

201324085B

---

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 24 年度～ 25 年度 総合研究報告書

---

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. 総合研究報告	
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. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	38
III. 研究成果の刊行物・別刷 -----	40

# 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

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

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

## 1 研究目的

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 (hereditary diffuse leukoencephalopathy with

neuroaxonal spheroids、HDLS) についても、各々その実態を明らかと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。

水野らは、CADASIL において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)、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) を評価した。

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た。本症は、2011 年末に colony stimulating factor 1 receptor 遺伝子 (CSF1R) が原因として同定されて以降、国内外で HDLS の確定診断例が急速に集積されてきた。

吉田らはこれまでに白質異常症 46 名の CSF1R 検査の依頼を受け、うち 10 名で CSF1R のエクソン 12-22 に変異を見出した。CSF1R 検査の適応を考える上で脳画像所見の詳細な評価は不可欠である。本研究班では自験例を中心に HDLS における脳画像所見を総括した。

HDLS 患者における既報の CSF1R 変異は細胞内チロシンキナーゼ部位に集中していることから、本症の白質変性には同部位のチロシンリン酸化阻害による細胞内シグナル伝達異常が深く関与していることが想定される。また、CSF1R は主にマクロファージ・ミクログリアなどの単球系細胞に発現していることから、結果的に上記のシグナル伝達異常はこれらの細胞の機能障害をきたすと推察される。そこで、吉田らは、この点を明らかにすることを目的に剖検脳を用いた神経病理学的、蛋白化学的検討、および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を行った。

池内らは、スフェロイド形成を伴う遺伝性びまん性白質脳症 (HDLS) は、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。本研究は、遺伝子解析により確定診断された 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、診断基準草案を作成することを目的とした。

Cerebral Autosomal Recessive Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leuko-encephalopathy (CARASIL) に関しては、野崎らが、原因遺伝子である HTRA1 変異の、脳小血管病への寄与を検討する目的で、家族歴を問わず、70 歳未満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、多型データベースにない HTRA1 変異をヘテロ接合体で有する症例を 4 例 (2.9%) 見だし、その分子病態機序を検討した。また豊嶋らはその病理所見を検討した。

小野寺らは、HtrA1 機能喪失時に起こる、脳小血管異常のメカニズムの探索のために、HtrA1 遺伝子を欠損した HtrA1-KO マウスを用いて、孤発性脳小血管病と CARASIL の共通病態である血管平滑筋の脱落、血管内膜の肥厚といった血管変性の分子メカニズムを明らかにすることを目的とする。分子メカニズムを探索する上で、我々は 1)HtrA1 機能の喪失が、生体内で CARASIL 病態を再現することを証明するとともに、2)HtrA1 機能喪失時に想定される脳アストロサイトからの

Transforming growth factor  $\beta$  (TGF  $\beta$ )ファミリーの分泌亢進が与える脳小血管への影響を、アストロサイト特異的に TGF  $\beta$  1 を過剰発現する TGF  $\beta$  1 transgenic (TGF  $\beta$  1 Tg)マウスを用いて検討した。

## 2 研究方法

CADASIL 研究の対象は NOTCH3 変異を認めた CADASIL 症例 8 名中 QI 法の評価は CADASIL 患者 6 名、活性化血小板マーカーの検討は 7 名、経時的な rCBF 測定を 8 名で行った。方法は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  $^{123}\text{I}$ -IMP-SPECT から ARG 法で rCBF (ml/100g/min) 定量から脳血管反応性を算出した。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) 像を作成し、ROI 解析で定量的評価を行った。

変異型 HTRA1 の解析は、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。

病態機序の解析には Htra1 遺伝子欠損マウス (Htra1-KO マウス) を用い、また TGF $\beta$  1 Tg マウスと対照群として同腹の野生型マウスを用いた。Htra1-KO マウスは月齢に沿って、4, 8, 16, 24 ヶ月齢の固定脳をサンプリングした。TGF $\beta$  1 マウスは GFAP プロモーター制御下にアストロサイト特異的に導入遺伝子を発現するマウスを用いた。

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 の有無を検討下、病理組織学的検索は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、Elastica-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。

遺伝子解析により CSF-1R 遺伝子に変異が同定された自験例 10 家系 10 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。

遺伝学的に確定診断された HDLS 患者の脳画像 (MRI、SPECT) を検討した。患者由来組織としては剖検脳、および末梢血単球 (CD14 陽性末梢血単核球) を用いた。剖検脳では western blot 法による CSF1R シグナル伝達分子の検討を行った。末梢血単球は CSF1R のリガンドである CSF-1 および IL-34、また CSF2R のリガンドである CSF-2 の存在下で培養し、細胞の形態、および免疫組織化学法による蛋白発現の検討を行った。

(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。患者剖検脳を用いた解析は個人情報の保護に努め行った。また遺伝子解析は関連指針に従い本学倫理委員会承認を得て行った。

### 3 研究結果

CADASIL 患者では、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。また初回安静時の 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  $73.5(58.-89.7)$  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。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。CADASILのQIでは白質病変、特に前頭葉白質のMD上昇を認めた。

次に変異型HTRA1については、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。

HTRA1 KO マウスの解析では、EV染色による軟膜下血管の構造解析の結果、Htra1-KO マウスの軟膜下血管は加齢依存的に血管壁の薄化、血管腔の拡大を示すことが明らかとなった。CARASILにおいても同様の血管構造所見が示されており、ヒト病態に類似するものであった。

次に、ISHによりHTRA1の発現細胞を解析し、アストロサイトがHTRA1を発

現することを明らかとした。

一方、TGF $\beta$ 1-Tgの脳血管構造解析を進めた結果、TGF $\beta$ 1-Tgにおいても24ヶ月齢においてHtra1-KOマウス同様の血管平滑筋細胞の変性と、周皮細胞被覆率の低下が観察された。

HDLS患者のMR画像では、以下のような共通した特徴が見られた。

1. 白質病変の分布は前頭葉～頭頂葉優位である。
2. 脳梁は早期から萎縮、かつ信号異常が見られる。一方、U fiberは保持される。
3. 白質病変の増強効果は見られない。
4. 側頭極、外包病変は見られない。
5. ラクナ梗塞、微小出血(T2\*像)は見られない。
6. 大脳病変に比べて、小脳、脳幹、脊髄病変は頻度が低い。

一方、拡散強調像(DWI)では、両側性に斑状の高信号病変が見られる患者、点状の高信号病変が散在する患者、明らかな高信号病変が見られない患者などさまざまであった。特に一次進行型多発性硬化症に類似した臨床像を呈する患者ではDWIで広範な高信号病変が見られやすい印象があり、同部位はしばしばADC mapで低信号を呈した。また、CSFIR変異が確認できなかった1例では、オリジナルのスウェーデン家系の患者に見られたのと同様の、側脳室前角近傍から前頭葉皮質下に拡がるhigh signal rimが見られた。

剖検脳を用いた蛋白化学的検討では、個体差が大きく、複数の患者に共通した、特定の分子の増減は明らかにできなかった。HDLS 患者由来の末梢血単球の培養 (CSF-1、あるいは IL-34 の存在下) では、培養日数を経るごとに細胞密度は顕著に減少した。また、spindle type、round type のマクロファージの出現は見られず、小突起を有する非常に小型の細胞のみを得た。これらの細胞は健常対照者の細胞と比較し、CSF1R、マクロファージの表面抗原として知られる CD163、CD203 の免疫染色性が低下していた。

診断基準作成のため既報例 54 家系を検索した。日本からの報告は 15 家系 (22%) と多い。平均発症年齢は  $45 \pm 12$  歳 (18 ~ 78 歳)。死亡時年齢は  $54 \pm 11$  歳。死亡時までの罹患期間は  $8 \pm 6$  年。遺伝形式は 77% が常染色体優性遺伝形式を呈し、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・陽性例を本診断基準案に適応すると、probable HDLS と診断される感度は 90%、特異度は 75% であった。

#### 4 考察

CADASIL では PAC-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。②ACZ 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。③

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。

ヘテロ接合体で発症する変異型 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している。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。

HTRA1 の機能喪失が実際に *in vivo* にて血管平滑筋細胞変性を中心とした CARASIL 脳小血管障害を誘発することが明らかとなった。HTRA1-KO の血管平滑筋細胞変性は、細胞萎縮、血管壁占有面積、成熟収縮型血管平滑筋細胞マーカー



ータンパク質である  $\alpha$ SMA の染色性の低下などの変性を示す一方で、明らかな血管平滑筋細胞数の減少を示さなかった。より、高齢期での観察によって、CARASIL 患者脳のような血管平滑筋細胞の減少所見が表れる可能性があるが、この結果は、HTRA1 機能喪失による血管平滑筋細胞の変性には、血管壁からの脱落の過程の前に、脱分化などの機能的変化が存在することが示唆される。また、現在のところヒト CARASIL では明らかとなっていない脳毛細血管周皮細胞の異常も HTRA1-KO マウスには存在することが明らかとなった。この結果は、脳実質をめぐる毛細血管の血液脳関門の異常や血流動態の異常が CARASIL では存在することを示唆している。

ISH 解析の結果、HTRA1 は脳アストロサイトで発現することが明らかとなった。CARASIL の病態背景には、HTRA1 プロテアーゼの基質である TGF $\beta$  ファミリーのシグナル異常が関与することが示唆されている。HTRA1 による TGF $\beta$  の切断は細胞内で起こっていることが示されており、これらのことから HTRA1 機能喪失下ではアストロサイトからの TGF $\beta$  分泌亢進が誘発されることが示唆される。実際にアストロサイト特異的に TGF $\beta$  1 を過剰発現する TGF $\beta$  1-Tg を解析した結果、HTRA1-KO と類似の血管変性所見が得られ、アストロサイトからの TGF $\beta$  ファミリーの異常分泌亢進は脳小血管変性

を引き起こすことが明らかとなった。TGF $\beta$  ファミリーシグナルは上述の血管平滑筋細胞の収縮型・合成型間の分化・脱分化の制御に関わっていることが明らかとなっており、この点からも CARASIL 血管変性には血管平滑筋細胞の分化状態の異常が関与していることが示唆される。

MR 画像は HDLS と他の白質異常症とを鑑別する上できわめて有用である。前記した特徴 1-6 はいずれも文献的に指摘されており、HDLS にとって普遍的な所見と考えられる。一方、DWI では患者ごとに所見が大きく異なっている。DWI 高信号を呈する病変は、しばしば長期的に高信号が持続する。また ADC map では低～等信号とさまざまである。DWI/ADC map の変化は、軸索、髄鞘の変性・脱落過程に対応して経時的に変化するものと思われ、その所見の意義は、本症の病態を考える上で興味深い。

剖検脳を用いた検討では、患者の年齢、病期（罹病期間）、採取部位などに個体差が大きく、それらを凌駕するほどのきわだった変化は蛋白化学的に捉えられなかった。そこで、より直接的に患者の病態を反映することを期待して、末梢血単球由来マクロファージを用いた検討を行った。HDLS 患者では、健常対照者に比べて CSF1R リガンド (CSF-1、IL-34) 刺激による生存率の低下、形態変化が明らか

であった。このことは HDLS 患者末梢血単球では CSF1R 機能異常によりマクロファージへの分化・成熟、生存に障害を来していることを示唆するものと考えた。

一方、HDLS 患者の脳白質では神経病理学的に軸索腫大とともに色素性マクロファージ (pigmentary glia) の存在が特徴的であり、また Iba1 陽性ミクログリアが増加していることが示されている。これらの病理所見と今回の末梢血単球由来マクロファージの分化・成熟、生存の障害という結果は一見解離するよう思える。今後はさらにこの点を検討していく予定である。

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 $\mu$ m の厚い切片を切つて観察することで、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。

自験例および文献的な報告例をレビューすることにより HDLS の臨床的な特徴を抽出した。本診断基準案を CSF-1R 遺伝子変異陽性例に適応されると、高い診断感度が得られた。

研究成果の学術的・国際的・社会的意義

については、CARASIL は本邦で確立された疾患概念であり、その原因遺伝子は本研究の研究代表者の研究グループが同定しているため、学術的、国際的な新規性がある。また、脳小血管病における遺伝的な危険因子が明らかになれば、予防介入ができる可能性があり、社会的意義が大きい。また CADASIL, HDLS は本邦でも比較的高頻度に見られる病気であることが判明した。本症は若年性認知症を主症状とするため社会的損失も大きい。その病態解明、治療法開発を目指した研究は社会的意義が大きいと考える。世界的にも HDLS の診断基準は未確立であり、本研究班における診断基準の作成に寄与した。

対象疾患は稀少疾患で有り症例の全国的な集積が必須で有る。厚生労働省での班研究は、この面で極めて有効で、効率的であった。

## 6 結論

CADASIL における血小板機能、脳血管反応性 Q-space imaging はそれぞれ病態進展のモニタリングに有用であることが示された。

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。

本研究によって、単一遺伝性疾患である

遺伝性脳小血管病 CARASIL の原因遺伝子である HtrA1 の機能喪失が生体内でヒト病態を惹起することが明らかとなり、同時に有用な動物疾患モデルを、この研究分野に提示することができた。このモデルの血管変性メカニズムの解明は、CARASIL、ひいては孤発性脳小血管病の分子病態メカニズムを明らかにすることに繋がることが期待される。また、TGF $\beta$ 1-Tg で類似の血管変性が起こることが明らかとなったことは、脳小血管病の分子メカニズムには、TGF $\beta$ ファミリーのシグナル異常が強く関与することを示唆している。

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。

HDLS に特徴的な臨床的および画像所見を抽出し、その知見を基に HDLS の診断基準案を作成した。HDLS における MR 画像の特徴を総括した。DWI/ADC map 所見が本症の病態、病理過程をどのように反映するのかが大変興味深い。また、HDLS では末梢血単球由来マクロファージにも明らかな機能異常が存在することが示唆されたが、このことが脳におけるマクロファージ・ミクログリアの異常といかに関連するのか、が今後の課題である。

## 7 研究発表

### 論文発表

1. 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
2. 水田依久子 水野敏樹. 脳小血管病 分子脳血管病 12: 281-283, 2013.
3. 水野敏樹. CADASIL の診断と治療 Brain & Nerve 65: 811-823, 2013
4. 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 ー研究と診療の進歩ー). 医学のあゆみ 247 (5): 433-438, 2013.
5. 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
6. 水野敏樹. CADASIL の診断, 病態, 治療の進歩ー本邦における CADASIL 診断基準の作成ー. 臨床神経 52: 303-313, 2012
7. 水田依久子 水野敏樹. 脳小血管病 分子脳血管病 12: 281-283, 2013.
8. 水野敏樹. CADASIL の診断と治療 Brain & Nerve 65: 811-823, 2013

### 学会発表

1. 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
2. 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
3. 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
4. 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
5. 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
6. 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
7. 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.
8. 渡邊明子, 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
9. 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. CADASIL 37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
10. 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
11. 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
12. 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
13. 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
14. 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
15. 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
16. 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
17. 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
18. 野崎洋明, 二本松萌, 斎藤洋兵,  
志賀篤, 小山哲秀, 加藤泰介, 水  
田依久子, 水野敏樹, 野田智子,  
垣内無一, 伊藤彰一, 西澤正豊,  
小野寺理. 片側アレルにのみ  
HTRA1 ミスセンス変異を有する  
例でも脳小血管病を引き起こす.  
2012 年, 第 53 回日本神経学会学  
術大会
19. 他田正義, 今野卓哉, 他田真理,  
荒川武蔵, 小山哲秀, 野崎洋明,  
針谷康夫, 西宮仁, 松永晶子, 米  
田誠, 吉倉延亮, 犬塚貴, 石原健  
司, 河村満, 高橋均, 小野寺理,  
西澤正豊, 池内 健. 神経軸索スフ  
ェロイドを伴う白質脳症 HDLS の  
臨床・遺伝学的解析. 第 54 回日本  
神経学会 2013.5.31 東京
20. 今野卓哉, 他田正義, 小山哲秀,  
他田真理, 荒川武蔵, 野崎洋明,  
針谷康夫, 西宮仁, 松永晶子, 米  
田誠, 吉倉延亮, 犬塚貴, 石原健  
司, 河村満, 高橋均, 小野寺理,  
西澤正豊, 池内 健. 神経軸索スフ  
ェロイドを伴う白質脳症 HDLS に  
おける CSF-1R シグナル伝達異常  
の解析. 第 54 回日本神経学会  
2013.5.31 東京
21. 他田正義, 今野卓哉, 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 の臨床・画像・遺伝学的解析. 第 32 回日本認知症学会 2013.11.9. 松本
22. 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 CSF-1R シグナル障害. 第 32 回日本認知症学会 2013.11.9. 松本
23. 勇垂衣子, 今野卓哉, 他田正義, 西澤正豊, 小山哲秀, 小野寺理, 池内 健. HDLS 患者関連 colony stimulating factor-1 receptor (CSF-1R)変異体による CSF-1R 介在シグナル伝達障害. 第 36 回分子生物学会 2013.12.3. 神戸
- Takahashi H, Nishizawa M, Onodera O, Kakita A, Ikeuchi T. Haploinsufficiency of *CSF-1R* and Clinicopathological Characterization in patients with HDLS. *Neurology* 82:139-148, 2014
2. Watanabe-Hosomi A, Watanabe Y, Tanaka M, Nakagawa M, Mizuno T. Transendocytosis is impaired in CADASIL-mutant NOTCH3. *Exp Neurol.* 233: p303-311, 2012
3. 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
4. Yagi T, Konoeda F, Mizuta I, Mizuno T, Suzuki N. Increasing Microbleeds in CADASIL. *Eur Neurol.*69(6):352-353,2013
5. 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.
- 2) 海外  
論文発表
1. Konno T, Tada M, 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,

Neuroradiology. 2013  
Feb;55(3):283-90.

Sachiko Hirokawa, Toshiya Sato,  
Yasuko Toyoshima, Minesuke  
Yokoyama, Shoji Tsuji,  
Masatoyo Nishizawa, Osamu  
Onodera. High-temperature  
requirement A serine peptidase 1,  
the causative gene for hereditary  
cerebral small vessel disease is  
expressed only in astrocyte.  
2012, the 50th Society for  
Neuroscience Annual Meeting.

## 2.学会発表

1. 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
2. T Mizuno. Transendocytosis is  
impaired in CADASIL-mutant  
NOTCH3. The Notch Meeting VI,  
Notch and Trafficking, Athene,  
Greece, 30. Sep-3. Oct, 2012
3. 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  
8<sup>th</sup> International Congress on  
Vascular Dementia.
4. Taisuke Kato, Yumi Sekine,  
Atsushi Shiga, Megumi  
Nihonmatsu, Hiroaki Nozaki,

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

## 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 を見だし, 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・動作の緩慢さが目立つ。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菲薄化を認める。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。

## CADASIL における新たな画像診断法, 血小板機能の評価

研究分担者: 水野敏樹<sup>1)</sup>

研究協力者: 渡邊明子<sup>1)</sup>, 濱野愛<sup>1)</sup>, 水田依久子<sup>1)</sup>, 中川正法<sup>2)</sup>, 山田慧<sup>3)</sup>, 松野浩之<sup>4)</sup>

1) 京都府立医科大学医学研究科神経内科学, 2) 同附属北部医療センター, 3) 同放射線診断治療学 4) 同志社女子大学薬学部臨床病態生化学

### 研究要旨

CADASIL は若年性脳梗塞, 広範な虚血性白質病変を特徴とし, 通常の抗血小板療法に対して抵抗性を示す. MRI 拡散強調画像 (DTI) の新たな手法 q-space imaging (QI), 血小板膜表面に発現し活性化血小板マーカーである PAC-1, 顆粒放出反応を反映する CD62P, acetazolamide (ACZ) 負荷前後の局所脳血流量 (r CBF) からの血管反応性を CADASIL 患者で検討した. 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, 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. また PAC-1, CD62P が上昇し, 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 は若年性脳梗塞, 広範な虚血性白質病変を特徴とし, 通常の抗血小板療法に対して抵抗性を示すため, 抗血小板剤治療法の選択が難しい. そこで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), 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) を用いて CADASIL 患者において QI PAC-1, CD62P, 脳血管反応性の有用性を評価した.

#### B. 研究方法

対象は *NOTCH3* 変異を認めた CADASIL 症例 8 名中 QI 法の評価は CADASIL 患

者 6 名, 活性化血小板マーカーの検討は 7 名, 経時的な rCBF 測定を 8 名で行った. 方法は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 r CBF (ml/ 100g/min) 定量から脳血管反応性を算出した. 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) 像を作成し, 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, 血液検査

の説明を行い、文書同意を得た上で行った。

### C. 研究結果

①PAC-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。②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 r CBF は再発群  $44.4(40.4-48.4)$  ml/100g/min、非再発群は  $73.5(58.-89.7)$  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。③ROI 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。CADASIL の QI では白質病変、特に前頭葉白質の MD 上昇を認めた。

### D. 考察

①PAC-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。②ACZ 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。③

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。

### E. 結論

CADASIL における血小板機能、脳血管反応性 Q-space imaging はそれぞれ病態進展のモニタリングに有用であることが示された。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Watanabe-Hosomi A, Watanabe Y, Tanaka M, Nakagawa M, Mizuno T. Transendocytosis is impaired in CADASIL-mutant NOTCH3. *Exp Neurol*. 233: p303-311, 2012
2. 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
3. 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
4. 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
5. Yagi T, Konoeda F, Mizuta I, Mizuno T, Suzuki N. Increasing Microbleeds in CADASIL. *Eur Neurol*.69(6):352-353,2013
6. 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.
7. 水田依久子 水野敏樹. 脳小血管病分子脳血管病 12: 281-283, 2013.
8. 水野敏樹. CADASIL の診断と治療

Brain & Nerve 65: 811-823, 2013

## 2.学会発表

1. 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

2. T Mizuno. Transendocytosis is

impaired in CADASIL-mutant NOTCH3.

The Notch Meeting VI, Notch and

Trafficking, Athene, Greece, 30. Sep-3.

Oct, 2012

3. 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

20012.4.26-28.

4. 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

5. 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

6. 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

7. 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

8. 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

9. 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

10. 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

11. 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

12. 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