

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 9 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860234

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発症機構の解明

研究課題名(英文)Pathomechanisms 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・助教

研究者番号：00572306

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：孤発性のアミロイド 蛋白(A $\beta$ )が髄膜および脳内の血管壁に沈着して生じる脳アミロイドアンギオパチー(CAA)では炎症・血管炎(CAA関連炎症)を生じるが、炎症を生じるメカニズムの詳細は不明である。本研究ではCAAおよびCAA関連炎症の症例について、当教室で保存されている検体と全国多施設より新たに収集した脳脊髄液、病理組織標本、DNAを用いて、炎症の発症に関する蛋白質やサイトカインの検討を行った。脳脊髄液では特定のサイトカインの増加を生じていることを明らかとし、CAAに関連した炎症を生じる機序の一端を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Cerebral amyloid angiopathy (CAA) characterized by deposition of amyloid protein in the vessel walls in the central nervous system rarely develops inflammation and/or vasculitis (CAA-related inflammation). Although CAA is commonly observed in elder people, details of the pathomechanisms of CAA-related inflammation are still uncertain. In this study, I have collected samples from the patients with CAA and CAA-related inflammation throughout Japan, such as cerebrospinal fluid, brain tissue, and DNA. Cerebrospinal fluid samples in patients with CAA-related inflammation demonstrated alteration of inflammatory cytokines. These data disclosed pathomechanisms of CAA-related inflammation.

研究分野：神経病理学

キーワード：脳アミロイドアンギオパチー 炎症

### 1. 研究開始当初の背景

脳アミロイドアンギオパチー (CAA) は髄膜および脳内の血管壁にアミロイド化した蛋白の沈着を認める疾患である。CAA は沈着したアミロイド蛋白によって病型分類されるが、孤発性のアミロイド蛋白 (A) の沈着による A 型 CAA が大多数を占める。A 型孤発性 CAA は反復して生じる脳葉型脳内出血の原因として知られていたが、近年、多発性皮質微小出血・梗塞、白質脳症、認知機能障害、沈着した A に対する免疫反応によって生じる炎症・血管炎 (CAA 関連炎症) の原因となることが注目されている。これまで、CAA の確定診断は病理学的に行わざるをえず、臨床的に確実度の高い診断をすることは極めて困難であったが、画像診断技術の発達に伴い、無症状の段階や症状出現後における診断が可能となっている。

CAA では通常軽度のリンパ球やマクロファージを主体とした炎症細胞浸潤を伴う。急性または亜急性の認知機能障害や異常行動を認め、頭部 MRI では白質の異常信号や髄膜の造影効果が見られることがある (CAA 関連炎症)。脳生検では多核巨細胞の出現を伴う肉芽腫性血管炎の所見と血管への A の沈着が見られ、マクロファージや多核巨細胞による A の貪食像が認められることもある。CAA 関連炎症では副腎皮質ステロイドや免疫抑制薬の使用により改善したとの報告が多数あり、速やかな診断の確定と治療の開始が必要である。病態については不明な点が多いが、A に対する免疫反応により高度な炎症反応・血管炎を生じることが考えられている。また、A に対する能動免疫を行った臨床試験の剖検報告では、著明な CAA の出現と共に、炎症細胞浸潤を主体とする脳炎を生じたとする報告がある。しかしながら、CAA の頻度と比較して臨床的に有意な炎症・血管炎を生じる症例は明らかに低頻度であり、現時点では CAA 関連炎症を生じる機序の詳細については明らかになっていない。

これまで、孤発性 A 型 CAA の遺伝的危険因子として、炎症に関連するサイトカインである transforming growth factor-1 (TGF-1) の遺伝子多型が当施設の研究グループより報告されていた。近年、脳内の免疫系を担当する細胞であるミクログリアの活動に関連する蛋白である triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM2) の遺伝子多型が同じ A に関連する疾患であるアルツハイマー病 (AD) に関連することが報告された。AD では老人斑として沈着した A の

除去にミクログリアが関連していることが知られており、血管壁に CAA として沈着した A の除去過程において過剰な免疫応答を生じ、CAA 関連炎症を発症する可能性が考えられる。

ミクログリアはその活動性により M1 と M2 に分類されており、M1 は IL-1、TNF-、IL-6、IL-23 といった炎症性サイトカインを産生することで炎症反応の増悪に関与し、M2 は TGF-1、IL-10 といったサイトカインを産生し、組織の修復や炎症の抑制に関与すると考えられている。CAA では通常の状態においても軽度の炎症細胞の浸潤を伴っているため、脳脊髄液内のサイトカインを解析することにより、脳内における血管壁に沈着した A に対してのミクログリア免疫応答の状況を判断することが可能であると思われる。

### 2. 研究の目的

本研究では、孤発性 A 型 CAA を認める症例において、CAA 関連炎症を生じた症例、CAA 関連炎症を合併しなかった症例、A に対する能動免疫を受けた AD 症例 (特に免疫治療後に脳炎を発症した症例) を用いて、TGF-1 や TREM2 といった遺伝子多型の解析、脳組織を用いたこれらのサイトカイン・蛋白質の発現量の変化を解析し、CAA 関連炎症の発症への関連の有無についての検討を行う。また、上記の症例シリーズの脳脊髄液中の各種のサイトカインを測定することにより、CAA 症例の脳内におけるミクログリアの活動性を評価し、CAA 関連炎症の発症予測および予防や治療の端緒とすることが目的である。

### 3. 研究の方法

検体の収集について、CAA 関連炎症は比較的稀な疾患であるため、わが国全体に脳組織 (パラフィンブロックおよび凍結)、血液 (DNA)、脳脊髄液といった生体試料の提供を呼びかけ、CAA 関連炎症、CAA の症例の検体を収集する。対象とする CAA の症例については CAA 関連脳出血に関する Boston criteria に基づき、組織学的な検討が得られた definite CAA のみとすることが望ましいが、検体数が不足することが予想されるため、possible CAA までを含めて検討を行うこととする。CAA 関連炎症の症例については、現時点では利用可能な臨床診断基準がない。従って、病理組織によって確定診断された症例の検体を主に収集するが、症例数が不足することが予想されるため、Chung らが提唱している臨床診断基準 (Chung KK, et al. J Neurol

Neurosurg Psychiatry 2011) を満たした症例も収集する。また、AD 病変の合併の有無についてはこれを問わない。

平成 21 年度より当施設の山田正仁が研究代表者となり CAA に関する生体資料の収集を行っており、これまで 26 検体が当施設に保存されている。本研究では、CAA 関連炎症の症例を中心に全国の多施設に調査および試料提供の依頼を行い検体の収集を行う。また、脳組織については多数の剖検脳の蓄積を行っている施設(新潟大学脳研究所 高橋均教授、柿田明美教授など)にも併せて試料の提供を依頼する。

#### (1) 脳組織における TREM2 および TGF- $\beta$ 1 の定量的な解析

TREM2 の定量的な解析については脳組織に対して免疫組織化学染色を行う予定とした。

TGF- $\beta$  1 の解析については凍結脳を用いてウェスタンブロット法を行う予定であったが、mRNA を利用した RT-PCR 法での定量的な解析を行う予定とした

#### (2) TREM2 および TGF- $\beta$ 1 の遺伝子多型の解析

##### TREM2

AD では TREM2 のエキソン 2 における遺伝子多型(rs75932628 における T アリル(R47H 変異))が AD の遺伝的な危険因子として報告されている。本研究では適切なプライマーを用いてエキソン 2 を PCR 法にて増幅し、この多型の有無について解析を行う。

##### TGF- $\beta$ 1

CAA ではエキソン 1 のコドン 10 における T/C の点変異が CAA の有無に関連することが報告されている。上記と同様に適切なプライマーを用いてエキソン 1 を PCR 法にて増幅し、点変異の有無について検討する。

#### (3) 脳脊髄液中のサイトカインの解析

脳内のミクログリアの活性状況の判定を行うため、脳脊髄液におけるサイトカインについて Bio-Plex system<sup>®</sup> を使用して測定を行う。組織の障害に関連する M1 型のミクログリアでは IL-1、TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-23 を産生するとされ、M2 では TGF- $\beta$  1 や IL-10 を産生するとされており(Boche D, et al. Neuropathol Appl Neurobiol 2013;39:3:18) これらについて解析し、症例シリーズにて比較検討を行う。

## 4. 研究成果

#### (1) 検体収集について

本研究の開始より、全国の多施設に呼びかけて CAA および CAA 関連炎症症例の検体収集を行った。その結果、Boston criteria の possible 以上を満たす CAA 症例については、脳脊髄液 20 例、凍結脳 3 例、パラフィン標本 11 例、DNA 11 例を収集した。新潟大学脳研究所より Boston criteria の definite または probable CAA with supporting pathology の症例について 12 例の凍結脳及びパラフィン標本の提供を受けた。

CAA 関連炎症について、脳脊髄液 9 例、パラフィン標本 2 例(2 例ともに脳脊髄液あり)、DNA 2 例を収集した。新潟大学脳研究所からは別に剖検 2 例と生検 7 例の標本について提供を受けた。CAA 関連炎症の 3 例については、治療前後における経時的な脳脊髄液を収集した。

#### (2) 脳組織における TREM2 と TGF- $\beta$ 1 の定量的な解析について

脳組織における TREM2 の解析について、CAA 関連炎症の 11 例が利用可能であった。しかしながら、使用を予定していた市販の TREM2 に関する 1 次抗体が製造中止となり、予定していた免疫組織化学染色による定量的な評価が行えなかった。

TGF- $\beta$  1 の定量的な解析について、RT-PCR による mRNA の定量を利用した解析を予定した。新潟大学脳研究所より CAA 関連炎症の 2 例、CAA 関連脳出血症例 15 例の凍結脳の提供を受けたが、CAA 関連炎症の症例数が少なく、現時点では定量的な解析は行っていない。今後、凍結脳を増やし、解析を行う予定である。

#### (3) 遺伝子多型の解析について

遺伝子多型の解析について、DNA については CAA 11 例、CAA 関連炎症の症例は凍結脳からの抽出症例を含めて 4 例について検討を行った。CAA 関連炎症の症例数が予定より少ないため、今後も症例の収集を継続し、解析を行っていく予定である。

#### (4) 脳脊髄液のサイトカイン解析について

最終的に CAA 20 例、CAA 関連炎症 9 例について脳脊髄液を収集した。特に、CAA 関連炎症の 3 例については治療前後の経時的な検体を収集した。これらの脳脊髄液を用いて、BioPlex system<sup>®</sup> を使用して脳脊髄液サイトカインの検討を行った。一部のサイトカインでは上昇が認められたが、一部のサイトカインでは対照症例と比較して増減は認められ

なかった。

サイトカインの上昇とどのようなタイプの細胞が活性化されているかについては関連が認められており、今後は病理標本を用いて、どのような炎症細胞によってCAA関連炎症が生じているかを明らかにすることで、脳脊髄液サイトカインの解析結果と併せて、CAA関連炎症における炎症発症機構の解明を行う。

今回の研究結果はCAA関連炎症における炎症機序の解明と今後の治療法開発における基礎的なデータとなると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

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. J Alzheimers Dis、査読あり、55、2017、905-913

Zekonyte J, Sakai K, Nicoll JAR, Weller RO, Carare RO. Quantification of molecular interactions between apoE, amyloid-beta (A $\beta$ ) and laminin: relevance to accumulation of A $\beta$  in Alzheimer's disease. Biochim Biophys Acta、査読あり、1862、2016、1047-1053

Hamaguchi T, Taniguchi Y, Sakai K, Kitamoto T, Takao M, Murayama S, Iwasaki S, 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 Neuropathol、査読あり、132、2016、313-315

Sakai K, Boche D, Carare R, Johnston D, Holmes C, Love S, Nicoll JAR. A $\beta$  immunotherapy for Alzheimer's disease: effects on apoE and cerebral vasculopathy. Acta Neuropathol、査読あり、128、2014、777-789

〔学会発表〕(計 1 件)

Sakai K, Boche D, Johnston D, Holmes C, Love S, Nicoll J. Aquaporin 4 and the response to A $\beta$  immunotherapy in human Alzheimer's disease. 5th International CAA Conference, Boston (USA), 2016.9.8-10.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂井 健二 (SAKAI, Kenji)

金沢大学・附属病院・助教

研究者番号: 00572306