

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293326

研究課題名(和文)特発性正常圧水頭症(iNPH)の的確な診断法の確立と病態解明

研究課題名(英文) Establishment of diagnostic method and pathophysiology for idiopathic normal pressure hydrocephalus

研究代表者

新井 一 (Arai, Hajime)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：70167229

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 9,800,000円

研究成果の概要(和文)：特発性正常圧水頭症(iNPH)の的確な診断法と病態を解明するため、モデルマウスを作製し行動実験、電気生理実験から脳機能を解明した基礎研究とiNPHの様々な診断法および治療法に関する臨床研究を進めた。加齢性変化で脳内発現増加したLeucine-rich alpha-2 glycoprotein(LRG)に着目し、中枢神経系にLRGを特異的に過剰発現させたトランスジェニックマウスで脳スライスパッチクランプによるpaired pulse facilitationや長期増強などシナプス可塑性について解析した結果、synaptophysinと結合しシナプスの量的減少を惹起し、記憶形成を障害した。

研究成果の概要(英文)：To investigate the relationship between LRG expression in the brain and memory impairment, we analyzed transgenic mice overexpressing LRG in the brain (Tg) focusing on hippocampus. Immunostaining and western blotting revealed age-related increase of LRG expression in hippocampal neuron. Y-maze and Morris water maze test indicated spatial memory was retained in 24-week-old Tg, while deteriorated in 48-week-old compared to age-matched controls. Field excitatory postsynaptic potential declined in Tg compared to controls in 8, 24, and 48-week-old, obviously with age. Paired-pulse ratio decreased with age in Tg, while increased in controls. As a result, long-term potentiation was retained in 8 and 24-week-old Tg while diminished in 48-week-old comparing with age-matched controls. Electron-microscopic observation revealed decrease of synaptic vesicles and junctions in Tg. Hippocampal LRG overexpression contributes to synaptic dysfunction, which lead to memory impairment with advance of age.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：糖タンパク質 認知機能障害 トランスジェニックマウス パッチクランプ

1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会に突入している我が国においては、高齢者の認知障害、歩行障害、排尿障害を有し、また転倒や寝たきりの原因として特発性正常圧水頭症（以下 iNPH）は重要な研究課題となる。iNPH の診断はガイドラインの刊行などにより著しく進歩を遂げたが、一方で髄液排除試験を行っても診断不可能な一群の症例も存在し、これらの症例を的確に診断するためには髄液バイオマーカーの探索など、新たな手法の開発が望まれる状況である。私たちはこれまで的確な髄液診断を目的に、iNPH 患者の髄液プロテオーム解析を行い、その髄液中に著しく増加する蛋白 leucine-rich alpha-2 glycoprotein (LRG1) を同定した (Li. X et al. *Acta Neurochir*, 2006)。さらに抗 LRG1 抗体を作製し、Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) 法による髄液中 LRG1 蛋白の測定法を確立した (Nakajima et al. *Acta Neurochir*, 2011)。また LRG1 蛋白はヒトおよびラット、マウスにおいて、加齢とともに脳内で増加していることを報告し、LRG1 が加齢関連糖蛋白である可能性を示した (Nakajima et al. *Acta Neurochir*, 2012, Miyajima et al. *PLOS one* 2013)。

LRG1 は、脳内では主にアストロサイトまたその突起が伸展した血管壁において発現が多く認められており、バインディングプロテインとして他の蛋白と接着し、神経活動に影響を与えている事と推察される。さらに、タンパク検出用プロテインアレイ (T. Kodadek, *Chemistry & Biology*, 8, 105, 2001) を用いて LRG1 を特異的に認識して結合するリガンドを検出した。検出された蛋白群の中でも、特にそれぞれ 120 倍、10 倍の親和性を持つ presynaptic cytomatrix protein である piccolo (PCLO)、cortactin (CTTN) に着目すると、PCLO は神経プレシナプス・アクティブゾーンに存在する蛋白であることが知られる。アクティブゾーンはプレシナプスの膜直下に位置する比較的電子密度の高い構造体で、シナプス小胞のドッキングの場所として、機能的にも重要な働きをしていると考えられている。また CTTN は、リン酸化により神経細胞における成長円錐の形成、神経突起の形成に関わるアクチン制御機構に深くかかわっていることが知られている。

先行研究では、加齢関連糖タンパク質である LRG1 を脳内に過剰発現させたトランスジェニック (Tg) マウスモデルを用いて、生後 8 週時の脳を形態学的に観察した。ワイルドタイプ (WT) マウスモデル (Contr.) と LRG-Tg マウスを比較したところ、生後 8 週 齢の時点で外観、体重では有意差がみられなかったが、脳形態は異なり、LRG-Tg マウスで脳は質量ともに有意に小さかった。LRG-Tg マウス大脳皮質には LRG が過剰に発現していることを確認した。

2. 研究の目的

本研究は高齢者認知症疾患に関連する iNPH を的確な診断と病態を解明するため、iNPH の様々な診断法および治療法に関する臨床研究とモデルマウスを用いた基礎研究とのトランスレーショナルリサーチである。診断法として、iNPH 患者から手術前およびシヤント治療介入後、定期的に患者から髄液を採取し、髄液中のバイオマーカーとなる各種蛋白 (アミロイド β 、タウ蛋白、LRG1 など)、また microRNA を測定した。髄液診断を行う目的として第一はアルツハイマー病、パーキンソン関連疾患など、治療予後に作用する併存疾患を同定することであり、第二としては、髄液シヤントの治療介入によって変化する髄液環境を詳細に検討することで、iNPH の病態解明に寄与すると考えるからである。また iNPH に同様な髄液シヤント治療を介入しても併存疾患の有無などにより治療予後が異なるのは何故かを明確にすることは、無駄な外科手術を介入しない医療経済上も重要な責務である。さらに、既述した通り iNPH 患者の髄液中に多く発現が認められた LRG1 がどのような臨床的意義を有するのか基礎実験から iNPH 病態解明に努める。我々は脳内においては生理的機能が不明である LRG1 に関して、過剰発現させるべく遺伝子組換えを行なったトランスジェニックマウスを作製し、LRG1 が脳内でどのような働きをし、マウスの認知機能低下にどのように関与しているのか、認知行動実験と電気生理実験を行い、また病理組織学的に検証する。

3. 研究の方法

臨床研究では、iNPH の診断に有用な髄液排除試験 (タップテスト) により、患者から採取された髄液を用いて、主に ELISA 法による髄液中各種蛋白を測定した。LRG1 以外にも、iNPH 症状の重症度、iNPH に高率に合併するとされるアルツハイマー病病理の評価として (アミロイド β (38, 42)、タウ蛋白 (t-tau, p-tau)、sAPP α およびシャペロンとして A β 排泄に関与する Lipocalin-type prostanoid D/ β -trace (L-PGDS)、シスタチン C) の髄液濃度と髄液シヤント介入の認知機能における長期治療効果 (ミニメンタルスケール (MMSE)) との関連を検証した。

一方基礎研究は、①LRG1 過剰発現トランスジェニック (LRG-Tg) マウスを作製、②同モデルマウスの認知行動異常を経時的に (8 週、24 週、48 週齢) 評価する。また③記憶の低下を電気生理学的な見地から証明するため、(脳スライスの海馬パッチクランプ法による) 神経生理学的な評価を行なった。各行程の詳細を以下に記す。

①トランスジェニックマウスの作製

(i) CAG-loxP-GFP-loxP-LRG1 ベクターの作製と遺伝子導入

本ベクターは CAG プロモーターと LRG1 との間に lox 配列で挟まれた poly (A) シグナルを有する GFP が存在しているため、転写が終了し、LRG1 は発現しないで、GFP が発現しグリーンに光るベクターを作製した。次にこのベクターをマウスに卵に遺伝子導入し、CAG-loxP-GFP-loxP-LRG1 遺伝子導入マウスを作製した。このマウスを hGFAP-Cre マウスと交配し、このマウスを GFAP promoter 下に LRG1 を高発現するマウスを作製した。

②LRG1 過剰発現トランスジェニックマウス脳組織の観察

先行研究の結果より、24 ヶ月齢の高齢マウスの脳組織スライスにおいても、LRG1 は加齢とともに大脳皮質、海馬、基底核、脳幹の神経細胞と小脳プルキンエ細胞の細胞質に広汎に免疫反応の発現が確認されていた。LRG1 を脳内に過剰発現した LRG-Tg マウスを用いて 8 週齢、24 週齢、48 週齢で認知行動検査 (Y 字迷路、モリス水迷路) を用いた空間参照記憶試験を行ない、平均反応率と平均反応潜時を測定し、得られたデータに関して 3 元配列による分散分析と各セッションにおける群間比較を統計学的に検討した。

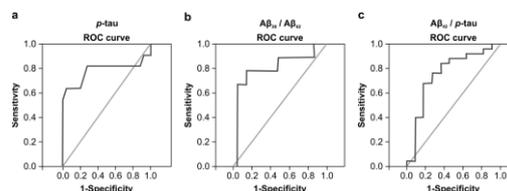
③LRG1 過剰発現トランスジェニックマウス神経生理学的評価

LRG-Tg マウスおよびコントロール群としてを、8 週齢、24 週齢、48 週齢で認知・記憶に重要な海馬における電気生理学的検索をパッチクランプ法による神経発火頻度を測定、解析した。シナプス機能の測定は、海馬 CA3 から CA1 に投射する Schaffer 側枝を電気刺激し、CA1 錐体細胞層でその応答 (興奮性シナプス後場電位; field excitatory postsynaptic potential, fEPSP) を記録して行なった。正常な神経線維を短時間に高頻度刺激すると、その神経終末でのシナプス伝達が増強され、fEPSP が長期間増強された状態が得られる。本現象は長期増強 (long-term potentiation, LTP) と称し、学習・記憶の際に特定の神経回路でシナプス伝達の強化が起こると考えられており、LRG-Tg マウスにおいても同手法にて、電気生理学的な評価を行なった。

4. 研究成果

臨床研究では、probable iNPH と診断した 36 名 (男女比 23:13 名、平均 $73.2 \pm SD6.46$) を対象にし、腰部クモ膜下腔腹腔シャント治療介入後、認知機能の改善を維持した群を予測しうるバイオマーカーを検証した。髄液シャント治療介入後、髄液中の A β 蛋白、p-tau、L-PGDS、シスタチン C 濃度の増加が認められた。MMSE 得点により分類した認知機能予後良好群と予後不良群の 2 群間では、術前 p-tau 値、AB1-38 / AB1-42 比、AB1-42/p-tau 比に統計学的有意差を認め、p-tau 値のカットオフ値 22.0 (pg/mL) で、感度 77.8%、特異度

71.4%、AB1-38 / AB1-42 比はカットオフ値 3.58 で感度 77.8%、特異度 81% で、また AB1-42/p-tau 比はカットオフ値 14.6 で感度 76%、特異度 72.7% で MMSE の改善を予測した。また iNPH の髄液シャント介入後は、術前低値であった L-PGDS、シスタチン C の分泌量が増加しており、脈絡叢などからの髄液産生量増加があつて、A β 排泄機構に影響を与えている可能性が推察された。



本結果は、Journal of Neurological Science, 357(1-2)2015 にて報告した。

また、疾患鑑別がどこまで明確にできるかを検討するため、生物学的マーカーとして脳脊髄液中の蛋白質や神経ペプチド、遺伝子の転写後発現調節に関与するマイクロ RNA (miRNA) を行なった。definit iNPH (n=21)、iNPH+パーキンソン症候群 (PS) 合併例 (n=18)、iNPH+アルツハイマー病 (AD) 合併例 (n=16) の髄液を、網羅的に array を用いてスクリーニングし、鑑別に有効と考えられる miRNA を定量ポリメラーゼ連鎖反応 (Q-PCR) にて定量した。iNPH+PD 関連疾患合併症例の診断定義としては、MIBG 心筋シンチグラフィまたは/かつ、脳ドーパミントランスポーターシンチ (ダットスキャン®) において取り込み低下をみた例、AD 合併例は、NINCDS/ADRDA による AD 臨床診断基準にて診断した。免疫化学的手法では、iNPH で髄液型 transferrin、sAPP α の低下、PD 関連疾患合併で LRG の増加、AD 合併で sAPP α の上昇、A β 1-42 の低下、p-tau の上昇を示し、miRNA 解析では miR-3675、miR-4274、miR-4310 が 3 疾患の鑑別に有用であった。ROC 解析を行うと miR-4274 は PS 合併している iNPH を AUC = 0.913 と高い水準で鑑別し得た。miR-4274、miR-4310 はドーパミン受容体シグナルに関与していた。

本結果は、J Alzheimers Dis 56(1): 317-325. 2017 にて報告した。

基礎研究では、高齢者認知症疾患に LRG の脳内発現が関与することを証明するため、LRG-Tg マウスの学習能の低下を検証した。LRG-Tg マウスの脳スライスによるパッチクランプ法にて長期増強 (LTP) を検証した。海馬 CA3 から CA1 に投射する Schaffer 側枝を電気刺激し、CA1 錐体細胞層でその応答 (fEPSP) を記録すると、刺激電流による fEPSP は、Tg マウス海馬スライスにいて反応が小さい傾向があつた。また fiber volley の大きさ (活動電位を反映し、刺激された軸索の数) を解析すると、Tg マウス海馬スライスで

fEPSP がより小さい傾向が認められた。また Paired-Pulse Ratio も Tg マウス海馬スライスで大きくなり、シナプス前終末の変化が示唆される結果が得られた。

LRG-Tg マウスで paired pulse facilitation, 長期増強 (LTP) のシナプス可塑性について解析した結果, 24 週齢から paired pulse facilitation, LTP は有意に低下を認め, LTP 形成のための刺激閾値が上昇した。認知行動実験において 24 週齢ではシナプス機能の代償が働き, 有意差は生じなかったが, 加齢に伴ない 48 週齢では短期記憶および空間記憶が障害されることを確認した。病理組織学的には, LRG-Tg マウスで synaptophysin の免疫反応が有意な低下を認め, 電子顕微鏡下にシナプス小胞とシナプス接合部の減少を確認した。LRG1 は synaptophysin と結合しシナプスの量的減少を惹起し, 記憶形成を傷害している可能性が推察された。本研究結果は現在, 海外専門誌に投稿中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 27 件)

M Nakajima, M Miyajima, I Ogino, H Sugano, C Akiba, H Miyata, KL Karagiozov, H Arai: Use of external lumbar cerebrospinal fluid drainage and lumboperitoneal shunts with Strata NSC valves in idiopathic normal pressure hydrocephalus: a single-center experience, World Neurosurgery 査読有 2014 83(3): 387-393, doi:10.1016/j.wneu.2014.08.004.

M Nakajima, M Miyajima, I Ogino, C Akiba, H Sugano, K Karagiozov, N Domon, H Arai: Cerebrospinal Fluid Biomarkers for Prognosis of Long-Term Cognitive Treatment Outcomes in Patients with Idiopathic Normal Pressure Hydrocephalus, Journal of Neurological Science, 査読有 2015, 357(1-2): 88-95. doi: 10.1016/j.jns.2015.07.001.

M Moriya, M Miyajima, M Nakajima, I Ogino, H Arai: Impact of cerebrospinal shunting for idiopathic normal pressure hydrocephalus on the amyloid cascade. Plos One 査読有 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0119973.

H Kazui, M Miyajima, E Mori, M Ishikawa, for the SINPHONI-2 Investigators: Lumboperitoneal shunt surgery for idiopathic normal pressure hydrocephalus (SINPHONI-2): an open-label randomised trial. Lancet Neurology, 査読有, 2015

14: 585-594, doi: 10.1016/S1474-4422(15)00046-0.

I Jurjevic, M Miyajima, I Ogino, C Akiba, M Nakajima, A Kondo, K Mika, N Hattori, H Arai: Potential MicroRNA Biomarkers for the Diagnosis of Idiopathic Normal Pressure Hydrocephalus. J Alzheimers Dis 査読有 2017, 56(1):317-325. doi: 10.3233/JAD-160848

[学会発表] (計 41 件)

M Nakajima, M Miyajima, I Ogino, C Akiba, H Arai: Cerebrospinal Fluid Biomarkers for Long-Term Treatment Outcomes Prognosis in Patients with Idiopathic Normal Pressure Hydrocephalus, Hydrocephalus 2014, University Bristol Bristol, UK 2014

M Nakajima, M Miyajima, I Ogino, M Kurosawa, N Kuriyama, W Fukushima, E Mori, T Kato, C Akiba, H Sugano, KL Karagiozov, H Arai: Nation wide epidemiological features & treatment of patients with idiopathic normal pressure hydrocephalus in Japan, Hydrocephalus 2015, Fairmont Banff Springs Hotel, Banff, Alberta, Canada, 2015.10.19-21

中島 円, 宮嶋雅一, 荻野郁子, 秋葉ちひろ, 新井 一: 髄液バイオマーカーより髄液シャント治療後の特発性正常圧水頭症患者が再び症状増悪する機序を探る. 日本認知症学会総会・学術集会, リンクステーション青森・ホテル青森, 青森, 2015.10.2-4

中島 円: 脳内 Leucine-Rich alpha-2 Glycoprotein の蓄積が認知障害を発現させる. 日本老年医学学術集会, 石川県立音楽堂・ANA クラウンプラザホテル・金沢アートホール, 金沢, 2016.6.8-10

中島 円, 宮嶋雅一, 秋葉ちひろ, 荻野郁子, 新井 一: A biochemical CSF analysis in the differential diagnosis of iNPH. 日本認知症学会総会・学術集会, 東京国際フォーラム, 東京, 2016.12.1-3

[図書] (計 8 件)

中島 円: 基本手術手技, 脳室腹腔シャント術, 腰椎腹腔シャント術, 文光堂, 2014

宮嶋雅一, 新井 一: 特発性正常圧水頭症の現況, 特発性正常圧水頭症の診療, 金芳堂, 2014

宮嶋雅一: 頭蓋内圧, 脳脊髄液流出抵抗, 脳脊髄液マーカー, 特発性正常圧水頭症の診療, 金芳堂, 2014

宮嶋雅一，新井 一：特発性正常圧水頭症—最近の進歩—Annual Review 神経，中外医学社，2014

宮嶋雅一：水頭症・二分脊椎必携 「髄液の産生と吸収についての再考」，日本二分脊椎・水頭症研究振興財団，2016

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新井 一 (ARAI, Hajime)
順天堂大学・医学部・教授
研究者番号：70167229

(2) 研究分担者

中島 円 (NAKAJIMA, Madoka)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号：50317450

宮嶋 雅一 (MIYAJIMA, Masakazu)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号：60200177

菅野 秀宣 (SUGANO, Hidenori)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号：90265992