenesis of CARASIL. *Nihon Naika Gakkai Zasshi*. 2011 Aug 10;100(8):2207-2213.
2. Atsushi Shiga, Hiroaki Nozaki, Akio Yokoseki, Megumi Nihonmatsu, Hirotohi Kawata, Taisuke Kato, Akihide Koyama, Kunimasa Arima, Mari Ikeda, Shinichi Katada, Yasuko Toyoshima, Hitoshi

hi Takahashi, Akira Tanaka, Imaharu Nakano, Takeshi Ikeuchi, Masatoyo Nishizawa, Osamu Onodera. *Cerebral small-vessel disease protein HTRA1 controls the amount of TGF- β 1 via cleavage of proTGF- β 1*. *Human Molecular Genetics* 2011;20(9):1800-1810.

3. 野崎洋明, 西澤正豊, 小野寺理. CARASIL の臨床・病理像と病態機序 (解説) *Annual Review 神経* 2011:251-259.

2. 学会発表

1. Megumi Nihonmatsu, Atsushi Shiga, Hiroaki Nozaki, Masatoyo Nishizawa, Osamu Onodera. TGF- β pathway is specifically activated in hereditary cerebral small-vessel disease. 第 32 回日本生化学会年会
2. Hiroaki Nozaki, Atsushi Shiga, Megumi Nihonmatsu, Akihide Koyama, Masatoyo Nishizawa, Osamu Onodera. HTRA1 controls BMP-2/4 signaling via cleavage of proBMP-2/4: implication for molecular pathogenesis of hereditary cerebral small vessel disease. the 48th Annual Meeting Neuroscience
3. Hiroaki Nozaki, Atsushi Shiga, Hirotohi Kawata, Kunimasa Arima, Kenju Hara, Toshio Fukutake, Akio Yokoseki, Akihide Koyama, Toshiaki Takahashi, Mari Ikeda, Akira Tanaka, Imaharu Nakano, Shu-ichi Ikeda, Tadashi Yamamoto, Takeshi Ikeuchi, Masatoyo Nishizawa, Shoji Tsuji, Osamu Onodera. the 62nd AAN Annual Meeting

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

(国民の生命・健康に重大な影響を及ぼす情報として厚生労働省に報告すべきものについて把握した過程、内容、理由を記載する。またその情報源の詳細。)

なし