

## I. II. 総括・分担研究報告

令和元年度厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等政策 研究事業）  
（総括・分担）研究報告書

成人発症白質脳症の実際と有効な医療施策に関する研究班

研究代表者 小野寺理 新潟大学脳研究所脳神経内科

研究分担者 水野敏樹 京都府立医科大学神経内科  
池内健 新潟大学脳研究所遺伝子機能解析学  
富本秀和 三重大学大学院医学系研究科神経内科学

## 研究要旨

成人発症の白質脳症には、禿頭と変形性脊椎症を伴う常染色体劣性白質脳症(CARASIL)、皮質下梗塞と白質脳症を伴う常染色体優性脳動脈症(CADASIL)、神経軸索スフェロイド形成を伴う遺伝性びまん性白質脳症(HDLS)、那須・ハコラ病等が含まれる。成人発症の白質脳症は、近年、遺伝子の単離が進み、疾患の同定が可能となってきた。しかし、その早期診断、生前診断が困難なことも多い。また、遺伝子診断陰性の症例も、まだ数多く存在する。それらの患者さんに対し、十分な医療体制が提供できていない現状がある。本研究申請では、これらの成人発症の白質脳症の早期診断を可能とし、適切な医療提供が行われるようにする事を目的とする。本研究計画では、現在の診断基準の妥当性の評価、さらに、遺伝子診断陰性群の疾患群としての特徴の抽出と診断基準の作成を目標とする。本年度は、新たに優性遺伝性CARASILの確診例を2例見出した。また優性遺伝性CARASILが疑われた症例1例の機能解析を進め、変異蛋白の機能喪失を確認した。他1例の優性遺伝性CARASILの疑い例についても機能解析を継続している。また、非CARASILかつ非CADASILである症例のうち、遺伝性疾患が強く疑われる11症例について、新たにエクソーム解析を追加したが、既存の遺伝子変異は認められなかった。これまでに白質脳症83例のエクソーム解析を実施し、仮性弾性黄色腫症2例、COL4A1の3'非翻訳領域新規変異例1例、伴性劣性副腎白質ジストロフィーを1例、白質消失病を3例同定した。これらのデータを元に神経症状の発症年齢を解析したところ、CADASIL/優性遺伝型CARASIL以外の遺伝性疾患は、55歳を越えての神経症状の発症は認められなかった。この知見から遺伝性白質脳症を疑った場合、発症年齢が55歳を下回る場合には、CADASILと遺伝性CARASIL以外の疾患も念頭に精査をする必要が示唆された。

CADASILについては、日本人CADASIL患者における最も大規模な遺伝型-表現型研究を行い、3つの主要な変異であるp.Arg141Cys、p.Arg182Cys、p.Arg75Proの特徴を明らかにし、今後のCADASILの診断治療に貢献した。CADASILを特徴づける大脳白質病変について、剖検脳を対象とした画像と病理の対比研究を行ってその成因を明らかにした。さらにCADASIL患者登録を行ってわが国のCADASILの疫学的特徴を明らかにした。HDLSについては、成人発症大脳白質変性症106例に原因遺伝子であるCSF1R変異解析を行い、27例(25%)にCSF1R変異を同定した。更にCSF1R変異をホモ接合体で有する姉妹例を同定した。小児で発症、大脳白質病変以外に低身長、骨病変など多彩な臨床徴候を呈した。CSF1R変異陰性例に対してエクソーム解析を行い、GFAP、AARS2遺伝子変異などを少数例に認めたが、既知の白質脳症の原因遺伝子変異を認めない症例が大半を占めた。

## A. 研究目的

成人発症の白質脳症には、禿頭と変形性脊椎症を伴う常染色体劣性白質脳症(CARASIL)、皮質下梗塞と白質脳症を伴う常染色体優性脳動脈症(CADASIL)、神経軸索スフェロイド形成を伴う遺伝性びまん性白質脳症(HDLS)、那須・ハコラ病等が含まれる。本疾患群は、一般に進行性の運動機能障害と認知症を来し、その療養も長期に亘るために、本人及び家族の負担も大きい。その為に、これらの疾患群の現状の把握と共に、そのニーズ、情報提供の必要性がある。

成人発症の白質脳症は、近年、遺伝子の単離が進み、疾患の同定が可能となってきた。しかし、その診断には諸症状がそろうことが必要とされ、早期診断には適切では無い。また臨床症状も多彩で有り、遺伝子診断無しでは生前診断が困難なことも多い。また、遺伝子診断陰性の症例も、まだ数多く存在する。それらの患者さんに対し、十分な医療体制が提供できていない現状がある。本研究申請では、これらの成人発症の白質脳症の早期診断を可能とし、適切な医療提供が行われるようにする事を目的とする。

申請者らは、本疾患の一つ、禿頭と変形性脊椎症を伴う常染色体劣性白質脳症の遺伝子を同定し、その臨床像、病態機序について明らかとしてきた。また、各々の疾患について、診断基準を策定し、その分子遺伝学的機序についても明らかとしてきた。その過程で、今まで劣性遺伝性として捉えられてきた禿頭と変形性脊椎症を伴う常染色体劣性白質脳症が、その原因遺伝子の変異型によって、一部は優性遺伝を示すことを明らかとし本症診断基準を改訂する必要性について明らかとしている。また全国調査によって検索した結果、まだ原因が明らかとなっていない症例も多数存在することが示されている。

今年度は、網羅的解析を用いた遺伝子診断によって同定された遺伝性成人発症白質脳症の臨床的特徴の抽出を行い、これらの群を診断するためのアプローチを提唱した。また日本人 CADASIL における遺伝型-臨床型解析を行い、NOTCH3 変異部位 (EGFr1-6vs7-34) と虚血性脳卒中の発症年齢との関連を解析し、本邦での疾患の特徴を明らかにし、今後の診療ガイドライン作成の基礎データとする。CADASIL で特徴的分布を示す大脳白質病変の成因を解明する。わが国の CADASIL の特性を明らかにすべく疫学調査を行い患者レジストリーを構築して創薬研究の基盤を構築する。加えて、HDLS および近縁疾患の臨床診断アプローチと遺伝子解析アプローチを確立することにより、成人発症大脳白質脳症の診療の質を向上させることを目的とする。

## B. 研究方法

CARASIL と那須・ハコラ病は主任研究者である小野寺が、CADASIL を分担研究者である水野と富本が、HDLS は分担研究者である池内が担当した。各研究者は、当該疾患の遺伝子診断について全国規模で行ってきた実績がある。本年度は、その実績に伴い、早期診断を目標とした、診断基準の作成を行った。すでに遺伝子診断での確定例を多数保有しているため、それらの症例の医療記録を後方視的に検討することにより診断基準を作成した。CADASIL については、遺伝子検査で変異陽性となった発端者の背景因子、神経学的症状、発症年齢、MRI 所見を収集した。各遺伝子型・変異部位による背景および臨床的特徴の違いを解析した。また白質病変の患者剖検脳をマイクロ MRI で調べ、微小血管病変を病理学的に検証した。加えて、CADASIL 家族会の結成の支援や全国疫学調査、REDCap による患者レジストリーを構築した。HDLS については、成人発症白質脳症症例に対して原因遺伝子である CSF1R の解析を実施した。更に CSF1R 陰性の成人発症白質脳症症例に対して全エクソーム解析を実施した。

## (倫理面への配慮)

本研究は各施設の倫理委員会の承認を得て実施された。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、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い文書で同意を得、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。今後全国共同研究推進に当たっては、共同研究機関、対象の拡大について承認を得て行う。遺伝子以外の臨床情報、血液、画像所見などの使用に関しても、十分な倫理的配慮が必要となる。特に、人を対象とする医学研究に関する倫理方針の各指針に則り、本研究を進める。この点に関して上記の遺伝子研究とは別に新潟大学倫理審査委員会に臨床試料の研究的使用の申請を行い、承認を得て行う。遺伝子解析とは別個にこの点に関して文書で同意を得る。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ている。また個人のプライバシーに関しては十分に保護する。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。

## C. 研究結果 及び D. 考察

CARASIL については、218 例の白質脳症患者の臨床情報と DNA を収集し、HTRA1 遺伝子解析を行った。その結果、CARASIL の確定例を 2 例、優性遺伝性 CARASIL の確定例を 8 例見いだした。昨年度、優性遺伝性 CARASIL が疑われた 2 例のうち、1 例は機能解析を終了し、その変異の病原性を確認した。これら合計 12 例について詳細な臨床情報を追加収集した。218 例の白質脳症患者の臨床情報と DNA を収集し、HTRA1 遺伝子解析と NOTCH3 遺伝子解析を行った。その結果、非 CARASIL かつ非 CADASIL である症例は 161 例であった。このうち 55 歳以下で神経症状を認める、または第 2 親等以内の類症が明らかな 83 症例については遺伝性疾患が強く疑われたためにエクソーム解析を追加した。結果、仮性弾性黄色腫症 2 例見出した。更に、1 例に血管基底膜の主要構成成分である COL4A1 の 3'非翻訳領域に新規変異を同定した。同変異の機能解析を追加して、その病原性を確認した。また脳小血管病とは異なる白質ジストロフィーに分類される疾患として、伴性劣性副腎白質ジストロフィーを 1 例、白質消失病を 3 例同定した。これらの知見を元に各疾患の神経症状の発症年齢について解析を行ったところ、CADASIL と優性遺伝型

CARASIL 以外は 55 歳以下で発症していることが明らかとなった。

CADASIL については、原因遺伝子である *NOTCH3* 変異を 68 種類認めた。5 個の新規変異 (p.Cys388Arg、p.Cys435Phe、p.Gly481Cys、p.Cys743Tyr、p.Cys1009Phe) を同定した。主要な変異は p.Arg75Pro (n=14、7.8%)、p.Arg141Cys (n=18、10.0%)、p.Arg182Cys (n=14、7.8%) であった。主要な 3 つの表現型は p.Arg141Cys は典型的、p.Arg75Pro は脳卒中/TIA の発症率が低く、高血圧の頻度が高く軽症/非定型、p.Arg182Cys は、初発症状が脳卒中/TIA 以外多岐にわたるといった特徴があった。変異部位により EGFr 1-6 (120 人、67%) と 7-34 (59 人、33%) に分けて臨床像を比較すると高血圧の頻度は、EGFr 7-34 で有意に高かった (P=0.0002)。Kaplan-Meier 法で計算した初発脳卒中/TIA までの期間は p.Arg75Pro を EGFr 1-6 群から除くと、EGFr 7-34 に対し EGFr 1-6 は有意に若かった (P=0.04)。EGFr7-34 の *NOTCH3* 変異は脳卒中/TIA 発症が高齢で、典型例である EGFr 1-6 と比べて見逃されやすい可能性が示唆された。

CADASIL の微小血管病変はマイクロ MRI で鮮明に描出され、白質病変は皮質微小血管に認める血管周囲腔の拡大、炎症細胞浸潤と密接に相関し、皮質微小血管の病理が白質病変の形成機転に深く関与していることが明らかになった。疫学調査では有病率が 10 万人当り 1.20~3.58 と考えられ、片頭痛や血管因子の関与が諸外国と比べて少ない傾向にあった。患者レジストリーでは 90 名を超える患者の登録に成功している。構築された CADASIL 患者レジストリーはアジアで最大規模であり、今後創薬基盤として期待できる。

HDLS については、成人発症大脳白質変性症 106 例に CSF1R 変異解析を行い、27 例 (25%) が CSF1R 変異陽性を示した。2 例 (姉妹例) は CSF1R 変異 p.T833M をホモ接合体で有しており、小児期 (2 歳と 4 歳) に発症し、HDLS (CSF1R 変異ヘテロ接合体) と比較して、重症であった。頭部 MRI では、大脳白質病変に加え、著明な石灰化を呈していた。CSF1R p.T833M 変異体の機能アッセイを行ったところ、CSF1R の自己リン酸化が減弱してたものの、ALSP 患者で認められる変異体 (p.I794T) よりもリン酸化活性が残存していた。更に、CSF1R 遺伝子変異陰性例に対して全エクソーム解析を行った。大脳白質変性症の既知の遺伝子について検索を行ったところ、GFAP、AARS2 遺伝子に変異を認めた症例が、それぞれ 1 例ずつ同定された。HDLS の臨床的特徴として若年発症 (通常 60 歳以下)、認知機能障害、性格変化・行動異常、錐体路徴候、パーキンソン症状、けいれん発作などが挙げられる。常染色体優性遺伝性を呈するが孤発症例も少なからず存在する。頭部画像では MRI と CT が有用であり、両側性の大脳白質病変、脳梁の菲薄化、点状の微小石灰化が認められる。今

回の解析で、CSF1R 変異ホモ接合体を有する小児姉妹例を同定した。われわれの症例に加え、CSF1R のスプライスサイト変異 (c.1754-1G>C) とナンセンス変異 (p.H643Q)、フレームシフト変異 (P.P658Fs\*24) のホモ接合体例、p.P132L/P.Gln481\* と p.L627del/p.S620delins40 の複合ヘテロ接合体例が報告されている。これらのホモ接合体/複合ヘテロ接合体の症例は、HDLS と比較して重症であり、中には胎児期からの脳形態異常を呈し、脳室周囲の石灰化と水頭症を合併した症例も含まれている。ALSP では認められない骨硬化変化と大理石病様変化を高頻度に呈する。フレームシフト変異例 (c.1754-1G>C) において剖検所見が報告されており、スフェロイド形成を伴う大脳白質変性が認められ、ミクログリアはほぼ消失していた。CSF1R 変異陰性の症例に対して全エクソーム解析を行ったが、既知の大脳白質脳症の原因となる遺伝子としては、GFAP、AARS2 に変異を少数例に認めたのみであった。大部分は、原因となる遺伝子変異が同定されておらず、未知の遺伝子が原因となっている可能性がある。今後、レアバリエーションなどを行い、CSF1R 変異陰性例の新規原因遺伝子の探索を進めていく

那須・ハコラ病に関しては新規患者を同定できなかった。

## E. 結論

CARASIL の確定例を 2 例、優性遺伝性 CARASIL の確定例を 9 例見いだした。また、非 CARASIL かつ非 CADASIL である症例のうち若年発症または第 2 親等以内の類症が明らかな、遺伝性疾患が強く疑われる 83 症例について、エクソーム解析を実施した。エクソーム解析の結果より同定された遺伝性成人発症白質脳症の 7 症例はいずれも 55 歳以下で神経症状を発症していることが確認された。この結果より若年で発症した成人発症白質脳症には CADASIL/優性遺伝型 CARASIL 以外の可能性を考慮して診療を行う必要があることを提唱した。今後は、遺伝子診断陰性例を絞り込み、データベース作成を完了し、遺伝子診断陰性群の臨床的な特徴を明らかにする予定である。

本研究は日本人 CADASIL 患者における最も大規模な遺伝型-表現型研究で、3 つの主要な変異である p.Arg141Cys、p.Arg182Cys、p.Arg75Pro の特徴を明らかにし、今後の CADASIL の診断治療に貢献した。また CADASIL の白質病変の成因に皮質微小血管の病態が関与する。わが国の CADASIL の有病率 10 万人当り 20~3.58 と推定される。HDLS の中核となる臨床病型とその多様性を明らかにした。また、HDLS の遺伝子診断の方法論を確立し、適切な臨床診断アプローチに基づいて大脳白質変性症の遺伝子解析を行う必要があると思われる。

F. 健康危険情報  
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Uemura M, Nozaki H, Koyama A, Sakai N, Ando S, Kanazawa M, Onodera O. HTRA1 Mutations Identified in Symptomatic Carriers Have the Property of Interfering the Trimer-Dependent Activation Cascade. *Front in Neurol.* 2019 June 28. doi: 10.3389/fneur.2019.00693.
  2. Sakai N, Uemura M, Kato T, Nozaki H, Koyama A, Ando S, Kamei H, Kato M and Onodera O. Hemorrhagic cerebral small vessel disease caused by a novel mutation in 3' UTR of collagen type IV alpha 1. *Neurol Genetics.* 2019 Dec 26. doi: 10.1212/NXG.0000000000000383.
  3. 上村昌寛, 小野寺理. 皮質下梗塞と白質脳症を伴う常染色体優性脳動脈症 (CADASIL) [指定難病 124]. 指定難病ペディア 2019. 2019年 148 巻特別号(1), p 111.
  4. Genotype-phenotype Correlations and Effect of Mutation Location in Japanese CADASIL Patients. Mukai M, et al. *J Hum Genet.* 2020 Apr 10. doi: 10.1038/s10038-020-0751-9.
  5. Ishikawa H, Ii Y, Shindo A, Tabei KI, Umino M, Ito AO, Matsuura K, Taniguchi A, Matsuyama H, Niwa A, Ogura T, Yoshimaru K, Satoh M, Maeda M, Tomimoto H. Cortical Microinfarcts Detected by 3-Tesla Magnetic Resonance Imaging: Differentiation Between Cerebral Amyloid Angiopathy and Embolism. *Stroke.* 2020;51(3):1010-1013.
  6. 冨本秀和. 遺伝性脳小血管病.SRL宝函40: 21-27,2019
  7. 松山裕文、冨本秀和. 遺伝性血管性認知症。 *Medical Practice* 36: 603-607, 2019
  8. Senzaki S, Miura S, Ochi M, Kato T, Okada T, Matsumoto S, Shiraoka A, Ochi H, Igase M, Kitazawa R, Zhu B, Ikeuchi T, Ohyagi Y. Sporadic Japanese case of adult-onset leukoencephalopathy with axonal spheroids and pigmented glia caused by a de novo p.Phe849del mutation in *CSF1R*. *Neurology Clinical Neuroscience* 8:96-98, 2020 / doi: [org/10.1111/ncn3.12367](https://doi.org/10.1111/ncn3.12367)
  9. 2) Tamhankar PM, Zhu B, Tamhankar VP, Withbawkar SM, Seabra L, Livingston J, Ikeuchi T, Crow YJ. Biallelic hypomorphic mutations in *CSF1R* associated with fatal childhood neurodegeneration. *Neuropediatrics* (in press)
  10. 3) Funayama M, Sugihara M, Takata T, Mimura M, Ikeuchi T. Remarkable behavioral signs and progressive non-fluent aphasia in a patient with adult-onset leukoencephalopathy with axonal spheroids and pigmented glia (ALSP). *Psychogeriatrics* 19:282-285, 2019 / doi: 10.1111/psyg.12387
  11. 4) Kawazoe T, Abe K, Ikeuchi T, Miura T, Mezaki N, Tsukamoto T, Takahashi Y. A sporadic case of young-onset rapidly progressive dementia with a novel frameshift mutation in exon 3 of the *CSF1R* gene. *Neurology Clinical Neuroscience* 7: 103-104, 2019 / doi: 10.1111/ncn3.12259
  12. 5) 池内 健, 朱 斌. ミクログリアの機能破綻を原因とする一次性ミクログリオパチー. *実験医学* 37:2926-2930, 2019
2. 学会発表
    1. 酒井直子, 上村昌寛, 加藤泰介, 安藤昭一郎, 野崎洋明, 亀井博之, 加藤元博, 小野寺理. Type IV collagen  $\alpha 1$  の 3'UTR の新規変異による脳小血管病. ポスター発表. 第 60 回日本神経学会学術大会. 2019/5/23 大阪.
    2. 上村昌寛, 小野寺理. Htra1 異常により引き起こされる脳小血管病. 招待講演. 第 24 回日本病態プロテアーゼ学会学術集会. 2019/8/2 岐阜.
    3. Uemura M, Nozaki H, Katada N, Kanazawa M, Mizuta I, Mizuno T, Onodera O. Frequencies of hereditary cerebral small vessel disease among patients with adult-onset leukoencephalopathy. Poster presentation. International Stroke Conference 2020. Los Angeles Convention Center. 2019/2/20. Los Angeles.
    4. 未成年者に対する CADASIL 遺伝子検査. 水田依久子, 渡邊明子, 吉田誠克, 水野敏樹 日本人人類遺伝学会第 64 回大会 長崎 2019/11/7
    5. 日本人 CADASIL における NOTCH3 変異と臨床像の多様性 水田依久子, 渡邊明子, 小泉崇, 向井麻央, 松浦潤, 水野敏樹 第 60 回日本神経学会学術大会 2019/5/24 大阪
    6. 目崎直実, 三浦 健, 野崎 洋明, 今野 卓哉, 春日 健作, 小野寺 理, 池内 健. LMNB1 関連常染色体優性遺伝性白質脳症の本邦例と既報例の比較. 第 60 回日本神経学会学術大会. 2019.5.24. 大阪国際会議場 (大阪市)
    7. 2) 目崎直美, 三浦 健, 春日健作, 池内 健. LMNB1 関連常染色体優性遺伝性白質脳症の本邦例と既報例の比較. 認知症学会奨励賞. 第 38 回日本認知症学会 学術集会. 2019.11.7. 京王プラザホテル (東京都)
    8. 3) 朱 斌, Liu Lixin, 三浦 健, 樋口 陽, 原 範和, 月江珠緒, 今野卓哉, 春日健作, 宮下哲典, 池内 健. ALSP 患者において同定された *CSF1R* 変異の機能アッセイ. 第 38 回日本認知症学会 学術集会. 2019.11.8. 京王プラザホテル (東京都)