

201407010A

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 26 年度 総括・分担研究報告書

代表研究者 猪原 匡史

平成 27 (2015) 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 ……21

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ……23

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、汎用性を考慮してマウスにおけるアメロイドコンストリクターを用いた動物モデルの創出を行う。また、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。また、汎用性を考慮してマウスにおけるアメロイドコンストリクターを用いた動物モデルの創出を行う。汎用性を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(下図黒線;SHR-2VGO 群)。対照群として、SHR に対する偽手術群(下図グレー線;SHR-sham 群)と SHR に対する両側総頸動脈閉塞群(下図破線;SHR-2VO 群)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。

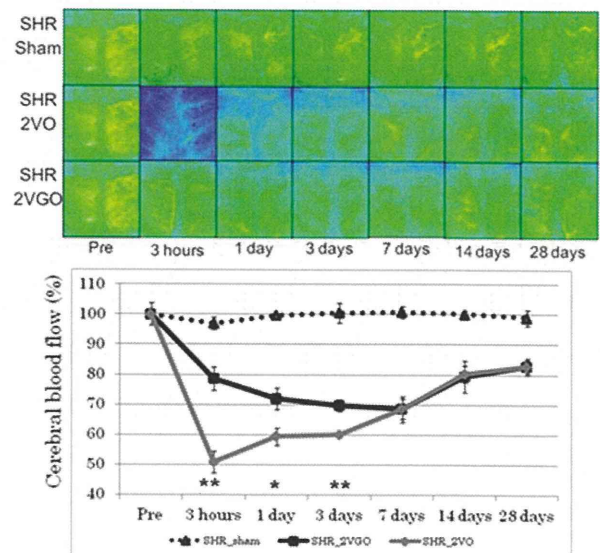


Fig. 2 Kitamura et al.

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、実際に SHR-2VO 群では 56.5% (23 匹中 13 匹) の死亡率を示したが、SHR-2VGO 群では 0% (0/12) であった。これは、SHR-2VO では SHR-2VGO よりも急激な脳血流の低下が誘導されることに関係すると考えられる。すなわち、SHR-2VO では、レーザースペックル方による脳血流解析に示されているように、術直後に急激な血流低下が引き起こされ、これは一般に言われる脳低灌流より虚血に近い。一方で、SHR-2VGO では、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る。よって、アメロイドコンストリクターを使用することで、より侵襲が少なく、よりヒトの病態に近い緩徐な脳血流低下を再現できた。

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。

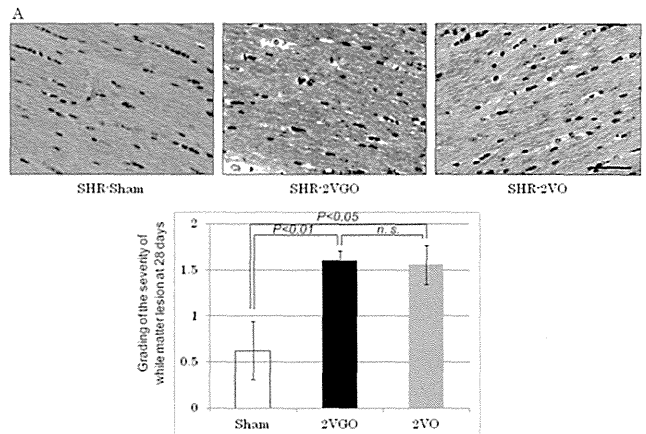
2. SHR ラットモデルの組織学的変化の解析

(三重大学: 富本グループ)

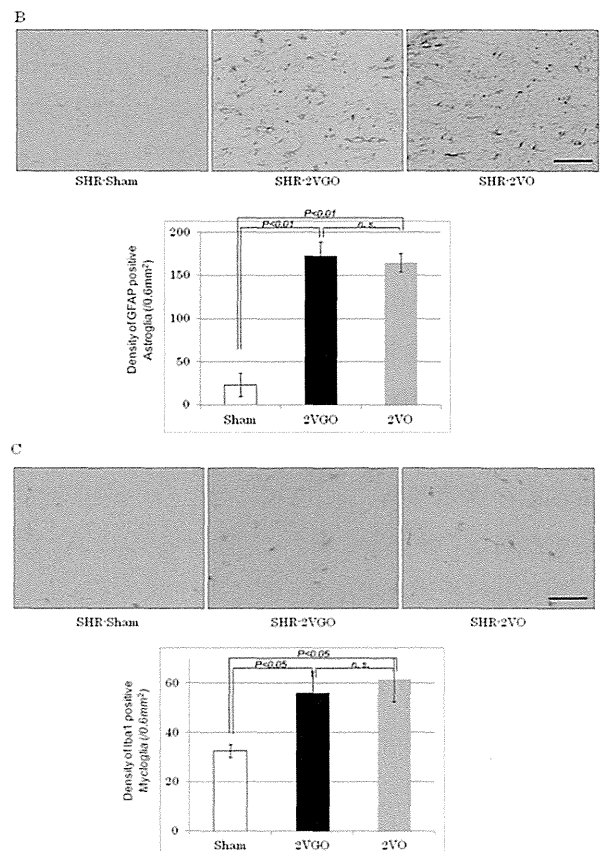
SHR に対するアメロイドコンストリクターの装着手術後 28 日の時点における大脳白質部 (Optic chiasm; 視交叉部, Corpus callosum; 脳梁部) の組織学的変化を Klüver-Barrera 染色により Grade 0 (低) から 3 (高) の 3 段階で評価した。

SHR の両側総頸動脈に対するアメロイドコンストリク

一処置 (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 (下図 A)。SHR-2vo 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。



さらに、同時期の SHR-2vo 群における GFAP 陽性のアストロサイトならびに Iba-1 陽性のミクログリアの密度も偽手術群と比較して有意に増加し、その密度は SHR-2vo 群に匹敵し (各下図 B, C)、白質における炎症を反映していた。

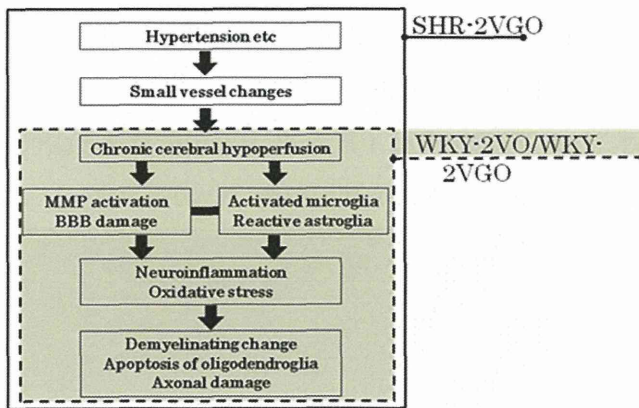
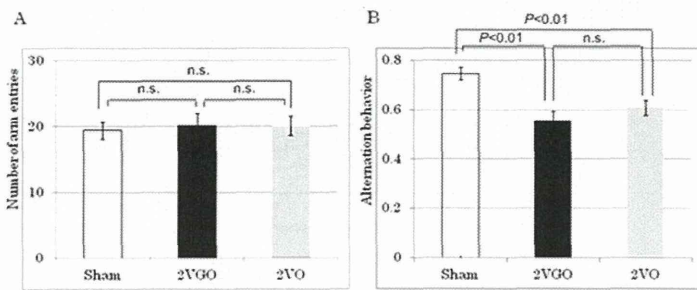


以上より、組織学的な観点からも、ヒト血管性認知症のモデル化を達成できた。

3. SHR ラットモデルの行動解析

(京都大学:福山グループ)

SHR に対する偽手術 (Sham), 両側総頸動脈へのアミノロイドコンストラクター装着 (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。3 群で運動量には差異がなかった (下図 A)。しかし, Sham 群と 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 (下図 B), 作業記憶の障害が示唆された。

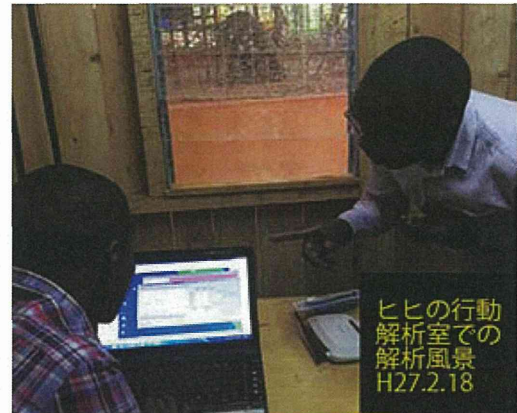


以上, SHR-2VGO はこれまでの WKY-2VO/WKY-2VGO モデルが再現していた皮質下血管性認知症の後半のカスケードに加えて前半の高血圧から小血管病変に至るカスケードまでも再現した, よりヒトの病態に忠実なモデル動物と表現することが出来る。

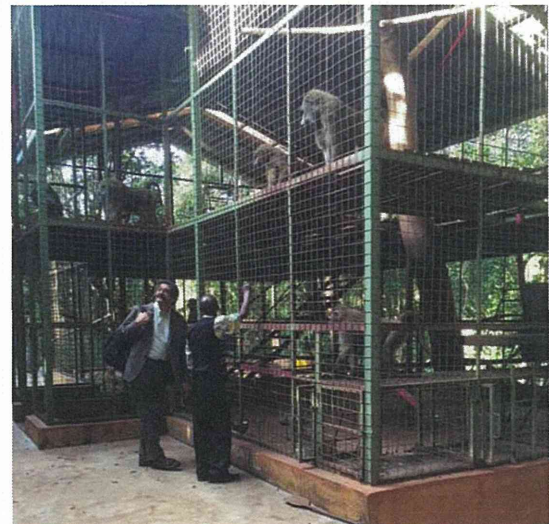
4. アヌビスヒ血管性認知症モデルの行動解析

(国立循環器病研究センター:猪原グループ)

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, 前年度に組織学的解析を終えた。現在ヒヒの行動解析装置の設置を終え, タッチパネルを用いた。



小窓の向こうにヒヒが確認できる。



ヒヒの行動実験用建屋を確認する Raj N. Kalaria 教授 (Newcastle 大学) と Michael N'dungu 博士 (IPR)

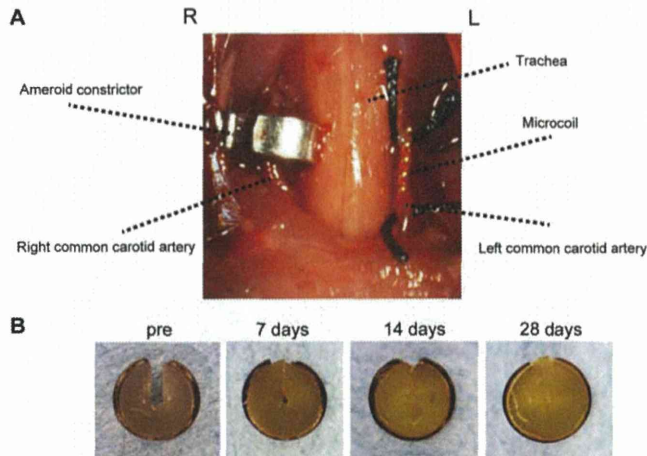
(倫理面の配慮)

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。

5. マウス血管性認知症モデルの確立

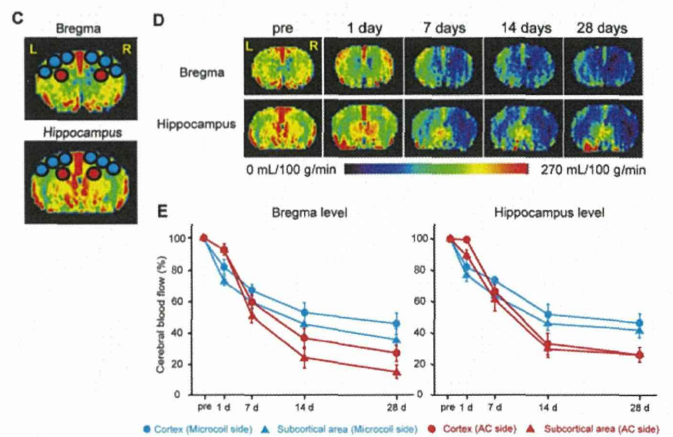
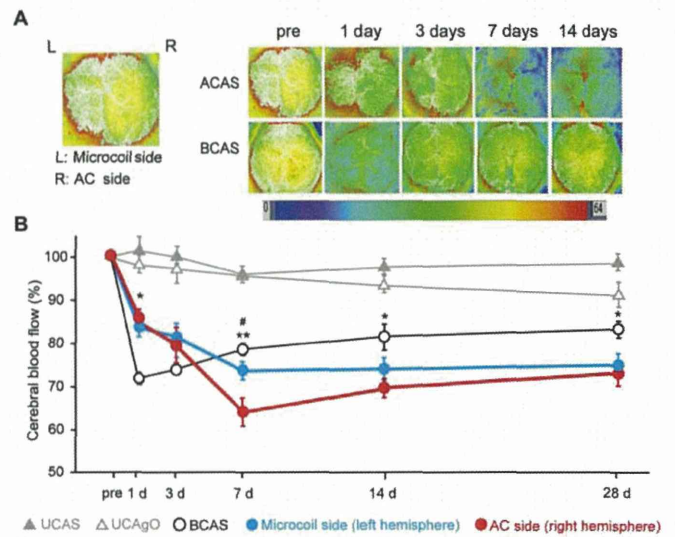
1. 方法

C57BL/6J マウス総頸動脈に右側にアメロイドコンストリクター(内径 0.50 mm), 左側に微小コイル(内径 0.18mm)を装着すると(下図 A), 右総頸動脈は緩徐に閉塞する(下図 B). Asymmetric common carotid artery surgery (ACAS)モデルと命名した.



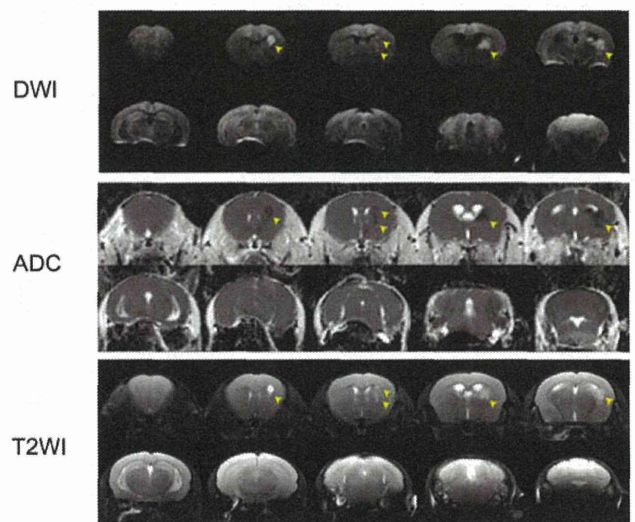
2. 脳血流推移

レーザースペックル法(下図 A, B)では, 微小コイルを用いた両側総頸動脈狭窄によって誘導される既存モデル(BCAS モデル)と比較して, より緩徐な脳表の脳血流低下が再現できることが明らかとなった. BCAS モデルでは術後すぐに脳血流が低下して緩徐に回復するという脳血流推移を示すが(黒線), ACAS モデルは, 左側(微小コイル)側ですら緩徐な脳血流低下を示し(青線), よりヒトの脳循環不全の病態を的確に反映していた. また, arterial spin labeling (ASL)法を用いて脳血流を解析したところ(下図 C, D), 大脳皮質(青線)と比較して, 皮質下(赤線)において脳血流がより長期にわたって低下することが明らかとなった. 脳表は側副血行により脳血流が回復する傾向があるが, 皮質下の深部脳組織は終末動脈によって灌流されているために脳血流の回復が乏しい. そのため皮質下において脳血流低下がより高度のマウスモデルを開発することができた.



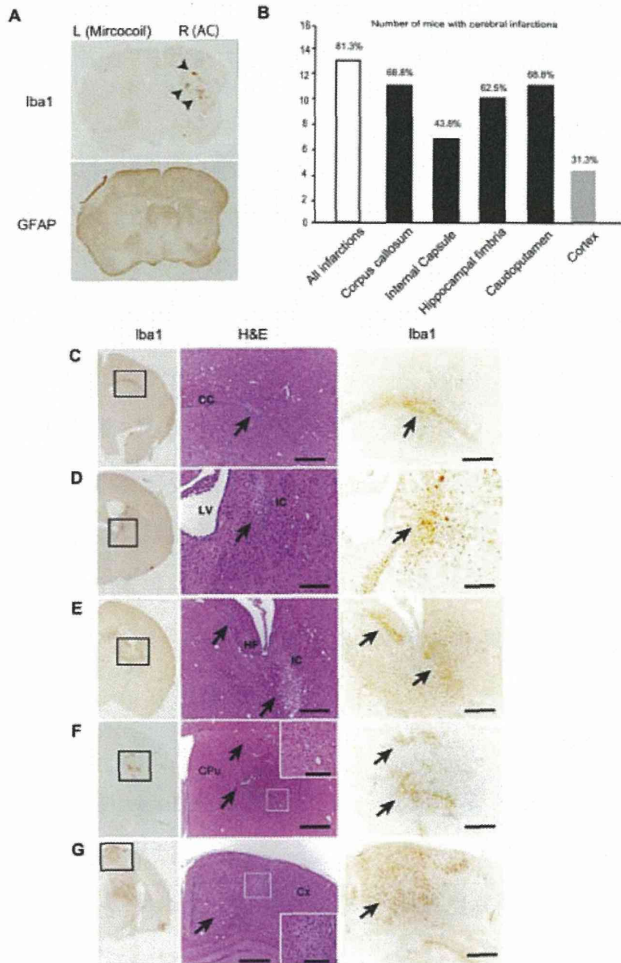
3. 7-tesla MRI による解析

皮質下の高度の脳血流低下が誘導された結果, 右側(アメロイドコンストリクター側)白質を中心に脳梗塞が誘導された(下図矢頭). 手術後 8 日目の拡散強調画像(DWI), ADC マップ, T2 強調画像(T2WI)を示す.



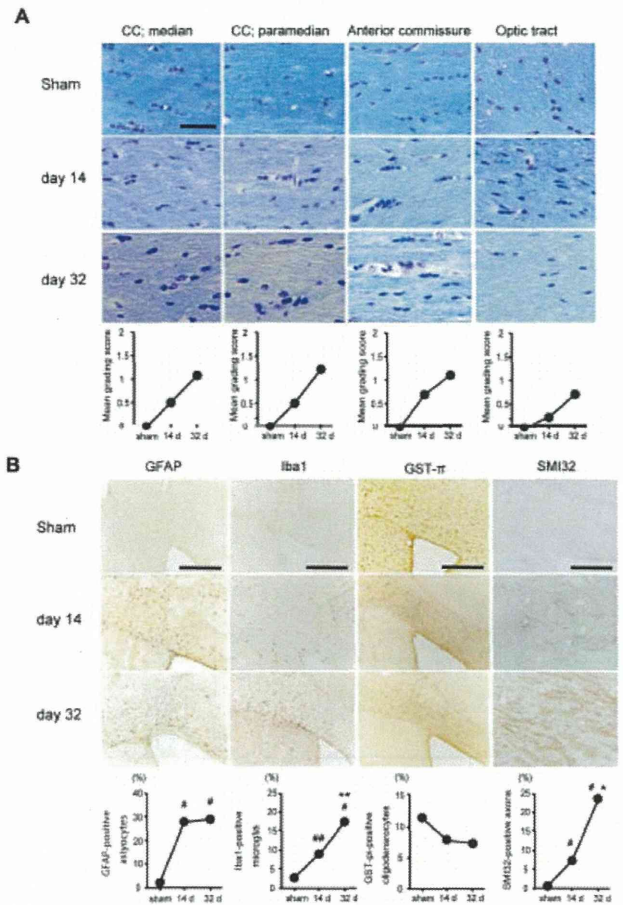
4. 組織学的解析 (主に右半球—アメロイドコンストリクタ一側)

組織学的には、多発性の脳梗塞が右半球に限局して誘導された(A, 矢頭; C, 矢印). 脳梁(CC), 内包(IC), 海馬采(HF)などの白質に多く見られ, また深部の基底核領域(BG)にも観察された. 一方, 大脳皮質の脳梗塞発生頻度は相対的に低かった(Cortex). 脳深部皮質下領域に緩徐ではあるが, 比較的強い低灌流を誘導できたことにより深部の脳梗塞を比較的選択的に再現できたものと考えられる.



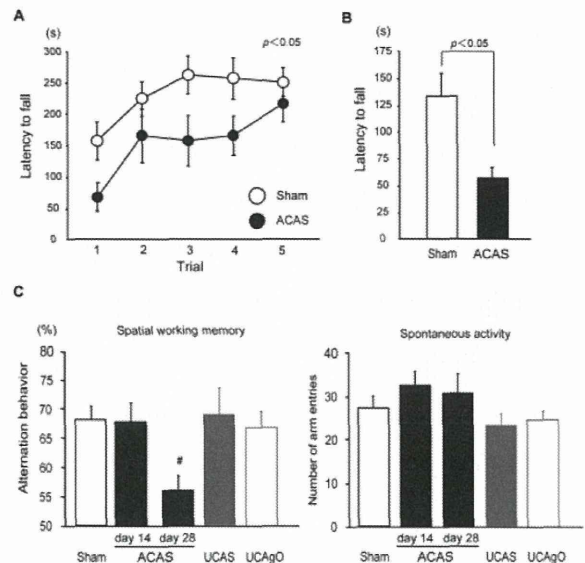
5. 組織学的解析 (左半球—微小コイル側)

一方, 左半球は右半球と比較しての低灌流の深度は浅く, 脳梗塞は出現せずに主に白質を中心とした脱髄(下図 A), 炎症反応(下図 B, 左 2 列), オリゴデンドロサイトの減少(下図 B, 3 列目), 軸索傷害(下図 B, 最右列)が惹起された.



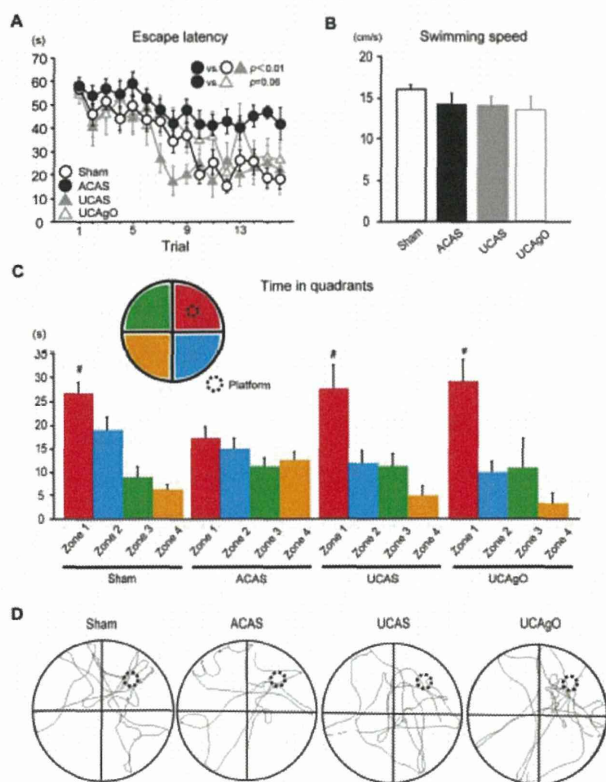
6. 行動解析—作業記憶

ACAS マウスは Rotarod (下図 A) や Wire hang test (下図 B) で示される運動障害を呈した. 認知障害に関してはまずは作業記憶を Y maze test で判定したが, 手術 14 日目では障害が見られないにもかかわらず, 28 日目では偽手術群と比べて作業記憶障害が見られた(下図 C). 行動量自体は不変であった(下図 D).



7. 行動解析—エピソード記憶

Water maze test でエピソード記憶を評価した. コントロールとして作成した右側のみアメロイドコンストリクター群 (UCAgO) や左側のみ微小コイル群 (UCAS) と比較して, ACAS 群では有意にプラットフォーム (逃避台) に到達するまでの時間が延長し (A), 遊泳スピードは不変であったものの (B), プラットフォームのある4分円 (C, 青) にいる時間も他の 3 つの4分円 (C, 青, 緑, もしくは黄) にいる時間との有意差が消失し, ACAS モデルはエピソード記憶障害を伴うと判断された.



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.

また, アメロイドコンストリクターを用いて新規の ACAS モデルを開発した. マウスで作成したことは汎用性を考えるうえで有用であると考えられる. 左右異なる低灌流深度が誘導できたために, 右半球では多発性の虚血巣, 左半球では白質病変 (脱髄, 軸索傷害) が誘導できた. さらに運動障害, 記憶障害を呈していることがあきらかとなり, ヒトの皮質下血管性認知症モデルとして使用できると考えられる.

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がなく, 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. 現在, 行動解析を行っている結果が早晚得られる予定である.

E. 結論

本研究事業で確立を行ったヒト血管性認知症のモデルラット, モデルマウス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. 3 つの種において, 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達成出来たと考えられる.

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: 40 件

2) 海外

口頭発表・講演: 2 件

原著論文: 22 件

そのうち主なもの

1. Hattori Y, Enmi JI, Kitamura A, Yamamoto Y, Saito S, Takahashi S, Iguchi S, Tsuji M, Yamahara K, Nagatsuka K, Iida H, Ihara M. A novel mouse model of subcortical infarcts with dementia. *J Neurosci* 2015;35(9):3915–3928.
2. Holland PR, Searcy JL, Salvadores N, Scullion G, Chen G, Lawson G, Scott F, Bastin ME, Ihara M, Kalaria RN, Wood ER, Smith C, Wardlaw JM, Horsburgh K. Gliovascular disruption and cognitive deficits in a mouse model with features of small vessel disease. *J Cereb Blood Flow Metab*, in press
3. Hattori Y, Okamoto Y, Nagatsuka K, Takahashi R, Kalaria RN, Kinoshita M, Ihara M. SIRT1 attenuates severe ischemic damage by preserving cerebral blood flow. *NeuroReport* 2015;26(3):113-117.
4. Watanabe H, Ono M, Iikuni S, Kimura H, Okamoto Y, Ihara M, Saji H. Synthesis and Biological Evaluation of ¹²³I-Labeled Pyridyl Benzoxazole Derivatives: Novel β -Amyloid Imaging Probes for Single-Photon Emission Computed Tomography. *RSC Advances* 2015;5: 1009-1015.
5. Craggs LJJ, Fenwick R, Oakley AE, Ihara M, Kalaria RN. Immunolocalisation of PDGFR β and pericytes in CADASIL. *Neuropath Appl Neurobiol*, in press
6. Saito S and Ihara M. New therapeutic approaches for Alzheimer's disease and cerebral amyloid angiopathy. *Front Aging Neurosci* 2014; 6: 290.
7. Igarashi K, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y, Kawate H, Yamauchi A, Toriyama Y, Tanaka M, Liu T, Xian X, Imai A, Zhai L, Owa S, Koyama T, Uetake R, Ihara M, Shindo T. Pathophysiological roles of adrenomedullin-RAMP2 system in acute and chronic cerebral ischemia. *Peptides* 2014;62(12):21-31.
8. Hattori Y, Okamoto Y, Maki T, Yamamoto Y, Oishi N, Yamahara K, Nagatsuka K, Takahashi R, Kalaria RN, Fukuyama H, Kinoshita M, Ihara M. Silent information regulator 2 homolog 1 counters cerebral hypoperfusion injury by deacetylating endothelial nitric oxide synthase. *Stroke* 2014;45(11):3403-3411.
9. Hattori Y, Kitamura A, Tsuji M, Nagatsuka K, Ihara M. Motor and cognitive impairment in a mouse model of ischemic carotid artery disease. *Neurosci Lett* 2014;581:1-6.
10. Maki T, Okamoto Y, Carare R, Hase Y, Hattori Y, Hawkes C, Saito S, Yamamoto Y, Terasaki Y, Ishibashi-Ueda, H, Taguchi A, Takahashi R, Miyakawa T, Kalaria R, Lo EH, Arai K, Ihara M. Phosphodiesterase III inhibitor promotes drainage of cerebrovascular β -amyloid. *Ann Clin Transl Neurol* 2014;1(8):519-533.

11. Nanri K, Mitoma H, Ihara M, Tanaka N, Taguchi T, Takeguchi M, Ishiko T, Mizusawa H. Gluten ataxia in Japan. *Cerebellum* 2014;13(5):623-627.
12. Nakaoku Y, Ihara M, Hase Y, Okamoto Y, Saito S, Hishizawa M, Uemura K, Kuwahara M, Oka N, Kusunoki S, Takahashi R. Possible paraneoplastic etiology in a case of Guillain-Barré syndrome with tumoral expression of ganglioside GM3. *Neurol Clin Neurosci* 2014;2(5):169-171.
13. Ihara M, Kalaria RN. Understanding and preventing the development of post-stroke dementia. *Expert Rev Neurother* 2014;14(9):1067-1077.
14. Seo JH, Maki T, Maeda M, Miyamoto N, Liang A, Hayakawa K, Pham LD, Suwa F, Taguchi A, Matsuyama T, Ihara M, Kim KW, Lo EH, Arai K. Oligodendrocyte precursor cells support blood-brain barrier integrity via TGF- β signaling. *PLoS One* 2014;9(7):e103174.
15. Hattori Y, Kitamura A, Nagatsuka K, Ihara M. A novel mouse model of ischemic carotid artery disease. *PLoS One* 2014;9(6):e100257.
16. 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.
17. Craggs LJ, Yamamoto Y, Ihara M, Fenwick R, Slade JY, Oakley A, Roeber S, Duering M, Kretschmar H, Kalaria RN. White matter pathology and disconnection in the frontal lobe in CADASIL. *Neuropath Appl Neurobiol* 2014;40(5):591-602.
18. 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.
19. 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.
- 学会発表
20. *Masafumi Ihara. Animal Models of Vascular Dementia. Invited lecture: Asia Pacific Stroke Conference (Taipei, Taiwan), Sep 14, 2014
21. *Masafumi Ihara. Animal models of SVD: what do they teach us about vascular cognitive disorders? **Invited lecture** at PIA meeting, Alzheimer's Association International Conference 2014 (Denmark), July 12, 2014
22. *Masafumi Ihara. Cilostazol add-on therapy in patients with mild dementia receiving donepezil. 第55回日本神経学会学術大会（福岡）. 2014年5月23日.
23. *猪原匡史. 脳血流と認知症. シンポジウム「東洋医学・非薬物療法を統合した認知症予防と対応」第21回日本未病システム学会学術総会（大阪）. 2014年11月2日.

24. *猪原匡史. 「認知症の先制医療」第22回 21世紀脳核医学カンファレンス (大阪). 2014年11月14日.
25. *猪原匡史. アルツハイマー病と血管性認知症の接点と治療戦略. 脳心血管抗加齢研究会2014 (大阪). 2014年12月7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(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。

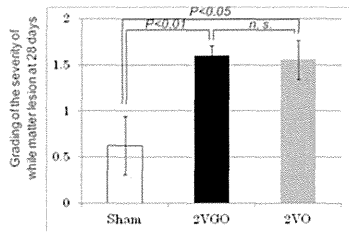
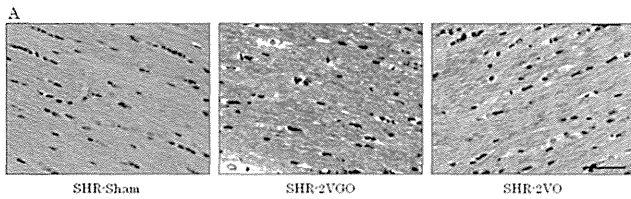
B. 研究方法

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。

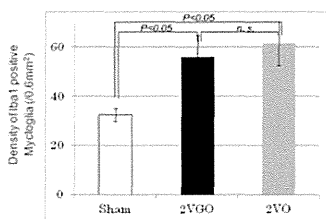
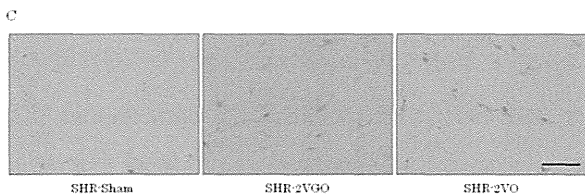
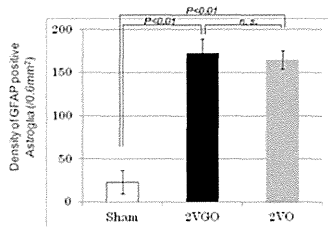
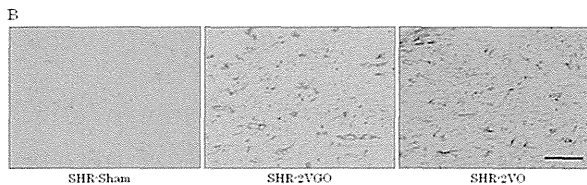
C. 研究結果

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(下図 A)。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。



さらに、同時期の SHR_2vgo 群における GFAP 陽性のアストロサイトならびに Iba-1 陽性のミクログリアの密度も偽手術群と比較して有意に増加し、その密度は SHR_2vo 群に匹敵し(各下図 B, C)、白質における炎症を反映していた。



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。

D. 考察

ラットの総頸動脈に対してアメ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. Yata K, Nishimura Y, Unekawa M, Tomita Y, Suzuki N, Tanaka T, Mizoguchi A, Tomimoto H. In vivo imaging of the mouse neurovascular unit under chronic cerebral hypoperfusion. *Stroke* 2014;45(12):3698-703.
2. Matsuura K, Tomimoto H. Use of istradefylline is recommended in the morning: a report of 4 cases. *Internal Medicine* 2015;54:509-511.
3. Tomimoto H, Wakita H. Animal models of vascular dementia: translational potential at the present time and in 2050¹. *Future Neurology* 2014;9(2):163-172.
4. Niwa A, Okamoto Y, Kondo T, Nabatame H, Takahashi R, Tomimoto H. Perivascularitic panencephalitis with relapsing polychondritis: an autopsy case report and review of previous cases. *Intern Med* 2014;53(11):1191-5.
5. Satoh M, Ogawa J, Tokita T, Nakaguchi N, Nakao K, Kida H, Tomimoto H. The effects of physical exercise with music on cognitive function of elderly people: Mihama-Kiho project. *PLoS One* 2014;25;9(4):e95230.

6. Shindo A, Wada H, Ishikawa H, Ito A, Asahi M, Ii Y, Ikejiri M, Tomimoto H. Clinical features and underlying causes of cerebral venous thrombosis in Japanese patients. *Int J Hematol* 2014;99(4):437-40.
7. Shindo A, Tanemura H, Yata K, Hamada K, Shibata M, Umeda Y, Asakura F, Toma N, Sakaida H, Fujisawa T, Taki W, Tomimoto H. Inflammatory Biomarkers in Atherosclerosis: Pentraxin 3 Can Become a Novel Marker of Plaque Vulnerability. *PLoS One* 2014;9(6):e100045.
8. Yata K, Tomimoto H. Chronic cerebral hypoperfusion and dementia. *Neurology and Clinical Neuroscience* 2014;2(5):129-134

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

冨本秀和, 佐藤正之, 木田博隆, 田部井賢一,
細谷徹夫: 情報処理装置及びコンピュータプロ
グラム 特許出願 2014-201890

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

分担研究報告書

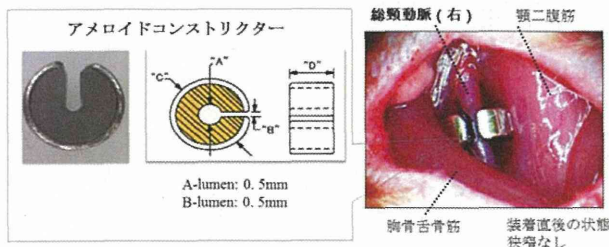
ヒトの血管性認知症の病態を的確に再現するラットモデルの画像的解析

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、内径 0.5 mm を用いた総頸動脈の閉塞がモデル化に有効であることを確認していた。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 により評価したところ、両側総頸動脈閉塞後に比べ、アメロイドコンストリクター使用により緩徐に脳血流を低下させることが出来ることを確認した。

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、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。

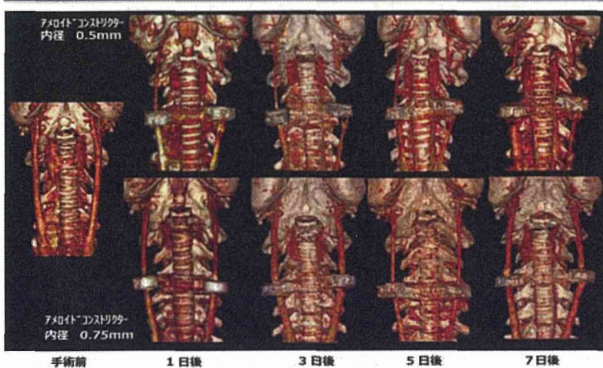
CTアンギオは、小動物用CT装置である R_mCT system (Rigaku 社製)を用いて取得した。インフルラン麻酔下にて、尾静脈より造影剤 (Iopamiron 370[®], 370 mg iodine/ml) 1ml を注射用ポンプを用いて一定速度、27秒で投与した。CTは、90 kV, 100 μ A の条件下で、アメロイドコンストリクター装着前、装着 1 日後、3 日後、5 日後、7 日後と繰り返し施行した。取得された元データは、filtered backprojection アルゴリズムにより画像再構成を行い、再構成画像は、481 \times 481 \times 481 ボクセルで、ボクセルサイズは、50 \times 50 \times 50 μ 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。

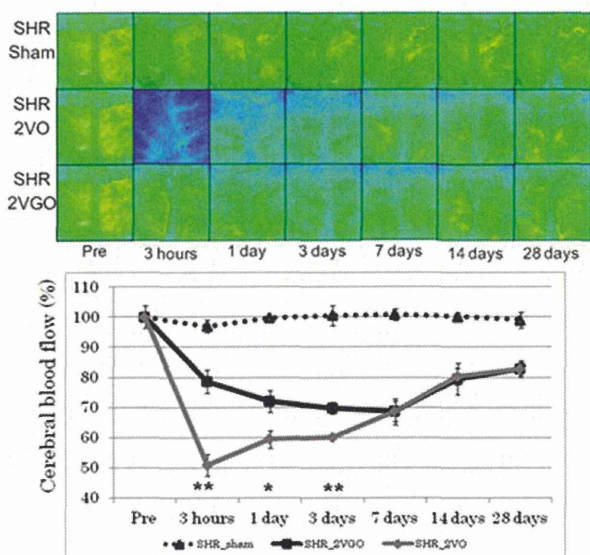
C. 研究結果

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(下図)。

SHR (2VGO)



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(下図黒線; SHR-2VGO 群)。対照群として、SHR に対する偽手術群(下図グレー線; SHR-sham 群)と



SHR に対する両側総頸動脈閉塞群(下図破線; SHR-2VO 群)を準備した。装着前の脳血流を100%とした時の相対値を示す。

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。この閉塞遅延は高血圧による圧抵抗でアメロイドコンストリクターの閉塞効率が低下した結果であると考えられる。レーザースペックル血流計によって、急激な急性期の脳血流低下を回避していることが明らかとなり、死亡率を低減させることにせいこうしたことは、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。

(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。

E. 健康危険情報

特記なし

F. 研究発表

原著論文

1. Abe M, Fukuyama H, Mima T. Water diffusion reveals networks that modulate multiregional morphological plasticity after repetitive brain stimulation. *Proc Natl Acad Sci USA*

2014;111:4608-4613.

Neurol Sci 2014;337:201-211.

2. Altmann CF, Terada S, Kashino M, Goto K, Mima T, Fukuyama H, Furukawa S. Independent or integrated processing of interaural time and level differences in human auditory cortex? *Hear Res* 2014;312: 121-127.
3. Altmann CF, Uesaki M, Ono K, Matsuhashi M, Mima T, Fukuyama H. Categorical speech perception during active discrimination of consonants and vowels. *Neuropsychologia* 2014;64C:13-23.
4. Asada T, Takayama Y, Oita J, Fukuyama H. Effects of mental rotation on acalculia: differences in the direction of mental rotation account for the differing characteristics of acalculia induced by right and left hemispheric brain injury. *Neurocase* 2014;20:163-174.
5. Asada T, Takeda K, Okiyama R, Isozaki E, Fukuyama H. The role of the thalamus in recovery from tactile extinction and crossed tactile extinction. *Neurocase* 2014;20:37-41.
6. Ashizuka A, Mima T, Sawamoto N, Aso T, Oishi N, Sugihara G, Kawada R, Takahashi H, Murai T, Fukuyama H. Functional relevance of the precuneus in verbal politeness. *Neurosci Res* 2015;91:48-56.
7. Aso T, Fukuyama H. Functional Heterogeneity in the Default Mode Network Edges. *Brain Connect* 2014, in press.
8. Enatsu R, Nagamine T, Matsubayashi J, Maezawa H, Kikuchi T, Fukuyama H, Mikuni N, Miyamoto S, Hashimoto N. The modulation of rolandic oscillation induced by digital nerve stimulation and self-paced movement of the finger: a MEG study. *J*
9. Fujino J, Takahashi H, Miyata J, Sugihara G, Kubota M, Sasamoto A, Fujiwara H, Aso T, Fukuyama H, Murai T. Impaired empathic abilities and reduced white matter integrity in schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2014;48:117-123.
10. Fujino J, Yamasaki N, Miyata J, Kawada R, Sasaki H, Matsukawa N, Takemura A, Ono M, Tei S, Takahashi H, Aso T, Fukuyama H, Murai T. Altered brain response to others' pain in major depressive disorder. *J Affect Disord* 2014;165:170-175.
11. Fujino J, Yamasaki N, Miyata J, Sasaki H, Matsukawa N, Takemura A, Tei S, Sugihara G, Aso T, Fukuyama H, Takahashi H, Inoue K, Murai T. Anterior cingulate volume predicts response to cognitive behavioral therapy in major depressive disorder. *J Affect Disord* 2015;174:397-399.
12. Fumuro T, Matsuhashi M, Miyazaki T, Inouchi M, Hitomi T, Matsumoto R, Takahashi R, Fukuyama H, Ikeda A. Alpha-band desynchronization in human parietal area during reach planning. *Clin Neurophysiol* 2014, in press.
13. Fumuro T, Matsumoto R, Shimotake A, Matsuhashi M, Inouchi M, Urayama SI, Sawamoto N, Fukuyama H, Takahashi R, Ikeda A. Network hyperexcitability in a patient with partial reading epilepsy: Converging evidence from magnetoencephalography, diffusion tractography, and functional magnetic resonance imaging. *Clin Neurophysiol* 2014, in press.
14. Hattori Y, Okamoto Y, Maki T, Yamamoto Y, Oishi N, Yamahara K, Nagatsuka K, Takahashi R, Kalaria RN, Fukuyama H, Kinoshita M, Ihara M. Silent

- information regulator 2 homolog 1 counters cerebral hypoperfusion injury by deacetylating endothelial nitric oxide synthase. *Stroke* 2014;45:3403-3411.
15. Hirose K, Miyata J, Sugihara G, Kubota M, Sasamoto A, Aso T, Fukuyama H, Murai T, Takahashi H. Fiber tract associated with autistic traits in healthy adults. *J Psychiatr Res* 2014;59:117-124.
 16. Hiyoshi-Taniguchi K, Oishi N, Namiki C, Miyata J, Murai T, Cichocki A, Fukuyama H. The Uncinate Fasciculus as a Predictor of Conversion from aMCI to Alzheimer Disease. *J Neuroimaging* 2014;00:1-6.
 17. Inano R, Oishi N, Kunieda T, Arakawa Y, Yamao Y, Shibata S, Kikuchi T, Fukuyama H, Miyamoto S. Voxel-based clustered imaging by multiparameter diffusion tensor images for glioma grading. *Neuroimage Clin* 2014;5:396-407.
 18. Koelkebeck K, Miyata J, Kubota M, Kohl W, Son S, Fukuyama H, Sawamoto N, Takahashi H, Murai T. The contribution of cortical thickness and surface area to gray matter asymmetries in the healthy human brain. *Hum Brain Mapp* 2014;35:6011-6022.
 19. Koganemaru S, Sawamoto N, Aso T, Sagara A, Ikkaku T, Shimada K, Kanematsu M, Takahashi R, Domen K, Fukuyama H, Mima T. Task-specific brain reorganization in motor recovery induced by a hybrid-rehabilitation combining training with brain stimulation after stroke. *Neurosci Res* 2015;92C:29-38.
 20. Maezawa H, Matsuhashi M, Yoshida K, Mima T, Nagamine T, Fukuyama H. Evaluation of lip sensory disturbance using somatosensory evoked magnetic fields. *Clin Neurophysiol* 2014;125:363-369.
 21. Matsumoto R, Mikuni N, Tanaka K, Usami K, Fukao K, Kunieda T, Takahashi Y, Miyamoto S, Fukuyama H, Takahashi R, Ikeda A. Possible induction of multiple seizure foci due to parietal tumour and anti-NMDAR antibody. *Epileptic Disord* 2015, in press.
 22. Minamoto T, Azuma M, Yaoi K, Ashizuka A, Mima T, Osaka M, Fukuyama H, Osaka N. The anodal tDCS over the left posterior parietal cortex enhances attention toward a focus word in a sentence. *Front Hum Neurosci* 2014;8:992.
 23. Ono K, Altmann CF, Matsuhashi M, Mima T, Fukuyama H. Neural correlates of perceptual grouping effects in the processing of sound omission by musicians and nonmusicians. *Hear Res* 2015;319:25-31.
 24. Ota K, Oishi N, Ito K, Fukuyama H, Group S-JS. A comparison of three brain atlases for MCI prediction. *J Neurosci Methods* 2014;221:139-150.
 25. Sasamoto A, Miyata J, Kubota M, Hirao K, Kawada R, Fujimoto S, Tanaka Y, Hazama M, Sugihara G, Sawamoto N, Fukuyama H, Takahashi H, Murai T. Global association between cortical thinning and white matter integrity reduction in schizophrenia. *Schizophr Bull* 2014;40:420-427.
 26. Shimotake A, Matsumoto R, Ueno T, Kunieda T, Saito S, Hoffman P, Kikuchi T, Fukuyama H, Miyamoto S, Takahashi R, Ikeda A, Lambon Ralph MA. Direct Exploration of the Role of the Ventral Anterior Temporal Lobe in Semantic Memory: Cortical Stimulation and Local Field Potential Evidence From Subdural Grid Electrodes. *Cereb Cortex* 2014;1-16.