

岐阜薬科大学博士（薬学）学位論文

虚血性脳卒中に対する脳保護薬の
薬理学的研究

守本 亘孝

2013 年

目次

| | |
|--|------|
| 序論 | 1 頁 |
| 第 1 章 虚血性神経細胞障害に対するミノサイクリンの神経保護作用 | 6 頁 |
| 第 1 節 緒言 | |
| 第 2 節 実験材料および方法 | |
| 第 3 節 実験成績 | |
| 第 4 節 考察 | |
| 第 2 章 虚血性神経細胞障害に対する SUN N8075 の神経保護作用 | 21 頁 |
| 第 1 節 緒言 | |
| 第 2 節 実験材料および方法 | |
| 第 3 節 実験成績 | |
| 第 4 節 考察 | |
| 第 3 章 マウス脳虚血再灌流障害における $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体アイソフォームの 関与 | 44 頁 |
| 第 1 節 緒言 | |
| 第 2 節 実験材料および方法 | |
| 第 3 節 実験成績 | |
| 第 4 節 考察 | |
| 総括および結論 | 62 頁 |
| 謝辞 | 66 頁 |
| 引用文献 | 67 頁 |
| 略語一覧表 | 83 頁 |

序論

脳血管障害 (脳卒中)は、先進国において死因の上位を占める疾患である。脳卒中医療の進歩により年々死亡率は減少し、我が国ではこれまで悪性新生物、心疾患に次ぐ死因の第3位から2011年には肺炎に次ぐ第4位となった (Fig. 1)。しかしながら、脳卒中は、たとえ一命を取り留めたとしても重篤な後遺症を残すことが多く、寝たきりや要介護原因の第1位となっている。また、患者本人の Quality of life (QOL)の低下だけでなく、介護者の負担も大きく、脳卒中による医療介護費や社会経済的損失は甚大なものとなっている。したがって、高齢化社会の我が国において、脳卒中の予防および重症化防止に向けての治療法の開発が急務となっている。

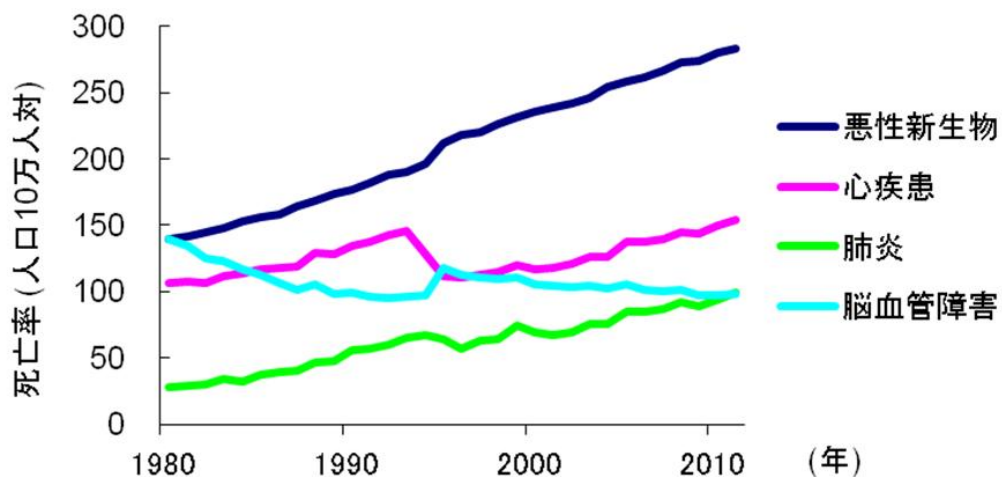


Fig. 1 日本人の死因別死亡率の年次推移

厚生労働省 2011年人口動態統計

脳卒中は出血性脳卒中である脳出血、くも膜下出血および虚血性脳卒中である脳梗塞の3つに大別され、脳梗塞は脳卒中全体の約75%、脳卒中による死亡の約60%を占めている。脳血管が閉塞されると、脳血流が低下し、ただちに細胞死が生じる虚血中

心領域 (コア領域)、機能は低下しているがすぐには細胞死には至らない虚血周辺領域 (ペナンプラ領域)が生じる。ペナンプラ領域は脳梗塞発症後、次第にコア領域に置き換わっていく (Fig. 2)。そのため、急性期の治療戦略として速やかに血流を改善させること、脳保護的な処置を行うことでペナンプラ領域を保護することが重要である。

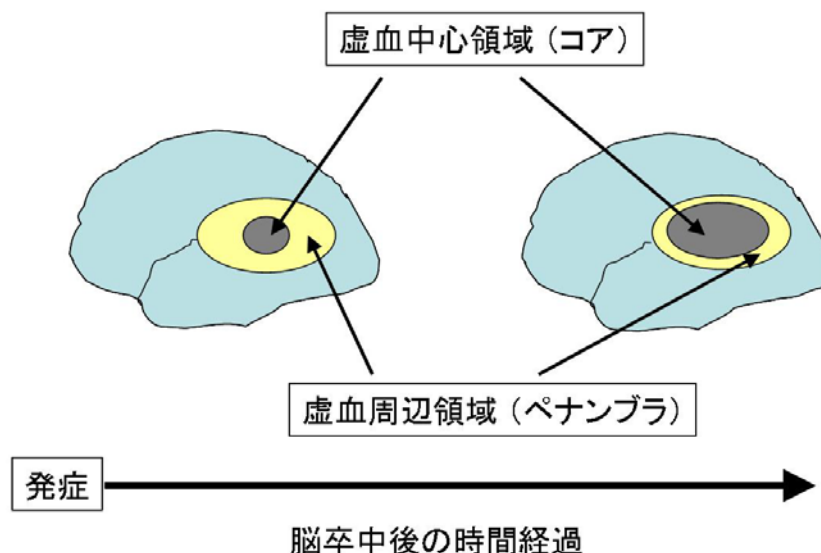


Fig. 2 虚血中心領域と虚血周辺領域

脳梗塞急性期における血流改善療法として、我が国では 2005 年 10 月より遺伝子組み換え組織プラスミノゲンアクチベーター (recombinant tissue plasminogen activator; rt-PA)の静脈内投与による血栓溶解療法が、発症後 3 時間以内の急性期脳梗塞患者に対して認可され臨床の場で広く用いられてきた。また、rt-PA 静注療法の治療可能時間 (therapeutic time window)拡大を評価した臨床試験では、発症後 5 ないし 6 時間以内の患者を対象とした試験で治療効果は明らかではなかったが (Hacke et al., 1995, 1998; Clark et al., 1999)、European Cooperative Acute Stroke Study III (ECASS III)および Safe Implementation of Treatments in Stroke-International Stroke Thrombolysis Registry (SITS-ISTR)では発症後 3-4.5 時間の患者の有効性、安全性が証明された (Hacke et al.,

2008; Wahlgren et al., 2008)。これらの結果を受け、rt-PA 静注療法は 2012 年 8 月 31 日から therapeutic time window が 4.5 時間まで延長された。しかしながら、合併症として症候性頭蓋内出血の頻度が増加することが報告されている (Hacke et al., 2008; Wahlgren et al., 2008)。また、実際の臨床の間では発症後から治療開始までの時間がある程度経過してしまっていることが多く、rt-PA 静注療法による発症後 3 時間以内の治療は脳梗塞患者全体の数%に留まっている。そのため、発症時間が特定できない患者、4.5 時間以上経過した患者に対して安全性、有効性の問題から投与できないなど課題も残されている。このような背景から、血栓溶解療法による副作用の抑制および therapeutic time window の延長、そして血栓溶解療法を施行できない症例に対する脳保護療法として脳梗塞急性期に使用可能な脳保護薬の開発が期待されている。

これまで、多くの脳保護薬の開発がグルタミン酸- Ca^{2+} 仮説 (Lipton et al., 1994; Ankarcróna et al., 1995)を中心とした神経細胞死を抑制することを目的に行われてきた。血流遮断により脳虚血に陥ると、神経細胞への酸素、グルコースの供給が障害され ATP の枯渇が生じる。それにより、細胞内イオン交換輸送機構の障害、細胞膜の脱分極が生じ、細胞外に興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸などの過剰放出が起こる。過剰なグルタミン酸による α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate (AMPA)、*N*-methyl-D-aspartate (NMDA)などのグルタミン酸受容体の活性化、電位依存性 Ca^{2+} チャネルの活性化により、細胞内への Ca^{2+} の流入が引き起こされる。細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇は、 Ca^{2+} 依存性の様々な酵素を活性化し、活性酸素種・活性窒素種などのフリーラジカルの産生、ミトコンドリアや小胞体の機能障害を引き起こし、これらが要因となって急性または遅発性の神経細胞死が誘発される (Fig. 3)。この虚血性神経細胞死メカニズムをターゲットとして、グルタミン酸受容体拮抗薬、カルシウムチャネル拮抗薬、一酸化窒素合成阻害薬、抗酸化薬および抗炎症薬などが開発され、基礎試験や臨床試験が行われてきた。しかしながら、これらの脳保護薬は動物実験では有効性が認められたのに対し、臨床試験においては副作用の出現または有効性が証明されない

などのため認可されず、我が国では唯一フリーラジカル消去薬であるエダラボン（ラジカット[®]）が認可されているのみである。脳保護薬により神経細胞を保護し虚血の拡大を防ぐことは、脳卒中後の神経症候および機能予後の改善にもつながることが期待される。そのため、副作用の少ない有効性のある脳保護薬の開発、虚血性神経細胞死メカニズムのさらなる解明とそのメカニズムに沿った脳保護薬の開発が望まれている。

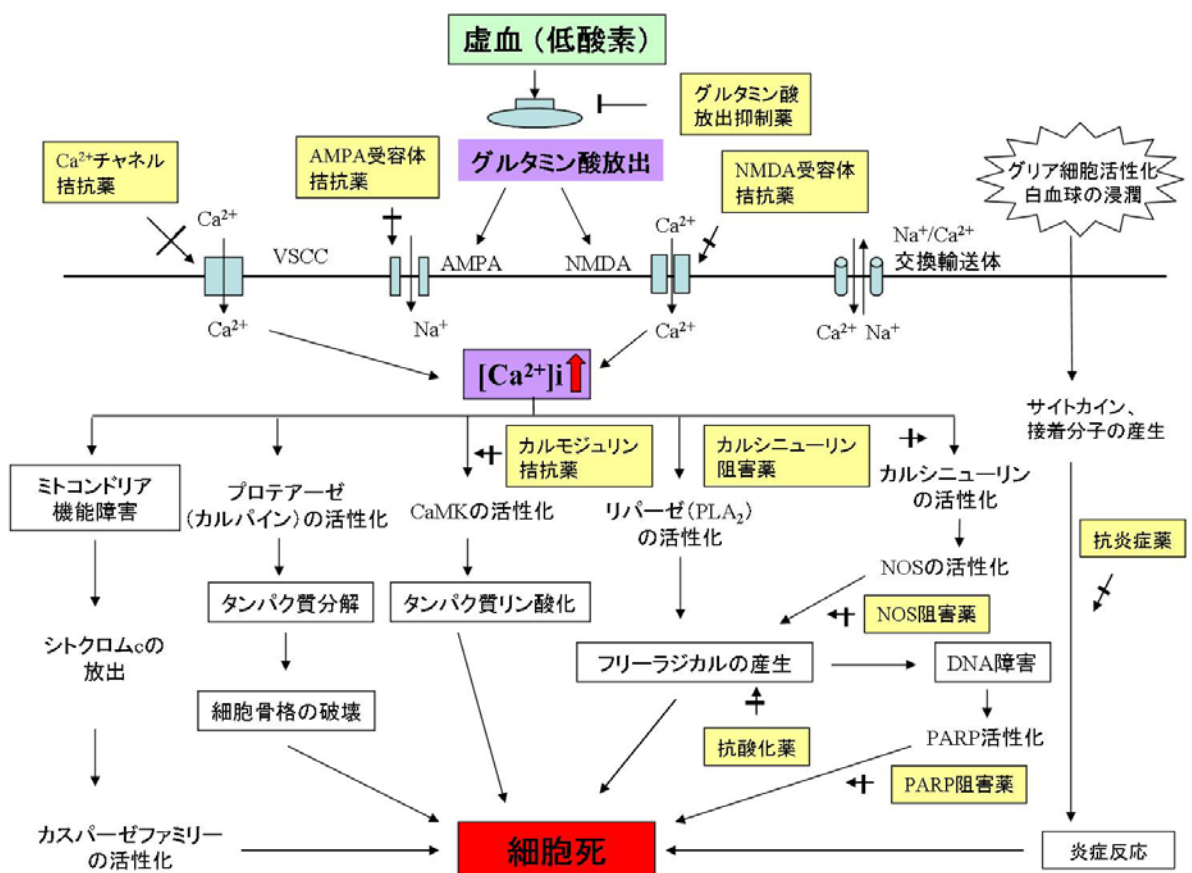


Fig. 3 脳虚血後の神経細胞死メカニズム

AMPA; α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate, CAMK; Calcium/calmodulin dependent protein kinase, DNA; deoxyribonucleic acid, NMDA; *N*-methyl-D-aspartate, NOS; nitric oxide synthase, PARP; poly (ADP-ribose) polymerase, PLA₂; phospholipase A₂, VSCC; voltage-sensitive calcium channel.

本研究では、新規脳保護薬の開発を目的に、安全性の高い薬剤として臨床で用いられている抗菌薬のミノサイクリンおよび新規抗酸化薬である (2S)-1-(4-Amino-2,3,5-trimethylphenoxy)-3-{4-[4-(4-fluorobenzyl)phenyl]-1-piperazinyl}-2-propanol dimethanesulfonate (SUN N8075)の虚血性神経細胞障害に対する有効性を検討した。また、神経細胞死メカニズムにおける $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体 (sodium/calcium exchanger; NCX)に着目し、NCX アイソフォームの関与を検討した。

第1章では、マウス中大脳動脈永久閉塞 (permanent middle cerebral artery occlusion; pMCAO)モデル誘発脳虚血障害およびラット大脳皮質初代培養細胞を用いた神経細胞障害モデルに対するミノサイクリンの保護作用および作用メカニズムを検討した。第2章では、マウス pMCAO モデル誘発脳虚血障害およびラット大脳皮質初代培養細胞を用いた神経細胞障害モデルに対する SUN N8075 の保護作用および作用メカニズムを検討した。第3章では、マウス中大脳動脈一過性閉塞 (transient middle cerebral artery occlusion; tMCAO)モデル誘発脳虚血再灌流障害における NCX アイソフォームの関与を、NCX ヘテロマウス (NCX1^{+/-}、NCX 2^{+/-}および NCX3^{+/-}マウス)および3種の NCX 阻害薬 (KB-R7943、SEA0400 および SN-6)の作用を比較することで検討した。これらの研究から得られた新知見を以下に報告する。

第1章 虚血性神経細胞障害に対するミノサイクリンの神経保護作用

第1節 緒言

虚血性脳卒中は、先進国において死因の上位にあげられ、寝たきりなどの長期的身体障害の主因となる致死性の神経疾患である。遺伝子組み換え組織プラスミノゲンアクチベーター (recombinant tissue plasminogen activator; rt-PA)などの血栓溶解薬は、現在急性虚血性脳卒中に対する薬理的治療が国際的に承認された唯一の薬剤である。rt-PAの早期投与は虚血障害に対する有効性が認められたが、合併症として閉塞血管の再開通による再灌流障害の発生が報告されている (Becker, 2001; Emsley and Tyrrell, 2002)。また、rt-PAは血液脳関門の破綻に伴い脳実質に漏出することで出血の危険性が増大する (Hacke et al., 1995, 1998; Dijkhuizen et al., 2002)。近年、rt-PAがN-methyl-D-aspartate (NMDA)受容体 NR1サブユニットの切断、細胞内Ca²⁺透過性亢進およびマトリックスメタロプロテイナーゼ (matrix metalloproteinase; MMP)ファミリーによる細胞内プロテアーゼの活性化などの興奮毒性を増加させることが報告されている (Kaur et al., 2004)。そのため、虚血性脳卒中に対する副作用の少ない脳保護薬の開発が望まれている。

塩酸ミノサイクリン (以下ミノサイクリン) (Fig. 4)などのテトラサイクリン系薬剤は、広域性抗菌活性を有する静菌性抗生物質として知られている。これらの薬剤は迅速かつ完全に吸収され、脳や脳脊髄液への高い組織移行性を示す (Aronson, 1980; Klein and Cunha, 1995)。ミノサイクリンは、抗菌活性とは別の生物学的作用を有する特異的なテトラサイクリン系薬剤である。臨床において良好な忍容性を示し、関節リウマチへの適応が考慮されている (Furst, 1998)。また、ハンチントン病 (Chen et al., 2000; Wang et al., 2003)、パーキンソン病 (Du et al., 2001; Wu et al., 2002)、多発性硬化症 (Popovic et al., 2002)、脊髄損傷 (Teng et al., 2004)および筋萎縮性側索硬化症 (ALS) (Zhu et al., 2002)などの諸種の神経障害モデルおよび興奮毒性条件下におけるミクロ

グリアの炎症反応を抑制する (Tikka et al., 2001)。さらに、砂ネズミおよびラットを用いた脳卒中モデルにおいて、一過性脳虚血誘発神経細胞障害を抑制することが報告されている (Yrjänheikki et al., 1998, 1999)。これらの報告から、ミノサイクリンは MMP 活性 (Golub et al., 1991)、iNOS (Amin et al., 1996)、ミトコンドリアシトクロム c 放出 (Teng et al., 2004) および caspase 依存的並びに非依存的細胞死経路 (Zhu et al., 2002) の活性化抑制などの幅広い作用を有することが明らかにされている。しかしながら、これまで大脳皮質培養細胞および永久局所脳虚血モデルを用いてミノサイクリンの作用を検討した報告はない。临床上、永久脳虚血は一過性脳虚血よりも高頻度に発生する。そこで、本章ではマウス中大脳動脈永久閉塞 (pMCAO) モデル誘発脳虚血障害およびラット大脳皮質初代培養細胞を用いたグルタミン酸誘発神経細胞障害に対するミノサイクリンの作用を検討した。さらに、マウス脳ホモジネートを用いた脂質過酸化反応および diphenyl-*p*-picrylhydrazyl (DPPH) 誘発ラジカル消去活性に対するミノサイクリンの作用を検討した。

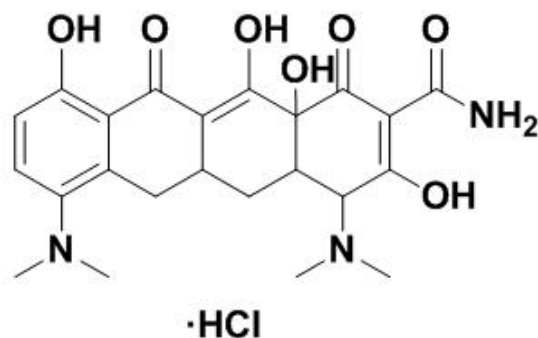


Fig. 4 Chemical structure of minocycline.

第2節 実験材料および方法

2.1. 実験動物

雄性 ddY マウスおよび妊娠 Wistar ラットは Japan SLC (Shizuoka, Japan)より購入した。購入した動物は自由給水下に固形飼料 (CE-2, CLEA Japan, Tokyo, Japan)を用いて飼育した。実験を行うにあたっては、岐阜薬科大学動物実験委員会に動物実験承認申請を行い、許可を受けた上で実施した。

2.2. 実験材料

Dulbecco's modified Eagles's medium nutrient mixture F-12 HAM (D-MEM/F-12)、ミノサイクリン、poly-ornithine、diphenyl-*p*-picrylhydrazyl (DPPH)、2-thiobarbituric acid、MK-801、2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC)および Trolox (the water-soluble Vitamin E)は Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)、L-glutamic acid monosodium salt は Nacalai Tesque (Kyoto, Japan)、isoflurane は Nissan Kagaku (Tokyo, Japan)、fetal bovine serum は VALEANT (Costa Mesa, CA, USA)、horse serum は Sanko Junyaku (Tokyo, Japan)、笑気ガスは Showa Denko K.K. (Tokyo, Japan)、酸素ガスは Taiyo Nippon Sanso Corp. (Tokyo, Japan)よりそれぞれ購入した。

2.3. 実験方法

2.3.1. マウス中大脳動脈永久閉塞 (pMCAO)モデルの作製および評価

実験には ddY 系雄性マウス体重 20-27 g を使用した。小動物用麻酔器 (Soft Lander, Sin-ei Industry Co. Ltd., Saitama, Japan)を用い、笑気ガス 70%、酸素ガス 30%下において、麻酔導入時には isoflurane 2%を、麻酔維持時には isoflurane 1%を使用した。体温は手術中および手術後正向反射が回復するまで保温ランプで維持した。左脳側中大脳動脈の閉塞は、フィラメント栓子を挿入することにより行った (Hara et al., 1996, 1997)。すなわち、実体顕微鏡下、左脳側中大脳動脈を頸動脈から silicone resin 混合物

(Xantopren + Activator Liquid)で先端を覆った 8-0 ナイロンモノフィラメント (Ethicon, Somerville, NJ, USA)を挿入し閉塞した。pMCAO 24 時間後の神経障害を測定、その後断頭し、mouse brain matrix (RBM-2000C, Activational Systems, Warren, MI, USA)を用いて、前脳を 2 mm の厚さで 5 切片作製した。脳切片を 2% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC)で 10-15 分間染色した。梗塞部位はデジタルカメラ (Nikon Cool PIX4500, Nikon Co., Tokyo, Japan)を用いて記録し、Image J を用いて梗塞面積を測定し、梗塞体積を計算した (Hara et al., 1996, 1997)。脳浮腫は次の公式 (infarct volume + ipsilateral undamaged volume – contralateral volume) × 100/contralateral volume (%)によって算出した (Hara et al., 1997)。

ミノサイクリン (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)は生理食塩水に溶解し、用時調製したものをを用いた。ミノサイクリンは pMCAO 60 分前、30 分後または 4 時間後に 90 mg/kg (0.1 ml/10 g)を腹腔内投与し、control 群には生理食塩水を投与した。本検討におけるミノサイクリンの投与量は、既報の検討結果から 90 mg/kg に設定した (Yrjänheikki et al., 1998, 1999; Du et al., 2001; Zhang et al., 2004)。

2.3.2. 神経症状観察

pMCAO 24 時間後のマウスの神経症状を以下の基準に従って観察・記録した (Hara et al., 1996)。0. 目立った神経症状なし (正常)、1. 右前肢の伸展が出来ない (軽症)、2. 右前肢の片麻痺が認められ、その場を回転する (中程度)、3. 歩行困難または立ち直り反射の消失 (重症)。

2.3.3. ラット大脳皮質初代培養

初代培養は既報に従い、妊娠 16-18 日目 Wistar ラットの胎児大脳皮質から調製した (Takada et al., 2003)。ラット胎児大脳皮質から単離した細胞を 6×10^5 cells/well の密度で poly-ornithine 処理した 24 well プレートに播種した。

細胞は播種後 10% fetal bovine serum、L-glutamine 2.5 mM、glucose 17.5 mM および NaHCO₃ 14.3 mM を含んだ D-MEM/F-12 培地に 1-7 日間、10% horse serum、L-glutamine 2.5 mM、glucose 17.5 mM および NaHCO₃ 14.3 mM を含んだ D-MEM/F-12 培地に 8-15 日間、37°C、5% CO₂ 条件下で培養を行った。播種 3 日後に cytosine-β-arabinoside 10 μM を添加し非神経細胞を除き、試験には培養 13-15 日目の生存成熟培養細胞を用いた。

2.3.4. 神経細胞障害評価

培養細胞にミノサイクリン 0.02-2 μM または MK-801 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 10 μM を添加し 1 時間培養した。その後、500 μM グルタミン酸条件下で 24 時間培養し、グルタミン酸誘発神経細胞死に対するミノサイクリンの作用を評価した。グルタミン酸誘発神経細胞死は細胞が resazurin を resorufin に還元する際の蛍光強度変化を測定することで定量的に評価した。試験は 10% horse serum を含む D-MEM/F-12 培地を用いて、37°C の条件下で行った。培地に resazurin を終濃度 10% になるように加え、3 時間培養後、蛍光強度 (励起波長 560 nm、蛍光波長 590 nm) を測定し、細胞生存率を評価した。

2.3.5. 蛍光核染色

細胞死は Hoechst dye 33342 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) および YO-PRO-1 (Molecular Probes) による蛍光染色法を用いて評価した。Hoechst 33342 (励起波長 350 nm、蛍光波長 461 nm) により全細胞を染色し、YO-PRO-1 (励起波長 491 nm、蛍光波長 509 nm) によりアポトーシス細胞を染色した。細胞培養後に Hoechst 33342 (終濃度 8 μM) および YO-PRO-1 (終濃度 0.1 μM) を添加し、15-30 分間静置し核染色を行った。

2.3.6. DPPH ラジカル消去活性評価

DPPH ラジカル消去活性は既報に従い評価した (Mellors and Tappel, 1966)。DPPH 含

有エタノール溶液 1.5 ml に、エタノールに溶解したミノサイクリンおよび Trolox 0.25 ml を添加した。添加 30 分後に 517 nm における DPPH の吸光度の減少を測定した。

2.3.7. マウス脳ホモジネートによる脂質過酸化評価

実験には ddY 系雄性マウス体重 20-25 g を使用した。既報に従い、マウス脳ホモジネートの上清を調製した (Hara and Kogure, 1990)。摘出したマウス脳を氷冷下、4 倍量の 50 mM PBS (pH 7.4) を加え、テフロンホモジナイザーでホモジナイズし、-80°C で冷凍保存した。脳ホモジネートは PBS を加えて 10 倍希釈し、希釈したホモジネート 2 ml に 10 μ l の被検薬を加え、37°C、30 分間インキュベートした。35% HClO₄ 400 μ l を添加し反応を停止させ、2,800 rpm、10 分間遠心した。上清 1 ml に 5 g/l thiobarbituric acid (TBA) 溶液 (50% 酢酸溶液) 0.5 ml を添加し、100°C、15 分間反応させ 532 nm における吸光度を測定した。

2.4. 統計学的解析

実験成績は平均値 \pm 標準誤差で示した。統計学的な比較は、STAT VIEW version 5.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を用いて、一元または二元配置分散分析法で分散を検定したのち、Student's *t*-test、Dunnett's test あるいは Mann-Whitney *U*-test により行った。危険率が 5% 未満を有意差有りとした。

第3節 実験成績

3.1. マウス pMCAO 誘発梗塞巣および脳浮腫に対するミノサイクリンの神経保護作用

ミノサイクリン 90 mg/kg を腹腔内投与したマウスは、虚血による神経症状以外の行動学的変化は観察されなかった。また、pMCAO 24 時間後において皮質および線条体に梗塞巣が認められた (Fig. 5, left side)。ミノサイクリン pMCAO 60 分前および 30 分後投与群は、control 群と比較して pMCAO 24 時間後の梗塞面積、梗塞体積および脳浮腫を有意に抑制した (Figs. 5 and 6)。一方、ミノサイクリン pMCAO 4 時間後投与群は、脳後部における梗塞面積、梗塞体積および脳浮腫の抑制傾向が認められたが、その作用は有意でなかった (Fig. 6)。

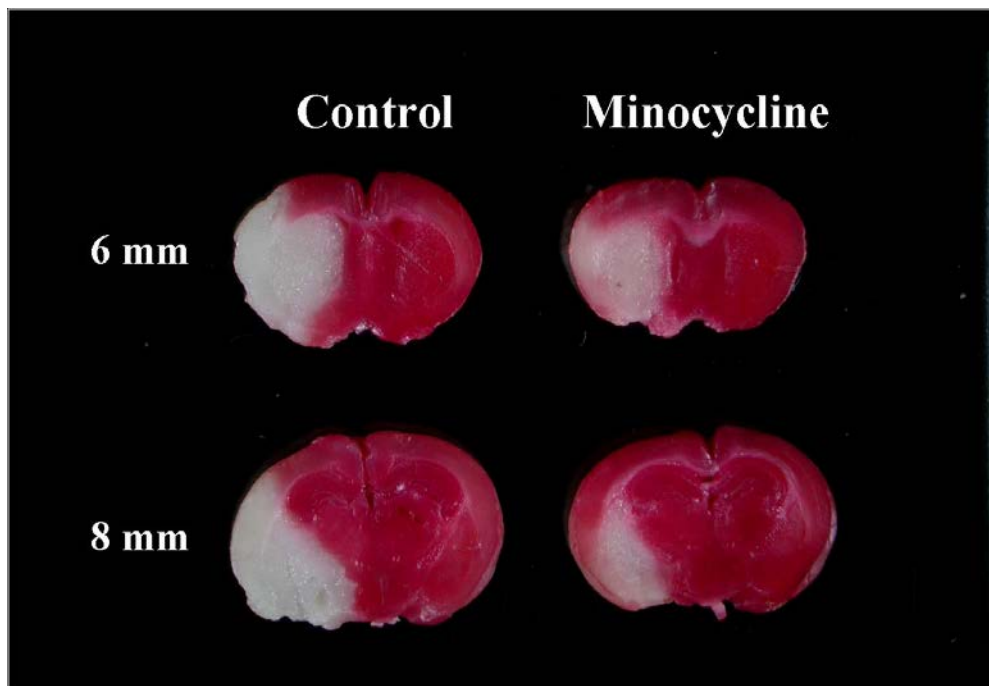


Fig. 5 TTC staining of coronal brain sections (6 and 8 mm from frontal pole) at 24 h after pMCAO in representative mice.

Damaged tissue is shown as white areas. Left and right brains are shown for a vehicle-treated mouse (control) and minocycline-treated mouse, respectively. Minocycline was administered at 30 min after the occlusion reduced infarction (compared with the control).

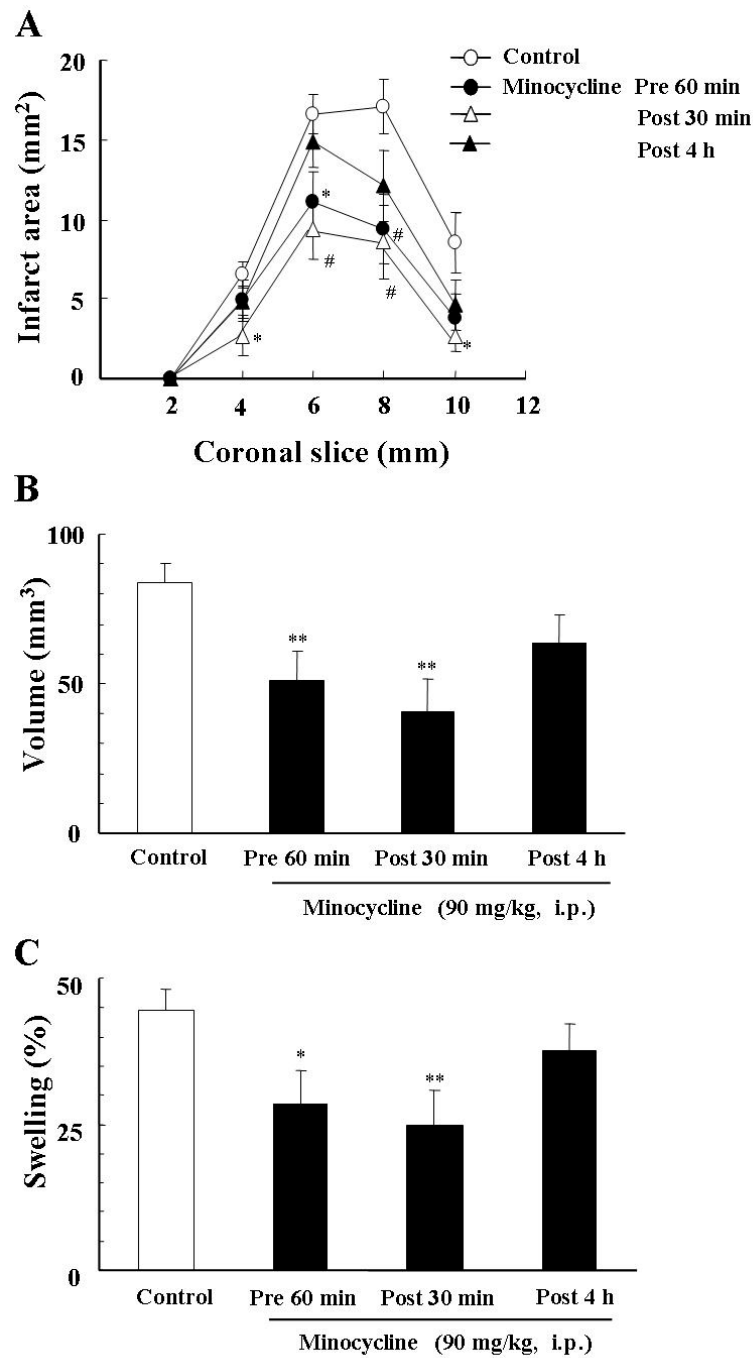


Fig. 6 Effects of minocycline on infarction at 24 h after pMCAO in mice.

(A) Brain infarct area at 24 h after pMCAO in mice. Each brain was removed and the forebrains sliced into five coronal 2-mm sections. Minocycline at 90 mg/kg, i.p. was administered 60 min before, 30 min after, or 4 h after the occlusion. Infarct areas in brain slices were stained with 2% TTC. * $p < 0.05$, # $p < 0.01$ vs. control, $n = 12-16$. (B) Effects of minocycline on infarct volume at 24 h after pMCAO in mice. ** $p < 0.01$ vs. control, $n = 12-16$. (C) Effects of minocycline on brain swelling at 24 h after pMCAO in mice. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. control, $n = 12-16$.

3.2. マウス pMCAO 誘発神経症状に対するミノサイクリンの作用

ミノサイクリン pMCAO 60 分前および 30 分後投与群は、control 群と比較して pMCAO 24 時間後の神経症状を有意に改善した。一方、ミノサイクリン pMCAO 4 時間後投与群は改善傾向が認められたが、その作用は有意でなかった (Table 1)。

Table 1 Effects of minocycline on neurologic deficits at 24 h after pMCAO in mice.

| Treatments | n | Neurologic scores | | | | Mean \pm S.E.M. |
|-------------------------------------|----|-------------------|---|----|---|-------------------|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | |
| Control | 16 | 0 | 4 | 11 | 1 | 1.8 \pm 0.14 |
| Minocycline pre-treatment (-60 min) | 15 | 2 | 8 | 5 | 0 | 1.2 \pm 0.17* |
| Minocycline post-treatment (30 min) | 12 | 3 | 4 | 5 | 0 | 1.2 \pm 0.24* |
| Minocycline post-treatment (4 h) | 12 | 0 | 5 | 7 | 0 | 1.6 \pm 0.15 |

Minocycline at 90 mg/kg, i.p. was administered 60 min before, 30 min after, or 4 h after the occlusion.

* $p < 0.05$ vs. control (vehicle-treated group). *n*; number of animals.

3.3. ラット大脳皮質初代培養細胞を用いたグルタミン酸誘発神経細胞障害に対するミノサイクリンの保護作用

ミノサイクリンはグルタミン酸誘発神経細胞死を 2 μ M で有意に抑制し、陽性対照薬である NMDA 受容体拮抗薬 MK-801 は、10 μ M で細胞死を有意に抑制した (Fig. 7)。Hoechst 33342 および YO-PRO-1 による蛍光核染色写真を Fig. 8 に示した。グルタミン酸無処置では、細胞は正常な核形態を示し YO-PRO-1 陰性であった (Fig. 8A and 8B)。一方、500 μ M グルタミン酸処置により、アポトーシス様の核形態変化および YO-PRO-1 陽性細胞が観察された (Fig. 8C and 8D)。ミノサイクリン 2 μ M 前処置により、グルタミン酸誘発による核形態異常の軽減および YO-PRO-1 陽性細胞数の減少が認められた (Fig. 8E and 8F)。

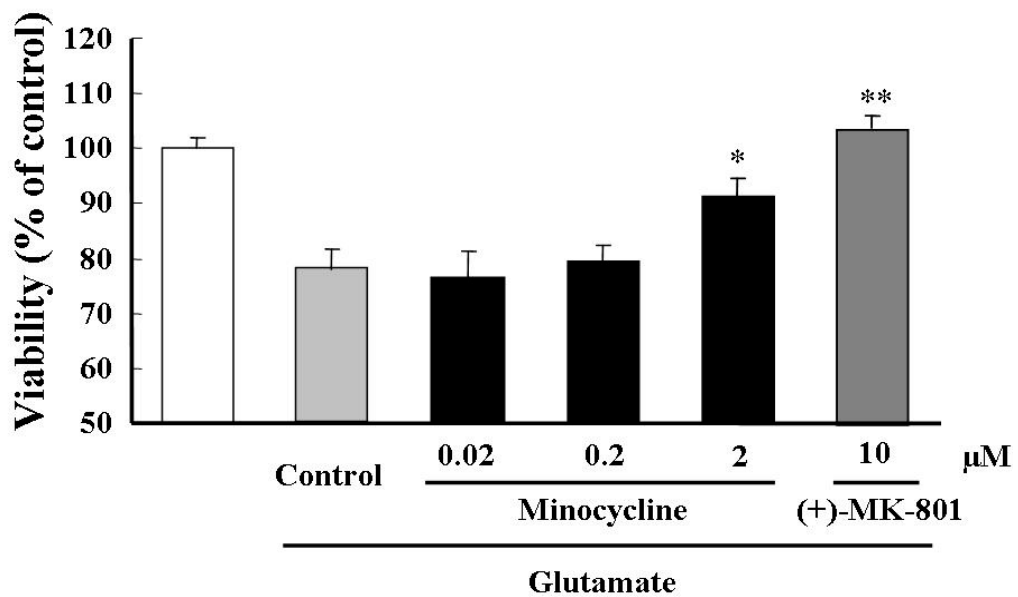
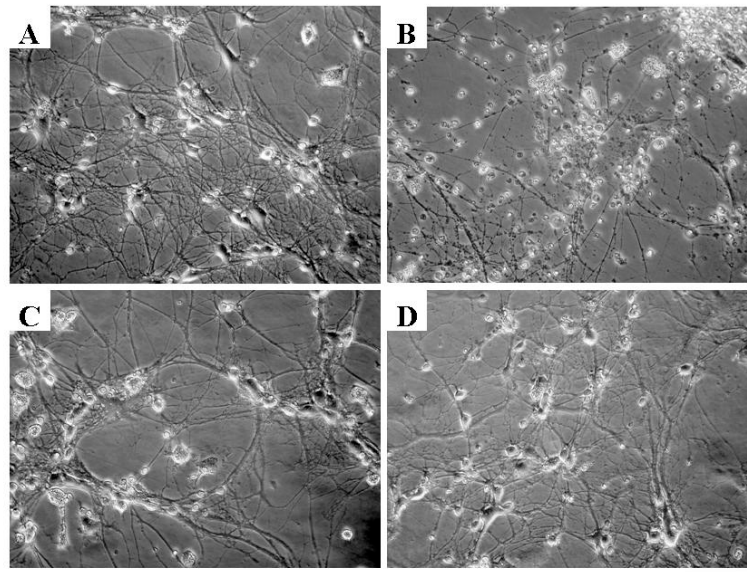


Fig. 7 Neuroprotective effects of minocycline against glutamate-induced cell death in rat primary cortical neuron culture.

Photomicrographs showing the pattern of resazurin staining of cells. (A) Untreated cells. (B) Cells treated with 500 μM glutamate for 1 day. Marked cell death was found to have occurred. (C and D) Cells were treated for 1 h with 2 μM minocycline (C) or 10 μM MK-801 (D), and for 1 day with both 500 μM glutamate and either agent (minocycline or MK-801). Minocycline and MK-801 reduced the number of stained cells, indicating that it inhibited cell death. Scale bar indicates 50 μm . Bar graph shows the protective effects of minocycline and MK-801 against glutamate-induced cell death. Each column represents the mean \pm S.E.M. $n = 6$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. control (untreated group).

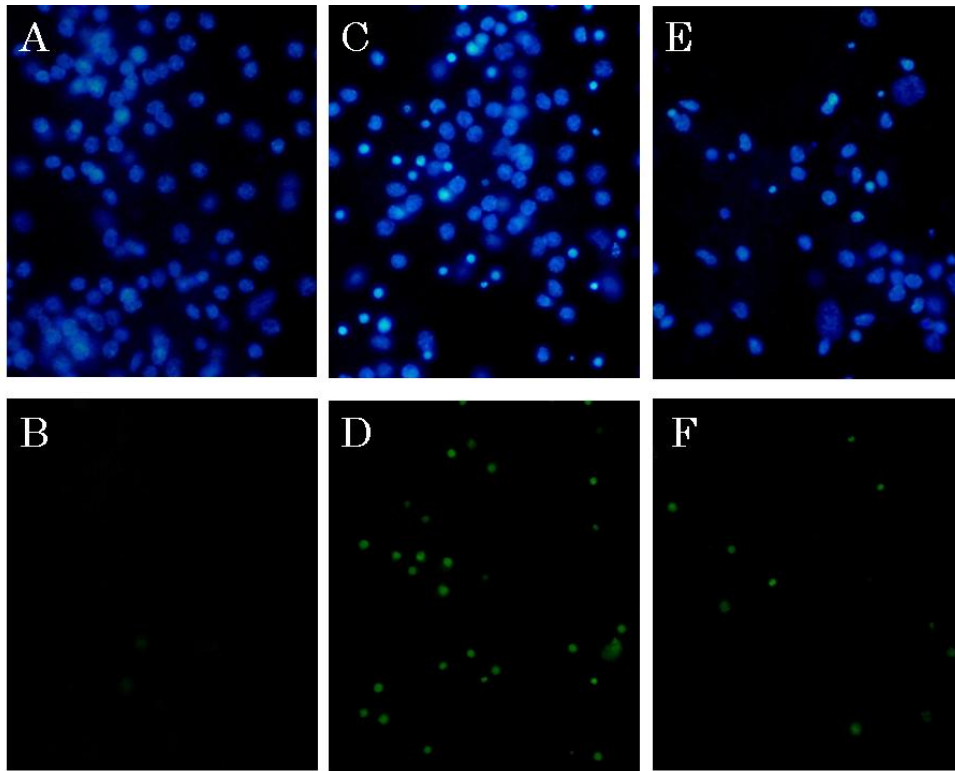


Fig. 8 Representative fluorescence microscopy of Hoechst 33342 (blue) and YO-PRO-1 (green) staining at 24 h after glutamate application.

Cells were grouped as shown below. (A) Non-treated cells showed normal nuclear morphology and (B) were negatively stained for YO-PRO-1. (C) Glutamate (500 μ M)-induced neurotoxicity, where cells showed condensation and fragmentation of their nuclei, including YO-PRO-1 positive stained cells (D). Pretreated with 2 μ M minocycline 1 h before 500 μ M glutamate treatment reduced both nuclear condensation (E) and YO-PRO-1-positive staining (F).

3.4. DPPH ラジカル消去活性およびマウス脳ホモジネートを用いた脂質過酸化反応に対するミノサイクリンの作用

安定なフリーラジカルである DPPH を用いて、ミノサイクリンおよび陽性対照薬である Trolox (水溶性ビタミン E 誘導体) のラジカル消去活性を評価した。ミノサイクリンおよび Trolox は、濃度依存的にラジカル消去活性を示し、それぞれ 2 および 0.2 μM 以上で有意であった (Table 2)。

脂質過酸化反応は、37°C、30 分間インキュベートにより生じた脳ホモジネート中 malondialdehyde (MDA) 量を評価した。ミノサイクリンおよび陽性対照薬である Trolox は、脂質過酸化反応を濃度依存的に抑制し、それぞれ 0.2 μM 以上で有意であった (Table 2)。

Table 2 Effects of minocycline and Trolox on DPPH-induced free radical production and lipid peroxidation in mouse forebrain homogenate.

| Treatments (μM) | <i>n</i> | DPPH free radical | Lipid peroxidation | |
|---|----------|----------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | | Absorbance (% of the control) | TBARS (% of the control) | |
| Control | 8 | 100 \pm 0.4 | 100 \pm 0.5 | |
| Minocycline | 0.02 | 4 | 97.9 \pm 1.3 | 99.0 \pm 0.5 |
| | 0.2 | 5 | 97.4 \pm 0.9 | 97.5 \pm 0.3 [#] |
| | 2 | 5 | 90.7 \pm 2.9* | 95.2 \pm 0.3 [#] |
| | 20 | 5 | 56.4 \pm 2.5 [#] | 54.9 \pm 0.8 [#] |
| | 200 | 5 | 20.4 \pm 3.9 [#] | 6.1 \pm 0.2 [#] |
| IC ₅₀ μM (95% CL) | | | 31.7 (19.2-58.1) | 18.1 (12.6-27.1) |
| Trolox | 0.02 | 4 | 92.9 \pm 3.6 | 98.3 \pm 0.3 |
| | 0.2 | 4 | 88.2 \pm 3.8* | 94.9 \pm 0.3 [#] |
| | 2 | 4 | 59.1 \pm 3.6 [#] | 90.5 \pm 0.7 [#] |
| | 20 | 4 | 5.1 \pm 1.1 [#] | 61.3 \pm 1.4 [#] |
| | 200 | 4 | 3.3 \pm 0.6 [#] | 7.0 \pm 0.7 [#] |
| IC ₅₀ μM (95% CL) | | | 2.2 (1.2-3.7) | 16.8 (10.4-28.8) |

DPPH; diphenyl-*p*-picrylhydrazyl, TBARS; thiobarbituric acid reactive substance, CL; confidence limit.

**p* < 0.05, [#]*p* < 0.01 vs. control (vehicle-treated group).

第4節 考察

本章では、マウス pMCAO モデル誘発脳虚血障害およびラット初代培養細胞を用いたグルタミン酸誘発神経細胞障害に対するミノサイクリンの作用を検討した。さらに、マウス脳ホモジネートを用いた脂質過酸化反応および DPPH ラジカル消去活性に対するミノサイクリンの作用を検討した。

ミノサイクリン pMCAO 60 分前および 30 分後投与は、マウス pMCAO 24 時間後の梗塞巣、脳浮腫を抑制し、神経症状を改善した。一方、ミノサイクリン pMCAO 4 時間後投与は、抑制傾向および改善傾向を示したが有意ではなかった (Figs. 5 and 6, Table 1)。ミノサイクリンはラット tMCAO による皮質周辺領域での梗塞巣を抑制し (Yrjanheikki et al., 1999)、砂ネズミ一過性前脳虚血誘発 CA1 野錐体細胞障害を抑制する (Yrjanheikki et al., 1998)。このことから、ミノサイクリンは一過性局所脳虚血誘発神経細胞障害と同様に、永久局所脳虚血誘発神経細胞障害も抑制することが明らかになった。ミノサイクリンは神経症状を改善し、その程度は梗塞巣および脳浮腫の抑制と同程度であった。このことから、脳障害が抑制されたことで神経症状が改善されたと考えられる。これらの結果は、過去の研究において caspase-3 阻害薬である z-DEVD.FMK がマウス tMCAO による梗塞巣、脳浮腫の抑制と同程度に神経症状を改善する結果と一致していた (Hara et al., 1997)。

ミノサイクリンはラット大脳皮質初代培養細胞を用いたグルタミン酸誘発神経細胞死を 2 μM の濃度で有意に抑制した (Figs. 7 and 8)。ミノサイクリンは神経細胞、アストロサイトおよびミクログリアを含むラット混合培養脊髄細胞を用いたグルタミン酸誘発細胞死およびグルタミン酸またはカイニン酸などの興奮毒性によるミクログリアの増殖を 0.02 μM の濃度で抑制した (Tikka et al., 2001)。このことから、ミクログリアの増殖および活性化を抑制することで、ミノサイクリンはグルタミン酸誘発神経細胞障害に対して保護的に作用した可能性が考えられる。Tikka らの報告では、ミノサイクリンは本検討で使用した大脳皮質神経細胞の 100 分の 1 の濃度で、混合培養

脊髄細胞における神経細胞死を抑制した (Tikka et al., 2001)。作用が認められた濃度の相違は、大脳皮質神経細胞と脊髄細胞の違いによるものと考えられる。これらの結果から、ミノサイクリンの主作用はミクログリアの活性化抑制である可能性が示唆され、その結果、大脳皮質神経細胞を用いたグルタミン酸誘発神経細胞障害に対して保護作用を示したと考えられる。

ミノサイクリンは抗酸化作用を有しており (Miyachi et al., 1986)、peroxynitrite 消去によりタンパク質のチロシンニトロ化を抑制する (Whiteman and Halliwell, 1997)。また、ラット小脳顆粒神経細胞を用いた 6-hydroxydopamine 誘発神経細胞障害およびフリーラジカル産生を抑制する (Lin et al., 2003)。このことから、著者らは DPPH ラジカル消去活性およびマウス脳ホモジネートを用いた脂質過酸化反応などの酸化ストレスに対するミノサイクリンの作用を検討した。ミノサイクリンおよび Trolox は、濃度依存的にラジカル消去活性および脂質過酸化反応を抑制した (Table 2)。抗生物質の中には、炎症部位において酸化ストレス除去により保護的に作用することが示唆されている (Wasil et al., 1987; Cantin and Woods, 1993; Whiteman and Halliwell, 1997)。臨床および非臨床試験結果では、虚血性神経細胞障害メカニズムの一環として、虚血および再灌流中に生じるフリーラジカル産生や脂質過酸化反応の関与が示唆されている (Flamm et al., 1978; Siesjo, 1981; Chan et al., 1984; Hara et al., 1993)。本検討において、ミノサイクリンはグリア細胞における抗炎症作用だけでなく、抗酸化作用も示すことで神経細胞に保護的に作用したと考えられる。

ミノサイクリンは臨床上忍容性の高い薬物であり、関節リウマチの臨床試験に対して有効性、安全性が認められている (Langevitz et al., 2000)。近年、ミノサイクリンは脳卒中 (Yrjanheikki et al., 1998, 1999)、ハンチントン病 (Wang et al., 2003)、パーキンソン病 (Du et al., 2001) および脊髄損傷 (Teng et al., 2004) などの細胞死が関与する神経障害モデルに対して保護作用を示すことが報告されている。脳梗塞発症後 6-24 時間の患者 151 名を対象とした臨床試験において、74 名のミノサイクリン 200 mg、5

日間投与患者群は、77名のプラセボ投与患者群と比較して脳梗塞発症90日後の症状を有意に改善した (Lampl et al., 2007)。今後さらなる臨床試験が行われ、ミノサイクリンが脳卒中治療薬として認可されることを期待したい。

本検討での *in vitro* および *in vivo* 試験において、ミノサイクリンは 0.2-2 μM (約 0.1-1 $\mu\text{g/ml}$) において作用が認められた。ミノサイクリンは、高齢者においても迅速かつ完全に吸収され (Barza et al., 1975; Kramer et al., 1978; Cunha et al., 1982; Sande et al., 1982)、脳への組織移行性は良好である (Aronson, 1980; Klein and Cunha, 1995)。イヌへのミノサイクリン 5 mg/kg 静脈内投与では、ミノサイクリンは脳内に 2.8 $\mu\text{g/g}$ 、脳脊髄液に 0.98 $\mu\text{g/ml}$ (2.0 μM) 移行する (Barza et al., 1975)。ラットを用いた薬物動態試験では、ミノサイクリンは用量および投与経路にかかわらず、血漿中濃度の 30-40% が脳内に移行する (Colovic and Caccia, 2003)。ミノサイクリン 25-50 mg/kg 腹腔内投与を行ったマウスの血清中濃度は 5-10 $\mu\text{g/ml}$ (10-20 μM) であり、ヒトにミノサイクリン 200 mg を投与した血中濃度と同様であった (Wells et al., 2003)。このことから、ミノサイクリンの投与は多くの動物種において神経細胞保護効果を発揮するのに十分な濃度が脳に移行すると考えられる。

以上の結果から、ミノサイクリンはマウス pMCAO モデル誘発脳虚血障害および培養神経細胞を用いた神経細胞障害に対して保護作用を示した。これらの神経細胞保護作用メカニズムの一部に、酸化ストレス抑制作用の関与が示唆された。

第2章 虚血性神経細胞障害に対する SUN N8075 の神経保護作用

第1節 緒言

第1章において、ミノサイクリンは *in vivo* および *in vitro* 試験による神経細胞障害モデルに対して保護作用を示し、その作用の一部に酸化ストレス抑制作用の関与が示唆された。酸化ストレスは脂質過酸化や DNA 障害を誘発する活性酸素種によって引き起こされ、虚血後脳障害の悪化を誘発する多くの要因の中で中心的な役割を果たすと考えられている (Chan, 1996)。虚血は活性酸素と抗酸化作用の不均衡を引き起こし、フリーラジカルの過剰産生は炎症、アポトーシス、膜脂質過酸化および DNA の酸化を通して酸化ストレス障害を誘発する (Chan, 2001)。したがって、神経細胞保護の観点からも酸化ストレス障害を抑制することは重要であると考えられる。実際に、フリーラジカル消去薬であるエダラボン (ラジカット®) は、日本で 2001 年から急性脳梗塞に対する脳保護薬として認可されている。

(2S)-1-(4-Amino-2,3,5-trimethylphenoxy)-3-{4-[4-(4-fluorobenzyl)phenyl]-1-piperazinyl}-2-propanol dimethanesulfonate (SUN N8075) (Fig. 9) は、Na⁺ および T 型 Ca²⁺ チャネル阻害作用および抗酸化作用を有する化合物であり、ラット一過性脳虚血障害を抑制し (Annoura et al., 2000)、脳卒中に対する臨床試験が行われている。SUN N8075 は虚血性神経細胞死における複数の因子に作用することで脳保護効果の増強が期待できる。

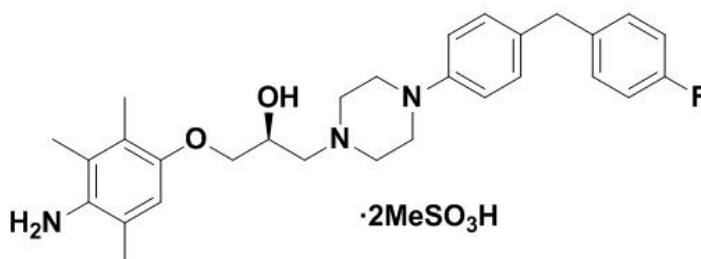


Fig. 9 Chemical structure of SUN N8075.

多くの脳梗塞治療薬が動物実験では有効性が認められたのに対し、臨床試験において有効性が見出されなかったことから、脳梗塞治療薬の開発にあたっては、1) 複数の動物種を用いた異なる脳梗塞モデル (永久局所脳虚血モデルおよび一過性局所脳虚血モデル)での評価、2) 用量反応性の検討、3) **therapeutic time window** の設定、4) 脳梗塞サイズ以外での神経機能評価、5) 実験のブラインド化、6) 異なる研究室での効果確認、7) 大型動物 (霊長類)での効果確認などの項目を実施することが提案されている (STAIR, 1999)。これまでマウス永久局所脳虚血モデルを用いて SUN N8075 の作用を検討した報告はない。そこで、本章ではマウス永久局所脳虚血による梗塞巣、脳浮腫および神経症状に対する SUN N8075 の神経保護作用を検討した。さらに、虚血によって生じる酸化ストレスに着目し、1) マウス脳ホモジネートを用いた脂質過酸化反応、2) ラット大脳皮質初代培養細胞を用いた低酸素および鉄イオン誘発神経細胞障害および 3) 脂質過酸化の免疫組織学的評価を行い、脳虚血障害に対する SUN N8075 の保護作用の作用メカニズムを検討した。

第2節 実験材料および方法

2.1. 実験動物

5週齢雄性 ddY マウスおよび妊娠 Wistar ラットは Japan SLC (Shizuoka, Japan) より購入した。購入した動物は自由給水下に固形飼料 (CE-2, CLEA Japan, Tokyo, Japan) を用いて飼育した。すべての動物実験は U.S. National Institutes of Health が発行した動物実験に関する指針に従い、岐阜薬科大学動物実験委員会に動物実験承認申請を行い、許可を受けた上で実施した。

2.2. 実験材料

SUN N8075 および Lubeluzole は Asubio Pharma Co. Ltd. (Osaka, Japan) より寄与されたものを使用した。Ebselen、Riluzole、Trolox、AC-Asp-Glu-Val-Asp-H (Ac-DEVD-CHO)、Hoechst 33258、2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC)、sodium pentobarbital、isoflurane、笑気ガスおよび酸素ガスは Cayman Chemical Co. (Ann Arbor, MI, USA)、Tocris Cookson Ltd. (Bristol, UK)、Tokyo Kasei Kogyo Co., Ltd. (Tokyo, Japan)、Peptide Institute Inc. (Osaka, Japan)、Invitrogen Molecular Probes (Eugene, OR, USA)、Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)、Nissan Kagaku (Tokyo, Japan)、Merck Hoei Ltd. (Osaka, Japan)、Showa Denko K.K. (Tokyo, Japan) および Taiyo Nippon Sanso Corp. (Tokyo, Japan) よりそれぞれ購入した。

2.3. 実験方法

2.3.1. マウス中大脳動脈永久閉塞 (pMCAO) モデルの作製

実験には ddY 系雄性マウスを使用した。小動物用麻酔器 (Soft Lander, Sin-ei Industry Co. Ltd., Saitama, Japan) を用い、笑気ガス 70%、酸素ガス 30% 下において、麻酔導入時には isoflurane 2.0-3.0 % を、麻酔維持時には isoflurane 1.0-1.5% を使用した。体温は手術中および手術後正向反射が回復するまで保温ランプで維持した。局所脳血流量 (rCBF) は、ブレグマから 2 mm 後方および 6 mm 外側頭蓋部にプローブを固定し、レ

ーザードップラー血流計 (Omegaflow flo-N1, Omegawave Inc., Tokyo, Japan)を用いて測定した。左脳側中大脳動脈の閉塞は、フィラメント栓子を挿入することにより行った (Hara et al., 1996, 1997)。すなわち、実体顕微鏡下、左脳側中大脳動脈を頸動脈から silicone resin 混合物 (Xantopren + Activator Liquid)で先端を覆った 8-0 ナイロンモノフィラメント (Ethicon, Somerville, NJ, USA)を挿入し閉塞した。

SUN N8075 は生理食塩水に溶解し、用時調製したものをを用いた。pMCAO 10 分前、1 時間後または 3 時間後に SUN N8075 3 mg/kg (0.1 ml/10 g)を 90 秒間かけて静脈内投与し、その後 10 mg/kg を皮下投与した。Vehicle 群には生理食塩水を投与した。

2.3.2. 生理学的モニタリング

血圧および心拍数は、pMCAO 20 分前および 30 分後に Power Laboratory/8SP (AD Instrument, Osaka, Japan)を用いて、左側大腿動脈にポリエチレンカテーテルを挿入し測定した。pMCAO 前および 30 分後に血液 50 μ l を採取し、血液ガス分析装置 (i-STAT 300 F, Abbot Co., Abbot Park, IL, USA)を用い、 pO_2 、 pCO_2 および pH を測定した。

2.3.3. 梗塞巣および脳浮腫評価

pMCAO 24 または 72 時間後に pentobarbital 麻酔下で安楽死後、mouse brain matrix (RBM-2000C, Activational Systems, Warren, MI, USA)を用いて、前脳を 2 mm の厚さで 5 切片作製した。脳切片を 2% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC)で 10-15 分間染色した。梗塞部位はデジタルカメラ (Nikon Cool PIX4500, Nikon Co., Tokyo, Japan)を用いて記録し、Image J を用いて梗塞面積を測定し、梗塞体積を計算した (Hara et al., 1996, 1997)。脳浮腫は次の公式 (infarct volume + ipsilateral undamaged volume – contralateral volume) \times 100/contralateral volume (%)によって算出した (Hara et al., 1997)。

2.3.4. 神経症状観察

pMCAO 24、48 または 72 時間後のマウスの神経症状を以下の基準に従って観察・記録した (Hara et al., 1996)。0. 目立った神経症状なし (正常)、1. 右前肢の伸展が出来ない (軽症)、2. 右前肢の片麻痺が認められ、その場を回転する (中程度)、3. 歩行困難または立ち直り反射の消失 (重症)。

2.3.5. 組織切片作製

マウスを pMCAO 24 時間後に pentobarbital 麻酔し、heparin 処理生理食塩水に続き 4% paraformaldehyde 含有 PBS を左心室内に注入して灌流固定した。その後、脳を摘出し、4% paraformaldehyde 含有 PBS にて一晩浸透した。常法に従い段階的に ethanol に浸し脱水し、xylene で透徹後、パラフィン包埋を行った。組織は microtome (RM2255, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) を用いて、厚さ 10 μm の脳切片を作製した。脳切片は、マウス脳アトラス (Paxinos and Franklin, 2001) を参照に、前脳先端からブレグマまでの 0.4-1.0 mm の範囲で前交連を通るように作製した。

2.3.6. Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling (TUNEL) 染色

TUNEL 染色は、*In situ* Cell Death Detection Kit (Roche Molecular Biochemicals Inc., Mannheim, Germany) のプロトコルに従い行った。脳切片は脱パラフィン、再親水化操作を行い、20 $\mu\text{g/ml}$ の proteinase K 溶液に 30 分間反応させた。3% H_2O_2 含有 methanol で 30 分間浸透後、terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) をラベル化した反応調製液で加湿条件下、37°C、90 分間反応させた。洗浄後、コンバーター-POD を加湿条件下、37°C、30 分間反応後、3,3'-diaminobenzidine 溶液を用いて染色した。

2.3.7. 4-Hydroxynonenal adducts (4-HNE)染色

脳切片を脱パラフィン後、10 μ M クエン酸緩衝液 (pH 6.0)を用いてマイクロウェーブによる賦活化処理を10分間行い、60分間静置し室温に戻した。PBSで3回洗浄し、3% H_2O_2 含有 methanol で30分間反応させた後、PBSに置換し1% mouse serum で30分間ブロッキングした。一次抗体は、抗4-HNEモノクローナル抗体 (25 μ g/ml, JaICA, Shizuoka, Japan)を用いて4°Cで一晩反応させた。二次抗体は、M.O.M. biotinylated anti-mouse IgGを室温、10分間反応させた。その後、avidin/biotinylated horseradish peroxidase complex (ABC Elite kit, Vector Laboratories, Peterborough, UK)で30分間反応後、3,3'-diaminobenzidine + nickel 溶液を用いて4分間染色した。

2.3.8. 組織評価

TUNEL陽性細胞数を計測することにより、虚血によるDNA断片化細胞数を評価した。TUNEL陽性細胞数は、線条体における虚血中心領域(コア領域)、皮質におけるコア領域および虚血周辺領域(ペナンプラ領域)(上方および下方の2領域の平均)をそれぞれ200倍の高倍率視野で計測した。また、TUNEL陽性細胞数測定と同様の方法で、4-HNE陽性細胞数を計測することにより酸化ストレス障害を評価した。

2.3.9. マウス脳ホモジネート脂質過酸化評価

実験には ddY 系雄性マウスを使用した。既報に従い、マウス脳ホモジネートの上清を調製した (Hara and Kogure, 1990)。摘出したマウス脳を氷冷下、4倍量の50 mM PBS (pH 7.4)を加え、テフロンホモジナイザーでホモジナイズし、-80°Cで冷凍保存した。脳ホモジネートはPBSを加えて10倍希釈し、希釈したホモジネート2 mlに10 μ lの被検薬を加え、37°C、30分間インキュベートした。35% $HClO_4$ 400 μ lを添加し反応を停止させ、2,800 rpm、10分間遠心した。上清1 mlに5 g/l thiobarbituric acid (TBA) 溶液 (50%酢酸溶液)0.5 mlを添加し、100°C、15分間反応させ532 nmにおける吸光度

を測定した。

2.3.10. ラット大脳皮質初代培養

初代培養は既報に従い、妊娠 18 日目 Wistar ラットの胎児大脳皮質から調製した (Hisanaga et al., 1988)。単離した大脳皮質を 0.6 unit/ml papain 溶液で 37°C、20 分間処理した。分離した細胞を 1.5×10^5 cells/well の密度で 0.1 g/l polyethyleneimine 処理したプレートに播種した。培養細胞は 10% fetal bovine serum、2 mM glutamine、50 IU/ml penicillin G および 50 µg/ml streptomycin を含んだ DMEM 培地に、37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。

2.3.11. 低酸素誘発細胞障害モデルにおける細胞生存率および caspase-3 活性評価

播種 2 日後の大脳皮質初代培養細胞に被検薬または vehicle を含む無血清の DMEM 培地に置換し、既報に従い 18 時間低酸素状態に曝した (Tamatani et al., 1988)。低酸素曝露後の細胞生存率は、アポトーシス細胞数および細胞からの lactate dehydrogenase (LDH) 漏出を測定することにより評価した。アポトーシス細胞は、10 µM Hoechst 33258 により 15 分間核染色を行い、蛍光顕微鏡 (Olympus BX50, Olympus, Tokyo, Japan) を用いて計測した。LDH 漏出は CytoTox96[®] kit (Non-radioactive Cytotoxicity Assay Kit, Promega K.K., Tokyo, Japan) を用いて測定した。Caspase-3 活性は下記の方法で測定した。細胞を 50 µM Tris-HCl (pH 7.4)、1 µM EDTA および 10 µM EGTA を含む培地に置換し、10 µM digitonin で 37°C、10 分間培養した。細胞溶解液を 15,000 rpm、3 分間遠心後、上清を Microcon YM-30 (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) を用いて約 50 倍に濃縮した。CaspACETM[®] assay system (Promega K.K.) を用いて、濃縮画分の caspase-3 活性を評価した。蛍光基質である Ac-DEVD-AMC が caspase-3 により切断されることで生じる 7-amino-4-methylcoumarin (AMC) 量を蛍光分光光度計 (Fluoroscan Ascent FL, Dainippon Pharmaceutical Co., Osaka, Japan) を用いて評価した (励起波長 375 nm、蛍光

波長 460 nm)。

2.3.11. 鉄イオン誘発神経細胞障害モデルにおける細胞生存率評価

播種 5 日後の脳皮質初代培養細胞に cytosine- β -arabinofuranoside 10 μ M を添加し、グリアの増殖を阻害した。播種後 8-10 日に既報に従い Fe^{2+} を添加した (Chow et al., 1994)。すなわち、被検薬または vehicle を含む DMEM 培地に置換し 1 時間培養後、ferrous sulfate (FeSO_4) (終濃度 150 μ M) を添加し、18 時間培養した。細胞生存率は細胞からの LDH 漏出により評価した。

2.4. 統計学的解析

実験成績は平均値 \pm 標準誤差で示した。統計学的な比較は、STAT VIEW version 5.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を用いて、一元または二元配置分散分析法で分散を検定したのち、Student's *t*-test、Dunnett's test あるいは Mann-Whitney *U*-test により行った。危険率が 5 % 未満を有意差有りとした。

第3節 実験成績

3.1. マウス pMCAO 誘発前後における生理的パラメーター評価

Vehicle および SUN N8075 投与群において、脳血流量 (rCBF)、平均動脈圧 (MABP)、心拍数 (HR)、動脈血 pH、動脈血酸素分圧 (pO₂) および動脈血二酸化炭素分圧 (pCO₂) に明らかな変化は認められなかった (Table 3)。全てのマウスにおいて、pMCAO 後に脳血流量の低下 (基線の 18-25%) が認められた。

Table 3 Physical parameters before and after drug administration.

| Parameters | Vehicle | | SUN N8075 | |
|-------------------------|-----------------|----------------|-----------------|----------------|
| | Before ischemia | After ischemia | Before ischemia | After ischemia |
| rCBF (ml/min/100 g) | 67.9 ± 3.7 | 14.0 ± 0.9 | 71.8 ± 2.0 | 14.8 ± 1.7 |
| (%) | 100 | 20.8 ± 1.6 | 100 | 20.7 ± 2.6 |
| MABP (mmHg) | 79.2 ± 3.0 | 85.6 ± 4.4 | 80.7 ± 2.7 | 86.6 ± 3.3 |
| HR (beats/min) | 545.7 ± 20.0 | 543.7 ± 41.2 | 545.1 ± 22.6 | 478.9 ± 30.0 |
| pH | 7.41 ± 0.03 | 7.36 ± 0.04 | 7.40 ± 0.02 | 7.36 ± 0.01 |
| pCO ₂ (mmHg) | 29.8 ± 1.7 | 29.6 ± 3.2 | 30.3 ± 2.6 | 30.6 ± 2.6 |
| pO ₂ (mmHg) | 146.6 ± 9.6 | 135.2 ± 10.8 | 133.0 ± 11.5 | 127.0 ± 7.0 |

Values are mean ± S.E.M. *n* = 5. rCBF was monitored by a laser-Doppler flowmetry with the use of a flexible probe affixed to the skull (2 mm posterior and 6 mm lateral to the bregma). MABP and HR were measured at 20 min before and 30 min after MCA occlusion. Blood samples were taken prior to and at 30 min after the onset of ischemia for pharmacokinetic analysis. pH, pCO₂, and pO₂ were measured. There was no significant difference in vehicle- and SUN N8075-administered mice.

3.2. マウス pMCAO 誘発梗塞巣、脳浮腫および神経症状に対する SUN N8075 の神経保護作用

pMCAO 24 時間後において、皮質および線条体に梗塞巣が認められた (Fig. 10)。SUN N8075 (3 mg/kg 静脈内投与 + 10 mg/kg 皮下投与) pMCAO 10 分前および 1 時間後投与群は、vehicle 群と比較して pMCAO 24 時間後の梗塞面積、梗塞体積および脳浮腫を有意に抑制し、神経症状を有意に改善した (Fig. 11A, 11B, 11C, and 11D)。一方、SUN N8075 pMCAO 3 時間後投与群は、脳浮腫を有意に抑制したが、梗塞面積、梗塞体積および神経症状に明らかな違いは認められなかった。SUN N8075 pMCAO 10 分前投与群は、vehicle 群と比較して pMCAO 24 時間後の皮質および皮質下部における梗塞面積、梗塞体積を有意に抑制した (Fig. 11E and 11F)。また、SUN N8075 pMCAO 10 分前投与群は、vehicle 群と比較して pMCAO 72 時間後の梗塞面積、梗塞体積および脳浮腫を有意に抑制し、pMCAO 48 および 72 時間後の神経症状を有意に改善した (Fig. 12)。

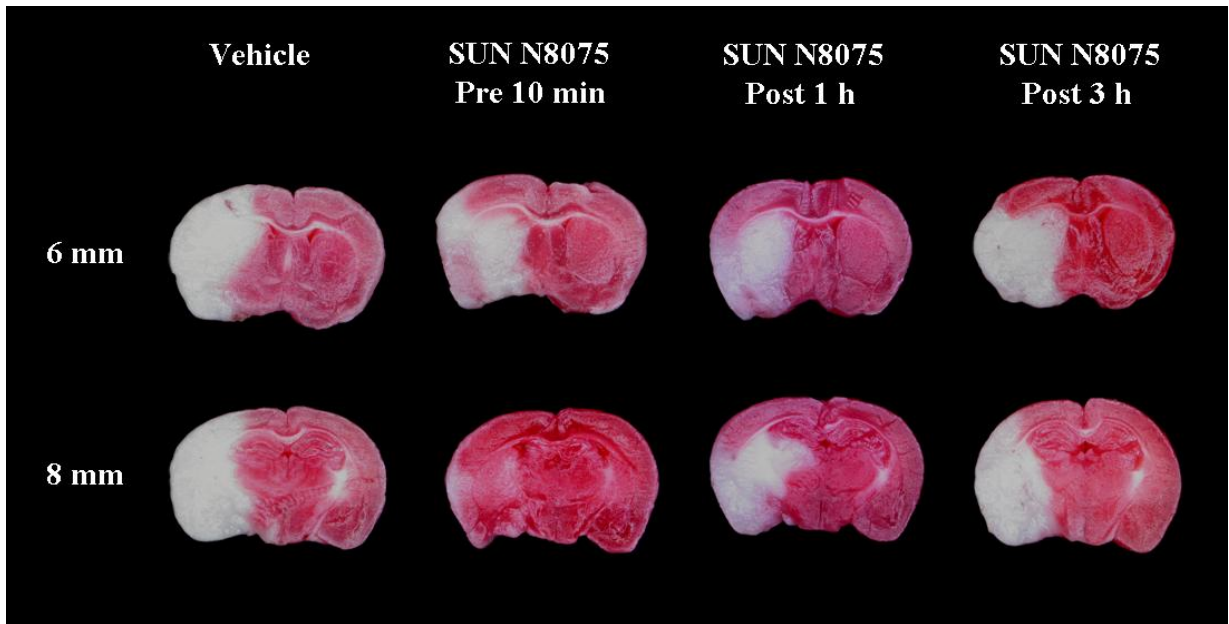


Fig. 10 TTC staining of coronal brain sections (6 and 8 mm from frontal pole) at 24 h after pMCAO in representative mice.

After TTC staining, damaged tissue appears white, whereas viable tissue appears red.

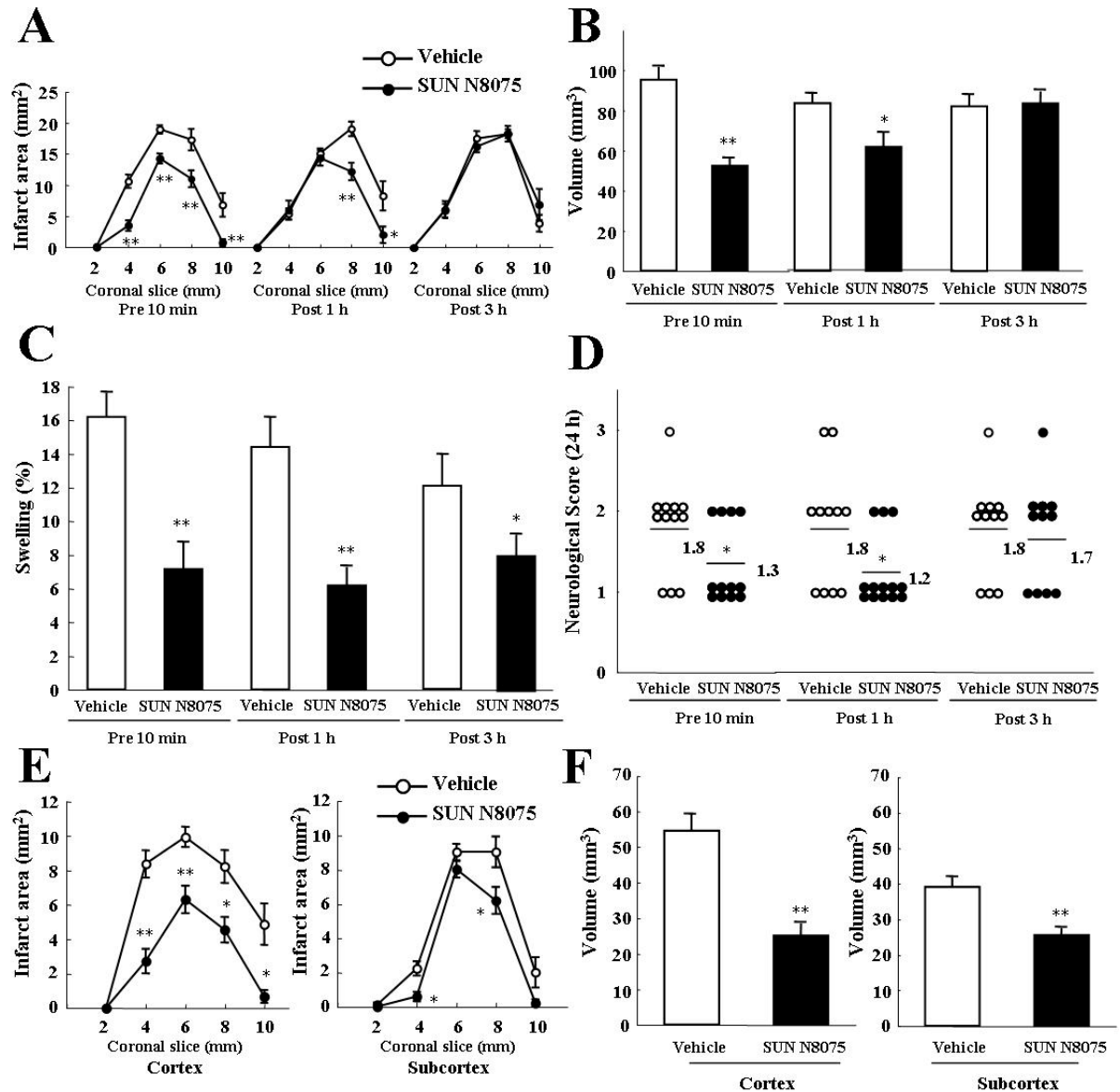


Fig. 11 Effects of SUN N8075 on infarction at 24 h after pMCAO in mice.

(A) Brain infarct area measured at 24 h after pMCAO. Brains were removed and the forebrains sliced into five coronal 2-mm sections. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. vehicle; $n = 11-13$. (B) Effects of SUN N8075 on infarct volume (measured at 24 h after pMCAO). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. vehicle; $n = 11-13$. (C) Effects of SUN N8075 on brain swelling (measured at 24 h after pMCAO). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. vehicle; $n = 11-13$. (D) Effects of SUN N8075 on neurological deficits (assessed at 24 h after pMCAO). * $P < 0.05$ vs. vehicle; $n = 11-13$. (E) Brain infarct areas in cortex and subcortex at 24 h after pMCAO. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. vehicle; $n = 11-13$. (F) Brain infarct volume in cortex and subcortex at 24 h after pMCAO. ** $P < 0.01$ vs. vehicle; $n = 11-13$.

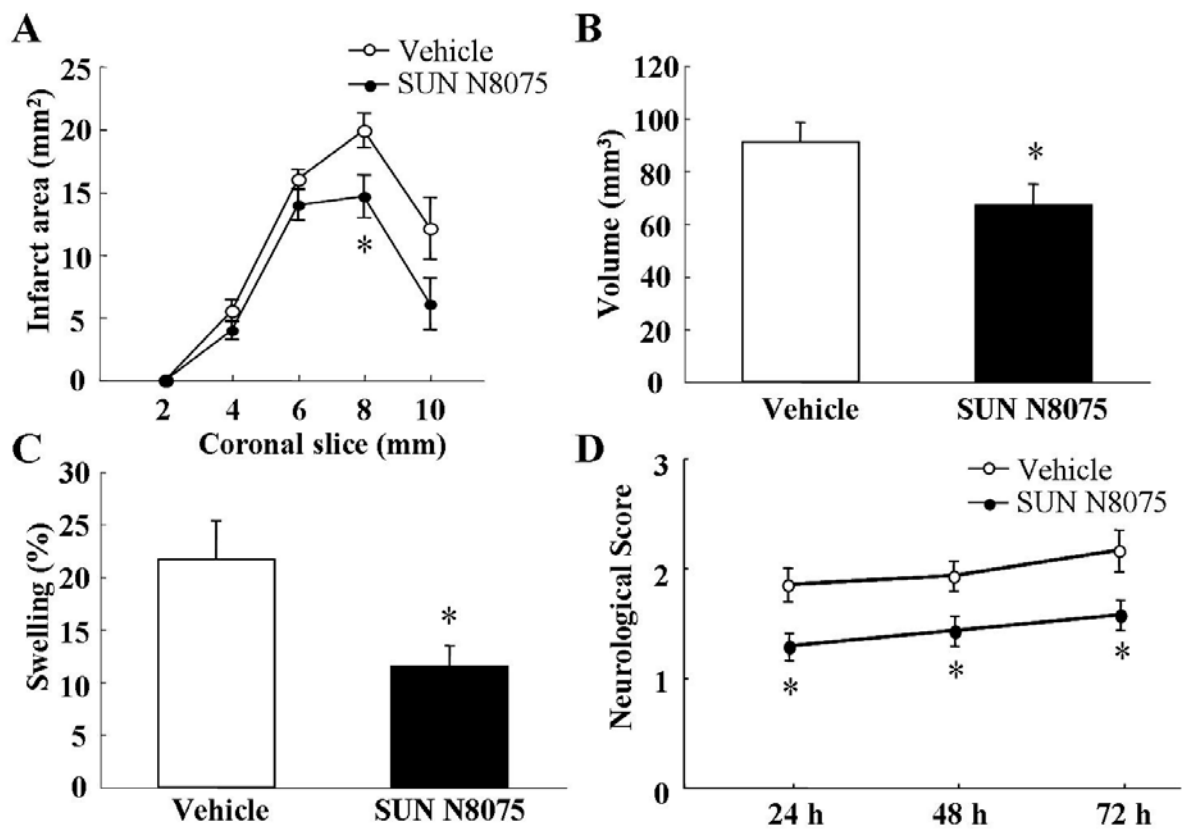


Fig. 12 Effects of SUN N8075 on infarction at 72 h after pMCAO in mice.

Brain infarct area measured at 72 h after pMCAO. Brains were removed and the forebrains sliced into five coronal 2-mm sections. * $P < 0.05$ vs. vehicle; $n = 13$ or 14. (B) Effects of SUN N8075 on infarct volume (measured at 72 h after pMCAO). * $P < 0.05$ vs. vehicle; $n = 13$ or 14. (C) Effects of SUN N8075 on brain swelling (measured at 72 h after pMCAO). * $P < 0.05$ vs. vehicle; $n = 13$ or 14. (D) Effects of SUN N8075 on neurological deficits (assessed at 24 h, 48 h or 72 h after pMCAO). * $P < 0.05$ vs. vehicle; $n = 13$ or 14.

3.3. マウス pMCAO 誘発 TUNEL および 4-HNE 発現に対する SUN N8075 の作用

虚血中心領域 (コア領域)および虚血周辺領域 (ペナンプラ領域)における TUNEL 陽性細胞の典型写真を Fig. 13B に示した。pMCAO による虚血領域において、コアおよびペナンプラ領域に TUNEL 陽性細胞の形態学的特徴である細胞体の縮小や核の凝集が観察された。TUNEL 陽性細胞 (ネクロシス様およびアポトーシス様含む)はペナンプラ領域よりもコア領域において数多く存在した。SUN N8075 投与群は、vehicle 投与群と比較して pMCAO 24 時間後のコアおよびペナンプラ領域における TUNEL 陽性細胞数の有意な減少が認められた (Fig. 13)。

脂質過酸化を反映する 4-HNE はコア領域における神経細胞体、樹状突起および軸索に発現が認められた (Fig. 14B)。SUN N8075 投与群は、vehicle 投与群と比較して皮質におけるコアおよびペナンプラ領域において 4-HNE 陽性細胞数の有意な減少が認められ、線条体においては減少傾向が認められた (Fig. 14)。SUN N8075 投与群における 4-HNE 陽性細胞数の減少は TUNEL 陽性細胞数の減少と同程度であった。

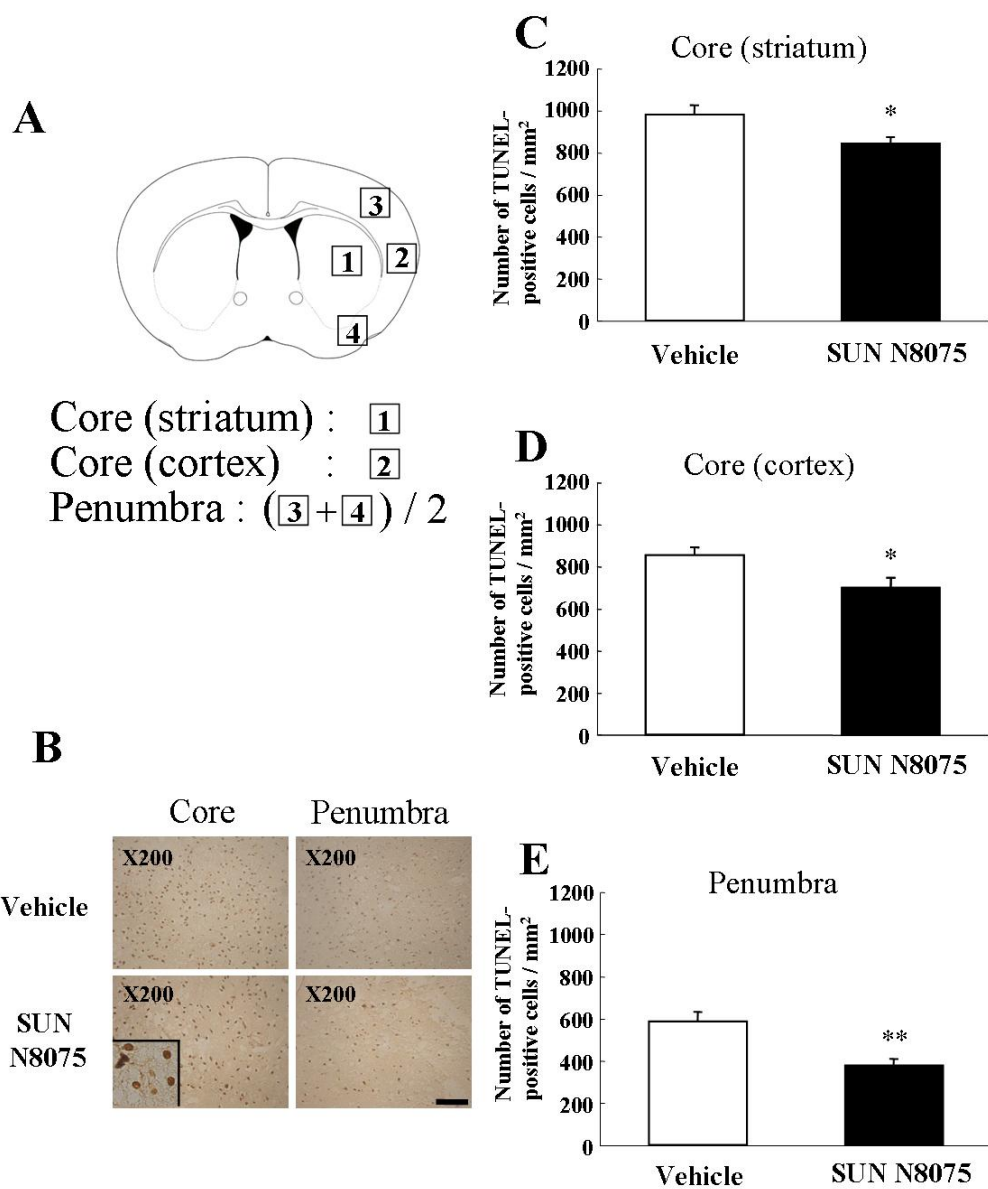


Fig. 13 Effect of SUN N8075 on the TUNEL staining after pMCAO in mice.

(A) Schematic drawing showing brain regions at 0.4-1.0 mm anterior to bregma (through the anterior commissure): 1, ischemic core (striatum); 2, ischemic core (cortex); 3 and 4, ischemic penumbra. The number of TUNEL-positive cells was counted in these areas, the average of the numbers obtained for areas 3 and 4 being taken as the number for the ischemic penumbra. (B) SUN N8075 reduced the number of TUNEL-positive cells (vs. vehicle treatment) in both the ischemic core and the ischemic penumbra. Scale bar = 100 μ m. (C, D, and E) Quantitative assessment of TUNEL-positive cells in ischemic brains treated with SUN N8075 or vehicle. Note the considerably smaller number of TUNEL-positive cells in the ischemic core (both striatum and cortex) and ischemic penumbra following treatment with SUN N8075 (vs. vehicle). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. vehicle; $n = 6$ or 7 .

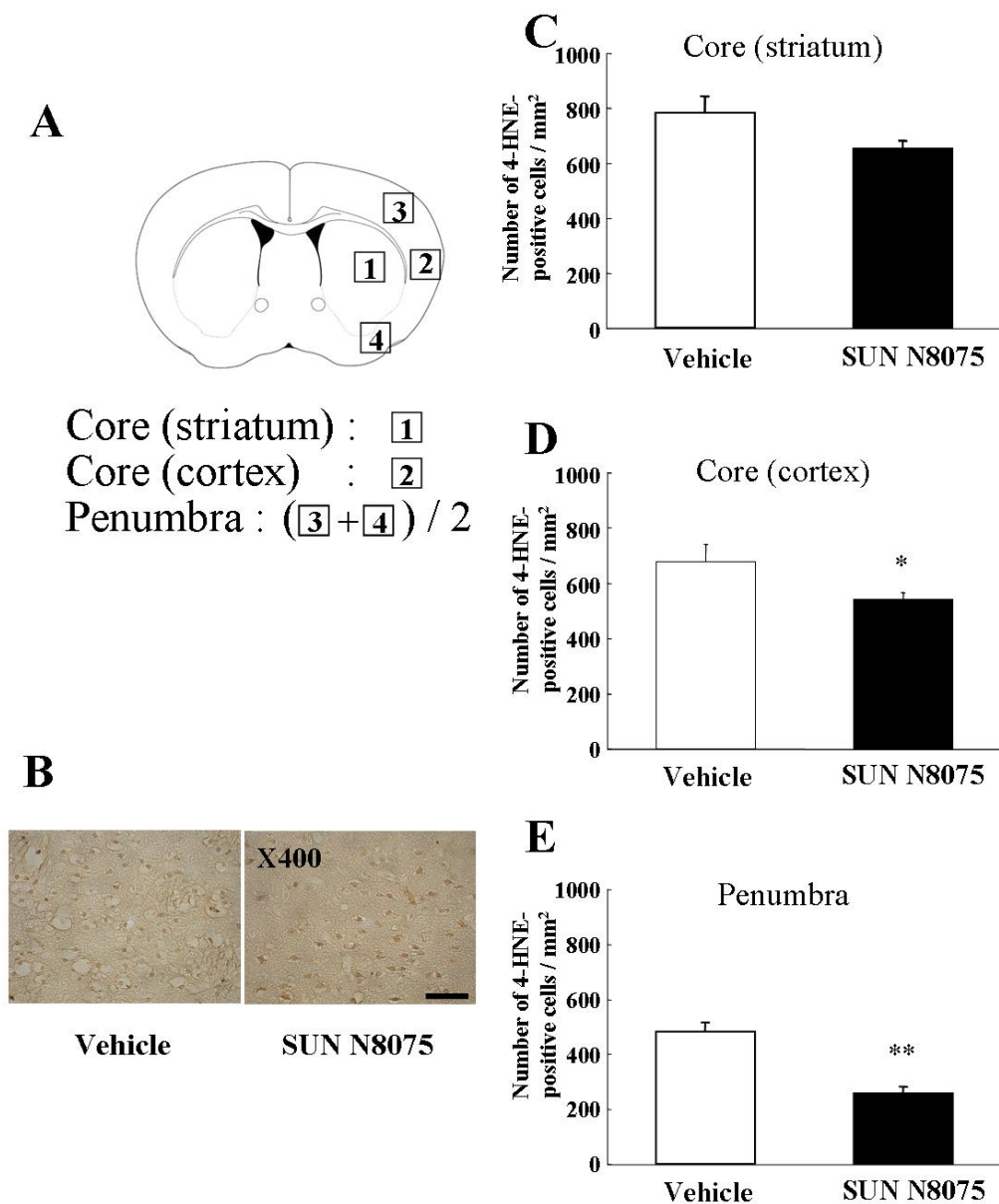


Fig. 14 Effect of SUN N8075 on 4-HNE staining after pMCAO in mice.

(A) Schematic drawing showing brain regions at 0.4-1.0 mm anterior to bregma (through the anterior commissure): 1, ischemic core (striatum); 2, ischemic core (cortex); 3 and 4, ischemic penumbra. (B) SUN

N8075 apparently reduced the number of 4-HNE-positive cells (vs. vehicle treatment). Scale bar = 50 μ m. (C, D, and E) Quantitative assessment of 4-HNE positive cells in ischemic brains treated with SUN N8075

or vehicle. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. vehicle; $n = 6$ or 7 .

3.4. マウス前脳ホモジネートを用いた脂質過酸化反応に対する SUN N8075 の作用

脂質過酸化反応は、37°C、30 分間インキュベートにより生じた脳ホモジネート中の malondialdehyde (MDA) 量を評価した。vehicle 処置群で生じた thiobarbituric acid (TBA) 反応生成物の平均を 100% とした。SUN N8075 0.02、0.2、2、20 および 200 μM 処置群は vehicle 処置群と比較してそれぞれ $97.7 \pm 0.2\%$ 、 $81.3 \pm 1.2\%$ 、 $10.3 \pm 0.1\%$ 、 $4.0 \pm 0.2\%$ および $3.2 \pm 0.2\%$ であった (各群 4 例)。SUN N8075 は脂質過酸化反応を濃度依存的に抑制し、0.2、2、20 および 200 μM 処置群において有意であった ($P < 0.01$)。SUN N8075 の IC_{50} 値 (95% 信頼区間) は 0.584 (0.291-0.982) μM に対し、陽性対照薬である Trolox (水溶性ビタミン E) は 16.8 (10.4-28.8) μM であった。SUN N8075 は Trolox の約 30 倍の力価を示した。

3.5. ラット初代培養細胞を用いた低酸素誘発神経細胞障害に対する SUN N8075 の保護作用

低酸素曝露により核の凝縮や断片化を示すアポトーシス細胞が増加したのに対し、SUN N8075 は 1 μM で有意に抑制した (Fig. 15A)。細胞障害の指標となる培地中 LDH 量は低酸素曝露により増加し、SUN N8075 および caspase-3 特異的阻害薬である Ac-DEVD-CHO は、それぞれ 0.01-1 μM および 1 μM で有意に抑制した (Fig. 15B)。また、SUN N8075 は 1 μM で低酸素誘発 caspase-3 活性を有意に抑制した (Fig. 15C)。

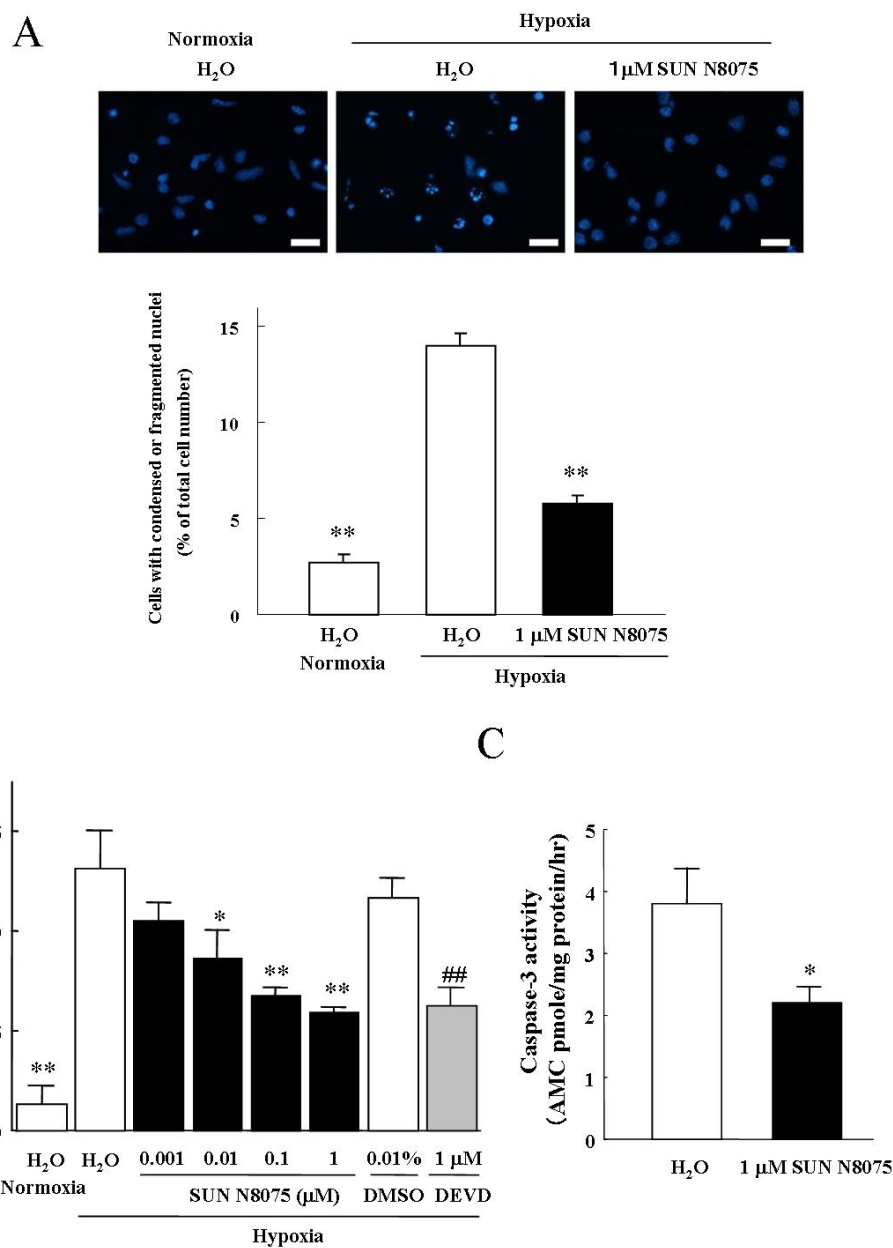


Fig. 15 Effects of SUN N8075 on the neuronal damage and caspase-3 activation induced by hypoxia in rat cultured cerebrocortical neurons.

(A) Neuronal damage after hypoxic treatment was assessed by counting apoptotic cells with condensed or fragmented nuclei stained with Hoechst 33258, shown in representative fluorescence images (scale bar = 20 μm). ** $P < 0.01$ vs. hypoxia-treated vehicle (H_2O) group; $n = 32$. (B) Neuronal damage after hypoxia was assessed by measuring LDH release into the culture medium. Data are mean \pm S.E.M. of six measurements. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. hypoxia-treated H_2O group. ### $P < 0.01$ vs. hypoxia-treated DMSO group. DEVD: Ac-DEVD-CHO. (C) Caspase-3 activity in cells after hypoxic treatment was determined (fluorometrically) by its ability to cleave Ac-DEVD-AMC. * $P < 0.05$ vs. hypoxia-treated vehicle (H_2O) group; $n = 6$ or 7 .

3.6. ラット初代培養細胞を用いた鉄イオン誘発神経細胞障害に対する SUN N8075 の保護作用

SUN N8075 は鉄イオン誘発神経細胞障害を濃度依存的に抑制し、0.01-1 μM で有意であった (Fig. 16A)。抗酸化薬である Ebselen は、鉄イオン誘発神経細胞障害を 3 μM で有意に抑制したが、抗酸化薬である Trolox、 Na^+ および T 型 Ca^{2+} チャネル阻害薬である Riluzole および Lubeluzole は、明らかな作用を示さなかった (Fig. 16B)。SUN N8075 は、Ebselen より低濃度で抑制した (Fig. 16A and 16B)。

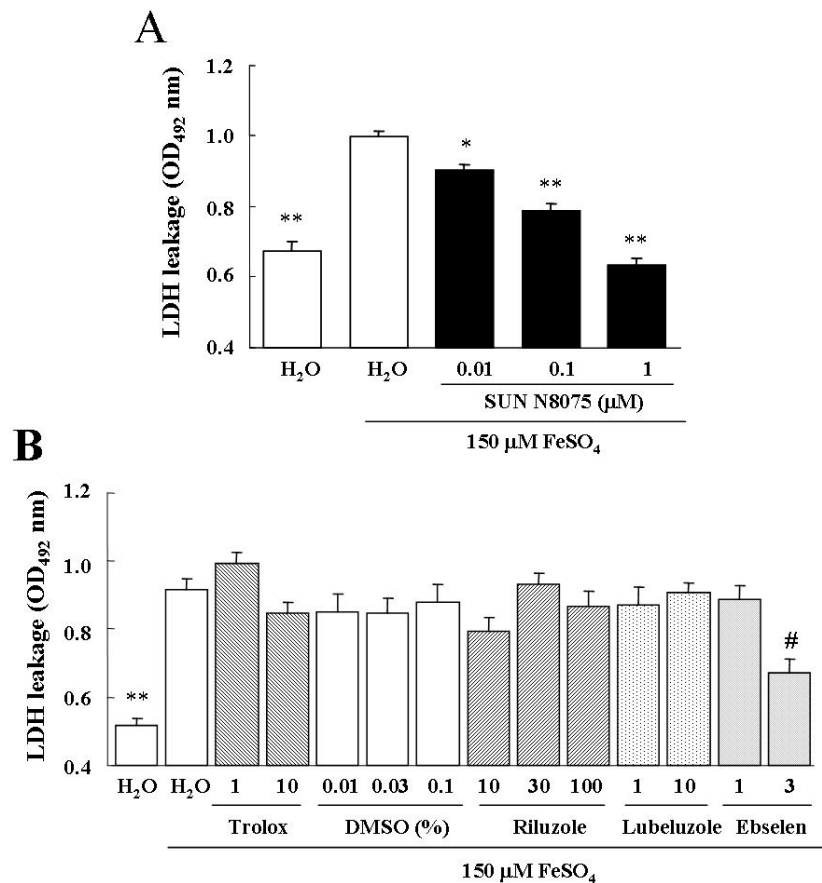


Fig. 16 Effects of SUN N8075 on the neuronal damage by FeSO_4 insult in rat cultured cerebrocortical neurons.

(A) Neuronal damage after FeSO_4 treatment was assessed by measuring LDH release into the culture medium. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. FeSO_4 -treated H_2O group; $n = 5$. (B) The effects of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ channel blockers and antioxidants on neuronal damage induced by FeSO_4 . ** $P < 0.01$ vs. FeSO_4 -treated H_2O group, # $P < 0.05$ vs. FeSO_4 -treated 0.03% DMSO group; $n = 6$.

第4節 考察

本章では、マウス pMCAO モデル誘発脳虚血障害に対する SUN N8075 の神経保護作用およびその作用メカニズムについて検討した。SUN N8075 は虚血による大脳皮質および皮質下部における組織障害に対して保護作用を示し、神経症状を改善した (Fig. 11)。SUN N8075 の pMCAO 10 分前投与は、pMCAO 24 および 72 時間後における梗塞巣および脳浮腫を抑制し、神経症状を改善した (Figs. 11 and 12)。SUN N8075 の保護作用は、pMCAO 10 分前投与群において強く認められ、pMCAO 1 および 3 時間後投与群においても脳浮腫の抑制が認められた。Vehicle 投与群において、虚血中心領域 (コア領域) および虚血周辺領域 (ペナンプラ領域) に TUNEL 陽性細胞が認められ、SUN N8075 投与によりこれらの領域における TUNEL 陽性細胞数の有意な減少が認められた (Fig. 13)。Lei らは MCAO 24 時間後において TUNEL 陽性細胞がペナンプラ領域に多く発現し、コア領域ではわずかであると報告している (Lei et al., 2004)。本検討との相違は、Lei らが一過性局所脳虚血モデルを用いたのに対し、本検討では永久局所脳虚血モデルを用いたためと考えられる。TUNEL 染色は核の DNA 断片化を検出し、DNA 断片化はネクロシスおよびアポトーシス細胞で生じる (Linnik et al., 1995)。本検討において、コア領域にネクロシス様の形態を示す TUNEL 陽性細胞が多く発現したのに対し、梗塞境界部の内側にアポトーシス様の形態を示す TUNEL 陽性細胞が多く発現した。脳虚血によりネクロシスおよびアポトーシスが誘導され (Li et al., 1995)、その多くは神経細胞マーカーである NeuN 陽性であった (Lei et al., 2004)。このことから、SUN N8075 投与によるペナンプラおよびコア領域における TUNEL 陽性細胞の減少は、神経細胞のアポトーシスおよびネクロシス抑制による可能性が示唆された。

In vitro 試験において、SUN N8075 は低酸素誘発神経細胞障害に対して caspase-3 阻害薬と同等の保護作用を示し、その保護作用は caspase-3 活性抑制に関連するものであった (Fig. 15)。Caspase-3 はアポトーシスが生じる過程において重要な酵素であり、

ラット tMCAO によるペナンプラ領域の神経細胞で caspase-3 活性が認められている (Zhang et al., 1999)。また、SUN N8075 は鉄イオン誘発神経細胞死に対して保護作用を示した。一方、抗酸化薬である Ebselen は保護作用を示したのに対し、抗酸化薬である Trolox、Na⁺および T 型 Ca²⁺チャネル阻害薬 (Riluzole および Lubeluzole) に作用は認められなかった (Fig. 16)。本検討では、鉄イオン処置 (150 μM Fe²⁺)16 時間後のラット大脳皮質培養細胞を用いて、1 および 10 μM の濃度で Trolox の評価を行った。鉄イオン処置 (50 μM Fe²⁺ および 50 μM Fe³⁺)24 時間後のマウス大脳皮質培養細胞では、鉄イオン処置細胞と比較して Trolox は 10 μM で LDH 漏出を約 40% 抑制した (Chow et al., 1994)。また、鉄イオン処置 (10 μM Fe²⁺)16 時間後のラット大脳皮質培養細胞では、鉄イオン処置細胞と比較して Trolox は 12.5 μM で LDH 漏出を約 50% 抑制した (Boland et al., 2000)。このことから、動物種および試験条件の違いにより、本検討では Trolox に作用が認められなかったことが考えられた。SUN N8075 は、Na⁺ および T 型 Ca²⁺ チャネル阻害作用および抗酸化作用を有している (Annoura et al., 2000)。鉄イオン誘発神経細胞死に対して Na⁺ および T 型 Ca²⁺ チャネル阻害薬に作用は認められなかったことから、SUN N8075 の保護作用は抗酸化作用によるものと考えられた。鉄イオンは活性酸素産生により細胞死を誘発することが知られており、活性酸素はアポトーシスを誘導する (Nicotera et al., 1997)。このことから、SUN N8075 の神経保護作用メカニズムの一部に caspase-3 活性によるアポトーシス誘導を抑制する可能性が示唆された。

本検討では、SUN N8075 を 3 mg/kg の静脈内投与後に 10 mg/kg の皮下投与を行った。¹⁴C-SUN N8075 のラットでの血漿タンパク結合率は約 1% であり、曝露濃度は一定であった。正常ラットでは、投与後 30 分において定常濃度に達し、10 時間にわたり残存した。SUN N8075 の血漿中濃度は約 0.6 μg/ml であり (Tamura et al., 未発表データ)、分子量は 669.82 である。このことから、SUN N8075 の血漿中遊離濃度は約 0.9 μM である。本検討での *in vitro* 試験において、SUN N8075 は 0.01 μM から保護作用が認められ (Figs. 15 and 16)、血漿中 SUN N8075 濃度は *in vitro* 試験で作用が認められた

濃度と一致した。

SOD-1 トランスジェニックマウスを用いた検討において、酸化ストレスが虚血性神経細胞障害を誘発すること (Kinouchi et al., 1991; Yang et al, 1994)、ビタミン E などの抗酸化薬が虚血性神経細胞障害に対して保護作用を示すことが報告されている (Hara et al., 1990)。本検討での脂質過酸化反応では、SUN N8075 は水溶性ビタミン E 誘導体である Trolox の約 30 倍の抗酸化作用が認められた。マウス pMCAO モデルを用いた免疫組織学的検討において、vehicle 投与群ではコアおよびペナンプラ領域に、酸化ストレス障害の細胞マーカーである 4-HNE 陽性細胞の増加が認められた (Fig. 14)。SUN N8075 投与により、TUNEL 陽性細胞と同様に、4-HNE 陽性細胞は皮質におけるコアおよびペナンプラ領域において有意に減少した。4-HNE は、アラキドン酸過酸化による生理活性産物であり、膜リン脂質、タンパク中のアミノ酸および DNA 中のアミノ核酸塩基と反応し、安定な高毒性の付加体を形成する。抗 4-HNE 抗体はグルタルアルデヒドまたはホルムアルデヒド処置したタンパク質と交差反応性を示さないことから、中性ホルマリン固定によるパラフィン包埋切片が用いられる (Yoshino et al., 1997)。一般的に遊離アルデヒドはパラフィン包埋組織中に残存しないことから、HNE は HNE 修飾タンパクとして間接的に同定することができる。Toyokuni は、1) 4-HNE の大部分はリン脂質結合型アラキドン酸由来であり、脂質過酸化を誘導するフリーラジカルの指標として信頼性が高いと考えられること、また、2) HNE は容易にタンパク質と反応すること、3) ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA) による持続的な酸化ストレスにより、処置後 48 時間にわたり HNE 修飾タンパクが高発現することを報告している (Toyokuni, 1999)。また、酸化ストレス曝露後数時間で遊離 HNE 量が減少することから、HNE 修飾タンパクは鋭敏な酸化ストレスマーカーになると考えられる。

本検討において、神経細胞だけでなくグリア様細胞においても 4-HNE 陽性細胞が認められ、SUN N8075 はこれらの細胞における 4-HNE 陽性細胞数を減少させた。4-HNE 陽性グリア様細胞はミクログリアを染色する OX-42 陽性である (Yoshino et al.,

1997)。ミクログリアにおける 4-HNE 発現は、ミクログリアによる 4-HNE 陽性神経細胞のファゴサイトーシス (Rosenfeld et al., 1990)およびミクログリア内で生じたフリーラジカル産生 (Boje and Arora, 1992)による可能性が考えられる。4-HNE は、神経細胞、軸索およびオリゴデンドロサイトに対して毒性を示す (Imai et al., 2001)。このことから、SUN N8075 による 4-HNE 抑制作用が作用メカニズムの一部に重要な役割を果たしていると考えられた。

フリーラジカル消去薬であるニトロン誘導体 NXY-059 は非臨床脳卒中モデルにおいて神経保護作用を示したが (Fisher et al., 2006)、臨床試験において有効性は認められなかった (Fisher, 2006)。有効性が認められなかった原因の一つとして、血液脳関門透過性の低さが考えられている。一過性局所脳虚血モデルを用いた検討において、NXY-059 の脳内移行性はわずかである (Kuroda et al., 1999)。また、NXY-059 の細胞透過性はごくわずかであった (Dehouck et al., 2002)。対照的に、SUN N8075 は容易に脳内へ移行する。SUN N8075 の全身投与は、聴原性てんかんマウス (DBA/2 マウス)において抗痙攣作用を示し、その中枢作用は SUN N8075 が血液脳関門を通過し、Na⁺ および T 型 Ca²⁺チャネル阻害によるものと推定されている (Annoura et al., 2000)。これらのことから、臨床において SUN N8075 は NXY-059 よりも脳虚血障害に対して強い作用を示すことが期待できる。

以上の結果から、*in vivo* 試験において、SUN N8075 はマウス pMCAO 誘発脳虚血障害に対し、脳虚血後投与においても神経保護作用を示した。また、*in vitro* 試験において、SUN N8075 は低酸素および鉄イオン誘発神経細胞障害を抑制した。これらの神経細胞保護作用メカニズムの一部に、SUN N8075 の有する酸化ストレス抑制作用の関与が示唆された。

第3章 マウス脳虚血再灌流障害における $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体アイソフォームの関与

第1節 緒言

これまで多くの研究によって、虚血性神経細胞死メカニズムが明らかにされてきた。虚血性神経細胞死メカニズムのさらなる解明は、新規脳保護薬の開発に繋がると考えられる。虚血による細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇は、 Ca^{2+} 依存性の様々な酵素を活性化し、神経細胞死を誘発すると考えられている。細胞内への Ca^{2+} 流入には、グルタミン酸受容体、電位依存性 Ca^{2+} チャネルおよび $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体 (sodium/calcium exchanger; NCX) が関与しており、グルタミン酸受容体拮抗薬およびカルシウムチャネル拮抗薬の臨床試験が行われてきたが副作用の出現または有効性が証明されないなどのため認可されていない。一方、NCX をターゲットとした臨床試験は行われていないことから、著者は神経細胞死メカニズムにおける NCX の関与に着目した。

NCX は、細胞膜を介して3個の Na^+ と1個の Ca^{2+} を交換輸送する細胞膜イオントランスポーターであり、細胞内 Ca^{2+} 濃度を調整する。正常条件下では、NCX は Na^+ 濃度勾配を利用して Ca^{2+} を細胞外へ汲みだすことが知られている (Ca^{2+} 流出モード)。一方、細胞内 Na^+ が蓄積する病理条件下では、NCX は細胞外から Ca^{2+} を流入させる方向に働く (Ca^{2+} 流入モード) (Fig. 17)。NCX は NCX1、NCX2 および NCX3 の3種のアイソフォームの存在が哺乳類で確認されている (Lytton, 2007)。NCX1 は、心臓、脳および腎臓など様々な組織で普遍的に発現しているのに対し、NCX2 および NCX3 は脳および骨格筋に発現している (Quednau et al., 1997)。

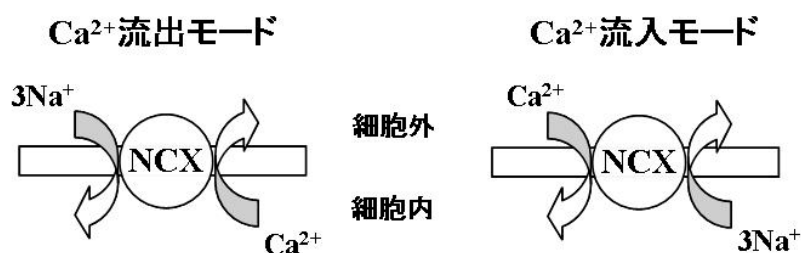


Fig. 17 Transport mode of the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger.

NCX は細胞内 Ca^{2+} 濃度を調節する重要なトランスポーターであることから、その薬理的機能研究に NCX 阻害薬が開発され用いられている (Fig. 18)。NCX 阻害薬である KB-R7943 {2-[2-[4-(4-nitrobenzyloxy)phenyl]ethyl]isothiourea}、SN-6 {2-[4-(4-nitrobenzyloxy)benzyl] thiazolidine-4-carboxylic acid ethyl ester} および SEA0400 {2-[4-[(2,5-difluorophenyl) methoxy]phenoxy]-5-ethoxyaniline} は共通構造として benzyloxyphenyl 構造を有しており、NCX の Ca^{2+} 流入モードを介する Ca^{2+} の流入を選択的に阻害する。また、これらの NCX 阻害薬はそれぞれ異なる NCX アイソフォーム選択性を持つ。KB-R7943 は、NCX1 および NCX2 より NCX3 を強く阻害する (Iwamoto et al., 1996; Iwamoto, 2004)。一方、SN-6 および SEA0400 は NCX2 および NCX3 より NCX1 を強く阻害し、SEA0400 は NCX3 を阻害しない (Iwamoto et al., 2004a, 2004b)。

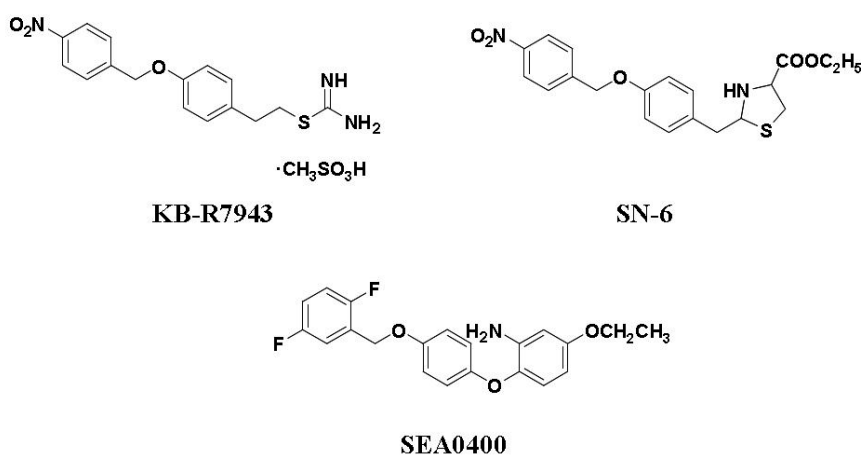


Fig. 18 Chemical structures of NCX inhibitors.

近年、虚血再灌流障害における NCX の Ca^{2+} 流入モードの関与が報告されている (Yamashita et al., 2003; Iwamoto, 2005)。臓器が虚血に陥ると、酸素欠乏による嫌氣的代謝が亢進し、細胞内 H^+ 濃度が上昇しアシドーシスへと至る。増加した細胞内 H^+ は、 Na^+/H^+ 交換輸送体を介して細胞外へ汲み出され、代わりに Na^+ が細胞内へ流入してくる。また、ATP の欠乏により、 Na^+/K^+ ATPase 活性の低下による細胞内 Na^+ 濃度が増加する。一方、再灌流時には、虚血により増加した細胞内 Na^+ が NCX の Ca^{2+} 流入モードを賦活化し細胞外へ汲み出され、代わりに細胞内 Ca^{2+} 濃度が増加する。心臓において、細胞内 Ca^{2+} 濃度の過剰な上昇は Ca^{2+} オーバーロードを引き起こし、心筋細胞障害の発生に関与すると考えられており (Watano et al., 1996)、不整脈、心不全および本態性高血圧などの虚血性疾患に対して NCX 阻害薬が保護作用を示すことが報告されている (Fig. 19) (Annunziato et al., 2004; Iwamoto, 2004; Lee et al., 2005)。

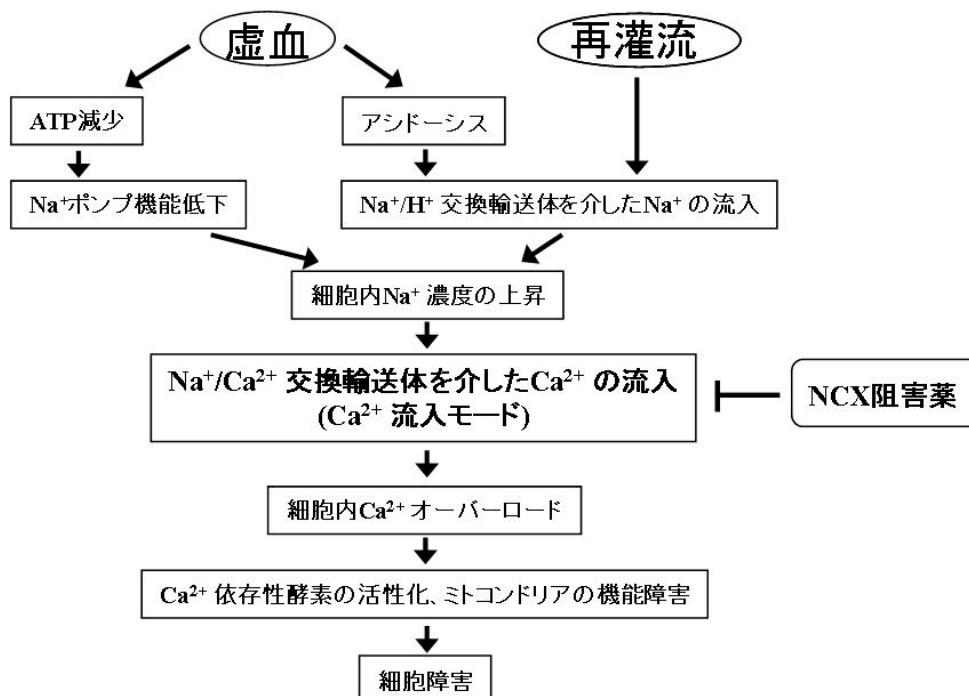


Fig. 19 Mechanisms of cellular injury in ischemia-reperfusion.

一方、NCX の脳虚血再灌流障害への関与も報告されているが (Matsuda et al., 2001; Pilitsis et al., 2001; Luo et al., 2007; Jeon et al., 2008; Molinaro et al., 2008)、虚血性脳障害における NCX の役割は議論の余地があり、そのメカニズムは未だ明らかとなっていない。そこで、本章では脳虚血再灌流障害における NCX アイソフォームの関与を検討するため、NCX ヘテロマウス (NCX1^{+/-}、NCX 2^{+/-}および NCX3^{+/-}マウス)を用いて、マウス中大脳動脈一過性閉塞 (tMCAO)モデルを作製し、NCX アイソフォームの関与を検討した。さらに、マウス脳虚血再灌流障害に対する NCX 阻害薬 (KB-R7943、SEA0400 および SN-6)の作用を比較することで NCX アイソフォームの関与を検討した。

第2節 実験材料および方法

2.1. 実験動物

雄性 NCX ヘテロマウス (NCX1^{+/+}、NCX 2^{+/+}および NCX3^{+/+}マウス)およびそれぞれの wild-type マウスは、C57BL/6J マウス (Japan SLC, Shizuoka, Japan)をバックグラウンドとしたものを用いた。雄性 ddY マウスは Kiwa Laboratory Animals Co., Ltd. (Wakayama, Japan)より購入したものを用いた。各動物は自由給水下に固形飼料を用いて飼育した。実験を行うにあたっては、岐阜薬科大学および福岡大学動物実験委員会に動物実験承認申請を行い、許可を受けた上で実施した。

2.2. 実験材料

SEA0400 は Taisho Pharmaceutical Co., Ltd. (Saitama, Japan)、SN-6 は Senju Pharmaceutical Co., Ltd. (Kobe, Japan)、KB-R7943 は Nippon Organon (Osaka, Japan)より寄与されたものを使用した。アラビアゴムは Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan)、isoflurane は Merck Hoesl Co., Ltd. (Tokushima, Japan)、2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC)は Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)、笑気ガスは Showa Denko K.K. (Tokyo, Japan)、酸素ガスは Taiyo Nippon Sanso Corp. (Tokyo, Japan)よりそれぞれ購入した。

2.3. 実験方法

2.3.1. Real-time PCR 解析

各 NCX ヘテロマウス (NCX1^{+/+}、NCX 2^{+/+}および NCX3^{+/+}マウス)およびそれぞれの wild-type マウスの脳を摘出した。各マウスの脳組織中 total RNA 抽出は RNeasy Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany)を用いて行い、QuantiTect Reverse Transcription kit (Qiagen)を用いて逆転写を行い cDNA を作製した。各 NCX アイソフォーム mRNA 発現は、QuantiTect SYBR green PCR kit (Qiagen)を用いて real-time PCR 法にて検討した。各

mRNA 発現は GAPDH mRNA によって標準化した。

<primer 配列>

NCX1-fw; 5'-TGAGAGGGACCAAGATGATG-3'

NCX1-rv; 5'-AATGCTCGGCTTTTCTGCTG-3'

NCX2-fw; 5'-ATGGAGGGAGCAGTTTATAG-3'

NCX2-rv; 5'-AGGAAGTGCATCACGTAGTC-3'

NCX3-fw; 5'-TTGGCATCTGTGTCTATGTG-3'

NCX3-rv; 5'-AGAAGACTGCCAGGATCATA-3'

GAPDH-fw; 5'-AACGACCCCTTCATTGAC-3'

GAPDH-rv; 5'-TCCACGACATACTCAGCAC-3'

2.3.2. ウェスタンブロット解析

脳組織からの膜タンパク抽出は4°C条件下で行った。脳を protease inhibitor 含有 PBS 中でホモジナイズ後、800 × g、15 分遠心分離し不純物を取り除いた。つぎに 100,000 × g、60 分間遠心分離し膜タンパクを抽出した。膜タンパクを sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide ゲル (7.5%) に電気泳動し、polyvinylidene fluoride (PVDF) 膜 (Immobilon-P, Millipore, Billerica, MA, USA) に転写した。転写後、一次抗体にはウサギ抗 NCX1 抗体、ウサギ抗 NCX2 抗体またはマウス抗 NCX3 抗体をそれぞれ 100 倍希釈したものを用い、二次抗体には horseradish peroxidase 標識抗ウサギまたは抗マウス IgG 抗体を用いた (Iwamoto et al., 1998)。標的タンパクを ECL Western blotting detection system (GE Healthcare, Waukesha, WI, USA) により発色し、lumino-image analyzer (LAS-3000, Fuji Film, Tokyo, Japan) を用いて検出した。

2.3.3. マウス中大脳動脈一過性閉塞 (tMCAO)モデルの作製および評価

小動物用麻酔器 (Soft Lander, Sin-ei Industry Co. Ltd., Saitama, Japan)を用い、笑気ガス 70%、酸素ガス 30% 下において、麻酔導入時には isoflurane 2%を、麻酔維持時には isoflurane 1%を使用した。体温は手術中および手術後正向反射が回復するまで保温ランプで維持した。左脳側中大脳動脈の閉塞は、フィラメント栓子を挿入することにより行った (Hara et al., 1996, 1997)。すなわち、実体顕微鏡下、左脳側中大脳動脈を頸動脈から silicone resin 混合物 (Xantopren + Activator Liquid)で先端を覆った 8-0 ナイロンモノフィラメント (Ethicon, Somerville, NJ, USA)を挿入し閉塞した。NCX マウスを用いた実験では MCAO 90 分後に、ddY マウスを用いた実験では MCAO 4 時間後に、再び isoflurane 麻酔下において、フィラメントを頸動脈から取り除き再灌流を行った。再灌流 24 時間後に断頭し、mouse brain matrix (RBM-2000C, Activational Systems, Warren, MI, USA)を用いて、前脳を 2 mm の厚さで 5 切片を作製した。脳切片を 2% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC)で 10-15 分間染色した。梗塞部位はデジタルカメラ (Nikon Cool PIX4500, Nikon Co., Tokyo, Japan)を用いて記録し、Image J を用いて梗塞面積を測定し、梗塞体積を計算した (Hara et al., 1996, 1997)。

NCX 阻害薬である KB-R7943、SEA0400 および SN-6 は 5%アラビアゴム溶液に溶解し、用時調製したものをを用いた。KB-R7943、SEA0400 および SN-6 は、それぞれ MCAO 30 分前に 3 mg/kg または 10 mg/kg (0.1 ml/10 g)を ddY マウスに腹腔内投与した。Vehicle 群には 5%アラビアゴムを投与した。

2.3.4. Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling (TUNEL)染色

NCX1^{+/+}および wild-type マウスを再灌流 24 時間後に pentobarbital 麻酔し、heparin 処理生理食塩水に続き、4% paraformaldehyde 含有 0.1 M phosphate buffer (PB) (pH 7.4) を左心室内に注入して灌流固定した。4°C 条件下で 20 分後に脳を取り出し、同液に

で一晩浸透した。常法に従い段階的に ethanol に浸し脱水し、xylene で透徹後、パラフィン包埋を行った。組織は microtome (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) を用いて、厚さ 10 μm の切片を作製した。TUNEL 染色は、*In situ* Cell Death Detection Kit (Roche Molecular Biochemicals Inc., Mannheim, Germany) のプロトコルに従い行った。切片は脱パラフィン、再親水化操作を行い、20 $\mu\text{g/ml}$ の proteinase K 溶液に 30 分間反応させた。3% H_2O_2 含有 methanol で 30 分間浸透後、terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) をラベル化した反応調製液で加湿条件下、37°C、90 分間反応させた。洗浄後、コンバーター-POD を加湿条件下、37°C、30 分間反応後、3,3'-diaminobenzidine 溶液を用いて染色した。

2.4. 統計学的解析

実験成績は平均値 \pm 標準誤差で示した。統計学的な比較は、STAT VIEW version 5.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を用いて、一元または二元配置分散分析法で、分散を検定したのち、Student's *t*-test あるいは Dunnett's test による検定を行った。危険率が 5% 未満を有意差有りとした。

第3節 実験成績

3.1. NCX1^{+/-}、NCX2^{+/-}およびNCX3^{+/-}マウスの脳組織中 NCX アイソフォーム発現

各 NCX ヘテロマウス (NCX1^{+/-}、NCX2^{+/-}および NCX3^{+/-}マウス)の脳組織中 NCX1、NCX2 および NCX3 mRNA 発現量をそれぞれの wild-type マウスの発現量と比較した。Real-time PCR 法を用いて測定した各 NCX ヘテロマウスの標的 NCX アイソフォーム発現量は、wild-type マウスの発現量と比較してそれぞれ約 1/3 - 2/3 の有意な減少が認められた。一方、標的外 NCX アイソフォーム発現量に明らかな変化は認められなかった (Fig. 20A)。また、ウェスタンブロット法を用いて測定した NCX1^{+/-}マウスの脳組織中 NCX1 タンパク発現量は、wild-type マウスの発現量の約 50%であった。一方、NCX2^{+/-}および NCX3^{+/-}マウスの脳組織中 NCX1 タンパク発現量は、wild-type マウスと比較して変化は認められなかった (Fig. 20B)。このことから、NCX ヘテロマウスを C57BL/6J マウスをバックグラウンドとする NCX アイソフォーム特異的ヘテロ欠損マウスとして実験に使用した。

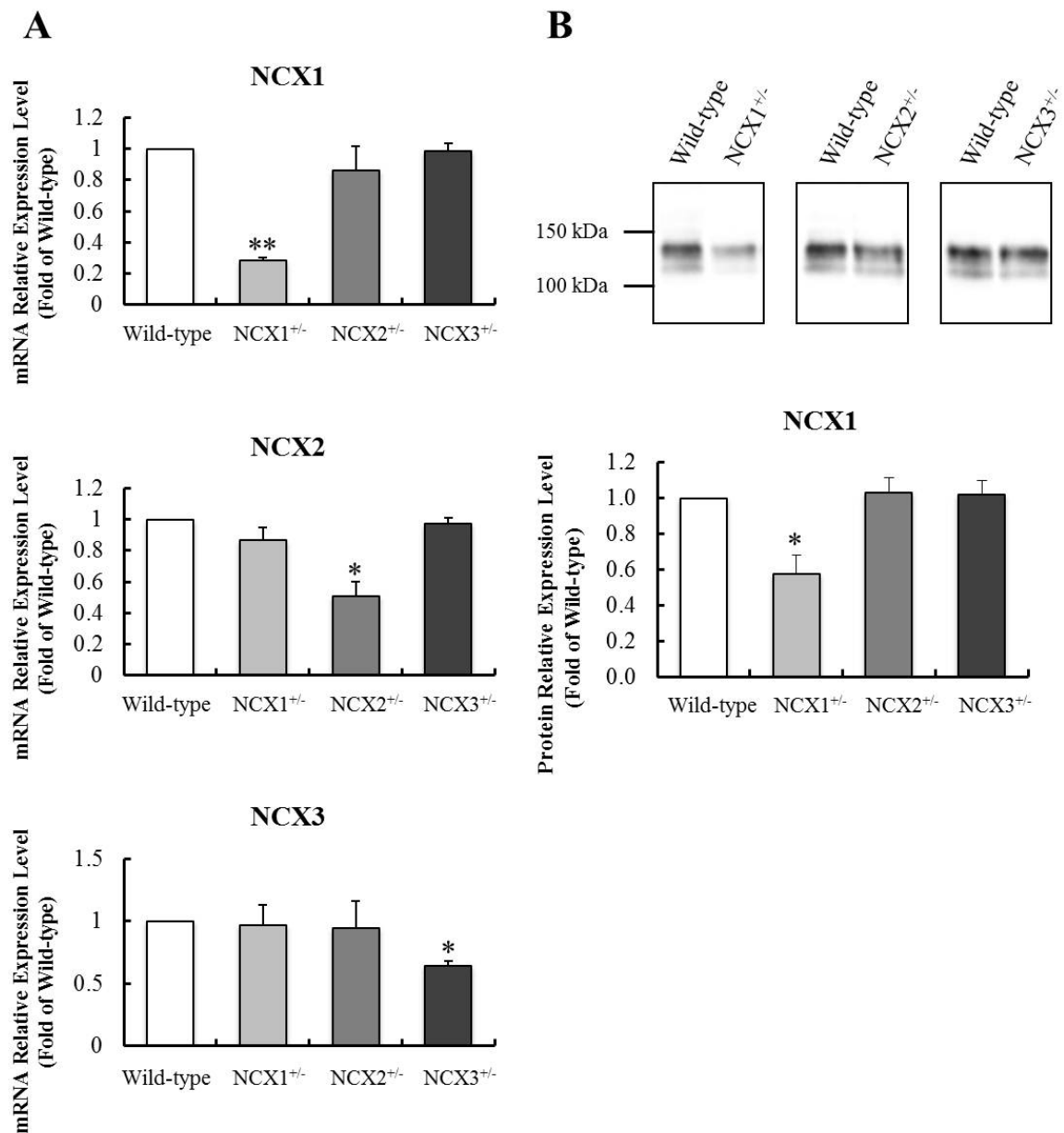


Fig. 20 Expressions of NCX isoforms in mouse brain.

A: Expressions of NCX1, NCX2, and NCX3 mRNA in brains isolated from NCX1, NCX2, and NCX3 heterozygous mice. NCX mRNA levels were analyzed by real-time PCR. The mRNA expressions were each standardized to the GAPDH mRNA level ($n = 3$ or 4 ; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ vs. wild-type mice). B: Expressions of NCX1 proteins in brains isolated from NCX1, NCX2, and NCX3 heterozygous mice. The same amounts of microsomes ($40 \mu\text{g}$) were subjected to immunoblot analysis using specific antibody against NCX1. The protein expressions were quantified as each band density ($n = 3$; *, $p < 0.05$ vs. wild-type mice).

3.2. マウス tMCAO 誘発梗塞巣における NCX アイソフォームの関与

同週齢の NCX1^{+/-}、NCX2^{+/-}および NCX3^{+/-}マウスおよびそれぞれの wild-type マウスを用いて、tMCAO (90 分間 MCAO + 24 時間再灌流)誘発脳虚血再灌流障害における NCX アイソフォームの関与を検討した。再灌流 24 時間後において、皮質および線条体に梗塞巣が認められた。NCX1^{+/-}マウスは、wild-type マウスと比較して再灌流 24 時間後の梗塞面積 (前脳先端から 6 および 10 mm)および梗塞体積の有意な減少が認められた。また、梗塞面積の減少は虚血中心領域 (コア領域)よりも虚血周辺領域 (ペナングラ領域)に認められた。一方、NCX2^{+/-}および NCX3^{+/-}マウスでは、明らかな変化は認められなかった (Fig. 21)。

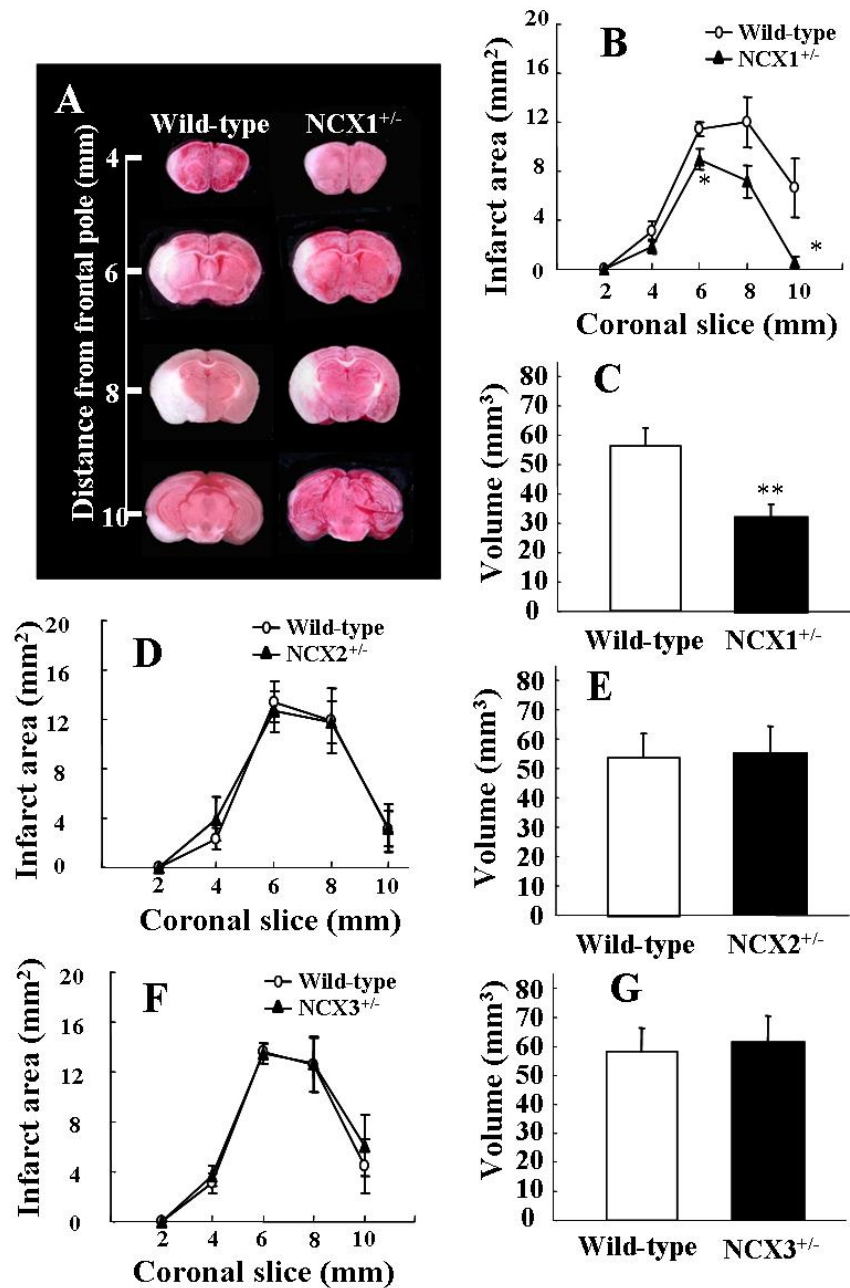


Fig. 21 Decreased infarct size in NCX1^{+/-} mice.

(A) TTC staining of coronal sections of brains taken at the end of 24 h reperfusion after 90 min MCAO in wild-type mice and in NCX1^{+/-} mice. After TTC staining, damaged tissue appears white, whereas viable tissue appears red. NCX1^{+/-} mice had reduced infarcts compared to wild-type mice. (B) Distribution of infarct areas in different brain slices in experimental mice. The area of infarction was smaller in brain slices from NCX1^{+/-} mice ($n = 12$ or 13 ; $p < 0.05$ vs. wild-type mice). (C) The infarct volume was reduced in NCX1^{+/-} mice too ($n = 12$ or 13 ; $p < 0.01$ vs. wild-type mice). However, NCX2^{+/-} and NCX3^{+/-} mice showed no improvement in either infarct area (D, F) or infarct volume (E, G) ($n = 6-8$).

3.3. マウス tMCAO 誘発 TUNEL 発現における NCX アイソフォームの関与

TTC 染色を行った虚血脳組織において、NCX1^{+/-}マウスに認められた梗塞面積の減少は、コア領域よりもペナンプラ領域によるものであった。このことから、NCX1^{+/-}マウスのペナンプラ領域における TUNEL 発現を検討した。Wild-type マウスにおいて、TUNEL 陽性細胞数は、コアおよびペナンプラ領域ともに対側の各領域より多く認められた (Fig. 22A)。一方、NCX1^{+/-}マウスは、wild-type マウスと比較してペナンプラ領域における TUNEL 陽性細胞数の有意な減少が認められた (Fig. 22A and 22B)。

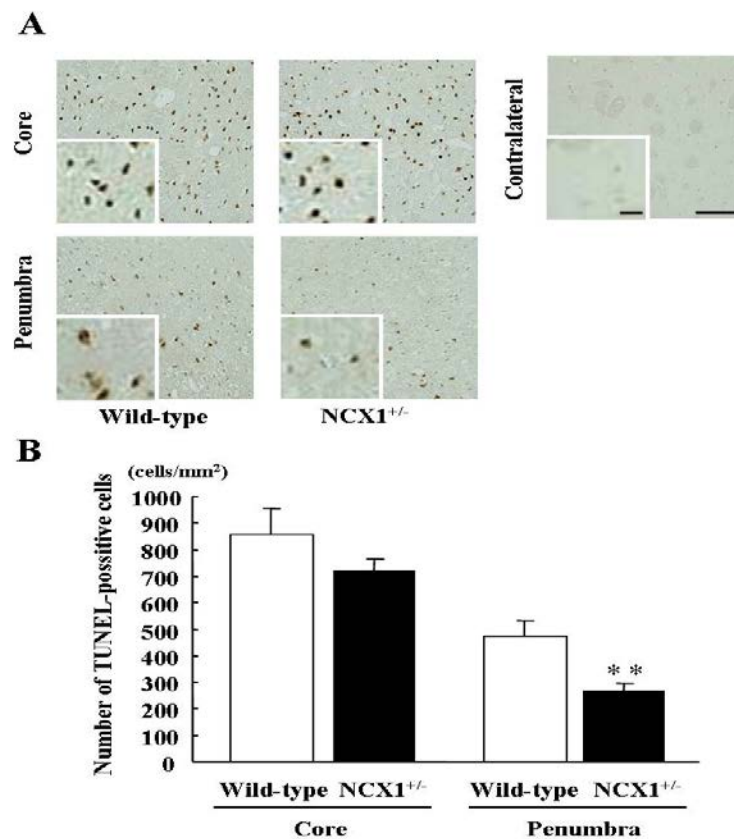


Fig. 22 NCX1^{+/-} mice displayed a reduced number of TUNEL-positive cells in the penumbra.

(A) Representative images of TUNEL staining in the infarct core and penumbra, and on the side contralateral to the infarction. Insets are higher-magnification images. NCX1^{+/-} mice exhibited a reduced number of MCAO-induced TUNEL-positive cells in the penumbra. Scale bars: higher-magnification panels, 20 μ m; lower-magnification panels, 100 μ m. (B) Cell-counting analysis revealed that NCX1^{+/-} mice had a significantly reduced number of TUNEL-positive cells in the penumbra ($n = 6-10$; ** $p < 0.01$ vs. wild-type mice).

3.4. tMCAO 誘発梗塞巣に対する各種 NCX 阻害薬の作用

脳虚血再灌流障害に対する NCX 阻害薬 KB-R7943、SEA0400 および SN-6 の作用を検討するため、ddY マウスに各種 NCX 阻害薬を 3 または 10 mg/kg 腹腔内投与し、tMCAO (4 時間 MCAO + 24 時間再灌流)を行った。

Vehicle 投与群と比較して SEA0400 および SN-6 の 10 mg/kg 投与は、再灌流 24 時間後の梗塞体積を有意に抑制したが、SN-6 の 3 mg/kg 投与は抑制傾向が認められたにすぎなかった。一方、KB-R7943 の 3 および 10 mg/kg 投与および SEA0400 の 3 mg/kg 投与では明らかな変化は認められなかった (Fig. 23)。

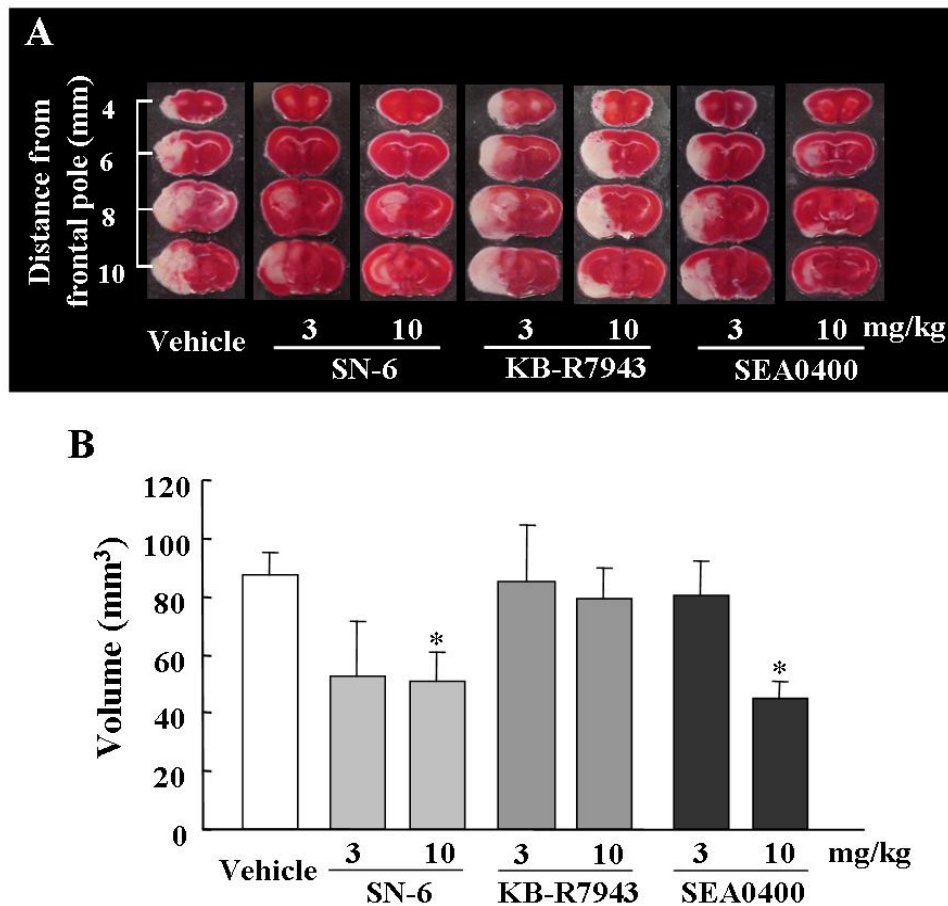


Fig. 23 Effects of various NCX inhibitors on infarction after MCAO and reperfusion in ddY mice. (A) TTC staining of coronal sections of brains taken at the end of 24 h reperfusion after prolonged (4 h) MCAO in representative mice. (B) Effects of various NCX inhibitors (SN-6, KB-R7943, and SEA0400) on infarct volume (measured at the end of 24 h reperfusion) ($n = 3-10$; * $p < 0.05$ vs. vehicle).

第4節 考察

本章では、マウス中大脳動脈一過性閉塞 (tMCAO)モデル誘発脳虚血再灌流障害における $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体 (NCX)アイソフォームの関与を、NCX ヘテロマウスおよび NCX 阻害薬を用いて検討した。NCX には3種のアイソフォーム (NCX1、NCX2 および NCX3)が存在し、脳には3種のアイソフォーム全てが発現している。本検討において、脳組織中 NCX1 mRNA 発現量は、NCX2 および NCX3 mRNA 発現量より高発現していた (未掲載データ)。大脳皮質錐体神経細胞において、NCX1 は NCX2 より高発現している (Papa et al., 2003)。一方、NCX2 は体性感覚神経において選択的に発現している (Papa et al., 2003)。海馬では、歯状回の顆粒細胞層および CA1 から CA4 領域の錐体細胞において3種の NCX アイソフォームが高発現している (Papa et al., 2003)。3種の NCX アイソフォームは中枢神経領域に特異的に分布しており、それぞれ異なる機能的役割を有すると考えられる。本検討において、各 NCX ヘテロマウス (NCX1^{+/-}、NCX2^{+/-}および NCX3^{+/-}マウス)の脳組織中標的 NCX アイソフォーム発現量は、wild-type マウスの発現量と比較してそれぞれ約 1/3 - 2/3 倍の有意な減少が認められた。一方、標的外 NCX アイソフォーム発現量に変化は認められなかった (Fig. 20)。これらの結果から、各 NCX ヘテロマウスが各 NCX アイソフォームの病理学的役割の解明に有効な手段になると考えられる。しかしながら、Molinaro らは NCX3^{+/-}および NCX3^{-/-}マウスの大脳皮質および海馬では、NCX1 および NCX2 mRNA 発現が高発現すると報告している (Molinaro et al., 2008)。本検討結果との相違は現時点では明らかではないため、今後更なる検討が必要である。

本検討において、NCX1^{+/-}マウスは、wild-type マウスと比較して tMCAO 24 時間後の梗塞巣の減少が認められた。一方、NCX2^{+/-}および NCX3^{+/-}マウスでは変化は認められなかった (Fig. 21)。しかしながら、1) NCX1^{+/-}マウスは、wild-type マウスと比較して tMCAO 24 時間後の梗塞巣に変化は認められない (Luo et al., 2007, 2008)、2) NCX2^{+/-}マウスは、wild-type マウスと比較して tMCAO 24 時間後の梗塞巣は悪化する (Jeon et

al., 2008)、3) NCX3^{+/+}およびNCX3^{-/-}マウスは、wild-type マウスと比較して tMCAO 24 時間後の梗塞巣は悪化する (Molinaro et al., 2008)、4) アンチセンスオリゴデオキシヌクレオチド (AS-ODNs)により各 NCX をノックダウンしたラットでは、pMCAO 24 時間後の脳虚血障害の悪化が NCX1 および NCX3 ノックダウンラットで認められたのに対し、NCX2 ノックダウンラットでは認められなかった (Pignataro et al., 2004)など本検討結果と異なる報告が行われている。Luo らは、129/SV マウスをバックグラウンドとする NCX1^{+/+}マウスを用いて、30 または 60 分間 MCAO を行い再灌流 24 時間後の脳虚血障害を評価した (Luo et al., 2007, 2008)。一方、本検討では C57BL/6J マウスをバックグラウンドとする各 NCX ヘテロマウスを用いて、90 分間 MCAO を行い再灌流 24 時間後の脳虚血障害を評価した。また、pMCAO モデルにおいて、NCX1 AS-ODNs によりタンパク発現量を約 20%に抑制した NCX1 ノックダウンラットは脳虚血障害が悪化する (Pignataro et al., 2004)。全脳虚血および局所脳虚血モデルにおいて、C57BL/6 マウスは 129/SV マウスより脳虚血障害が生じやすい (Fujii et al., 1997; Maeda et al., 1999)。この感受性の差は C57BL/6 マウスの 93%および 129/SV マウスの 50%に後交通動脈の不十分な発達または欠損が認められるなどの頭蓋内脳血管構造の違いによるものと考えられる (Majid et al., 2000)。さらに、これらの系統では他の生化学的相違も報告されている (Momoi et al., 2003; Houde et al., 2004)。このことから、NCX アイソフォームにおける結果の相違は、系統差や虚血条件の差による可能性が考えられるが、これらの違いを明らかにするには今後更なる検討が必要である。一方、酸素およびグルコースを3時間除去し21時間再酸素化を行った *in vitro* 試験において、NCX1^{+/+}神経細胞は対照群の細胞死亡率より低値を示しており、虚血再灌流による神経細胞死に NCX1 の細胞内への Ca²⁺流入機構が関与する可能性が示唆された (Luo et al., 2007, 2008)。本検討では、C57BL/6J をバックグラウンドとする NCX2^{+/+}マウスを交配させることで NCX2^{-/-}マウスの作製を試みたが胎生致死であったのに対し、Jeon らは 129/SV および C57BL/6J をバックグラウンドとする NCX2^{+/+}マウスを交配させる

ことで NCX2^{-/-}マウスの作製に成功した (Jeon et al., 2003)。tMCAO モデルにおいて、NCX2^{-/-}マウスは、wild-type マウスと比較して梗塞巣の悪化が認められた (Jeon et al., 2008)。一方、本検討での NCX2^{+/-}マウスを用いた tMCAO モデルおよび NCX2 AS-ODN によりタンパク発現量を約 20%に抑制した NCX2 ノックダウンラットを用いた pMCAO モデルでは、脳虚血障害に変化は認められなかった (Pignataro et al., 2004)。このことから、脳虚血障害における NCX2 の病理学的関与は、NCX1 より低い可能性が示唆された。また、本検討において NCX3^{+/-}マウスは、wild-type マウスと比較して tMCAO 誘発脳虚血障害に変化は認められなかった。一方、NCX3^{+/-}および NCX3^{-/-}マウスを用いた tMCAO モデルおよび NCX3 AS-ODNs によりタンパク発現量を約 60%に抑制した NCX3 ノックダウンラットを用いた pMCAO モデルでは脳虚血障害がそれぞれ悪化した (Pignataro et al., 2004; Molinaro et al., 2008)。興味深いことに、pMCAO および tMCAO 両方のモデルで虚血領域における NCX1 および NCX3 タンパク発現量が持続的に低下した (Pignataro et al., 2004, 2011)。NCX3^{+/-}および NCX3^{-/-}マウスでは、皮質において NCX1 タンパク発現量が有意に上昇し (Molinaro et al., 2008)、NCX3 ノックダウンラットでは、非虚血脳組織における NCX1 および NCX2 タンパク発現量の増加傾向が認められた (Pignataro et al., 2004)。このことから、他の NCX アイソフォームの代償的な増加が、NCX3 欠損マウスにおける脳虚血障害の悪化に関与する可能性が示唆された。しかしながら、本検討では wild-type マウスと比較して、NCX3^{+/-}マウスの脳組織中における他の NCX アイソフォーム (NCX1 および NCX2)発現量に変化は認められなかった。NCX3 ノックアウトマウスにおける今回の結果とこれまでの報告の相違を明らかにするためには、今後更なる研究が必要である。

脳虚血における NCX アイソフォームの関与を検討するため、4 時間 MCAO を行い再灌流 24 時間後の脳虚血モデルを用いて 3 種類の NCX 阻害薬の評価を行った。NCX1 への選択性の高い SEA0400 および SN-6 の 10 mg/kg 投与は、マウス tMCAO 24 時間後における梗塞巣を有意に抑制した。一方、KB-R7943 の 10 mg/kg 投与では抑制作用

は認められなかった (Fig. 23)。このことは、SEA0400 がラット tMCAO 後の大脳皮質における梗塞体積を抑制する結果と一致する (Matsuda et al., 2001)。脳虚血条件下では、細胞外グルタミン酸の過剰蓄積により、神経細胞内の Na^+ および Ca^{2+} の恒常性機能障害が引き起こされ、神経細胞死を誘発する (Kiedrowski et al., 1994)。虚血によるエネルギー供給障害は、脱分極、細胞内 Na^+ の流入、イオン交換輸送機構の逆転、細胞内 Ca^{2+} のオーバーロードなど一連の反応を誘発し、不可逆的な神経細胞障害を引き起こす (Lo et al., 2003)。本検討で用いた NCX 阻害薬は、NCX を介した Ca^{2+} の流出よりも Ca^{2+} の流入を選択的に阻害する (Iwamoto et al., 2004a, 2004b)。本検討では、少なくともマウスにおいて、一過性脳虚血後に生じる神経細胞障害メカニズムに NCX1 を介した Ca^{2+} のオーバーロードの関与を明らかにした。このことから、NCX1 を介した Ca^{2+} の流入によるオーバーロードが、脳虚血障害における病態形成に重要な役割を果たす可能性が示唆された。本検討では、NCX1 に選択性の高い阻害薬として SEA0400 および SN-6 を用いた。SEA0400 および SN-6 の高用量投与 (10 mg/kg) では、両阻害薬の脳虚血再灌流障害抑制作用に違いは認められなかった。一方、SN-6 の低用量投与 (3 mg/kg) では抑制傾向が認められたのに対し、SEA0400 の低用量投与では作用が認められなかった。SN-6 はフリーラジカル消去作用を有することから (Hotta et al., 2002)、脳虚血再灌流障害に対して NCX 阻害作用およびフリーラジカル消去作用の 2 つの作用により効果を示した可能性が考えられる。一方、KB-R7943 は、tMCAO 誘発脳虚血再灌流障害に対して作用が認められなかった。KB-R7943 は NCX1 および NCX2 より NCX3 を 3 倍以上選択的に阻害する (Iwamoto and Shigekawa, 1998)。KB-R7943 は NCX1 阻害作用が低いことから作用を示さなかったことが考えられ、tMCAO 誘発脳虚血再灌流障害に対する NCX3 の関与は低い可能性が考えられる。

以上の結果から、脳虚血再灌流障害に対して NCX1 の関与が示唆され、選択的 NCX1 阻害薬が脳卒中治療薬の候補の一つとなる可能性が示唆された。

総括および結論

本研究では、新規脳保護薬の開発を目的に、安全性の高い薬剤として臨床で用いられている抗菌薬のミノサイクリンおよび新規抗酸化薬である (2S)-1-(4-Amino-2,3,5-trimethylphenoxy)-3-{4-[4-(4-fluorobenzyl)phenyl]-1-piperazinyl}-2-propanol dimethanesulfonate (SUN N8075)の虚血性神経細胞障害に対する有効性を検討した。また、神経細胞死メカニズムにおける $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体 (sodium/calcium exchanger; NCX)に着目し、脳虚血再灌流障害における NCX アイソフォームの関与を検討した。得られた知見を以下に記す。

第1章では、虚血性神経細胞障害に対するミノサイクリンの神経保護作用を *in vivo* および *in vitro* 試験で検討した。*In vivo* 試験では、ミノサイクリンはマウス中大脳動脈永久閉塞 (pMCAO) 60分前、30分後または4時間後に 90 mg/kg を腹腔内投与した。

- 1) ミノサイクリン pMCAO 60分前および30分後投与は、pMCAO 誘発脳虚血障害を有意に抑制した。一方、ミノサイクリン pMCAO 4時間後投与では抑制傾向が認められたが、有意ではなかった。
- 2) ミノサイクリンは、大脳皮質初代培養細胞を用いたグルタミン酸誘発神経細胞死を 2 μM で有意に抑制した。
- 3) ミノサイクリンは、濃度依存的に DPPH ラジカル消去活性および脳ホモジネートを用いた脂質過酸化反応を抑制し、それぞれ 2 μM および 0.2 μM 以上で有意であった。

第2章では、虚血性神経細胞障害に対する SUN N8075 の神経保護作用を *in vivo* および *in vitro* 試験で検討した。*In vivo* 試験では、SUN N8075 はマウス中大脳動脈永久閉塞 (pMCAO)10分前、1時間後または3時間後に 3 mg/kg の静脈内投与後、10 mg/kg

の皮下投与を行った。

- 1) SUN N8075 pMCAO 10 分前および 1 時間後投与は、pMCAO 誘発脳虚血障害を有意に抑制した。一方、SUN N8075 pMCAO 3 時間後投与は、脳浮腫を有意に抑制したが、梗塞体積および神経症状に対して明らかな作用は認められなかった。
- 2) SUN N8075 投与は、虚血中心領域 (コア領域)および虚血周辺領域 (ペナンプラ領域)における TUNEL 陽性細胞数の有意な減少が認められた。また、皮質におけるコアおよびペナンプラ領域において 4-HNE 陽性細胞数の有意な減少が認められた。
- 3) SUN N8075 は、脳ホモジネートを用いた脂質過酸化反応を濃度依存的に抑制し、0.2 μM 以上で有意であった。
- 4) SUN N8075 は大脳皮質初代培養細胞を用いた低酸素および鉄イオン誘発神経細胞障害を濃度依存的に抑制し、0.01-1 μM で有意であった。また、SUN N8075 は、1 μM で低酸素誘発 caspase-3 活性を有意に抑制した。

第 3 章では、マウス中大脳動脈一過性閉塞 (tMCAO)モデル誘発脳虚血再灌流障害における $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体 (NCX)アイソフォームの関与を、NCX ヘテロマウス (NCX1^{+/-}、NCX 2^{+/-}および NCX3^{+/-}マウス)および NCX 阻害薬 (KB-R7943、SEA0400 および SN-6)の作用を比較することで検討した。NCX 阻害薬は MCAO 30 分前に低用量 (3 mg/kg)または高用量 (10 mg/kg)を腹腔内投与した。

- 1) 各 NCX ヘテロマウスの脳組織中標的 NCX アイソフォームの mRNA およびタンパク発現量は、wild-type マウスの発現量と比較してそれぞれ約 1/3 - 2/3 の有意な減少が認められた。一方、標的外 NCX アイソフォーム発現量に明らかな変化は認められなかった。
- 2) NCX1^{+/-}マウスは tMCAO 誘発脳虚血再灌流障害を有意に減少させ、ペナンプラ領域における TUNEL 陽性細胞数を有意に減少させた。一方、NCX2^{+/-}および NCX3^{+/-}マウスでは明らかな変化は認められなかった。

3) NCX1 に選択性の高い SN-6 および SEA0400 の高用量投与は、tMCAO 誘発脳虚血再灌流障害を有意に抑制し、SN-6 の低用量投与は抑制傾向が認められた。一方、NCX3 に選択性の高い KB-R7943 および SEA0400 の低用量投与では明らかな作用は認められなかった。

本研究の結果より、マウス中大脳動脈永久閉塞誘発脳虚血障害およびラット大脳皮質初代培養細胞を用いた神経細胞障害モデルに対して、ミノサイクリンおよび SUN N8075 の神経細胞保護作用が認められ、その作用の一部に抗酸化作用の関与が示唆された。また、マウス中大脳動脈一過性閉塞誘発脳虚血再灌流障害における NCX1 の関与が示唆された。

これまで、臨床試験に用いられた多くの脳保護薬に有効性が認められなかった原因の一つとして、薬剤自体の有効性以外にも治療可能時間 (therapeutic time window) の設定が考えられる。実際の臨床現場では、脳梗塞発症後ある程度時間が経過してから治療が開始されることが多い。グルタミン酸受容体拮抗薬など虚血性神経細胞死メカニズムの上流に作用する薬剤は、therapeutic time window が短く有効性を示さなかった可能性が考えられる。一方、フリーラジカルの産生は虚血早期から始まり、脳梗塞進展における幅広い過程で関与し、therapeutic time window は比較的長いと考えられる。実際に、フリーラジカル消去薬であるエダラボンの therapeutic time window は脳梗塞発症後 24 時間以内である。また、虚血性神経細胞死はその進展メカニズムが複雑であり、単一のメカニズムを抑制するだけでは十分な効果を得られない可能性も考えられる。

本研究で用いたミノサイクリンは、抗酸化作用以外に MMP 活性 (Golub et al., 1991)、iNOS (Amin et al., 1996)、ミトコンドリアシトクロム c 放出 (Teng et al., 2004) および caspase 依存的並びに非依存的細胞死経路 (Zhu et al., 2002) の活性化抑制作用を有している。また、SUN N8075 は抗酸化作用以外に Na⁺ および T 型 Ca²⁺ チャネル阻害作用

(Annoura et al., 2000)および小胞体ストレス抑制作用を有している (Shimazawa et al., 2010)。これらの薬剤は複数の因子をターゲットとすることから、虚血性神経細胞死を相加・相乗的に抑制する可能性が考えられる。一方、NCX1 阻害薬は神経細胞死メカニズムの上流に関与する薬剤であるが、遺伝子組み換え組織プラスミノゲンアクチベーター (recombinant tissue plasminogen activator; rt-PA)などの血栓溶解薬と併用することで血栓溶解後の血流再開に伴う再灌流障害の抑制が期待できる。

以上の結果より、ミノサイクリン、SUN N8075 および NCX1 阻害薬は、新規脳保護薬の候補化合物として有用である可能性が示唆された。

謝辞

本稿を終えるに臨み、本研究遂行に際して終始御懇篤なる御指導，御鞭撻を賜りました岐阜薬科大学生体機能解析学大講座薬効解析学研究室教授 原 英彰博士に深甚なる謝意を表します。

また、本研究に際して終始御懇切なる御指導，御助言を賜りました岐阜薬科大学生体機能解析学大講座薬効解析学研究室准教授 嶋澤 雅光博士並びに助教 鶴間 一寛博士に深謝致します。また，諸種の多大なるご協力を頂きました薬効解析学研究室諸氏に深謝致します。

本論文の審査にあたり、有益な御助言を賜りました岐阜薬科大学機能分子学大講座薬理学研究室教授 稲垣 直樹博士、岐阜薬科大学生体機能解析学大講座分子生物学研究室教授 古川 昭栄博士並びに岐阜薬科大学医療薬剤学大講座薬物治療学研究室教授 保住 功博士に深謝致します。

本研究の遂行にあたり、御指導並びに御支援を賜りました岐阜県総合医療センター小谷 嘉則博士、福岡大学医学部薬理学教室教授 岩本 隆宏博士並びに講師 喜多紗斗美博士、福岡大学薬学部臨床疾患薬理学教室教授 岩崎 克典博士、アスピオファーマ株式会社 井上 照好氏、田村 滋規氏並びに田村 義子氏、岐阜薬科大学グローバル・レギュラトリー・サイエンス講座教授 塚本 桂博士、株式会社三和化学研究所加藤 憲明博士並びに中村 敬志氏に深謝致します。また、実験材料の御提供を頂きました大正製薬株式会社、千寿製薬株式会社、日本オルガノン株式会社 (現:MSD)並びにアスピオファーマ株式会社に深謝致します。

引用文献

Amin AR, Attur MG, Thakker GD, Patel PD, Vyas PR, Patel RN, Patel IR, Abramson SB.

(1996) A novel mechanism of action of tetracyclines: effects on nitric oxide synthases. *Proc Natl Acad Sci USA*, **93**, 14014-14019.

Ankarcrona M, Dybukt JM, Bonfoco E, Zhivotovsky B, Orrenius S, Lipton SA, Nicotera P.

(1995) Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neurone*, **15**, 961-973.

Annoura H, Nakanishi K, Toba T, Takemoto N, Imajo S, Miyajima A, Tamura-Horikawa Y,

Tamura S. (2000) Discovery of (2*S*)-1-(4-amino-2,3,5- trimethylphenoxy)-3-[4-[4-(4-fluorobenzyl)phenyl]-1-piperazinyl]-2-propanol dimethanesulfonate (SUN N8075): a dual Na⁺ and Ca²⁺ channel blocker with antioxidant activity. *J Med Chem*, **43**, 3372-3376.

Annunziato L, Pignataro G, Di Renzo GF. (2004) Pharmacology of brain Na⁺/Ca²⁺ exchanger: from molecular biology to therapeutic perspectives. *Pharmacol Rev*, **56**, 633-654.

Aronson AL. (1980) Pharmaco-therapeutics of the newer tetracyclines. *J Am Vet Med Assoc*, **176**, 1061-1068.

Barza M, Brown RB, Shanks C, Gamble C, Weinstein L. (1975) Relation between

lipophilicity and pharmacological behavior of minocycline, doxycycline, tetracycline, and oxytetracycline in dogs. *Antimicrob. Agents Chemother*, **8**, 713-720.

Becker KJ. (2001) Targeting the central nervous system inflammatory response in ischemic stroke. *Curr Opin Neurol*, **14**, 349-353.

Boje KM, Arora PK. (1992) Microglial-produced nitric oxide and reactive nitrogen oxides mediate neuronal cell death. *Brain Res*, **587**, 250-256.

Boland A, Delapierre D, Mossay D, Hans P, Dresse A. (2000) Propofol protects cultured brain cells from iron ion-induced death: comparison with trolox. *Eur J Pharmacol*, **404**, 21-27.

Cantin A, Woods DE. (1993) Protection by antibiotics against myeloperoxidase-dependent cytotoxicity to lung epithelial cells in vitro. *J Clin Invest*, **91**, 38-45.

Chan PH. (1996) Role of oxidants in ischemic brain damage. *Stroke*, **27**, 1124-1129.

Chan PH. (2001) Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *Cereb Blood Flow Metab*, **21**, 2-14.

Chan PH, Schmidley JW, Fishman RA, Longar SM. (1984) Brain injury, edema, and resicular permeability changes induced by oxygen-derived free radicals. *Neurology*, **34**, 315-320.

Chen M, Ona VO, Li M, Ferrante RJ, Fink KB, Zhu S, Bian J, Guo L, Farrell LA, Hersch SM, Hobbs W, Vonsattel JP, Cha JH, Friedlander RM. (2000) Minocycline inhibits caspase-1 and caspase-3 expression and delays mortality in a transgenic mouse model of Huntington disease. *Nat Med*, **6**, 797-801.

Chow HS, Lynch JJ 3rd, Rose K, Choi DW. (1994) Trolox attenuates cortical neuronal injury induced by iron, ultraviolet light, glucose deprivation, or AMPA. *Brain Res*, **639**, 102-108.

Clark WM, Wissman S, Albers GW, Jhamandas JH, Madden KP, Hamilton S. (1999) Recombinant tissue-type plasminogen activator (Alteplase) for ischemic stroke 3 to 5 hours after symptom onset. The ATLANTIS Study: a randomized controlled trial. Alteplase Thrombolysis for Acute Noninterventional Therapy in Ischemic Stroke. *JAMA*, **282**, 2019-2026.

Colovic M, Caccia S. (2003) Liquid chromatographic determination of minocycline in brain-to-plasma distribution studies in the rat. *J Chromatography B*, **791**, 337-343.

Cunha BA, Sibley C, Ristuccia PA. (1982) Doxycycline. *Therapeutics Drug Monitoring*, **4**, 115-135.

Dehouck MP, Cecchelli R, Richard Green A, Renftel M, Lundquist S. (2002) In vitro blood-brain barrier permeability and cerebral endothelial cell uptake of the neuroprotective nitron compound NXY-059 in normoxic, hypoxic and ischemic conditions. *Brain Res*, **955**, 229-235.

Dijkhuizen RM, Asahi M, Wu O, Rosen BR, Lo EH. (2002) Rapid breakdown of microvascular barriers and subsequent hemorrhagic transformation after delayed recombinant tissue plasminogen activator treatment in a rat embolic stroke model. *Stroke*, **33**, 2100-2104.

Du Y, Ma Z, Lin S, Dodel RC, Gao F, Bales KR, Triarhou LC, Chernet E, Perry KW, Nelson

DL, Luecke S, Phebus LA, Bymaster FP, Paul SM. (2001) Minocycline prevents nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, **98**, 14669-14674.

Emsley HC, Tyrrell PJ. (2002) Inflammation and infarction in clinical stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*, **22**, 1399-1419.

Fisher M. (2006) NXY-059 for acute ischemic stroke: the promise of neuroprotection is finally realized? *Stroke*, **37**, 2651-2652.

Fisher M, Lees K, Papadakis M, Buchan AM. (2006) NXY-059: brain or vessel protection. *Stroke*, **37**, 2189-2190.

Flamm ES, Demopoulos HB, Seligman ML, Poser RG, Ransohoff J. (1978) Free radical in cerebral ischemia. *Stroke*, **9**, 445-447.

Fujii M, Hara H, Meng W, Vonsattel JP, Huang Z, Moskowitz MA. (1997) Strain-related differences in susceptibility to transient forebrain ischemia in SV-129 and C57black/6 mice. *Stroke*, **28**, 1805-1810 (discussion 1811).

Furst DE. (1998) Update on clinical trials in the rheumatic diseases. *Curr Opin Rheumatol*, **10**, 123-128.

Golub LM, Ramamurthy NS, McNamara TF, Greenwald RA, Rifkin BR. (1991) Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown: new therapeutic implications for an old family of drugs.

Crit Rev Oral Biol Med, **2**, 297-322.

Hacke W, Kaste M, Fieschi C, Toni D, Lesaffre E, von Kummer R, Boysen G, Bluhmki E, Höxter G, Mahagne MH, Hennerici M. (1995) Intravenous thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator for acute hemispheric stroke: the European Cooperative Acute Stroke Study (ECASS), *JAMA*, **274**, 1017–1025.

Hacke W, Kaste M, Fieschi C, von Kummer R, Davalos A, Meier D, Larrue V, Bluhmki E, Davis S, Donnan G, Schneider D, Diez-Tejedor E, Trouillas P. (1998) Randomised double-blind placebo-controlled trial of thrombolytic therapy with intravenous alteplase in acute ischaemic stroke (ECASS II). *Lancet*, **352**, 1245–1251.

Hacke W, Kaste M, Bluhmki E, Brozman M, Dávalos A, Guidetti D, Larrue V, Lees KR, Medeghri Z, Machnig T, Schneider D, von Kummer R, Wahlgren N, Toni D; ECASS Investigators. (2008) Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N Engl J Med*, **359**, 1317-1329.

Hara H, Friedlander RM, Gagliardini V, Ayata C, Fink K, Huang Z, Shimizu-Sasamata M, Yuan J, Moskowitz MA. (1997) Inhibition of interleukin 1beta converting enzyme family proteases reduces ischemic and excitotoxic neuronal damage. *Proc Natl Acad Sci USA*, **94**, 2007-2012.

Hara H, Huang PL, Panahian N, Fishman MC, Moskowitz MA. (1996) Reduced brain edema and infarction volume in mice lacking the neuronal isoform of nitric oxide synthase after transient MCA occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab*, **16**, 605-611.

Hara H, Kato H, Kogure K. (1990) Protective effect of alpha-tocopherol on ischemic neuronal damage in the gerbil hippocampus. *Brain Res*, **510**, 335-338.

Hara H, Kogure K. (1990) Prevention of hippocampus neuronal damage in ischemic gerbils by a novel lipid peroxidation inhibitor (quinazoline derivative). *J Pharmacol Exp Ther*, **255**, 906-913.

Hara H, Sukamoto T, Kogure K. (1993) Mechanism and pathogenesis of ischemia-induced neuronal damage. *Progress in Neurobiol*, **40**, 645-670.

Hisanaga K, Tsukui H, Takei N, Hatanaka H. (1988) Transplantation of fetal and early postnatal rat septal cholinergic neurons cultured in serum-free and serum-containing medium with nerve growth factor. *Brain Res*, **475**, 349-355.

Hotta Y, Nagatsu A, Liu W, Muto T, Narumiya C, Lu X, Yajima M, Ishikawa N, Miyazeki K, Kawai N, Mizukami H, Sakakibara J. (2002) Protective effects of antioxidative serotonin derivatives isolated from safflower against postischemic myocardial dysfunction. *Mol Cell Biochem*, **238**, 151-162.

Houde C, Banks KG, Coulombe N, Rasper D, Grimm E, Roy S, Simpson EM, Nicholson DW. (2004) Caspase-7 expanded function and intrinsic expression level underlies strain-specific brain phenotype of caspase-3-null mice. *J Neurosci*, **24**, 9977-9984.

Imai H, Masayasu H, Dewar D, Graham DI, Macrae IM. (2001) Ebselen protects both gray and white matter in a rodent model of focal cerebral ischemia. *Stroke*, **32**, 2149-2154.

Iwamoto T. (2004) Forefront of Na⁺/Ca²⁺ exchanger studies: molecular pharmacology of Na⁺/Ca²⁺ exchange inhibitors. *J Pharmacol Sci*, **96**, 27-32.

Iwamoto T. (2005) Sodium-calcium exchange inhibitors: therapeutic potential in cardiovascular diseases. *Future Cardiol*, **1**, 519-529.

Iwamoto T, Inoue Y, Ito K, Sakaue T, Kita S, Katsuragi T. (2004a) The exchanger inhibitory peptide region-dependent inhibition of Na⁺/Ca²⁺ exchange by SN-6 [2-[4-(4-nitrobenzyloxy)benzyl]thiazolidine-4-carboxylic acid ethyl ester], a novel benzyloxyphenyl derivative. *Mol Pharmacol*, **66**, 45-55.

Iwamoto T, Kita S, Uehara A, Imanaga I, Matsuda T, Baba A, Katsuragi T. (2004b) Molecular determinants of Na⁺/Ca²⁺ exchange (NCX1) inhibition by SEA0400. *J Biol Chem*, **279**, 7544-7553.

Iwamoto T, Pan Y, Nakamura TY, Wakabayashi S, Shigekawa M. (1998) Protein kinase C-dependent regulation of Na⁺/Ca²⁺ exchanger isoforms NCX1 and NCX3 does not require their direct phosphorylation. *Biochemistry*, **37**, 17230-17238.

Iwamoto T, Shigekawa M. (1998) Differential inhibition of Na⁺/Ca²⁺ exchanger isoforms by divalent cations and isothiourea derivative. *Am J Physiol*, **275**, C423-430.

Iwamoto T, Watano T, Shigekawa M. (1996) A novel isothiourea derivative selectively inhibits the reverse mode of Na⁺/Ca²⁺ exchange in cells expressing NCX1. *J Biol Chem*, **271**, 22391-22397.

Jeon D, Chu K, Jung KH, Kim M, Yoon BW, Lee CJ, Oh U, Shin HS. (2008) Na⁺/Ca²⁺ exchanger 2 is neuroprotective by exporting Ca²⁺ during a transient focal cerebral ischemia in the mouse. *Cell Calcium*, **43**, 482-491.

Jeon D, Yang YM, Jeong MJ, Philipson KD, Rhim H, Shin HS. (2003) Enhanced learning and memory in mice lacking Na⁺/Ca²⁺ exchanger 2. *Neuron*, **38**, 965-976.

Kaur J, Zhao Z, Klein GM, Lo EH, Buchan AM. (2004) The neurotoxicity of tissue plasminogen activator? *J Cereb Blood Flow Metab*, **24**, 945-963.

Kiedrowski L, Brooker G, Costa E, Wroblewski JT. (1994) Glutamate impairs neuronal calcium extrusion while reducing sodium gradient. *Neuron*, **12**, 295-300.

Kinouchi H, Epstein CJ, Mizui T, Carlson E, Chen SF, Chan PH. (1991) Attenuation of focal cerebral ischemic injury in transgenic mice overexpressing CuZn superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci USA*, **88**, 11158-11162.

Klein NC, Cunha BA. (1995) Tetracyclines. *Med Clin N Am*, **79**, 789-801.

Kramer PA, Chapron DJ, Benson J, Mercik SA. (1978) Tetracycline absorption in elderly patients with achlorhydria. *Clin Pharmacol Ther*, **23**, 467-472.

Kuroda S, Tsuchidate R, Smith ML, Maples KR, Siesjö BK. (1999) Neuroprotective effects of a novel nitron, NXY-059, after transient focal cerebral ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab*, **119**, 778-787.

Langevitz P, Livneh A, Bank I, Pras M. (2000) Benefits and risks of minocycline in rheumatoid arthritis. *Drug Saf*, **22**, 405-414.

Lampl Y, Boaz M, Gilad R, Lorberboym M, Dabby R, Rapoport A, Anca-Hershkowitz M, Sadeh M. (2007) Minocycline treatment in acute stroke: an open-label, evaluator-blinded study. *Neurology*, **69**, 1404-1410.

Lee C, Dhalla NS, Hryshko LV. (2005) Therapeutic potential of novel Na⁺-Ca²⁺ exchange inhibitors in attenuating ischemia-reperfusion injury. *Can J Cardiol*, **21**, 509-516.

Lei B, Popp S, Capuano-Waters C, Cottrell JE, Kass IS. (2004) Lidocaine attenuates apoptosis in the ischemic penumbra and reduces infarct size after transient focal cerebral ischemia in rats. *Neuroscience*, **125**, 691-701.

Li Y, Chopp M, Jiang N, Yao F, Zaloga C. (1995) Temporal profile of in situ DNA fragmentation after transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab*, **15**, 389-397.

Lin S, Wei X, Xu Y, Yan C, Dodel R, Zhang Y, Liu J, Klaunig JE, Farlow M, Du Y. (2003) Minocycline blocks 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity and free radical production in rat cerebellar granule neurons. *Life Sci*, **72**, 1635-1641.

Linnik MD, Miller JA, Sprinkle-Cavallo J, Mason PJ, Thompson FY, Montgomery LR, Schroeder KK. (1995) Apoptotic DNA fragmentation in the rat cerebral cortex induced by permanent middle cerebral artery occlusion. *Brain Res Mol Brain Res*, **32**, 116-124.

Lipton SA, Rosenberg PA. (1994) Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N Engl J Med*, **330**, 613-622.

Lo EH, Dalkara T, Moskowitz MA. (2003) Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. *Nat Rev Neurosci*, **4**, 399-415.

Luo J, Wang Y, Chen H, Kintner DB, Cramer SW, Gerds JK, Chen X, Shull GE, Philipson KD, Sun D. (2008) A concerted role of Na⁺-K⁺-Cl⁻ cotransporter and Na⁺/Ca²⁺ exchanger in ischemic damage. *J Cereb Blood Flow Metab*, **28**, 737-746.

Luo J, Wang Y, Chen X, Chen H, Kintner DB, Shull GE, Philipson KD, Sun D. (2007) Increased tolerance to ischemic neuronal damage by knockdown of Na⁺-Ca²⁺ exchanger isoform 1. *Ann N Y Acad Sci*, **1099**, 292-305.

Lytton J. (2007) Na⁺/Ca²⁺ exchangers: three mammalian gene families control Ca²⁺ transport. *Biochem J*, **406**, 365-382.

Maeda K, Hata R, Hossmann KA. (1999) Regional metabolic disturbances and cerebrovascular anatomy after permanent middle cerebral artery occlusion in C57black/6 and SV129 mice. *Neurobiol Dis*, **6**, 101-108.

Majid A, He YY, Gidday JM, Kaplan SS, Gonzales ER, Park TS, Fenstermacher JD, Wei L, Choi DW, Hsu CY. (2000) Differences in vulnerability to permanent focal cerebral ischemia among 3 common mouse strains. *Stroke*, **231**, 2707-2714.

Matsuda T, Arakawa N, Takuma K, Kishida Y, Kawasaki Y, Sakaue M, Takahashi K, Takahashi T, Suzuki T, Ota T, Hamano-Takahashi A, Onishi M, Tanaka Y, Kameo K, Baba A. (2001) SEA0400, a novel and selective inhibitor of the Na⁺-Ca²⁺ exchanger, attenuates reperfusion injury in the in vitro and in vivo cerebral ischemic models. *J Pharmacol Exp Ther*, **298**, 249-256.

Mellors A, Tappel AL. (1966) The inhibition of mitochondrial peroxidation by ubiquinone and ubiquinol. *J Biol Chem*, **241**, 4353-4356.

Miyachi Y, Yoshioka A, Imamura S, Niwa Y. (1986) Effect of antibiotics on the generation of reactive oxygen species. *J Invest Dermatol*, **86**, 449-453.

Molinaro P, Cuomo O, Pignataro G, Boscia F, Sirabella R, Pannaccione A, Secondo A, Scorziello A, Adornetto A, Gala R, Viggiano D, Sokolow S, Herchuelz A, Schurmans S, Di Renzo G, Annunziato L. (2008) Targeted disruption of Na⁺/Ca²⁺ exchanger 3 (NCX3) gene leads to a worsening of ischemic brain damage. *J Neurosci*, **28**, 1179-1184.

Momoi T, Fujita E, Urase K. (2003) Strain-specific caspase-3-dependent programmed cell death in the early developing mouse forebrain. *Neuroreport*, **14**, 111-115.

Nicotera P, Ankarcrona M, Bonfoco E, Orrenius S, Lipton SA. (1997) Neuronal necrosis and apoptosis: two distinct events induced by exposure to glutamate or oxidative stress. *Adv Neurol*, **72**, 95-101.

Papa M, Canitano A, Boscia F, Castaldo P, Sellitti S, Porzig H, Tagliatela M, Annunziato L.

(2003) Differential expression of the Na⁺-Ca²⁺ exchanger transcripts and proteins in rat brain regions. *J Comp Neurol*, **461**, 31-48.

Paxinos G, Franklin KBJ. (2001) The mouse brain in stereotaxic coordinates, 2nd ed. San Diego, Academic Press.

Pignataro G, Esposito E, Cuomo O, Sirabella R, Boscia F, Guida N, Di Renzo G, Annunziato L. (2011) The NCX3 isoform of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger contributes to neuroprotection elicited by ischemic postconditioning. *J Cereb Blood Flow Metab*, **31**, 362-370.

Pignataro G, Gala R, Cuomo O, Tortiglione A, Giaccio L, Castaldo P, Sirabella R, Matrone C, Canitano A, Amoroso S, Di Renzo G, Annunziato L. (2004) Two sodium/calcium exchanger gene products, NCX1 and NCX3, play a major role in the development of permanent focal cerebral ischemia. *Stroke*, **35**, 2566-2570.

Pilitsis JG, Diaz FG, O'Regan MH, Phillis JW. (2001) Inhibition of Na⁺/Ca²⁺ exchange by KB-R7943, a novel selective antagonist, attenuates phosphoethanolamine and free fatty acid efflux in rat cerebral cortex during ischemia-reperfusion injury. *Brain Res*, **916**, 192-198.

Popovic N, Schubart A, Goetz BD, Zhang SC, Linington C, Duncan ID. (2002) Inhibition of autoimmune encephalomyelitis by a tetracycline. *Ann Neurol*, **51**, 215-223.

Quednau BD, Nicoll DA, Philipson KD. (1997) Tissue specificity and alternative splicing of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger isoforms NCX1, NCX2, and NCX3 in rat. *Am J Physiol*, **272**, C1250-1261.

Rosenfeld ME, Palinski W, Ylä-Herttuala S, Butler S, Witztum JL. (1990) Distribution of oxidation specific lipid-protein adducts and apolipoprotein B in atherosclerotic lesions of varying severity from WHHL rabbits. *Arteriosclerosis*, **10**, 336-349.

Sande MA, Mandell GL. (1982) Tetracyclines, chloramphenicol, erythromycin and miscellaneous antibacterial agents. *In The pharmacological Basis of Therapeutics*, eds. Gilman AG, Rall TW, Nies AS and Taylor P, pp.1117-1145. New York, Macmillan.

Shimazawa M, Tanaka H, Ito Y, Morimoto N, Tsuruma K, Kadokura M, Tamura S, Inoue T, Yamada M, Takahashi H, Warita H, Aoki M, Hara H. (2010) An inducer of VGF protects cells from ER stress-induced cell death and prolongs survival in the mutant SOD1 animal models of familial ALS. *PLoS One*, **5**, e15307.

Siesjo BK. (1981) Cell damage in the brain: a speculative synthesis. *J Cereb Blood Flow Metabol*, **1**, 155-184.

Stroke Therapy Academic Industry Roundtable (STAIR). (1999) Recommendations for standards regarding preclinical neuroprotective and restorative drug development. *Stroke*, **30**, 2752-2758.

Takada Y, Yonezawa A, Kume T, Katsuki H, Kaneko S, Sugimoto H, Akaike A. (2003) Nicotinic acetylcholine receptor-mediated neuroprotection by donepezil against glutamate neurotoxicity in rat cortical neurons. *J Pharmacol Exp Ther*, **306**, 772-777.

Tamatani M, Ogawa S, Tohyama M. (1998) Roles of Bcl-2 and caspases in hypoxia-induced

neuronal cell death: a possible neuroprotective mechanism of peptide growth factors. *Mol Brain Res*, **58**, 27-39.

Teng YD, Choi H, Onario RC, Zhu S, Desilets FC, Lan S, Woodard EJ, Snyder EY, Eichler ME, Friedlander RM. (2004) Minocycline inhibits contusion-triggered mitochondrial cytochrome c release and mitigates functional deficits after spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci USA*, **101**, 3071-3076.

Tikka T, Fiebich BL, Goldsteins G, Keinanen R, Koistinaho J. (2001) Minocycline, a tetracycline derivative, is neuroprotective against excitotoxicity by inhibiting activation and proliferation of microglia. *J Neurosci*, **21**, 2580-2588.

Toyokuni S. (1999) Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology. *Pathol Int*, **49**, 91-102.

Wahlgren N, Ahmed N, Dávalos A, Hacke W, Millán M, Muir K, Roine RO, Toni D, Lees KR; SITS investigators. (2008) Thrombolysis with alteplase 3-4.5 h after acute ischaemic stroke (SITS-ISTR): an observational study. *Lancet*, **372**, 1303-1309.

Wang X, Zhu S, Drozda M, Zhang W, Stavrovskaya IG, Cattaneo E, Ferrante RJ, Kristal BS, Friedlander RM. (2003) Minocycline inhibits caspase-independent and -dependent mitochondrial cell death pathways in models of Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, **100**, 10483-10487.

Watano T, Kimura J, Morita T, Nakanishi H. (1996) A novel antagonist, No.7943, of the

Na⁺/Ca²⁺ exchange current in guinea-pig cardiac ventricular cells. *Br J Pharmacol*, **199**, 555-563.

Wells JE, Hurlbert RJ, Fehlings MG, Yong VW. (2003) Neuroprotection by minocycline facilitates significant recovery from spinal cord injury in mice. *Brain*, **126**, 1628-1637.

Wasil M, Halliwell B, Moorhouse CP. (1987) Scavenging of hypochlorous acid by tetracycline, rifampicin and some other antibiotics: a possible antioxidant action of rifampicin and tetracycline? *Biochem Pharmacol*, **37**, 775-778.

Whiteman M, Halliwell B. (1997) Prevention of peroxynitrite-dependent tyrosine nitration and inactivation of α 1-antiproteinase by antibiotics. *Free Radic Res*, **26**, 49-56.

Wu DC, Jackson-Lewis V, Vila M, Tieu K, Teismann P, Vadseth C, Choi DK, Ischiropoulos H, Przedborski S. (2002) Blockade of microglia activation is neuroprotective in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson disease. *J Neurosci*, **22**, 1763-1771.

Yamashita J, Kita S, Iwamoto T, Ogata M, Takaoka M, Tazawa N, Nishikawa M, Wakimoto K, Shigekawa M, Komuro I, Matsumura Y. (2003) Attenuation of ischemia/reperfusion-induced renal injury in mice deficient in Na⁺/Ca²⁺ exchanger. *J Pharmacol Exp Ther*, **304**, 284-293.

Yang G, Chan PH, Chen J, Carlson E, Chen SF, Weinstein P, Epstein CJ, Kamii H. (1994) Human copper-zinc superoxide dismutase transgenic mice are highly resistant to reperfusion injury after focal cerebral ischemia. *Stroke*, **25**, 165-170.

Yoshino H, Hattori N, Urabe T, Uchida K, Tanaka M, Mizuno Y. (1997) Postischemic accumulation of lipid peroxidation products in the rat brain: immunohistochemical detection of 4-hydroxy-2-nonenal modified proteins. *Brain Res*, **767**, 81-86.

Yrjänheikki J, Keinänen R, Pellikka M, Hökfelt T, Koistinaho J. (1998) Tetracyclines inhibit microglia activation and are neuroprotective in global brain ischemia. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**, 15769-15774.

Yrjänheikki J, Tikka T, Keinänen R, Goldsteins G, Chan PH, Koistinaho J. (1999) A tetracycline derivative, minocycline, reduces inflammation and protects against focal cerebral ischemia with a wide therapeutic window. *Proc Natl Acad Sci USA*, **96**, 13496-13500.

Zhang WR, Kitagawa H, Hayashi T, Sasaki C, Sakai K, Warita H, Shiro Y, Suenaga H, Ohmae H, Tsuji S, Itoh T, Nishimura O, Nagasaki H, Abe K. (1999) Topical application of neurotrophin-3 attenuates ischemic brain injury after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Res*, **842**, 211-214.

Zhang C, Lei B, Lam TT, Yang F, Sinha D, Tso MO. (2004) Neuroprotection of photoreceptors by minocycline in light-induced retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **45**, 2753-2759.

Zhu S, Stavrovskaya IG, Drozda M, Kim BY, Ona V, Li M, Sarang S, Liu AS, Hartley DM, Wu DC, Gullans S, Ferrante RJ, Przedborski S, Kristal BS, Friedlander RM. (2002) Minocycline inhibits cytochrome c release and delays progression of amyotrophic lateral sclerosis in mice. *Nature*, **417**, 74-78.

略語一覽表

| | |
|-------------------------------|--|
| AMC | : 7-amino-4- methylcoumarin |
| AMPA | : α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate |
| AS-ODNs | : antisense oligodeoxynucleotides |
| ATP | : adenosine triphosphate |
| ATPase | : adenosine triphosphatase |
| ALS | : amyotrophic lateral sclerosis |
| CA | : cornu ammonis |
| cDNA | : complementary deoxyribonucleic acid |
| DNA | : deoxyribonucleic acid |
| DPPH | : diphenyl- <i>p</i> -picrylhydrazyl |
| ECASS III | : European Cooperative Acute Stroke Study III |
| ECL | : enhanced chemiluminescence |
| EDTA | : ethylenediaminetetraacetic acid |
| EGTA | : ethylene glycol tetraacetic acid |
| FeSO ₄ | : ferrous sulfate |
| GAPDH | : glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase |
| HClO ₄ | : perchloric acid |
| 4-HNE | : 4-hydroxynonenal adducts |
| H ₂ O ₂ | : hydrogen peroxide |
| HR | : heart rate |
| iNOS | : inducible nitric oxide synthase |
| LDH | : lactate dehydrogenase |
| MABP | : mean arterial blood pressure |

| | |
|------------------|---|
| MCAO | : middle cerebral artery occlusion |
| MDA | : malondialdehyde |
| MMP | : matrix metalloproteinase |
| mRNA | : messenger ribonucleic acid |
| NCX | : sodium/calcium exchanger |
| NMDA | : <i>N</i> -methyl-D-aspartate |
| NR | : <i>N</i> -methyl-D-aspartate receptor |
| PB | : phosphate buffer |
| PBS | : phosphate buffer saline |
| pCO ₂ | : carbon dioxide partial pressure |
| PCR | : polymerase chain reaction |
| pO ₂ | : oxygen partial pressure |
| pMCAO | : permanent middle cerebral artery occlusion |
| PVDF | : polyvinylidene fluoride |
| QOL | : quality of life |
| rCBF | : regional cerebral blood flow |
| RNA | : ribonucleic acid |
| rt-PA | : recombinant tissue plasminogen activator |
| SITS-ISTR | : Safe Implementation of Treatments in Stroke-International Stroke Thrombolysis Registry |
| SOD | : superoxide dismutase |
| STAIR | : Stroke Therapy Academic Industry Roundtable |
| TBA | : thiobarbituric acid |
| tMCAO | : transient middle cerebral artery occlusion |

TTC : 2,3,5- triphenyltetrazolium chloride

TUNEL : terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick
end-labeling