

201407010B

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～26 年度 総合研究報告書

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 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. 研究成果の刊行に関する一覧表……………	17
-------------------------	----

III. 研究成果の刊行物・別刷……………	19
-----------------------	----

I 総合研究報告書

（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 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

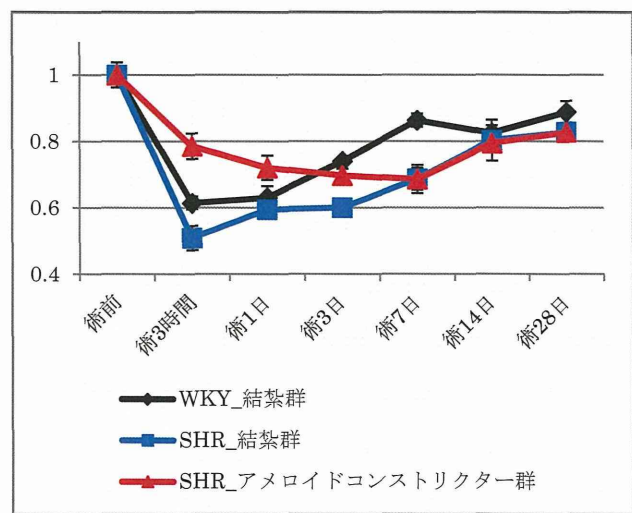
1. SHR ラットモデルの脳血流推移の解析

（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(下図赤線;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;黒線)とSHRに対する両側総頸動脈閉塞群(SHR_結紮群;青線)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, 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, ウィ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(図青線). 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, 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(図赤線). 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.

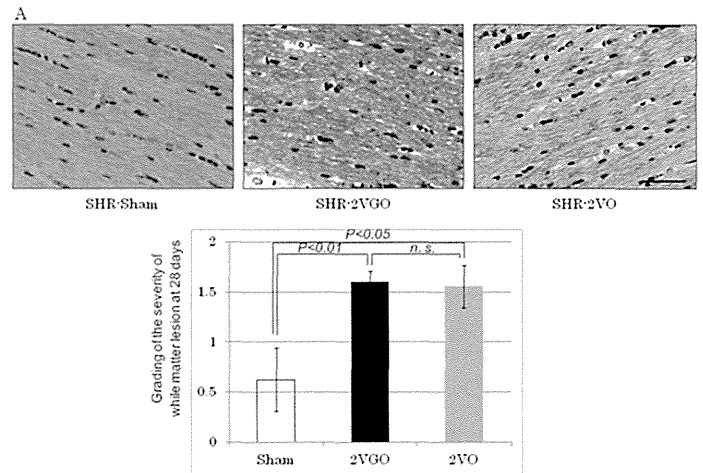
2. SHR ラットモデルの組織学的変化の解析

(三重大学: 富本グループ)

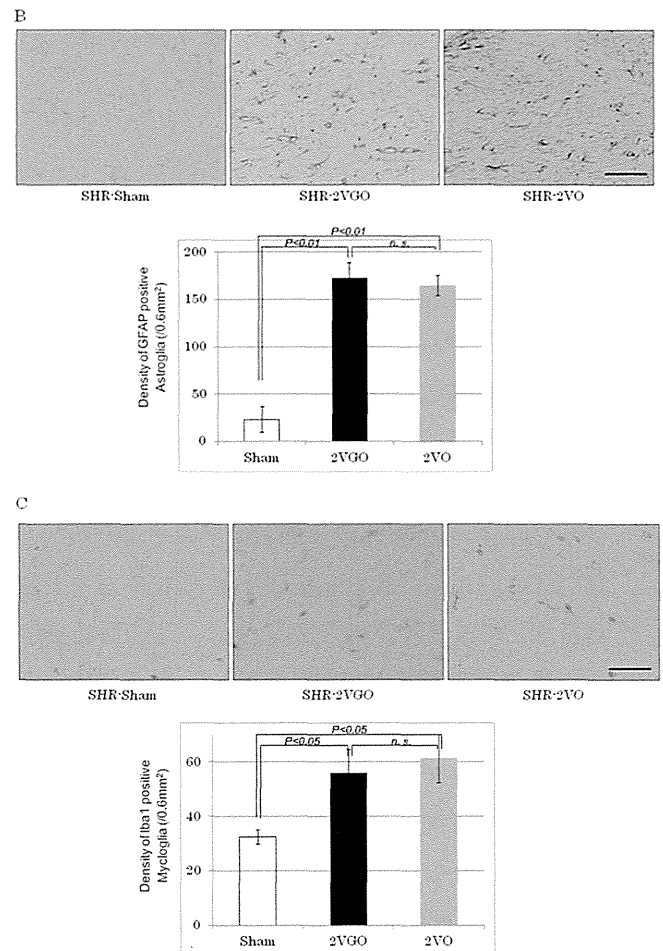
SHR に対するアメロイドコンストリクターの装着手術後 28 日の時点における大脳白質部(Optic chiasm; 視交叉部, Corpus callosum ; 脳梁部)の組織学的変化を Klüber-Barrera 染色により Grade 0(低)から 3(高)の 3 段階で評価した.

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.



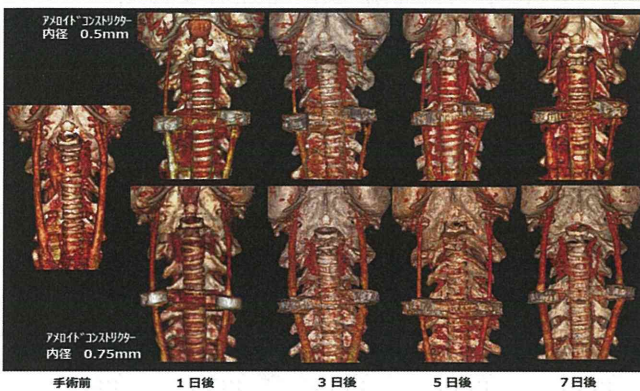
以上より、組織学的な観点からも、ヒト血管性認知症のモデル化を達成できた。

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)。

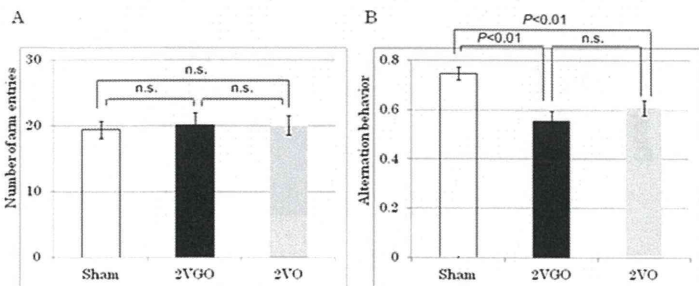
SHR (2VGO)



4. SHR ラットモデルの行動解析

(京都大学:福山グループ)

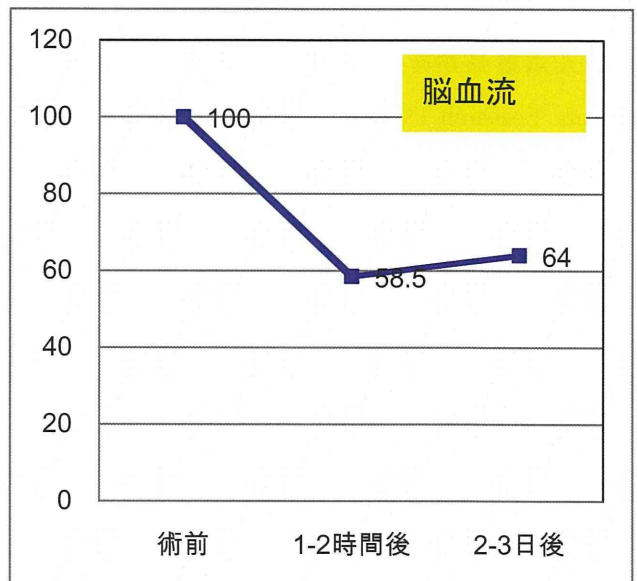
SHR に対する偽手術 (Sham), 両側総頸動脈へのアメロイドコンストリクター装着 (2VGO), 両側総頸動脈の結紮 (2VO) を行い、Y 迷路試験にて作業記憶の評価を行った。3 群で運動量には差異がなかった(下図 A)。しかし、Sham 群と比較して、2VGO 群、2VO 群いずれにおいても、Y 迷路試験で観察される交替現象の割合が有意に低く(下図 B)、作業記憶の障害が示唆された。



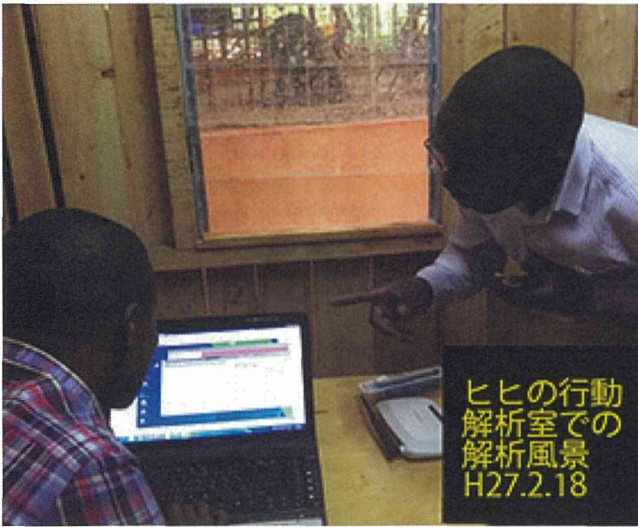
5. アヌビスヒト血管性認知症モデルの脳血流変化

(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 (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ため、ヒト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。



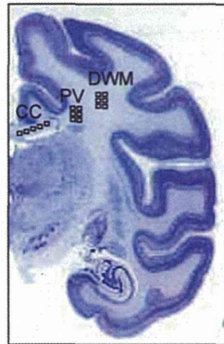
(倫理面の配慮)

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。



Hematoxylin-eosin 染色,
Luxol fast blue 染色
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。

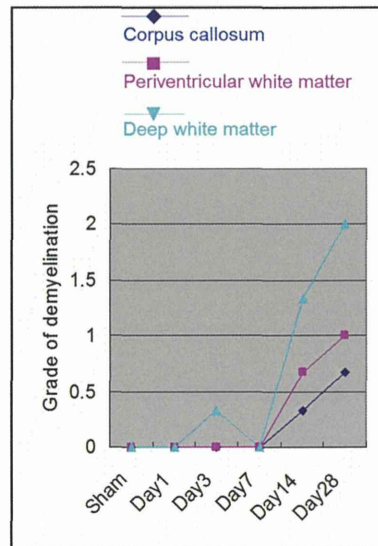


図. 手術後の脱髓の経時変化

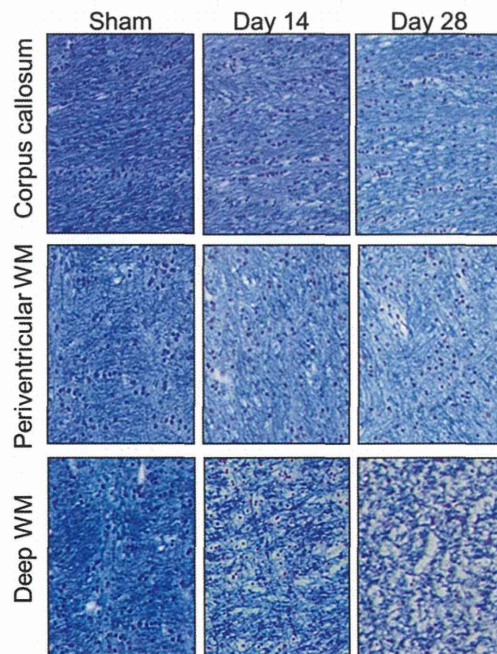


図. 代表的な脱髓所見

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。

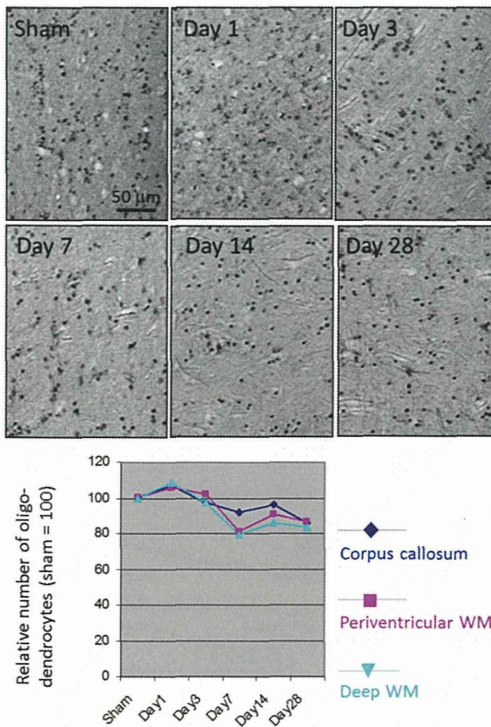


図. Corpus callosum(脳梁), Periventricular WM(脳室周囲白質), Deep WM(深部白質)におけるオリゴデンドロサイト(乏突起膠細胞)の密度変化

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。

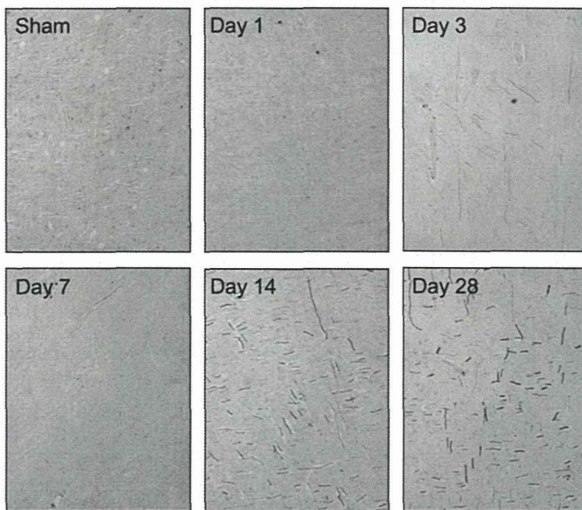


図. Deep WM(深部白質)における SMI32 染色結果

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。

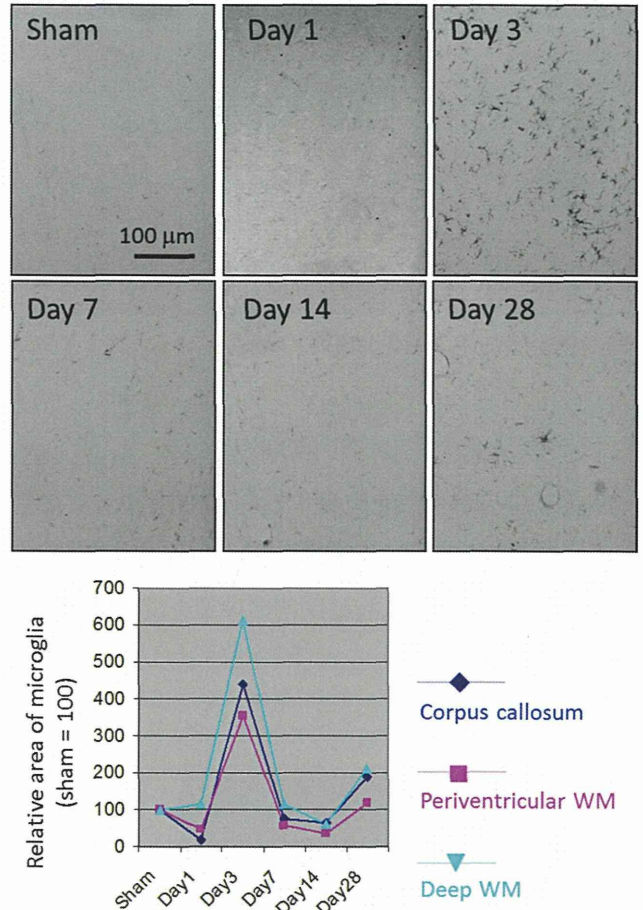


図. HLA-DR 染色によるミクログリア活性化の経時変化

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。

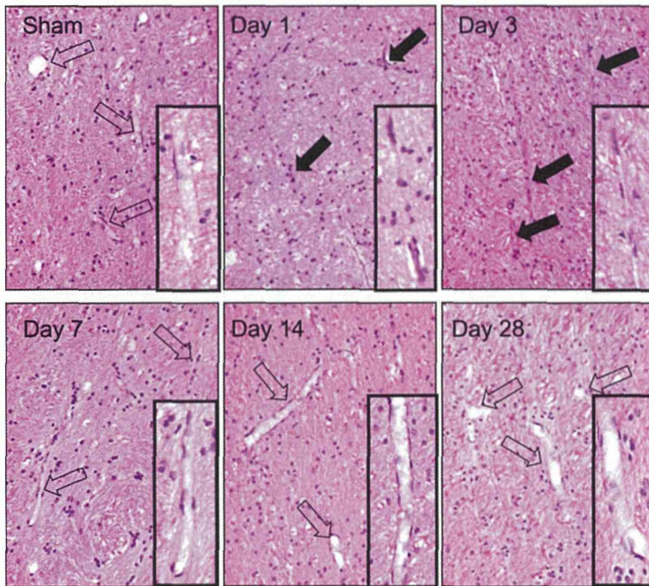


図. H&E 染色による微小血管の評価

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。

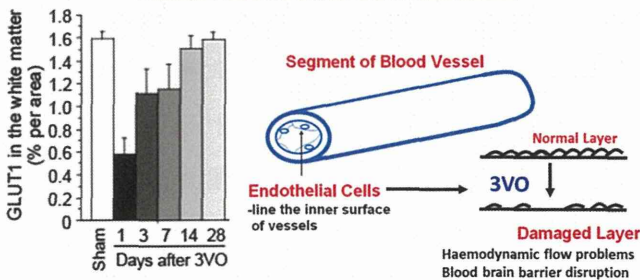
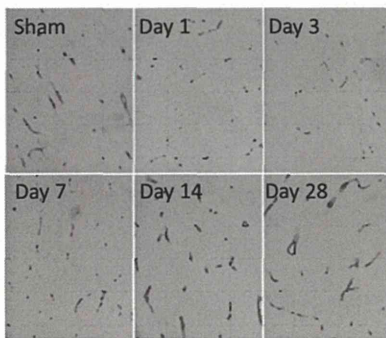


図. GLUT1 染色による血管内皮細胞の評価

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。

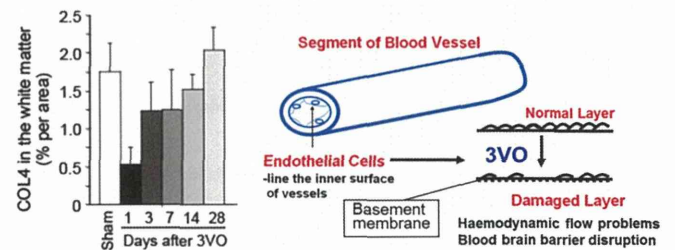
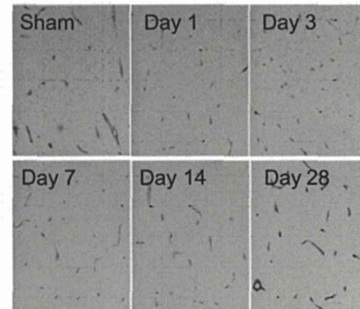


図. COL4 染色による血管基底膜の評価

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。

7. 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ラクター(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.

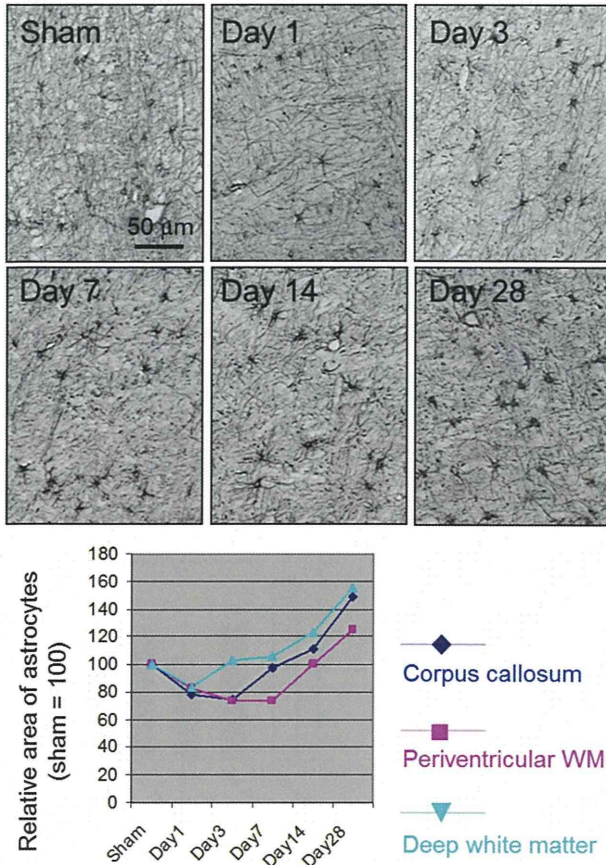
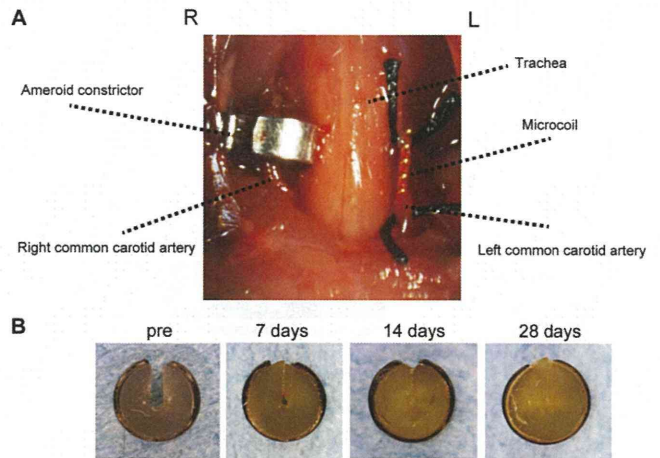
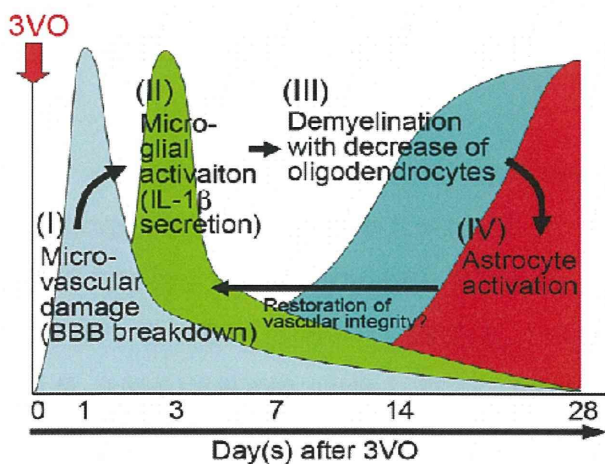


図. GFAP 染色によるアストロサイトの評価

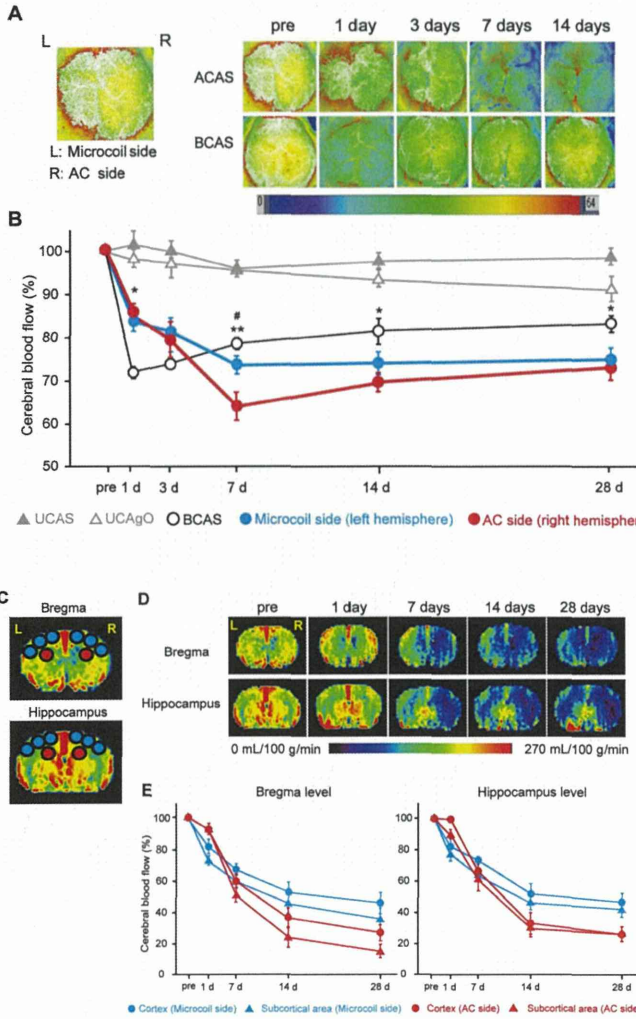
9. 組織学的評価のまとめ

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.



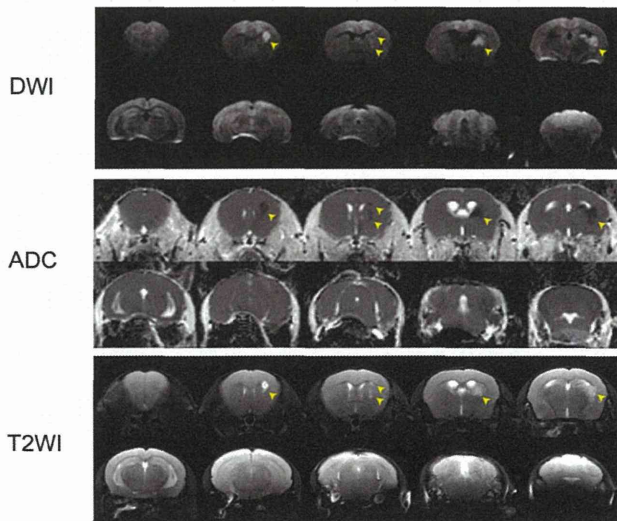
2. 脳血流推移

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.



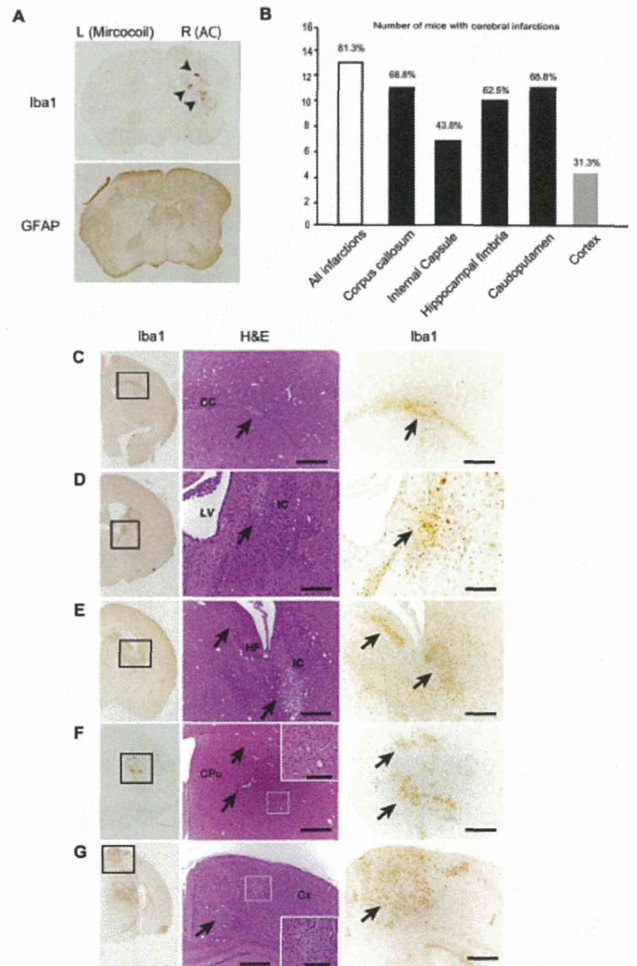
3. 7-tesla MRI による解析

皮質下の高度の脳血流低下が誘導された結果、右側(アモ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。



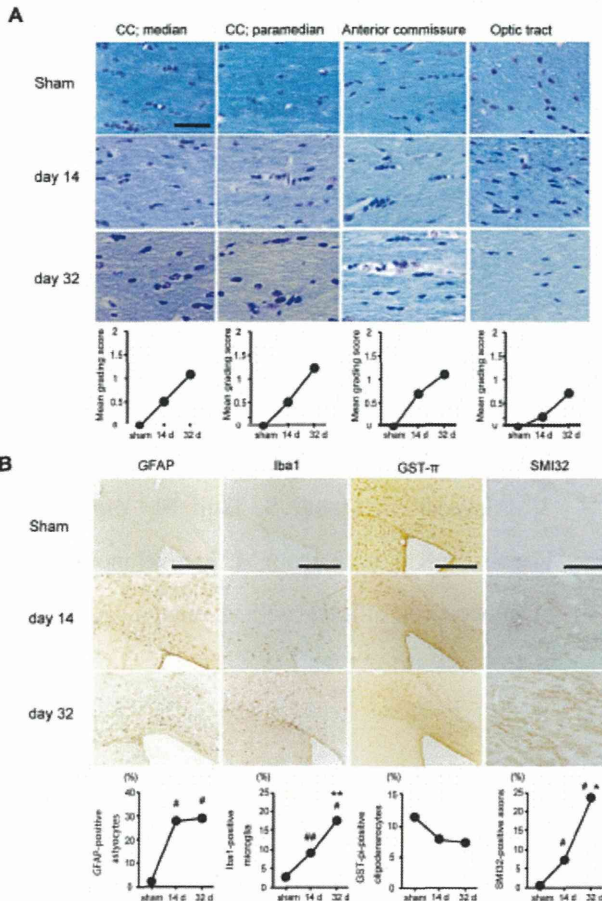
4. 組織学的解析(主に右半球—アモロイドコンストリクター側)

組織学的には、多発性の脳梗塞が右半球に局限して誘導された(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。



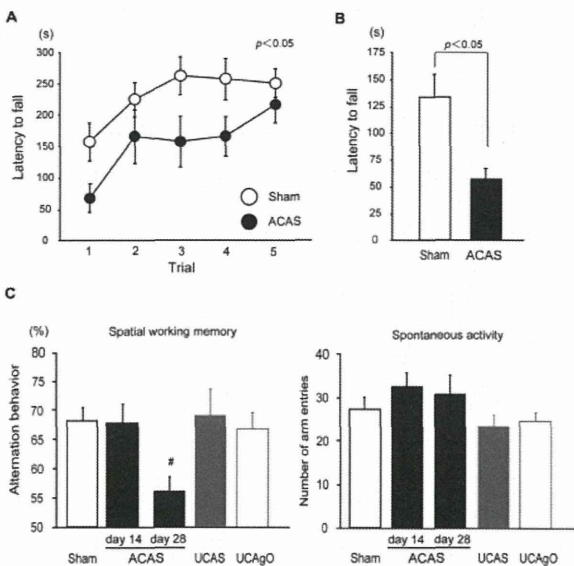
5. 組織学的解析(左半球—微小コイル側)

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。



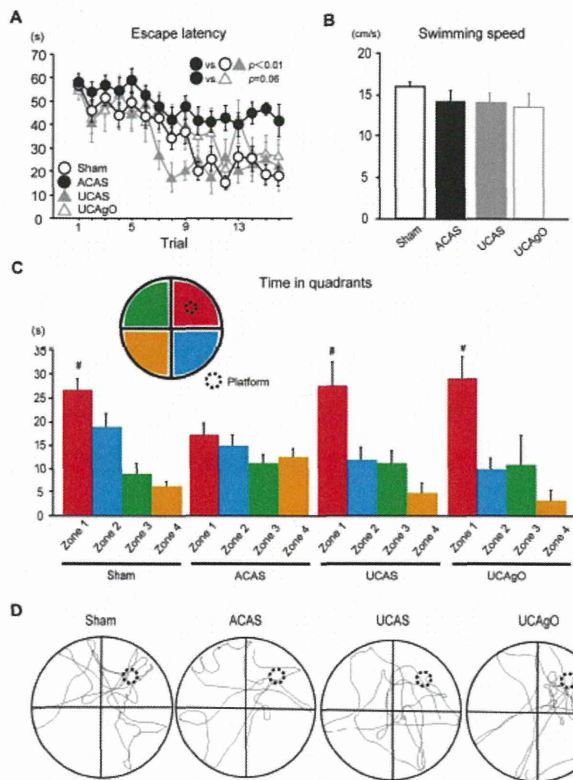
6. 行動解析—作業記憶

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明らかとなり、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晩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が出来たと考える。

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:12 件

2) 海外

口頭発表・講演:8 件

原著論文:40 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. 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, Kretzschmar 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.
20. 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.
21. 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.
22. Kalaria RN, Ihara M. Vascular and neurodegenerative pathways—will they meet? *Nat Rev Neurol* 2013;9(9):487-488.
23. 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.
24. 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* 2013;40(5):591-602.
25. 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.
26. 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* 2013;4(7):596-600.
27. 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.
28. Kasahara Y, Ihara M, Taguchi A. Experimental and clinical challenge for neuroregeneration following stroke. *Front Neurol Neurosci* 2013;32:69-75.
29. 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.
30. 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.
 31. 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* 2013;10(6):642-53.
 32. 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.
 33. 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.
 34. 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* 2013;10(6):642-53.
 35. 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.
 36. Kalaria RN, Akinyemi R, Ihara M. Does vascular pathology contribute to Alzheimer changes? *J Neurol Sci* 2012;322(1-2):141-147.
 37. 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* 2013;22(6):737-741.
 38. 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.
 39. 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. *Exp Neurol* 2012;233(1):523-533.
 40. 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 β deposition and memory deficit in APP transgenic mice. *Neurobiol Aging*, 2012;33(5):1011.e11-23.

学会発表

41. *Masafumi Ihara. Animal Models of Vascular Dementia. Invited lecture: Asia Pacific Stroke Conference (Taipei, Taiwan) Sep 14, 2014.

42. *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 (Denmark), July 12 2014.

43. *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.

44. *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.

45. *Masafumi Ihara. Lessons from rodent models characterizing features of vascular cognitive impairment. Minisymposium (Animal models of VCI). Vas-Cog2013 (Toronto, Canada) Jun 26, 2013.

46. *Masafumi Ihara. Animal models of brain hypoperfusion and cognitive impairment. (Nairobi) Dec 7, 2012.

47. *Masafumi Ihara. CAA and Cerebrovascular Disease: markers and mechanisms. Animal models II. 3rd CAA meeting (Plenary lecture). (Leiden) Oct 24, 2012.

48. *Masafumi Ihara. Cerebral hypoperfusion accelerates cerebral amyloid angiopathy and promotes cortical microinfarcts. World Stroke Congress (Brazilia). Oct 12, 2012.

49. *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.

50. *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.

51. *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.

52. *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.

53. *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

54. *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

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 2012年6月15日

55. *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

2. 実用新案登録

なし

56. *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

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)

57. *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

58. *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

59. 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

60. 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

Ⅱ 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
Hattori Y, Enmi JI, Kitamura A, Yamamoto Y, Saito S, Takahashi S, Iguchi S, Tsuji M, Yamahara K, Nagatsuka K, Iida H, <u>Ihara M.</u>	A novel mouse model of subcortical infarcts with dementia.	<i>J Neurosci.</i>	35(9)	3915-3928	2015
Hattori Y, Okamoto Y, Maki T, Yamamoto Y, Oishi N, Yamahara K, Nagatsuka K, Takahashi R, Kalaria RN, Fukuyama H, Kinoshita M, <u>Ihara M.</u>	Silent information regulator 2 homolog 1 counters cerebral hypoperfusion injury by deacetylating endothelial nitric oxide synthase.	<i>Stroke.</i>	45(11)	3403-3411	2014
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, <u>Ihara M.</u>	Phosphodiesterase III inhibitor promotes drainage of cerebrovascular β -amyloid.	<i>Ann Clin Transl Neurol.</i>	1(8)	519-533	2014
Hattori Y, Kitamura A, Nagatsuka K, <u>Ihara M.</u>	A novel mouse model of ischemic carotid artery disease.	<i>PLoS One.</i>	9(6)	e100257	2014
<u>Ihara M</u> , Taguchi A, Maki T, Washida K, Tomimoto H.	A mouse model of chronic cerebral hypoperfusion characterizing features of cognitive impairment.	<i>Methods Mol Biol.</i>	1135	95-102	2014
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, <u>Ihara M.</u>	Selective white matter abnormalities in a novel rat model of vascular dementia.	<i>Neurobiol Aging.</i>	23(5)	1012-e25-35	2012