

201307024A

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 25 年度 **総括**・分担研究報告書

代表研究者 猪原 匡史

平成26 (2014)年 3月

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 25 年度 統括・分担研究報告書

代表研究者 猪原 匡史

平成26 (2014)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 新規ラットおよび霊長類モデルの開発研究 猪原 匡史(独立行政法人国立循環器病研究センター脳神経内科)	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 組織学的変化の解析 富本 秀和(三重大学 大学院 医学系研究科)	11
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 福山 秀直(京都大学 大学院 医学系研究科)	15

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	19
---------------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	21
-----------------------	----

I 総括研究報告書

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

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 独立行政法人国立循環器病研究センター 脳神経内科 医長

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

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
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

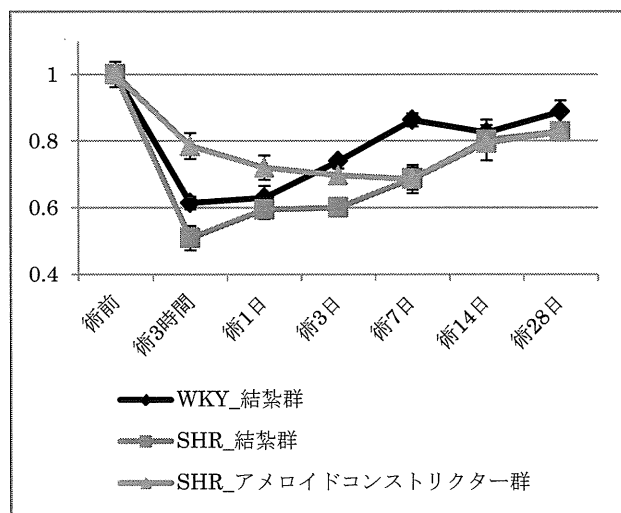
B・C. 研究方法および結果

1. SHR ラットモデルの脳血流推移の解析
(国立循環器病研究センター:猪原グループ, 京都大学:福山グループ)

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。

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変化を Laser speckle flowmetry により評価した(下図△線;SHR_アメロイドコンストリクター群)。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_結紮群;◇線)とSHRに対する両側総頸動脈閉塞群(SHR_結紮群;□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。



従来より、SHR に対する両側総頸動脈閉塞手術は死亡率が高く、モデル化を阻む主因とされていたが、ウイスター京都ラットに対する両側総頸動脈閉塞よりも急激な脳血流の低下が観察された(図;□線)。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、徐々に脳血流が低下し、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;△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。

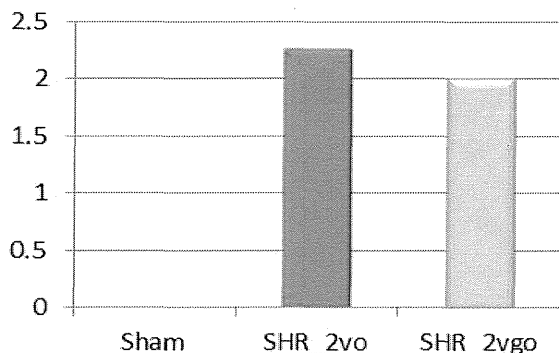
(倫理面への配慮)

動物実験は、課題名「神経変性疾患と血管疾患における病態と治療法に関する研究」として国立循環器病研究センター承認済みであり、動物の扱いに関しては、「動物実験の実施に関する規程」に則って実験が施行された。マウスの使用は、データ採取に必要な最低限の頭数を用いることとし、実験動物の生命倫理に最大限配慮した。

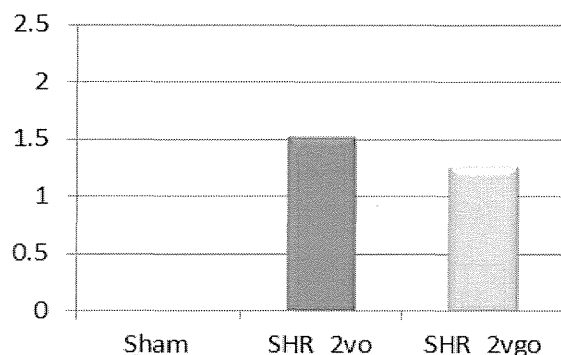
2. SHR ラットモデルの組織学的変化の解析

(三重大学: 富本グループ)

Optic chiasm



Corpus Callosum (medial)



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。

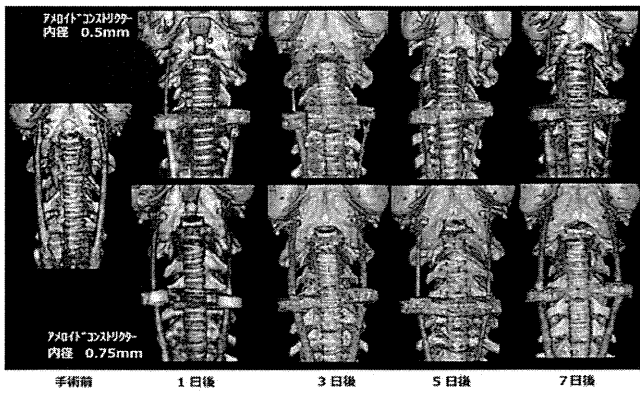
以上より、組織学的な観点からも、ヒト血管性認知症のモデル化を達成できた。

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)

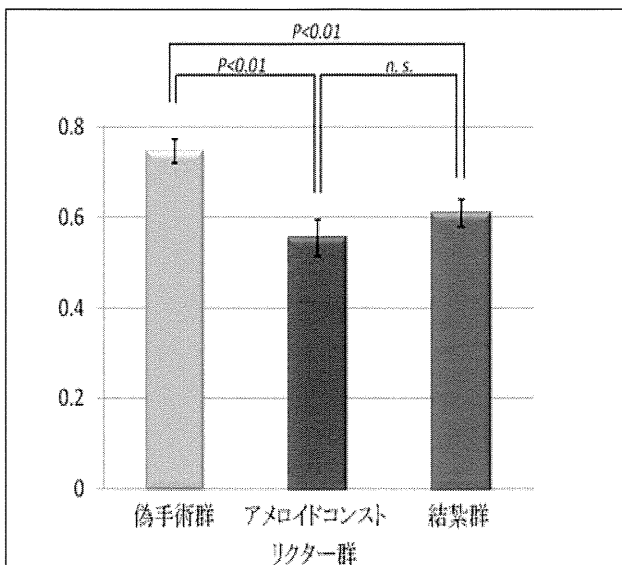
CT アンギオグラムによる頸部血管の観察により、内径 0.7 mm のアメロイドコンストリクターでは総頸動脈は閉塞にまで至らなかったが、内径 0.5 mm を用いると、総頸動脈が手術 3 日目以降に閉塞することが明らかとなった(下図)。

SHR (2VGO)



4. SHR ラットモデルの行動解析

SHR に対する偽手術(Sham), 両側総頸動脈へのアミロイドコンストリクター装着(2VGO), 両側総頸動脈の結紮(2VO)を行い, Y 迷路試験にて作業記憶の評価を行った. Sham 群と比較して, 2VGO 群, 2VO 群いずれにおいても, Y 迷路試験で観察される交替現象の割合が有意に低く, 作業記憶の障害が示唆された.

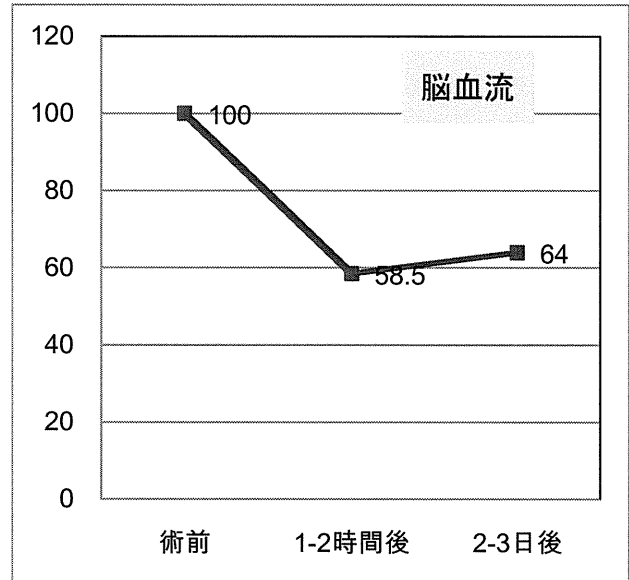


5. アヌビスヒヒ血管性認知症モデルの脳血流変化

(国立循環器病研究センター: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 にて評価した脳表面の脳血流概算値(前値=100)の推移を示す. アヌビスヒ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ため, ヒヒのモデル作成においては, 3動脈結紮が望ましいと判断した.



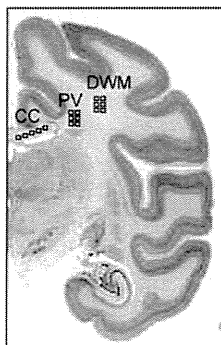
(倫理面の配慮)

非人類霊長類を用いた動物実験は、Institute of Primate Research (Nairobi, Kenya)の規定に則り、獣医師 Michael Ndung'u の監督のもと行われた。ヒヒの使用は、データ採取に必要な最低限の頭数を用いることとし、実験動物の生命倫理に最大限配慮した。

6. アヌビスヒヒ血管性認知症モデルの組織学的変化

(国立循環器病研究センター:猪原グループ)

ヒヒ脳の冠状断(右図)において脳梁(CC)に5か所の関心領域、脳室周囲白質(PV)と深部白質(DWM)に6か所の関心領域を設定して、組織学的評価を行った。



1. Hematoxylin-eosin 染色

2. Luxol fast blue 染色

3. 免疫組織染色

- Glutathione S-transferase (GST) pi
- Human leukocyte antigen (HLA)-DR
- Glial fibrillary acidic protein (GFAP)
- Glucose transporter 1 (GLUT1)
- Collagen type IV (COL4)
- Non-phosphorylated neurofilament (SMI32)

を用いた。

各 Time point で3頭の解析結果を示す。

1. Luxol fast blue 染色による脱髓の評価

脱髓を0(脱髓なし), 1(軽度), 2(中等度), 3(高度)の4段階に分類し(Wakita H, et al. Acta Neuropathol 1994;87(5):484-92 で用いた方法に準ずる)評価した結果を示す(下図)。

3動脈結紮後14日目より脱髓が進行していくことが明らかとなった。

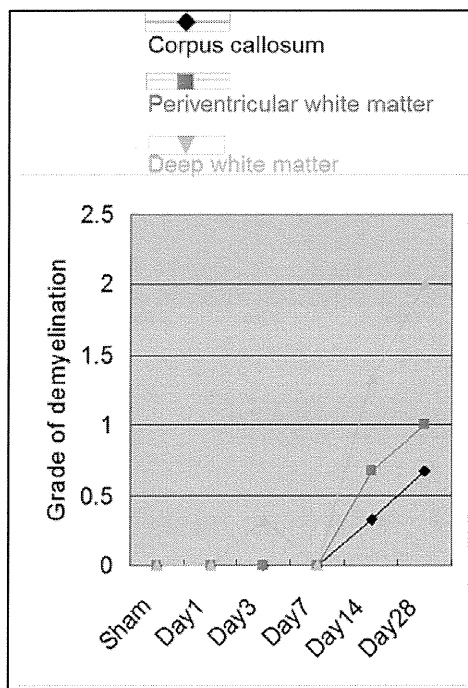


図. 手術後の脱髓の経時変化

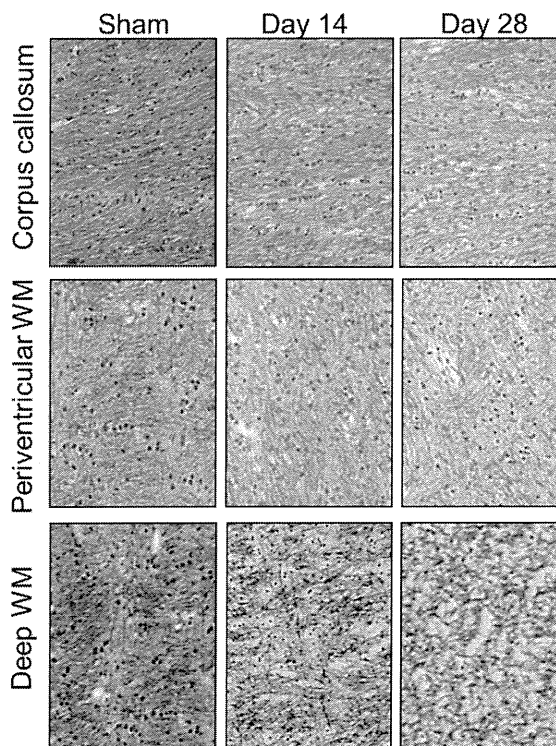


図. 代表的な脱髓所見

2. GSTpi 染色によるオリゴデンドロサイト(乏突起膠細胞)の密度変化

3 動脈結紮後, 乏突起膠細胞の密度は低灌流を反映して 7 日目まで次第に減少した。

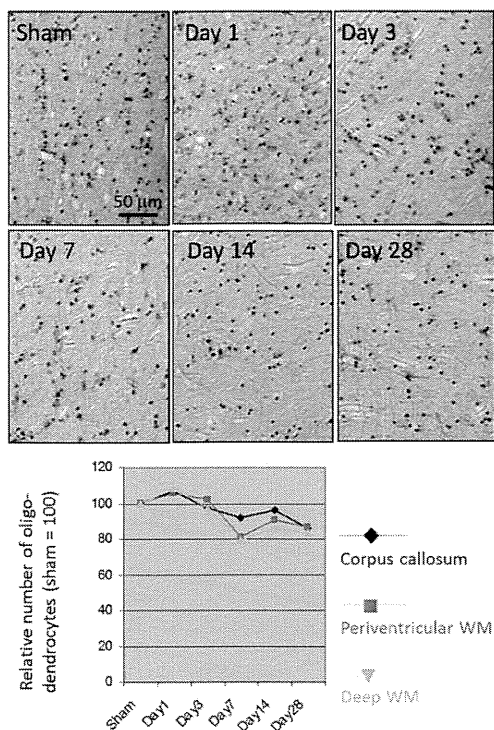


図. Corpus callosum(脳梁), Periventricular WM(脳室周囲白質), Deep WM(深部白質)におけるオリゴデンドロサイト(乏突起膠細胞)の密度変化

3. SMI32 染色による軸索傷害の評価

軸索傷害は時間とともに増強する傾向があった。

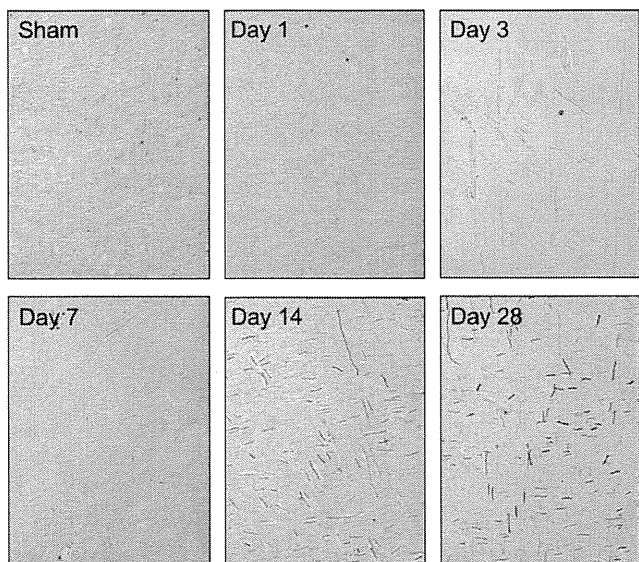


図. Deep WM(深部白質)における SMI32 染色結果

4. HLA-DR 染色によるミクログリア活性化の評価

Corpus callosum(脳梁), Periventricular WM(脳室周囲白質), Deep WM(深部白質)に観察される活性化ミクログリアは術後 3 日目でピークを迎え, その後は活性が低下した。

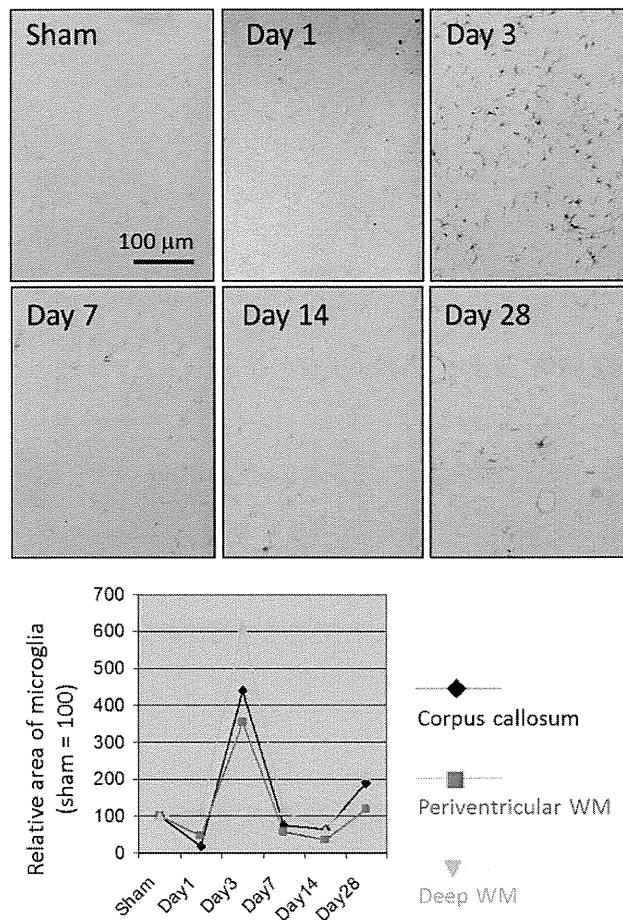


図. HLA-DR 染色によるミクログリア活性化の経時変化

5. H&E 染色による微小血管の評価

げっ歯類では血管径が小さいため, 毛細血管の評価が困難なことが少なくないが, ヒビでは明瞭に観察された. Sham 群では明らかな内腔を有して観察される capillary(白矢印)が術後 1 日目から 3 日目では内腔が潰れ, 血管内皮が線上に観察される(黒矢印)が, 7 日目以降は内腔が回復していた. これは, 3 動脈結紮による灌流圧の低下か浮腫等による組織圧の上昇により, 血管が機械的に押しつぶされた可能性が示唆された. 血管の構造変化を伴っていることから血液脳関門の破綻を引き起こしている可能性が示唆された。

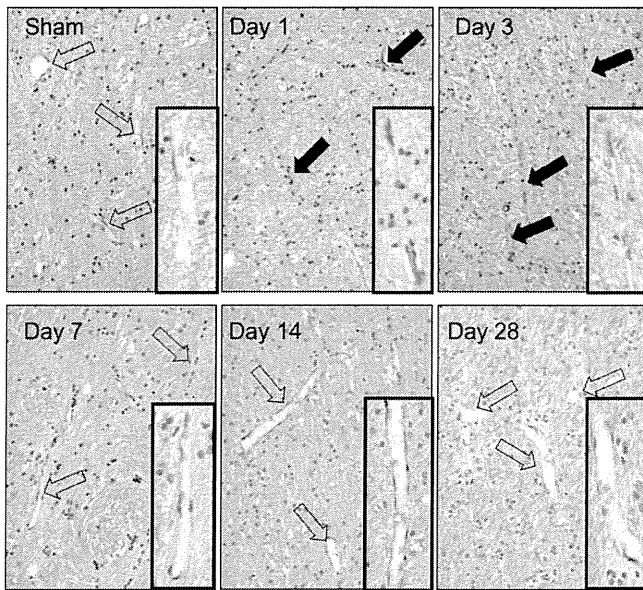


図. H&E 染色による微小血管の評価

6. GLUT1 染色による血管内皮細胞の評価

偽手術群では内腔を被覆するように連続性に観察された血管内皮細胞が、手術後 1-7 日目においては不連続性に観察され、血液脳関門の破綻を反映していると考えられた。

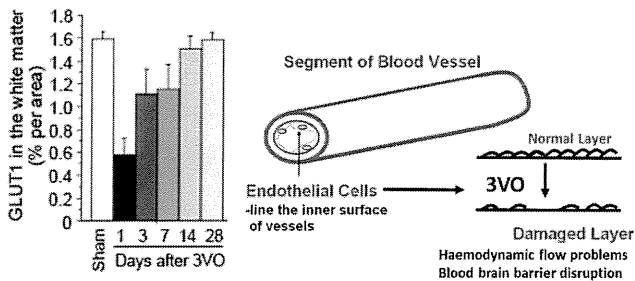
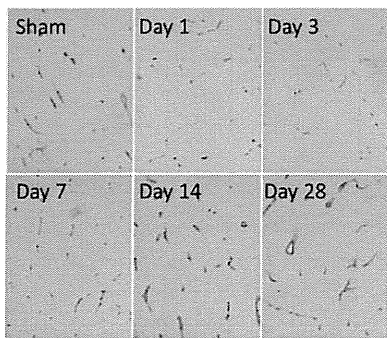


図. GLUT1 染色による血管内皮細胞の評価

7. Collagen IV 染色による血管基底膜の評価

偽手術群では連続性に観察された Collagen IV 陽性の血管基底膜が、手術後 1-7 日目においては不連続性に観察され、上述の血管内皮細胞の所見と同様、血液脳関門の破綻を反映していると考えられた。

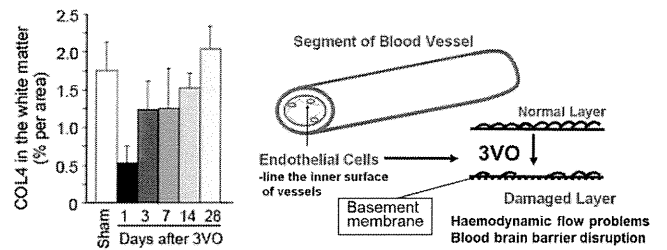
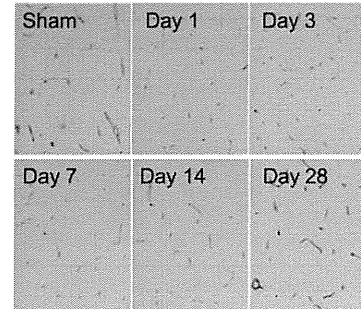


図. COL4 染色による血管基底膜の評価

8. GFAP 染色による星状膠細胞の評価

Corpus callosum (脳梁), Periventricular WM (脳室周囲白質), Deep WM (深部白質) に観察されるアストロサイト (星状膠細胞) 密度は、術後1日目で一旦低下するも、その後上昇し、術後 28 日目においては、胞体が大きな活性化(肥はん型)アストロサイトがいずれの白質領域にも観察されるようになった。

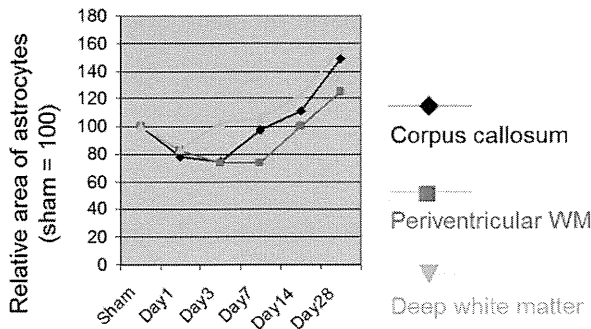
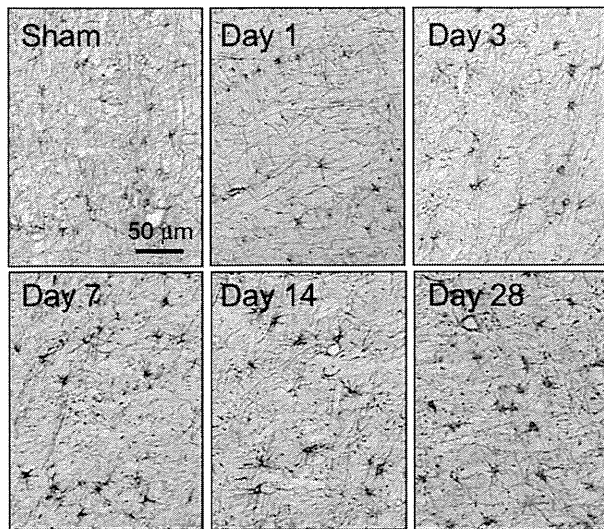
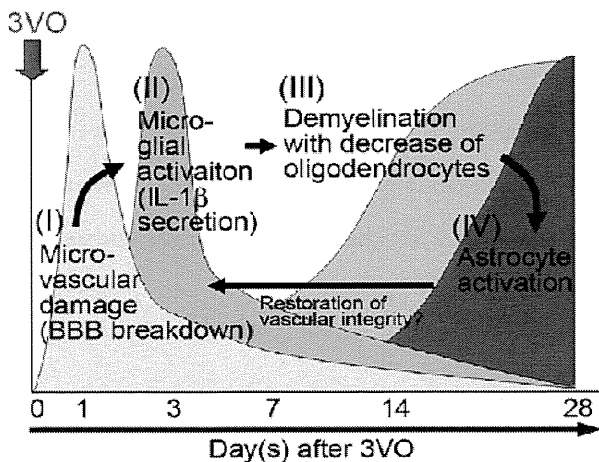


図. GFAP 染色によるアストロサイトの評価

9. 組織学的評価のまとめ

3 動脈結紮後にはまず血管の虚脱 (collapse) による内腔狭小化が見られ、血液脳関門の破綻 (1 日～7 日) が示唆された。その後ミクログリアの活性化 (3 日目) がピークおそらくは細胞傷害性機転、白質の粗鬆化 (7 日目以降) を経て、28 日後にはアストロサイトの活性化が見られた。アストロサイトは浮腫性変化を軽減するなど組織の修復機転の一つと想定される。



D. 考察

アメロイドコンストリクターを用いて手術 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。この新規モデルラットは、今年度の解析により、白質病変と作業記憶障害を示し、皮質下血管性認知症の病態を的確に再現していた。これまでのモデル動物は小血管病変を伴わないことが弱点とされていたが、SHR を用いることによって、小血管病変を有し、かつ低灌流により白質病変と認知機能障害を、手術により予想される時期に再現できる新規モデル動物が作成できた。今後は本モデル動物が様々な薬剤介入試験のげっ歯類の標準モデルとなると考えられる。

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、アヌビスヒビ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を装着する必要はない可能性はなく、3 動脈結紮で低灌流を再現できた。組織解析により、術後 1 ヶ月以内に大脳白質病変を誘導できることが判明し、皮質下血管性認知症の非人類霊長類モデルとして有用であると考えられた。次年度に、行動解析を追加して、モデル動物としての妥当性をさらに検証していく。

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ビ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。最終年度にさらなる検証を継続し、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. Ihara M, Nishino M, Taguchi A, Yamamoto Y, Hattori Y, Saito S, Takahashi Y, Tsuji M, Kasahara Y, Takata Y, Okada M. Cilostazol add-on therapy in patients with mild dementia receiving donepezil: a retrospective study. *PLoS ONE* 2014;9(2):e89516.
2. Tsuji M, Taguchi A, Ohshima M, Kasahara Y, Sato Y, Tsuda H, Otani K, Yamahara K, Ihara M, Harada-Shiba M, Ikeda T, Matsuyama T. Effects of intravenous administration of umbilical cord blood CD34+ cells in a mouse model of neonatal stroke. *Neuroscience* 2014;263:148-158.
3. Kalaria RN, Ihara M. Vascular and neurodegenerative pathways—will they meet? *Nat Rev Neurol* 2013;9(9):487-488.
4. Ono M, Cheng Y, Kimura H, Watanabe H, Matsumura K, Yoshimura M, Iikuni S, Okamoto Y, Ihara M, Takahashi R, Saji H. Development of Novel 123I-Labeled Pyridyl Benzofuran Derivatives for SPECT Imaging of β -Amyloid Plaques in Alzheimer's Disease. *PLoS ONE* 2013;8(9):e74104.
5. Craggs LJ, Yamamoto Y, Ihara M, Fenwick R, Slade JY, Oakley A, Roeber S, Duering M, Kretzschmar H, Kalaria RN. White matter pathology and disconnection in the frontal lobe in CADASIL. *Neuropath Appl Neurobiol*, in press
6. Ihara M, Taguchi A, Maki T, Washida K, Tomimoto H. A mouse model of chronic cerebral hypoperfusion characterizing features of cognitive impairment. *Methods Mol Biol* 2014;1135:95-102.
7. Masashi Y, Ono M, Matsumura K, Watanabe H, Kimura H, Cui M, Nakamoto Y, Togashi K, Okamoto Y, Ihara M, Takahashi R, Saji H. Structure-activity Relationships and in vivo Evaluation of Quinoxaline Derivatives for PET Imaging of β -Amyloid Plaques. *ACS Med Chem Lett*, in press
8. Taguchi A, Takata Y, Ihara M, Kasahara Y, Tsuji M, Nishino M, Stern D, Okada M. Cilostazol improves cognitive function in patients with mild cognitive impairment: A retrospective analysis. *Psychogeriatrics* 2013;13(3):164-169.
9. Kasahara Y, Ihara M, Taguchi A. Experimental and clinical challenge for neuroregeneration following stroke. *Front Neurol Neurosci* 2013;32:69-75.
10. Kasahara Y, Ihara M, Nakagomi T, Momota Y, Stern DM, Matsuyama T, Taguchi A. A highly

- reproducible model of cerebral ischemia/reperfusion with extended survival in CB-17 mice. *Neurosci Res* 2013;76(3):163-168.
11. 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* 2013; 22(7):e146-151.
 12. Akinyemi R, Mukaetova-Ladinska E, Attens J, Ihara M, Kalaria RN. Vascular Risk Factors and Neurodegeneration in Ageing related Dementias: Alzheimer's Disease and Vascular Dementia. *Curr Alzheimer Res* 2013;10(6):642-53.
 13. Matsumura K, Ono M, Yoshimura M, Kimura H, Watanabe H, Okamoto Y, Ihara M, Takahashi R, Saji H. Synthesis and Biological Evaluation of Novel Styryl Benzimidazole Derivatives as Probes for Imaging of Neurofibrillary Tangles in Alzheimer's Disease. *Bioorg Med Chem* 2013;21(11):3356-3362
 14. Okuchi S, Okada T, Ihara M, Gotoh K, Kido A, Fujimoto K, Yamamoto A, Kanagaki M, Tanaka S, Takahashi R, Togashi K. Visualization of Lenticulostriate Arteries by Flow-Sensitive Black-Blood MR Angiography on a 1.5T MRI System: A Comparative Study between Subjects with and without Stroke. *AJNR Am J Neuroradiol* 2013;34(4):780-784.
 15. Masafumi Ihara. Bench to bedside: using mouse models to identify new treatment approaches for Alzheimer's disease. Invited lecture: 19th Southampton Neuroscience Group (SoNG) Meeting (Southampton, UK), Sep 19, 2013
 16. Masafumi Ihara. Generating rodent models of chronic cerebral hypoperfusion and investigating the pathogenesis of vascular cognitive impairment. Plenary session (Special session on animal models of VCI). Vas-Cog2013 (Toronto, Canada) Jun 26, 2013
 17. Masafumi Ihara. Lessons from rodent models characterizing features of vascular cognitive impairment. Minisymposium (Animal models of VCI). Vas-Cog2013 (Toronto, Canada) Jun 26, 2013
 18. 猪原匡史. シンポジウム5「血管性認知障害」血管性認知障害の病態—モデル動物を用いて明らかとなった知見—。第39回日本脳卒中学会総会（大阪）。2014年3月15日
 19. 猪原匡史. 「認知症の発症にかかわる脳血管の機能」。脳心血管抗加齢研究会2013（大阪）。2013年12月15日
 20. 猪原匡史. 「シロスタゾールによる血管依存性βアミロイドクリアランスの促進」。脳循環代謝学会（札幌）。2013年11月2日
 21. 猪原匡史. 「血管病としての認知症」 Vas-Cog Japan（東京）。2013年8月10日

22. Masafumi Ihara. 「S2-5-2中枢神経疾患治療に対するトランスレーショナルリサーチの現状とその課題」. Novel mechanism and therapy to treat patient with dementia. Neuro2013 (京都).
2013年6月21日

23. Masafumi Ihara. Symposium S (4) -1. Vascular Dementia and Its Associated Conditions-Vascular Cognitive Impairment (VCI) . Cerebral amyloid angiopathy and cognitive impairment. 第54回日本神経学会学術大会 (東京) . 2013年6月1日

H. 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

研究協力者

服部 頼都 (国立循環器病研究センター・再生医療部)

北村 彰浩 (京都大学医学研究科・神経内科)

長谷 佳樹 (ニューカッスル大学・神経病理学)

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(SHR-2vessel gradual occlusion: 2VGO 群)または結紮(SHR-2vessel occlusion: 2VO 群)し、経時的に組織評価を行った。S 術後 28 日目の評価で、両群とも白質中心に著明なミクログリアの増生とグリオーシスを認めた。また、白質障害の程度は、正常血圧ラットを用いた同様の実験に比し顕著であった。血管危険因子と小血管病を有し、緩徐な血流の低下に伴う著明な白質障害が再現された SHR-2VGO は、ヒトの血管性認知症の病態をよりの確に反映している可能性が示唆された。

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(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。

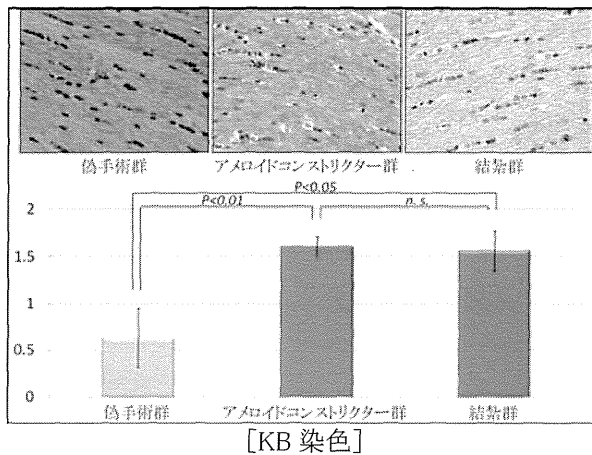
B. 研究方法

SHR の両側総頸動脈に内径 0.5mm およびのアメロイドコンストリクターを装着 (SHR-2VGO 群)、結紮 (SHR-2VO 群)、又は偽手術 (Sham 群) を施行し、組織学的変化を経時的に施行した。

組織学的評価は、術後 28 日目に灌流固定し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色、クリューバーバレラ (KB) 染色、抗 Iba1 抗体・抗 GFAP 抗体等を用いた免疫組織化学染色を施行した。関心領域は視交叉、脳梁正中部分、外側部、尾状核被核に設定した。

C. 研究結果

術 28 日後の組織学的評価では、両群ともに、白質中心に、有意に Iba1 陽性ミクログリアが増加しており、依然として炎症が持続していると考えられた。また、両群ともに白質で GFAP 陽性アストロサイトが増加しており、著明なグリオーシスを認め、KB 染色では著明な白質の粗鬆化を認めた(次ページ図)。



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。今後、脳小血管自体、海馬等の組織学的評価を進める予定である。

E. 健康危険情報 特記なし

F. 研究発表

原著論文

1. Tomimoto H, Wakita H. Animal models of vascular dementia: translational potential at the present time and in 2050' *Future Neurology*. 2014;9(2):163-172

2. Y Shindo A, Satoh M, Naito Y, Asahi M, Takashima S, Sasaki R, Furukawa K, Narita Y, Kuzuhara S, Tomimoto H. Global aphasia without hemiparesis: the underlying mechanism examined by transcranial magnetic stimulation. *Neurologist*. 2013;19(1):11-14
3. Nishimura Y, Yata K, Nomoto T, Ogiwara T, Watanabe K, Shintou T, Tsuboyama A, Okano M, Umemoto N, Zhang Z, Kawabata M, Zhang B, Kuroyanagi J, Shimada Y, Miyazaki T, Imamura T, Tomimoto H, Tanaka T. Identification of a Novel Indoline Derivative for in Vivo Fluorescent Imaging of Blood-Brain Barrier Disruption in Animal Models. *ACS Chem Neurosci*. 2013;4(8):1183-1193
4. Matsuura K, Maeda M, Yata K, Ichiba Y, Yamaguchi T, Kanamaru K, Tomimoto H. Neuromelanin magnetic resonance imaging in Parkinson's disease and multiple system atrophy. *Eur Neurol*. 2013;70(1-2):70-77.
5. Shindo A, Yata K, Sasaki R, Tomimoto H. Chronic cerebral ischemia induces redistribution and abnormal phosphorylation of transactivation-responsive DNA-binding protein-43 in mice. *Brain Res*. 2013;1533:131-140.

学会発表

6. Hidekazu Tomimoto. 「Chronic cerebral hypoperfusion as a putative model for vascular dementia」. BRAIN2013 Shanghai, China May 20-23, 2013

7. 富本秀和, 「血管性認知症とアルツハイマー病の共通病態と鑑別診断」. 第 54 回日本神経学会学術大会 東京 2013. 5. 29-6. 1
 8. 富本秀和, 「特殊な脳卒中 ; 脳アミロイド血管症、CADASIL、CARASIL」. 第 39 回日本脳卒中学会総会 大阪 2014. 3. 13-15
 9. 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
富本秀和, 佐藤正之, 弓場徹, 佐久間肇, 竹田寛, 水谷靖: 認知症の改善を支援するための装置、認知症の改善を支援するための方法、当該方法をコンピュータに実現させるためのプログラム 特許出願 2013-185222
 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)を装着(SHR-2vessel gradual occlusion: 2VGO 群)または結紮(SHR-2vessel occlusion: 2VO 群)し、経時的に脳血流、行動評価を行った。SHR-2VGO 群では、SHR-2VO 群に比して死亡率が激減し、脳血流は術後の急激な低下がなく緩徐に低下した。術後 28 日目の評価で、両群とも有意な空間作業記憶の障害を認めた。血管危険因子と小血管病を有し、緩徐な血流の低下に伴う空間作業記憶の障害が再現された SHR-2VGO は、ヒトの血管性認知症の病態をよりの確に反映している可能性が示唆された。

(1) SHR の両側総頸動脈にアメロイドコンストリクター装着後の脳血流、組織、行動評価

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)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。

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。そこで本申請課題では、総頸動脈にアメロイドコンストリクターを装着し、血管危険因子と小血管病を有する SHR に慢性脳低灌流状態を再現することで、ヒトの血管性認知症の病態をよりの確に反映するモデル動物の作成を目的とした。

B. 研究方法

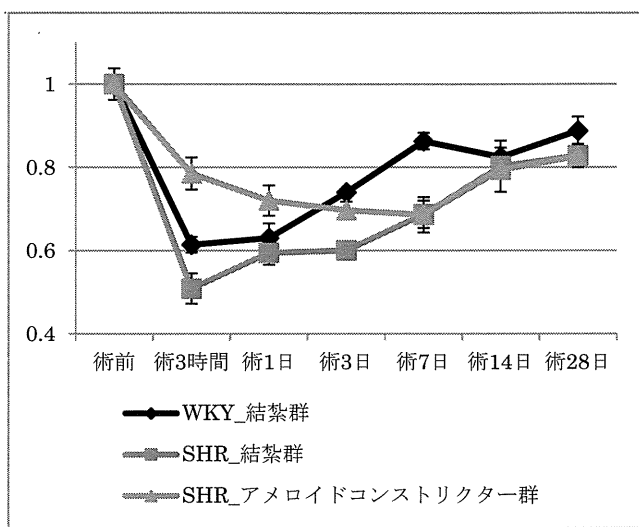
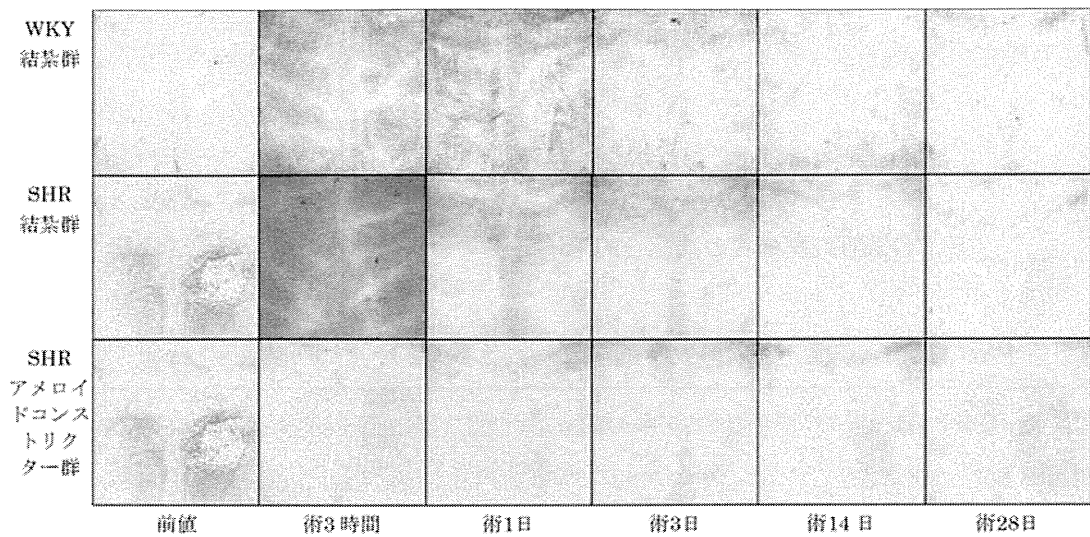
SHR の両側総頸動脈に内径 0.5mm およびのアメロイドコンストリクターを装着 (SHR-2VGO 群)、結紮 (SHR-2VO 群)、又は偽手術(Sham 群)を施行し、死亡率、脳血流、組織、行動評価を経時的に施行した。

脳血流は、レーザー血流画像装置 OMEGA ZONE を用いて、経頭蓋的に脳表(bregma から 3cm 側方・2cm 尾側の地点を中心とした 3cm 大の円に関心領域を設定)の血流を評価した。行動評価は、術後 28 日目に Y 迷路試験を施行し、空間作業記憶の評価を行った。

C. 研究結果

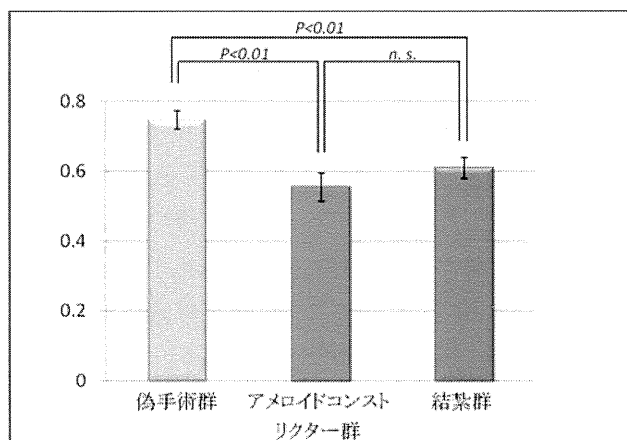
死亡率は、結紮群で 56.5% (13/23) と高率であったのに対し、アメロイドコンストリクター群では 0% (0/12) であった。

脳血流は、アメロイドコンストリクター群では、結紮群で生じる術直後の急激な血流低下を認めず、術後 3 日目まで徐々に低下し、その後、側副血行路の発達に伴い徐々に改善した。正常血圧ラット(WKY) (Kitamura A, et al. Neurobiol Aging 2011) で同様の実験を施行した結果に比し、血流の低下は高度であった(次ページ図とグラフ)。



[脳血流経時的变化]

術 28 日後の行動評価では、Y 迷路試験で両群ともに有意な空間作業記憶の障害を認めた(下図)。



[Y 迷路試験]

D. 考察

SHR は小血管病を有する数少ないモデル動物であり、血管性認知症研究への応用が試みられてきたが、両側総頸動脈を結紮したこれまでの報告では死亡率が高く、モデルとしては確立が困難であった。本研究では、SHR にアメロイドコンストリクターを装着することで、脳血流は、術後の急激な低下なく緩徐に低下した。急性脳虚血の要素を取り除き、脳低灌流状態のみを再現することが出来たと考えられる。その結果、死亡率も SHR-アメロイドコンストリクター群では、SHR-結紮群に比し著明に改善した。

術後 28 日目の評価で、両群とも有意な空間作業記憶の障害を認めた。行動評価で結紮群でのより激しい変化を予想していたが、両群に優位差を認めなかった理由の一つとして survival bias が考えられた。

また、血流低下の程度は、正常血圧ラットを用いた同様の実験に比し顕著であり、脳小血管の機能障害を反映している可能性が考えられた。

血管危険因子と小血管病を有し、緩徐な血流の低下に伴う著明な白質障害と空間作業記憶の障害が再現された SHR-アメロイドコンストリクターは、ヒトの血管性認知症の病態をよりの確に反映している可能性が示唆された。

E. 健康危険情報 特記なし