

令和 4 年 5 月 17 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03572

研究課題名(和文)脳アミロイド血管症の末梢血バイオマーカーと認知症根本治療法の確立を目指した研究

研究課題名(英文)A strategic research to establish blood biomarker for cerebral amyloid angiopathy and disease modifying therapy in dementia.

研究代表者

富本 秀和 (Tomimoto, Hidekazu)

三重大学・医学系研究科・特定教授

研究者番号：80324648

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,000,000円

研究成果の概要(和文)：脳アミロイド血管症はアルツハイマー病に随伴する病態である。アルツハイマー病の原因物質とされるアミロイド(A $\beta$ )は毛細血管を介して脳外へ搬出されるため、脳血管にA $\beta$ が沈着する脳アミロイド血管症の患者は、抗A $\beta$ 抗体を投与して脳内アミロイドの減少を図るアルツハイマー病の疾患修飾療法では、A $\beta$ の脳外クリアランスの効率が低下して副作用を生じやすい。本研究では、脳アミロイド血管症の患者末梢血で補体が高値であることを示しバイオマーカーとなる可能性があることを明らかにした。また、A $\beta$ が沈着した毛細血管で炎症を惹起する補体、アポE4、PTX3が共存し、A $\beta$ の脳外へのクリアランスを障害する機序を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳アミロイド血管症はアルツハイマー病(AD)の8割以上の患者で認められる。脳アミロイド血管症の目立つAD患者は、抗アミロイド抗体による副作用(アミロイド関連画像異常)が生じやすいことが示唆されている。本研究では脳アミロイド血管症の末梢血バイオマーカーをし、高危険確立群の抽出に有効である可能性を示した。さらに、毛細血管へのアポE、補体、PTX3などの炎症関連の沈着が生じることでアミロイドの脳外へのクリアランスが障害される可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Cerebral amyloid angiopathy (CAA) is an accompanying condition of Alzheimer's disease (AD). Amyloid  $\beta$  (A $\beta$ ), a peptide responsible for AD pathogenesis, is transported outside the brain via the intracerebral capillaries, and therefore, accumulation of A $\beta$  in the capillaries may hamper A $\beta$  clearance and cause adverse side effect when anti A $\beta$  antibody increase degraded A $\beta$  in disease modifying therapy. In the present study, the blood samples of CAA patients exhibited an increase of complement protein as compared to the patients of AD without CAA and normal controls. Moreover, in autopsy brains, there coexisted complement, Apo E4, and PTX3 in the A $\beta$ -laden capillaries, which may imply that complement-mediated inflammatory process may disturb A $\beta$  clearance outside the brain.

研究分野：脳神経内科全般、脳卒中、認知症

キーワード：アルツハイマー病 アミロイド血管症 アミロイド グリンパティック 血管周囲腔

## 1. 研究開始当初の背景

AD の患者数はわが国で 500 万人、全世界で 4,500 万人に達し、低・中所得国を中心に今なお増加を続けている。1999 年、Schenk らは AD モデルマウスに A を投与して A に対する能動免疫を誘導し、脳内 A の除去に成功した (Schenk D et al, Nature, 400: 173-177, 1999)。これを受けてアミロイド能動ワクチン AN-1792 による治験が実施された。しかし、治験期間中から副作用の報告が相次ぎ、6% の患者で自己免疫性脳炎が発症したため、2002 年に開発が中止されている。これらの患者の剖検脳では、老人斑が消失した一方で微小血管に A が沈着し炎症細胞が浸潤することが報告された (Sevigny J et al, Nature, 537:50-6, 2016)。この事実は、老人斑の A 凝集体がアミロイドワクチンの作用によって分解され、血管周囲に移行したこと意味しており、脳内血管炎症を制御することで臨床的改善が得られる可能性が示唆されている。A クリアランスの障害は A の血管系への最初の流入部位となる毛細血管基底膜で生じており、その影響は CAA 患者で特に大きいことが予測される。

CAA の診断は、従来は臨床的に皮質下出血を起こすまでは困難であったが、脳葉に限局する微小出血 (microbleeds; MB)、皮質型脳表ヘモジデロシス (cortical superficial siderosis; cSS)、皮質微小梗塞 (cortical microinfarct; CMI) などの放射線学的所見が CAA の指標となることが報告されるようになった。CMI は従来は画像化困難と考えられてきたが、申請者らが開発した MRI 画像診断技術 (3D-DIR 法) によって安定的に検出可能となっている。以上の状況を背景に、脳アミロイド血管症に関する論文報告は 2000 年を境に指数関数的に増加している。したがって、CAA 患者を神経画像を診断マーカーとして臨床的に診断し、その末梢血を分析することで CAA の末梢血バイオマーカーを確立することの可能性が現実的となってきている。

## 2. 研究の目的

AD の末梢血バイオマーカーは全世界で研究されているが、CAA のバイオマーカーを確立して CAA を早期診断、治療する試みは皆無である。本研究の核心は、第 1 に CAA の末梢血バイオマーカーによる簡易診断法を確立することである。CAA の臨床診断は、従来は皮質下出血を指標とする Boston 診断基準に準拠してきたため、早期の CAA 患者を診断することが困難であった。しかし、申請者らは高磁場 MRI を用いて、皮質微小梗塞を画像化する技術 (3D-DIR 法; Ii Y et al. J Neuroimaging, 23: 28-32, 2013; Niwa A et al, J Alzheimers Dis, 59: 951-959, 2017; Ueda Y et al. J Alzheimers Dis, 53: 315-325, 2016) に世界で初めて成功し、CAA の効率的な画像診断技術を確立した。AD の早期診断のための有力な末梢血バイオマーカーはほぼ確立されてきているが (Nakamura A et al, Nature 554:249-254, 2018)、CAA の末梢血診断バイオマーカーについては未だ存在しない。

第 2 の目的として、CAA に随伴する炎症病態を解明し、その制御によって A クリアランス機構を恒常的に維持して CAA を治療する方法を確立することである。CAA モデルマウスに慢性脳低灌流負荷をかけると皮質微小梗塞が出現して、認知機能が増悪する (Okamoto Y et al, Acta Neuropathol, 123: 381-394, 2012)。さらに、CAA 患者の毛細血管では A が沈着する病態 (capillary CAA) が存在し、このような capillary CAA 症例では炎症に関与する C1q, C3d が発現する。A の脳外へのクリアランス経路の最初の入り口になる毛細血管に炎症を生じる事実

は、A 抗体医薬によるアルツハイマー病の疾患修飾療法においても重要な治療戦略目標となることが想定されている。

### 3 . 研究の方法

臨床病理学的に診断された CAA 22 例、対照 8 例で炎症関連分子の発現を比較した。炎症関連分子の候補として、補体 C1q, C3d、補体受容体 (CR3)、C5b-9 複合体 (membrane attack complex; MAC) 拮抗作用のあるクラスタリン、マクロファージスカベンジャー受容体 (MSR) を検討した。A の凝集性を規定する ApoE、A のクリアランスに関与するアクアポリン 4 についても検索を行った。

末梢血バイオマーカーの探索は以下の方法に拠った。三重大学病院とその関連病院で MBs、cSS、CMI の 3 所見を高感度に検出するための頭部 MRI 三重大プロトコルを確立し、もの忘れ外来受診者 450 名について頭部 MRI の撮像を行った。上記 3 所見のうち 2 所見以上を有する 24 症例を CAA 疑診例として登録し CAA 群とした。上記 3 所見いずれも認めない AD 群 (20 例) 上記 3 所見陰性で認知機能正常の対照群 (20 例) の 3 群について、末梢血でプロテオーム解析を行った。タンパク質は蛍光色素 (Cy dye) でラベルし、蛍光標識二次元ディファレンスゲル電気泳動解析システム (2D-DIGE) により、網羅的にタンパク質スポットの発現量の統計解析を行った。タンパク質の同定は、飛行時間型質量分析装置 (TOF/TOF-MS) とデータベースを用いた。

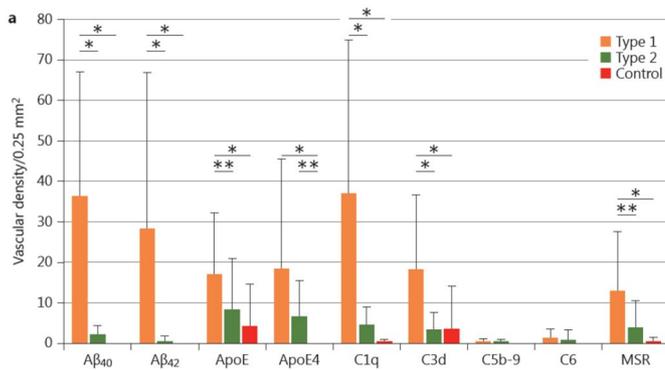
理化学研究所の北爪しのぶ博士と共同開発した CAA モデルマウスの病態を修飾する方法として、慢性脳低灌流負荷を行った。慢性脳低灌流では、補体 C5 の沈着が増加し (Liu Q et al, Plos ONE, 9: e94516, 2014)、A 凝集が亢進して CAA による微小血管病巣が増加する (Okamoto Y & Tomimoto H, Acta Neuropathol, 123:381-394, 2012)。また、水分子の移動に関わるアクアポリンの血管周囲への分布が障害されるため、グリンパティック系の機能が低下して A クリアランスが抑制される (Chen A et al, Brain, 139:242-58, 2016)。血管周囲の浮腫、微小梗塞、出血は経時的に動物用 MRI の FLAIR 画像、T2 強調画像、T2\* 強調画像で検出することで生体内の変化を観察することが可能である。撮像後に脳を灌流固定し、画像で検出された病巣部位に対応する脳切片を作成する。免疫組織化学で補体、補体受容体、MSR などの炎症関連分子の発現を調べ、CAA に随伴する炎症病態とその機序を明らかにする。

### 4 . 研究成果

#### CAA 患者剖検脳における炎症関連タンパク質の発現

CAA 剖検脳における炎症関連分子の発現は、34 剖検脳を検索した。うち、22 例が CAA 症例、12 例はそのほかの神経疾患脳であった。Capillary CAA 症例は 12 例、non-capillary CAA 症例は 10 例であった。図 1 に示すように、C1q、C3d、Apo E 4 の発現は Capillary CAA 剖検脳に特有であり、non-capillary CAA の患者脳では発現を認めなかった。また、補体活性化の最終産物である membrane attack complex (MAC; C5b-9) は cSS を認める症例で有意に多かった。

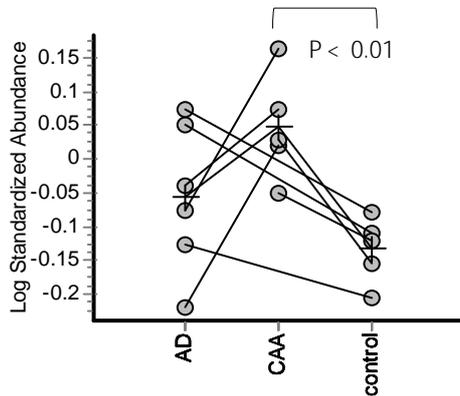
図 1



脳アミロイド血管症のバイオマーカー探索

MRI 画像情報をもとに診断した早期 CAA の 5 名の患者血液を用いたプロテオーム解析では、CAA 患者は AD や対照群に比較して補体 C1q、C3d が有意に増加していた (P>0.01)。

図 2: 脳アミロイド血管症(CAA)のバイオマーカー探索 (末梢血プロテオーム解析)



CAA モデルマウスによる病態解明

EC-APP770+マウスは内皮細胞特異的にヒト APP770 遺伝子を導入されたマウスである。本マウスは血清 A の増加はみとめるものの、老齢マウスとなっても A の脳内沈着は認めていなかった。しかし、本マウスに APP ノックインマウス (AppNL-F/NL-F) を掛け合わせと脳血管特異的に A、補体 (C5a) の沈着、すなわち CAA を認めた。また、EC-APP770+マウスに慢性脳低灌流負荷を加えた場合も同様に脳血管に A の沈着を認めた。

5. 考察

ApoE と結合した A 凝集体が補体を活性化して微小血管炎を生じ、血管中膜内の A のクリアランス (Intramural periarterial drainage; IPAD) を阻害する可能性が示された。臨床的に A に関連する微小血管炎として生体内で抗 A 抗体が自然に産生されて生じる CAA 関連炎症や、抗 A 抗体投与によるアミロイドワクチン療法で生じる自己免疫性脳炎/アミロイド関連画像異常 (Amyloid-related imaging abnormality; ARIA) が知られているが、これらの病態では微小血管炎を抑制することで A 脳外クリアランス機能が保護される可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 6件 / うち国際学会 0件）

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	及川 伸二  (Oikawa Shinji)  (10277006)	三重大学・医学系研究科・准教授   (14101)	
研究分担者	新堂 晃大  (Shindo Akihiro)  (60422820)	三重大学・医学部附属病院・准教授   (14101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関