

---

厚生労働科学研究費補助金  
難治性疾患等克服研究事業

遺伝性脳小血管病およびその類縁疾患の  
診断基準の確立と治療法の研究

平成 24 年度 総括・分担研究報告書

---

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

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

研究代表者 小野寺 理

平成25(2013)年3月

## 目次

### I. 総括研究報告

遺伝性脳小血管病およびその類縁疾患の診断基準の確立と治療法の研究

研究代表者 小野寺 理

..... 1

### II. 分担研究報告

1. "HTRA1 変異ヘテロ接合体における脳小血管病の発症機序"に関する研究 ..... 9

分担研究者 豊島靖子(新潟大学脳研究所病理学分野)

研究協力者 野崎洋明(新潟大学医学部保健学科)

小野寺理(新潟大学脳研究所分子神経疾患資源解析学)

2. CADASIL における抗血小板剤治療の現状と脳血管反応性 ..... 12

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 渡邊明子、濱野 愛、水田依久子、安池博美、中川正法  
(京都府立医科大学神経内科)

松野浩之(同志社女子大学薬学部臨床病態生化学)

3. 神経軸索スフェロイドを伴う遺伝性びまん性白質脳症(HDLS)患者の脳画像所見と  
剖検脳における細胞内シグナル伝達分子の検討 ..... 15

分担研究者 吉田邦広(信州大学医学部神経難病学講座)

研究協力者 福島和広、近藤恭史、木下通亨、木下朋実、池田修一  
(信州大学医学部脳神経内科、リウマチ・膠原病内科)

小柳清光(信州大学医学部神経難病学講座)

4. 神経軸索スフェロイドを伴うびまん性白質脳症(HDLS)の診断基準作成に向けての  
草案 ..... 19

分担研究者 小野寺理(新潟大学脳研究所分子神経疾患資源解析学)  
研究協力者 他田正義(新潟大学脳研究所分子神経疾患資源解析学分野)  
今野卓哉、西澤正豊(新潟大学神経内科学分野)  
野崎洋明(新潟大学医学部保健学科)  
他田真理(新潟大学病理学分野)  
小山哲秀、池内 健(新潟大学超域学術院)

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)

### 総括研究報告書

遺伝性脳小血管病およびその類縁疾患の診断基準の確立と治療法の研究

研究代表者 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

遺伝性脳小血管病 (HSVD) には Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL) や Cerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CARASIL) がある。申請者は難治性疾患克服研究事業症例研究分野で両疾患の調査を行った。その結果、本邦では CADASIL が 100 家系以上、CARASIL が 6 家系あることが判明した。さらに、CARASIL のヘテロ接合体で脳小血管病を起こす症例を 4 症例見いだした。一方、両疾患が陰性である HSVD や類縁疾患が存在することも明らかとなった。中でも spheroid を伴う若年性認知症の一群に注目した。本研究班では、まず CADASIL、CARASIL の診断基準について、神経学会での承認を得る。さらに CARASIL のヘテロ接合体での脳小血管病のリスクを明らかとするために、その発症機序を解明しつつある。本年度は、症例の集積と、ヘテロ接合体者の発症機序の解明を引き続き行う。次に、非 CADASIL、CARASIL の HSVD 特に spheroid を伴う若年性認知症については、遺伝子が単離され、遺伝子異常が判明した本症例を 7 例確認した。遺伝子診断確定例を用いて、本症の疾患概念、診断基準を確立する。さらにその病態機序についても検討を加える。CARASIL は National Organization for Rare Disorders にも記載され、GeneReviews にも疾患概念の記載が終了している。いずれも申請者が直接執筆、添削し、国際的イニシアチブを取っている。本研究は、希少疾患の克服に向けた、厚生行政の目的と合致する。さらに、収集した生体資料は、横断的研究班との連携により、未解明の新規原因遺伝子の同定に向けた有力なリソースとなる。方法として引き続き 1) 遺伝性脳小血管病の実態調査 2) 未解明若年性認知症の組織診断確定例の調査 3) Spheroid を伴う若年性認知症の診断基準の構築を行う。本研究は関連研究の倫理指針に則り進める。

#### 研究分担者

水野敏樹 京都府立医科大学神経内科学  
准教授

吉田邦宏 信州大学医学部神経難病学講座・  
神経内科学 特任教授

豊島靖子 新潟大学脳研究所病理学分  
野・神経病理学 准教授

近年、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 は認知症、脳梗塞、出血性脳梗塞の発症に関わる。しかし病態機序は不明であり、有効な治療方法も確立されていない。さらに抗血小板薬の使用による脳出血が危惧されているが、抗血小板剤使用の是非も明らかではない。本病態の中に、家族性に LA を起こす遺伝

#### 研究目的

性脳小血管病がある。本症には、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) 等がある。申請者は難治性疾患克服研究事業症例研究分野で両疾患の全国調査を行った。その結果、本邦では CADASIL が 100 家系以上、CARASIL が 6 家系あることを明らかにした。さらに、CARASIL のヘテロ接合体で脳小血管病を起こす症例を 4 症例見いだした。一方、両疾患が陰性である、家族性脳小血管病や類縁疾患が存在することも明らかとなった。中でも、病理学的に spheroid を伴う若年性認知症 (HDLS) に注目している。本疾患は CARASIL, CADASIL にとの鑑別が必要となる。本年、本疾患の遺伝子が単離された。本邦でも類似例を集積し、今までに剖検例 2 例、疑い例 5 例にて遺伝子変異を見いだした。

本申請では、これらの知見をもとに、全国の脳外科医、神経内科医に、若年性の脳小血管障害を疑った場合に、常に、有用な情報を与え続け、診断について提案を続けるコアステーションを形成することにある。その中でも、本事業計画の目的として次の 3 点をあげた。① 遺伝性脳小血管病の実態調査 (水野 小野寺) ② 未解明若年性認知症の組織診断確定例の調査 (吉田, 豊島) ③ Spheroid を伴う若年性認知症の診断基準の構築 (吉田 小野寺 水野 豊島)。平成 24 年度に症例を集積し、平成 25 年度は、その知識に立った、新たな疾患概念の構築を行う予定であり、これに沿って事業を進めている。

## 研究方法

難治性神経疾患の症例の集積、追跡は多年にわたる地道な集積とシステムの構築が必須である。この研究計画は、全国の脳外科医、神経内科医に、若年性の脳小血管障害を疑った場合に、常に、有用な情報を与え続け、診断について提案を続けるコアステーションを形成することにある。その中でも、本事業計画の目的として次の 3 点をあげ進めてきた。平成 25 年度は、その知識に立った、新たな疾患概念の構築を行う予定であり、これに沿って事業を進めている。重点的な目標とした Spheroid を伴う若年性認知症については、疾患概念を規定し、臨床的に同一な患者を 5 例集めることを目標としていたが、現時点で遺伝子異常を確認した 7 例を集積した。

### ① 遺伝性脳小血管病の実態調査 (水野 小野寺)

引き続き本邦における CARASIL, CADASIL の現在行われている薬物治療などの実態調査と生体資料収集を行う。遺伝性脳血管障害班で作製した診断基準について、学会承認をえて、英文での公表を行う。また脳小血管病を疑う症例を広く集め、遺伝子診断を進め、診断基準の感度、特異度を前向きに検討する。さらに症例追跡研究のため、同一のプロトコールを各施設に依頼し、前向き自然史研究の基盤を確立する。すでに患者実態調査に関しては 90 施設での倫理委員会承認が終了し、生体資料の収集を開始しており、本研究計画では、これを引き続き継承しう。さらに、症例の 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。また、非 CARASIL, CADASIL の脳小血管病症例について、その臨床情報、生体資料、とくに遺

伝子同定解析のための非発症者の遺伝子の集積を行う。本解析についてはすでに十分な実績をもち、Notch3, HTRA1, TREX, COL41A の全翻訳領域の解析が可能であり、また HTRA1 については酵素活性を測定する。本年は CARASIL に関して MRI 画像を集積した。来年度は HTRA1 変異ヘテロ接合者の臨床像を集積し、その病態機序について明らかとする事を目標とする。

### ② 未解明若年性認知症の組織診断確定例の調査（吉田 豊島）

病理診断で確定している spheroid を伴う若年性認知症の臨床、病理学的特徴を検討する。すでに、新潟、および信州、筑波大学で、当該疾患が確認されている。それらの特徴を抽出した後、学会報告レベルで同様の疾患がないか、類縁疾患の経験がないか、全国の長期療養型施設を中心とした調査を行い症例の掘り起こしを進める。本疾患は原因不明のてんかんを伴う若年性認知症としてフォローされている可能性があるが、画像所見が比較的特徴的であり、特徴的な画像所見を提示することで、類縁疾患の掘り起こしが可能となる。すでに病理標本の集積を開始し HDLS の 4 例を集めた。来年度も引き続き集積に努める。得られた症例の情報を元に診断基準を作製し日本神経学会での承認を得る。

### ③ Spheroid を伴う若年性認知症の診断基準の構築（吉田 小野寺 水野 豊島）

spheroid を伴う白質脳症は、神経病理学が根付いており、画像診断が発達している我が国で家系が集まりやすい。本症は常染色体優性の初老期認知症として、家族性アルツハイマー病、CADASIL と混同されている可能性があり、

そのことを学会員に広く周知し、症例の蓄積を計る。前述したようにすでに 7 症例を集積し、その遺伝子異常を解明した。遺伝子が解明されたため、今後は遺伝子異常に基づく病態機序の解析と、それに基づく根本的な治療方法の開発に向けて検討を進める。すでにミクログリアの異常が背景にある事を見いだしている。

#### （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・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成 13 年 3 月 29 日 文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号、平成 16 年 12 月 28 日 全部改正、平成 17 年 6 月 29 日 一部改正）に沿って、倫理的配慮のもとに実施する。すなわち、十分なインフォームドコンセントを行った上で文書で同意を得、末梢血から DNA を抽出し、保存する。これらのヒト由来試料や臨床データに関する個人識別情報は、連結可能匿名化を行い、大学内で定められた個人識別情報管理者が厳重に管理する。本研究の一部に関しては新潟大学遺伝子研究倫理委員会審査を受け、承認を得ている（平成 22 年 11 月 24 日 新潟大学遺伝子倫理審査委員会承認）。個人のプライバシーに関しては十分に保護する。規定の P1 もしくは P2 実験室はすでに承認済みの施設を保有している。研究を通じて協力者の人権は守られ、現時点で予想される不利益はない。

#### 研究結果と考察

・研究班全体としての研究成果

難治性神経疾患の症例の集積、追跡は多年にわたる地道な集積とシステムの構築が必須である。本研究により、全国の脳外科医、神経内科医に、若年性の脳小血管障害を疑った場

合の遺伝子診断を提供している。さらに、いまままで未解明であった spheroid を伴う若年性認知症の臨床症状を明確にしている。加えて CARASIL, CADASIL の臨床的多様性を見いだした。今後、本研究班の知見により、さらに非典型例の症例の蓄積が推進すると考えられる。これらの研究は、遺伝性のみならず、孤発性の脳小血管病の解明にも寄与する。

・個々の研究成果

① 遺伝性脳小血管病の実態調査 (水野 小野寺)

- 患者実態調査に関しては 90 施設での倫理委員会承認が終了し、生体資料の収集を開始した。
- CARASIL に関して MRI 画像を集積した。
- HTRA1 変異ヘテロ接合者の臨床像を集積し、広汎な白質障害を来す患者 4 例で HTRA1 変異のヘテロ接合体者をみいだした。
- これらの新規変異型 HTRA1 は優性阻害効果を示しプロテアーゼ活性の著明な低下を来すことを示した。

② 未解明若年性認知症の組織診断確定例の調査 (吉田, 豊島)

病理診断で確定している spheroid を伴う若年性認知症 (HDLS) の臨床、病理学的特徴を検討し、新潟、および信州、筑波大学で、当該疾患をみいだ、病理標本の集積を開始し HDLS の 4 例を集めた。

③ Spheroid を伴う若年性認知症の診断基準の構築 (吉田 小野寺 水野 豊島)

- HDLS 剖検例 2 例, 臨床的疑い例 5 例, 計 7 家系 7 症例を収集し, CSF1R 遺伝子の塩基配列を解析し, 全例で同遺伝子のチロシンキナーゼドメイン内に変異を見いだした。

それらの臨床症状を明らかとした。家族歴は 4 家系で明らかではなく。平均発症年齢は 43.9 歳(36-55 歳)で、平均罹病期間は 6.6 年(1-14 年)であった。初発症状は認知機能障害が多く、4-5 年で無言無動状態に陥った。MRI 所見では大脳白質病変は、前頭・頭頂葉優位、かつ脳室周囲の深部白質に目立つ特徴を有した。全例で病初期から高度の脳梁の菲薄化を認めた。

### 結論

当初計画では CARASIL, CADASIL の臨床像, Hereditary diffuse leukoencephalopathy with spheroids (HDLS) の実態を明らかにする事であった。これらについて、初年度の目標は十分に達成した。本年度はこれらの知見に基づいた疾患概念、診断基準の構築を行うことについて重点的に取り組む予定であり、十分に達成可能である。

本研究により、遺伝性脳小血管病 (SVD)、および、原因不明の若年性認知症の一群が認識され、その疾患概念が確立されれば、診断、有効な治療方法の開発に向けた提言が可能となる。これは希少疾患の克服に向けた、厚生行政の目的と合致し、臨床の現場にて正確な診断と病態の把握の面から活用される。また正確な診断は、正確な予後把握と、適切な対症療法を選択に繋がる。さらに、本研究班で収集した生体資料は、横断的研究班との連携により、新規原因遺伝子の同定に向けた



有力なリソースとなる。また、本年遺伝子が同定された spheroid を伴う若年性認知症は、本邦ですでに複数例を集積した。CARASIL は National Organizatio for Rare Disorders にも重要な疾患として記載され、GeneReviws にも疾患概念の記載が終了している。これらは、いずれも申請者が直接執筆、もしくは添削し、国際的イニシアチブを取っている。これらの組織との関係は、希少疾患の症例研究、臨床研究において重要であり、本邦がイニシアチブを取っている本研究の研究組織を維持することは本邦の希少性疾患行政においても重要である。本研究の間接的な成果としては、本症の病態解明により、より多くの患者さんのいる孤発性 SVD に対する新たな治療方法の提案が期待できる。SVD は脳血管性認知症をきたすため、本研究成果は認知症に対する新たなアプローチにも繋がる。

## 研究発表

### 論文発表(英語査読論文のみ)

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

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

T Mizuno, I Mizuta, A Hosomi-Watanabe, A Hamano, Y Azuma, M Kondo, O Onodera, M Nakagawa. Clinical and genetic features of Japanese CADASIL. *Cerebrovasc Dis* 34 S1 125, 2012

Kinoshita M, Yoshida K, Oyanagi K,

Hashimoto T, Ikeda S. Hereditary diffuse

leukoencephalopathy with axonal spheroids

caused by R782H mutation in *CSF1R*: Case

report. *J NeurolSci* 318: 115-118, 2012.

Kondo Y, Kinoshita M, Fukushima K, Yoshida K, Ikeda S. Early involvement of the corpus callosum in a patient with hereditary diffuse leukoencephalopathy with spheroids carrying the *de novo* K793T mutation of *CSF1R*. *Intern Med* 52: 2013 (in press)

### 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)

分担研究報告書

遺伝性脳小血管病およびその類縁疾患の診断基準の確立と治療法の研究

“HTRA1 変異ヘテロ接合体における脳小血管病の発症機序”に関する研究

分担研究者	豊島 靖子	新潟大学脳研究所病理学分野
研究協力者	野崎 洋明	新潟大学医学部保健学科
	小野寺 理	新潟大学脳研究所分子神経疾患資源解析学

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。我々は CARASIL 研究の過程で、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し、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。これまでの報告で、ほとんどタンパクを産生できないナンセンス変異型 *HTRA1* であっても、そのヘテロ接合体は発症しないことがわかっている。このことから、*HTRA1* 変異のヘテロ接合体の発症機序を検討する場合、変異型 *HTRA1* のプロテアーゼ活性低下以外の機序を考える必要があった。本研究では、ヘテロ接合体で発症する変異型 *HTRA1* が、自身のプロテアーゼ活性の低下に加えて、3 量体形成を介した *HTRA1* プロテアーゼドメインの活性化機構を阻害することによって、ドミナントネガティブ効果を示すことを明らかにした。

A. 研究目的

Cerebral Autosomal Recessive Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy (CARASIL) は常染色体劣性遺伝性の脳小血管病である。40 歳までに大脳白質病変とラクナ梗塞を呈し、禿頭と変形性脊椎症を合併する。CARASIL は High Temperature Requirement Serine Peptidase A1 (*HTRA1*) 遺伝子の変異によっておこる。*HTRA1* はセリンプロテアーゼの一種であり、CARASIL は *HTRA1* プロテアーゼ機能の喪失によって発症する。

我々は、脳小血管病に対する *HTRA1* 変異の寄与を検討する目的で、家族歴を問わず、若年発症で広汎な白質病変と多発ラクナ梗塞を呈する症例について、*HTRA1* の塩基配列の解析を行い、*HTRA1* の新規変異をヘテロ

接合体で有する症例を 4 例見いだした。これらの新規変異は病的意義を有すると考えられたが、ホモ接合体で見いだされた従来の変異とどのように違うのか、その分子病態機序は不明であった。

*HTRA1* を産生出来ないナンセンス変異型 *HTRA1* のヘテロ接合体が無症状であることから、片側の正常アレルに由来する野生型 *HTRA1* が機能していれば、脳小血管病を発症しないと考えられる。この事実は、ヘテロ接合体の発症には、変異型タンパクのプロテアーゼ活性低下以外の機序が存在することを示している。*HTRA1* のプロテアーゼ活性獲得機構として、3 カ所の stacking site (Tyr169, Phe171, Phe278) によって 3 量体を形成した後に、互いに隣接する *HTRA1* のプロテアーゼドメインを活性化するというモデルが提唱さ

れている。このモデルでは、204-364 アミノ酸残基で形成されるプロテアーゼドメインのうち、L3 ループ(301-314 アミノ酸残基)に基質が結合すると、L3 ループが隣接する HTRA1 の LD ループ(285-289 アミノ酸残基)に作用し、その結果、隣接する HTRA1 のプロテアーゼドメインの構造が変化することによって、プロテアーゼ活性を獲得する。脳小血管病患者で見いだしたヘテロ接合体で発症する変異は、全て LD ループか L3 ループあるいはその近傍に位置していたが、既報のホモ接合体で発症する変異はこれらの領域には位置しなかった。そこで、ヘテロ接合体で発症する変異型 HTRA1 では、自身のプロテアーゼ活性の低下に加えて、この活性化機構が障害されており、野生型のプロテアーゼ活性に対してドミナントネガティブ効果を示すとの仮説を立て、これを検証した。

## B. 研究方法

GeneTailor site-directed mutagenesis system を用いて HTRA1 変異導入プラスミドを作成し、FreeStyle 293 Expression System によって精製タンパクを得た。HTRA1 のプロテアーゼ活性は、FTC 標識カゼインを基質に用いて測定した。HTRA1 の 3 量体形成能については、ゲル濾過クロマトグラフィーにより、タンパクをサイズ依存的に分離し、免疫ブロットによって評価した。

(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

まず、変異型 HTRA1 のプロテアーゼ活性を測定し、新規変異型 HTRA1 が野生型 HTRA1 に比して、有意に低下していることを示した。次に、stacking site の変異型 HTRA1 を作成し、3 量体を形成しないことをゲルろ過クロマトグラフィーによって確認し、この変異型 HTRA1 がプロテアーゼ活性を喪失することを示した。最後に、精製した変異型 HTRA1 と野生型 HTRA1 を混合したタンパクと、変異型と野生型を細胞に共発現して作成したタンパクを用いたプロテアーゼ活性の測定を行った。その結果、変異型と野生型を共発現したタンパクでの

み、野生型のプロテアーゼ活性の抑制を認めた。

## D. 考察

この研究では、ヘテロ接合体で発症する新規変異型 HTRA1 が、機能喪失とドミナントネガティブ効果を示すことを明らかにした。ヘテロ接合体で発症する変異はプロテアーゼドメインに位置しており、プロテアーゼ活性を喪失していた。Stacking site の変異型 HTRA1 がプロテアーゼ活性を喪失したことは、HTRA1 がプロテアーゼ活性を獲得するためには、3 量体を形成することが必須であることを示唆する。さらに変異型と野生型を細胞に共発現した場合のみ、野生型のプロテアーゼ活性が抑制されたことは、変異型が野生型と共同して 3 量体を形成することによってドミナントネガティブ効果をあらわすことを示唆する。

## E. 結論

ヘテロ接合体で発症する変異は、自身のプロテアーゼ活性の低下に加えて、3 量体形成を介してドミナントネガティブ効果を示す。

## F. 健康危険情報

特に報告すべきものはない。

## G. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表 なし

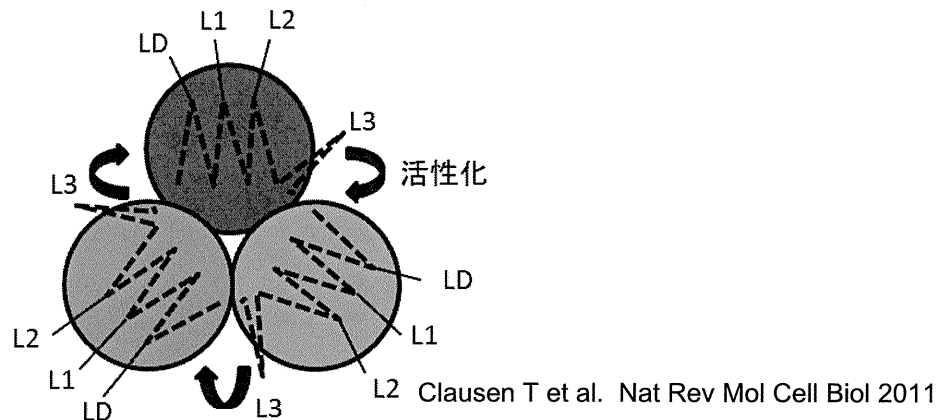
## H. 知的財産権の出願・登録状況(予定含む)

(特許取得・実用新案登録・その他)

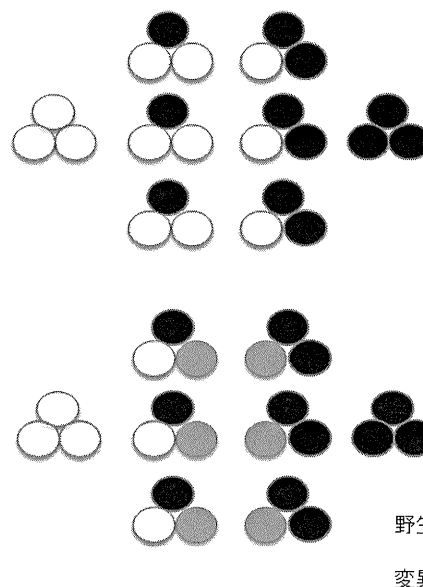
なし

# 想定されるHTRA1 変異ヘテロ接合体の発症機序

- ▶ HTRA1のプロテアーゼ活性獲得機構のモデル
  - ▶ 3量体形成
  - ▶ L3が隣接するHTRA1のLDを活性化
  - ▶ 隣接するHTRA1のプロテアーゼドメインの構造変化
- ▶ ヘテロ接合体で発症する変異はL3, LDとその近傍に位置する
  - ▶ プロテアーゼ活性の獲得を阻害する



## Dominant negative効果によるプロテアーゼ活性の変化



- ▶ L1, L2 変異のヘテロ接合体
  - ▶ 通常は発症しない
  - ▶ 12/24 = 50% が活性をもつ

- ▶ LD, L3 変異のヘテロ接合体
  - ▶ 発症の高リスク
  - ▶ 6/24 = 25% が活性をもつ

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)

分担研究報告書

遺伝性脳小血管症およびその類縁疾患の診断基準の確立と治療法の研究

CADASIL における抗血小板剤治療の現状と脳血管反応性

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	渡邊明子	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
	安池博美	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
	松野浩之	同志社女子大学薬学部臨床病態生化学

研究要旨

CADASIL は通常の抗血小板療法に対して抵抗性を示すため、研究班で作成した診断基準に基づいて遺伝子診断を行った CADASIL 患者 52 名に対する各施設での抗血小板治療の現状を解析した。血小板膜表面に発現し活性化血小板マーカーとして注目され、血小板凝集反応を反映する PAC-1、不可逆的血小板の活性化である顆粒放出反応を反映する CD62P が上昇していることを認めた。また acetazolamide (ACZ) 負荷前後の局所脳血流量 (r CBF) からの血管反応性低下が脳梗塞再発予測に有用であった。

A. 研究目的

CADASIL は通常の抗血小板療法に対して抵抗性を示すこと、脳出血を合併するため抗血小板剤の選択が難しい。今回研究班で作成した診断基準に基づいて遺伝子診断を行い CADASIL と確定した症例に対する各施設での抗血小板治療の現状を解析した。また血小板膜表面に発現し活性化血小板マーカーとして注目され、血小板凝集反応を反映する PAC-1、不可逆的血小板の活性化である顆粒放出反応を反映する CD62P の有用性、ならびに臨床病態のマーカーとして acetazolamide (ACZ) 負荷前後の局所脳血流量 (r CBF) の有用性を検討した。

B. 研究方法

*NOTCH3* 変異を認めた CADASIL 症例 54 名中治療歴が明らかな 52 名 (男性 23 名, 女性 29 名)。当科通院中の 7 名では活性化血小板マーカーの検討, 8 名で経時的な r CBF 測定を行った。脳梗塞発症群と未発症群に分けて、抗血小板治療、脳卒中危険因子、臨床症状などを比

較検討した。フローサイトメトリーにより血小板表面の PAC-1/CD62P, レーザー散乱粒子計測法による自然誘発微小血小板凝集塊 (SMAP) を測定した。ACZ 負荷前後に撮像した <sup>123</sup>I-IMP-SPECT から ARG 法で定量的に r CBF(ml/100g/min)を算出した。

(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

①脳梗塞発症群は 37 例、未発症群は 15 例で、抗血小板薬は発症群 33 例、未発症群 7 例で投与されていた。抗血小板剤の内訳は aspirin 12 例、clopidogrel/ticlopidine 8 例、cilostazole 15 例、その他 5 例であった。発症群で抗血小板薬 2 剤群、単剤群、なし群の 3 群を比較すると脳出血の頻度は 0%、4.5%、50%と有意に異なっていた。② PAC-1 は  $2.4 \pm 1.1\%$  total, CD62P は  $2.3 \pm 1.3\%$  total と血小板活性化を認めた。SMAP は 7 例中 5 例で認めた。

③初回安静時の rCBF には有意差を認めなかったが、ACZ 負荷後の大脳皮質平均 rCBF は再発群 44.4(40.4-48.4) ml/100g/min、非再発群は 73.5 (58.8-89.7) ml/100g/min と、再発群は非再発群と比較し有意に低下していた。

#### D. 考察

①CADASIL に対する抗血小板剤非投与群で脳出血が多く、脳出血の合併が抗血小板剤の選択に影響を与えたことが示唆された。②PAC-1/CD62P 測定では CADASIL 全症例において不可逆的な血小板活性化を認め、微小血小板凝集塊も高率に認めており、血小板凝集のモニタリングに有用と考えられた。③ACZ 負荷後の血流低下は、脳血管反応性の低下を反映し、その低値は再発予測に有用であることが示唆された。

#### E. 結論

CADASIL における脳血管障害再発予防のため、血小板機能および脳血管反応性をモニタリングする必要がある。

#### F 研究発表

##### 1. 論文発表

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

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

T Mizuno, I Mizuta, A Hosomi-Watanabe, A Hamano, Y Azuma, M Kondo, O Onodera, M Nakagawa. Clinical and genetic features of Japanese CADASIL. *Cerebrovasc Dis* 34 S1 125, 2012

水野敏樹 水田依久子. NOTCH3 非関連 CADASIL 症候群. *循環器内科* 71: 158-163, 2012

水野敏樹. CADASIL の診断, 病態, 治療の進歩—本邦における CADASIL 診断基準の作成—. *臨床神経* 52: 303-313, 2012

##### 2. 学会発表

T Mizuno, I Mizuta, A Hosomi-Watanabe, A Hamano, Y Azuma, M Kondo, O Onodera, M Nakagawa. Clinical and genetic features of Japanese CADASIL. *Asia Pacific Stroke Conference 2012*, 2012/9/10-12, Tokyo, Japan

T Mizuno. Transendocytosis is impaired in CADASIL-mutant NOTCH3. *The Notch Meeting VI, Notch and Trafficking*, Athene, Greece, 30. Sep-3. Oct, 2012

水野敏樹 山田恵 酒井晃二 富井康宏 牧野雅弘 中川正法. Q space imaging による CADASIL の解析. 第 37 回日本脳卒中学会総会福岡 2012.4.26-28.

渡辺明子, 渡邊義久, 濱野愛, 水田依久子, 水野敏樹, 田中雅樹, 中川正法 CADASIL 変異型による NOTCH3 transendocytosis 障害の検討. 第 53 回日本神経学会学術大会 東京 2012.5.22-25

水野敏樹, 水田依久子, 濱野愛, 富井康宏, 渡邊明子, 近藤正樹, 藤原康弘, 牧野雅弘, 徳田隆彦, 中川正法. CADASIL37 例における遺伝学的・脳卒中危険因子の検討. 第 53 回日本神経学会学術大会 東京 2012.5.22-25

濱野愛, 水野敏樹, 藤原康弘, 奥山智緒, 水田依久子, 富井康宏, 近藤正樹, 徳田隆彦, 中川正法 CADASIL における脳血流および認知機能の経時的変化 第 53 回日本神経学会学術大会 東京 2012.5.22-25

木村紀久 藤村晴俊 佐古田三郎 矢野幸洋 水野敏樹. 病初期に Trousseau 症候群を疑われた Cerebral Autosomal Dominant Arteropathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL) の一例. *日本神経学会第 97 回近畿地方会* 大阪 2012.12.8

##### E. 知的財産権の出願・登録状況

なし

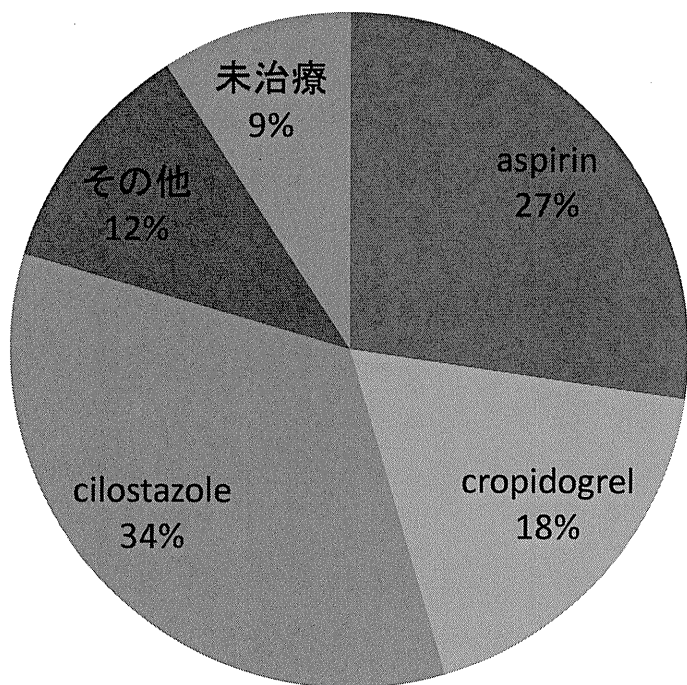
##### F. 健康危険情報

なし

# CADASIL患者における抗血小板療法

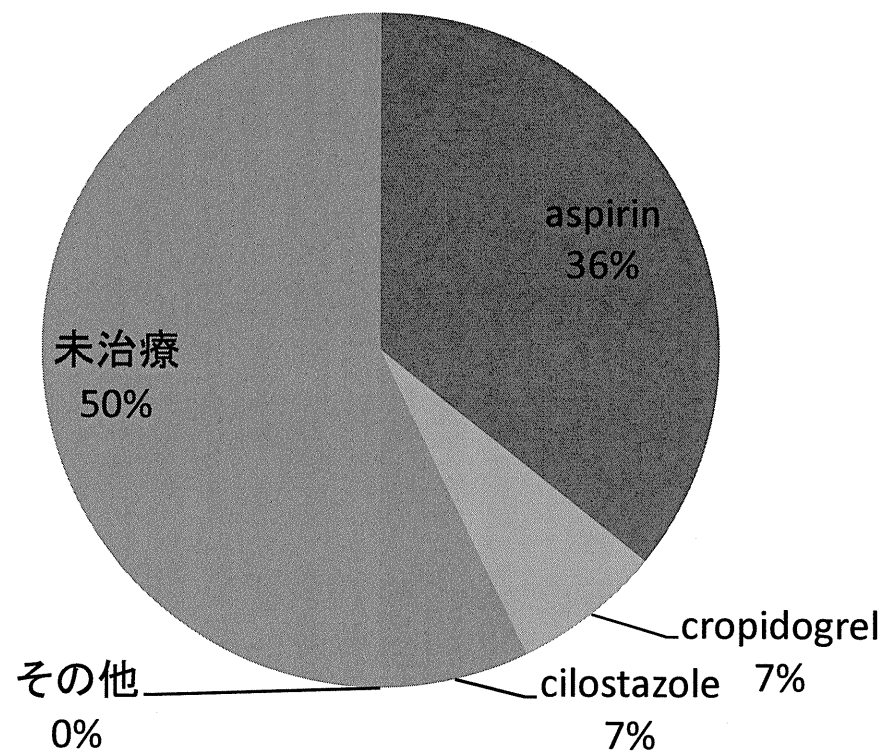
## 脳梗塞発症例

37例



## 脳梗塞未発症例

15例





厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)

分担研究報告書

遺伝性脳小血管病およびその類縁疾患の診断基準の確立と治療法の研究

神経軸索スフェロイドを伴う遺伝性びまん性白質脳症 (HDLS) 患者の脳画像所見と剖検脳における  
細胞内シグナル伝達分子の検討

分担研究者	吉田 邦広	信州大学医学部神経難病学講座
研究協力者	福島 和広	信州大学医学部脳神経内科、リウマチ・膠原病内科
	近藤 恭史	同上
	木下 通亨	同上
	木下 朋実	同上
	小柳 清光	信州大学医学部神経難病学講座
	池田 修一	信州大学医学部脳神経内科、リウマチ・膠原病内科

研究要旨

遺伝学的に確定診断された HDLS 5 家系 6 名の MRI、SPECT 画像を検討した。大脳白質病変および脳萎縮は前頭葉、頭頂葉優位であり、脳血流低下も辺縁系～前頭前野（帯状回前部、上・中前頭回）、次いで頭頂葉後部（楔前部、帯状回後部、角回、縁上回）に見られた。これらの所見は抑うつ、意思発動性の低下、遂行機能障害などの精神症状、行動異常を主徴とする HDLS の臨床像とよく対応するものと考えられた。また MRI 上、脳梁の萎縮を伴う T2、FLAIR 高信号は本症の病理変化を反映した一次的なものであり、HDLS の診断上、重要な手掛かりになるものと思われた。

A. 研究目的

2011 年末に Rademakers らにより神経軸索スフェロイドを伴う遺伝性びまん性白質脳症 (hereditary diffuse leukoencephalopathy with neuroaxonal spheroids, HDLS) の原因遺伝子として colony stimulating factor 1 receptor 遺伝子 (CSF1R) が同定された。この報告を受け、当科では、これまでに 5 家系 (6 名) において異なる CSF1R 変異を同定した。そのうち 2 名の凍結脳試料を入手した。

本研究では、HDLS の脳画像的特徴を明らかにすることを目的に遺伝学的に確定診断された HDLS 患者の脳画像所見 (MRI、SPECT) を検討した。また、凍結脳を用いて、CSF1R の下流に存在する細胞内シグナル伝達分子の増減を検討した。

B. 研究方法

脳画像の検討は遺伝学的に確定診断された

HDLS 患者 5 家系 6 名、および病理学的にスフェロイドを伴う白質脳症 (DLS) と診断されたが CSFIR 変異を持っていない 1 名を加えた計 7 名 (男性 3 名、女性 4 名) を対象とした。MRI は 7 名 11 画像 (撮像時の平均年齢 48.1 歳)、SPECT は 5 名 7 画像を検討した。

凍結脳の生化学的検討には、S759F、K793T 変異を有する 2 名、さらに上記の CSFIR 変異が確認できなかった 1 名を加えて計 3 名を対象にした。

(倫理面への配慮)

CSFIR 変異の解析、および剖検脳を用いた生化学的検討はいずれも信州大学医学部倫理委員会の承認を得た。CSFIR 変異の解析にあたっては、家族から書面での同意を得た。

### C. 研究結果

7 名の発症年齢は平均 46.1 歳 (HDLS 確定診断例に限れば 44.5 歳)、Sundal らによる MRI severity score は平均 21.8 だった。大脳白質病変は前頭葉、頭頂葉優位であり、CADASIL に特徴的とされる側頭極の T2、FLAIR 高信号は見られなかった。T2\*画像は 4 名で撮像されたが、microbleeds はいずれの患者にも見られなかった。一方、脳梁、特に膨大部の T2、FLAIR 高信号は 7 名全員で見られた。

脳梁病変を詳細に検討するため、血管性認知症 (vascular dementia, VaD) 20 名 (撮像時の平均年齢 68.5 歳)、非中枢神経疾患 (non-CNS) 24 名 (撮像時の平均年齢 49.9 歳) を対照として、corpus callosum index (CCI) を検討した。CCI は HDLS 群 ( $0.212 \pm 0.047$ , mean  $\pm$  SD) では、VaD 群 ( $0.289 \pm 0.050$ )、non-CNS 群 ( $0.371 \pm 0.056$ ) に比べて有意に低値であった。また、側

脳室拡大の指標である Evans index は HDLS 群 ( $0.313 \pm 0.040$ ) において、VaD 群 ( $0.272 \pm 0.026$ )、non-CNS 群 ( $0.246 \pm 0.022$ ) に比べて有意に増大していた。

SPECT-3D-SSP では、主として前頭葉、次いで頭頂葉の血流低下が見られた。特に medial view にて帯状回前部、上前頭回、lateral view にて中前頭回、上前頭回の血流低下が共通して見られた。一部の患者では上記に加えて、楔前部、帯状回後部、角回、縁上回などの血流低下が見られた。一方、後頭葉の血流はよく保たれていた。

剖検脳を用いた蛋白解析では、2 名の HDLS 患者および CSFIR 変異を有さない 1 名の DLS 患者において CSFIR 蛋白量は対照と有意な差はなかった。また CSFIR 変異を有さない DLS 患者において p-Src の蛋白量が対照および 2 名の HDLS 患者に比べて明らかに増加していた。これらの結果は現時点では preliminary なものであり、さらに検討中である。

### D. 考察

HDLS では抑うつ、意思発動性の低下、注意力低下、無関心、遂行機能障害などの精神症状、行動異常が主症状となるが、これらはいずれも前頭葉機能障害で説明できる。SPECT-3D-SSP で見られた血流低下部位は前頭前野が主体であり、臨床症状によく対応するものと思われる。

HDLS の鑑別上、画像的には Binswanger 病を含む VaD が最も問題になるが、脳梁の萎縮と T2、FLAIR 高信号は HDLS を示唆する有力な手掛かりになると考えられる。特に脳梁膨大部～左右の側脳室後角周囲へ広がる T2、FLAIR 高信号は早期から目立つ印象がある。脳梁は病理学的にも髄鞘の崩壊、スフェロイドの形成が明ら

## 様式 I

かであり、脳梁の画像変化は本症の一次的な病理変化に基づくものと考えられる。

病理学的には DLS でありながら、*CSF1R* 変異が同定されなかった患者では、Nasu-Hakola 病の原因遺伝子である *TREM2*、*DAPI2* 変異も見られなかった。本例は孤発例であるが、*CSF1R* の新生突然変異例も決して稀ではないことから、本例は HDLS の遺伝的多様性を示唆する症例かも知れない。

### E. 結論

HDLS では脳画像的に病変の主座は前頭葉、特に前頭前野にあることが示唆された。このことは初期から遂行機能障害を主徴とする本症の臨床像とよく相応するものと考えられる。また脳梁萎縮と T2、FLAIR 高信号は本症の一次的な病理変化に伴うものであり、診断の手掛かりになる所見であると思われる。

### F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1) Kinoshita M, Yoshida K, Oyanagi K, Hashimoto T, Ikeda S. Hereditary diffuse leukoencephalopathy with axonal spheroids caused by R782H mutation in *CSF1R*: Case report. *J Neurol Sci* 318: 115-118, 2012.

2) Kondo Y, Kinoshita M, Fukushima K, Yoshida K, Ikeda S. Early involvement of the corpus callosum in a patient with hereditary diffuse leukoencephalopathy with spheroids carrying the *de*

*nov*o K793T mutation of *CSF1R*. *Intern Med* 52: 2013 (in press)

#### 2. 学会発表

1) 近藤恭史, 木下通亨, 吉田邦広, 池田修一. *CSF1R* 遺伝子の *de novo* 変異が見いだされた神経軸索スフェロイドを伴う遺伝性びまん性白質脳症 (HDLS) の 41 歳男性例. 第 202 回日本神経学会関東地方会. 2012.9.1. 東京.

2) 吉田邦広, 木下通亨, 福島和広, 星研一, 小柳清光, 池田修一. 神経軸索スフェロイドを伴う遺伝性びまん性白質脳症 (HDLS) の 3 家系 4 症例の臨床的・脳画像的検討. 日本人類遺伝学会第 57 回大会. 2012. 10. 25, 東京.

3) 木下通亨, 吉田邦広, 小柳清光, 星研一, 池田修一. 神経軸索スフェロイドを伴う遺伝性白質脳症 (HDLS) の 2 家系 3 症例の検討. 第 31 回日本認知症学会学術集会. 2012.10.26. つくば.

### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定含む)

#### 1. 特許取得

なし

#### 2. 実用新案登録

なし

#### 3. その他

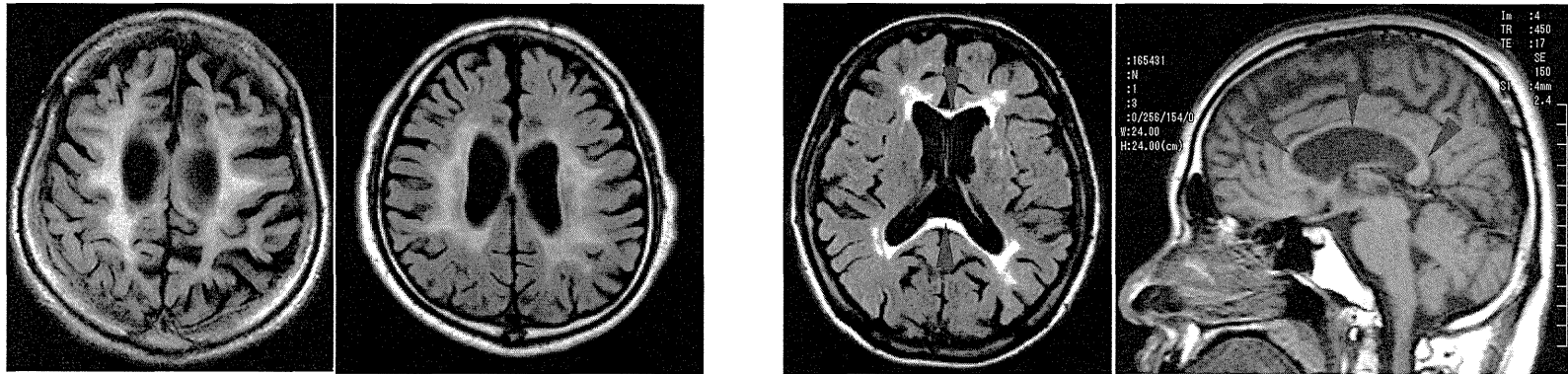
なし

神経軸索スフェロイドを伴う遺伝性白質脳症(HDLS)の診断基準作成にむけた考察  
 ー前頭葉機能障害に対する脳画像所見の意義ー

①若年成人発症の白質脳症・・・行動異常, 精神症状, 運動症状(パーキンソニズム, 錐体路徴候) → 無為・無動, 自発語消失、痙攣



②MRIにおける大脳白質病変

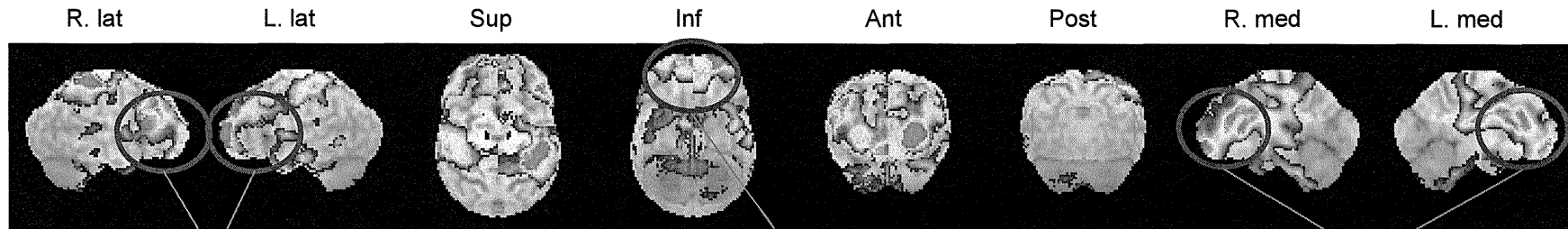


前頭葉, 頭頂葉優位の白質病変と皮質萎縮

脳梁病変(脳梁の信号変化と萎縮)



③SPECTにおける前頭前野・頭頂葉の血流低下



背外側前頭前野  
(遂行機能障害, 語流暢性障害)

腹内側前頭前野  
(脱抑制, 衝動性・攻撃性の亢進, 計画性  
欠如, 性的逸脱, 他人への思慮の欠如)

内側前頭前野  
(抑うつ, 無関心, 自発性低下,  
感情鈍麻)



④CSF1R遺伝子検査