

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860664

研究課題名(和文)脳アミロイドアンギオパチー関連炎症の病態機序の解明とバイオマーカーの確立

研究課題名(英文)Biomarkers for cerebral amyloid angiopathy-related inflammation

研究代表者

吉倉 延亮(Yoshikura, Nobuaki)

岐阜大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80585654

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：脳アミロイドアンギオパチー関連炎症(CAA-ri)患者は、多発大脳微小出血(mCMBs)と広範な大脳白質病変を伴うAD患者と比較し、有意に髄液抗A抗体価、IL-8、髄液/血清アルブミン比、IgG indexが高値であった。一方で、mCMBs合併・非合併AD患者間では、これらのマーカーに有意差はなかった。以上よりCAA-riは類似の画像を呈するADとは異なる病態機序を有すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Brain magnetic resonance imaging (MRI) of patients with Alzheimer's disease (AD) sometimes reveals multiple cerebral microbleeds (CMBs) and confluent white matter hyperintensities (WMHs) similar to those observed in cerebral amyloid angiopathy-related inflammation (CAA-I). We investigated the cerebrospinal fluid (CSF) profiles of 38 AD, five amnesic mild cognitive impairment (MCI), and six CAA-I patients. The AD and MCI patients were divided into groups of patients with (n = 10) or without (n = 33) multiple CMBs (n = 2) on T2*-gradient echo sequences of brain MRI. The levels of CSF anti-amyloid autoantibody, interleukin 8, CSF/serum albumin ratios and immunoglobulin G indexes, were significantly higher in CAA-I patients than the other groups. However, there were no significant differences in the CSF profiles of patients with or without multiple CMBs. Our study provides evidence for different pathophysiological mechanisms underlying these differential MRI findings in AD and CAA-I.

研究分野：認知症

キーワード：アミロイド アルツハイマー型認知症 脳アミロイドアンギオパチー 抗A 抗体

1. 研究開始当初の背景

(1) 脳アミロイドアンギオパチー (cerebral amyloid angiopathy; CAA)は脳血管壁にアミロイドが進行性に沈着し、血管に続発性病変をもたらす。CAAの頻度は加齢とともに増加し60歳以上では約半数に、またアルツハイマー型認知症患者 (Alzheimer's disease; AD)では約80~90%に合併するとされている。臨床的には、血管壁の脆弱性を基盤とした葉型出血が知られているが、時に亜急性白質脳症の経過をたどる、脳アミロイドアンギオパチー関連炎症 (CAA-related inflammation; CAA-ri)を呈することがある。

(2) CAA-riの病態機序として、ステロイドや免疫抑制療法が奏功することから、血管壁に沈着したアミロイドに対する自己免疫学的機序の存在が示唆されている。しかし、CAA-riと画像上の特徴が類似する疾患もあり、正確な診断のためには脳生検による病理学的な診断が必要とされる。脳生検は侵襲の大きな検査であり患者への負担も大きいことが問題である。より侵襲の少ない、血液や髄液を用いた診断方法を確立することが重要である。

(3) CAA-ri患者の髄液中で抗A抗体が上昇していることが報告されている。

2. 研究の目的

(1) CAA-ri患者の髄液中抗A抗体をより多数例で測定し、アルツハイマー型認知症患者との比較を行う必要がある。

(2) CAA-ri患者の髄液中抗A抗体の病態への関連性を検討する。

3. 研究の方法

(1) 2013年2月から2015年1月までに認知症症状のために訪れた43名の認知症患者に対して、Mini-Mental State Examination (MMSE)およびFrontal Assessment Battery (FAB)を行った。43名の患者の内訳は、38名がAD患者で5名が軽度認知障害 (mild cognitive impairment; MCI)であった。ADの診断はNational Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke-Alzheimer's Disease and Related Disorders Association (NINCDS-ADRDA)による診断基準を用いた。Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders Forth Edition Text Revision (DSM-TR)では認知症の基準を満たさず、MMSE 26点の症例に保たれている症例をMCIとした。

(2) CAA-ri患者については6名を検討に

加えた。4名は当施設で診断され、2名は他関連施設で診断された患者であった。CAA-riの診断はChungらによる診断基準を用いた (Chung et al, 2011)。診断基準上4名はprobableで、2名はdefiniteであった。病理学的な検討のなされた2名は、CAA-riの病型のうち、A-related angitis (ABRA)と呼ばれる状態であった。

(3) 49名の患者は全員が髄液検査を受けた。ADおよびMCI患者は髄液採取前には特に免疫療法は受けていなかった。なおCAA-ri患者6名はいずれも急性期で、2名は採取前にステロイドパルス療法を受け、そのうち1名は引き続いてステロイド内服療法を受けていた。髄液検査はすべての患者から書面にて同意を取得したうえで行った。採取した髄液は保存用チューブに移し替え、24時間以内に-80のフリーザーにて保存した。患者髄液を用いて、髄液細胞数、総タンパク、A40、A42、リン酸化タウ、抗A抗体、interleukin8 (IL-8)、Interferon-gamma inducible Protein 10 (IP-10)、CSF/Serum albumin ratio (quotient albumin; Q-alb)およびIgG indexを測定した。髄液中のA40、A42、リン酸化タウ、IL-8、IP-10は市販されているELISA kitを利用し測定した (髄液A40およびA42: Wako, Osaka, Japan; リン酸化タウ: Nipro, Osaka, Japan; IL-8: eBioscience, San Diego, CA, USA; IP-10: Diaclone, Besancon Cedex, France; MCP-1: Boster Biological Technology, Pleasanton, CA, USA)。抗A抗体に関しては我々のラボで測定した。

(4) 抗A抗体はELISAプレートを作成して行った。96 well plate (Maxisorp Loose Nunc Immuno Module, Nunc, Kamstrup, Denmark)の各ウェルに1μgヒトリコンピナントA40タンパク (hydrochloride)加炭酸-重炭酸塩緩衝液100μlを加えて4で一晚インキュベートし、ペプチドをウェルに固相化した。0.05% Tween20を含むリン酸緩衝生理食塩水 (PBST)で洗浄したのち、室温で2時間、1%スキムミルクでブロッキングを行った。各ウェルをPBSTで洗浄し、PBSで2倍に希釈した患者髄液100μlをアプライした。室温で1.5時間インキュベートしたのち、3回洗浄し、PBSで3000倍に希釈したhorseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-human IgG antibodies (Vector, Burlingame, CA, USA)を加え1時間インキュベートした。PBSで3回の洗浄のち、発色基質 (TMB Substrate Reagent Set, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA)を加え、30分間インキュベートした。その後、反応停止溶液 (1M H₂SO₄)を加え、反応を停止した。その後、ELISA Processor (Dade Behring, Marburg, Germany)を用い、450nmで吸光度を読み取った。標準曲線を作成する

ために、コントロールとして 5 人の AD 患者の血清を用い、さまざまな濃度に希釈した場合の吸光度を測定した。血清を 10 倍希釈した場合の吸光度を 100U とした。

(5) 43 人の AD および MCI 患者は、シーケンズとして T2*-gradient echo(GRE)法と FLAIR 画像を含む、3 テスラの頭部 MRI 画像検査を受けた。2 人の神経科医が画像を評価し、T2*-GRE 法にて大脳微小出血 (cerebral microbleed; CMB)の有無を評価し、FLAIR 法にて大脳白質病変の程度を評価し、T1 強調画像および T2 協調画像を用いてラクナ梗塞の有無を評価した。43 人の患者を T2*-GRE 法による評価において、大脳微小出血が 2 つ以上ある CMBs (+)群とそれ以外の CMBs (-)群とに分けた。また、FLAIR 画像による大脳白質病変の程度の評価は、Fazekas rating scale を用いて、側脳室周囲の病変 (periventricular white matter hyperintensity: PVH)と大脳深部白質の病変 (deep and subcortical white matter hyperintensity: DSWMH)に分けて、それぞれ 0-3 の 4 段階に評価した。具体的には PVH に関しては、白質病変がないものを grade 0、"caps"や"pencil-thin lining"を grade 1、smooth "halo"を grade 2、Irregular PVH extending into the deep matter のものを grade 3 とした。DSWMH については、白質病変のないものを grade 0、punctate foci を grade 1、Beginning confluence of foci を grade 2、Large confluent areas を grade 3 とした。

(6) 2 群間の比較には、Mann-Whitney U Test を、3 群間の比較には Steel-Dwass Test を用いた。関連性の検討については、Spearman's rank correlation を用いて統計処理を行い、 p 値が 0.05 未満である場合を有意と評価した。

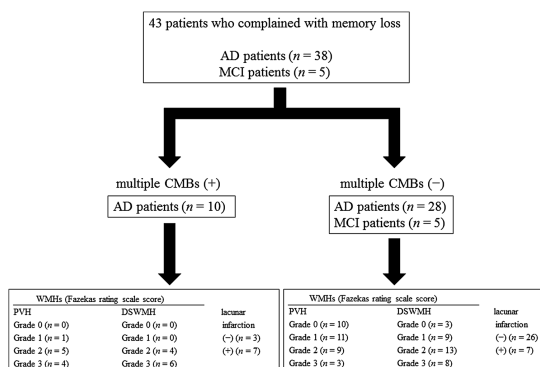


図 1 AD および MCI 患者の MRI 所見による分類 (microbleed が 2 個以上の場合、CMBs (+) 群とし、それ以外の場合を CMBs (-) 群とした。その後、FLAIR 画像を用いて、PVH および DSWMH を Fazekas rating scale を用いて評価した)

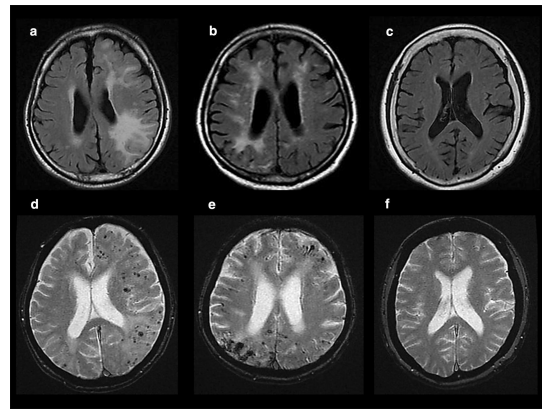


図 2 各群患者の典型的な MRI 画像(上段が FLAIR 画像、下段が T2*-GRE 画像。左の列から CAA-ri 患者、CMBs (+)患者、CMBs (-)患者の画像)

4. 研究成果

(1) 各群間における年齢差、性差はみとめなかった。PVH および DSWMH に関しては、CMB (+)群で CMB (-)に比較して優位に高値であった (PVH ; $p < 0.001$, DWMH ; $p < 0.01$)。ラクナ梗塞は CMBs 群で有意に合併率が高かった ($p < 0.005$)。

	CMBs (+)	CMBs (-)	CAA-ri
患者数	10 名(AD 10 名)	33 名 (AD = 28, MCI = 5)	6
年齢	76.3 ± 6.52	74.5 ± 7.50	71.2 ± 10.3
性別 (男性 : 女性)	4 : 6	11:22	2:4
MMSE	21.7 ± 3.46	22.8 ± 4.11	NA
FAB	10.2 ± 0.88	10.0 ± 2.93	NA
PVH	2.30 ± 0.67	1.15 ± 0.97	NA
DSWMH	2.60 ± 0.52	1.79 ± 0.93	NA
ラクナ梗塞	70%	21%	NA

表 1 各群の臨床および画像所見

(2) 各群において、髄液細胞数は CMBs (+) 1.10 ± 0.88 cells/ μ l、CMBs (-) 1.10 ± 1.26 cells/ μ l、CAA-ri 43.3 ± 97.9 cells/ μ L で 3 群間に有意差は認められなかった。髄液タンパク量については CMBs (+) 49+3 ± 14.4 mg/dl、CMBs (-) 44.7 ± 12.5 mg/dl、CAA-ri 81.7 ± 49.8 mg/dl で 3 群間に有意差はみられなかった。髄液 A β 40 に関しては、CMBs (+) 2840 ± 1320 pmol/L、CMBs(-) 3050 ± 921 pmol/L、CAA-ri 1730 ± 753 pmol/L で、CMBs (-)群と比較して CAA-ri

群で有意に低値であった($p < 0.05$)。髄液 A42 に関しては、CMBs (+) 322 ± 157 pg/ml、CMBs (-) 292 ± 164 pg/ml、CAA-ri 193 ± 98.4 pg/ml で、3 群間で有意差はみられなかった。髄液リン酸化タウに関しては、CMBs (+) 56.7 ± 20.6 pg/ml、CMBs (-) 76.3 ± 32.4 pg/ml、CAA-ri 35.5 ± 10.3 pg/ml で、CMBs (-) 群と比較してCAA-ri 群で有意に低値であった ($p < 0.005$)。

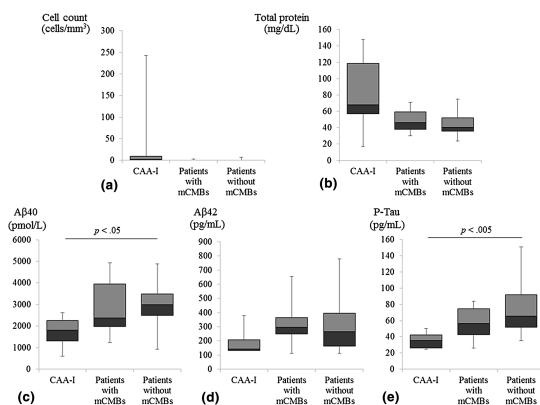


図2 3群間の髄液細胞数、髄液タンパク量、髄液 A40、髄液 A42 およびリン酸化タウの比較

(3) 各群において、髄液抗 A 抗体はCMBs (+) 3.76 ± 2.76 unit/ml, CMBs (-) 2.99 ± 2.48 unit/ml, CAA-ri 62.1 ± 92.1 unit/ml で、CAA-ri 群でCMBs (+)群やCMBs (-)群よりも有意に高値であった (CAA-ri vs CMBs (+); $p < 0.005$, CAA-ri vs CMBs (-); $p < 0.0005$)。髄液 IL-8 においては、CMBs (+) 56.2 ± 10.1 pg/ml, CMBs (-) 65.3 ± 16.0 pg/ml, CAA-ri 357 ± 305 pg/ml で、CAA-ri 群でCMBs (+)群やCMBs (-)群よりも有意に高値であった (CAA-ri vs CMBs (+); $p < 0.005$, CAA-ri vs CMBs (-); $p < 0.0005$)。髄液 MCP-1 については、CMBs (+) 402 ± 131 pg/ml, CMBs (-) 316 ± 103 pg/ml, CAA-ri 493 ± 248 pg/ml で、3 群間に有意差は認められなかった。髄液 IP-10 に関しては、CMBs (+) 555 ± 250 pg/ml, CMBs (-) 413 ± 166 pg/ml, CAA-ri 423 ± 236 pg/ml で、3 群間に有意差は認められなかった。Q-alb に関しては、CMBs (+) 6.00 ± 1.71 , CMBs (-) 5.52 ± 1.96 , CAA-ri 26.6 ± 29.1 で、CAA-ri 群でCMBs (+)群やCMBs (-)群よりも有意に高値であった (CAA-ri vs CMBs (+); $p < 0.05$, CAA-ri vs CMBs (-); $p < 0.005$)。IgG index に関しては、CMBs (+) 0.53 ± 0.04 , CMBs (-) 2.99 ± 2.48 unit/ml, CAA-ri 62.1 ± 92.1 unit/ml で、CAA-ri 群でCMBs (+)群やCMBs (-)群よりも有意に高値であった (CAA-ri vs CMBs (+); $p < 0.005$, CAA-ri vs CMBs (-); $p < 0.0005$)。

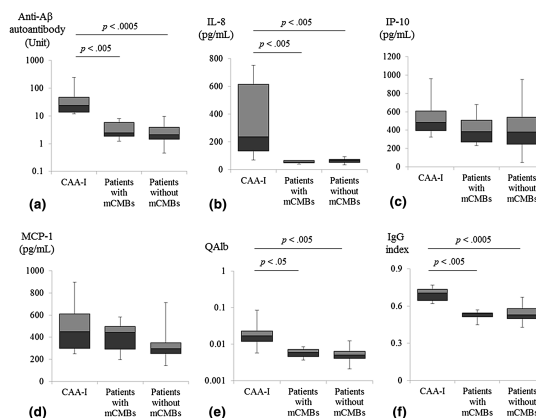


図3 3群間の髄液抗 A 抗体、髄液 IL-8、髄液 IP-10、髄液 MCP-1、Q-alb および IgG index の比較

(4) 図1に示すように、CAA-ri 患者の画像所見と、CMBs (+)患者の画像は白質病変や微小出血などにおいて、よく似ているものの、髄液抗 A 抗体はCAA-ri 群で高値を示していた。また、IgG index や、サイトカインの一つである髄液 IL-8 も同様であった。加えて、脳血管関門の透過性を示すQ-alb についても、CAA-ri 群で有意に高値であった。これらの事実からは、CAA-ri とCMBs (+)における類似の画像所見は異なる病態によることが予想される。CAA-ri の病態機序として、加えて、脳血管壁に沈着したアミロイドに対する抗 A 抗体を介した自己免疫応答が想定されているが、本研究の結果はそれを支持するものであった。

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 6 件)

(1) Kimura A, Takemura M, Saito K, Serrero G, Yoshikura N, Hayashi Y, Inuzuka T. Increased cerebrospinal fluid progranulin correlation with interleukin-6 in the acute phase of neuromyelitis optica spectrum disorder. J Neuroimmunol, 査読あり、15 巻、2017、175-181 DOI : 10.1016/j.jneurolim.2017.01.006

(2) Kimura A, Takemura M, Kunisaki S, Yoshikura N, Hayashi Y, Inuzuka T. Association between naturally occurring anti-amyloid autoantibodies and medialtemporal lobe atrophy in Alzheimer's disease. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 査読あり、88 巻、2017、126-131 DOI : 10.1136/jnnp-2016-313476

(3) Kimura A, Takemura M, Kunisaki S, Yoshikura N, Hayashi Y, Harada N, Nishida

H, Inuzuka T. Comparizon of cerebrospinal fluid profiles in Alzheimer's disease with multiple cerebral microbleeds and cerebral-amyloid angipathy related inflammation. J Neurol、査読あり、264 巻、2017、373-381
DOI : 10.1007/s00415-016-8362-2

(4) Kimura A, Sakurai T, Yoshikura N, Koumura A, Hayashi Y, Ohtaki H, Chousa M, Seishima M, Inuzuka T. Identification of target antigents of antiendothelial cell antibodies against human brain microvascular endothelial cells in health subjects. Curr Neurovasc Res、査読なし、12 巻、2015、25-30
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25564020>

(5) Kimura A, Yoshikura N, Koumura A, Hayashi Y, Inuzuka T. B-cell-activating factor belonging to the tumor necrosis factor family (BAFF) and a proliferation including ligand (APRIL) levels in cerebrospinal fluid of patients with meningoencephalitis. J Neurol Sci、査読なし、353 巻、2015、79-83
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=kimura+a%2C+BAFF>

(6) Kimura A, Yoshikura N, Koumura A, Hayashi Y, Kobayashi I, Inuzuka T. Identification of taget antigents of naturally occurring autoantibodies in cerebrospinal fluid. J Proteomics、査読なし、14 巻、2015、450-457
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=kimura+a%2C+Identification+of+taget+antigents+of+naturally+occurring+autoantibodies+in+cerebrospinal+fluid>

〔学会発表〕(計 5 件)

(1) 吉倉 延亮、木村 暁夫、工藤 琢哉、安西 将大、竹腰 顕、山田 恵、林 祐一、犬塚 貴. 抗 NMDA 受容体抗体陽性脳炎における多彩な自律神経症状の出現時期とその対応、神経免疫学会、2016 年 9 月 29 日～2016 年 9 月 30 日、長崎ブリックホール

(2) 吉倉 延亮、木村 暁夫、安西 将大、竹腰 顕、林 祐一、犬塚 貴. 自己免疫性神経疾患における新規抗血管内皮抗体の同定、神経学会、2016 年 5 月 18 日～2016 年 5 月 21 日、神戸国際会議場・神戸国際展示場、神戸ポートピアホテル

(3) 吉倉 延亮、木村 暁夫、村上 宗玄、竹腰 顕、山田 恵、林 祐一、犬塚 貴. 自己免疫性神経疾患における新規抗血管内皮抗体の同定、神経免疫学会、2015 年 9 月

15 日～2015 年 9 月 16 日、長良川国際会議場

(4) 吉倉 延亮、木村 暁夫、安西 将大、竹腰 顕、原田 斉子、香村 彰宏、林 祐一、犬塚 貴. 脳アミロイドアンギオパチー関連炎症における臨床及び髄液所見の検討、神経免疫学会、2014 年 9 月 4 日～2014 年 9 月 6 日、金沢歌劇座

(5) 吉倉 延亮、木村 暁夫、竹腰 顕、原田 斉子、香村 彰宏、林 祐一、犬塚 貴. アルツハイマー型認知症における microbleed と臨床所見との関連性の検討、神経学会、2014 年 5 月 21 日～2014 年 5 月 24 日、福岡国際センター

6 . 研究組織

(1)研究代表者

吉倉 延亮 (Yoshikura Nobuaki)
岐阜大学・医学部附属病院・助教
研究者番号 : 80585654