

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07958

研究課題名(和文) 脳アミロイドアンギオパチー関連炎症動物モデルの作成と病態解析

研究課題名(英文) Pathomechanistic analysis of animal model of cerebral amyloid angiopathy-related inflammation

研究代表者

坂井 健二 (Sakai, Kenji)

金沢大学・附属病院・講師

研究者番号：00572306

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：脳アミロイドアンギオパチー(CAA)関連炎症の脳脊髄液について、15症例の検体を収集し、ELISAを用いた抗A<sub>β</sub>抗体測定系の確立を行った。アルツハイマー病マウスモデルについて、APP(NL-G-F/NL-G-F)では脳血管へのA<sub>β</sub>沈着は軽度であったため、別の動物モデルであるR1.40マウスの繁殖を行った。

CAA関連炎症とCAA症例の脳脊髄液や脳病理標本を解析し、CAA関連炎症の治療後では脳脊髄液中のA<sub>β40</sub>やA<sub>β42</sub>が治療前と比較して低下することを見出した。また、CAA関連炎症の急性期では、血管壁の一部にのみA<sub>β</sub>沈着が見られる血管が増加することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳アミロイドアンギオパチー(CAA)関連炎症はステロイドや免疫抑制薬の投与で改善が見込める病態であるが、疾患特異的な治療法は確立されていない。治療法開発のためには動物モデルの確立とそれを用いた病態の詳細な解明が重要である。現時点ではCAA関連炎症マウスモデルの確立には至っていないが、研究継続に必要なCAA関連炎症症例の脳脊髄液を収集できており、今後も研究を継続する。CAA関連炎症の脳脊髄液や病理標本の解析研究で、脳脊髄液のA<sub>β40</sub>やA<sub>β42</sub>の測定がCAA関連炎症における診断や治療マーカーとなりうることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We obtained cerebrospinal fluid (CSF) samples of 15 patients with cerebral amyloid angiopathy-related inflammation/vasculitis (CAA-ri). We have tried to establish experimental method of examination of anti-amyloid protein (A<sub>β</sub>) antibodies in the CSF samples by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Then, we have bred mouse model of Alzheimer's disease. APP knock-in mice model (APPNL-G-F/NL-G-F) demonstrated insufficient frequency of A<sub>β</sub> deposition on the blood vessels. We have bred another mouse model of Alzheimer's disease (R1.40 mouse) which showed CAA in the brain. Analysis of CSF samples from patients with CAA-ri revealed lower CSF levels of A<sub>β40</sub> and A<sub>β42</sub> in comparison to those in patients with post-treatment CAA-ri. Moreover, brain specimens of the pre-treatment CAA-ri showed higher frequency of partially A<sub>β</sub> deposited blood vessels than those of the post-treatment CAA-ri.

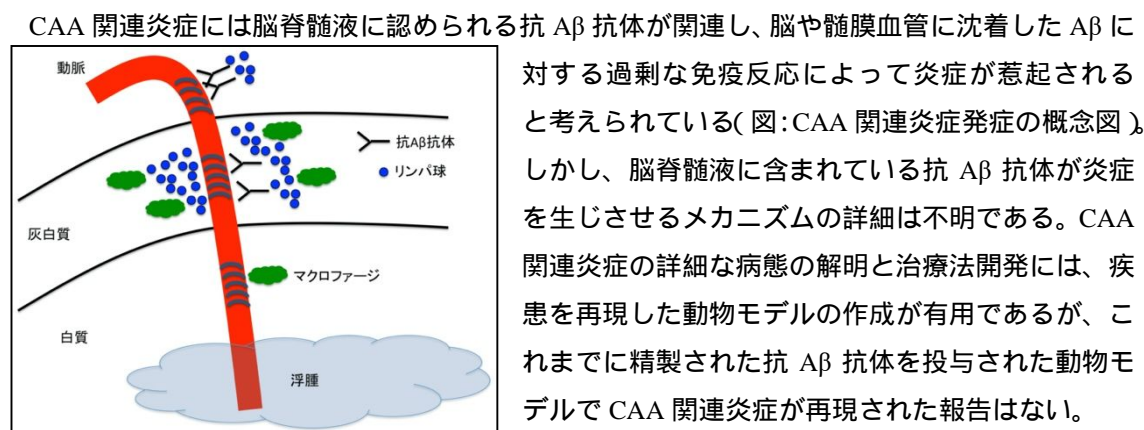
研究分野：脳神経内科学

キーワード：脳神経内科 神経病理 脳血管障害 炎症 アミロイド

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

脳アミロイドアンギオパチー(CAA)は脳や髄膜の血管にアミロイドが沈着して生じる疾患であり、アミロイドβ蛋白(Aβ)の沈着によるCAAは60歳以上の約半数に認められる。CAAでは沈着したAβに対する免疫反応によって炎症・血管炎(CAA関連炎症)を引き起こすことがあるが、その発症機序の詳細は不明で、疾患特異的治療法は開発されていない。



### 2. 研究の目的

本研究ではCAA関連炎症の症例より採取した、抗Aβ抗体を含有しているヒトの脳脊髄液を凍結乾燥して濃縮し、それらをアルツハイマー病モデルマウスの脳内や腹腔内に投与してCAA関連炎症のモデルマウス作成を試みる。作成したモデルマウスを病理学的に解析し、抗Aβ抗体によって生じるCAA関連炎症の病態機序の解明を行うとともに、疾患特異的な治療法開発の端緒とする。CAA関連炎症の動物モデルを確立することで、有効性が期待できる新規薬物の探索が可能となると考えられる。

### 3. 研究の方法

#### (1) CAA関連炎症の脳脊髄液の収集と抗Aβ抗体の測定

本研究ではCAA関連炎症の症例の脳脊髄液を濃縮して使用する。CAA関連炎症はわが国における推定患者数が170人と非常に稀な疾患であり、自施設のみで検体を収集することが困難であるため、全国の多施設に依頼して必要な検体を収集する。

脳脊髄液の抗Aβ抗体の測定について、ELISA法を用いて測定する。

#### (2) CAA関連炎症マウスモデルの作成と病態解析

血管と脳実質にAβ沈着が認められるアルツハイマー病モデルマウスを繁殖し、十分な脳血管へのAβ沈着が認められる月齢で大脳皮質や腹腔内に濃縮したCAA関連炎症症例の脳脊髄液を注入する。脳内および腹腔内へ注入した1週、7週、12週、24週、36週後にマウスの脳を採取し、髄膜血管と脳実質の血管について、CAAの程度や炎症細胞浸潤の有無を免疫染色にて解析する。髄膜を採取して炎症に関連する蛋白質の発現について解析する。

#### (3) ヒトのCAA関連炎症における脳脊髄液バイオマーカーと病理所見との関連についての検討

ヒトのCAA関連炎症の症例の脳脊髄液マーカーや病理標本を検討し、CAA関連炎症におけるAβの排泄機構の解明と診断や治療効果の判定に使用できるバイオマーカーとなり得るかどうかを検討する。

#### 4. 研究成果

- (1) 脳アミロイドアンギオパチー（CAA）関連炎症の症例の脳脊髄液の収集について、以前より保存している検体と併せて、研究期間中に15症例の検体が使用可能となった。脳脊髄液の抗A $\beta$ 抗体の測定について、研究計画の申請時には市販のELISAキットの使用を予定していたが、キットの販売が終了となったため、ELISA法を用いて測定系の確立を試みた。新規のELISA系で抗A $\beta$ 抗体価を測定することが可能であることを確認できたが、測定結果が不安定で、本研究計画の研究期間中に測定系の確立を行うことはできなかった。抗A $\beta$ 抗体測定はCAA関連炎症の臨床診断にも有用であり、今後も測定系の確立についての実験を継続する。
- (2) 本研究で使用するアルツハイマー病モデルマウスについて、当初はAPP23マウスの使用を予定していたが、ヒトのアルツハイマー病のモデルとしてより適切であると考えられているAPPノックインマウスの使用を検討した。APP (NL-G-F/NL-G-F) マウスについて、血管へのA $\beta$ の沈着の程度に関する病理学的な検討を行い、8ヶ月齢マウスにおいて大脳皮質に加え脳血管でのA $\beta$ 沈着を確認した。しかしながら、血管へのA $\beta$ の沈着は比較的軽度であり、金沢大学で繁殖しているR1.40マウスを使用する方針とし、金沢大学動物実験委員会や金沢大学医学倫理委員会での実験計画に関する承認を得た。
- (3) これまで収集して保存している脳脊髄液検体（CAA関連炎症 15例、CAA 15例）やヒトの病理標本（CAA関連炎症の生検例 6例、剖検例 2例）を解析した。CAA関連炎症について、治療後では脳脊髄液中のA $\beta$ 40やA $\beta$ 42が治療前と比較して低下すること、CAA関連炎症の急性期では血管壁の一部にのみA $\beta$ 沈着が見られる血管が増加傾向であることを明らかにした。それらの結果より、CAA関連炎症における血管壁に沈着したA $\beta$ は、主にintramural periarterial drainage (IPAD) 経路や集簇した貪食細胞によって除去されることが示された。すなわち、CAA関連炎症における脳浮腫はIPAD経路の障害による脳間質液の排出障害で生じると考えられること、脳脊髄液のA $\beta$ の低下がCAA関連炎症の治療効果の判定に有用である可能性があることが示された。

当初の研究計画で予定していたCAA関連炎症モデルマウスの作成や病態の解析は研究期間で行うことはできなかったが、今後も継続して研究を行う予定である。一方、CAA関連炎症における脳脊髄液マーカーや病理標本の解析を行い、CAA関連炎症における脳内からのA $\beta$ 排泄のメカニズムを明らかにし、脳脊髄液A $\beta$ の測定が治療効果の判定に有用である可能性を示した。

CAA関連炎症に関する病理学的な解析研究はほとんど行われておらず、脳脊髄液マーカーと組み合わせた研究はオリジナリティの高い研究である。マウスモデルの作成は病態の詳細な解明や治療法開発に有用であり、今後も研究の継続を行う予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sakai K, Noguchi-Shinohara M, Ikeda T, Hamaguchi T, Ono K, Yamada M	4. 巻 143
2. 論文標題 Cerebrospinal fluid cytokines and metalloproteinases in cerebral amyloid angiopathy-related inflammation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Acta Neurol Scand	6. 最初と最後の頁 450-457
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/ane.13382.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 坂井健二、山田正仁	4. 巻 35
2. 論文標題 脳アミロイドアンギオパチー（脳アミロイド血管症）	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BIO Clinica	6. 最初と最後の頁 21-25
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 坂井健二、瀨口毅、山田正仁	4. 巻 39
2. 論文標題 脳アミロイドアンギオパチー	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical Neuroscience	6. 最初と最後の頁 132-134
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 坂井健二、山田正仁	4. 巻 73
2. 論文標題 脳アミロイドアンギオパチー関連炎症・血管炎	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BRAIN NERVE	6. 最初と最後の頁 489-495
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sakai Kenji, Yamada Masahito	4. 巻 12
2. 論文標題 Cerebral amyloid angiopathy related inflammation and dementia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Neuroimmunology	6. 最初と最後の頁 101-106
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cen3.12634	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sakai K, Ueda M, Fukushima W, Tamaoka A, Shoji M, Ando Y, Yamada M	4. 巻 26
2. 論文標題 Nationwide survey on cerebral amyloid angiopathy in Japan	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 European Journal of Neurology	6. 最初と最後の頁 1487 ~ 1493
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ene.14031	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamada Masahito, Hamaguchi Tsuyoshi, Sakai Kenji	4. 巻 168
2. 論文標題 Acquired cerebral amyloid angiopathy: An emerging concept	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Prog Mol Biol Transl Sci	6. 最初と最後の頁 85 ~ 95
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/bs.pmbts.2019.05.012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hamaguchi Tsuyoshi, Komatsu Junji, Sakai Kenji, Noguchi-Shinohara Moeko, Aoki Satoshi, Ikeuchi Takeshi, Yamada Masahito	4. 巻 399
2. 論文標題 Cerebral hemorrhagic stroke associated with cerebral amyloid angiopathy in young adults about 3 decades after neurosurgeries in their infancy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of the Neurological Sciences	6. 最初と最後の頁 3 ~ 5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jns.2019.01.051	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 坂井健二, 篠原もえ子, 池田篤平, 浜口毅, 小野賢二郎, 山田正仁
2. 発表標題 脳アミロイドアンギオパチー関連炎症の脳関髄液における炎症関連マーカーの解析
3. 学会等名 第46回日本脳卒中学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坂井健二、山田正仁
2. 発表標題 脳アミロイドアンギオパチーにおける炎症と認知症
3. 学会等名 第32回日本神経免疫学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 坂井健二、山田正仁
2. 発表標題 脳間質液の排出障害と脳アミロイドアンギオパチー
3. 学会等名 第61回日本神経病理学会総会学術研究会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sakai K, Ueda M, Fukushima W, Tamaoka A, Shoji M, Ando Y, Yamada M
2. 発表標題 CAA-related intracerebral hemorrhage in younger patients: a nationwide study in Japan
3. 学会等名 第60回日本神経学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sakai K, Yamada M
2. 発表標題 Cerebral amyloid angiopathy-related cognitive impairment and inflammation
3. 学会等名 第60回日本神経学会総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂井健二、山田正仁
2. 発表標題 脳アミロイドアンギオパチー関連炎症と頭痛
3. 学会等名 第47回日本頭痛学会総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Yamada M, Sakai K, Hamaguchi T, Noguchi-Shinohara M	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 81-94
3. 書名 Stroke Revised: Pathophysiology of Stroke	

〔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	濱口 毅  (Hamaguchi Tsuyoshi)  (70452109)	金沢大学・医学系・准教授   (13301)	

6. 研究組織（つづき）

	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	山田 正仁  (Yamada Masahito)  (80191336)	金沢大学・医学系・協力研究員    (13301)	

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