

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究年度終了報告書

遺伝性脳小血管症の病態機序の解明と治療法の開発

二光子レーザー顕微鏡を用いた両側総頸動脈閉塞症における脳微小循環の解析

分担研究者 富本秀和 三重大学 神経病態内科学

研究協力者 矢田健一郎 三重大学 神経病態内科学

研究要旨

両側総頸動脈閉塞症における脳微小循環を、二光子レーザー顕微鏡を用いて観察した。片側閉塞で血流は半分程度まで低下し、両側閉塞後10分程度で血流は完全に停止した。再灌流後の観察においては、白血球のRolling・Adhesion、血小板血栓は、細静脈レベルで著明に観察され、毛細血管レベルでも一部の毛細血管で血流停止が遺残した。

A. 研究目的

遺伝性脳小血管症の病態解明を行う場合、脳小血管の微小循環を、生体内で評価することは必要不可欠である。昨年度は慢性低灌流脳における微小循環を解析し、白血球のRolling・Adhesionが慢性脳低灌流で高率に観察されることを報告した。本年度は慢性脳低灌流で特徴的に観察される血球の接着現象が発生する機序を解析する目的で、両側総頸動脈閉塞・再灌流させ灌流圧が変化する時の微小循環動態を観察した。

B. 研究方法

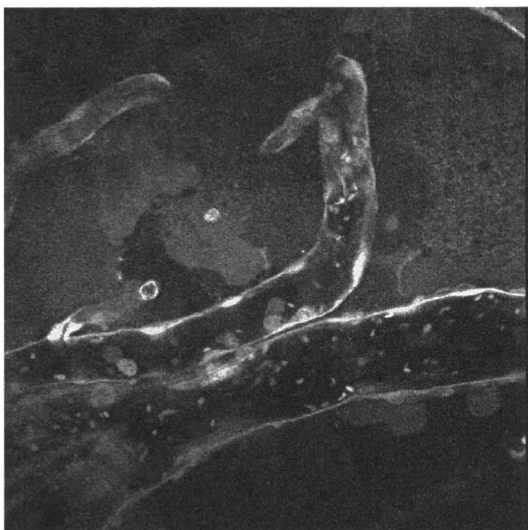
アクチンプロモーター領域にGFAをtransgenicしたGreen mouse(C57BL/6 TgN(b-act-EGFP)0sb)を用いて、両側総頸動脈に交連した絹糸を牽引することにより段階的に脳低灌流状態を作成した。左大脳を開頭し、閉塞前、左総頸動脈閉塞、右総頸動脈閉塞、両側総頸動脈再開通までの状態を二光子レーザー顕微鏡を用いて連続的に

観察した。白血球、血小板は、GFP陽性細胞として観察した。また、Tex Red 標識Dextranを静脈内投与することにより、赤血球はTexRed欠損陰影として観察し、この赤血球陰影の移動をLine scanningすることによりVelocityを測定した。

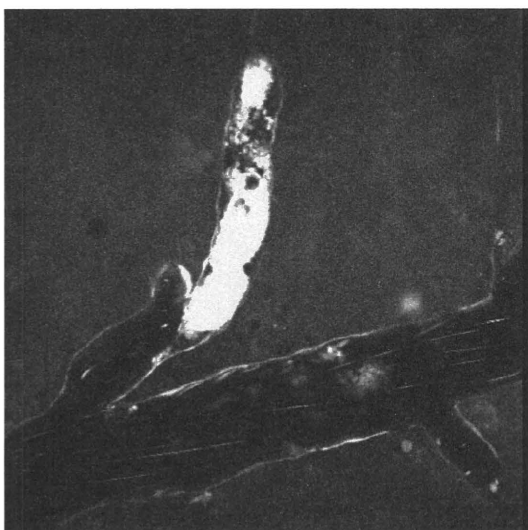
C. 研究結果

左総頸動脈閉塞に伴い、velocityはほぼ半分程度まで低下した。さらに、右総頸動脈閉塞を加えることにより、Velocityは著明に低下したが、最終的に10分程度でほぼ血流は停止した。総頸動脈の再開通に伴い、血流は再開したが前値の50%程度の回復であった。再開通後の観察では、細動脈レベルでは、明らかな異常所見は認められなかったが、細静脈レベルでは、著明な白血球のRolling・Adhesionが認められた(写真A)。また、再開通早期に、細静脈レベルで血小板血栓の急激な形成が認められた(写真B)。毛細血管レベルでは、再開通に

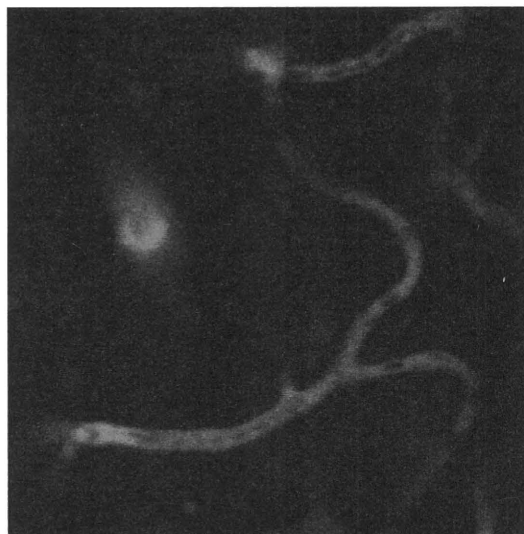
も係わらず、血流の再開しない毛細血管が多数観察された (no reflow 現象; 写真 C)。



A:再灌流後の細動脈と細静脈(上:細静脈、下:細動脈)細静脈に白血球の Adhesion が著明に認められた。



B:再灌流後の細静脈。再灌流後に血小板血栓の急激な形成が認められた。



C:再灌流後の毛細血管。毛細血管レベルでは、血流が再開した毛細血管が多数認められた (右上方の毛細血管は血流停止)。

#### D. 研究発表

##### 1. 発表論文

富本秀和：皮質下血管性認知症の診断と治療。臨床神経学 2010 50(8)：539-546

##### 2. 学会発表

二光子励起レーザー顕微鏡を用いたマウス脳低灌流状態における血行動態の評価日本神経学会総会 2010.5 東京

#### E. 知的財産権の出願・登録状況 (予定含む)

(特許取得・実用新案登録・その他)

#### F. 健康危険情報

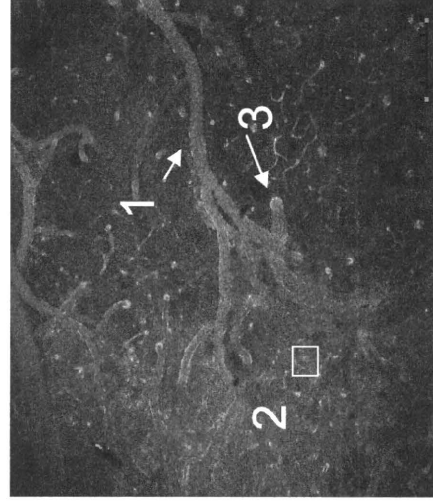
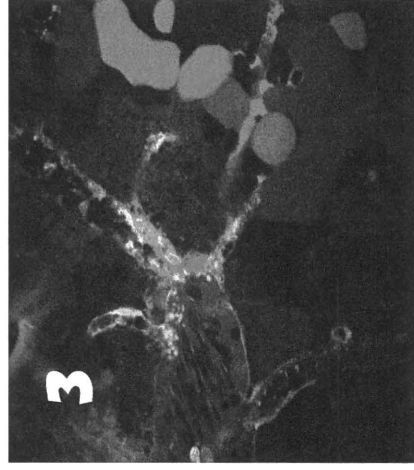
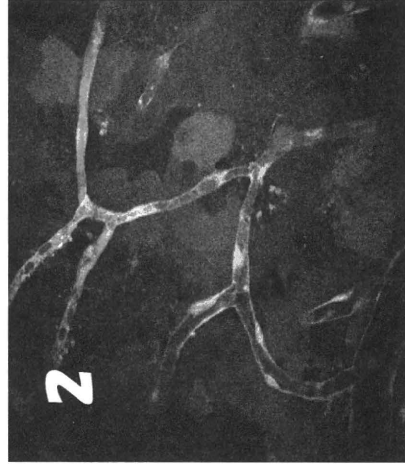
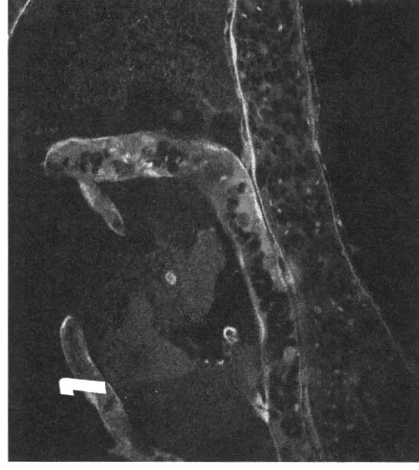
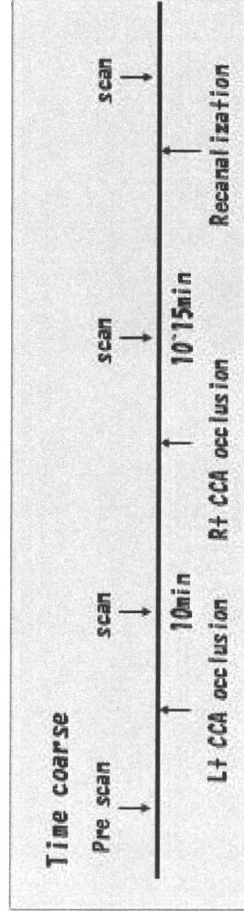
(国民の生命・健康に重大な影響を及ぼす情報として厚生労働省に報告すべきものについて把握した過程、内容、理由を記載する。またその情報源の詳細。)

# 二光子レーザー顕微鏡を用いた両側総頸動脈閉塞症における脳微小循環の解析

## ★ 両側頸動脈閉塞症モデル

両側総頸動脈に交絡した絹糸を牽引することにより段階的に血流を低下。

- ・ GFP-Tg mice (Green mouse) actin promoter labeling
- ・ Tex Red 標識 Dextranを用いて plasma labeling
- ・ 二光子レーザー顕微鏡を用いて観察



- ・ 一過性脳虚血後の再灌流後に毛細血管(2)、細静脈(3)で白血球(緑)のrolling、adhesionが観察される。
- ・ No reflow 現象にrolling、adhesionの関与が示唆される。

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)

分担研究年度終了報告書

遺伝性脳小血管病の病態機序の解明と治療法の開発

血液脳関門の研究(モデル動物)

分担研究者 伊東 史子 筑波大学大学院人間総合科学研究科・実験病理学

研究要旨

TGF- $\beta$  シグナルを伝達する Smad2, Smad3 を血管内皮細胞特異的に欠損させると、胎生 11.5 日に全身から出血を認め、胎生 13.5 日までに致死となる。しかしながら、一方で Smad2, Smad3 はアクチビンのシグナル伝達を担っているため、これまでに見られた表現系が TGF- $\beta$  シグナルの欠損によるものであることを検証する必要がある。そこで、血管内皮細胞特異的に TGF- $\beta$  シグナルを欠損したマウスを) 作製し、血管新生について検証を行った。さらに、Smad2, Smad3 を欠損した血管内皮細胞の動態を明らかにする為に、血流から受ける圧力に対する遺伝子変動を検討した。

A. 研究目的

TGF- $\beta$  シグナルは、血管内皮細胞上の I 型 II 型受容体を介して血管新生を正負両面から調節している。細胞内シグナル伝達因子 Smad2, Smad3 を血管内皮細胞特異的に欠損した(CDKO)マウスの解析から、TGF- $\beta$  シグナルが単なる血管新生抑制因子ではなく、血管の成熟過程に必須のシグナルであることを明らかにしてきた。しかしながら、TGF- $\beta$ /Smad2/3 シグナルの生体での分子メカニズムの詳細は明らかではなく、生体に近い条件でその分子メカニズムを明らかにする必要がある。

さらに、Smad2/3 は TGF- $\beta$  シグナルだけでなくアクチビンシグナルの伝達にも関与しているため、CDKO マウスで得られた表現系が確かに TGF- $\beta$  シグナルによるものであることを検証する必要がある。

B. 研究方法

遺伝子改変マウス胎仔由来の不死化させた Smad2/3 欠損血管内皮細胞を用いて、血

流から受けるずり応力 (シヤストレス) への影響を検討した。

TGF- $\beta$ I 型及び II 型受容体のコンディショナルノックアウトマウスと Tie2-Cre マウスを交配した。血管内皮細胞特異的に受容体を欠損させたマウスは出生しないため、胎仔の解析を行った。

(倫理面への配慮)

動物実験及び組換え DNA 実験は、国立大学大学法人筑波大学動物実験取扱規定及び国立大学法人筑波大学法人遺伝子組換え実験取扱規定に従い、適切に研究を行った。

C. 研究結果

TGF- $\beta$ I 型及び II 型受容体を血管内皮細胞特異的に欠損させたマウス、ALK5<sup>F/F</sup>; Tie2-Cre, T $\beta$ RI<sup>F/F</sup>; Tie2-Cre では血管内皮細胞特異的 Smad2/3 欠損マウス(Smad2<sup>F/F</sup>; Smad3<sup>-/-</sup>; Tie2-Cre(CDKO))マウスと同様の表現系を示し、CDKO マウスで得られた表現系は、確かに TGF- $\beta$  シグナル欠損に依存

することが示された。さらに非常に面白いことに、ALK5<sup>FF</sup>; Tie2-Cre, TBRI<sup>FF</sup>; Tie2-Cre マウスは CDKO マウスよりも約半日長生きして胎生 14 日ごろまでに死亡しており、Smad2/3 の代償シグナルの存在が示唆された。

血管内皮細胞を動脈圧のシェアストレス下で培養し、マイクロアレイ解析を行ったところ、多数の遺伝子の変動した。その中には TGF-β シグナルの標的分子が見られたが、Smad2/3 を欠損した血管内皮細胞では、それら分子の変動はみられなかった。

#### D. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Nakano N, Itoh S, Watanabe Y, Maeyama K, Itoh F & Kato M. Requirement of TCF7L2 for TGF-β-independent transcriptional activation of the TMEPAI gene. *J. Biol. Chem.*, 285, 38023-38033 (2010)
2. Ishitobi H, Matsumoto K, Azami T, Itoh F, Itoh S, Takahashi S & Ema M. *Flik1-GFP* BAC Tg mice: an animal model for the study of blood vessel development. *Exp. Anim.*, 59, 615-622 (2010)
3. Tanaka A, Itoh F, Nishiyama K, Takezawa T, Kurihara H, Itoh S & Kato M. Inhibition of endothelial cell activation by bHLH protein E2-2 and its impairment of angiogenesis. *Blood*, 115, 4138-4147 (2010)

##### 2. 学会発表

1. 伊東史子、伊東進. 血管・リンパ管安定性維持における TGF-βシグナルの役割解明 第 18 回血管生物医学会学術集会 (2010)
2. Itoh F: Involvement of TGF-β/Smad signaling in Angiogenesis and lymphangiogenesis. TGF-β meeting. Leiden, the Netherlands. (2010)
3. Itoh F, Itoh S, Adachi T & Kato M: Vascular endothelial cell-specific Smad2 and Smad3 signaling is required for blood vessel integrity. The 59<sup>th</sup> Fujiwara International Seminar. Tomakomai, Japan (2010)
4. Itoh F, Itoh S, Adachi T, Festing M, Weinstein M & Kato M: Impairment of vascular stability by endothelial specific ablation for Smad2 and Smad3 genes the 16<sup>th</sup> International Vascular Biology Meeting. Los Angeles, California, U.S. (2010).

#### E. 知的財産権の出願・登録状況(予定含む)

(特許取得・実用新案登録・その他)

なし

#### F. 健康危険情報

(国民の生命・健康に重大な影響を及ぼす情報として厚生労働省に報告すべきものについて把握した過程、内容、理由を記載する。またその情報源の詳細。)

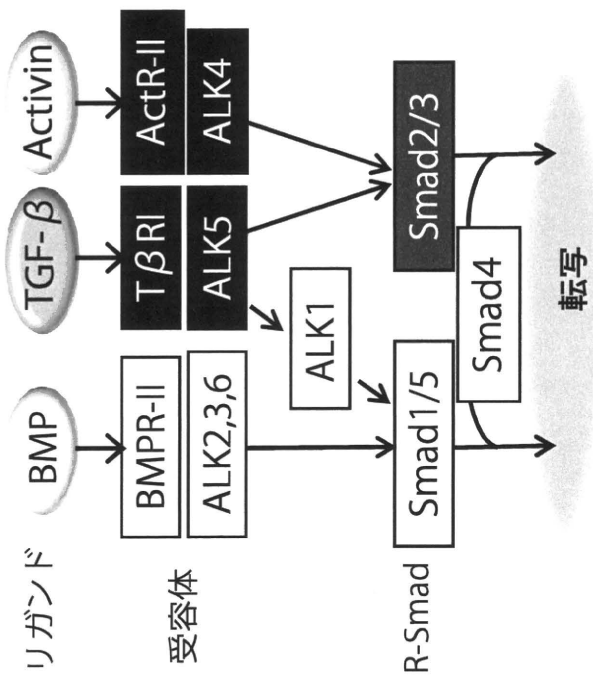


図1 TGF- $\beta$ ファミリーシグナルの概略図  
 TGF- $\beta$ シグナルは細胞膜上のI型(ALK5), II型受容体による、Smad2, Smad3のリン酸化を介して伝達される。しかし、Smad2, Smad3はアクチビンシグナルの伝達も担っている。

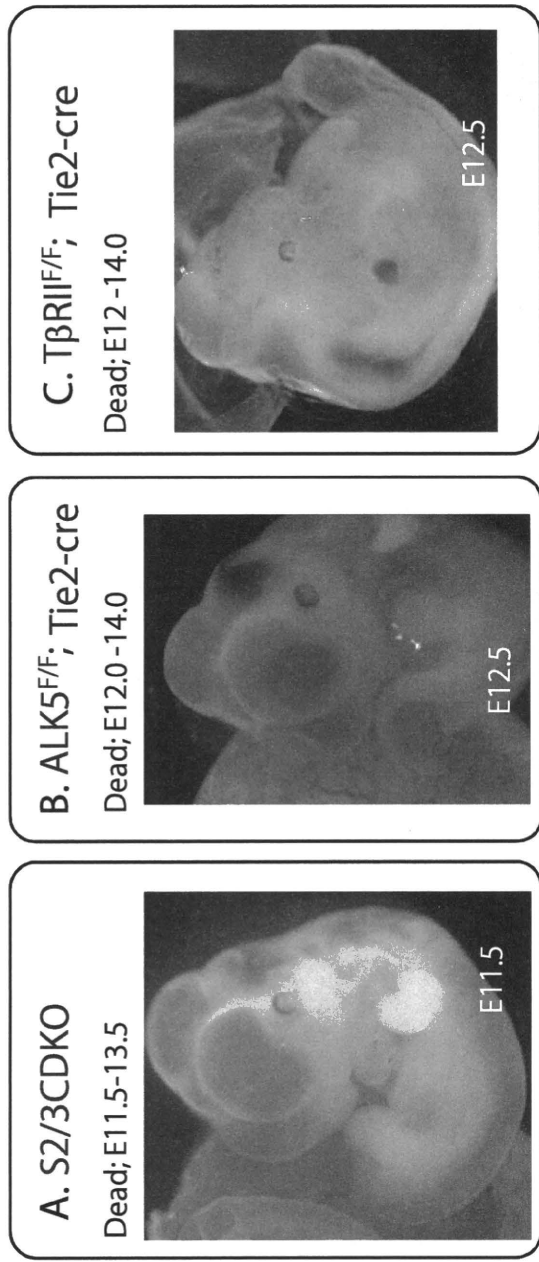


図2 血管内皮細胞特異的TGF- $\beta$ シグナルマウス胎仔の表現系

CDKOマウスは胎生11.5日に全身で出血が認められた。また、血管内皮細胞特異的にALK5(B)またはT $\beta$ RII(C)を欠損させたマウスでは、胎生12.5日に出血が認められ、CDKOマウスより半日遅く死亡が確認できた

血管内皮細胞の樹立

シエアストレス下、変動する遺伝子の網羅的同一

シエアストレス下、TGF- $\beta$ シグナルの標的遺伝子の変動がみられたが、CDKO由来血管内皮細胞では見られなかった

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)

分担研究年度終了報告書

遺伝性脳小血管病の病態機序の解明と治療法の開発

脳虚血再還流 BBB モデルの作成と BBB 保護薬としての ARB の薬効検定

分担研究者	丹羽 正美	長崎大学大学院医歯薬学研究科神経薬理学分野
研究協力者	中川 慎介	長崎大学大学院医歯薬学研究科神経薬理学分野
	宗 剛平	長崎大学大学院医歯薬学研究科脳神経外科
	永田 泉	長崎大学大学院医歯薬学研究科脳神経外科

研究要旨

血液脳関門 (Blood-brain barrier, BBB) は、脳小血管病の虚血性脳血管病変における神経細胞救済のための標的システムである。我々は、*in vitro* 低酸素再酸素を利用した再現性の高い正確な脳虚血再還流 BBB モデルを作成した。BBB 保護を目的とする薬剤の薬効検定に有用で、今回我々は、このシステムを用いてアンジオテンシン II 受容体拮抗薬 (ARB) candesartan の BBB 保護効果を明らかにした。

A. 研究目的

遺伝性脳小血管病 (CARASIL) の脳小血管異常による多発性脳梗塞と白質脳症は、虚血再還流障害による神経細胞死を引き起こし血管認知症の原因となる。血液脳関門 (BBB) の保護が神経細胞を救済するため、BBB 保護薬の探索が必要である。本研究では、BBB 保護薬の薬効スクリーニングのための再現性のある *in vitro* 実験系の確立を目指した。さらに、薬効スクリーニング系としての有用性の確認のために、本実験系を用いてアンジオテンシン II 受容体拮抗薬 (ARB) candesartan の BBB 保護効果を検証した。

B. 研究方法

脳虚血再還流 BBB モデルの作成手順: (1) 虚血開始前の BBB キットの電気抵抗 (TEER) を測定する。(2) Normoxia 群は血清なしの DMEM (glucose 4.5g/L) に交換する。Hypoxia 群は血清なしの DMEM (glucose free) で 1 回洗浄後、DMEM (glucose free) に交換する。(3) 酸素吸着剤 (Anaero Pack®) により低酸素負荷を行う。(4) CO<sub>2</sub> インキュベーターで 6 時間 (hr) インキュベートする。Normoxia 群はそのままインキュベーターへ。(5) インキュベーターから BBB キットを取り出し、培養液 2 に交換する。(6) TEER (経内皮電気抵抗) の測定 (7) 24~30 時

間インキュベート (8) TEER の測定

薬物負荷: candesartan (1 nM, 10 nM, 100 nM) は虚血再酸素実験開始前 2 日間作用させ、3 日目に虚血再酸素実験を開始し、虚血は 6 時間、その後再酸素負荷とし 30 時間まで評価した。

C. 研究結果

1) 脳虚血再還流 BBB モデルの評価: TEER は、再酸素後 24 時間で 80% に低下し、タイトジャンクション (TJs) タンパクの claudin-5 と occludin の顕微鏡的免疫蛍光細胞像検査で、TJs 機能低下を示す蛍光強度の低下、細胞楕円状化、Zipper 様細胞境界蛍光像が観察された。BBB 機能障害が発症していることが確認された。再酸素負荷後、上部チャンパー (管腔側) の adrenomedullin 濃度は、再酸素初期の 1 時間後に有意に増加し、3 時間後さらに有意に増加した。NO<sub>2</sub> と NO<sub>3</sub> 量は、再酸素後 2 4 時間で有意に増加していた。さらに、この虚血再酸素条件による BBB-TJs 機能障害は、100 μM edaravone で回復した。以上から、この虚血 (+無グルコース) 再酸素負荷の実験条件は、*in vivo* 虚血再還流障害を *in vitro* で再現しているものと思われた。

(2) BBB 保護薬としての ARB の薬効検

定： 10 nM candesartan 処置で、6 hr 虚血再酸素後 24 時間で TEER の低下が回復した。TJs タンパクの顕微鏡的免疫蛍光細胞像の乱れも解消された。candesartan 処置群のいずれの濃度でも、管腔側の NO<sub>2</sub>+ NO<sub>3</sub> 濃度および adrenomedullin 濃度には有意な変化はなかった。AT1 受容体タンパク量には変化がみられなかった。Candesartan に、マイルドな虚血再還流障害による BBB 機能障害を防止する効果があることが示唆される。

#### D. 研究発表

1. 論文発表①Tatsumi R, Suzuki Y, Sumi T, Sone M, Suemori H, and Nakatsuji N: Simple and highly efficient method for production of endothelial cells from human embryonic stem cells. *Cell Transplantation* (in press)2010 ② Deli MA, Veszelkaa S, Csiszara B, Totha A, Kittelb A, Csetec M, Siposc A, Szalaic A, Fulopd L, Penked B, Abrahama C, Niwa M: Protection of the blood-brain barrier by pentosan against amyloid-induced toxicity. *Journal of Alzheimers Disease* 22: 777-794, 2010 (doi:10.3233/JAD-2010-100759) ③Yang WM, Jung KJ, Lee MO, Lee YS, Lee YH, Nakagawa S, Niwa M, Cho SS, Kim DW: Transient expression of iron transport proteins in the capillary of the developing rat brain. *Cell Mol Neurobiol* 2010 (doi:10.1007/s10571-010-9558-0) ④Kumagai K, Shirabe S, Miyata N, Murata M, Yamauchi A, Kataoka Y, Niwa M: Sodium pentosan polysulfate brought about cartilage improvement in knee osteoarthritis - An open clinical trial-. *BMC Clinical Pharmacology*10:7, 2010 (doi:10.1186/1472-6904-10-7) ⑤Morofuji Y, Nakagawa S, So G, Hiu T, Horai S, Hayashi K, Tanaka K, Suyama K, Deli MA, Nagata I, Niwa M: Pitavastatin Strengthens the Barrier Integrity in Primary Cultures of Rat Brain Endothelial Cells. *Cell Mol Neurobiol* 30: 727-735, 2010 (doi:10.1007/s10571-010-9497-9) ⑥ Miyata N, Kumagai K, Osaki M, Murata M, Tomita M, Hozumi A, Nozaki Y, Niwa M: Pentosan re-

duces osteonecrosis of femoral head in SHRSP. *Cli ExpHypertens* 32 (8) : 511-516, 2010 (doi:10.3109/10641963.2010.496511)

⑦Yamashita Y, Nabika T, Niwa M: Blood pressure-independent factors determine the susceptibility to delayed neuronal death in the stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Cell Mol Neurobiol* 30: 283-287, 2010 (doi:10.1007/s10571-009-9450-y) ⑧ Sakurai-Yamashita Y, Harada N, and Niwa M: Lercanidipine rescues hippocampus pyramidal neurons from mild ischemia-induced delayed neuronal death in SHRSP. *Cell Mol Neurobiol* (in press) 2011 ⑨中川慎介, 田中邦彦, 田川泰, 丹羽正美: 血液脳関門再構成モデルと機能解明への活用. *分子脳血管病* 9 (3) :17-25, 2010

2. 学会発表①So T et al. The effect of candesartan on blood-brain barrier. 13<sup>th</sup> Intern Symp Signal Transduction in the BBB, Zurich Sep2-4, 2010 ② Tatsumi R et al. Tight junction protein expression and barrier properties of human embryonic stem cells (hES) cell-derived endothelial cells. *Ibid.* ③Yamada N et al. Comparison between in vitro-BBB effects of HGF and TGF-β. *Ibid.* ④Nakagawa S et al. An *in vitro* monkey BBB model. *Ibid.* ⑤Nakagawa S, Maria Deli, Thuy DHD, Sagara M, Yamada N, Tanaka K, Niwa M: Development of *in vitro* monkey BBB model. 第 83 回日本薬理学会年会, 大阪, 2010, *J Pharmacol Sci* 112 (Suppl 1): 91, 2010 ⑥Nakagawa S, Maria Deli, Thuy DHD, Sagara M, Yamada N, Tanaka K, Niwa M: Development of ready-to use 24-well type BBB Kit. 同, *J Pharmacol Sci* 112 (Suppl 1): 189, 2010

#### E. 知的財産権の出願・登録状況 (予定含む)

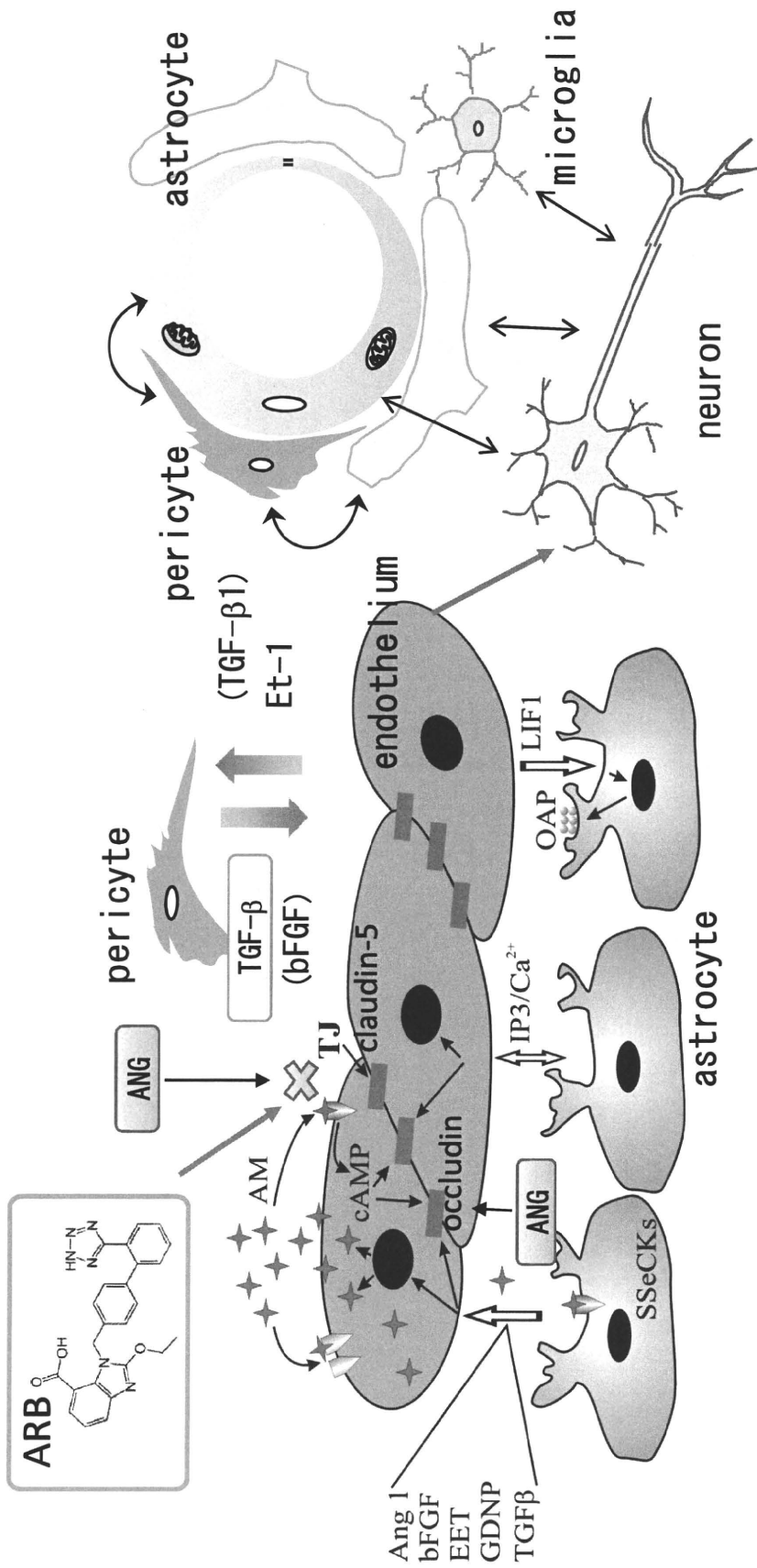
(特許取得・実用新案登録・その他)

なし

#### F. 健康危険情報

(国民の生命・健康に重大な影響を及ぼす情報として厚生労働省に報告すべきものについて把握した過程、内容、理由を記載する。またその情報源の詳細。) なし





## Neurovascular unit & Drugs

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)

分担研究年度終了報告書

遺伝性脳小血管症の病態機序の解明と治療法の開発

CARASIL 原因遺伝子: HtrA1 遺伝子欠損マウスと CARASIL 剖検脳の脳血管病理解析に関する研究

分担研究者	佐藤 俊哉	新潟大学脳研究所動物資源解析学分野
研究協力者	加藤 泰介	新潟大学医学部臓器連関研究センター
	二本松 萌	新潟大学脳研究所神経内科
	廣川 祥子	新潟大学脳研究所動物資源解析学分野
	野崎 洋明	新潟大学脳研究所神経内科
	志賀 篤	新潟大学脳研究所神経内科
	辻 省次	東京大学神経内科
	遠藤 直人	新潟大学医学部臓器連関研究センター、新潟大学整形外科
	西澤 正豊	新潟大学脳研究所神経内科
	小野寺 理	新潟大学脳研究所生命科学リソース研究センター

研究要旨

High temperature requirement A1 (HtrA1) は遺伝性脳小血管病の一つである CARASIL の原因遺伝子であり、HtrA1 遺伝子変異によるプロテアーゼ機能喪失/低下がこの疾患の発症原因であることが推測されている (Hara K et al., N Eng J Med 2009)。CARASIL 患者の脳血管では血管平滑筋細胞の消失をはじめ、弾性板解裂、内膜肥厚化、血管腔拡大などの病理学的所見が存在する。われわれは HtrA1 機能喪失による脳血管への影響を検討する目的で、HtrA1 ノックアウトマウス (HtrA1-KO マウス) の脳血管異常を病理学的に解析した。解析の結果、HtrA1-KO マウスは加齢依存的に血管平滑筋細胞の変性、血管構造異常を示した。また、高血圧負荷によって、HtrA1-KO マウスはワイルドタイプ (WT) マウスと比較して、血管リモデリングの加速、血管平滑筋細胞変性の亢進を示した。また、HtrA1-KO 特異的に虚血変性と思われる病理所見が見られた。HtrA1-KO マウスの血管壁変性が加齢依存的であったこと、さらに高血圧負荷への脆弱性を示すこれらの結果は、HtrA1 の機能喪失は血管ストレス、特に血圧性のストレスに対する脆弱性に繋がることを示唆している。

また、CARASIL 患者剖検脳の病理解析では虚血、炎症性病変が脳内に高度に認められた。さらに、CARASIL 患者脳内には血漿成分を含有した活性化アストロサイトが高頻度に存在し、血液脳関門の破綻が示唆された。

以上のことから、CARASIL の病態発症には、HtrA1 の機能喪失による血圧性ストレス、加齢といった血管変性ストレスへの脆弱性が関与すると考えられる。また、時系列は不明であるが、その進展には炎症、虚血、血液脳関門の破綻が背景に存在することが示唆される(図 1)。

A. 研究目的

脳小血管病は脳血管を病変の首座とし、平滑筋細胞消失、内膜肥厚、弾性板解裂といった変性をきたす。また大脳白質に虚血性変化

に類似した脱髄 (leukoaraiosis) を示す。本症はアルツハイマーと並ぶ、認知症の大きな原因で考えられているが、発症原因は不明である。遺伝性脳小血管病; CARASIL は孤発性

の脳小血管病に病態が酷似し、CARASIL の発症メカニズムの解明は、孤発性脳小血管病研究に大きく寄与することが予想される。

本研究は、主に CARASIL 原因遺伝子; HtrA1 の KO マウスを研究対象とし、HtrA1 の機能喪失がどのように CARASIL 病態を発症させるのかを明らかにすることが目的である。

## B. 研究方法

### ・ HtrA1-KO マウス脳病理解析

マウスの月齢に沿って、4, 8, 16, 23 ヶ月齢の固定脳をサンプリングした。脳血管構造の病理解析を elastic van gieson (EV)、hematoxylin eosin (HE) 染色を用いておこなった。白質変性病変は Klüver-Barrera (KB) 染色を用いて解析した。また、血管平滑筋細胞を  $\alpha$  smooth muscle actin ( $\alpha$ SMA) の免疫染色によって解析した。

マウスへの高血圧負荷は血管収縮薬である angiotensin II の浸透圧ポンプ慢性投与 (60  $\mu$ g/hr/kg, 2 weeks) と血管弛緩阻害薬である L-NAME の飲料水投与 (1.0 mg/ml, 2 weeks) によっておこなった。

### ・ CARASIL 剖検脳病理解析

CARASIL 死後脳の病理解析は HtrA1 遺伝子変異 (C1108T) を持つ患者剖検脳を用いて行った。一般病理解析は HE, EV 染色を用いて行った。炎症性病変解析は、脳血管壁、脳実質内浸潤性炎症系細胞の各マーカータンパク質の免疫染色により行った。

### (倫理面への配慮)

CARASIL 患者剖検脳は、病理解析前にご家族に研究についての同意を得た。また個人情報保護に努め行った。

## C. 研究結果

加齢に沿った病理解析の結果、16, 23 ヶ月齢の HtrA1-KO マウスでは血管壁の薄化、血管腔の拡大所見が見られた。また  $\alpha$ SMA 免疫染色では、23 ヶ月齢の HtrA1-KO マウスの脳軟膜血管における平滑筋細胞の変性/委縮が認められた。

アンギオテンシン II と L-NAME による高血圧負荷実験では、HtrA1-KO マウスに高齢期と同様

の血管平滑筋細胞変性が認められた。また、angiotensin II、L-NAME 共に線条体領域を中心にアストロサイト end-feet の膨化、壊死神経細胞、neuropil の泡沫化といった虚血性病変が認められた。

CARASIL 剖検脳病理解析では、層状壊死やマクローファージ、T 細胞などの炎症系細胞の浸潤といった虚血、炎症性病変が高度に見とめられた。さらに、脳内の多くのアストロサイトが細胞内部に血漿タンパクである fibrinogen をため込んだ活性型アストロサイトの形態を示しており、血液脳関門の破綻が示唆された。

## D. 研究発表

### 1. 論文発表

・ Kato T, Kasai A, Mizuno M, Fengyi L, Shintani N, Maeda S, Yokoyama M, Ozaki M, Nawa H. Phenotypic characterization of transgenic mice overexpressing neuregulin-1. (2010) PLoS One, 5(12):e14185.

・ Kato T, Abe Y, Sotoyama H, Kakita A, Kominami R, Hirokawa S, Ozaki M, Takahashi H, Nawa H. Transient exposure of neonatal mice to neuregulin-1 results in hyperdopaminergic states in adulthood: implication in neurodevelopmental hypothesis for schizophrenia. (2010) Mol Psychiatry, in press.

### 2. 学会発表

なし

(発表誌名・巻号・頁・発行年等も記入)

## E. 知的財産権の出願・登録状況 (予定含む)

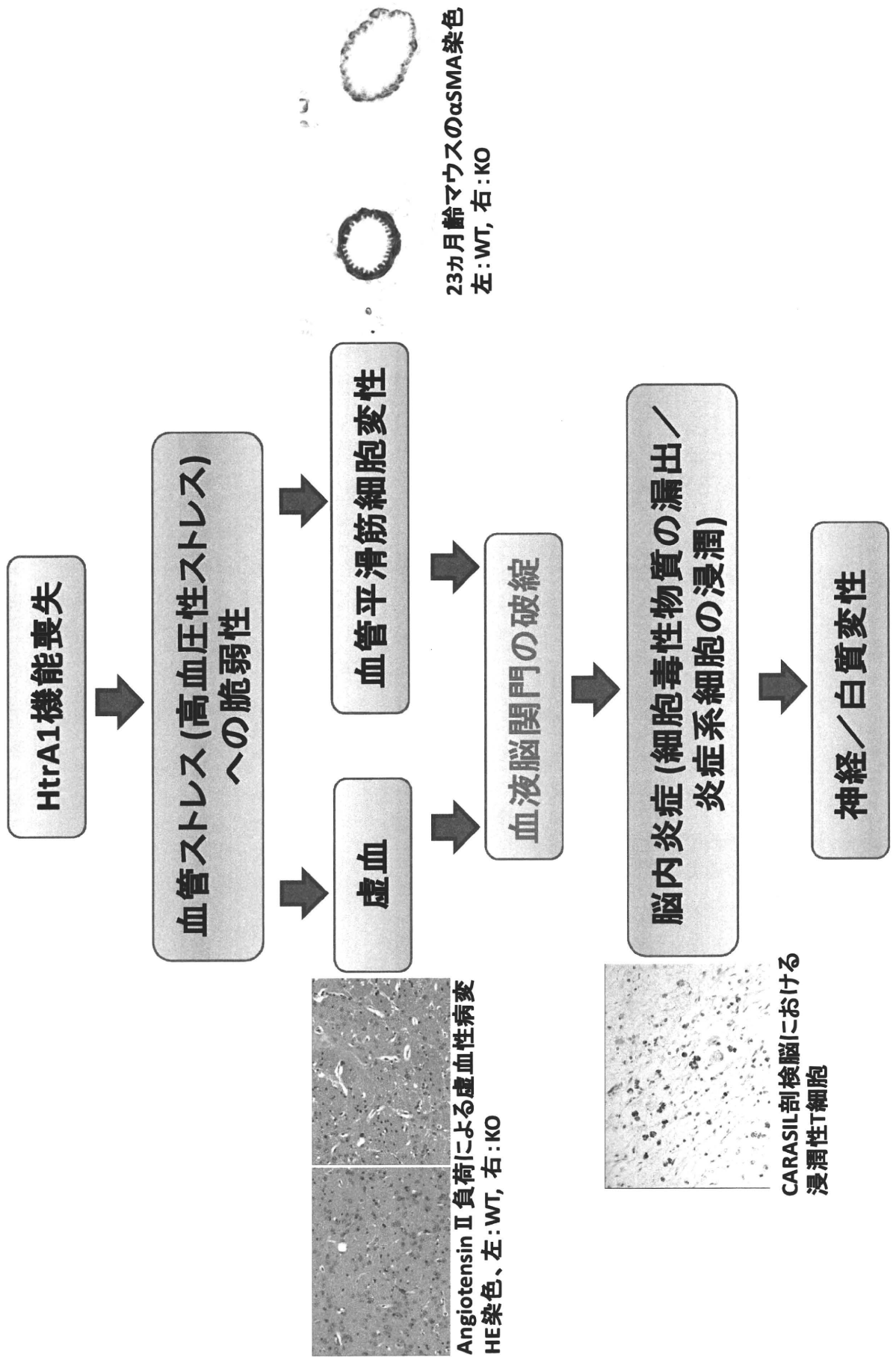
(特許取得・実用新案登録・その他)

なし

## F. 健康危険情報

なし

# 図1. CARASILの病態期機序



### Ⅲ 研究成果の刊行に 関する一覧表

伊東史子

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nakano N, Itoh S, Watanabe Y, Maeyama K, <b>Itoh F</b> & Kato M.	Requirement of TCF7L2 for TGF- $\beta$ -dependent transcriptional activation of the TMEPAI gene.	<b>J. Biol. Chem.</b>	285	38023-38033	2010
Ishitobi H, Matsu moto K, Azami T, <b>Itoh F</b> , Itoh S, Takahashi S & Ema M.	<i>Fli1-GFP</i> BAC Tg mice: an animal model for the study of blood vessel development.	<b>Exp. Anim.</b>	59	615-622	2010
Tanaka A, <b>Itoh F</b> , Nishiyama K, Takezawa T, Kurihara H, Itoh S & Kato M.	Inhibition of endothelial cell activation by bHLH protein E2-2 and its impairment of angiogenesis.	<b>Blood</b>	115	4138-4147	2010
<b>伊東史子</b> 、加藤光保	TGF- $\beta$ ファミリーによる血管新生制御機構.	<b>医学のあゆみ</b>	234	923-927	2010
<b>伊東史子</b> 、伊東進、加藤光保	血管新生におけるTGF- $\beta$ ファミリーの役割と疾患.	<b>実験医学</b>	28	877-882	2010

内野 誠

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
植田明彦 平野照之	CADASIL/CARASIL	青木滋	Clinical Neurosciences	中外出版社	東京	2009	1258-1259

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
A. Ueda, T. Hirano, K. Takahashi, R. Kurisaki, H. Hino, E. Uyama, M. Uchinou.	Detection of granular eosinophilic material of cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy by light microscopy in frozen sections.	<b>Neuropathology and Applied Neurobiology</b>	35	618-622	2009

小野寺理

1: Shiga A, Nozaki H, Yokoseki A, Nihonmatsu M, Kawata H, Kato T, Koyama A, Arima K, Ikeda M, Katada S, Toyoshima Y, Takahashi H, Tanaka A, Nakano I, Ikeuchi T, Nishizawa M, Onodera O. Cerebral small-vessel disease protein HTRA1 controls the amount of TGF- $\beta$ 1 via cleavage of proTGF- $\beta$ 1. Hum Mol Genet. 2011 Feb 23. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 21320870.

2: Onodera O, Nozaki H, Fukutake T. CARASIL . 2010 Apr 27 [updated 2011 Feb 17]. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, Stephens K, editors. GeneReviews [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=gene&part=carasil> PubMed PMID: 20437615.

富本秀和

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
横田徳康、 <u>富本秀和</u> 、高橋良輔ほか	視神経炎様症状を呈した遺伝性血管性白質脳症 (CARASIL) の一例。	日本眼科学会雑誌	113 (4)	505-512	2010
丹羽篤、 <u>富本秀和</u>	海外論文照会：HTRA1 変異と家族性虚血性脳小血管病の関連。	分子脳血管病	9	104-106	2010
丹羽篤、 <u>富本秀和</u>	血管性認知症の病態と臨床的特徴。	Cognition and Dementia	9(3)	201-208	2010
<u>富本秀和</u>	皮質下血管性認知症の診断と治療。	臨床神経学	50(8)	539-546	2010
<u>富本秀和</u>	慢性脳虚血と認知症：慢性脳低灌流モデルを用いた解析。	老年期認知症研究会誌a	17	53-56	2010

## 丹羽正美

雑誌

- ① Tatsumi R, Suzuki Y, Sumi T, Sone M, Suemori H, and Nakatsuji N:  
Simple and highly efficient method for production of endothelial cells from human embryonic stem cells.  
Cell Transplantation (in press) 2010 (doi:10.3727/096368910X547444)
- ② Deli MA, Veszelkaa S, Csiszara B, Totha A, Kittelb A, Csetec M, Siposc A, Szalaic A, Fulopd L, Penked B, Abrahama C, Niwa M:  
Protection of the blood-brain barrier by pentosan against amyloid-induced toxicity.  
Journal of Alzheimer's Disease 22: 777-794, 2010 (doi:10.3233/JAD-2010-100759)
- ③ Yang WM, Jung KJ, Lee MO, Lee YS, Lee YH, Nakagawa S, Niwa M, Cho SS, Kim DW:  
Transient expression of iron transport proteins in the capillary of the developing rat brain.  
Cellular and Molecular Neurobiology 2010 (doi:10.1007/s10571-010-9558-0)
- ④ Kumagai K, Shirabe S, Miyata N, Murata M, Yamauchi A, Kataoka Y, Niwa M:  
Sodium pentosan polysulfate brought about cartilage improvement in knee osteoarthritis - An open clinical trial-.  
BMC Clinical Pharmacology 10:7, 2010 (doi:10.1186/1472-6904-10-7)
- ⑤ Morofuji Y, Nakagawa S, So G, Hiu T, Horai S, Hayashi K, Tanaka K, Suyama K, Deli MA, Nagata I, Niwa M:  
Pitavastatin strengthens the barrier integrity in primary cultures of rat brain endothelial cells.  
Cellular and Molecular Neurobiology 30: 727-735, 2010 (doi:10.1007/s10571-010-9497-9)
- ⑥ Miyata N, Kumagai K, Osaki M, Murata M, Tomita M, Hozumi A, Nozaki Y, Niwa M:  
Pentosan reduces osteonecrosis of femoral head in SHRSP.  
Clinical and Experimental Hypertension 32(8): 511-516, 2010 (doi:10.3109/10641963.2010.496511)
- ⑦ Yamashita Y, Nabika T, Niwa M:  
Blood pressure-independent factors determine the susceptibility to delayed neuronal death in the stroke-prone spontaneously hypertensive rats.  
Cellular and Molecular Neurobiology 30: 283-287, 2010 (doi:10.1007/s10571-009-9450-y)
- ⑧ Sakurai-Yamashita Y, Harada N, and Niwa M: Lercanidipine rescues hippocampus pyramidal neurons from mild ischemia-induced delayed neuronal death in SHRSP. Cellular and Molecular Neurobiology (in press) 2011
- ⑨ 中川慎介, 田中邦彦, 田川泰, 丹羽正美:  
血液脳関門再構成モデルと機能解明への活用.  
分子脳血管病 9(3):17-25, 2010



西澤正豊

1: Shiga A, Nozaki H, Yokoseki A, Nihonmatsu M, Kawata H, Kato T, Koyama A, Arima K, Ikeda M, Katada S, Toyoshima Y, Takahashi H, Tanaka A, Nakano I, Ikeuchi T, Nishizawa M, Onodera O. Cerebral small-vessel disease protein HTRA1 controls the amount of TGF- $\beta$ 1 via cleavage of proTGF- $\beta$ 1. Hum Mol Genet. 2011 Feb 23. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 21320870.

水野敏樹

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kuriyama N, Nagakane Y, Hosomi A, Ohara T, Kasai T, Harada S, Takeda K, Yamada K, Ozasa K, Tokuda T, Watanabe Y, Mizuno T, Nakagawa M	Evaluation of factors associated with elevated levels of platelet-derived microparticles in the acute phase of cerebral infarction.	Clin Appl Thromb Hemost	Feb;16(1)	26-32	2010
Chena C-H, Mizuno T, Elston R, Kariuki MM., Hall K, Unverzagt F, Hendrie H, Gatere S, Kioy P, Patel NB., Friedland RP., Kalaria RN.	A comparative study to screen dementia and <i>APOE</i> genotypes in an ageing East African population.	Neurobiol Aging	May31(5)	732-40	2010
Kuriyama N, Mizuno T, Niwa F, Watanabe Y, Nakagawa M	Autonomic nervous dysfunction during acute cerebral infarction.	Neurol Res.	32(8)	821-827	2010

