

201208027A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

「ヒトの血管性認知症の病態を的確に再現し治療法開発に直結する

新規ラットおよび霊長類モデルの開発研究」

平成 24 年度 **総括**・分担研究報告書

代表研究者 猪原 匡史

平成 25(2013)年 3月

# 目 次

## I. 総括研究報告書

|                                                                                            |   |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|---|
| ヒトの血管性認知症の病態を的確に再現し治療法開発に直結する<br>新規ラットおよび霊長類モデルの開発研究<br>猪原 匡史((公財)先端医療振興財団 先端医療センター) ..... | 1 |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|---|

## II. 分担研究報告書

|                                                                             |   |
|-----------------------------------------------------------------------------|---|
| 1. ヒトの血管性認知症の病態を的確に再現するラットモデルの<br>組織学的変化の解析<br>冨本 秀和(三重大学 大学院 医学系研究科) ..... | 7 |
| 2. ヒトの血管性認知症の病態を的確に再現するラットモデルの画像的解析<br>福山 秀直(京都大学 大学院 医学系研究科) .....         | 9 |

|                           |    |
|---------------------------|----|
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ..... | 11 |
|---------------------------|----|

|                       |    |
|-----------------------|----|
| IV. 研究成果の刊行物・別刷 ..... | 13 |
|-----------------------|----|

# I 総括研究報告書

## 総合研究報告書

### ヒトの血管性認知症の病態を的確に再現し治療法開発に直結する 新規ラットおよび霊長類モデルの開発研究

代表研究者 猪原 匡史（公財）先端医療振興財団 先端医療センター再生医療研究部副部長

**研究概要：**血管性認知症の新規動物モデルの確立のために、高血圧自然発症ラットの総頸動脈に対し、血管を緩徐に狭窄させるアメロイドコンストリクターを装着する。さらに、ケニア霊長類研究所と共同でアヌビスヒビの内頸動脈あるいは椎骨動脈に対する処置を行い、非人類霊長類モデルの確立を目指す。これらのモデル動物に対するイメージング、組織学的解析、行動学的解析を行い、血管性認知症動物モデルとしての妥当性を検証する。

#### 分担研究者名

富本 秀和 三重大学 大学院 医学系研究科  
神経病態内科学 教授

福山 秀直 京都大学 大学院 医学研究科  
附属脳機能総合研究センター 教授

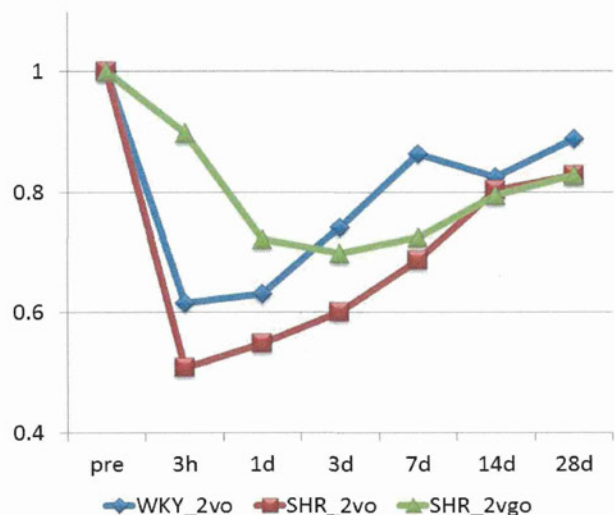
#### A. 研究目的

高血圧などの血管性危険因子に起因する脳小血管病変を再現する高血圧自然発症ラット(SHR)にアメロイドコンストリクターを適応することにより、ヒト血管性認知症の病態をさらに忠実に反映する画期的モデルラットの開発を試みる。最新の画像解析を用いて非侵襲的かつ経時的に脳循環代謝を評価し、行動解析や3次元組織解析などの重層的評価を行い、個体ごとの機能-解剖-表現型の連関解析に取り組む。また、げっ歯類よりも、脳や脳血管の構造がよりヒトに近似するアヌビスヒビの血管性認知症モデルの確立も同時に行う。本研究により、ヒト血管性認知症の病態をより忠実に反映した、ヒトへの外挿性の高いモデル動物の確立を行い、認知症の画期的・独創的医薬品の創製に資する基盤技術とすることを主たる目的とする。

#### B・C. 研究方法および結果

**1. SHR ラットモデルの脳血流推移の解析** (先端医療センター:猪原グループ)

SHRに対するアメロイドコンストリクターを装着した後の脳血流の経時的变化を Laser speckle flowmetry により評価した(下図緑線;SHR\_2vgo). 対照群として、ウイスター京都ラットに対する両側総頸動脈閉塞群(WKY\_2vo;青線)と SHR に対する両側総頸動脈閉塞群(SHR\_2vo;赤線)を準備した. 装着前の脳血流を1とした時の相対値を下図に示す.



SHR に対する両側総頸動脈閉塞手術(図赤線)は、ウィスター京都ラットに対する両側総頸動脈閉塞(図青線)よりも急激な脳血流の低下を誘導し、従来より報告されている通り、高死亡率によるモデル化阻害の主因と考えられた。一方で、SHR に対するアメロイドコンストリクターの装着手術によって、緩徐に脳血流が低下し、処置 3 日後に底値を示し、両側総頸動脈の閉塞処置による急激な脳血流の低下を回避できた(図緑線)。SHR に対する両側総頸動脈閉塞手術は約 20%の死亡率を示したが、アメロイドコンストリクターの装着では 5%未満の死亡率に留まった。

以上より、SHR に対するアメロイドコンストリクターの装着により、ヒトの血管性認知症における「慢性」脳低灌流をよりの確に再現することができた。

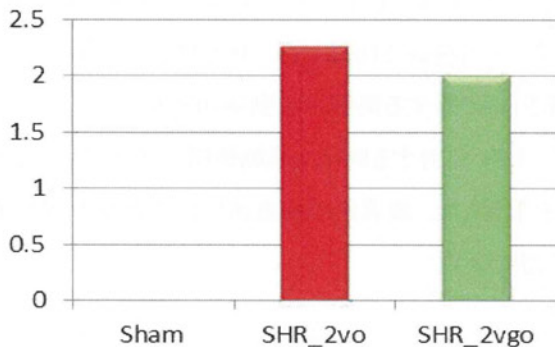
SHR に対するアメロイドコンストリクターの装着手術後 28 日の時点における大脳白質部(Optic chiasm;視交叉部, Corpus callosum ; 脳梁部)の組織学的変化を Klüver-Barrera 染色により Grade 0(低)から 3(高)の 3 段階で評価した。

SHR の両側総頸動脈に対するアメロイドコンストリクター処置(SHR\_2vgo)は、同血管閉塞(SHR\_2vo)に匹敵する程度の大脳白質病変を示した。SHR\_2vgo 群において、急性期の脳血流低下の回避による組織学的変化の軽減は観察されず、むしろ「慢性」脳低灌流を的確に反映できた結果、慢性脳低灌流後の変化としての虚血性大脳白質病変が的確に再現されていた。

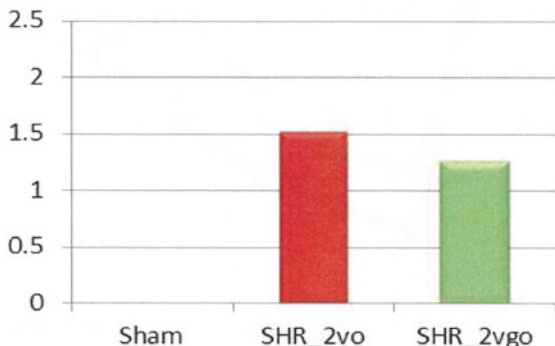
以上より、組織学的な観点からも、ヒト血管性認知症のモデル化を達成できた。

2. SHR ラットモデルの組織学的変化の解析(三重大学: 富本グループ)

Optic chiasm



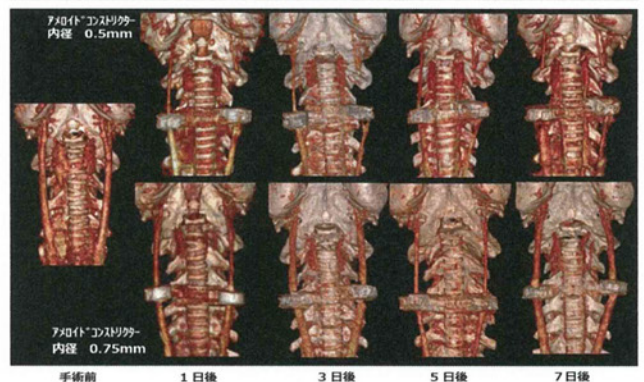
Corpus Callosum (medial)



3. SHR ラットモデルの総頸動脈径の CT アンギオによる観察(京都大学: 福山グループ)

CT アンギオグラムによる頸部血管の観察により、内径 0.7 mm のアメロイドコンストリクターでは総頸動脈は閉塞にまで至らなかったが、内径 0.5 mm を用いると、総頸動脈が手術 3 日目以降に閉塞することが明らかとなった(下図)。

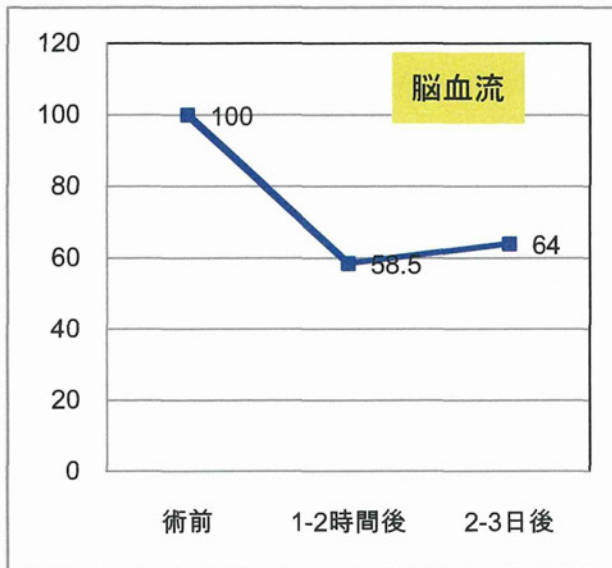
SHR (2VGO)



#### 4. アヌビスヒ血管性認知症モデルの評価(先端医療

センター:猪原グループ)

ラットとヒトの種差には乗り越えることができない障壁がある。この限界を超えるため、本研究提案では、英国ニューカッスル大学との密接な協力関係の下、ケニア霊長類研究センターの助力を得て、霊長類であるアヌビスヒ (Papio Anubis) 血管性認知症モデルの開発を目指している。



上図は、アヌビスヒの両側内頸動脈と左椎骨動脈を閉塞後の Laser Doppler flowmetry にて評価した脳表の脳血流概算値(前値=100)の推移を示す。アヌビスヒは齧歯類と異なり、ヒトに近似した Willis 動脈輪を有し、慢性脳低灌流を再現するためには3動脈の結紮が必要であることが判明した。今後は3動脈閉塞モデルを軸にアメロイドコンストリクターを使用する必要があるかどうかを検討していく。



#### D. 考察

以前我々が施行した、ウイスター京都ラットを用いた実験 (Kitamura A, et al. Neurobiol Aging 2011) では、3日後に両側の総頸動脈の閉塞が確認できたが、今回の SHR を用いた実験では、手術後3日目の時点で一側のみ閉塞が確認され、7日目に両側の閉塞が確認できた。この閉塞の遅延が高血圧によるものか、血管の器質的変化によるものかを検討するため、今後再現性の確認と総頸動脈の組織解析を行う予定である。しかし、手術3日目以降に SHR の総頸動脈が閉塞することは、急激な急性期の脳血流低下を回避し、死亡率を低減することに貢献していると考えられ、CTアンギオを用いた本研究結果からも、本申請課題の最終目的である新規血管性認知症モデル確立への道筋が見えたものと考えている。

さらに、げっ歯類とヒトとの種差を鑑み同時に行っている、アヌビスヒの血管性認知症モデルの確立研究でも、3動脈結紮により脳血流低下を誘導することが出来た。霊長類の Willis 動脈輪はヒトと同様に発達しており、ラットで行ったようなアメロイドコンストリクターの装着を必要としない可能性もあり、今後行動解析や組織解析を追加して、モデル動物としての妥当性を検証していく。

#### E. 結論

本研究事業で確立を目指すヒト血管性認知症のモデルラットおよびモデルヒヒはともに慢性脳低灌流を的確に反映する動物モデルであることがこれまでの研究で明らかとなった。組織学および行動学的な妥当性評価を継続し、ヒトの血管性認知症の医薬品の創製に資する基盤技術モデル動物の確立を目指す。

#### F. 健康危険情報特記なし

#### G. 研究発表

- 1) 国内  
口頭発表・講演: 20 件
- 2) 海外

口頭発表・講演:10 件

原著論文:15 件

そのうち主なもの

1. Akinyemi R, Mukaetova-Ladinska E, Attems J, Ihara M, Kalaria RN. Vascular risk factors and neurodegeneration in ageing related dementias: Alzheimer's disease and vascular dementia. *Curr Alzheimer Res*, in press
  2. Fujita Y, Kuchimaru T, Kadonosono T, Tanaka S, Hase Y, Tomimoto H, Hiraoka M, Kizaka-Kondoh S, Ihara M, Takahashi R. In vivo imaging of brain ischemia using an oxygen-dependent degradative fusion protein probe. *PLoS One* 2012;7(10):e48051.
  3. Kalaria RN, Akinyemi R, Ihara M. Does vascular pathology contribute to Alzheimer changes? *J NeurolSci* 2012;322(1-2):141-147.
  4. Ihara M, Okamoto Y, Takahashi R. Greater suitability of the Montreal Cognitive Assessment against the Mini-Mental State Examination in the detection of vascular cognitive impairment. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, in press
  5. Kitamura A, Fujita Y, Oishi N, Kalaria RN, Washida K, Maki T, Okamoto Y, Hase Y, Yamada M, Takahashi J, Ito H, Tomimoto H, Fukuyama H, Takahashi R, Ihara M. Selective white matter abnormalities in a novel rat model of vascular dementia. *Neurobiol Aging* 2012 ;33(5):1012.e25-35.
  6. Hase Y, Okamoto Y, Fujita Y, Kitamura A, Ito H, Maki T, Washida K, Takahashi R, Ihara M. Cilostazol, a phosphodiesterase inhibitor, prevents no-reflow and hemorrhage in mice with focal cerebral ischemia. *ExpNeurol* 2012;233(1):523-533.
  7. Maesako M, Uemura K, Kubota M, Kuzuya A, Sasaki K, Asada M, Watanabe K, Hayashida N, Ihara M, Ito H, Kihara T, Kinoshita A. Environmental enrichment ameliorated high fat diet-induced A $\beta$  deposition and memory deficit in APP transgenic mice. *Neurobiol Aging*, 2012;33(5):1011.e11-23.
- 学会発表
8. Masafumi Ihara. Animal models of brain hypoperfusion and cognitive impairment. (Nairobi) Dec 7, 2012
  9. Masafumi Ihara. CAA and Cerebrovascular Disease: markers and mechanisms. Animal models II. 3rd CAA meeting (Plenary lecture). (Leiden) Oct 24, 2012
  10. Masafumi Ihara. Cerebral hypoperfusion accelerates cerebral amyloid angiopathy and promotes cortical microinfarcts. World Stroke Congress (Brazilia). Oct 12, 2012
  11. 猪原匡史. シンポジウム1. 血管性認知症の最先端「血管性認知症とAlzheimer病理」第31回日本認知症学会学術集会(つくば). 2012年10月26日
  12. 猪原匡史. 血管病としての認知症～その制圧へ向けた試み～. 第3回VAS-COG Japan 2012(東京). 2012年9月8日

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許出願

出願番号:特願 2012-135906

発明者:猪原匡史、眞木崇州、田口明彦

発明の名称:間質流改善薬

出願人:公益財団法人・先端医療振興財団

出願日 H24 年 6 月 15 日

### 2. 実用新案登録 なし

### 3. その他

研究協力者

服部 頼都(京都大学医学研究科・臨床神経学)

北村 彰浩(金沢医科大学・神経内科)

長谷 佳樹(大津日赤病院・神経内科)

眞木 崇州(マサチューセッツ総合病院)



## Ⅱ 分担研究報告書

## 分担研究報告書

ヒトの血管性認知症の病態を的確に再現するラットモデルの組織学的変化の解析

分担研究者 富本 秀和 三重大学 大学院 医学系研究科 神経病態内科学 教授

**研究要旨：**血管性認知症の新規動物モデルの確立のために、高血圧自然発症ラット(SHR)の総頸動脈に対し、血管を緩徐に狭窄させるアメロイドコンストリクター(内径 0.5 mm)を装着し、装着手術後 28 日の時点における大脳白質部(視交叉部および脳梁部)の組織学的変化を Klüver-Barrera 染色により評価した。SHRの両側総頸動脈に対するアメロイドコンストリクター処置は、同血管閉塞に匹敵する程度の大脳白質病変を示し、慢性脳低灌流としての組織学的妥当性が明らかとなった。

### A. 研究目的

本調査研究では、小血管病を有する高血圧自然発症ラット(SHR)に、血管を緩徐に狭窄させるアメロイドコンストリクター(製品名 SW-MICE-0.5: 内径 0.5 mm および SW-MICE-0.7: 内径 0.7 mm)を用いる。SHR の血圧は 6 週齢で食塩負荷の有無にかかわらず 200 mmHg まで上昇し、徐々に小血管の形態学的変化と機能異常を認める。また、アメロイドコンストリクターは金属製ないしプラスチック製リングの内側にドーナツ状のカゼインコアをもつ閉鎖具であり、血管周囲に装着すれば、カゼインが徐々に組織中の水分を吸収することで膨張し、緩徐に血管を閉塞することができる。

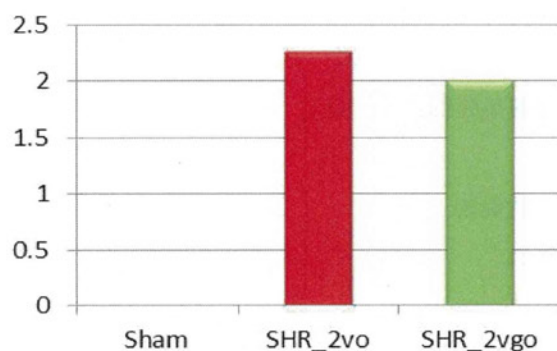
SHR の両側総頸動脈を結紮したこれまでの報告では正常血圧ラットに比し脳虚血の深度が強すぎるため、死亡率が高く、モデルとしては確立が困難であったが、SHR にアメロイドコンストリクターを装着した予備実験では、緩徐な脳血流低下を実現できるため、93.8%の非常に高い生存率を認めた。そこで本申請課題では、血管性認知症の新規モデルの確立のために、SHR の総頸動脈に対し、0.5mm 内径のアメロイドコンストリクターを装着し、大脳白質部の虚血性変化を Klüver-Barrera 染色を用いて評価する。

### B. 研究方法

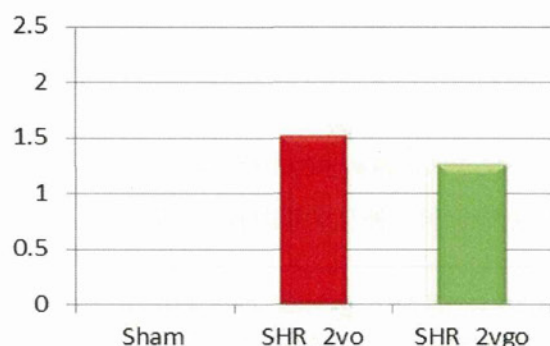
SHR の両側総頸動脈に対して、内径 0.5mm のアメロイドコンストリクターを装着した。装着後 28 日目に灌流固定後に脳を取り出し、Klüver-Barrera 染色により大脳白質部(Optic chiasm; 視交叉部, Corpus callosum; 脳梁部)の組織学的変化を Grade 0(低)から 3(高)の 3 段階で評価した。

### C. 研究結果

#### Optic chiasm



## Corpus Callosum (medial)



SHR に対するアミロイドコンストリクターの装着手術後 28 日の時点における大脳白質部 (Optic chiasm; 視交叉部, Corpus callosum; 脳梁部) の組織学的変化を Klüver-Barrera 染色により Grade 0 (低) から 3 (高) の 3 段階で評価した。SHR の両側総頸動脈に対するアミロイドコンストリクター処置 (SHR\_2vgo) は、同血管閉塞 (SHR\_2vo) に匹敵する程度の大脳白質病変を示した。SHR\_2vgo 群においては、急性期の脳血流低下を回避したことにより組織学的変化が軽くなることはなく、むしろ「慢性」脳低灌流を的確に反映できた結果、虚血性大脳白質病変を代表とする慢性脳低灌流後の変化が的確に再現されていた。

### D. 考察

ラットの総頸動脈に対してアミロイドコンストリクターを装着することで、ヒト血管性認知症における大脳白質病変を再現できることが明らかとなった。慢性的な脳循環不全に基づく組織病変であり、ヒトの病態をより忠実に再現していると考えられた。

### E. 健康危険情報特記なし

### F. 研究発表

#### 原著論文

1. Fujita Y, Kuchimaru T, Kadonosono T, Tanaka S, Hase Y, Tomimoto H, Hiraoka M, Kizaka-Kondoh S, Ihara M, Takahashi R. In vivo imaging of brain ischemia using an oxygen-dependent degradative fusion protein probe. *PLoS One*. 7: e48051, 2012

2. Yang R, Chen L, Wang H, Xu B, Tomimoto H, Chen L. Anti-amyloid effect of neurosteroid PREGS in A $\beta$  25-35-injected mice through  $\sigma$ 1 receptor- and  $\alpha$ 7nAChR-mediated neuroprotection. *Neuropharmacology*. 2012 Nov; 63 (6) :1042-50.
3. Niwa A, Matsuo K, Shindo A, Yata K, Shiraishi T, Tomimoto H. Clinical and neuropathological findings in a patient with familial Alzheimer disease showing a mutation in the PSEN1 gene. *Neuropathology*. 2012 [Epub ahead of print]
4. Ii Y, Maeda M, Kida H, Matsuo K, Shindo A, Taniguchi A, Tomimoto H. In vivo Detection of Cortical Microinfarcts on Ultrahigh-Field MRI. *J Neuroimaging*. 23: 28-32, 2013
5. Otsuka Y, Yamauchi H, Sawamoto N, Iseki K, Tomimoto H, Fukuyama H. Diffuse tract damage in the hemispheric deep white matter may correlate with global cognitive impairment and callosal atrophy in patients with extensive leukoariosis. *AJNR Am J Neuroradiol*. 33: 726-732, 2012

#### 学会発表

6. 富本秀和：脳小血管病の概念と分類。第 37 回日本脳卒中学会総会 福岡 2012. 4. 26-28
7. 富本秀和：脳卒中、認知症を予防する生活習慣。第 53 回日本神経学会学術大会市民公開講座 東京 2012. 5. 26
8. 富本秀和：無症候性白質病変；その病態および症候性白質病変との相違点。第 20 回日本脳ドック学会総会 広島 2012. 6. 15-16
9. 富本秀和：認知症予防における降圧治療の意義。第 35 回日本高血圧学会 名古屋 2012. 9. 20-22
10. 富本秀和：血管性認知症の治療戦略。第 30 回日本神経治療学会総会 福岡 2012. 11. 28-30

### G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他

## 分担研究報告書

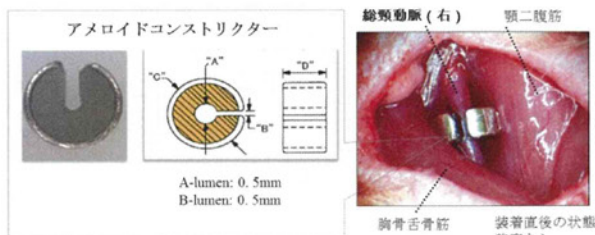
### ヒトの血管性認知症の病態を的確に再現するラットモデルの画像的解析

分担研究者 福山 秀直 京都大学大学院 医学研究科 附属脳機能総合研究センター 教授

**研究要旨：**血管性認知症の新規動物モデルの確立のために、高血圧自然発症ラット(SHR)の総頸動脈に対し、血管を緩徐に狭窄させるアメロイドコンストリクター(内径 0.5 mm または内径 0.7 mm)を装着し、総頸動脈径の経時的変化を CT アンギオにて評価した。内径 0.7 mm のアメロイドコンストリクターでは総頸動脈は閉塞しなかったが、内径 0.5 mm を用いたところ総頸動脈の閉塞が手術 3 日目以降に観察された。よって、SHR の両側総頸動脈へのアメロイドコンストリクターの使用による慢性脳循環不全モデル化への目途が立った。

#### A. 研究目的

本調査研究では、小血管病を有する高血圧自然発症ラット(SHR)に、血管を緩徐に狭窄させるアメロイドコンストリクター(製品名 SW-MICE-0.5: 内径 0.5 mm および SW-MICE-0.7: 内径 0.7 mm)を用いる。SHRの血圧は6週齢で食塩負荷の有無にかかわらず 200 mmHg まで上昇し、徐々に小血管の形態学的変化と機能異常を認める。また、アメロイドコンストリクターはプラスチック製リングの内側にドーナツ状のカゼインコアをもつ閉鎖具であり、血管周囲に装着すれば、カゼインが徐々に組織中の水分を吸収することで膨張し、緩徐に血管を閉塞することができる(下図; Neurobiol Aging 2011 より引用)。



SHR の両側総頸動脈を結紮したこれまでの報告では正常血圧ラットに比し脳虚血の深度が強すぎるため、死亡率が高く、モデルとしては確立が困難であったが、SHR にアメロイドコンストリクターを装着した申請者らの予備実験では、緩徐な脳血流低下を実現できるため、93.8% の非常に高い生存率を認めた。そこで本申請課題で

は、血管性認知症の新規モデルの確立のために、SHR の総頸動脈に対し、2 種類の径のアメロイドコンストリクターを装着し、総頸動脈径の経時的変化を CT アンギオを用いて評価する。

#### B. 研究方法

SHR の両側総頸動脈に対して、内径 0.5mm および 0.7mm のアメロイドコンストリクターをそれぞれ装着した。

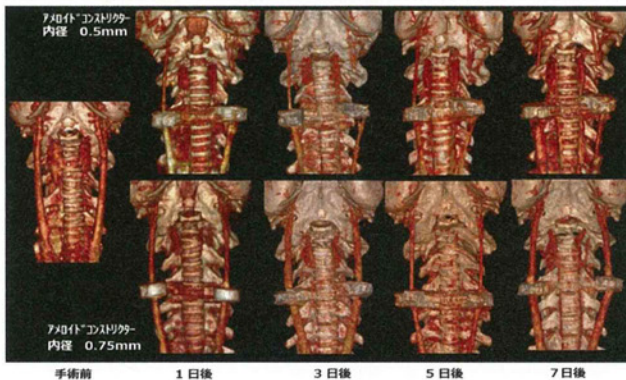
CT アンギオは、小動物用 CT 装置である R<sub>m</sub>CT system (Rigaku 社製)を用いて取得した。インフルラン麻酔下にて、尾静脈より造影剤(Iopamiron 370<sup>®</sup>, 370 mg iodine/ml) 1ml を注射用ポンプを用いて一定速度、27 秒で投与した。CT は、90 kV、100  $\mu$ A の条件下で、アメロイドコンストリクター装着前、装着 1 日後、3 日後、5 日後、7 日後と繰り返し施行した。取得された元データは、filtered backprojection アルゴリズムにより画像再構成を行い、再構成画像は、481 $\times$ 481 $\times$ 481 ボクセルで、ボクセルサイズは、50 $\times$ 50 $\times$ 50  $\mu$ m であった。今回使用したアメロイドコンストリクターのリングが金属製で CT 上アーチファクトの影響もあり、画質の更なる改善を図るために、再構成画像に対して我々が独自に開発した 3D Non-Local Means フィルタによるエッジ保持ノイズ除去も行った。最終的に処理された画像は、OsiriX (version 3.6.1; OsiriX Imaging software, (www.osirix-viewer.com))を用いて 3 次元ボリュームレンダリングを行い、総頸動

脈径の経時的変化を視覚的に評価した。

### C. 研究結果

内径 0.7 mm のアメロイドコンストラクターでは総頸動脈は閉塞しなかったが、内径 0.5 mm を用いたところ総頸動脈の閉塞が手術 3 日目以降に観察された(下図)。

#### SHR (2VGO)



### D. 考察

以前我々が施行した、ウイスター京都ラットを用いた実験 (Kitamura A, et al. Neurobiol Aging 2011) では、3 日後に両側の総頸動脈の閉塞が確認できたが、今回の SHR を用いた実験では、手術後 3 日目の時点で一侧のみの閉塞が確認され、7 日目に両側の閉塞が確認できた。この閉塞の遅延が高血圧によるものか、血管の器質的変化によるものかを検討するため、今後再現性の確認と総頸動脈の組織解析を行う予定である。しかし、手術 3 日目以降に SHR の総頸動脈が閉塞することは、急激な急性期の脳血流低下を回避し、死亡率を低減することに貢献していると考えられ、CT アンギオを用いた本研究結果からも、本申請課題である新規血管性認知症モデルの確立へ道筋が見えたものと考えられる。

### E. 健康危険情報特記なし

### F. 研究発表

### 原著論文

1. Kitamura A, Fujita Y, Oishi N, Kalaria RN, Washida K, Maki T, Okamoto Y, Hase Y, Yamada M, Takahashi J, Ito H, Tomimoto H, Fukuyama H, Takahashi R, Ihara M. Selective white matter abnormalities in a novel rat model of vascular dementia. Neurobiol Aging 2012 ;33(5):1012. e25-35.
2. Hase Y, Okamoto Y, Fujita Y, Kitamura A, Ito H, Maki T, Washida K, Takahashi R, Ihara M. Cilostazol, a phosphodiesterase inhibitor, prevents no-reflow and hemorrhage in mice with focal cerebral ischemia. ExpNeurol 2012;233(1):523-533.

### G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他

### Ⅲ 研究成果の刊行に関する一覧表

原著論文

| 発表者氏名                                                                                                                                                        | 論文タイトル                                                                                                                                                                  | 発表誌名                  | 巻号          | ページ               | 出版年  |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|-------------|-------------------|------|
| Kitamura A, Fujita Y, Oishi N, Kalaria RN, Washida K, Maki T, Okamoto Y, Hase Y, Yamada M, Takahashi J, Ito H, Tomimoto H, Fukuyama H, Takahashi R, Ihara M. | Selective white matter abnormalities in a novel rat model of vascular dementia                                                                                          | Neurobiol Aging       | 33(5):1012  | e25-35            | 2012 |
| Kalaria RN, Akinyemi R, Ihara M.                                                                                                                             | Does vascular pathology contribute to Alzheimer changes?                                                                                                                | J NeurolSci           | 15;322(1-2) | 141-7             | 2012 |
| Okamoto Y, Yamamoto T, Kalaria RN, Senzaki H, Maki T, Hase Y, Kitamura A, Washida K, Yamada M, Ito H, Tomimoto H, Takahashi R, Ihara M.                      | Cerebral hypoperfusion accelerates cerebral amyloid angiopathy and promotes cortical microinfarcts.                                                                     | ActaNeuropathol       | 123         | 381-394           | 2012 |
| Hase Y, Okamoto Y, Fujita Y, Kitamura A, Nakabayashi H, Ito H, Maki T, Washida K, Takahashi R, Ihara M.                                                      | Cilostazol, a phosphodiesterase inhibitor, prevents no-reflow and hemorrhage in mice with focal cerebral ischemia.                                                      | ExpNeurol             | 233         | 523-533           | 2012 |
| Maesako M, Uemura K, Kubota M, Kuzuya A, Sasaki K, Asada M, Watanabe K, Hayashida N, Ihara M, Ito H, Shimohama S, Kihara T, Kinoshita A.                     | Environmental enrichment ameliorated high-fat diet-induced A $\beta$ deposition and memory deficit in APP transgenic mice.                                              | Neurobiol Aging       | 33          | 1011.e11-1011.e23 | 2012 |
| Fujita Y, Kuchimaru T, Kadonosono T, Tanaka S, Hase Y, Tomimoto H, Hiraoka M, Kizaka-Kondoh S, Ihara M, Takahashi R.                                         | In vivo imaging of brain ischemia using an oxygen-dependent degradative fusion protein probe.                                                                           | PLoS ONE              | 7(10)       | e48051            | 2012 |
| Otsuka Y, Yamauchi H, Sawamoto N, Iseki K, Tomimoto H, Fukuyama H.                                                                                           | Diffuse tract damage in the hemispheric deep white matter may correlate with global cognitive impairment and callosal atrophy in patients with extensive leukoaraiosis. | AJNR Am J Neuroradiol | 33(4)       | 726-32            | 2012 |

|                                                                     |                                                                                                                                                                |                          |          |           |      |
|---------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|----------|-----------|------|
| Ii Y, Maeda M, Kida H, Matsuo K, Shindo A, Taniguchi A, Tomimoto H. | In vivo Detection of Cortical Microinfarcts on Ultrahigh-Field MRI.                                                                                            | J Neuroimaging           | 23       | 28-32     | 2013 |
| Yang R, Chen L, Wang H, Xu B, Tomimoto H, Chen L.                   | Anti-amnesic effect of neurosteroid PREGS in A $\beta$ 25-35-injected mice through $\sigma$ 1 receptor- and $\alpha$ 7nAChR-mediated neuroprotection.          | Neuropharmacology        | 63       | 1042-1050 | 2012 |
| Ihara M, Okamoto Y, Takahashi R.                                    | Suitability of the Montreal Cognitive Assessment versus the Mini-Mental State Examination in Detecting Vascular Cognitive Impairment                           | J Stroke Cerebrovasc Dis | in press |           |      |
| Ihara M, Okamoto Y, Hase Y, Takahashi R.                            | Association of Physical Activity with the Visuospatial/Executive Functions of the Montreal Cognitive Assessment in Patients with Vascular Cognitive Impairment | J Stroke Cerebrovasc Dis | in press |           |      |



## IV 研究成果の刊行物・別刷

## Selective white matter abnormalities in a novel rat model of vascular dementia

Akihiro Kitamura<sup>a</sup>, Youshi Fujita<sup>a</sup>, Naoya Oishi<sup>b</sup>, Raj N. Kalaria<sup>c</sup>, Kazuo Washida<sup>a</sup>, Takakuni Maki<sup>a</sup>, Yoko Okamoto<sup>a</sup>, Yoshiki Hase<sup>a</sup>, Mahito Yamada<sup>a</sup>, Jun Takahashi<sup>d</sup>, Hidefumi Ito<sup>a</sup>, Hidekazu Tomimoto<sup>e</sup>, Hidenao Fukuyama<sup>b</sup>, Ryosuke Takahashi<sup>a</sup>, Masafumi Ihara<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Neurology, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto, Japan

<sup>b</sup> Human Brain Research Center, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kyoto, Japan

<sup>c</sup> Institute for Ageing and Health, WRC, Campus for Ageing and Vitality, Newcastle University, Newcastle, UK

<sup>d</sup> Department of Biological Repair, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University, Kyoto, Japan

<sup>e</sup> Department of Neurology, Graduate School of Medicine, Mie University, Tsu, Japan

Received 17 August 2011; received in revised form 25 October 2011; accepted 26 October 2011

### Abstract

Rats subjected to bilateral common carotid artery (CCA) occlusion or 2-vessel occlusion (2VO) have been used as animal models of subcortical ischemic vascular dementia. However, this model possesses an inherent limitation in that cerebral blood flow (CBF) drops too sharply and substantially after ligation of CCAs. To circumvent such hypoxic-ischemic conditions, we tested implantation of the ameroid constrictor device on bilateral CCAs of male Wistar-Kyoto rats and more precisely replicated chronic cerebral hypoperfusion by gradual narrowing of the CCAs (2-vessel gradual occlusion; 2VGO). The acute cerebral blood flow reduction and resultant inflammatory responses observed in the 2VO rats were eliminated in the 2VGO rats. Thus, chronic cerebral hypoperfusion was segregated, and induced selective white matter changes with relatively preserved neurovascular coupling and substantially less metabolic and histological derangements in the gray matter including the hippocampus. This led to significant spatial working memory impairment of a magnitude similar to the 2VO rats at 28 days postoperation. The 2VGO model may more closely mimic cognitive impairment subsequent to selective white matter damage. © 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Vascular dementia; Chronic cerebral hypoperfusion; Ameroid constrictor; White matter change; Rat; Neurovascular coupling

### 1. Introduction

Vascular dementia (VaD) is the second most common cause of dementing illnesses after Alzheimer's disease (AD). Approximately half of all cases of vascular dementia are explained by subcortical ischemic vascular dementia (SIVD) (Yoshitake et al., 1995), which is characterized by lacunar infarctions in the basal ganglia and ischemic white matter changes. Loss of vasomotor reactivity in the small

vessels and resultant chronic cerebral hypoperfusion with blood-brain barrier (BBB) disruption and glial activation may underlie the white matter changes (Marshall and Lazar, 2011; Pantoni, 2010).

To mimic such a pathological condition and explore the underlying mechanisms, several animal models of chronic cerebral hypoperfusion have been developed, including bilateral common carotid artery (CCA) or 2-vessel occlusion (2VO) in rats, bilateral CCA stenosis in gerbils or mice (BCAS) (Shibata et al., 2004), and unilateral CCA occlusion in mice (Yoshizaki et al., 2008). Among these, the rat 2VO model has been frequently used (Jiwa et al., 2010) and may become more important when genetically-modified rats

\* Corresponding author at: Kyoto University, 54 Kawahara-cho, Shogoin, Sakyo, Kyoto 606-8507, Japan. Tel.: +81 75 751 3766; fax: +81 75 751 3265.

E-mail address: ihara@kuhp.kyoto-u.ac.jp (M. Ihara).

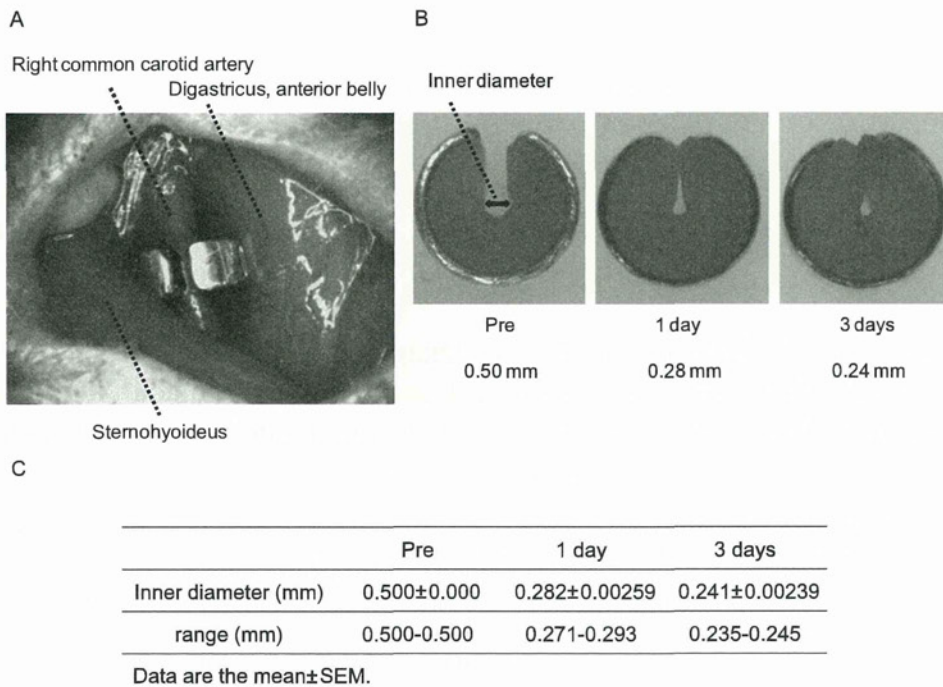


Fig. 1. (A) Surgical implantation of the ameroid constrictor device on the right common carotid artery. (B) Representative images of ameroid constrictors at indicated time points. (C) Table showing the temporal profiles of stenosis of ameroid constrictor before surgical implantation ( $n = 4$ ), and 1 ( $n = 8$ ) and 3 days ( $n = 4$ ) postoperation.

are widely available. The 2VO model exhibits characteristic features of SIVD, such as white matter damage (Wakita et al., 1994, 2002), and cognitive impairment (Farkas et al., 2007; Hainsworth and Markus, 2008; Jiwa et al., 2010). Nevertheless, this model possesses an inherent limitation in that cerebral blood flow (CBF) drops too sharply and substantially after the ligation of the CCAs and remains too low (30%–45% of the baseline level) for 2–3 days; this therefore creates hypoxic-ischemic conditions too severe to replicate “chronic” cerebral hypoperfusion (Marosi et al., 2006). After this acute phase, CBF gradually recovers but still remains relatively low (50%–90%) for 8 weeks to 3 months postoperation (chronic phase) (Otori et al., 2003; Tomimoto et al., 2003). Although the sustained oligemia in the chronic phase is believed to better replicate chronic cerebral hypoperfusion associated with SIVD, the contribution of the preceding acute phase to the neuropathological and behavioral consequences is an ongoing concern (Farkas et al., 2007). We therefore sought to establish a novel rat model that eliminates the acute phase, meaning that CBF would gradually decrease to the level in the chronic phase, using the ameroid constrictor device. This device could predictably achieve gradual narrowing of the CCAs and establish a rat model of SIVD that replicates “chronic” cerebral hypoperfusion more precisely. We therefore henceforth refer to this novel rat model as the “2-vessel gradual occlusion (2VGO)” model.

## 2. Methods

### 2.1. Animals

We used 12- to 14-week-old male Wistar-Kyoto rats (WKY) (See Supplemental Method I for details).

### 2.2. Ameroid constrictor

The ameroid constrictor (Research Instruments NW, Lebanon, OR, USA) consists of a stainless steel casing surrounding a hygroscopic casein material that has an internal lumen. The casein component gradually absorbs water and consequently swells, leading to predictable narrowing and occlusion of the arterial lumen that it encases (Fig. 1). The inner diameter was 0.5 mm, the outer diameter 3.25 mm, and the length 1.28 mm.

### 2.3. Study design

WKY rats were divided into 3 groups: 2-vessel gradual occlusion (2VGO), 2-vessel occlusion (2VO), and sham control groups (Supplemental Method II). Temporal changes of blood flow in the CCAs were recorded by computed tomography-angiography (CTA); the CBF in the frontal cortices was measured by laser speckle flowmetry (LSF; Omega, Zone; Omegawave, Tokyo, Japan), and  $^{18}\text{F}$ -fluorodeoxyglucose (FDG) positron emission tomography (PET) imaging was performed at indicated time points. Histologic evaluation of demyelinating changes

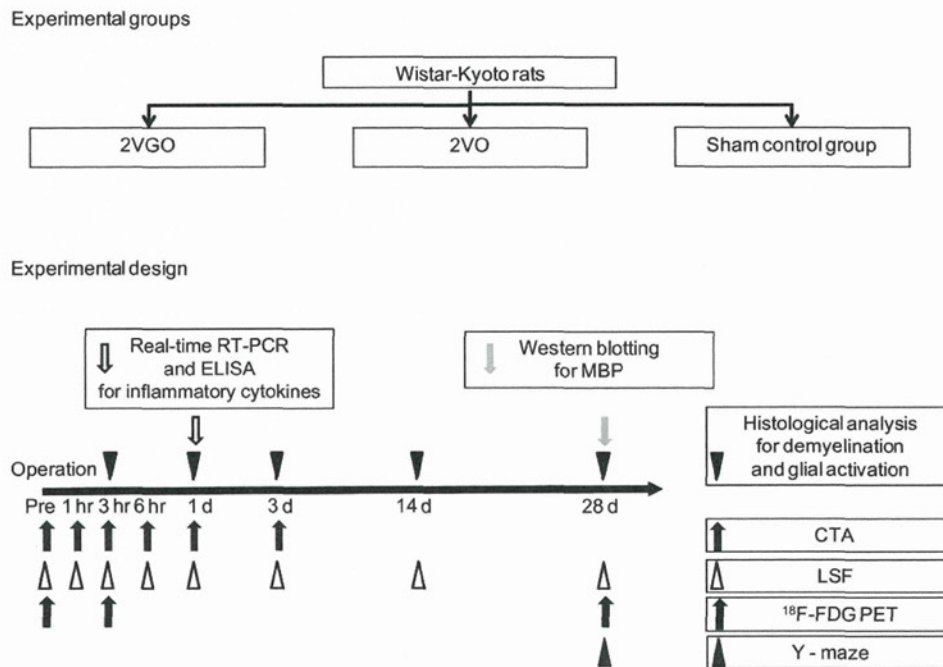


Fig. 2. Experimental protocol. Abbreviations: d, day; hr, hour.

and glial activation, analysis of cerebral messenger RNA (mRNA) and protein levels of inflammatory cytokines and Western blotting analysis of myelin basic protein (MBP) were performed at indicated points. Spatial working memory was assessed by the Y-maze test (Fig. 2).

#### 2.4. Surgical procedure

Under anesthesia, the 2VGO rats were subjected to surgical implantation of ameroid constrictors on the CCAs bilaterally whereas in the 2VO group, both the CCAs were ligated (Supplemental Method III).

#### 2.5. Computed tomography-angiography

CTA of the bilateral CCAs was repeatedly performed under anesthesia using the R\_mCT system (Rigaku, Tokyo, Japan) (Supplemental Method IV).

#### 2.6. Cerebral blood flow, blood pressure, and pulse rate measurement

CBF in the frontal cortices was recorded by LSF under anesthesia with isoflurane, 1.5% (Supplemental Method V).

#### 2.7. <sup>18</sup>F-FDG PET acquisition and image analysis

Small animal PET imaging was performed to assess temporal changes in <sup>18</sup>F-FDG uptake during the first 5 minutes and again between 45 and 90 minutes (Supplemental Method VI).

#### 2.8. Histologic evaluation of demyelinating changes and glial activation

Paraffin-embedded coronal sections of the brain (6  $\mu$ m thick) were analyzed with hematoxylin-eosin (HE) staining for detection of infarcted areas in the forebrain and for neurodegeneration in the hippocampal CA1 and CA3 regions, and with Klüver-Barrera staining for demyelinating changes. The severity of the white matter lesions in the optic chiasma, medial and lateral parts of the corpus callosum, and caudoputamen, was graded as normal (grade 0), disarrangement of the nerve fibers (grade 1), the formation of marked vacuoles (grade 2), and the disappearance of myelinated fibers (grade 3), according to the established criteria (Wakita et al., 1994). They were also immunostained for ionized calcium binding adapter molecule-1 (Iba-1; a marker of microglia; Wako, Osaka, Japan), glial fibrillary acidic protein (GFAP; astrocyte; Dako, Glostrup, Denmark), glutathione S-transferase- $\pi$  (GST- $\pi$ ; oligodendrocyte; Assay Designs, Ann Arbor, MI, USA), degraded MBP (dMBP; demyelinating changes; a gift from Dr. Wakita) (Ihara et al., 2010), and myelin-associated glycoprotein (MAG; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) (Supplemental Method VII).

#### 2.9. Quantitative real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)

Cerebral mRNA levels of the monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )