

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 4月 10日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2011

課題番号：20390242

研究課題名（和文） 脳アミロイドアンギオパチー関連脳出血のリスク評価法および予防法の開発

研究課題名（英文） Development of risk assessment and prevention of cerebral amyloid angiopathy-related cerebral hemorrhages

研究代表者

山田 正仁（YAMADA MASAHIRO）

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：80191336

研究成果の概要（和文）：脳アミロイドアンギオパチー（CAA）関連脳出血リスク評価法およびCAA及びCAA関連脳出血の予防法の開発を行った。CAA例を調査研究し、CAA及びCAA関連血管障害のバイオマーカー、危険因子からなるリスク評価法を提案した。CAAの*in vitro*モデルを構築し、フェノール化合物のA $\beta$ 線維化・オリゴマー化抑制効果、作用機序を解明した。それらは*in vivo*モデルにおいてCAAを含む脳アミロイド沈着を抑制した。

研究成果の概要（英文）：We investigated cerebral amyloid angiopathy (CAA) and CAA-related hemorrhages to develop methods of risk assessment and prevention. We propose a table of biomarkers and risk factors to predict future development of CAA-related hemorrhages and other disorders. We established an *in vitro* model of CAA. We revealed that natural phenolic compounds inhibited fibril formation and oligomerization of amyloid  $\beta$ -protein (A $\beta$ ) in *in vitro* and *in vivo* models.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	3,100,000	930,000	4,030,000
2009年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
総計	10,500,000	3,150,000	13,650,000

研究分野：神経内科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・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、脳内出血、MRI、PET、アミロイド $\beta$ 蛋白、実験モデル、天然フェノール化合物

## 1. 研究開始当初の背景

CAAは脳血管に沈着するアミロイド蛋白の種類によって分類されるが、高齢者やAlzheimer病（AD）患者に頻発するCAAは孤発性A $\beta$ 型である。CAAは脳葉型脳内出血、

白質脳症、血管炎等を生じ、認知症と密接に関連する。

孤発性A $\beta$ 型CAA関連病態の発症過程は(1)脳血管へのアミロイド沈着、(2)その結果生じる脳出血等のさまざまな病態の2つのステップに大別され、それぞれに対する危険因子

が存在するものと考えられる。アポリポ蛋白 E (ApoE) と皮質微小出血の存在が CAA と関連することが報告されているものの病理検索なしで CAA 関連脳出血のリスクを評価する方法は未だ確立していない。

また、CAA の予防・治療法でエビデンスのあるものは存在しない。抗 Aβ 療法開発では免疫療法が先行しているが、CAA は治療抵抗性であるばかりか、AD に対する Aβ 免疫療法で、むしろ CAA 関連脳出血が誘発される可能性が示唆されている。

以上のように臨床的ニーズや学術的背景に基づき、孤発性 Aβ 型 CAA 関連脳出血のリスク評価法および予防法の開発研究を着想するに至った。

## 2. 研究の目的

**[1] CAA 関連脳出血のリスク評価法** : CAA 関連脳出血のリスクの評価を、脳画像、生化学マーカー等を用いて観点から行う方法を確立する。

**[2] CAA 関連脳出血の予防法** : CAA の *in vitro* 実験モデルを確立し、それにより CAA に対して有効な化合物をスクリーニングし、さらに *in vivo* のモデル動物を用いてその効果を確認する。

## 3. 研究の方法

**[1] CAA 関連脳出血リスク評価法開発** (山田/吉田)

地域健常高齢者群、認知症患者群を中心に血漿、脳脊髄液、DNA 検体、MRI 及び PET [FDG-PET、アミロイド (PIB-PET)] 画像データを収集し、それらと CAA 及び CAA 関連脳内出血 (CAA-ICH) との関連を解析した。CAA 全国調査で収集した CAA-ICH 303 例を解析した。CAA 及び CAA 関連脳出血・他の CAA 関連血管障害のバイオマーカー及び危険因子のリストを作成し、リスク評価法を提案した。

**[2] CAA 及び CAA 関連脳出血の予防法の開発** (山田/内木)

1. CAA の *in vitro* モデルの作成とそれに基づく阻害化合物の探索 : CAA の *in vitro* モデルを構築し、CAA 阻害 (予防) 効果が予想される化合物を探索し、その作用メカニズムを解析した。

2. CAA *in vivo* モデルを用いた、CAA に有効な抗アミロイド化合物の探索 : *in vitro* モデルで抗アミロイド効果が確認された化合物を脳アミロイドシスモデル動物に長期投与を行い *in vivo* モデルにおける効果を検

討した。

## 4. 研究成果

### [1] CAA 関連脳出血リスク評価法開発

世界初の CAA 全国調査により CAA 関連脳出血 303 例を解析し、わが国の CAA-ICH の臨床像を明らかにした : ① CAA-ICH 発症年齢平均 73.2 歳、女/男は 2.2 で女性に多かった。② 発症時 7.3% が抗血小板薬を内服していた。③ ICH 数は平均 2.0 で、前頭葉と頭頂葉に多かったが、容積補正をすると頭頂葉で最も多かった。④ 平均 35.3 ヶ月のフォロー期間中、31.7% に再発がみられ、再発までの平均期間は 11.3 ヶ月であった。⑤ CAA-ICH に対する脳外科手術は、97.1% の患者で安全に施行し得た。

脳 MRI T2\*GE 法によるアルツハイマー病 (AD) 112 例の脳内微小出血 (BMB) (=CAA 合併の指標) の検討では、AD では正常対照と比較し、脳内微小出血 (BMB) 陽性率が高く、AD と BMB の関連が示された。また、BMB のある AD では、BMB のない AD と比べ側頭葉の代謝低下や萎縮が高度であり、アミロイドの分布が異なっていた。CAA に関連する BMB の存在は脳の灰白質容積、脳糖代謝に影響し、AD の脳機能をさらに低下させていることが明らかになった。

CAA 及び CAA 関連血管障害のバイオマーカー (画像、脳脊髄液など)、危険因子のリストを作成した (表 1)。バイオマーカー 1 項目以上に加えて危険因子が 1 項目以上あれば、CAA 関連脳出血や他の CAA 関連脳血管障害を発症する可能性が高いことが予想される。リスクを定量的に示す評価法を確立するためには、今後、CAA 多数例の前向き研究が必要である。

**表 1. Biomarker findings and risk factors for cerebral amyloid angiopathy (CAA) and CAA-related intracerebral hemorrhages (ICH) and other cerebrovascular disorders (Yamada M. *Front Neurol* 2012)**

### [1] Biomarkers

#### a. Biomarkers suggestive of CAA:

- Amyloid imaging with greater occipital uptake
- Cerebrospinal fluid markers with a decrease of Aβ40 levels

#### b. Biomarkers suggestive of CAA-related ICH and other cerebrovascular disorders:

- Symptomatic lobar intracerebral hemorrhages on CT/MRI
- Microhemorrhages in lobar cortical-subcortical regions on MRI\*
- Convexal, non-aneurysmal subarachnoid

hemorrhages or superficial siderosis on MRI\*  
- Cortical microinfarcts on MRI\*\*  
- Subacute leukoencephalopathy compatible with CAA-related inflammation or angiitis on MRI

## [2] Risk factors

### a. General factors:

- Old age
- Alzheimer's disease

### b. Genetic factors:

- CAA-related gene mutations in familial cases\*\*\*
- Apolipoprotein E gene in sporadic cases: ε4 for CAA and ε2 for hemorrhage.

### c. Non-genetic factors to induce CAA-related hemorrhages:

- Thrombolytic, anti-coagulation, and anti-platelet therapies
- Hypertension
- Minor head trauma

### d. Anti-amyloid therapies

\*Gradient echo T2\* or susceptibility-weighted images are recommended to detect microhemorrhages or focal superficial siderosis.

\*\*Future development of MRI scanners with a higher spatial resolution is necessary to detect cortical microinfarcts.

\*\*\*Some mutations in the AβPP and presenilin genes are associated with severe CAA [see a review (Yamada M, Naiki H. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2012)].

## [2] CAA及びCAA関連脳出血の予防法の開発

1. CAAの *in vitro* モデルの作成とそれに基づく阻害化合物の探索: マイクロプレートを用い、アミロイド線維特異的蛍光色素チオフラビン T の共存下に Aβ ペプチドをインキュベートし、形成した凝集体量をプレートリーダーで、また凝集体の形態を蛍光顕微鏡で、リアルタイムに測定・観察する方法を確立した。試験管内βアミロイド線維重合反応において、生体条件に近づけるため Aβ ペプチドを低濃度にすると、気液界面で線維の重合核を形成することを見いだした。反応容器の気液界面をなくすことでこの問題を回避し、生体内のβアミロイド線維形成をより正確に模倣しうる反応系を構築した。

Aβ凝集 *in vitro* モデルを用いて天然フェノール化合物等に抗アミロイド効果を見出した。5つの天然フェノール化合物(ミリセチン、クルクミン、ローズマリー酸、フェルラ酸、NDGA)はアミロイドβ蛋白(Aβ)の線維化ばかりでなくオリゴマー化を抑制した。NMR解析でミリセチンのAβモノマーの結合部位を解明し、ミリセチンとロスマリン

酸はAβオリゴマーの細胞毒性とシナプス毒性を軽減した。これらの結果から、天然フェノール化合物とAβモノマー及び各種Aβ凝集体との結合は化合物ごとに異なり、ミリセチンやロスマリン酸はAβとの異なった結合によりAβ早期凝集過程と神経毒性をブロックすることが明らかとなった。

2. CAA *in vivo* モデルを用いた、CAAに有効な抗アミロイド化合物の探索: Aβ凝集 *in vitro* モデルを用いて抗アミロイド効果があることが確認されたポリフェノール類等の有機化合物(ミリセチン、クルクミン、ローズマリー酸など)を脳アミロイドシスモデル動物に長期投与し、これらの化合物が脳アミロイド沈着を抑制することを見出した。ロスマリン酸、ミリセチン、クルクミン投与群は対照群と較べてCAAスコアが低く、CAA関連脳出血もみられなかった。

今後、これらの天然フェノール化合物のCAAおよびCAA関連脳出血に対する予防効果を臨床試験で検証していく必要がある。

## 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24件)

- ①Yamada M. Predicting cerebral amyloid angiopathy-related intracerebral hemorrhages and other cerebrovascular disorders in Alzheimer's disease. *Front Neurol*, in press. 査読有
- ②Yamada M, Naiki H. Cerebral amyloid angiopathy. *Prog Mol Biol Transl Sci*, in press. 査読有
- ③Ono K, Li L, Takamura Y, Yoshiike Y, Zhu L, Han F, Mao X, Ikeda T, Takasaki J-I, Nishijo H, Takashima A, Teplow DB, Zagorski MG, Yamada M. Phenolic compounds prevent amyloid β-protein oligomerization and synaptic dysfunction by site specific binding. *J Biol Chem*, in press. 査読有
- ④Sakai K, Hayashi S, Sanpei K, Yamada M, Takahashi H. Multiple cerebral infarcts with a few vasculitic lesions in the chronic stage of cerebral amyloid angiopathy related inflammation. *Neuropathology*, in press. 査読有
- ⑤Morinaga A, Ono K, Takasaki J, Ikeda T, Hirohata M, Yamada M. Effects of sex hormones on Alzheimer disease-associated β-amyloid oligomer formation *in vitro*. *Exp Neurol* 228:298-302, 2011. 査読有
- ⑥Takasaki J-I\*, Ono K\*, Yoshiike Y, Hirohata M, Ikeda T, Morinaga A,

Takashima A, Yamada M. Vitamin A has antioligomerization effects on amyloid  $\beta$ -protein *in vitro*. *J Alzheimers Dis* 27:271-280, 2011. \*contributed equally 査読有

⑦Hamaguchi T, Ono K, Yamada M. Curcumin and Alzheimer's disease. *CNS Neurosci Ther* 16:285-297, 2010. 査読有

⑧Hirohata M, Yoshita M, Ishida C, Ikeda S-I, Tamaoka A, Kuzuhara S, Shoji M, Ando Y, Tokuda T, Yamada M. Clinical features of non-hypertensive lobar intracerebral hemorrhage related to cerebral amyloid angiopathy. *Eur J Neurol* 17:823-829, 2010. 査読有

⑨Ikeda T, Ono K, Elashoff D, Condrion MM, Noguchi-Shinohara M, Yoshita M, Teplow DB, Yamada M. Cerebrospinal fluid of Alzheimer patients promotes amyloid  $\beta$ -protein oligomerization. *J Alzheimers Dis* 21:81-86, 2010. 査読有

⑩Morinaga A\*, Hasegawa K\*, Nomura R, Ookoshi T, Ozawa D, Goto Y, Yamada M, Naiki H. Critical role of interfaces and agitation on the nucleation of A $\beta$  amyloid fibrils at low concentrations of A $\beta$  monomers. *Biochem Biophys Acta - Proteins and Proteomics* 1804:986-995, 2010. \*equally contributed 査読有

⑪Morinaga A, Ono K, Yamada M. New therapeutic strategy for amyloidosis. *Future Neurol* 4:287-289, 2009. 査読有

⑫Hamaguchi T, Ono K, Murase A, Yamada M. Phenolic compounds prevent Alzheimer's pathology through different effects on the amyloid  $\beta$  aggregation pathway. *Am J Pathol* 175:2557-2565, 2009. 査読有

⑬Yamada M. Editorial: Anti-amyloidogenic/protein-misfolding therapies in amyloidosis and other protein-misfolding disorders. *Curr Pharm Design* 14:3203-3204, 2008. 査読無

[学会発表] (計4件)

①Yamada M, Hamaguchi T, Ono K, Hirohata M, Morinaga A, Ikeda T, Takasaki J, Murase A. The effects of phenolic compounds on A $\beta$  aggregation and cerebral A $\beta$  plaques and angiopathy. 2<sup>nd</sup> International CAA Conference, May 15, 2010, UCLA Medical Center (USA)

②Yamada M. Cerebral Amyloid Angiopathy: Epidemiology, Clinical Features and Genetic Risk Factors. The 11th International conference on Alzheimer's disease and Related Disorders, July 29, 2008, McCormick Place (USA)

[図書] (計4件)

①山田正仁 (編). アミロイドーシスー診療のすべて: ガイドライン完全解説、医歯薬出版、東京、2011.

②山田正仁、石田千穂. 脳アミロイドアンギオパチー. 篠原幸人、小川 彰、鈴木則宏、片山泰朗、木村彰男 (編集) 脳卒中治療ガイドライン 2009、協和企画、東京、pp261-262、2009.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山田 正仁 (YAMADA MASAHIRO)  
金沢大学・医学系・教授  
研究者番号: 80191336

### (2) 研究分担者

吉田 光宏 (YOSHITA MITSUHIRO)  
金沢大学・医学系・協力研究員  
研究者番号: 60361995

### (3) 連携研究者

内木 宏延 (NAIKI HIRONOBU)  
福井大学・医学部・教授  
研究者番号: 10227704  
(H20→H21: 研究分担者)