

博士論文

マウス慢性脳低灌流モデルを用いた大脳白質慢性虚血性変化
に対する Cilostazol の投与効果に関する研究

大友 亮

マウス慢性脳低灌流モデルを用いた大脳白質慢性虚血性変化
に対する Cilostazol の投与効果に関する研究

所属 脳神経医学専攻 神経内科学

指導教員 辻 省次

申請者 大友 亮

要旨

両側総頸動脈狭窄マウスに最長 10 週間 Cilostazol を投与し、本薬剤が慢性脳低灌流による白質の粗鬆化を長期的に抑制する事を確認した。

続いて、マイクロアレイ解析により同マウス脳梁において経時的発現増加を来す遺伝子群を同定し、その翻訳産物に対して免疫組織染色を行い、これらが白質においては oligodendrocyte で強く発現する事を特定した。本遺伝子群中の *Btg2* は Cilostazol 投与により発現が促進された。

以上より、Cilostazol は慢性脳低灌流状態において白質保護効果を発揮するとともに、oligodendrocyte において、特定の遺伝子の発現増加を促進する可能性が示唆された。

目次

要旨.....	2
目次.....	3
略語集.....	5
序文.....	6
血管性認知症とは.....	6
血管性認知症の病型分類.....	8
SIVD とは.....	9
SIVD の予防・治療.....	10
SIVD のモデル動物.....	11
BCAS マウスについて.....	12
BCAOラット・BCASマウスを用いた先行研究.....	13
抗血小板薬 Cilostazol の SIVD 治療薬としての可能性.....	14
本研究の着眼点.....	15
本研究の目的.....	16
方法.....	17
Bilateral common carotid artery stenosis (BCAS)マウスの作成.....	17
パラフィン切片の作成と Hematoxylin-Eosin/Kluver-Barrera 染色.....	18
Cilostazol 懸濁液の調整.....	20
Cilostazol 投薬プロトコール.....	20
凍結切片の作成と蛍光免疫染色.....	21
画像解析.....	22
Total RNA 抽出のためのマウス脳梁の摘出.....	23
Total RNA の抽出と品質検定.....	23
マイクロアレイ解析.....	24
定量 RT-PCR.....	26

3, 3',- Diaminobenzidine (DAB) 発色免疫染色.....	27
Olig2 陽性細胞の計数.....	28
Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) 法による脳梁 cAMP 定量.....	28
統計解析.....	29
結果	30
1. 慢性脳低灌流状態において, Cilostazol は長期白質保護効果を発揮する.....	30
2. 慢性脳虚血下で発現増加する遺伝子群は oligodendrocyte で強く発現している.....	32
考察	36
1. 慢性脳低灌流に対する Cilostazol 長期投与の有効性.....	36
2. 遺伝子発現解析から想定される oligodendrocyte の慢性脳虚血における役割.....	38
3. 慢性脳虚血下における Cilostazol と oligodendrocyte の関係性.....	39
4. 本研究の限界点と今後の課題.....	40
5. 結論.....	42
謝辞	44
図表	45
参考文献	80

略語集

cAMP: cyclic adenosine monophosphate

DNA: deoxyribonucleic acid

GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

PBS: phosphate buffered saline

PCNA: proliferating cell nuclear antigen

PDGFR: platelet-derived growth factor receptor

RNA: ribonucleic Acid

RT-PCR: reverse transcription polymerase chain reaction

SD: standard deviation

SEM: standard error of the mean

TBS: tris buffered saline

序文

血管性認知症とは

血管性認知症(vascular dementia: VaD)とは脳血管障害(cerebrovascular disease: CVD)に関連して出現した認知機能障害の呼称であり、全世界的にはアルツハイマー病(Alzheimer's Disease: AD)に次いで2番目に多いタイプの認知症(20~30%)とされている¹。本疾患概念は1891年にフランスのKlippelが、1894年にはオーストリアのBinswangerが、生前に認知症と診断されていた剖検症例の中に当時流行していた神経梅毒による進行麻痺とは明らかに病理学的に異なる、脳内の動脈硬化性変化と梗塞巣のみを認めた例を確認した事に端を発する^{2,3}。

このように疾患概念の歴史こそ古いですが、VaDはCVDの様々な病態を基盤とする上に、ADのような臨床的・病理学的特徴を有さないため、個々の症例で血管病変と認知機能障害の関連を明確化することは必ずしも容易ではなかった。その影響もあり、病態生理が十分に吟味されないまま「変性疾患の証拠が確認されない認知症で、CVDを合併するもの= VaD」という「ゴミ箱診断」が一人歩きしていた時代が長く続いた。しかしながら、1990年代以降の疫学的病理研究を通して、血管病変とアルツハイマー病変の混合病理による認知症の割合が意外にも高く、それが高齢者においてより顕著である事が分かってきた事や⁴⁻¹²、VaDとADとの間に共通の危険因子(図1)が存在する事が明らかにされてきた事から¹³⁻¹⁷、疾患背景が血管障害であるVaDを変性疾患であるADと相容れない対局疾患と捉える事なく、ADとの関連性や連続性を考慮した上で再整理す

るという風潮が芽生え始めたことにより、近年、改めてVaDが注目され始めたのである(図2)。これは1990年代にHachinskiらが、CVDに関連した認知症を表現する高位の概念として、純粹に血管病変によるもの以外に、(ADとの)混合型認知症や血管性軽度認知障害を包含する、血管性認知障害(Vascular cognitive impairment: VCI)を提唱し¹⁸、2011年、American Heart Association (AHA)/American Stroke Association (ASA)によってその診断ガイドラインが策定された事からも見て取る事ができる(表1)¹⁹。

VaDには World health organization (WHO)による International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems (ICD)-10、米国精神医学会による Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM)-IV、Alzheimer's Disease Diagnostic and Treatment Centers (ADDTC)による虚血性血管性認知症の診断基準、National Institute of Neurological Disorders and Stroke (NINDS)と Association Internationale pour la Recherche et l'Enseignement en Neurosciences (AIRESN)による国際ワークショップで作成された診断基準、と4つの代表的な診断基準が存在している²⁰⁻²⁴(表2, 3, 4)。ところが、基準間の診断一致率が80~100%とばらつきが大きいという報告や²⁵、ADDTCとNINDS-AIRESNの診断基準に関しては、感度(60%程度)、特異度(60~80%)ともに高くないという報告もあり¹³、その信頼性については疑問が残る。前述のAHA/ASA新ガイドラインにおいてもまた、疾患特異性の高い画像所見やバイオマーカーについての言及は一切なく、具体性を欠くVaDの診断基準は依然として日常臨床の中で実践的に活用可能なものとは言い難い。こうした問題点は、認知機能障害を説明し得る血管

病理学的基盤(vascular pathology substrate)が確立されない限り，解決には至らないと考えられる。

血管性認知症の病型分類

VaDの病型分類としては，1993年に策定されたNINDS - AIRENによる分類(表4)が最も汎用性の高いものとなっている²⁴。本分類において，血管性認知症は1) 多発梗塞性認知症，2) 単一病変に伴うStrategic single-infarct dementia，3) 認知症を伴う脳小血管病，4) 低灌流によるもの，5) 出血性認知症，6) その他の機序によるもの，の6型に分類されている。

我が国においては「認知症を伴う脳小血管病」が約半数を占め，多発梗塞性認知症が2～3割であるとされている²⁶。「認知症を伴う脳小血管病」については，皮質領域と皮質下領域に細分類されており，大多数を占める皮質下領域病変に相当するものとして多発ラクナ梗塞とBinswanger型脳梗塞が挙げられている。皮質下病変については，NINDS-AIRENワークショップの一員であったErkinjunttiらがより均一な臨床病理像を呈する血管性認知症の亜型として皮質下血管性認知症(Subcortical ischemic vascular dementia: SIVD)を定義し，診断基準を提唱した(表5)^{27,28}。SIVDはその大部分が小血管性認知症と重複しているが，皮質に分布する小血管病変を含んでいない。

SIVDは患者数の多さのみならず，病理学的基盤が主幹動脈ではなく微小血管であるという点においても他の病型と一線を画している。主幹動脈を首座とする病変のよ

うに、治療・予防に対するエビデンス（例えば、アテローム血栓性脳梗塞に対する抗血小板薬投与や高血圧等のリスク管理、心原性脳塞栓症に対する抗凝固薬、出血性病変に対する血圧の管理といった具合に）が確立されておらず、病態の存在を疑っても、具体的な対応に窮する事が多いという問題点がある。次項からは、このようにVaDの中でも「異質な病態」であるSIVDに焦点を当てる事とする。

SIVDとは

SIVDの中核をなすBinswanger 型脳梗塞は、1894年にOtto Binswangerによって報告された³。Encephalitis subcorticalis chronica progressivaと命名された病態は、側頭後頭葉白質の高度の萎縮と脳血管の動脈硬化を認め、大脳皮質がほぼ正常に保たれた症例を基にしたものであった。後にJellingerらによって、同様の病理所見を呈する疾患群がprogressive subcortical vascular encephalopathy of Binswanger typeとして紹介されるに至った²⁹。

SIVDの危険因子としては、高血圧・糖尿病・加齢などが指摘されてきた³⁰⁻³²。これらの因子が大脳白質の髄質動脈において、細動脈硬化(fibrohyalinosis)と呼ばれる中膜平滑筋細胞の変性と中外膜の膠原繊維の増生を引き起こし、血管反応性を低下させ、白質における血流をびまん性に低下させる結果、病変が形成される仮説が示されているが、これらの見解については議論がなされている³³。ヒトにおける白質病変の病理所見においては、病変部位に血液脳関門の障害、microgliaの活性化、astrocyteの増生

と変性, oligodendrocyteのアポトーシスとその減少, 及び変成したmyelin basic proteinの蓄積が確認されている³⁴⁻³⁶.

臨床症状は①遂行機能障害を主体とする認知症(抑うつ・apathyといった周辺症状も含む), ②歩行障害, ③めまいなどの非典型的な神経症状が主体である. 病変の広がりによっては偽性球麻痺による嚥下障害を来しうる. ①, ②については白質病変が高度であるほど, 増悪傾向にある事が示されている^{37,38}. 発症年齢は50~70台に多く, 緩徐進行性または階段状の経過を辿る. 特に脱水や感染に伴い凝固能が亢進する際に増悪しやすい事も分かっている^{39,40}. 早期より歩行障害や嚥下障害を伴う事が多いため, 慢性的な臥床状態を強いられる患者も少なくなく, 医療経済的問題を孕みやすい傾向にある.

SIVDの予防・治療

SIVDの予防手段として唯一エビデンスのあるものは, fibrohyalinosisの原因となる高血圧に対する, 降圧薬による薬物療法である. 高齢者高血圧患者を対象に行われた大規模臨床試験 Syst-Eur においては, カルシウム拮抗薬である Nitrendipine 投与群で SIVD を含めた認知症発症率が対照群よりも 55%低減し⁴¹, 日本も参加した脳卒中の二次予防を目的とした大規模臨床試験 PROGRESS においては, ACE 阻害薬である Perindopril および利尿薬である Indapamide を投与した患者群では SIVD を含む VaD および AD の発症が有意に低かったと報告されている⁴².

認知機能に対する治療に関しては、臨床試験においてある程度の有効性が報告されているものとして、アセチルコリンエステラーゼ阻害薬である Donepezil⁴³, Galantamine⁴⁴, Rivastigmine⁴⁵, や(NMDA)受容体拮抗薬である Memantine⁴⁶ などの薬物療法があるが、いずれも対症療法であり、SIVDの基本病態であるびまん性大脳白質病変の進展を抑制しうるものではない。

SIVDのモデル動物

高齢者が増加の一途を辿る本邦において、SIVDに至る病態機序の解明と予防・治療の検索は、既に医療費の1割を担っていると言われる脳卒中診療による医療経済的負担を増大させないためにも、急務であると思われるが、本病態については未だに不明点が多い。病態解明の一助として、びまん性白質障害と認知機能障害を再現する齧歯類を用いた慢性脳低灌流モデルが開発されている(表6)。虚血による白質病変は高血圧自然発症脳卒中易発症ラット(SHR-SP)でも観察されるが、病変発症に5か月程度を要し、その程度も軽度であると言われ、病態解析には向かないとされる⁴⁷。一方で齧歯類を用いた慢性脳低灌流モデルである、ラットbilateral common carotid artery occlusion (BCAO)モデル(以降BCAOラットと表記)⁴⁸・砂ネズミbilateral common carotid artery stenosis (BCAS)モデル⁴⁹・マウスBCASモデル⁵⁰(以降BCASマウスと表記)は、fibrohyalinosisを再現はしていないが、両側総頸動脈閉塞ないしは狭窄の結果として生じる慢性脳低灌流を介して、白質病変を病理学的に再現しているという点や、行動解

析実験において作業記憶の低下は見られても参照記憶障害は観察されず、SIVDの認知プロフィールを再現している点から⁵¹、SIVDの良質なモデルと見做されている。BCAOラットには血管結紮1～3日後にかけての急激な血流低下(手術前値の30～50%に低下)が見られ、厳密には慢性脳低灌流を再現していない可能性がある点⁵²、砂ネズミモデルは側副血行路の発達に個体差がある点においてBCASマウスに劣る⁵³。加えて、BCASマウスは遺伝子改変マウスへの適用が容易であるという利点もあり、現在のところ、最も優れたモデルとして世界中で汎用されている。

BCASマウスについて

BCASマウスは後交通動脈の発達が最も悪い系統であるC57BL/6Jマウスの両側総頸動脈にピッチ0.5mm、全長2.5mmのピアノ線からなるマイクロコイル(内径は0.16mm～0.22mmの間で調整)を装着する事で作成される。コイル内径により病理学的変化の程度や部位に変動が見られるが、内径0.18mmコイルを用いた場合、術後7日後の生存率が少なくとも85%を越え、灰白質梗塞を来すことなく、明確に白質の経時的な病理学的変化を確認できるため、同内径コイルが最も頻用されている。白質障害の程度としては脳梁が最も強く、それに線条体が続く。白質の病理学的変化としては術後7日目以降からのmicrogliaの活性化、14日目以降からのastrocyteの増生が観察され、30日後には軸索構造の乱れを伴わない白質髄鞘の脱落が見られる^{50,54}。

BCAOラット・BCASマウスを用いた先行研究

BCAOラットを用いた先行研究により、慢性脳虚血により活性化されたmatrix metalloprotease (MMP)が血管基底膜の構成タンパクの分解に作用する事でblood brain barrier(BBB)を破壊し、血清タンパク質の漏出が認められた結果、白質障害を引き起こす事、MMPの中でもMMP2が強いmyelin basic protein (MBP)分解能を有し、白質を直接障害し得る事が確認された^{55,56}。これらの結果を踏まえて、議論の余地はあるものの、現在では慢性脳虚血によるびまん性白質病変の成因として図3に示すような経路が想定されている。その一方で、BCAOラットの脳梁において、PDGFR- α 陽性のOligodendrocyte precursor cell (OPC)が増殖細胞のマーカーであるPCNAとともに有意に増加していた事から、軽度の虚血障害がmyelin修復系を活性化する可能性が示されており⁵⁷、慢性脳虚血における白質において何らかの再生機序も作動している事が予想されている。同モデルを用いた薬理実験としては、炎症性機序の関与の可能性を受けて、免疫抑制剤であるCyclosporin AとTacrolimus, Cyclooxygenase-2(COX-2)阻害薬、MMP阻害薬を用いた研究が行われており、それぞれの白質保護作用が確認されている⁵⁸⁻⁶¹。また、抗血小板薬であるCilostazolはanti-apoptotic protein (Bcl-2)の活性化を通して、フリーラジカルスカベンジャーであるEdaravoneはBBB破壊抑制を介して白質保護作用を発揮する可能性が示唆されている^{62,63}。

マウスモデルにおいても、薬理実験が施されており、Cilostazolが慢性虚血下における脳梁OPCの増殖を促進する事で白質のmyelinを再生する事が確認されている⁶⁴。そ

の他にも、脳梁のマイクロアレイ解析により、慢性脳低灌流状態では、炎症性変化や血管新生に寄与する遺伝子群の発現量が増加する事を報告した研究や⁵⁴、MMP2欠損マウスに慢性低灌流負荷を加え、野生型に比べ白質が保護される事を示した研究⁶¹、アデノシンA_{2A}受容体欠損マウスの慢性虚血後の白質障害の増悪を確認した例がある⁶⁵。さらには、変異型ヒトアミロイド前駆体タンパク質を過剰発現するマウスにBCAS手技を施す事で、神経変性が加速したというADと慢性虚血の関係性を示唆した研究もある⁶⁶。

抗血小板薬 Cilostazol の SIVD 治療薬としての可能性

齧歯類モデルを用いて種々の薬理実験が行われてきたが、多くの薬剤が炎症性機序を抑制する事により大脳白質病変の進展を防止する中で⁵⁸⁻⁶¹、抗血小板薬であるCilostazolは白質のmyelin再生に関与する可能性が示唆されたという点で異質な存在となっている⁶⁴。元よりCilostazolはPhosphodiesterase3 (PDE3)の選択的阻害によって細胞内cAMPを上昇させ⁶⁷、血小板においては凝集抑制作用⁶⁸、血管平滑筋においてはその弛緩による血管拡張作用を示すため⁶⁹、脳梗塞発症後の再発抑制に関して強力なエビデンスを持つ薬剤である⁷⁰。日本脳卒中学会が制定した脳卒中治療ガイドライン2015においては、Cilostazolは心原性脳塞栓症を除く脳梗塞治療で選択されるべき抗血小板薬のfirst choiceとなっている。本薬剤が急性期CVDのみならず、SIVDのような慢性疾患にも有用となれば、これは非常に画期的な事である。

本研究の着眼点

先行研究により、慢性脳虚血による白質障害のメカニズムが炎症性反応である可能性が示され、抗炎症作用を示す薬剤が白質保護に効果的に作用する事が確認された⁵⁸⁻⁶¹。その一方で、少数例ではあるが、軽度の虚血障害はmyelin修復系を活性化する可能性が示されている⁵⁶。これは、SIVDの白質変化への対応策を考慮するにあたり、炎症反応を抑制する事のみならず、「慢性虚血下で惹起される何らかの内因性の白質保護作用」にも着目すべきである事を示唆している。

これまで炎症性機序がより注目されていた理由は、マウスモデルの弱点にあると考える。その弱点とは、BCAOラットに比してその程度は軽度とは言え、BCASマウスにおいても、手術直後～翌日にかけては脳血流が手術前値の60%程度に低下してしまい、手術後2日以降は、厳密には「急性期と慢性期の混在した組織変化」を観察している事になってしまう点である(図4)⁵⁰。前述のマイクロアレイ解析を例にとれば、周術期の血流低下の影響を受けたBCASマウスとその影響をほとんど受けていないであろう

sham-operationを施したマウス脳梁における遺伝子発現変化を比較しているが、BCASマウスに急性期の組織変化が混入している以上、両者を比較すれば急性期組織障害による炎症性変化が前面に出てきてしまうのは当然の結果ではないかという疑問が生じてくる。薬理実験についても同様の事が言え、Cilostazolを例にとれば、先行研究ではBCAS手術当日～翌日にかけて薬剤投与を開始しており、その効果対象が「急性期の急激な脳血流低下」であった可能性が排除出来ていないのではないかという疑問が残る。

本研究の目的

こうした疑問を踏まえ、本研究においては、既存のBCASモデルを用いつつ、術後急性期を回避するタイミングでCilostazolを投与した際の、大脳白質慢性虚血性変化に対する効果について検証する事を目的とした。そのために、本研究では以下の2つの実験を行った。

1. 先行研究によりSIVD齧歯類モデルにおいて内因性のmyelin修復機構を促進させる可能性が指摘されたCilostazolが、急性期を回避するタイミングで投与した場合においても同様の役割を果たしうるかを検証する実験.
2. BCASマウス群の脳梁において経時的に発現が増加する遺伝子群を調べ、その中から特に変動が大きかった遺伝子を抽出し、その脳梁における発現局在を確認した後、Cilostazol投与による同遺伝子の発現変化を検証する実験.

方法

以下の行程は東京大学大学院医学系研究科動物実験委員会の承認を得た上で施行した(承認番号：医-P12-44, 医-P15-042).

Bilateral common carotid artery stenosis (BCAS)マウスの作成

一連の作業は実体顕微鏡 Stemi2000 (Zeiss, Oberkochen, Germany)使用下で行った.

9～10 週年齢の C57BL/6Jcl マウス(日本クレア, 東京)に対して, 動物用麻酔器 LMS-56 (LMS, 東京)を用いてイソフルラン(フォーレン[®], アボットジャパン ; 流量 : 1L/分, 濃度 : 導入時 3%, 維持時 1%)吸入を行った後, 持続麻酔下で頸部腹側の皮膚に 5mm の正中切開を行った(作業中余剰ガスについては LMS SR-1 (LMS, 東京)を用いて回収). 続いて, 左頸動脈鞘を切開後, 総頸動脈を迷走神経から丁寧に剥離した. 露出した左総頸動脈に内径 0.18mm のピアノ線からなるマイクロコイル(サミニ株式会社, 浜松市)をコイルの溝を動脈に巻きつけるように装着した(図 5). 10 分間, 麻酔継続下で一側のみを処理した状態を維持し, 反対側にも同様の手技を行った. 両側にコイルが脱落なく装着されている事を確認した後, 持続麻酔を中止し, マウスの覚醒(全て 10 分以内には覚醒)を確認したところでケージに戻した. 同様に, 総頸動脈の剥離までは行うが, コイルは掛けない sham-operation 群(以降 sham 群とする)も作成した.

以降 coil 装着 X 週後マウスを coil Xw, sham-operation 後 Y 週後マウスを sham Yw と表記する.

パラフィン切片の作成と Hematoxylin-Eosin/Kluver-Barrera 染色

①パラフィン切片の作成

Sham 4w (n=3), coil4w (n=3), coil 6w (n=3)を頸椎脱臼後, 50mL 0.15M NaCl 溶液で脱血し, 50mL 4%パラホルムアルデヒドで灌流固定を行った. その後, 脳を摘出し, 4%パラホルムアルデヒドに4°Covernight で浸し, 後固定を行った. その後, Bregma 前方 1.5mm~後方 2.5mm の領域をブレインスライサ MK-MC-01 (室町機械株式会社, 東京)で切り出し(図 6), 自動固定埋包装置(サクラファインテック株式会社, 東京)にて脱水・脱脂・パラフィン浸透を行った. パラフィンプロックは HISTO STAR (Thermo Fisher)で作成した. 得られたブロックより Microm HM400 (Thermo Fisher)を用いて 6 μ m の薄切切片を切り出し, 水中で伸展させた後, スライドガラスに載せ, 室温 overnight で自然乾燥した. 完成したスライドは資料ボックスに入れて, 室温で染色時まで保存した.

②Hematoxylin-Eosin (HE)染色

灰白質(大脳皮質・海馬 CA1 領域)における虚血性神経細胞死の有無を確認するために, sham 4w 群と coil 4w 群から得られたパラフィン切片に対して HE 染色を行った. 標本を Hematoxylin 染色液(Merck, Darmstadt, Germany)に 5 分浸した後, 流水で 5 分間洗浄した. 続いて, Eosin 染色液(Merck)で 2 分間浸し, 流水で数秒間洗浄した. 上記作業後は脱水・透徹作業を行い, キシレンで希釈したマリノール(武藤化学株式会社)

で封入した。完成したスライドは Axiophot2/Axioplan2 (Zeiss)を用いて観察し，写真は AxioCam HRC/ AxioVision release 4.6.3 SP1 (Zeiss)で撮像した。

③Kluver-Barrera (KB)染色

白質(脳梁・線条体)における髄鞘の粗鬆化を確認するために，HE 染色同様，sham 4w 群と coil 4w 群から得られたパラフィン切片に対して KB 染色を施した。脱パラフィンを行った切片を 95%エタノール槽に浸し 3 分間放置した。その後，0.1%ルクソールファスト青液(武藤化学株式会社，東京)の入った染色バットに入れ，60°Cのパラフィン溶融器中で overnight 処理を行った。バットを取り出し，室温で 1~2 時間放置した後，95%エタノール槽に浸し 3 分間放置し，余分なルクソールファスト青液を洗浄した。更に，脱イオン水で 3 回，30 秒ずつすすぎ，エタノールを落とした後，0.1%炭酸リチウム(武藤化学株式会社)に 5 分間浸した。引き続き 70%エタノール槽 2 槽で分別し，再度脱イオン水で 3 回 30 秒ずつ洗浄した。次に 0.1%クレシル紫(武藤化学株式会社)に浸し，5 分間放置した後，10%酢酸を数滴加えた 95%エタノール槽→100%エタノール槽の順に浸す事で分別を行った。上記作業後は脱水・透徹作業を行い，キシレンで希釈したマリノールで封入した。完成したスライドは HE 染色同様，Axiophot2/Axioplan2 (Zeiss)を用いて観察し，写真は AxioCam HRC/ AxioVision release 4.6.3 SP1 (Zeiss)で撮像した。

Cilostazol 懸濁液の調整

0.5% Carboxymethyl Cellulose Sodium Salt (CMC; 和光純薬工業, 大阪) を作成し, Cilostazol (和光純薬工業) の溶媒とした. 本溶液に 10mL に Cilostazol 0.1g を懸濁し, 10mg/mL 懸濁液を作成し 4°C で冷蔵保存した. 懸濁液は腐敗を避けるため, 1 週間ごとに作り替えた.

Cilostazol 投薬プロトコール

計 32 匹の BCAS マウスを作成し, Cilostazol 投与群 (100mg/kg/day, n=12) と偽薬 (CMC) 投与群 (10mL/kg/day, n=20) に分けて投薬を行った. 投薬はコイル装着後の急性期脳血流低下に対する Cilostazol の効果を除外するため, 手術 1 週間後より開始した. 投与量については日々の体重 (測定は GX-2000, エー・アンド・デイ, 東京で行った) に応じた量を調整した. 投薬に当たってはディスポーザブルゾンデ 5200 (フチガミ器械, 京都) を用い, 前述の Cilostazol 懸濁液, CMC 溶液を経口投与した (図 7). Cilostazol 投与群については投与開始後 2, 6, 10w 後に, CMC 投与群については投与開始後 2, 4, 6, 8, 10w 後にそれぞれ 4 匹ずつ sacrifice し, 後述の要領で凍結切片を作成した (図 8). 以降, Cilostazol 投与 X 週後の BCAS マウスを Cilostazol Xw, CMC 投与 Y 週後の BCAS マウスを CMC Yw と表記する.

凍結切片の作成と蛍光免疫染色

①凍結切片の作成

目的の観察期間に達したマウスを頸椎脱臼後、50mL 0.15M NaCl 溶液で脱血し、50mL 4%パラホルムアルデヒドで灌流固定を行った。その後、脳を摘出し、4%パラホルムアルデヒドに4°C overnight で浸し、後固定を行った。同処理脳を1×PBS で1回洗浄後、50mL チューブに入った20%スクロース/PBS 溶液30mL に浸し、チューブ底に沈殿するまで放置する事でスクロース置換を行った。次に、置換後脳から観察対象となる Bregma 前方 1.5mm～後方 2.5mm 領域をブレインスライサで切り出し、プラスチック埋包皿(クリオモルド2号, サクラファインテック)に満たした Optimal Cutting Temperature (OCT) compound (Tissue Tek, サクラファインテック)に包埋後、液体窒素で急速凍結を行った。引き続き、クライオスタット(Microm HM525, Thermo Fisher)で薄切(10 μ m)を行い、3-Aminopropyltriethoxysilane (APS)コートスライドガラス(松波硝子工業株式会社, 大阪)への接着を行った。標本は自然乾燥後、染色時まで湿気を避け-30°Cで保管した。

②蛍光免疫染色

凍結検体を展開したスライド0.1% Triton-X 100・TBS (pH 7.4)溶液(TBST)で透過処理を行い、パラフィン切片同様に抗原賦活化を行った。ブロッキングは5%正常ヤギ血清を用いて1時間行った。その後、100倍希釈したウサギポリクローナル抗 Myelin proteolipid protein (PLP) 抗体(abcam, Cambridge, UK)を1次抗体として用い、4°C

overnight で反応させた． PBS で 10 分間洗浄を 3 回繰り返した後，暗所で 500 倍に希釈した Alexa Fluor[®] 594 付加抗体ウサギ IgG 抗体(Thermo Fisher)と室温で 1 時間反応させた． 再度 PBS で 10 分間洗浄を 3 回繰り返した後， ProLong[®] Diamond Antifade Mountant (Thermo Fisher)で封入した． 作成標本は速やかに水銀ランプ点灯下 (AttoArc HBO 100W, Zeiss でランプ出力を 50%に調節)で Axiophot2/Axioplan2 (Zeiss) を用いて観察し，写真はランプ出力 100%下で露出時間 150ms のもと， AxioCam HRc (Zeiss)で撮像した．

画像解析

輝度比較の部位としては，経時的变化が最も明確に観察された帯状束を用いる事とした． まず，撮像データ(zvi 形式ファイル， RGB カラー)をオープンソース画像処理ソフトウェア ImageJ (imagej.nih.gov/ij/)にプラグインツール Bio-Formats (LOCI, Madison, USA)を用いて取り込み， 16bit グレースケールに変換し， rolling ball アルゴリズムに基づいた背景の減算を行った(この際，減算後の画像データが背景よりも小さな値を取らないように smoothing を行わないオプションを選択した)． 引き続き，目で同定した片側の帯状束をその外縁に沿った線で囲んだ後， region of interest として選択し，同領域内の平均輝度を測定した． 1 個体につき 3 箇所(別切片)の平均輝度を測定し，各治療群において 1 観察期間あたり 12 箇所(3 箇所×各期間の個体数)値の平均と標準誤差を算出した． 最終的には CMC 2w 群の平均輝度値を 1 とすることで，

Cilostazol 投与群(Cilostazol 2w, 6w, 10w)や同群の他観察期間(CMC 4w, 6w, 8w, 10w)における輝度値との相対比較を行った。

Total RNA 抽出のためのマウス脳梁の摘出

手術後、一定期間を経たマウスに対して頸椎脱臼を行った後、速やかに脳を摘出し、ブレインスライサに載せた状態で -80°C に 12 分間放置し、半凍結脳を作成した。同脳より、ブレインスライサを用いて静脈洞合流部の前方 1mm~5mm に相当する coronal section を切り出し、氷冷しながら実体顕微鏡下で眼科用メス(Fine Science Tools, North Vancouver, Canada 10315-12, 10316-14)を用いて脳梁の摘出を行った。摘出検体はオートクレーブ済の 1.5mL マイクロチューブにて(1 個体につき 1 本使用)、total RNA 抽出作業時まで -80°C で凍結保存した。

Total RNA の抽出と品質検定

Total RNA は 1 サンプル(2~4mg)あたり 400 μL の TRIzol[®] RNA Isolation Reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)を用いて、添付プロトコールに従い抽出を行った。引き続き、RNA 溶液(RNase free water 20 μL に溶解)に対して 0.1 倍量の 3M 酢酸ナトリウム(pH 5.2)と 2.5 倍量の 100%エタノールを加え、 -80°C 下で overnight とし、RNA の精製・濃縮を行い、最終的に 10 μL の溶液を得た。各サンプルの Total RNA 濃度は Qubit[®] Fluorometer と Qubit[®] RNA BR Assay Kit (Thermo Fisher Scientific)を、純

度測定(OD 260/280, 260/230)は分光光度計 DU[®]730 (Beckman Coulter, Brea, USA)を用いて測定した。純度は OD 260/280>1.6 かつ OD 260/230>1.6 を満たすものを選定し、Agilent 2100 バイオアナライザ(Agilent Technologies, Santa Clara, USA)で品質検定を行った。品質基準としては total RNA の分解度を表す RNA integrity number (RIN)を用い⁷¹, 7以上をマイクロアレイ解析の使用条件とした。

マイクロアレイ解析

GeneChip[®] Mouse Genome 430 2.0 Array (Affymetrix, Santa Clara, USA)を用いて解析を行った。Total RNA は coil 2w, coil 4w, coil 6w (n=3 each), sham4w (n=3)の脳梁より抽出した。解析行程は下記の如く GeneChip 3' *In Vitro* Transcription (IVT) Express Kit User Manual に順じた。

① ターゲット作製

GeneChip 3' IVT Express Kit (Affymetrix)を使用した。前述の要領で得られた total RNA のうち各サンプルあたり 250ng を用い、オリゴ dT に T7 プロモーターを付加したプライマーを用いて RNA の逆転写反応を行った。その後、double-stranded cDNA を合成し、T7 RNA ポリメラーゼによる *in vitro* transcription で complement RNA (cRNA) を合成した。この際ビオチンラベルされたリボヌクレオチドを取り込ませ、ビオチン標識 cRNA を合成した。

② ハイブリダイゼーション

Hybridization, Wash and Stain Kit (Affymetrix)を使用した。合成された cRNA 10 μ g を断片化し、Mouse Genome 430 2.0 Array へのハイブリダイゼーションを行った。その後、Affymetrix GeneChip Command Console (AGCC) Software ソフトウェア制御のもと洗浄および染色を行い、レーザースキャナー(GeneChip Scanner 3000 7G)で画像を取得し、プローブセルのシグナル強度の情報がまとめられている CEL ファイルを作成した。

③ データ解析

解析には統計計算環境 R(<https://www.r-project.org/>, 本実験においては Windows 7 Professional, 64bit で version 3.0.1 を起動)を基盤に作られたバイオインフォマティクス解析パッケージ集 Bioconductor (<https://www.bioconductor.org/>)を用いた。初めに、得られた CEL 形式ファイルを Group 1: coil 4w vs. sham 4w と Group 2: coil 2w vs. coil 6w の 2 グループに分類し、グループ毎にデータを Robust Multiple Average (RMA)法で標準化し、RMA 形式ファイルを作成した。次に、小サンプル数の RMA 形式ファイルの処理に最適とされる Rank product 法(倍率変化に基づくランキング法)によって各グループ内の 2 群間における遺伝子発現変動解析を行った⁷²。続いて、各グループにおいて False Discovery Rate (FDR) < 0.1 を満たし、かつ 2 倍以上の発現を認めた遺伝子群に対し、遺伝子の機能アノテーションに基づく発現解析を行うオンラインツールである PANTHER (Protein Analysis Through Evolutionary Relationships,

<http://www.pantherdb.org/>)を用い、Gene Ontology (GO)解析を行った。

定量 RT-PCR

グループ 2 の Gene Ontology 解析において上位の機能分類カテゴリーに属する遺伝子群に対して、マイクロアレイ解析結果の validation を行う目的で coil 2w 群 (n=5, うち3検体はマイクロアレイと同一検体を使用), coil 6w 群 (n=5, 同様にうち3検体はマイクロアレイと同一検体を使用), sham 2w 群 (n=4), sham 6w 群 (n=4)より前記方法にて total RNA を抽出した。その内 500ng を使用し、逆転写酵素(ReverTraAce[®], 東洋紡, 大阪)で complementary DNA (cDNA)を合成した。20 μ L に調整済の cDNA 溶液を蒸留水に溶き 1mL 溶液とした後、目的遺伝子の発現を TaqMan[®] Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Foster City, USA)および 7900HT Fast Real-Time PCR System[®] (Applied Biosystems)を用い、リファレンス遺伝子である GAPDH に対する相対量(Relative Quantity: RQ)として定量した($\Delta\Delta$ Ct 法)。使用プローブ一覧を表 7 に示した。RQ score は解析ソフト RQ Manager version 1.0.2 (Applied Biosystems)を用いて算出し、各群において平均値と標準偏差を算出した。2w coil の RQ score の平均値を 1 とした場合の各群における相対発現量を比較した。

また同手法を用いて、CMC 6w(n=4)と Cilostazol 6w(n=4)より各個体あたり total RNA を 300ng 抽出し、20 μ L の cDNA 溶液を作成した。本溶液を蒸留水に溶き

600 μ L とした後, coil 2w - coil 6w 間で発現上昇が確認された遺伝子について, CMC 6w と Cilostazol 6w における RQ score の平均値と分散を前述の要領で確認した. 各遺伝子について, CMC 6w の RQ score の平均値を 1 とした場合の Cilostazol 6w における相対発現量を算出した.

3, 3',- Diaminobenzidine (DAB)発色免疫染色

定量 RT-PCR で有意差が得られた遺伝子群のマウス脳梁における発現局在を確認するため, sham 6w 群, coil 6w 群から得られたパラフィン切片を対象として免疫染色を行った. 脱パラフィンを行った後, 0.1% Triton-X 100 \cdot TBS (pH 7.4)溶液(TBST)で透過処理を行い, Decloaking Chamber NxGen (BIOCARE MEDICAL, Concord, USA)を用いて抗原賦活化(クエン酸ナトリウム(pH 7.4) 95 $^{\circ}$ C 25 分)を行った. ブロッキングから発色までは VECTASTAIN[®] Elite[®] ABC Kit (anti-mouse, anti-rabbit; Vector Laboratories, Burlingame, USA)を用いて, 基本的には添付のプロトコールに従う形で行った. 尚, ブロッキングには 1 時間, 1 次抗体反応は overnight で, 2 次抗体は 1 時間, ABC reagent は 1 時間反応させた(使用した 1 次抗体は表 8 を参照). 発色液は DAB (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) 20mg + 1MTris(pH7.4) 2mL + 30% H₂O₂ 24 μ L + 蒸留水 38mL で調整し, スライドを 3~5 分浸す事で反応させた. 発色終了後は蒸留水で洗浄し, 脱水 \cdot 透徹作業を行い, キシレンで希釈したマリノールで封入した. 完成したスライドは KB 染色, 蛍光免疫染色同様に Axiophot2/Axioplan2 (Zeiss)を用いて観察し, 写真は AxioCam HRc

(Zeiss)で撮像した.

Olig2 陽性細胞の計数

慢性脳低灌流に伴う脳梁内 oligodendrocyte 数の変化を検討するため, sham 6w 群 (n=3), coil 6w 群(n=3)から得られたパラフィン切片に対して, 前述の要領で Olig2 に対する DAB 染色を行い, 単位面積あたりの Olig2 陽性細胞数を計測した. 具体的には, それぞれの個体から得られた切片から, 解剖学的に近似した部位の冠状断切片を選び, 同切片内の脳梁において 3 箇所(左右の帯状束直下の脳梁, 脳梁正中部)を region of interest (0.01mm²)として設定し, 同領域内における Olig2 陽性細胞数を計測した.

その後, 各群(n=9 each: 3 個体×3 箇所)における Olig2 陽性細胞数の平均値を比較した.

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)法による脳梁 cAMP 定量

BCAS マウス脳梁における経時的な cAMP 量の変化を確認するために, ELISA 法を用いた定量を行った. 検体としては, 術後 2w, 6w 経過した BCAS マウス(n=5 each)から, total RNA 抽出時と同様の手順で摘出した脳梁(1.5~3mg)を用い, 各サンプルを 0.1M HCl に溶解(サンプル 1mg あたり 0.1M HCl 10 μ L に溶解)した. 以降の手順は Direct cAMP ELISA kit (Enzo Life Sciences, Farmingdale, USA)のアセチル化プロトコールに従った. 処理後サンプルは SpectraMax[®] Plus 384 Microplate Reader (Molecular Devices, Sunnyvale, USA)を用いて測定波長 405nm で吸光度測定を行い, Standard の濃度と吸光

度から得られた検量線(Microsoft Excel 2010 で作成)から各サンプルの cAMP 濃度 (pmol/mL)を算出した。続いて、この濃度をもとに、各サンプル 1mg あたりの cAMP 量(pmol/mg tissue)を求め、その coil 2w 群における平均値を 1 とした場合の coil 6w の 相対値を算出した。

統計解析

統計解析ツールとしては特に記載が無い限り、統計計算環境 R version 3.0.1 (<https://www.r-project.org/>)を用いた。

蛍光免疫染色の輝度平均の比較における統計学的有意差の検定は、一元配置分散分析を行った後、post-hoc 検定として Tukey honestly significant difference (HSD) test を行った。いずれも $p < 0.05$ を有意差ありとした。

定量 RT-PCR の相対発現量の比較における統計学的有意差の検定は、分散の等分散性を Bartlett Test で確認し、 $p > 0.05$ の時は Tukey HSD 法による多重検定を、 $p < 0.05$ の時は Steel-Dwass 法による多重検定を用いた。いずれも $p < 0.05$ を有意差ありとした。

他の 2 群比較における統計学的有意差の検定は Wilcoxon rank sum test を用いて検証し、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

結果

1. 慢性脳低灌流状態において、Cilostazol は長期白質保護効果を発揮する

BCAS マウスにおいては、帯状束において最も髄鞘の粗鬆化が目立つ

内径 0.18mm のコイルで処理した BCAS マウスでは、灰白質梗塞は観察されず、白質が脳梁>線条体の順で障害されると報告されている⁵⁰。その再現性を検証すべく、coil 4w と sham 4w における灰白質(大脳皮質・海馬 CA1 領域)を HE 染色で比較し、白質障害の程度を KB 染色による髄鞘染色性の差で比較した(n=3 each)。図 9 に示すように、灰白質においては 2 群間で差異が確認されなかったが、白質では coil 群で sham 群に比して、脳梁外側周辺における髄鞘染色性の低下が目立っており、それは帯状束において最も顕著に観察された。線条体領域においても髄鞘染色性の低下が確認された。以上の結果から、BCAS マウスが問題なく作成されている事が確認された。

Cilostazol 投与 BCAS マウスにおいては、経時的な myelin 密度の低下が抑制される

帯状束において髄鞘の脱落が顕著に観察された KB 染色の結果をうけて、CMC 投与 BCAS マウスの帯状束における蛍光輝度の 2w ごとの経時的変化を確認した。今回は myelin 構成タンパクの最大成分である Proteolipid protein (PLP)に対する抗体を蛍光標識したため、蛍光輝度は myelin 密度を反映している。その結果、CMC 群において

は持続的な蛍光輝度の低下傾向が観察された。CMC 2w 群の平均輝度を 1 とした場合、10w 後には平均輝度が 0.7 前後に低下しており、両者の間には統計学的な有意差が認められた($p=0.003$)(図 10)。この結果から慢性脳低灌流状態におけるマウス大脳白質においては、低灌流期間が長期化すると、myelin の脱落が進行する事が確認された。

次に、BCAS 手術直後の急激な脳血流低下による影響を回避し、血行動態が安定した状態における Cilostazol の効果を確認するため、BCAS 手術後 1w 後より Cilostazol を投与したマウス帯状束における蛍光輝度の経時的变化を検証した。Cilostazol 投与 BCAS マウス群(Cilostazol 群)においては、同じく CMC2w 群の平均輝度を 1 とした場合、投薬開始 6w, 10w 後の平均輝度はほぼ等しく 0.99 前後であり、観察期間中、myelin の脱落はごく軽度であった(図 11)。投薬開始 10w 後には Cilostazol 群と CMC 群の myelin 密度に統計学的有意差が認められた($p=0.02$)(図 12)。

以上の結果により、慢性脳低灌流状態において、Cilostazol が白質障害に対して保護的な役割を果たし得る事が示された。また、投薬開始 10 週間後に偽薬群との間に有意な myelin 密度の差を確認する事ができたことは、慢性虚血性白質変化に対する Cilostazol 長期投与の有用性を示唆するものであった。

2. 慢性脳虚血下で発現増加する遺伝子群は oligodendrocyte で強く発現している

Cilostazol が何らかの形で白質に対して保護的に働いている事は確認されたが、その作用メカニズムについては序論で述べた如く、炎症性変化やアポトーシスに対して抑制的に働くという説もあれば⁶²、細胞分化(例えば OPC)に支援的に作用するという説もあり^{57,64}、一定した見解は得られていない。このような背景から、まず、BCAS マウス脳梁の網羅的遺伝子発現解析を行い、大脳白質の病理学的変化が生じる過程の中で有意に変動する遺伝子群を捉え、それらの Cilostazol 投与に伴う発現変化を検証する事とした。

慢性虚血下の白質では、細胞分化・組織形成に関連した遺伝子群が大きく変動する

網羅的遺伝子発現解析の手法としては DNA マイクロアレイを用い、Group 1 においては同週数(4w)での sham 群 - coil 群間の解析を行った。同様に Group 2 においては、myelin の脱落がほぼ見られない BCAS 手術 2w 後と、myelin 脱落が顕著となる 6w 後、つまり、脳の血行動態が安定した後、白質の病理学的変化が顕在化する期間にある 2 個体群間における遺伝子発現変化を検証した。発現変動遺伝子の順位付けに Rank product 法を使用したところ、False Discovery Rate (FDR) < 0.1 を満たし、かつ 2 倍以上の発現増加を認めた上位変動遺伝子は Group 1 で 23 個、Group 2 で 17 個であった(表 9)。これらの変動遺伝子群がどのような生物学的プロセスに関与しているかを確認するために GO (biological process based)解析を行った結果、Group 1 においては先行研究

同様、免疫応答に関与する遺伝子群が大きく変動していたが、本現象は Group 2 では確認されなかった(図 13). 更に上位 5 位までにランキングされた GO term を調べた結果、Group 1 は免疫や炎症に関連したカテゴリーで占められる一方で、Group 2 は細胞分化や組織形成に関与するカテゴリーで占められ、両者は異なる結果となった(表 10).

BCAS マウスの病理学的変化が顕在化する期間に発現増加する遺伝子群

Group2 の GO 解析により、慢性脳低灌流状態における発現増加遺伝子群が細胞分化や組織形成に関与するものである事が確認された。Rank product 法で FDR < 0.1 を満たした、発現増加遺伝子群を各サンプルの発現状況と対応させたヒートマップと共に提示する(図 14). 次に、この中から、最上位の変動遺伝子群を抽出し、マイクロアレイ解析の結果の正当性を検証するために、2 倍以上の発現増加が見られ、表 10 において上位にランキングされている GO カテゴリーに分類される 8 つの遺伝子 *Btg2*, *Cyr61*, *Dusp1*, *Egr2*, *Folr1*, *Fos*, *Junb*, *Rarb* につき、定量 RT-PCR による発現上昇の確認を行った。

定量 RT-PCR 発現上昇が確認された遺伝子群を図 15 に示す。 *Btg2* (p=0.03, Tukey HSD), *Egr2* (p=0.045, Steel-Dwass), *Fos* (p=0.01, Tukey HSD), *Rarb* (p=0.045, Steel-Dwass) にて coil 2w と coil 6w 間に有意な発現増加が確認された。図 16 には定量 RT-PCR では発現増加が確認されなかった遺伝子群を挙げたが、*Dusp1* においては sham 群にお

いて経時的に有意な発現減少が認められており(p=0.005, Tukey HSD), 慢性脳低灌流状態においては *Dusp1* の発現は相対的に増加しているものと考えた。

白質において *Btg2, Dusp1, Egr2, Fos, Rarb* は Oligodendrocyte で強く発現している

次に, 定量 RT-PCR で発現増加が確認された遺伝子群:*Btg2, Dusp1, Egr2, Fos, Rarb* の白質における発現局在を確認するために, sham 6w, coil 6w マウスから得られた切片の免疫組織染色を行った。比較対象として図 17 のように astrocyte のマーカーである GFAP (glial fibrillary acidic protein)を, microglia のマーカーである Iba-1 を, oligodendrocyte の核のマーカーである Olig2, 細胞質のマーカーである TPPP (Tubulin Polymerization Promoting Protein)を染色した。先行研究の報告通り, coil 群においては sham 群では観察されなかった astrocyte の増生, 活性化 microglia の存在が確認された。慢性脳低灌流による脳梁内の oligodendrocyte 数の変化を単位面積あたりの Olig2 陽性細胞数 sham 群, coil 群で比較したが, 図 18 に示すように統計学的な有意差は得られなかった(p=0.5, Wilcoxon rank sum test)。各翻訳産物の染色においては, *Btg2* は Olig2 と一致するよう一部の oligodendrocyte の核に強い染色性を示し, その他はその主たる発現が細胞質にある事が知られている *Rarb* も含め, TPPP と一致するよう oligodendrocyte の細胞質に強い染色性(一部核にも染色性あり)を認めた。*Btg2* と *Dusp1* については coil 群のみで oligodendrocyte が濃染され, *Egr2, Fos, Rarb* においては sham 群と coil 群の間に染

色性の差は見られなかった。この結果、慢性脳虚血状態の脳梁において発現が増加している遺伝子群は *oligodendrocyte* で特に強く発現している事が分かった(図 19, 20)。

Cilostazol 投与によって *Btg2* の発現が促進される

次に、Cilostazol による白質保護作用と、その薬理作用(細胞内 cAMP 上昇)が *Btg2*, *Dusp1*, *Egr2*, *Fos*, *Rarb* の発現に与える影響との関連性を検証するため、CMC 6w 群 (n=4), と Cilostazol 6w 群 (n=4)の脳梁における同遺伝子群の発現を比較した。

Cilostazol 投与群では *Btg2* の発現が促進されており、CMC 投与群との間に統計学的有意差が見られた(p=0.03)(図 21)。

更に、*Btg2*, *Dusp1*, *Egr2*, *Fos*, *Rarb* の発現が cAMP によって促進される事を示した先行研究を受けて⁷³⁻⁷⁷, 慢性脳低灌流状態においてこれらの遺伝子群の発現が増加する背景にも白質における内因性の cAMP 上昇が関与している可能性を考え、coil 2w-coil 6w 間における白質内の cAMP 量の変化について確認したが、図 22 に示すように、統計学的な有意差は得られなかった(p=0.2, Wilcoxon rank sum test)。

考察

1. 慢性脳低灌流に対する Cilostazol 長期投与の有効性

ヒトにおける SIVD の基本病態は、びまん性大脳白質病変によって引き起こされる認知機能障害である。白質病変は加齢や長期にわたる高血圧への暴露などにより大脳白質を灌流する髄質動脈が fibrohyalinosis を来たす事で、血管反応性が低下し、白質組織が慢性的な低灌流状態となる事により緩徐に形成されるとされている³³。同白質病変においては、脳血液関門の障害、microglia の活性化、astrocyte の増生と変性、oligodendrocyte のアポトーシスといった病理学的変化が確認されている³⁴⁻³⁶。認知機能障害に関しては、参照記憶は比較的保たれる一方で、作業記憶の低下による遂行機能障害が目立つといった特徴があると言われている²⁶。

BCAS マウスにおいては細動脈硬化までは再現されないものの、両側総頸動脈の人工的狭窄によりもたらされる実験的白質病変において、ヒト同様に脳血液関門の障害、microglia の活性化、アストロサイトの反応性変化などの病理学的変化が確認されており⁵⁰、行動実験においても、作業記憶の低下は見られるものの、参照記憶の障害は観察されないという点において⁵¹、SIVD による認知機能障害を再現していると言われる。上記のような特徴を兼ね備えている上に、他の齧歯類モデルとは異なり、遺伝子改変モデルマウスへの応用が可能であるといった利点も有している点が、BCAS マウスが最も優れたモデルとして汎用されている事由である。

Cilostazol は PDE3 の選択的阻害によって細胞内 cAMP を上昇させ⁶⁷, 血小板においては凝集抑制作用⁶⁸, 血管平滑筋においてはその弛緩による血管拡張作用を示すため⁶⁹, 既に, 急性期脳梗塞治療で選択されるべき抗血小板薬の first choice となっている. BCAA ラット・BCAS マウスを用いて種々の薬理実験が行われてきたが, 多くの薬剤が炎症性機序を抑制する事により大脳白質病変の進展を防止する中で⁵⁸⁻⁶¹, Cilostazol は白質の myelin 再生に関与する可能性が示唆されたという点で異質な存在となっている^{57,64}. 本薬剤が急性期 CVD のみならず, SIVD のような慢性疾患にも有用となれば, これは非常に画期的な事であり, 注目に値するのである.

先述のように, Cilostazol の慢性脳虚血下大脳白質に対する効果は BCAA ラットないしは BCAS マウスを用いた先行研究により明らかにされてきた. しかしながら, 手術直後に脳血流が前値の 30~50%に低下するラット BCAA ラットほど極端ではないが, BCAS マウスにおいても, 術後数時間から翌日にかけて脳血流が前値の 60~70%程度にまで落ち込んでしまう⁵⁰. 先行研究においては, 何れも手術当日より投薬を開始していたため, 急性期における Cilostazol の効果の影響を無視できなかった. また, Cilostazol のヒトへの応用を考慮した場合, 先行研究においては薬剤投与期間が 2~4 週間と短く, 長期内服の成績が不明であったため, SIVD における白質病変の進展予防薬としてのインパクトも小さかった.

そこで, 本研究においては, 脳血流量がコイル装着前の 80%前後で安定した手術 1 週間後より投与を開始し, 10 週間の長期にわたり経口投与(先行研究においては腹腔

内注射や混餌の形で投与されていた)を行う事によって「SIVD が進展しうる生理的條件」により近い状況で効果を再確認する方針とした。結果的には、偽薬投与群は経時的な myelin 脱落を認めた一方で、Cilostazol 投与群は投与開始 6w 後から 10w 後にかけて myelin 密度がほぼ不変であった事から、Cilostazol の継続投与が長期にわたり、慢性脳低灌流による白質変化に対して有効である事が確認された。本結果は Cilostazol の SIVD への積極的な使用を支持するものであると考えられた。

ただし、今回の結果が 100mg/kg/day 投与した結果もたらされたものである事も忘れてはならない。投与量を検討するにあたっては、先行研究において 100mg/kg/day を腹腔内投与していた例があった事や⁷⁸、マウスを用いた安全性薬理試験において 100mg/kg/day 経口投与下で有害事象が確認されなかった事⁷⁹、マウスに対する単回投与毒性試験で LD₅₀>5000mg/kg であった事などを参考とし⁸⁰、100mg/kg/day は薬理実験の dose としては適正であったと考えている。しかしながら、本実験に用いた投与量は、現在、ヒトの脳梗塞急性期の再発予防や慢性閉塞性動脈硬化症に対して使用されている用量(100~200mg/day ; ヒトの重量を 50kg とした場合、2~4mg/kg/day)に比べてかなり多いため、ヒトに対する現行の用量が SIVD の進展予防に有効である保証はなく、解釈には注意が必要である。

2. 遺伝子発現解析から想定される oligodendrocyte の慢性脳虚血における役割

BCAS マウスは前述の通り、軽度ながらも周術期の急峻な血流低下を受けるため、その経時的白質変化は厳密には「急性期と慢性期の混在した組織変化」を観察している事になってしまう。先行研究においては、周術期の影響を受けた BCAS マウスとその影響を全く受けていない sham-operation を施したマウスの組織における病理学的変化や遺伝子発現変化を比較していたが、BCAS マウスに急性期の組織変化が混入している以上、両者を比較すれば炎症性変化が目立ってしまうのは当然の結果と言える。実際に、本研究においても sham 4w と coil 4w を比較した実験においては、免疫・炎症に関連した遺伝子群が最も大きく変動しており、同週の sham 群と coil 装着群を比較した先行研究と一致した⁵⁴。一方で、術後急性期から十分に時間が経過した状態にあるが、白質の病理学的変化(myelin 脱落)が極軽度である coil 2w と、病理学的変化が明らかとなる coil 6w を比較した実験においては、細胞分化や組織形成に関与する遺伝子群が大きく変動していた。この結果に加えて、定量 RT-PCR において、発現増加が確認された *Btg2*, *Dusp1*, *Egr2*, *Fos*, *Rarb* が coil 6w の白質においては oligodendrocyte で強く発現している事が明らかとなった。本遺伝子群の機能については表 11 に簡潔に示す。これらの遺伝子のうち、*Egr2*, *Fos* は外部刺激に対応した細胞特性や性質の変化を引き起こすための転写因子やシナプス関連タンパクなどの新規発現や、その変化を維持するための細胞骨格関連タンパクなどの補充といった役割を担う最初期遺伝子に相当する^{81,82}。また、*Btg2* は過剰発現によって神経前駆細胞の分化を促進する事が *in vivo* で確認されている^{83,84}。このような機能を持つ遺伝子が慢性脳低灌流によって発現増加してい

るという事は、炎症性機序による myelin の脱落という病理学的変化の背景に、
oligodendrocyte の分化を中心とした myelin 再生機構が働いている可能性を示唆するも
のであった。

3. 慢性脳虚血下における Cilostazol と oligodendrocyte の関係性

成人脳における oligodendrocyte は大多数が図23で示すような premyelinating
oligodendrocyte と myelinating oligodendrocyte の形で存在しているが、OPC も少なからず
残存しており(全グリア細胞の5~8%を占めると言われる)⁸⁵、分化能を保持したまま、
維持されているものと考えられている⁸⁶。つまり、OPC から myelinating oligodendrocyte
に至る経路の何処かを活性化すれば、myelin 再生は常に成人脳においても十分に起り
うると考えられる。先行研究においてはラットBCAOモデルの脳梁で、PDGFR- α 陽
性のOPCが増殖細胞のマーカーであるPCNAとともに有意に増加していた事から、軽
度の虚血障害がmyelin修復系を活性化する可能性が示されており⁵⁷、SIVDにおいては、
慢性脳低灌流によりOPCが増加し、白質の修復機構が働くが、自力で正常な成熟分化
を遂げる事が出来ないために白質の脱髄化が進行していくという学説も唱えられて
いる⁸⁷。Cilostazolは、BCAOラットへの投与後に脳梁におけるOPCの増加と白質障害
の抑制を確認した研究⁵⁷やラット培養細胞への投与後にOPCがmature oligodendrocyte
への分化が促進された研究⁶⁴の結果を受けて、上記メカニズムを活性化させる薬剤と
しても注目されている。これら先行研究の結果と、今回、慢性虚血時に一部のOlig2
陽性細胞で発現が上昇している*Btg2*がoligodendrocyte投与により発現がさらに促進さ

れた実験結果からは、Cilostazolがoligodendrocyteの特定の遺伝子の発現を亢進させる事で、その分化促進に関与している可能性が考えられた。

ただし、白質においては、oligodendrocyteの他に astrocyte, microglia, pericyte, 血管内皮細胞等、様々な構造物が一体をなしており、今回の結果が種々の薬理作用を有するCilostazolのoligodendrocyteへの直接的な作用の結果であるのか、または他の経路を介しての反応であるのかについては追加の検証が必要であると考えられる。

4. 本研究の限界点と今後の課題

現時点においては、BCASマウスがSIVDの動物モデルとしては最も汎用され、信頼できるモデルである。しかしながら、前述のように、手術後に一時的に急速な血流低下を来たしてしまうという点において、その病態生理を反映しきれていないという問題点を孕んでおり、本研究における最大の限界点であると思われる。近年、加齢性慢性虚血性変化をより生理的に反映するものとして、経時的に緩徐に総頸動脈を狭窄していくアメロイドコンストラクターと呼ばれるデバイスを用いたマウスモデルが開発されたが⁸⁸、死亡率の高さや、4w後には総頸動脈を完全閉塞させてしまうため長期観察には向かないという致命的な問題点を抱えており、今後の改良が待たれる。もう一つの限界点は脳血流量を測定できなかった事である。図4に示すように、BCASモデルにおける脳血流量は側副血行路の形成などにより、時間経過とともに緩徐に手術前値に戻る。BCAOラットにおいては、4wのCilostazol投与によって、無投薬群と

の間に脳血流量の変化は見られなかった事が報告されているが⁵⁷、今回の研究においては 10w にわたり投与したため、その間に、Cilostazol が血管拡張作用により白質における血流量を増加させた可能性や側副血行路の新生に対して補助的に作用した可能性は否定できない。観察期間中に脳血流を経時的に測定していれば、これらの懸念事項は除外できたはずである。

今後の課題としては、今回の実験で、翻訳産物の免疫組織染色時に sham 群と coil 群で染色性が異なった上に、Cilostazol 投与によって発現が促進された *Btg2* について、その翻訳産物の局在をより詳細に検討する事を直近の課題としたい。また、同遺伝子が oligodendrocyte の分化過程のどの段階で最も強く発現しているかについて培養細胞を用いながら検証する事を考えている。将来的にはヒトにおいても Cilostazol が SIVD の進展予防薬として有効か、また、今回得られた病理学的所見が SIVD 患者の脳白質病変においても再現され得るか確認する必要があるが、その実現のためには、正確に SIVD と診断された患者から提供して頂いた標本が必要となる。それ故にベンチワークのみならず、診断基準が曖昧な現状においても可能な限り臨床的に SIVD を他の疾患と鑑別する日々の診療における努力も欠かせないと考えている。

5. 結論

本研究は SIVD の動物モデルである慢性脳低灌流マウスに対して 10 週間にわたり Cilostazol を経口投与し、慢性脳虚血に対して Cilostazol の長期投与が有効である可能

性を示した。また，同マウスにおいて，経時的に発現が上昇する遺伝子群が **oligodendrocyte** で強く発現しており，その中の1つである *Btg2* が **Cilostazol** により発現が促進される事を示した。以上より，**Cilostazol** は慢性脳低灌流状態において白質保護効果を発揮するとともに，**oligodendrocyte** において，特定の遺伝子の発現増加を促進する可能性が示唆された。

謝辞

本研究の機会を与えて頂いた東京大学大学院医学系研究科脳神経医学専攻神経内科学 教授 辻省次先生に深謝申し上げます。

終始たゆまぬ御指導を賜りました東京大学大学院医学系研究科脳神経医学専攻神経内科学 講師 岩田淳先生に心より深謝申し上げます。

また、モデルマウスの作成にあたり、懇切丁寧に御指導頂きました三重大学大学院医学系研究科神経病態内科学 教授 富本秀和先生，同 助教 新堂晃大先生に心より御礼申し上げます。

マイクロアレイ解析において、種々の貴重な御助言を頂いた阿山晴取様に心から感謝申し上げます。

研究において様々な御助言を頂きました東京大学神経内科生化学研究室の先生方にも心から感謝申し上げます。

病理標本の処理につき、御指導・御助言頂きました東京大学神経内科実験助手 鷺島通子様，時村直子様にも御礼申し上げます。

图表

表1 AHA/ASA VCI診断基準 文献19より改変

1. 血管性認知障害 (VCI)は血管性認知症 (VaD)から血管障害に起因する軽度認知機能障害 (MCI)など全ての認知機能障害を含む。
2. 以下の診断基準は薬物やアルコール乱用、または依存と診断される患者には適応されない。患者は過去3か月間、前記いずれの状態にも暴露されていない必要がある。
3. 以下の基準はせん妄の患者には適用されない。

VaD(血管性認知症)

1. 認知症の診断は、少なくとも2つ以上の認知領域において認知機能の増悪や検査結果の低下が認められ、その結果、患者の日常生活が損なわれていると判断される必要がある。
2. 認知症の診断は、認知機能検査の結果に基づいて判断される。認知に関する少なくとも4領域(実行機能・記憶・言語・視空間認知機能)を検査する。
3. 患者の日常生活障害は、血管障害の結果生じる運動麻痺や知覚障害とは無関係である。

Probable VaD

1. 認知障害と脳血管障害の画像所見が認められ、
 - a. 血管障害(例えば卒中発作)と認知障害の発症の間に明確な時間的関連が存在すること、または
 - b. 認知障害と程度やタイプと、び慢性または皮質下性の脳血管病理(例えばCADASIL)の間に明確な関連性が認められること。
2. 卒中発作の前後で、非血管性の神経変性疾患を示唆する緩徐進行性の認知記憶障害の病歴が存在しない。

Possible VaD

認知障害と脳血管障害の画像所見が認められるが、

1. 血管障害(例えば無症候性脳梗塞や皮質下の小血管病変)と認知障害の間に明確な時間、重症度やタイプの整合性が存在しない場合。
2. VaDの診断に関する十分な情報が得られない場合(例えば、臨床症状から血管障害が疑われるが、CT/MRI検査結果が得られない、など)。
3. 重度の失語のために正確な認知機能の評価が困難である場合。ただし、失語の原因となった卒中発作の以前は認知機能正常の記録がある患者(例えば例年実施される認知機能検査など)についてはprobable VaDと診断しうる。
4. 認知機能に影響しうる脳血管疾患に加え、以下のような他の神経変性疾患や病態を疑う根拠が存在する場合。
 - a. 神経変性疾患の病歴がある(例えば、パーキンソン病・進行性核上性麻痺・レビー小体型認知症)、または、
 - b. バイオマーカー(例えばPET、髄液でのアミロイド変化)や遺伝子検査(例えばPS1変異)からアルツハイマー病理の存在が示される、または、
 - c. 認知機能に影響しうる活動性のがん・精神疾患・代謝性疾患の病歴がある。

VaMCI(血管性軽度認知機能障害)

1. VaMCIはMCIの4亜型、すなわち健忘型(amnestic type)・他の認知領域障害を伴う健忘型・非健忘型の単一認知領域の障害・非健忘型の多認知領域の障害、を含む。
2. VaMCIの分類は認知機能検査に基づいて行うこととし、少なくとも4つの認知領域、すなわち実行機能/注意・記憶・言語・視空間認知を評価する。分類は以前の水準からの低下で認知機能の低下を判断し、少なくとも1つの認知領域が障害されているものとする。
3. 運動、知覚障害の程度に関わらず、手段的日常生活動作(IADL)は正常あるいは軽度の障害がありうる。

Probable VaMCI

1. 認知障害と脳血管障害の画像所見が認められ、
 - a. 血管障害(例えば卒中発作)と認知障害の発症の間に明確な時間的関連が存在すること、または
 - b. 認知障害の程度やタイプと、び慢性または皮質下性の脳血管病理(例えばCADASIL)の間に明確な関連性が認められること。
2. 卒中発作の前後で、非血管性の神経変性疾患を示唆する緩徐進行性の認知記憶障害の病歴が存在しない。

Possible VaMCI

認知障害と脳血管障害の画像所見が認められるが、

1. 血管障害(例えば無症候性脳梗塞や皮質下小血管病変)と認知障害の間に明確な時間、重症度やタイプの整合性が存在しない場合。
2. VaMCIの診断に関する十分な情報が得られない場合(例えば、臨床症状から血管障害が疑われるが、CT/MRI検査結果が得られない、など)。
3. 重度の失語のために正確な認知機能の評価が困難である場合。ただし、失語の原因となった卒中発作の以前は認知機能正常の記録がある患者(例えば例年実施される認知機能検査など)についてはprobable VaMCIと診断しうる。
4. 認知機能に影響しうる脳血管疾患に加え、以下のような他の神経変性疾患や病態を疑う根拠が存在する場合。
 - a. 神経変性疾患の病歴がある(例えば、パーキンソン病・進行性核上性麻痺・レビー小体型認知症)、または
 - b. バイオマーカー(例えばPET、髄液でのアミロイド変化)や遺伝子検査(例えばPS1変異)からアルツハイマー病理の存在が示される、または、
 - c. 認知機能に影響しうる活動性のがん、精神疾患、代謝性疾患の病歴がある。

Unstable VaMCI

probable VaMCI またはpossible VaMCIと診断され正常に復した患者はunstable VaMCIと分類する。

表2 ICD-10, DSM-IVによるVaD診断基準 文献20, 21より改変

ICD-10

<p>A. 認知症がある 認知機能障害は不均一あるいはまだら状で記憶力や知的能力の低下があるが、病識や判断力は比較的良く保たれる</p> <p>B. 突然発症, 段階的な増悪, 局所神経徴候等</p> <p>C. CTあるいは最終的に病理によって確認</p> <p>D. 特徴的な症候 高血圧, 頸動脈雑音, 一過性のうつ気分, 情動不安定, 再発する梗塞により生じる一過性の意識混濁やせん妄人格は比較的良く保たれているが, 無感情, 抑制欠如, 自己中心性, 妄想的態度, 易刺激性, 病前性格先鋭化等の人格変化が認められる事がある</p>

DSM-IV

<p>A. 多彩な認知機能障害の発現(以下の2項目)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1 記憶障害(新しい情報を学習したり, 以前に学習した情報を想起する能力の障害) 2 以下の認知機能障害が1つ以上存在する <ol style="list-style-type: none"> a 失語(言語の障害) b 失行(運動能力は障害されていないが, 運動行為が障害される) c 失認(感覚機能が傷害されていないのに, 対象を認識または同定出来ない) <p>B. 実行機能(計画を立てる, 組織化する, 順序立てる, 抽象化する)の障害 A1およびA2の認知機能障害は, その各々が, 社会的または職業的機能の著しい障害を引き起こし, 病前の機能水準からの著しい低下を示す</p> <p>C. 局所的神経徴候や症状(病的反射, 仮性球麻痺, 歩行障害等)または臨床検査上その障害に病因的関連があると判断されるCVD (皮質や皮質下白質を含む多発性梗塞)を示す</p> <p>D. 認知機能障害はせん妄の経過中にのみ現れるものではない</p>
--

表3 ADDTCによるVaD診断基準, Hachinskiの虚血スコア 文献22より改変

ADDTCによるprobable ischemic VaD

A.	次の全てが存在する
1	認知症がある
2	既往歴, 神経学的徴候and/or画像診断(CTまたはMRI)から, 2個(回)以上の虚血発作が証明される
3	CTまたはMRIで小脳以外に少なくとも1個以上の梗塞巣がある
B.	診断根拠
1	認知機能に関連する脳領域の多発性梗塞の証明
2	一過性脳虚血発作多発の既往歴
3	CVDの危険因子の既往(高血圧, 心疾患, 糖尿病 等)
4	Hachinskiの虚血スコア7点以上 ※
C.	VaDと関連する臨床症候(ただし, さらに要検討のものも含む)
1	歩行障害, 尿失禁の比較的早期からの出現
2	MRIで年齢相応以上の脳室周囲および脳深部白質の変化
3	電気生理学的検査または生理学的神経画像研究(PET, SPECT 等)で局所的変化がみられる
D.	診断にあまり役立たないもの
1	緩徐進行, 錯覚, 妄想, 精神症候, 幻覚, 痙攣
E.	診断が疑わしいもの
1	画像診断で該当する局所障害がない超皮質性感覚性失語
2	認知症以外に中枢神経症候を欠くもの

※ **Hachinskiの虚血スコア** 文献23より改変

特徴	スコア
急激な発症	2
段階的増悪	1
動揺性の経過	2
夜間の錯乱	1
人格が比較的保たれる	1
うつ症状	1
身体的訴え	1
情動失禁	1
高血圧の既往	1
脳卒中の既往	2
アテローム硬化合併の証拠	1
局所神経症状	2
局所神経徴候	2

4 ≤ 合計スコアならADが

7 ≥ 合計スコアVaDの可能性が大

表4 NINDS-AIREN VaD診断基準, 病型分類 文献24より改変

probable VaDの診断基準

A.	認知症がある
a	記憶障害と, 次の認知機能のうち2つ以上の障害がある. 見当識, 注意力, 言語, 視覚空間機能, 行動機能, 運動統制, 行為
b	臨床的診察と神経心理学的検査の両方で確認する事が望ましい
c	機能障害は, 日常生活に支障をきたすほど重症である. しかし, これは脳卒中に基づく身体障害によるものを除く
	【除外基準】
a	神経心理検査を妨げる意識障害, せん妄, 精神病, 重症失語, 著明な感覚運動障害がない
b	記憶や認知機能を障害する全身性疾患や他の脳疾患がない
B.	CVDがある
a	神経学的診察で, 脳卒中の際にみられる局所神経症候がある (片麻痺・下部顔面麻痺・Babinski徴候・感覚障害・半盲・構音障害)
b	CT・MRIで明らかな多発性の大梗塞, 重要な領域の単発梗塞, 多発性の基底核ないしは白質の小梗塞あるいは広範な脳室周囲白質の病変を認める
C.	上記の両者に関連がみられる. 下記a,bのいずれかを満足する
a	明らかな脳血管障害後3ヶ月以内に認知症が起こる
b	認知機能が急激に低下するか, 認知機能障害が動揺性ないし段階的に進行する.

VaDの病型分類

1.	多発梗塞性認知症
	皮質・皮質下領域に大きな完全梗塞が多発する
2.	Strategic single-infarct dementia
A.	皮質領域
	角回
	前大脳動脈領域
	中大脳動脈領域
	後大脳動脈領域
B.	皮質下領域
	視床
	前脳基底部
3.	認知症を伴う脳小血管病
A.	皮質領域
	脳アミロイド血管症
B.	皮質下領域
	多発ラクナ梗塞, Binswanger病
4.	低灌流によるもの
5.	出血性認知症
6.	その他の機序によるもの

表5 ErkinjuntiらによるSIVDの診断基準 文献28より改変

<p>I. 次のすべてを満たす</p> <p>1. 認知機能障害として以下の両者</p> <p>A. 遂行機能障害</p> <p>B. 記銘力障害（おそらく軽度）</p> <p>2. 脳血管障害として以下の両者</p> <p>A. 支持的な神経画像所見</p> <p>1) CTによる基準</p> <p>脳脊髄液と正常白質の中間密度の脳室周囲または深部白質病変で、半卵円中心に伸びる境界不鮮明なもの＋最低ひとつのラクナ梗塞.</p> <p>2) MRIによる基準</p> <p><u>主に白質病変によるもの (Binswanger type)</u></p> <p>幅10 mm以上のPVH, 幅25mmを超える融合性の深部白質病変, 広汎白質病変＋深部灰白質のラクナ梗塞</p> <p><u>主にラクナ梗塞によるもの (Lacunar state type)</u></p> <p>深部灰白質の多発(たとえば5個以上)ラクナ梗塞＋中等度以上の白質病変</p> <p>B. 皮質下血管病変を支持する神経徴候の存在, または既往</p> <p>II. 診断を支持する所見</p> <p>1. 上位運動ニューロン障害のエピソード</p> <p>2. 早期からの歩行障害の存在</p> <p>3. ふらつきや原因不明の頻繁な意識消失</p> <p>4. 早期からの頻尿, 尿意促迫, その他の泌尿器症状</p> <p>5. 構音障害, 嚥下障害, 錐体外路症状</p> <p>6. 行動症状, 心理症状</p> <p>III. 診断を支持しないあるいは否定する特徴</p> <p>1. 記憶障害や他の認知機能障害の早期からの発症, 或いは進行性の悪化</p> <p>2. CTやMRIで脳血管障害がない</p>
--

表6 齧齒類皮質下白質障害モデルの比較

Requirements	SHR-SP	BCAO Rat	BCAS Mouse	BCAS Gerbil
簡便さ	○	○	×	×
	処置なし	結紮のみ	マイクロコイルの装着	鋼製コイルの装着
血流低下度(%前値)	-	50-70%	~70%	~70%
白質障害の出現時期	20W	1W	2W	>8W
灰白質梗塞	- ~ +	- ~ +	-	- ~ +
認知機能障害(行動解析)	-	4週後	4週後	12週後

SHR-SP: Spontaneously Hypertensive Rats-Stroke Prone

BCAO: Bilateral common Carotid Artery Occlusion

BCAS: Bilateral common Carotid Artery Stenosis

表7 使用TaqMan® probe 一覽

Gene Symbol	Gene Name	Assay ID	Dye Label	5'	Context Sequence	3'
Btg2	B cell translocation gene 2, anti-proliferative	Mm00476162_m1	FAM		AGGACGCACCTGACCCGATCATTACAA	
Cyr61	cysteine rich protein 61	Mm00487499_g1	FAM		TGAAAGGGATCTGCAGAGCTCAGTC	
Dusp1	dual specificity phosphatase 1	Mm00457274_g1	FAM		TACGATCAGGGGGCCAGTGGAGA	
Egr2	early growth response 2	Mm00456650_m1	FAM		GGAGTGGCGGAGATGGCATGATCA	
Folr1	folate receptor 1 (adult)	Mm00433355_m1	FAM		GACCAAGTGCAGCCCTGGAAGACGA	
Fos	FBJ osteosarcoma oncogene	Mm00487425_m1	FAM		CTGTCAACACACACAGGACTTTTGCCG	
Junb	jun B proto-oncogene	Mm04243546_s1	FAM		CGCAGACCGTACCGGAGGCACGCAG	
Penk	preproenkephalin	Mm01212875_m1	FAM		TTCCTGGCGTGCACACTGGAATGTG	
Rarb	retinoic acid receptor, beta	Mm01319677_m1	FAM		AATACACCACGAAATTCAGCGCTGA	

FAM: Fluorescein Phosphoramidite

表8 使用一次抗体一覧

抗体名	動物種, Clonality	品番	メーカー	希釈濃度(倍)
Anti-GFAP antibody [2A5]	Mouse monoclonal	ab4648	abcam, UK	1000
Anti-Iba1 antibody [1022-5]	Mouse monoclonal	ab15690	abcam, UK	500
Anti-Olig2, clone211F1.1	Mouse monoclonal	MABN50	Merck Millipore, Germany	500
Anti-Tubulin Polymerization Promoting Protein [EPR3316]	Rabbit monoclonal	ab92305	abcam, UK	500
Anti-cFos antibody - ChIP Grade	Rabbit monoclonal	ab7963	abcam, UK	500
Anti-Btg2 antibody	Rabbit polyclonal	ab197362	abcam, UK	100
Anti-DUSP1 antibody	Rabbit polyclonal	ab61201	abcam, UK	100
Anti-EGR2 antibody	Rabbit polyclonal	NB100-92327	Novus biologicals, USA	100
Anti-Retinoic Acid Receptor beta antibody	Rabbit polyclonal	ab53161	abcam, UK	200
Anti-Myelin PLP antibody	Rabbit polyclonal	ab28486	abcam, UK	100

表9 Group1, Group2における上位変動遺伝子群

Sham 4w vs. Coil 4w

Gene Symbol	FDR	Fold change (Exp 2)
<i>Cst7</i>	0.001	2.8
LOC100505359	0.0033	1.5
<i>Clec7a</i>	0.0043	2.2
<i>Lyz2</i>	0.006	1.7
<i>Ccl3</i>	0.0066	1.7
<i>C4b</i>	0.019	1.5
H2-Q7	0.02	1.1
<i>Gp49a</i>	0.022	1.3
<i>Cd52</i>	0.023	1.5
<i>Serpina3n</i>	0.025	1.3
<i>Cd68</i>	0.026	1.4
<i>Lyz1</i>	0.034	1.2
<i>Itgax</i>	0.035	1.3
<i>Ifit1</i>	0.037	1
<i>Spp1</i>	0.04	1.3
<i>C1qa</i>	0.047	1.2
<i>Mpeg1</i>	0.048	1.3
<i>Ccl6</i>	0.06	1.3
<i>Tyrobp</i>	0.088	1.2
<i>Gfap</i>	0.089	1.1
<i>Itgb2</i>	0.09	1.1
<i>C1qc</i>	0.093	1.1
<i>Ifi2712a</i>	0.1	1.2

Coil 2w vs. Coil 6w

Gene Symbol	FDR	Fold change (Exp 2)
<i>Fos</i>	<0.0001	1.7
<i>Btg2</i>	<0.0001	1.3
<i>Gpr6</i>	<0.0001	2
<i>Cyr61</i>	<0.0001	1.8
<i>Junb</i>	<0.0001	1.3
<i>Npas4</i>	<0.0001	1.7
<i>Egr2</i>	<0.0001	1.6
<i>Kcne2</i>	<0.0001	1.5
<i>Dusp1</i>	0.00011	1.2
<i>Arc</i>	0.001	1.2
<i>Kcnj13</i>	0.0016	1.3
<i>Folr1</i>	0.0017	1.3
<i>Rarb</i>	0.0018	1.1
<i>Penk</i>	0.0023	1.2
<i>Eml2</i>	0.0034	1.1
1110059M19Rik	0.0063	1.1
<i>F5</i>	0.0066	1.2

FDR順に配列

表10 Group1, Group2における上位GO term (biological process)

Sham 4w vs. Coil 4w

GO biological process	Number of reference genes	Number of up-regulated genes	P value (Bonferroni)
defense response (GO: 0006952)	863	12	3.73E-06
immune response (GO: 0006955)	758	11	1.54E-05
immune effector process (GO: 0002252)	348	8	1.12E-04
regulation of immune response (GO: 0050776)	451	7	1.38E-02
positive regulation of immune response (GO: 0050778)	328	6	3.28E-02

Coil 2w vs. Coil 6w

GO biological process	Number of reference genes	Number of up-regulated genes	P value (Bonferroni)
tissue development (GO: 0009888)	1461	9 (<i>Arc, Btg2, Cyr61, Egr2, Eml2, Folr1, Fos, Gpr6, Junb, Rarb</i>)	5.69E-04
cellular response to endogenous stimulus (GO: 0071495)	692	6 (<i>Egr2, Folr1, Fos, Junb, Npas4, Rarb</i>)	2.59E-02
regulation of cellular process (GO: 0050794)	9809	15 (<i>Arc, Btg2, Cyr61, Dusp1, Egr2, Eml2, Folr1, Fos, Gpr6, Junb, Kcne2, Kcnj13, Npas4, Penk, Rarb</i>)	3.27E-02
regulation of biological process (GO: 0050789)	10256	15 (<i>Arc, Btg2, Cyr61, Dusp1, Egr2, Eml2, Folr1, Fos, Gpr6, Junb, Kcne2, Kcnj13, Npas4, Penk, Rarb</i>)	6.38E-02
skeletal muscle cell differentiation (GO: 0035914)	60	3 (<i>Btg2, Egr2, Fos</i>)	6.40E-02

表11 慢性脳低灌流により有意な発現増加が確認された遺伝子群の機能とcAMPの関係

Symbol	Name	Function	Effect by cAMP
<i>Btg2</i>	B-cell translocation gene 2	Induces differentiation of neural progenitor cells of the dentate gyrus and subventricular zone during adult neurogenesis	Upregulated
<i>Dusp1</i>	Dual specificity protein phosphatase 1	Specifically inactivates mitogen-activated protein (MAP) kinase. May play an important role in the human cellular response to environmental stress as well as in the negative regulation of cellular proliferation	Upregulated
<i>Egr2</i>	Early growth response protein 2	Transcription factor, Immediate-early gene	Upregulated
<i>Fos</i>	Finkel-Biskis-Jenkins murine osteosarcoma viral oncogene homolog	Transcription factor, Immediate-early gene	Upregulated
<i>Rarb</i>	Retinoic acid receptor beta	Localizes to the cytoplasm and to subnuclear compartments. Binds retinoic acid, which correlates with the growth inhibition, cell cycle arrest, and apoptosis	Upregulated

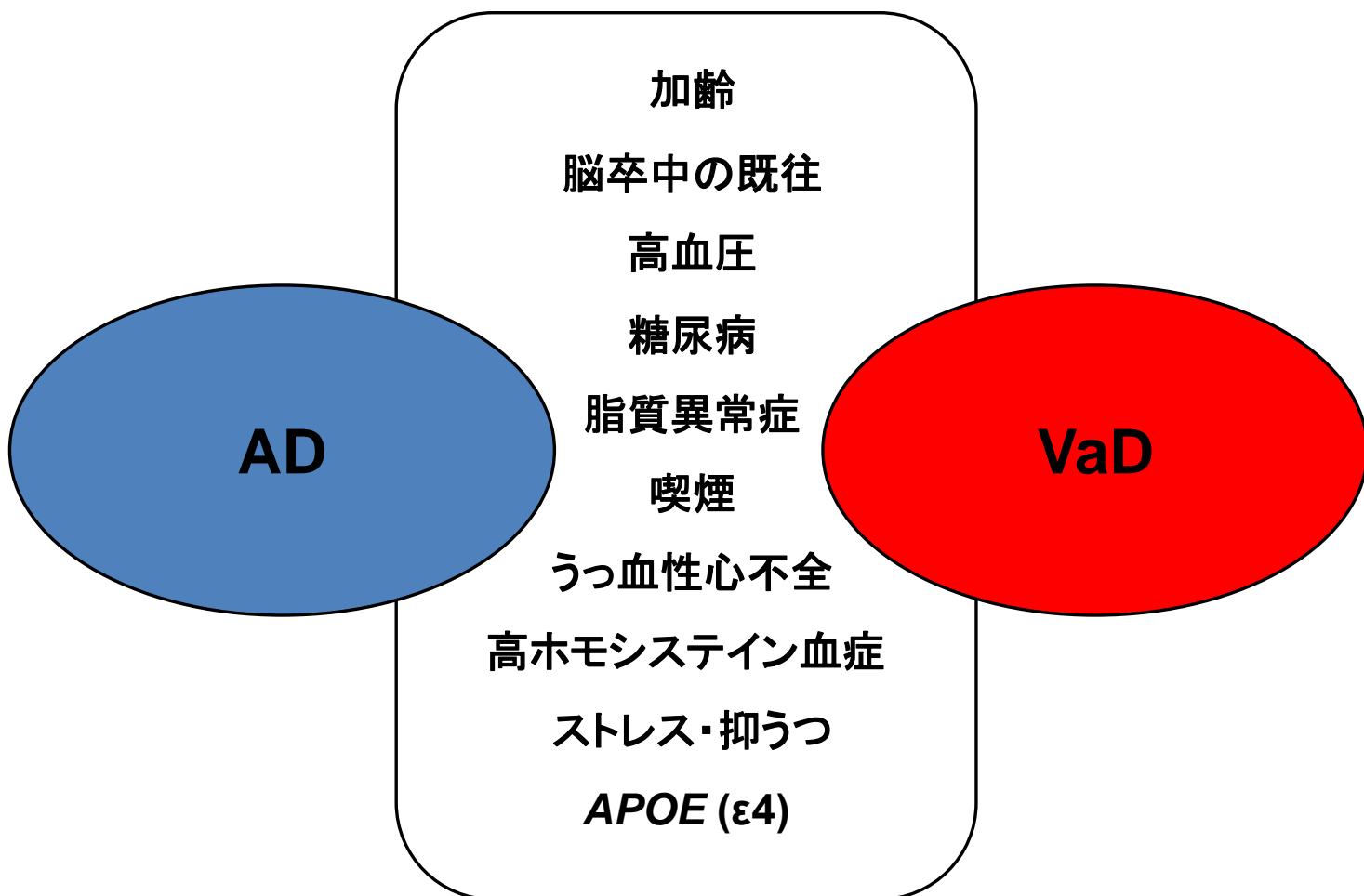
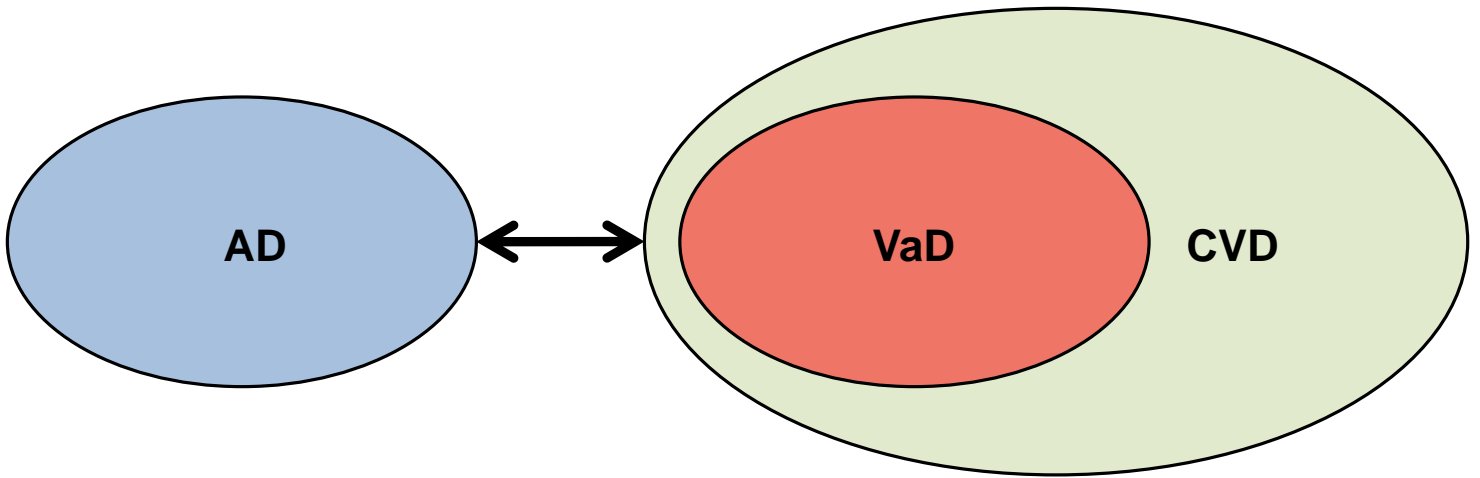


図1 VaDとADの危険因子

両者には加齢，脳卒中の既往，高血圧といった共通の危険因子が存在する。

1980年代頃まで



疫学的病理研究(1990年代)以降

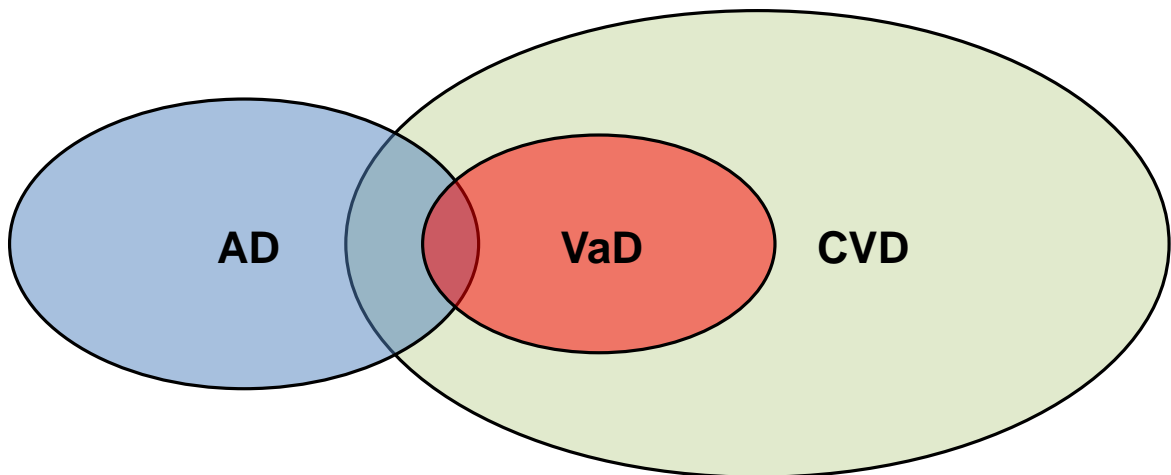


図2 VaDとADとの関係性に対する考え方のパラダイムシフト

かつては血管障害と変性疾患という背景疾患の違いから、VaDとADを対局的な疾患体系と捉える風潮があり、脳血管障害(CVD)を有する認知症が全てVaDと解釈されがちであったが、血管障害とADのオーバーラップが病理学的に確認されるようになり、CVDを有する症例が必ずしもVaDとは定義されないという認識が広く受け入れられるようになった。

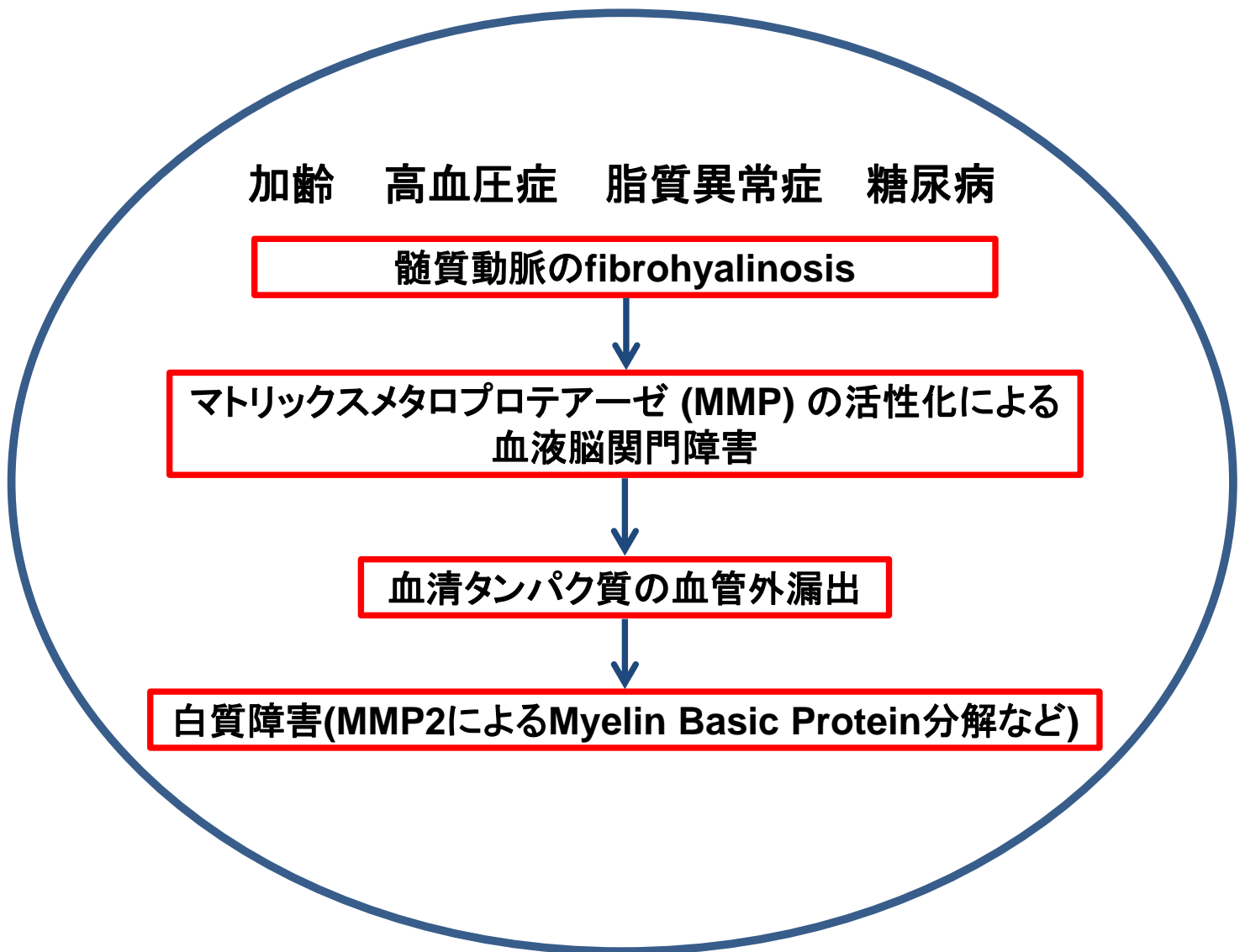


図3 びまん性虚血性白質病変の成因

- 1) 加齢・高血圧・脂質異常症・糖尿病等種々の要因から髄質動脈の末枝に相当する細動脈にfibrohyalinosisが形成される。
- 2) 血管基底膜の構成タンパクの分解に作用するmatrix metalloprotease (MMP)の活性化により血液脳関門(BBB)が破壊される。
- 3) 最終的には血清タンパク質が血管外に漏出し、Myelin basic protein (MBP)の分解等により白質を障害する。

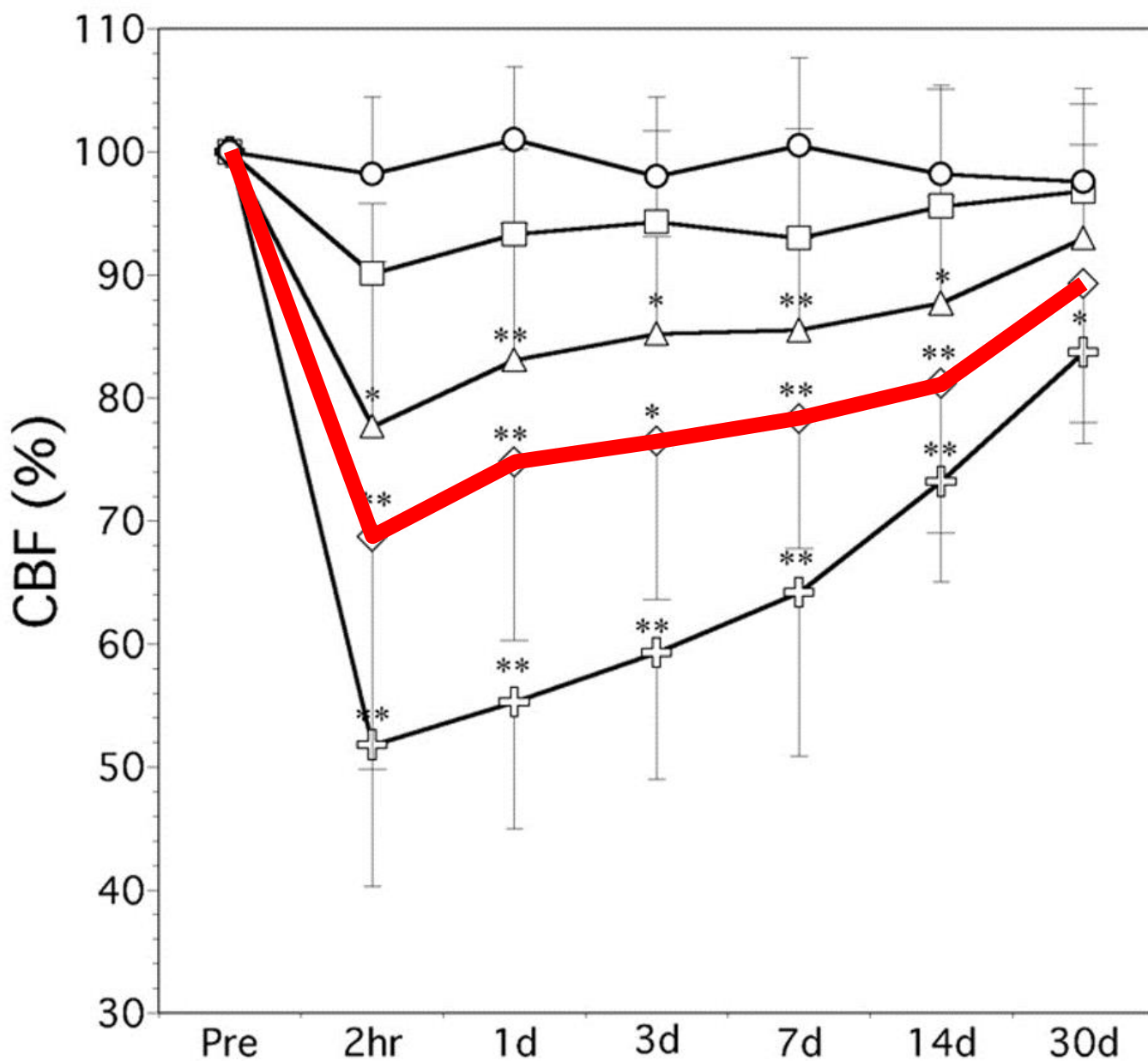


図4 BCASマウスにおける脳血流の推移 文献50より改変

脳血流は手術直後には急激に低下し、前値の70%を下回るが、緩徐に回復し、手術1週間後には80%台で安定する。グラフは上から順にsham群、0.22mm群(coil径), 0.20mm群, 0.18mm群, 0.16mm群である。今回用いた0.18mm群の血流の推移を赤太線で示した。

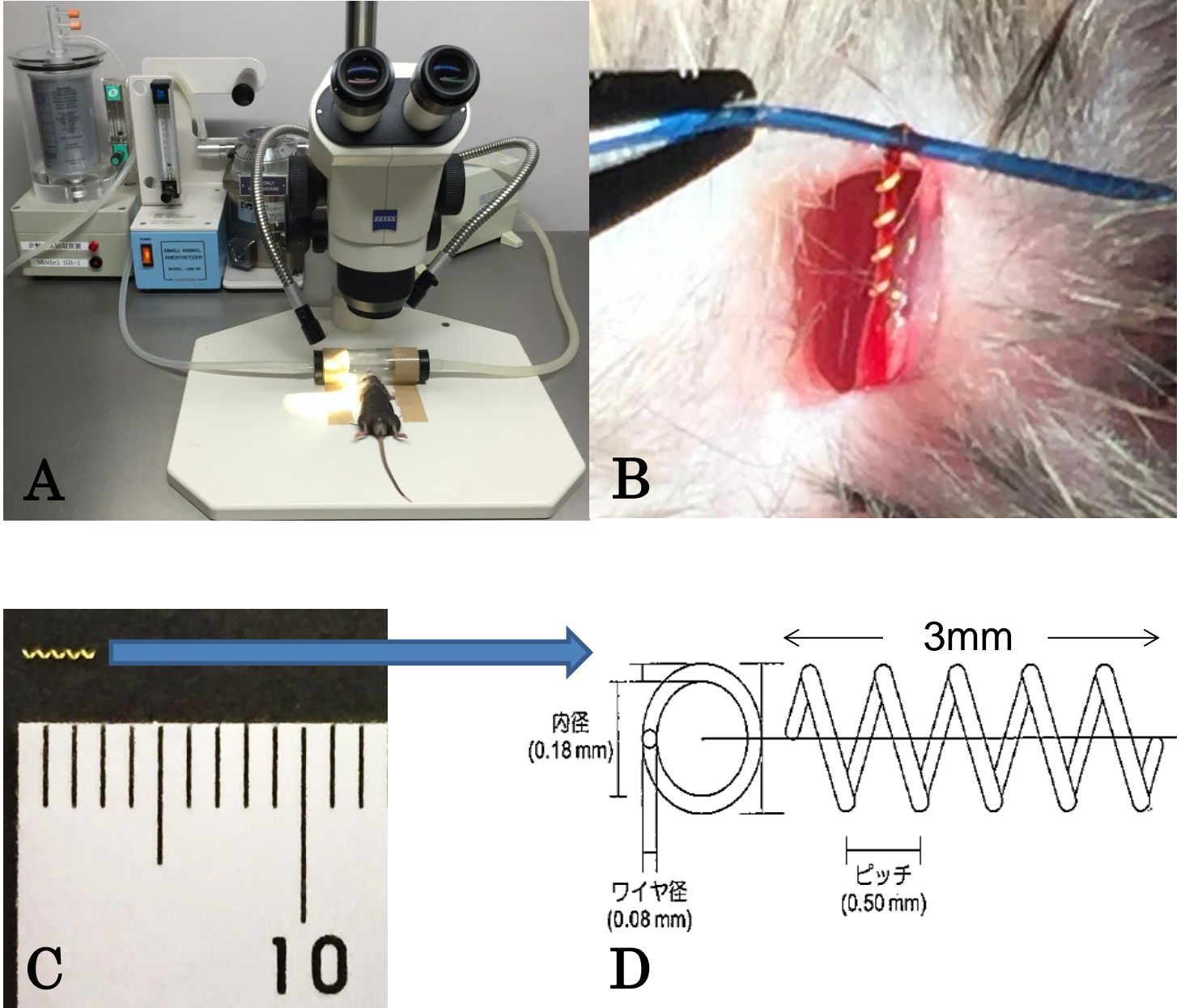


図5 A: 手術装置, B: コイル装着直後の総頸動脈, C, D: 使用コイルの寸法

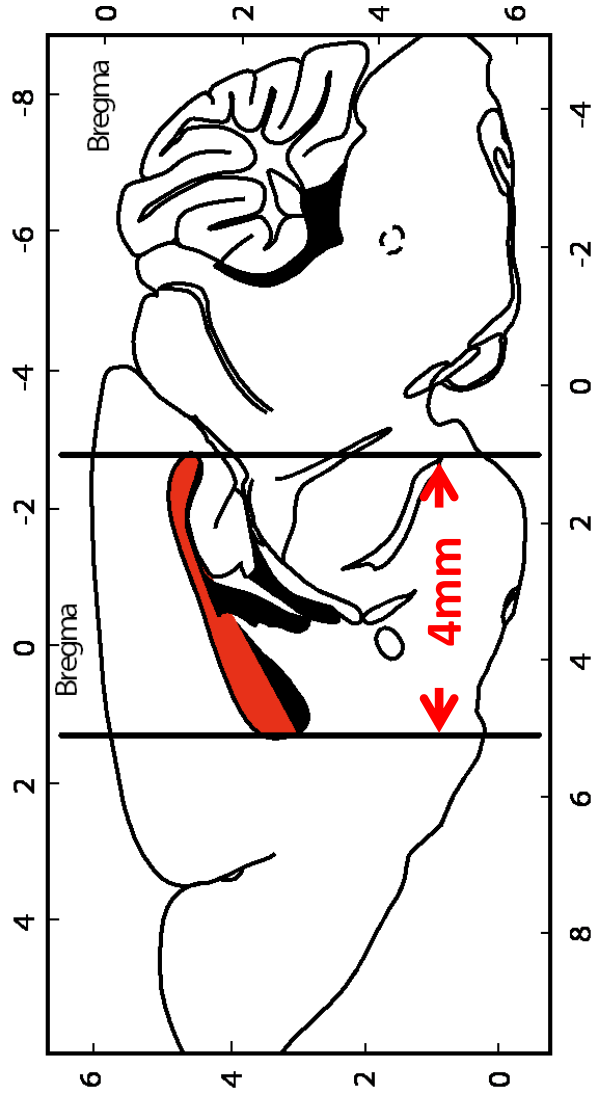


図6 ブレインスライサ(左)と脳梁採取部位(右)

1mm単位でマウス脳冠状断スライスを作成可能なブレインスライサを用い、脳梁を観察可能なBregma前方1.5mmから後方2.5mmの領域を切り出した。

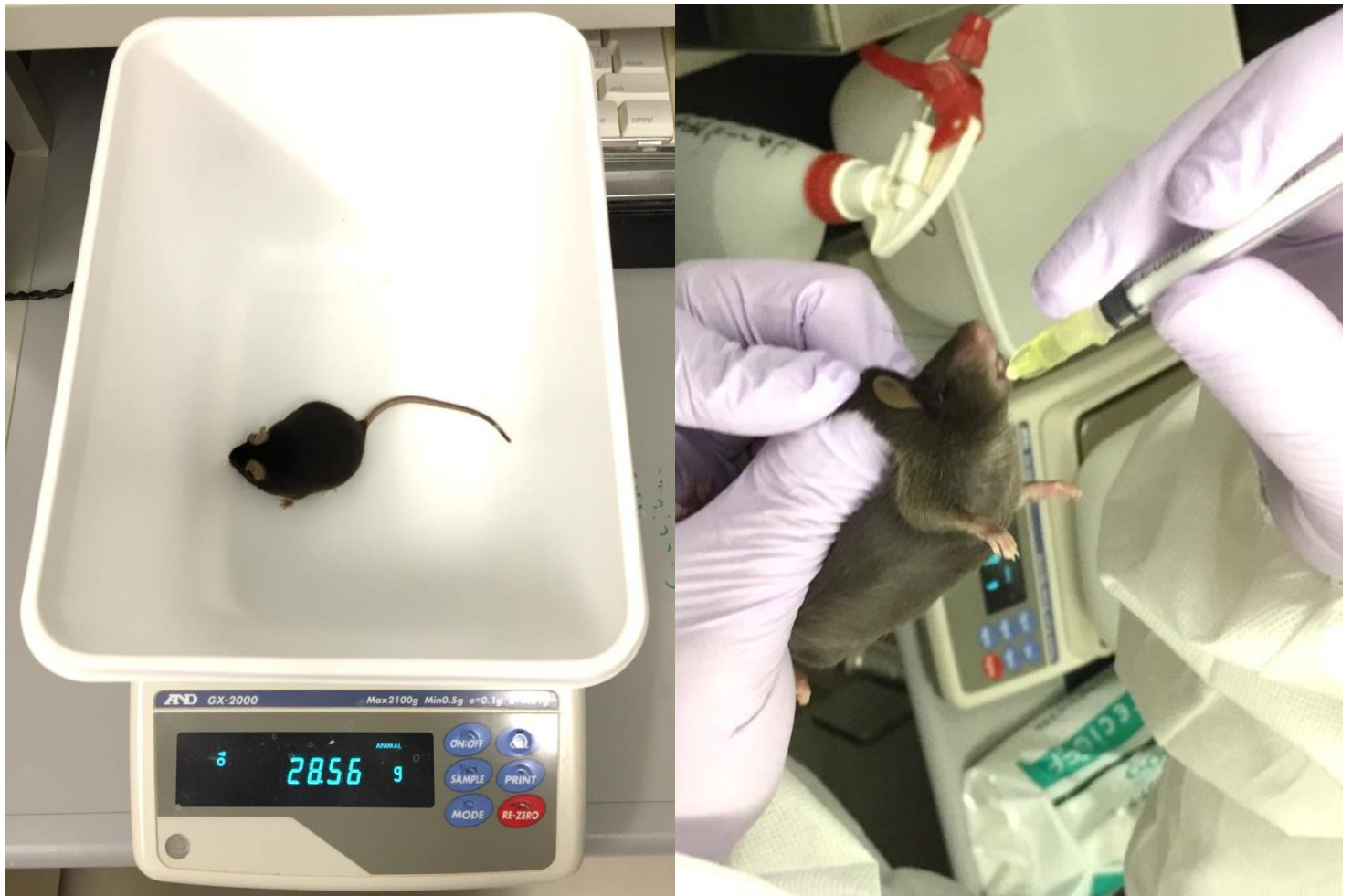


図7 体重測定と経口投与の様子

個々のマウス体重を毎日測定し，Cilostazol: 100mg/kg/day,
CMC: 10mL/kg/day投与となるように各溶液(懸濁液)の量を調整した.

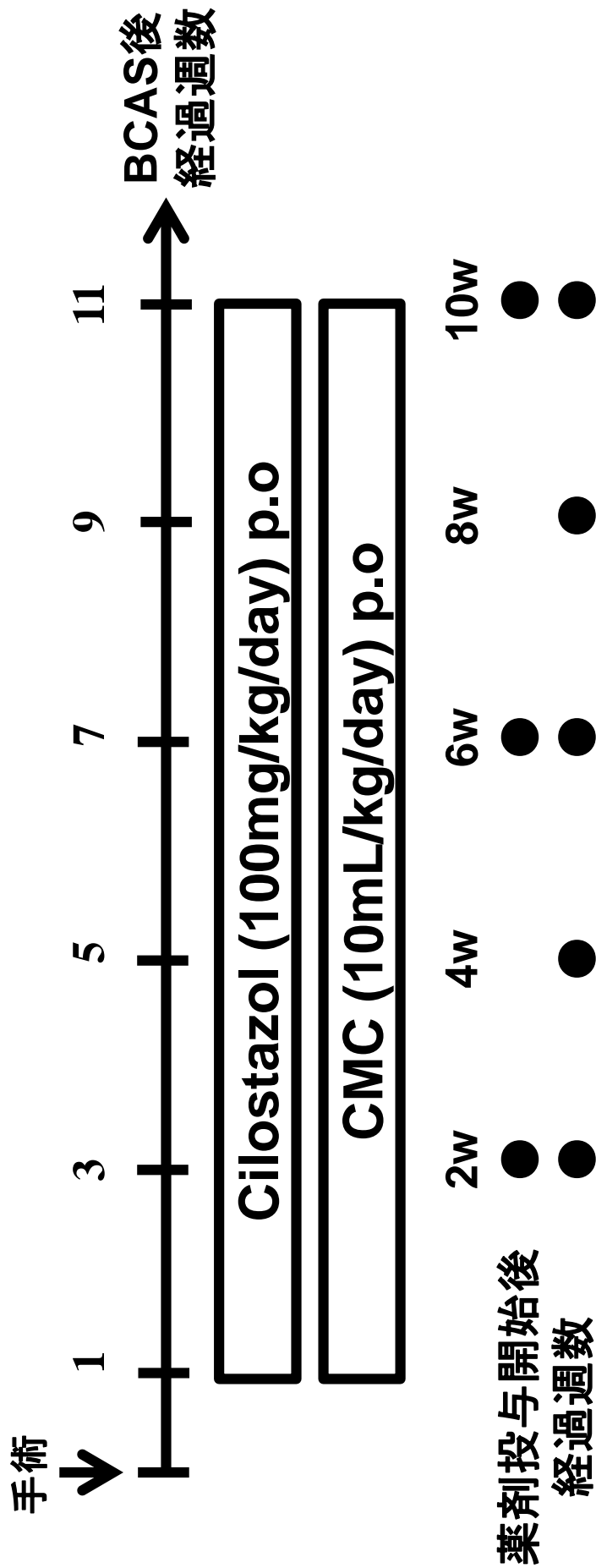


図8 Cilostazol投与プロトコール

手術後1週間後より，Cilostazol (n=12より開始)，またはCMC (n=20より開始)の経口投与を開始した。Cilostazol投与群は投与開始2, 6, 10w後に，CMC投与群は2, 4, 6, 8, 10w後にそれぞれ4匹ずつsacrificeし，摘出脳から凍結切片を作成した。

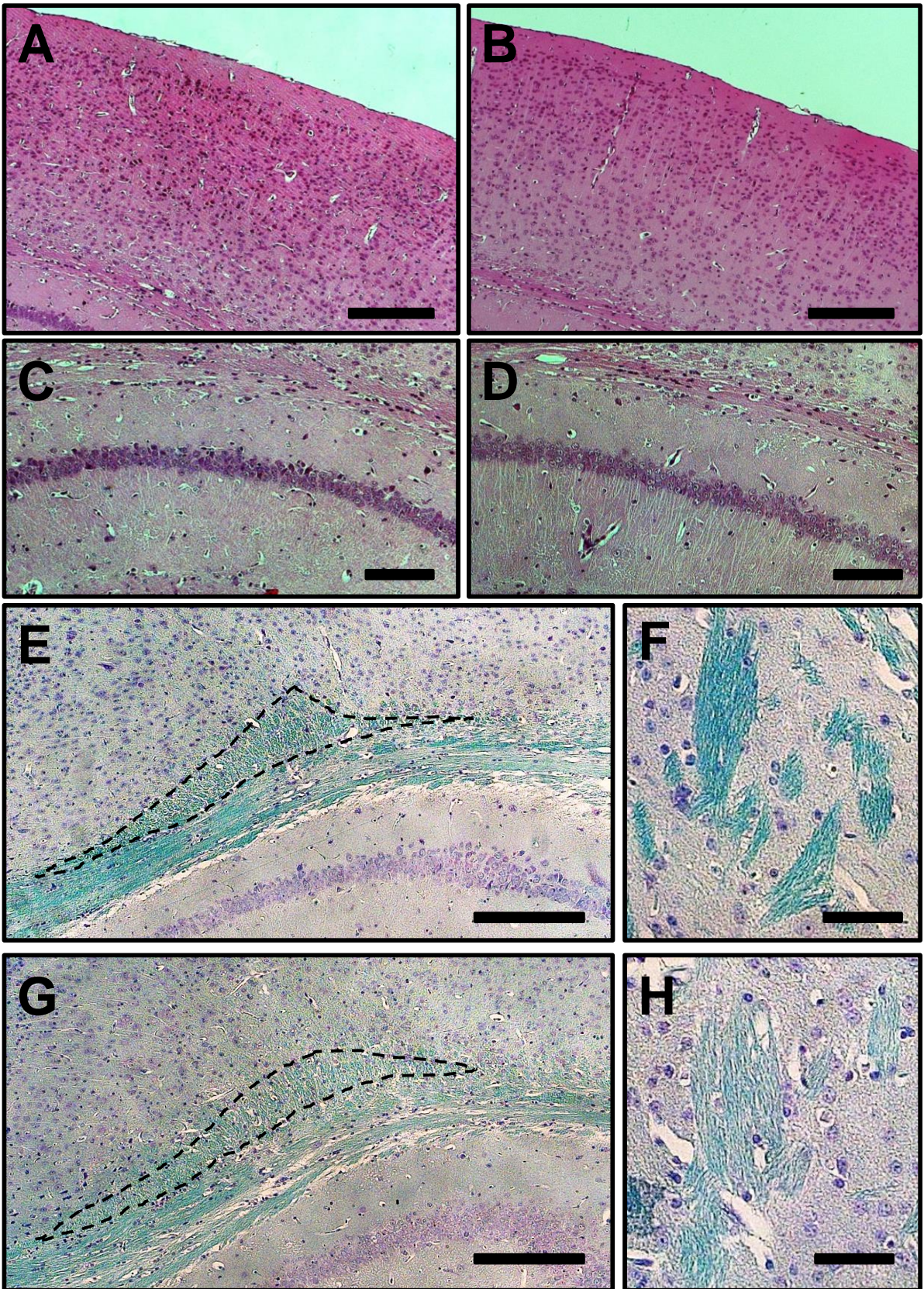
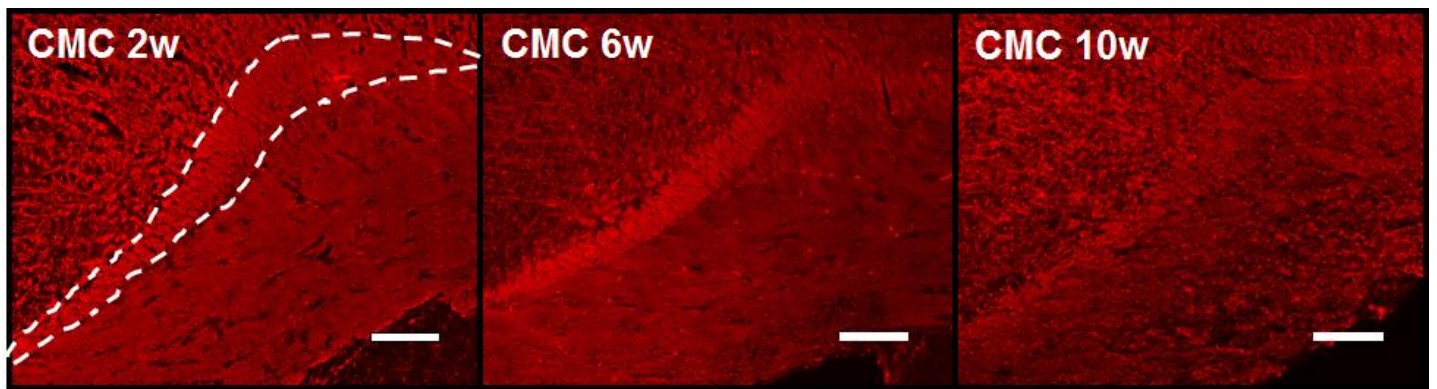


図9 Sham 4wとcoil 4wにおける灰白質と白質の組織像の比較

HE染色後の大脳皮質(A (sham), B (coil)), 海馬CA1領域(C (sham), D (coil))とKB染色後の脳梁外側(E (sham), G (coil))と線条体(F (sham), H (coil))を示す. 灰白質においては両群に差は見られず, 白質においてはcoil群で脳梁外側・線条体で髄鞘染色性の低下が目立ち, それは図の点線部で囲まれた帯状束において最も顕著であった. (Bar: A, B, E, G 200 μ m; C, D 100 μ m; F, H 50 μ m)



Bar=100 μ m

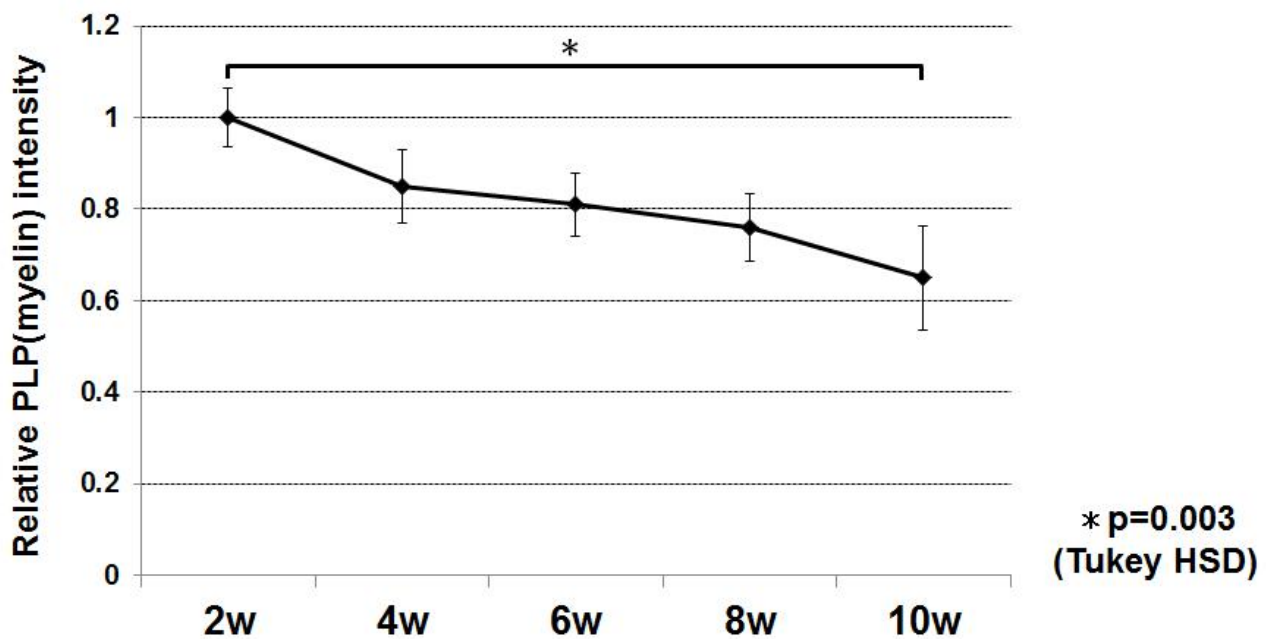
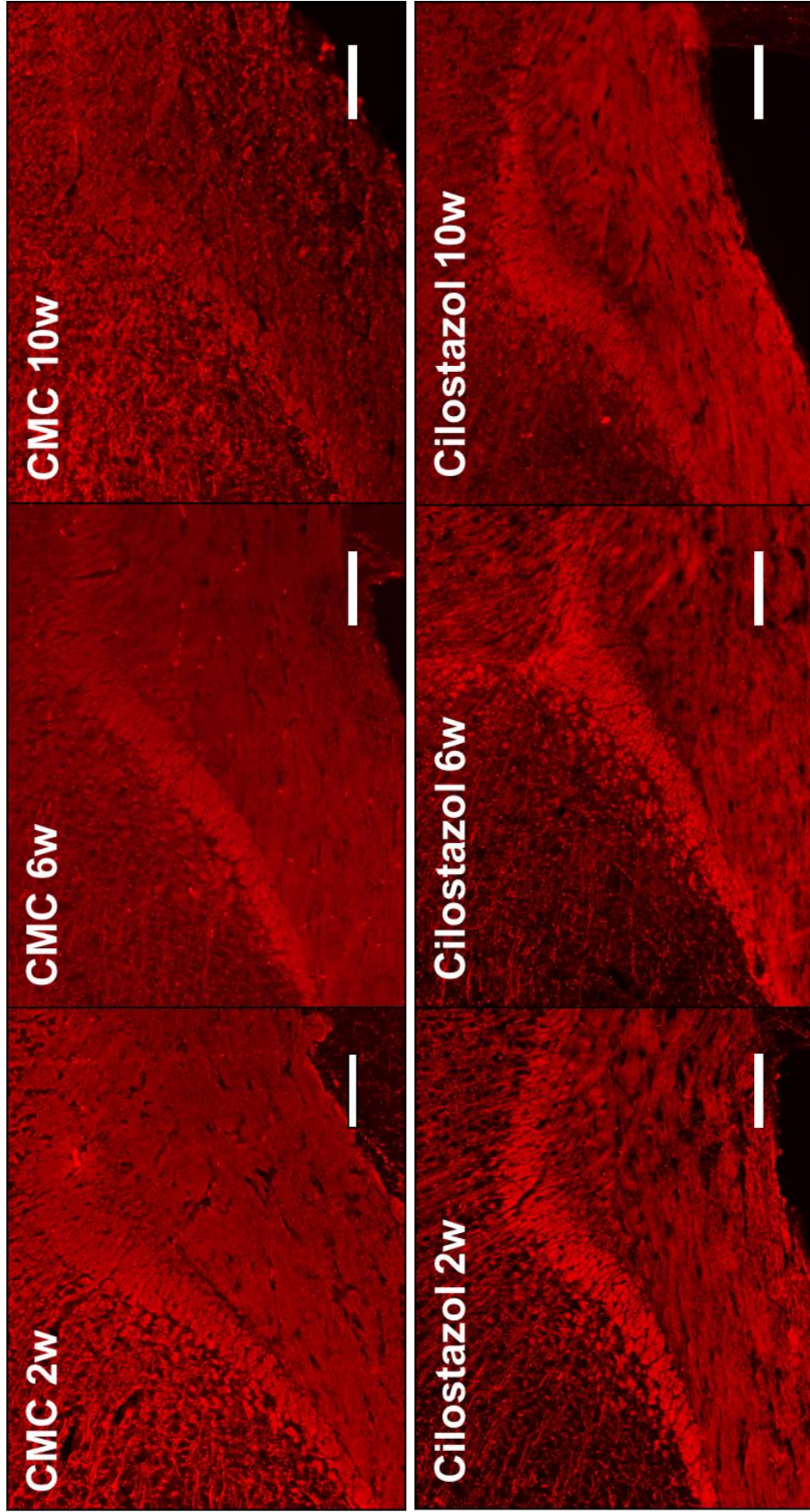


図10 蛍光輝度の経時的変化

目視で同定した片側の帯状束を上図白点線で示すように囲んだ後， region of interestとして選択し，同領域内の平均輝度を測定した．CMC 2w群の輝度平均値を1とした場合の各週群の相対値を算出し，比較した．帯状束の蛍光輝度は2週間毎に低下している．CMC投与2w後と10w後の間には統計学的有意差が見られた．(n=12 (n=4, 3 slices each)/group, Error bar: SEM)



Bar=100μm

図11 Cilostazol投与群における蛍光輝度変化

上図のように、CMC投与群(上段)では経時的に輝度低下を来した一方で、Cilostazol投与群(下段)においては10wまで輝度が維持される傾向にあった。

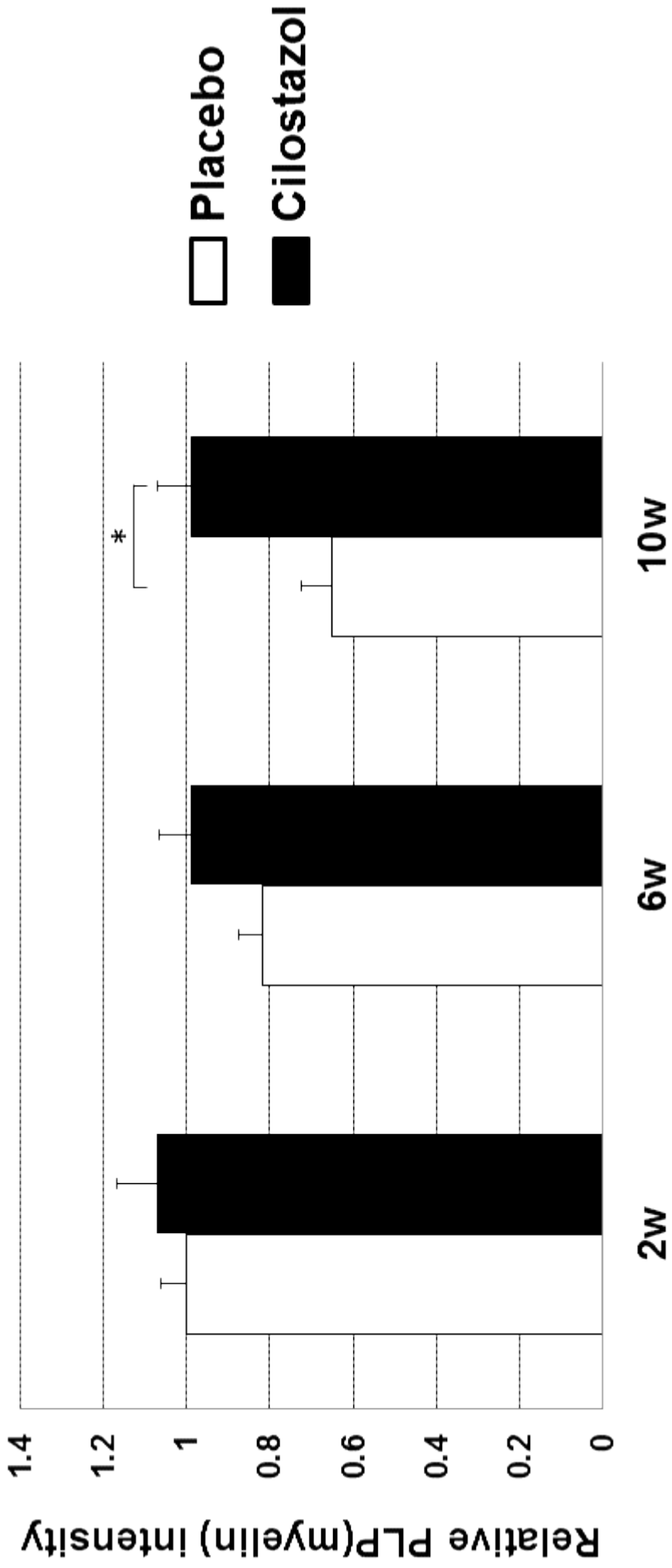
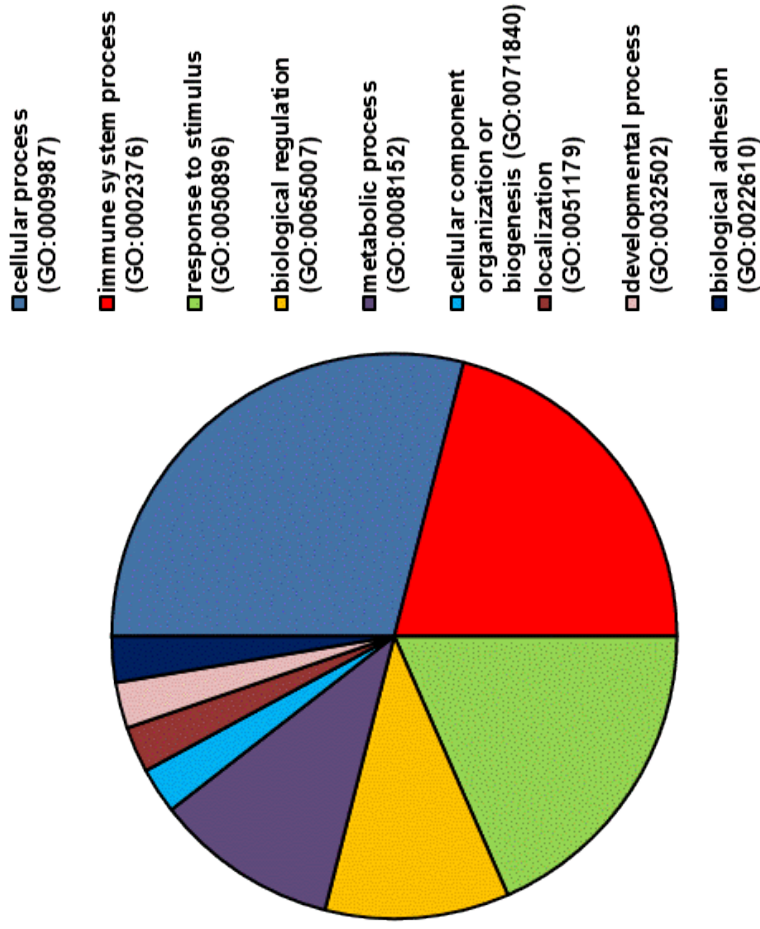
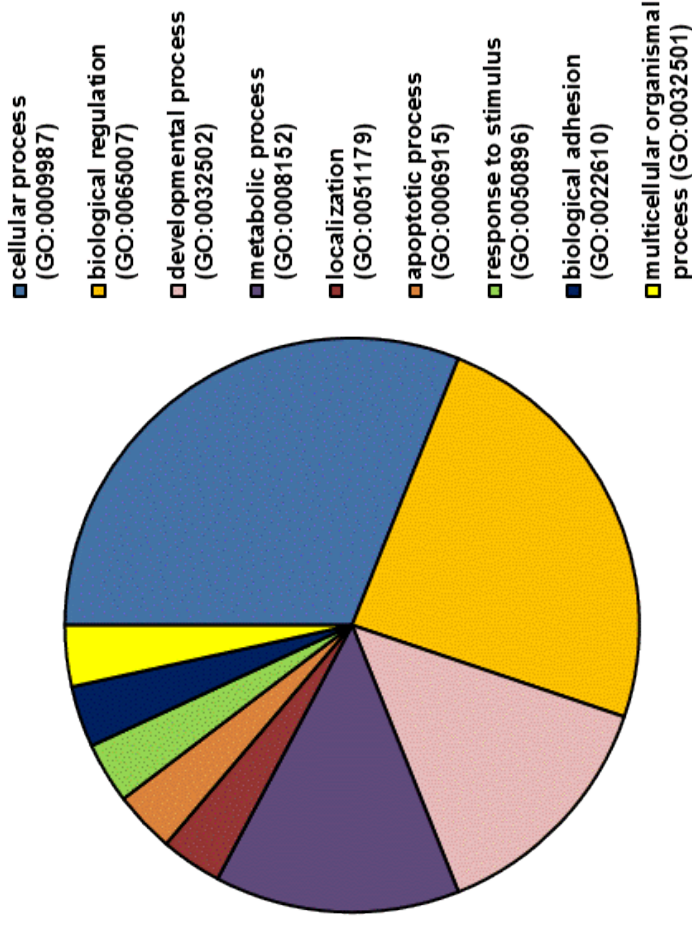


図12 CMC投与群とCilostazol投与群における蛍光輝度変化の差異

図10同様に帯状束をregion of interestとして選択し，同領域内の平均輝度を算出した． CMC 2w群の輝度平均値を1とした場合の各群の相対値を算出し，比較した． CMC 投与群に比して， Cilostazol投与群においては6w以降の蛍光輝度が維持される傾向にあった． 10週間後には2群間に統計学的有意差が認められた． (n=12 (n=4, 3 slices each)/group, Error bar: SEM, * p=0.02 (Tukey HSD))



sham 4w vs. coil 4w



coil 2w vs. coil 6w

図13 Gene Ontology (Biological Process)に基づいたup-regulated genesの機能情報分類

Sham 4wとcoil 4wを比較した群においては免疫応答に関連した遺伝子群が大きく変動していたが、coil 2wとcoil 6wを比較した群においてはその傾向が見られなかった。

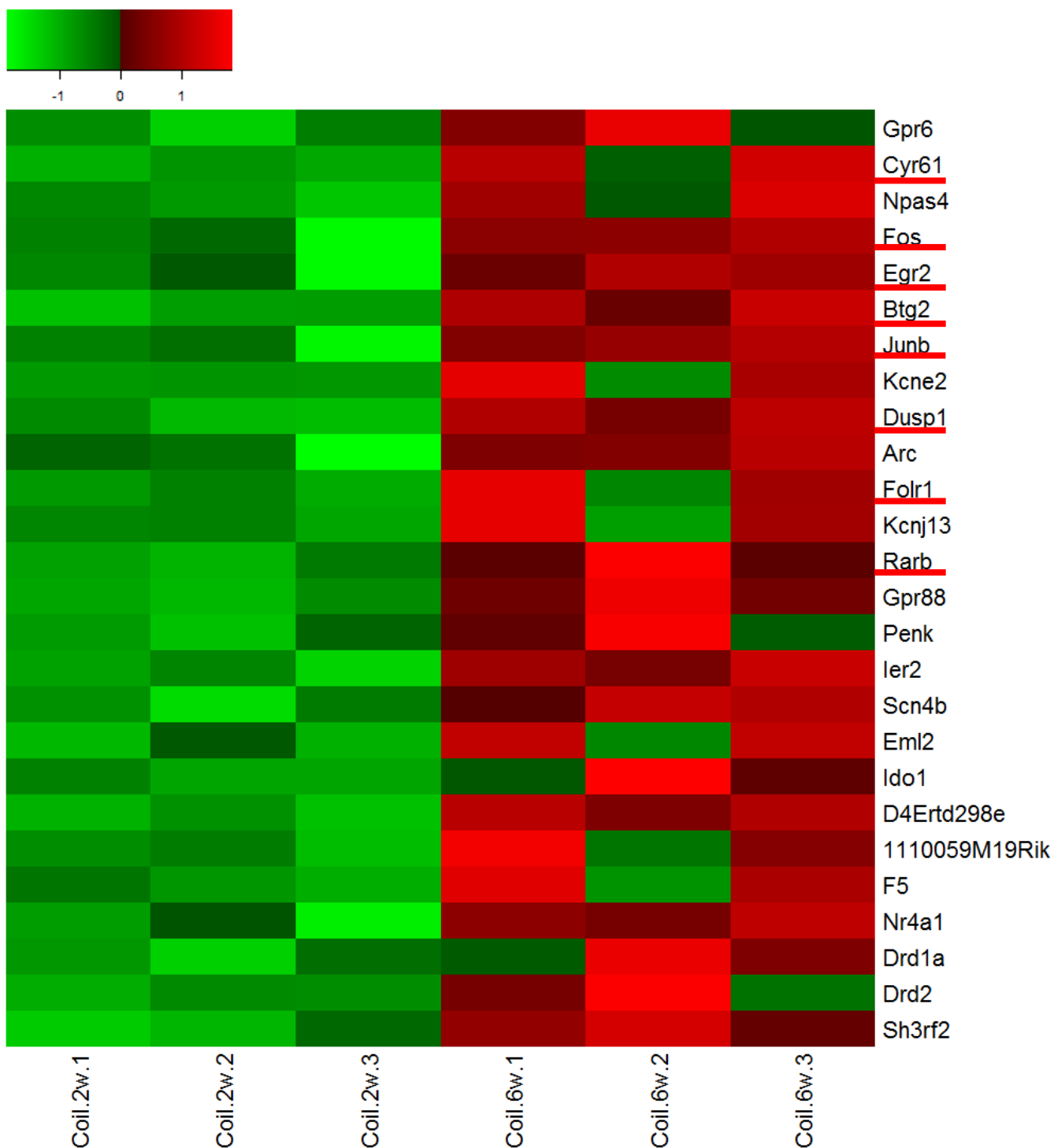


図14 RankProduct法でFDR < 0.01を満たした上位変動遺伝子群(Group 2)

Heatmapの右側に、上からRankProductの順位順に上位発現変動遺伝子を列挙した(明度の高い赤が発現増加を意味する). 定量RT-PCRの対象となった遺伝子群には赤線を引いた.

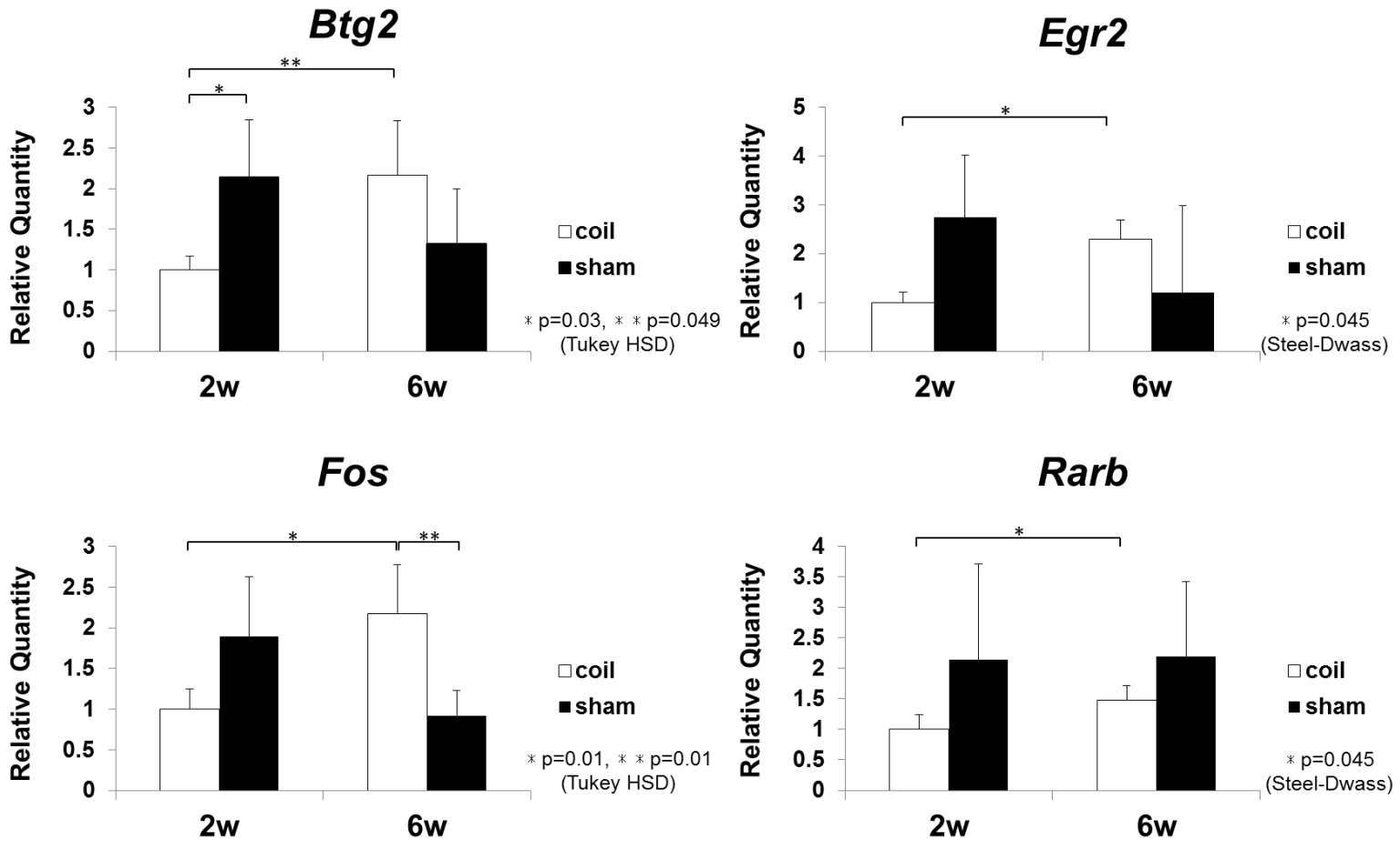


図15 定量RT-PCRで発現増加が確認された遺伝子群

2wにおいてsham群の発現量が上回っていた遺伝子群においても、*Btg2*, *Egr2*, *Fos*に関しては、6wにはsham群における発現量減少の影響もあり、上下関係の逆転が見られた。(Coil群: n=5 each, Sham群: n=4 each, Error bar: SD)

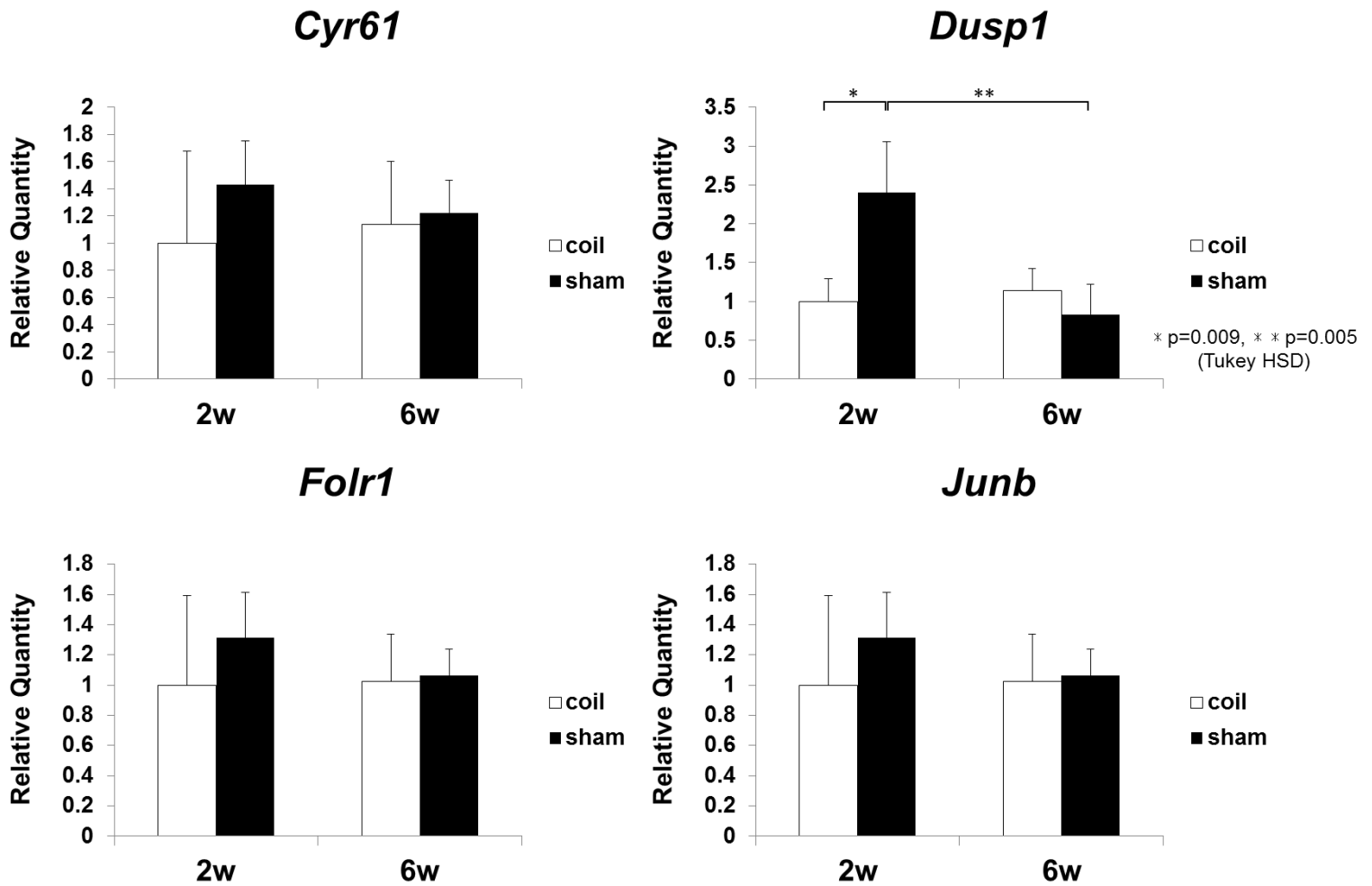
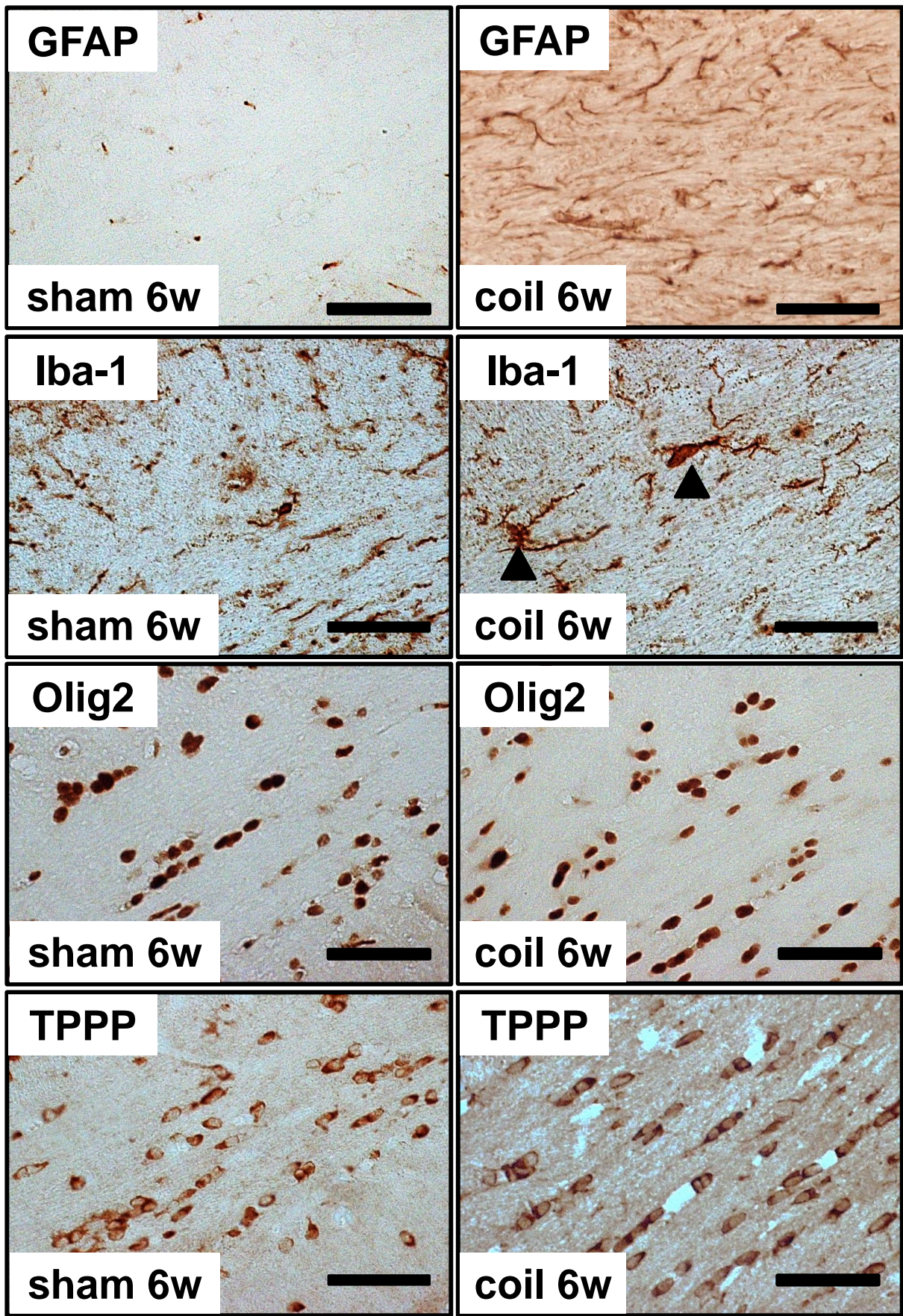


図16 定量RT-PCRで発現増加が確認されなかった遺伝子群

Dusp1はCoil群間で有意差が見られなかったが、Sham群では経時的に有意に減少しており、相対的な発現増加が考えられた。(Coil群: n=5 each, Sham群: n=4 each, Error bar: SD)



Bar=50μm

図17 Sham 6wおよびcoil 6wマウス脳梁におけるGFAP, Iba-1, Olig2, TPPPに対する免疫染色
 先行研究の如く, coil装着群においてはastrocyteの増生と活性化microglia (矢頭)が確認された.

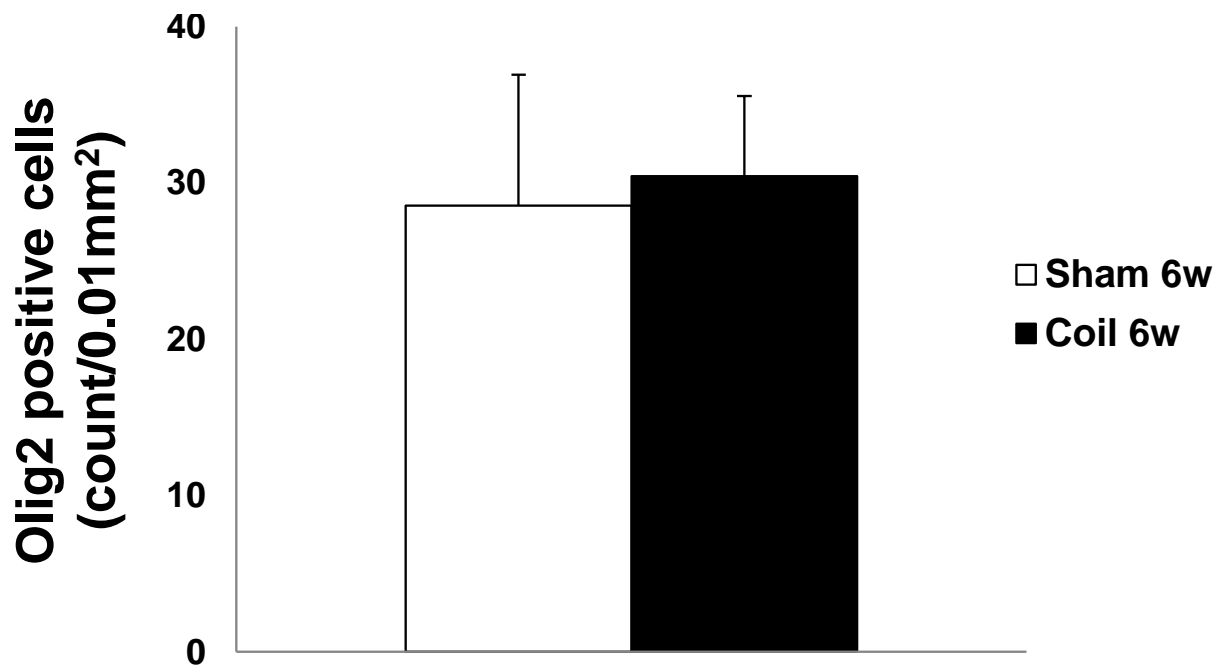


図18 Sham 6wおよびcoil 6wマウス脳梁におけるOlig2陽性細胞数の変化

Sham 6w と coil 6wの脳梁内Olig2陽性細胞数を, 1 個体につき3箇所単位面積(0.01mm²)あたりの陽性細胞数を数える事で比較した. Sham群とcoil群の間には統計学的有意差は見られなかった. (Sham 6w群: n=3, coil 6w群: n=3, Error bar=SD)

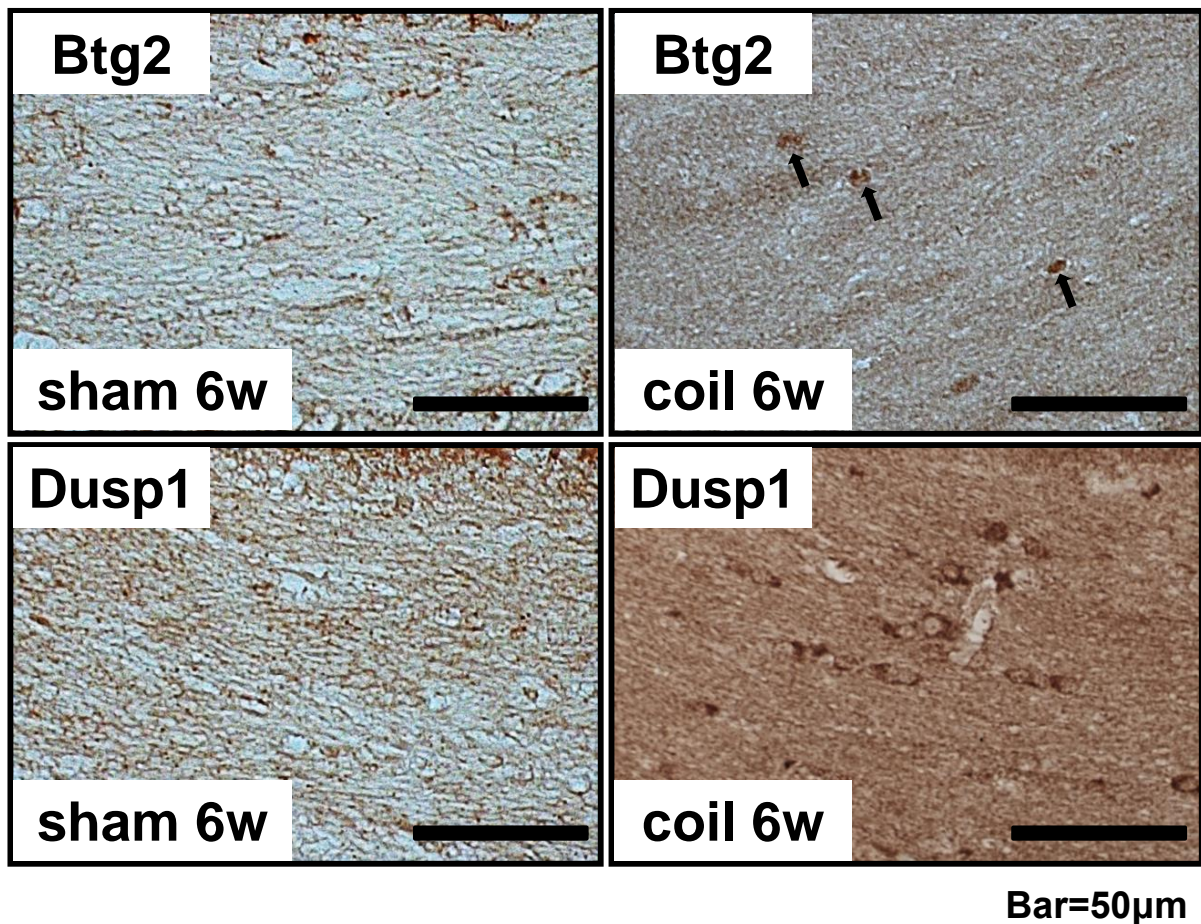
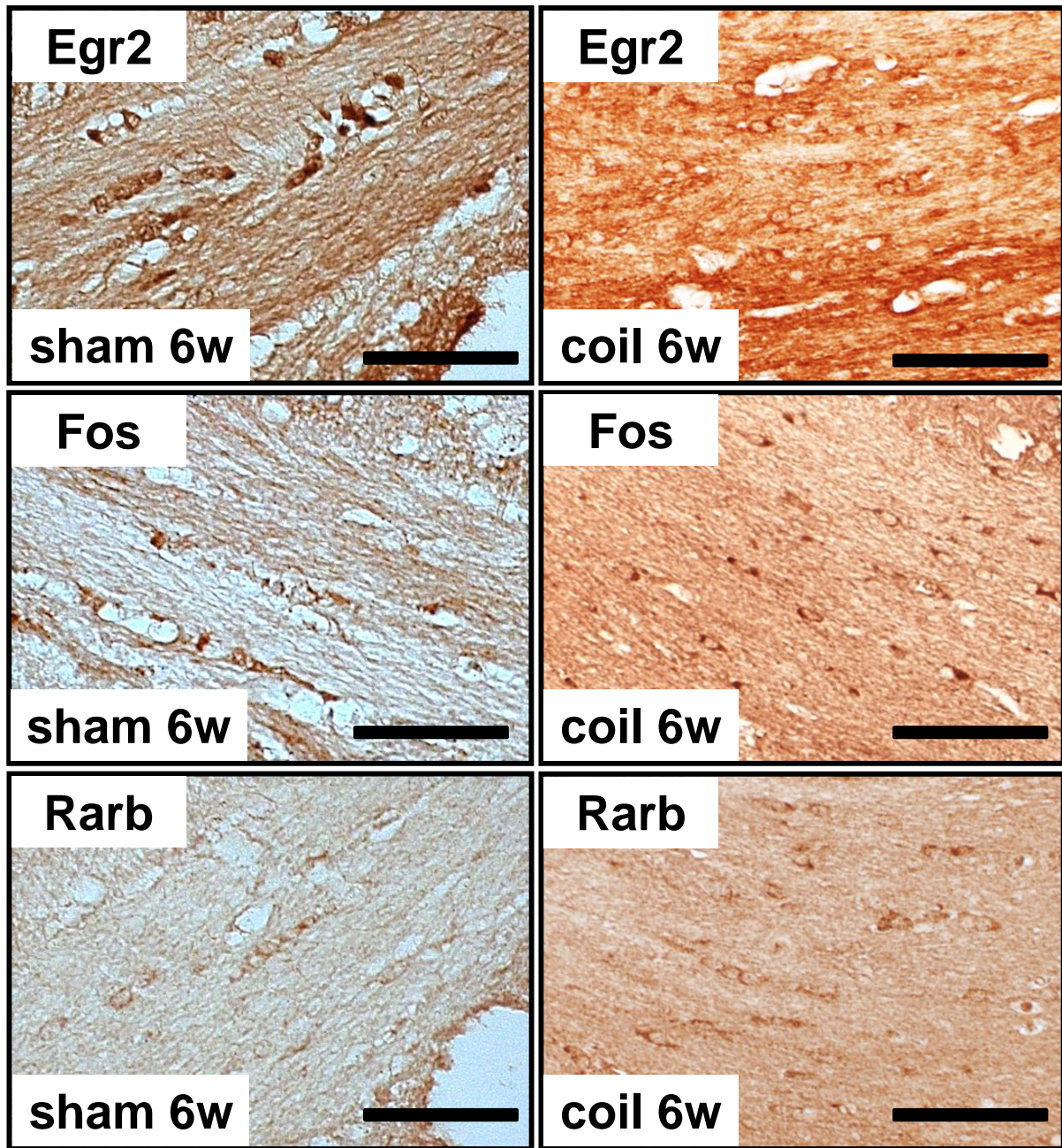


図19 *Btg2*, *Dusp1*の翻訳産物に対する免疫染色

*Btg2*は一部のOlig2陽性細胞に一致するようにoligodendrocyteの核で(矢印), *Dusp1*はTPPP陽性細胞に一致するようにoligodendrocyteの細胞質で強く発現している事が分かる. Sham 6w脳梁においては、いずれも濃染される構造物は確認されなかった.



Bar=50μm

図20 *Egr2*, *Fos*, *Rarb*の翻訳産物に対する免疫染色

Egr2, *Fos*, *Rarb*ともにTPPP陽性細胞に一致する形でoligodendrocyteの細胞質で強く発現していた。染色性については, sham 6wとcoil 6wの間で大きな差異は確認できなかった。

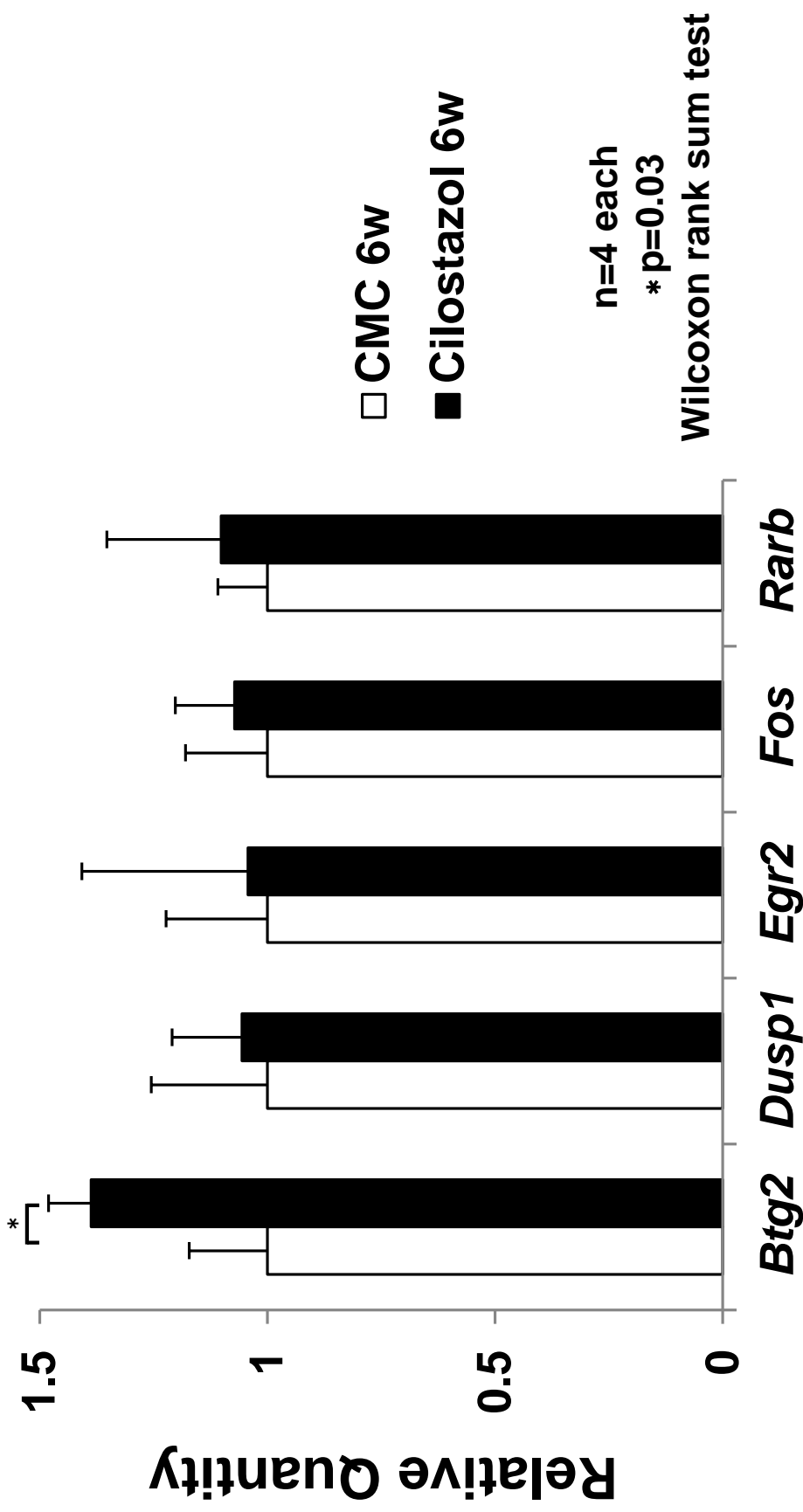


図21 Cilostazol投与による遺伝子群の発現変化

*Btg2*の発現量は、CMC 6w投与群に比してCilostazol 6w投与群において促進されており、統計学的有意差が確認された。(CMC 6w群: n=4 each, Cilostazol 6w群: n=4 each, Error bar: SD)

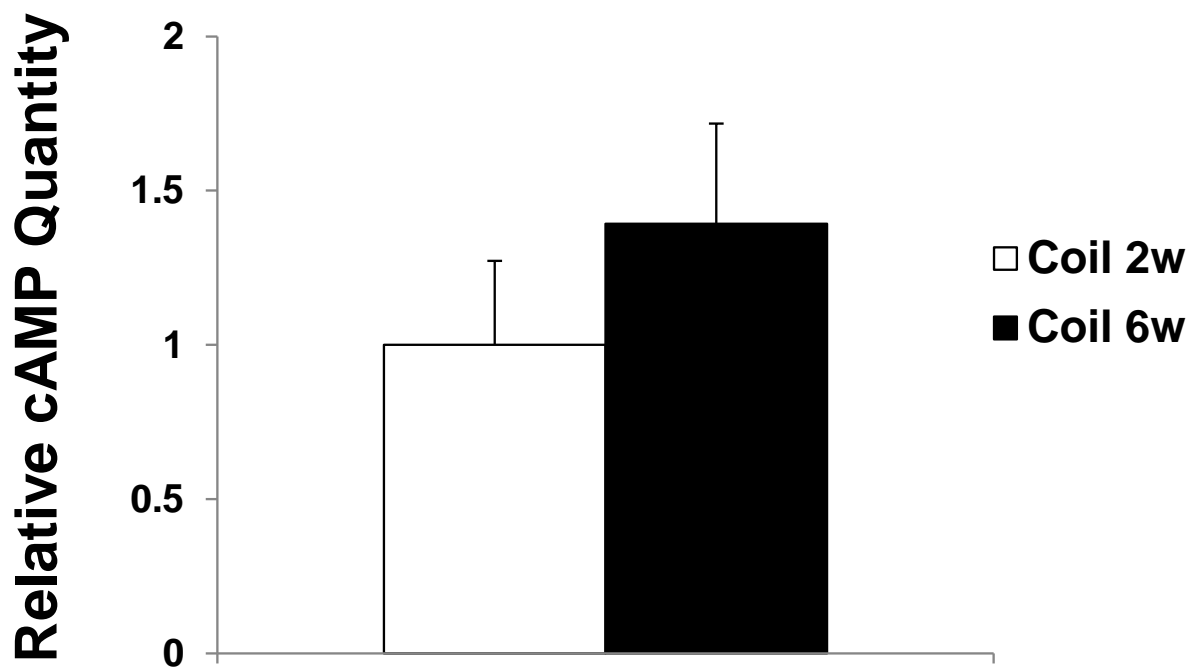


図22 BCASマウス脳梁におけるcAMP量の経時的変化

Coil 2w群, 6w群間においては, 脳梁1mgあたりのcAMP量に統計学的有意差は得られなかった. (Coil 2w群 : n=5, Coil 6w群 : n=5, Error bar: SEM)

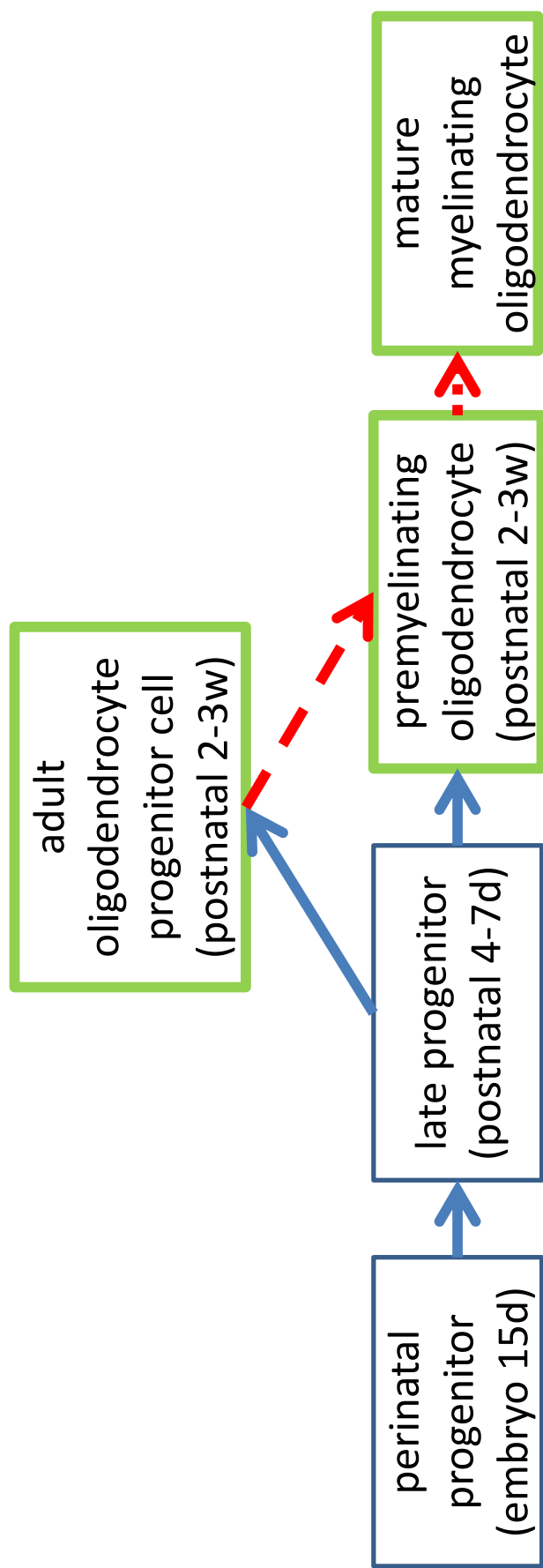


図23 胎生期からのoligodendrocyteの分化機構

成人脳においてもOPCは分化能を保持したまま残存している(緑の枠：成人脳に存在する細胞)。成人脳では赤点線矢印で示した経路がmyelin再生の律速段階となつていと考えられる。

参考文献

- 1 Prince M, Albanese E., Guerchet M, Prina M. *World Alzheimer Report* (2014).
- 2 Klippel, M. Caractères histologique différentiels de la paralysie générale; Classification histologique des paralysie générale. *Archives de Médecine Experimental* **3**, 660-676 (1891).
- 3 Binswanger, O. Die Abgrenzung der allgemeinen progressive Paralyse. *Berliner Klinische Wochenschrift* **31**, 1103-1105, 1137-1139, 1180-1186 (1894).
- 4 Nolan, K. A., Lino, M. M., Seligmann, A. W. & Blass, J. P. Absence of vascular dementia in an autopsy series from a dementia clinic. *Journal of the American Geriatrics Society* **46**, 597-604 (1998).
- 5 Lim, A. *et al.* Clinico-neuropathological correlation of Alzheimer's disease in a community-based case series. *Journal of the American Geriatrics Society* **47**, 564-569 (1999).
- 6 Riley, K. P., Snowden, D. A. & Markesbery, W. R. Alzheimer's neurofibrillary pathology and the spectrum of cognitive function: findings from the Nun Study. *Annals of Neurology* **51**, 567-577 (2002).
- 7 Barker, W. W. *et al.* Relative frequencies of Alzheimer disease, Lewy body, vascular and frontotemporal dementia, and hippocampal sclerosis in the State of Florida Brain Bank. *Alzheimer disease and associated disorders* **16**, 203-212 (2002).

- 8 Petrovitch, H. *et al.* AD lesions and infarcts in demented and non-demented Japanese-American men. *Annals of Neurology* **57**, 98-103 (2005).
- 9 Chui, H. C. *et al.* Cognitive impact of subcortical vascular and Alzheimer's disease pathology. *Annals of Neurology* **60**, 677-687 (2006).
- 10 Jellinger, K. A. The enigma of mixed dementia. *Alzheimer's & dementia* **3**, 40-53 (2007).
- 11 Ishunina, T. A., Kamphorst, W. & Swaab, D. F. Metabolic alterations in the hypothalamus and basal forebrain in vascular dementia. *Journal of neuropathology and experimental neurology* **63**, 1243-1254 (2004).
- 12 Schneider, J. A., Arvanitakis, Z., Bang, W. & Bennett, D. A. Mixed brain pathologies account for most dementia cases in community-dwelling older persons. *Neurology* **69**, 2197-2204 (2007).
- 13 Gold, G. *et al.* Sensitivity and specificity of newly proposed clinical criteria for possible vascular dementia. *Neurology* **49**, 690-694 (1997).
- 14 Petrovitch, H. *et al.* Midlife blood pressure and neuritic plaques, neurofibrillary tangles, and brain weight at death: the HAAS. Honolulu-Asia aging Study. *Neurobiology of aging* **21**, 57-62 (2000).
- 15 Tyas, S. L. *et al.* Mid-life smoking and late-life dementia: the Honolulu-Asia Aging Study. *Neurobiology of aging* **24**, 589-596 (2003).

- 16 山崎貴史. アルツハイマー病における血管性危険因子と画像所見の横断的検討.
脳卒中 **30**, 660-667 (2005).
- 17 Kivipelto, M. *et al.* Obesity and vascular risk factors at midlife and the risk of dementia and Alzheimer disease. *Archives of Neurology* **62**, 1556-1560 (2005).
- 18 Hachinski, V. C. & Bowler, J. V. Vascular dementia. *Neurology* **43**, 2159-2161 (1993).
- 19 Gorelick, P. B. *et al.* Vascular contributions to cognitive impairment and dementia: a statement for healthcare professionals from the american heart association/american stroke association. *Stroke* **42**, 2672-2713 (2011).
- 20 International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems. 10th Revision. Geneva: *World Health Organization* (1992).
- 21 Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth edition. Washington DC: *American Psychiatric Association*, 135-155 (1994).
- 22 Chui, H. C. *et al.* Criteria for the diagnosis of ischemic vascular dementia proposed by the State of California Alzheimer's Disease Diagnostic and Treatment Centers. *Neurology* **42**, 473-480 (1992). Roman, G. C. *et al.* Vascular dementia: diagnostic criteria for research studies. Report of the NINDS-AIREN International Workshop. *Neurology* **43**, 250-260 (1993).
- 23 Hachinski, V. C., Lassen, N. A. & Marshall, J. Multi-infarct dementia. A cause of mental deterioration in the elderly. *Lancet* **2**, 207-210 (1974).

- 24 Roman, G. C. *et al.* Vascular dementia: diagnostic criteria for research studies. Report of the NINDS-AIREN International Workshop. *Neurology* **43**, 250-260 (1993).
- 25 Pohjasvaara, T., Mantyla, R., Ylikoski, R., Kaste, M. & Erkinjuntti, T. Comparison of different clinical criteria (DSM-III, ADDTC, ICD-10, NINDS-AIREN, DSM-IV) for the diagnosis of vascular dementia. National Institute of Neurological Disorders and Stroke-Association Internationale pour la Recherche et l'Enseignement en Neurosciences. *Stroke* **31**, 2952-2957 (2000).
- 26 Tomimoto, H. [Diagnosis and treatment of subcortical vascular dementia]. *Rinsho shinkeigaku* **50**, 539-546 (2010).
- 27 Erkinjuntti, T. *et al.* Research criteria for subcortical vascular dementia in clinical trials. *Journal of neural transmission. Supplementum* **59**, 23-30 (2000).
- 28 Erkinjuntti, T. *et al.* Limitations of clinical criteria for the diagnosis of vascular dementia in clinical trials. Is a focus on subcortical vascular dementia a solution? *Annals of the New York Academy of Sciences* **903**, 262-272 (2000).
- 29 Jellinger, K. & Neumayer, E. [Binswanger's progressive subcortical vascular encephalopathy. A clinico-neuropathological study]. *Archiv fur Psychiatrie und Nervenkrankheiten* **205**, 523-554 (1964).
- 30 Lechner, H. *et al.* Nuclear magnetic resonance image white matter lesions and risk factors for stroke in normal individuals. *Stroke* **19**, 263-265 (1988).

- 31 Liao, D. *et al.* The prevalence and severity of white matter lesions, their relationship with age, ethnicity, gender, and cardiovascular disease risk factors: the ARIC Study. *Neuroepidemiology* **16**, 149-162 (1997).
- 32 Gouw, A. A. *et al.* Progression of white matter hyperintensities and incidence of new lacunes over a 3-year period: the Leukoaraiosis and Disability study. *Stroke* **39**, 1414-1420 (2008).
- 33 Roman, G. C., Erkinjuntti, T., Wallin, A., Pantoni, L. & Chui, H. C. Subcortical ischaemic vascular dementia. *The Lancet. Neurology* **1**, 426-436 (2002).
- 34 Tomimoto, H., Akiguchi, I., Akiyama, H., Kimura, J. & Yanagihara, T. T-cell infiltration and expression of MHC class II antigen by macrophages and microglia in a heterogeneous group in leukoencephalopathy. *The American journal of pathology* **143**, 579-586 (1993).
- 35 Tomimoto, H. *et al.* Alterations of the blood-brain barrier and glial cells in white-matter lesions in cerebrovascular and Alzheimer's disease patients. *Stroke* **27**, 2069-2074 (1996).
- 36 Tomimoto, H. *et al.* Glial expression of cytokines in the brains of cerebrovascular disease patients. *Acta neuropathologica* **92**, 281-287 (1996).
- 37 Longstreth, W. T., Jr. *et al.* Incidence, manifestations, and predictors of worsening white matter on serial cranial magnetic resonance imaging in the elderly: the

- Cardiovascular Health Study. *Stroke* **36**, 56-61 (2005).
- 38 Baloh, R. W., Ying, S. H. & Jacobson, K. M. A longitudinal study of gait and balance dysfunction in normal older people. *Archives of Neurology* **60**, 835-839 (2003).
- 39 Iwamoto, T., Kubo, H. & Takasaki, M. Platelet activation in the cerebral circulation in different subtypes of ischemic stroke and Binswanger's disease. *Stroke* **26**, 52-56 (1995).
- 40 Tomimoto, H. *et al.* The coagulation-fibrinolysis system in patients with leukoaraiosis and Binswanger disease. *Archives of Neurology* **58**, 1620-1625 (2001).
- 41 Forette, F. *et al.* Prevention of dementia in randomised double-blind placebo-controlled Systolic Hypertension in Europe (Syst-Eur) trial. *Lancet* **352**, 1347-1351 (1998).
- 42 Tzourio, C. *et al.* Effects of blood pressure lowering with perindopril and indapamide therapy on dementia and cognitive decline in patients with cerebrovascular disease. *Archives of internal medicine* **163**, 1069-1075 (2003).
- 43 Roman, G. C. *et al.* Donepezil in vascular dementia: combined analysis of two large-scale clinical trials. *Dementia and geriatric cognitive disorders* **20**, 338-344 (2005).
- 44 Erkinjuntti, T. *et al.* Efficacy of galantamine in probable vascular dementia and Alzheimer's disease combined with cerebrovascular disease: a randomised trial.

- Lancet* **359**, 1283-1290 (2002).
- 45 Moretti, R., Torre, P., Antonello, R. M., Cazzato, G. & Bava, A. Rivastigmine in subcortical vascular dementia: a randomized, controlled, open 12-month study in 208 patients. *American journal of Alzheimer's disease and other dementias* **18**, 265-272 (2003).
- 46 Kavirajan, H. & Schneider, L. S. Efficacy and adverse effects of cholinesterase inhibitors and memantine in vascular dementia: a meta-analysis of randomised controlled trials. *The Lancet. Neurology* **6**, 782-792 (2007).
- 47 Lin, J. X. *et al.* White matter lesions and alteration of vascular cell composition in the brain of spontaneously hypertensive rats. *Neuroreport* **12**, 1835-1839 (2001).
- 48 Tsuchiya, M., Sako, K., Yura, S. & Yonemasu, Y. Cerebral blood flow and histopathological changes following permanent bilateral carotid artery ligation in Wistar rats. *Experimental brain research* **89**, 87-92 (1992).
- 49 Kurumatani, T., Kudo, T., Ikura, Y. & Takeda, M. White matter changes in the gerbil brain under chronic cerebral hypoperfusion. *Stroke* **29**, 1058-1062 (1998).
- 50 Shibata, M., Ohtani, R., Ihara, M. & Tomimoto, H. White matter lesions and glial activation in a novel mouse model of chronic cerebral hypoperfusion. *Stroke* **35**, 2598-2603 (2004).
- 51 Shibata, M. *et al.* Selective impairment of working memory in a mouse model of

- chronic cerebral hypoperfusion. *Stroke* **38**, 2826-2832 (2007).
- 52 Farkas, E., Luiten, P. G. & Bari, F. Permanent, bilateral common carotid artery occlusion in the rat: a model for chronic cerebral hypoperfusion-related neurodegenerative diseases. *Brain research reviews* **54**, 162-180 (2007).
- 53 Seal, J. B., Buchh, B. N. & Marks, J. D. New variability in cerebrovascular anatomy determines severity of hippocampal injury following forebrain ischemia in the Mongolian gerbil. *Brain research* **1073-1074**, 451-459 (2006).
- 54 Reimer, M. M. *et al.* Rapid disruption of axon-glia integrity in response to mild cerebral hypoperfusion. *The Journal of neuroscience* **31**, 18185-18194 (2011).
- 55 Ueno, M., Tomimoto, H., Akiguchi, I., Wakita, H. & Sakamoto, H. Blood-brain barrier disruption in white matter lesions in a rat model of chronic cerebral hypoperfusion. *Journal of cerebral blood flow and metabolism* **22**, 97-104 (2002).
- 56 Ihara, M. *et al.* Chronic cerebral hypoperfusion induces MMP-2 but not MMP-9 expression in the microglia and vascular endothelium of white matter. *Journal of cerebral blood flow and metabolism* **21**, 828-834 (2001).
- 57 Miyamoto, N. *et al.* Phosphodiesterase III inhibition promotes differentiation and survival of oligodendrocyte progenitors and enhances regeneration of ischemic white matter lesions in the adult mammalian brain. *Journal of cerebral blood flow and metabolism* **30**, 299-310 (2010).

- 58 Wakita, H., Tomimoto, H., Akiguchi, I. & Kimura, J. Protective effect of cyclosporin A on white matter changes in the rat brain after chronic cerebral hypoperfusion. *Stroke* **26**, 1415-1422 (1995).
- 59 Wakita, H., Tomimoto, H., Akiguchi, I. & Kimura, J. Dose-dependent, protective effect of FK506 against white matter changes in the rat brain after chronic cerebral ischemia. *Brain research* **792**, 105-113 (1998).
- 60 Tomimoto, H., Akiguchi, I., Wakita, H., Lin, J. X. & Budka, H. Cyclooxygenase-2 is induced in microglia during chronic cerebral ischemia in humans. *Acta neuropathologica* **99**, 26-30 (2000).
- 61 Nakaji, K. *et al.* Matrix metalloproteinase-2 plays a critical role in the pathogenesis of white matter lesions after chronic cerebral hypoperfusion in rodents. *Stroke* **37**, 2816-2823 (2006).
- 62 Watanabe, T. *et al.* Cilostazol protects against brain white matter damage and cognitive impairment in a rat model of chronic cerebral hypoperfusion. *Stroke* **37**, 1539-1545 (2006).
- 63 Ueno, Y. *et al.* Edaravone attenuates white matter lesions through endothelial protection in a rat chronic hypoperfusion model. *Neuroscience* **162**, 317-327 (2009).
- 64 Miyamoto, N. *et al.* Age-related decline in oligodendrogenesis retards white matter repair in mice. *Stroke* **44**, 2573-2578 (2013).

- 65 Duan, W. *et al.* Adenosine A2A receptor deficiency exacerbates white matter lesions and cognitive deficits induced by chronic cerebral hypoperfusion in mice. *Journal of the neurological sciences* **285**, 39-45 (2009).
- 66 Yamada, M. *et al.* The influence of chronic cerebral hypoperfusion on cognitive function and amyloid beta metabolism in APP overexpressing mice. *PloS one* **6**, e16567 (2011).
- 67 Sudo, T. *et al.* Potent effects of novel anti-platelet aggregatory cilostamide analogues on recombinant cyclic nucleotide phosphodiesterase isozyme activity. *Biochemical pharmacology* **59**, 347-356 (2000).
- 68 Kimura, Y., Tani, T., Kanbe, T. & Watanabe, K. Effect of cilostazol on platelet aggregation and experimental thrombosis. *Arzneimittel-Forschung* **35**, 1144-1149 (1985).
- 69 Kawamura, K., Watanabe, K. & Kimura, Y. Effect of cilostazol, a new antithrombotic drug, on cerebral circulation. *Arzneimittel-Forschung* **35**, 1149-1154 (1985).
- 70 Shinohara, Y. *et al.* Cilostazol for prevention of secondary stroke (CSPS 2): an aspirin-controlled, double-blind, randomised non-inferiority trial. *The Lancet. Neurology* **9** (2010).
- 71 Schroeder, A. *et al.* The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC molecular biology* **7**, 3 (2006).

- 72 Armengaud, P., Breitling, R. & Amtmann, A. The potassium-dependent transcriptome of *Arabidopsis* reveals a prominent role of jasmonic acid in nutrient signaling. *Plant physiology* **136** (2004).
- 73 Srivastava, R. K., Srivastava, A. R. & Cho-Chung, Y. S. Synergistic effects of 8-Cl-cAMP and retinoic acids in the inhibition of growth and induction of apoptosis in ovarian cancer cells: induction of retinoic acid receptor beta. *Molecular and cellular biochemistry* **204**, 1-9 (2000).
- 74 Kim, C. *et al.* Antiinflammatory cAMP signaling and cell migration genes co-opted by the anthrax bacillus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 6150-6155, (2008).
- 75 Kim, Y. D. *et al.* B-cell translocation gene 2 regulates hepatic glucose homeostasis via induction of orphan nuclear receptor Nur77 in diabetic mouse model. *Diabetes* **63**, 1870-1880 (2014).
- 76 Fukuchi, M., Kanasaki, K., Takasaki, I., Tabuchi, A. & Tsuda, M. Convergent effects of Ca(2+) and cAMP signals on the expression of immediate early genes in neurons. *Biochemical and biophysical research communications* **466**, 572-577 (2015).
- 77 Kipanyula, M. J. *et al.* Calcineurin-nuclear factor of activated T cells regulation of Krox-20 expression in Schwann cells requires elevation of intracellular cyclic AMP. *Journal of neuroscience research* **91** (2013).

- 78 Hiramatsu, M., Takiguchi, O., Nishiyama, A. & Mori, H. Cilostazol prevents amyloid beta peptide(25-35)-induced memory impairment and oxidative stress in mice. *British journal of pharmacology* **161** (2010).
- 79 Shintani, S. *et al.* General pharmacological properties of cilostazol, a new antithrombotic drug. Part I: Effects on the central nervous system. *Arzneimittel-Forschung* **35**, 1157-1162 (1985).
- 80 野村岳之ほか. *医薬品研究* **16**, 1200-12033 (1985).
- 81 Sheng, M. & Greenberg, M. E. The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron* **4**, 477-485 (1990).
- 82 Okuno, H. Regulation and function of immediate-early genes in the brain: beyond neuronal activity markers. *Neuroscience research* **69**, 175-186 (2011).
- 83 Canzoniere, D. *et al.* Dual control of neurogenesis by PC3 through cell cycle inhibition and induction of Math1. *The Journal of neuroscience* **24**, 3355-3369 (2004).
- 84 Corrente, G., Guardavaccaro, D. & Tirone, F. PC3 potentiates NGF-induced differentiation and protects neurons from apoptosis. *Neuroreport* **13**, 417-422 (2002).
- 85 Chang, A., Nishiyama, A., Peterson, J., Prineas, J. & Trapp, B. D. NG2-positive oligodendrocyte progenitor cells in adult human brain and multiple sclerosis lesions. *The Journal of neuroscience* **20**, 6404-6412 (2000).
- 86 Ono, K. *et al.* Regional- and temporal-dependent changes in the differentiation of

Olig2 progenitors in the forebrain, and the impact on astrocyte development in the dorsal pallium. *Developmental biology* **320**, 456-468 (2008).

87 田中亮太. 成体脳の内在性神経前駆細胞・グリア前駆細胞を応用した虚血性神経疾患の治療. *脳循環代謝* **24**, 89-93 (2013).

88 Hattori, Y., Kitamura, A., Nagatsuka, K. & Ihara, M. A novel mouse model of ischemic carotid artery disease. *PloS one* **9**, e100257 (2014).