

201128087B

---

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～ 23 年度 総合研究報告書

---

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. 総合研究報告

- 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 …… 11

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(認知症と白質病変の特徴と病理所見の解析) …… 15

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 平成 22 年度)  
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 平成 23 年度)  
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分野)

3. ①CARASIL の MRI 画像に関する研究 …… 19

#### ②HTRA1 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)  
① 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研究センター)  
② 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リソース研究センター)

# I 総合研究報告

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- $\beta$  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- $\beta$  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- $\beta$  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- $\beta$  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- $\beta$ 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- $\beta$ 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- $\beta$ シグナルの亢進が推定される。今後、HtrA1欠損マウスのTGF- $\beta$ 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- $\beta$ の活性制御にかかわるフィブリリン1やTGF- $\beta$ 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- $\beta$ シグナルが亢進しており、TGF- $\beta$ 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)で改善しうる。本報告を応用し、本モデルマウスの表現型をTGF- $\beta$ 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- $\beta$ 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- $\beta$ 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- $\beta$ シグナルについて検討した。TGF- $\beta$ 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- $\beta$ 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- $\beta$ /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- $\beta$ /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、NO<sub>2</sub>、NO<sub>3</sub> 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- $\beta$  負荷における BBB 保護薬の検討を行った。TGF- $\beta$  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- $\beta$  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- $\beta$  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- $\beta$  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- $\beta$  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- $\beta$  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- $\beta$  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]

Chen 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]

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- $\beta$  family signaling pathway. *Growth Factors*, 5, 163-173 (2011) review

Nakano N, Itoh S, Watanabe Y, Maeyama K, Itoh F & Kato M. Requirement of TCF7L2 for TGF- $\beta$  -dependent transcriptional activation of the TMEPAI gene. *J. Biol. Chem.*, 285, 38023-38033 (2010)

Tanaka A, Itoh F, Nishiyama K, Takezawa T, Kurihara H, Itoh S & Kato M. Inhibition of endothelial cell activation by bHLH protein E2-2 and its impairment of angiogenesis. *Blood*, 115, 4138-4147 (2010)

Toth A, Veszelka 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

Deli MA, Veszelka S, Csiszara B, Totha A, Kittelb A, Csetec M, Sipos A, Szalai A, Fulop L, Penke B, Abraham C, Niwa M: Protection of the blood-brain barrier by pentosan against amyloid-induced toxicity. *Journal of Alzheimer's Disease* 22: 777-794, 2010

Kumagai K, Shirabe S, Miyata N, Murata M, Yamauchi A, Kataoka Y, Niwa M: Sodium pentosan polysulfate brought about cartilage improvement in knee osteoarthritis - An open clinical trial-. *BMC Clinical Pharmacology* 10: 7, 2010

Morofuji Y, Nakagawa S, So G, Hiu T, Horai S, Hayashi K, Tanaka K, Suyama K, Deli MA, Nagata I, Niwa M: Pitavastatin Strengthens the Barrier Integrity in Primary Cultures of Rat Brain Endothelial Cells. *Cell Mol Neurobiol* 30: 727-735, 2010

Yamashita Y, Nabika T, Niwa M: Blood pressure-independent factors determine the susceptibility to delayed neuronal death in the stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Cell Mol Neurobiol* 30: 283-287, 2010

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

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- $\beta$ 1 via cleavage of proTGF- $\beta$ 1. *Hum Mol Genet*. 2011 May 1;20(9):1800-10.

Onodera O, Nozaki H, Fukutake T. CARASIL. 2010 Apr 27. In: Pagon RA, Bird TC, Dolan CR, Stephens K, editors. *GeneReviews* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=gene&part=carasil>

学会発表(国際学会のみ)

Mizuno T, Watanabe-Hosomi A, Watanabe Y,

Tanaka M, Nakagawa M. Transendoctysis is impaired in CADASIL. 5th Congress of the international society for Vacular 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

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

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

Itoh F: Involvement of TGF- $\beta$ /Smad signaling in Angiogenesis and lymphangiogenesis. TGF- $\beta$  meeting. Leiden, the Netharlands. (2010)

Itoh F, Itoh S, Adachi T & Kato M:Vascular endothelial cell-specific Smad2 and Smad3 signaling is required for blood vessel integrity. The 59th Fujiwara International Seminar. Tomakomai, Japan (2010)

Itoh F, Itoh S, Adachi T, Festing M, Weinstein M & Kato M: Impairment of vascular stability by endothelial specific ablation for Smad2 and Smad3 genes the 16th International Vascular Biology Meeting. Los Angeles, California, U.S. (2010).

Takeshita T et al. Cilostazol rescues AGE-related ischemic BBB damage. 14th

Intern Symp Signal Trans-duction in the BBB, Istanbul Sep7-9, 2011

So T et al.The effect of candesartan on blood-brain barrier.13th Intern Symp Signal Transduction in the BBB, Zurich Sep2-4, 2010

#### 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)

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 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

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と本邦での発症年齢、臨床症状に影響を与える因子を既に遺伝子診断により CADASIL と確定した 37 名で検討した。発症年齢、臨床症状に最も影響する因子は脳梗塞危険因子の合併であった。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。当科で遺伝子診断した CADASIL37 例の臨床的特徴、発症要因を検討した。また Davous により提唱された CADASIL の診断基準を用いると本邦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作成した新しい診断基準(厚労基準)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 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

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。またこれらの症例を用いて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  $\chi^2$  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)

Davous 診断基準の感度は除外例 24.3%、probable 10.8%、possible 51.4%となり、probable と possible を合わせても 62.2%であった。(表2)一方厚労基準各の感度は probable 18.9%、possible 56.8%で、probable と possible を合わせると 97.3%であった。(表2)

#### 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。

またこの幅広い発症年齢や合併する危険因子を考慮すると従来用いられてきた Davous の診断基準は適当でなく、今回研究班で作成した診断基準は本邦の実態に即しており、スクリーニングで見落とす危険性が低いと考えられる。

#### E. 結論

新たに作成した診断基準は診断基準として妥当であり、これを用いて CADASIL の正確な有病率を明らかにすることが必要である。

## 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. [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]

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.

Chen 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]

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 長谷斉 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 $\beta$ 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 惠、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 2011.08.01.

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

なし  
F. 健康危険情報  
なし

E. 知的財産権の出願・登録状況

	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)

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(認知症と白質病変の特徴と病理所見の解析)

分担研究者	内野 誠(平成 22 年度)	熊本大学大学院	生命科学研究部	神経内科学分野
	平野照之(平成 23 年度)	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

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。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。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。

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。

- 1) 臨床像：認知症の特徴：CADASIL の認知症の特徴を明らかにする。
- 2) **Basophilic Submicron Granules (BSG)**を用いた病理診断および組織化学的検討：CADASIL に特異的な電子顕微鏡所見である Granular Osmiophilic Material (GOM)の光学顕微鏡像を明らかにして、病理診断および研究に活用する。
- 3) 白質病変の重症度と臨床像の関係 CADASIL の白質病変は側脳室周囲から皮質直下白質にかけて形成される。しかし、どのような白質病変が臨床像の重症度と関係するのか明らかにされていない。そこで本検討では、白質病変の分布と臨床像の重症度との関係を明らかにする。

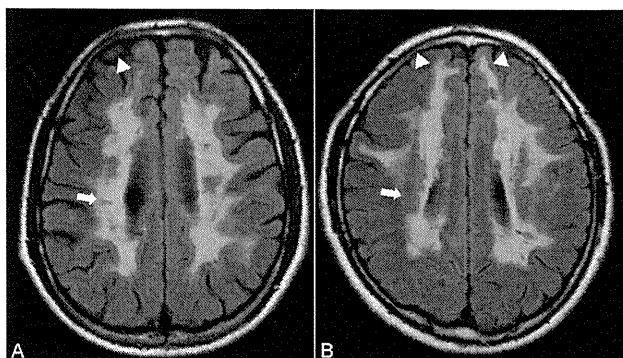
B. 研究方法

- 1) 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。

2) 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。また、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。

3) CADASIL と診断された 15 例 [男性 7 例、平均年齢 55.1 歳]を対象とした。白質病変は、皮質直下から皮質下に広がる表在病変：superficial white matter hypertension (SWMH)(図 矢頭)と、側脳室周囲白質病変：periventricular hypertension (PVH) (図 矢印)に分け、評価した。SWMHは、融合して皮質直下の白質の大部分に広く分布する病変を重度、PVHはShinoharaらの基準でグレード III 以上を重度とした。





図A: PVH グレードIV、SWMH グレードⅢ、  
図B: PVH グレードⅡ、SWMHグレードⅣ

危険因子（高血圧、喫煙、糖尿病、脂質異常症）の有無を検討し、ADLはmodified Rankin Scale（mRS）で評価した。

（倫理面への配慮）

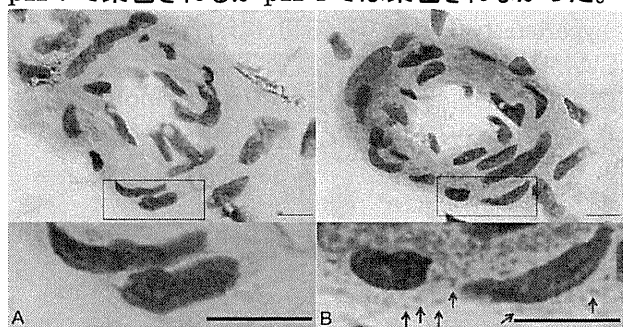
遺伝子診断に関しては、遺伝子検査の倫理指針に基づき当院の倫理委員会で承認を得た。検体の採取にあたっては、患者または家族のinformed consentを得た。

### C. 研究結果

1) 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。

2) 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  $\mu\text{m}$ の細動脈を検出できなかった。

トルイジン青染色の大野法を用いて検討では、細胞核はpH 4(図A)、pH 7(図B)の緩衝液中でもトルイジン青で染色された。一方、BSG(矢印)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。

3) 重度のPVHを有する8例〔男性4例：平均年齢58.1歳〕中、5例(63%)が危険因子を有し、mRS $\geq$ 2が4例(50%)とADL不良であった。一方、PVH軽度の7例〔男性3例：平均年齢51.4歳〕で、危険因子はなく、mRS $\geq$ 2の症例はなかった。55歳以上で重度のSWMHを認めるもののPVHが軽度であった2例は、mRS $\leq$ 1とADL良好であった。

### D. 考察

1) 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。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。また、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、脳梗塞によるものか、それとも神経変性によるものか今後の検討が必要である。

2) 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。GOMは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。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。

3) CADASILのADLは、側脳室周囲の白質病変の重症度と関係していた。危険因子のない例では、側脳室周囲に白質病変が形成されず、危険因子のある例では、側脳室周囲に白質病変が形成され、症候性の神経症状を呈していた。CADASILの白質病変は危険因子の存在により修飾され、分布が異なると考えられた。

### E. 結論

1) CADASILの認知症は皮質下性のみでなく、皮質性の認知症も生じることがある。

2) GOMの光学顕微鏡像であるBSGは病理診断や組織化学的検討に用いることができる。

3) 側脳室周囲の白質病変はCADASILの臨床像の重症度を反映している。

## F. 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 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

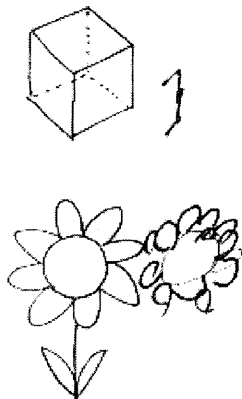
7<sup>th</sup> WORLD STROKE CONGRESS  
The pathologic findings of cortical microbleeds in a case of CADASIL  
Akihiko Ueda, Teruyuki Hirano, Naoko Udaka, Toshinori Hirai, Takaaki Ito, Makoto Uchino

## G. 知的財産権の出願・登録状況(予定含む)

特記事項なし

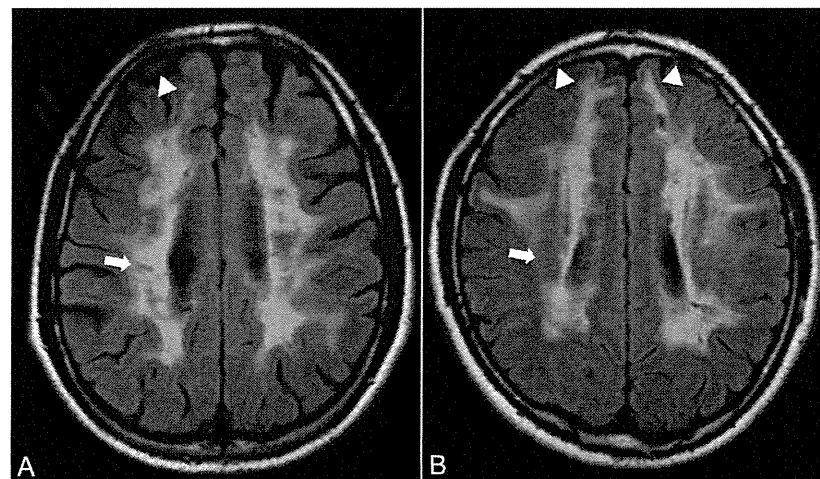
# CADASILの認知症の特徴

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  
 アルツハイマー病様の病態



Patient with CADASIL  
 Notch3 R133C mutation

## 側脳室周囲白質病変と臨床像の重症度

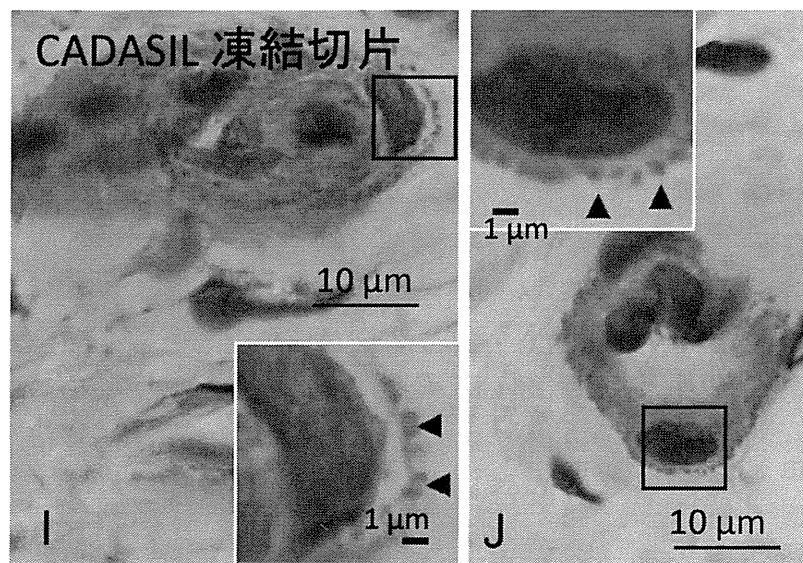


61M Notch3 R75P  
 運動障害+認知症  
 危険因子あり

63M Notch3 R141C  
 運動障害なし、認知症なし  
 危険因子なし

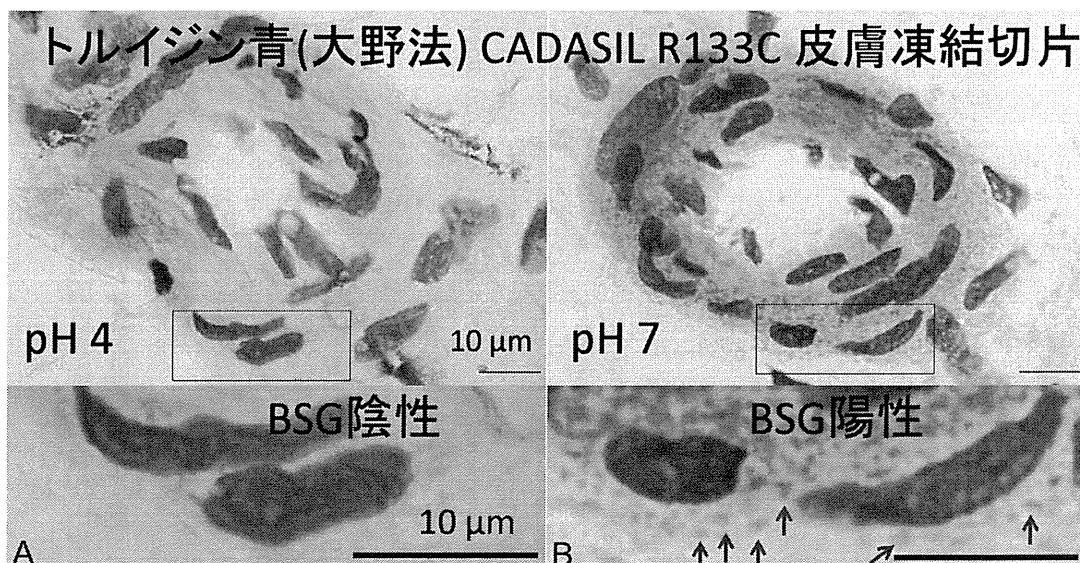
- 18 -

## Granular Osmiophilic Material (GOM)の光学顕微鏡所見: Basophilic submicron granule (BSG)



1 μm未満のヘマトキシリン陽性顆粒

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



システイン残基の性質に一致

pH 4 -SH

pH 7 -S<sup>-</sup> + H<sup>+</sup>

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

①CARASIL の MRI 画像に関する研究

②HTRA1 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	①野崎 洋明	新潟大学脳研究所神経内科
	①福武 敏夫	亀田メディカルセンター
	①下江 豊	鹿島労災病院
	①平山 幹夫	春日井市民病院
	①柳川 宗平	飯田市立病院
	①西本 祥仁	慶應義塾大学神経内科
	①鈴木 規宏	慶應義塾大学神経内科
	①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
	②齋藤 洋兵	新潟大学脳研究所神経内科
	②二本松 萌	新潟大学脳研究所神経内科
	②小山 哲秀	新潟大学超域学術院
	②野崎 洋明	新潟大学脳研究所神経内科
	②水野 敏樹	京都府立医科大学神経内科
	②野田 智子	名古屋医療センター神経内科
	②垣内 無一	金沢医科大学神経内科
	②伊藤 彰一	千葉大学神経内科
	②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

①CARASIL の MRI 画像 に関する研究

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。

②HTRA1 変異ヘテロ接合体と脳小血管病の関連 に関する研究

*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