

脳梗塞及び脳出血病態の解明と
Neurovascular unit を標的とした
新規治療薬の探索に関する研究

今井 貴彦

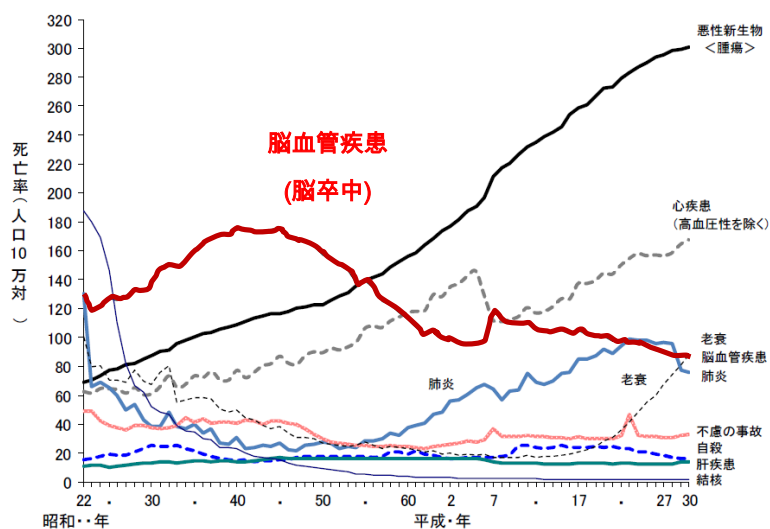
目次

序論	1 頁
第 1 章 マウス脳梗塞及び脳出血モデルに対するフリーラジカル捕捉薬の作用	7 頁
1 節 緒言	
2 節 実験材料及び方法	
3 節 実験成績	
4 節 考察	
第 2 章 マウス出血性脳障害モデルに対する Nrf2 活性化薬の作用	36 頁
1 節 緒言	
2 節 実験材料及び方法	
3 節 実験成績	
4 節 考察	
第 3 章 脳出血病態における細胞内二価鉄蓄積の関与と鉄キレート剤の作用	74 頁
1 節 緒言	
2 節 実験材料及び方法	
3 節 実験成績	
4 節 考察	
総括及び結論	130 頁
謝辞	133 頁
引用文献	134 頁
略語一覧表	149 頁

序論

脳卒中は、2017年の世界各国における罹患者は約1億人、死亡者数は約620万人に及び、世界の死因の第2位に位置づけられる致死率の高い疾患である(1)。日本における死亡者数は約11万人で、悪性新生物、心疾患、老衰に次いで第4位の死因である(厚生労働省 2018年人口動態統計月報年計)(Fig. 1)。発症後には片麻痺

や高次機能障害などの後遺症が残存する可能性が極めて高いため、寝たきり(要介護5)患者の約40%が脳卒中を発症している(厚生労働省 2013年国民生活基礎調査の概況)。また、後遺症の



厚生労働省 2018年人口動態統計月報年計[概数]より改変引用

Fig. 1 The mortality rate of major cause of death (/10⁵ population).

影響により、治療や介護が長期に及ぶため、2017年の脳卒中に対する年間医療費は1兆8,000億円と推計されている(厚生労働省 2017年国民医療費の概況)。近年では、様々な降圧薬の普及(2)や減塩による血圧管理(3)によって脳卒中の死亡者割合は減少したが(4)、脂質摂取量の増加による肥満や動脈硬化症患者の増加に加えて、発症者の多い高齢者人口の増加により、罹患者数は今後も増加することが懸念される(5)(脳卒中データバンク 2015)。上記のように、脳卒中は、高い致死率と後遺症の観点から、患者の身体的・精神的負担だけでなく、患者家族並びに国の医療経済に対しても負担が大きい疾患である。超高齢社会を迎えた日本においては、今後も患者数の増加が予想されるため、国家的な対策が急務といえる。

脳卒中は、「血管の閉塞」が原因となる脳梗塞と「血管の破裂」が原因となる脳出血及びくも膜下出血に大きく分類される (Fig. 2)。脳梗塞は脳卒中の約 76%を占めており (脳卒中データバ

ンク 2015)、血管の閉塞や狭窄により脳への血液供給が遮断され、脳組織が壊死する疾患である。閉塞した血管の太

さや発症原因によってラクナ梗塞、アテローム血栓性脳梗塞、心原性脳塞栓症、そして一過性脳虚血発作に分類される (米国 NINDS 分類 第三版)。発症からの時間経過に伴って梗塞巣の拡大や神経死が進行し、片麻痺や認知障害、失語症などの高次機能障害を招き、最悪の場合死に至るため (6)、閉塞血管の再開通と脳血流を回復させることが重要である (7)。脳卒中治療においては、これまでの臨床試験のエビデンスをもとに、治療推奨度がグレード A から D の 5 段階で定められており (Table 1)、フリーラジカル捕捉薬 (エダラボン; グレード B) や抗血小板薬 (アスピリン、オザグレル、クロピトグレル; グレード A、B) 、そして抗凝固薬 (ヘパリン、ワルファリン; グレード B、C1) など様々な薬剤が用いられ

ている。なかでも、発症 4.5 時間以内の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) 静脈内投与による血栓溶解療法が患者転帰において良好な治療成績を示している (8, 9) (グレード A)。しかし、脳梗塞の発症は突発的であるため、rt-PA の投与可能時間を超過した状態の患者は多く、2018 年の国内における rt-PA 使用率

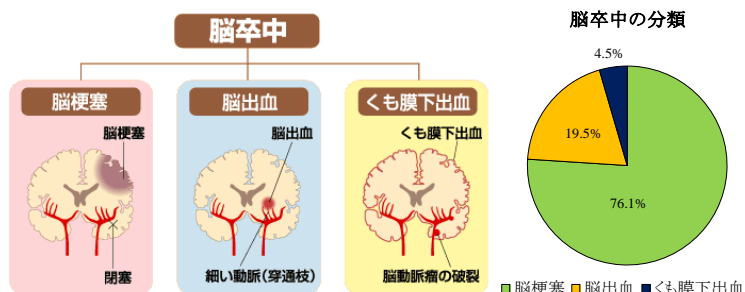


Fig. 2 The category types of stroke.

倉敷中央病院 HP (https://www.kchnet.or.jp/about_us/knews/vol10/) 及び脳卒中データバンク 2015 より改変引用

Table 1 The recommendation grade in stroke therapy.

推奨グレード	内容
A	行うように強く勧められる
B	行うように勧められる
C1	行うことを考慮してよいが、十分な科学的根拠がない
C2	科学的根拠がないので、勧められない
D	行わないよう勧められる

脳卒中ガイドライン 2015 より改変引用

は急性期脳卒中患者の全体約 7~8%である (国立循環器病研究センターHP)。加えて、rt-PA や抗血小板薬、抗凝固薬の使用は致命的な頭蓋内出血を発症するリスクがあるなど (10)、臨床上の課題は多い。

脳出血は脳梗塞治療に伴って発症するケースもあるが、多くの場合が加齢や高血圧及び動脈硬化症などの生活習慣病によって脆くなった動脈が破裂し、血液成分が脳内に拡がることにより発症する (11, 12)。漏出した血液は血腫を形成し、周辺組織を障害することで神経症状を引き起こす (13)。血腫の拡大に伴う頭蓋内圧の亢進は共通の所見であるが、出血した部位や出血量によって症状は様々である (14, 15)。また、脳出血発症患者は脳梗塞よりも寝たきりになる割合が多い (脳卒中データバンク 2015)。脳出血治療は、血腫が大きい (31 mL 以上)、あるいは脳室内に及ぶ症例に対しては血腫除去術が施行される (グレード C1)。また、降圧薬による血圧管理が予後改善に重要であり、収縮期血圧 140 mmHg 以下を維持することが推奨されている (グレード B, C1)。続発する脳浮腫や頭蓋内圧亢進に対しては、高張グリセロールやマンニトールが使用される (グレード C1)。脳出血発症後には、血腫によって発症早期と後期に様々な障害が引き起こされるが、その機序には不明な点が多い。加えて、現在の治療法の多くは対症療法であり、グレード C1 の有効性に明確なエビデンスがないものも多い。脳出血の病態解明や治療薬の開発は、脳梗塞治療における出血リスク低減方法の構築にもつながり、その医学的意義は大きい。

脳卒中病態は血管の損傷が原因であり、血液脳関門 (blood brain barrier: BBB) の障害は病態の発生及び悪化に大きく関与している (16)。BBB は脳毛細血管に存在し、血管内皮細胞、ペリサイト、アストロサイト、細胞外マトリックスから構成される組織であり、神経細胞やミクログリアと神経血管ユニット (neurovascular unit: NVU) を構築している (Fig. 3) (17)。BBB の主要な機能として、脳と末梢組織間のバリアー機能が挙げられる。BBB 構成細胞の一つである内皮細胞は、隣接する細胞間同士で強固

な間結合 (タイトジャンクション及びアドヘレンスジャンクション) を形成し、薬物や障害誘発性物質などの脳実質内への移動を制限する役割を持つことに加えて (18)、物質選択的な輸送体の発現

を介してグルコースや乳酸などの栄養素を取り込む働きもあり、BBB 構造やその機能において中核を担う (17)。また、内皮細胞を被覆するように存在するペリサイトは、内皮細胞と相互作用することにより血

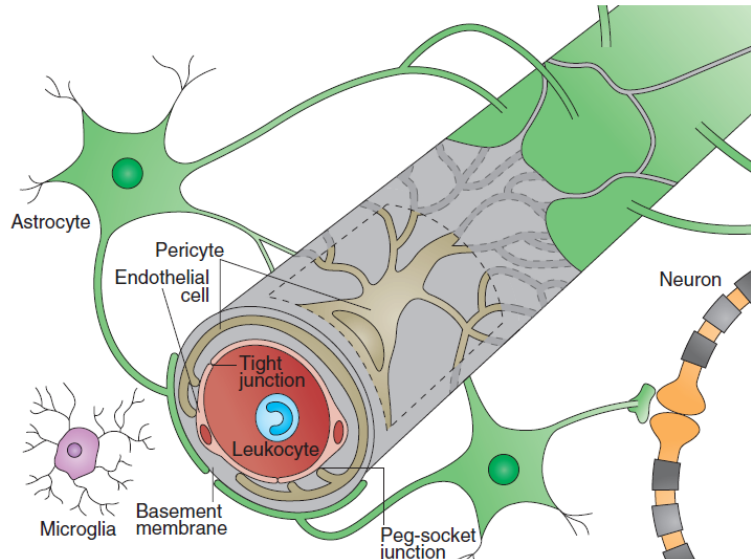


Fig. 3 Blood brain barrier and neurovascular unit in brain capillary.

文献 (Obermeier B *et al.*, Nat Med. 2013) より引用

管の安定性や血流及び血管新生の調節を担っているため、ペリサイトの喪失は BBB 機能障害を引き起こす (19)。加齢や病的ストレスなどは、タイトジャンクションなどの内皮細胞間の結合因子の変化やペリサイトの脱離を引き起こし、BBB の整合性の喪失により、血管の透過性を亢進させる (20)。その結果、BBB バリアー機能の低下により、血液成分が脳実質組織中へ漏出し、免疫担当細胞の浸潤に伴う炎症反応や神経細胞死を引き起こす (21)。脳虚血後には BBB 透過性亢進や破綻が原因となって、脳出血や浮腫が誘発され、二次的な梗塞巣の拡大が生じ、重篤な神経障害や生存率の低下をもたらす (17, 18)。脳卒中病態に起因する BBB 障害後の二次的な脳障害は発症数日以内に生じる (21-23)。これらの知見から、急性期治療の一環として BBB 障害を予防または緩和することは、二次的な神経症状の悪化を抑制し、神経症状が原因となる要介護者数の減少につながると考えられる。

様々な神経変性疾患の発症及び進行に酸化ストレスの関与が報告されているが (24)、脳卒中病態においても同様である (25)。加齢または高血圧症や糖尿病などの生活習慣病は、酸化ストレスを惹起し血管の脆弱性を亢進することで、BBB 障害を徐々に引き起こす (17, 26)。脳梗塞時には、血流低下に伴う低酸素及び低栄養状態によるエネルギー枯渇、アシドーシスの亢進、グルタミン酸の増加、マトリックスメタロプロテアーゼ (matrix metalloproteinases: MMPs) 活性化などにより活性酸素種

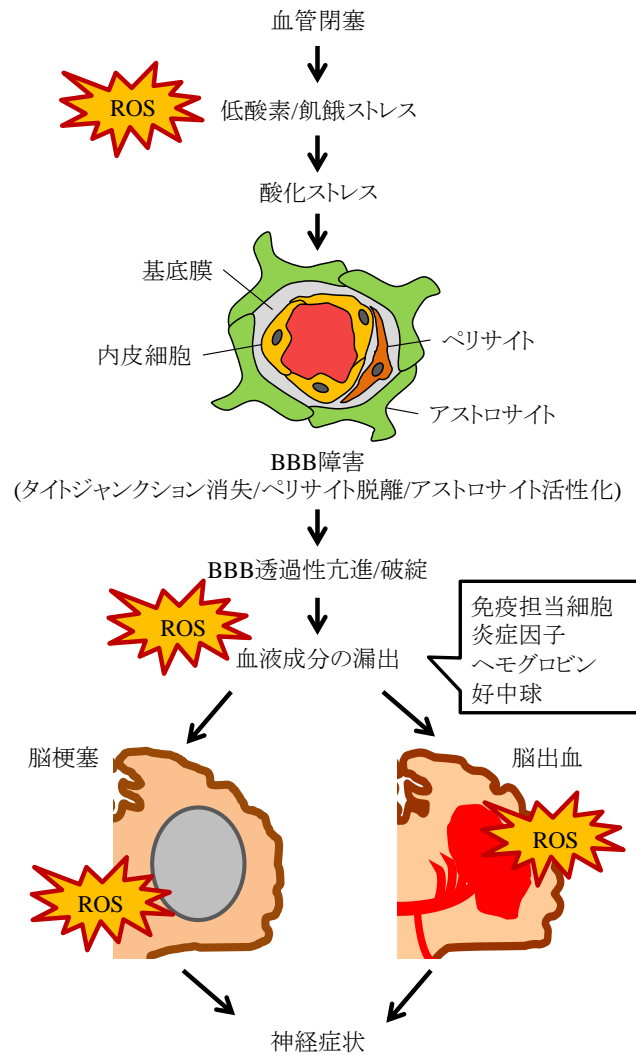


Fig. 4 ROS contributes to BBB damage in stroke.

(reactive oxygen species : ROS) の産生量が亢進する (27)。さらに、脳梗塞時の有効な治療法である rt-PA を用いた血栓溶解による再灌流は、血流回復後の急激な酸素流入に伴って ROS が過剰に産生され、酸化ストレスを引き起こし、病態の悪化を招く場合がある (28, 29)。脳出血発症後にも、血腫成分が ROS 産生の増加を介して周辺組織に酸化ストレスを誘発する (30) (Fig. 4)。虚血再灌流時や出血時に増加する ROS 産生に伴う酸化ストレスは脳卒中病態を悪化させるため、その制御は予後悪化の抑制に重要であるが、ROS の発生要因やその制御機構は複雑である。現在では、脳梗塞後の再灌流時に発生するフリーラジカルを除去することを目的とした脳保護薬と

して、上述したエダラボンが臨床応用されている (31) (グレード B)。エダラボンは、基礎並びに臨床研究で有効性が実証されているが、腎排泄型の薬剤であり副作用として重篤な腎障害を引き起こすことが懸念されている (32)。脳卒中罹患者の多くが腎機能の低下している高齢者であることから、エダラボンの使用は制限される場合がある。そのため、新たな脳保護薬開発を目的に多くの臨床試験が行われたが、エダラボンに対して優位性を示したものは未だ存在しない (33-35)。このことから、新たな治療薬創出のため、脳卒中病態下での酸化ストレスの発生機序やその制御機構及び BBB への影響をより詳細に理解することが重要である。

本研究では、酸化ストレスが脳梗塞や脳出血などの脳卒中病態に対して及ぼす影響とその制御を目的として検討を行った。第 1 章ではマウス脳梗塞及び脳出血モデルを用いて、病態時に増加する酸化ストレスへの対抗策としてフリーラジカル捕捉薬の有用性を検討した。第 2 章では、脳虚血再灌流後の出血性梗塞モデル並びに自己血注入脳出血モデルを用いて、生体内の抗酸化ストレス機構を賦活化させる Nrf2 活性化薬による BBB 構造や神経細胞に対する保護作用を検討した。第 3 章では、酸化ストレスの原因となる ROS の供給源として、生体の必須元素である鉄に着目し、出血時に放出されるヘモグロビンやその代謝産物のヘミンなどが鉄蓄積を介して BBB 構造や神経細胞に及ぼす影響並びに鉄キレート剤の脳出血病態に対する作用について検討した。

第1章 マウス脳梗塞及び脳出血モデルに対するフリーラジカル捕捉薬の作用

第1節 緒言

脳梗塞は、生活習慣病や心臓病などの基礎疾患を含む何らかの原因で脳血管が閉塞することにより発症する疾患であり、閉塞時間の経過に伴い片麻痺や意識障害、認知機能障害などの様々な高次機能障害を引き起こすだけでなく、場合によっては死につながる (6)。そのため、速やかに血流を再開通 (再灌流) させることが患者の予後に重要とされている (7)。治療においては、発症 4.5 時間以内の rt-PA 静脈内投与による血栓溶解療法が有効であり、強く推奨されている (脳卒中治療ガイドライン 2015; グレード A) (8, 9)。一方、再灌流に伴う急激な血液流入は、ROS の増加を起因とした酸化ストレスの誘発を引き起こし、虚血により脆弱性が亢進した神経細胞や BBB に損傷を与えることが懸念される (36)。上記の現象は再灌流障害とされ、重篤な脳障害を引き起こす場合がある (37)。特に、臨床試験において発症 4.5 時間以降の血栓溶解療法を行った際に生じる再灌流障害は、致死的な頭蓋内出血を引き起こすことが示唆されており (10)、本治療は投薬までの時間が制限されている (rt-PA 静注療法 適正治療指針 第二版)。そのため、再灌流時の出血リスクを軽減し rt-PA の適応時間を延長することは、患者の予後改善に大きく貢献すると考えられる。

フリーラジカル捕捉薬であるエダラボンは、過剰な ROS を捕捉することにより酸化ストレスを抑制する。本剤は、脳梗塞発症急性期の脳保護薬として本邦で 2001 年に承認されており、血栓溶解療法施行時にも併用される (31, 38)。国内第 III 相試験においても、発症 72 時間以内の脳梗塞患者における転帰の改善に有効性が示されている (39)。これまでに、抗酸化剤である NXY-059、カルシウム拮抗薬であるニモジピン、遺伝子組み換え型ヒトエリスロポエチンなど数多くの臨床試験が行われてきたが、現時点で脳梗塞に対して有効性が示された薬剤はエダラボンのみである (33-35)。しかし、市販後調査においては感染症の合併、高度な意識障害、重篤な腎機能障害などの副

作用を引き起こすことが報告されているため(32)、エダラボンに代わる新たな脳保護薬の開発が喫緊の課題である。

NSP-116 [4-(4-acetylpiperazin-1-yl)-2-(1H-imidazol-1-yl) aniline] は、日本曹達株式会社により創製されたフリーラジカル捕捉薬である (Fig. 5)。本薬剤は、経口投与可能である点、血中濃度のピーク到達までの時間が 1 時間と非常に速い点、フリーラジカル抑制作用や脂質過酸化抑制作用がビタミン E 誘導体のトロロックスと同程度である点が報告されており (40)、有効性及び服薬コンプライアンスの向上が期待できる。また、当研究室においても、*in vitro* 及び *in vivo* 光誘発網膜障害モデルに対して NSP116 投与が保護作用を示したことを報告している (40)。

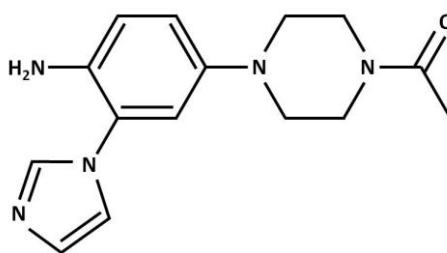


Fig. 5 The structure of NSP-116.

本章では、エダラボン以外に有効な脳保護薬が存在しない脳卒中治療の現状を鑑みて、フリーラジカル捕捉薬 NSP-116 処置が脳梗塞病態に及ぼす影響を以下の観点から評価した。まず、*in vitro* 過酸化水素 (hydrogen peroxide: H_2O_2) 処置神経細胞障害モデル並びにマウス中大脳動脈閉塞術 (middle cerebral artery occlusion: MCAO) により作製した脳虚血マウスモデルを用いて、神経細胞死や梗塞巣形成及び神経症状に及ぼす影響を検討した。また、脳梗塞治療時には再灌流に伴い脳出血が併発する (10)。この出血リスクの低減は rt-PA の使用時間延長や患者の予後改善につながる。そのため、同薬の脳出血病態に及ぼす影響を、脳実質内へのコラゲナーゼ注入による脳出血マウスモデル並びに *in vitro* コラゲナーゼ処置血管内皮細胞障害モデルを用いて、出血量及び神経症状や脳毛細血管内皮細胞に及ぼす影響を検討した。

第2節 実験材料及び方法

2-1 実験材料

実験に用いた薬物及び試薬は以下の通りである。

ヒト神経芽細胞腫 (human neuroblastoma cells; SHSY5Y cells) は the European Collection of Cell Culture (Wiltshire, UK)、ヒト脳毛細血管内皮細胞 (Human brain microvascular endothelial cells: HBMVECs) は DS Pharma Biomedical (Osaka, Japan)、グリシン、ジメチルスルホキシド (dimethyl sulfoxide: DMSO)、Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM)、Blocking One-P は Nacalai Tesque (Kyoto, Japan)、ウシ胎児血清 (fetal bovine serum: FBS) は VALEANT (Costa Mesa, CA, USA)、ストレプトマイシン、ペニシリンは Meiji Seika ファルマ株式会社 (Tokyo, Japan)、Endothelial cells basal medium (EBM)TM-2 BulleKitTM は Lonza (Basle, Switzerland)、6-アミノヘキサミン酸、Igepal CA-630、イムノスター[®]LD、塩酸、H₂O₂、デオキシコール酸ナトリウム、ドデシル硫酸ナトリウム (sodium dodecyl sulfate: SDS)、SDS ポリアクリルアミドゲル、トリプシン、メタノール、2-メルカプトエタノール、Sample Buffer Solution (2ME+)(×4)、リン酸緩衝液 (phosphate buffered solution: PBS)、カルボキシメチルセルロースナトリウム (sodium carboxymethyl cellulose: CMC) は富士フイルム和光純薬株式会社 (Osaka, Japan)、塩化ナトリウム、ペントバルビタールはキシダ化学株式会社、phosphatase inhibitor cocktails 2、phosphatase inhibitor cocktails 3、protease inhibitor、mouse monoclonal anti-β-actin、トリフェニルテトラゾリウム塩化物 (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride:TTC)、細菌性コラゲナーゼ (collagenase VII-S) は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)、Immobilon[®]は Merck Millipore Co. (Darmstadt, Germany)、ウェルコート用機材のコラーゲン は Cellmatrix[®] Nitta Zelatin Inc. (Osaka, Japan)、ROS 検知プローブ [5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester:

CM-H₂DCFDA], Hoechst33342, propidium iodide (PI) は Molecular Probes (Eugene, OR, USA)、ミトコンドリア膜電位測定キット (JC1 assay kit)、タンパク質定量キット (BCA Protein Assay kit)、HRP-conjugated goat anti-rabbit antibody、HRP-conjugated goat anti-mouse antibody は Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)、Cell Counting Kit-8 (CCK-8) は同仁化学研究所 (Kumamoto, Japan)、Can Get Signal Solution 1 及び 2 は TOYOBO Co., Ltd. (Osaka, Japan)、Tween 20 溶液 (Tween)、Triton X-100、トリスは Bio-Rad Lab (Hercules, CA, USA)、rabbit polyclonal anti-cleaved caspase-3、rabbit polyclonal anti-poly (adenosine diphosphate)-ribosepolymerase (PARP) は Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)、栓子用ナイロンフィラメント (8-0 nylon monofilament) は Ethicon (Somerville, NJ, USA)、栓子用シリコンコート剤 (a mixture of silicone resin) は Provil novo (Heraeus Kulzer GmbH, Hanau, Germany)、ヘモグロビン測定キット (Hemoglobin assay kit) は BioAssay Systems (Hayward, CA, USA)、酸素ガス (O₂) は大陽日酸株式会社 (Tokyo, Japan)、笑気ガス (N₂O) は昭和電工株式会社 (Tokyo, Japan)、インフルランは Mylan (Tokyo, Japan) から購入した。

NSP-116 は日本曹達株式会社 (Tokyo, Japan) より供与頂いた。

2-2 *In vitro* における実験方法

2-2-1 ヒト神経芽細胞腫 (SHSY5Y cells) 及びヒト脳毛細血管内皮細胞 (HBMVECs) の培養

SHSY5Y 細胞は、10%FBS、100 U/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシンを添加した DMEM を用いて、37°C、5%CO₂ の条件で培養した。HBMVECs は、コラーゲンコート を 事前に 施した デッシュュ において、EBMTM-2 BulleKitTM (endothelial cells basal medium 500 mL、FBS 10 mL、hydrocortisone 0.2 mL、human fibroblast growth

factors- β 2 mL、vascular endothelial growth factor 0.5 mL、recombinant analog of insulin-like growth factor 0.5 mL、ascorbic acid 0.5 mL、human epidermal growth factor 0.50 mL、gentamicin/amphotericin-B 0.5 mL、heparin 0.5 mL) 中に含まれる成長因子や抗生物質を添加した EBM-2 培地を用いて同条件で培養した。それぞれの細胞は 80%コンフルエントに達した段階でトリプシン処理により継代を行った。

2-2-2 *In vitro* H₂O₂ 誘発神経細胞障害モデルの作製

SHSY5Y 細胞を 96 well plate 中では 10⁴ cells/well、12 well plate 中では 10⁵ cells/well の密度で播種し、5%CO₂ の条件下で 1 日間培養した。培地を 1%FBS 含有の DMEM に交換した後、各ウェルにおける終濃度が 200 μ M になるように H₂O₂ を添加し、12 時間培養することで細胞死を惹起した。

2-2-3 *In vitro* コラゲナーゼ誘発血管内皮細胞障害モデルの作製

過去の報告に従って障害モデルを作製した (41)。HBMVECs を 96 well plate 中に 5,000 cells/well の密度で播種し、5%CO₂ の条件下で 80%コンフルエントになるまで培養した。コラゲナーゼの終濃度が 30 U/mL になるように培地を調整し、各ウェルに添加し、4 時間培養することで細胞死を惹起した。

2-2-4 *In vitro* における NSP-116 の調製と処置

NSP-116 原末を DMSO に溶解し、10 mM のストック溶液を作製した。ストック溶液は PBS を用いて DMSO の終濃度は 0.1% になるように希釈し、各ウェルにおける終濃度が 0.1-10 μ M となるように調製した。その後、H₂O₂ 誘発神経細胞障害モデルにおいては H₂O₂ 処置の 1 時間前 (事前処置; Pre-treatment) または H₂O₂ 処置と同時 (共処置; Co-treatment) に NSP-116 ストック溶液を添加した。また、コラゲナーゼ誘発血管内

皮細胞障害においてはコラゲナーゼ処置と同時に NSP-116 ストック溶液を添加した。

2-2-5 細胞生存活性評価

2-2-2 の手順に従って細胞障害モデルを作製した後に、CCK-8 を用いて生細胞の nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) によって還元されるホルマザンを測定し、細胞の生存活性を評価した。CCK-8 試薬を 10 μ L 各ウェルに添加し、添加直後 (0 時間後) と 3 時間インキュベート後の吸光度 (450 nm 及び 650 nm) をマイクロプレートリーダー (Varioskan Flash 2.4; Thermo Fisher Scientific) により測定し、変化量を算出した。

2-2-6 細胞死評価

2-2-2 または 2-2-3 の手順に従って細胞障害モデルを作製した後に、Hoechst33342 (終濃度 8.1 μ M) 及び PI (終濃度 1.5 μ M) を添加することで全細胞と死細胞をそれぞれ染色し、BIOREVO BZ-X710 (Keyence, Osaka, Japan) にて観察した。その後、ImageJ (version 1.43 h; National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) を用いて全細胞数における死細胞数を計測し、死細胞率を算出した。

2-2-7 細胞内 ROS 蓄積評価

2-2-2 の手順に従って細胞障害モデルを作製した後に、 H_2O_2 、ヒドロキシラジカル、ペルオキシ亜硝酸などを含む細胞内 ROS を検出することができる CM- H_2 DCFDA (終濃度 10 μ M) を各ウェルに添加し、37°C で 30 分間インキュベートした。その後、吸光度 (495 nm 及び 527 nm) をマイクロプレートリーダーにより測定した。測定値は、2-2-5 の手順で行った生細胞数 (全細胞数 - 死細胞数) で補正した。

2-2-8 ミトコンドリア膜電位評価

2-2-2 の手順に従って細胞障害モデルを作製した後に、ミトコンドリアの膜電位により蛍光波長を変化させる膜透過性色素 JC1 を用いてミトコンドリア膜電位を評価した。JC1 試薬 (終濃度 2 μM) を各ウェルに添加し、37°C で 30 分間インキュベートした。その後、吸光度 (540/605 nm 及び 480/510 nm) をマイクロプレートリーダーにより測定した。JC1 の蛍光波長は、正常状態を表す凝集型ミトコンドリアにおいては赤色 (540/605 nm) を示し、これは膜電位が過分極状態であることを示す。一方、 H_2O_2 処置などにより障害が惹起されることで異常ミトコンドリアを示すモノマー型ミトコンドリアが増加し、緑色 (480/510 nm) の脱分極状態にシフトする。測定値から緑色/赤色 (Green fluorescence/Red fluorescence; G/R) の比をとり、Hoechst33342 を用いた核染色により全細胞数で補正をかけることでミトコンドリア膜電位を算出した。また、BIOREVO BZ-X710 にて赤色及び緑色の蛍光波長における細胞形態をウェル毎に観察し、撮影した。

2-2-9 ウェスタンブロット法によるタンパク質発現量の評価

2-2-9-1 タンパク質抽出

2-2-2 の手順に従って細胞障害モデルを作製した後に、細胞を PBS で洗浄した。Protease inhibitor、phosphatase inhibitor cocktails 2 及び 3 を含む RIPA buffer [50 mM トリス塩酸 (pH 8.0)、150 mM 塩化ナトリウム、0.5% デオキシコール酸ナトリウム、0.1% SDS、1% Igepal CA-630] の混合液を各ウェルに 100 μL 添加し、細胞溶解液を採取した。その後、4°C にて 12,000 $\times g$ で 20 分間遠心し、上清を回収することでタンパク質抽出液とした。

2-2-9-2 タンパク質の定量及び泳動サンプルの調製

回収したタンパク質抽出液におけるタンパク質定量は BCA protein assay kit を用いて行った。段階希釈したウシ血清アルブミンを用いて標準曲線を作製するとともに、タンパク質抽出液を 96 well plate の各ウェルに 10 μ L ずつ添加し、それぞれのウェルに Thermo Pierce BCA protein assay reagent A 液と B 液を 50:1 で混合した溶液を 200 μ L ずつ添加し、37°C、30 分間反応させた。その後、マイクロプレートリーダーを用いて吸光度 (570 nm) を測定し、それぞれのタンパク質量を定量した。タンパク質溶液は protease inhibitor、phosphatase inhibitor cocktails 2 及び 3 を含む RIPA buffer 及び 20%2-メルカプトエタノール含有 4 \times sample buffer solution を用いて、2 μ g/10 μ L とした。調製後に 100°Cの熱湯で 5 分間煮沸し、サンプルは-80°Cに保存した。

2-2-9-3 電気泳動及び転写

SDS ポリアクリルアミドゲル (Super Sep 5-20%) を泳動装置にセットし、緩衝液 (25 mM トリス、192 mM グリシン、3.5 mM SDS) で容器内を満たした。サンプルを氷上で解凍し、1 レーンあたりに各サンプルを 10 μ L 添加した。分子量マーカーは 2 μ L を添加した。サンプルを添加後、ゲル 1 枚につき 20 mA で泳動を行った。泳動後、ゲルを cathode buffer (25 mM トリス、40 mM 6-アミノヘキサン酸、20%メタノール) に 15 分間浸透させた。転写膜 (Immobilon[®]) は、メタノールに 30 秒間浸透させた後、超純水に 15 分間浸透した。その後、anode buffer 2 (25 mM トリス、20%メタノール) に 20 分間浸透した。陽極側から、anode buffer 1 (0.3 M トリス、20%メタノール) に浸透させたろ紙、anode buffer 2 に浸透させたろ紙、転写膜、ゲル、cathde buffer に浸透させたろ紙の順に積み上げ、膜 1 枚につき 100 mA で 45 分間転写した。

2-2-9-4 タンパク質発現量の解析

転写後、0.05% Tween20 含有 50 mM トリス緩衝液 (Tris buffered saline: TBS)

(T-TBS; 10 mM トリス、40 mM トリス塩酸、15 mM 塩化ナトリウム) で洗浄し、転写膜を Blocking One-P に浸透させることで 30 分間ブロッキングした。その後、T-TBS で洗浄後、Can Get Signal Solution 1 で一次抗体を希釈し、4°Cで一晩浸透した。再び T-TBS で洗浄後、Can Get Signal Solution 2 で二次抗体を希釈して室温にて 1 時間浸透し反応させた。その後、T-TBS で洗浄し、イムノスター[®]LD 中で 5 分間浸透した。その後、Amersham Imager 680 (Fujifilm、Tokyo、Japan) を用いてバンドを検出し、バンドの強度を数値化した後に β -actin に対する比として個々の値を算出した。各群の平均値を算出し、未処置群 (Control 群) の発現強度を 1 として発現量を比較した。

一次抗体には、rabbit polyclonal anti- PARP (1:1,000)、rabbit polyclonal anti-cleaved caspase-3 (1:1,000) 及び mouse monoclonal anti- β -actin (1:2,000) を用いた。二次抗体には、HRP-conjugated goat anti-rabbit antibody (1:2,000)、HRP-conjugated goat anti-mouse antibody (1:2,000) を用いた。

2-3 *In vivo* における実験方法

2-3-1 実験動物

6 または 8 週齢雄性非近交系 ddY マウスは日本エスエルシー株式会社 (Shizuoka、Japan) より購入した。全てのマウスは設定温度: $24 \pm 2^\circ\text{C}$ 、設定湿度: $55 \pm 10\%$ 、明暗各 12 時間 (照明: 午前 8 時~午後 8 時) に維持された本学 6 階動物飼育室にて飼育した。マウスはプラスチック製ケージ (縦 24.5×横 17.5×高さ 12.5 cm) を用い、自由給水化で固形飼料 (CE-2; 日本クレア株式会社、Tokyo、Japan) にて飼育した。実験を行うにあたっては、岐阜薬科大学動物飼育・動物実験委員会に動物実験承認申請を行い、許可を得た上で実施した。

2-3-2 中大脳動脈閉塞脳虚血モデルの作製

中大脳動脈閉塞術 (MCAO) を施行することにより一過性脳虚血再灌流モデル (transient-MCAO: t-MCAO) と永久閉塞モデル (permanent-MCAO: p-MCAO) をそれぞれ作製した (42, 43) (Fig. 6)。笑気ガス 70%/酸素ガス 30%の条件下で、大型麻酔器 (Soft Lander、新鋭工業株式会社、Saitama、Japan) を用いて、イソフルランを麻酔導入時には 2~3%、維持時は 1~2% で吸入させた。イソフルラン麻酔下でマウスを仰向けに固定し、頸部を切開した。始めに左総頸動脈 (common carotid artery: CCA) を露出させた後に、糸で結紮した。つぎに左外頸動脈 (external carotid artery: ECA) を同様に糸で結紮した。血管ハサミを用いて総頸動脈に穴をあけ、そこから先端 4~6 mm をシリコンでコーティングした 8-0 ナイロンモノフィラメント栓子を挿入し、左内頸動脈 (internal carotid artery: ICA) を経由して中大脳動脈 (MCA) を閉塞した。その後、栓子を血管内に留置した状態で内頸動脈を糸で結紮し、切開部を縫合した。

t-MCAO モデルの作製の際には、1 時間または 2 時間後に再度イソフルラン吸入により麻酔を施し、頸部の縫合と内頸動脈の結紮を解除した後に、栓子を引き抜くことで血流を再開による再灌流を施した。永久閉塞モデルにおいてはサンプリング時まで栓子をそのまま留置した。偽処置群 (Sham) では、麻酔下で頸部切開のみを施した。

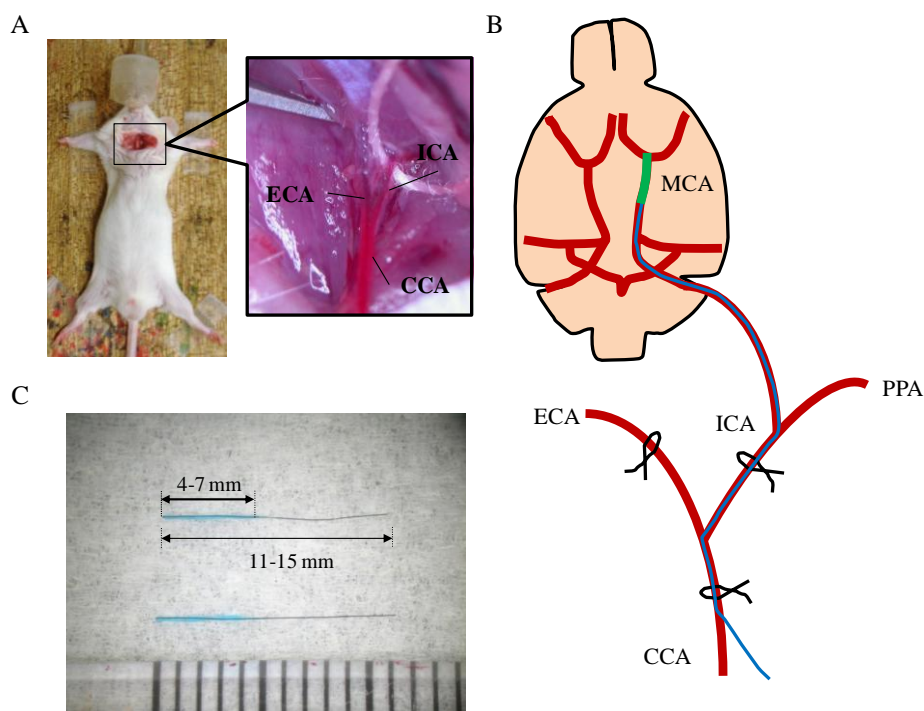


Fig. 6 The procedure of establishment nylon monofilament MCAO model.

(A) Under anesthesia, mice were incised the neck skin and exposure the common carotid artery (CCA). (B) After ligation of CCA, external carotid artery (ECA) was also ligated. Next, a silicon-coated nylon mono filament was inserted from CCA to middle cerebral artery (MCA) *via* internal carotid artery (ICA) to occlude vessels in MCA area. (C) The image of silicon-coated nylon mono filaments. PPA: pterygopalatine artery.

2-3-3 コラゲナーゼ誘発脳出血モデルの作製

2-3-2と同様に大型麻酔器にイソフルランを充填しマウスに麻酔を施し、当研究室の過去の報告をもとに脳出血 (intracranial hemorrhage: ICH) モデルを作製した (Fig. 7) (41)。麻酔下でマウスの頭皮を切開し、頭蓋骨を露出させ、ブレグマ (十字縫合) から左側方 2 mm に 18G 針 (TERUMO、Tokyo、Japan) を用いて頭蓋骨に小孔をあけた。その穴からコラゲナーゼ (0.9 U/ μ L) を 0.5 μ L 充填したハミルトンシリンジ (Hamilton syringes 7000 series syringes、Hamilton Company、Reno、NV、USA) を刺し込み、1 分間維持、約 2 分かけて内容液を左基底核 (深さ 3.5 mm) に注入、溶液の組織への浸透のため 3 分間維持、そして液漏れや逆流を避けるため約 1 分間かけてシリンジをゆっくりと引き抜いた。術部は麻酔下で縫合した。偽処置群 (Sham) では、

麻酔下で頭皮切開し頭蓋骨露出のみを施した。本検討では、患者において ICH の好発部位である被殻を含む線条体部に出血を誘導した (脳卒中データバンク 2009)。

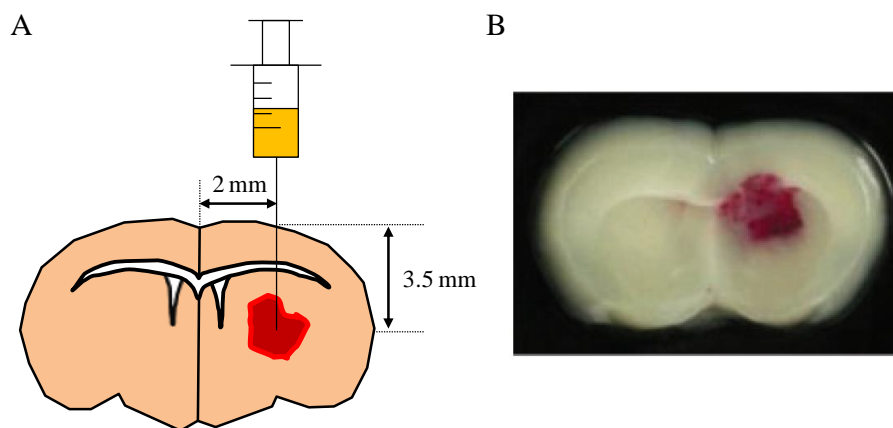


Fig. 7 The scheme of establishment collagenase-induced ICH model and a brain slice image after ICH.

(A) Collagenase VII-S (0.45 U/ 0.5 μ L) was injected into brain striatum. Injection point was 0.0 mm anterior and 2 mm lateral to the bregma at a depth of 3.5 mm. (B) Image of a hemorrhagic brain slice after 24 hours. (Takagi T, *et al.*, Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism. 2017)

2-3-4 *In vivo* における NSP-116 の調整と投与

NSP-116 原末を 0.5% CMC 溶液に懸濁し、t-MCAO モデルにおいては MCAO 処置の直前と再灌流の直後に経口用ゾンデ (Fuchigami, Kyoto, Japan) を用いて、NSP-116 (30 mg/kg) を経口投与 (p.o.; 10 mL/kg) した。p-MCAO モデルにおいては MCAO 処置の直前と直後に NSP-116 (30 mg/kg) を計 2 回経口投与した。一方、脳出血モデルにおいては 1 日前 (Pre 群) または脳出血誘導直後 (Post 群) に NSP-116 (30 mg/kg) をそれぞれ 1 回経口投与した。Vehicle 群においては 0.5% CMC 溶液のみを 10 ml/kg 経口投与した。

2-3-5 脳血流量評価

t-MCAO モデルにおいてのみ脳血流量を測定した。イソフルラン吸入により麻酔を施し、マウスの頭皮を切開し頭蓋骨を露出した。レーザースペックル血流計

(LSFG-ANM; Softcare Co., Ltd., Fukuoka, Japan) を用いて MCAO 処置直前 (Pre-MCAO) の脳血流量 (Cerebral blood flow: CBF) 画像を撮影した。その後、2-3-2 の手順に従って MCAO を施すことにより脳虚血モデルを作製し、MCAO 直後 (Post-MCAO) と再灌流直後 (Post-Reperfusion) の CBF 画像を同様に撮影した。撮影した画像をソフトウェア (Laser speckle imaging system, Omegazone; Omegawave, Inc.; Tokyo, Japan) に取り込み、梗塞側 (Ipsilateral side) と対側 (Contralateral side) の MCA 領域の CBF 量をそれぞれ測定した。CBF 量は対側との比により算出した。

2-3-6 Garcia 試験による神経症状評価

2-3-2 または 2-3-3 の手順に従って病態モデルを作製した後、過去の論文をもとに行動観察による神経症状の評価を行った (44)。脳虚血モデルにおいては誘導 1 日後、脳出血モデルにおいては誘導 3 日後に Garcia 試験を行った。Garcia 試験は、6 種類の項目をそれぞれスコアリングすることにより評価することから総合的な神経機能の評価を行うことができる。それぞれの項目は、(1) 5 分間の自発活動の評価、(2) 四肢の動きにおける左右対称性の評価、(3) 前肢の伸展の評価、(4) 握力と登坂能力の評価、(5) 体への接触刺激による感覚受容の評価、(6) 髭への接触刺激による反応評価であり、(1)~(3) は 0~3、(4)~(6) は 1~3 のスコアリングとし、合計 3~18 点とし

Table 2 The scoring assessment on Garcia test.

Garcia Score	
(1) 自発行動 (Spontaneous activity)	
3: 周囲を動き、ケージ内を探索する	
2: しぶしぶと動き、少なくともケージの1辺に到達する	
1: ケージ内をまれに動くが、どの辺にもいかない	
0: 全く動かない	
(2) 四肢の左右対称性 (Symmetry movement of four limbs)	
3: 四肢が左右対称的に伸びる	
2: 同側と比べ、対側の肢が伸びにくい	
1: 対側の肢がかろうじて動く	
0: 対側の肢は全く動かない	
(3) 前肢の伸展 (Forepaws outstretching)	
3: 前肢は伸展し、前肢を対称的に使用し歩く	
2: 片側が伸展せず、歩行障害がある	
1: 片側の動きが制限されている	
0: 片側の前肢が全く動かない	
(4) 登坂能力 (Climbing)	
3: 両前肢でしっかりと握り、登坂する	
2: 片側に障害があり、しっかりと握れずに放してしまう	
1: 登坂できない	
(5) 体性感覚 (Body proprioception)	
3: 両側の刺激に対して、頭を回転させ同程度反応する	
2: 片側の刺激にはゆっくりと反応する	
1: 片側の刺激には反応しない	
(6) 髭刺激への反応 (Vibrissae touch)	
3: 両側の刺激に対して、頭を回転させ同程度反応する	
2: 片側の刺激にはゆっくりと反応する	
1: 片側の刺激には反応しない	

た (Table 2)。本試験は、盲検下で行ったのでモデル作製時の施術者とは異なる者が観察を行った。

2-3-7 梗塞体積評価

2-3-2 の手順に従って脳虚血モデルを作製し、MCAO 処置から 24 時間後に断首し、脳を摘出した。摘出脳を 2 mm 幅で 5 つの切片に切断し、生理食塩水を用いて調製した 2% TTC 溶液に 10~20 分間浸し染色した。TTC は本来白色だが、細胞内の脱水素酵素により還元されることで赤色のトリフェニルホルマザンに変化するため、細胞が生存する非梗塞部位は赤色、細胞が死滅している梗塞部位は白色に染色することができる。染色した切片は、iPhone (Apple Inc., CA, Cupertino, USA) にて撮影を行った。撮影した画像は ImageJ を用いて、5 つの切片の梗塞側 (同側) における非梗塞領域 (正常領域)、梗塞領域及び対側の面積をそれぞれ測定し、計算式により体積を算出した。

2-3-8 出血量評価

2-3-3 の手順に従って脳出血モデルを作製した 3 日後に、ペントバルビタール (50 mg/kg) をマウスの腹腔内 (intraperitoneal: i.p.) に注射し、深麻酔をかけた。正向反射の消失を確認した後に、ペリスタポンプ (Atto, Tokyo, Japan) を用いて生理食塩水を左心室に注入し灌流を行った。2~3 分後に断首し、脳を摘出し、嗅球と小脳を取り除いた。その後、2 mm 幅に切断し、血腫を確認後に切片を iPhone にて撮影した。その後、切片を血腫側と対側とに分け、それぞれをマイクロチューブに入れ、超純水を 300 μ L 加えた後に氷上に静置した。チューブ内の脳組織を細分化した後に、ホモジナイザー (Physcotron, Microtec Co, Chiba, Japan) を用いてホモジナイズした。その後、室温 (25°C) にて 13,000 \times g で 30 分間遠心し、上清を回収した。回収した上清をサン

プルとして 96 well plates に 50 μL ずつ各ウェルに加え、超純水 (Blank) と Hemoglobin Assay kit 中の標準物質 (Calibrator) は 3 ウェル分を同様に加えた。サンプルの入っているウェルには反応液 (Reagent) を 200 μL 加え、それ以外には超純水を同量加えた。室温で 5 分間タップし、マイクロプレートリーダーを用いて吸光度 (400 nm) を測定した。測定値からサンプル中のヘモグロビン量を算出し、出血量 (μl) とした。

2-5 統計学的解析

実験成績は平均値 \pm 標準誤差 (SE) または標準偏差 (SD) で示した。ボックスプロットにおいては、四分位範囲をボックスで示し、最大値及び最小値を SD で示した (Fig. 8)。統計学的な比較は、Statistical Package for the Social Science 15.0 J for Windows9 software (SPSS Japan Inc., Tokyo, Japan) を用いて、2 群間の比較では F 検定後に Student's *t*-test または Welch's *t*-test を行った。ノンパラメトリック検定では Mann Whitney *U*-test を行った。多群間の比較では one-way analysis of variance (ANOVA) 後に、Dunnet's test または Tukey's test により検定を行った。危険率が 5% 未満を有意差ありとした。

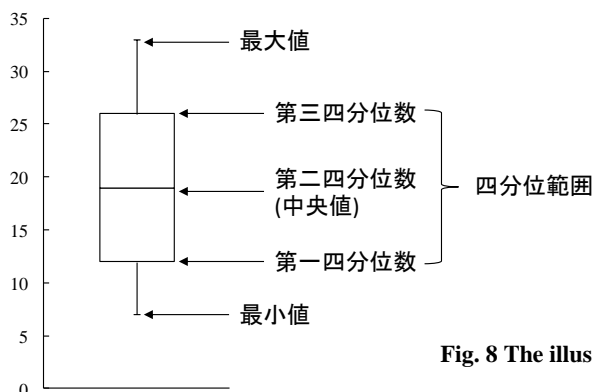


Fig. 8 The illustration of box plot.

第3節 実験結果

3-1 *In vitro* H₂O₂ 誘発神経細胞 (SHSY5Y) 障害モデルを用いた検討

3-1-1 細胞生存活性に対する NSP-116 の作用

フリーラジカル捕捉薬である NSP-116 の *in vitro* H₂O₂ 誘発神経細胞障害に対する作用を評価した (Fig. 9A)。H₂O₂ (200 μM) を 12 時間処置した vehicle 群において、CCK-8 によって示される細胞生存活性は、対照群 (Control 群) と比べ有意に低下したが、NSP-116 (1 または 10 μM) の 1 時間前処置により、細胞生存活性の低下は有意に抑制された。加えて、NSP-116 (10 μM) の単独処置は細胞生存活性に影響を及ぼさなかった (Fig. 9B)。

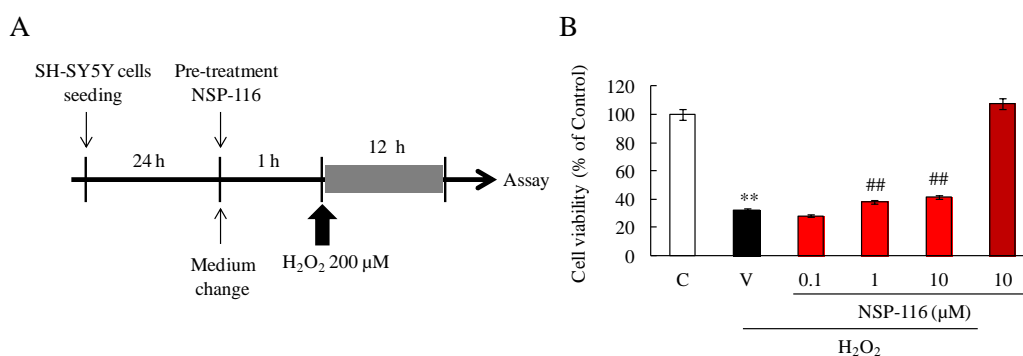


Fig. 9 NSP-116 treatment preserved cell viability on *in vitro* H₂O₂-induced neuronal injury model.

(A) Experimental protocol. 24 h after seeding SHSY5Y cells, NSP-116 was pretreatment for 1 h. After then, cells were incubated with H₂O₂ 200 μM for 12 h and evaluated the cell viability by CCK-8 assay kit. (B) The quantitative graph of cell viability. Data are expressed as mean ± SE. Control; n = 5, other groups; n = 6. ** $p < 0.01$ vs. control, ## $p < 0.01$ vs. vehicle, statistical significance was determined by Student's *t*-test, Welch's *t*-test, or Dunnett's test. C; control, V; vehicle.

3-1-2 細胞死に対する NSP-116 の作用

NSP-116 の細胞死に対する作用を評価した (Fig. 10A)。H₂O₂ (200 μM) の 12 時間処置により vehicle 群では対照群 (Control 群) と比べ細胞死が有意に惹起されたが、NSP-116 (10 μM) の 1 時間前処置 (Pre-NSP-116、Fig. 10B) または同時処置 (Co-NSP-116、Fig. 10C) により細胞死が有意に抑制された。一方、NSP-116 10 μM の

単独処置では明らかな作用は認められなかった。

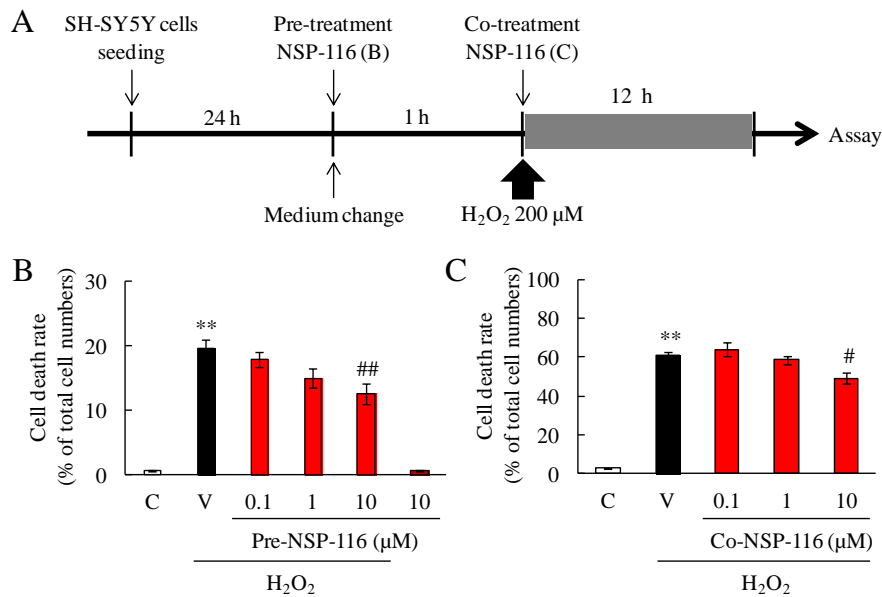


Fig. 10 Both pre- and co-treatment of NSP-116 suppressed cell death on *in vitro* H₂O₂-induced neuronal injury model.

(A) Experimental protocol. (B) 24 h after seeding cells, NSP-116 was pretreatment for 1 h. After 1 h pre-treatment, cells were incubated with H₂O₂ for 12 h and evaluated the cell death rate. The number of PI and Hoechst 33342-positive cells was counted, and the cell death rate was calculated as a percentage of PI-positive to Hoechst33342-positive cells. (C) NSP-116 was co-incubated with H₂O₂ for 12 h. Data are expressed as mean ± SE. Each group, n = 6. ** *p* < 0.01 vs. control, # *p* < 0.05, ## *p* < 0.01 vs. vehicle, statistical significance was determined by Student's *t*-test (B), Welch's *t*-test (B,C) or Dunnett's test (B). C; control, V; vehicle.

3-1-3 ROS 蓄積に対する NSP-116 の作用

過去の検討では、NSP-116 はビタミン E 誘導体であるトロロックスと同程度の強い抗酸化作用を持つことが明らかになっているため (40)、本検討では酸化ストレスの主要因となる ROS の蓄積に対する作用を評価した。H₂O₂ (200 μM) の 12 時間処置により対照群 (Control 群) と比べ vehicle 群では ROS 蓄積が有意に増加したが、NSP-116 (10 μM) の 1 時間前処置により ROS 蓄積の亢進が有意に抑制された。NSP-116 10 μM の単独処置では ROS 蓄積が減少した (Fig. 11)。

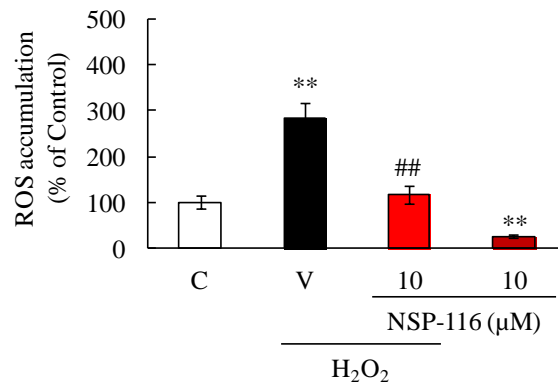


Fig. 11 Pre-treatment of NSP-116 suppressed ROS accumulation on *in vitro* H₂O₂-induced neuronal injury model.

After same procedure, ROS accumulation rate was evaluated by using CM-H₂DCFDA probe. ROS accumulation rate was corrected by the number of living cells. Each group, n = 6. Data are expressed as mean ± SE. ** *p* < 0.01 vs. control, ## *p* < 0.01 vs. vehicle, statistical significance was determined by Tukey's test. C; control, V; vehicle.

3-1-4 ミトコンドリア膜電位に対する NSP-116 の作用

前述のように、NSP-116 の保護作用は ROS 消去作用に基づくことが示唆された。ROS 産生はミトコンドリアの機能が密接に関係することから、ミトコンドリア膜電位に及ぼす影響を JC1 染色により評価した。H₂O₂ (200 μM) の 12 時間処置により対照群 (Control 群) と比べ、vehicle 群では正常ミトコンドリアを示す赤色蛍光 (R) の減少と異常ミトコンドリアを示す緑色蛍光 (G) が増加し、G/R 比が有意に増加した。NSP-116 (10 μM) の 1 時間前処置により赤色蛍光の増加と緑色蛍光の減少が引き起こされ、G/R 比は有意に低下した。一方、NSP-116 (10 μM) の単独処置では明らかな変化は認められなかった (Fig. 12)。

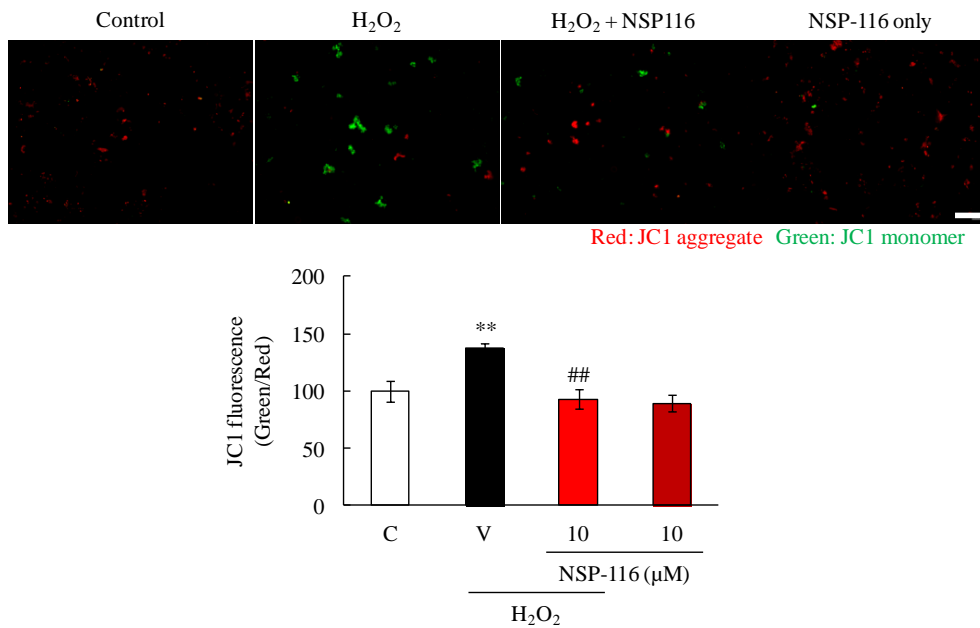


Fig. 12 Pre-treatment of NSP-116 maintained mitochondrial membrane potential on *in vitro* H₂O₂-induced neuronal injury model.

After same procedure, mitochondrial membrane potential was evaluated by using JC1 staining. Mitochondrial membrane potential was calculated by ratio of red (JC1 aggregation; normal) and green (JC1 monomer; damaged) and which was corrected by the number of total cells. Scale bar = 200 μm. Each group, n = 6. Data are expressed as mean ± SE. ** $p < 0.01$ vs. control, ## $p < 0.01$ vs. vehicle, statistical significance was determined by Tukey's test. C; control, V; vehicle.

3-1-5 タンパク質発現量に対する NSP-116 の作用

つづいて、NSP-116 の H₂O₂ 障害に対する保護作用の機序を解明するために、ウェスタンブロット法によりアポトーシスマーカーである PARP 及び caspase3 の発現量を検討した。対照群 (Control 群) において、切断型 PARP (cleaved-PARP) は全く検出されなかったが、H₂O₂ (200 μM) の 12 時間処置により vehicle 群では切断型の発現が有意に増加し、NSP-116 (10 μM) の 1 時間前処置によりその増加が有意に抑制された (Fig. 13A)。Caspase3 においては、H₂O₂ (200 μM) の 12 時間処置により vehicle 群では切断型 caspase3 (cleaved-caspase3) の発現が有意に増加したが、NSP-116 (10 μM) の 1 時間前処置によりその増加が抑制される傾向を示した (Fig. 13B)。

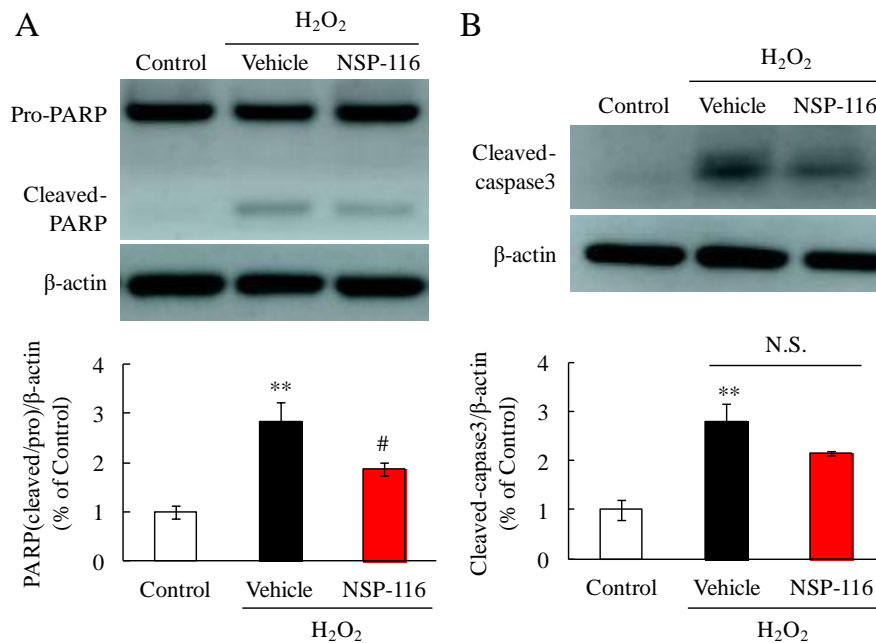


Fig. 13 Pre-treatment of NSP-116 suppressed apoptosis on *in vitro* H₂O₂-induced neuronal injury model.

After same procedure, the expression levels of three proteins were evaluated by western blotting. (A) The expression of PARP. Each group, n = 5. (B) The expression of caspase3. Each group, n = 4. Data are expressed as mean ± SE. ** $p < 0.01$ vs. control, # $p < 0.01$ vs. vehicle, statistical significance was determined by Tukey's test. N.S.; not significant.

3-2 マウス脳虚血モデルに対する NSP-116 の作用

3-2-1 マウス一過性脳虚血再灌流モデルを用いた検討

3-2-1-1 マウス 1 時間脳虚血モデルを用いた検討

In vitro H₂O₂ 誘発神経細胞障害モデルにおいて NSP-116 は細胞保護作用を示したため、マウス一過性脳虚血再灌流モデルを用いて NSP-116 の脳保護作用を検討した。まず、1 時間の虚血障害に対する NSP-116 (30 mg/kg, p.o.) の作用を検討した。レーザースペックル血流計を用いた CBF 量評価において、虚血誘導後 (Post-MCAO) に vehicle 群及び NSP-116 投与群の両群で CBF 量の有意な低下が認められたが、NSP-116 投与群では再灌流後 (Post-Reperfusion) に vehicle 群と比べ CBF 量が有意に増加した (Fig. 14A)。Garcia 試験による虚血誘導 24 時間後の神経

症状評価において、虚血誘導により sham 群と比べ vehicle 群で神経スコアの低下が認められたが、NSP-116 投与群では神経スコアの低下が有意に抑制された (Fig. 14B)。TTC 染色を用いた虚血誘導 24 時間後の梗塞体積評価において、虚血により小規模な梗塞巣が形成された。NSP-116 投与により梗塞体積を減少させる傾向を示したが、有意差は認められなかった (Fig. 14C)。

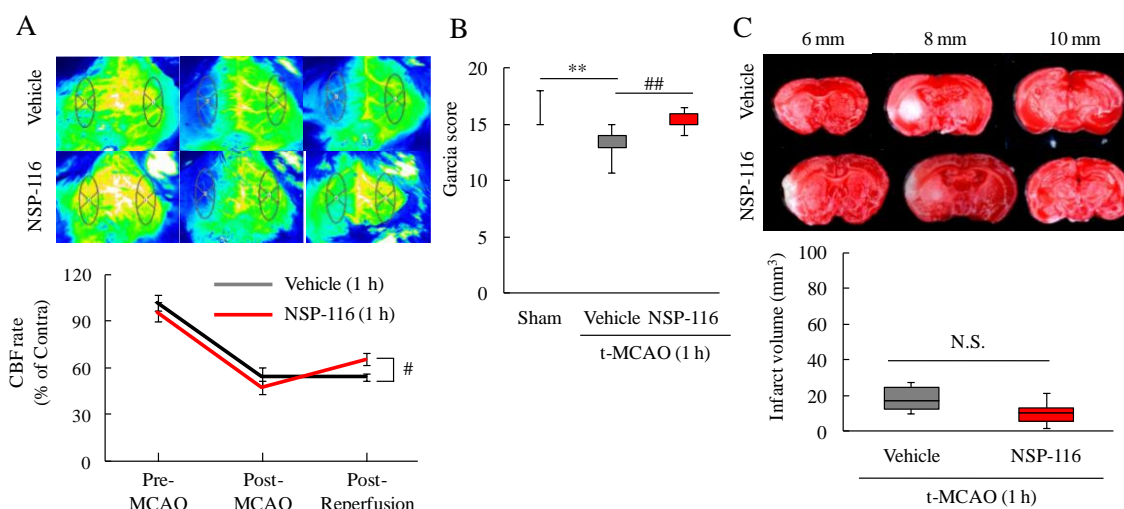


Fig. 14 Effects of NSP-116 oral administration on brain ischemia reperfusion damage after 1h of t-MCAO.

Brain ischemia reperfusion damage was induced in mice by 1 h of t-MCAO. (A) The upper panel shows representative images of the brain surface CBF. The lower panel shows the quantitative analysis of CBF rate. CBF were measured at three times; pre- and post-MCAO, and post-reperfusion. Vehicle; n = 9, NSP-116; n = 9. (B) Neurological assessment using the Garcia test at 24 h after t-MCAO. Sham; n = 5, Vehicle; n = 9, NSP-116; n = 9. (C) The result of infarct assessment by TTC staining 24 h after MCAO. The upper panel shows representative images of brain slices, while lower panel shows quantitative data. Vehicle; n = 6, NSP-116; n = 7. Data are expressed as mean \pm SE (A) or SD (B, C). ** $p < 0.01$ vs. sham, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. vehicle, statistical significance was determined by Student's *t*-test (A, C) or Mann Whitney *U*-test (B). N.S.; not significant.

3-2-1-2 マウス 2 時間脳虚血モデルを用いた検討

つぎに、虚血の影響がより重度となる 2 時間の虚血障害に対する作用を検討した。CBF 量評価において、1 時間虚血時と同様に、虚血誘導後 (Post-MCAO) に両群で CBF 量の有意な低下が認められたが、NSP-116 投与群では再灌流後 (Post-Reperfusion) において vehicle 群と比べ CBF 量が有意に増加した (Fig. 15A)。

虚血誘導 24 時間後の神経症状評価においても、虚血誘導により sham 群と比べ vehicle 群で神経スコアの低下が認められたが、NSP-116 投与群では神経スコアの低下が有意に抑制された (Fig. 15B)。一方、虚血誘導 24 時間後の梗塞体積評価においては 1 時間虚血時よりも広範な梗塞巣が形成されたが、NSP-116 投与により vehicle 群と比べ梗塞体積が有意に減少した (Fig. 15C)。

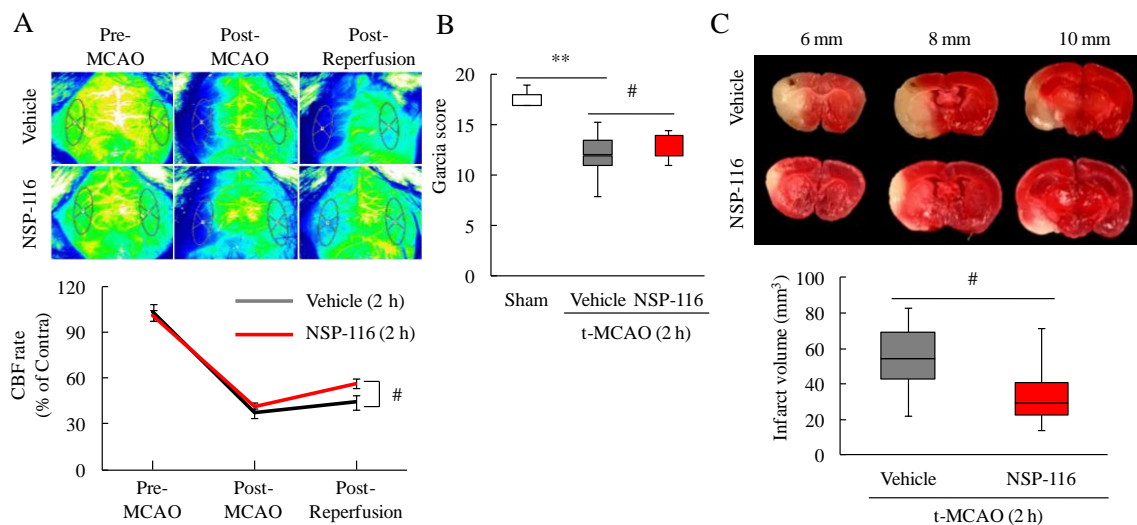


Fig. 15 Effects of NSP-116 oral administration on brain ischemia reperfusion damage after 2h of t-MCAO.

Brain ischemia reperfusion damage was induced in mice by 2 h of t-MCAO. (A) The evaluation of CBF rate. Vehicle; n = 9, NSP-116; n = 9. (B) Neurological assessment using the Garcia test at 24 h after MCAO. Sham; n = 7, Vehicle; n = 15, NSP-116; n = 17. (C) The result of infarct assessment by TTC staining. Vehicle; n = 14, NSP-116; n = 14. Data are expressed as mean \pm SE (A) or SD (B, C). ** $p < 0.01$ vs. sham, # $p < 0.05$ vs. vehicle, statistical significance was determined by Student's *t*-test (A, C) or Mann Whitney *U*-test (B).

3-2-2 マウス永久脳虚血モデルを用いた検討

前述のように、マウス一過性脳虚血再灌流モデルにおいて、NSP-116 は脳保護作用を示した。つぎに、NSP-116 の保護作用が再灌流に依存するか否かを検討するため、再灌流を施さない永久閉塞モデルを用いて検討を行った。虚血誘導 24 時間後の神経症状評価においては、虚血誘導により sham 群と比べ vehicle 群で神経スコアの低下が認められたが、NSP-116 投与による明らかな作用は認められなかった (Fig. 16A)。

一方、虚血誘導 24 時間後の梗塞体積評価においては、MCAO により広範な梗塞巣が形成されたが、NSP-116 投与により vehicle 群と比べ梗塞体積が有意に減少した (Fig. 16B)。

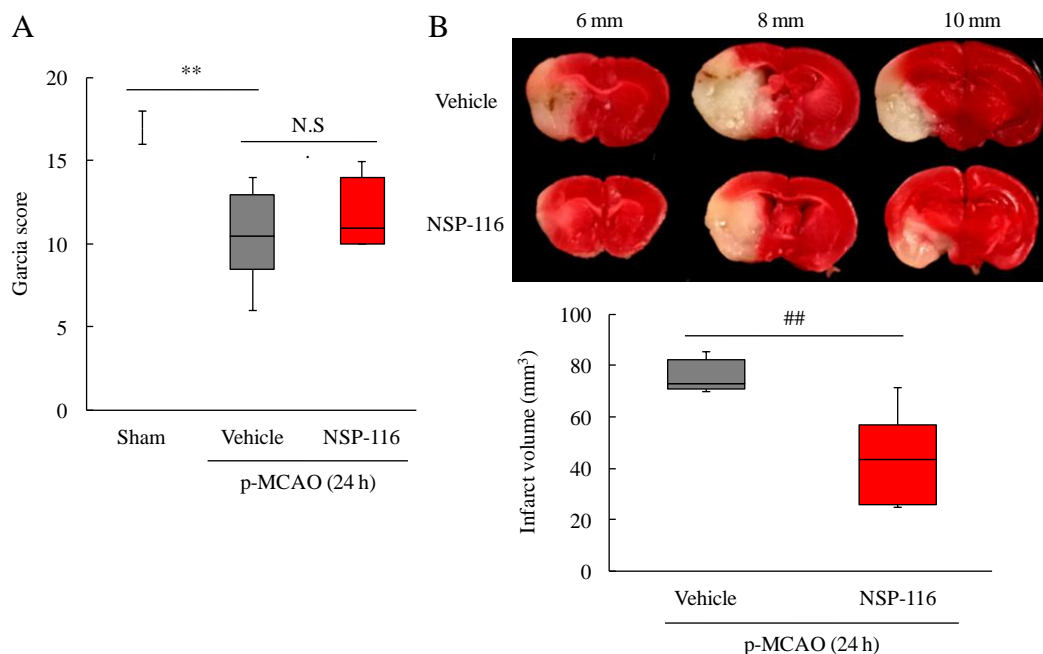


Fig. 16 Effects of NSP-116 oral administration on brain ischemia damage after p-MCAO.

Brain ischemia damage was induced in mice by p-MCAO. (A) Neurological assessment using the Garcia test at 24 h after MCAO. Sham; n = 5, Vehicle; n = 8, NSP-116; n = 9. (B) The infarct volume 24 h after MCAO by TTC staining. Vehicle; n = 6, NSP-116; n = 8. Data are expressed as mean \pm SD. ** $p < 0.01$ vs. sham, ## $p < 0.01$ vs. vehicle, statistical significance was determined by Mann Whitney *U*-test (A) or Student's *t*-test (B). N.S.; not significant.

3-3 マウス脳出血モデルを用いた検討

マウス脳虚血モデルを用いた検討において、NSP-116 は梗塞巣の形成及び神経症状の悪化を抑制した。脳梗塞時は脳出血を併発する可能性があることから、本検討ではコラゲナーゼ注入誘発脳出血モデルマウスを用いて NSP-116 の作用を検討した。

まず、Garcia 試験によりコラゲナーゼ注入 3 日後における神経症状を評価した。脳コラゲナーゼ注入 3 日後に sham 群と比べ vehicle 群において神経スコアの有意な低下が認められたが、NSP-116 の術前投与 (Pre) または術後投与 (Post) の両群にお

いて神経症状の悪化が有意に抑制された (Fig. 17A)。コラゲナーゼの脳実質内注入によって脳内に血腫が形成され、vehicle 群と比べて NSP-116 の術前投与 (Pre) により血腫量が有意に減少した (Fig. 17B)。

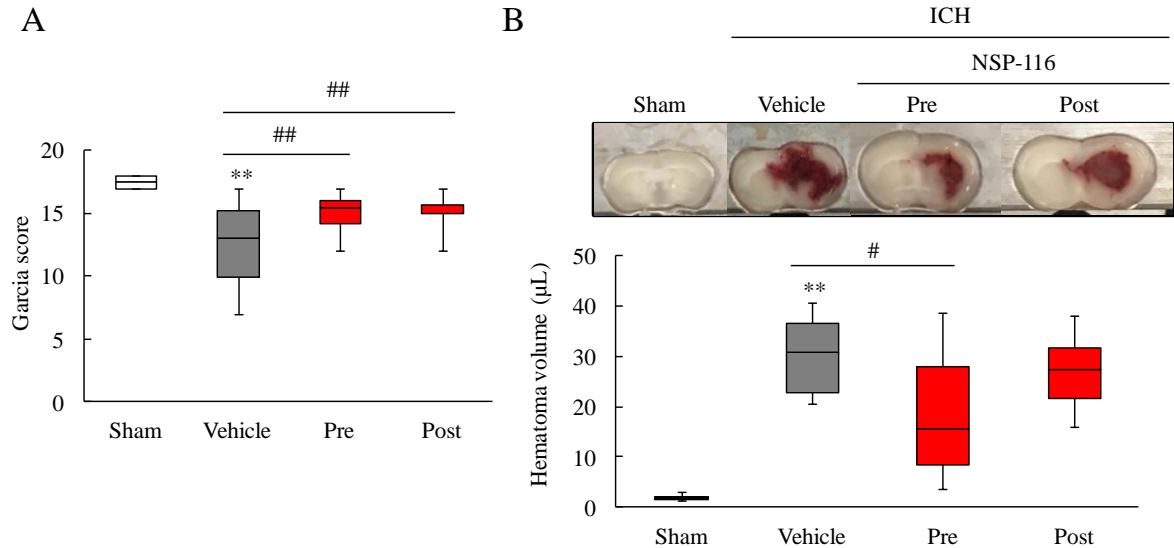


Fig. 17 Effects of NSP-116 oral administration on collagenase-induced ICH model.

A collagenase injection induced hematoma formation and neurological deficits in mice, which contributed to endothelial cell damage. (A) Neurological assessment using the Garcia test at 3 days after ICH. Sham; n = 10, Vehicle; n = 16, Pre; n = 22, Post; n = 22. (B) The upper panel shows representative brain images 3 days after surgery. The lower panel shows quantitative data of the hematoma volume, which was assessed using a Hemoglobin assay kit. Sham; n = 5, Vehicle; n = 12, Pre; n = 11, Post; n = 11. Data are expressed as mean ± SD. ** $p < 0.01$ vs. sham, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. vehicle, statistical significance was determined by Tukey's test (A, B). N.S.; not significant, Pre; pre-treatment, Post; post-treatment.

3-4 *In vitro* コラゲナーゼ誘発血管内皮細胞障害モデルを用いた検討

コラゲナーゼ注入マウス脳出血モデルにおいて、NSP-116 投与は神経症状の悪化と血腫の形成を両方ともに抑制した。つぎに、コラゲナーゼは血管内皮細胞に障害を及ぼすことで出血を引き起こすため (45)、NSP-116 のコラゲナーゼによる血管内皮細胞障害に対する作用を検討した。HBMVECs にコラゲナーゼ (30 U/mL) を 4 時間処置することにより、対照群 (Control 群) と比べ vehicle 群では細胞死が増加し、NSP-116 (10 µM) の 1 時間前処置により細胞死が有意に抑制された。一方、NSP-116

(10 μM) の単独処置では明らかな作用は認められなかった (Fig. 18)。

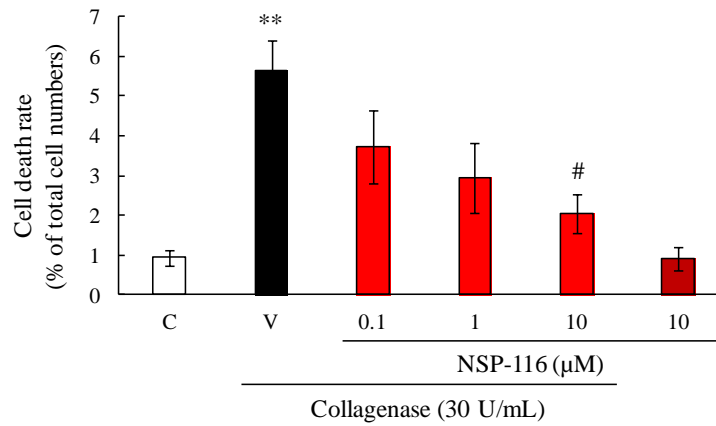


Fig. 18 Pre-treatment of NSP-116 suppressed collagenase-induced endothelial cells damage.

HBMVECs were incubated with collagenase for 4 h. The number of PI and Hoechst33342-positive cells was counted, and the cell death rate was calculated as a percentage of PI-positive to Hoechst33342-positive cells. Each group, $n = 6$. Data are expressed as mean \pm SE. ** $p < 0.01$ vs. control, # $p < 0.05$ vs. vehicle, statistical significance was determined by Student's t -test, Welch's t -test or Dunnett's test. C; control, V; vehicle.

第4節 考察

本章では、フリーラジカル捕捉薬 NSP-116 の脳卒中病態に対する保護作用を明らかにすることを目的として、*in vitro* 細胞障害モデル及び *in vivo* マウス脳卒中病態モデルを用いて検討を行った。NSP-116 処置は *in vitro* H₂O₂ 誘発神経細胞障害モデルやコラゲナーゼ誘発血管内皮細胞障害モデルにおいて細胞障害を抑制した。さらに、NSP-116 は *in vivo* マウス脳梗塞及び脳出血モデルにおける梗塞巣の拡大、出血量の増加及び神経症状の悪化を抑制した。

過去の当研究室の報告において、NSP-116 はスーパーオキシドアニオンやヒドロキシラジカルなどのフリーラジカルを捕捉し、酸化ストレスを抑制した (40)。脳虚血状態では、フリーラジカルが原因となって酸化ストレスや炎症反応を惹起し、脳神経細胞死が誘発する (25)。神経細胞の喪失は認知症や運動機能障害などの脳機能障害、さらには生存率の低下を招く (6, 46)。本検討では、酸化ストレス誘発モデルである *in vitro* H₂O₂ 誘発神経細胞障害モデルに対して、NSP-116 は細胞生存活性の低下や細胞死、加えて過剰な細胞内 ROS 蓄積を抑制した (Fig. 9-11)。H₂O₂ 処置は、細胞膜の脂質過酸化やミトコンドリアの機能不全を引き起こし、アポトーシスを誘発するが (24, 47)、NSP-116 の処置が H₂O₂ によって生じるミトコンドリア膜抵抗値の低下やアポトーシスを抑制することを明らかにした (Fig. 12, 13)。ROS 蓄積の増加は、extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) や c-Jun N-terminal kinase (JNK) などの mitogen-activated protein kinase (MAPK) 経路を介してアポトーシスを誘発する (48, 49)。そのため、NSP-116 はそれ自身が有する強いフリーラジカル捕捉能により、H₂O₂ 処置によって生じた細胞内 ROS を除去し、上記の経路の抑制を介してアポトーシスを抑制したと考えられる。

マウス脳虚血再灌流モデルを用いた検討では、1 時間または 2 時間脳虚血の両条件下において NSP-116 は、再灌流後の CBF 量を増加させた (Fig. 14A, 15A)。閉塞

血管の再灌流時には過剰な酸素流入により ROS が発生し (36)、それは血管内皮細胞や平滑筋細胞においてカルシウムイオン (Ca^{2+}) の過剰流入による血管径の調節機能障害を引き起こす (7, 50)。 Ca^{2+} の過剰流入は rho-associated coiled-coil protein kinase (ROCK) や endothelial nitric oxide synthase (eNOS) 経路を介した血流調節機能障害により低酸素状態を悪化させる (51-53)。過去の報告では、エダラボンやメラトニンなどのフリーラジカル捕捉作用を有する薬剤は、血管周辺細胞の保護や脳血流量の増加を介して脳虚血病態に保護作用を示した (54-56)。NSP-116 投与は過剰なフリーラジカル蓄積を制御することにより、CBF 量の回復に寄与したと考えられる。本検討で用いた MCAO 処置による一過性脳虚血モデルでは、血管閉塞から 30 分後に梗塞巣の形成が開始し、神経症状が悪化する (57)。本検討で用いた 1 時間及び 2 時間の t-MCAO による一過性脳虚血モデルにおいても、神経症状の悪化 (Fig. 14B、15B) 及び梗塞巣の形成 (Fig. 14C、15C) が観察され、NSP-116 投与は神経症状の悪化を抑制した (Fig. 14B、15B)。*In vitro* における直接的な神経細胞保護作用に加え、脳血流循環を改善したことが神経症状の悪化を抑制したとことが考えられる。さらに、NSP-116 投与は、2 時間脳虚血による梗塞巣の拡大を抑制した (Fig. 15C)。虚血時間の延長に伴い血管内皮細胞障害や ROS の過剰蓄積が進行し、BBB 透過性の亢進や浮腫が生じ、梗塞巣は拡大する (57-60)。2 時間虚血後に生じる梗塞巣の形成や再灌流障害は、1 時間脳虚血後の障害よりも ROS 蓄積が増悪因子としてより深く関与していると考えられ、強いフリーラジカル捕捉作用を有する NSP-116 投与による保護作用がより顕著に表れた可能性が考えられる。さらに、再灌流を施さない p-MCAO によるマウス永久脳虚血モデルを用いた検討において、NSP-116 投与は梗塞巣を縮小させることに加え、有意差はないものの神経症状の悪化を抑制する傾向を示した (Fig. 16)。永久脳虚血モデルでは脱分極やアシドーシスが進行し、一過性脳虚血モデルと比べて梗塞の中心であるコア領域の拡大により神経細胞が残存するペナンプラ領域

が縮小するため、浮腫や神経症状の程度がより重篤となる (57, 61, 62)。一過性脳虚血モデルにおいては再灌流により急激に ROS 蓄積が亢進し、永久脳虚血モデルと比較してその増加は著しい (63)。しかし、虚血誘導から時間経過に伴い永久脳虚血モデルにおいても ROS は徐々に増加し (63)、誘導 8 日後には一過性脳虚血モデルと比べ酸化ストレスマーカーは脳内で顕著に増加するため (64)、非再灌流条件下においても ROS は病態悪化に関与する。上記の結果より、NSP-116 投与は脳梗塞後の梗塞巣拡大や神経症状の悪化を緩和することが明らかとなり、再灌流療法と併用することにより神経症状に対してより有効であることが示唆された。

脳虚血再灌流障害は BBB 破綻により脳出血を併発する場合があるため (6, 7, 65, 66)、出血病態に対する NSP-116 の作用を検討することは脳卒中病態に対する脳保護薬としての有用性を高めることにつながる。コラゲナーゼ注入の 1 日前 (Pre) または直後 (Post) に NSP-116 を投与した結果、脳出血後の神経症状の悪化が抑制された (Fig. 17A)。脳出血発症後は、ヘモグロビンや炎症性因子が ROS 産生を亢進し、神経細胞死や高次機能障害を引き起こす (67-69)。In vitro H₂O₂ 誘発神経細胞障害モデルを用いた検討において、NSP-116 は細胞内 ROS 蓄積の亢進を抑制することにより神経細胞を保護した (Fig. 11)。この様な NSP-116 の神経細胞保護作用により、脳出血後の血腫に起因する ROS 蓄積を抑制し、神経症状の悪化を抑制したと推察できる。コラゲナーゼは血管の細胞外マトリックス (コラーゲン) を分解することにより血管を損傷し、脳実質内に注入した場合には約 4 時間で血腫を形成する (45)。コラゲナーゼ注入の 1 日前に NSP-116 を投与した結果、血腫の拡大を抑制した (Fig. 17B)。In vitro コラゲナーゼ処置モデルを用いた検討から、NSP-116 は血管内皮細胞をコラゲナーゼによる障害から保護した (Fig.18)。過去の当研究室の報告において、血管内皮細胞の保護が血腫の拡大やその後の神経症状の抑制に有用であることが明らかになっている (41)。また、コラゲナーゼ (MMP-1, 8, 13) は MMP ファミリーの一つであ

り、MMPs の活性化は炎症反応を引き起こし、ROS 蓄積を介して細胞障害を引き起こす (70, 71)。ROS 蓄積の亢進はその後、さらなる MMPs の活性化を引き起こす (71)。そのため、NSP-116 はコラゲナーゼ注入による血管内皮細胞障害を防ぎ、間接的に血腫の拡大や神経機能障害を抑制した可能性が考えられる。

以上より、本章においてはフリーラジカル捕捉薬である NSP-116 は、マウス脳梗塞モデル及び脳出血モデルに対して保護作用を示した。さらに、NSP-116 は *in vitro* 神経細胞及び血管内皮細胞障害モデルに対しても保護作用を示した。これらの保護作用には、過剰な ROS 蓄積とその後誘発されるアポトーシスの抑制に起因することが示唆された。本結果は、再灌流及び非再灌流条件の脳梗塞病態、並びに脳出血病態において NSP-116 の経口投与が脳保護作用を有することを明らかにし、脳卒中患者に対する新たな治療薬になりうることを示唆している。過剰な ROS 蓄積を抑制することは、酸化ストレスの抑制と BBB 及び神経細胞を含む NVU を保護することにつながり、脳卒中治療において有効と考えられる。そのため、次章では脳卒中病態下で過剰に蓄積される ROS がどのように制御されているかを明らかにすることを目的に、内因性の抗酸化ストレス機構に着目し、その中核を担う Nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) を治療ターゲットとして検討を行った。

第 2 章 マウス出血性脳障害モデルに対する Nrf2 活性化薬の作用

第 1 節 緒言

前章で記述した通り、脳梗塞発症後においては rt-PA 投与による血栓溶解療法を用いた血液の再灌流が片麻痺や高次機能障害の予防につながり、患者の転帰を良好にするため推奨される (72-75)。しかしながら、再灌流は場合によって出血を引き起こす危険性がある (28)。特に、脳梗塞の再発予防を目的に抗凝固薬を服用している患者は易出血性状態であるため、再灌流により出血性梗塞や頭蓋内出血などの致死的な出血性合併症を生じる恐れがある (76-78)。

ワルファリンは、ビタミン K 拮抗作用により凝固カスケード中の第 II 因子、第 VII 因子、第 IX 因子、第 X 因子などの多くの凝固因子の肝臓における産生を阻害する抗凝固薬であり (Fig. 19)、非弁膜症性心房細動のある脳梗塞または一過性脳虚血発作の再発予防を目的に使用されている (脳卒中治療ガイドライン 2015; グレード B) (78-80)。ワルファリン服用による脳梗塞の再発予防作用は確かなものであるが (80, 81)、重篤な出血性合併症の発症リスクが高いため (77, 82)、血液検査によるモニタリング (prothrombin time-international normalized ratio: PT-INR) や食事制限、他薬剤との相互作用に留意する必要がある (83-85)。ワルファリンの出血リスクや患者の服薬コンプライアンスの点から、近年ではより安全な非ビタミン K 拮抗阻害経口抗凝固薬である直接トロンビン阻害薬 (ダビガトラン) や活性化第 X 因子 (Xa) 阻害薬 (リバロキサバン、アピキサバン、エドキサバン) に注目が集まっているが (86-90)、効果の面で優位性が認められない事や高額な薬価の観点から依然としてワルファリンの使用は多い。そのため、臨床に貢献し得るエビデンスを構築するためには、ワルファリン服用を前提とした実験モデルを用いて出血性合併症の発生機序や薬剤の保護作用を検討することが重要である。

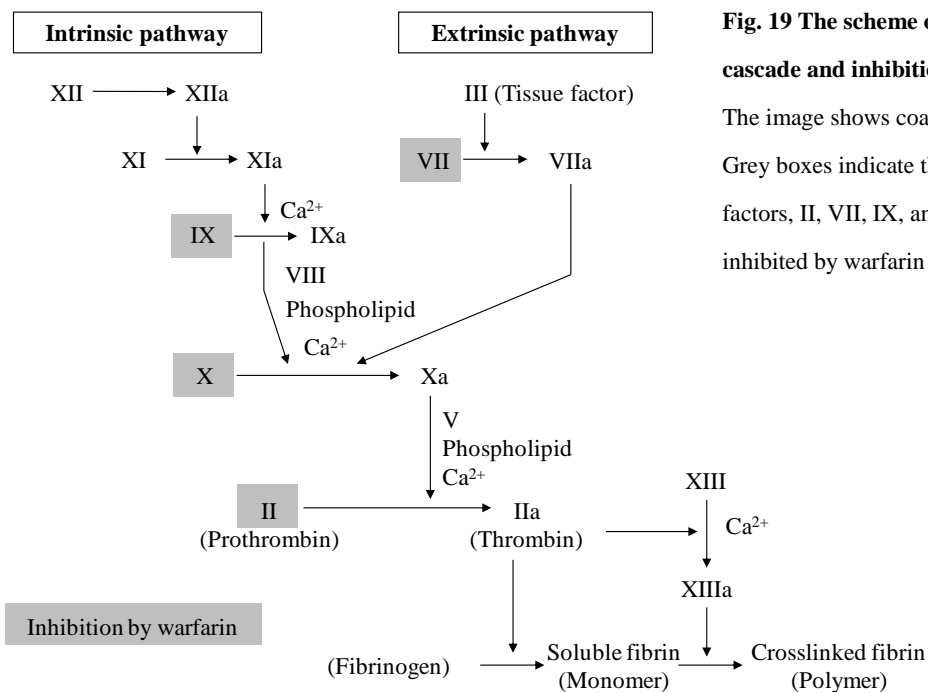


Fig. 19 The scheme of coagulant cascade and inhibition of warfarin.
The image shows coagulant cascade. Grey boxes indicate the coagulant factors, II, VII, IX, and X which are inhibited by warfarin administration.

日本血液製剤協会 HP (http://www.ketsukyo.or.jp/plasma/hemophilia/hem_02.html) より改変引用

前章では、各種脳卒中病態に対するフリーラジカル捕捉薬の保護作用を検討し、再灌流後の過剰な ROS 蓄積を制御することは酸化ストレスから神経細胞を保護し、梗塞巣の縮小や神経症状の抑制、さらには出血の抑制につながることを明らかにした (第 1 章 Fig. 14-17)。過去の報告からも、脳梗塞後の出血性梗塞は、酸化ストレス惹起による BBB 障害とそれに伴う血管透過性の亢進が関係していることが報告されている (28, 29, 91-93)。これらの結果より、脳虚血再灌流障害に伴う出血性変化と ROS を起因とした酸化ストレスには密接な関係があることが推察され、酸化ストレスの制御は BBB 障害や出血抑制、神経症状の改善に寄与し得る治療法と考えられる。

Nrf2 は、酸化ストレスに対抗する内因性防御機構の中核を担う転写因子である (94) (Fig. 20)。Nrf2 は塩基性領域/ロイシンジッパー構造をもち、通常非ストレス条件下においては Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1) と複合体を形成し、速やかにユビキチン化 (Ubiquitination: Ub) され、プロテアソームにより分解されることで発現が制御されている (95, 96)。しかし、酸化ストレスなどのストレス条件下では、

Nrf2 は Keap1 との複合体から解離した後に核内移行し、抗酸化応答配列 (antioxidant response elements: ARE) に結合することで第 2 相酵素類である heme oxygenase-1 (HO-1) や nicotinamide adenine dinucleotide phosphate quinone oxidoreductase 1 (NQO1)、glutamate-cysteine ligase modifier subunit (Gclm) などの転写を促進し、抗酸化ストレス応答を示す (97, 98)。近年では、Nrf2 活性化薬であるフェマル酸ジメチルが多発性硬化症に臨床応用されたこともあり、Nrf2 に対して注目が集まっている (99, 100)。さらに、スルホラファンやクルクミンなどの化合物は、Nrf2 活性化作用を介して脳卒中病態モデルに対して保護作用を示すことが報告されているため (101-103)、Nrf2 は脳卒中に対する新規治療標的として臨床応用が期待されている因子のひとつといえる。

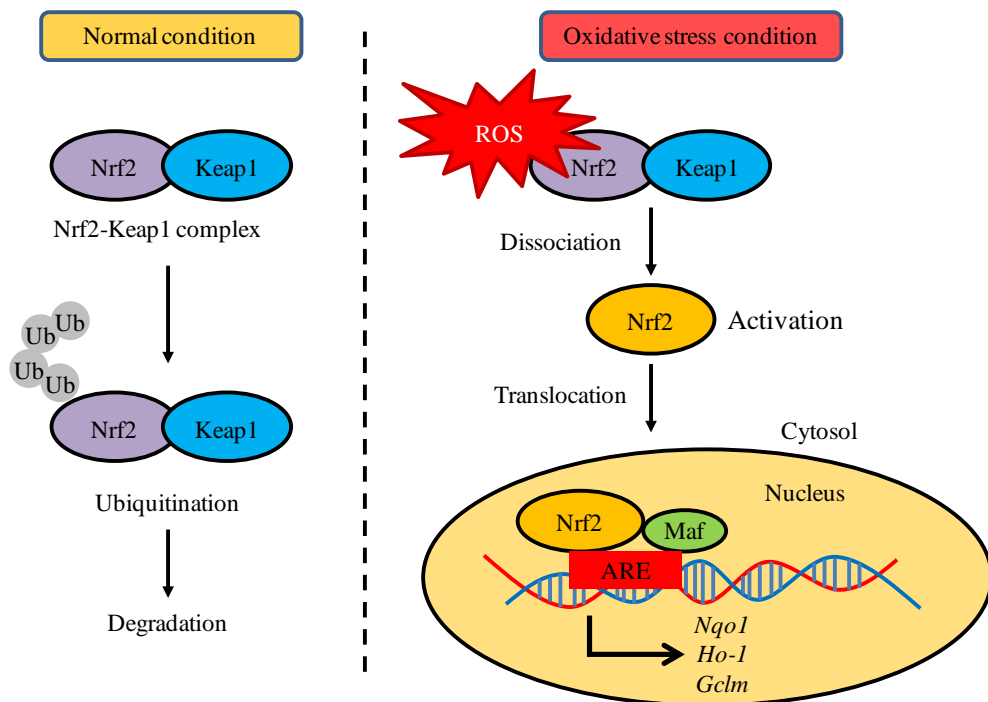


Fig. 20 The scheme of the anti-oxidative stress defense system by Nrf2 activation.

Under normal conditions, Nrf2 is bound to Keap1 and forms complex, which promotes rapid proteasomal degradation of Nrf2 via ubiquitination (Ub). During oxidative stress, Nrf2 dissociates from Keap1 and translocates into the nucleus. There, it binds to antioxidant response elements (ARE) and activates ARE-dependent transcription of phase II and antioxidant defense enzymes such as HO-1 and NQO1 to attenuate cellular oxidative stress.

Bardoxolone methyl [2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9(11)-dien-28-oic acid methyl ester; CDDO-Me; BARD] はオレイン酸から合成される合成トリテルペノイドであり (Fig.

21)、Keap1 のシステイン残基 (Cys-151) と相互作用し、Keap1 の構造を変化させることで複合体形成を阻害し、Nrf2 の安定化と核内移行

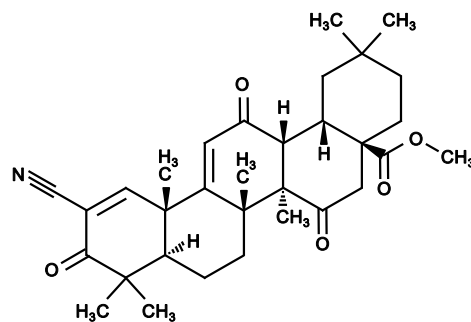


Fig. 21 The structure of BARD.

を促進する (104)。さらに、BARD は Nrf2 活性化作用を介した抗酸化作用や抗炎症作用を有し (105, 106)、2 型糖尿病性腎不全患者を対象とした第 II 相試験において良好な結果を示し、先駆け審査指定品目指定を受けている (107, 108)。マウス脳梗塞病態モデルを用いた報告では、BARD 投与は Nrf2 下流に存在する HO-1 の発現を増加し、脳虚血再灌流後の梗塞巣拡大と神経症状の悪化を抑制することが明らかとなっている (109) (Fig. 22)。しかしながら、出血性梗塞の際に発生する BBB 障害や神経症状の悪化、出血量の増加に対して BARD 投与の作用は明らかにされていない。

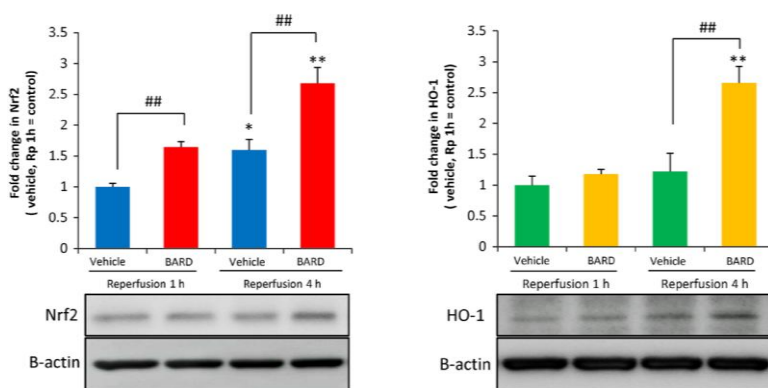


Fig.22 BARD increased the expression of Nrf2 and HO-1 after brain ischemia/reperfusion injury.

文献 (Takagi T. et al., *Free radical biology & medicine*. 2014) より改変引用

また、BARD をリード化合物として微生物形質転換技術により創製された RS9 [methyl (1 α ,2 α ,21 β)-2-cyano-21-hydroxy-3,12-dioxo-1,2-epoxyolean-9(11)-en-28-oate] (Fig. 23) は BARD よりも Nrf2 活性化作用が強い薬剤である (110)。RS9 は、*in vitro* 及び *in vivo* 光誘発視細胞障害に対して HO-1 の増加を介して保護作用を示し (111)、

BARDと同様に脳虚血再灌流モデルにおいて梗塞体積の減少及び神経症状の改善作用を有することが過去の当研究の報告で明らかとなっている (112)。しかしながら、BARDと同様に、出血性脳卒中に対する保護作用は明らかにされていない。

本章では、脳梗塞後の出血性梗塞に対する新たな治療アプローチとして、生体内の抗酸化ストレス防御機構の中核を担う Nrf2 の活性化に着目し、ワルファリン投与条件下における脳梗塞病態及びその後に発症する出血性梗塞に対する Nrf2 活性化薬 BARD の作用を検討した。さらに、マウスの頸静脈から採取した血液を脳実質内に注入して作製した自己血注入脳出血モデルを用いて、脳浮腫や神経症状に対する RS9 の作用を検討した。

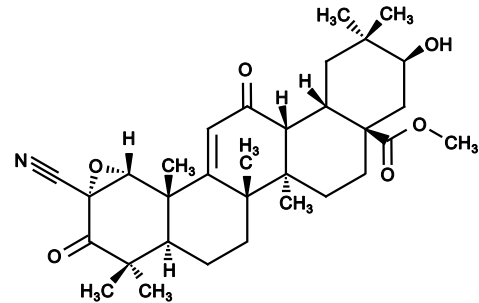


Fig. 23 The structure of RS9.

第2節 実験材料及び方法

2-1 実験材料

実験に用いた薬物及び試薬は以下の通りである。

グリシン、DMSO、パラホルムアルデヒド (paraformaldehyde: PFA) は Nacalai Tesque、スキムミルク (脱脂粉乳) は森永乳業株式会社 (Tokyo, Japan)、6-アミノヘキサ酸、Igepal CA-630、イムノスター[®]LD、エバンスブルー (evans blue: EB)、塩酸、Sample Buffer Solution (2ME+)($\times 4$)、スクロース、デオキシコール酸ナトリウム、SDS、SDS ポリアクリルアミドゲル、ホルムアミド、メタノール、2-メルカプトエタノール、PBS は富士フイルム和光純薬株式会社、塩化ナトリウム、ペントバルビタールはキシダ化学株式会社、O.C.T. compound はサクラファインテックジャパン株式会社、フルオロマウントは Diagnostic Bio Systems (Pleasanton, CA, USA)、TTC、phosphatase inhibitor cocktails 2 及び 3、protease inhibitor、mouse monoclonal anti- β -actin は Sigma-Aldrich、Immobilon[®] は Merck Millipore Co.、タンパク質定量キット (BCA Protein Assay kit)、HRP-conjugated goat anti-rabbit antibody、HRP-conjugated goat anti-mouse antibody、Alexa Fluor[®] 546 goat anti-rabbit、Alexa Fluor[®] 488 goat anti-mouse、は Thermo Fisher Scientific、Hoechst 33342 は Molecular Probes、Can Get Signal Solution 1 及び 2 は TOYOBO Co., Ltd.、Tween20 溶液、Triton X-100、トリスは Bio-Rad Lab、栓子用ナイロンフィラメントは Ethicon、栓子用シリコンコート剤は Provil novo、ヘモグロビン測定キットは BioAssay Systems、酸素ガスは大陽日酸株式会社、笑気ガスは昭和電工株式会社、イソフルランは Mylan、ワルファリン K 細粒 0.2%「YD」は株式会社陽進堂 (Toyama, Japan)、rabbit polyclonal anti-zonula occludens-1 (ZO-1)、anti-vascular endothelial cadherin (VE-cadherin)、mouse monoclonal anti-CD31 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1: PECAM-1) は Abcam (Cambridge, UK)、rabbit polyclonal anti-claudin-5、anti-platelet-derived growth factor receptor- β (PDGFR- β)、

anti-Nrf2、anti-HO-1、mouse polyclonal anti- PDGFR- β は Santa Cruz (Dallas, TX, USA)、normal goat serum、Mouse on Mouse (M.O.M.) immunodetection kit (M.O.M. blocking reagent、M.O.M. protein concentrate) は Vector Labs (Burlingame, CA, USA)、rabbit polyclonal anti-NeuN、anti- superoxide dismutase 1 (SOD1) は Cell Signaling Technology、BARD は AdooQ Bioscience LLC (Irvine, CA, USA) から購入した。

RS9 は第一三共株式会社 (Tokyo, Japan) より供与頂いた。

2-2 実験動物

4~6 または 12 週齢の雄性非近交系 ddY マウスを日本エスエルシー株式会社より購入し、第 1 章 2-3-1 の手順と同様に飼育した。実験を行うにあたっては、岐阜薬科大学動物飼育・動物実験委員会に動物実験承認申請を行い、許可を得た上で実施した。

2-3 マウス出血性脳卒中モデルの作製

2-3-1 ワルファリン誘発易出血性脳虚血再灌流モデルの作製

2-3-1-1 ワルファリンの調製と自由引水による投与

ワルファリン K 細粒 0.2%「YD」4 g をマウス用飲料水 300 mL に溶解し、調製したワルファリン溶液を給水瓶に充填し、18 時間自由飲水させた。過去の当研究室の検討より (113)、本検討で用いたワルファリンの投与量は、マウスの体重を 20 g、水分飲水量を 15 mL/100 g と仮定した場合、0.08 mg (4.0 mg/kg) に相当する。本条件での INR 値は、脳梗塞の再発予防時のワルファリン療法時に推奨される 2.0~3.0 (脳卒中治療ガイドライン; グレード A) を超える値であり、出血性合併症を発生するリスクが高い(114, 115) (Fig. 24)。

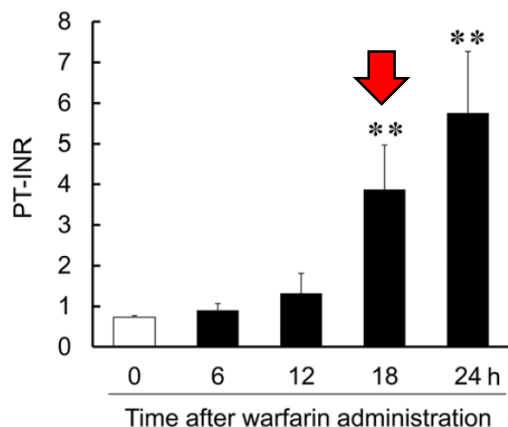


Fig. 24 Prothrombin time-international normalized ratio (PT-INR) values in mice after warfarin administration in drinking water.

文献 (Kitashoji A. *et al.*, Stroke. 2013) より改変引用

2-3-1-2 中大脳動脈閉塞脳虚血モデルの作製

本検討では、ワルファリンの自由飲水開始 18 時間後にイソフルラン吸入麻酔下で中大脳動脈閉塞術 (MCAO) を施し、脳虚血再灌流モデルを作製した。第 1 章 2-3-2 の方法で栓子を CCA から挿入し、MCA を閉塞させた。その後、ICA を結紮後に頸部を縫合した。MCAO 処置 6 時間後に再度イソフルラン吸入麻酔下で、頸部の縫合と内頸動脈の結紮を解除した後に、栓子を引き抜くことにより再灌流を施した。偽処置群 (Sham) では、麻酔下で頸部切開のみを施した。

2-3-2 自己血注入脳出血モデルの作製

第 1 章 2-3-2 と同様に大型麻酔器にイソフルランを充填しマウスに麻酔を施した。麻酔下でマウスの頭皮を切開し、頭蓋骨を露出させた。18G 針を用いてブレグマ (十字縫合) から左側方 2 mm の頭蓋骨に小孔をあけた。つぎに、マウス頸部を切開後、左頸静脈から血液を約 50 μ L 採取し、22s-G 100- μ L 用ハミルトンシリンジ (Hamilton syringes 700 series syringes, Hamilton Company) に充填した。頭蓋骨の小孔から同シリンジを刺し込み、1 分間保持した後、25 μ L の血液を 2 μ L/30 秒の速度で左基底核 (脳表から深さ 3.5 mm) に注入した。血液の逆流を避けるためシリンジを 5 分間保持し

た後、約 5 分間かけてシリンジをゆっくりと引き抜いた。術部は麻酔下で縫合した。偽処置群 (Sham) では、麻酔下で頭皮切開と頭蓋骨露出のみを施した。

2-4 Nrf2 活性化薬の調製及び投与

2-4-1 BARD の調製及び頸静脈内投与

BARD の調製と投与は、過去の報告に従って行った (109)。

BARD 原末を DMSO に溶解し、ストック溶液を作製した。ストック溶液は PBS を用いて DMSO の終濃度が 0.1% となるように希釈し、BARD の終濃度が 0.06、0.2、0.6、2.0 mg/kg となるようにワーキング溶液を調整した。BARD 投与は、本章 2-3-1-2 の手順に従って再灌流を行った直後に、麻酔下で頸静脈内にワーキング溶液を 10 mL/kg 投与した。

2-4-1 RS9 の調製及び頸静脈内投与

RS9 の調製と投与は、過去の報告に従って行った (111)。

BARD と同様に RS9 原末を DMSO に溶解してストック溶液を作製した。ストック溶液は PBS を用いて DMSO の終濃度が 0.1% となるように希釈し、RS9 の終濃度が 0.2 mg/kg となるようにワーキング溶液を調整した。RS9 は、本章 2-3-2 の手順に従って自己血を脳実質内に注入した直後、24 時間後、48 時間後の計 3 回にわたり腹腔内 (i.p.) にワーキング溶液を 10 mL/kg 投与した。

2-5 梗塞体積評価

本章 2-3-1-2 の手順に従って MCAO 処置を施した 24 時間後または 3 日後に、第 1 章 2-3-7 の手順に従い TTC 染色法により梗塞体積を評価した。

2-6 出血量評価

本章 2-3-1-2 の手順に従って MCAO 処置を施した 24 時間後に、第 1 章 2-3-8 の手順に従いヘモグロビン測定キットを用いて出血量を評価した。

2-7 BBB 透過性評価

BBB 透過性亢進は出血や浮腫を引き起こす (6, 17, 18, 116)。エバンスブルー (EB) 色素は血中アルブミンとの親和性が高く、通常時に血管から脳実質組織中に漏出することはない。しかし、脳卒中病態では BBB の透過性亢進または構造的破綻が生じているため、EB は組織中に移行する。上記より、組織中への EB 量漏出は BBB 透過性亢進の指標として有用である (117, 118)。

本章 2-3-1-2 の手順に従って MCAO 処置を施した 22 時間後に、31G の注射針を装着した 1 mL シリンジを用いて PBS に溶解した 4%EB を 2 mL/kg で腹腔内または尾静脈内に投与した。EB 投与から 2 時間循環させた後、ペントバルビタール (50 mg/kg) を腹腔内に投与し麻酔を施した。麻酔下で開胸し、ペリスタポンプを用いて生理食塩水を左心室内に 2 分間注入することで灌流を行った。灌流後に脳を摘出し、嗅球と小脳を取り除き脳重量の測定を行った。ホルムアルデヒドを 500 μ L 加え、55°C で 2 日間インキュベートした。その後、10,000 \times g で 10 分間遠心分離し上清を回収した。上清を 96 well plate 中に添加し、マイクロプレートリーダーにより吸光度 (620 nm) の測定を行った。EB 原末を段階希釈 (0、10、50、100、200、500、1,000、1,500、2,000、5,000、10,000 ng/mL) して作成した検量線を用いて、測定値よりサンプル中の EB 量 (EB 量/脳重量; μ g/g) を算出した。

2-8 行動試験による神経症状評価

2-8-1 神経学的スコア

本章 2-3-1-2 の手順に従って MCAO 処置を施した 24 時間後に、過去の報告に基づき (119)、行動観察による神経学的スコア (Neurological score) を重症度によって以下のようにスコアリング評価した (Table 3)。

Table 3 Evaluation items of neurological score

Neurological Score	
0	神経学的な異常がなにも観察されない
1	前肢の伸展に不具合がある
2	対側方向に旋回する
3	歩行や正向反射を失う

2-8-2 コーナーターン試験

本章 2-3-1-2 の手順に従って MCAO 処置を施した 24 時間後に、過去の報告に基づきコーナーターン試験を行い、感覚運動の非対称性を評価した (120)。マウスを 30° の角度を持つコーナーに設置し、角の到達した際にマウスが探索行動を行った後にターンする方向 (右折・左折) を記録した。試験間隔を少なくとも 30 秒間あけ 10 度繰り返し行い、左折の割合 $[(\text{left turn}/10) \times 100\%]$ を算出した (Fig. 25)。探索行動を行わないターンは除外した。

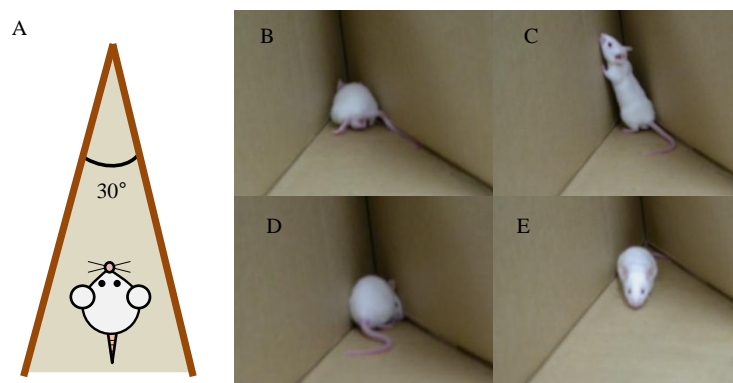


Fig. 25 The apparatus of corner test.

(A) The illustration of corner with an angle of 30 degree. (B) Mice were placed the open-edge and allowed to go into the corner. (C) Vertical exploration at the corner. (D) Turning to the side by placing forepaws along the wall, and the turn side, right or left was recorded. (E) Completion of a full turn signifies a body position 180° from starting point. The test was repeated 10 times, with at least 30 seconds between trials, and the percentage of left turns was calculated.

2-8-3 Garcia 試験

本章 2-3-1-2 の手順で MCAO 処置を施した 24 時間後、第 1 章 2-3-6 の手順で Garcia 試験を行った。また、本章 2-3-2 の手順で自己血注入脳出血を作製した 1 日後、2 日後及び 3 日後に同試験を行った。本試験では、評価前にマウスが死亡した場合はスコアを 0 としたため、合計スコアは 0 点または 3~18 点となり、スコアが低いほど神経症状が重度である。

2-8-4 感覚運動機能評価 (Grid walking test)

本章 2-3-2 の手順に従って自己血注入脳出血モデルを作製した 1 日後、2 日後及び 3 日後に、Grid walking 試験を行い感覚運動機能の評価を行った。マウスを格子状の網 (網目の大きさ; 10 mm^2 、網の太さ; 0.24 mm) の上で 2 分間自由歩行させ、その間の前肢の踏み外し回数 (エラー数) を測定した (Fig. 26)。

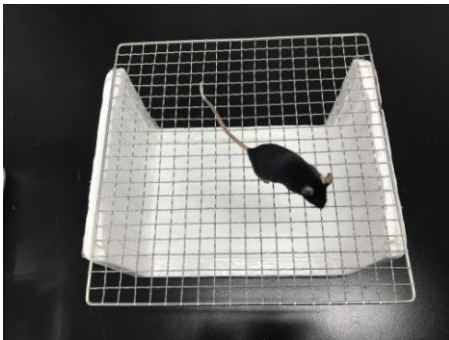


Fig. 26 Grid walking test.

Mice were put on square net to evaluate the forelimb motor function by the grid walking test. The number of step errors was counted for 2 min during spontaneous movement on a grid, which is 0.24-mm wide and 10-mm^2 opening.

2-9 生存率評価

出血性梗塞モデルにおいては、亜急性期である 7 日後までの生存率に対して BARD が及ぼす影響を検討した。本章 2-3-1-2 の手順に従って MCAO 処置を施し、7 日後までの生存率を評価した。本試験においては、1 日 1 回体重を測定した後に、本章 2-8-3 の Garcia 試験を行い、神経症状への影響も同時に評価した。

2-10 ウェスタンブロット法によるタンパク質発現量の評価

2-10-1 タンパク質抽出

本章 2-3-1-2 の手順に従って MCAO 処置を施した 24 時間後、または本章 2-3-2 の手順に従って自己血を注入した 72 時間後に断首し、マウスの脳を摘出した。嗅球と小脳を取り除き、梗塞側 (Ipsilateral side) と対側 (Contralateral side) に分割した。採取した脳組織は protease inhibitor、phosphatase inhibitor cocktails 2 及び 3 を含む RIPA buffer を加えた後に、ホモジナイザーにて細分化した。その後、4°Cにて 12,000×g で 20 分間遠心した後、上清を回収することでタンパク質抽出液とした。

2-10-2 タンパク質定量及び泳動サンプルの調製

第 1 章 2-2-9-2 の手順に従ってタンパク質の定量を行い、1 サンプル当たりのタンパク質量を 10 µg/10 µL として調製し、サンプルを保存した。

2-10-3 電気泳動及び転写

第 1 章 2-2-9-3 の手順に従って行った。

2-10-4 タンパク質発現量の解析

転写後、0.05% Tween20 含有 50 mM TBS で洗浄し、転写膜を 5% スキムミルク溶液 (スキムミルク 2.25g/T-TBS 45 mL) に浸透させることで 30 分間ブロッキングした。その後、T-TBS で洗浄後、Can Get Signal Solution 1 で一次抗体を希釈し、4°Cで一晩浸透した。再び T-TBS で洗浄後、Can Get Signal Solution 2 で二次抗体を希釈して室温にて 1 時間浸透し反応させた。T-TBS で洗浄後、イムノスター®LD 中で 5 分間浸透した。その後、LAS-4000UVmini (Fujifilm、Tokyo、Japan) を用いてバンドを検出した。バンドの強度は ImageJ を用いて解析し、数値化した後に β-actin に対する比として個々の

値を計算した。各群の平均値を算出し、未処置群 (Sham 群) の発現強度を 1 として発現量を比較した。

一次抗体には、rabbit polyclonal anti-ZO-1 (1:250)、anti-VE-cadherin (1:2,000)、anti-claudin-5 (1:200)、anti-PDGFR- β (1:200)、anti-HO-1 (1:200)、anti-SOD1 (1:1,000)、mouse monoclonal anti-CD31 (1:1,000) 及び anti- β -actin (1:5,000) を用いた。二次抗体には、HRP-conjugated goat anti-rabbit antibody (1:2,000)、HRP-conjugated goat anti-mouse antibody (1:2,000) を用いた。

2-11 免疫染色法による評価

2-11-1 免疫染色用凍結組織切片の作製

本章 2-3-2 の手順に従って MCAO 処置を施した 22 時間後に、ペントバルビタール (50 mg/kg) を腹腔内に投与し麻酔を施した。麻酔下で開胸し、ペリスタポンプを用いて生理食塩水を左心室内に 2 分間注入し、灌流を行い、ついで 4%PFA 含有 0.1 M PB (pH 7.4) を同様に 2 分間灌流し固定を行った。その後に脳を摘出し、同固定液中に一晩浸漬した。固定後に脳を 25%スクロース含有 0.1 M PB に 24 時間浸漬し、液体窒素を用いて O.C.T. compound 中に凍結包埋し、クライオスタット (Leica, Tokyo, Japan) を用いて、-20°Cで厚さ 10~20 μ m の切片を作製し、MAS コーティングされたスライドガラス (松波ガラス工業株式会社, Osaka, Japan) に貼付し、-80°Cで保存した。

2-11-2 免疫組織染色による Nrf2 の発現細胞の同定

-80°Cより切片を取り出し、-20°Cで 2 時間、4°Cで 1 時間、室温で 1 時間乾燥させた。その後、Super PAP pen (大道産業株式会社, Osaka, Japan) にて添加液の流出を防ぐため切片周囲を囲った。まず、切片を 0.01 M の PBS で洗浄し、ブロッキング溶液 (5% normal goat serum/PBS) を用いて室温で 1 時間ブロッキングを行った。つぎに、

ブロッキング溶液を用いて rabbit monoclonal anti-Nrf2 を 50 倍希釈して調整した一次抗体を添加し、4°Cで一晩反応させた。その後、PBS で洗浄を行い、ブロッキング溶液を用いて Alexa Fluor[®] 546 goat anti-rabbit を 1,000 倍希釈して調整した二次抗体を添加し、室温で遮光のもと 1 時間反応させた。PBS で洗浄後、M.O.M. blocking reagent を用いて室温で 1 時間ブロッキングを行った。PBS で洗浄後、M.O.M. diluents mixture (PBS:M.O.M. concentrate = 25:2) を用いて mouse monoclonal anti-CD31 または anti-PDGFR- β をそれぞれ 100 倍希釈して調整した一次抗体を添加し、4°Cで一晩反応させた。PBS で洗浄後、M.O.M. diluents mixture を用いて Alexa Fluor[®] 488 goat anti-mouse 及び核染色用の Hoechst33342 をそれぞれ 1,000 倍希釈して調整した二次抗体を室温で 1 時間反応させた。PBS で洗浄後に水溶性封入基材であるフルオロマウントを用いて封入した。ネガティブコントロールは、一次抗体の代わりに PBS を用いて同様の手順で行った。染色した切片は、共焦点レーザー走査型顕微鏡 (FluoView FV10; Olympus, Tokyo, Japan) を用いて梗塞周辺領域 (peri-infarct region)、梗塞中心領域 (core-infarct region)、対側領域 (contralateral region) の観察を行い (Fig. 27)、ランダムに各領域の 3 か所を撮影した。その後、撮影した画像を ImageJ に取り込み、画像内の Nrf2 陽性かつ CD31 陽性細胞 (Nrf2⁺/CD31⁺) または PDGFR- β 陽性細胞 (Nrf2⁺/PDGFR- β ⁺) のマージ細胞数をカウントし、mm²あたりの細胞数を算出した。

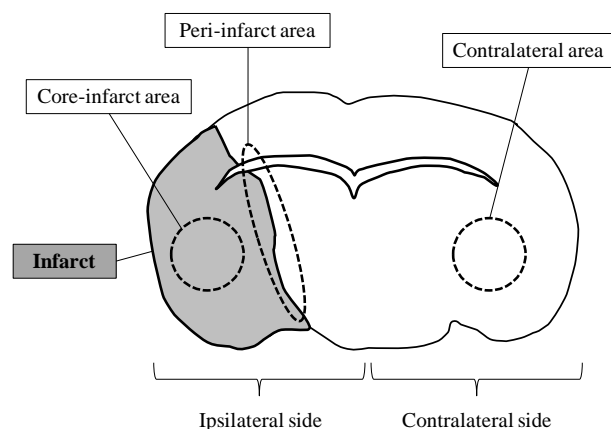


Fig. 27 The illustration of ischemic brain section in immunostaining analysis.

Gray area indicates infarct area.

Core-infarct, peri-infarct and contralateral area were observed.

2-11-3 免疫組織染色による NeuN の発現細胞の定量

本章 2-11-2 と同様の手法でブロッキングまでを行い、ブロッキング溶液を用いて rabbit polyclonal anti-NeuN を 200 倍希釈して調整した一次抗体を添加し、4°Cで一晩反応させた。PBS で洗浄後、ブロッキング溶液を用いて Alexa Fluor[®] 546 goat anti-rabbit 及び Hoechst33342 をそれぞれ 1,000 倍希釈して調整した二次抗体を添加し、室温で遮光のもと 1 時間反応させた。PBS で洗浄後、フルオロマウントを用いて封入した。ネガティブコントロールは、一次抗体の代わりに PBS を用いて同様の手順で行った。染色した切片は、本章 2-11-2 の手順と同様に観察を行い、ランダムに各領域の 3 か所を撮影した。その後、撮影した画像を ImageJ に取り込み、画像内の NeuN 陽性細胞数をカウントし、mm²あたりの細胞数を算出した。

2-12 脳水分量測定による脳浮腫評価

本章 2-3-2 の手順に従って自己血注入脳出血モデルを作製した 3 日後に断首し、マウスの脳を摘出した。嗅球と小脳を取り除き、脳を出血側 (Ipsilateral side) と対側 (Contralateral side) に分割して脳重量を測定した (乾燥前重量; wet weight)。その後、100°Cで 24 時間インキュベートして乾燥後、再度脳重量を測定した (乾燥後重量; dry weight)。脳水分量は [(wet weight) – (dry weight)/(wet weight) ×100%] で算出された。

2-13 神経障害領域の評価 (クレシルバイオレット染色)

本章 2-3-2 の手順に従って自己血注入脳出血モデルを作製した 3 日後に本章 2-11-1 の手順と同様に脳凍結切片を作製した。切片を 20 分間 1%クレシルバイオレット液に浸した後に、蒸留水、70%エタノール、95%エタノールの順に数秒間浸し、無水

エタノールに 5 分間浸透させ、脱水した。その後、キシレンに 2 回浸し、油性基材であるオイキットで封入した。染色した切片は BIOREVO BZ-X710 を用いて撮影し、画像を ImageJ に取り込み、非染色部位を障害領域として面積を測定し、全脳における障害領域の割合を算出した。

2-14 統計学的解析

実験成績は平均値 \pm 標準誤差 (SE) で示した。統計学的な比較は、Statview version 5.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を用いて、2 群間の比較では F 検定後に Student's *t*-test を行った。多群間の比較では Bonferroni 補正をかけた Student's *t*-test を行った。ノンパラメトリック検定では Mann Whitney *U*-test を行い、生存率の比較では Log-rank *t*-test により検定を行った。危険率が 5% 未満を有意差ありとした。

第3節 実験結果

3-1 梗塞巣形成に対する BARD の作用

6時間の虚血障害によって形成された梗塞巣に対する BARD 静脈内投与の作用を検討した (Fig. 28A)。MCAO 処置の 24 時間後において、vehicle 群と比べ warfarin 投与群では TTC 染色後における脳切片上の出血痕 (黒色部) が増加した。さらに、warfarin 投与群と比べ BARD 投与群ではそれらの出血痕が減少した (Fig. 28B)。梗塞体積を定量した結果、MCAO 処置を行った vehicle 群、warfarin 投与群及び BARD 投与群 (0.2、0.6、2.0 mg/kg) の各群間で明らかな変化は認められなかった (Fig. 28C)。また、MCAO 処置の 3 日後においては、24 時間後の脳切片と同様に warfarin 投与群で出血痕が増加し、BARD 投与群ではその増加が抑制された (Fig. 28D)。梗塞体積の定量では、各群間で明らかな変化は認められなかった (Fig. 28E)。

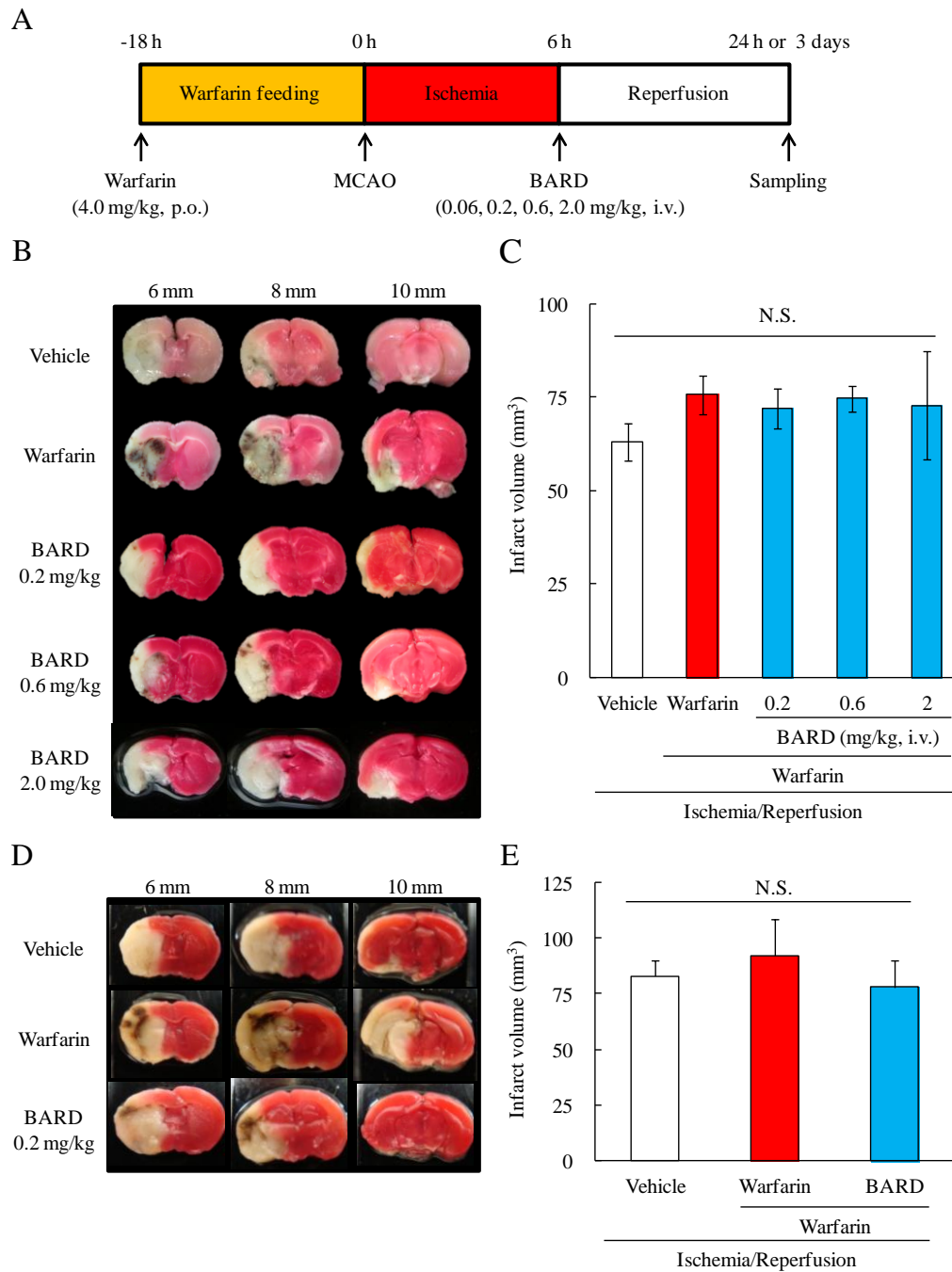


Fig. 28 Effects of warfarin and BARD on infarct volume at 24 h and 3 days after t-MCAO.

(A) Experimental protocol. (B) TTC staining of brain slices at 24 h after t-MCAO. The black stained parts in brains indicates hemorrhagic area. (C) The quantitative graph of infarct volume at 24 h after t-MCAO. (D) TTC staining of brain slices at 3 days after t-MCAO. (E) The quantitative graph of infarct volume at 3 days after t-MCAO. 24 h; Vehicle (ischemia/reperfusion; IRI), $n = 7$; Warfarin (IRI + warfarin), $n = 8$; BARD (IRI + warfarin + BARD 0.2, 0.6 or 2.0 mg/kg), $n = 10, 7, 4$. 3 days; Vehicle, $n = 10$; Warfarin, $n = 6$; BARD, $n = 4$. Data are expressed as mean \pm SE. Statistical significance was determined by Student's *t*-test with Bonferroni's correction. N.S.; not significant.

3-2 出血性梗塞 (出血量) に対する BARD の作用

Warfarin 投与条件下での脳梗塞誘導によって生じる出血性梗塞に対する BARD の作用を検討するため、ヘモグロビン測定キットを用いて出血量を評価した。MCAO 処置の 24 時間後において、sham 群と比べ MCAO 処置を行った vehicle 群では出血量が顕著に増加し、warfarin 投与はその出血を悪化させた。0.2 mg/kg の BARD 静脈内投与は warfarin 投与群と比べ出血量を減少したが (Fig. 29A、B)、0.06 mg/kg 及び 0.6 mg/kg の BARD 投与は出血量に影響を及ぼさなかった (Fig. 29A、B)。

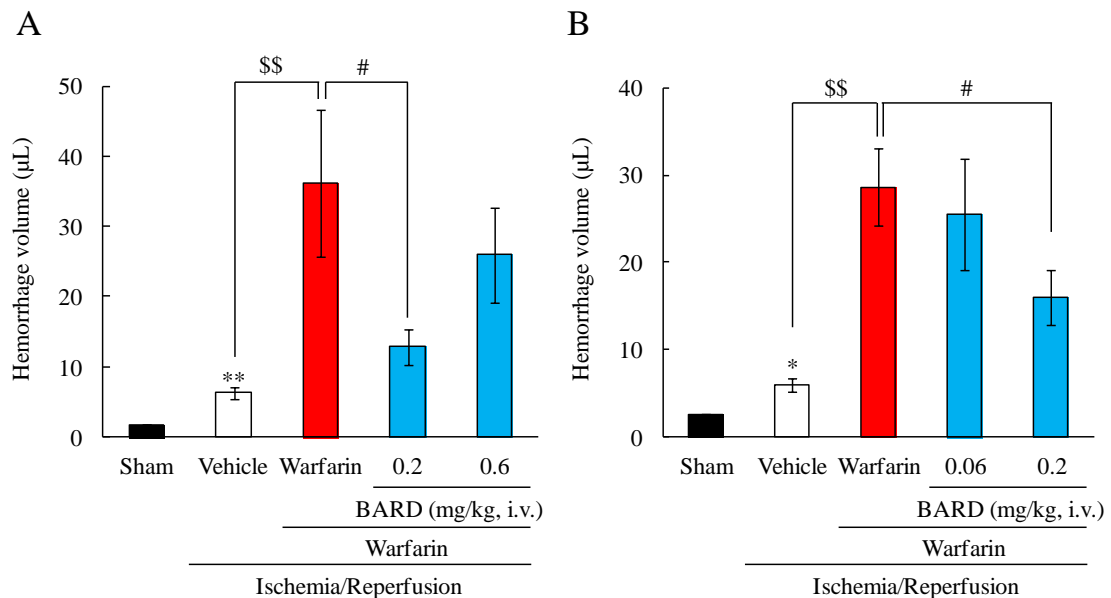


Fig. 29 Effects of warfarin and BARD on hemorrhage volume.

(A) The quantitative graph of hemorrhage volume to evaluate the effect of BARD (0.2 or 0.6 mg/kg, i.v.). (B) The quantitative graph of hemorrhage volume to evaluate the effect of BARD (0.06 or 0.2 mg/kg, i.v.). (A); sham, n = 14; Vehicle, n = 16; Warfarin, n = 12; BARD 0.2 mg/kg, n = 12; BARD 0.6 mg/kg, n = 12; (B) Sham, n = 5; Vehicle, n = 10; Warfarin, n = 10; BARD 0.2 mg/kg, n = 10; BARD 0.06 mg/kg, n = 10. Data are expressed as mean \pm SE. Statistical significance was determined by Student's *t*-test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. sham; \$\$ $p < 0.01$ vs. vehicle; # $p < 0.05$ vs. warfarin. N.S.; not significant.

3-3 神経症状及び7日間生存率に対する BARD の作用

3種の行動観察試験により神経症状の評価を行うとともにMCAO処置7日後までの生存率に対するBARD (0.2 mg/kg, i.v.) 投与の作用を検討した。神経学的スコアにおいては、vehicle群と比べwarfarin投与により神経症状が悪化し、BARD投与はこの変化に影響を及ぼさなかった (Fig. 30A)。コーナーターン試験においては、sham群と比べMCAO処置を行ったvehicle群に左旋回の割合が増加し、warfarin投与によりさらに増加した。BARD投与は旋回の割合に対して影響を及ぼさなかった (Fig. 30B)。Garcia試験においては、sham群と比べwarfarin投与群においてMCAO処置1日後のスコアが低下したため、神経症状が悪化した。また、スコアの低下は徐々に進行し、MCAO処置7日後までスコアは低下したままであり、神経症状の悪化は持続していた。一方、BARD投与群においてはMCAO処置1日後からスコアが低下したが、4日後にはwarfarin投与群と比べて高いスコアを示し、以後7日後までwarfarin投与群よりも高いスコアであったため、BARD投与はwarfarin投与による神経症状の悪化を抑制した (Fig. 30C)。MCAO処置7日後までの生存率を検討した結果、warfarin投与群では7日後時点で18匹中18匹 (100%) のマウスが死亡したが、BARD投与により19匹中3匹 (15%) が生存した。しかし、warfarin投与群とBARD投与群の間に統計学的な有意差は認められなかった (Fig. 30D)。上記の結果より、BARD投与は脳梗塞後の出血性梗塞によって発生する神経症状の悪化を抑制することが示唆された。

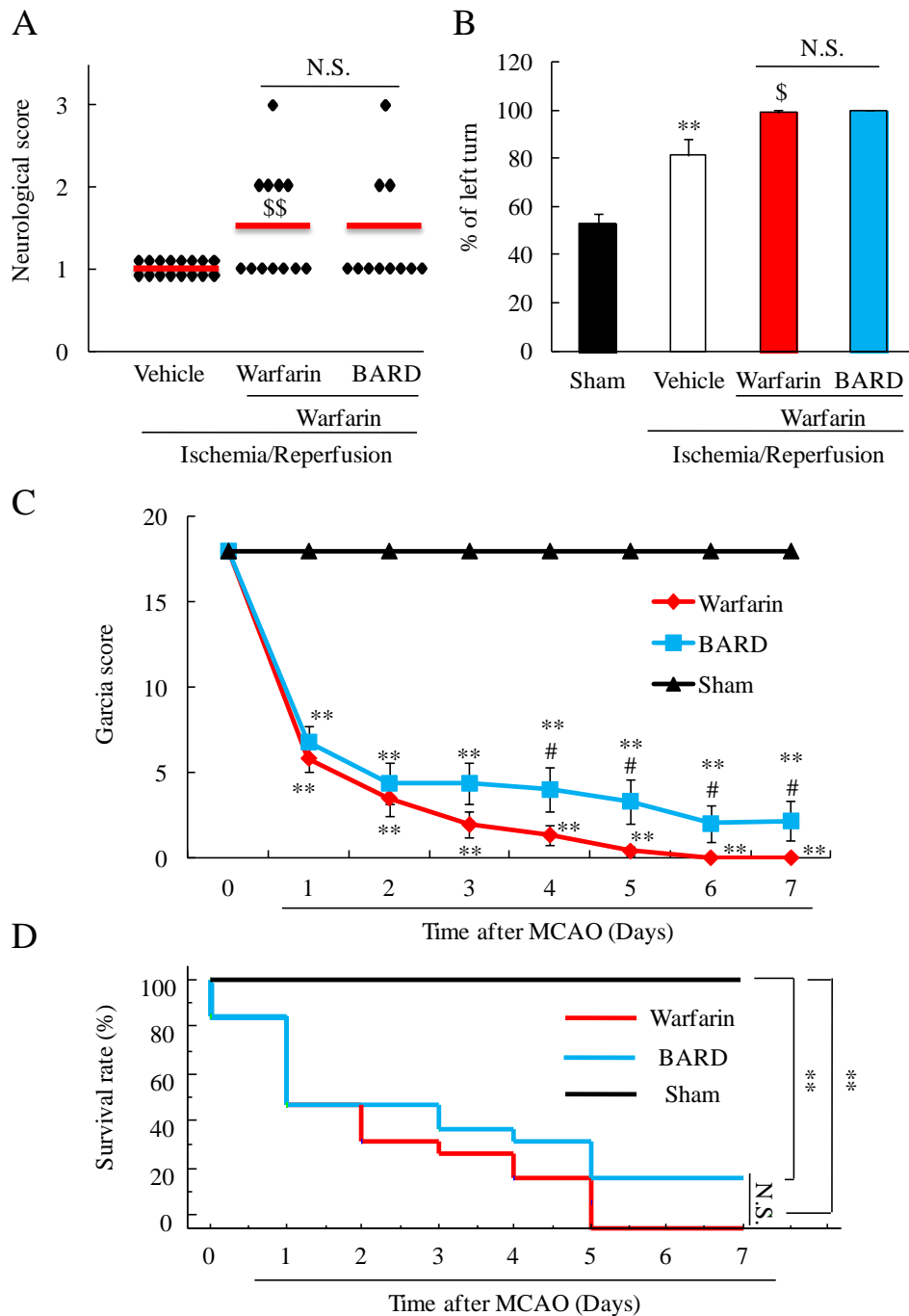


Fig. 30 Effects of warfarin and BARD on neurological deficits and survival rate.

(A)-(C) Effects on neurological deficits. (A) Neurological score; (B) Corner test; (C) Garcia test; (D) Survival rate.

(A)-(B) was evaluated at 24 h after MCAO, (C)-(D) was until 7 days after MCAO. (A)-(B); Sham, n = 14; Vehicle, n = 16; Warfarin, n = 12; BARD 0.2 mg/kg, n = 12; (C)-(D) Sham, n = 7; Warfarin, n = 18; BARD 0.2 mg/kg, n = 19.

Data are expressed as mean \pm SE. Statistical significance was determined by Mann Whitney *U*-test, Student's *t*-test and Log-rank *t*-test, \$ $p < 0.05$, \$\$ $p < 0.01$ vs. vehicle; ** $p < 0.01$ vs. sham; # $p < 0.05$ vs. warfarin. N.S.; not significant.

3-4 BBB 透過性亢進に対する BARD の作用

BARD 投与は脳梗塞後の出血性梗塞やそれによって生じる神経症状の悪化を抑制することが示唆されたため、出血の原因である BBB 透過性に対する BARD (0.2 mg/kg, i.v.) 投与の作用を EB の組織内漏出量を測定することにより評価した。MCAO 処置 1 日後において、sham 群と比べ MCAO 処置を行った 3 群 (vehicle 群、warfarin 投与群、BARD 投与群) の梗塞側 (Top; 左、Bottom; 右) で脳表面の出血 (赤) と EB 漏出 (青) が認められた (Fig. 31A)。EB 漏出量の定量では、sham 群と比べ vehicle 群で EB 量が増加し、warfarin 投与によりさらに増加した。一方、0.2 mg/kg の BARD 静脈内投与によりその増加は抑制された (Fig. 31B)。これらの結果より、BARD 投与は warfarin によって悪化する脳梗塞後の BBB 透過性亢進を抑制し、出血性梗塞の悪化を防ぐことが示唆された。

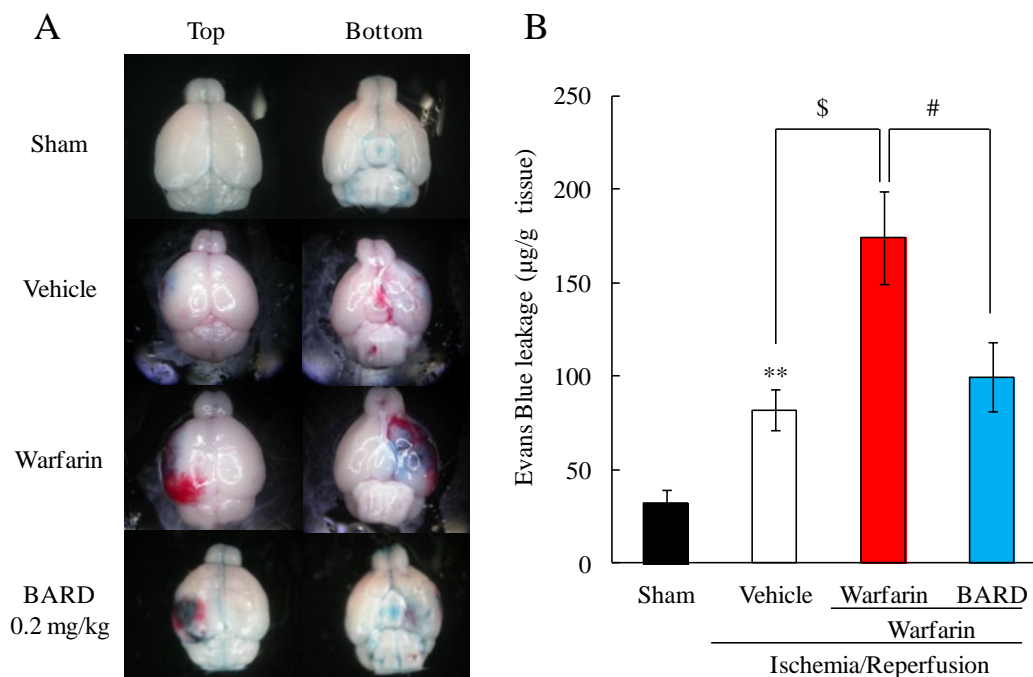


Fig. 31 Effect of warfarin and BARD on BBB permeability after MCAO.

(A) Representative images of EB leakage in representative mice brains in each group at 24 h after MCAO. (B) Quantitative analysis of EB amount in brains. Blue area shows extravasation of EB, indicating BBB disruption. Data are expressed as mean \pm SE. Statistical significance was determined by Student's *t*-test, ** $p < 0.01$ vs. sham; $^{\$}$ $p < 0.05$ vs. vehicle; $^{\#}$ $p < 0.05$ vs. warfarin. (B) Sham, $n = 6$; Vehicle, $n = 5$; Warfarin, $n = 12$; BARD 0.2 mg/kg, $n = 8$.

3-5 出血性梗塞後の神経細胞障害に対する BARD の作用

BARD は、warfarin 誘発性出血性梗塞によって引き起こされる神経症状の悪化を抑制することが示唆された。つづいて、BARD (0.2 mg/kg, i.v.) 投与が梗塞領域やその周辺における神経細胞に及ぼす影響を免疫染色法により評価した。神経細胞のマーカである NeuN を用いて免疫染色を行った結果、梗塞周辺領域における NeuN 陽性細胞数は MCAO 処置のみを施した vehicle 群と比べ、warfarin 投与群において減少したが、BARD 投与はその減少を抑制した。梗塞中心領域では各群とも周辺領域より NeuN 陽性細胞数が少ない傾向にあったが、各群間における有意な変化は認められなかった。また、対側領域の NeuN 陽性細胞数に関して各群間で明らかな差は認められなかった (Fig. 32A, B)。上記より、BARD 投与は、脳梗塞や二次的な出血性梗塞によって生じる神経細胞数の減少を抑制することが示唆された。

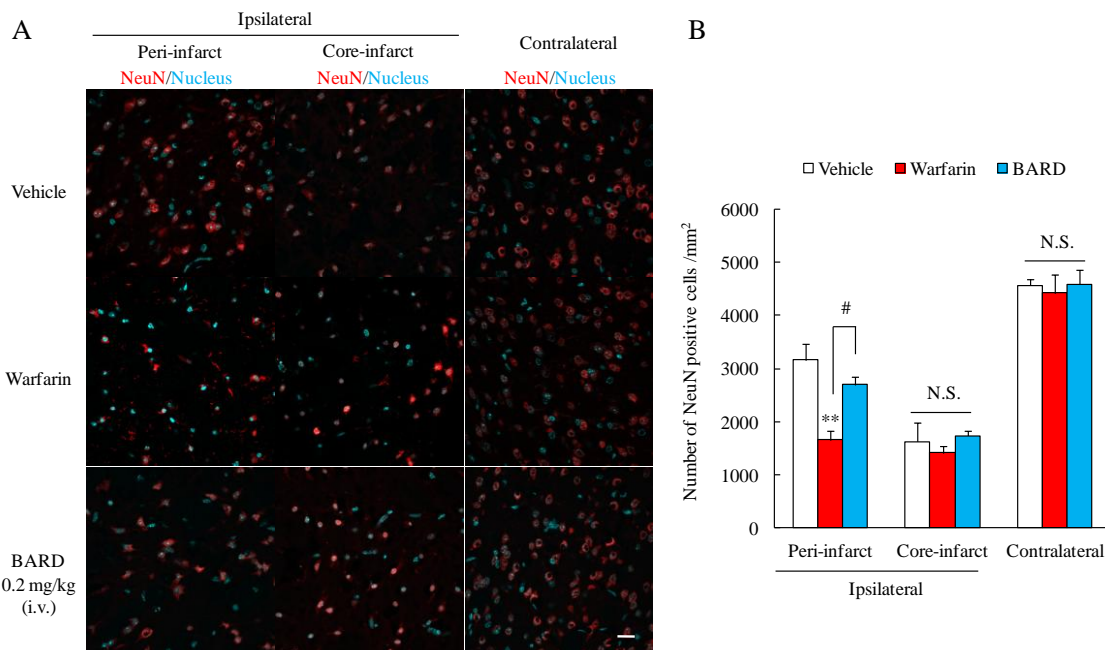


Fig. 32 Effect of warfarin and BARD on neurons at 24 h after t-MCAO.

(A) Representative immunofluorescence images for NeuN (red; neurons) and Hoechst 33342 (blue; nucleus) in peri-, core-infarct and contralateral side of brains at 24 h after t-MCAO. (B) Quantification of co-expression cells in (A). Vehicle, n = 3; Warfarin, n = 3; BARD 0.2 mg/kg, n = 3. Scale bar = 20 μ m. Data are expressed as mean \pm SE. Statistical significance was determined by Tukey's test, ** $p < 0.01$ vs. vehicle; # $p < 0.05$ vs. warfarin. N.S.; not significant.

3-6 出血性梗塞後の BBB 構成因子に対する BARD の作用

3-6-1 血管内皮細胞に対する BARD の作用

BARD 投与により出血性梗塞の悪化や BBB 透過性の亢進が抑制されたため、BARD は BBB 構成因子に影響を及ぼす可能性がある。そのため、BARD による血管内皮細胞への Nrf2 の発現、並びに血管内皮細胞マーカーのタンパク質発現量に及ぼす影響を検討した。まず、免疫染色法により BARD (0.2 mg/kg, i.v.) 投与後の梗塞巣中心及びその周辺領域に存在する血管内皮細胞における Nrf2 の発現を評価した。Nrf2 (赤) は梗塞巣中心 (コア) 及びその周辺領域において、矢印で示すように血管内皮細胞 (CD31; 緑) と共局在した (Fig. 33A)。矢印で示す Nrf2 を発現する血管内皮細胞 (Nrf2 陽性血管内皮細胞; CD31⁺/Nrf2⁺) の数を計測した結果、MCAO 処置のみを施した vehicle 群と比べ warfarin 投与群ではコア及びその周辺領域における CD31⁺/Nrf2⁺ 細胞数が減少したが、BARD 投与によってその減少が抑制された。一方、対側の CD31⁺/Nrf2⁺ 細胞数に関しては明らかな変化は認められなかった (Fig. 33B)。つぎに、ウェスタンブロット法により血管内皮細胞マーカーである CD31 の発現量を検討した結果、CD31 の発現量は sham 群と比べ vehicle 群で減少傾向がみられ、warfarin 投与により更に減少した。一方、BARD 投与によって、CD31 の発現量の減少が抑制された (Fig. 33C)。

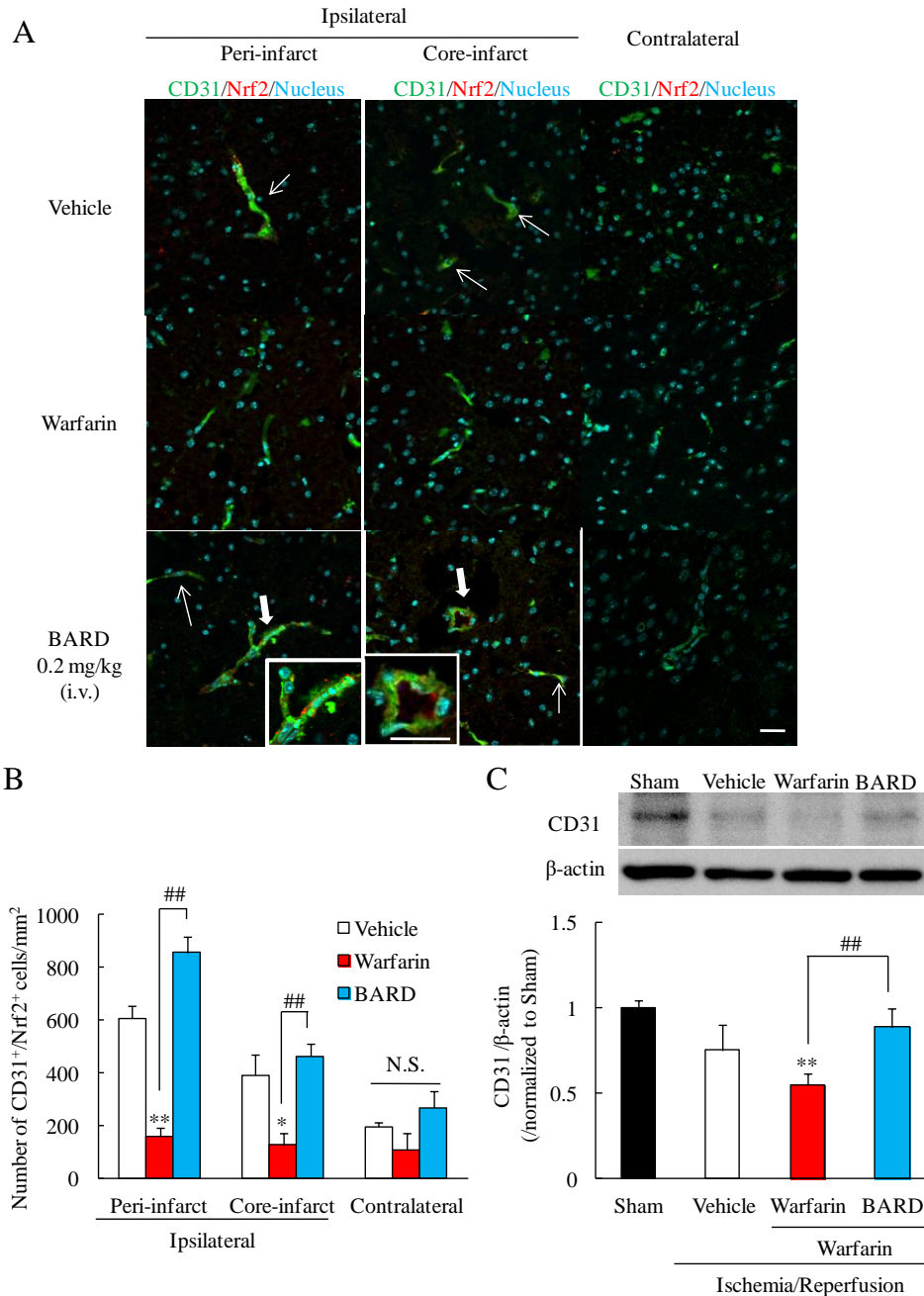


Fig.33 Effects of warfarin and BARD on endothelial cells at 24 h after t-MCAO.

(A) Representative immunofluorescence images for Nrf2 (red), CD31 (green; endothelial cells) and Hoechst33342 (blue; nucleus) in peri-, core-infarct and contralateral side of brains after MCAO, and big arrows indicate cells in enlarged images, small arrows indicate co-expression cells. (B) Quantification of co-expression cells in (A). (C) Western blotting of CD31. (A)-(B) Vehicle, n = 3; Warfarin, n = 3; BARD 0.2 mg/kg, n = 3. Scale bar = 20 μm. (C) Sham, n = 6; Vehicle, n = 9; Warfarin, n = 9; BARD 0.2 mg/kg, n = 10. Data are expressed as mean ± SE. Statistical significance was determined by Student's *t*-test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. sham or vehicle; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. warfarin. N.S.; not significant.

3-6-2 ペリサイトに対する BARD の作用

ペリサイトの血管からの脱離や変性は BBB 透過性の亢進を引き起こすことから (20)、血管内皮細胞と同様に BARD によるペリサイトへの Nrf2 の発現、並びにペリサイトマーカーのタンパク質発現量に及ぼす影響を検討した。まず、免疫染色法により BARD (0.2 mg/kg, i.v.) 投与後の梗塞巣中心及びその周辺領域に存在するペリサイトにおける Nrf2 の発現を評価した。Nrf2 (赤) はコア及びその周辺領域において、矢印で示すように ペリサイト (PDGFR- β ; 緑) と共局在した (Fig. 34A)。矢印で示す Nrf2 を発現するペリサイト (Nrf2 陽性ペリサイト; PDGFR- β^+ /Nrf2 $^+$) の数を計測した結果、MCAO 処置のみを施した vehicle 群と比べ warfarin 投与群ではコア及びその周辺領域における PDGFR- β^+ /Nrf2 $^+$ 細胞数が減少したが、BARD 投与によってその減少が抑制された。一方、対側の PDGFR- β^+ /Nrf2 $^+$ 細胞数に関しては明らかな変化は認められなかった (Fig. 34B)。つぎに、ウェスタンブロット法によりペリサイトマーカーである PDGFR- β の発現量を検討した結果、PDGFR- β の発現は sham 群と比べ vehicle 群で有意に減少し、warfarin 投与によりその減少は更に顕著であった。一方、BARD 投与によって PDGFR- β の発現量の減少が抑制された (Fig. 34C)。

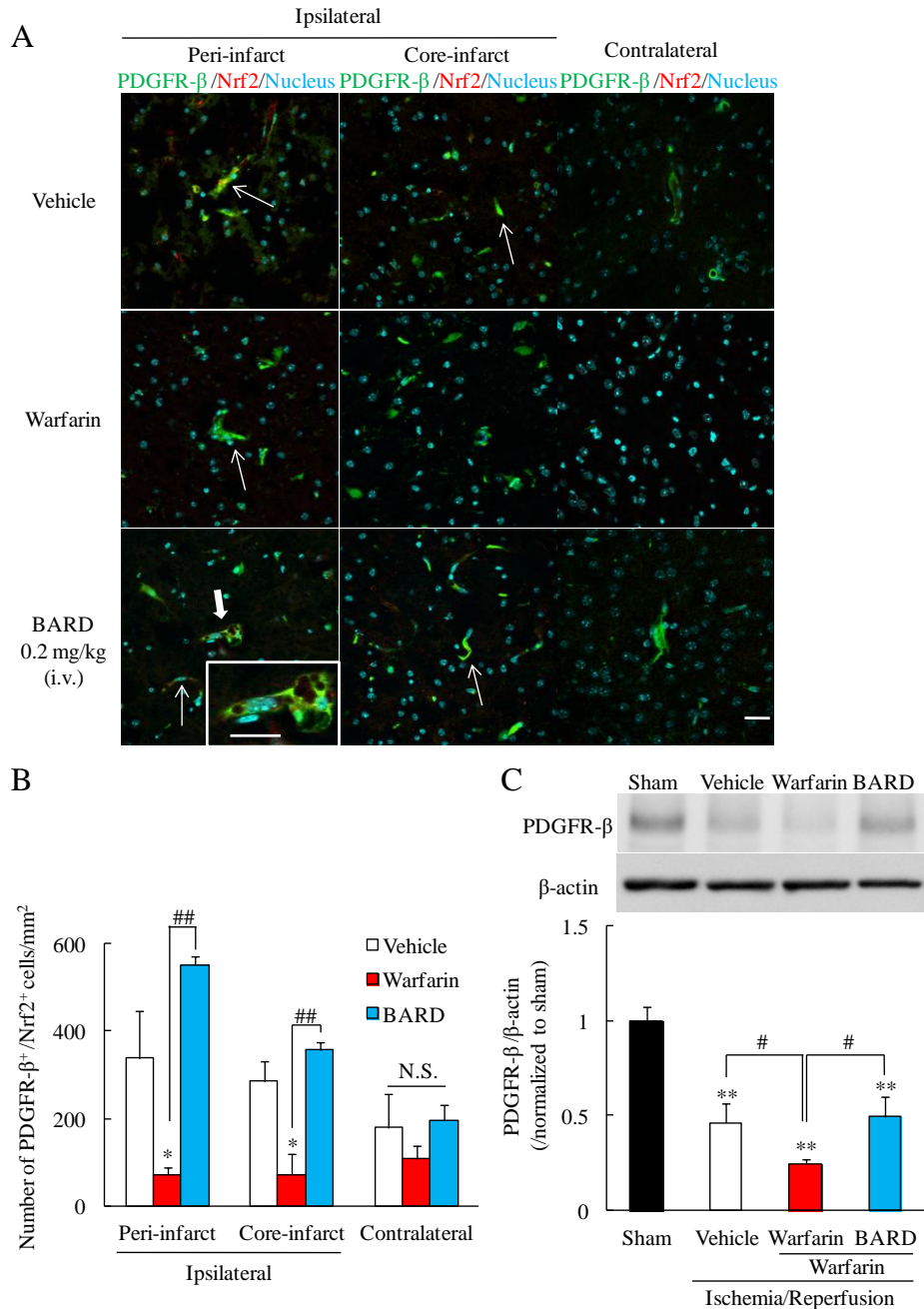


Fig. 34 Effect of warfarin and BARD on pericytes at 24 h after t-MCAO.

(A) Representative immunofluorescence staining for Nrf2 (red), PDGFR-β (green; pericytes) and Hoechst33342 (blue; nucleus) in peri-, core-infarct and contralateral of brains after MCAO, and big arrows indicate cells in enlarged images, small arrows indicate co-expression cells. (B) Quantification of co-expression cells in (A). (C) Western blotting of PDGFR-β. (A)-(B) Vehicle, n = 3; Warfarin, n = 3; BARD 0.2 mg/kg, n = 3. Scale bar = 20 μm. (C) Sham, n = 6; Vehicle, n = 9; Warfarin, n = 9; BARD 0.2 mg/kg, n = 10. Data are expressed as mean ± SE. Statistical significance was determined by Student's *t*-test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. sham or vehicle; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. warfarin. N.S.; not significant.

3-6-3 血管内皮細胞間に存在する結合因子の発現量評価

血管内皮細胞間に存在する結合因子は BBB 構造において重要な機能を果たしているため (17, 18)、タイトジャンクション (密着結合; ZO-1、claudin-5) 及びアドヘレンスジャンクション (付着結合; VE-cadherin) などの細胞間結合因子の発現量に対する BARD (0.2 mg/kg, i.v.) 投与の作用をウェスタンブロット法により評価した。Sham 群と比べ vehicle 群では ZO-1 の発現量の減少、並びに claudin-5 の発現量の減少傾向がみられた。さらに、warfarin 投与によりそれらは顕著に減少した。一方、BARD 投与によって ZO-1 及び claudin-5 の発現減少が有意に抑制された (Fig. 35A, B)。Sham 群と比べ vehicle 群では VE-cadherin の発現量の減少がみられ、warfarin 投与により更に減少した。一方、BARD 投与によって VE-cadherin の発現量の減少が有意に抑制された (Fig. 35C)。

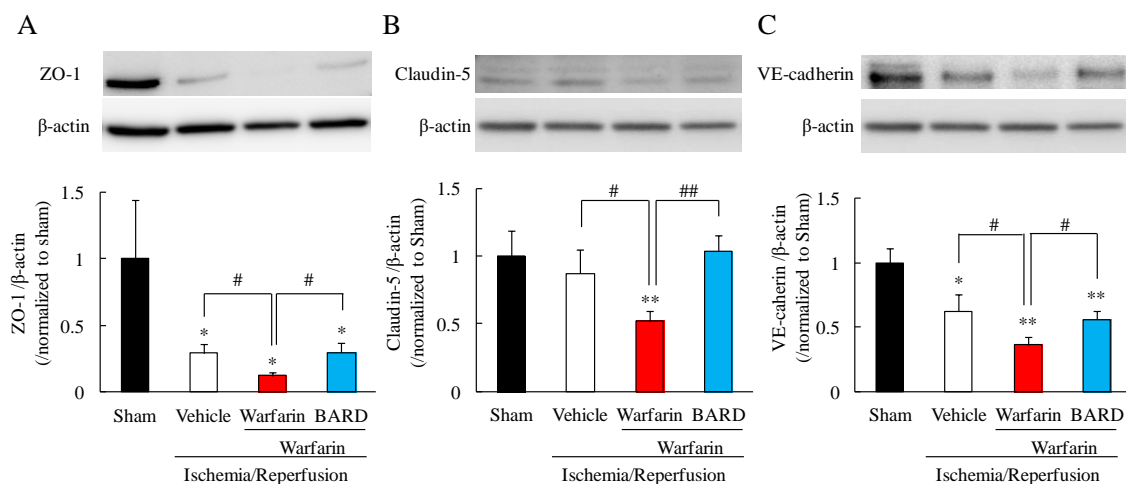


Fig. 35 Effects of warfarin and BARD on junction proteins.

These data shows the expression levels of (A) ZO-1, (B) Claudin-5, (C) VE-cadherin.; Sham, n = 6; Vehicle, n = 9; Warfarin, n = 9; BARD 0.2 mg/kg, n = 10. Data are expressed as mean \pm SE. Statistical significance was determined by Student's *t*-test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. sham; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. warfarin.

3-7 自己血注入脳出血モデルを用いた検討

3-7-1 脳出血後の脳浮腫及び神経障害に対する RS9 の作用

これまでの結果から、Nrf2 活性化薬が出血性脳卒中病態に有効であることが示唆されたため、脳出血に対する Nrf2 活性化薬 RS9 の作用を検討した (Fig. 36A)。脳出血誘導 72 時間後における出血側 (Ipsilateral side) の線条体 (Striatum) 及び全脳 (Total) の脳水分量は、0.2 mg/kg の RS9 を術後に頻回腹腔内投与することにより Vehicle 群と比べて減少した (Fig. 36B)。出血側の皮質 (Cortex) や対側 (Contralateral side) の各領域においては、両群で明らかな変化は認められなかった。つぎに、自己血注入後の神経症状を評価した結果、脳出血誘導 48 時間後及び 72 時間後において vehicle 群と比べて RS9 投与により神経スコアが増加し、エラー数が低下した (Fig. 36C、D)。さらに、脳出血誘導 72 時間後の神経障害領域をクレシルバイオレット染色により評価した結果、RS9 投与により障害領域が減少した (Fig. 36E)。

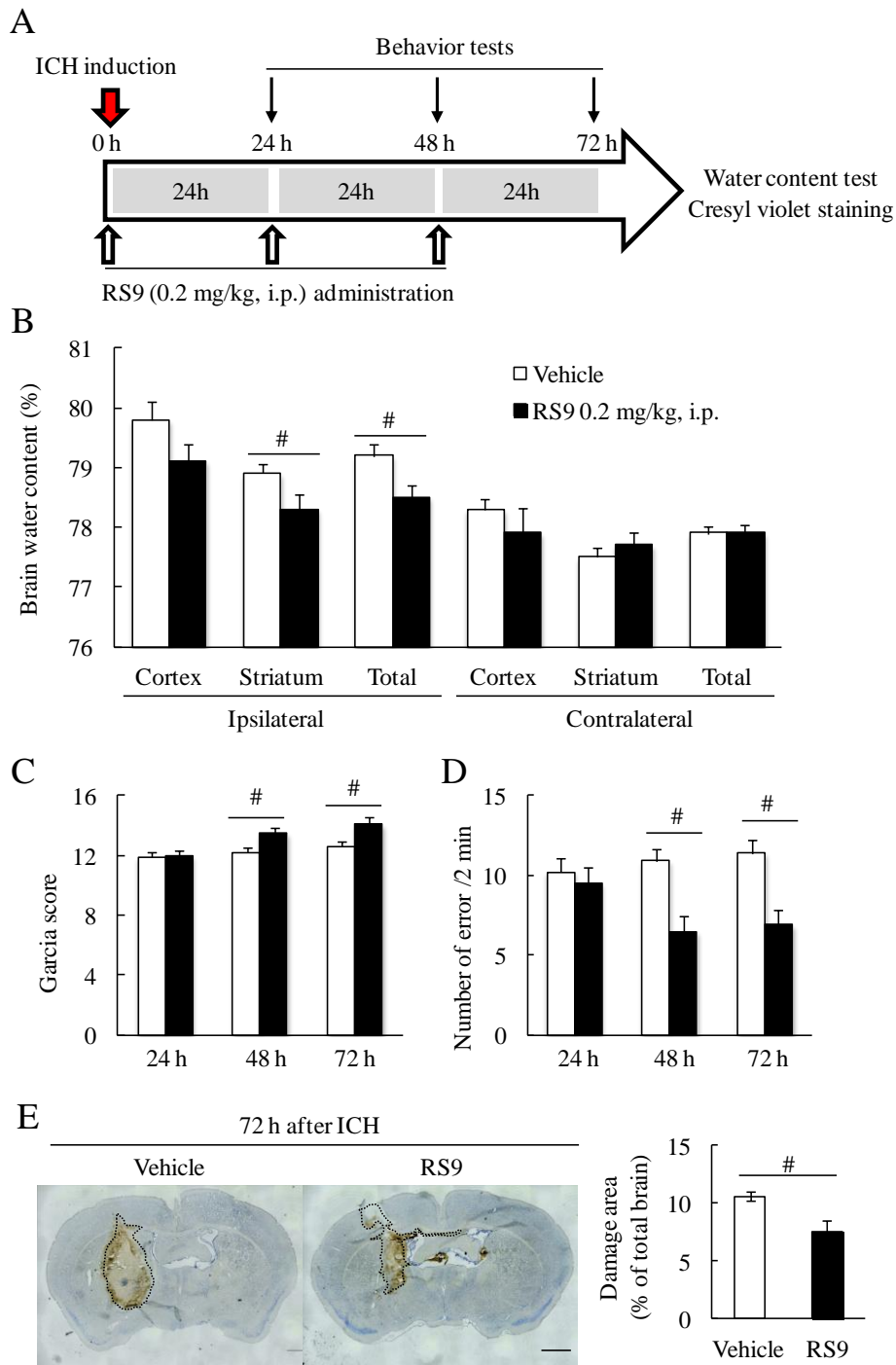


Fig. 36 The protective effects of RS9 on autologous blood injection mouse ICH model.

(A) Experimental protocol. Mice were treated with vehicle or RS9 (0.2 mg/kg) intraperitoneally after ICH induction and once a day. (B) The brain water content was evaluated 72 h after the induction of ICH ($^{\#}p < 0.05$ vs. vehicle, the Student's *t*-test). (C) Neurological assessment such as Garcia test and Grid walking test were evaluated at 24, 48, and 72 h after ICH induction. Data are expressed as the mean \pm SE. Statistical significance was determined by Student's *t*-test or the Mann Whitney *U*-test, $^{\#}p < 0.05$ vs. vehicle. (B-D; Vehicle, *n* = 13; RS9, *n* = 14; E; each group, *n* = 5)

3-7-2 脳出血後の脳障害に対する RS9 の保護作用機序

過去の当研究室の報告において、Nrf2 活性化薬 RS9 は抗酸化ストレス酵素である HO-1 を誘導することが明らかにされている (111)。そのため、脳出血誘導 8 時間後及び 72 時間後における抗酸化ストレス酵素のタンパク質発現量に対する RS9 の及ぼす影響を検討した。脳出血誘導 72 時間後に抗酸化ストレス酵素である HO-1 及び SOD1 の発現量は control 群と比べて有意に増加した。その増加は、RS9 投与により顕著に増加した。一方、発症早期である 8 時間後においてはどちらのタンパク質も発現量に明らかな変化は認められなかった (Fig. 37)。

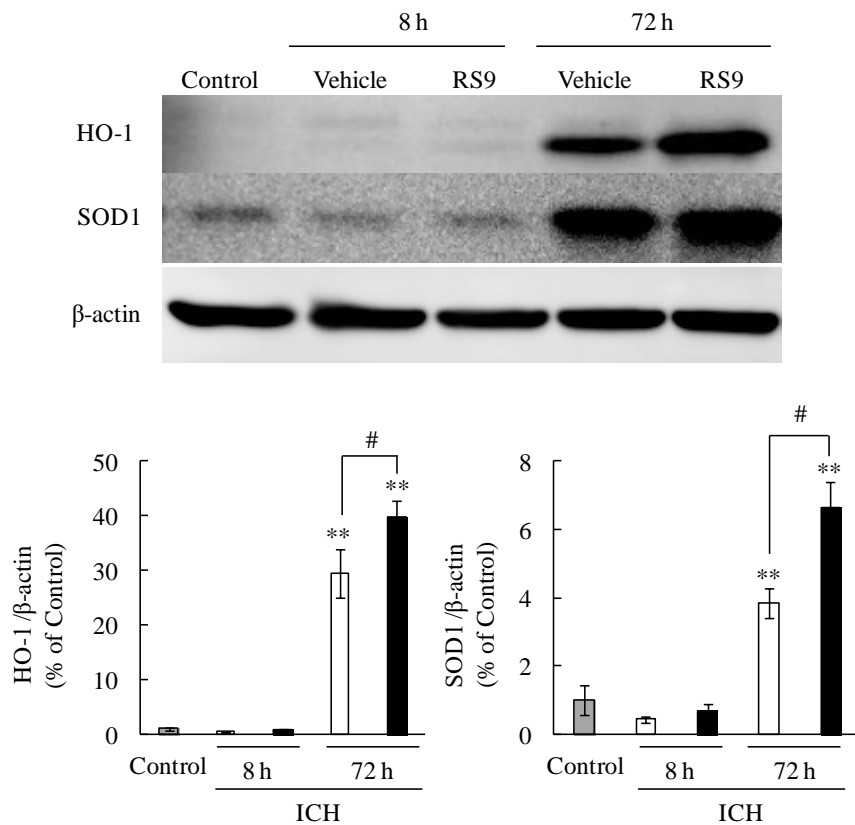


Fig. 37 Antioxidant proteins expression at 8 and 72 h after ICH induction.

Mice were sacrificed 8 and 72 h after ICH induction. Brain tissues were obtained from the peri-hematoma area on the ipsilateral side of autologous blood injection mice model. The upper bands indicate representative bands. The lower graph shows quantitative data. Data are expressed as the mean \pm SE. Statistical significance was determined by Tukey's test, ** $p < 0.01$ vs. control, # $p < 0.05$ vs. vehicle. (Each group, $n = 5$)

第4節 考察

本章では、脳虚血再灌流後に発症する致死的な出血性梗塞に対して、生体内の抗酸化ストレス防御機構の中核を担う Nrf2 活性化がどのような影響を及ぼすかを明らかにするために検討を行った。その結果、BARD 投与は、(1) 易出血性条件下での6時間脳虚血再灌流後に発症する出血性梗塞を減弱させ、(2) 血管内皮細胞、ペリサイト及び細胞間結合因子を保護することで BBB 透過性亢進を抑制し、(3) 脳梗塞後の梗塞周辺領域に存在する血管内皮細胞及びペリサイトに Nrf2 の発現を亢進させることが明らかになった。また、(4) Nrf2 活性化薬 RS9 投与は、抗酸化ストレス酵素の発現を増強し、脳出血後の脳浮腫や神経障害を抑制することを明らかにした。

本章では、ワルファリン投与により易出血性状態を誘導したマウスに rt-PA の使用可能時間を超過した6時間の虚血負荷を MCAO 処置により施した。その結果、MCAO 処置24時間後及び3日後において、広範な梗塞巣が形成されるとともに、ワルファリン投与群では重度の出血（出血性梗塞）が惹起された。2時間の一過性脳虚血モデルを使用した過去の報告では、再灌流時の BARD 投与により梗塞巣が有意に縮小したが (109)、本試験の条件下では、BARD 投与による梗塞巣への影響は認められなかった (Fig. 28)。梗塞巣の形成は3時間の脳虚血負荷ですでに完成するため (57)、6時間の脳虚血負荷における BARD の再灌流時投与は梗塞巣に影響を及ぼさなかったと考えられる。一方、BARD はワルファリン投与による出血量の悪化を抑制した (Fig. 29)。Nrf2 活性化薬の投与は、短時間の脳虚血負荷後に生じる再灌流障害に対して有効であることが報告されているが (103, 109, 121)、重症度の高い6時間虚血負荷や出血性梗塞に及ぼす影響は不明であった。本検討より、BARD 投与により脳虚血再灌流後の血腫量が減少したことから、Nrf2 活性化薬は出血性梗塞に対しても有効であると考えられるが、その詳細な機序は現時点では不明である。

脳虚血再灌流時の BARD 投与は、脳梗塞24時間後の急性期の神経症状に対し

て影響を及ぼさなかったが (Fig. 30A、B、C)、脳梗塞 4~7 日後の亜急性期において症状の進行を抑制した (Fig. 30C)。しかし、BARD 投与は脳梗塞 1 日後または 3 日後の梗塞体積に影響を及ぼさなかった。急性期では、6 時間虚血による広範な梗塞巣の形成が神経症状に強く影響したため、神経症状の改善が観察されなかったと推察される。一方、脳梗塞 4 日後以降の亜急性期では、再灌流時に生じた出血が炎症反応や浮腫といった副次的な障害を引き起こし、神経症状を悪化させることが知られている (23, 30, 122-124)。また、Nrf2 活性化作用を有する化合物は、脳出血によって生じる浮腫を抑制し、神経症状の悪化を抑制することが報告されている (125, 126)。本検討においても、BARD 投与による脳内の血腫量の減少が副次的な障害の進行を抑制し、亜急性期における神経症状の進行を抑制したと考えられる。梗塞巣の拡大は、神経症状だけでなく生存率にも影響を及ぼし、梗塞巣の縮小により生存率の低下は改善することが報告されている (127, 128)。BARD 投与は脳梗塞発症 7 日後までの生存率に対しては影響を及ぼさなかった (Fig. 30D)。これには、6 時間の脳虚血負荷による広範な梗塞巣が強く生存率に影響を及ぼしたことが考えられる。上記の結果より、梗塞巣が広範であったとしても、Nrf2 活性化により再灌流後の出血を抑制することにより、炎症反応や浮腫が原因となって生じる副次的な神経症状の悪化を抑制する可能性が考えられる。

脳虚血及びその後の再灌流による急激な ROS 産生亢進は、酸化ストレスの惹起により血管内皮細胞の浮腫や BBB 透過性を亢進する (28, 29, 59)。BBB 透過性亢進は、脳実質組織への免疫担当細胞やサイトカインの浸潤を促進し、炎症反応に伴う浮腫を誘発する (17, 21)。その後、炎症反応の進行に伴い BBB が破綻し、最終的には出血の誘発とさらなる ROS 産生亢進により、二次的な神経症状の悪化を引き起こす (17, 18, 116)。そのため、BBB 透過性亢進の抑制は、脳梗塞後の神経症状の改善を目的とした治療法の確立につながる。BARD 投与により出血性梗塞後の BBB 透過性亢進

が抑制された (Fig. 31)。また、**BARD** 投与は梗塞周辺領域に存在する神経細胞数の低下を抑制した (Fig. 32)。上記より、**BARD** による BBB 及び神経細胞の保護は脳梗塞後の神経症状に関与する。過去の報告において、**BARD** 投与は脳梗塞後の梗塞周辺領域に存在する神経細胞やアストロサイトにおいて **Nrf2** を発現することが明らかになっているが (109)、BBB 構成細胞における **Nrf2** 発現は不明である。本検討の免疫染色法を用いた脳組織評価の結果から、**BARD** 投与は出血性梗塞発症後に BBB 構成細胞である血管内皮細胞及びペリサイトで **Nrf2** の発現を上昇させた (Fig. 33A、34A)。さらに、その **Nrf2** を発現する血管内皮細胞やペリサイトは梗塞周辺領域において顕著に増加していた (Fig. 33B、34B)。酸化ストレスに応答して発現上昇した **Nrf2** は、下流に存在する **HO-1** などの抗酸化酵素誘導を促進し (97, 98)、虚血及び再灌流時のストレスを減弱することにより細胞保護作用を示すことが知られている (101-103, 109)。本検討においても、**Nrf2** 発現が顕著に増加した梗塞周辺領域において、**BARD** 投与は血管内皮細胞やペリサイト、タイトジャンクションなどの細胞間結合因子のタンパク質発現量減少を抑制した (Fig. 33C、34C、35)。脳梗塞後には、虚血及び再灌流時の酸化ストレスにより血管内皮細胞の浮腫や細胞間結合因子の減少により、BBB 破綻やその後の出血を誘発する (17, 18, 93)。**BARD** は、梗塞周辺領域に存在する各種細胞に **Nrf2** を発現させ、酸化ストレスによる障害から保護し、BBB 障害やその後の神経細胞死による神経症状の悪化を抑制することが示唆された。本検討と過去の報告の結果より (109)、**BARD** 投与は神経細胞、アストロサイト、血管内皮細胞、ペリサイト、そして細胞間結合因子を脳虚血再灌流によるダメージから保護することが明らかになった。**RS9** は **BARD** を基に合成された **Nrf2** 活性化薬であり、**BARD** よりも **Nrf2** 活性化作用は強く、毒性も低い (110)。本章では、脳出血誘導後の **RS9** 頻回投与により、脳浮腫や神経症状の悪化、さらには神経障害領域の拡大が抑制された (Fig. 36)。脳出血誘導 72 時間後においては、酸化ストレスや炎症性により浮腫が誘発

され、神経症状の悪化を招く (23, 30, 68)。RS9 はマウス脳虚血再灌流モデルにおいて HO-1 の誘導を介し、炎症を惹起する nuclear factor-kappa B (NF-kB) の活性化を抑制することが報告されている (112)。そのため、脳出血病態における保護作用は、Nrf2 活性化に伴う抗炎症作用が強く関与している。BARD 及び RS9 は Nrf2 やその下流因子を活性化することにより、BBB や神経細胞を保護し、脳虚血再灌流障害及び出血性脳障害に対して有効性を示すと考えられる。上記より、Nrf2 活性化薬は脳卒中病態下で生じる障害から NVU を包括的に保護する可能性がある (Fig. 38)。

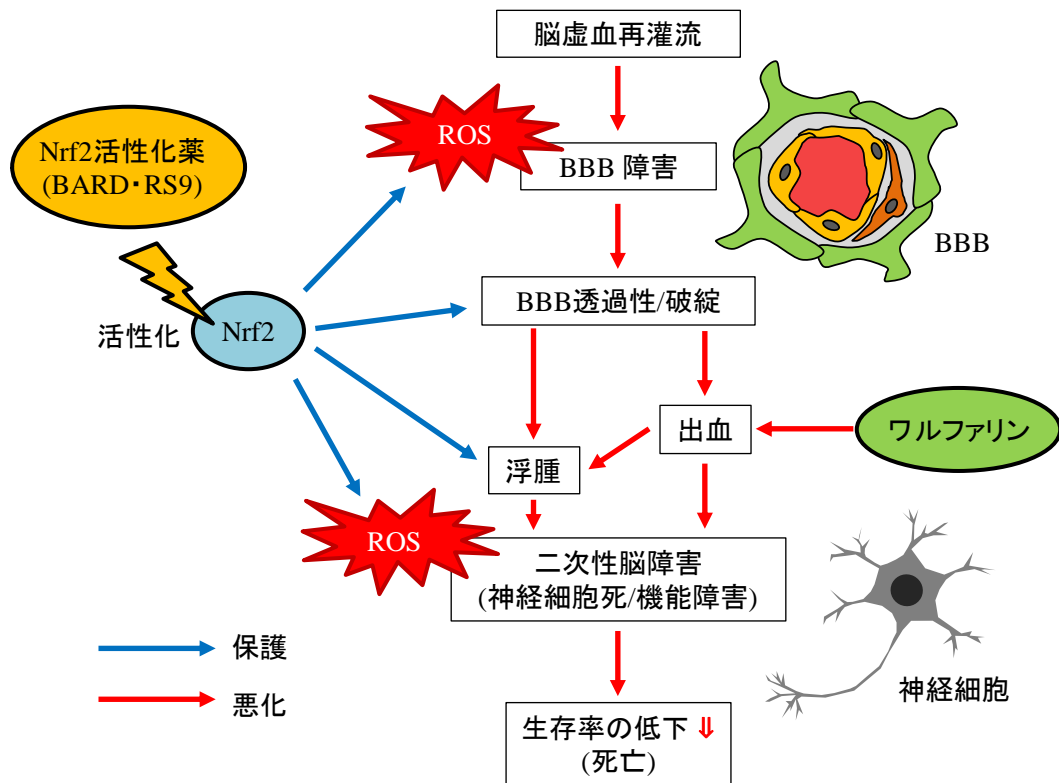


Fig. 38 Protective effects of an Nrf2 activator, BARD on neurovascular unit.

The schema shows the protective effect of BARD on neurovascular unit (NVU) such as BBB and neurons. After brain ischemia reperfusion, BBB was damaged, which induced BBB hyper-permeability and disruption. BBB disruption led to brain hemorrhage and aggravated the neuronal injury. BARD administration activated the Nrf2 expression, which protected NVU against ischemic stress and hemorrhagic transformation after stroke via anti-oxidant effects.

前章ではフリーラジカル捕捉薬により ROS の除去を行い、酸化ストレスを制御するこ

とで脳卒中病態の悪化を抑制した。本章では、生体が恒常的に備えている抗酸化ストレス防御機構の中核を担う Nrf2 を活性化させることにより、脳虚血再灌流障害やその後の出血性梗塞によるダメージを軽減できることを明らかにした。すなわち、BBB 及び神経細胞に対して保護作用を有する Nrf2 活性化薬が脳卒中病態の新たな治療薬になり得ることを提唱した。また、前章及び本章において、酸化ストレスの制御が再灌流障害、出血性梗塞及び脳出血に対して有効なアプローチであることが示された。さらに、脳出血の抑制が脳卒中後の神経症状を改善したことから、出血中に含まれる因子が酸化ストレスを増強すると推察される。第 3 章では、脳卒中病態における酸化ストレス亢進のメカニズムをより詳細に解明するため、出血後に血管内から組織へ漏出する血液成分に着目した。なかでも、血液の主成分であるヘモグロビン中に含まれる鉄が酸化ストレスを惹起すると仮定し、*in vivo* マウス出血性脳卒中モデルや *in vitro* 鉄誘発性細胞障害モデルを作製し、各種検討を行った。

第3章 脳出血病態における細胞内二価鉄蓄積の関与と鉄キレート剤の作用

緒言

脳出血は、加齢や糖尿病による血管の脆弱性の亢進または慢性的な高血圧症による血行力学的ストレスにより BBB の透過性が亢進し、脳実質組織に血液が漏出することで発症する (11, 12)。脳出血発症後の脳障害は、血腫の形成と拡大により周辺組織を圧迫することで生じる物理的な障害 (一次障害) と、血腫から放出される血液成分や炎症性サイトカイン、免疫担当細胞による副次的な障害 (二次障害) に分類される (68)。一次障害は血腫の拡大に伴って進行し、脳内圧の亢進や脳ヘルニアを引き起こすため、外科的な血腫除去術や高浸透圧薬剤のマンニトールを用いた治療が行われる (脳卒中ガイドライン 2015; グレード C1)。一方、発症数日から数週間で生じる二次障害は浮腫や高次機能障害を引き起こすが (23, 30, 68)、現状では有効な治療法は存在せず (129)、降圧薬投与による血圧管理が対症療法として行われる (グレード B、C1)。

脳出血後に形成された血腫はヘモグロビン (hemoglobin: Hb) を放出し、血腫周辺の正常組織に二次障害を及ぼす (30, 68, 130)。Hb は血液成分の大部分を占める赤血球中に含まれる。また Hb は、 α サブユニットと β サブユニットの 2 種類のポリペプチドから構成されるグロビンと二価鉄原子を中心としたポルフィリン環を有するヘムによって構成されているタンパク質である (131, 132)。1 つの Hb は 4 つのヘムを含み、ヘム中の鉄原子は酸素との高い親和性を有するため、Hb は生体における酸素の運搬を担っている (133)。ヘムは Hb から放出された後に、貪食細胞であるマクロファージやミクログリアに取り込まれ、ヘムオキシゲナーゼ (HO-1/2) によって鉄・ビリベルジン・一酸化炭素に代謝される (68, 130) (Fig. 39A)。上記の代謝反応で産生された鉄は、Hb 中の酸素運搬の役割以外に、カタラーゼやシトクロムなどの補因子としても利用され、生体のホメオスタシスを保つ必須金属として重要な役割を担っている (134)。鉄はヒト

の全身に約 2~4 g 存在しており、組織内に過剰に蓄積した場合、Fenton 反応を介してラジカルを産生し、酸化ストレスを惹起する (24, 130, 135) (Fig. 39B)。

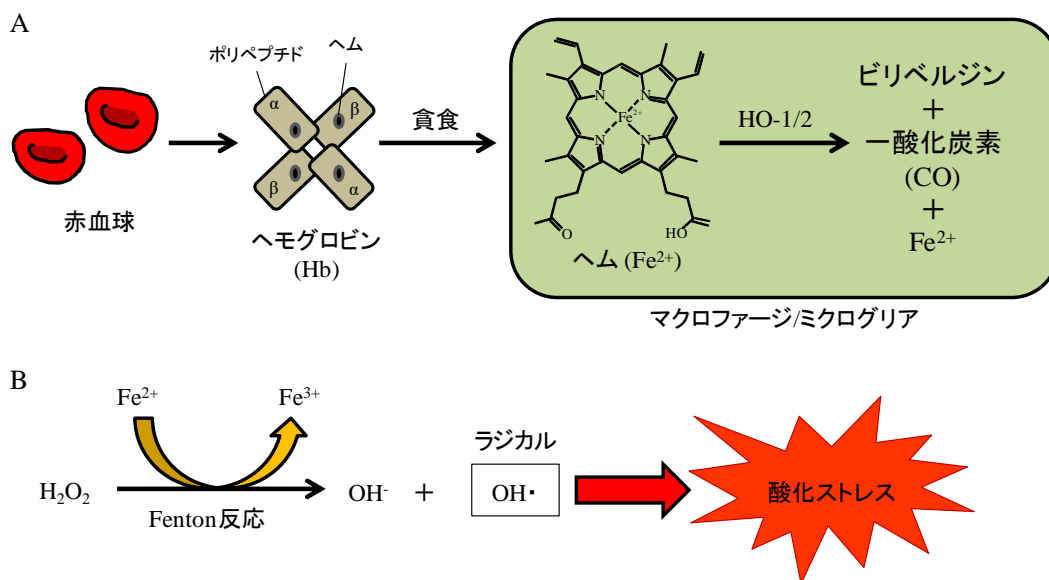


Fig. 39 Hb/heme metabolism, and Fenton reaction.

(A) Red blood cells are converted to hemoglobin (Hb) which is composed as four polypeptide and heme. Hb is captured by macrophage/microglia and metabolized to biliverdin, carbon monoxide and iron. (B) Bivalent iron (Fe^{2+}) promotes the Fenton reaction. Hydrogen peroxide (H_2O_2) is converted to hydroxyl radicals ($OH \cdot$), which induce oxidative stress.

脳出血実験モデルにおいては、血腫近傍に存在する神経細胞やグリア細胞中に鉄の蓄積を認め、ROS 産生を介した脂質過酸化物の増加により細胞死や神経症状を誘発することが報告された (130, 135, 136)。また、鉄蓄積依存的な細胞死である ferroptosis が脳出血病態の悪化を引き起こすことや (69, 125)、脳出血後の予後不良と鉄蓄積には正の相関があることも報告されている (137)。脳出血モデルに鉄キレート剤を用いた過去の検討においては、BBB 透過性の亢進や脳浮腫、ミクログリアの活性化、神経障害の悪化を抑制することが報告されている (67, 138)。上記より、出血後に組織中で増加する鉄蓄積の制御は、脳出血後の二次障害への新たな治療アプローチになると期待され、脳出血患者を対象に三価の鉄キレート剤であるデフェロキサミン

の第 II 相試験が実施されたが、残念ながら 90 日後の転帰に効果を示さなかった (139)。そのため、脳出血後の鉄蓄積やその障害機序の解明並びに有効な治療法の開発が求められる。

第 1 章と第 2 章では、脳卒中病態下での過剰なフリーラジカルの捕捉や Nrf2 活性化を介した防御機構の賦活化を介して酸化ストレスから BBB を保護することにより、出血の誘発やその後の神経症状の進行が抑制されることを明らかにした。しかし、酸化ストレスの供給源である Hb やその代謝産物が BBB 構造に及ぼす影響やその機序、並びに鉄キレート剤投与による脳保護作用に関しては未知な点が多い。本章では、Hb やその代謝産物を用いて *in vitro* 細胞障害モデルを作製し、BBB 構成細胞における鉄蓄積と細胞死の関係性、またその機序解明について検討した。さらに、*in vivo* 脳出血モデルを作製し、血腫が BBB 構造や神経症状に及ぼす影響を検討した。加えて、二価鉄キレート剤ビピリジル (2,2'-bipyridil: BP) や三価鉄キレート剤デフェラシロクス (deferasirox: DFR) を用いて、出血後の鉄蓄積制御が BBB 及び神経細胞に及ぼす影響を検証した。

第2節 実験材料及び方法

2-1 実験材料

本章の実験に用いた薬物及び試薬は以下の通りである。

ヒト脳毛細血管内皮細胞 (HBMVECs) は DS Pharma Biomedical、ヒト脳毛細血管ペリサイト (Human brain microvascular pericytes: HBMVPs) は Primary Cell (Kyoto, Japan)、ヒト神経芽細胞腫 (SHSY5Y cells) は the European Collection of Cell Culture、EBMTM-2 BulleKitTM は Lonza、Pericyte medium、HBMVPs の播種ウェルコート用機材の poly-L-lysine は ScienCell (Corte Carlsbad, CA, USA)、HBMVECs の播種ウェルコート用機材のコラーゲンは Cellmatrix[®] Nitta Zeland Inc.、ヒトヘモグロビン (human hemoglobin: Hb)、蛍光トレーサー fluorescein isothiocyanate (FITC)-dextran、チオバルビツール酸、phosphatase inhibitor cocktails 2 及び 3、protease inhibitor、mouse monoclonal anti- β -actin、クレシルバイオレットは Sigma-Aldrich、FBS は VALEANT、ヘミンは東京化成工業 (Tokyo, Japan)、グリシン、DMSO、DMEM、PFA、Blocking One-P は Nacalai Tesque、硫酸アンモニウム鉄・六水和物 (ferrous ammonium sulfate hexahydrate: FAS)、6-アミノヘキサノ酸、Igepal CA-630、イムノスター[®]LD、エタノール、N-アセチル-L-システイン (N-acetyl-L-cysteine: NAC)、エバンスブルー (EB)、塩酸、塩化カリウム、Sample Buffer Solution (2ME+)($\times 4$)、キシレン、酢酸、スクロース、デオキシコール酸ナトリウム、SDS、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル、トリクロロ酢酸、1-ブタノール、トリプシン、ピリジン、ホルムアミド、メタノール、2-メルカプトエタノール、PBS は富士フイルム和光純薬株式会社、CCK-8 は同仁化学研究所、塩化ナトリウム、ペントバルビタールはキシダ化学株式会社、O.C.T. compound はサクラファインテックジャパン株式会社、オイキットは As One (Osaka, Japan)、フルオロマウントは Diagnostic Bio Systems、Immobilon[®]は Merck Millipore Co.、Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS)、タンパク質定量キット (BCA Protein Assay kit)、HRP-conjugated

goat anti-rabbit antibody、HRP-conjugated goat anti-mouse antibody、Alexa Fluor[®] 546 goat anti-rabbit、Alexa Fluor[®] 488 goat anti-mouse は Thermo Fisher Scientific、ROS 検知プローブ (CM-H₂DCFDA)、Hoechst33342、propidium iodide (PI) は Molecular Probes、Can Get Signal Solution 1 及び 2 は TOYOBO Co., Ltd.、Tween20 溶液、Triton X-100、トリスは Bio-Rad Lab、ヘモグロビン測定キットは BioAssay Systems、酸素ガスは大陽日酸株式会社、笑気ガスは昭和電工株式会社、インフルランは Mylan、rabbit polyclonal anti-VE-cadherin、anti-occludin、rabbit monoclonal anti-Ferritin は Abcam、rabbit polyclonal anti-HO-1、anti-PDGFR- β 、mouse polyclonal anti-PDGFR- β は Santa Cruz、mouse monoclonal anti-CD31 は BD Biosciences、normal goat serum、M.O.M. immunodetection kit (M.O.M. blocking reagent、M.O.M. protein concentrate)、biotinylated goat anti-rabbit IgG、Vectastain Elite ABC Reagent、ImmPACT DAB substances は Vector Labs、rabbit polyclonal anti-cleaved caspase-3、anti-PARP (1:1,000)、anti-LC3 I&II (1:1,000)、anti-phospho p38 (1:1,000)、anti-total p38 (1:1000)、anti-p62 (1:1,000) は Cell Signaling Technology、デフェラシロクス (DFR) は Cayman Chemical (Michigan、USA) から購入した。

二価鉄キレート剤ビピリジル (BP) 及び二価鉄検知用蛍光プローブ Si-RhoNox-1 は、本学薬化学研究室 永澤教授、平山准教授より供与頂いた。

2-2 *In vitro* 実験

2-2-1 ヒト神経芽細胞腫 (SHSY5Y cells)、ヒト脳毛細血管内皮細胞 (HBMVECs) 及びヒト脳毛細血管ペリサイト (HBMVPs) の培養

SHSY5Y 細胞及び HBMVECs は、第 1 章 2-2-1 の手順に従って培養した。HBMVPs は事前に poly-L-lysine コートを施したデッシュを使用し、Pericyte Medium (basal medium 500 mL、FBS 10 mL、pericyte growth supplement 5 mL) を用いて

37°C、5%CO₂の条件で培養した。それぞれの細胞は80%コンフルエントに達した段階で継代した。

2-2-2 *In vitro* 細胞障害モデルの作製

2-2-2-1 Hb 誘発血管細胞障害モデルの作製

HBMVECs または HBMVPs を 15,000 cells/cm² の密度で 96 well plate、24 well plate (BD Biosciences) 及び 4 wells CELLviewTM glass bottom dish (Greiner Bio-One Int., Kremsmünster, Austria) に播種し、37°C、5%CO₂ の条件下でコンフルエントになるまで約 3~4 日間培養した。Hb (分子量; 64,500) は、滅菌水に溶解し、10 mM のストック溶液を調整した。その後、各ウェルに終濃度が 1、10、25 µM になる様にそれぞれストック溶液を添加した後、1、4 または 24 時間培養し、細胞障害を惹起した。

2-2-2-2 二価鉄剤 (FAS) 誘発血管細胞障害モデル

本章 2-2-2-1 の手順と同様に、HBMVECs または HBMVPs を培養した。二価鉄剤である硫酸アンモニウム鉄・六水和物 (FAS; 分子量; 349.14) は滅菌水に溶解した。各ウェルに終濃度が 30、100、300 µM になる様にそれぞれストック溶液を添加した後、0.5、2、4、6、12 または 24 時間培養し、細胞障害を惹起した。

2-2-2-3 ヘミン誘発血管構成細胞障害モデル

本章 2-2-2-1 の手順と同様に、HBMVECs または HBMVPs を培養した。Hb の代謝産物であるヘミン (分子量; 645.95、Fig. 40) は DMSO に溶解し、DMSO の終濃度が 0.1%となる様に

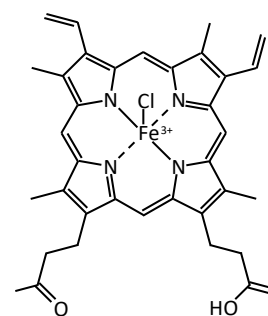


Fig. 40 The structure of hemin.

PBS で希釈した。各ウェルに終濃度が 1、10、50 µM になる様にヘミンを添加した後、1 または 24 時間培養し、細胞障害を惹起した。

2-2-2-4 ヘミン誘発神経細胞障害モデル

SHSY5Y 細胞を 96 well plate 中では 10^4 cells/well、12 well plate 中では 10^5 cells/well 及び 4 wells CELLview™ glass bottom dish 中では 10^4 cells/well の密度で播種し、5%CO₂ の条件下でコンフルエントになるまで培養した。本章 2-2-2-5 と同様の手順で各ウェルに終濃度が 10 μM になる様にヘミンを添加した後、1、2、6、12 または 24 時間培養し、細胞障害を惹起した。

2-2-2-5 H₂O₂ 誘発細胞障害モデル

第 1 章 2-2-2 の手順と同様に、SHSY5Y 細胞を 96 well plate 中に 10^4 cells/well の密度で播種し、5%CO₂ の条件下でコンフルエントになるまで 24 時間培養した。培地を 1%FBS 含有の DMEM に交換した後、各ウェルに終濃度が 200 μM になる様に H₂O₂ を添加し、6、12 または 18 時間培養し、細胞障害を惹起した。

2-2-3 *In vitro* における抗酸化剤または鉄キレート剤の調製及び添加

2-2-3-1 N-アセチルシステイン (NAC)

NAC は抗酸化剤として用いられており、過去の報告において細胞障害モデルに対して保護作用を示している (69)。NAC 原末を PBS に溶解し、各ウェルの終濃度が 1 mM になる様に Hb 処置と同時に培養培地へ添加した。

2-2-3-2 ビピリジル (BP) の調製及び添加

BP (Fig. 41) は細胞膜透過性が良好な二価鉄キレート剤である (140)。BP 原末を DMSO に溶解し、1M のスト

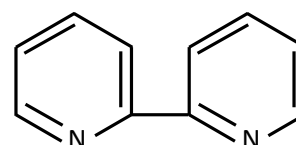


Fig. 41 The structure of 2,2'-bipyridyl (BP).

ック溶液を調製した。DMSO の終濃度が 0.1%となる様に PBS で希釈し、各ウェルの BP 濃度が 1 mM になる様に Hb や FAS、hemin 処置と同時に培養培地へ添加した。

2-2-3-3 デフェラシロクス (DFR) の調製及び添加

DFR (Fig. 42) は三価鉄キレート剤であり、輸血後の慢性鉄過剰症に対する経口投与可能な治療薬として承認されている (141)。DFR は他の鉄キレート剤と比べて半減期が 10~20 時間と長いことが特徴である (142, 143)。DFR 原末を DMSO に溶解し、50 mM のストック溶液を調製した。DMSO の終濃度が 0.1%となる様に PBS で希釈し、各ウェルの DFR 濃度が 1、3、10 μ M になる様に、ヘミン処置と同時、またはヘミン処置 6 及び 12 時間後に培養培地に添加した。

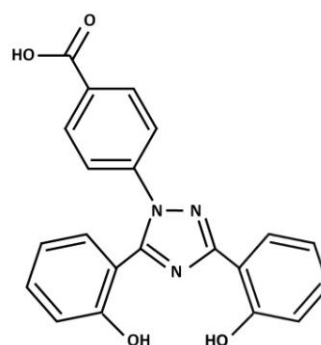


Fig. 42 The structure of deferasirox (DFR).

2-2-4 細胞死評価

本章 2-2-2 の手順に従って、それぞれの細胞障害モデルを作製した後に、第 1 章 2-2-6 の手順と同様の方法で細胞死を評価した。

2-2-5 ROS 産生量評価

本章 2-2-2 の手順に従って、Hb またはヘミン誘発細胞障害モデルを作製した後に、第 1 章 2-2-7 の手順と同様の方法で CM-H₂DCFDA を用いて ROS 産生量を評価した。

2-2-6 脂質過酸化物質評価

本章 2-2-2-4 の手順に従ってヘミン誘発神経細胞障害モデルを作製した後に、チオバルビツール酸試験を行い、脂質過酸化物質の産生量を評価した。SHSY5Y 細胞を 12

well plate に 10^5 cells/well で播種した 24 時間後に、ヘミン $10 \mu\text{M}$ を処置し 24 時間培養した。培養後、培地を回収し、PBS で 1 回洗浄した。その後、1.15% 塩化カリウム溶液 (0.575 g 塩化カリウム/超純水 44.35 mL) を $80 \mu\text{L}$ 添加し細胞を溶解した。3 well 分の細胞を 1 サンプルとして回収し、 4°C 、3,000 rpm で 10 分間遠心し、上清を回収した。上清 $200 \mu\text{L}$ に 8.1% SDS (4.05 g SDS/超純水 45.95 mL) $40 \mu\text{L}$ 及び酢酸緩衝液 (酢酸 20 mL + 超純水 80 mL + 10 M 水酸化ナトリウム; pH 3.6) $200 \mu\text{L}$ をそれぞれ加え、その後に 0.8% チオバルビツール酸溶液 (98% TBA 80 mg/超純水 10 mL) $200 \mu\text{L}$ を添加し、沸騰水浴中で 1 時間インキュベートした。その後、氷冷下で 1-ブタノールとピリジンを 15:1 で混合した溶液を $400 \mu\text{L}$ 加え、攪拌した。その後、室温、4,000 rpm で 10 分間遠心し、上層の有機層から $200 \mu\text{L}$ を 96 well plate に移し、マイクロプレートリーダーで 532 nm の吸光度を測定した。測定値を生細胞数で補正し、未処置群 (Control 群) との比として算出した。

2-2-7 細胞生存活性評価

本章 2-2-2-3 の手順に従ってヘミン誘発血管構成細胞障害モデルを作製した後に、第 1 章 2-2-5 の手順と同様に CCK-8 を用いて細胞生存活性を評価した

2-2-8 細胞内二価鉄蓄積評価

4 wells dish に細胞を播種し、本章 2-2-2 の手順に従ってそれぞれの細胞障害モデルを作製し、蛍光プローブ Si-RhoNox-1 を用いて細胞内における二価鉄 (Fe^{2+}) の蓄積を評価した。Si-RhoNox-1 は、構造中の N-オキシド部分が二価鉄と反応することにより還元され、蛍光を発し、生体内に存在するグルタチオンやアスコルビン酸などの還元物質に影響されず、三価鉄 (Fe^{3+}) との反応性も低いことから、 Fe^{2+} を特異的に検出することが可能である (144)。

Hb や二価鉄剤 (FAS)、ヘミンをそれぞれの時間負荷した後に、培養液を除去し、PBS で洗浄後、Si-RhoNox-1 を 5 μ M 含んだ HBSS に交換し、37°C、5%CO₂ の条件下で 30 分間培養した。その後、HBSS を除去し、PBS で洗浄した後に、再度 HBSS を添加し、共焦点顕微鏡にて 575 nm 及び 660 nm の波長で観察し、1 ウェルあたり 3~5 か所を撮影した。撮影した画像は ImageJ に取り込み、蛍光強度の数値化と Si-RhoNOx-1 陽性細胞数のカウント及び面積測定を行い、それぞれの値で蛍光強度を補正し、未処置群 (Control 群) の発現強度を 100 として細胞内 Fe²⁺ 量を比較評価した。

2-2-9 ウェスタンブロット法を用いたタンパク質発現量評価

2-2-9-1 タンパク質抽出

本章 2-2-2 の手順に従って Hb またはヘミン誘発細胞障害モデルを作製した後に、第 1 章 2-2-9-1 の手順と同様にタンパク質抽出液を調製した。

2-2-9-2 タンパク定量

第 1 章 2-2-9-2 の手順に従って抽出液に含まれるタンパク質量が 2 μ g/10 μ L となる様に調製し、保存した。

2-2-9-3 電気泳動及び転写

第 1 章 2-2-9-3 の手順に従って電気泳動及び転写を行った。

2-2-9-4 タンパク質発現量の解析

第 1 章 2-2-9-4 の手順に従って転写後の操作を行い、LAS-4000UVmini を用いてバンドを検出した。ImageJ を用いてバンドの強度を解析し、数値化した後に β -actin に

対する比として個々の値を算出した。各群の平均値を算出し、control 群 (未処置群) の発現強度を 1 として発現量を比較した。

一次抗体には、rabbit polyclonal anti-HO-1 (1:200)、anti-cleaved caspase-3 (1:1,000)、anti-PARP (1:1,000)、anti-LC3 I&II (1:1,000)、anti-phospho p38 (1:1,000)、anti-total p38 (1:1000)、anti-p62 (1:1,000)、rabbit monoclonal anti-Ferritin (1:1,000) 及び mouse monoclonal anti- β -actin (1:2,000) を用いた。二次抗体には、HRP-conjugated goat anti-rabbit antibody (1:2,000)、HRP-conjugated goat anti-mouse antibody (1:2,000) を用いた。

2-2-10 血管内皮細胞のバリアー機能評価

2-2-10-1 膜電気抵抗値の評価

第 2 章で前述した通り、血管内皮細胞は強固な細胞間結合を形成し、イオンやグルコースを含む血液中の成分の侵入を防ぐバリアーの役割を担っている (17, 18)。血管内皮細胞におけるバリアー機能の低下は、脳出血病態を引き起こす (116)。

Transwell システム (Corning, Inc., Canton, NY, USA, Fig. 43) を用いて細胞培養を行った。コラーゲンコートをした Transwell[®] インサートウェル (ウェル面積 0.33 cm²) に HBMVECs を 10⁵ cells/cm² の密度で播種し、インサートウェルを 24 well plate に設置した。上部 (Upper; Transwell インサート) のウェル内には成長因子を含む EBM-2 培地を 200 μ L、下部 (Lower; 24 well plate のウェル) には同様の培地を 600 μ L 添加し、十分な細胞間結合が形成されるまで 37°C、5%CO₂ の条件で培養した。播種 1 日後に培地を交換し、その後は 1 日毎に培地交換を行った。

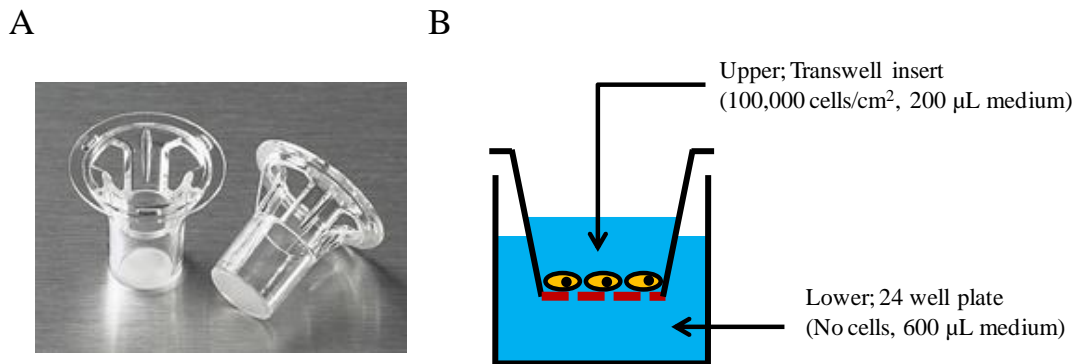


Fig. 43 Transwell cell culture system.

(A) The image of Transwell inserts. (B) The scheme of Transwell culture system. Upper; cells were seeding at 10^5 cells/cm² into insert and incubated in 200 µL medium. Lower; there was no cell but 600 µL medium was added into the 24 well plates.

Corning HP

(<https://ecatalog.corning.com/life-sciences/b2c/SE/en/Permeable-Supports/Inserts/Transwell%C2%AE-COL-Collagen-coated-Inserts,-PTFE-Membrane/p/3495>) より引用

血管内皮細胞のバリアー機能は、Epithelial Volt-Ohm Meter (Millicell, ESR-2, Merck Millipore Co., Fig. 44) を用いて膜電気抵抗値 (trans-endothelial electrical resistance value: TEER value) を測定することにより評価した(145) (Fig. 45)。10 µM の Hb または 50 µM のヘミンを処置する前に TEER 値を測定し (pre)、群間差が生じない様に各ウェルの群分けを行った。測定後、細胞死評価と同様に Hb を 4 時間、ヘミンを 24 時間、細胞に負荷した後、TEER 値を測定した (post)。

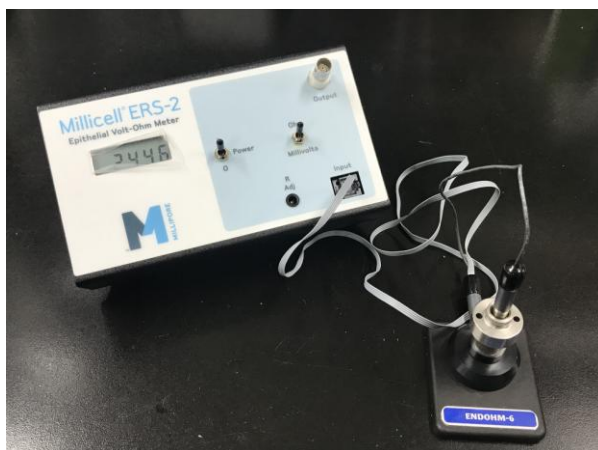


Fig. 44 Epithelial Volt-Ohm Meter

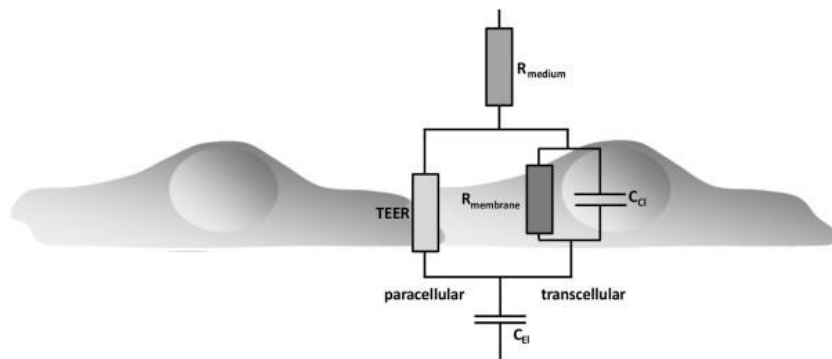


Fig. 45 Equivalent circuit diagram describing the contribution of the trans- and paracellular pathway to the total impedance, Z , of the cellular system.

TEER, transendothelial electric resistance; C_{El} , capacitance of the electrodes; C_{Cl} , capacitance of the cell layer; R_{medium} , ohmic resistance of the medium; $R_{membrane}$, ohmic resistance of the membranes. Please note that for most epithelial cells the TEER can be dominated by the transcellular pathway. This is true for tight epithelia already under resting conditions and, in leaky epithelia, after activation of ion channels.

文献 (Benson et al., Fluids Barriers CNS. 2013) より改変引用

2-2-10-2 高分子蛍光標識物質の膜透過性評価

TEER 値を測定後、上部のインサートと下部の 24 ウェル内の培地を除去した。上部には高分子蛍光標識物質である FITC-dextran (1 mg/mL、分子量; 2,000,000) 含有培地、また下部には通常の EBM-2 培地を添加し、37°C、5%CO₂ の条件で 1 時間培養した。培養後に、下部の培地を 100 μL 回収し、96 well plate に移した。その後、マイクロプレートリーダーで 485 nm 及び 530 nm の吸光度を測定した。未処置の control 群を基準とし、上部のインサートから下部の 24 well 内への FITC-dextran 漏出量を算出した (Fig. 46)。

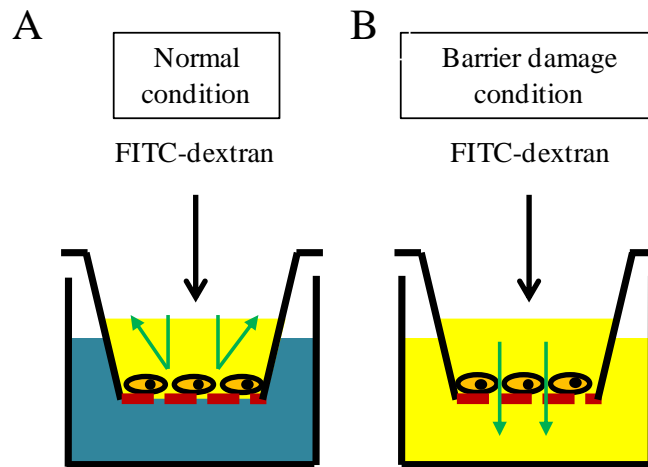


Fig. 46 FITC-dextran permeability assay by using Transwell culture system.

FITC-dextran, a fluorescence tracer has a high molecular weight (MW; 2,000,000). (A) In the normal condition, the endothelial barrier function is sustained and FITC-dextran could not pass through the lower well from upper well. (B) In the pathological condition, the endothelial barrier function is damaged and FITC-dextran passed through the lower well from upper well, which indicates the hyper-permeability.

2-2-10-3 免疫染色法による細胞間結合の形態評価

FITC-dextran 培地で 1 時間培養した後、上部の Transwell インサート内の培地を除去し、5 μM の Si-RhoNox-1 を含有した培地に交換し、1 時間培養した。PBS で洗浄後、4%PFA 含有 0.1 M PB (pH 7.4) を添加し、15 分間室温にて細胞固定を行った。その後、PBS で洗浄し、抗体の細胞膜透過性を上げるために、0.3% Triton X-100/PBS を添加し、10 分間室温で反応させた。PBS で洗浄を再度行い、ブロッキング溶液 (5% goat serum/PBS) と 30 分間室温で反応させた。つぎに、rabbit polyclonal anti-VE-cadherin をブロッキング溶液で 400 倍希釈した一次抗体をウェルに添加し、4°C で一晩反応させた。PBS で洗浄後、Alexa Fluor[®] 488 goat anti-rabbit 及び Hoechst33342 をブロッキング溶液で 1,000 倍希釈した二次抗体をウェルに添加し、室温で遮光のもと 1 時間反応させた。反応後、細胞が接着している Transwell インサートの底面を切り取り、MAS コーティングされたスライドガラスに載せ、フルオロマウントで封入した。染色を行ったサ

ンプルは、共焦点レーザー走査型顕微鏡により細胞形態や Fe^{2+} 蓄積を観察し、撮影した。細胞間結合因子である VE-cadherin の蛍光は 485 nm 及び 530 nm、 Fe^{2+} 蓄積を示す Si-RhoNox-1 の蛍光は 575 nm 及び 660 nm の波長を検出し観察した。

2-3 *In vivo* 実験

2-3-1 実験動物

8~12 週齢雄性非近近系 ddY マウスを日本エスエルシー株式会社より購入し、第 1 章 2-3-1 の手順と同様に飼育した。実験を行うにあたっては、岐阜薬科大学動物飼育・動物実験委員会に動物実験承認申請を行い、許可を得た上で実施した。

2-3-2 マウス脳出血モデルの作製

本検討では、以下に示す 3 種類の脳出血モデルを作製した。

2-3-2-1 自己血注入脳出血モデルの作製

第 2 章 2-3-2 の手順に従って自己血注入によるマウス脳出血モデルを作製した。

2-3-2-2 ヘミン注入脳出血モデルの作製

ヘミン原末を DMSO に溶解した後、DMSO 終濃度が 1% となるように PBS で希釈し、10 mM の注入溶液を調製した。本章 2-3-2-1 の手順と同様に、マウスの頭蓋骨にあげた小孔からハミルトンシリンジを用いて注入溶液を 10 μL 左基底核に 1 μL /分の速度で注入し、5 分間シリンジを刺した状態で保持した。その後に溶液の漏れや逆流を避けるため約 3 分間かけてシリンジをゆっくりと引き抜いた。術部は麻酔下で縫合した。偽処置群 (Sham) では、麻酔下で頭皮切開と頭蓋骨露出のみを施した。Vehicle 群は、ヘミン注入と同様の方法で DMSO を 1% 含む PBS 溶液 10 μL を左基底核に注入した。

2-3-2-3 コラゲナーゼ注入脳出血モデルの作製

第1章 2-3-3 の手順に従ってマウスの左基底核にコラゲナーゼ (0.2 U) を 1 μ L 注入した。偽処置群 (Sham) では、麻酔下で頭皮切開と頭蓋骨露出のみを施した。

2-3-3 BBB 透過性評価

本章 2-3-2-2 の手順に従ってヘミン注入脳出血モデルを作製した1日後または3日後に、脳ホモジネートを用いて BBB 透過性を評価した。PBS に溶解した 4%エバンスブルー (EB) を 2 mL/kg で尾静脈内に投与した。EB 投与の1時間後に、第1章 2-3-8 の手順と同様に麻酔下で生理食塩水による灌流を行った。灌流後に脳を摘出し、嗅球と小脳を取り除いた後の脳重量を測定した。測定後、脳サンプルを 1.5 mL チューブに入れ、PBS 250 μ L を加え、ホモジネートした。その後、50%トリクロロ酢酸を 250 μ L 加え、4°C、10,000 rpm で 20 分間遠心し、上清を回収した。上清を 96 well plate に添加し、同量のエタノールを加えて 1:1 になるように希釈し、マイクロプレートリーダーで 600 nm の吸光度を測定した。EB 原末の段階希釈 (0、10、50、100、200、500、1,000、1,500、2,000、5,000、10,000 ng/mL) により作成した検量線を用いて、測定値よりサンプル中の EB 量 (EB 量/脳重量; μ g/g) を算出した。

加えて、同様に本章 2-3-2-2 の手順に従って障害を誘導した3日後に脳切片を用いて BBB 透過性を評価した。第2章 2-11-1 の手順に従って生理食塩水を用いた灌流及び PFA を用いた脳組織の固定を行い、15 μ m の脳凍結切片を作製した。脳切片は、PBS で洗浄後にフルオロマウントで封入し、BIOREVO BZ-X710 により障害領域における EB の漏出を観察した。

2-3-4 行動試験による神経症状評価

2-3-4-1 Garcia 試験

本章 2-3-2-2 の手順に従ってヘミン注入脳出血モデルを作製した 1 及び 3 日後に、第 1 章 2-3-6 の手順と同様に Garcia 試験を行った。

2-3-4-2 感覚運動機能評価 (Grid walking test)

本章 2-3-2-2 の手順に従ってヘミン注入脳出血モデルを作製した 1 日後及び 3 日後に、第 2 章 2-8-4 の手順に従って Grid walking 試験を行い感覚運動機能の評価を行った。また、コラゲナーゼ注入脳出血モデルでは、本章 2-3-2-3 の手順でモデルを作製した 1、3 及び 7 日後に同試験を行った。

2-3-5 神経障害領域の評価 (クレシルバイオレット染色)

本章 2-3-2-2 の手順に従ってヘミン注入脳出血モデルを作製した 3 日後に脳凍結切片を作製し、第 2 章 2-13 の手順に従ってクレシルバイオレット染色を行い、その後障害領域面積の評価を行った。

2-3-6 ウェスタンブロット法を用いたタンパク質発現量の評価

2-3-6-1 タンパク質抽出

第 2 章 2-10-1 の手順に従ってマウス脳出血モデルの脳組織からタンパク質を抽出した。本章 2-3-2 の手順で各種脳出血マウスモデルを作製し、1 または 3 日後に脳を摘出した。嗅球と小脳を取り除き、出血側 (Ipsilateral side) と対側 (Contralateral side) に分割し、それぞれ血腫が存在する線条体領域付近を採取した。採取した脳組織は protease inhibitor、phosphatase inhibitor cocktails 2 及び 3 を含む RIPA buffer を加えた後に、ホモジナイザーにて細分化した。4°Cにて 12,000×g で 20 分間遠心した後、上清を回収し、タンパク質抽出液とした。

2-3-6-2 タンパク定量及び調製

第2章 2-10-2の手順に従ってサンプル中のタンパク量を定量し、すべてのサンプルを一定のタンパク量となる様に調整した。

2-3-6-3 電気泳動及び転写

第1章 2-2-9-3の手順に従って電気泳動及び転写を行った。

2-3-6-4 タンパク質発現量の解析

第1章 2-2-9-4 及び第2章 2-10-4の手順に従って解析を行った。

一次抗体には、rabbit polyclonal anti-HO-1 (1:200)、anti-VE-cadherin (1:1,000)、anti-occludin (1:2,000)、anti-PDGFR- β (1:200)、anti-Ferritin (1:1,000) 及び mouse monoclonal anti- β -actin (1:2,000) を用いた。二次抗体には、HRP-conjugated goat anti-rabbit antibody (1:2,000)、HRP-conjugated goat anti-mouse antibody (1:2,000) を用いた。

2-3-7 *In vivo* 自己血注入マウス脳出血モデルにおける鉄蓄積の評価

本章 2-3-2-1の手順に従って自己血注入脳出血モデルを作製した3日後に脳凍結切片を作製した。添加液の流出を防ぐため切片周囲を Super PAP pen で囲った。切片を PBS により5分間3回の洗浄を行った後、内因性ペルオキシダーゼを不活性化させるために、PBSで希釈した0.3% H_2O_2 /10%メタノール溶液を用いて30分間反応させた。PBSで洗浄し、ブロッキング溶液(5% normal goat serum/PBS)を用いて1時間ブロッキングを行った。再びPBSで洗浄し、rabbit monoclonal anti-Ferritinをブロッキング溶液で100倍希釈した一次抗体を脳切片に添加し、4°Cで一晩反応させた。翌日に

PBS で洗浄し、biotinylated goat anti-rabbit IgG をブロッキング溶液で 200 倍希釈した二次抗体と脳切片を 1 時間反応させた。PBS で洗浄後、Vectastain Elite ABC Reagent と 30 分間反応させ、ImmPACT DAB を用いて染色した。染色後、蒸留水で 2 回洗浄し、70%、95%、99%、無水エタノールの順に浸し、脱水を行った。キシレンに 5 分間 2 回浸した後に、オイキットを用いて封入した。染色後の切片は、BIOREVO BZ-X710 を用いて血腫周辺における Ferritin 陽性細胞の存在を観察し、撮影した。

2-3-8 *In vivo* ヘミン注入マウス脳出血モデルにおける Fe²⁺ 蓄積の評価

2-3-8-1 Si-RhoNox-1 を用いたヘミン注入部位周辺における Fe²⁺ 蓄積評価

本章 2-3-2-2 の手順に従ってヘミン注入脳出血モデルを作製した 3 日後に、本章 2-3-3 の手順に従って脳凍結切片を作製した。切片を PBS で洗浄した後、5 μM の Si-RhoNox-1 を添加し、1 時間室温にて反応させた。その後、共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いてヘミン注入部位周辺における Fe²⁺ 蓄積を、575 及び 660 nm の波長を検出し、観察した。

2-3-8-2 BBB 構成細胞における鉄蓄積の評価

2-3-8-1 と同様に脳凍結切片を作製し、-20°C で 2 時間、4°C で 1 時間、室温で 1 時間乾燥させた。添加液の流出を防ぐため切片周囲を Super PAP pen で囲った。まず、切片を 0.01 M の PBS で洗浄し、ブロッキング溶液 (5% normal goat serum/PBS) を用いて室温で 1 時間ブロッキングを行った。つぎに、rabbit monoclonal anti-Ferritin をブロッキング溶液で 100 倍希釈した一次抗体を脳切片に添加し、4°C で一晩反応させた。その後、PBS で洗浄し、Alexa Fluor[®] 546 goat anti-rabbit をブロッキング溶液で 1,000 倍希釈した二次抗体を添加し、室温で遮光のもと 1 時間反応させた。PBS で洗浄し、M.O.M. blocking reagent を用いて室温で 1 時間ブロッキングを行った。PBS で洗浄し

た後に、mouse monoclonal anti-CD31 または anti-PDGFR- β を M.O.M. diluents mixture (PBS:M.O.M. concentrate = 25:2) でそれぞれ 100 倍希釈した一次抗体を脳切片に添加し、4°Cで一晩反応させた。その後、PBS で洗浄し、Alexa Fluor[®] 488 goat anti-mouse 及び核染色用の Hoechst33342 を M.O.M. diluents mixture で 1,000 倍希釈した二次抗体を室温で 1 時間反応させた。PBS で洗浄後、フルオロマウントを用いて脳切片を封入した。ネガティブコントロールは、一次抗体の代わりに PBS を用いて同様の染色操作を行った。染色した脳切片は、共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いてヘミン注入部位周辺の観察を行い、Ferritin 陽性かつ CD31 陽性細胞 (Ferritin⁺/CD31⁺) または PDGFR- β 陽性細胞 (Ferritin⁺/PDGFR- β ⁺) を示すマージ細胞の存在を確認した。

2-3-9 *In vivo* における鉄キレート剤の調製及び投与

2-3-9-1 BP の調製及び投与

BP 原末を DMSO に溶解しストック溶液を調製した後に、DMSO 終濃度が 1%となるように PBS で希釈し、注入溶液を調整した。ヘミン注入による脳出血誘導の 2 時間後、6 時間後、1 日後、2 日後、3 日後の計 5 回にわたり BP (40 mg/kg) をマウスの腹腔内 (i.p.) に投与した。針刺し障害のみを行った vehicle 群及びヘミンを注入した hemin 群には、DMSO を 1%含む saline を同様に腹腔内投与した。

2-3-9-2 DFR の調製及び投与

DFR 原末を DMSO に溶解しストック溶液を調製した後に、DMSO 終濃度が 1%となるように PBS で希釈し、10 μ M または 100 μ M の注入溶液を調整した。本章 2-3-2-3 の記載の通り、コラゲナーゼ注入による脳出血誘導を行った直後に、対側であるマウスの右脳室内 (ブレグマから前方 0.5 mm、側方 1 mm、深さ 2.5 mm) にハミルトンシリン

ジを用いて 2 μ L をゆっくりと注入した (刺し込み後シリンジを 1 分間保持、約 2 分かけて内容液を注入、溶液の組織への浸透のためシリンジを 3 分間保持、液漏れや逆流を避けるため約 1 分間かけてシリンジをゆっくりと引き抜いた)。Vehicle 群には、DMSO を 1% 含む saline を同様に脳出血誘導直後の脳室内に投与した。

2-3-10 出血量評価

本章 2-3-2-3 の手順に従ってコラゲナーゼ注入による脳出血モデルを作製した 1 日後に、第 1 章 2-3-8 の手順に従ってヘモグロビンアッセイを行い、出血量を評価した。

2-4 統計学的解析

実験成績は平均値 \pm 標準誤差 (SE) または標準偏差 (SD) で示した。ボックスプロットは第 1 章 2-5 と同様に、四分位範囲をボックスで示し、最大値及び最小値は SD で示した (Fig. 8)。統計学的な比較は、Statistical Package for the Social Science 15.0 J for Windows9 software を用いて、2 群間の比較では F 検定後に Student's *t*-test または Welch's *t*-test を行った。ノンパラメトリック検定では Mann Whitney *U*-test を行った。多群間の比較では ANOVA を行った後に、Dunnet's test または Tukey's test により検定を行った。相関を評価する際は、Spearman's rank correlation coefficient により検定した。危険率が 5% 未満を有意差がありとした。

第3節 実験結果

3-1 自己血注入マウス脳出血モデルにおける Ferritin の発現量

自己血注入マウス脳出血モデルを作製し、免疫染色法及びウェスタンブロット法を用いて、鉄貯蔵タンパク質である Ferritin の発現を評価した。Sham 群と比較し、脳出血誘導 1 日後に血腫 (H) 周辺領域において Ferritin 陽性細胞 (矢印) の数が増加し、3 日後ではより顕著に増加した (Fig. 47A)。Ferritin のタンパク質発現量は脳出血誘導 3 日後において有意に増加した (Fig. 47B)。本結果から、脳出血後には発症からの時間経過に伴い、血腫周辺領域において鉄貯蔵タンパク質 Ferritin が増加することを明らかにした。

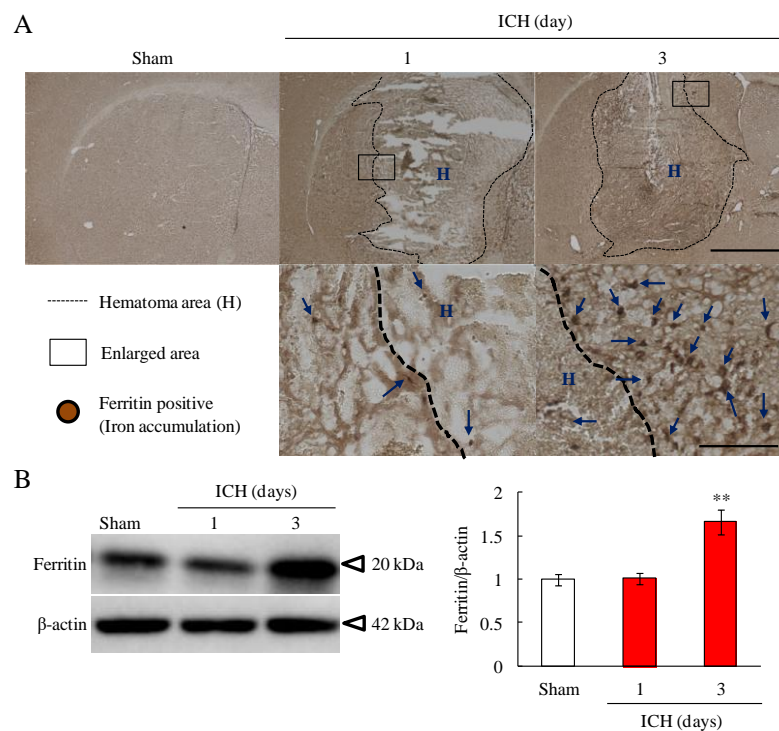


Fig. 47 Iron was accumulated around hematoma in in autologous blood injection ICH mice model.

ICH model was established by autologous blood injection into striatum region. (A) Ferritin, an iron storage protein was detected by immunofluorescence at 1 or 3 days after ICH induction (Each group, $n = 3$). Dot line areas show hematoma area. Arrows indicate the Ferritin-positive cells. Scale bars show 1 mm (upper images) or 100 μ m (lower images). (B) The expression levels of Ferritin around hematoma at 1 or 3 days after ICH induction (Each group, $n = 5$). The upper images show the representative image of bands. The lower graph shows the quantitative analysis. ** $p < 0.01$ vs. Sham. Data are expressed as mean \pm SE and analyzed with the Dunnett's test.

3-2 *In vitro* BBB 構成細胞障害モデルを用いた検討

3-2-1 Hb 処置モデルを用いた検討

3-2-1-1 HBMVECs 及び HBMVPs の細胞死に対する Hb の作用

BBB 構成細胞であるヒト脳毛細血管内皮細胞 (HBMVECs) やペリサイト (HBMVPs) を用いて、ヒトヘモグロビン (Hb) 処置による細胞死の誘発を評価した。Hb (1、10 及び 25 μ M) を HBMVECs 及び HBMVPs に 4 時間処置した結果 (Fig. 48A)、対照群 (Control 群) と比べ両細胞共に濃度依存的に細胞死が誘発された (Fig. 48B)。また、抗酸化剤である NAC (1 mM) や Fe^{2+} キレート剤である BP (1 mM) を Hb と同時に 4 時間処置した結果 (Fig. 48C)、両細胞共に両群で細胞死の誘発が抑制された (Fig. 48D)。一方、NAC や BP の単独処置では、対照群と比べ細胞死率に明らかな変化は認められなかった。

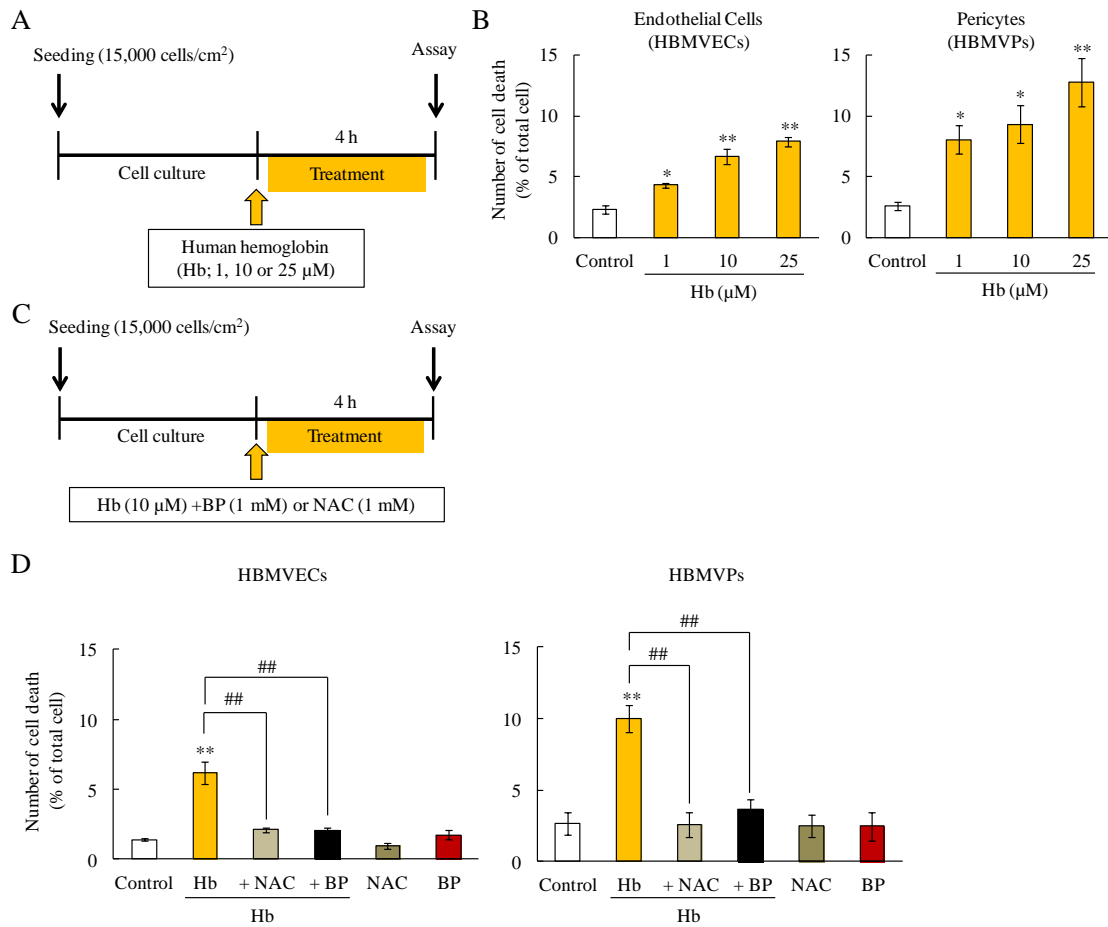


Fig. 48 Hb induced cell death in endothelial cells and pericytes.

(A) Experimental protocol of the cell death assay after human hemoglobin (Hb) treatment (1, 10 or 25 μM). (B) Human brain microvascular endothelial cells (HBMVECs) and pericytes (HBMVPs) were incubated with Hb for 4 hours. The number of PI and Hoechst33342-positive cells was counted, and the cell death rate was calculated as a percentage of PI-positive to Hoechst33342-positive cells (n = 4). (C) Experimental protocol of the cell death with N-acetyl cysteine (NAC) or 2,2'-bipyridil (BP) co-treatment. NAC is an antioxidant and BP is a Fe²⁺ chelator. (D) Cells were incubated with Hb (10 μM) and NAC (1 mM) or BP (1 mM) for 4 hours. The cell death rate (n = 6). * *p* < 0.05, ** *p* < 0.01 vs. Control; ## *p* < 0.01 vs. Hb. Data are expressed as the mean ± SE, and analyzed with the Dunnett's test (B) or Tukey's test (D).

3-2-1-2 HBMVECs 及び HBMVPs の ROS 産生量に対する Hb の作用

血腫から放出される Hb 及びその代謝産物は、ROS 産生亢進により正常組織に対して毒性を示す (69, 130, 146, 147)。Hb (10 μM) を HBMVECs 及び HBMVPs に 4 時間処置した結果、対照群 (Control 群) と比べ両細胞共に ROS 産生量が増加した。ま

た、HbとBP (1 mM) の併用処置によりその増加は抑制された。一方、BPの単独処置では対照群と比べROS産生量に明らかな変化は認められなかった (Fig. 49)。これらの結果より、Hb曝露によるHBMVECs及びHBMVPsの細胞障害機序には、 Fe^{2+} による細胞内ROS産生量の亢進が関与する可能性が考えられる。

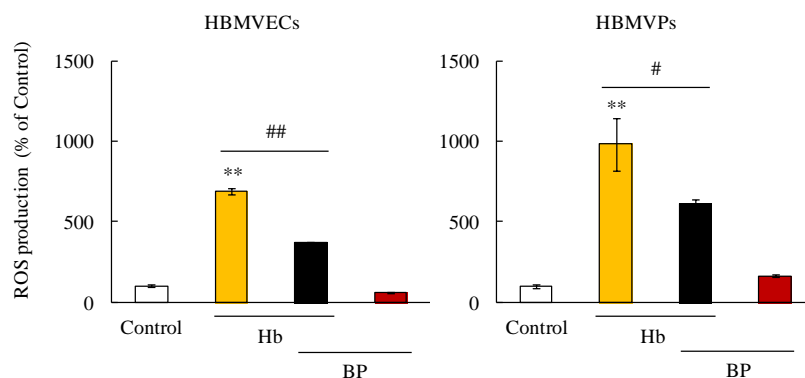


Fig. 49 Hb induced ROS over-production in endothelial cells and pericytes.

The ROS production rate was evaluated by using CM-H₂DCFDA probe and corrected by the number of living cells (n = 6). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. Control; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. Hb. Data are expressed as the mean \pm SE, and analyzed with the Tukey's test.

3-2-1-3 ヘム代謝酵素 HO-1 の発現量に対する Hb の作用

Hbに内包されるヘムは、抗酸化ストレス応答因子であるHO-1により鉄に代謝されるため(130, 135, 148)、HO-1の発現変化は鉄蓄積や酸化ストレスの誘発に関与すると考えられる。Hb (1 及び 10 μ M) をHBMVECs及びHBMVPsに4時間処置した結果、HO-1のタンパク質発現量は、HBMVECsではHb 10 μ Mの処置により対照群 (Control群) と比べ増加し、HBMVPsではHb 1 及び 10 μ Mの処置により増加した (Fig. 50)。BBB構成細胞において、Hbの曝露はHO-1の発現を増加させ、ヘムから鉄への代謝を促進する可能性が考えられる。

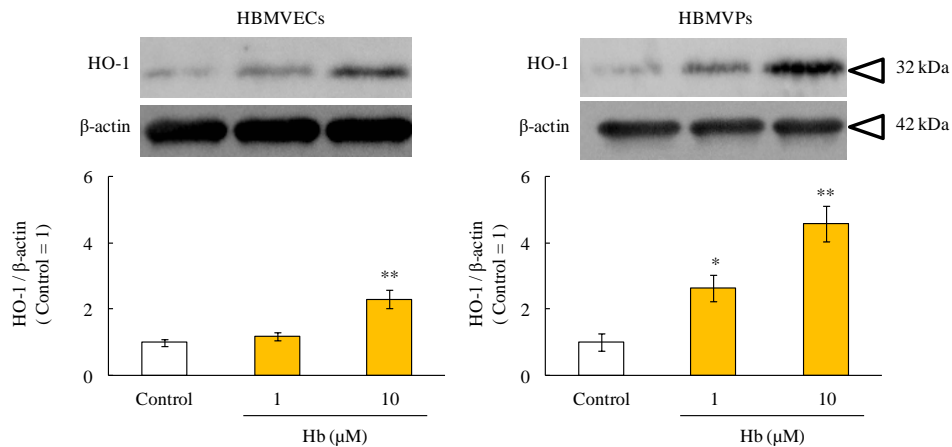


Fig. 50 Hb increased HO-1 expression in endothelial cells and pericytes.

HO-1 is a heme metabolized enzyme, and inducible enzyme response to oxidative stress. The expression level was evaluated by western blotting analysis. The upper images are representative bands and the lower graphs show the quantitative data (n = 4). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. Control. Data are expressed as the mean \pm SE, and analyzed with the Dunnett's test.

3-2-1-4 細胞内 Fe^{2+} の蓄積に対する Hb の作用

Fe^{2+} がラジカル産生を介して酸化ストレスを惹起することから (24, 47, 149)、 Fe^{2+} を特異的に検出する蛍光プローブ Si-RhoNox-1 を用いて、細胞内の Fe^{2+} の蓄積を評価した。Hb (1, 10 及び 25 μM) を HBMVECs 及び HBMVPs に 1 時間処置した結果 (Fig. 51A)、対照群 (Control 群) と比べ両細胞共に濃度依存的に Si-RhoNox-1 の蛍光強度が増加した (Fig. 51B)。また、BP を Hb と同時に処置することにより、両細胞共に Si-RhoNox-1 の蛍光強度の増加は抑制された (Fig. 51C)。これらの結果より、Hb 曝露は細胞内に Fe^{2+} を蓄積させることが示唆された。

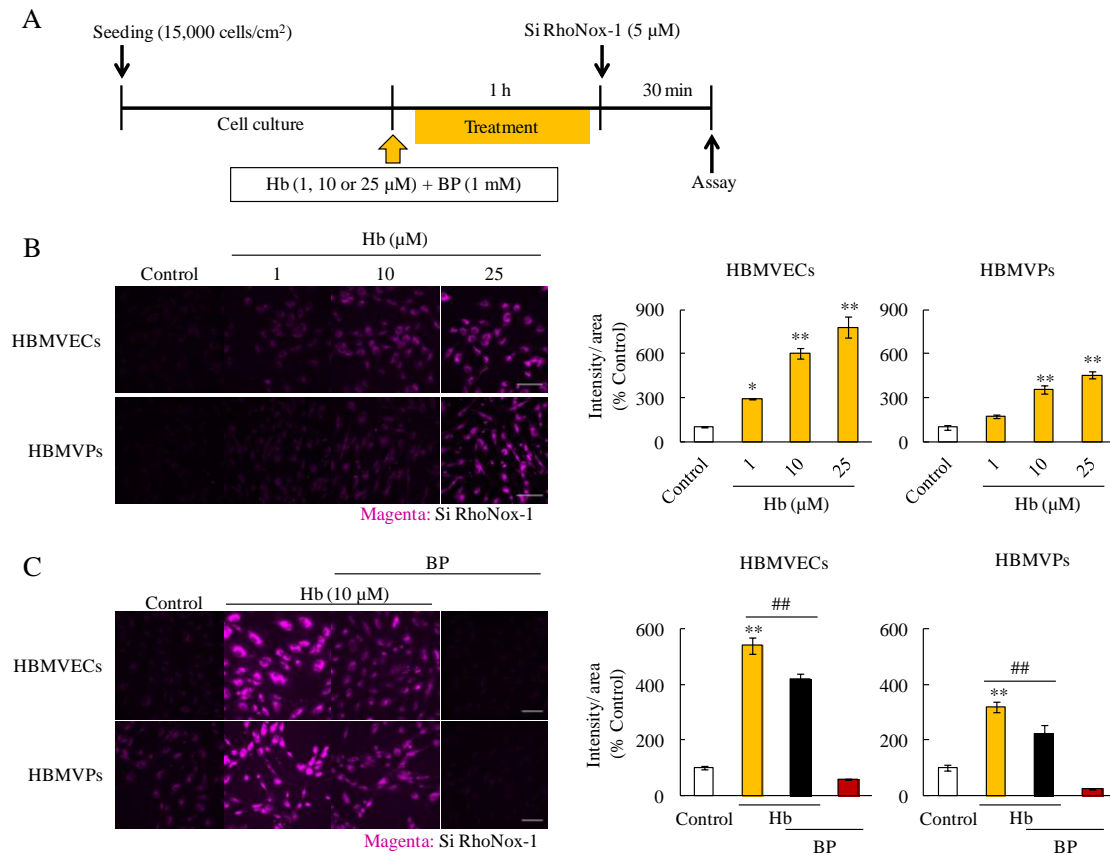


Fig. 51 Hb treatment induced intracellular Fe²⁺ accumulation in both endothelial cells and pericytes.

(A) Experimental protocol of the intracellular Fe²⁺ accumulation assay after Hb treatment (1, 10 or 25 µM). (B) Intracellular Fe²⁺ accumulation assay (n = 3 or 4). (C) Intracellular Fe²⁺ accumulation assay upon treatment with BP (n = 4 to 6). The left images show Si-RhoNox-1 staining (5 µM; magenta). The right graphs comprise the quantitative data. * *p* < 0.05, ** *p* < 0.01 vs. Control; ## *p* < 0.01 vs. Hb. Data are expressed as the mean ± SE, and analyzed with the Dunnett's test (B) or Tukey's test (C). Scale bar = 100 µm.

3-2-1-5 血管内皮細胞のバリアー機能に対する Hb の作用

血管内皮細胞は BBB 構造におけるバリアー機能の中核を担っているため、HBMVECs を用いてバリアー機能に及ぼす Hb 処置の影響を評価した。Hb (10 µM) を HBMVECs に 4 時間処置した結果 (Fig. 52A)、対照群 (Control 群) と比べ TEER 値は低下した。また、高分子蛍光標識物質である FITC-dextran の漏出量測定では、上部 Transwell インサート内から下部の 24 well 内への漏出量が対照群と比べ増加し

た (Fig. 52B)。本結果より、Hb 曝露は HBMVECs のバリアー機能に障害を及ぼすことが示唆された。

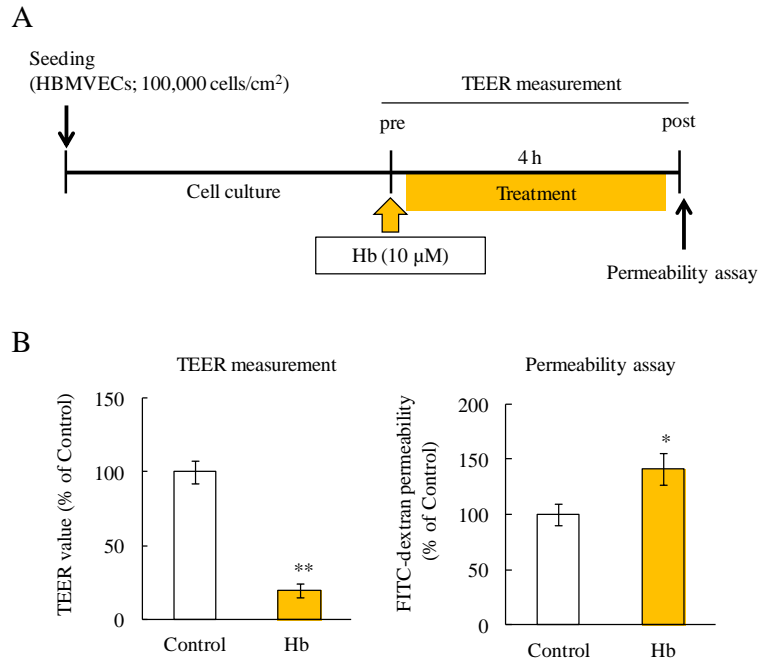


Fig. 52 Hb induced endothelial barrier dysfunction.

(A) Experimental protocol of TEER value measurement and FITC-dextran permeability assay after Hb treatment (10 μM) (Both groups; $n = 4$). (B) The TEER values. (C) Permeability rate. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. Control. Data are expressed as the mean \pm SE, and analyzed with the Student's t -test and.

3-2-2 鉄剤を用いた検討

3-2-2-1 細胞内 Fe^{2+} 蓄積に対する鉄剤の作用

本検討では、Hb の最終代謝産物である鉄自体が BBB 構成細胞に及ぼす影響を評価するため、鉄剤である硫酸アンモニウム鉄 (FAS) を用いて検討した。FAS (30、100 及び 300 μM) を HBMVECs に 0.5 時間処置した結果 (Fig. 53A)、FAS 300 μM の処置により HBMVECs 内で Si-RhoNox-1 の蛍光強度が対照群 (Control 群) と比べ有意に増加した。また、HBMVPs を用いて同様の検討を行った結果、FAS 100 及び 300 μM で Si-RhoNox-1 の蛍光強度が増加した (Fig. 53B)。また、FAS (300 μM) と

BP の同時処置により、両細胞における Si-RhoNox-1 の蛍光強度の増加は抑制された (Fig. 53C)。

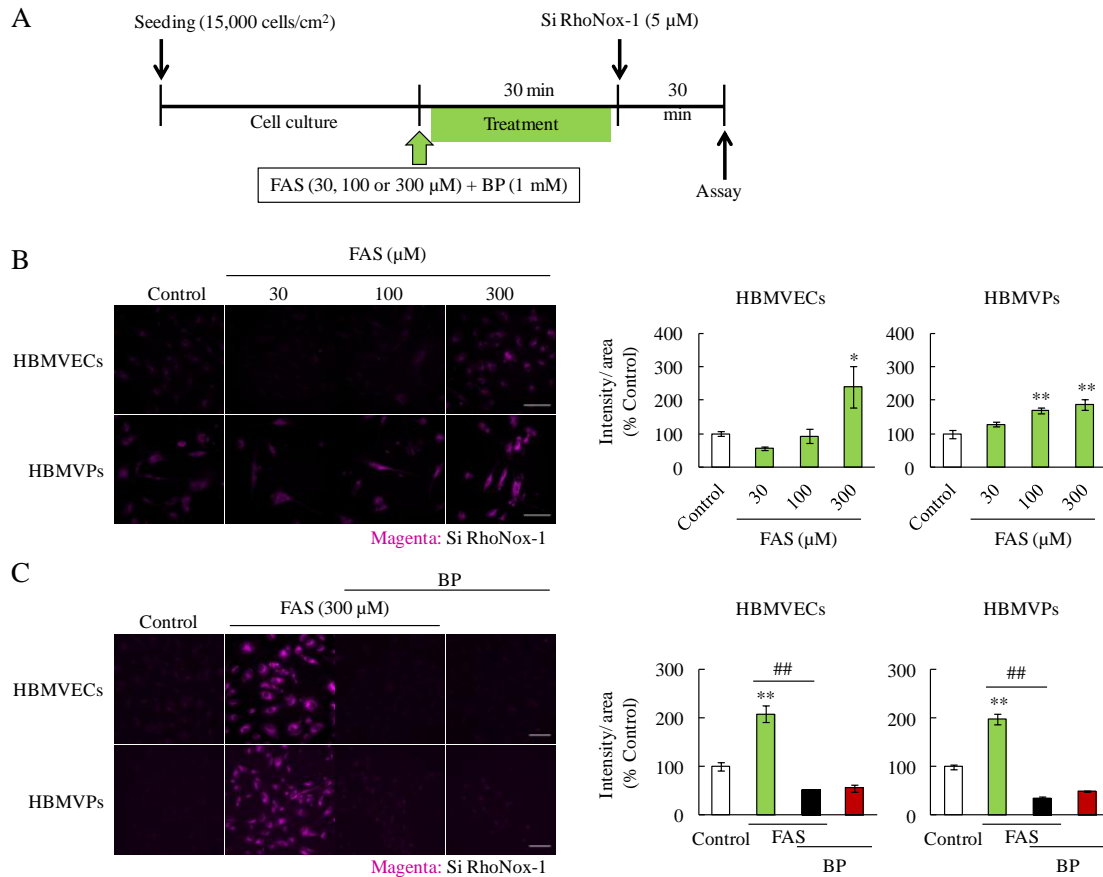


Fig. 53 An iron reagent, FAS induced intracellular Fe²⁺ accumulated in both endothelial cells and pericytes. (A) Experimental protocol of the Fe²⁺ accumulation assay. Cells were incubated with ferrous ammonium sulfate hexahydrate (FAS; 30, 100 or 300 µM) for 30 min and Fe²⁺ accumulation rate was analyzed. (B) Intracellular Fe²⁺ accumulation assay (n = 4). (C) Intracellular Fe²⁺ accumulation assay upon treatment with BP (n = 4). The left images show Si-RhoNox-1 staining (5 µM; magenta). The right graphs comprise the quantitative data. * *p* < 0.05, ** *p* < 0.01 vs. Control; ## *p* < 0.01 vs. FAS. Data are expressed as the mean ± SE, and analyzed with the Dunnett's test (B) or Tukey's test (C). Scale bar = 100 µm.

3-2-2-1 細胞内 Fe²⁺ 蓄積と細胞死の相関関係に及ぼす鉄剤処置の影響

細胞内における Fe²⁺ の蓄積と細胞死の関係性を明らかにするため、各濃度の FAS (30, 100 及び 300 µM) を HBMVECs 及び HBMVPs に処置し、細胞死と鉄蓄積を経時的に評価した (Fig. 54A)。HBMVECs においては、FAS 30 µM 処置で 12 及び 24

時間後に細胞死が対照群 (Control 群) と比べ増加したが、いずれの時間においても細胞内 Fe^{2+} 蓄積を認めなかった。FAS 100 μM 処置では24時間後に細胞死が増加し、6及び24時間後で細胞内 Fe^{2+} 蓄積を認めた。FAS 300 μM 処置では12及び24時間後に細胞死が増加し、いずれの時間においても細胞内 Fe^{2+} 蓄積を認めた。

HBMVPs においては、FAS 30 μM 処置で4時間後から24時間後まで細胞死が増加し、0.5及び24時間で細胞内 Fe^{2+} 蓄積を認めた。FAS 100 μM 処置では4時間後から24時間後まで細胞死が増加し、いずれの時間においても細胞内 Fe^{2+} 蓄積を認めた。FAS 300 μM 処置においても同様に、4時間後から24時間後まで細胞死が増加し、いずれの時間においても細胞内 Fe^{2+} 蓄積を認めた。(Fig. 54B、C)。また、両細胞共に細胞死と細胞内 Fe^{2+} 蓄積の間に正の相関関係が認められた (Fig. 54D)。これらの結果は、BBB 構成細胞内における Fe^{2+} の蓄積が細胞死を惹起することを示唆している。

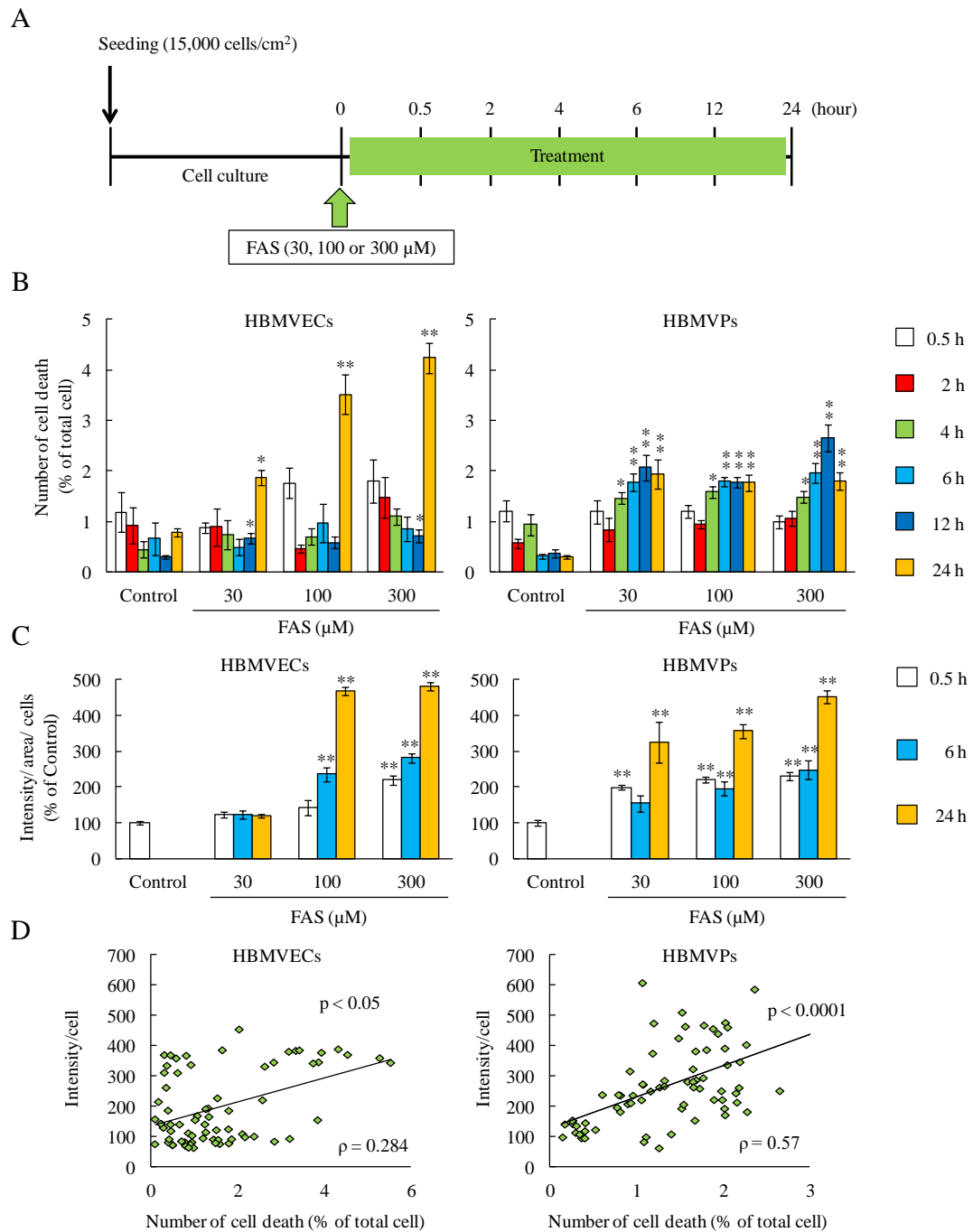


Fig. 54 Intracellular Fe²⁺ accumulation correlated to cell death both endothelial cells and pericytes.

(A) Experimental protocol of the time-dependently cell death and intracellular Fe²⁺ accumulation assay after FAS treatment (30, 100 or 300 µM). (B) Cell death rate was evaluated at 0.5, 2, 4, 6, 12 and 24 h after FAS treatment (n = 6). (C) Intracellular Fe²⁺ accumulation assay was performed at 0.5, 6 and 24 h after FAS treatment (n = 6). (D) The correlation assessment of intracellular Fe²⁺ accumulation and cell death rate (n = 72). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. Control. Data are expressed as the mean ± SE, and analyzed with the Dunnett's test (B, C) and Spearman's rank correlation coefficient.

3-2-3 Hb の中間代謝産物であるヘミンを用いた検討

3-2-3-1 細胞内 Fe^{2+} 蓄積及び細胞障害に対するヘミンの作用

本検討では、Hb と鉄の中間代謝産物であり、反応性及び毒性が高いヘミンの処置による BBB 構成細胞への影響を検討した。ヘミン (1、10 及び 50 μM) を HBMVECs 及び HBMVPs に 1 時間処置した結果 (Fig. 55A)、対照群 (Control 群) と比べ両細胞共に濃度依存的に Si-RhoNox-1 の蛍光強度が増加した (Fig. 55B)。また、両細胞において、ヘミン処置による Si-RhoNox-1 の蛍光強度の増加が、BP の同時処置により抑制された (Fig. 55C)。さらに、ヘミン (1、10 及び 50 μM) を HBMVECs 及び HBMVPs に 24 時間処置した結果 (Fig. 55D)、両細胞共に濃度依存的に細胞生存活性が低下した (Fig. 55E)。さらに、ヘミン (50 μM) を 24 時間処置した結果、両細胞共に対照群と比べ顕著に細胞死が誘発し、BP の同時処置によりそれらの細胞死は抑制された (Fig. 55F)。血管内皮細胞やペリサイトにおいて、ヘミン曝露は Hb や鉄と同様に細胞内 Fe^{2+} の蓄積を介して細胞障害を誘発することが示唆された。

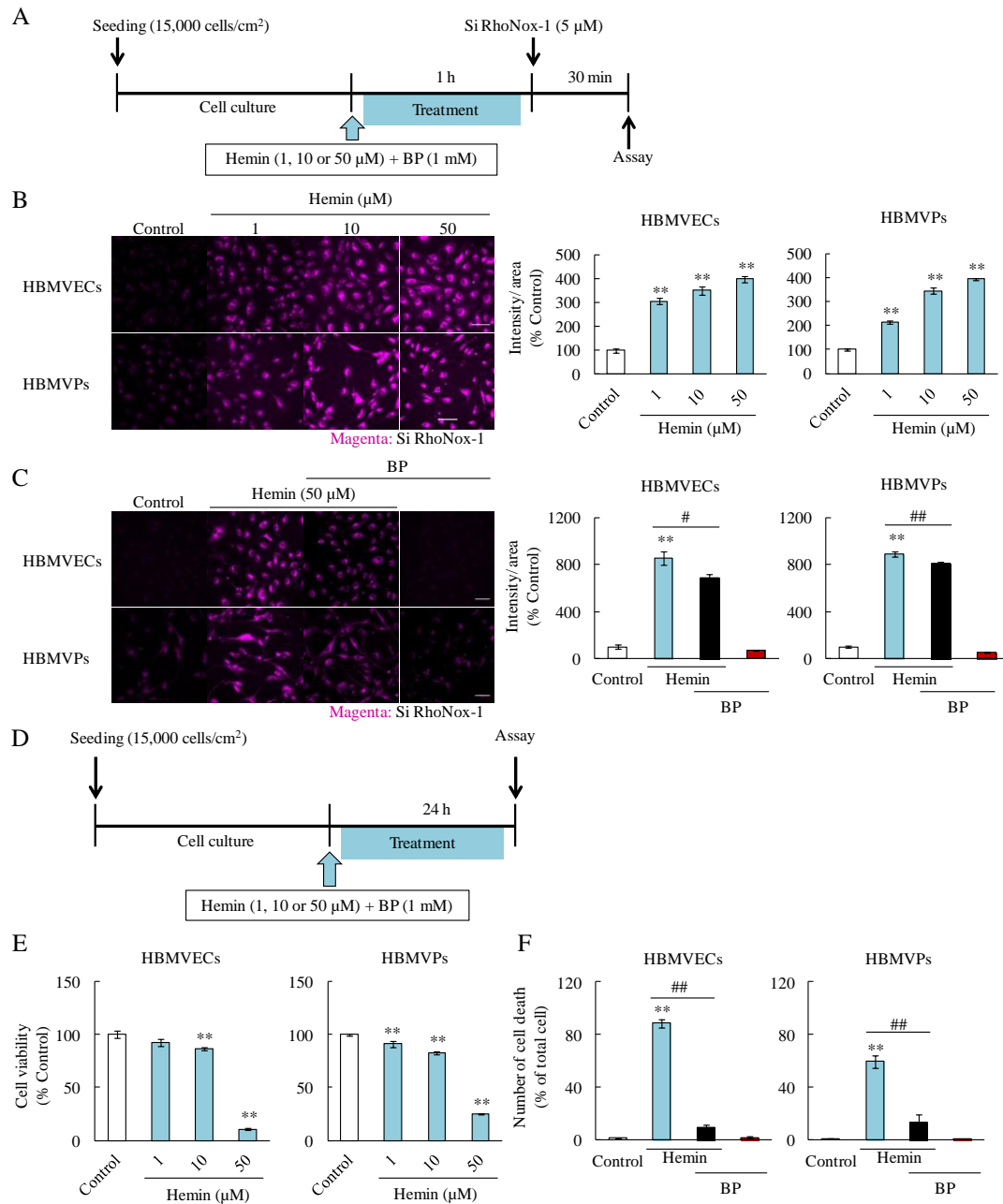


Fig. 55 Hemin induced intracellular Fe²⁺ accumulation and cell damage in both endothelial cells and pericytes.

(A) Experimental protocol of the intracellular Fe²⁺ accumulation assay after hemin (1, 10 or 50 µM) treatment. (B) Intracellular Fe²⁺ accumulation assay (n = 3 or 4). (C) Intracellular Fe²⁺ accumulation assay upon treatment with BP (n = 4-6). The left images show Si-RhoNox-1 staining (5 µM; magenta). The right graphs comprise the quantitative data. (D) Experimental protocol of cell viability and cell death assays. (E) The cell viability rate after hemin treatment for 24 hours (n = 6). (F) The cell death rate after co-treatment with hemin (50 µM) and BP (1 mM) for 24 hours (n = 3). ** *p* < 0.01 vs. Control; # *p* < 0.05, ## *p* < 0.01 vs. Hb or Hemin. Data are expressed as the mean ± SE, and analyzed with the Dunnett's test (B, E) or Tukey's test (C, F). Scale bar = 100 µm.

3-2-3-2 ROS 産生量に対するヘミンの作用

Hb 処置と同様に酸化ストレスの惹起が細胞障害に関与すると考えられるため、ROS 産生量を評価した。ヘミン (50 μM) を HBMVECs 及び HBMVPs に 24 時間処置した結果、対照群 (Control 群) と比べ両細胞共に対照群と比べ細胞内 ROS 産生量が増加した。また、BP の同時処置により、両細胞共に ROS 産生量の増加が抑制された (Fig. 56)。これらの結果は、ヘミンによる細胞障害は ROS 産生量の増加を介することを示唆している。

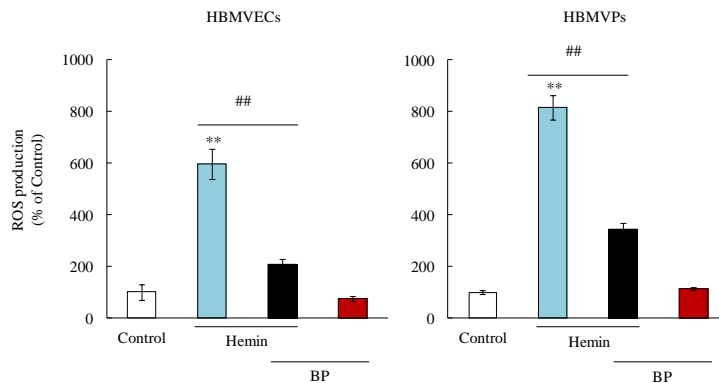


Fig. 56 Hemin treatment increased ROS production in both endothelial cells and pericytes.

The quantitative analysis of ROS production after hemin with BP co-treatment (n = 5-6). The ROS production rate was corrected by the number of living cells. ** $p < 0.01$ vs. Control; ## $p < 0.01$ vs. Hemin. Data are expressed as the mean \pm SE, and analyzed with the Tukey's test. Scale bar = 100 μm .

3-2-3-3 血管内皮細胞バリアー機能やタンパク質発現に対するヘミンの作用

ヘミン処置による血管内皮細胞のバリアー機能やタンパク質発現量に及ぼす影響を評価した。ヘミン (50 μM) を HBMVECs に 24 時間処置した結果 (Fig. 57A)、TEER 値が対照群 (Control 群) と比べ低下した (Fig. 57B)。また、上部 Transwell インサート内から下部の 24 well 内への FITC-dextran の漏出量が増加した (Fig. 57C)。その後、免疫染色法により血管内皮細胞間に存在する結合因子である VE-cadherin の状態と Fe^{2+} の細胞内蓄積を観察した。対照群では VE-cadherin が隣接する細胞間

に強く発現しており、 Fe^{2+} の細胞内における蛍光強度はわずかであった。一方、ヘミン処置により、対照群と比べ細胞間における VE-cadherin の発現は減少した。加えて、ヘミン処置により細胞内における Si-RhoNox-1 の蛍光強度の増加 (矢印) が観察された (Fig. 57D)。つぎに、ウェスタンブロット法を用いてヘミン処置後の血管内皮細胞におけるタンパク質発現量の変化を検討した。ヘミン (50 μM) を HBMVECs に 24 時間処置した結果、ヘム代謝酵素 HO-1、アポトーシスマーカー cleaved caspase-3、鉄貯蔵タンパク質 Ferritin がヘミン処置により増加した。BP の併用処置により、これらのタンパク質の増加は抑制された (Fig. 57E)。

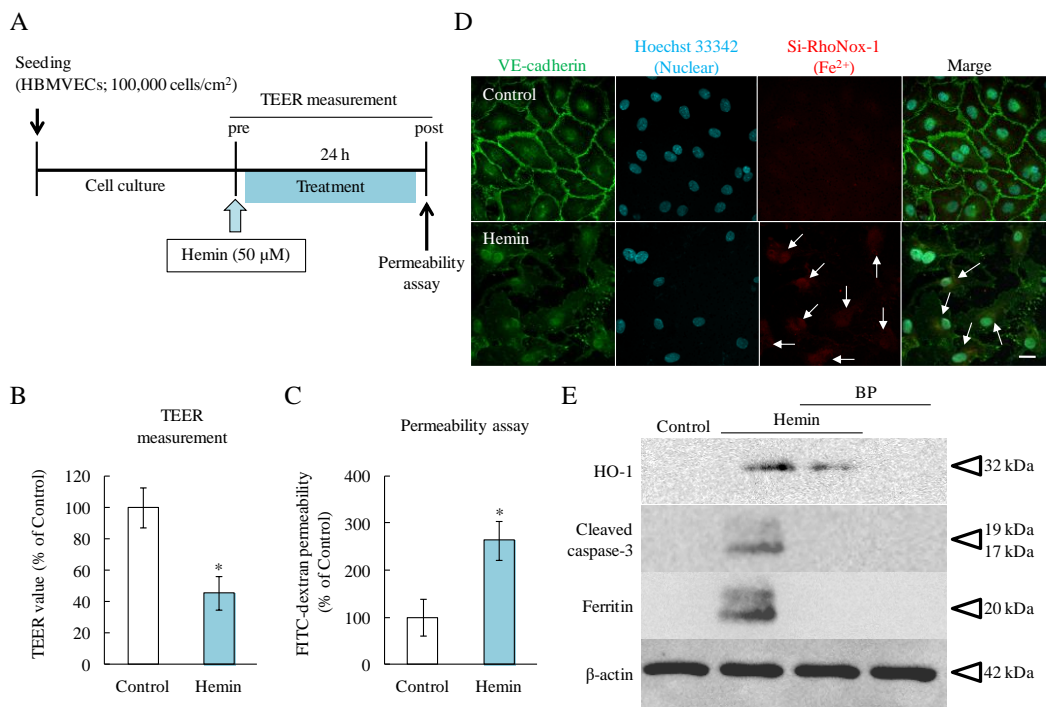


Fig. 57 Hemin disrupted endothelial barrier function and altered proteins expression.

(A) Experimental protocol of TEER value measurement and FITC-dextran permeability assay after hemin treatment (50 μM). (B) The TEER values at 24 h after hemin treatment (n = 4). (C) Permeability rate (n = 4). (D) The representative images of endothelial cells after performing TEER and FITC-dextran assay. The following fluorescent probes were utilized to detect different cellular components; VE-cadherin (anti-VE-cadherin antibody, green), nucleus (Hoechst33342, blue), and Fe^{2+} (Si-RhoNox-1, red). (E) The representative bands images by western blotting. HO-1, the heme metabolizing enzyme, cleaved caspase-3, an apoptosis marker, Ferritin, an iron storage protein, β -actin, loading control. * $p < 0.05$ vs. Control. Data are expressed as the mean \pm SE, and analyzed with the Student's *t*-test. Scale bar = 20 μm .

3-3 *In vivo* ヘミン注入脳出血モデルを用いた検討

3-3-1 BBB 透過性に対するヘミンの脳実質内投与の作用

In vitro の実験結果より、血腫から放出される Hb やその代謝産物であるヘミン及び鉄の処置により、BBB 構成細胞が障害を受けることが明らかになった。上記の 3 因子の中で処置後の細胞死率が最も高かったヘミンを用いて、BBB 透過性に及ぼす影響を検討した (Fig. 58A)。マウスの線条体領域にヘミンを注入した 1 及び 3 日後に、ヘミン投与部位周辺で蓄積物が観察された (Fig. 58B; 上図)。処置 3 日後の脳切片において、注入部位に出血様所見が認められ、血腫周辺では透過性亢進の指標となる EB の蛍光強度が増加した (Fig. 58B; 下図)。脳重量あたりの EB 量を定量した結果、処置 1 及び 3 日後に注入側線条体で EB 量が増加した。また、処置 3 日後では対側を含む線条体以外の領域で EB 量の増加が認められた (Fig. 58C)。これらの結果より、ヘミンの脳実質内投与により BBB の透過性が亢進することが示唆された。

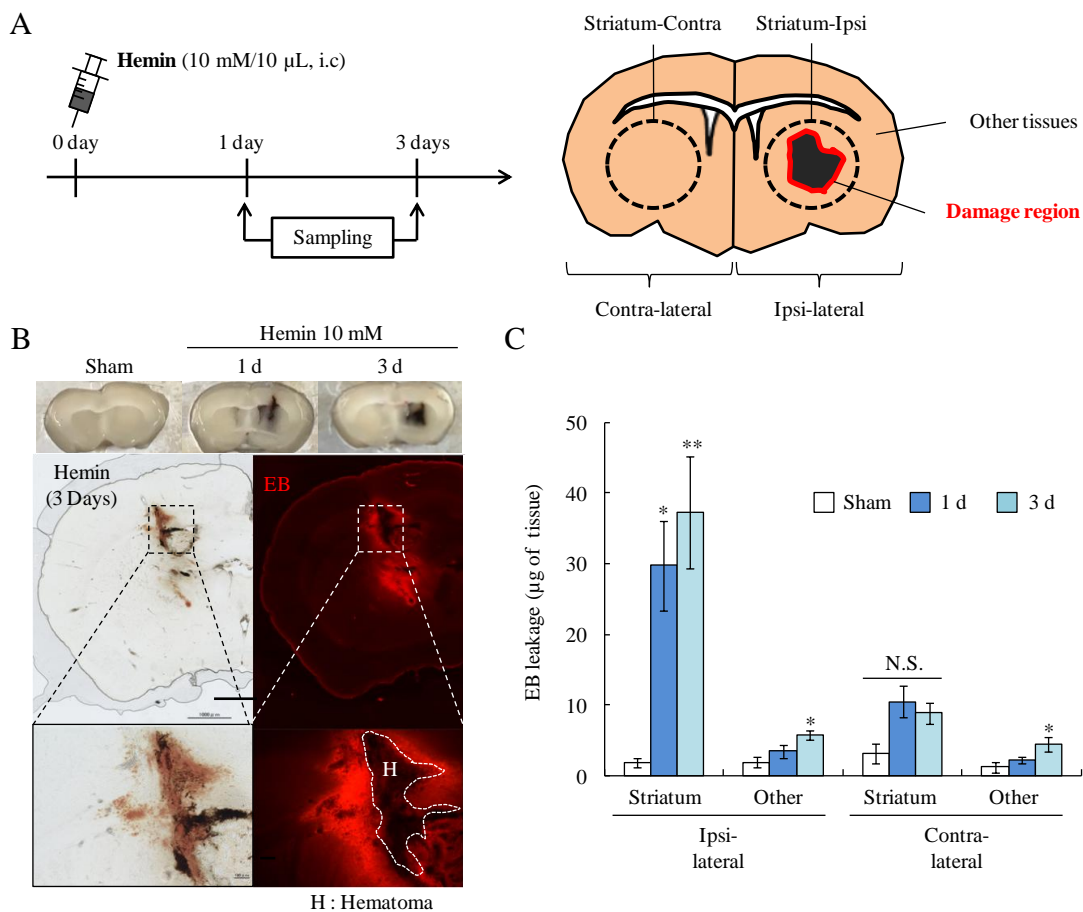


Fig. 58 Intracerebral injection of hemin induced BBB hyper-permeability *in vivo*.

(A) Experimental protocol of the hemin injection model. The schema of the mouse brain after hemin injection. Hemin was administered into the striatum region. The injection site (striatum) and other tissue in both the ipsilateral and contralateral regions were harvested. (B) The upper images show the representative brain slices after hemin injection. The lower images depict the Evans blue leakage in brain sections and the hematoma region (H) is shown. (C) The graph represents the quantitation of Evans blue leakage (μg of brain tissue), which indicates BBB hyper-permeability (Sham, $n = 5$; Hemin 1 day, $n = 9$; Hemin 3 day, $n = 9$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. Sham. Data are expressed as the mean \pm SE, and analyzed with the Tukey's test. N.S.; not significant.

3-3-2 タンパク質発現量に対するヘミン脳実質内投与の作用

BBB 構造においては結合タンパク質やペリサイトの存在が重要であるため (18, 19)、ヘミン注入後の各種タンパク質の発現量を評価した。ヘミン注入 3 日後において、vehicle 群 (PBS 注入群) と比較し、ヘミン注入群ではペリサイトマーカー PDGFR- β 、内皮細胞間結合因子 VE-cadherin 及び Occludin の発現量が減少した。また、ヘム代

謝酵素 HO-1 は、vehicle 群と比較してヘミン注入群で増加した (Fig. 59)。

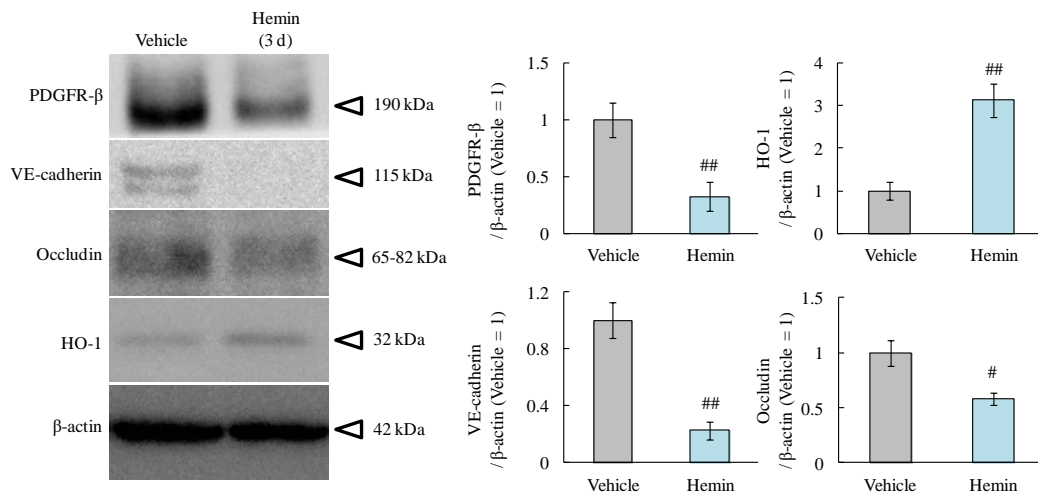


Fig. 59 Intracerebral injection of hemin altered several proteins at peri-hematoma region.

Western blot analysis of PDGFR-β, VE-cadherin, occludin and HO-1 in the damaged region 3 days after hemin injection (Vehicle, n = 7; Hemin, n = 7). # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. Vehicle. Data was analyzed with the Student's *t*-test and expressed as the mean \pm SE.

3-3-3 神経機能に対するヘミンの脳実質内投与の作用

脳出血後の周辺領域における BBB 透過性の亢進は、浮腫や炎症性因子の浸潤を促進し、二次障害による神経症状を引き起こす(68, 116, 136)。前項で示されたヘミンによる BBB 透過性の亢進と神経症状の関係を検討するため、2 種の行動試験及び組織染色による検討を行った。Garcia 試験では、処置 1 日後では未処置の sham 群と比較して、PBS 注入群及びヘミン注入群の両群で神経スコアが低下した。処置 3 日後では未処置の sham 群と比較して、ヘミン群でのみ神経スコアの顕著な低下を認め、さらに PBS 群と比べても低いスコアであった (Fig. 60A; 上グラフ)。前肢の踏み外し観察による感覚運動試験では、処置 1 日後では未処置の sham 群と比較して、PBS 注入群及びヘミン注入群の両群で前肢のエラー数が増加した。処置 3 日後では未処置の sham 群と比較して、ヘミン群でのみエラー数の増加を認め、さらに PBS 群と比べても増加した (Fig. 60A; 下グラフ)。クレシルバイオレット染色を用いた組織評価では、非

染色部位を障害領域として定量した。処置 3 日後において、PBS 注入群と比べてヘミン注入群で神経障害領域が増加した (Fig. 60B)。

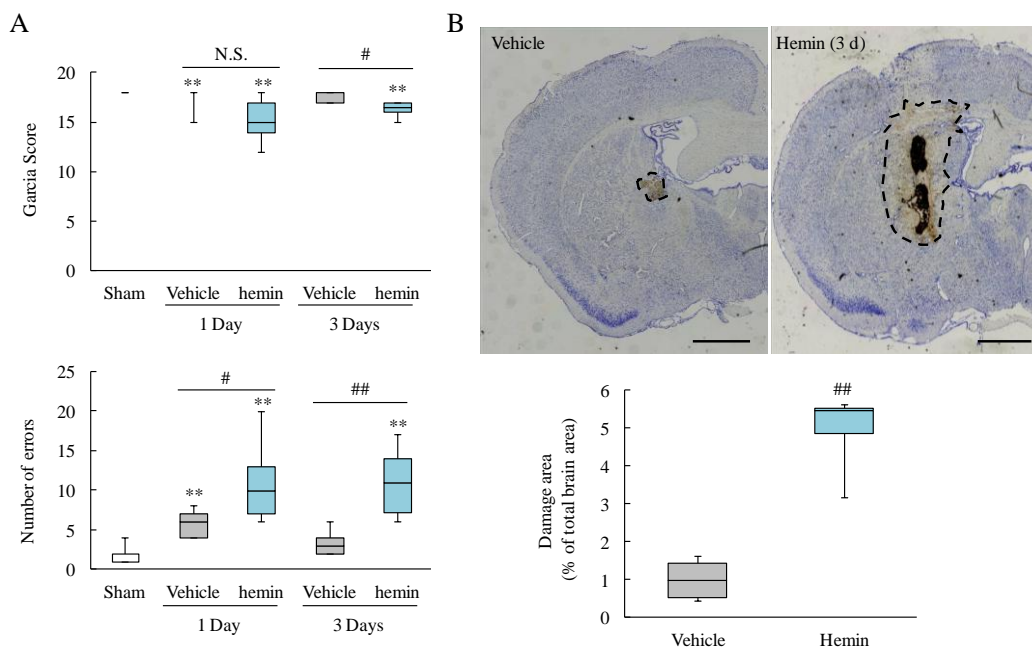


Fig. 60 Intracerebral injection of hemin induced neuronal loss and neurological deficits *in vivo*.

(A) Behavior test data. The upper panel shows the Garcia test score and the lower panel shows the number of errors in a grid-walking test (Sham, n = 8; Vehicle 1 day, n = 5; Vehicle 3 day, n = 5; Hemin 1 day, n = 9; Hemin 3 day, n = 7). (B) Neuronal damage assay. The upper panel shows the representative brain images which were stained by cresyl violet and the lower graph represents the quantitation of the damage area/total brain area (Vehicle, n = 4; Hemin, n = 4). Scale bar = 1 mm. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. Sham; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. Vehicle. Data are expressed as the mean \pm SD, and analyzed with the Mann-Whitney U -test (A), or the Student's t -test (B). N.S.; not significant.

3-3-4 鉄蓄積に対するヘミン脳実質内投与の作用

ヘミン注入部位周辺における鉄蓄積を評価した。ヘミン注入 3 日後において、vehicle 群 (PBS 注入群) と比較し、ヘミン注入群では Si-RhoNox-1 の蛍光強度やその発色領域が増加した。自己血注入群においても、血腫周辺領域で Si-RhoNox-1 の蛍光強度が増加した (Fig. 61A)。また、Si-RhoNox-1 の発色領域で免疫染色法を行った結果、血管内皮細胞マーカー CD31 (Fig. 61B-b) 及びペリサイトマーカー PDGFR- β (Fig. 61C-b) と鉄貯蔵タンパク質 Ferritin を共発現している細胞が観察され

た (Fig. 61B-e、C-e)。

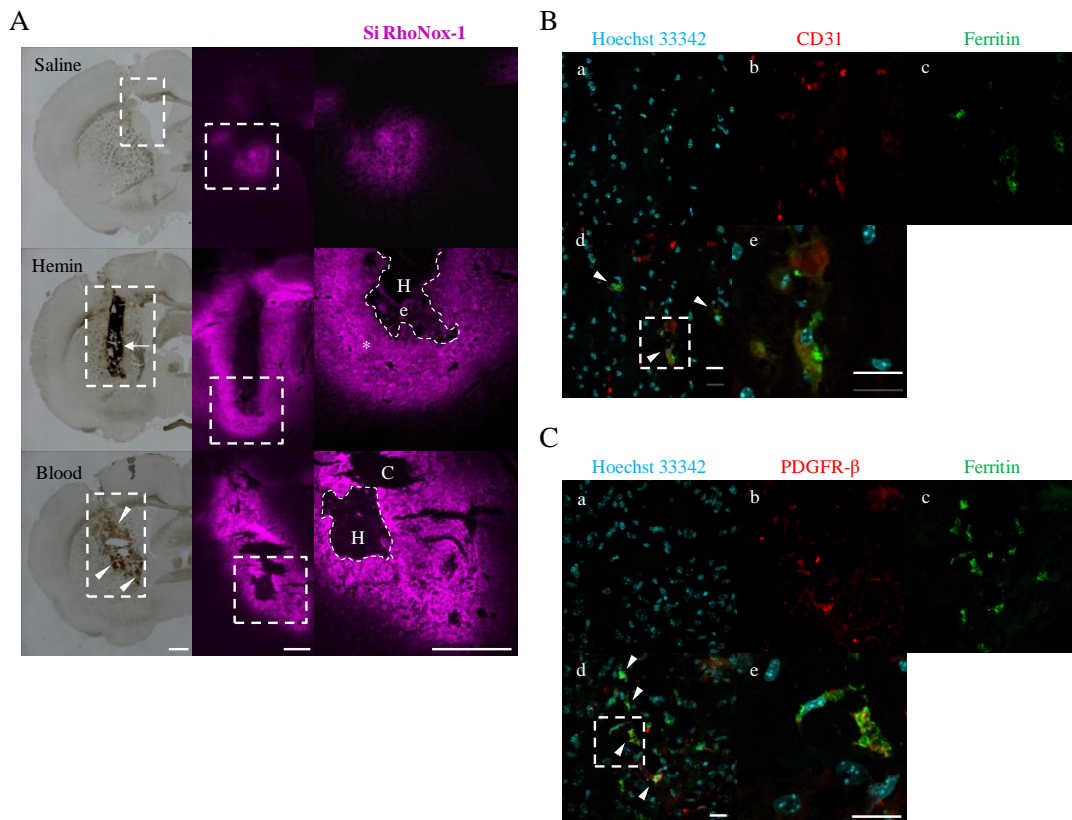


Fig. 61 Intracerebral injection of hemin induced Fe^{2+} accumulation in both endothelial cell and pericyte at peri-hematoma region.

(A) The detection of Fe^{2+} accumulation at 3 days after hemin injection using Si-RhoNox-1. The groups comprise the following: upper is saline injection (Vehicle), middle is hemin injection (Hemin) and lower is autologous blood injection (Blood). In the brightfield images, the arrow (black area) shows remnant hemin and the arrow heads (red area) delineate the hemorrhagic area. In the fluorescent images, the dashed square indicates the enlarged area. The Si-RhoNox-1 staining (magenta) is shown. [He] Remnant hemin, [H] the hematoma, and [C] the cavity portion of the brain are shown (Vehicle, n = 4; Hemin, n = 4; Blood, n = 3). Scale bar = 500 μm. (B) Representative immunofluorescence staining at peri-hematoma region (* mark in B). [a] Hoechst 33342 (blue; nucleus), [b] CD31 (red; the marker of endothelial cell), [c] Ferritin (green; the marker of iron), [d] the merged image and [e] enlarged image of dashed square in the merged image (n = 3). (C) Representative immunofluorescence staining. [b] PDGFR-β (red; the marker of pericyte) (n = 3). Scale bar = 20 μm. Arrowheads indicate merged cells.

3-3-5 ヘミン脳実質内投与モデルにおける鉄キレート剤 BP 投与による保護作用

ヘミン注入脳出血モデルを用いて、鉄キレート剤 BP の神経症状に及ぼす影響を検

討した。ヘミン注入の2時間後、6時間後、1日後、2日後、3日後にBPをマウスの腹腔内に頻回投与し、3日後における感覚運動試験を行い、前肢の踏み外し回数(エラー数)を測定した結果(Fig. 62A)、未処置のsham群やvehicle群(PBS注入群)と比べ、ヘミン注入群でエラー数が増加した。しかしながら、BP投与群ではヘミン群と比べてエラー数が有意に減少した(Fig. 62B)。

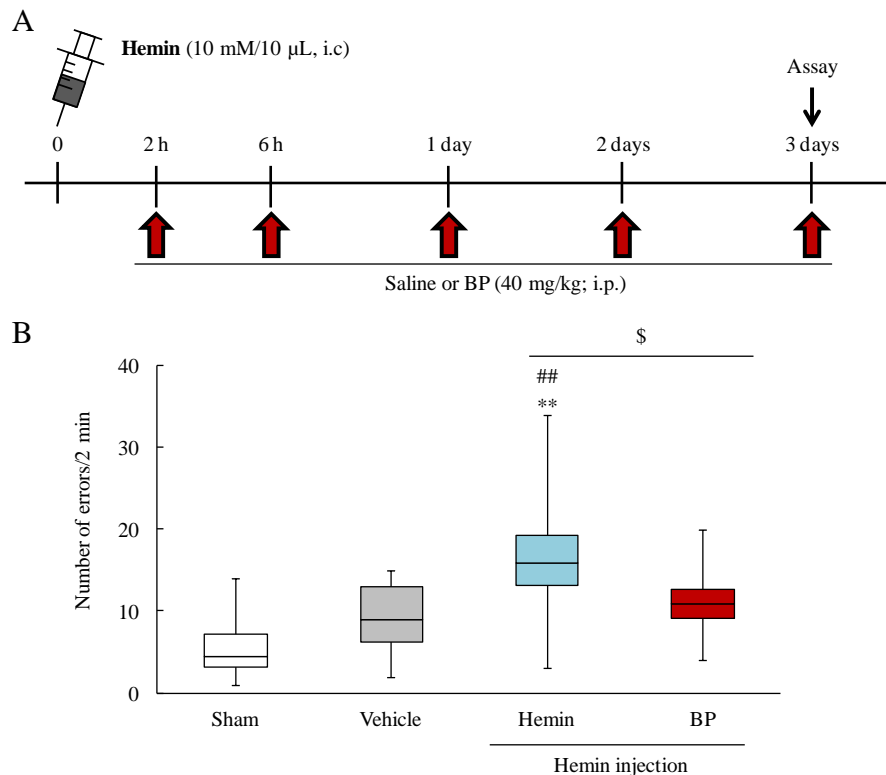


Fig. 62 The protective effect of an iron chelator, BP in *in vivo* hemin model.

(A) Experimental protocol of BP treatment in the hemin injection model (Sham, n = 3; Vehicle, n = 9; Hemin, n = 9; BP, n = 9). BP or saline was administered 5 times after hemin injection (2 h, 6 h, 1 day, 2 days and 3 days). (I) Behavior test data. The graph shows the number of errors in a grid walking test. ** $p < 0.01$ vs. Sham; ## $p < 0.01$ vs. Vehicle; § $p < 0.05$ vs. Hemin. Data was analyzed with the Mann Whitney *U*-test (B) and expressed as the mean \pm SD.

3-4 鉄キレート剤デフェラシロクス (DFR) の作用

3-4-1 *In vitro* ヘミン誘発性神経細胞障害モデルに対する作用

脳出血後のBP投与により神経症状が抑制されたことから、その他の鉄キレート剤も

同様に脳出血後の二次性神経障害に対して治療効果を示す可能性がある。デフェラシロクス (DFR) は、輸血時の鉄過剰症に対して承認されている鉄キレート剤であり (141)、他の鉄キレート剤と比較して、半減期が長いことや鉄欠乏症のリスクが低いことが報告されている (142, 143)。本検討では、ヘミンによって誘発される神経細胞障害に対する DFR の保護作用を検討した。

3-4-1-1 ヘミン誘発性細胞内 Fe^{2+} 蓄積に対する DFR の作用

Si-RhoNox-1 を用いて、DFR のヘミン処置後の細胞内 Fe^{2+} 蓄積に及ぼす影響を検討した。10 μM のヘミンを SHSY5Y 細胞に 1、2、6 及び 12 時間とそれぞれ処置した結果、ヘミン処置の 1 時間後から対照群と比較して Si-RhoNox-1 の蛍光強度が増加した。一方、10 μM の DFR をヘミンと同時に処置した結果、処置 6 時間後及び 12 時間後で Si-RhoNox-1 の蛍光強度の増加を抑制した (Fig. 63A、B)。

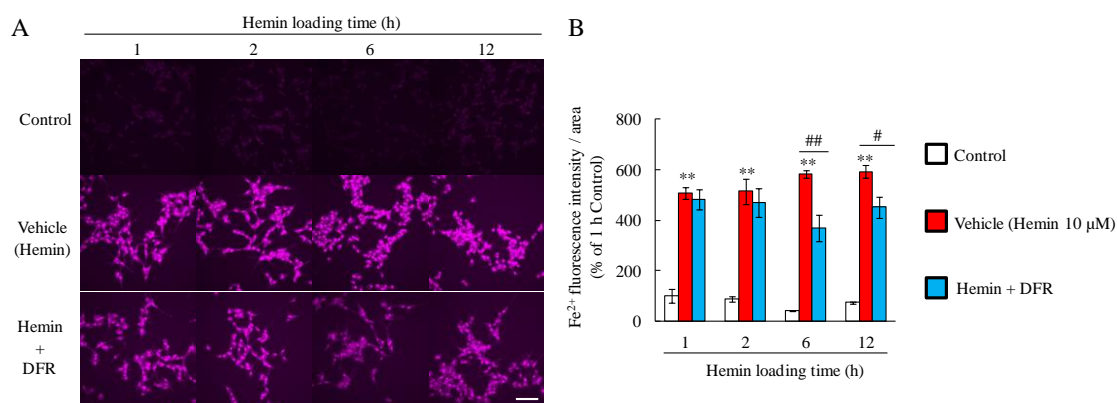


Fig. 63 DFR suppressed the intracellular bivalent iron (Fe^{2+}) accumulation after hemin treatment in SHSY5Y cell lines.

Twenty four hours after cell seeding (10,000 cells/well), cells were co-incubated with hemin (10 μM) and DFR (10 μM) for each time (1, 2, 6 or 12 h). Intracellular Fe^{2+} accumulation was evaluated by using Si-RhoNox-1 (5 μM), a specific Fe^{2+} -detectable fluorescent probe. (A) The representative images show Si-RhoNox-1 staining as fluorescence intensity (magenta). (B) The graphs comprise the quantitative data (each group, $n = 5$ or 6). ** $p < 0.01$ vs. Control, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. Vehicle (Hemin), statistical significance was determined by Tukey's test. Scale bar = 100 μm . Data are expressed as mean \pm SE.

3-4-1-2 ヘミン誘発性細胞死に対する DFR の作用

Hb またはヘミンを神経細胞に処置した結果、Hb 及びヘミン処置群のどちらにおいても有意に細胞死率が増加し、その増加はヘミン処置群でより顕著であった (Fig. 64A、B)。つぎに、ヘミン誘発性細胞死に対する DFR の保護作用を検討するため、ヘミン (10 μ M) を SHSY5Y 細胞に処置し、6、12 及び 24 時間後における細胞死を評価した。ヘミン処置によりいずれの時間においても細胞死が誘発し、その細胞死は時間依存的に増加した。一方、DFR (1、3 及び 10 μ M) をヘミンと同時に処置した結果、DFR 10 μ M はいずれの時間においても細胞死の増加を抑制した。また、DFR 3 μ M は 12 及び 24 時間後のヘミンによる死細胞数の増加を抑制した。DFR 1 μ M はいずれの時間においてもヘミンによる細胞死に対して影響を及ぼさなかった。DFR 10 μ M を 24 時間単独処置した群では対照群と比べ細胞死が誘発されていた (Fig. 64C)。つぎに、ヘミン処置から 6 (Post 6 h) 及び 12 時間 (Post 12 h) の間隔を空けて DFR 10 μ M を後処置した結果、DFR 10 μ M 処置はヘミンと同時に処置した際 (Co-treat) と同様にいずれの時間においてもヘミンによる死細胞数の増加を抑制した (Fig. 64D)。

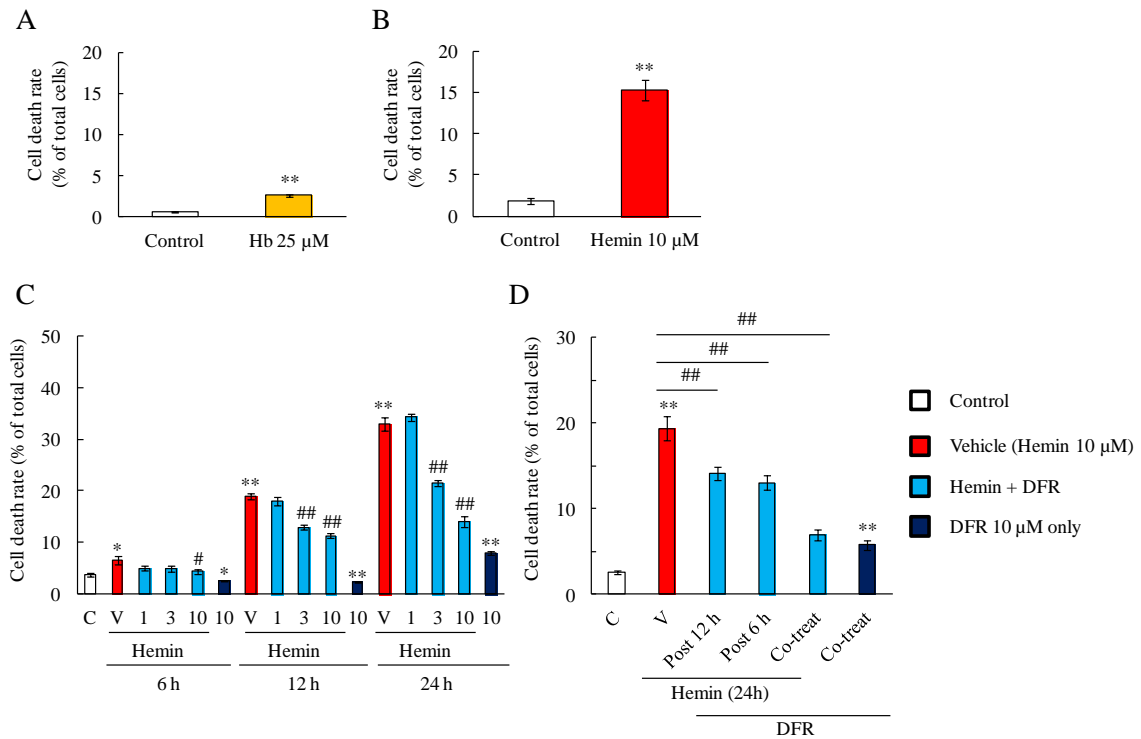


Fig. 64 DFR suppressed the hemin-induced neuronal cell damage.

(A, B) Twenty four hours after cell seeding (10,000 cells/well), cells were incubated with Hb (25 μ M) or hemin (10 μ M) for 24 h. In addition, cells were also co-incubated with hemin (10 μ M) and DFR (1, 3 or 10 μ M) for each time (6, 12 or 24 h). (C) The result in cell death rate after hemin treatment. The number of PI and Hoechst33342-positive cells were counted, and the cell death rate was calculated as a percentage of PI-positive to Hoechst33342-positive cells (n = 6). (D) The cell death rate assay in post-treatment of DFR for each hour (12, 18 or 24 h) (n = 4-5). Data are expressed as mean \pm SE. ** p < 0.01, * p < 0.05 vs. Control, # p < 0.05, ## p < 0.01 vs. Vehicle, statistical significance was determined by the Student's t -test (A-C), Welch's t -test (C), Dunnett's test (C), and Tukey's test (D).

3-4-1-3 酸化ストレスに関連する因子に対するヘミン及び DFR の作用

ヘミン (10 μM) を SHSY5Y 細胞に 24 時間処置した結果、対照群と比べ細胞内 ROS 産生量が増加した。DFR (1, 3 及び 10 μM) をヘミンと同時に処置した結果、DFR 3 及び 10 μM はヘミンによる細胞内 ROS 産生の増加を抑制した。DFR 1 μM をヘミンと同時に処置した群及び DFR 10 μM を単独処置した群は、共に細胞内 ROS 産生量に対して影響を及ぼさなかった (Fig. 65A)。つぎに、DFR の脂質過酸化物産生に及ぼす影響を検討した。ヘミン (10 μM) を SHSY5Y 細胞に 24 時間処置した結果、対照群と比べ TBA 値が増加した。DFR 10 μM をヘミンと同時に処置した結果、その増加は抑制された (Fig. 65B)。さらに、DFR の酸化ストレスに及ぼす影響を H_2O_2 処置による細胞障害モデルを用いて検討を行った。 H_2O_2 (200 μM) を SHSY5Y に処置し、6 時間後、12 時間後、18 時間後における細胞死を評価した。 H_2O_2 処置により、いずれの時間においても細胞死が誘発し、その細胞死は時間依存的に増加した。一方、DFR (1, 3 及び 10 μM) を H_2O_2 と同時に処置した結果、DFR 10 μM はいずれの時間においても細胞死の増加を抑制した。また、DFR 3 μM は 12 時間の時点において細胞死の増加を抑制した。DFR 1 μM はいずれの時間においても細胞死に影響を及ぼさなかった (Fig. 65C)。

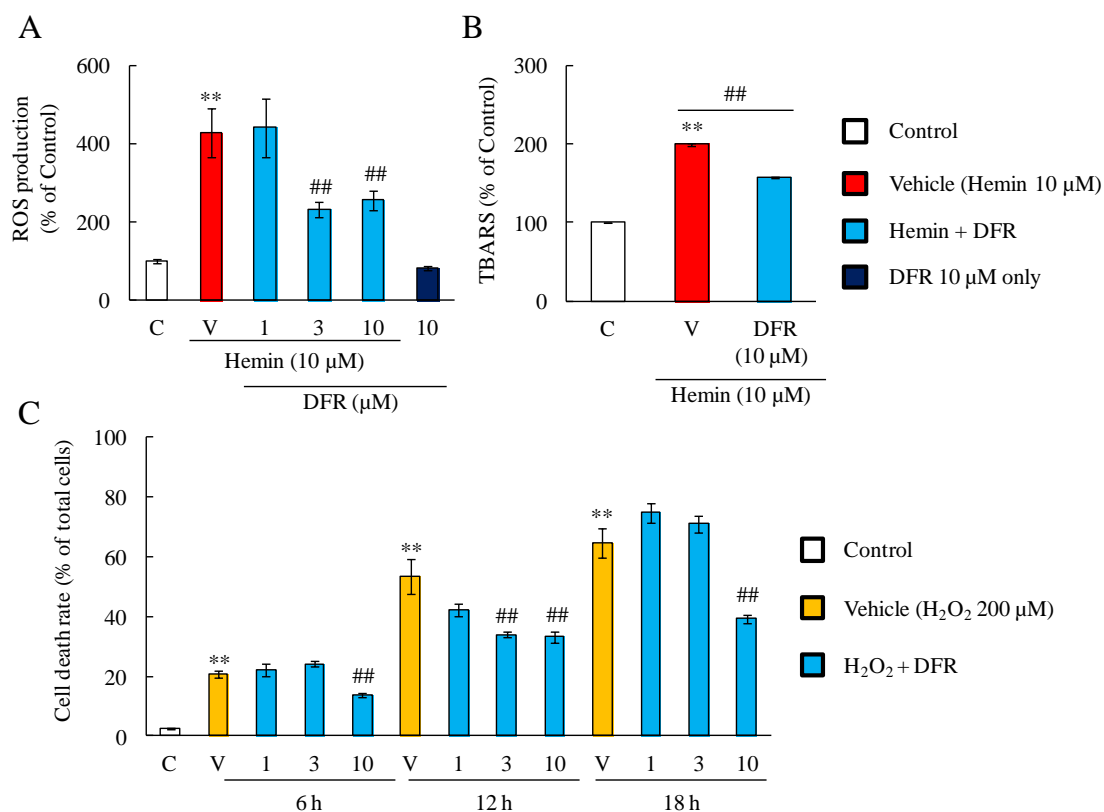


Fig. 65 DFR suppressed oxidative stress damage-induced by hemin.

Twenty four hours after cell seeding (10,000 cells/well), cells were co-incubated with hemin (10 μM) or H₂O₂ (200 μM) and DFR (1, 3 or 10 μM) for each time (6, 12 or 24 h). (A) The ROS production rate was calculated by using the ROS detectable probe, CM-H₂DCFDA, and corrected by the number of living cells (n = 6). (B) The lipid peroxidation was evaluated by 2-thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay which measures the malondialdehyde (MDA) (n = 4). (C) The cell death rate assay after H₂O₂ treatment for each hour (6, 12 or 24 h) (n = 6). Data are expressed as mean ± SE. ** *p* < 0.01 vs. Control, ## *p* < 0.01 vs. Vehicle, statistical significance was determined by the Student's *t*-test (C), Welch's *t*-test (A, C), Dunnett's test (C), and Tukey's test (B).

3-4-1-4 ヘミン処置後の各種タンパク質発現量に対する DFR の作用

ヘミン (10 μ M) を SHSY5Y 細胞に処置し、処置 6、12 及び 24 時間後における鉄貯蔵タンパク質やアポトーシス関連タンパク質などの発現量変化に及ぼす影響を検討した。また、DFR (10 μ M) をヘミンと同時に処置し、ヘミン処置によるタンパク質発現量の変化に及ぼす影響を検討した (Fig. 66)。Ferritin は鉄貯蔵タンパク質である。ヘミン処置の 12 及び 24 時間後に Ferritin は増加し、DFR の併用によりそれらの増加は抑制された。LC3 はオートファジーの進行に伴い増加し、オートファゴソームの形成に関与するタンパク質である。ヘミン処置の 12 及び 24 時間後に細胞質に存在する I 型 LC3 に対して膜に存在する活性型の II 型 LC3 の発現量が増加し、DFR の併用によりそれらの増加は抑制された。p62 は LC3 に結合してオートファジーと関連するタンパク質である。ヘミン処置の 12 及び 24 時間処置に p62 は増加し、DFR の併用によりそれらの増加は抑制された。p38 は酸化ストレスに応答して変動するストレス応答タンパク質である。ヘミン処置の 24 時間後にリン酸化型 p38 の発現量が増加し、DFR の併用によりその増加は抑制された。Caspase-3 や PARP はアポトーシス関連タンパク質である。ヘミン処置の 12 及び 24 時間処置によりアポトーシスの活性化を示す切断型の発現量が増加し、DFR の併用によりそれらの増加は抑制された。

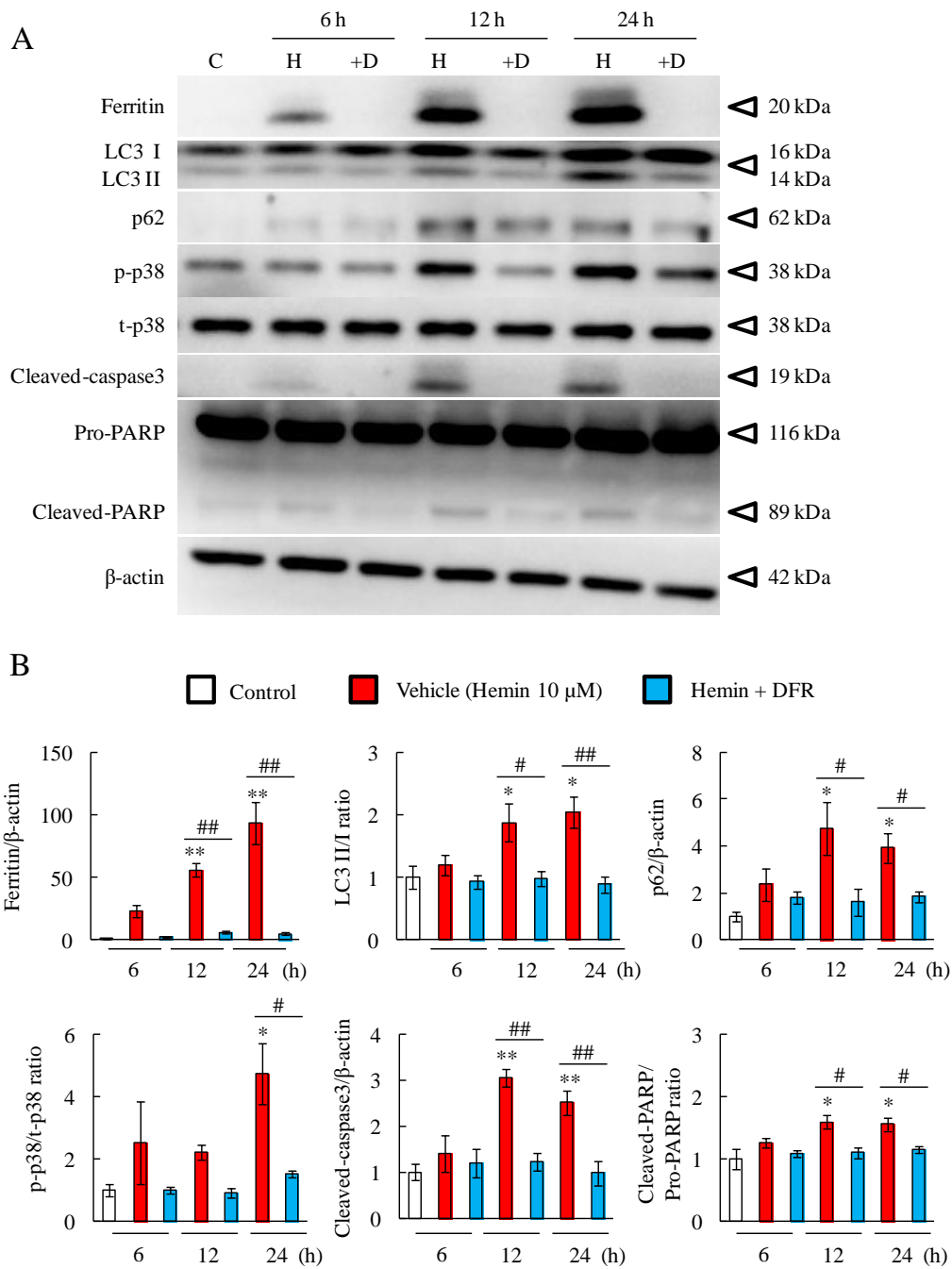


Fig. 66 The influences of DFR treatment on hemin-induced neuronal cell death model

Twenty four hours after cell seeding (100,000 cells/well), cells were co-incubated with hemin (10 μM) and deferasirox (DFR 10 μM) for each time (6, 12 or 24 h). Then, western blotting analysis was performed. (A) These images indicate the representative bands. (B) The graphs comprise the quantitative data (each group, n = 4). Ferritin; an iron storage protein, LC3-II/I and p62; autophagy markers, p-38; a stress responding protein, caspase-3 and PARP; apoptosis markers. Data are expressed as mean ± SE. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. Control, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. Vehicle, statistical significance was determined by the Tukey's test.

3-4-2 コラゲナーゼ注入脳出血モデルに対する DFR の作用

DFR はヘミン処置による神経細胞死を抑制したため、脳出血マウスモデルにおける DFR の脳室内投与による保護作用を検討した (Fig. 67A)。まず DFR 投与が血腫の形成や拡大に影響を及ぼすか否かを検討した。コラゲナーゼ注入の 1 日後には広範な血腫が形成されたが (Fig. 67B; 左図)、投与 7 日後の時点では縮小した (Fig. 67B; 右図)。血腫の面積及び容積を定量した結果、脳出血誘導直後の DFR 脳室内投与は、10 及び 100 μM のいずれの濃度においても血腫面積及び容積に影響を及ぼさなかった (Fig. 67C)。脳出血誘導の 1、3 及び 7 日後における感覚運動試験を行った結果、1、3 及び 7 日後のいずれの時点においても sham 群と比較して、コラゲナーゼ注入群ではエラー回数が増加した。一方、DFR 100 μM の投与により、いずれの時点においてもその増加は抑制された。また DFR 10 μM の投与は、3 及び 7 日後におけるエラー数の増加を抑制した (Fig. 67D)。

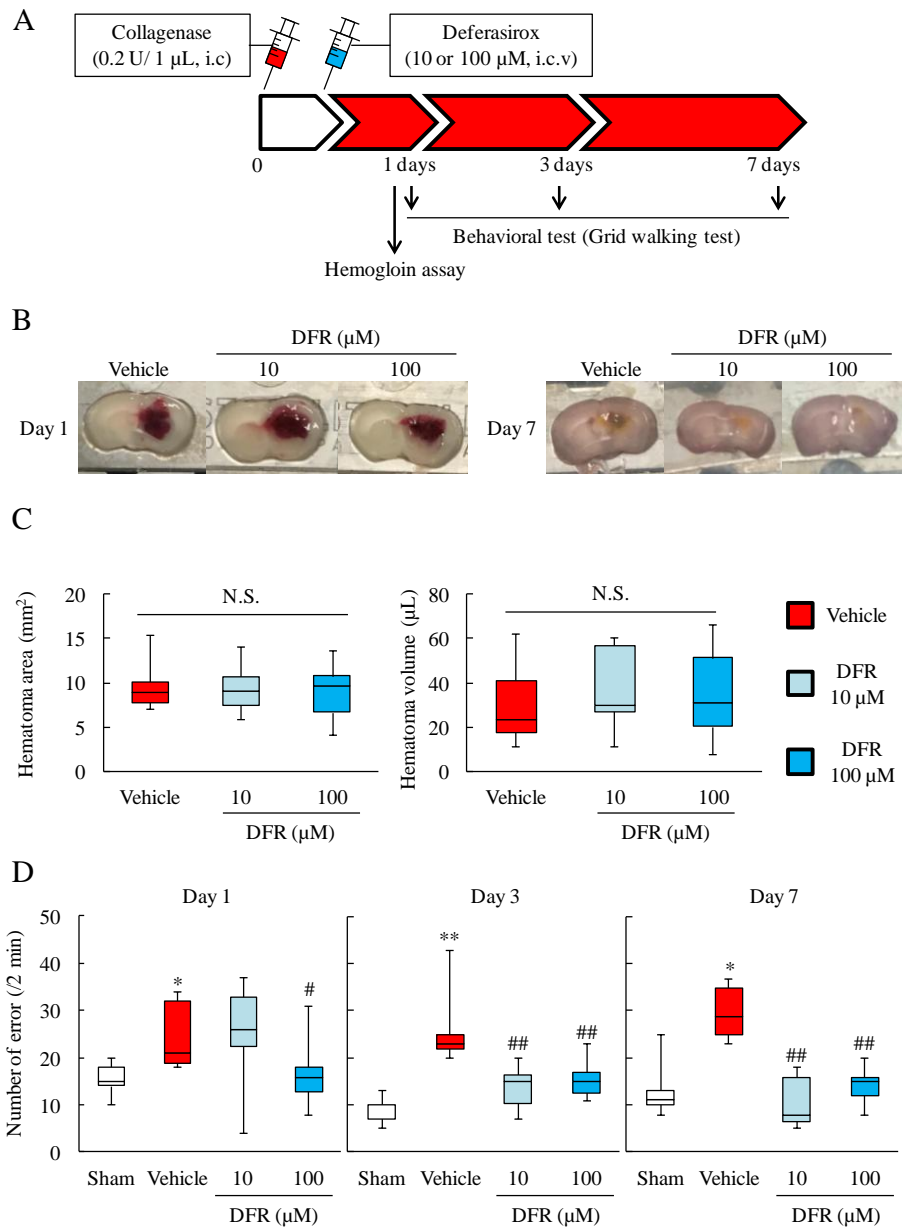


Fig. 67 DFR administration attenuated the neuronal deficits on collagenase-induced ICH model

(A) Experimental protocol of collagenase-induced ICH model and DFR intraventricular (i.c.v) administration. DFR (10 or 100 μM) was injection into intraventricular area immediately after ICH induction. After ICH induction, hematoma and neurological deficits were evaluated from 1 day to 7 days. (B) The representative brain images at 1 day (Left) and 7 days (Right) after collagenase injection. (C) Hematoma evaluation. Left graph shows the quantitative analysis of hematoma area (mm^2). The right graph shows quantitative analysis of hematoma volume by using hemoglobin assay kit. (Vehicle; n = 7, DFR10; n = 9, DFR100; n = 7) (D) Neurological assessment using the grid walking test at 1 day, 3 days and 7 days after ICH. (Sham; n = 5, Vehicle; n = 6, DFR10; n =, DFR100; n = 7) Data are expressed as mean \pm SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. sham, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. vehicle, statistical significance was determined by the Tukey's test (C) or Mann Whitney U-test (D). N.S.; not significant.

第4節 考察

本章では、脳出血後の血腫によって誘発される二次性障害の機序解明及びそれに対する治療薬開発を目的として、*in vitro* 細胞障害モデル及び *in vivo* マウス脳出血モデルを作製し各種検討を行った。BBB 構成細胞や神経細胞において、血腫から放出される Hb やその代謝産物が、 Fe^{2+} の細胞内蓄積を介して酸化ストレスを引き起こし、細胞死や BBB 透過性の亢進、感覚機能の低下を中心とした神経障害を誘発することを明らかにした。また、BP や DFR などの鉄キレート剤の投与は、脳出血後の神経症状の悪化を抑制することを見出した。

脳出血発症の約 24 時間後から血腫中に存在する赤血球の溶解が進行し、Hb やヘムが組織中に放出され、貪食細胞であるマクロファージやミクログリアに取り込まれる (130)。その後、ヘムは HO-1 によって鉄に代謝され、貯蔵タンパク質である Ferritin と結合するため、Ferritin の増加と鉄蓄積は密接に関わっている (135)。マウスの自己血注入脳出血モデルを用いた検討では、時間経過に伴って血腫周辺における Ferritin 発現が増加した (Fig. 47)。組織における Hb や鉄の蓄積は、酸化ストレスを介して組織障害を引き起こす (22, 30, 149)。*In vitro* における Hb 処置は、BBB 構成細胞である血管内皮細胞やペリサイトにおいて、細胞死を誘発した (Fig. 48B)。Hb による細胞死は、抗酸化剤である NAC または Fe^{2+} キレート剤である BP の投与によって抑制された (Fig. 48D)。Hb は水に溶解することで速やかにヘムに変換され、その後 HO-1/2 (HO-1; 誘導型、HO-2; 常時発現型) によって鉄に代謝される (148, 150)。過去の報告では、HO-1 の増加はヘム代謝を促進し、グリアの活性化や鉄蓄積を介して脳出血病態を悪化させる (130, 151, 152)。本検討においては、Hb 処置により BBB を構成する両細胞において ROS 産生量の亢進し、その増加は BP の併用により抑制された (Fig. 49)。また、誘導型代謝酵素である HO-1 が増加していたことより (Fig. 50)、Hb から鉄への代謝が促進され酸化ストレスを惹起したと考えられる。さらに、 Fe^{2+} を特異的

に検出する蛍光プローブ Si-RhoNox-1 (144) の使用により、Hb 処置後の細胞内で Fe^{2+} 蓄積が検出された (Fig. 51)。生体内の鉄は、大部分が安定で毒性の低い Fe^{3+} の状態で存在し、鉄輸送タンパク質トランスフェリンと結合することで細胞内にエンドサイトーシスで取り込まれる (153)。取り込まれた Fe^{3+} は、細胞内で利用される際にフェリレダクターゼで Fe^{2+} に還元され、生じた Fe^{2+} は Fenton 反応によってラジカルを産生するため、過剰な Fe^{2+} の産生は細胞毒性を示す (154)。 Fe^{2+} 剤 (FAS) 処置後の BBB 構成細胞における細胞内 Fe^{2+} 蓄積の増加は細胞死の誘発と正の相関性が認められたことから (Fig. 53, 54)、出血後に生じる組織障害は Fe^{2+} の細胞内蓄積が大きく寄与していると考えられる。また、FAS 処置時の BP による細胞内 Fe^{2+} 蓄積に対する抑制作用は、Hb 処置よりも顕著であった (Fig. 51C, 53C)。本結果より、Hb 由来の鉄は細胞内で Fe^{2+} または Fe^{3+} の状態で共存している可能性がある。そのため、Hb と鉄の中間代謝物に関して評価することは出血後の障害機序の解明につながる考えられる。

ヘミンは Fe^{3+} を中心としたポルフィリン環構造を持った Hb の代謝産物であり、ROS 産生量増加によるミトコンドリア障害や MMP-9、並びに Toll 様受容体 2 の活性化による炎症反応を惹起し、細胞障害を誘発することが知られている (136, 155)。しかし、ヘミンが BBB 構成細胞に及ぼす影響やその詳細な機序は、十分に明らかになっていない。本検討では、血管内皮細胞やペリサイトへのヘミン処置は Fe^{2+} の細胞内蓄積を増加し、ROS 産生量の亢進や細胞死を誘発することが明らかとなった (Fig. 55, 56)。Hb 処置の際と同様に、短時間のヘミン処置により細胞内で Fe^{2+} 検出プローブの蛍光が観察された (Fig. 55C)。BP による細胞内 Fe^{2+} 蓄積に対する抑制作用が部分的であったため、ヘミンが内包する Fe^{3+} の一部は速やかに細胞内で Fe^{2+} に還元される可能性がある。ヘミン処置後の血管内皮細胞では、バリアー機能の低下やアポトーシスが誘導された (Fig. 57)。さらに、マウス脳内へのヘミン注入は BBB の透過性亢進や

BBB 構成因子に関連するタンパク質発現の低下をもたらした (Fig. 58, 59)。また、ヘミン注入3日後には神経症状の悪化が認められた (Fig. 60)。出血後に生じるHbやヘミンは、BBBのバリアー機能に影響を及ぼし、その後の二次障害を誘発することが明らかとなった。加えて、ヘミン注入後には、注入部位周辺でHO-1の発現上昇や Fe^{2+} の蓄積、BBB構成細胞におけるFerritinの発現が観察された (Fig. 59, 61)。 Fe^{2+} のキレート剤であるBP投与によってヘミンによる神経症状が改善されたため (Fig. 62)、脳出血後の二次障害は血腫の代謝により産生された Fe^{2+} の蓄積が原因であると推察される (Fig. 68)。ヘミンはMMP-9を介した炎症反応やミトコンドリア障害だけでなく、鉄依存的な細胞死であるferroptosisを引き起こす (69, 136, 148, 155)。ヘミンは脳出血後の二次障害に深く関与するため、今後もより詳細な検討が必要である。

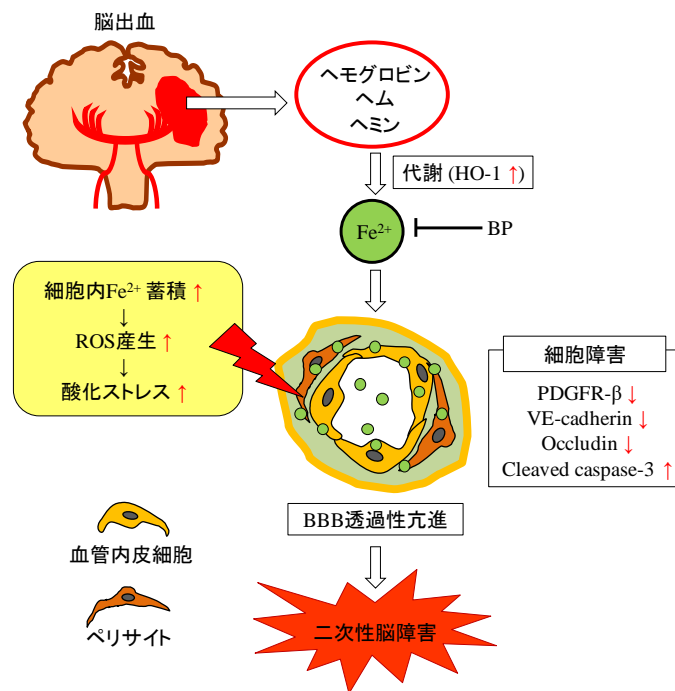


Fig. 68 Secondary brain injury after ICH was caused by Fe^{2+} accumulation in BBB composed cells

After ICH, Hb is released from hematoma and converted to heme/hemin, which is highly reactive substance. Subsequently, heme/hemin is metabolized to Fe^{2+} by inducible typed HO-1. Fe^{2+} is uptake into BBB composed cells such as endothelial cells and pericytes. Progressing the Fe^{2+} accumulation, ROS production is gradually increased and induces oxidative stress. Then, BBB is damaged and caused hyper-permeability, which induces the migration of inflammatory factors and neuronal damage. These cascades ultimately induce secondary brain injury.

マウス及びラットの脳出血モデルを用いて種々の鉄キレート剤や抗酸化剤の保護作用が報告されている (67, 125, 156)。本検討でも鉄キレート剤の一種である BP は、ヘミン注入脳出血に対して神経症状の悪化を抑制した。しかし、Caliaperumal J.らの報告では BP の保護作用が認められなかったという報告もあるため (157)、鉄キレート剤の有効性に関しては未だ議論の余地がある。In vivo 及び in vitro ヘミン誘発性障害モデルに鉄キレート剤 BP が有効であったことから、ドラッグリポジショニングの観点よりすでに臨床応用されている鉄キレート剤の脳出血病態後の神経障害における有効性を検討した。デフェラシロクス (DFR) は、輸血時の慢性鉄過剰症に対して承認されている三価鉄のキレート剤である。脳出血を対象とした基礎研究では同じ三価鉄の鉄キレート剤であるデフェロキサミンが頻繁に使用されている (158)。デフェロキサミンは点滴静注または筋肉注射で用いられ半減期は 5~10 分と短い、DFR は経口投与を目的として設計されているため半減期が 8~20 時間と長く、三価への選択性が高いが低いことが特徴である (141-143)。脳虚血病態においては、DFR 投与により梗塞巣が縮小したが (159)、脳出血における影響は不明である。本検討では、DFR によりヘミン処置後の神経細胞内 Fe^{2+} 蓄積が抑制された (Fig. 63)。DFR は三価鉄キレート剤であるため、ヘミンが内包する三価鉄自体を細胞内外で二価に還元される前にキレートした可能性が考えられる。また、DFR によりヘミン処置後の神経細胞死は抑制され (Fig. 64C)、ヘミン処置から時間経過後に DFR を使用した際にも細胞死抑制作用は認められた (Fig. 64D)。したがって、DFR は Fe^{2+} 蓄積を抑制することによりヘミンによって誘発される細胞死を抑制したことが考えられ、鉄の蓄積が進行した場合においても、その細胞保護作用が発揮される可能性が考えられる。一方、DFR の 24 時間単独処置により軽度ではあるが神経細胞死が誘発されたことから、過度な条件における DFR 処置は正常細胞内の鉄を枯渇させ毒性を示す可能性があり、最適な投与条件の検討が必要である。DFR の保護作用機序としては、ROS 産生量の亢進を抑制したことによる脂質過酸化

物産生の抑制が挙げられる (Fig. 65A、B)。脂質過酸化物の産生亢進は ferroptosis を引き起こし、細胞死を誘発する (69, 125)。興味深いことに、酸化ストレスモデルである H_2O_2 処置に対しても DFR の併用は細胞保護作用を示した (Fig. 65C)。これらの結果は、DFR が細胞内の Fe^{2+} 蓄積を抑制することで、Fenton 反応による Fe^{2+} を介したラジカル産生と酸化ストレスの誘発を抑制したと推察される。ヘミン処置後の神経細胞では、鉄貯蔵タンパク質の Ferritin やオートファジーに関連する LC3 並びに p62、アポトーシスマーカー (PARP、caspase3)、そしてストレス応答因子である p38 のリン酸化が増加し、DFR はそれらの増加を抑制した (Fig. 66)。細胞への鉄やヘミン負荷により LC3 及び p62 の増加が起こる (160, 161)。これらのオートファジー関連因子の増加は、鉄蓄積に伴って細胞内で増加した Ferritin が原因であると報告されている (162)。脳出血患者においても LC3 や Beclin だけでなく Ferritin が重症度に応じて増加することが報告されている (137, 163)。鉄キレート剤投与により LC3 の増加とオートファジーの亢進が抑制されることから (164)、本検討においても、DFR は鉄蓄積の抑制によりオートファジーを抑制した可能性が考えられる。また、鉄の蓄積によって増加した ROS は、p38 を含む MPAK 経路を介してオートファジーやアポトーシスを誘発することが報告されている (48, 49, 165)。これらの報告より、DFR は細胞内の鉄蓄積とその後の ROS 産生亢進を抑制することにより、オートファジーやアポトーシスを抑制し、神経細胞保護作用を示した可能性が考えられる。*In vivo* 脳出血モデルを用いて DFR が亜急性期までの神経症状に及ぼす影響を検討した結果、脳室内への DFR 単回投与は血腫の大きさには影響を及ぼすことなく、7 日後までの神経症状を抑制した (Fig. 67)。血腫量の縮小は、脳内圧の亢進を緩和し神経細胞への物理的圧迫を改善する (脳卒中ガイドライン 2015)。しかしながら、DFR は血腫自体には影響を及ぼさなかったため、DFR の保護作用は、本章における *in vitro* の実験で明らかになった抗酸化ストレス作用やアポトーシス抑制作用、並びに細胞内 Fe^{2+} 蓄積抑制作用が関与すると考えられる

(Fig. 69)。そのため、発症から一定時間が経過して発生する二次障害にも十分な作用が期待できる可能性がある。

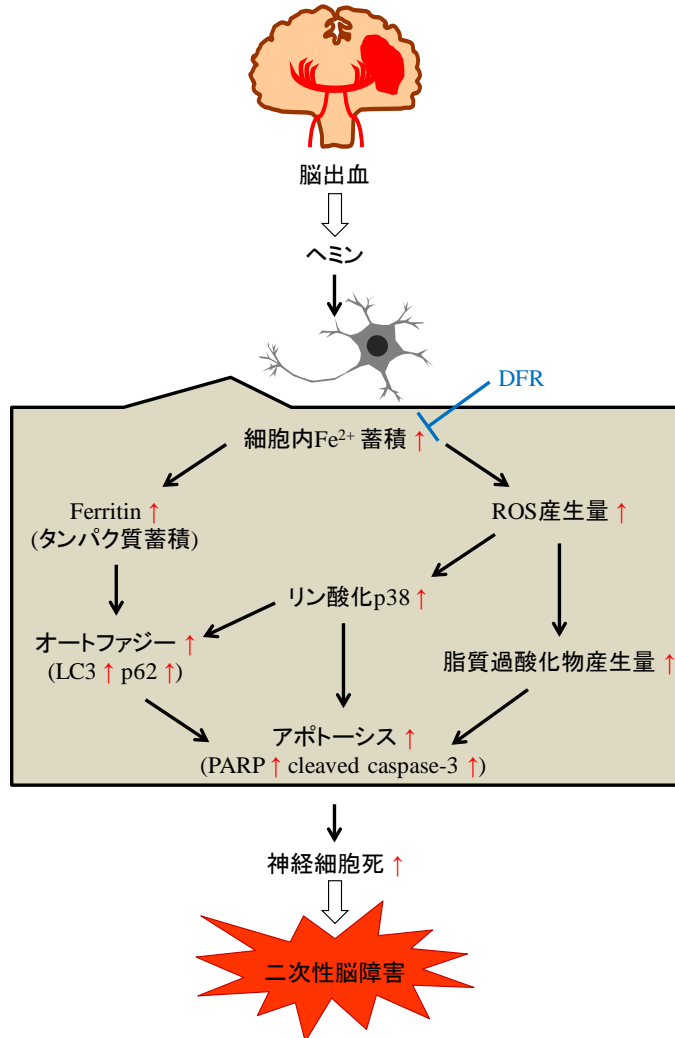


Fig. 69 DFR attenuated the neuronal cell damage via suppressing Fe^{2+} accumulation and oxidative stress.

After ICH, hemin is appeared surrounding the hematoma. Hemin is uptaken into the cell and induces intracellular Fe^{2+} accumulation, which ultimately leads to neuronal cell death via autophagy and apoptosis. DFR treatment suppressed the intracellular Fe^{2+} accumulation and ROS over-production, which prevented the several harmful pathways such as autophagy and apoptosis. In summary, DFR treatment may be novel therapy for secondary brain injury after ICH.

本章では、BBB 構成細胞や神経細胞における Fe^{2+} の細胞内蓄積が脳出血後の二次障害を引き起こす一因であることを明らかにした。加えて、二価鉄キレート BP や三価鉄キレート剤 DFR の投与により、細胞内鉄蓄積を制御することで、脳出血後の BBB 透過性の亢進や続発する神経症状の悪化を抑制できることを明らかにした。

総括及び結論

脳梗塞や脳出血、くも膜下出血を代表とする脳卒中は、2017年の調べでは日本人の死因の第4位を占める疾患であり、その死亡者数は年間約13万人に及び、寝たきり原因の第1位を占めている。脳卒中は主に加齢や基礎疾患が原因で血管に異常が起こることで発症するため、今後超高齢社会を迎える本邦において、患者数が増加すると予想される。また、一命をとりとめた場合も、片麻痺や高次機能障害などの重度の後遺症を残すことが多いことから、要介護となるため、患者本人だけでなく家族への負担も大きい重篤な疾患である。脳卒中の治療は発症予防・急性期治療・慢性期の再発防止からなり、外科的手術や降圧薬による血圧管理、抗凝固薬による血栓予防などの対症療法に頼る場合が多く、急性期治療に応用される脳保護薬はエダラボンである。しかし、そのエダラボンも腎障害や感染症などの副作用の懸念があり、新規治療薬の開発が望まれている。

本研究では、脳梗塞や脳出血などの脳卒中における病態解明と新規治療薬の探索を目的に、*in vitro* 及び *in vivo* において各種脳卒中病態モデルを作製し、フリーラジカル捕捉薬や Nrf2 活性化薬を用いて酸化ストレスに対する薬効評価を行った。さらに、酸化ストレスを惹起する ROS の供給源として、鉄の蓄積に着目し、BBB 構造や神経細胞における鉄蓄積と脳卒中病態の関係性を解明するために、鉄を含む血液成分の細胞毒性の評価や、それらに対する鉄キレート剤の保護作用に関する検討を行った。

第1章では、*in vitro* H₂O₂ 誘発神経細胞障害モデル並びにマウス脳梗塞及び脳出血モデルを用いて、フリーラジカル捕捉薬 NSP-116 の保護作用を検討した。

- 1) H₂O₂ 誘発性ヒト神経芽細胞種 (SHSY5Y cells) 障害モデルにおいて、NSP-116 は細胞死、ミトコンドリアの異常並びにアポトーシスの誘導を抑制した。

- 2) マウス中大脳動脈閉塞性脳梗塞モデルにおいて、NSP-116 の経口投与は再灌流後の脳血流量を増加させ、神経症状の悪化や梗塞巣の拡大を抑制した。
- 3) マウスコラゲナーゼ注入脳出血モデルにおいて、NSP-116 の経口投与は血腫の拡大を抑制し、神経症状の悪化を抑制した。

第 2 章では、脳虚血再灌流後の重篤な出血性梗塞を模したマウスモデル及び血液注入によるマウス脳出血モデルを用いて、脳毛細血管内皮細胞、ペリサイト、神経細胞に対する Nrf2 活性化薬 BARD または RS9 の保護作用を検討した。

- 1) 再灌流時の BARD 投与は、梗塞巣に影響を及ぼすことなく出血量を減少した。
- 2) BARD 投与は、出血性梗塞発症 4 日後以降に生じる神経症状の悪化を抑制した。
- 3) BARD 投与は、BBB 透過性の亢進を抑制した。
- 4) BARD 投与は、梗塞領域に存在する血管内皮細胞やペリサイトに、Nrf2 を高発現させ、ZO-1、claudin-5 及び VE-cadherin の結合因子の発現低下を抑制した。
- 5) 脳出血誘導後の RS9 頻回投与は、HO-1 などの抗酸化ストレス酵素の発現を増強し、脳浮腫や神経症状の悪化を抑制した。

第 3 章では、血腫から放出される Hb やその代謝産物が BBB 及び神経細胞に及ぼす影響、並びに *in vitro* 及び *in vivo* マウス脳出血モデルに対して鉄キレート剤であるビピリジル (BP) やデフェラシロクス (DFR) の作用を検討した。

- 1) ヒト脳毛細血管内皮細胞やペリサイトにおいて、Hb 処置は細胞内 Fe²⁺ の蓄積を誘発させた。その結果、細胞内 ROS 産生量の増加を介した細胞障害が誘発された。
- 2) BBB 構成細胞における細胞内 Fe²⁺ の蓄積と細胞死誘発の間には正の相関が認

められた。

- 3) Hb の中間代謝産物であるヘミンは、細胞内 ROS 産生量の亢進を介して、BBB 構成細胞に障害を与え、血管内皮細胞が構築するバリアー機能を低下させた。
- 4) マウス脳実質組織へのヘミン注入は、血管内皮細胞及びペリサイトの細胞内における鉄の蓄積を増加させ、BBB 透過性の亢進と神経症状を誘発した。
- 5) マウスヘミン脳内注入モデルにおいて、二価鉄キレート剤 BP の頻回腹腔内投与は、神経症状の悪化を抑制した。
- 6) *In vitro* ヘミン誘発性 SHSY5Y 細胞障害モデルにおいて、三価鉄キレート剤 DFR は、 Fe^{2+} の細胞内蓄積を抑制し、細胞死や ROS 及び脂質過酸化物の産生亢進を抑制した。
- 7) *In vitro* ヘミン誘発性細胞障害モデルにおいて、DFR はオートファジーやアポトーシスの誘発を抑制した。
- 8) マウスコラゲナーゼ注入脳出血モデルにおいて、出血誘導直後の DFR 脳室内投与は血腫の形成には影響を及ぼすことなく、注入 7 日後までの神経症状の悪化を抑制した。

以上より、各種薬剤投与によってフリーラジカルの捕捉や Nrf2 の活性化を介して、酸化ストレスを減弱させることは、脳卒中病態における細胞障害やその後の BBB 透過性亢進、神経症状の悪化の抑制につながることを明らかにした。加えて、細胞内 Fe^{2+} の蓄積が、病態下での細胞内 ROS の過剰産生を促進し、酸化ストレスを助長することが明らかになった。BP や DFR などの鉄キレート剤の適用は、脳卒中病態における新規治療戦略の一つとなることが示唆された。

謝辞

本稿を終えるに臨み、本研究を行うにあたり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。

本研究に際して終始御懇切なる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、並びに同講師 中村信介博士に深謝いたします。また、御協力と御助言をいただきました岐阜薬科大学 生体機能解析学大講座 薬効解析学研究室諸氏に心から感謝の意を表します。

本論文の審査にあたり有益なる御指導・御助言を賜りました岐阜薬科大学 医療薬剤学大講座 薬物治療学研究室教授 保住功博士、機能分子学大講座 薬理学研究室教授 檜井栄一博士、並びに医療薬剤学大講座 臨床薬剤学研究室講師 神谷哲朗博士に深謝致します。

また、本研究の遂行にあたり、御支援並びに実験試薬の御提供を賜りました岐阜薬科大学 創薬化学大講座 薬化学研究室教授 永澤秀子博士、同准教授 平山祐博士、日本曹達株式会社 内田誠一様、第一三共株式会社 中神康裕博士に心から感謝の意を表します。

引用文献

1. Avan, A., Digaleh, H., Di Napoli, M., Stranges, S., Behrouz, R., Shojaeianbabaee, G., Amiri, A., Tabrizi, R., Mokhber, N., Spence, J. D., and Azarpazhooh, M. R. (2019) Socioeconomic status and stroke incidence, prevalence, mortality, and worldwide burden: an ecological analysis from the Global Burden of Disease Study 2017. *BMC medicine* **17**, 191
2. Mori, H., Ukai, H., Yamamoto, H., Saitou, S., Hirao, K., Yamauchi, M., and Umemura, S. (2006) Current status of antihypertensive prescription and associated blood pressure control in Japan. *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension* **29**, 143-151
3. Nakano, M., Eguchi, K., Sato, T., Onoguchi, A., Hoshide, S., and Kario, K. (2016) Effect of Intensive Salt-Restriction Education on Clinic, Home, and Ambulatory Blood Pressure Levels in Treated Hypertensive Patients During a 3-Month Education Period. *Journal of clinical hypertension* **18**, 385-392
4. Ueshima, H. (2007) Explanation for the Japanese paradox: prevention of increase in coronary heart disease and reduction in stroke. *Journal of atherosclerosis and thrombosis* **14**, 278-286
5. Cui, R., Iso, H., Yamagishi, K., Saito, I., Kokubo, Y., Inoue, M., Tsugane, S., and Group, J. S. (2012) High serum total cholesterol levels is a risk factor of ischemic stroke for general Japanese population: the JPHC study. *Atherosclerosis* **221**, 565-569
6. Donnan, G. A., Fisher, M., Macleod, M., and Davis, S. M. (2008) Stroke. *Lancet* **371**, 1612-1623
7. Palomares, S. M., and Cipolla, M. J. (2011) Vascular Protection Following Cerebral Ischemia and Reperfusion. *J Neurol Neurophysiol* **2011**, S1-004
8. Powers, W. J., Rabinstein, A. A., Ackerson, T., Adeoye, O. M., Bambakidis, N. C., Becker, K., Biller, J., Brown, M., Demaerschalk, B. M., Hoh, B., Jauch, E. C., Kidwell, C. S., Leslie-Mazwi, T. M., Ovbiagele, B., Scott, P. A., Sheth, K. N., Southerland, A. M., Summers, D. V., Tirschwell, D. L., and American Heart Association Stroke, C. (2018) 2018 Guidelines for the Early Management of Patients With Acute Ischemic Stroke: A Guideline for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* **49**, e46-e110
9. Suzuki, Y. (2010) Role of tissue-type plasminogen activator in ischemic stroke. *J Pharmacol Sci* **113**, 203-207
10. Lees, K. R., Bluhmki, E., von Kummer, R., Brott, T. G., Toni, D., Grotta, J. C., Albers, G. W., Kaste, M., Marler, J. R., Hamilton, S. A., Tilley, B. C., Davis, S. M., Donnan, G. A., Hacke, W., Ecass, A. N., Group, E. r.-P. S., Allen, K., Mau, J., Meier, D., del Zoppo, G., De Silva, D. A., Butcher, K. S., Parsons, M. W., Barber, P. A., Levi, C., Bladin, C., and Byrnes, G. (2010) Time to treatment with intravenous alteplase and outcome in stroke: an updated pooled analysis of ECASS, ATLANTIS, NINDS, and EPITHET trials. *Lancet* **375**, 1695-1703

11. Fukuhara, M., Arima, H., Ninomiya, T., Hata, J., Yonemoto, K., Doi, Y., Hirakawa, Y., Matsumura, K., Kitazono, T., and Kiyohara, Y. (2012) Impact of lower range of prehypertension on cardiovascular events in a general population: the Hisayama Study. *Journal of hypertension* **30**, 893-900
12. Lammie, G. A. (2002) Hypertensive cerebral small vessel disease and stroke. *Brain pathology* **12**, 358-370
13. Tapia, J. F., Kase, C. S., Sawyer, R. H., and Mohr, J. P. (1983) Hypertensive putaminal hemorrhage presenting as pure motor hemiparesis. *Stroke* **14**, 505-506
14. Ojemann, R. G., and Heros, R. C. (1983) Spontaneous brain hemorrhage. *Stroke* **14**, 468-475
15. Arboix, A., Comes, E., Garcia-Eroles, L., Massons, J., Oliveres, M., Balcells, M., and Targa, C. (2002) Site of bleeding and early outcome in primary intracerebral hemorrhage. *Acta neurologica Scandinavica* **105**, 282-288
16. Carvey, P. M., Hendey, B., and Monahan, A. J. (2009) The blood-brain barrier in neurodegenerative disease: a rhetorical perspective. *Journal of neurochemistry* **111**, 291-314
17. Obermeier, B., Daneman, R., and Ransohoff, R. M. (2013) Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier. *Nature medicine* **19**, 1584-1596
18. Sandoval, K. E., and Witt, K. A. (2008) Blood-brain barrier tight junction permeability and ischemic stroke. *Neurobiology of disease* **32**, 200-219
19. Armulik, A., Genove, G., Mae, M., Nisancioglu, M. H., Wallgard, E., Niaudet, C., He, L., Norlin, J., Lindblom, P., Strittmatter, K., Johansson, B. R., and Betsholtz, C. (2010) Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature* **468**, 557-561
20. Villasenor, R., Kuennecke, B., Ozmen, L., Ammann, M., Kugler, C., Gruninger, F., Loetscher, H., Freskgard, P. O., and Collin, L. (2017) Region-specific permeability of the blood-brain barrier upon pericyte loss. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **37**, 3683-3694
21. Kriz, J. (2006) Inflammation in ischemic brain injury: timing is important. *Critical reviews in neurobiology* **18**, 145-157
22. Siesjo, B. K., and Siesjo, P. (1996) Mechanisms of secondary brain injury. *European journal of anaesthesiology* **13**, 247-268
23. Wang, J., and Dore, S. (2007) Inflammation after intracerebral hemorrhage. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **27**, 894-908
24. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., and Telser, J. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* **39**, 44-84
25. Puig, B., Brenna, S., and Magnus, T. (2018) Molecular Communication of a Dying Neuron in

- Stroke. *Int J Mol Sci* **19**, 2834
26. del Zoppo, G. J. (2012) Aging and the neurovascular unit. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1268**, 127-133
 27. Nour, M., Scalzo, F., and Liebeskind, D. S. (2013) Ischemia-reperfusion injury in stroke. *Interventional neurology* **1**, 185-199
 28. Gurses-Ozdemir, Y., Can, A., and Dalkara, T. (2004) Reperfusion-induced oxidative/nitrate injury to neurovascular unit after focal cerebral ischemia. *Stroke* **35**, 1449-1453
 29. Chan, P. H. (1996) Role of oxidants in ischemic brain damage. *Stroke* **27**, 1124-1129
 30. Duan, X., Wen, Z., Shen, H., Shen, M., and Chen, G. (2016) Intracerebral Hemorrhage, Oxidative Stress, and Antioxidant Therapy. *Oxidative medicine and cellular longevity* **2016**, 1203285
 31. Yamaguchi, T., Awano, H., Matsuda, H., Tanahashi, N., and Investigators, P. (2017) Edoxaban with and without 0.6 Mg/kg Alteplase within 4.5 Hours after Ischemic Stroke: A Prospective Cohort Study (PROTECT4.5). *Journal of stroke and cerebrovascular diseases : the official journal of National Stroke Association* **26**, 756-765
 32. Ishibashi, A., Yoshitake, Y., and Adachi, H. (2013) Investigation of effect of edoxaban on ischemic stroke. *Kurume Med J* **60**, 53-57
 33. Lees, K. R., Zivin, J. A., Ashwood, T., Davalos, A., Davis, S. M., Diener, H. C., Grotta, J., Lyden, P., Shuaib, A., Hardemark, H. G., Wasiewski, W. W., and Stroke-Acute Ischemic, N. X. Y. T. T. I. (2006) NXY-059 for acute ischemic stroke. *The New England journal of medicine* **354**, 588-600
 34. Zhang, J., Yang, J., Zhang, C., Jiang, X., Zhou, H., and Liu, M. (2012) Calcium antagonists for acute ischemic stroke. *Cochrane Database Syst Rev*, CD001928
 35. Ehrenreich, H., Weissenborn, K., Prange, H., Schneider, D., Weimar, C., Wartenberg, K., Schellinger, P. D., Bohn, M., Becker, H., Wegryzn, M., Jahnig, P., Herrmann, M., Knauth, M., Bahr, M., Heide, W., Wagner, A., Schwab, S., Reichmann, H., Schwendemann, G., Dengler, R., Kastrup, A., Bartels, C., and Group, E. P. O. S. T. (2009) Recombinant human erythropoietin in the treatment of acute ischemic stroke. *Stroke* **40**, e647-656
 36. Sun, M. S., Jin, H., Sun, X., Huang, S., Zhang, F. L., Guo, Z. N., and Yang, Y. (2018) Free Radical Damage in Ischemia-Reperfusion Injury: An Obstacle in Acute Ischemic Stroke after Revascularization Therapy. *Oxidative medicine and cellular longevity* **2018**, 3804979
 37. Eltzschig, H. K., and Eckle, T. (2011) Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation. *Nature medicine* **17**, 1391-1401
 38. Wada, T., Yasunaga, H., Inokuchi, R., Horiguchi, H., Fushimi, K., Matsubara, T., Nakajima, S., and Yahagi, N. (2014) Effects of edoxaban on early outcomes in acute ischemic stroke patients treated with recombinant tissue plasminogen activator. *Journal of the neurological sciences* **345**, 106-111

39. Edaravone Acute Infarction Study, G. (2003) Effect of a novel free radical scavenger, edaravone (MCI-186), on acute brain infarction. Randomized, placebo-controlled, double-blind study at multicenters. *Cerebrovasc Dis* **15**, 222-229
40. Izawa, H., Shimazawa, M., Inoue, Y., Uchida, S., Moroe, H., Tsuruma, K., and Hara, H. (2016) Protective effects of NSP-116, a novel imidazolyl aniline derivative, against light-induced retinal damage in vitro and in vivo. *Free radical biology & medicine* **96**, 304-312
41. Takagi, T., Imai, T., Mishiro, K., Ishisaka, M., Tsujimoto, M., Ito, H., Nagashima, K., Matsukawa, H., Tsuruma, K., Shimazawa, M., Yoshimura, S., Kozawa, O., Iwama, T., and Hara, H. (2017) Cilostazol ameliorates collagenase-induced cerebral hemorrhage by protecting the blood-brain barrier. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **37**, 123-139
42. Hara, H., Friedlander, R. M., Gagliardini, V., Ayata, C., Fink, K., Huang, Z., Shimizu-Sasamata, M., Yuan, J., and Moskowitz, M. A. (1997) Inhibition of interleukin 1beta converting enzyme family proteases reduces ischemic and excitotoxic neuronal damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 2007-2012
43. Kotani, Y., Nakajima, Y., Hasegawa, T., Satoh, M., Nagase, H., Shimazawa, M., Yoshimura, S., Iwama, T., and Hara, H. (2008) Propofol exerts greater neuroprotection with disodium edetate than without it. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **28**, 354-366
44. Garcia, J. H., Wagner, S., Liu, K. F., and Hu, X. J. (1995) Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. Statistical validation. *Stroke* **26**, 627-634; discussion 635
45. Rosenberg, G. A., Mun-Bryce, S., Wesley, M., and Kornfeld, M. (1990) Collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rats. *Stroke* **21**, 801-807
46. Benjamin, E. J., Blaha, M. J., Chiuve, S. E., Cushman, M., Das, S. R., Deo, R., de Ferranti, S. D., Floyd, J., Fornage, M., Gillespie, C., Isasi, C. R., Jimenez, M. C., Jordan, L. C., Judd, S. E., Lackland, D., Lichtman, J. H., Lisabeth, L., Liu, S., Longenecker, C. T., Mackey, R. H., Matsushita, K., Mozaffarian, D., Mussolino, M. E., Nasir, K., Neumar, R. W., Palaniappan, L., Pandey, D. K., Thiagarajan, R. R., Reeves, M. J., Ritchey, M., Rodriguez, C. J., Roth, G. A., Rosamond, W. D., Sasson, C., Towfighi, A., Tsao, C. W., Turner, M. B., Virani, S. S., Voeks, J. H., Willey, J. Z., Wilkins, J. T., Wu, J. H., Alger, H. M., Wong, S. S., Muntner, P., American Heart Association Statistics, C., and Stroke Statistics, S. (2017) Heart Disease and Stroke Statistics-2017 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* **135**, e146-e603
47. Chen, X., Guo, C., and Kong, J. (2012) Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Neural*

- regeneration research* **7**, 376-385
48. Ruffels, J., Griffin, M., and Dickenson, J. M. (2004) Activation of ERK1/2, JNK and PKB by hydrogen peroxide in human SH-SY5Y neuroblastoma cells: role of ERK1/2 in H₂O₂-induced cell death. *European journal of pharmacology* **483**, 163-173
 49. Wang, X., Martindale, J. L., Liu, Y., and Holbrook, N. J. (1998) The cellular response to oxidative stress: influences of mitogen-activated protein kinase signalling pathways on cell survival. *The Biochemical journal* **333 (Pt 2)**, 291-300
 50. Cipolla, M. J., McCall, A. L., Lessov, N., and Porter, J. M. (1997) Reperfusion decreases myogenic reactivity and alters middle cerebral artery function after focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* **28**, 176-180
 51. Sena, C. M., Leandro, A., Azul, L., Seica, R., and Perry, G. (2018) Vascular Oxidative Stress: Impact and Therapeutic Approaches. *Front Physiol* **9**, 1668
 52. Wang, D., Liu, Y., Lu, P., Zhu, D., and Zhu, Y. (2016) 15-oxo-ETE-induced internal carotid artery constriction in hypoxic rats is mediated by potassium channels. *Physiol Res* **65**, 391-399
 53. Hernandez-Resendiz, S., Munoz-Vega, M., Contreras, W. E., Crespo-Avilan, G. E., Rodriguez-Montesinos, J., Arias-Carrion, O., Perez-Mendez, O., Boisvert, W. A., Preissner, K. T., and Cabrera-Fuentes, H. A. (2018) Responses of Endothelial Cells Towards Ischemic Conditioning Following Acute Myocardial Infarction. *Cond Med* **1**, 247-258
 54. Deguchi, K., Liu, N., Liu, W., Omote, Y., Kono, S., Yunoki, T., Deguchi, S., Yamashita, T., Ikeda, Y., and Abe, K. (2014) Pericyte protection by edaravone after tissue plasminogen activator treatment in rat cerebral ischemia. *J Neurosci Res* **92**, 1509-1519
 55. Nonaka, Y., Shimazawa, M., Yoshimura, S., Iwama, T., and Hara, H. (2008) Combination effects of normobaric hyperoxia and edaravone on focal cerebral ischemia-induced neuronal damage in mice. *Neuroscience letters* **441**, 224-228
 56. Beker, M. C., Caglayan, A. B., Kelestemur, T., Caglayan, B., Yalcin, E., Yulug, B., Kilic, U., Hermann, D. M., and Kilic, E. (2015) Effects of normobaric oxygen and melatonin on reperfusion injury: role of cerebral microcirculation. *Oncotarget* **6**, 30604-30614
 57. Hossmann, K. A. (2012) The two pathophysiologies of focal brain ischemia: implications for translational stroke research. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **32**, 1310-1316
 58. Choi, K. H., Kim, H. S., Park, M. S., Lee, E. B., Lee, J. K., Kim, J. T., Kim, J. H., Lee, M. C., Lee, H. J., and Cho, K. H. (2016) Overexpression of caveolin-1 attenuates brain edema by inhibiting tight junction degradation. *Oncotarget* **7**, 67857-67867
 59. Krueger, M., Mages, B., Hobusch, C., and Michalski, D. (2019) Endothelial edema precedes blood-brain barrier breakdown in early time points after experimental focal cerebral ischemia.

60. Shen, C. C., Huang, H. M., Ou, H. C., Chen, H. L., Chen, W. C., and Jeng, K. C. (2004) Protective effect of nicotinamide on neuronal cells under oxygen and glucose deprivation and hypoxia/reoxygenation. *Journal of biomedical science* **11**, 472-481
61. Shim, R., Wen, S. W., Wanrooy, B. J., Rank, M., Thirugnanachandran, T., Ho, L., Sepehrizadeh, T., de Veer, M., Srikanth, V. K., Ma, H., Phan, T. G., Sobey, C. G., and Wong, C. H. Y. (2019) Stroke Severity, and Not Cerebral Infarct Location, Increases the Risk of Infection. *Translational stroke research*
62. Tachibana, M., Ago, T., Wakisaka, Y., Kuroda, J., Shijo, M., Yoshikawa, Y., Komori, M., Nishimura, A., Makihara, N., Nakamura, K., and Kitazono, T. (2017) Early Reperfusion After Brain Ischemia Has Beneficial Effects Beyond Rescuing Neurons. *Stroke* **48**, 2222-2230
63. Peters, O., Back, T., Lindauer, U., Busch, C., Megow, D., Dreier, J., and Dirnagl, U. (1998) Increased formation of reactive oxygen species after permanent and reversible middle cerebral artery occlusion in the rat. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **18**, 196-205
64. Shah, F. A., Li, T., Kury, L. T. A., Zeb, A., Khatoon, S., Liu, G., Yang, X., Liu, F., Yao, H., Khan, A. U., Koh, P. O., Jiang, Y., and Li, S. (2019) Pathological Comparisons of the Hippocampal Changes in the Transient and Permanent Middle Cerebral Artery Occlusion Rat Models. *Frontiers in neurology* **10**, 1178
65. Jauch, E. C., Saver, J. L., Adams, H. P., Jr., Bruno, A., Connors, J. J., Demaerschalk, B. M., Khatri, P., McMullan, P. W., Jr., Qureshi, A. I., Rosenfield, K., Scott, P. A., Summers, D. R., Wang, D. Z., Wintermark, M., Yonas, H., American Heart Association Stroke, C., Council on Cardiovascular, N., Council on Peripheral Vascular, D., and Council on Clinical, C. (2013) Guidelines for the early management of patients with acute ischemic stroke: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* **44**, 870-947
66. Pan, J., Konstas, A. A., Bateman, B., Ortolano, G. A., and Pile-Spellman, J. (2007) Reperfusion injury following cerebral ischemia: pathophysiology, MR imaging, and potential therapies. *Neuroradiology* **49**, 93-102
67. Li, Q., Wan, J., Lan, X., Han, X., Wang, Z., and Wang, J. (2017) Neuroprotection of brain-permeable iron chelator VK-28 against intracerebral hemorrhage in mice. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **37**, 3110-3123
68. Ziai, W. C. (2013) Hematology and inflammatory signaling of intracerebral hemorrhage. *Stroke* **44**, S74-78
69. Zille, M., Karuppagounder, S. S., Chen, Y., Gough, P. J., Bertin, J., Finger, J., Milner, T. A.,

- Jonas, E. A., and Ratan, R. R. (2017) Neuronal Death After Hemorrhagic Stroke In Vitro and In Vivo Shares Features of Ferroptosis and Necroptosis. *Stroke* **48**, 1033-1043
70. Pun, P. B., Lu, J., and Moochhala, S. (2009) Involvement of ROS in BBB dysfunction. *Free radical research* **43**, 348-364
71. Lehner, C., Gehwolf, R., Tempfer, H., Krizbai, I., Hennig, B., Bauer, H. C., and Bauer, H. (2011) Oxidative stress and blood-brain barrier dysfunction under particular consideration of matrix metalloproteinases. *Antioxidants & redox signaling* **15**, 1305-1323
72. Hacke, W., Kaste, M., Bluhmki, E., Brozman, M., Davalos, A., Guidetti, D., Larrue, V., Lees, K. R., Medeghri, Z., Machnig, T., Schneider, D., von Kummer, R., Wahlgren, N., Toni, D., and Investigators, E. (2008) Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *The New England journal of medicine* **359**, 1317-1329
73. Davis, S. M., Donnan, G. A., Parsons, M. W., Levi, C., Butcher, K. S., Peeters, A., Barber, P. A., Bladin, C., De Silva, D. A., Byrnes, G., Chalk, J. B., Fink, J. N., Kimber, T. E., Schultz, D., Hand, P. J., Frayne, J., Hankey, G., Muir, K., Gerraty, R., Tress, B. M., Desmond, P. M., and investigators, E. (2008) Effects of alteplase beyond 3 h after stroke in the Echoplanar Imaging Thrombolytic Evaluation Trial (EPITHET): a placebo-controlled randomised trial. *The Lancet. Neurology* **7**, 299-309
74. Emberson, J., Lees, K. R., Lyden, P., Blackwell, L., Albers, G., Bluhmki, E., Brott, T., Cohen, G., Davis, S., Donnan, G., Grotta, J., Howard, G., Kaste, M., Koga, M., von Kummer, R., Lansberg, M., Lindley, R. I., Murray, G., Olivot, J. M., Parsons, M., Tilley, B., Toni, D., Toyoda, K., Wahlgren, N., Wardlaw, J., Whiteley, W., del Zoppo, G. J., Baigent, C., Sandercock, P., Hacke, W., and Stroke Thrombolysis Trialists' Collaborative, G. (2014) Effect of treatment delay, age, and stroke severity on the effects of intravenous thrombolysis with alteplase for acute ischaemic stroke: a meta-analysis of individual patient data from randomised trials. *Lancet* **384**, 1929-1935
75. Lees, K. R., Emberson, J., Blackwell, L., Bluhmki, E., Davis, S. M., Donnan, G. A., Grotta, J. C., Kaste, M., von Kummer, R., Lansberg, M. G., Lindley, R. I., Lyden, P., Murray, G. D., Sandercock, P. A., Toni, D., Toyoda, K., Wardlaw, J. M., Whiteley, W. N., Baigent, C., Hacke, W., Howard, G., and Stroke Thrombolysis Trialists' Collaborators, G. (2016) Effects of Alteplase for Acute Stroke on the Distribution of Functional Outcomes: A Pooled Analysis of 9 Trials. *Stroke* **47**, 2373-2379
76. Flaherty, M. L., Tao, H., Haverbusch, M., Sekar, P., Kleindorfer, D., Kissela, B., Khatri, P., Stettler, B., Adeoye, O., Moomaw, C. J., Broderick, J. P., and Woo, D. (2008) Warfarin use leads to larger intracerebral hematomas. *Neurology* **71**, 1084-1089
77. Flaherty, M. L., Kissela, B., Woo, D., Kleindorfer, D., Alwell, K., Sekar, P., Moomaw, C. J., Haverbusch, M., and Broderick, J. P. (2007) The increasing incidence of

- anticoagulant-associated intracerebral hemorrhage. *Neurology* **68**, 116-121
78. (1993) Secondary prevention in non-rheumatic atrial fibrillation after transient ischaemic attack or minor stroke. EAFT (European Atrial Fibrillation Trial) Study Group. *Lancet* **342**, 1255-1262
 79. Hylek, E. M., Go, A. S., Chang, Y., Jensvold, N. G., Henault, L. E., Selby, J. V., and Singer, D. E. (2003) Effect of intensity of oral anticoagulation on stroke severity and mortality in atrial fibrillation. *The New England journal of medicine* **349**, 1019-1026
 80. Hart, R. G., Pearce, L. A., and Aguilar, M. I. (2007) Meta-analysis: antithrombotic therapy to prevent stroke in patients who have nonvalvular atrial fibrillation. *Annals of internal medicine* **146**, 857-867
 81. Yasaka, M., and Yamaguchi, T. (2001) Secondary prevention of stroke in patients with nonvalvular atrial fibrillation: optimal intensity of anticoagulation. *CNS drugs* **15**, 623-631
 82. Fang, M. C., Go, A. S., Chang, Y., Hylek, E. M., Henault, L. E., Jensvold, N. G., and Singer, D. E. (2007) Death and disability from warfarin-associated intracranial and extracranial hemorrhages. *The American journal of medicine* **120**, 700-705
 83. Hart, R. G., Tonarelli, S. B., and Pearce, L. A. (2005) Avoiding central nervous system bleeding during antithrombotic therapy: recent data and ideas. *Stroke* **36**, 1588-1593
 84. Taylor, J. R., and Wilt, V. M. (1999) Probable antagonism of warfarin by green tea. *The Annals of pharmacotherapy* **33**, 426-428
 85. Nutescu, E. A., Shapiro, N. L., Ibrahim, S., and West, P. (2006) Warfarin and its interactions with foods, herbs and other dietary supplements. *Expert opinion on drug safety* **5**, 433-451
 86. Inohara, T., Xian, Y., Liang, L., Matsouaka, R. A., Saver, J. L., Smith, E. E., Schwamm, L. H., Reeves, M. J., Hernandez, A. F., Bhatt, D. L., Peterson, E. D., and Fonarow, G. C. (2018) Association of Intracerebral Hemorrhage Among Patients Taking Non-Vitamin K Antagonist vs Vitamin K Antagonist Oral Anticoagulants With In-Hospital Mortality. *Jama* **319**, 463-473
 87. Connolly, S. J., Ezekowitz, M. D., Yusuf, S., Eikelboom, J., Oldgren, J., Parekh, A., Pogue, J., Reilly, P. A., Themeles, E., Varrone, J., Wang, S., Alings, M., Xavier, D., Zhu, J., Diaz, R., Lewis, B. S., Darius, H., Diener, H. C., Joyner, C. D., Wallentin, L., Committee, R.-L. S., and Investigators. (2009) Dabigatran versus warfarin in patients with atrial fibrillation. *The New England journal of medicine* **361**, 1139-1151
 88. Giugliano, R. P., Ruff, C. T., Braunwald, E., Murphy, S. A., Wiviott, S. D., Halperin, J. L., Waldo, A. L., Ezekowitz, M. D., Weitz, J. I., Spinar, J., Ruzyllo, W., Ruda, M., Koretsune, Y., Betcher, J., Shi, M., Grip, L. T., Patel, S. P., Patel, I., Hanyok, J. J., Mercuri, M., Antman, E. M., and Investigators, E. A.-T. (2013) Edoxaban versus warfarin in patients with atrial fibrillation. *The New England journal of medicine* **369**, 2093-2104
 89. Granger, C. B., Alexander, J. H., McMurray, J. J., Lopes, R. D., Hylek, E. M., Hanna, M.,

- Al-Khalidi, H. R., Ansell, J., Atar, D., Avezum, A., Bahit, M. C., Diaz, R., Easton, J. D., Ezekowitz, J. A., Flaker, G., Garcia, D., Geraldles, M., Gersh, B. J., Golitsyn, S., Goto, S., Hermosillo, A. G., Hohnloser, S. H., Horowitz, J., Mohan, P., Jansky, P., Lewis, B. S., Lopez-Sendon, J. L., Pais, P., Parkhomenko, A., Verheugt, F. W., Zhu, J., Wallentin, L., Committees, A., and Investigators. (2011) Apixaban versus warfarin in patients with atrial fibrillation. *The New England journal of medicine* **365**, 981-992
90. Patel, M. R., Mahaffey, K. W., Garg, J., Pan, G., Singer, D. E., Hacke, W., Breithardt, G., Halperin, J. L., Hankey, G. J., Piccini, J. P., Becker, R. C., Nessel, C. C., Paolini, J. F., Berkowitz, S. D., Fox, K. A., Califf, R. M., and Investigators, R. A. (2011) Rivaroxaban versus warfarin in nonvalvular atrial fibrillation. *The New England journal of medicine* **365**, 883-891
91. Tuo, Y. H., Liu, Z., Chen, J. W., Wang, Q. Y., Li, S. L., Li, M. C., Dai, G., Wang, J. S., Zhang, Y. L., Feng, L., and Shi, Z. S. (2017) NADPH oxidase inhibitor improves outcome of mechanical reperfusion by suppressing hemorrhagic transformation. *Journal of neurointerventional surgery* **9**, 492-498
92. Okamura, K., Tsubokawa, T., Johshita, H., Miyazaki, H., and Shiokawa, Y. (2014) Edaravone, a free radical scavenger, attenuates cerebral infarction and hemorrhagic infarction in rats with hyperglycemia. *Neurological research* **36**, 65-69
93. Sumii, T., and Lo, E. H. (2002) Involvement of matrix metalloproteinase in thrombolysis-associated hemorrhagic transformation after embolic focal ischemia in rats. *Stroke* **33**, 831-836
94. Ishii, T., Itoh, K., Takahashi, S., Sato, H., Yanagawa, T., Katoh, Y., Bannai, S., and Yamamoto, M. (2000) Transcription factor Nrf2 coordinately regulates a group of oxidative stress-inducible genes in macrophages. *The Journal of biological chemistry* **275**, 16023-16029
95. Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T., Igarashi, K., Engel, J. D., and Yamamoto, M. (1999) Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes & development* **13**, 76-86
96. Kobayashi, A., Kang, M. I., Okawa, H., Ohtsuji, M., Zenke, Y., Chiba, T., Igarashi, K., and Yamamoto, M. (2004) Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Molecular and cellular biology* **24**, 7130-7139
97. Holtzclaw, W. D., Dinkova-Kostova, A. T., and Talalay, P. (2004) Protection against electrophile and oxidative stress by induction of phase 2 genes: the quest for the elusive sensor that responds to inducers. *Advances in enzyme regulation* **44**, 335-367
98. Zhang, M., An, C., Gao, Y., Leak, R. K., Chen, J., and Zhang, F. (2013) Emerging roles of Nrf2 and phase II antioxidant enzymes in neuroprotection. *Progress in neurobiology* **100**, 30-47
99. Bompreszi, R. (2015) Dimethyl fumarate in the treatment of relapsing-remitting multiple

- sclerosis: an overview. *Therapeutic advances in neurological disorders* **8**, 20-30
100. Macaron, G., Feng, J., Moodley, M., and Rensel, M. (2019) Newer Treatment Approaches in Pediatric-Onset Multiple Sclerosis. *Current treatment options in neurology* **21**, 50
 101. Zhao, J., Kobori, N., Aronowski, J., and Dash, P. K. (2006) Sulforaphane reduces infarct volume following focal cerebral ischemia in rodents. *Neuroscience letters* **393**, 108-112
 102. Yang, C., Zhang, X., Fan, H., and Liu, Y. (2009) Curcumin upregulates transcription factor Nrf2, HO-1 expression and protects rat brains against focal ischemia. *Brain research* **1282**, 133-141
 103. Shih, A. Y., Li, P., and Murphy, T. H. (2005) A small-molecule-inducible Nrf2-mediated antioxidant response provides effective prophylaxis against cerebral ischemia in vivo. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **25**, 10321-10335
 104. Yates, M. S., Tauchi, M., Katsuoka, F., Flanders, K. C., Liby, K. T., Honda, T., Gribble, G. W., Johnson, D. A., Johnson, J. A., Burton, N. C., Guilarte, T. R., Yamamoto, M., Sporn, M. B., and Kensler, T. W. (2007) Pharmacodynamic characterization of chemopreventive triterpenoids as exceptionally potent inducers of Nrf2-regulated genes. *Molecular cancer therapeutics* **6**, 154-162
 105. Dinkova-Kostova, A. T., Liby, K. T., Stephenson, K. K., Holtzclaw, W. D., Gao, X., Suh, N., Williams, C., Risingsong, R., Honda, T., Gribble, G. W., Sporn, M. B., and Talalay, P. (2005) Extremely potent triterpenoid inducers of the phase 2 response: correlations of protection against oxidant and inflammatory stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 4584-4589
 106. Sporn, M. B., Liby, K. T., Yore, M. M., Fu, L., Lopchuk, J. M., and Gribble, G. W. (2011) New synthetic triterpenoids: potent agents for prevention and treatment of tissue injury caused by inflammatory and oxidative stress. *Journal of natural products* **74**, 537-545
 107. Chin, M. P., Bakris, G. L., Block, G. A., Chertow, G. M., Goldsberry, A., Inker, L. A., Heerspink, H. J. L., O'Grady, M., Pergola, P. E., Wanner, C., Warnock, D. G., and Meyer, C. J. (2018) Bardoxolone Methyl Improves Kidney Function in Patients with Chronic Kidney Disease Stage 4 and Type 2 Diabetes: Post-Hoc Analyses from Bardoxolone Methyl Evaluation in Patients with Chronic Kidney Disease and Type 2 Diabetes Study. *American journal of nephrology* **47**, 40-47
 108. Pergola, P. E., Raskin, P., Toto, R. D., Meyer, C. J., Huff, J. W., Grossman, E. B., Krauth, M., Ruiz, S., Audhya, P., Christ-Schmidt, H., Wittes, J., Warnock, D. G., and Investigators, B. S. (2011) Bardoxolone methyl and kidney function in CKD with type 2 diabetes. *The New England journal of medicine* **365**, 327-336
 109. Takagi, T., Kitashoji, A., Iwawaki, T., Tsuruma, K., Shimazawa, M., Yoshimura, S., Iwama, T., and Hara, H. (2014) Temporal activation of Nrf2 in the penumbra and Nrf2

- activator-mediated neuroprotection in ischemia-reperfusion injury. *Free radical biology & medicine* **72**, 124-133
110. Nakagami, Y., Hatano, E., Inoue, T., Yoshida, K., Kondo, M., and Terasaki, H. (2016) Cytoprotective Effects of a Novel Nrf2 Activator, RS9, in Rhodopsin Pro347Leu Rabbits. *Current eye research* **41**, 1123-1126
111. Inoue, Y., Shimazawa, M., Noda, Y., Nagano, R., Otsuka, T., Kuse, Y., Nakano, Y., Tsuruma, K., Nakagami, Y., and Hara, H. (2017) RS9, a novel Nrf2 activator, attenuates light-induced death of cells of photoreceptor cells and Muller glia cells. *Journal of neurochemistry* **141**, 750-765
112. Yamauchi, K., Nakano, Y., Imai, T., Takagi, T., Tsuruma, K., Shimazawa, M., Iwama, T., and Hara, H. (2016) A novel nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) activator RS9 attenuates brain injury after ischemia reperfusion in mice. *Neuroscience* **333**, 302-310
113. Kitashoji, A., Egashira, Y., Mishiro, K., Suzuki, Y., Ito, H., Tsuruma, K., Shimazawa, M., and Hara, H. (2013) Cilostazol ameliorates warfarin-induced hemorrhagic transformation after cerebral ischemia in mice. *Stroke* **44**, 2862-2868
114. Yasaka, M., Minematsu, K., and Yamaguchi, T. (2001) Optimal intensity of international normalized ratio in warfarin therapy for secondary prevention of stroke in patients with non-valvular atrial fibrillation. *Internal medicine* **40**, 1183-1188
115. Inoue, H., Okumura, K., Atarashi, H., Yamashita, T., Origasa, H., Kumagai, N., Sakurai, M., Kawamura, Y., Kubota, I., Matsumoto, K., Kaneko, Y., Ogawa, S., Aizawa, Y., Chinushi, M., Kodama, I., Watanabe, E., Koretsune, Y., Okuyama, Y., Shimizu, A., Igawa, O., Bando, S., Fukatani, M., Saikawa, T., Chishaki, A., and Investigators, J. R. R. (2013) Target international normalized ratio values for preventing thromboembolic and hemorrhagic events in Japanese patients with non-valvular atrial fibrillation: results of the J-RHYTHM Registry. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society* **77**, 2264-2270
116. Keep, R. F., Xiang, J., Ennis, S. R., Andjelkovic, A., Hua, Y., Xi, G., and Hoff, J. T. (2008) Blood-brain barrier function in intracerebral hemorrhage. *Acta neurochirurgica. Supplement* **105**, 73-77
117. Kuntz, M., Mysiorek, C., Petrault, O., Petrault, M., Uzbekov, R., Bordet, R., Fenart, L., Cecchelli, R., and Berezowski, V. (2014) Stroke-induced brain parenchymal injury drives blood-brain barrier early leakage kinetics: a combined in vivo/in vitro study. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **34**, 95-107
118. Nag, S. (2003) Blood-brain barrier permeability using tracers and immunohistochemistry. *Methods in molecular medicine* **89**, 133-144
119. Hara, H., Huang, P. L., Panahian, N., Fishman, M. C., and Moskowitz, M. A. (1996) Reduced

- brain edema and infarction volume in mice lacking the neuronal isoform of nitric oxide synthase after transient MCA occlusion. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **16**, 605-611
120. Zhang, L., Schallert, T., Zhang, Z. G., Jiang, Q., Arniego, P., Li, Q., Lu, M., and Chopp, M. (2002) A test for detecting long-term sensorimotor dysfunction in the mouse after focal cerebral ischemia. *Journal of neuroscience methods* **117**, 207-214
121. Tanaka, N., Ikeda, Y., Ohta, Y., Deguchi, K., Tian, F., Shang, J., Matsuura, T., and Abe, K. (2011) Expression of Keap1-Nrf2 system and antioxidative proteins in mouse brain after transient middle cerebral artery occlusion. *Brain research* **1370**, 246-253
122. Zhao, B., Shi, Q. J., Zhang, Z. Z., Wang, S. Y., Wang, X., and Wang, H. (2018) Protective effects of paeonol on subacute/chronic brain injury during cerebral ischemia in rats. *Experimental and therapeutic medicine* **15**, 3836-3846
123. Han, D., Li, S., Xiong, Q., Zhou, L., and Luo, A. (2015) Effect of Propofol on the Expression of MMP-9 and Its Relevant Inflammatory Factors in Brain of Rat with Intracerebral Hemorrhage. *Cell biochemistry and biophysics* **72**, 675-679
124. Ding, R., Feng, L., He, L., Chen, Y., Wen, P., Fu, Z., Lin, C., Yang, S., Deng, X., Zeng, J., and Sun, G. (2015) Peroxynitrite decomposition catalyst prevents matrix metalloproteinase-9 activation and neurovascular injury after hemoglobin injection into the caudate nucleus of rats. *Neuroscience* **297**, 182-193
125. Chang, C. F., Cho, S., and Wang, J. (2014) (-)-Epicatechin protects hemorrhagic brain via synergistic Nrf2 pathways. *Annals of clinical and translational neurology* **1**, 258-271
126. Zhao, X., Sun, G., Zhang, J., Ting, S. M., Gonzales, N., and Aronowski, J. (2015) Dimethyl Fumarate Protects Brain From Damage Produced by Intracerebral Hemorrhage by Mechanism Involving Nrf2. *Stroke* **46**, 1923-1928
127. Egashira, Y., Suzuki, Y., Azuma, Y., Takagi, T., Mishiro, K., Sugitani, S., Tsuruma, K., Shimazawa, M., Yoshimura, S., Kashimata, M., Iwama, T., and Hara, H. (2013) The growth factor progranulin attenuates neuronal injury induced by cerebral ischemia-reperfusion through the suppression of neutrophil recruitment. *Journal of neuroinflammation* **10**, 105
128. Tan, Z., Turner, R. C., Leon, R. L., Li, X., Hongpaisan, J., Zheng, W., Logsdon, A. F., Naser, Z. J., Alkon, D. L., Rosen, C. L., and Huber, J. D. (2013) Bryostatins improves survival and reduces ischemic brain injury in aged rats after acute ischemic stroke. *Stroke* **44**, 3490-3497
129. Cordonnier, C., Demchuk, A., Ziai, W., and Anderson, C. S. (2018) Intracerebral haemorrhage: current approaches to acute management. *Lancet* **392**, 1257-1268
130. Wagner, K. R., Sharp, F. R., Ardizzone, T. D., Lu, A., and Clark, J. F. (2003) Heme and iron metabolism: role in cerebral hemorrhage. *Journal of cerebral blood flow and metabolism :*

- official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **23**, 629-652
131. Chiabrando, D., Mercurio, S., and Tolosano, E. (2014) Heme and erythropoiesis: more than a structural role. *Haematologica* **99**, 973-983
 132. Marengo-Rowe, A. J. (2006) Structure-function relations of human hemoglobins. *Proceedings* **19**, 239-245
 133. Perutz, M. F. (1969) Structure and function of hemoglobin. *Harvey lectures* **63**, 213-261
 134. Wolonciej, M., Milewska, E., and Roszkowska-Jakimiec, W. (2016) Trace elements as an activator of antioxidant enzymes. *Postepy higieny i medycyny doswiadczalnej* **70**, 1483-1498
 135. Wu, J., Hua, Y., Keep, R. F., Nakamura, T., Hoff, J. T., and Xi, G. (2003) Iron and iron-handling proteins in the brain after intracerebral hemorrhage. *Stroke* **34**, 2964-2969
 136. Min, H., Choi, B., Jang, Y. H., Cho, I. H., and Lee, S. J. (2017) Heme molecule functions as an endogenous agonist of astrocyte TLR2 to contribute to secondary brain damage after intracerebral hemorrhage. *Molecular brain* **10**, 27
 137. Yang, G., Hu, R., Zhang, C., Qian, C., Luo, Q. Q., Yung, W. H., Ke, Y., Feng, H., and Qian, Z. M. (2016) A combination of serum iron, ferritin and transferrin predicts outcome in patients with intracerebral hemorrhage. *Scientific reports* **6**, 21970
 138. Wang, G., Hu, W., Tang, Q., Wang, L., Sun, X. G., Chen, Y., Yin, Y., Xue, F., and Sun, Z. (2016) Effect Comparison of Both Iron Chelators on Outcomes, Iron Deposit, and Iron Transporters After Intracerebral Hemorrhage in Rats. *Molecular neurobiology* **53**, 3576-3585
 139. Selim, M., Foster, L. D., Moy, C. S., Xi, G., Hill, M. D., Morgenstern, L. B., Greenberg, S. M., James, M. L., Singh, V., Clark, W. M., Norton, C., Palesch, Y. Y., Yeatts, S. D., and i, D. E. F. I. (2019) Deferoxamine mesylate in patients with intracerebral haemorrhage (i-DEF): a multicentre, randomised, placebo-controlled, double-blind phase 2 trial. *The Lancet. Neurology* **18**, 428-438
 140. Petrat, F., de Groot, H., and Rauen, U. (2000) Determination of the chelatable iron pool of single intact cells by laser scanning microscopy. *Archives of biochemistry and biophysics* **376**, 74-81
 141. (2012) Chelating Agents. In *LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury*, Bethesda (MD)
 142. Liu, J. L., Fan, Y. G., Yang, Z. S., Wang, Z. Y., and Guo, C. (2018) Iron and Alzheimer's Disease: From Pathogenesis to Therapeutic Implications. *Frontiers in neuroscience* **12**, 632
 143. Sauerbeck, A., Schonberg, D. L., Laws, J. L., and McTigue, D. M. (2013) Systemic iron chelation results in limited functional and histological recovery after traumatic spinal cord injury in rats. *Experimental neurology* **248**, 53-61
 144. Hirayama, T., Tsuboi, H., Niwa, M., Miki, A., Kadota, S., Ikeshita, Y., Okuda, K., and

- Nagasawa, H. (2017) A universal fluorogenic switch for Fe(ii) ion based on N-oxide chemistry permits the visualization of intracellular redox equilibrium shift towards labile iron in hypoxic tumor cells. *Chemical science* **8**, 4858-4866
145. Benson, K., Cramer, S., and Galla, H. J. (2013) Impedance-based cell monitoring: barrier properties and beyond. *Fluids and barriers of the CNS* **10**, 5
146. Bobinger, T., Burkardt, P., H, B. H., and Manaenko, A. (2018) Programmed Cell Death after Intracerebral Hemorrhage. *Current neuropharmacology* **16**, 1267-1281
147. Wang, X., Mori, T., Sumii, T., and Lo, E. H. (2002) Hemoglobin-induced cytotoxicity in rat cerebral cortical neurons: caspase activation and oxidative stress. *Stroke* **33**, 1882-1888
148. Belcher, J. D., Beckman, J. D., Balla, G., Balla, J., and Vercellotti, G. (2010) Heme degradation and vascular injury. *Antioxidants & redox signaling* **12**, 233-248
149. Mills, E., Dong, X. P., Wang, F., and Xu, H. (2010) Mechanisms of brain iron transport: insight into neurodegeneration and CNS disorders. *Future medicinal chemistry* **2**, 51-64
150. Rose, M. Y., and Olson, J. S. (1983) The kinetic mechanism of heme binding to human apohemoglobin. *The Journal of biological chemistry* **258**, 4298-4303
151. Wang, J., and Dore, S. (2007) Heme oxygenase-1 exacerbates early brain injury after intracerebral haemorrhage. *Brain : a journal of neurology* **130**, 1643-1652
152. Zhang, Z., Song, Y., Zhang, Z., Li, D., Zhu, H., Liang, R., Gu, Y., Pang, Y., Qi, J., Wu, H., and Wang, J. (2017) Distinct role of heme oxygenase-1 in early- and late-stage intracerebral hemorrhage in 12-month-old mice. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **37**, 25-38
153. Garton, T., Keep, R. F., Hua, Y., and Xi, G. (2016) Brain iron overload following intracranial haemorrhage. *Stroke and vascular neurology* **1**, 172-184
154. McCarthy, R. C., and Kosman, D. J. (2015) Iron transport across the blood-brain barrier: development, neurovascular regulation and cerebral amyloid angiopathy. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **72**, 709-727
155. Higdon, A. N., Benavides, G. A., Chacko, B. K., Ouyang, X., Johnson, M. S., Landar, A., Zhang, J., and Darley-Usmar, V. M. (2012) Hemin causes mitochondrial dysfunction in endothelial cells through promoting lipid peroxidation: the protective role of autophagy. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **302**, H1394-1409
156. Nakamura, T., Keep, R. F., Hua, Y., Schallert, T., Hoff, J. T., and Xi, G. (2004) Deferoxamine-induced attenuation of brain edema and neurological deficits in a rat model of intracerebral hemorrhage. *Journal of neurosurgery* **100**, 672-678
157. Caliaaperumal, J., Wowk, S., Jones, S., Ma, Y., and Colbourne, F. (2013) Bipyridine, an iron chelator, does not lessen intracerebral iron-induced damage or improve outcome after intracerebral hemorrhagic stroke in rats. *Translational stroke research* **4**, 719-728

158. Cui, H. J., He, H. Y., Yang, A. L., Zhou, H. J., Wang, C., Luo, J. K., Lin, Y., and Tang, T. (2015) Efficacy of deferoxamine in animal models of intracerebral hemorrhage: a systematic review and stratified meta-analysis. *PloS one* **10**, e0127256
159. Zhao, Y., and Rempe, D. A. (2011) Prophylactic neuroprotection against stroke: low-dose, prolonged treatment with deferoxamine or deferasirox establishes prolonged neuroprotection independent of HIF-1 function. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **31**, 1412-1423
160. Grosso, R. A., Caldarone, P. V. S., Sanchez, M. C., Chiabrando, G. A., Colombo, M. I., and Fader, C. M. (2019) Hemin induces autophagy in a leukemic erythroblast cell line through the LRP1 receptor. *Bioscience reports* **39**
161. Sung, H. K., Song, E., Jahng, J. W. S., Pantopoulos, K., and Sweeney, G. (2019) Iron induces insulin resistance in cardiomyocytes via regulation of oxidative stress. *Scientific reports* **9**, 4668
162. Quiles Del Rey, M., and Mancias, J. D. (2019) NCOA4-Mediated Ferritinophagy: A Potential Link to Neurodegeneration. *Frontiers in neuroscience* **13**, 238
163. Wu, C., Yan, X., Liao, Y., Liao, L., Huang, S., Zuo, Q., Zhou, L., Gao, L., Wang, Y., Lin, J., Li, S., Wang, K., Ge, X., Song, H., Yang, R., and Lu, F. (2019) Increased perihematomal neuron autophagy and plasma thrombin-antithrombin levels in patients with intracerebral hemorrhage: An observational study. *Medicine* **98**, e17130
164. He, Y., Wan, S., Hua, Y., Keep, R. F., and Xi, G. (2008) Autophagy after experimental intracerebral hemorrhage. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **28**, 897-905
165. Zhang, L., Niu, W., He, Z., Zhang, Q., Wu, Y., Jiang, C., Tang, C., Hu, Y., and Jia, J. (2014) Autophagy suppression by exercise pretreatment and p38 inhibition is neuroprotective in cerebral ischemia. *Brain research* **1587**, 127-132

略語一覽

ANOVA: one-way analysis of variance
ARE: antioxidant response elements
BARD: bardoxolone methyl
BBB: blood brain-barrier
BP: 2,2'-bipyridil
CBF: cerebral blood flow
CCA: common carotid artery
CCK-8: cell counting kit-8
CD31 (PECAM-1): platelet endothelial cell adhesion molecule-1
CMC: sodium carboxymethyl cellulose
DFR: deferasirox
DMEM: dulbecco's modified eagle's medium
DMSO: dimethyl sulfoxide
EBM: endothelial cells basal medium
ECA: external carotid artery
eNOS: endothelial nitric oxide synthase
EB: evans blue
ERK1/2: extracellular signal-regulated kinase 1/2
FAS: ferrous ammonium sulfate hexahydrate
FBS: fetal bovine serum
Fe²⁺: bivalent iron
Fe³⁺: trivalent iron
FITC: fluorescein isothiocyanate
Gclm: glutamate-cysteine ligase modifier subunit
Hb: hemoglobin
HBMVECs: human brain microvascular endothelial cells
HBMVPs: human brain microvascular pericytes
HBSS: hanks' balanced salt solution
HO-1/2: heme oxygenase-1/2
H₂O₂: hydrogen peroxide
ICA: internal carotid artery
ICH: intracranial hemorrhage
Keap1: Kelch-like ECH-associated protein 1
JNK: c-Jun N-terminal kinase
MAPK: mitogen-activated protein kinase

MCAO: middle cerebral artery occlusion
MDA: malondialdehyde
MMPs: matrix metalloproteinases
M.O.M.: mouse on mouse
NAC: N-acetyl-L-cysteine
NF- κ B: nuclear factor-kappa B
NQO1: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate quinone oxidoreductase 1
Nrf2: nuclear factor-erythroid 2-related factor 2
NVU: neurovascular unit
PARP: poly [adenosine diphosphate]-ribosepolymerase
PBS: phosphate buffered solution
PDGFR- β : platelet-derived growth factor receptor- β
PI: propidium iodide
PT-INR: prothrombin time-international normalized ratio
ROCK: rho-associated coiled-coil protein kinase
ROS: reactive oxygen species
rt-PA: recombinant tissue plasminogen activator
SDS: sodium dodecyl sulfate
SHSY5Y: human neuroblastoma
SOD1: superoxide dismutase 1
TBA: thiobarbituric acid
TBS: tris buffered saline
TEER: trans-endothelial electrical resistance
TTC: 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride
Ub: ubiquitination
VE-cadherin: vascular endothelial cadherin
ZO-1: zonula occludens-1