

平成30年6月26日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15336

研究課題名(和文) 孤発性脳アミロイドアンギオパチーの伝播に関する研究

研究課題名(英文) Study on transmission of sporadic cerebral amyloid angiopathy

研究代表者

山田 正仁 (YAMADA, Masahito)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：80191336

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：脳アミロイドアンギオパチー(CAA)特異的なアミロイド 蛋白(A<sub>42</sub>)株が存在し、それによってCAAが伝播するという仮説を検証する目的で、CAAを含むヒト剖検脳(n=12)をR1.40 APP transgenicマウスに接種した。マウス脳ホモジネートのウェスタンブロット解析では、9例の剖検脳でA<sub>42</sub>を検出し、うち3例ではA<sub>40</sub>優位、6例ではA<sub>42</sub>優位であった。マウス脳のA<sub>42</sub>免疫染色で、全てのマウス脳でA<sub>42</sub>沈着を認め、A<sub>42</sub>陽性面積率/A<sub>40</sub>陽性面積率は多様であり、CAAの程度とA<sub>40</sub>陽性面積率と正の相関を認めた。ヒト脳A<sub>42</sub>沈着所見とマウス脳所見との関連を検討中である。

研究成果の概要(英文)：To examine a hypothesis that sporadic cerebral amyloid angiopathy (CAA) can be transmitted from humans to humans through CAA-specific amyloid $\beta$ -protein (A $\beta$ ) strain, we performed transmission experiments to R1.40 APP transgenic mice with brain samples from patients with CAA without Alzheimer's disease (AD) (n = 3), AD with CAA (n = 3), AD without CAA (n = 3), and no AD/CAA (n = 3). Western blot of brains from the mice inoculated with the human brain samples presented with A $\beta$  (n = 9) with A<sub>40</sub> (n = 3) or A<sub>42</sub> predominance (n = 6). Immunohistochemically, all the mice showed A $\beta$  deposition in the brain with remarkable variations of A<sub>42</sub>/A<sub>40</sub> ratios [A<sub>42</sub> immunoreactive areas (%) / A<sub>40</sub> immunoreactive areas (%)]. Severity of CAA correlated with A<sub>40</sub> immunoreactive areas (%). Study on correlations in the pattern of A $\beta$  deposition between human and mouse brains is ongoing.

研究分野：神経内科学

キーワード：脳アミロイドアンギオパチー アミロイド 蛋白 伝播 剖検脳 アルツハイマー病

1. 研究開始当初の背景

孤発性脳アミロイドアンギオパチー (CAA) は高齢者やアルツハイマー病患者で高率にみられ、脳血管障害や認知症と密接に関連している。CAA においてアミロイドβ蛋白 (Aβ) が脳血管選択的に沈着する原因は不明であり、脳における Aβ 産生と排泄経路との関連が考えられている。

2. 研究の目的

申請者は、孤発性 CAA 特異的な Aβ 株が存在し、それが中枢神経系に直接、あるいは末梢ルートから投与された場合、CAA が伝播するという仮説を立てた。その仮説を検証する目的で孤発性 CAA 伝播実験により CAA 特異的 Aβ 株の確立をめざして研究を行った。

3. 研究の方法

(1) CAA ヒト剖検脳サンプルの準備と評価

高齢者 300 例の剖検脳から、マウス接種用に次の 4 群 (各群間で年齢をマッチ) を設定し該当例を選択した。

A 群 (n = 3) : 高度の CAA を有するが、SP を全く欠く (pure CAA)。

B 群 (n = 3) : AD で多数の SP を有するが、CAA を全く欠く (pure AD)。

C 群 (n = 3) : AD で多数の SP ばかりでなく、高度の CAA を随伴する (AD+CAA)。

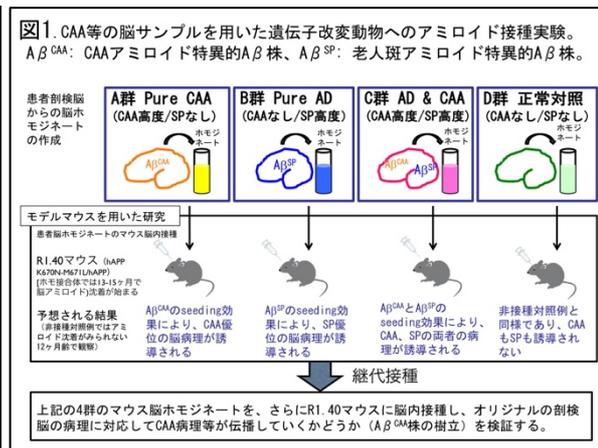
D 群 (n = 3) : SP も CAA もみられない正常対照脳。

これらの脳サンプルについて、サンプルの特性がわからないようにブラインドで下記のマウスへの接種実験を行った。

オリジナルの剖検脳について、Aβ 沈着のみならず、タウ、αシヌクレイン、TDP-43 などの沈着の有無や分布を免疫組織化学に評価した。

(2) CAA 脳サンプル等を用いた遺伝子改変マウスへの脳アミロイド接種実験

上記 4 群の脳ホモジネートの seeding 効果を見るために、脳内接種実験を行った。具体的には、4 群脳ホモジネートを R1.40 APP transgenic マウス (ホモ接合体) (3 ヶ月齢) に脳内接種した (図 1)。R1.40 マウスはアミロイド沈着がみられる時期が 13-15 ヶ月齢と遅いため、seeding 効果の観察に適している (Hamaguchi *et al.* *Acta Neuropathol* 2012)。R1.40 マウスは Jucker 教授 (Tübingen 大学) から供与を受け、金沢大学にて繁殖させた。オリジナルの剖検脳のアミロイド病理に対応し、それぞれに特異的なアミロイド沈着型がマウス脳に出現するかどうかを 15 ヶ月齢で検討した。



4. 研究成果

脳ホモジネートのウェスタンブロット解析では、9 例の剖検脳で Aβ を検出し、残りの 3 例では Aβ を検出出来なかった。また、Aβ 40 と Aβ 42 を分けると、3 例の剖検脳で Aβ 40 が Aβ 42 より多く検出され、6 例は Aβ 42 の方が多く検出された。Aβ 42 の方が多かった 6 例中、4 例ではほとんど Aβ 40 のバンドを同定することが出来なかった。

脳ホモジネートを脳に接種したマウス脳の免疫染色による解析では、Aβ に対する抗体 (4G8) を用いた染色で、全てのマウス脳で Aβ の沈着を認めた。一方、PBS を接種したマウス脳では Aβ の沈着を認めなかった。オールインワン顕微鏡 (KEYENCE BZ-X700) を用いて Aβ の沈着面積率の検討を行ったところ、それぞれのマウスの Aβ 沈着面積率は 0.0716%~0.758%であった。ウェスタンブロットでの Aβ 量と免疫染色での Aβ 沈着面積率に相関を認めなかった。Aβ 40 に対する抗体と Aβ 42 に対する抗体を用いた免疫染色では、Aβ 42 陽性面積率/Aβ 40 陽性面積率が 0.9 未満の剖検例が 3 例、0.9 以上 2.0 以下が 6 例、2.0 以上が 3 例存在した。マウス脳の CAA の程度については、Aβ 40 陽性面積率と正の相関を認めたが、Aβ 陽性面積率や Aβ 42 陽性面積率とは相関はなかった。CAA の程度と脳ホモジネートのウェスタンブロットの Aβ 量との間に相関は認めなかった。

現在、オリジナルの 12 剖検例の脳の多数の部位について Aβ、リン酸化タウ、リン酸化αシヌクレイン、リン酸化 TDP-43 に対する特異抗体を用いた免疫染色を実施し、それぞれの接種したマウス脳の所見との相関を検討している。

今後、継代脳内接種実験 (A~D 群の剖検脳サンプルを接種されたマウスの脳のホモジネートを、さらに次の R1.40 APP transgenic マウス (ホモ接合体) に脳内接種) を行い、CAA 病理がマウスに継代して保持されるか否か等を検討する。また、末梢に投与した場合に CAA を伝播させることができるか否かを検討するために、R1.40 APP transgenic マウス (ホモ接合体) 腹腔内投与実験を行う。さらに、上記の研究により CAA 特異的 Aβ 株を樹立できた

場合、申請者らが独自に確立した試験管内 A $\beta$  40/A $\beta$  42 凝集系に、各群の剖検脳及びそれに由来するマウス脳のホモジネートをシードとして加え、チオフラビン、電顕、原子間力顕微鏡 (AFM) 等を用いて凝集効率・スピードや凝集形態の違いを観察し、CAA 特異的な A $\beta$  コンフォメーションと SP 特異的な A $\beta$  コンフォメーションがシードとして作用する場合の seeding 効果の差異を明らかにする。それにより、それらを区別して検出する方法を考案し、それを脳脊髄液等の体液を用いた CAA 診断法の開発に応用する。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

- ① Noguchi-Shinohara M, Komatsu J, Samuraki M, Matsunari I, Ikeda T, Sakai K, Hamaguchi T, Ono K, Nakamura H, Yamada M, Cerebral amyloid angiopathy-related microbleeds and CSF biomarkers in Alzheimer's disease, *Journal of Alzheimer's Disease*, 査読有、Vol. 55, 2017, 905-913, DOI: 10. 3233/JAD-160651
- ② Sakai K, Asakawa M, Takahashi R, Ishida C, Nakamura R, Hamaguchi T, Ono K, Iwasa K, Yamada M, Coexistence of transthyretin- and A $\beta$ -type cerebral amyloid angiopathy in a patient with hereditary transthyretin V30M amyloidosis, *Journal of the Neurological Sciences*, 査読有、Vol. 381, 2017, 144-146, DOI: 10. 1016/j. jns. 2017. 08. 3240
- ③ Hamaguchi T, Taniguchi Y, Sakai K, Kitamoto T, Takao M, Murayama S, Iwasaki Y, Yoshida M, Shimizu H, Kakita A, Takahashi H, Suzuki H, Naiki H, Sanjo N, Mizusawa H, Yamada M, Significant association of cadaveric dura mater grafting with subpial A $\beta$  deposition and meningeal amyloid angiopathy, *Acta neuropathologica*, 査読有、Vol. 132, 2016, 313-315, DOI: 10. 1007/s00401-016-1588-3.
- ④ 坂井健二, 山田正仁, 脳アミロイドアンギオパチー, *Clinical Neuroscience*, 査読無、Vol. 34, 2016, 446-448
- ⑤ 坂井健二, 山田正仁, 脳アミロイドアンギオパチーの臨床像と治療法, *医学のあゆみ*, 査読無、Vol. 258, 2016, 703-709

- ⑥ 濱口 毅, 山田正仁, A $\beta$  とタウ蛋白の感染性, *Clinical Neuroscience*, 査読無、Vol. 34, 2016, 988-991
- ⑦ Samuraki M, Matsunari I, Yoshita M, Shima K, Noguchi-Shinohara M, Hamaguchi T, Ono K, Yamada M, Cerebral amyloid angiopathy-related microbleeds correlate with glucose metabolism and brain volume in Alzheimer's disease, *Journal of Alzheimer's Disease*, 査読有、2015, Vol. 48, 517-528, DOI: 10. 3233/JAD-150274.
- ⑧ Yamada M, Cerebral amyloid angiopathy: emerging concepts, *Journal of stroke*, 査読有、Vol. 17, 2015, 17-30, DOI: 10. 5853/jos. 2015. 17. 1. 17.
- ⑨ 坂井健二, 山田正仁, 脳アミロイドアンギオパチー関連炎症の病態と治療, *診断と治療*, 査読無、Vol. 103, 2015, 101-104

[学会発表] (計 9 件)

- ① Sakai K, Noguchi-Shinohara M, Yamada M, Cerebral amyloid angiopathy in Alzheimer's disease, 第 36 回日本認知症学会学術集会, 2017
- ② Sakai K, Boche D, Jonston D, Love S, Nicoll J, Aquaporin 4 and the response to A $\beta$  immunotherapy in human Alzheimer's disease, 5th International CAA Conference, 2016
- ③ Yamada M, Hamaguchi T, Taniguchi Y, Sakai K, Kitamoto T, Takao M, Murayama S, Iwasaki Y, Yoshida M, Shimizu H, Kakita, Takahashi H, Suzuki H, Naiki H, Sanjo N, Mizusawa H, Possible iatrogenic transmission of cerebral amyloid antipathy and subpial A $\beta$  deposition via cadaveric dura mater grafting, 5th International CAA Conference, 2016
- ④ 濱口 毅, 山田正仁, ヒトにおけるアミロイドーシスの伝播, 第 4 回日本アミロイドーシス研究会学術集会, 2016
- ⑤ 佐村木美晴, 松成一朗, 吉田光宏, 島啓介, 篠原もえ子, 濱口 毅, 小野賢二郎, 山田正仁, アルツハイマー病における脳アミロイドアンギオパチー関連微小出血と脳糖代謝・灰白質容量との関係, 第 7 回日本脳血管・認知症学会学術大会

(VAS-COG Japan 2016)、2016

- ⑥ 濱口 毅、山田正仁、医療行為によって脳βアミロイドーシスが伝播する可能性について、第57回日本神経学会学術大会、2016
- ⑦ 篠原もえ子、小松潤史、佐村木美晴、松成一朗、池田篤平、坂井健二、濱口 毅、小野賢二郎、山田正仁、アルツハイマー病におけるCAA関連微小出血と脳脊髄液バイオマーカーとの関連、第57回日本神経学会学術大会、2016
- ⑧ Hamaguchi T、Sakai K、Kitamoto T、Takao M、Murayama S、Iwasaki Y、Yoshida M、Shimizu H、Kakita A、Takahashi H、Suzuki H、Naiki H、Sanjo N、Mizusawa H、Yamada M、Cerebral β-amyloidosis in patients with dura mater graft-associated Creutzfeldt-Jakob disease、PRION 2016、2016
- ⑨ Yamada M、Samuraki M、Yoshita M、Shima K、Noguchi-Shinohara M、Hamaguchi T、Ono K、Matsunari I、Cerebral amyloid angiopathy in Alzheimer's disease、7th World Congress of the International Society for Vascular Behavioural and Cognitive Disorders (VAS-COG 2015 TOKYO)、2015

[図書] (計5件)

- ① 坂井 健二、山田 正仁、玉岡 晃、医歯薬出版、最新アミロイドーシスのすべて、2017、264 (pp206-219)
- ② 坂井 健二、山田 正仁、医歯薬出版、別冊「医学のあゆみ」アミロイドーシスの最新情報、2017、160 (pp103-109)
- ③ 濱口 毅、山田 正仁、診断と治療社、必携脳卒中ハンドブック、2017、476 (pp383-386)
- ④ 坂井健二、山田正仁、中外医学社、脳出血・くも膜下出血診療読本、2016、406 (pp2-21)
- ⑤ 濱口 毅、山田正仁、中外医学社、神経内科 Clinical Questions & Pearls 脳血管障害、2016、330 (pp254-260)

[その他]

ホームページ等

<http://neurology.w3.kanazawa-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 正仁 (YAMADA, Masahito)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：80191336

(2) 研究分担者

濱口 毅 (HAMAGUCHI, Tsuyoshi)

金沢大学・附属病院・講師

研究者番号：70452109

(3) 連携研究者

小野 賢二郎 (ONO, Kenjiro)

昭和大学・医学部・教授

研究者番号：70377381

(4) 連携研究者

坂井 健二 (SAKAI, Kenji)

金沢大学・附属病院・助教

研究者番号：00572306