

軸索腫大を伴う遺伝性びまん性白質脳症 (HDLS) の脳画像所見と  
患者由来組織を用いた蛋白化学的、細胞生物学的検討

研究分担者：吉田邦広<sup>1)</sup>

研究協力者：福島和広<sup>2)</sup>、松嶋聡<sup>2)</sup>、木下通亨<sup>2)</sup>、近藤恭史<sup>2)</sup>、木下朋実<sup>2)</sup>、長崎園望<sup>2)</sup>、  
星研一<sup>3)</sup>、佐藤俊一<sup>3)</sup>、小柳清光<sup>1)</sup>、池田修一<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>信州大学医学部神経難病学

<sup>2)</sup>信州大学医学部脳神経内科、リウマチ・膠原病内科

<sup>3)</sup>長野赤十字病院神経内科

### 研究要旨

遺伝学的に確定診断した HDLS 患者の脳 MRI 所見をまとめた。前頭葉～頭頂葉優位の分布、脳梁の易罹患性、増強効果を欠く、血管病変を欠く、などの特徴は普遍的であり、他の白質異常症との鑑別上、きわめて有用である。一方、MRI 拡散強調像/ADC map は個体差が大きく、個々の患者における脳内病変の活動性や病理過程の違いを反映するのではないかと思われる。末梢血単球由来マクロファージを用いた検討では、HDLS 患者由来の細胞では健常対照者に比べて、明らかに CSF-1、IL-34 存在下での生存率が低下し、かつ生存細胞でも形態的な異常が見られた。これは HDLS 末梢血単球ではマクロファージの分化・成熟、および生存が障害されていることを示すものと思われる。

#### A. 研究目的

2011 年末に軸索腫大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。当科で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ことが推察される。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。

## B. 研究方法

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 のリカント<sup>®</sup> である CSF-1 および IL-34、また CSF2R のリカント<sup>®</sup> 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) HDLS の遺伝学的検査、剖検脳、および末梢血単球由来マクロファージを用いた検討に関しては、それぞれ学内の倫理委員会の承認を得た。

## C. 研究結果

9 例の 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。

7. 白質病変の分布は前頭葉～頭頂葉優位である。
8. 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。
9. 白質病変の増強効果は見られない。
10. 側頭極、外包病変は見られない。
11. ラクナ梗塞、微小出血 (T2\*像) は見られない。
12. 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、CSF1R 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。5 例の SPECT (3D-SSP) では、MR 画像所見に一致して前頭葉、頭頂葉の血流低下が見られた。特に medial view にて帯状回前部、内側前頭前野、lateral view にて外側前頭前野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。CSF-2 の存在下での HDLS 患者由来単球の培養では、健常者と比べて数は少ないながらも spindle type、round type の培養マクロ

ファージを得た。また CSF1R、CD163、CD203の免疫染色性も明瞭に認められたが、健常者と比較すると全体に低下していた。

#### D. 考察

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に思える。今後はさらにこの点を検討していく予定である。

#### E. 結論

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。

#### F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

#### 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. 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 novo* K793T mutation of *CSF1R*. *Intern Med* 52: 503-506, 2013.
3. 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.
  4. Kimura T, Ishizawa K, Mitsufuji T, Abe T, Nakazato Y, Yoshida K, Sasaki A, Araki N. A clinicopathological and genetic study of sporadic diffuse leukoencephalopathy with spheroids: A report of two cases. *Neuropathol Appl Neurobiol* 39: 837-843, 2013.
  5. Saitoh B, Yoshida K, Hayashi S, Yamasaki R, Sato S, Kamada T, Suzuki SO, Murai H, Iwaki T, Ikeda S, Kira J. Sporadic hereditary diffuse leukoencephalopathy with axonal spheroids showing numerous lesions with restricted diffusivity caused by a novel splice site mutation in the *CSF1R* gene. *Clin Exp Neuroimmunol* 4: 76-81, 2013.
  6. 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.
  7. Kinoshita M, Kondo Y, Yoshida K, Fukushima K, Hoshi K, Ishizawa K, Araki N, Yazawa I, Washimi Y, Saitoh B, Kira J, Ikeda S. Corpus callosum atrophy in hereditary diffuse leukoencephalopathy with neuroaxonal spheroids: an MRI-based study. *Intern Med* 53: 21-27, 2014.
- ## 2.学会発表 (筆頭のみ)
1. 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.
  2. Kunihiro Yoshida. Lessons from genetically-determined patients with HDLS. International Symposium on Hereditary Diffuse Leukoencephalopathy with Axonal Spheroids (HDLS). 2013. 2. 21, Tokyo.
  3. 吉田邦広. 白質病変の病態と HDLS の MRI 画像. シンポジウム 2 「新しい画像技術と病態解析の breakthrough」 第41回日本核磁気共鳴医学会大会. 2013.9.20, 徳島.

4. Kunihiro Yoshida, Ryo Yamasaki.  
Primary microgliopathy mimics  
primary progressive MS. 6<sup>th</sup>  
Pan-Asian Committee for  
Treatment and Research in  
Multiple Sclerosis (PACTRIMS)  
Congress. 2013.11.7, Kyoto.
5. 吉田邦広, 木下朋実, 近藤恭史, 木  
下通亨, 福島和広, 浅川美果, 鈴木  
絵美, 上原弥生, 池田修一, 小柳清  
光. 軸索腫大を伴う遺伝性びまん性  
白質脳症の SPECT 所見とその神経  
病理学的背景. 第 32 回日本認知症学  
会学術集会. 2013.11.8, 松本.

**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

## “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

研究分担者：野崎洋明<sup>1)</sup>

研究協力者：加藤泰介<sup>2)</sup> 横関明男<sup>3)</sup> 水田依久子<sup>4)</sup> 水野敏樹<sup>4)</sup>

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

### 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、脳小血管病患者における HTRA1 遺伝子変異の頻度を調べる目的で、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、*Notch-3*の変異が否定された 138 例を対象として、*HTRA1* の塩基配列解析を行ったところ、4 例 (2.9%) で多型データベースにない *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、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%) 見いだした。これらの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が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 ヵ所の 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、倫理面の問題はない。

## 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

本研究では、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。

#### 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

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

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.

4. 野崎洋明. CARASILの病態機序への考察. *臨床神経学* 2012;52:1360-1362.

##### 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 8<sup>th</sup> International Congress on Vascular Dementia.

2. 野崎洋明, 齋藤洋兵, 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



3. 野崎洋明, 二本松萌, 齋藤洋兵, 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

#### 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

## 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：加藤 泰介<sup>1)</sup>

研究協力者：関根 有美<sup>2)</sup>、野崎 洋明<sup>3)</sup>、佐藤 俊哉<sup>4)</sup>、廣川 祥子<sup>1)</sup>、豊島 靖子<sup>5)</sup>、高橋 均<sup>5)</sup>、西澤 正豊<sup>2)</sup>

- 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) 新潟大学脳研究所病理学分野

### 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 (N Eng J Med 2009)。本研究は、HTRA1 機能喪失により実際に *in vivo* にて CARASIL 病態が再現されうるかを中心に解析を進めてきた。さらに、CARASIL の病態背景にはプロテアーゼである HTRA1 の基質である Transforming growth factor  $\beta$  (TGF  $\beta$ )ファミリーのシグナル亢進が強く関与することが示唆されている。この仮説を検証するために、HTRA1 機能喪失時に想定されるアストロサイトからの TGF  $\beta$  の分泌亢進を模倣する TGF  $\beta$  1 トランスジェニックマウス (TGF  $\beta$  1-Tg)を用いて TGF  $\beta$  シグナル亢進が CARASIL 病態を引き起こすかの検証を進めた。

解析の結果、*HtrA1* ノックアウトマウス (*HtrA1*-KO マウス)は、加齢依存的に血管平滑筋細胞の変性、軟膜下血管腔の拡大、さらに脳毛細血管における周皮細胞の変性を示すことが明らかとなった。また、同様の解析を TGF  $\beta$  1-Tg で進めた結果、*HtrA1*-KO マウスと同様の CARASIL 類似の血管平滑筋細胞、周皮細胞の変性を加齢依存的に示すことが明らかとなった。

以上の解析結果により、*HtrA1* の機能喪失が、実際に生体において CARASIL 病態を再現することが明らかとなり、*HtrA1*-KO マウスが有用な脳小血管病モデルであることが示された。また TGF  $\beta$  1-Tg の結果から、CARASIL 病態には TGF  $\beta$  ファミリーシグナルが関与することが強く示唆され、これらの結果は脳小血管病の分子メカニズムの解明に大きく寄与するものであると考えられる。

#### A. 研究目的

CARASIL は禿頭・変形性脊椎症・脳症を

三大兆候とする遺伝性脳小血管病の一つである。我々のグループは、劣性遺伝性

形式を示す遺伝性脳小血管症 (CARASIL) の原因遺伝子 High temperature requirement A1 (HtrA1) を発見した (Hara K et al., N Eng J Med 2009)。CARASIL の病変は、脳の細小血管を主体とした動脈硬化を示し、一般の高齢者における脳血管の変化に極めて近い。これは CARASIL の病態機序を解明することが、びまん性虚血性病変を示す孤発性脳血管病の治療に有用であることを示唆している。

本研究では、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。

## B. 研究方法

### ・マウス

解析には、HtrA1 遺伝子欠損マウス (HtrA1-KO マウス) と対照群として同腹の野生型マウスを、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。

### ・HtrA1-KO マウス脳病理解析

脳軟膜下血管構造の病理解析を elastica van gieson (EV) 染色を用いておこなった。取得した画像から軟膜下血管の内腔面積を NIH image を用いて算出した。

### ・HtrA1-KO マウス脳血管解析

血管平滑筋細胞をマーカータンパク質である  $\alpha$  smooth muscle actin ( $\alpha$  SMA) で染色し、①血管壁面積に対する血管平滑筋細胞の占有比 ② $\alpha$  SMA 染色強度 ③血管平滑筋細胞数 ④個々の血管平滑筋細胞の面積という 4 点を指標に血管平滑筋細胞変性を半定量的に評価した。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、ペイサイト 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。

・HtrA1 in situ hybridization (ISH) 解析  
脳内 HtrA1 発現細胞の解析は、マウス脳凍結切片を用いて、HtrA1 anti-sense RNA probe による in situ hybridization と免疫染色を組み合わせを行った。各細胞マーカーとして、神経細胞: NeuN, ア

astrocyte: GFAP, microglia: Iba-1, 血管内皮細胞: CD31, 血管平滑筋細胞:  $\alpha$ SMA を用いた。また、同様の解析をヒト剖検脳を用いて、ヒト脳内 Htra1 発現分布についても検討を行った。

#### ・マイクロアレイ解析

マイクロアレイ解析は affymetrix 社の GeneAtlas system を用いて行った。アレイストリップは affymetrix MG-430 PM Array Strip を使用した。マウス脳小血管の精製は、血管内皮細胞の表面抗原である PECAM1 抗体を用いた毛細血管の pull-down 法によって行った。血管精製度は、神経細胞、グリア細胞、血管壁細胞マーカーの定量 RT-PCR によって確認を行った。

(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。

### C. 研究結果

#### 1) 軟膜下血管構造解析

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。

#### 2) 血管平滑筋細胞構造解析

$\alpha$ SMA 染色による血管平滑筋細胞の解析の結果、Htra1-KO マウスは血管構造

と同様に加齢依存的に血管平滑筋細胞の血管壁占有率の低下、血管平滑筋細胞の縮小化などの血管平滑筋細胞の変性を示すことが明らかとなった。一方で、血管壁に存在する血管平滑筋細胞の数に 24 ヶ月齢というもっとも高齢な時点でも減少は見られなかった。

#### 3) 脳毛細血管周皮細胞の解析

血管平滑筋細胞の変性が観察された 24 ヶ月齢の時点で、脳毛細血管の解析を進めた。その結果、毛細血管を取り巻く周皮細胞の被覆率が Htra1-KO マウスでは同齢の野生型マウスと比して有意な低下を示していた。この結果は、解析を行った大脳皮質、線条体、海馬いずれの脳部位でも観察された。また、毛細血管においても軟膜下血管同様に血管内腔の拡大が観察された。

#### ・ISH による HTRA1 発現細胞の解析

ISH と各種脳内細胞マーカーとの 2 重染色の解析の結果、astrocyte が HTRA1 を発現することが明らかとなった。また、軟膜下血管の血管内皮細胞においても HTRA1 の発現が認められた。

さらに、ヒト剖検脳を使用した発現解析でもマウスと同様に astrocyte に Htra1 の発現を見とめた。同様の解析を Htra1 遺伝子ナンセンス変異を保有した CARASIL 剖検脳を用いて行った結果、Htra1 mRNA シグナルの消失を認めた。

#### ・精製脳血管由来 RNA マイクロアレイ解析

Htra1 ノックアウト・野生型マウスの脳より調整した毛細血管由来の mRNA を用いたマイクロアレイ解析の結果、Htra1 ノックアウトマウスの脳血管では

ICAM-1をはじめとするいくつかの炎症性マーカー遺伝子の発現の増加が認められた。

#### ・TGF $\beta$ 1-Tg マウス脳血管構造解析

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。

#### D. 考察

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。

アストロサイトは毛細血管を end-feet を介して密に取り巻いており、毛細血管機能維持に関わっていると考えられている。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。アストロサイトは毛細血管を取り巻く一方で、脳の最外層を end-feet で覆っており、脳周囲の脳脊髄液はアストロサイトと接し循環する。従って、アストロサイトから分泌された TGF $\beta$  は毛細血管に直接的に、そして軟膜下血管には脳脊髄液を介して作用すると考えられる。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。

#### E. 結論

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。

#### **F.健康危険情報**

なし

#### **G.研究発表**

##### **4.論文発表**

なし

##### **2.学会発表**

Taisuke Kato, Yumi Sekine, Atsushi Shiga, Megumi Nihonmatsu, Hiroaki Nozaki, 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.

#### **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**

なし

## 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、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。

#### 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。病理組織学的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<sup>1)</sup>はパーキンソン病患者の脳を 50 $\mu$ 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。

#### 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)

#### 5. 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 (予定を含む)

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他



## 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

研究分担者：池内 健<sup>1)</sup>

研究協力者：今野卓哉<sup>2)</sup> 他田正義<sup>2)</sup> 野崎洋明<sup>3)</sup> 他田真理<sup>4)</sup> 西澤正豊<sup>2)</sup> 小野寺理<sup>5)</sup>

- 1) 所属 新潟大学脳研究所遺伝子機能解析学
- 2) 所属 新潟大学脳研究所神経内科
- 3) 所属 新潟大学医学部保健学科
- 4) 所属 新潟大学脳研究所病理学
- 5) 所属 新潟大学脳研究所分子神経疾患資源解析学

### 研究要旨

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。確定診断を行うには脳組織を用いた病理診断が従来まで必要であったため、HDLS の診断例は少なく、そのため疾患概念は十分には確立されていなかった。2012年にHDLSの原因遺伝子としてCSF-1Rが同定されて以来、遺伝子解析による確定診断が生前に可能になり、HDLSの確定診断例が本邦を中心に増えている。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の診断基準案の策定を行った。CSF-1R遺伝子変異が陽性例を、本診断基準案に適用すると、probable HDLSと診断される感度は90%、特異度は75%となった。本診断基準は成人発症の白質脳症の鑑別診断に有用である可能性がある。

#### A. 研究目的

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する。

#### B. 研究方法

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。

(倫理面への配慮)

当施設における遺伝子解析は、遺伝子倫理委員会の承認を受け行った。

#### C. 研究結果

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。死亡時までの罹患期間は8±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用すると、probable HDLS と診断される感度は 90%、特異度は 75%であった。

#### D. 考察

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用されると、高い診断感度が得られた。

#### E. 結論

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。

#### 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

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, 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. 学会発表

1. 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
2. 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
3. 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
4. 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
5. 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

**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

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 すべて査読有り

1. Kinoshita M, Kondo Y, Yoshida K, Fukushima K, Hoshi K, Ishizawa K, Araki N, Yazawa I, Washimi Y, Saitoh B, Kira J, Ikeda S. Corpus callosum atrophy in hereditary diffuse leukoencephalopathy with neuroaxonal spheroids: an MRI-based study. *Intern Med* 53: 21-27, 2014.
2. 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.
3. Yagi T, Konoeda F, Mizuta I, Mizuno T, Suzuki N. Increasing microbleeds in CADASIL. *Eur Neurol*. 2013;69(6):352-3.
4. 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* August 22, 2013, doi: 10.3174/ajnr.A3704
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. *Neuroradiology*. 2013 Feb;55(3):283-90.
6. 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; 30 JUL 2013 DOI: 10.1111/neup.12057
7. 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* December 13, 2013, doi: 10.1212/WNL.0000000000000046
8. 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.
9. 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*