

201324085A

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

課題番号：H24- 難治等（難） - 一般 -047

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 25 年度 総括・分担研究報告書

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

平成26(2014)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 -----	1
小野寺理	
II. 分担研究報告	
CADASIL における q space imaging 法の検討 -----	9
水野敏樹	
HTRA1 遺伝子多型が脳小血管病の発症に与える影響の検討 -----	12
野崎洋明	
L11_L12insS, hetero が認められた Binswanger 病剖検例の検討 -----	15
豊島靖子	
CARASIL 原因遺伝子; <i>Htra1</i> 遺伝子欠損マウスを用いた CARASIL 病態メカニズムの解析 -----	17
小野寺理	
軸索腫大を伴う遺伝性びまん性白質脳症 (HDLS) の拡散強調像の多様性と末梢血単球由来マクロファージを用いた細胞生物学的検討 -----	20
吉田邦広	
スフェロイド形成を伴うびまん性白質脳症 (HDLS) の診断基準案の策定 -----	24
池内 健	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	26
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	28

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：所属機関 新潟大学脳研究所附属生命科学リソース研究センター

氏 名 小野寺理

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 HTRA1 のヘテロ接合体で脳小血管病を起こす症例を見いだした。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。本年度は、患者さんとの情報交換の場を公開講座の形で本疾患にて初めて行った。さらに、非 CADASIL, CARASIL の HSVD 特に spheroid を伴う若年性認知症について遺伝子診断確定例を用いて、本症の疾患概念、診断基準を確立した。さらにその病態機序についても検討を加えた。また HTRA1 モデルマウスを用いた病態機序の研究、および HTRA1 の遺伝子多型が脳小血管病に与える影響について検討を加えた。

研究分担者：

新潟大学医学部保健学科

野崎洋明

新潟大学脳研究所病理学分野

豊島靖子

京都府立医科大学医学研究科神経内科学

水野敏樹

信州大学医学部神経難病学講座

吉田邦広

新潟大学 脳研究所

池内 健

1 研究目的

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。本申請では、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を目的とした。

それと並立し、本研究班において、我々は遺伝性脳小血管病である cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL) および cerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CARASIL) さらに両者に類似する臨床症状を示す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) についても、各々その実態を明らかにすることを目的とした。本報告書では各々について、述べる。

CARASIL については、これまでに HTRA1 遺伝子変異のホモ接合体が CARASIL を引き起こすことを明らかにした。HTRA1 蛋白はセリンプロテアーゼの一種であり、変異によってプロテアーゼ機能を喪失する結果、CARASIL を発症する。我々は、脳小血管病患者における HTRA1 遺伝子変異の頻度を調査する過程で、HTRA1 遺伝子のエクソン 1 に遺伝子多型 c.34_35delCinsTCCT (p.L11_L12insS) を見いだした。これまでに、CADASIL の原因遺伝子 NOTCH3 の遺伝子多型が、高血圧を有する高齢者において脳小血管病の発症危険因子になることが報告されている。そこで、本多型が脳小血管病の危険因子となる可能性を考え、これを検討した。さらに、陽性症例に特

異的に認められる病理組織学的所見を検索した。

CADASIL に関しては、その診断技術の向上を目的として、MRI 拡散強調画像 (DTI) の手法の一つで、細孔材料の内腔に満たされた水の拡散能を測定することで材料の直径を非侵襲的に計測する方法である q-space imaging (QI) の臨床応用を試み、従来法との比較を行った。

認知障害を中核症状とする成人発症の遺伝性白質脳症である HDLS に対しては、その脳画像上の特徴、および他の白質脳症との鑑別点を明らかにすることを目的とし、患者脳、末梢血細胞を用いて細胞内のコロニー刺激因子 1 受容体 (CSF1R) 以下のシグナル伝達異常を検討した。さらに、遺伝子解析により確定診断をされた HDLS 症例について、自験例および既報例をレビューすることにより、HDLS の疾患概念の確立を目指し、診断基準作成草案を作成することを目的とした。

2 研究方法

家族歴を問わずに収集した、大脳深部の白質病変と大脳基底核のラクナ梗塞を有する症例 126 例を脳小血管病群および、Binswanger 病と病理診断のついている症例について、凍結組織から DNA を抽出しとし、頭部 MRI 検査で白質病変が乏しい 60 歳以上の研究協力者 136 例を対照群として、症例対照研究を行った。TaqMan PCR によって、両群間の多型の頻度を明らかにし、カイ二乗検定を用いて有意差を検討した。陽性例について、主に血管の病理組織学的検索を通常の染色、免疫染色で、また超微細構造を電子顕微鏡で観察し

た。

QI は、CADASIL 患者 6 名 (平均年齢 55 歳) と正常者 5 名 (平均年齢 41 歳) を対象とし、Philips 社製 1.5TMRI 装置を用いて QI 用に拡散強調画像を single-shot echo-planar (EPI) 法 [repetition time (TR)/echo time (TE) = 6000/173 ms], 128 x 128 matrix で撮像した。b 値を 10,000 s/mm² までの 10 段階で、3-mm 幅 gap なしで撮像した。QI は 1 スライス当たり 136 画像を 25 分で得た。QI は pixel 毎に mean displacement (MD) を算出し、最小 MD, apparent diffusion coefficient (ADC), fractional anisotropy (FA), radial diffusivity (RD) 像を作成すると共に ROI 解析で定量的評価を行った。

HDLS に関しては、遺伝学的に確定診断された HDLS 患者の脳画像所見 (MRI, SPECT), およびその病理学的背景を検討した。患者剖検脳、および末梢血単球由来の培養マクロファージを用いて、その形態およびシグナル伝達分子、転写因子等に関する検討を行った。遺伝子解析により CSF1R 遺伝子に変異が同定された自験例 7 家系 7 症例、既報例 73 症例 54 家系について発症年齢、経過年数、初発症状、および経過中に認める臨床症状を明らかにした。

(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、また剖検時に遺伝子検査の承諾をうけている。臨床試験も患者の同意書を得施行した。倫理委員会の承認 (H22 年 11 月 24 日付けにて承認) を受け行った。

3 研究結果

HTRA1 遺伝子多型 c.34_35delCinsTCCT の頻度は、脳小血管病患者群 126 例中 13 例 (10.3%), 対照群 136 例中 9 例 (7.1%), であり、両群間に有意差は認めなかった ($p = 0.28$)。Binswanger 病と病理診断のついている症例 2 3 名について、凍結組織から DNA を抽出し L11_L12insS, hetero の有無を検討。陽性例は 3 名であった。該当症例の通常組織学的検索、超微細構造の観察で有意な所見を得なかった。

CADASIL の QI 解析では、ROI 解析では正常者と CADASIL では大脳白質の全部位、特に前頭葉と側頭葉で、有意差を認めた (前頭葉 C 群 0.21/V 群 0.36, 側頭葉 C 群 0.27/V 群 0.38)。一方 ADC と RD での評価では後頭葉の有意差は認めなかった。正常者の MD 像では白質と皮質をより良く弁別が可能であった。CADASIL の QI では白質病変、特に前頭葉白質の MD 上昇を認めたが、皮質白質の U 線維と後頭葉では上昇を認めなかった。

HDLS に関しては、これまでに MRI 上、両側性の白質病変を有する 44 名の患者の CSF1R 検査の依頼を受け、そのうち 10 名で 8 つの CSF1R 変異を見出した。これらの患者のうち MRI 画像が入手できた 6 名の画像を詳細に検討し、既報の通り白質病変は前頭葉、頭頂葉優位であることを確認した。また、信号異常を伴う脳梁萎縮は早期から見られること、側頭極、外包病変は認めないこと、microbleed は認めないこと、を示した。さらに臨床的に一次進行型多発性硬化症 (PPMS) と類似した HDLS 例では、より若年発症で、病変分布

は頭頂葉優位であること、しばしば広範な拡散強調像での高信号病変が見られることを指摘した。脳 SPECT では MRI に対応して、前頭葉、頭頂葉優位の血流低下が必発であったが、神経病理学的にはあくまで病変の主座は白質であり、病変の強い前頭葉、頭頂葉においても皮質の神経細胞脱落や形態変化は目立たなかった。剖検脳を用いたシグナル伝達分子の解析では、症例によるばらつきが大きく、疾患特異的な変化が捉えることは困難であった。そこで HDLS 患者、健常対照者それぞれ 2 例の末梢血から採取した単球 (CD14 陽性の末梢血単核球) を CSF1R のリガンドである CSF-1, IL-34, および CSF-2 の存在下で培養し、細胞形態やシグナル伝達分子の検討を行った。その結果、HDLS 患者由来の単球では、CSF1R リガンド刺激により得られる培養マクロファージの数が極めて少なく形態も異な

っており、CSF1R 遺伝子異常に伴う細胞内シグナル伝達の異常が示唆された。今後、これらの培養マクロファージを用いて、DNA マイクロアレイなどの解析を進める予定である。表 1 に HDLS の診断基準案を提示する。既報例 54 家系中、日本からの報告は 15 家系 (22%) と多い。平均発症年齢は 45 ± 12 歳 (18~78 歳)、死亡時年齢は 54 ± 11 歳、死亡までの罹病期間は 8 ± 6 年。遺伝形式は 77% が常染色体優性遺伝し、23% は孤発例であった。臨床症状としては、認知障害 (97%)、性格変化や行動異常 (97%)、パーキンソン徴候 (67%)、錐体路徴候 (28%)、うつ状態 (51%)、けいれん (41%) であった。CSF-1R 遺伝子変異が陽性である症例を本診断基準案に当てはめると、probable HDLS と診断される感度 90%、特異度 75% となった。

表 1

主要項目

1. 60 歳以下の発症 (大脳白質病変もしくは 2. の臨床症状) 注 1
2. 下記のうち二つ以上の臨床症状注 2
 - a. 進行性認知症、かつ病初期における性格変化・行動異常
 - b. 錐体路徴候
 - c. パーキンソン症状
 - d. けいれん発作
3. 常染色体優性遺伝形式もしくは孤発例注 3
4. MRI/CT で両側性の広範な大脳白質病変と脳梁の菲薄化注 4
5. 白質ジストロフィーを除外できる (ALD, MLD 等)

支持項目

1. 臨床徴候や FAB 検査等で前頭葉障害を示唆する所見を認める
2. 2回以上の stroke-like episodes (脳血管障害様エピソード) は認めない。ただし、けいれん発作は除く
3. 進行が早い。通常、発症後5年以内に臥床状態となる
4. 頭部 CT で大脳白質に点状の石灰化を認める注4

除外項目

1. 10歳未満の発症
2. 高度の末梢神経障害の合併

判定

【definite】主要項目2, 3, 4を見たし, CSF-1R 遺伝子の変異, または HDLS に特徴的な神経病理学的所見を認める注5

【probable】主要項目5項目全てを満たすが, CSF-1R 遺伝子変異の検索, または病理学的検索が行われていない

【possible】主要項目2-a, 3, および4を満たすが, CSF-1R 遺伝子変異の検索, または神経病理学的検索が行われていない

補足事項

注1. 発症年齢に関連して

45±12歳の発症が多い。ただし、遺伝子変異が確認された例では18~78歳と幅が広い。発症前は通常の社会生活が可能なが多い

注2. 臨床症状に関連して

認知症は皮質性が目立つ場合も少なくない。前頭葉機能障害を反映して、意思発動性低下、注意障害、無関心・無頓着、遂行機能障害などの性格変化や行動異常が前景に立つ。パーキンソン症状は発語・思考・動作の緩慢が目立つ。a. はほぼ必発。b. は8割以上、c. および d. は3~5割以上で認められる。

注3. 家族歴に関連して

de novo 変異による孤発例が存在する。また、家系内でも症状が多彩で家族歴を見落としやすい。

注4. 頭部画像に関連して

白質病変は初期には散在性のことがあるが、やがて融合性/びまん性となる。前頭葉・頭頂葉優位で、かつ脳室周囲の深部白質に目立つ。病初期から高度の脳梁非薄化を認める。中期以降

は内包後脚などの投射線維に信号異常を認める。MRI 拡散強調画像で白質病変の一部に高信号を呈する例が存在する。一方、脳小血管病で認められる側頭極病変や穿通枝領域の多発性ラクナ梗塞、多発性の微小出血は認めない。また、thin-slice CT で大脳白質に点状の石灰化を認める（石灰化病変の検出には thin-slice CT が有用である）。

注5. 神経病理所見に関連して

広範な白質変性（髄鞘・軸索の崩壊）、軸索腫大（スフェロイド）、マクロファージの浸潤を特徴とする。

4 考察

HTRA1 遺伝子多型 c.34_35delCinsTCCT の頻度は脳小血管病群とコントロール群で有意差を認めず、本多型は単独では脳小血管病発症の危険因子にならないと考えられた。

CADASIL においては QI 法は従来の MRI 画像評価や拡散能を示す ADC 値や FA 値と異なり、早期の病変ならびに、質的な定量的評価を行える可能性が示唆された。

HDLS は臨床的にも脳画像的にも PPMS との鑑別は難しく、症例によっては PPMS と誤診されている可能性がある。今後は前記した拡散協調画像での所見の意義付けが HDLS の病態を考える一つの手がかりになると思われる。シグナル伝達分子の検討は CSF1R 異常とマクロファージ/ミクログリアの機能異常を結びつけるものであり、その異常は HDLS 病態とも密接に関連することが期待される。

HDLS の臨床的および画像的な特徴的な所見をまとめた。本診断基準を用いることにより、高い診断効率を得ることができた。

6 結論

HTRA1 遺伝子多型 p.L11_L12insS は脳小血管病の発症危険因子にならない。Q-space imaging は従来の拡散強調画像よりも

CADASIL における白質病変を鋭敏に描出が可能である。HDLS は若年性認知症の主要な原因疾患と位置付けられる。画像的に他の白質脳症との鑑別はある程度可能であるものの最終的な確定診断は CSF1R 検査に拠らざるを得ない。HDLS の病態解明、治療法の開発に向けては、細胞（マクロファージ/ミクログリア）レベルでの機能異常へのアプローチが必須である。HDLS に特徴的な臨床所見と画像所見を抽出できた。その知見をもとに、HDLS の診断基準を作成した。

7 研究発表

論文発表

野崎洋明, 西澤正豊, 小野寺理. 遺伝性脳小血管病研究の現況と展望. 日本臨床 2013;71:545-554

水田依久子 水野敏樹. 脳小血管病 分子脳血管病 12: 281-283, 2013.

水野敏樹. CADASIL の診断と治療 Brain & Nerve 65: 811-823, 2013

吉田邦広. 軸索腫大を伴う遺伝性びまん性白質脳症の臨床と分子病態（神経変性疾患 — 研究と診療の進歩—）. 医学のあゆみ 247 (5): 433-438, 2013.

学会発表

今野卓哉, 他田正義, 他田真理, 小山哲秀, 野崎洋明, 高橋均, 西澤正豊, 小野寺理, 柿田明美, 池内健. 神経軸索スフェロイドを伴う白質脳症 HDLS の病態解析 ハプロ不全と CSF1R シグナル障害. 2013年5月31日, 第54回日本神経学会学術大会

野崎洋明, 加藤泰介, 斎藤洋兵, 二本松萌, 小山哲秀, 志賀篤, 西澤正豊, 小野寺理. ドミナントネガティブ効果を示す HTRA1 変異は, ヘテロ接合体でも脳小血管病を引き起こす. 2013年5月31日, 第54回日本神経学会学術大会

関根有美, 加藤泰介, 野崎洋明, 廣川祥子, 佐藤俊哉, 志賀篤, 横山峯介, 西澤正豊, 小野寺理. 周皮細胞被覆率の解析による脳血管障害評価法の検討. 2013年5月29日, 第54回日本神経学会学術大会

CADASIL の Notch3 遺伝子変異型分布と臨床像との関連性について. 水田依久子 水野敏樹 濱野 愛 渡邊明子 中川正法 第54回日本神経学会学術大会, 東京, 2013.5.29

CADASIL における抗血小板剤治療の現状 水野敏樹, 濱野 愛 水田依久子 渡邊明子 近藤正樹 中川正法 第54回日本神経学会学術大会, 東京, 2013.5.29

CADASIL における活性化血小板マーカー 水野敏樹 藤並 潤 安池博美 濱野 愛 水田依久子 渡邊明子 近藤正樹 松野浩之 中川正法 第32回日本認知症学会学術集会 松本, 2013.11.8-10

2) 海外

論文発表

Konno T, Tada M, Koyama A, Nozaki H, Harigaya Y, Nishimiya J, Matsunaga A, Yoshikura N, Ishihara K, Arakawa M, Isami A, Okazaki K, Yokoo H, Itoh K, Yoneda M, Kawamura M, Inuzuka T, Takahashi H, Nishizawa M, Onodera O, Kakita A, Ikeuchi T. Haploinsufficiency of CSF-1R and clinicopathologic characterization in patients with HDLS. *Neurology* 2013 Dec 13[Epub ahead of print]

Matsuo K, Saburi M, Ishikawa H, Tei K, Hosokawa Y, Fujii C, Mizuno T, Nakagawa M. Sjögren syndrome presenting with encephalopathy mimicking Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neurol Sci* 326(1-2): 100-103, 2013.

Yagi T, Konoeda F, Mizuta I, Mizuno T, Suzuki N. Increasing Microbleeds in CADASIL. *Eur Neurol*.69(6):352-353,2013
Tamura A, Kasai T, Akazawa K, Nagakane Y, Yoshida T, Fujiwara Y, Kuriyama N, Yamada K, Mizuno T, Nakagawa M. Long insular artery infarction: characteristics of a previously unrecognized entity *Am J Neuroradiol* (in press)

Yamada T, Itoh K, Matsuo K, Yamamoto Y, Hosokawa Y, Koizumi T, Shiga K, Mizuno T, Nakagawa M, Fushiki. Concomitant alpha-synuclein pathology in an autopsy case of amyotrophic lateral sclerosis presenting with orthostatic hypotension and cardiac arrests. *Neuropathology*

2013; 33 (in press)
 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:
 503-506, 2013.
 Saitoh B, Yamasaki R, Hayashi S,
 Yoshimura S, Tateishi T, Ohyagi Y, Murai
 H, Iwaki T, Yoshida K, Kira JI. A case of
 hereditary diffuse leukoencephalopathy
 with axonal spheroids caused by a de novo
 mutation in CSF1R masquerading as
 primary progressive multiple sclerosis.
 Mult Scler 19: 1367-1370, 2013.

学会発表

Hiroaki Nozaki, Yumi Sekine, Toshio
 Fukutake, Yoshinori Nishimoto, Mamoru
 Shibata, Akiko Shirata, Kiyomi Yamane,
 Yutaka Shimoe, Sohei Yanagawa, Mikio
 Hirayama, Imaharu Nakano, Norihiro
 Suzuki, Masatoyo Nishizawa, Osamu
 Onodera. MRI Features of Cerebral

Autosomal Recessive Arteriopathy with
 Subcortical Infarcts and
 Leukoencephalopathy. The 8th
 International Congress on Vascular
 Dementia. October 19,2013
 Hiroaki Nozaki, Yumi Sekine, Toshio
 Fukutake, Yoshinori Nishimoto, Mamoru
 Shibata, Akiko Shirata, Kiyomi Yamane,
 Yutaka Shimoe, Sohei Yanagawa, Mikio
 Hirayama, Imaharu Nakano, Norihiro
 Suzuki, Masatoyo Nishizawa, Osamu
 Onodera. MRI Features of Cerebral
 Autosomal Recessive Arteriopathy with
 Subcortical Infarcts and
 Leukoencephalopathy. The 65th AAN
 annual meeting. March 21,2013

8 知的所有権の出願・取得状況（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

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）
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班
平成 25 年度（分担）研究報告書
CADASIL における q space imaging 法の検討

研究分担者：水野敏樹¹⁾

研究協力者：渡邊明子，濱野 愛，水田依久子，中川正法，山田 慧

- 1) 京都府立医科大学医学研究科神経内科学
- 2) 京都府立医科大学医学研究科フロンティア医科学
- 3) 京都府立医科大学医学研究科放射線診断学

研究要旨

CADASIL は若年性脳梗塞の発症と共に広範な虚血性白質病変の進展を特徴とする。MRI 拡散強調画像 (DTI) の新たな手法で、細孔材料の非破壊検査に使われる q-space imaging (QI) を用いて CADASIL 患者 6 名で検討した。QI 法では CADASIL 患者の白質病変、特に前頭葉白質の MD 上昇を認めたが、皮質白質の U 線維と後頭葉では上昇を認めなかった。QI 法は従来の拡散強調画像よりも CADASIL における白質病変を鋭敏に描出が可能であることが示唆された。

A. 研究目的

MRI 拡散強調画像 (DTI) の手法の一つで、細孔材料の非破壊検査に使われる q-space imaging (QI) は細孔材料の内腔に満たされた水の拡散能を測定することで材料の直径を非侵襲的に計測する方法である。虚血性大脳白質病変を有する CADASIL 患者で QI の臨床応用を試み、従来法との比較を行った。

B. 研究方法

対象は CADASIL 患者 6 名 (平均年齢 55 歳) と正常者 5 名 (平均年齢 41 歳)。方法は Philips 社製 1.5T MRI 装置を用いて QI 用に拡散強調画像を single-shot echo-planar (EPI) 法 [repetition time (TR)/echo time (TE) = 6000/173 ms], 128 x 128 matrix で撮像した。

b 値を 10,000 s/mm² までの 10 段階で、3-mm 幅 gap なしで撮像した。QI は 1 スライス当たり 136 画像を 25 分で得た。QI は pixel 毎に mean displacement (MD) を算出し、最小 MD, apparent diffusion coefficient (ADC), fractional anisotropy (FA), radial diffusivity (RD) 像を作成すると共に ROI 解析で定量的評価を行った。

(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て遺伝子検査および MRI 検査の研究の説明を行い、同意を得た上で行った。

C. 研究結果

ROI 解析では正常者と CADASIL では大脳白質の全部位、特に前頭葉と側頭葉で、有意差

を認めた (前頭葉 C 群 0.21/V 群 0.36, 側頭葉 C 群 0.27/V 群 0.38)。一方 ADC と RD での評価では後頭葉の有意差は認めなかった。正常者の MD 像では白質と皮質をより良く弁別が可能であった。CADASIL の QI では白質病変, 特に前頭葉白質の MD 上昇を認めたが, 皮質白質の U 線維と後頭葉では上昇を認めなかった。

D. 考察

CADASIL においては MRI 画像で広範な白質病変を認めるが, その病変の質的評価は難しい。新たな QI 法は従来の MRI 画像評価や拡散能を示す ADC 値や FA 値と異なり, 早期の病変ならびに, 質的な定量的評価を行える可能性が示唆された。

E. 結論

Q-space imaging は従来の拡散強調画像よりも CADASIL における白質病変を鋭敏に描出が可能である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Matsuo K, Saburi M, Ishikawa H, Tei K, Hosokawa Y, Fujii C, Mizuno T, Nakagawa M. Sjögren syndrome presenting with encephalopathy mimicking Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neurol Sci* 326(1-2): 100-103, 2013.
2. Yagi T, Konoeda F, Mizuta I, Mizuno T, Suzuki N. Increasing Microbleeds in CADASIL. *Eur Neurol*.69(6):352-353,2013
3. Tamura A, Kasai T, Akazawa K, Nagakane Y, Yoshida T, Fujiwara Y,

Kuriyama N, Yamada K, Mizuno T, Nakagawa M. Long insular artery infarction: characteristics of a previously unrecognized entity *Am J Neuroradiol* (in press)

4. Yamada K, Sakai K, Akazawa K, Sugimoto N, Nakagawa M, Mizuno T. Detection of early neuronal damage in CADASIL patients by q-space MR imaging. *Neuroradiology*. 2013 Feb;55(3):283-90.

5. Yamada T, Itoh K, Matsuo K, Yamamoto Y, Hosokawa Y, Koizumi T, Shiga K, Mizuno T, Nakagawa M, Fushiki. Concomitant alpha-synuclein pathology in an autopsy case of amyotrophic lateral sclerosis presenting with orthostatic hypotension and cardiac arrests. *Neuropathology* 2013; 33 (in press)

6. 水田依久子 水野敏樹. 脳小血管病 分子脳血管病 12: 281-283, 2013.

7. 水野敏樹. CADASIL の診断と治療 *Brain & Nerve* 65: 811-823, 2013

2. 学会発表

1. 高血圧症における疾患関連 HTRA1 遺伝子多型 栗山 長門, 尾崎 悦子, 小野寺理, 猪原 匡史, 水野 敏樹, 中川 正法, 渡邊 能行 第 38 回日本脳卒中学会 東京 2013.3.21-23
2. CADASIL50 例を用いた本邦での診断基準の検討渡辺明子, 濱野 愛, 水田依久子, 小野寺 理, 中川正法, 水野 敏樹 第 38 回日本脳卒中学会 東京 2013.3.21-23

3. 京都府共通の脳卒中地域連携パスの IT 化の取組 (第 3 報) 武澤 信夫, 垣田 清人, 吉岡 亮, 武田 隆司, 並河 茂, 大嶋 孝司, 瀧澤 透 中野 博美, 水野 敏樹, 中川 正法 第 38 回日本脳卒中学会 東京 2013.3.21-23
4. CADASIL における活性化血小板マーカーの検討. 水野敏樹, 安池博美, 濱野 愛, 水田依久子, 森井 芙貴子, 渡邊明子, 藤並 潤, 近藤正樹, 松野浩之, 中川正法. 第 38 回日本脳卒中学会 東京 2013.3.21-23
5. CADASIL の Notch3 遺伝子変異型分布と臨床像との関連性について. 水田依久子 水野敏樹 濱野 愛 渡邊明子 中川正法 第 54 回日本神経学会学術大会、東京、2013.5.29
6. CADASIL における抗血小板剤治療の現状
水野敏樹、濱野 愛 水田依久子 渡邊明子 近藤正樹 中川正法 第 54 回日本神経学会学術大会、東京、2013.5.29
7. CADASIL における活性化血小板マーカー
水野敏樹 藤並 潤 安池博美 濱野 愛 水田依久子 渡邊明子 近藤正樹 松野浩之 中川正法 第 32 回日本認知症学会学術集会 松本、2013.11.8-10
- H.知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
遺伝性脳小血管病およびその類縁疾患の診断基準の確立と治療法の研究班
（分担）研究報告書

HTRA1 遺伝子多型が脳小血管病の発症に与える影響の検討

研究協力者：野崎洋明¹⁾

研究協力者：横関明男²⁾ 水田依久子³⁾ 水野敏樹³⁾ 小野寺理⁴⁾

- 1) 新潟大学医学部保健学科
- 2) 新潟大学大学院超域学術院
- 3) 京都府立医科大学神経内科
- 4) 新潟大学脳研究所

研究要旨

HTRA1 遺伝子変異のホモ接合体は、劣性遺伝性の脳小血管病である cerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy を引き起こす。我々は、脳小血管病患者群において、2種類のアミノ酸変異を伴う HTRA1 遺伝子多型を見いだした (c.34delCinsTCCT (p.L11_L12insS), c.59C>T (p.A20V))。本研究では、これらの多型の病的意義を症例対照研究によって検討し、いずれの多型も脳小血管病の発症危険因子にならない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、HTRA1 遺伝子変異のホモ接合体によって引き起こされる、劣性遺伝性の脳小血管病である。HTRA1 蛋白はセリンプロテアーゼの一種であり、CARASIL では遺伝子変異によってプロテアーゼ機能を喪失する結果、発症する。

我々は、脳小血管病患者における HTRA1 遺伝子変異の頻度を調査する過程で、ORF 内にアミノ酸変異を伴う HTRA1 遺伝子多型を2種類見いだした (c.34delCinsTCCT (p.L11_L12insS), c.59C>T (p.A20V))。これまでに、優性遺伝性の脳小血管病である cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and

leukoencephalopathy の原因遺伝子

NOTCH3 の遺伝子多型が、高血圧を有する高齢者において脳小血管病の発症危険因子になることが報告されている。そこで、本多型が脳小血管病の危険因子となる可能性を考え、これを検討した。

B. 研究方法

家族歴を問わずに収集した、大脳深部の広汎な白質病変と大脳基底核のラクナ梗塞を有する症例 138 例を脳小血管病群とし、頭部 MRI 検査で白質病変が50ml未満である60歳以上の研究協力者 190 例を対照群として、症例対照研究を行った。ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer を用いた direct sequence 解析によって、両群間の多型の頻度を明らかにし、カイ二乗検定を用いて有意差を検討した。(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

c.34delCinsTCCT を有するものは、脳小血管病群では 12 例 (8.7%)、対照群では 18 例 (9.5%) であり、両群間に有意差は認めなかった ($p = 0.809$)。c.34delCinsTCCT をホモ接合体で有するものは、脳小血管病群で 1 例 (0.7%) 認めたが、対照群では認めなかった。

c.59C>T を有するものは 51 例 (9.5%) 脳小血管病群では 51 例 (37.0%)、対照群では 75 例 (39.5%) であり、両群間に有意差は認めなかった ($p = 0.899$)。c.59C>T をホモ接合体で有するものは、脳小血管病群では 10 例 (7.2%)、対照群では 14 例 (7.4%) であり、両群間に有意差は認めなかった ($p = 0.967$)。

c.34delCinsTCCT と c.59C>T を複合ヘテロ接合体で有するものは、脳小血管病群では 2 例 (1.4%)、対照群では 4 例 (2.1%) であり、両群間に有意差は認めなかった ($p = 0.662$)。

D. 考察

脳小血管病群と対照群で、HTRA1 遺伝子多型 c.34delCinsTCCT あるいは c.59C>T の頻度に有意差を認めず、本多型は単独では脳小血管病発症の危険因子にならないと考えられた。また、c.59C>T のホモ接合体と、c.34delCinsTCCT と c.59C>T の複合ヘテロ接合体の頻度についても、両群間で有意差を認めず、脳小血管病発症の危険因子にならな

いと考えられた。

一方で、c.34delCinsTCCT のホモ接合体は、脳小血管病群でのみ認めており (0.72%)、対照群のアレル頻度から予想されるホモ接合体の頻度 0.24% よりも高頻度であることから、Hardy-Weinberg の法則を乱している可能性があった。また、蛋白局在予測ソフトである WoLF-PSORT による解析でも

c.34delCinsTCCT によっておこるアミノ酸変異 p.L11_L12insS の局在は野生型と異なることが推定されており、c.34delCinsTCCT のホモ接合体は病的意義を持つ可能性があると考えた。しかし、本研究で c.34delCinsTCCT のホモ接合体が確認されたのは 1 例のみであるため、同変異のホモ接合体の病的意義を明らかにするためには、さらに多数例での検討が必要である。

E. 結論

HTRA1 遺伝子多型 p.L11_L12insS と p.A20V は脳小血管病の発症危険因子にならない。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

2. 論文発表

1. Konno T, Tada M, Koyama A, Nozaki H, Harigaya Y, Nishimiya J, Matsunaga A, Yoshikura N, Ishihara K, Arakawa M, Isami A, Okazaki K, Yokoo H, Itoh K, Yoneda M, Kawamura M, Inuzuka T, Takahashi H, Nishizawa M, Onodera O, Kakita A,

- Ikeuchi T. Haploinsufficiency of CSF-1R and clinicopathologic characterization in patients with HDLS. Neurology 2013 Dec 13[Epub ahead of print]
2. 野崎洋明, 西澤正豊, 小野寺理. 遺伝性脳小血管病研究の現況と展望. 日本臨床 2013;71:545-554
 3. 関根有美, 野崎洋明, 西澤正豊, 小野寺理. 脳小血管病と遺伝性脳小血管病. 循環器内科 2012;71:140-144.

2. 学会発表

1. Hiroaki Nozaki, Yumi Sekine, Yoshinori Nishimoto, Yutaka Shimoe, Akiko Shirata, Sohei Yanagawa, Mikio Hirayama, Imaharu Nakano, Masatoyo Nishizawa, Osamu Onodera. MRI features of cerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical

infarcts and leukoencephalopathy. 2013, the 8th International Congress on Vascular Dementia.

2. 野崎洋明, 斎藤洋兵, 二本松萌, 小山哲秀, 加藤泰介, 西澤正豊, 小野寺理. Dominant negative 効果をもつ変異型 HTRA1 はヘテロ接合体でも脳小血管病を引き起こす. 2013年, 第54回日本神経学会学術大会

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

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
遺伝性脳小血管病およびその類縁疾患の診断基準の確立と治療法の研究班
（分担）研究報告書

表題 L11_L12insS, hetero が認められた Binswanger 病剖検例の検討

研究分担者：豊島靖子

所属 新潟大学脳研究所 病理学分野

研究要旨

L11_L12insS, hetero が Binswanger 病剖検例に認められるかを検討し、その陽性症例に特異的に認められる病理組織学的所見を検索した。Binswanger 病の中に L11_L12insS, hetero を有する症例は 1 割ほどの頻度で存在したが、一般の病理組織学的検索ではこの変異を持たない症例との違いを明らかにできなかった。

A. 研究目的

Binswanger 病 (BD) は脳血管性認知症としては比較的頻度が高く、その代表的なものの一つとして知られている。この疾患は高血圧との関係が深く、病理学的には脳動脈の高度の硬化（太い動脈から実質内、特に白質内の小・細動脈に至る動脈硬化）を基盤とした広汎な白質病変が特徴的とされている。小・細動脈では中膜の平滑筋細胞が高度に変性し、CARASIL の病理組織学的所見と似た状態を呈する。我々は、当教室で病理組織学的に BD と診断された症例で、先に共同演者らが発表した L11-L12insS, hetero が認められるかを検討し、その陽性例に何らかの病理組織学的特徴が認められるかについて一般の病理組織学的手段を用いて検討した。

B. 研究方法

当教室および関連施設で剖検された症例中、Binswanger 病と病理診断のついている症例 23 名について、凍結脳組織から DNA を抽出し L11_L12insS, hetero の有無を検討。
病理組織学的検索：パラフィン包埋切片をヘマトキシリン-エオジン (HE) 染色、

Klüver-Barrera (KB) 染色、Elastic-Goldner (EL-G) 染色と、一次抗体に抗 smooth muscle actin (SMA)、抗 collagen IV、抗 versican 抗体を用いて免疫染色を行った。

遺伝子検査については、剖検時に遺族の承諾を得ている。

C. 研究結果

L11_L12insS, hetero を有する症例は 23 例中 3 例で、死亡時年齢は 80 歳、90 歳、95 歳といずれも高齢であった。3 名中 2 名にパーキンソン病の合併があった。病理組織学にはいずれの症例も小・細動脈の硬化が高度に認められ、中膜の平滑筋は変性を認めた。年齢をマッチさせた遺伝子変異のない BD と比較して、明らかな組織学的所見のちがいは認められなかった。

D. 考察

剖検で診断が BD とされた症例の 1 割強に L11-L12insS, hetero が認められた。今回一般的な病理組織学的検索で特異な所見は得られなかったが、Guan ら¹⁾はパーキンソン病患者の脳を 50 μ m の厚い切片を切って観察する

ことで、その毛細血管レベルの内皮細胞の異常を報告している。今後このような方法を用いて細小動脈や毛細血管レベルの違いを検索したい。

- 1) Guan J et al. *Brain Pathol* 23 (2013) 154-164

E. 結論

Binswanger 病の中に L11_L12insS, hetero を有する症例は 1 割ほどの頻度で存在した。病理組織学的にはこの変異を持たない症例との違いを明らかにできなかった。

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

3. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
遺伝性脳小血管病およびその類縁疾患の診断基準の確立と治療法の研究班
（分担）研究報告書

CARASIL 原因遺伝子; *Htra1* 遺伝子欠損マウスを用いた
CARASIL 病態メカニズムの解析

研究分担者：小野寺 理¹⁾

研究協力者：加藤 泰介¹⁾ 関根 有美²⁾ 野崎 洋明³⁾ 佐藤 俊哉⁴⁾
廣川 祥子¹⁾ 辻 省次⁵⁾ 遠藤 直人⁶⁾ 横山 峯介⁴⁾ 西澤 正豊²⁾

- 1) 新潟大学脳研究所脳科学リソース研究部門分子神経疾患資源解析学分野
- 2) 新潟大学脳研究所臨床神経科学部門神経内科学分野
- 3) 新潟大学医学部保健学科
- 4) 新潟大学脳研究所生命科学リソース研究センター動物資源開発研究分野
- 5) 東京大学神経内科
- 6) 新潟大学整形外科

研究要旨

High temperature requirement A1 (*Htra1*) は遺伝性脳小血管病の一つである CARASIL の原因遺伝子であり、*Htra1* 遺伝子変異によるプロテアーゼ機能喪失/低下がこの疾患の発症原因であることが推測されている (Hara K et al., N Eng J Med 2009)。CARASIL 患者の脳血管では血管平滑筋細胞の消失をはじめ、弾性板解裂、内膜肥厚化、血管腔拡大などの病理学的所見が存在する。われわれは *Htra1* 機能喪失による脳血管への影響を検討する目的で、*Htra1* ノックアウトマウス (*Htra1*-KO マウス) の脳血管異常を病理学的に進めてきた。また、*HTRA1* 機能喪失下において予想される Transforming growth factor β ($TGF\beta$) シグナル亢進と CARASIL 病態との関連を観察するために $TGF\beta$ トランスジェニックマウス ($TGF\beta$ -Tg) の脳血管病理解析を行った。

これまでに *Htra1*-KO マウスは高齢期において血管平滑筋細胞の血管占有率が有意に低下するという変性所見を得ていた。さらに解析を進めた結果、*Htra1*-KO マウスの血管平滑筋細胞は高齢期において野生型と比較して有意差を持って萎縮・小型化していることが示された。さらに、脳毛細血管の周皮細胞の被覆率も、大脳皮質・線条体・海馬において有意な低下を示していた。また、周皮細胞被覆率が低下を示した毛細血管は、軟膜下血管同様に血管腔の拡大を示していた。

同様の脳血管解析を $TGF\beta 1$ を過剰発現する $TGF\beta$ -Tg でも進めた結果、 $TGF\beta$ の過剰シグナルによって、*Htra1*-KO マウスと同様の血管平滑筋細胞と周皮細胞の変性を認めた。

A. 研究目的

脳小血管病は脳血管を病変の首座とし、血

管平滑筋細胞消失、内膜肥厚、弾性板解裂と
いった変性をきたす。また大脳白質に虚血性

変化に類似した脱髄 (leukoaraiosis)を示す。本症はアルツハイマーと並ぶ、認知症の大きな原因で考えられているが、発症原因は不明である。遺伝性脳小血管病; CARASIL は孤発性の脳小血管病に病態が酷似し、CARASIL の発症メカニズムの解明は、孤発性脳小血管病研究に大きく寄与することが予想される。本研究は、主に CARASIL 原因遺伝子; HtrA1 の KO マウスを研究対象とし、HtrA1 の機能喪失がどのように CARASIL 病態を発症させるのかを明らかにすることが目的である。

B. 研究方法

・脳血管構造解析

20 ヶ月齢〜の高齢マウス固定脳をサンプリングした。血管平滑筋細胞をマーカータンパク質である α smooth muscle actin (α SMA)で染色し、軟膜下血管平滑筋細胞染色画像を得た。取得した画像を画像解析ソフトウェア (bitplan)により解析し、軟膜下血管壁に存在する個々の血管平滑筋細胞の面積を算出した。一個体あたり 2 枚の軟膜下血管画像を解析した。また周皮細胞は、毛細血管内皮細胞を lectin によって、周皮細胞をマーカータンパク質である aminopeptidase-N によって二重染色を施した組織切片から共焦点画像を取得し、imaris を用いて作製した 3D 画像内の lectin 陽性の毛細血管の体積に対する aminopeptidase-N の体積比を求め、周皮細胞 coverage (被覆率)を算出、比較した。毛細血管腔は血管内皮細胞を PECAM-1 によって染色し、レーザー共焦点顕微鏡により取得した画像から、imaris を用いて毛細血管径を算出した。

(倫理面への配慮)

動物の愛護及び管理に関する法律に基づいて行うとともに、新潟大学の動物実験規則およ

び組換え DNA 実験安全管理規則に従い、学長許可を受けて実施した。

C. 研究結果

軟膜下血管壁に存在する個々の血管平滑筋細胞の面積を算出し、HtrA1-KO マウスと野生型マウスとの比較を行った結果、高齢期の HtrA1-KO マウスでは野生型マウスに比して有意に血管平滑筋細胞の面積が萎縮、小型化していた。

また、昨年度に引き続き脳毛細血管の周皮細胞の血管被覆率の解析を進めた結果、HtrA1-KO マウスの脳内毛細血管では周皮細胞被覆率が有意に低下していた。この結果は解析を行った大脳皮質、線条体、海馬いずれの部位でも観察された。

また、同様の脳血管構造解析を TGF β 1-Tg マウスで行った結果、TGF β 1-Tg マウスにおいても血管平滑筋細胞の萎縮、脱落などの変性の所見が観察された。現在、HtrA1-KO マウスと同様の定量的な解析を進めている。また、毛細血管周皮細胞被覆率においても大脳皮質で野生型と比して有意な低下が観察された。海馬、線条体においても解析を進めている。

D. 考察

HtrA1-KO マウスは、血管平滑筋細胞、毛細血管の周皮細胞いずれの細胞においても変性を示した。HtrA1 は、脳内アストロサイトで発現が観察されることから、HtrA1 プロテアーゼの喪失が原因で、アストロサイト由来もしくは他の血管周囲細胞由来の因子のシグナル制御に異常が生じていると考えられる。

さらに、TGF β 1-Tg も高齢期において HtrA1-KO と同様の血管変性所見を示した。HtrA1 による TGF β ファミリーの分解は細胞内で起こるという知見から (Shiga et al.,