

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：13101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06211・19K21314

研究課題名(和文)血管性認知症：脳小血管病の臨床病理診断基準の確立へ向けて

研究課題名(英文) Vascular dementia: for establishing clinicopathologic diagnostic criteria for small vessel disease

研究代表者

齋藤 理恵 (Saito, Rie)

新潟大学・脳研究所・助教

研究者番号：80829078

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：脳小血管病の代表的2疾患について、平面的空間的に詳細な解析を行い、MRIでは同じ白質脳症を呈するものの、両者の白質や血管の変性パターンが異なることを突き止めた。これは、両者の病態機序の違いを反映していると考えられ、今後の研究ターゲットを探る上で意義は大きい。また、組織透明化による立体的イメージング手法を改良させ、詳細に血管網を立体のまま観察することに成功し、これまで未知であった白質の血管走行や血管障害部位を同定することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、変性した大脳白質と小血管を2D, 3Dで詳細に解析する手法が確立した。これによって、脳小血管病の白質変性に影響する小血管変性パラメーターを同定できた。また、脳小血管病の中には、障害されやすい血管の種類が疾患ごとに異なることを明らかにした。これら病理基盤の解明によって、病因ターゲットが明確となり、より有効な治療法開発への応用が期待される。また、同時に開発された組織透明化による高解像度3Dイメージングは、今後の神経科学の発展に大きく寄与するものとして注目される。

研究成果の概要(英文)：We clarified the different degenerative pattern of white matter and small vessels in the CNS between representative two small vessel diseases, CADASIL and HTRA1-autosomal dominant disease.

研究分野：神経病理学

キーワード：脳血管性認知症 脳小血管病 白質変性 血管変性 血管走行パターン 3D蛍光イメージング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

血管性認知症の主要な原因の一つである脳小血管病は、900 $\mu$ m 以下の脳小血管を病変の主座とし、加齢や高血圧などを素地とする。臨床的にはラクナ梗塞、微小脳出血、びまん性白質病変、認知症を来し、血管性認知症の臨床診断基準(1)のII型に相当する。しかし、その重要性にも関わらず、病理学的定義は曖昧で、正確な頻度や詳細な病理基盤は不明である。この要因として、まず大血管病/アルツハイマー病などの複合病変が多いこと、MRI で描出不能であり、脳小血管そのものの評価が難しいことが挙げられる。さらに、脳微小循環が neurovascular unit という高次に機能的なシステムであるにも関わらず、断面による評価しか行えず、病態の本質に迫る研究方法が確立されてこなかったことによる。

### 2. 研究の目的

(1) 脳小血管の機能不全はどのように惹起され、それにより白質変性はどのように生じ、神経症状として進展していくのか。軸索と髄鞘脱落の時間・空間的關係、グリアの機能への影響を明らかにする。

(2) 脳小血管病による血管性認知症の明確な臨床病理学的診断基準を確立する。

### 3. 研究の方法

(1) 対象は新潟大学脳研究所病理学分野で管理する脳小血管変性連続剖検例 80 例である。まず、脳小血管病の代表的モデルと言われる遺伝性脳小血管病である cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarct and leukoencephalopathy (CADASIL) と HTRA1-autosomal dominant disease (HTRA1-AD) の症例を抽出した。さらに、最も有病率の高い孤発性脳小血管病 (sSVD) として、血管性認知症の臨床診断基準(1)のII型に相当する症例を同定した。観察の結果、これら 3 疾患では前頭葉半卵円中心の白質変性が強く、側頭葉白質の変性が軽度であることが判明した。このため、この 2 領域を対象として、次の病理学的パラメーターを設定し、定量化。3 群で比較し従来の平面的解析方法で詳細に検討し、MRI を含む臨床データと照合した。

白質変性：髄鞘密度、軸索密度、Glialfibrillary acidic protein 密度、グリオシスの程度

血管変性：SMA 密度、細動脈硬化度、毛細血管硬化度、血管周囲腔：perivascular space (PVS) の開大度、CADASIL のみ Notch3/ECD 追加

(2) 空間的病理解析を行うために、ヒト脳剖検サンプルの組織透明化による高解像度 3D イメージング技術のさらなる改良を行う。脂質の多い白質の透明度が課題であり、免疫染色可能な試薬を検討する。その後、平面的解析をした症例で立体的な血管網を観察し、血管のどの部位が障害されているか同定する。

### 4. 研究成果

#### (1) 臨床像

CADASIL 3 例、HTRA1-AD 3 例、sSVD として 4 例を検討対象とした。これらは臨床病理像に加え、遺伝子検査で確定診断した。

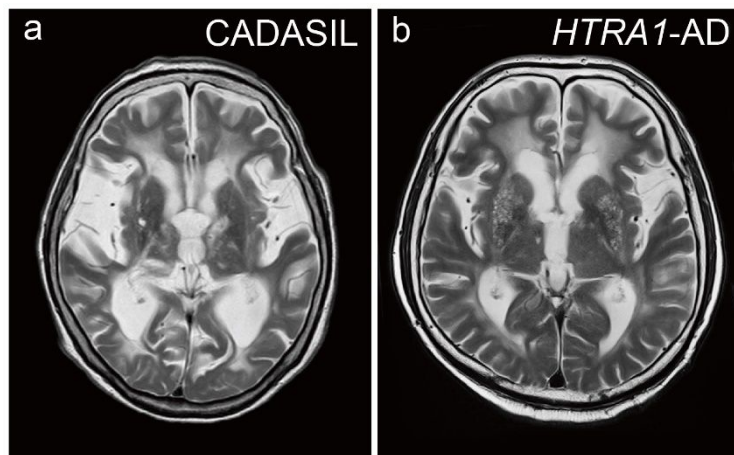
発症年齢：遺伝性 2 疾患は、sSVD に比して、明らかに若年発症であった (45.0 $\pm$ 7.8, 49.3 $\pm$ 8.1, 72.5 $\pm$ 10.3 歳)。

全例で認知機能低下と歩行障害を呈した。

心血管危険因子：CADASIL の 2/3 例、HTRA1-AD の 3/3 例、sSVD の 3/4 例で高血圧などの心血管病危険因子を有していた。

特徴的な臨床像：HTRA1-AD 1 例、sSVD の 3/4 例でパーキンソン病などの神経変性疾患の合併がないにも関わらず振戦などのパーキンソニズムが認められた。HTRA1-AD では全例高度の脊椎症を呈し、うち 1 例は死因の一因ともなった。

MRI 画像：全例半卵円中心をアクセントとして、leukoaraiosis を呈していた。基底核の PVS も全例で目立つものの、特に HTRA1-AD で顕著であった。



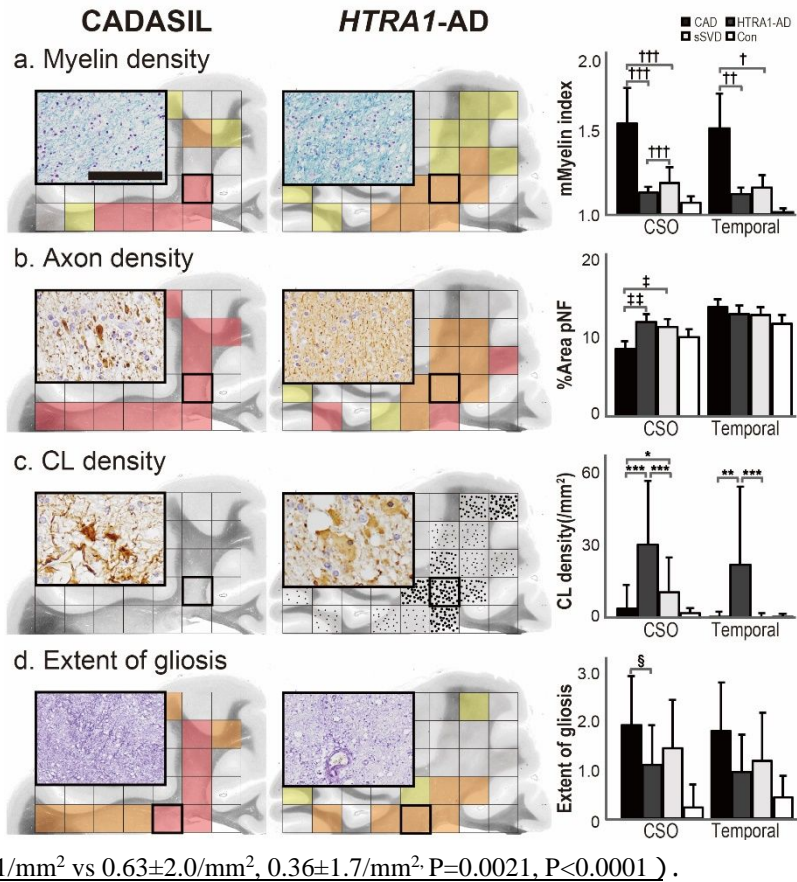
## (2) 各群の白質変性の特徴 (右下図)

髄鞘や軸索の脱落グリオシスの程度は半卵円に比して側頭葉白質は軽度。

側頭葉では軸索密度が3群に有意差を認めないものの、髄鞘脱落はCADASILでHTRA1-ADやsSVDに比して有意に高度(mMyelin index:  $1.54 \pm 0.22$  vs  $1.1 \pm 0.037\%$ ,  $1.2 \pm 0.078\%$ ,  $P=0.0003$ ,  $P=0.0012$ )。

これらパラメーターは3群中CADASILの半卵円中心で最も高度。半卵円の中でも脳室周囲の深部白質で顕著。

一方、BBBの破綻で出現すると言われる障害されたアストロサイト: clasmotodendrocytes (CL) は、HTRA1-ADでCADASILやsSVDに比して著増(半卵円:  $29.2 \pm 25.6$  vs  $3.92 \pm 9.4$ ,  $10.2 \pm 14.1$ ,  $P < 0.0001$ ,  $P < 0.0001$ , 側頭葉:  $21.3 \pm 31.1/\text{mm}^2$  vs  $0.63 \pm 2.0/\text{mm}^2$ ,  $0.36 \pm 1.7/\text{mm}^2$ ,  $P=0.0021$ ,  $P < 0.0001$ )。

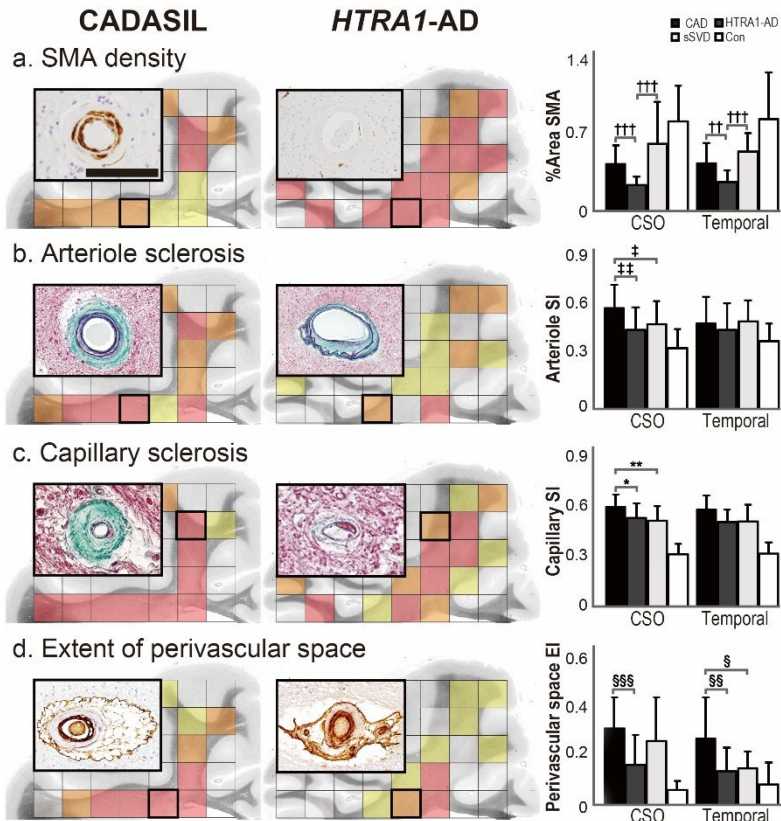


## (3) 各群の血管変性の特徴 (右下図)

HTRA1-ADではCADASILやsSVDに比してSMA脱落の程度が半卵円中心、側頭葉ともに有意に高度(半卵円:  $0.24 \pm 0.072\%$  vs  $0.42 \pm 0.16\%$ ,  $0.60 \pm 0.38\%$ ,  $P=$ , 側頭葉:  $0.26 \pm 0.11\%$  vs  $0.43 \pm 0.18\%$ ,  $0.53 \pm 0.16\%$ ,  $P < 0.0001$ ,  $P < 0.0001$ )。

細動脈と毛細血管硬化度はともに半卵円におけるCADASILで最も高度(細動脈硬化度:  $0.56 \pm 0.13$  vs  $0.44 \pm 0.12$ ,  $0.48 \pm 0.13$ ,  $P=0.0006$ ,  $P=0.015$ )。

MRI上、基底核のPVS拡大はCADASILに比してHTRA1-ADの方が目立っていたものの、半卵円中心と側頭葉についてはHTRA1-ADよりもCADASILの方が有意に拡大(半卵円:  $0.31 \pm 0.13$  vs  $0.16 \pm 0.11$ ,  $P=0.0002$ , 側頭葉:  $0.27 \pm 0.16$  vs  $0.14 \pm 0.094$ ,  $P < 0.0001$ )。



## (4) 白質変性パラメーターと血管変性パラメーターの相互関係

上記の結果から、側頭葉の髄鞘脱落が比較的早期の変化として推測された。これと関係する他のパラメーターを同定するために多変量解析を行ったものの、CADASILの側

頭葉の髄鞘脱落について、報告のある PVS を含めて有意な相関を示すパラメーターはなかった (Spearman の順位相関係数)。その他の検討では以下の事柄が見いだされた。

### 3 群に共通する特徴

同じ小動脈であるものの、3 群とも細動脈と毛細血管硬化度は有意な相関を示さなかった。PVS 開大については細動脈や毛細血管硬化度と正の相関を示すと予想されたものの、HTRA1-AD の側頭葉で細動脈硬化度と負の相関を示す以外、明らかな相関を認めなかった。CL は白質の障害を反映しない。

### 各疾患の特徴

**Notch3/ECD** : CADASIL 特異的に血管壁に異常蓄積する Notch3/ECD は、半卵円中心において、髄鞘脱落や%SMA 面積と正の相関を示し ( $\rho=0.4308$ ,  $P=0.0221$ ,  $\rho=0.4915$ ,  $P=0.0079$ )、側頭葉では%SMA 面積と負の相関を示した ( $\rho=-0.5263$ ,  $P=0.0362$ )。意外なことに、他の血管変性因子である細動脈硬化や毛細血管硬化度、PVS とは有意な相関を示さなかった。

**HTRA1-AD** の半卵円中心において、髄鞘脱落とグリオーシスは強い正の相関を示し ( $\rho=0.5599$ ,  $P<0.0001$ )、前者は細動脈硬化度と PVS ( $\rho=0.435$ ,  $P=0.0025$ ,  $\rho=0.3415$ ,  $P=0.0202$ )、後者は細動脈硬化度と正の相関を示した ( $\rho=0.3455$ ,  $P=0.010187$ )。

**sSVD** の側頭葉では、髄鞘脱落とグリオーシス、PVS の開大が有意に正の相関を示した ( $\rho=0.665$ ,  $P=0.0007$ ,  $\rho=0.4365$ ,  $P=0.0423$ )。半卵円中心では CL 密度とグリオーシスは正の相関を示し ( $\rho=0.3169$ ,  $P=0.0339$ )、PVS 開大は軸索密度と%SMA 面積と負の相関を示した ( $\rho=-0.3140$ ,  $P=0.0335$ ,  $\rho=-0.3299$ ,  $P=0.0269$ )。

### (5) 組織透明化による高解像度 3D イメージング

上記 2D 解析の結果から、CADASIL と HTRA1-AD の白質では、HTRA1-AD の方が変性は比較的軽度であるものの、SMA の脱落が半卵円、側頭葉ともに高度であることが明らかとなった。このため、白質の血管における SMA の脱落部位を同定するために高解像度 3D イメージングを行った。

#### 白質透明化の改良と SMA, laminin の高解像度免疫染色の成功

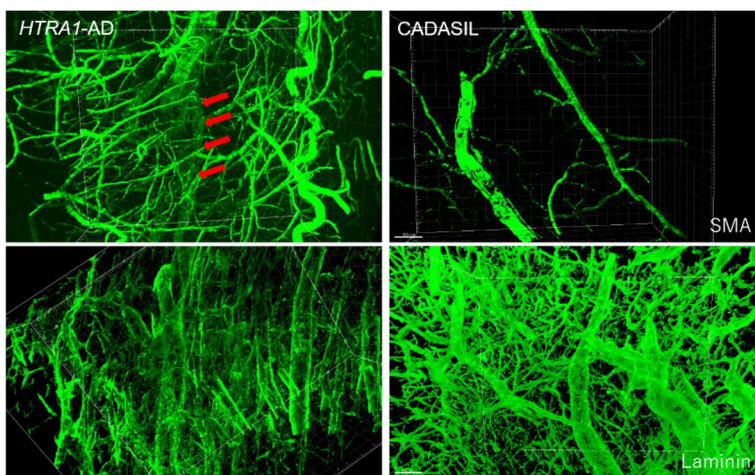
白質においては、高解像度 3D イメージングに必要な透明度が不十分であったため(2)、試薬の再検討を行った。これは脱脂を 1,2-hexanediol に変更し、SMA や laminin の浸透性は塩基性とするこで改善された。これについて論文報告を行った(3)。

#### 白質小動脈の解剖の解明と疾患ごとの立体的障害部位の違い

正常の白質では 200-300 $\mu\text{m}$  の細動脈数本が貫き、そこから分枝を繰り返して、毛細血管に至る。各細動脈どうしは毛細血管を通してつながっている。これら白質の細動脈は脳表から皮質を貫き、皮質内で分枝を出さずに白質に至る medullary penetrator と皮質内に分枝を出す subcortical penetrator に大別されることが確認された。

CADASIL と HTRA1-AD の半卵円深部白質を同手法にて観察したところ SMA の脱落部位が両者で異なることが分

かった。CADASIL では最も大きな細動脈を残してそれ以遠の小血管の SMA が高度に脱落。一方、HTRA1-AD は逆に太い径の動脈の SMA が脱落し(右上図：赤矢印)、それより以遠の SMA は保たれていた。Laminin では両疾患の白質とも血管の密度が保たれていた。平面断面で計測した際に HTRA1-AD でより SMA 脱落が高度であったのは、CADASIL に比べてより太い径で SMA 脱落が顕著であったためと考えられた。



### (6) 成果の国内外の位置づけ

HTRA1-AD は 2016 年に報告されて間もない疾患であり、CADASIL 同様、常染色体優性遺伝性疾患であることから、未診断例が多く存在すると言われる。このため、今後 CADASIL とともに SVD の疾患モデルとして重要度が増す疾患である。この 2 疾患について、詳細な定量的解析を行ったのは本研究が初めてである。MRI では同じ leukoencephalopathy を呈するものの、両者は変性の程度、血管変性パターンの異なることを明らかにすることができた。これは、SVD における今後の研究ターゲットを探る上で意義は大きい。

また、ヒト死後脳の組織透明化による 3D イメージングは世界中でさかんに研究されているも

のの、本研究で成功した皮質・白質を含めた大きなサンプルの高解像度蛍光免疫染色が可能な手法は、いまだ報告が無く、ハイスループットでの3Dデータ取得を可能にした。そこで得られた知見とともに、開発された手法も神経科学の発展に大きく貢献することが期待される。

#### (7) 今後の展望

まず、本研究の論文化を行う。次に、CADASILとHTRA1-ADの変性パターンの違いについて、その原因を分子遺伝学的手法も用いて明らかにする。また、他のSVDについても同様に解析を進め、ミクログリオパチーの体系化を進め、治療につなげたい。

#### 【引用文献】

- (1) Raj N Kalaria. Acta Neuropathol. 2016;131:659-85
- (2) Tainaka K, Saito R, Kakita A. Cell Rep., 2018, 24, 2196-2210. e9
- (3) Inoue M, Saito R, Tainaka K, Kakita A. Bioorg Med Chem Lett., 2019: 29, 1886-1890

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Rie Saito, Nozaki Hiroaki, Kato Taisuke, Kakita Akiyoshi, et al.	4. 巻 78
2. 論文標題 Retinal Vasculopathy With Cerebral Leukodystrophy: Clinicopathologic Features of an Autopsied Patient With a Heterozygous TREX 1 Mutation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Neuropathol Exp Neurol	6. 最初と最後の頁 181-186
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jnen/nly115	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 Inoue Masafumi, Rie Saito, Kakita Akiyoshi, Tainaka Kazuki	4. 巻 29
2. 論文標題 Rapid clearing of white matter in post-mortem human brain by 1,2-hexanediol delipidation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters in press	6. 最初と最後の頁 1886-1890
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 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3件（うち招待講演 1件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Rie Saito, Akiyoshi Kakita
2. 発表標題 CADASIL and CARASIL
3. 学会等名 19th International Congress of Neuropathology（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 齋藤理恵, 他田真理, 柿田明美ら
2. 発表標題 Astrocytic features in white matter of patients with CADASIL and Binswanger's disease
3. 学会等名 第59回神経学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Rie Saito, Kazuki Tainaka, Akiyoshi Kakita
2. 発表標題 Small vessel characteristics of autopsied patients with CADASIL and those heterozygous for HTRA1 mutations: 3D analysis using the Cubic tissue clearing technique
3. 学会等名 American Academy of Neurology (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

新潟大学脳研究所病理学分野研究内容 <a href="https://pathology-bri-niigata-u.jp/topics/">https://pathology-bri-niigata-u.jp/topics/</a>
--

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