

平成 28 年度 博士学位論文

論題

脳梗塞時における血液凝固制御因子 ADAMTS13 の
病態生理学的役割の解明と治療への応用

指導教授 三島 健一

福岡大学大学院 薬学研究科

薬学専攻

学籍番号 PD131004

氏名 中野 貴文

目次

緒言	1
第1章 中大脳動脈 (MCA)閉塞モデルの基礎検討	5
第1節 脳虚血後の行動学的変化	5
1 実験材料ならびに実験方法	5
1.1. 実験動物ならびに飼育方法	
1.2. 実験手続き	
1.2.1. MCA 閉塞マウスの作成手順	
1.2.2. 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) 染色	
1.2.3. 梗塞巣体積の算出	
1.2.4. Neurological score と生存率の評価	
1.2.5. Rota-rod 法による協調運動機能の検討	
1.3. 統計処理	
2. 実験結果	7
2.1. 梗塞巣体積	
2.2. Neurological score	
2.3. Rota-rod を用いた協調運動失調の評価	
2.4. 生存率	
第2節 脳虚血後の脳内変化 (脳虚血急性期)	11
1 実験材料ならびに実験方法	11
1.1. 実験動物ならびに飼育方法	
1.2. 実験手続き	
1.2.1. MCA 閉塞マウスの作成手順	
1.2.2. 脳血流量測定	
1.2.3. グルタミン酸遊離量測定	
1.3. 統計処理	
2. 実験結果	13
2.1. 脳血流量変化	
2.2. 遊離グルタミン酸定量	
第3節 脳虚血後の脳内変化 (脳虚血亜急性期)	15
1 実験材料ならびに実験方法	15
1.1. 実験動物ならびに飼育方法	
1.2. 実験手続き	

1.2.1.	MCA 閉塞マウスの作成手順	
1.2.2.	血液脳関門 (Blood-Brain Barrier; BBB) 崩壊時間の検討	
1.2.3.	炎症反応 (MPO 活性, HMGB1, CD36) 発現量測定	
1.2.4.	組織標本の作製方法	
1.2.5.	MPO 抗体を用いた免疫組織学的検討	
1.2.6.	MPO 酵素活性測定法	
1.2.7.	ELISA 法	
1.3.	統計処理	
2.	実験結果	22
2.1.	BBB 崩壊時間の検討	
2.2.	虚血後の脳内 MPO の変化	
2.3.	MPO 酵素活性測定	
2.4.	虚血後の血中及び脳内 HMGB1 の発現量	
2.5.	虚血後の脳内 CD36 受容体の発現量変化	
第 4 節	脳虚血後の脳内変化 (慢性期)	28
1	実験材料ならびに実験方法	28
1.1.	実験動物ならびに飼育方法	
1.2.	実験手続き	
1.2.1.	MCA 閉塞マウスの作成手順	
1.2.2.	脳萎縮率の測定	
1.2.3.	組織標本の作製方法	
1.2.4.	Hematoxylin-Eosin (H&E) 染色の手順	
1.2.5.	Iba1 及び GFAP 抗体を用いた免疫組織学的検討	
1.2.6.	可視染色	
1.2.7.	Western blotting 法	
1.3.	統計処理	
2.	実験結果	31
2.1.	MCA 閉塞後の脳内グリア細胞及び脳内マーカーの発現量変化	
2.1.1.	MCA 閉塞による脳萎縮率の変化	
2.1.2.	H&E 染色	
2.1.3.	Iba1 染色	
2.1.4.	GFAP 染色	
2.1.5.	Iba1, GFAP のタンパク定量	
第 1 章	考察	38

第2章 脳梗塞に対する新規治療薬の検討 (ADAMTS13の脳梗塞治療への応用)	42
第1節 組織プラスミノゲンアクチベータ (t-PA)投与による脳梗塞治療効果の検討	42
1 実験材料ならびに実験方法	42
1.1. 実験動物ならびに飼育方法	
1.2. 実験手続き	
1.2.1. 使用薬物および実験スケジュール	
1.2.2. MCA 閉塞マウスの作成手順	
1.2.3. 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) 染色	
1.2.4. 梗塞巣体積の算出	
1.2.5. 脳出血量測定	
1.3. 統計処理	
2 実験結果	43
2.1. MCA 閉塞後、t-PA 投与による梗塞巣体積変化	
2.2. MCA 閉塞後、t-PA 投与により誘発させる脳出血量測定	
第2節 脳虚血時における ADAMTS13 の病態生理的役割の解明 (ADAMTS13knock out マウスによる検討)	48
1 実験材料ならびに実験方法	48
1.1. 実験動物ならびに飼育方法	
1.2. 実験手続き	
1.2.1. MCA 閉塞マウスの作成手順	
1.2.2. 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) 染色	
1.2.3. 梗塞巣体積の算出	
1.2.4. Neurological score	
1.2.5. 直腸体温測定法	
1.2.6. 脳血流量測定	
1.2.7. プロトロンビン時間測定	
1.2.8. 血液ガス測定	
1.2.9. 炎症反応 (MPO, 血漿中 HMGB1) 測定	
1.2.9.1. MPO 酵素活性測定法	
1.2.9.2. 血漿中 HMGB1 測定法	
1.3. 統計処理	
2 実験結果	49
2.1. MCA 閉塞による梗塞巣体積	
2.2. MCA 閉塞による Neurological score の変化	
2.3. MCA 閉塞による直腸体温の変化	

2.4.	MCA 閉塞による脳血流量変化、プロトロンビン時間、血液ガスの測定	
2.5.	MCA 閉塞による炎症反応の変化	
第3節	ADAMTS13 タンパク投与による脳梗塞治療効果の検討	57
1	実験材料ならびに実験方法	57
1.1.	実験動物ならびに飼育方法	
1.2.	実験手続き	
1.2.1.	使用薬物および投与方法	
1.2.2.	MCA 閉塞マウスの作成手順	
1.2.3.	2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) 染色	
1.2.4.	梗塞巣体積の算出	
1.2.5.	脳出血量測定	
1.3.	統計処理	
2	実験結果	58
2.1.	MCA 閉塞後、ADAMTS13 投与による梗塞巣体積変化 (t-PA との比較検討)	
2.2.	MCA 閉塞後、ADAMTS13 投与により誘発させる脳出血量測定 (t-PA との比較検討)	
第2章	考察	64
第3章	ADAMTS13 による抗炎症作用の検討	68
第1節	A172 (ヒト神経膠芽腫細胞) を用いた細胞障害に対する ADAMTS13 の効果	68
1	実験材料ならびに実験方法	68
1.1.	細胞培養法	
1.1.1.	実験細胞	
1.1.2.	使用試薬	
1.1.3.	細胞培養法	
1.2.	免疫染色	
1.3.	WST-1 Assay 法	
1.3.1.	WST-1 による蔘き数検討	
1.4.	使用薬物および調製方法	
1.5.	WST-1 による薬物濃度の決定	
1.6.	細胞保護効果の検討	
1.7.	Ox-LDLによるHMGB1遊離濃度の測定	
1.8.	Thrombospondin 1による抗炎症作用 (HMGB1遊離量測定)	
1.9.	統計処理	
2	実験結果	72

2.1.	WST-1 による蔘き数検討	
2.2.	WST-1 による薬物濃度の決定	
2.3.	Thrombospondin 1 の細胞保護効果	
2.4.	Ox-LDL による HMGB1 遊離濃度の測定	
2.5.	Thrombospondin 1 による抗炎症作用 (HMGB1 遊離量測定)	
 第 2 節 脳梗塞に対する Thrombospondin 1 の脳保護効果検討		79
1	実験材料ならびに実験方法	79
1.1.	実験動物ならびに飼育方法	
1.2.	実験手続き	
1.2.1.	使用薬物および実験スケジュール	
1.2.2.	MCA 閉塞マウスの作成手順	
1.2.3.	2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) 染色	
1.2.4.	梗塞巣体積の算出	
1.3.	統計処理	
2	実験結果	79
2.1.	MCA 閉塞後、Thrombospondin 1 (TSP-1) 投与による梗塞巣体積変化	
 第 3 章 考察		81
 総括		83
 参考文献		86
 謝辞		90

緒言

脳梗塞を含む脳血管疾患は、総患者数が約 123 万人であり(厚生労働省平成 23 年「患者調査の概況」)、我が国における死因の第 4 位に位置している(図 1)。その中でも脳梗塞は国内年間死亡者数が約 7 万人(厚生労働省平成 23 年「人口動態統計の概況」)であり、重篤な疾患である。また、脳梗塞に罹患すると、たとえ生存できたとしても、片麻痺や言語障害、認知症などの後遺症が残る危険性が高い。そのため、脳梗塞は要介護となる疾患の中でも第一に位置している(図 2)¹⁾。更に、脳梗塞で懸念されることに、再発率が非常に高い疾患であるということが挙げられる。脳梗塞発症から 1 年以内に 10 人に 1 人が、そして 10 年以内に 2 人に 1 人が再発をすると報告されている²⁾。現在の日本は本格的な後期高齢化社会に突入している。そのため、脳梗塞の発症率・再発率は今後更に増加するものと考えられ、2020 年には約 300 万人に達すると予想されている³⁾。そのため、脳梗塞に対する医療ニーズは非常に高く、脳梗塞治療の更なる発展は必要不可欠であると言える。

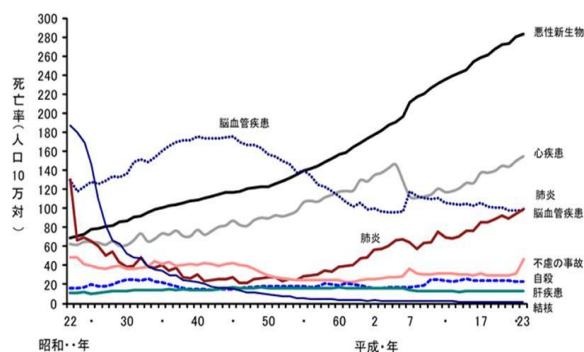


図 1 疾患別の死亡率(厚生労働省による統計)

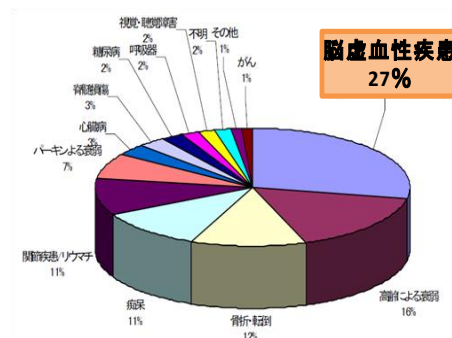


図 2 介護が必要となった原因疾患

<脳梗塞治療の現状と問題点>

脳梗塞治療は、「Time is brain」と言われるほど、脳梗塞発症からどれだけ素早く治療を行えるかが重要である。特に血栓溶解薬の組織プラスミノゲンアクチベータ(tissue plasminogen activator; t-PA)は脳梗塞に対し、劇的な治療効果を発揮する^{4,5)}。しかし、脳梗塞の病態が進行した状態で、t-PAを投与すると、t-PAの強力な血栓溶解作用により、脳出血を誘発させるリスクが高くなってしまう。そのため、t-PAが投与できるのは、脳梗塞発症後4.5時間以内と限定されており(脳卒中ガイドライン2015)、治療可能時間の短い薬剤といえる。これらt-PAの投与時間の制限や脳出血誘発といった問題点から、実際にt-PA療法を施行できる患者は脳梗塞患者全体の10%以下にしかすぎないのが現状である⁶⁾。以上のことから、より効果的で治療可能時間の長い脳梗塞治療薬の探索は急務である。

<治療可能時間の長い脳梗塞治療薬を見つけるためには>

図3に示すように、脳梗塞後の脳内では、急性期に引き起こされる血栓形成に伴う脳血流量低下や興奮毒性による細胞障害と⁷⁻⁹⁾、亜急性期に引き起こされる炎症反応による細胞障害が惹起される¹⁰⁾。このような亜急性期に起こる炎症に対しては、t-PAは効果をもたず、他に有用な薬物も現在までに存在していない¹¹⁾。よって、①急性期において、

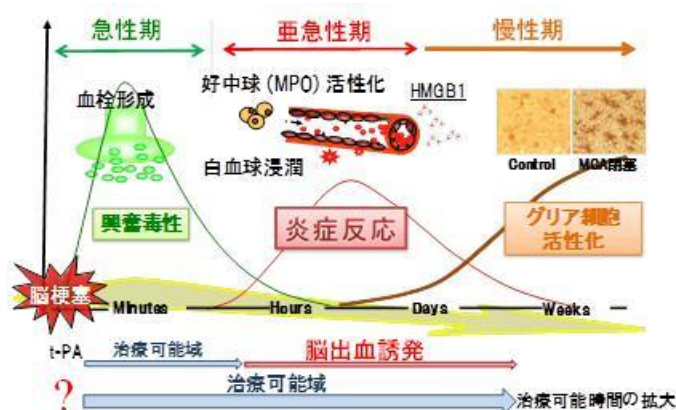


図3 脳梗塞後の脳内変化とt-PAの治療可能域

脳出血誘発のリスクが少ない血栓溶解作用を持つ薬物や、②亜急性期以降において、炎症反応を中心とした細胞障害を軽減する薬物が、脳梗塞の治療可能時間を長くする薬物として求められていると考える。

<vWF 切断酵素 ADAMTS13 に関する基礎研究>

～新たな血栓溶解薬～

von Willebrand Factor (vWF) は血管内皮細胞や肝臓などで産生される糖蛋白質であり、分子量 250kDa の単一サブユニットが S-S 結合を介して重合し、血漿中で 500～20,000kDa のマルチマーとして存在している¹²⁾。その vWF の主な生理機能は、一次止血因子として障害を受けた血管内皮に接着し、血小板の粘着・凝集反応を促進させることで、止血機能を維持する役割を果たしている¹³⁾。しかし、vWF による血液凝固反応が強すぎると心筋梗塞や脳梗塞などの血栓症を引き起こしてしまう。それを防ぐため、適切な止血機能維持に関わっているものが、vWF を特異的に切断する酵素の A Disintegrin And Metalloprotease with ThromboSpondin type 1 motif 13 (ADAMTS13) である¹²⁻¹⁴⁾。ADAMTS13 は亜鉛型金属プロテアーゼであり、vWF の A2 ドメインに存在する Tyr842-Met843 間のペプチド結合を特異的に切断することで、適切な止血機能維持に関与していると考えられている¹²⁾。また、人の血中では約 10 µg/ml の濃度で循環しているタンパクである¹⁵⁾。

近年の研究成果により、この ADAMTS13 が血小板減少症の鑑別診断、特に血栓性血小板減少性紫斑病 (Thrombotic Thrombocytopenic Purpura ; TTP) の診断にきわめて重要であることが確立された^{12,16,17)}。TTP は ADAMTS13 の機能不全により発症すると言われており^{16,17)}、vWF の過剰発現により全身に微小血栓を形成し、多臓器窓外を誘発させる疾患である。この TTP の特徴から、ADAMTS13 は vWF を切断することにより、生体内で血栓溶解的に働いていると考えられる。この性質を活かし、新たな血栓溶解作用を持つ薬剤として ADAMTS13 タンパクを脳梗塞治療に応用できる可能性があると考えた。

<ADAMTS13 の脳梗塞治療における可能性：t-PA を超えることができるのか>

～ずり応力依存的な血栓溶解～

志田ら (2008 年) により, ADAMTS13 には, ずり応力依存的に vWF を切断する特徴を持つことが報告されている¹⁸⁾. 図4で示すように血栓が形成されると血流速度に差が生じる. そして血流速度の速い側では血栓を引き延ばそうとする力が働き, vWF の stretch が起きる. これを血液のずり応力と呼び, ADAMTS13 はこのずり応力により引き延ばされた vWF を切断することで血栓溶解作用を示す. そのため ADAMTS13 は, 血流に直接暴露されている血栓表面部位, つまり血栓の端から徐々に血栓を削

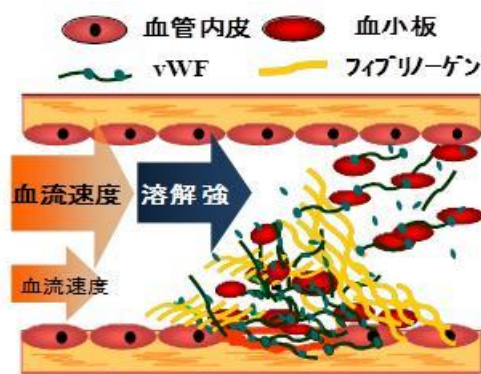


図4 ADAMTS13による血栓溶解様式

る作用を示す(図4). このことから, t-PA がフィブリンノーゲンを溶解し線溶作用を示すことに対し, ADAMTS13 は本来生体防御に必須な止血機能を維持した状態で, 病的血栓を溶解すると考えられる. よって, ADAMTS13 が, t-PA で問題となる脳出血の誘発を克服できる可能性があり, t-PA に替わる脳梗塞治療薬の候補として可能性があると考えられる.

～新たな治療ターゲット：炎症反応～

ADAMTS13 は, 1427 アミノ酸残基からなる一本鎖のメタロプロテアーゼであり¹²⁾, 図5に示すようなマルチドメインをもつ. このうち, ADAMTS13 は Thrombospondin type 1 (TSP-1) repeats を介して, CD36 受容体と結合することが報告されている¹⁹⁾. この結合は一般的に, ADAMTS13 が, 血管内皮細胞等の CD36 と結合することで, 固相化酵素として機能するために重要であると考えられている¹⁹⁾. しかし, CD36 とは血管内皮, ミクログリア, マクロファージ上に発現している膜貫通型の蛋白であり, スカベンジャー受容体として生理機能を持つ²⁰⁾. また, CD36 は下流の NF- κ B を介して, 炎症性サイトカインの産生に関与しており²¹⁾, CD36KO マウスでは脳梗塞後の炎症反応が抑制され, 梗塞巣体積が減少すると報告されている²²⁾. また, この CD36 のアンタゴニストとして TSP-1 を使用している文献等がある²³⁾. つまり TSP-1 をマルチドメインに含む ADAMTS13 は CD36 との結合を介し, 血栓溶解に伴う2次的な抗炎症作用だけでなく, 直接的に抗炎症作用を示す可能性を持つことが期待できる.

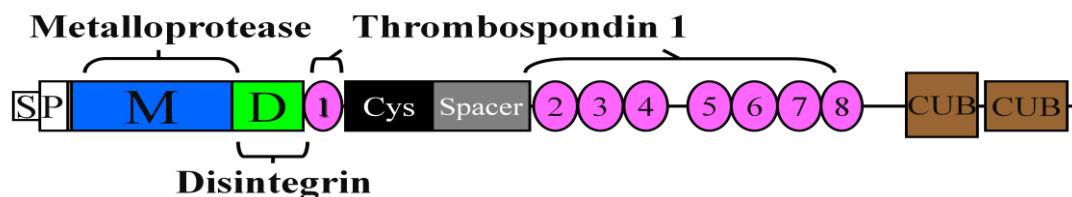


図5 ADAMTS13 のマルチドメイン

＜本研究の概要＞

本研究では、MCA 閉塞モデルマウスを用いて、脳梗塞時における ADAMTS13 の病態生理学的役割の解明と、それを応用した脳梗塞治療への適用を目的としている。第 1 章では、基礎検討として MCA 閉塞モデルマウスに梗塞巣が形成されていることを確認し、MCA 閉塞後の運動機能の経日的な変化を検討した。また、それに伴う脳内変化を検討することで、脳梗塞治療のターゲットとなりえる標的分子を探し出した。第 2 章では、脳梗塞発症時における ADAMTS13 の病態生理学的役割を解明し、ADAMTS13 が、t-PA に替わり、脳出血を誘発することなく、血栓溶解作用をもつ新規治療薬の候補となりうるか検討した。第 3 章では、ADAMTS13 が t-PA に比べ、より治療効果の高いものとして確立するため、ADAMTS13 が血栓溶解に伴う 2 次的な抗炎症作用だけではなく、直接的に抗炎症作用を示すのか *in vivo* により検討を行った。

第1章 中大脳動脈 (MCA)閉塞モデルの基礎検討

MCA 閉塞による運動機能障害の経目的な変化を、脳虚血急性期から慢性期まで検討した。また、それに伴う脳内変化を、脳虚血急性期 (~1d), 脳虚血亜急性期 (~7d), 脳虚血慢性期 (~14d)と分けて検討することで、時間軸毎の脳梗塞治療のターゲットとなりえる標的分子を探し出した。

第1節 脳虚血後の行動学的変化

1. 実験材料ならびに実験方法

1.1. 実験動物ならびに飼育方法

実験動物は 6-7 週齢, 体重 25-30g の ddY 系雄性マウス (紀和実験動物研究所, 和歌山) を用いた。マウスは、プラスチックケージ内に入れ, 室温 $21\pm 2^{\circ}\text{C}$, 湿度 $60\pm 2\%$ および 12 時間の明暗サイクル (7:00 AM に点灯) の動物室で飼育した。なお、水および餌 (CE-2; 日本クレア株式会社 東京) は自由摂取できるようにした。実験動物の取り扱いについては、福岡大学動物実験委員会 (Experimental animal care and use committee) に準じて行った。

1.2. 実験手続き

1.2.1. MCA 閉塞マウスの作成手順

マウスを 2% イソフルラン吸入より麻酔を導入し, 効果が得られた後に 1% で維持した。マウスを仰向けに手術台に固定し, 頸部中央を切開し, 左側総頸動脈と外頸動脈を結紮した。総頸動脈分岐部を約 1 mm 程度切開し, 塞栓子が MCA の起始部に到達するように, 切開口から 9 mm 挿入した。再灌流は, 塞栓子を手前に引き抜くことによって行った。塞栓子は長さ 11 mm の 8-0 ナイロンモノフィラメント (Ethilon ; Ethicon, NJ, USA) の先端から 4 mm をシリコン樹脂 (Xantopren ; Bayer Dental, Osaka, Japan) でコーティングしたものを使用した。コーティング部分の直径は, 体重により適切な太さを選択した。MCA 閉塞時間は 30 分, 2 時間, 4 時間など目的に合わせて変えている。また, 梗塞巣の変化を観察するため MCA 閉塞 24 時間後に TTC 染色を行い, 梗塞巣体積の変化を検討した。

1.2.2. 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) 染色

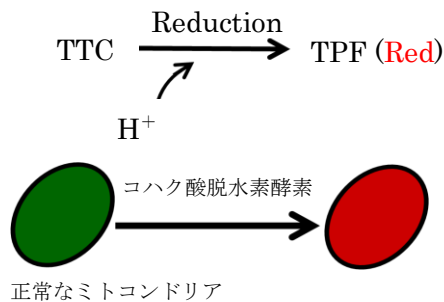
<使用試薬>

(a) 2% TTC 溶液

TTC (Sigma 製) 試薬を生理食塩液で溶解し, 2% (w/v) に調製した。

<測定原理>

TTC は水素で還元され、水に溶けない赤色をした TPF (トリフェニルホルマザン) となる。ミトコンドリアには好気呼吸に関する酵素群の 1 つであるコハク酸脱水素酵素が含まれている。TTC 溶液の中に脳組織切片を入れると、組織中ミトコンドリア内で基質の脱水素反応が起こり、遊離した水素で TTC が還元される。還元された TTC は赤色の TPF となるため、ミトコンドリア正常部位の組織が赤色を呈する。この原理を利用して、大脳皮質分子層以外のミトコンドリアが染まらない白色の部分梗塞巣とし、その体積を計測した。



<方法>

MCA 閉塞後、所定の時間後に再灌流を行い、MCA 閉塞 24 時間後にマウスの頸椎を脱臼した後、直ちに断頭した。取り出した脳を冷却した生理食塩液でよく冷やし、大脳皮質を含む脳の前額断スライスを 2 mm 間隔で作製した。切片を 2 % 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC, SIGMA) 溶液中で 37°C, 30 分間インキュベートした。そして、スライドガラス上に並べ、デジタルスチルカメラ (MVC-FD91, SONY) で撮影した。

1.2.3. 梗塞巣体積の算出

梗塞巣体積は、断面の写真から梗塞総面積を画像解析ソフト (NIH Image 1.63) で測定し算出した。

1.2.4. Neurological score と生存率の評価

Neurological score は、神経障害の程度によって点数化し評価した。また、生存率は肉眼的観察により経日的に確認した。

<Neurological score>

0: normal motor function

1: flexion of torso and of contralateral forelimb upon lifting of the animal by the tail

2: circling to the contralateral side but normal posture at rest

3: circling to the contralateral side

4: rolling to the contralateral side

5: leaning to the contralateral side at rest (no spontaneous motor activity)



flexion



circling

1.2.5. Rota-rod 法による協調運動機能の検討

Rota-rod 装置は、直径 3cm のプラスチック製の棒が一定の速度で回転しており、この上にマウスを回転方向と逆向きに頭の位置がくるように乗せ、落下するまでの時間を測定した。また、MCA 閉塞 7 日前より rota-rod に 120 秒間乗れるように訓練をしたのちに MCA 処置を行った。回転速度は 510 rpm で行い、観察時間を最大 120 秒とし、3 回の平均を評価値とした。

1.3. 統計処理

独立した 2 群間の比較には student t-test を使用し、また多重比較を行う場合は Tukey's test を使用した。なお、危険率が 5% である場合を統計学的に有意差有りとした。

2. 実験結果

2.1. 梗塞巣体積

梗塞巣体積について図 6 に示した。MCA 閉塞後 24 時間後に、脳を取り出し TTC 染色を行ったところ、MCA 閉塞群では梗塞巣が形成されていることが確認された。

Sham ; 0 mm³, 4h MCA 閉塞 ; 88.0±9.8 mm³.

2.2. Neurological score

Neurological score について図 6 に示した。MCA 閉塞後、継続的に神経障害はみられたが、1-3 日をピークに改善傾向にあることが認められた。

Sham (4 時間後~14 日後) ; 0.

4h MCA 閉塞; 1 日後 3.45±0.2, 3 日後 4.10±0.2, 7 日後 2.91±0.5, 14 日後 1.90±0.2.

2.3. Rota-rod を用いた協調運動失調の評価

協調運動失調の評価について図 7 に示した。MCA 閉塞後、協調運動失調が認められたが、日にちが経過するにつれて改善傾向にあることが認められた。

Sham ; 1 日後 120.0 ± 0.2 s, 7 日後 119.0 ± 1.1 s, 14 日後 120 ± 0.4 s.

4h MCA 閉塞 ; 虚血 1 日後 20.0 ± 10.4 s, 虚血 7 日後 40.8 ± 12.7 s, 虚血 14 日後 81.0 ± 17.5 s.

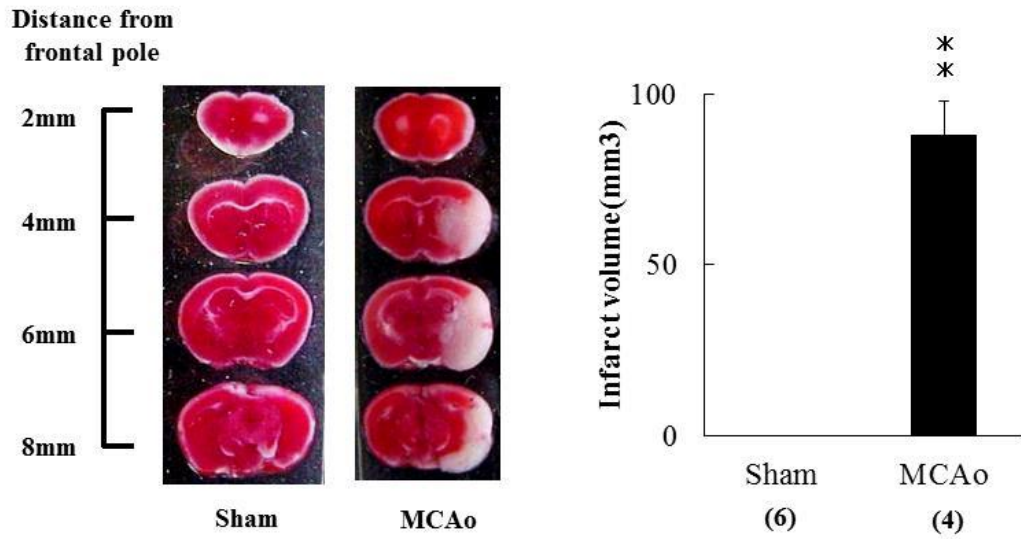
2.4. 生存率

生存率について図 7 に示した. MCA 閉塞後 14 日後までに 35% が生き残ることが認められた.

Sham (4 時間後~14 日後) ; 0%.

4h MCA 閉塞; 1 日後 90.8%, 7 日後 54.6%, 14 日後 35%.

梗塞巣体積



** $P < 0.01$ vs. Sham (Student t-test)

神経症状

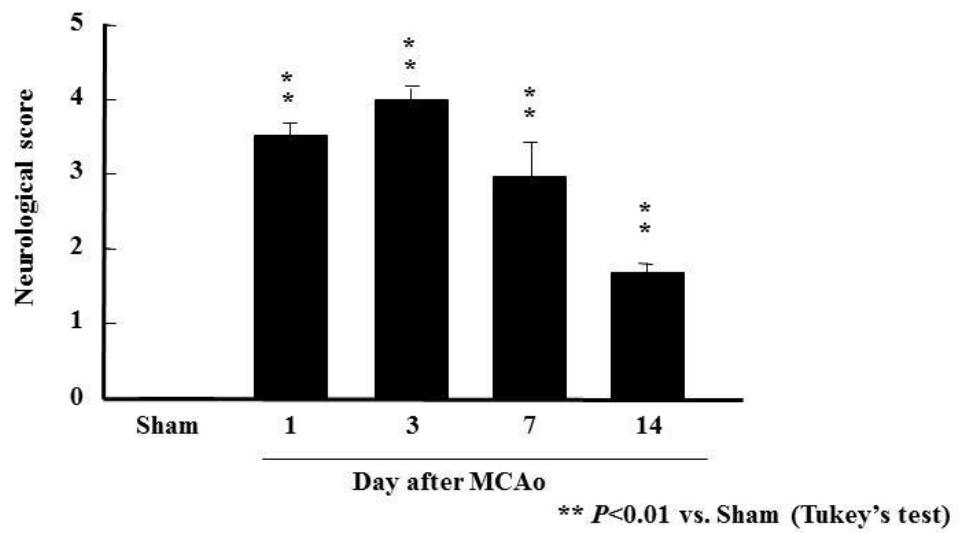


図6 4hMCA閉塞後の梗塞巣体積と神経症状

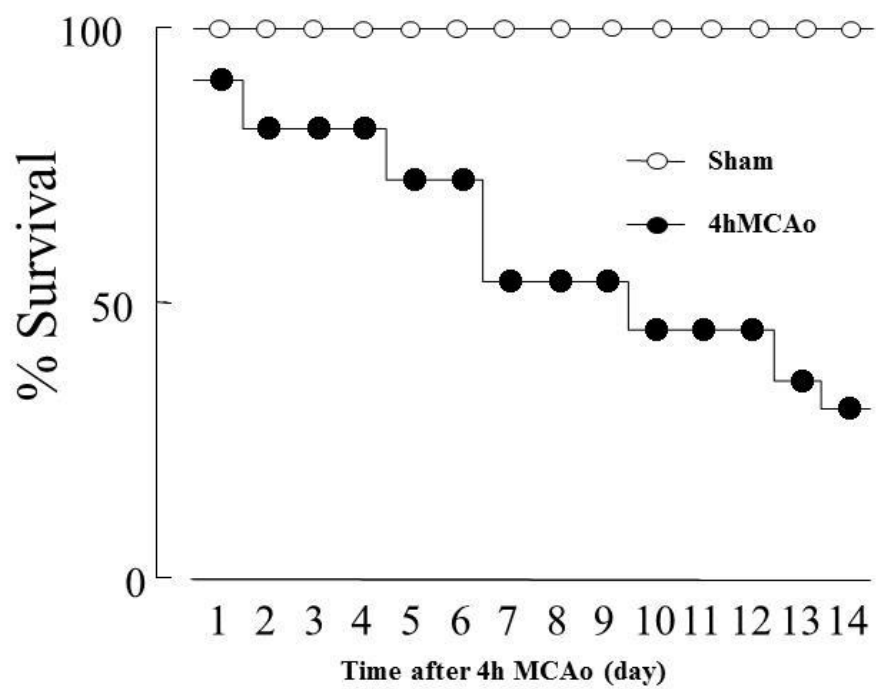
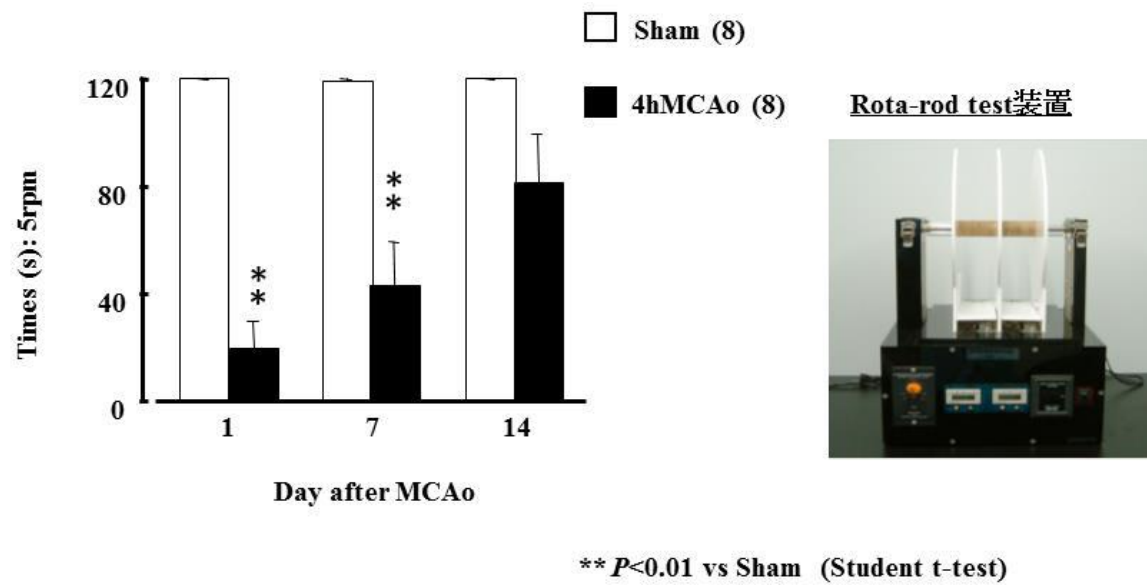


図7 4hMCA閉塞後の協調運動と生存率の経日的変化

第2節 脳虚血後の脳内変化 (脳虚血急性期) <脳虚血後の脳血流量変化とグルタミン酸遊離量>

1. 実験材料ならびに実験方法

1.1. 実験動物ならびに飼育方法

実験動物ならびに飼育方法は、第1章第1節 1.1.と同様である。

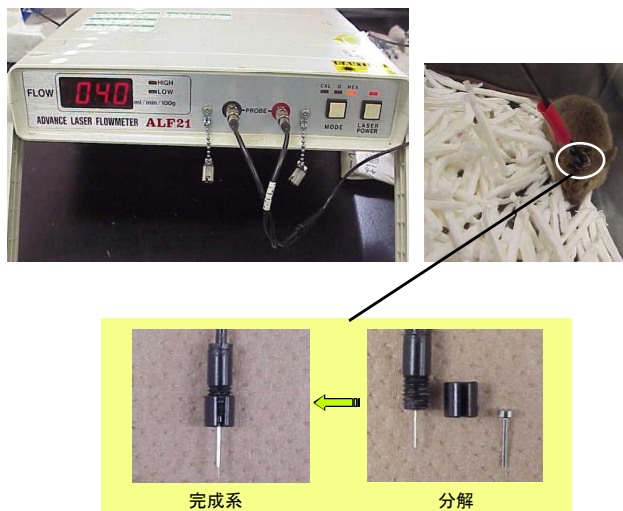
1.2. 実験手続き

1.2.1. MCA 閉塞マウスの作成手順

MCA 閉塞マウスの作成手順は、第1章第1節 1.2.1.と同様である。

1.2.2. 脳血流量測定

脳血流は、直径 5 mm の probe (ALF 2100, Advance Co, Tokyo, Japan) を用い、laser Doppler flowmetry (ALF21, Advance Co., Tokyo, Japan) を用いて測定した。Probe の植え込みは MCA 閉塞を行う前日に施行した。Probe の植え込み方法はガイドカニューレを用いて、sodium pentobarbital 50 mg/kg の腹腔内投与麻酔下で、マウスをマウス定位固定装置に固定した後、頭皮を切開し、虚血同側である左半球の大脳皮質 (A:-0.22mm, L:2.5mm, H:1.5mm) に施した。各部位は、The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates を参考にした。脳血流測定は MCA 閉塞 30 分前から行い、MCA 閉塞から 4 時間、さらに再灌流から 20 時間まで測定した。



1.2.3. グルタミン酸遊離量測定

生存している状態での脳内の遊離物質を測定するために脳内透析法 (Microdialysis 法) を行った。Microdialysis 法によりグルタミン酸測定装置を用いて、マウス脳内の脳虚血後のグルタミン酸遊離量を測定した。

<使用試薬>

(a) リンゲル液

NaCl : 0.86 g, KCL : 0.03 g, CaCl₂ : 0.033 g を超純水 100 mL に溶解して調製した.

(b) グルタミン酸標準液

L-グルタミン酸 (Wako) 14.7 mg を超純水により全量 10 mL に調製した. 更に, 0.1N 塩酸で溶解し, 10 mM の標準液として冷蔵保存した. 実験を行う際にはこれをリンゲル液で 10 μ M に調製した.

(c) 移動層

Na₂HPO₄·12H₂O (キシダ化学) 5.37 g を超純水 1 L に溶解した後, 10 倍希釈した特級リン酸 (キシダ化学) を加えて, pH7.5 (7.48~7.53) になるように調製した. これに 250 mg の Hexadecylammonium Bromide (ナカライテスク) を加えて溶解した.

<Microdialysis probe の植え込み手術>

マウスの麻酔には sodium pentobarbital 50 mg/kg を使用し, 脳定位固定装置に頭部を固定した. Paxinos & Watson の脳図譜に従い, 虚血同側の大脳皮質 (A:-0.22mm, L:2.5mm, H:1.5mm) にガイドカニューレ (UI-AG-2, Eicom) を埋め込んだ. これを歯科用セメント (クイックレジン, 松風) を用いて固定した. 歯科用セメントが完全に乾いた後に, ダミーカニューレ (UI-AD-2, Eicom) をガイドカニューレに挿入し, キャップナット (AC-1, Eicom) で固定し, マウスの頭皮を縫合した. 手術後, 透析実験開始まで 1 匹ずつ飼育用ケージ内で飼育し, 翌日実験に供した.

<Dialysis probe>

本実験に使用した probe 類は全て Eicom 社より購入した. マウスの脳内に植え込むガイドカニューレ (0.75mm ID×0.85mm OD×8mm), 透析時に用いる透析プローブ (A-UI-4-02) (0.7mm OD×17mm, 透析膜の長さ 2mm), およびダミーカニューレ (0.7mm OD×17mm) を用いた. なお, これらのカニューレに接続するチューブには, ジョイント付きテフロンチューブ (0.1mm ID×0.4mm OD×50cm) を用いた.

<分析機器ならびに測定条件>

測定には高速液体クロマトウラフィー電気化学検出法 (HPLC-ECD) を使用した. 電気化学検出器 ECD-300 (Eicom) を用いて, 白金作用電極に Ag-AgCl₂ 参照電極に対して +500mV の印加電圧を負荷して用いた. カラムはグルタミン酸分析用カラム E-GEL (ϕ 4.6×150mm, Eicom) に酵素固定カラム E-ENZ (glutamate oxidase が固定されたもの, ϕ 3×4mm, Eicom) を接続して用いた. カラム温度はカラムオーブン ATC-300 (Eicom) により 30°C に保たれるように設定した. HPLC

ポンプ EP-300 (Eicom)の流速は 0.5mL/min に設定した.

灌流のためのポンプは, マイクロシリンジポンプ ESP-64 (Eicom) を用いて, 流速 2 μ L/min で灌流した. マウスの行動に影響がないように得られる灌流液の捕集には, フリームービング用シーベルを用いてオートインジェクターEAS-20(Eicom)で 1 フラクションを 10 分間とした.

1.3. 統計処理

独立した 2 群間の比較には student t-test を使用し, また多重比較を行う場合は Tukey's test を使用した. なお, 危険率が 5%である場合を統計学的に有意差有りとした.

2. 実験結果

2.1. 脳血流量変化

虚血-再灌流時の脳血流量変化を図 8 に示した. MCA 閉塞中は脳血流量の低下が認められた. MCA 閉塞後 4 時間後の再灌流時には一過性に脳血流量が上昇し, 再び血流量の低下が認められた.

<脳血流量>

-閉塞中-

MCA 閉塞 1 時間後; 23.7 \pm 9.7 % of base, MCA 閉塞 2 時間後; 22.1 \pm 9.0 % of base

MCA 閉塞 3 時間後; 20.1 \pm 8.2 % of base, MCA 閉塞 4 時間後; 19.6 \pm 8.0 % of base

-再灌流後-

MCA 閉塞 5 時間後; 64.4 \pm 26.3 % of base, MCA 閉塞 6 時間後; 42.0 \pm 17.2 % of base

MCA 閉塞 7 時間後; 35.6 \pm 14.5 % of base, MCA 閉塞 24 時間後; 22.5 \pm 9.2 % of base

2.2. 遊離グルタミン酸定量

脳虚血により遊離したグルタミン酸量を図 9 に示した. グルタミン酸は, 虚血中に上昇し, 再灌流後徐々に低下した.

<遊離グルタミン酸量>

Sham; 0 時間後 1.1 \pm 1.0 μ M, 1 時間後 2.8 \pm 1.0 μ M, 2 時間後 2.5 \pm 1.2 μ M, 3 時間後 3.2 \pm 1.9 μ M, 4 時間後 3.3 \pm 1.5 μ M, 5 時間後 3.3 \pm 1.3 μ M.

4h MCA 閉塞; 0 時間後 1.3 \pm 1.0 μ M, 1 時間後 29.1 \pm 10.4 μ M, 2 時間後 24.5 \pm 5.0 μ M, 3 時間後 21.1 \pm 8.1 μ M, 4 時間後 23.4 \pm 8.1 μ M, 5 時間後 7.1 \pm 1.9 μ M

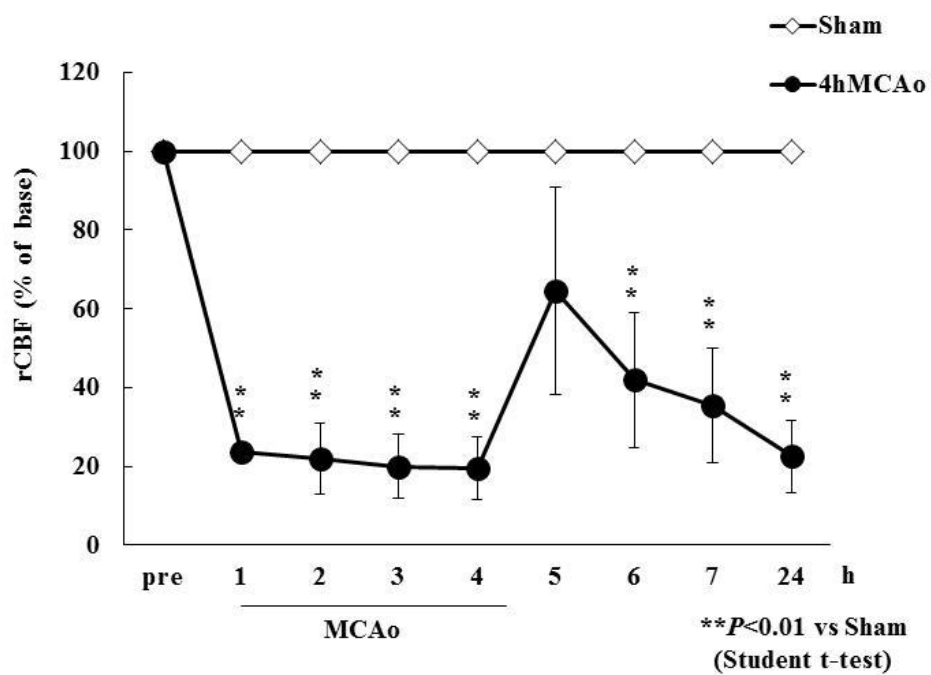


図8 4hMCA閉塞後による脳血流量変化

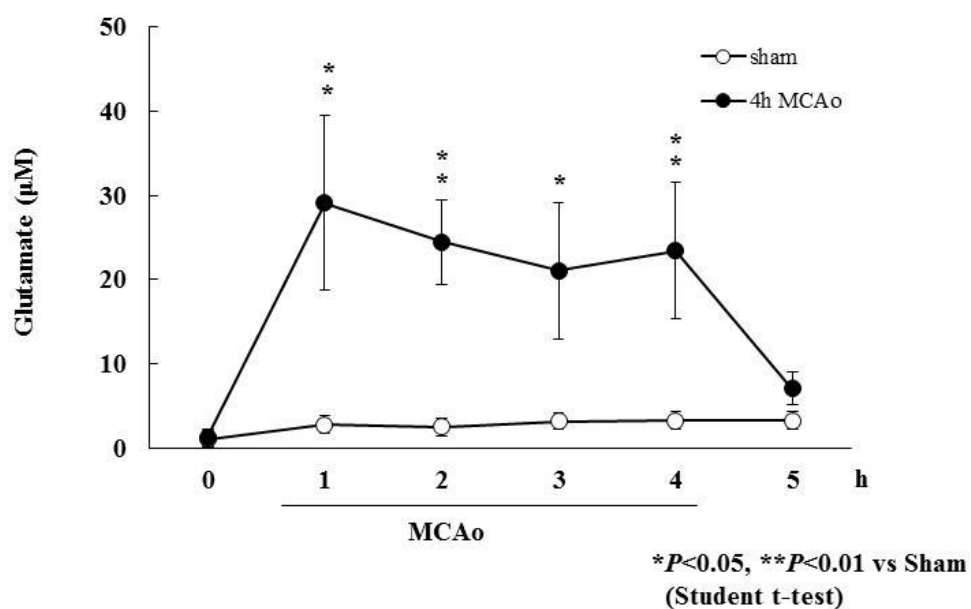


図9 4hMCA閉塞によるグルタミン酸遊離量の変化

第3節 脳虚血後の脳内変化 (脳虚血亜急性期) <脳虚血後の血液脳関門の崩壊と炎症反応>

1. 実験材料ならびに実験方法

1.1. 実験動物ならびに飼育方法

実験動物ならびに飼育方法は、第1章第1節 1.1.と同様である。

1.2. 実験手続き

1.2.1. MCA 閉塞マウスの作成手順

MCA 閉塞マウスの作成手順は、第1章第1節 1.2.1.と同様である。

1.2.2. 血液脳関門 (Blood-Brain Barrier; BBB) 崩壊時間の検討

Evans blueを生理食塩液で溶解し、2.0%の濃度に調製する。Evans blueは血管内アルブミンと結合することから、通常、脳内の実質へのEvans blueの浸潤はみられない。この性質を使用して、2%Evans blue液をMCA閉塞後に10 μ L/g の用量でマウスに尾静脈投与する。その後、虚血再灌流直後、再灌流2時間後、再灌流4時間後にマウスの脳を取り出し、Evans blueの脳内への浸潤を視覚的に確認する。

1.2.3. 炎症反応 (MPO 活性, HMGB1, CD36) 発現量測定

好中球由来の炎症マーカーである MPO (myeloperoxidase) 活性と炎症性サイトカインである HMGB1, 炎症反応を誘導する受容体である CD36 について検討を行った。

1.2.4. 組織標本の作製方法

<使用試薬>

(a) ヘパリン加生理食塩液

生理食塩液

ヘパリン 10 単位/mL

(b) 4%パラホルムアルデヒド

パラホルムアルデヒド(Wako 製)を蒸留水で溶解し、4%(w/v)になるよう調製した。また、50°Cのインキュベーターを用いてパラホルムアルデヒドが全て溶解するまで暖めた後、pH調整を1N NaOH 溶液を用いて行った (pH7.4)。

<操作手順>

マウスをジエチルエーテル麻酔下で開腹し、予めヘパリン加生理食塩液を滴下させた状態の

灌流針を左心室心尖部より挿入し、挿入部を鉗子にて固定した。続いて、右心耳を切開し、灌流液の流出経路を確保した。最初にヘパリン加生理食塩液を 20-40 mL 程度流し、右心耳からの出血が淡色化してきたことを確認した後、4%パラホルムアルデヒドに切り替え約 20-40 mL 流した。灌流固定終了後灌流針を抜き、断頭後全脳を摘出し、テフロンパックに入れ 4%パラホルムアルデヒド中で保存した。保存期間は最長 3 日間とした。

<切片作製>

固定済の標本を自動固定包埋装置（サクラ精機）を用いて脱水し、有機溶媒に十分に馴染ませた後脱脂し、パラフィンを浸透させ、Tissue Teck 包埋システムを用いてパラフィンプロックを作製した。次いで、1 日冷所で保存したパラフィンプロックを、ミトクロームを用いて厚さ 5 μ m の切片を作製し、スライドガラスに乗せて、パラフィン伸展器を用いて 37℃条件下で一晩乾燥させた。

1.2.5. MPO 抗体を用いた免疫組織学的検討

<使用試薬>

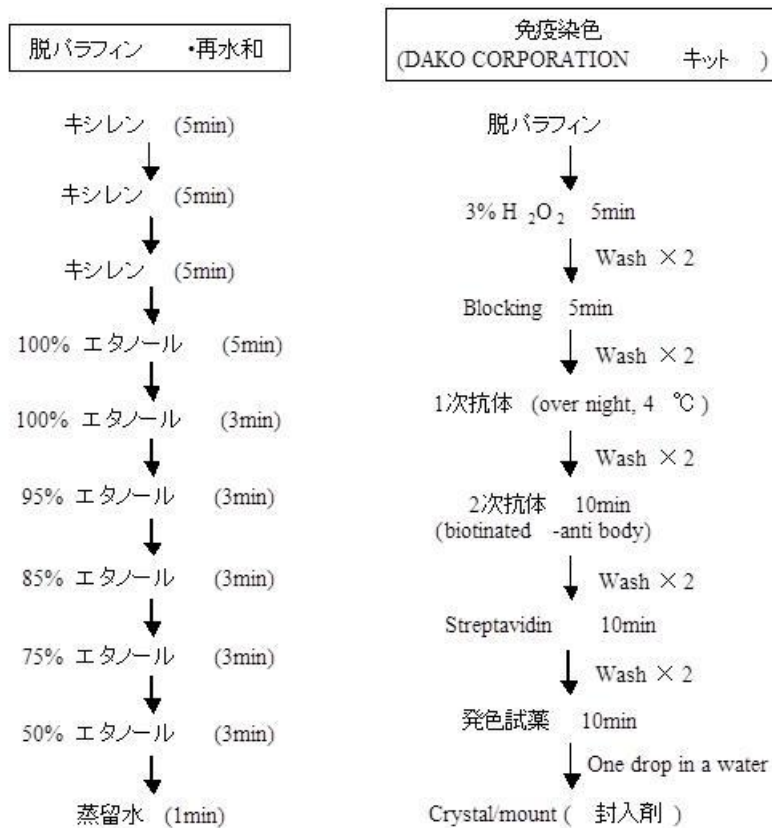
(a) TBS

1 M Tris-HCl (pH 7.4, ULTROL[®] Grade CALBIOCHEM[®] 製) 20 mL, NaCl 9 g を蒸留水に混合し総量を 1 L にして調製した。

(b) Primary antibody: anti-myeloperoxidase (Dako:Polyclonal Rabbit)

TBS を用いて 200 倍希釈を行った。

<免疫染色の手順>



1.2.6. MPO 酵素活性測定法

<使用試薬>

(a) Hexadecyltri-methylammonium bromide (HTAB)

HTAB (Sigma 製) を 0.5% (w/v) になるように蒸留水で希釈した.

(b) 50mM K₃PO₄ (pH6)

K₃PO₄ (212.28 g/mol, Sigma 製) 10.6g を蒸留水に混合し総量を 1L にして, その後リン酸を用いて pH6 に調製した.

(c) o-dianisidine dihydrochloride

o-dianisidine dihydrochloride (Sigma 製) 33.4mg を蒸留水に混合し総量を 10mL に調製した.

(d) Hydrogen peroxide (H₂O₂)

30% H₂O₂ (Wako 製) を蒸留水に混合し 1% に希釈して用いた.

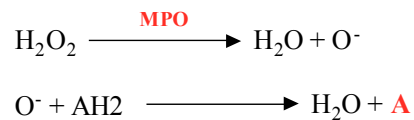
<実験手続き>

マウスの脳を摘出し, 小脳を取り除いた後, 速やかに虚血同側と虚血反対側に分画した. それぞれの脳組織の重量を測り, 1g に対して 1 mL の割合で HTAB を加え, ホモジナイズした. そ

れをを遠心分離 (4°C, 15,000 rpm, 3 min) し, 上清を採取 sample とした.

<測定原理>

MPO はマクロファージ/好中球の細胞内顆粒内に存在しており, MPO 酵素活性を測定することによりこれらの細胞の活性化を間接的に測定することができる. MPO のオキシダーゼ活性を利用して H_2O_2 を分解し, その後 o-dianisidine dihydrochloride が還元されることにより 450 nm に最大吸収波長を持つ赤橙色を発色する.



また, 1mol の H_2O_2 が分解したときに与える吸光度への影響は $\Delta A = 1.13 \times 10^4 / \text{min}$ であることが知られている. よって, $1 \mu\text{mol}$ の H_2O_2 が分解したときに与える吸光度への影響は $\Delta A = 1.13 \times 10^{-2} / \text{min}$ である. そこで, 今回 $1 \mu\text{mol}$ の H_2O_2 が分解したときに与える吸光度への影響を 1Unit of MPO とした.

1.2.7. ELISA 法

1.2.7.1. 血中タンパク質の抽出

炎症性サイトカインである HMGB1 を脳梗塞後の炎症マーカーとして測定をする.

採血は, エーテル麻酔下で MCA 閉塞から 1, 7, 14 日後にマウスの下大静脈より行い, それぞれ 1000 μL を採血した. その後, 遠心分離(3000rpm, 10min)を行い, その上清を 400-500 μL 取り, microcon YM-100 (Millipore 製) にて遠心分離濾過を行った. その抽出液を HMGB1 ELISA kit (シノテスト) を用いて血漿中 HMGB1 濃度を測定した

1.2.8. Western blotting

1.2.8.1. 脳分画からのタンパク質抽出

<使用試薬>

(a) TBS

1 M Tris-HCl (pH 7.4, ULTROL[®] Grade CALBIOCHEM[®] 製) 20 mL, NaCl 9 g を蒸留水に混合し総量を 1 L にして調製した.

(b) Cell Lysis buffer

Pro-prep (メーカー) を使用した.

<実験手続き>

マウスの脳を摘出し、速やかに大脳皮質、線条体を分画した。それぞれの組織の重量を測り、1 g に対して 2 mL の割合で Lysis buffer を加え、氷中にてホモジナイズした。ホモジネートを遠心分離（4 °C, 15,000 rpm, 30 min）し上清を採取しタンパク質抽出液を得た。

1.2.8.2. タンパク質濃度測定

<使用キット>

タンパク質濃度測定には Protein Quantification Kit-rapid（（株）同仁化学研究所）を用いた。

<実験手続き>

タンパク質抽出液は TBS を用いて 50 倍希釈し測定用サンプルとした。検量線用の BSA 希釈溶液は付属の 4000 µg/mL の BSA 溶液を TBS で順次 2 倍希釈し、2000～32.0 µg/mL BSA 希釈溶液を調製した。96 well マイクロプレートに検量線用 BSA 希釈溶液または測定用サンプル 4 µL を添加した。CBB solution 200 µL を各 well に加えて攪拌した。室温で 2 分間以上静置し、MICROPLATE READER Model 550（BIO-RAD 製）を用いて 595 nm での吸光度を測定した。横軸に BSA の濃度を取り、BSA 希釈溶液の吸光度を縦軸に取り検量線を作製した。検量線を基に測定用サンプルの濃度を算出し希釈倍率を乗じることによりタンパク質抽出液の濃度を求めた。

<測定原理>

Bradford 法は酸性溶液中、トリフェニルメタン系青色色素の Coomassie Brilliant Blue G-250 がタンパク質と結合することで、最大吸収波長が 465 nm から 595 nm にシフトすることにより色調が赤紫色から青色に変化することを利用してタンパク質を定量する方法である。吸収波長のシフトは色素とタンパク質との疎水性相互作用およびイオン相互作用に基づいている。この測定法の長所は、妨害物質の影響を受けにくく、操作が非常に簡単であることであり、短所はタンパク質の種類により発色率に差があることである。また、界面活性剤の混入により発色が妨害されることがある。

測定キットの取扱説明書に Triton X-100 の測定に誤差を与える濃度は 0.125% と記載されている。タンパク質抽出において膜タンパク質の可溶化のため 0.1 % Triton X-100 を加えているが、測定時には 50 倍希釈し Triton X-100 の測定時濃度は 0.0025 % となり測定値に誤差を与えないと考えられる。よって使用サンプル量が少量で良いことから有用であるため本測定法を採用しタンパク質濃度を測定した。

1.2.8.3. SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) および Westernblot

<使用試薬>

(a) TBS

1 M Tris-HCl (pH 7.4, ULTROL[®] Grade CALBIOCHEM[®] 製) 20 mL, NaCl 9 g を蒸留水に混合し総量を 1 L にして調製した.

(b) 2×SDS sample buffer

0.25 M Tris-HCl (pH 6.8) 50 mL, SDS 4.0 g, Glycerin 20 mL, 蒸留水 30 mL, BPB 10 mg を混合し調製した. 使用直前にはこの一部を分取し, 2-メルカプトエタノールを終濃度 100 μ L/mL となるように加えた.

(c) TBS-T

TBS に 0.1 % となるように Tween 20 を加えて調製した.

(d) Transfer buffer

2.4 g Tris, 14.2 g glycine, 200 mL メタノールを混合し総量 1 L にし, 10 % SDS 1 mL を加えて調製した.

(e) Blocking buffer

100 mL TBS に 5 g スキムミルクを混合して調製した.

(f) 12 % アクリルアミドゲル

0.75 M Tris-HCl (pH 8.8) 10 mL, 29 % アクリルアミド / 0.5 % ビスアクリルアミド 8.0 mL, 10 % SDS および蒸留水 1.6 mL を混合しする. TEMED 10 μ L および 10 % APS 75 μ L を加えて良く攪拌し重合を開始した後, 泳動ゲル板のガラス板の間に重層した. 溶液上部にコームを挿しこみゲルが固まるまで静置した. ゲルが固まった後コームを外し, 使用するまで 4 $^{\circ}$ C で保存した.

<実験手続き>

上記 2 で求めたタンパク質濃度から 3 mg/mL になるように TBS を用いて希釈した. 2×SDS sample buffer を等量加え加温 (95 $^{\circ}$ C, 2 min) し SDS sample (タンパク質濃度 1.5 mg/mL) とした. SDS sample 10 μ L (総タンパク質量 15 μ g) を SDS-PAGE (12 % アクリルアミドゲル, 定圧 200V, 1 hour) を用いて分離した. タンパク質は PVDF メンブレンに転写 (2 mA/cm², 1.5 hour) 後, TBS-T での洗浄を 3 回行なった. メンブレンを Blocking buffer を用いて 4 $^{\circ}$ C で 3 時間インキュベートした. TBS-T で 3 回洗浄し, 1 次抗体 (anti-CB1 200:1, anti-GAPDH 1000:1) を加えた 5% スキムミルクを含む TBS 中で 4 $^{\circ}$ C 終夜インキュベートした. TBS-T で 3 回洗浄し, 2 次抗体 (anti-rabbit IgG 1000:1) を加えた 1 mg/mL BSA を含む TBS-T 中でインキュベーション (室温, 2 hour) した. TBS-T で 3 回洗浄し, 発色液 (ECL plus) を用いて発色させた.

<原理>

SDS-PAGE ; アクリルアミドゲル電気泳動はアクリルアミドとビスアクリルアミドの重合体によって形成された孔によりタンパク質を分離する手法である。タンパク質を未変性状態でゲル電気泳動により分離すると、その移動度は分子量およびタンパク質が持つ電荷や形状により影響を受ける。SDS は親水基のスルホン基 ($-\text{SO}_4^-$) と疎水基の ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}$) -を持つ陰イオン性界面活性剤である。SDS 存在下にてタンパク質を変性させた状態でのゲル電気泳動 (SDS-PAGE) ではタンパク質 1 g あたり 1.4 g の SDS が結合し、タンパク質自身の持つ電荷を打ち消す。また、2-メルカプトエタノールなどの還元剤を用いることにより分子内のジスルフィド結合を切断し、-SH 基の酸化を防ぐとタンパク質は直鎖状となる。このように SDS-PAGE はタンパク質を分子量によってのみ分離する方法として汎用されている。

Western-blot ; SDS-PAGE によって分離したタンパク質を通電によって膜に転写後、目的タンパク質に対する 1 次抗体、1 次抗体に対する 2 次抗体 (anti-IgG) を反応させ、2 次抗体に結合している酵素 (アルカリフォスファターゼ (AP) やホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP)) または放射活性物質により目的タンパク質を検出する方法である。検出方法としては RI、化学発光および化学発色法がある。今回用いた化学発色法は感度が低いが高くないが、CB₁ タンパク質および GAPDH を検出可能であることを確認した後、MCAo 処置等での CB₁ タンパク質発現量の検討を実施した。

<試薬>

1 次抗体	anti-HMGB1 (Rabbit)	CALBIOCHEM 製
	anti-CD36 (Rabbit)	Santa Cruz Biotechnology, inc. 製
	GAPDH (FL-335): sc-25778	Santa Cruz Biotechnology, inc. 製
2 次抗体	Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)-AP	BIO-RAD 製
発色キット	ECL plus	BIO-RAD 製
Tris ; (2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol Tris(hydroxymethyl)aminomethane)	ULTROL [®] Grade	CALBIOCHEM [®] 製
Protease inhibitor cocktail for General Use Lyophilized solution	SIGMA 製	
Triton X-100	SIGMA 製	
SDS (Sodium Dodecylsulfate)	和光純薬工業製	
Tween 20	BIORAD 製	
BPB (Bromophenol Blue)	SIGMA 製	
Brilliant Blue (CBB ; Coomassie Brilliant Blue)	SIGMA 製	

Immun-Blot® PVDF メンブレンシート 10 × 15 cm BIO-RAD 製
TEMED (N,N,N',N'-tetramethyl ethylenediamine) 和光純薬工業製
NaCl 和光純薬工業製
2-メルカプトエタノール 東京化成工業製
Glycerin (Glycerol) キシダ化学製
Acrylamide 電気泳動用 生化学工業製
N,N'-Methylenbis-(acrylamide) 和光純薬工業製
APS (Ammonium Persulfate) 林純薬工業製
EGTA (Ethylene glycolp-bis (2-aminoethyl-ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid) SIGMA 製
EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid tetrasodium salt)
Glycine 和光純薬工業製
スキムミルク 雪印製

<機器>

ミニプロティアン 3 セル BIORAD 製
トランスブロット SD セル BIORAD 製

1.3. 統計処理

独立した 2 群間の比較には student t-test を使用し、また多重比較を行う場合は Tukey's test を使用した。なお、危険率が 5% である場合を統計学的に有意差有りとした。

2. 実験結果

2.1. BBB 崩壊時間の検討

再灌流直後の脳実質内に Evans blue の浸潤は視覚的にはみられなかったが、再灌流 2 時間後より視覚的に脳実質内に Evans blue の浸潤が確認できるようになった (図 10)。

2.2. 虚血後の脳内 MPO の変化

MPO 免疫染色像を図 11 に示した。MPO 免疫陽性細胞は脳虚血 1 日後及び 3 日後に最も観察され、7 日後ではほとんど観察できなかった。

2.3. MPO 酵素活性測定

MPO 酵素活性を図 12 に示した。MPO 酵素活性は虚血後 4 時間から徐々に上昇し、虚血 24 時間後にピークに達した。その後は徐々に低下し、虚血 168 時間後には有意な活性は認められなか

った. (control 0.066 ± 0.052 U/g, sham group (ope24 時間後) 0.052 ± 0.033 U/g, 再灌流直後(虚血 4 時間後) 0.386 ± 0.032 U/g, 再灌流 1 時間後 (虚血 5 時間後) 0.610 ± 0.099 U/g, 再灌流 8 時間後 (虚血 12 時間後) 0.64 ± 0.032 U/g, 再灌流 20 時間後 (虚血 24 時間後) 0.698 ± 0.048 U/g, 再灌流 68 時間後 (虚血 72 時間後) 0.340 ± 0.022 U/g, 再灌流 164 時間後 (虚血 168 時間後) 0.142 ± 0.016 U/g), 再灌流 336 時間後 (虚血 332 時間後) 0.18 ± 0.020 U/g).

2.4. 虚血後の血中及び脳内 HMGB1 の発現量

結果を図 13 に示した. 虚血後血漿中の HMGB1 は徐々に増加した. 一方で脳内の HMGB1 は虚血後 1 日目で低下し, 14 日目にかけて明らかな発現量の増加が認められた. 詳細は以下の通りである.

<血漿中 HMGB1>

Sham ; 35.3 ± 0.9 ng/ml

4h MCA 閉塞; 1 日後 112.1 ± 2.3 ng/ml, 3 日後 122.1 ± 16.6 ng/ml, 7 日後 192.1 ± 14.8 ng/ml, 14 日後 143.0 ± 14.0 ng/ml.

<脳内 HMGB1 (線条体)>

Sham; 1

4h MCA 閉塞; 1 日後 0.5 ± 0.1 , 3 日後 0.6 ± 0.14 , 7 日後 1.2 ± 0.5 , 14 日後 2.0 ± 0.5 .

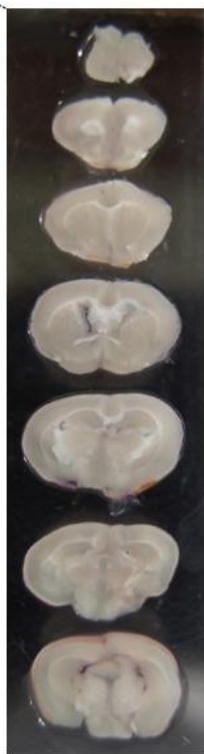
2.5. 虚血後の脳内 CD36 受容体の発現量変化

虚血後の脳内 CD36 受容体の発現量変化についての結果を図 14 に示した. MCA 閉塞後, 1 日目をピークに 3 日目まで CD36 の発現量増加が認められた.

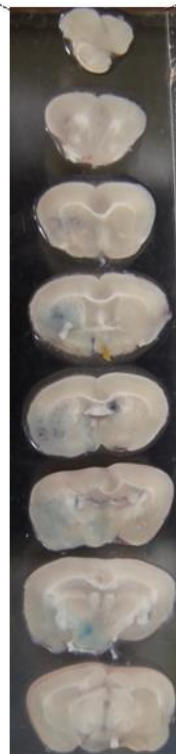
Immediately after reperfusion in 4h MCAO



2hr after reperfusion in 4h MCAO



断面



断面

図10 4hMCA閉塞後のBBB崩壊に伴うEvans blueの脳内浸潤

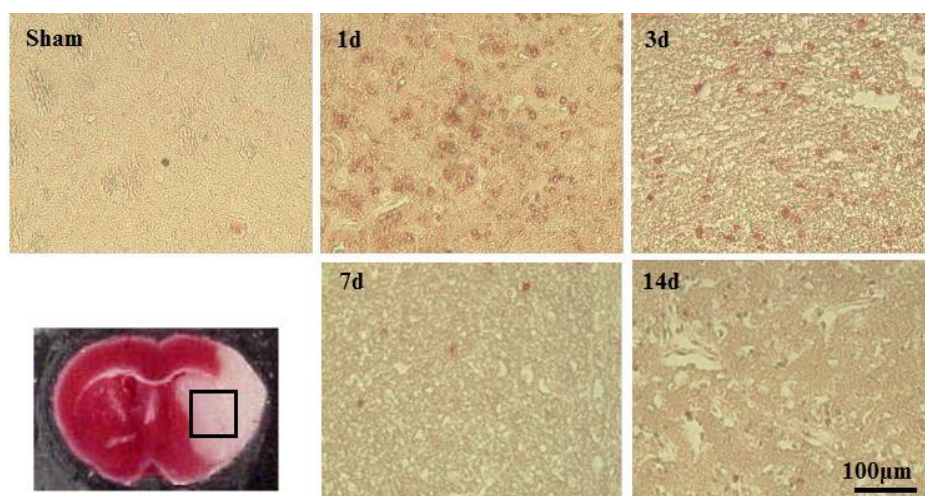
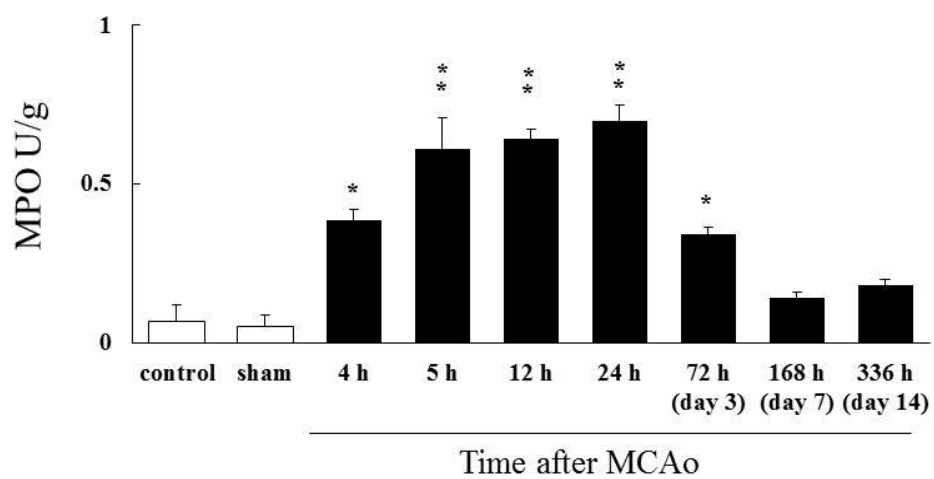


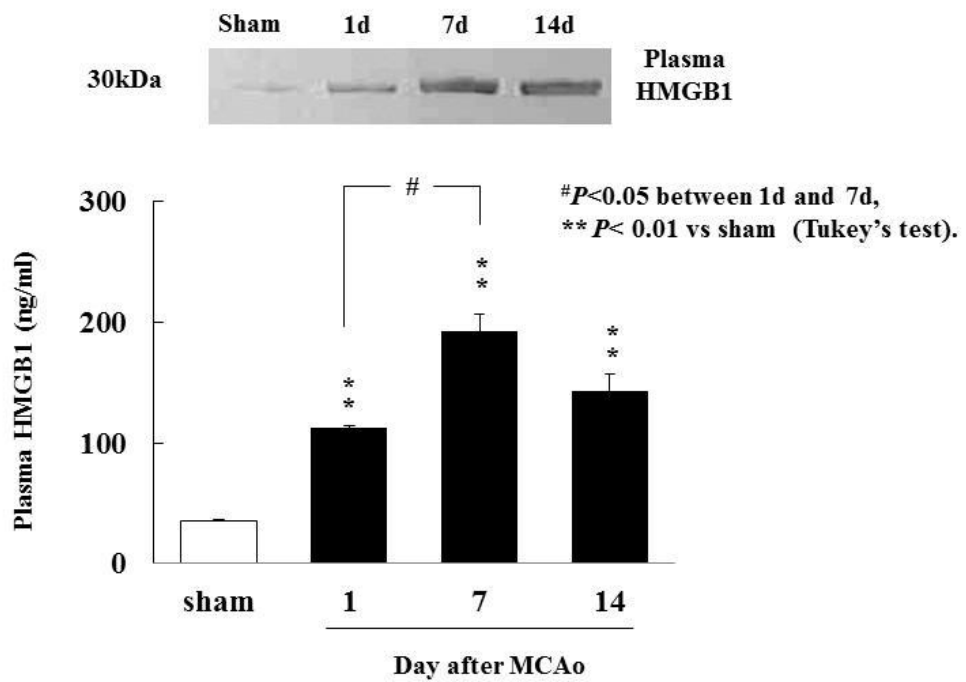
図11 4hMCA閉塞後のMPO免疫染色



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs sham (Tukey's test).

図12 4hMCA閉塞後のMPO酵素活性

(A) Plasma



(B) Brain (striatum)

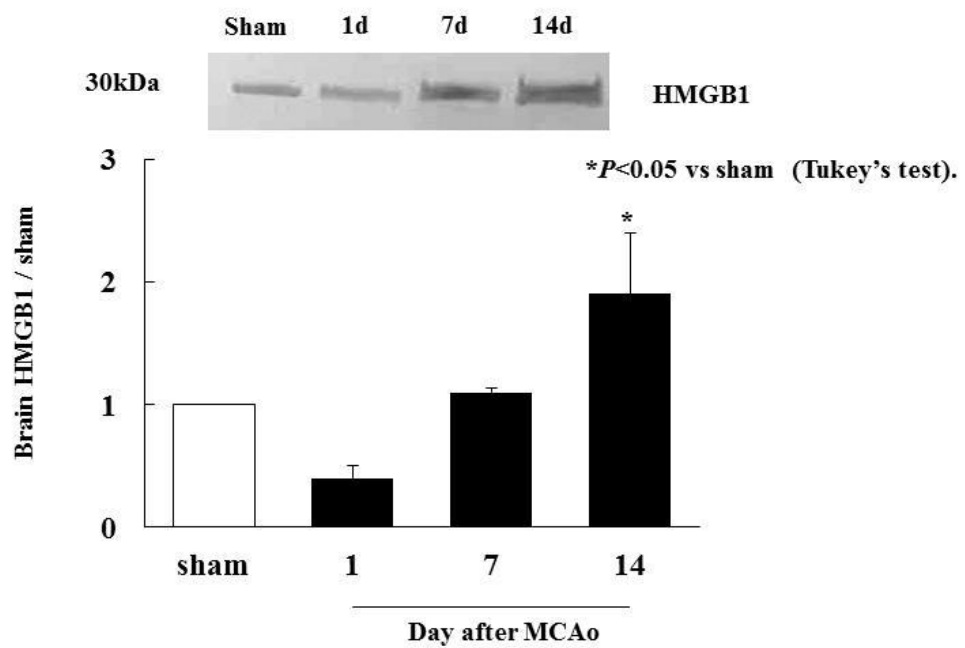
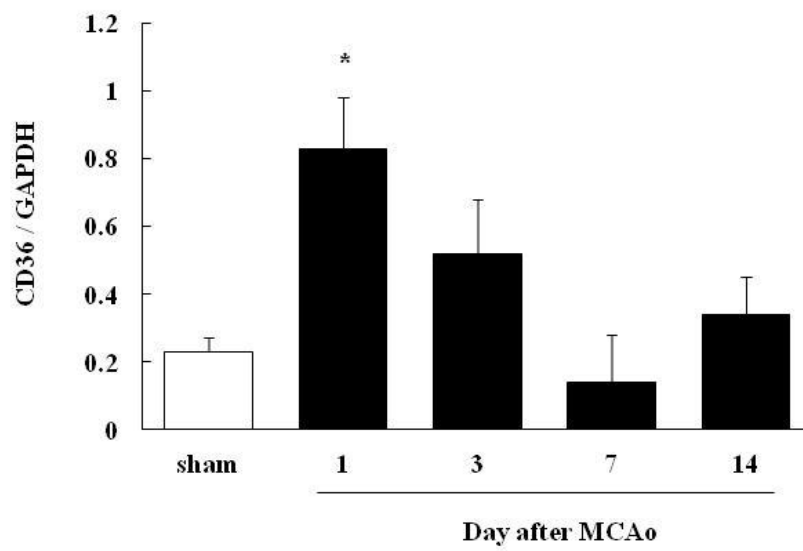
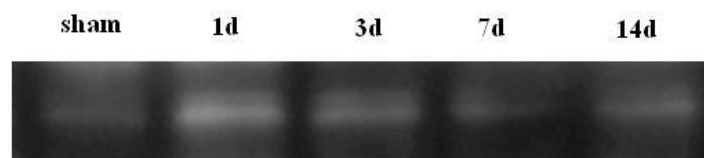
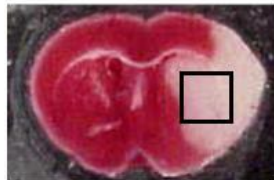


図13 4hMCA閉塞後の血中及び脳内HMGB1発現量の変化

Brain (striatum)



* $P < 0.05$ vs sham (Tukey's test).

図14 4hMCA閉塞後のCD36の発現量変化

第4節 脳虚血後の脳内変化 (慢性期) <脳内グリア細胞の活性化と器質的変化>

1. 実験材料ならびに実験方法

1.1. 実験動物ならびに飼育方法

実験動物ならびに飼育方法は、第1章第1節 1.1.と同様である。

1.2. 実験手続き

1.2.1. MCA 閉塞マウスの作成手順

MCA 閉塞マウスの作成手順は、第1章第1節 1.2.1.と同様である。

1.2.2. 脳萎縮率の測定

MCA 閉塞後 1,3,7,14,28 日後の線条体及び大脳皮質を含む切片から、虚血同側と反対側の面積の割合を求め、脳虚血後の経日的な脳萎縮の程度を評価した。

$$\text{脳萎縮率} = (\text{脳虚血同側の面積}) \div (\text{反対側の面積})$$



虚血同側

虚血反対側

1.2.3. 組織標本の作製方法

作成手順は、第1章第3節 1.2.2.1.と同様である。

1.2.4. Hematoxylin-Eosin (H&E) 染色の手順

<使用試薬>

(a) Mayer Hematoxylin 液

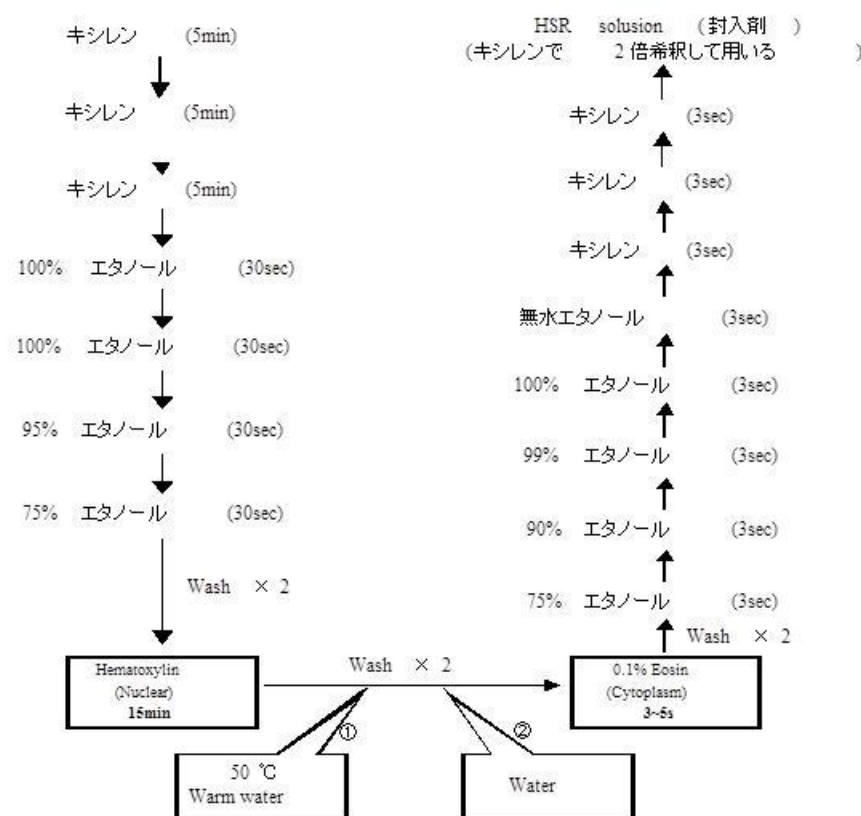
Hematoxylin	1g	クエン酸	1g
ヨウ素酸ナトリウム	0.2g	硫酸アルミニウムカリウム	50g
抱水クロラル	50g	蒸留水	900ml

(b) Eosin 液 (1%アルコール・エオシン保存液)

Eosin Y	1g
蒸留水	20ml
95%エタノール (溶解後に加える)	80ml

使用する際は80%エタノールで10倍希釈して0.1%液とし、100mLあたりに酢酸を0.5mL (1-2滴) 加える。

<H&E 染色の手順>



1.2.5. Iba1 及び GFAP 抗体を用いた免疫組織学的検討

<使用試薬>

(a) TBS

1 M Tris-HCl (pH 7.4, ULTROL[®] Grade CALBIOCHEM[®] 製) 20 mL, NaCl 9 g を蒸留水に混合し総量を 1 L にして調製した。

(b) Primary antibody: anti-Iba1 (Wako 製: Polyclonal Rabbit)

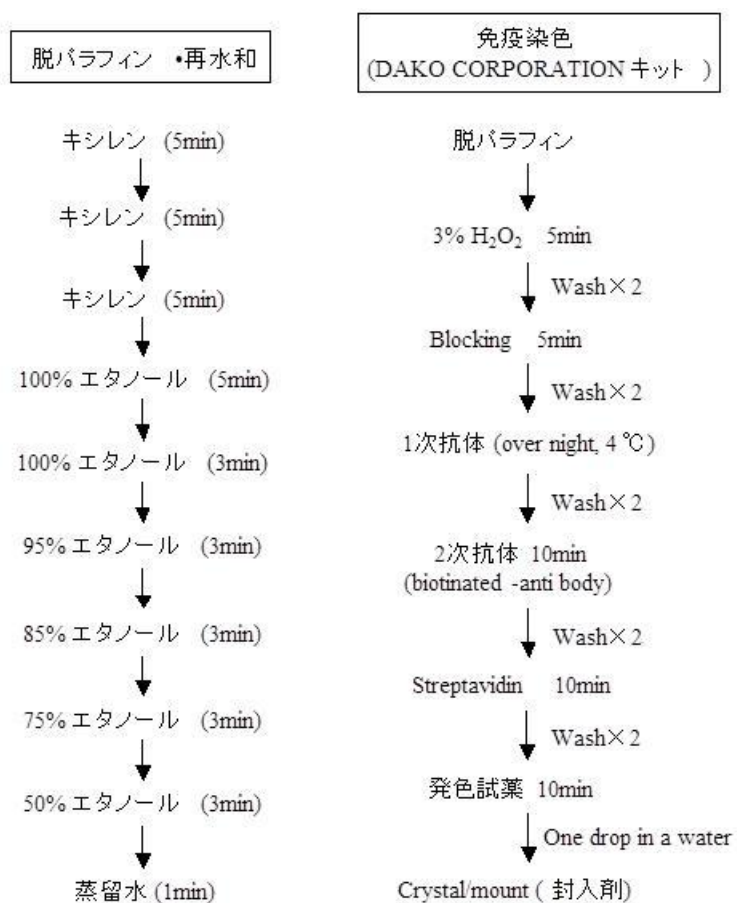
TBS を用いて 200 倍希釈を行った。(Iba1 は activated microglia/macrophage が有するタンパク質である。)

(c) Primary antibody: anti-GFAP (ベントナジャパン製:Polyclonal Rabbit)

anti-Iba1 (ベントナジャパン製:Polyclonal Rabbit)

TBS を用いて 200 倍希釈を行った。(GFAP は astrocyte が有する骨格タンパクである。Iba1 は microglia や macrophage 固有のタンパクである。)

<免疫染色の手順>



1.2.6. 可視染色

Iba1 及び GFAP 染色

使用する 1 次抗体は、第 1 章第 4 節 1.2.5.と同様である

Secondary antibody: goat anti-rabbit IgG (Santa cruz製)

発色試薬はDABを用いて行った。

1.2.7. Western blotting法

1.2.7.1. 脳分画からのタンパク質抽出

方法は第 1 章 3 節 1.2.2.3.2.と同様に行った。

1.2.7.2. タンパク質濃度測定

方法は第 1 章 3 節 1.2.2.3.3.と同様に行った.

1.2.7.3. SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) および Westernblot

方法は第 1 章 3 節 1.2.2.3.4.と同様に行った.

1.3. 統計処理

独立した 2 群間の比較には student t-test を使用し, また多重比較を行う場合は Tukey's test を使用した. なお, 危険率が 5%である場合を統計学的に有意差有りとした.

2. 実験結果

2.1. MCA 閉塞後の脳内グリア細胞及び脳内マーカーの発現量変化

2.1.1. MCA 閉塞による脳萎縮率の変化

脳萎縮率の経日的変化を図 15 に示した. MCA 閉塞後 1 日目には虚血同側の面積の増大傾向が見られた. しかしながら, その後経日的に虚血同側の面積は縮小し, 脳萎縮が認められた.

<脳萎縮率>

Sham : $101.6 \pm 3.7\%$

4h MCA 閉塞 1 日後 : $111.9 \pm 1.9\%$, 3 日後 : $106.5 \pm 2.6\%$, 7 日後 : $92.6 \pm 2.6\%$,

14 日後 : $80.0 \pm 5.5\%$, 28 日後 : $76.5 \pm 3.6\%$

2.1.2. H&E 染色

H&E 染色像を図 16 に示した. 4hMCA 閉塞後 1~3 日目までに組織損傷が確認でき, その後 7 日目には梗塞巣領域の空洞化が起き, 14 日後には細胞の凝集が認められた.

2.1.3. Iba1 染色

Iba1 染色像を図 17 に示した. 4hMCA 閉塞 7 日後から虚血中心部より周辺部にミクログリアのマーカータンパク質である Iba1 陽性細胞が多く見られるようになり, 虚血 14 日後に Iba1 陽性細胞が虚血中心部に凝集していることが確認された.

2.1.4. GFAP 染色

GFAP 染色像を図 18 に示した. 4hMCA 閉塞の 3 日後からアストロサイトのマーカータンパク質である GFAP 陽性細胞の活性化が, 虚血中心部より周辺部で多く観察された.

2.1.5. Iba1, GFAP のタンパク定量

結果を図 19 に示した. MCA 閉塞後 14 日目で, 梗塞巣中心部となる線条体ではミクログリアの有意な発現量増加と, 梗塞巣周辺部である皮質においてはアストロサイトノ発現量増加が認められた.

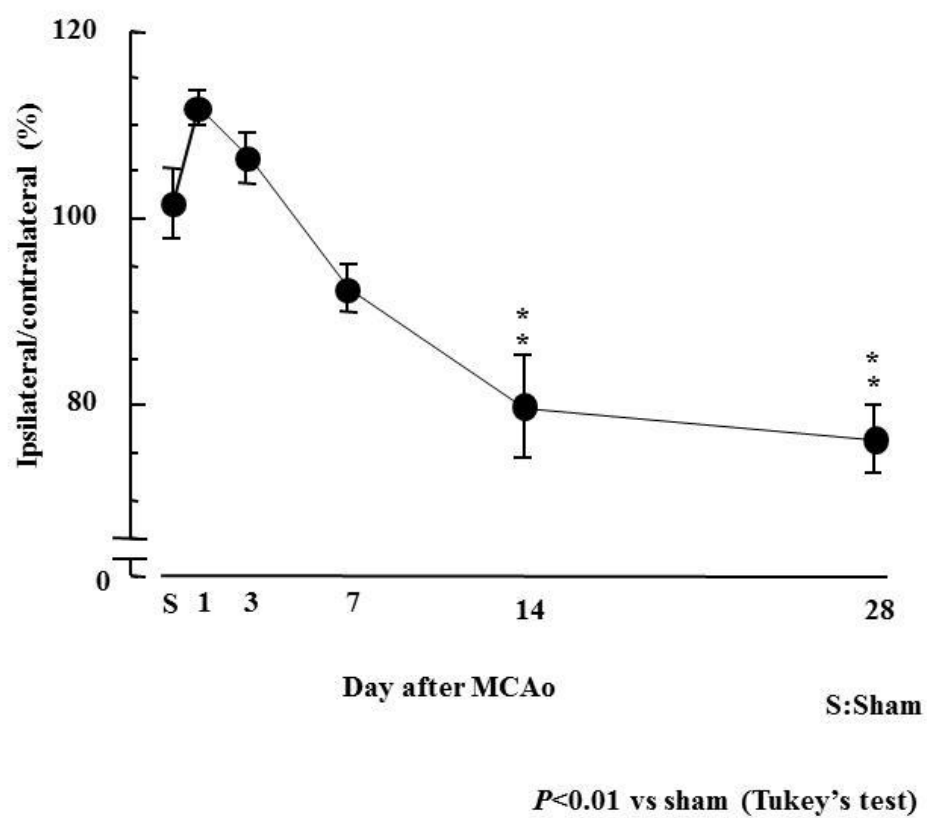


図15 4hMCA閉塞後の脳萎縮率



青：核
赤：組織

全体像

梗塞巣周辺

梗塞巣中心部

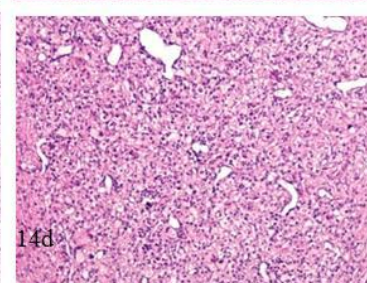
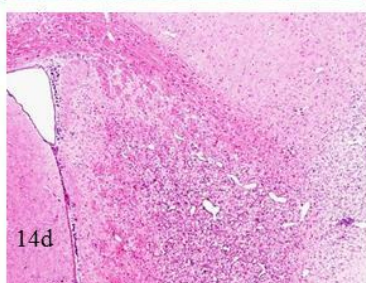
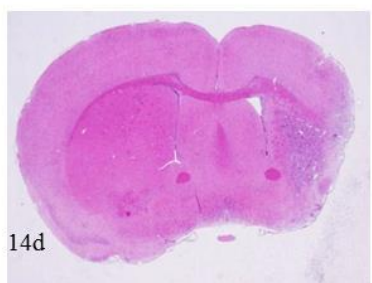
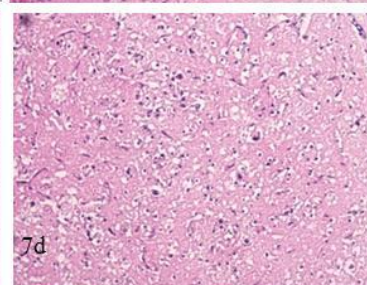
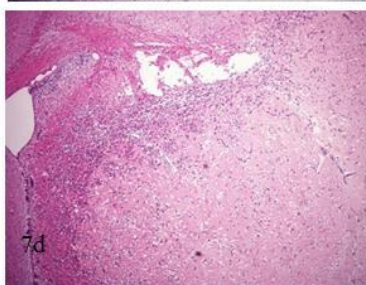
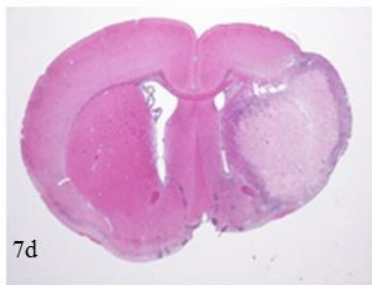
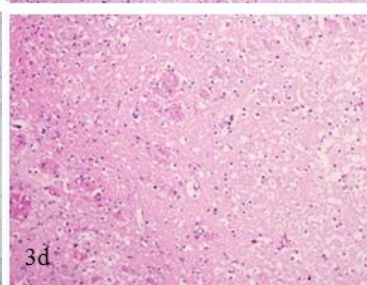
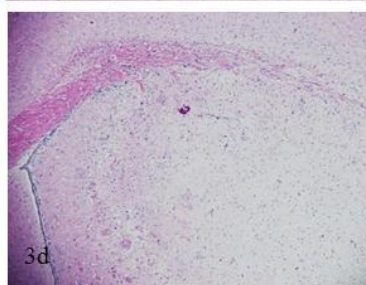
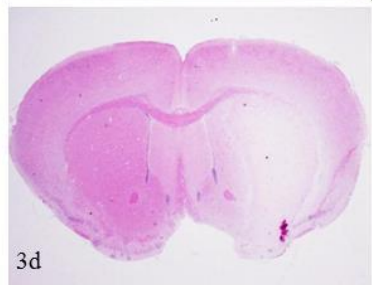
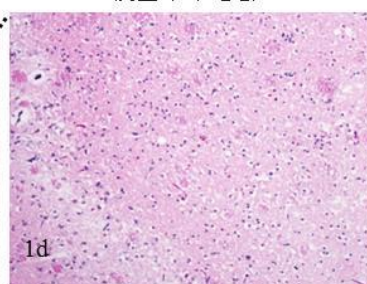
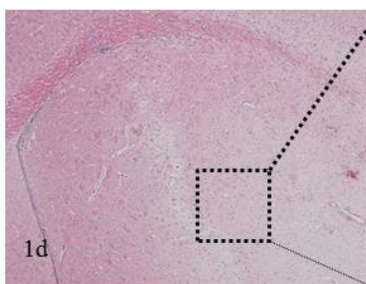
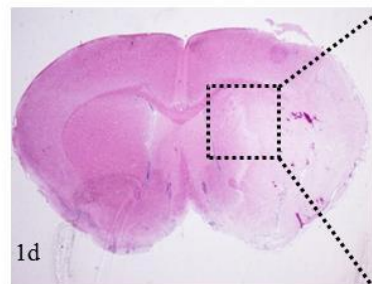


図16 4hMCA閉塞後のHE染色

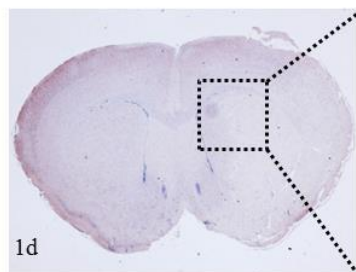


青 : 核
茶 : Iba1陽性細胞 ; ミクログリア

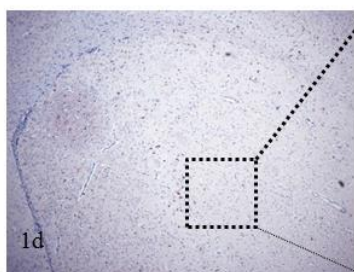
全体像

梗塞巣周辺

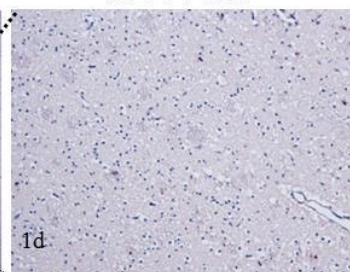
梗塞巣中心部



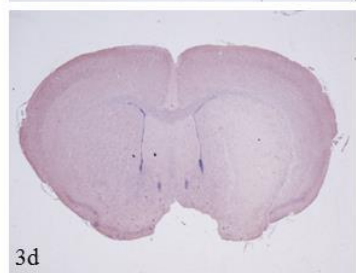
1d



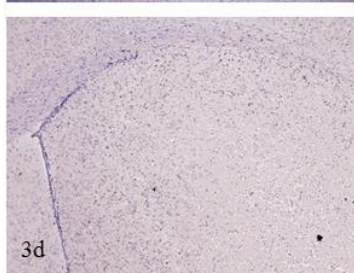
1d



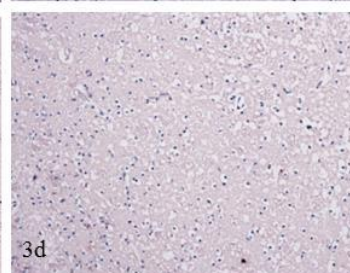
1d



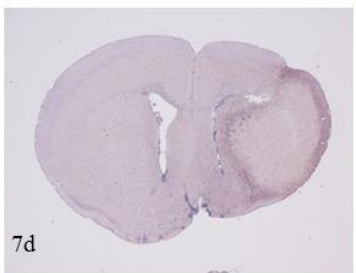
3d



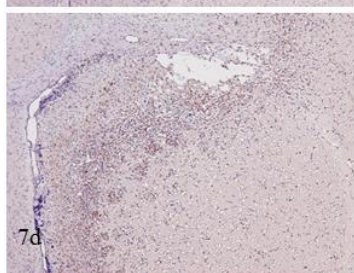
3d



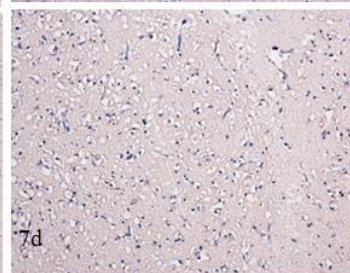
3d



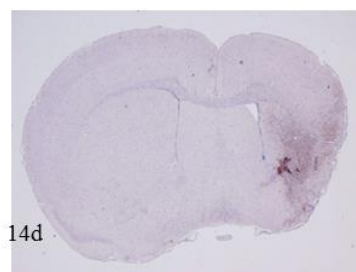
7d



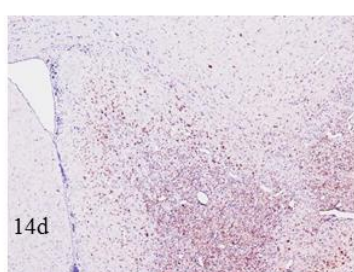
7d



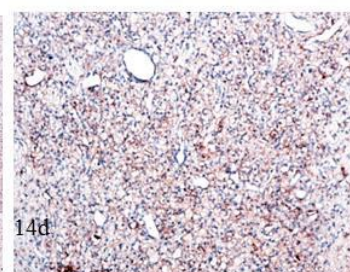
7d



14d



14d



14d

図17 4hMCA閉塞後のIba1染色



青：核
茶：GFAP陽性細胞；アストロサイト

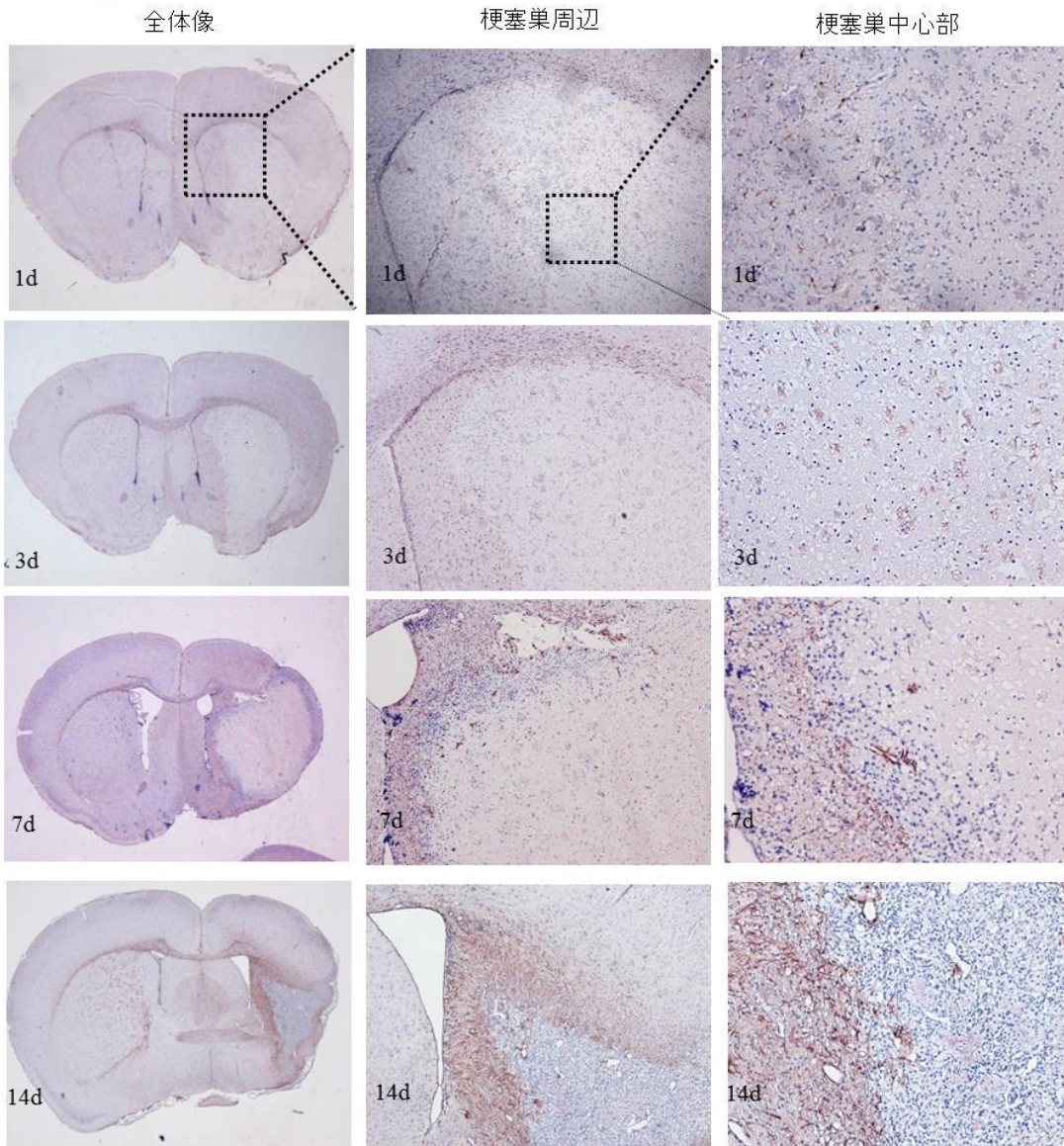


図18 4hMCA閉塞後のGFAP染色

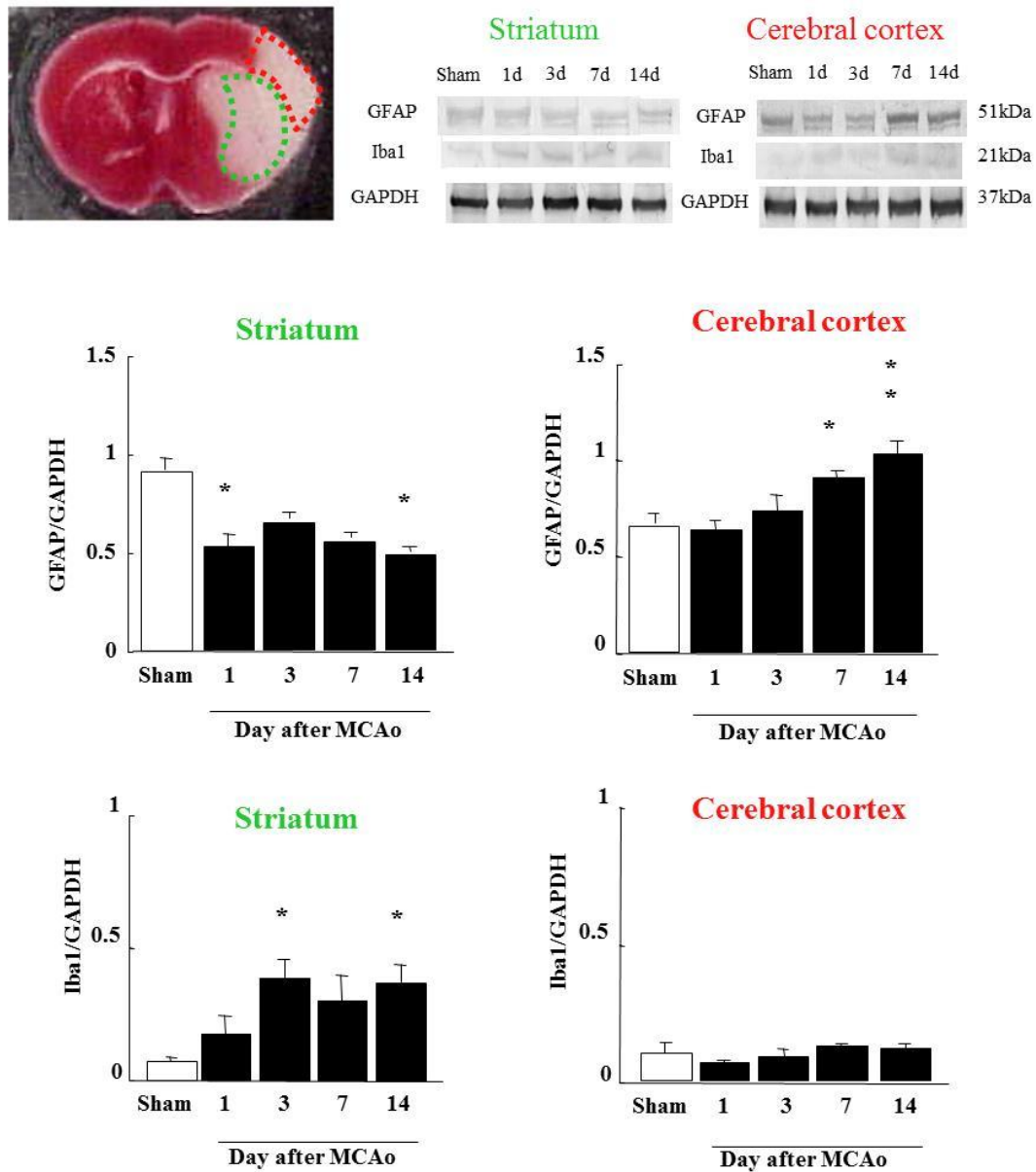


図19 4hMCA閉塞後のIba1とGFAPの経時的な発現量変化

考察

本章では、MCA 閉塞モデルマウスの基礎検討として、MCA 閉塞による行動学的・組織学的変化を評価し、脳梗塞の病態を反映したモデルマウスであることを検証した。更に、本モデルマウスを用いて脳梗塞後の脳内環境を明らかにし、新規脳梗塞治療薬のターゲットとなりえる標的分子を探索した。

第1節では MCA 閉塞後に梗塞巣が形成されていることを確認し、MCA 閉塞後の運動機能の経日的な変化を検討した。TTC 染色の結果から、MCA を閉塞されたマウスの 線条体領域には梗塞巣が形成されていることが明らかとなった。また、神経障害 (Neurological score)、協調運動、生存率について検討した結果、Neurological score は、脳虚血後 1-3 日目をピークに上昇し、その後 7 日目以降は回復傾向になることが示唆された。また、協調運動に関しても、急性期をピークとし、脳虚血後 7 日目以降から改善がみられた。生存率に関しても、脳虚血後 7 日目までに急激に低下していくが、7 日目のピークを超えるとその後は生存率も安定していた。以上のことから、脳虚血後 1-7 日目は脳梗塞の急性期症状を引き起こし、7 日目以降は回復期となるモデルマウスであることが明らかとなった。

第2節では、MCA 閉塞後、急性期の脳内ではどのような反応が起きているのかを明らかにした。まず、MCA 閉塞時、虚血同側の大脳皮質領域における血流量は、閉塞前に比べて 80% 程度の低下がみられた。その後、塞栓子を引き抜くことで再灌流を施すが、一過性の脳血流量の上昇はみられたものの、MCA 閉塞 24 時間後には再度脳血流量の低下が生じていることが明らかとなった。このことから、MCA 閉塞時には塞栓子による血流障害が生じ、塞栓子の再灌流後には微小循環障害などによる血流障害が生じるモデルであることが明らかとなった。また、脳虚血時の脳内の生理機能の変化としてグルタミン酸の遊離量について検討を行った。その結果、脳内のグルタミン酸遊離量は MCA 閉塞後より上昇を示し、再灌流後には改善を示した。神経細胞は脳梗塞などの重度の低酸素に曝露されると、細胞内のエネルギー源が枯渇し、 Na^+/K^+ -ATPase が活動を停止することが知られている。これにより、細胞内に Na^+ が蓄積し、電気化学的勾配が変化することで、細胞外へ大量のグルタミン酸が放出される。この細胞外の高濃度グルタミン酸はグルタミン酸受容体、N-methyl D-aspartate (NMDA) 受容体および非 NMDA 受容体などに作用する。特に NMDA 受容体は大量の Ca^{2+} を細胞内に流入させるため、プロテアーゼ活性化を誘導し、細胞骨格蛋白を分解する。このことが脳虚血後の神経細胞死を引き起こす最初の要因とされているが、本モデルマウスにおいても急性期において同様の症状が生じていると考えられる。

続いて第3節では、MCA 閉塞後、亜急性期の脳内ではどのような反応が起きているのか、特に炎症反応に着目して検証した。本来、炎症反応は生体内防御機構として、重要な役割を担っている。しかし、過剰な炎症反応は細胞障害、ラジカルの産生、脳浮腫等を引き起こす^{27, 28)}。脳梗塞

においても炎症反応が生じることが知られているが、更に血液脳関門が破綻した場合には様々な炎症性物質が脳内に誘導され、組織損傷の悪化を招く。本検討においても、虚血・再灌流後に Evans blue が脳実質内へ浸潤しており、血液脳関門が破綻していることが確認された。それに伴い、脳内では好中球由来の MPO 活性の上昇が認められ、炎症反応が活発化していることが認められた。このことから、脳梗塞後、急性期から亜急性期にかけては、血栓形成に伴う細胞障害と、炎症反応に伴う細胞障害が生じることが明らかとなった。

第 4 節では、第 1 節の結果より、MCA 閉塞後 7 日目以降の慢性期に運動機能の回復や神経障害の改善が見られるため、このときに脳内ではどのような変化が起きているのかを検討した。まず、脳梗塞による脳の萎縮については、虚血同側で脳虚血 7~28 日後に観察された。また、H&E 染色による組織学的な評価では、脳虚血 1, 3 日後では線条体及び大脳皮質を含む梗塞領域で、組織損傷や核の萎縮などが認められた。また、最も生存率が低下する脳虚血後 7 日目では、梗塞巣領域が空包化していることが認められ、組織損傷がピークに達していることが示唆された。その後、脳虚血後 14 日目の回復期では、7 日目では空包化になっていた領域に、細胞の凝集が見られていた。この梗塞巣領域への細胞の凝集が運動機能回復に因果関係があるのではないかと考えられる。Lee らは脳梗塞発症後、ミクログリアの活性化が脳損傷を悪化させ²⁴⁾、Cragnolini らはアストロサイトが NGF などの神経栄養因子を放出し、神経保護の役割を担うと報告している^{25, 26)}。このことから MCA 閉塞後のグリア細胞（ミクログリアやアストロサイト）の局在部位と発現量変化について、免疫染色法やウェスタンブロット法を用いて検討した。免疫染色法により、脳虚血後 1, 3 日目は変化が認められなかったが、7 日目では梗塞巣領域の空包化した部位周辺でアストロサイトとミクログリアの活性化が認められた。その後 14 日目では、ミクログリアが梗塞部位へ集積し、その周辺部を埋めるようにアストロサイトが存在していた。ウェスタンブロット法においても、MCA 閉塞後 14 日目で、梗塞巣中心部となる線条体ではミクログリアの有意な発現量増加と、梗塞巣周辺部である皮質においてはアストロサイトの発現量増加が認められた。

我々の研究では、脳虚血後慢性期において、梗塞巣中心部に多くの TUNEL 陽性細胞が存在することを確認していることから、梗塞部位へ集積したミクログリアの食食作用により、TUNEL 陽性細胞の増加をもたらしたのではないかと考えられる。このことから、ミクログリアにより不要な細胞が食食され、その周辺部を埋めるようにアストロサイトが存在し、ミクログリアの働きを調節しているか、あるいはアストロサイトが NGF などを放出し、梗塞巣の拡大阻止や修復促進を行っているのではないかと考えられる。以上のことから、運動機能の回復に因果関係があると考えられた梗塞巣領域への細胞の凝集は、グリア細胞の活性化と特徴的な局在が関係していると考えられる。

以上のことより、MCA 閉塞後、脳内では血栓形成に伴う細胞障害、炎症反応による細胞障害、

グリア細胞による食食や神経保護作用等が段階的に生じることが明らかとなった。これらの結果は、臨床における脳梗塞後の脳内の反応とも類似しており、脳梗塞治療の検討を行う上で、適した脳梗塞モデルであると考えた。また、本検討より、脳梗塞治療において、いかに血管閉塞時間を短くできるか、また、炎症反応やラジカルの産生による2次的細胞障害を抑えられるかが重要であると考えた。そこで、我々は脳梗塞の増悪因子として炎症反応に着目した。

炎症反応については、近年、新たなサイトカインメディエータとして着目されている HMGB1 について検討をした。HMGB1 は、細胞核内に局在するクロマチン結合性の非ヒストンタンパクで、クロマチン構造の維持や DNA の修復などに重要な働きをしている。しかし、1999 年に Kevin Tracey らによって、HMGB1 は敗血症ショックの遅延性メディエータとして働くことが報告され、以後数々の炎症性疾患に関与しているということが明らかにされた^{29, 30, 31)}。その後、HMGB1 と脳梗塞との関連も多数報告され、Kim らは脳梗塞後に HMGB1 が大量に細胞外へ放出され、脳梗塞後の脳内炎症反応を増悪させていると報告している³⁰⁾。更に、Liu らは2時間 MCA 閉塞マウスの再灌流直後とその6時間後の2回、抗 HMGB1 抗体を尾静注すると、梗塞巣体積が減少し、運動麻痺が改善したと報告している³²⁾。また、HMGB1 は2つの相同な DNA 結合ドメイン (boxA, boxB) および C 末端ドメインの三部構造で形成されており (図 15)、RAGE (終末糖化産物受容体 図 16) や TLR (toll like receptor) 2, TLR4 に結合することが報告されている²⁹⁾。Muhammad らは、RAGE ノックアウトマウスはワイルドタイプマウスと比較して MCA 閉塞による梗塞巣体積が減少し、マクロファージ系細胞が減弱することを明らかにし、HMGB1 の受容体である RAGE が脳障害に寄与していると報告している³³⁾。こうした報告から、脳梗塞後に放出される HMGB1 による障害を抑制することが重要な治療法になりうる可能性が考えられる。そのため、本研究で使用した4時間 MCA 閉塞モデルマウスにおいても HMGB1 の挙動を把握する必要があると考えた。そこで、虚血後の血漿中および脳内 HMGB1 について検討したところ、MCA 閉塞後、7日目をピークに血漿中の HMGB1 の遊離量が増加していることが確認された。また、脳内 HMGB1 は虚血後1日目で一旦急激に減少し、虚血後14日目には有意に発現量が増加した。また、血漿中に遊離された HMGB1 は致死性の病態の場合にはより高値となるため、死のメディエータとしても考えられている³⁴⁾。実際に本研究で使用した4時間 MCA 閉塞モデルマウスにおいても、HMGB1 の血漿中濃度がピークに達する時期 (MCA 閉塞7日目) に、急激な生存率の低下が現れることが認められており、血漿中 HMGB1 値の上昇が起因となっている可能性が示唆された。以上のことより、脳虚血後、HMGB1 による炎症反応は脳虚血後の増悪因子として深く関与していると考えられる。実際に我々の研究において、テトラサイクリン系抗生物質であるミノサイクリンが、MCA 閉塞後の HMGB1 遊離量を抑制することで、脳虚血後の神経機能障害を改善したと報告している³⁵⁾。このことから、HMGB1 は脳梗塞発症後の予後を測るのに適切なマーカーであることが示唆された。

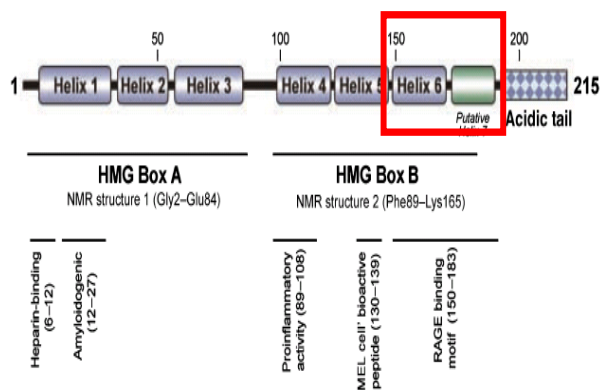


図 20 HMGB1 の構成

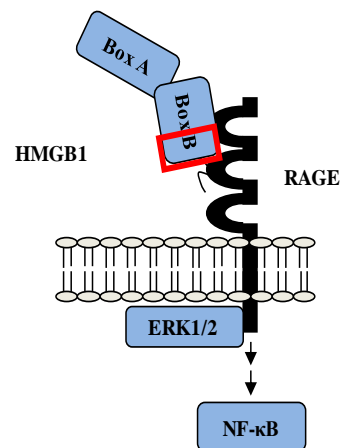


図 21 HMGB1 と RAGE との結合

また、その他の炎症マーカーとしてスカベンジャー受容体である CD36 の MCA 閉塞後の発現量変化を検討した。CD36 とは血管内皮、ミクログリア、単球やマクロファージなどの好中球上に発現している膜貫通型の蛋白であり²⁰⁾、そのリガンドには酸化 LDL²⁰⁻²²⁾ や thrombospondin 1²³⁾ などがある。CD36 はマクロファージを活性化させ、マクロファージの泡沫化を促進させるため動脈硬化を促進させるものとしても注目されている³⁶⁾。この CD36 は NF-κB を介して、炎症性サイトカインの産生に関与しており²¹⁾、CD36 ノックアウトマウスでは炎症反応の軽減により梗塞巣体積が減少すると報告されている²²⁾。また、ラジカルの産生能も高めることから^{37,38)}、組織損傷の引き金となる受容体のひとつであると考えられる。更に、Sunghee らは MCA 閉塞後、CD36 の発現量が増加することを報告している³⁸⁾。実際に本実験での MCA 閉塞モデルマウスにおいても、脳虚血後 1 日目をピークに 3 日目まで CD36 の発現量が増加していることが認められた。この発現量の増加は、好中球由来の炎症マーカーであるミエロペルオキシダーゼ (MPO) の活性化に由来するものであると考えられる。

以上より、CD36 の発現量変化及び HMGB1 等の炎症性物質を脳梗塞治療における標的分子にすることで、脳虚血後の組織損傷の軽減や予後改善を期待することができると考えた。

第2章 脳梗塞に対する新規治療薬の検討 (ADAMTS13 の脳梗塞治療への応用)

第2章では、唯一の脳梗塞治療薬である組織プラスミノゲンアクチベータ (t-PA) の治療効果と副作用について基礎的検討を行う。また、新規治療薬の候補として血液凝固制御因子のADAMTS13と呼ばれる生体内酵素に着目し、脳梗塞発症時におけるADAMTS13の病態生理的役割を解明する。更に、ADAMTS13を脳梗塞時に投与すると治療効果を得ることができるのか、t-PAとの比較検討を行う。

第1節 組織プラスミノゲンアクチベータ (t-PA) 投与による脳梗塞治療効果の検討

1. 実験材料ならびに実験方法

1.1. 実験動物ならびに飼育方法

実験動物ならびに飼育方法は、第1章第1節の1.1.と同様である。

1.2. 実験手続き

1.2.1. 使用薬物および実験スケジュール

<使用薬物>

アクチバシン (アルテプラゼ) 田辺三菱製薬

投与量 : 1.0 mg/kg, 10 mg/kg

<実験スケジュール>

実験① 2h-MCA 閉塞後、再灌流直後に尾静注を行い、MCA 閉塞 24 時間後梗塞巣体積を測定。

実験② 4h-MCA 閉塞後、再灌流直後に尾静注を行い、MCA 閉塞 24 時間後梗塞巣体積を測定。

1.2.2. MCA 閉塞マウスの作成手順

MCA 閉塞マウスの作成手順は、第1章第1節の1.2.1.と同様である。

1.2.3. 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) 染色

TTC 染色は、第1章第1節の1.2.2.と同様である。

1.2.4. 梗塞巣体積の算出

梗塞巣体積の算出は、第1章第1節の1.2.3.と同様である。

1.2.5. 脳出血量測定

脳出血量は、断面の写真から脳出血巣総面積を画像解析ソフト (NIH Image 1.63) で測定し算

出した

1.3. 統計処理

独立した2群間の比較には student t-test を使用し、また多重比較を行う場合は Tukey's test を使用した。なお、危険率が 5% である場合を統計学的に有意差有りとした。

2. 実験結果

2.1. MCA 閉塞後、t-PA 投与による梗塞巣体積変化

実験①の結果について図 22 に示した。2hMCA 閉塞を施した脳梗塞モデルマウスに対し、t-PA (1 mg/kg) 投与したところ梗塞巣体積に変化は認められなかったが、t-PA (10 mg/kg) 投与では梗塞巣体積の減少が認められた。

<梗塞巣体積>

Vehicle : $91.8 \pm 9.8 \text{ mm}^3$, t-PA (1 mg/kg) : $77.9 \pm 12.9 \text{ mm}^3$, t-PA (10 mg/kg) : $41.4 \pm 10.9 \text{ mm}^3$.

実験②の結果について図 23 に示した。4hMCA 閉塞を施した脳梗塞モデルマウスに対し、t-PA (1 mg/kg または 10 mg/kg) を投与したところ梗塞巣体積に変化は認められなかった。

<梗塞巣体積>

Vehicle : $99.8 \pm 10.1 \text{ mm}^3$, t-PA (1 mg/kg) : $83.4 \pm 8.6 \text{ mm}^3$, t-PA (10 mg/kg) : $96.4 \pm 7.4 \text{ mm}^3$.

2.2. MCA 閉塞後、t-PA 投与により誘発される脳出血量測定

実験①の結果について図 21 に示した。2 hMCA 閉塞を施した脳梗塞モデルマウスに対し、t-PA (1 mg/kg または 10 mg/kg) を投与したところ脳出血量に変化はなく、脳出血の誘発は生じていないことが認められた。

<脳出血量>

Vehicle : $4.7 \pm 0.7 \text{ mm}^3$, t-PA (1 mg/kg) : $4.0 \pm 0.5 \text{ mm}^3$, t-PA (10 mg/kg) : $4.6 \pm 0.8 \text{ mm}^3$.

実験②の結果について図 21 に示した。4hMCA 閉塞を施した脳梗塞モデルマウスに対し、t-PA (1 mg/kg) 投与したところ脳出血量に変化は認められなかったが、t-PA (10 mg/kg) 投与では脳出血量の増加が認められた。

<脳出血量>

Vehicle : $3.1 \pm 0.6 \text{ mm}^3$, t-PA (1 mg/kg) : $5.9 \pm 0.4 \text{ mm}^3$, t-PA (10 mg/kg) : $10.1 \pm 0.5 \text{ mm}^3$.

t-PA は脳梗塞発症から 2 時間後の投与 (10 mg/kg) では治療効果を示すが、脳梗塞発症から 4

時間後の投与 (10 mg/kg) では, むしろ脳出血を誘発させてしまうことが認められた.

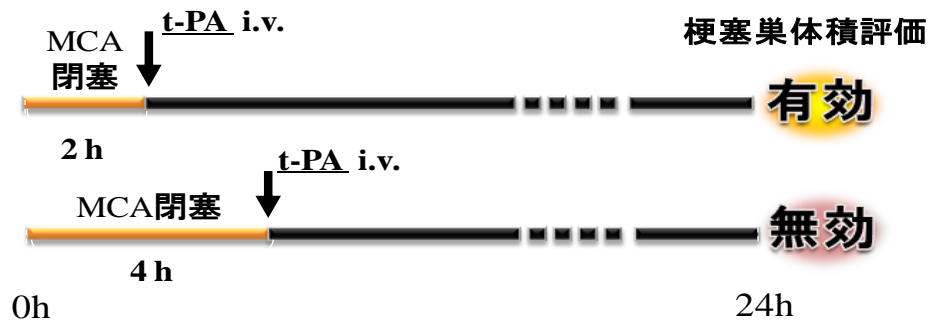


図 22 MCA 閉塞モデルにおける t-PA の治療可能域

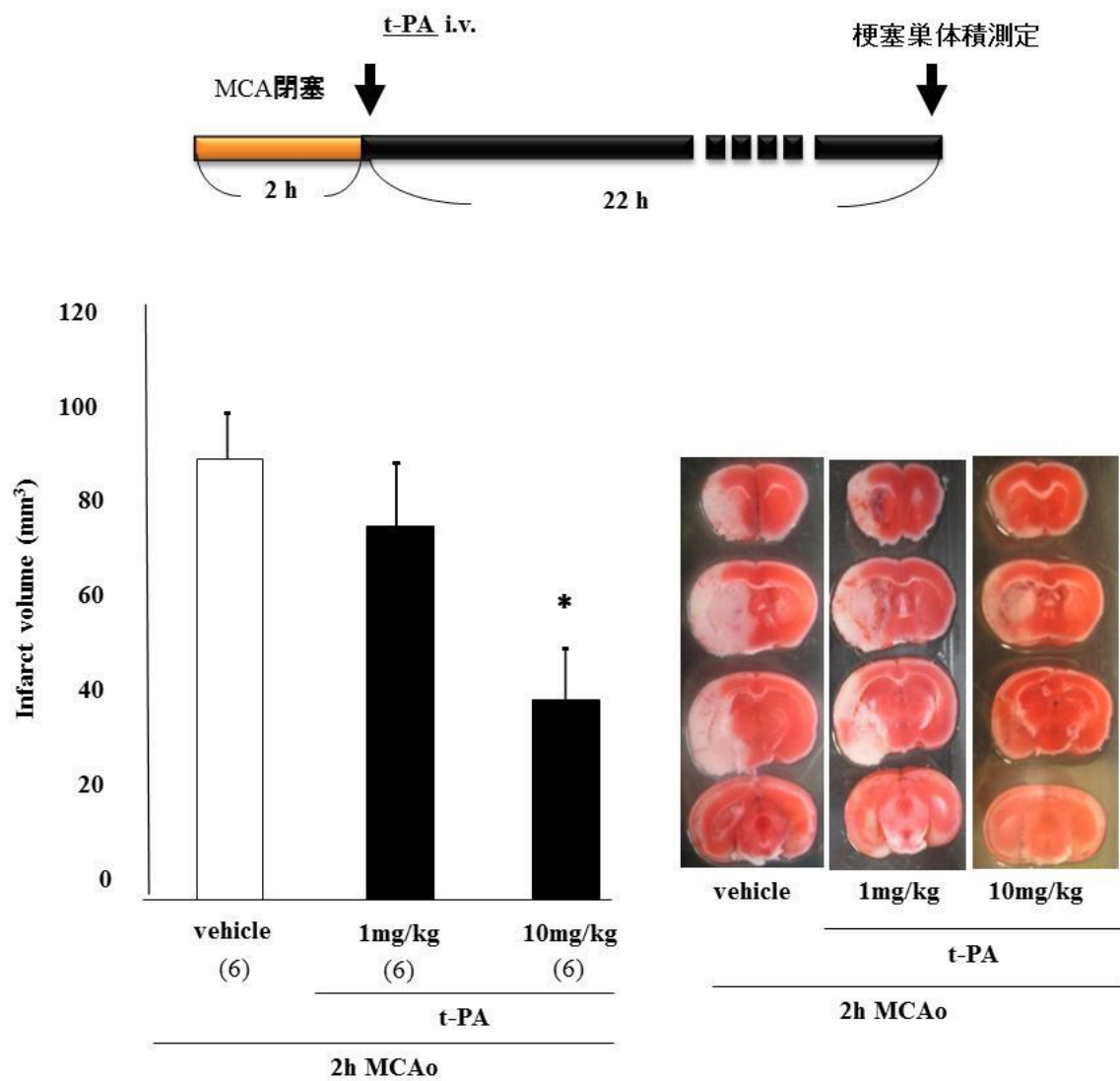


図23 2時間MCA閉塞モデルマウスへのt-PA投与による梗塞巣体積変化

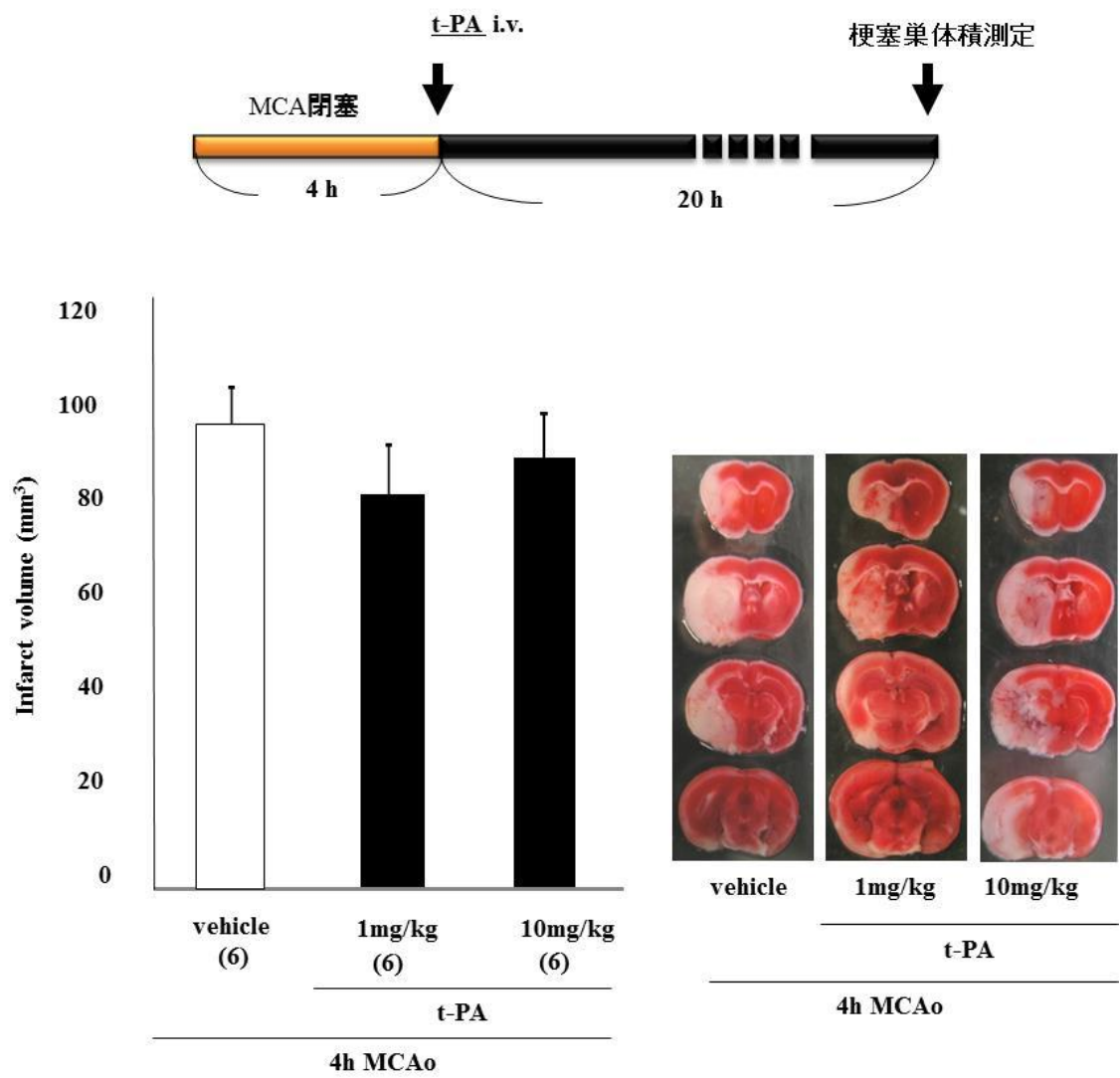
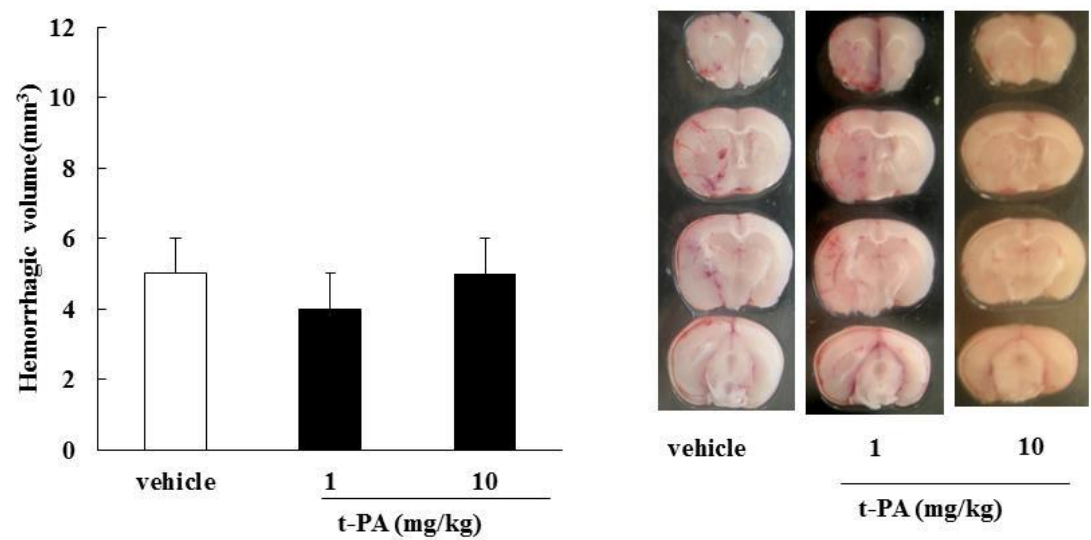


図24 2時間MCA閉塞モデルマウスへのt-PA投与による梗塞巣体積変化

虚血後2h後投与



虚血後4h後投与

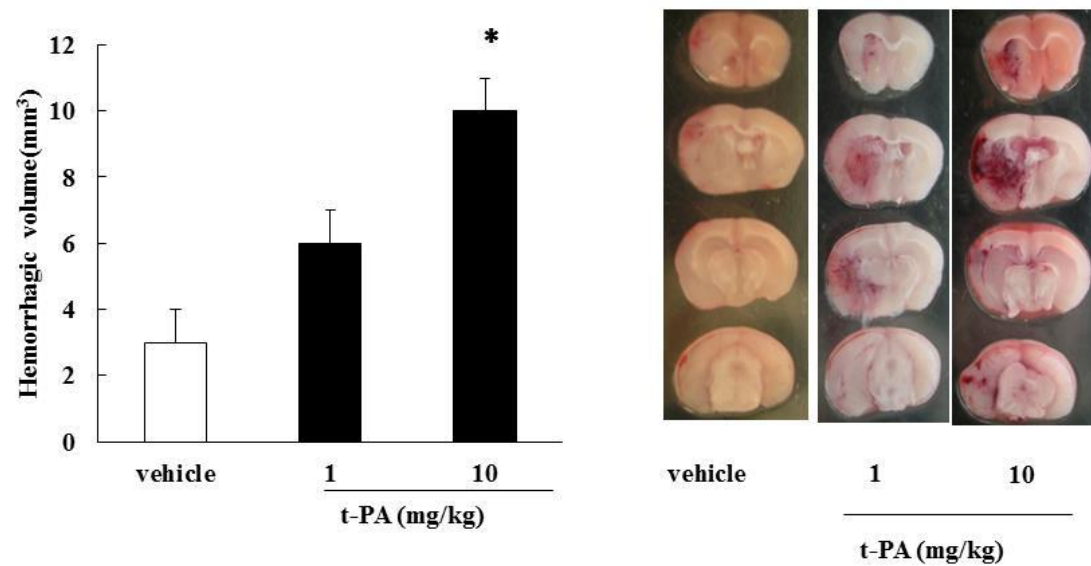


図25 t-PA投与後の脳出血の併発

第2節 脳虚血時における ADAMTS13 の病態生理的役割の解明 (ADAMTS13knock out マウスによる検討)

1. 実験材料ならびに実験方法

1.1. 実験動物ならびに飼育方法

実験動物は体重 25-30g の雄の ADAMTS13 Knock Out (KO) マウスと Wild Type (WT) マウスを用いた。飼育方法は、第1章第1節の 1.1.と同様である。

1.2. 実験手続き

1.2.1. MCA 閉塞マウスの作成手順

MCA 閉塞マウスの作成手順は、第1章第1節の 1.2.1.と同様であるが、KO マウスが虚血に軟弱なため、MCA 閉塞時間は 30 分とした。



ADAMTS13KO マウス

1.2.2. 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) 染色

TTC 染色は、第1章第1節の 1.2.2.と同様である。

1.2.3. 梗塞巣体積の算出

梗塞巣体積の算出は、第1章第1節の 1.2.3.と同様である。

1.2.4. Neurological score

Neurological score の評価は、第1章第1節の 1.2.4.と同様である。

1.2.5. 直腸体温測定法



直腸温度は、針型の温度計をマウスの肛門から 1.5 cm 挿入し、その値を Digital laboratory thermometer (BAT-12, Physitemp Instruments Inc., NJ, USA) を用いて測定した。温度計の挿入の際、潤滑油としてグリセリンを用いた。測定は、室温 ($23\pm 1^{\circ}\text{C}$) で行い、無麻酔下で MCA 閉塞直前、MCA 閉塞後 10, 20, 30 分の合計 4 回測定した。

1.2.6. 脳血流量測定

脳血流量の測定方法は、第1章第2節 1.2.2.と同様である。

1.2.7. プロトロンビン時間測定

採血は、エーテル麻酔下で MCA 閉塞から 24 時間後にマウスの下大静脈より行い、500 μ L を採血した。その後遠心分離(3000rpm,10min)を行い、その上清を 100 μ L 取り、血液凝固自動測定装置 (KC1 デルタ, エム・シー・メディカル株式会社)を用いてプロトロンビン時間を測定した。

1.2.8. 血液ガス測定

採血はエーテル麻酔下で MCA 閉塞から 24 時間後にマウスの下大静脈より行い、500 μ L を採血した。その血液を直接 Blood analysis system ((International) Technidyne Co., USA)を用いて、血液中の pH, pCO₂, pO₂ 値 (IRMA, Blood Analysis System)を測定した。

1.2.9. 炎症反応 (MPO 活性, 血漿中 HMGB1) 測定

好中球由来の炎症マーカーである MPO (myeloperoxidase) 活性と炎症性サイトカインである HMGB1 について検討を行った。

1.2.9.1. MPO 酵素活性測定法

MPO 酵素活性の測定は、第 1 章第 3 節の 1.2.4-5 と同様である。

1.2.9.2. 血漿中 HMGB1 測定法

血漿中 HMGB1 の測定は、第 1 章第 2 節の 1.2.7. と同様である。

1.3. 統計処理

独立した 2 群間の比較には student t-test を使用し、また多重比較を行う場合は Tukey's test を使用した。なお、危険率が 5%である場合を統計学的に有意差有りとした。

2. 実験結果

2.1. MCA 閉塞による梗塞巣体積

梗塞巣体積の結果について図 26 で示した。KO マウスでは WT マウスに比べ梗塞巣体積が増大していることが認められた。

<梗塞巣体積>

WT マウス : 11.4 \pm 1.9 mm³ , KO マウス : 31.0 \pm 6.5 mm³

2.2. MCA 閉塞による Neurological score の変化

Neurological score の結果について図 26 で示した。KO マウスは WT マウスに比べ神経障害が悪化していることが認められた。

< Neurological score >

WT マウス : 1.3 ± 0.9 , KO マウス : 1.9 ± 0.2

2.3. MCA 閉塞による直腸体温の変化

虚血時の深部体温変化を図 27 に示した. KO マウスと WT マウスでは直腸体温に変化はなく, 体温変化による脳梗塞への影響はないものとして考えられる.

<直腸体温>

MCA 閉塞直前 ; WT マウス : 36.2 ± 0.2 °C, KO マウス : 36.2 ± 0.2 °C

MCA 閉塞 10 分後 ; WT マウス : 35.1 ± 0.2 °C, KO マウス : 35.1 ± 0.2 °C

MCA 閉塞 20 分後 ; WT マウス : 35.5 ± 0.1 °C, KO マウス : 35.6 ± 0.2 °C

MCA 閉塞 30 分後 ; WT マウス : 35.8 ± 0.1 °C, KO マウス : 35.9 ± 0.1 °C

2.4. MCA 閉塞による脳血流量変化、プロトロンビン時間、血液ガスの測定

虚血-再灌流時の脳血流量変化を図 28, 29 に示した. KO マウス, WT マウス共に MCA 閉塞中は脳血流量の低下が認められたが, KO マウスでは再灌流後も再び血流量の低下が認められ, それは MCA 閉塞後 24 時間後まで継続して見られた.

<脳血流量>

MCA 閉塞直後 ; WT マウス : 12.9 ± 3.4 % of base, KO マウス : 14.5 ± 2.4 % of base

MCA 閉塞 10 分後 ; WT マウス : 17.1 ± 2.5 % of base, KO マウス : 21.5 ± 5.4 % of base

MCA 閉塞 20 分後 ; WT マウス : 18.4 ± 3.9 % of base, KO マウス : 20.7 ± 5.0 % of base

MCA 閉塞 30 分後 ; WT マウス : 16.8 ± 3.4 % of base, KO マウス : 19.1 ± 3.3 % of base

再灌流直後 ; WT マウス : 103.8 ± 15.6 % of base, KO マウス : 92.7 ± 6.9 % of base

再灌流後, 10 分後 ; WT マウス : 86.5 ± 9.9 % of base, KO マウス : 49.0 ± 6.42 % of base

再灌流後, 20 分後 ; WT マウス : 91.4 ± 9.1 % of base, KO マウス : 40.8 ± 7.1 % of base

再灌流後, 30 分後 ; WT マウス : 83.2 ± 6.8 % of base, KO マウス : 34.6 ± 5.8 % of base

再灌流後, 23.5 時間後 ; WT マウス : 72.9 ± 13.9 % of base, KO マウス : 44.0 ± 8.5 % of base

プロトロンビン時間を測定した結果を図 29 に示す. KO マウス, WT マウスともにプロトロンビン時間に変化はないことが認められた.

<プロトロンビン時間>

WT マウス : 12.1 ± 0.81 s, KO マウス : 11.6 ± 0.99 s

血液ガスを測定した結果を図 29 に示す. KO マウス, WT マウスともに血液ガスに変化はないこ

とが認められた.

<血液ガス>

pH ; WT マウス : 7.14 ± 0.04 , KO マウス : 7.13 ± 0.04

pO₂ ; WT マウス : 56.2 ± 2.2 , KO マウス : 53.0 ± 1.1

pCO₂ ; WT マウス : 68.9 ± 1.8 , KO マウス : 67.2 ± 2.1

2.5. MCA 閉塞による炎症反応の変化

MPO 活性, 血漿中 HMGB1 濃度を測定した結果を図 30 に示す. KO マウスは WT マウスに比べ, MCA 閉塞後, 線条体, 皮質の両部位で MPO 活性が上昇していることが認められた. また, 血漿中 HMGB1 濃度についても KO マウスでは WT マウスに比べて増加していることが認められた.

<炎症マーカー>

MPO 活性 ; (線条体) WT マウス : 0.071 ± 0.033 , KO マウス : 0.146 ± 0.018

; (皮質) WT マウス : 0.026 ± 0.003 , KO マウス : 0.062 ± 0.020

血漿中 HMGB1 濃度 ; WT マウス : 19.6 ± 3.5 , KO マウス : 34.4 ± 5.3

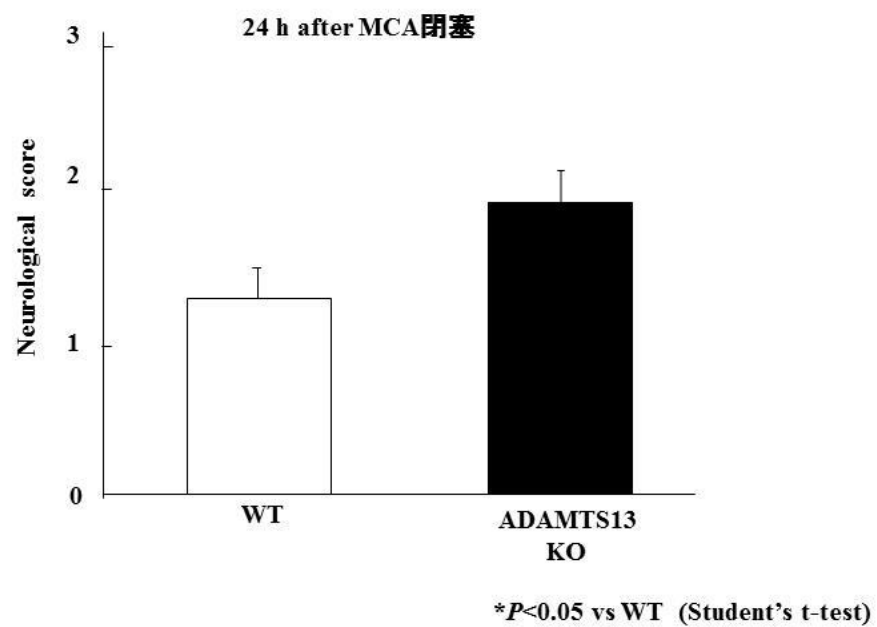
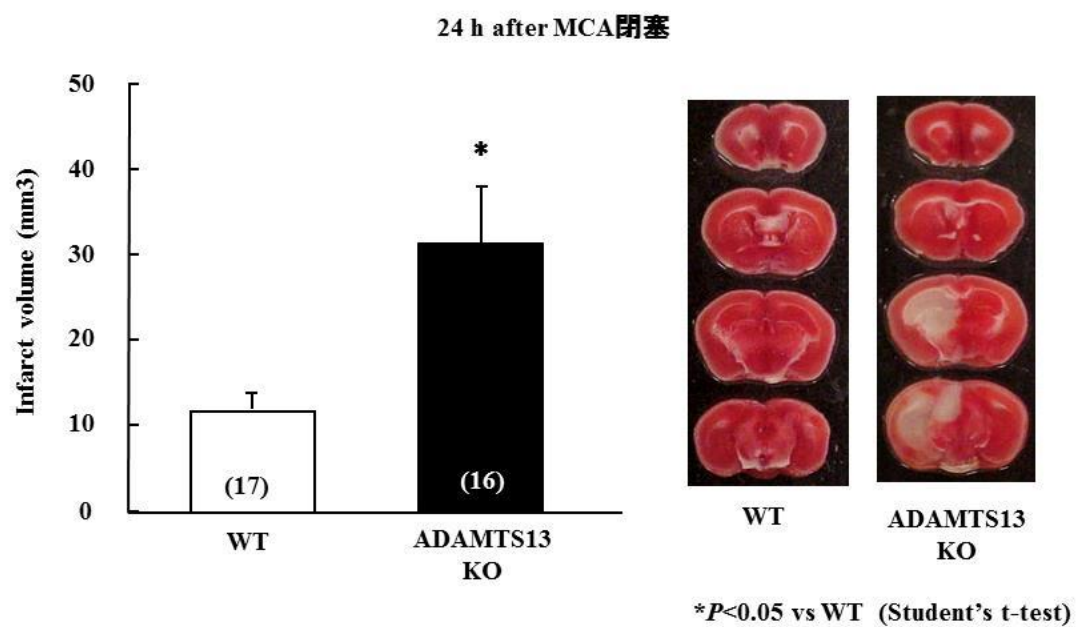


図26 30分MCA閉塞後,24時間後の梗塞巣体積変化と神経障害

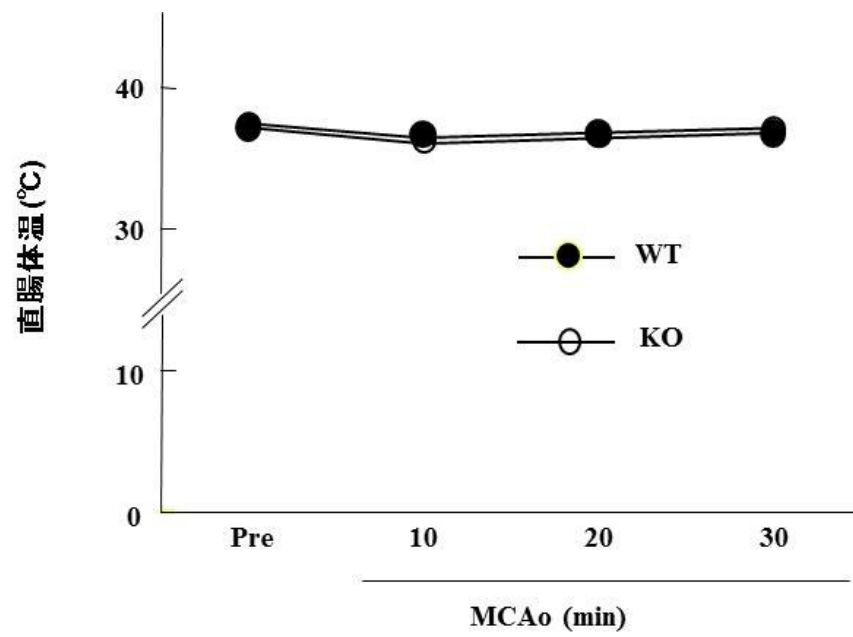


図27 30分MCA閉塞中の直腸体温変化

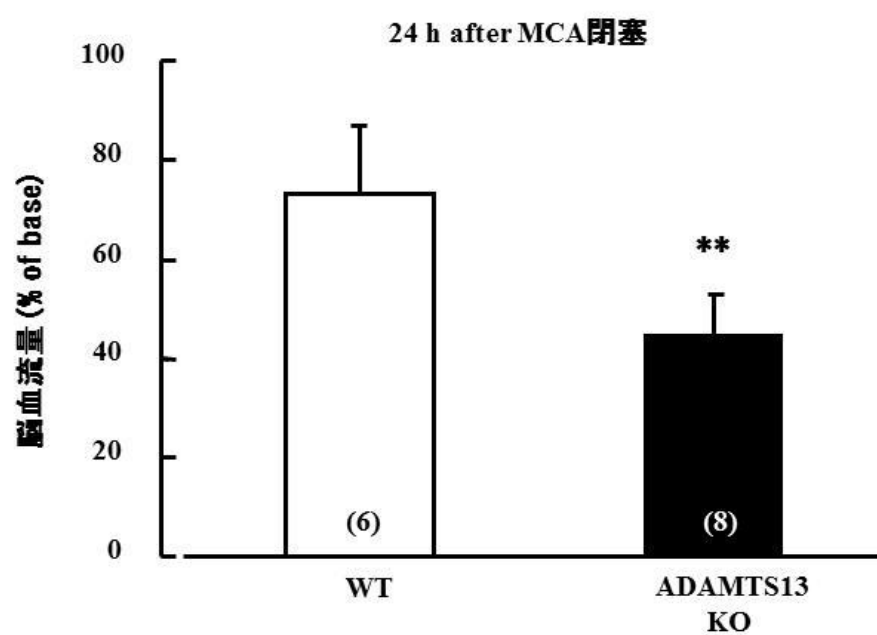
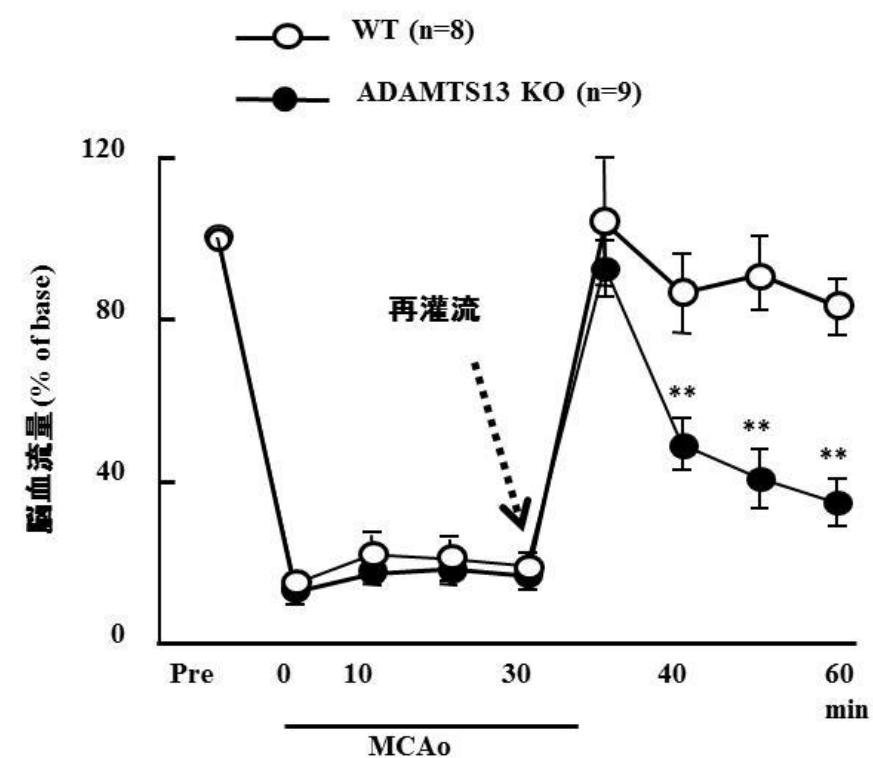
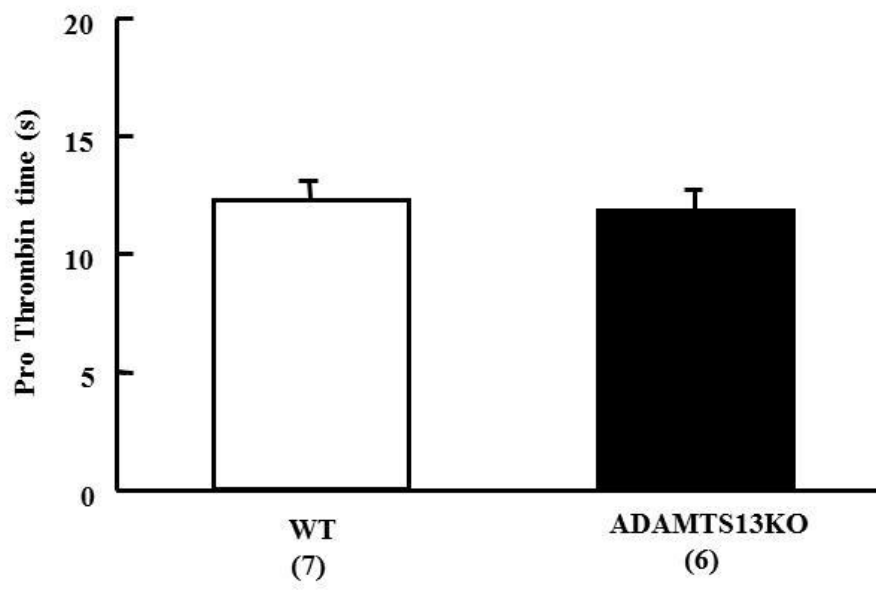


図28 30分MCA閉塞後の脳血流量変化



	WT (8)	KO (8)
pH	7.14±0.04	7.13±0.04
pO ₂	56.2±2.2	53.0±1.1
pCO ₂	68.9±1.8	67.2±2.1

図29 WT, KOマウスのプロトロンビン時間と血液ガス

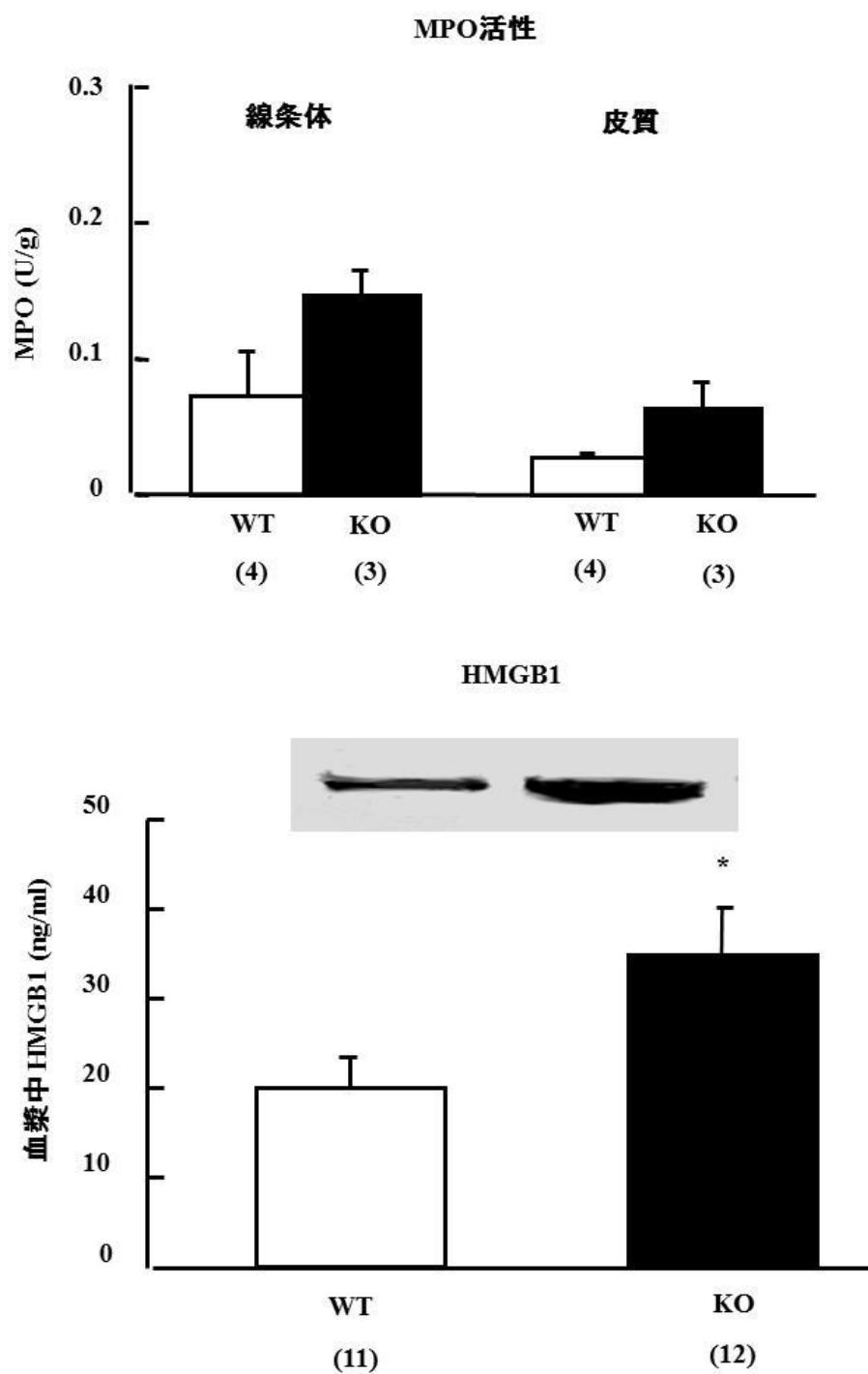


図30 30分MCA閉塞後,24時間後の炎症反応

第3節 ADAMTS13 タンパク投与による脳梗塞治療効果の検討

第3節では、ADAMTS13の脳梗塞治療効果について検討を行った。第2章第1節より、t-PAは2時間閉塞には有効だが、4時間閉塞に対しては無効であった。この節ではADAMTS13を2時間閉塞後および4時間閉塞後に投与し、治療効果を示すか検討することで、t-PAとADAMTS13の治療可能時間を差別化することを目的として検討を行った。

1. 実験材料ならびに実験方法

1.1. 実験動物ならびに飼育方法

実験動物ならびに飼育方法は、第1章第1節の1.1.と同様である。

1.2. 実験手続き

1.2.1. 使用薬物および実験スケジュール

<使用試薬>

ADAMTS13 タンパク フナコシ 投与量 : 0.1 mg/kg

tPA は第2章第1節の1.2.1.と同様である。

<実験スケジュール>

4h-MCA 閉塞後、再灌流直後に尾静注を行い、MCA 閉塞 24 時間後梗塞巣体積を測定。

1.2.2. MCA 閉塞マウスの作成手順

MCA 閉塞マウスの作成手順は、第1章第1節の1.2.1.と同様である。

1.2.3. 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) 染色

TTC 染色は、第1章第1節の1.2.2.と同様である。

1.2.4. 梗塞巣体積の算出

梗塞巣体積の算出は、第1章第1節の1.2.3.と同様である。

1.2.5. 脳出血量測定

脳出血量は、断面の写真から脳出血巣総面積を画像解析ソフト（NIH Image 1.63）で測定し算出した

1.2.6. 脳血流量測定

脳血流量の測定方法は第 1 章第 2 節の 1.2.2.と同様である。

1.2.7. 血漿中 HMGB1 濃度測定

MCA 閉塞後、4 時間後に ADAMTS13 (0.1 mg/kg) または t-PA (10 mg/kg) を尾静脈より、投与し、再灌流を行った。MCA 閉塞後 24 時間後にジエチルエーテ麻酔下で、マウスの腹部を切開し、下大静脈より血液を採取した。採取した血液は遠心機を用いて 3000rpm で 10 分間遠心分離を行った。その上澄みを採取し、サンプルとした。

尚、HMGB1 の測定にはシノテストを用いて行った。

1.3. 統計処理

独立した 2 群間の比較には student t-test を使用し、また多重比較を行う場合は Tukey's test を使用した。なお、危険率が 5%である場合を統計学的に有意差有りとした。

2. 実験結果

2.1. MCA 閉塞後、ADAMTS13 投与による梗塞巣体積変化 (t-PA との比較検討)

MCA 閉塞後、ADAMTS13 投与による梗塞巣体積変化についての結果を図 31 に示した。4 時間という長時間の虚血に対し t-PA 投与群は梗塞巣体積に変化は認められないが、ADAMTS13 投与群では梗塞巣体積の減少が認められた。

<梗塞巣体積>

Vehicle : $98.0 \pm 6.4 \text{ mm}^3$, t-PA (10 mg/kg) : $97.5 \pm 7.8 \text{ mm}^3$, ADAMTS13 (0.1 mg/kg) : $66.9 \pm 13.2 \text{ mm}^3$.

2.2. MCA 閉塞後、ADAMTS13 投与により誘発される脳出血量測定 (t-PA との比較検討)

MCA 閉塞後、ADAMTS13 投与により誘発される脳出血量の結果について図 32 に示した。4 時間という長時間の虚血に対し t-PA 投与群は脳出血量の増加が認められたが、ADAMTS13 投与群では脳出血量に変化はなかった。

<脳出血量>

Vehicle : $4.7 \pm 0.6 \text{ mm}^3$, t-PA (10 mg/kg) : $10.3 \pm 0.4 \text{ mm}^3$, ADAMTS13 (0.1 mg/kg) : $4.2 \pm 0.7 \text{ mm}^3$.

2.3. MCA 閉塞後、ADAMTS13 投与による脳血流量変化 (t-PA との比較検討)

MCA 閉塞後、ADAMTS13 投与による脳血流量変化の結果について図 33 に示した。ADAMTS13 投与後より脳血流量は改善し、MCA 閉塞後 24 時間後においても継続して脳血流量の改善が認められた。一方で t-PA 投与は一過性の脳血流量の改善はみられたものの、出血性梗塞を起こしたためか、MCA 閉塞後 24 時間後には脳血流量が低下していた。

<脳血流量>

Vehicle (%):

Pre; 100±0.0, 1h; 23.7±9.7, 2h; 22.1±9.0, 3h; 20.0±8.2, 4h; 19.6±8.0,
5h; 64.4±26.3, 6h; 42.0±17.2, 7h; 35.6±14.5, 8h; 22.5±9.2

ADAMTS13 (%):

Pre; 100±0.0, 1h; 22.1±9.0, 2h; 16.8±6.9, 3h; 20.0±8.2, 4h; 17.1±7.0,
5h; 80.2±32.8, 6h; 69.6±28.4, 7h; 71.7±29.3, 8h; 60.6±24.7

t-PA (%):

Pre; 100±0.0, 1h; 23.7±7.3, 2h; 24.9±7.3, 3h; 13.5±5.5, 4h; 12.8±5.2,
5h; 92.7±40.0, 6h; 97.4±36.8, 7h; 64.8±26.5, 8h; 18.0±9.0

2.4. MCA 閉塞後, ADAMTS13 投与による血漿中 HMGB1 濃度の変化 (t-PA との比較検討)

MCA 閉塞後, ADAMTS13 投与による血漿中 HMGB1 濃度の変化について図 34 に示した. ADAMTS13 投与より MCA 閉塞 24 時間後の血漿中 HMGB1 濃度は vehicle 投与群に比べて有意に減少することが明らかとなった. 一方で t-PA 投与群では HMGB1 の血漿中濃度に有意な減少はみられなかった.

sham: 36.0±11.5 ng/mL

vehicle: 86.8±5.6 ng/mL

t-PA: 91.8±9.6 ng/mL

ADAMTS13: 64.5±6.2 ng/mL

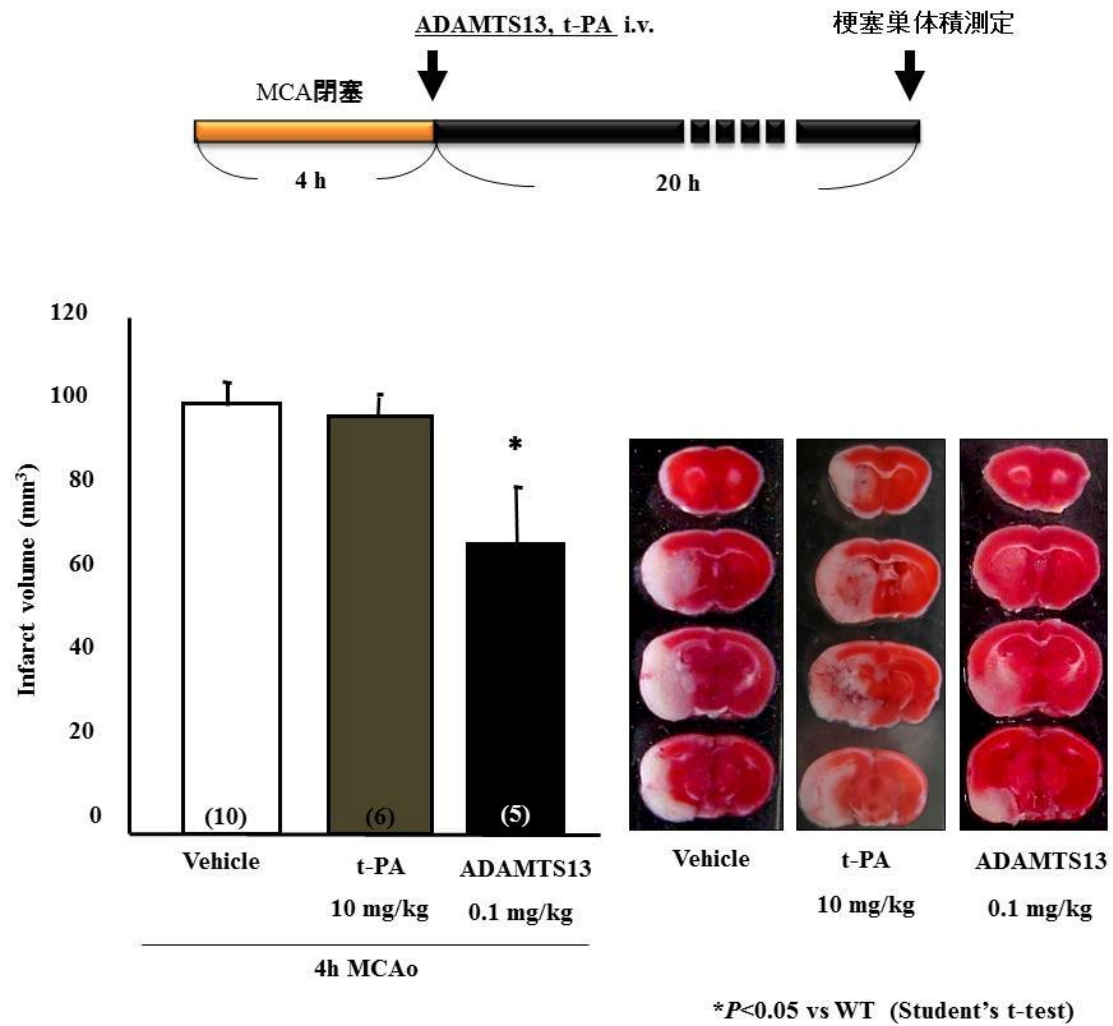
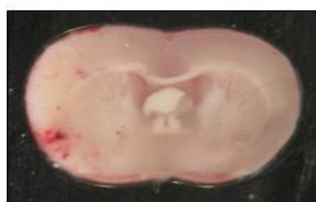
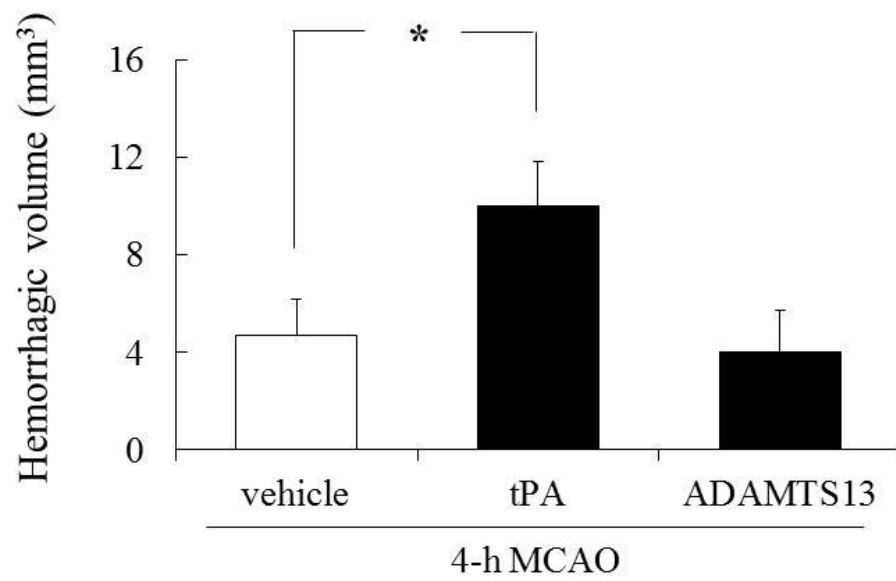
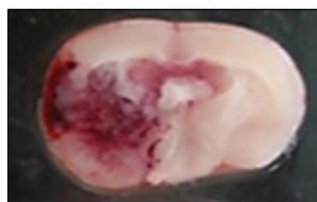


図31 4時間MCA閉塞モデルマウスへのADAMTS13タンパク投与による梗塞巣体積変化



vehicle



tPA



ADAMTS13

* $P < 0.05$ vs vehicle (Student's t-test)

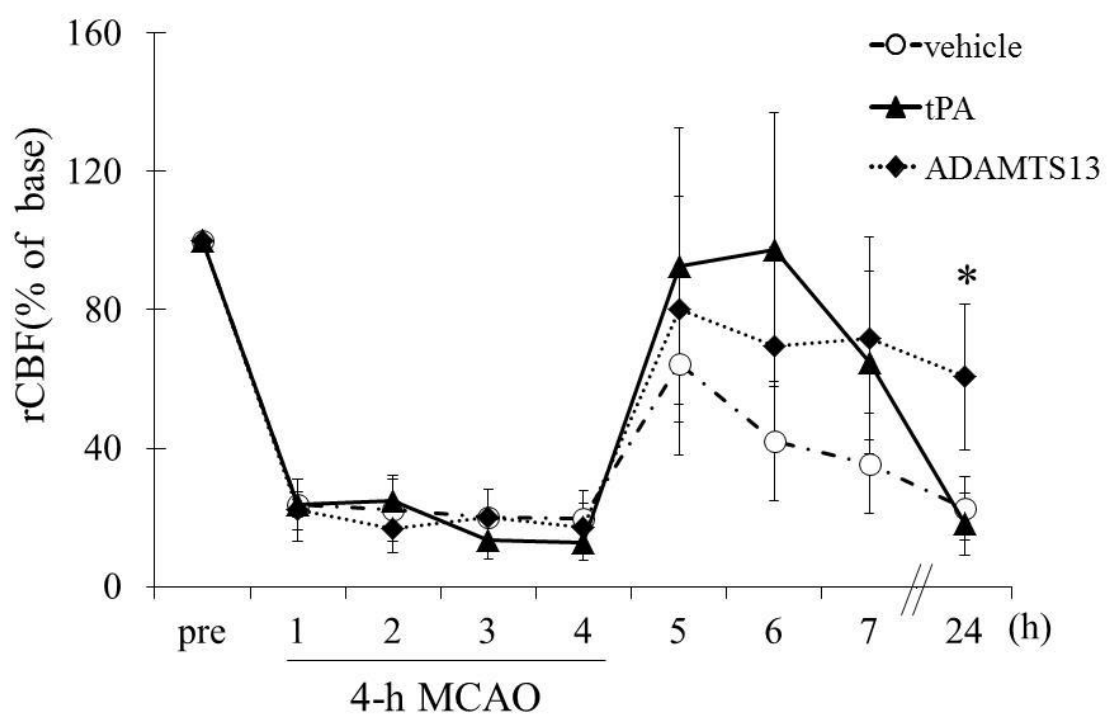


図33 ADAMTS13タンパク投与による脳血流量の変化

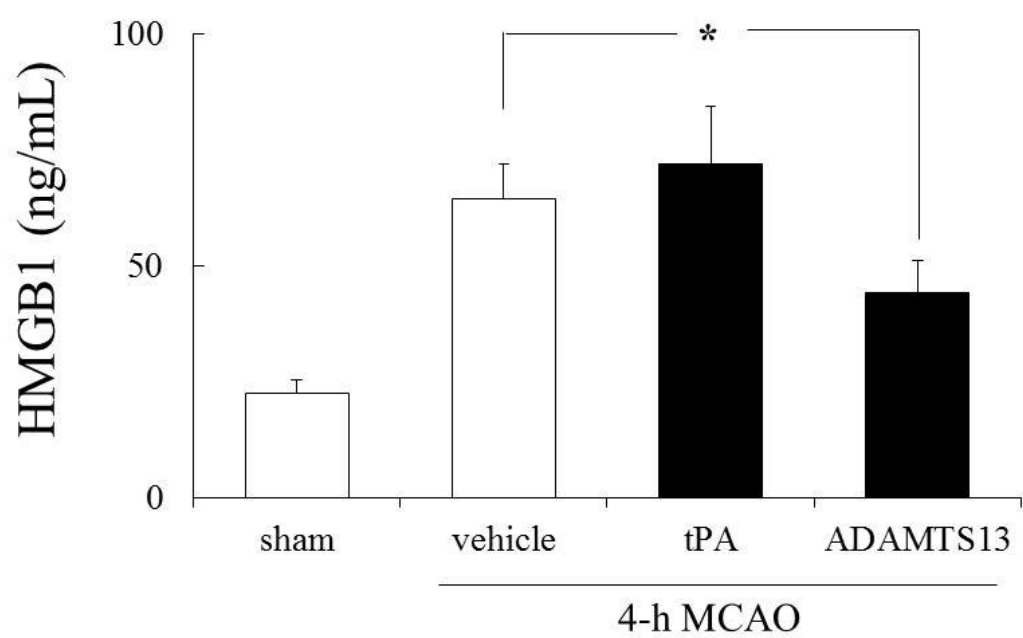


図34 ADAMTS13タンパク投与による血漿中HMGB1濃度の変化

考察

本章では、まず、血栓溶解剤である組織プラスミノゲンアクチベータ (t-PA) の脳梗塞治療可能時間について、脳梗塞モデルマウスを用いて検討した。次いで、今回新たな血栓溶解薬の候補として着目している生体内血液凝固制御因子の ADAMTS13 の脳梗塞時における病態生理学的役割について検討した。そして、ADAMTS13 を脳梗塞治療薬へ応用し、t-PA 以上の脳梗塞治療可能時間を示すことができるかを検討し、ADAMTS13 が新規脳梗塞治療薬の候補となりえるかを検証した。

第1節では、t-PA を MCA 閉塞後さまざまな時間帯に投与し、治療効果を示すのか、または脳出血を誘発するかを検討し、t-PA の治療可能時間を検討した。MCA 閉塞後 2 時間での t-PA 投与 (10 mg/kg) は vehicle 投与群に比べて梗塞巣体積を有意に減少させた。また、血栓溶解薬の副作用として問題となる脳出血の誘発もみられなかった。一方で、MCA 閉塞後 4 時間での t-PA 投与 (10 mg/kg) は梗塞巣体積に変化は見られず、大量に脳出血を誘発させていることが認められた。以上の結果から、脳虚血後 2 時間以内の t-PA 投与では治療効果を発揮することができるが、4 時間を超えると大量の脳出血を引き起こすことから、臨床でも言われているように発症からの投与が遅延した場合は t-PA が治療効果を示さないどころか、重篤な脳出血を生じることが動物実験でも明らかとなった。脳虚血後、長時間が経過すると、血管内皮などは脆くなっていき、その状態で t-PA のような強力な血栓溶解作用を持つ薬物を投与すると、急激な血流量増加により、脆くなった血管内皮や血管壁が破綻し、脳出血を併発させると考えられる。また、t-PA 自体に MMP3 や MMP9 を活性化させ、血管内皮を傷つけてしまう作用や、血栓溶解時に赤血球分解産物が血液内に放出されることにより Fe^{2+} を核としたラジカルが生じ、血管内皮障害を悪化させる作用や、血小板インテグリン受容体遮断による易出血状態に陥るといった作用などさまざまな作用があり、t-PA はまさに「もろ刃の剣」として定義されている³⁹⁾。そのため、t-PA 以上の治療可能時間と脳出血を引き起こしにくい新たな治療法を確立する必要がある。

第2節では、新たな血栓溶解作用を持つタンパクとして着目した ADAMTS13 の脳梗塞時における病態生理学的な役割について、遺伝子改変した ADAMTS13KO (KO) マウスを用いて検討した。まず、検討を行う上で、KO マウスと WT マウスで体温、血液ガス、プロトロンビン時間など梗塞巣の拡大に影響を与えると思われる生体そのものの機能に差はないことを明らかにした。脳梗塞後の生体内 ADAMTS13 の病態生理学的な役割を解明するため、KO マウスと Wild Type (WT) マウスに 30 分 MCA 閉塞を施し、23.5 時間後の梗塞巣体積を比較したところ、30 分という短い脳虚血に対しても KO マウスでは梗塞巣の拡大が進行していることが認められた。このことから、生体内 ADAMTS13 は脳梗塞時に脳保護に働く役割をしていることが考えられる。また、本実験で 30 分間の MCA 閉塞時間を選択したのは、KO マウスに 1 時間以上の脳虚血を与えるとほぼ全例死亡してしまうことによる。このことから ADAMTS13 は脳梗塞時において重要な役割を果

たしているということが考えられる。次に、脳血流量について検討したところ、MCA 閉塞時では WT マウス、KO マウス共に血流量の低下が認められたが、KO マウスでは再灌流後も再び血流量の低下がみられた。血管閉塞時にグルタミン酸過剰遊離による興奮毒性や、酸欠、炎症などにより、血管内皮に損傷が生じると、再び血流が開通された際に、損傷部位に血小板やvWFなどの凝血因子が接着し、微小循環障害として2次的な脳損傷を引き起こす⁴⁰⁾。ADAMTS13はその血栓溶解作用により、虚血-再灌流後の微小循環障害により引き起こされる脳損傷に対し、血流を改善することで悪化を防いでいると考えられる。また、炎症反応に関して、第1章で脳梗塞後の予後を測る上で適切であるとしたMPO活性と血漿中HMGB1濃度について検討を行った。MCA閉塞後24時間後、KOマウスはWTマウスに比べ、MPO活性、血漿中HMGB1濃度が共に高く、KOマウスでは強い炎症反応が生じていることが認められた。このことから、ADAMTS13は脳梗塞時、炎症反応の惹起を抑制させる作用を持つと考えられる。現在、最も脳梗塞に有効とされているt-PAには抗炎症作用を持つとの報告等はなく、ADAMTS13が血栓溶解作用のみならず、抗炎症作用も備え持つことは、t-PA以上の治療効果を期待することができる。

第3節では、実際にADAMTS13が脳梗塞に対し治療効果を示すのか、正常マウスにMCA閉塞を施し、ADAMTS13タンパクを投与することで検討した。まずMCA閉塞後2時間でのADAMTS13投与はt-PA投与時と同等の梗塞巣体積の減少を示した。続いて、MCA閉塞後4時間でのADAMTS13投与は、t-PA投与が効果を示さなかったのに対し、ADAMTS13投与群はvehicle投与群に比べて有意に梗塞巣体積を減少させた。この要因として、治療可能時間を超えたt-PA投与では明らかな脳出血を誘発していることに対し、ADAMTS13投与群では脳出血を誘発しておらず、このことが治療効果の明暗を分けた理由のひとつであると考えられる。実際にMCA閉塞後4時間でのADAMTS13またはt-PA投与による脳血流量の変化では、t-PA投与群では投与後、一過性の脳血流量の変化はみられたものの、脳出血を生じたためか、MCA閉塞後24時間後では脳血流量の低下が認められた。一方で、ADAMTS13投与群ではMCA閉塞後24時間後でも継続して脳血流量に改善がみられていた。以上のことより、ADAMTS13はt-PA以上の脳梗塞治療可能時間を持つ可能性があると考えられる。しかし、t-PA同様にADAMTS13も血栓溶解作用を示すにも関わらず異なる結果を得た要因として、ADAMTS13の特徴的な血栓溶解様式にあると考えられる。t-PAの血栓溶解様式は、その強力な血栓溶解作用から血栓を根元から溶解するため、血栓溶解という面では抜群の効果を発揮するが、脳出血を誘発しやすい状態にも陥る(図35)。一方、ADAMTS13は、ずり応力依存的にvWFを切断し血栓を溶解する特徴を持つことが報告されている¹⁸⁾。vWFは一つのsubunitが多重に重合した状態で血液中を循環している¹²⁾。ADAMTS13はvWFのA2ドメインを特異的に切断する酵素であるが、vWFが重合した状態ではA2ドメインに到達することができず、ADAMTS13は血栓溶解反応を示すことができない¹⁸⁾。つまり、ADAMTS13がvWFを切断するにはvWFのstretchが重要であると報告されている。

この事が何を意味するのかというと、図 35 で示すように、血栓が形成されると血流速度に差が生じる。そして血流速度の速い側では血栓を引き延ばそうとする力が働き、vWF の stretch が起きる。これを血液のずり応力と呼び、ADAMTS13 はずり応力により引き延ばされた vWF を切断することで血栓溶解作用を示すと考えられる。つまり ADAMTS13 は血栓の端から徐々に血栓を削る性質を持ち、病的血栓が消失し、血流速度の勾配が消失すると ADAMTS13 は vWF を切断しなくなるため、本来生体防御に必須な止血機能は維持することができると考えられる。この性質により、ADAMTS13 は t-PA で問題となる脳出血の誘発を克服できたと考えられる。

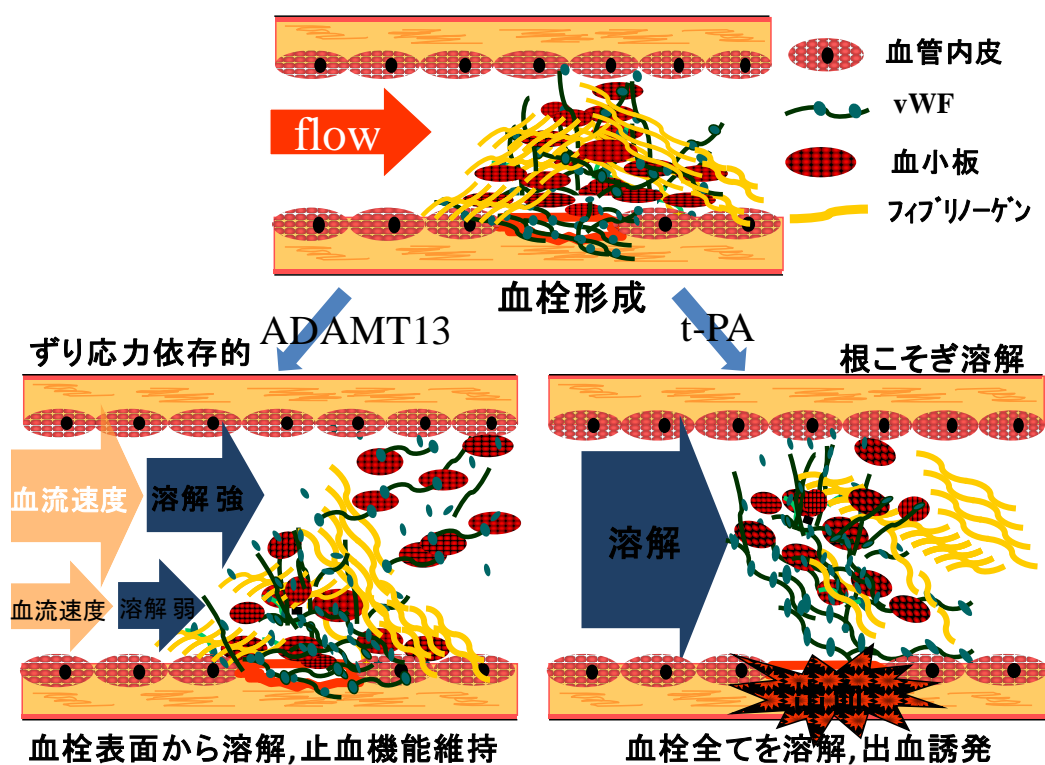


図 35 ADATS13 と t-PA の血栓溶解様式

また, t-PA による脳出血誘発の要因には炎症反応も関与していると報告されている。脳梗塞後の炎症反応は血液脳関門の破綻や血管内皮の損傷を引き起こし, 脳出血を誘発させやすい状態へと導く。また, t-PA 自体にも炎症反応を誘発させる作用があることが報告されており, t-PA を脳梗塞後遅発的に投与すると P-セレクチンや E-セレクチン, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) などの血管炎症が生じると報告されている。ADAMTS13 は第 2 章第 2 節の結果より, 炎症反応にも寄与している可能性があり, 実際に ADAMTS13 投与後の血漿中 HMGB1 濃度は有意に減少したことから, 抗炎症作用も示すことが明らかとなった。つまり ADAMTS13 の持つ抗炎症作用は, 炎症による梗塞巣拡大の抑制だけでなく, 脳出血リスクの軽減にも働いていると考えられる。

以上のことより, 血栓溶解作用のみならず抗炎症作用も示す ADAMTS13 は急性期から亜急性期に引き起こす細胞障害に対し有効であり, その特徴的な血栓溶解様式から脳出血を併発しにくい可能性がある。そのため, ADAMTS13 は t-PA 以上の安全性, 治療効果, 治療可能時間の拡大が期待でき, 脳梗塞の新規治療薬の候補として可能性を秘めていることが示唆された。

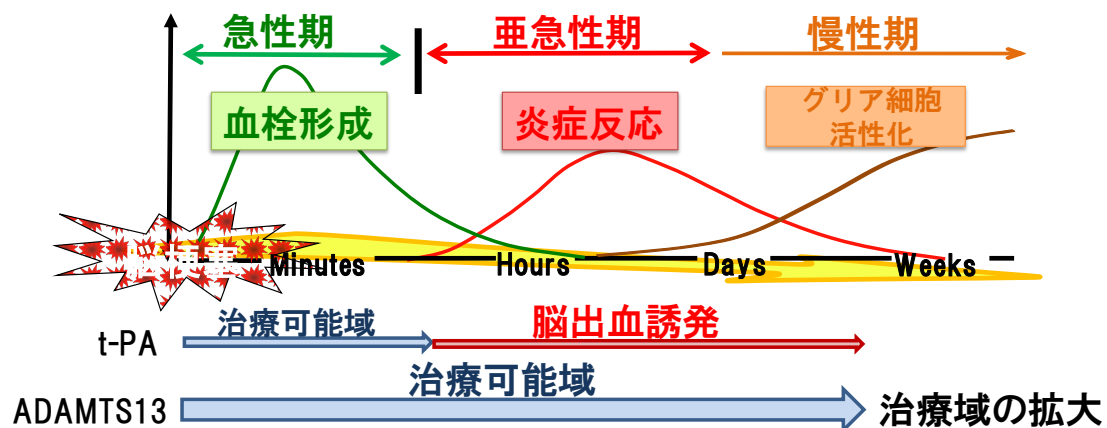


図 36 t-PA と ADAMTS13 の脳梗塞治療可能域の比較

第3章 ADAMTS13による抗炎症作用の検討

第2章第2,3節の結果から,ADAMTS13は血栓溶解作用のみならず抗炎症作用も備え持つことが明らかとなった.第3章では,ADAMTS13がt-PAに比べ,より治療効果の高いものとして確立するため,ADAMTS13が血栓溶解に伴う2次的な抗炎症作用だけではなく,直接的に抗炎症作用を示すのか検討した.第1節ではADAMTS13の抗炎症部分を示すと考えられるドメインのひとつであるThrombospondin 1(TSP-1)がCD36受容体を介して抗炎症作用を示すか,in vitroで検討を行った.また,第2節では実際にTSP-1を脳梗塞モデルマウスに投与し,治療効果を示すか検討した.

第1節 A172(ヒト神経膠芽腫細胞)を用いた細胞障害に対するADAMTS13の効果

1. 実験材料ならびに実験方法

1.1. 細胞培養法

1.1.1. 実験細胞

A172(ヒト神経膠芽腫細胞, Human glioblastoma, 理化学研究所)を用いた.(Human glioblastomaは,アストロサイトのみで組織される細胞である.図31参照.)

1.1.2. 使用試薬

<培地の作製方法>

① DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Invitrogen 製) 1袋	
NaHCO ₃	3.7g
精製水	
<hr/>	
総量 1000mL	

1-1: 培養液(培養時)

① で作製したDMEM溶液	500mL
FBS	50mL
ペニシリン・ストレプトマイシン	5mL

これを滅菌処理し,使用した.

1-2: 培養液(実験時)

① で作製したDMEM溶液	500mL
FBS	5mL

ペニシリン・ストレプトマイシン 5mL

これを滅菌処理し、使用した。

<PBS の作製方法>

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (Invitrogen 製) 1 袋
精製水

総量 1000mL

これを滅菌処理し、使用した。

1.1.3. 細胞培養法

A172 細胞をベントキャップフラスコ 50mL (FALCON 社製) にまき、培養液中にて培養した。細胞が約 80% コンフレント状態になるたびに約 3~4 割の細胞数を採取し、培養を継続した。

1.2. 免疫染色

培養細胞免疫染色用チャンバーに A172 細胞を撒き、80% コンフレントに達した状態にする。培養液を捨て、PBS で 3 回洗浄し、4% パラホルムアルデヒド液 (第 1 章 3 節 1.2.4. と同じ) を用いて細胞を固定する (10 分間)。固定後、PBS で 3 回洗浄をし、PBS で調製した 0.2% Triton X を用いて透過処理を行う (5 分間)。終了したら、再度 PBS で 3 回洗浄を行う。PBS で調製した 1% BSA でブロッキングを行う (1 時間)。その後、3 回洗浄し、PBS で調製した 1 次抗体 (200 倍希釈) を滴下し、4℃ オーバーナイトインキュベートする。

3 回洗浄後、PBS で調製した 2 次抗体 (1000 倍希釈) を滴下し、1~2 時間インキュベートする。その後、PBS で 3 回洗浄し、DAPI を用いて封入を行う。この時にスライドガラス上のチャンバーカバーを取り外す。

<試薬>

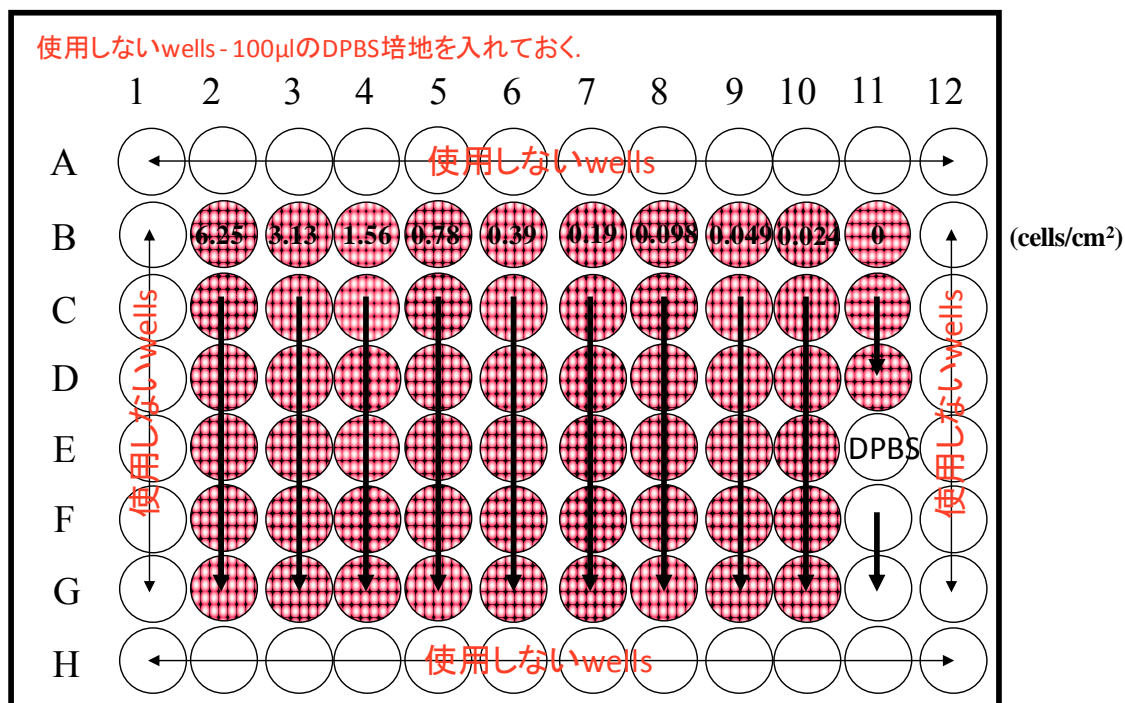
1 次抗体	anti-GFAP (Goat)	Santa Cruz Biotechnology, inc. 製
	anti-CD36 (Rabbit)	Santa Cruz Biotechnology, inc. 製
2 次抗体	anti-Goat TR	Santa Cruz Biotechnology, inc. 製
	anti-Rabbit FITC	Santa Cruz Biotechnology, inc. 製
封入剤	DAPI (4', 6-ジアミジノ-2-フェニルインドール)	Thermo Fisher 製

1.3. WST-1 Assay 法

1.3.1. WST-1 による薺き数検討

80% コンフレントに達した A172 細胞を DMEM 培地で段階希釈し、96well plate の各 well に、 6.25×10^4 , 3.13×10^4 , 1.56×10^4 , 0.78×10^4 , 0.39×10^4 , 0.195×10^4 , 0.098×10^4 cells/cm² ずつプレーティング

した. 72 時間インキュベート後, WST-1 試薬 (Takara) を各々の well に 20 μ L ずつ速やかに加え, 1, 2, 3, 4 時間 37 $^{\circ}$ C インキュベーター中に放置した. 反応後, 波長 450nm (補正波長 655nm) における OD 値を測定した.



1.4 使用薬物および調製方法

<試薬>

Thrombospondin 1, human, bovine, mouse (ABGENT)

Oxidized Low Density Lipoprotein, human (Biomedical Technologies Inc.)

anti-CD36, Rabbit (Santa Cruz Biotechnology, inc.)

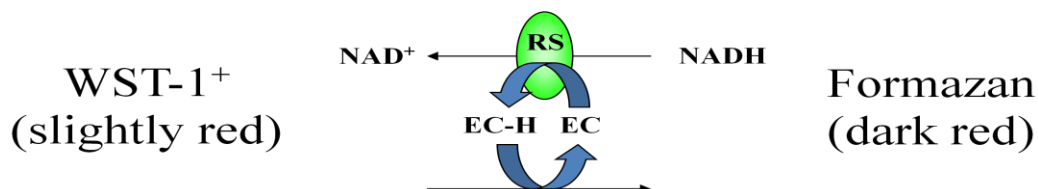
それぞれの試薬を, 滅菌された DPBS で適当な濃度に希釈し使用した.

1.5. WST-1 による薬物濃度の決定

80% コンフレントに達した A172 細胞を DMEM 培地で希釈し, 96well plate の各 well に 2 \times 10⁴ cells/cm² ずつプレーティングし over night した. 第 3 章 1.3. で調製したサンプルを各 well に 20 μ L ずつ添加し, 48 時間インキュベート後, WST-1 試薬を各々の well に 20 μ L ずつ速やかに加え, 1 または 2 時間 37 $^{\circ}$ C インキュベーター中に放置した. 反応後, 波長 450nm (補正波長 655nm) における OD 値を測定した.

<測定原理>

WST-1 Assay 法は、生細胞、細胞増殖能力及び細胞生存能力の指標となる方法である。WST-1 (テトラゾリウム塩) がミトコンドリア呼吸により産生した電子を受け取り、ホルマザン色素に還元される。このホルマザン色素を 450nm (補正波長 655nm) の吸収波長で測定する。



RS: ミトコンドリアのコハク酸-テトラゾリウム還元システム

EC: 電子結合試薬

1.6. 細胞保護効果の検討

80%コンフレントに達した A172 細胞を DMEM 培地で希釈し、96well plate の各 well に 2×10^4 cells/cm² ずつプレーティングし over night した。適当な濃度で調製した anti-CD36 または Thrombospondin 1 をあらかじめ、各 well に 20μL ずつ添加し、2 時間インキュベート後、Oxidized Low Density Lipoprotein (Ox-LDL) を添加し、48 時間インキュベートした。その後、WST-1 試薬を各々の well に 20μL ずつ速やかに加え、1 または 2 時間 37℃インキュベーター中に放置した。反応後、波長 450nm (補正波長 655nm) における OD 値を測定した。

1.7. Ox-LDLによるHMGB1遊離濃度の測定

80%コンフレントに達した A172 細胞を DMEM 培地で希釈し、6well plate の各 well に 2×10^4 cells/cm² ずつプレーティングし over night した。翌日、Ox-LDL を 0.5, 5.0, 50 μg/mL の濃度で添加し、その 48 時間後に上澄みを回収し、遠心分離 (15,000rpm 15分) を行い、上澄み液をサンプルとした。

尚、HMGB1 の測定にはシノテストを用いた。

1.8. Thrombospondin 1による抗炎症作用 (HMGB1遊離量測定)

第3章1.6.と同様に A172 細胞をプレーティングした。翌日、Ox-LDL を 5.0 μg/mL 添加した 60 分後に Thrombospondin 1 を 0.5, 5.0 μg/mL を添加した。その 48 時間後に上澄みを回収し、遠心分離

(15,000rpm 15分) を行い、上澄み液をサンプルとした。

尚、HMGB1の測定には第3章1節1.6.と同様に行った。

1.9. 統計処理

独立した2群間の比較には student t-test を使用し、また多重比較を行う場合は Tukey's test を使用した。なお、危険率が 5%である場合を統計学的に有意差有りとした。

2. 実験結果

2.1. WST-1 による蒔き数検討

結果を図 32 に示した。結果より、蒔く細胞数は 2×10^4 cells/cm² とし、WST-1 の測定は WST-1 を添加して 1 時間後および 2 時間後とした。

2.2. WST-1 による薬物濃度の決定

結果を図 33 に示した。結果より、Thrombospondin 1 の添加後濃度（培養中濃度）は細胞の生存に影響のみられない 10 µg/ml 以下が望ましいとした。また、anti-CD36 の添加後濃度（培養中濃度）については変化が認められなかったため、Shu-Tong らの報告⁴¹⁾をもとに 2~10 µg/ml を用いることにした。Ox-LDL については細胞障害の認められる濃度 50 µg/ml を用いることにした。

2.3. Thrombospondin 1 の細胞保護効果

結果を図 34 に示した。結果より、anti-CD36 の添加により、Ox-LDL による細胞障害を抑制することが認められた。また、Thrombospondin 1 の添加によっても、Ox-LDL による細胞障害を抑制することが認められた。

2.4. Ox-LDL による HMGB1 遊離濃度の測定

結果を図 35 に示した。結果より、Ox-LDL 添加による HMGB1 の遊離量は濃度依存的に上昇することが明らかとなった。ただし、第3章第1節2.2.の結果より、Ox-LDL を 50 µg/mL で添加した際の HMGB1 遊離量は、細胞死により放出された HMGB1 の量も含まれると考え、第3章1節1.8.の検討では細胞死を起こさず、HMGB1 を遊離させることのできる 5.0 µg/mL の濃度を用いて検討を行った。

2.5. Thrombospondin 1 による抗炎症作用 (HMGB1 遊離量測定)

結果を図 36 に示した。結果より, Ox-LDL 添加による HMGB1 の遊離量は TSP-1 を加えることで有意に減少した。つまり, Ox-LDL による HMGB1 の遊離を CD36 受容体と結合する TSP-1 が抑制することが明らかとなった。

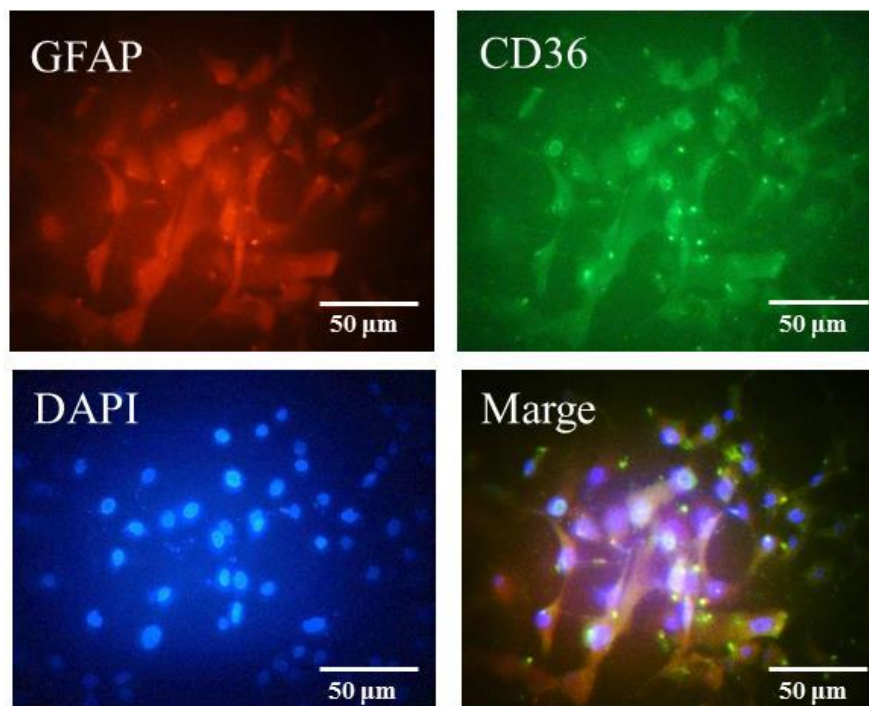


図 31 A172 immunohistochemistry

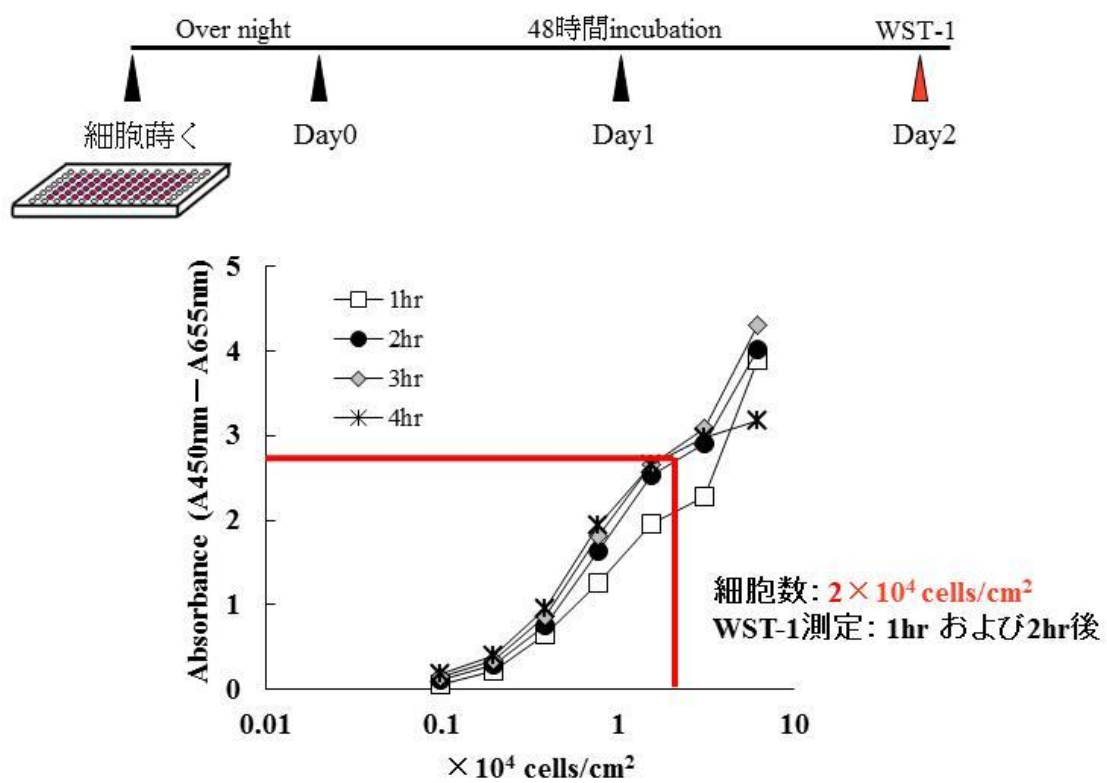


図32 WST-1による細胞数検討

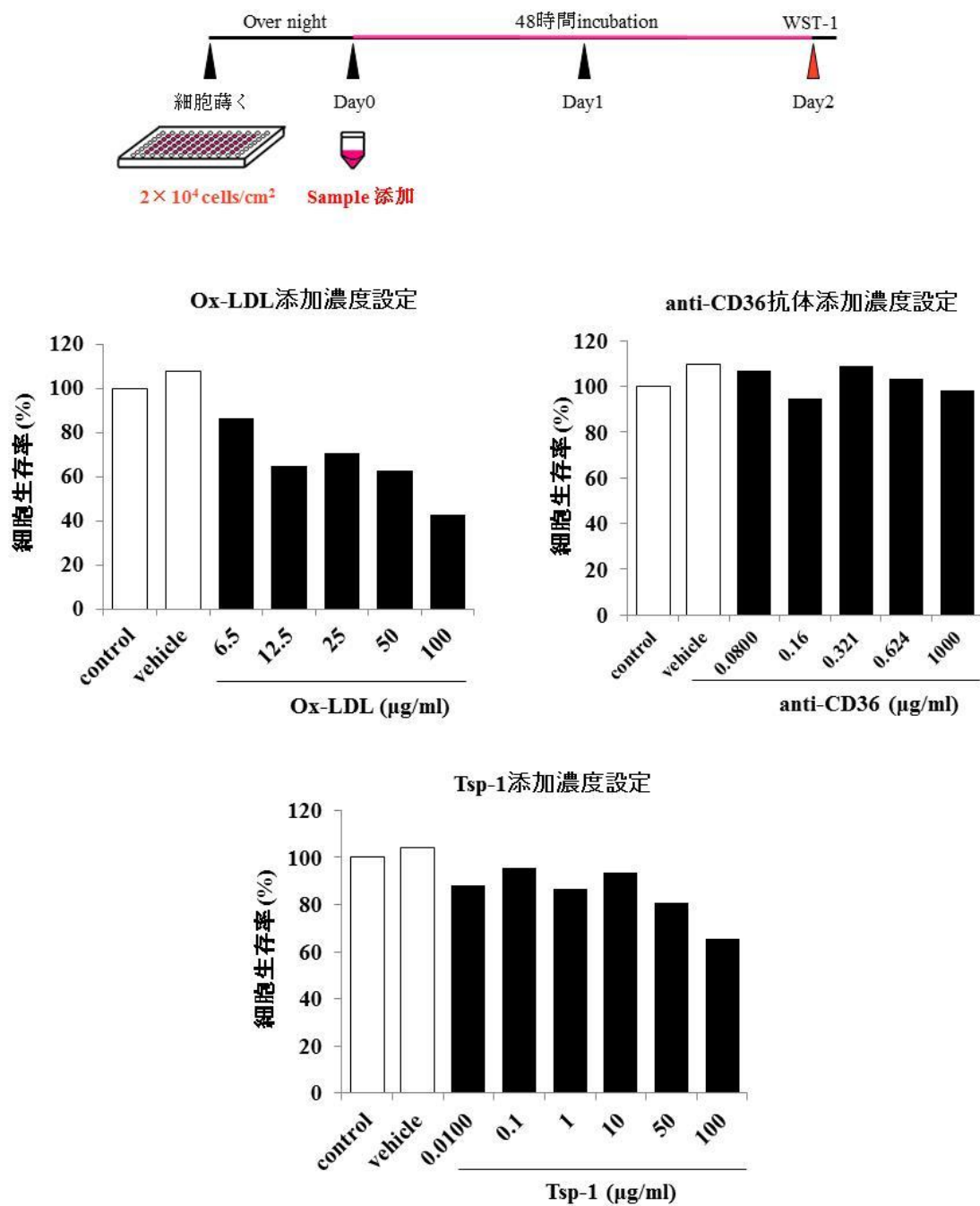


図33 WST-1による薬物の濃度設定

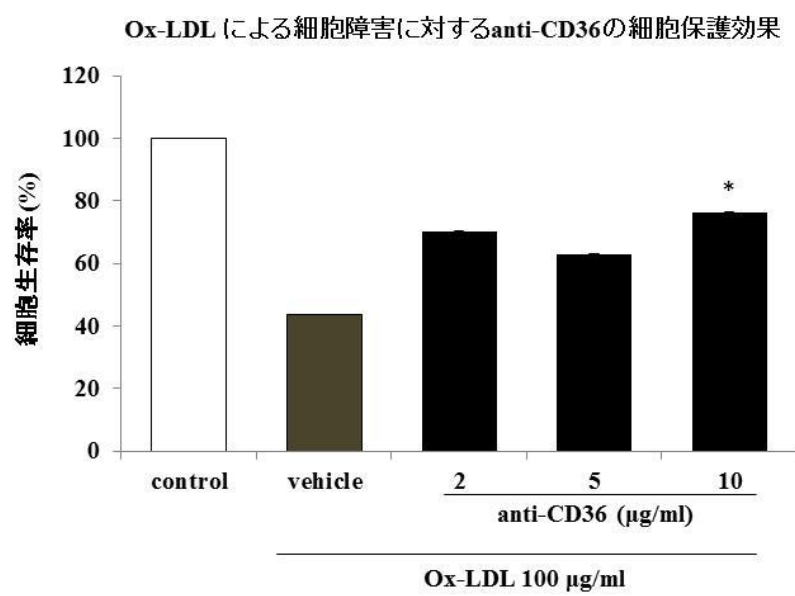
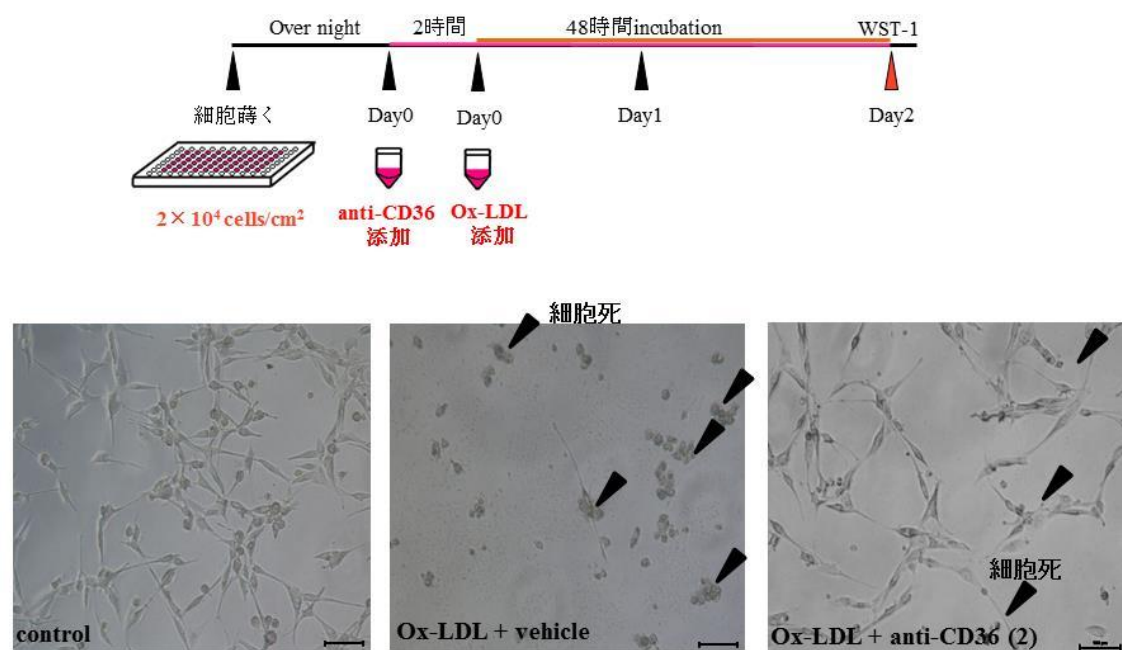


図34 Ox-LDL による細胞障害に対するanti-CD36の細胞保護効果

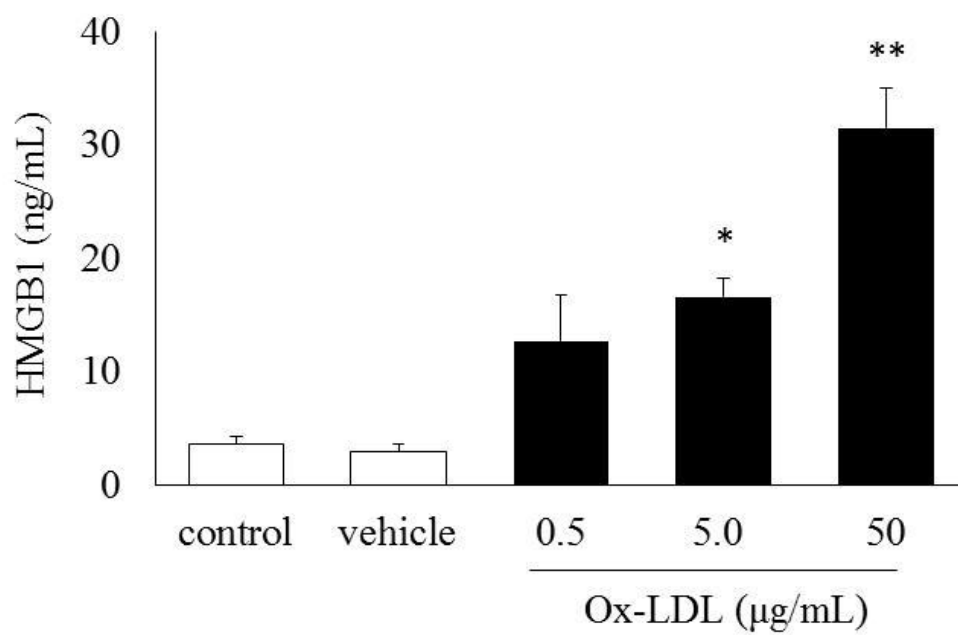
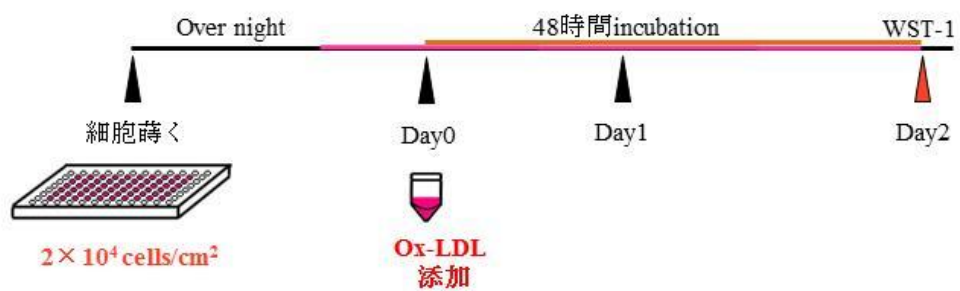


図35 Ox-LDLによるHMGB1遊離濃度

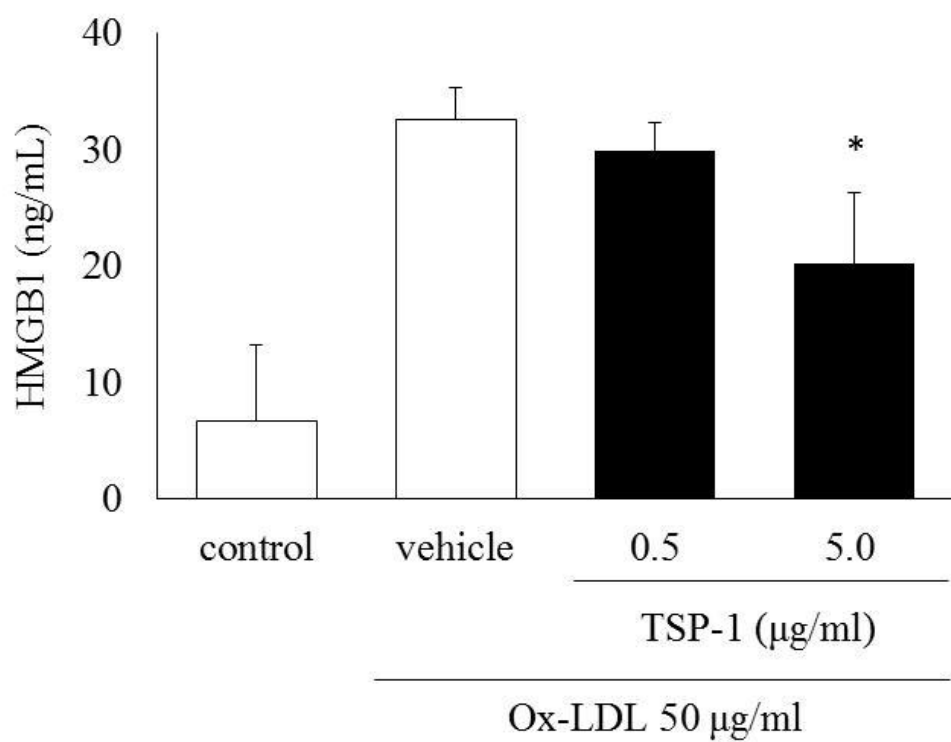


図36 TSP-1添加後のOx-LDLによるHMGB1遊離濃度

第2節 脳梗塞に対する Thrombospondin 1 の脳保護効果検討

1. 実験材料ならびに実験方法

1.1. 実験動物ならびに飼育方法

実験動物ならびに飼育方法は、第1章第1節の1.1.と同様である。

1.2. 実験手続き

1.2.1. 使用薬物および実験スケジュール

<試薬>

Thrombospondin 1 (Abcam)

投与量 : 0.1 mg/kg, 1.0 mg/kg

<実験スケジュール>

4h-MCA 閉塞後、再灌流直後に尾静注を行い、MCA 閉塞 24 時間後梗塞巣体積を測定。

1.2.2. MCA 閉塞マウスの作成手順

MCA 閉塞マウスの作成手順は、第1章第1節の1.2.1.と同様である。

1.2.3. 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) 染色

TTC 染色は、第1章第1節の1.2.2.と同様である。

1.2.4. 梗塞巣体積の算出

梗塞巣体積の算出は、第1章第1節の1.2.3.と同様である。

1.3. 統計処理

Tukey's test を使用した。なお、危険率が 5%である場合を統計学的に有意差有りとした。

2. 実験結果

2.1. MCA 閉塞後、Thrombospondin 1 (TSP-1) 投与による梗塞巣体積変化

結果を図 37 に示した。4hMCA 閉塞を施した脳梗塞モデルマウスに対し、Thrombospondin 1 (TSP-1) を投与したところ、1.0 mg/kg の投与で梗塞巣体積の減少が認められた。

<梗塞巣体積>

vehicle : $99.8 \pm 10.8 \text{ mm}^3$, TSP-1 (0.1 mg/kg) : $84.9 \pm 9.9 \text{ mm}^3$, TSP-1 (1.0 mg/kg) : $72.4 \pm 8.9 \text{ mm}^3$

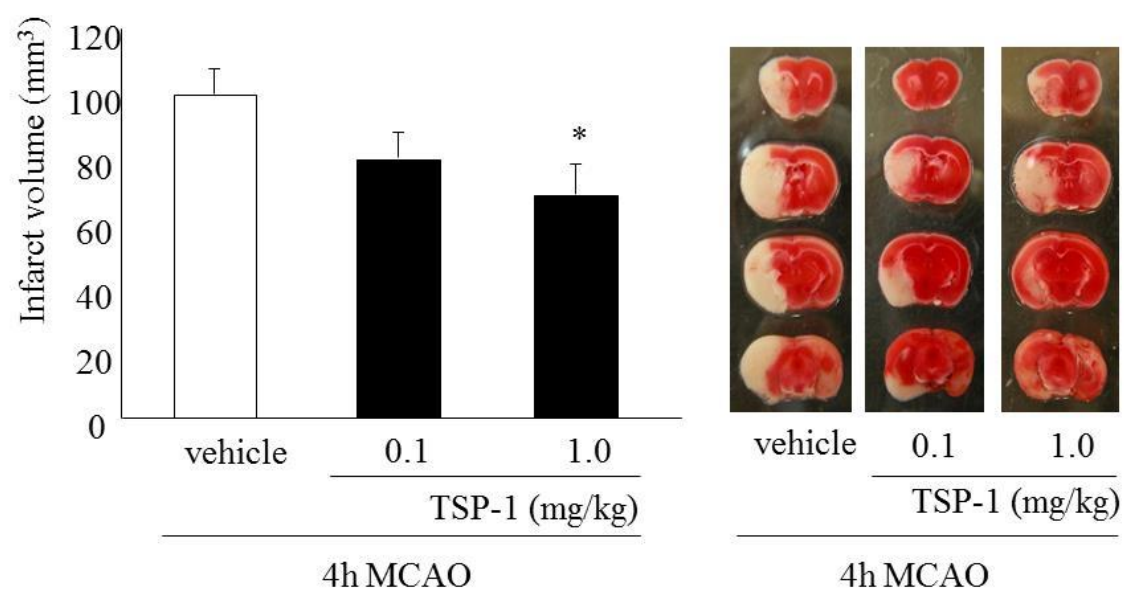


図37 Ox-LDLによるHMGB1遊離濃度

考察

第2章第2節の結果から、ADAMTS13は血栓溶解作用のみならず抗炎症作用も備え持つことが明らかとなった。本章では、ADAMTS13がt-PAに比べ、より治療効果の高いものとして確立するため、ADAMTS13が血栓溶解に伴う2次的な抗炎症作用だけではなく、直接的に抗炎症作用を示すのかin vivoにより検討を行った。

ADAMTS13のマルチドメインのひとつであるthrombospondin 1 (TSP-1)は、脳梗塞時の炎症反応に関わるスカベンジャー受容体CD36と結合する。この結合がCD36の活動を抑えることで抗炎症作用を示すのか検討するため、CD36受容体を有するアストロサイト^{42,43,44}のグリオーマであるA172細胞を用いて検討を行った。まず、この実験系がCD36の検討を行う上で、正しく検討することができるのか、CD36のリガンドである酸化LDLと、CD36のブロッカーとしてanti-CD36を用いて検討を行った。A172細胞に、酸化LDLを6.5~100 µg/ml 曝露させたところ濃度依存的に細胞死が起きていることが認められた。CD36受容体を有する細胞への酸化LDLの添加は、NF-κBの活性化やTNF-αの遊離量増加を引き起こし、炎症反応を誘導すると報告されており⁴⁵、このことが細胞死を引き起こしたと考えられる。次に、anti-CD36をあらかじめA172細胞に添加しておき、酸化LDL 100µg/mlを曝露させたところ、優位に細胞死を抑制することが認められた。つまり、この実験系において、CD36受容体に対するアゴニスト、アンタゴニストの関係を正しく検討できることが確認された。

TSP-1とあらかじめA172細胞に添加しておき、酸化LDL 100µg/mlを曝露させたところ、有意に細胞死を抑制することが認められた。つまり、TSP-1はCD36と結合することで、CD36のリガンドによる情報伝達を拮抗することが示唆された(図38)。

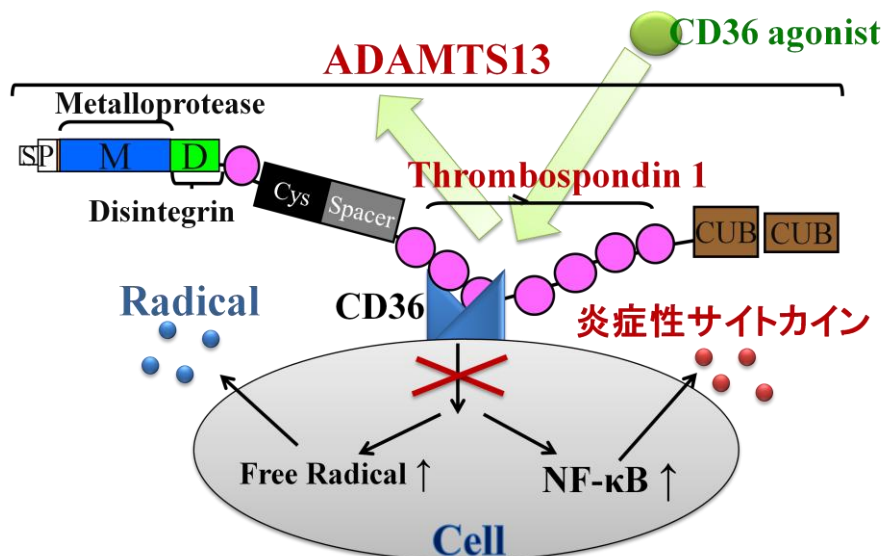


図 38 ADAMTS13 と CD36 の結合様式

以上のことから、TSP-1 をマルチドメインに含む ADAMTS13 は CD36 による炎症反応の惹起を抑制することができると考えられる。第 1 章第 2 節より、MCA 閉塞後、CD36 の発現量は脳虚血後 1 日目をピークに 3 日目まで上昇していることから、ADAMTS13 による抗炎症作用は脳虚血後 3 日目まで効果を期待することができると考えられ、t-PA 以上の治療域を持つことが期待できる。

また、CD36 受容体の下流には NF- κ B が存在する^{21,46)}。この NF- κ B の活性化は HMGB1 の遊離を促進すると報告されており^{47,48)}、ADAMTS13 が CD36 を介して HMGB1 の遊離を抑制する可能性がある。更に、大神らによると CD36 は advanced glycation endproducts (AGE) の一つであり⁴⁹⁾、また HMGB1 の受容体である RAGE もそのファミリーに属すると報告されている (図 39)^{49,50)}。このことから ADAMTS13 は直接 HMGB1 に作用する可能性が考えられる。

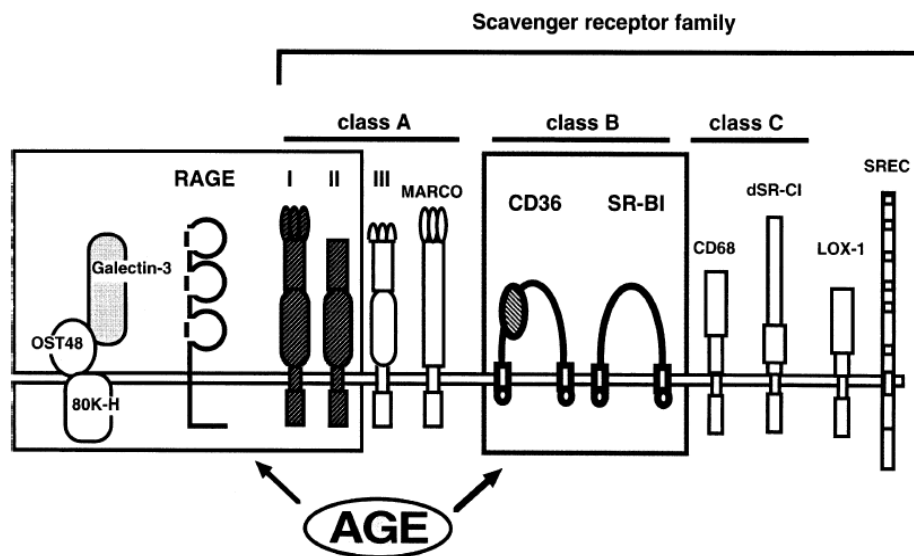


図 39 AGE のファミリー⁵⁰⁾

総括ならびに結論

脳梗塞治療では、t-PA 以上の有用な治療可能時間の長い治療法が求められている。本研究では新たな血栓溶解薬の候補として、von Willebrand factor 切断酵素である ADAMTS13 に着目した。このタンパクの脳梗塞時における病態生理学的役割を解明し、ADAMTS13 が、t-PA に替わり、脳出血を誘発することなく、血栓溶解作用をもつ新たな脳梗塞治療薬の候補となりえるか検討した。

<MCA 閉塞モデルの基礎検討>

- ・ 4 時間の MCA 閉塞，20 時間の再灌流処置は，線条体に脳梗塞巣を有意に形成した。
- ・ 4 時間 MCA 閉塞後，炎症マーカーである血漿中 HMGB1 濃度と CD36 の発現量増加が認められた。
- ・ 4 時間 MCA 閉塞後，血漿中 HMGB1 濃度がピークに達する時期に，最も死亡率の増加が認められた。
- ・ 4 時間 MCA 閉塞後，運動機能障害が現れるが慢性期になるにつれて改善がみられた。
- ・ 運動機能障害の改善が認められる時期に，脳内ではアストロサイトの活性化と特徴的な局在が認められた。

以上の結果から，4 時間の MCA 閉塞により閉塞された血管は，虚血状態になり破壊され，その後 20 時間の再灌流により，破壊された血管部に血液（酸素）が再び流れることで CD36 や HMGB1 などによる炎症性神経細胞死を誘発し，脳梗塞巣を形成していることが明らかになった。更に，HMGB1 に関しては MCA 閉塞後の死亡率増加と因果関係があることから，脳梗塞発症後の予後を測るのに適切なマーカーであることが明らかとなった。

また，慢性期にみられる運動機能の回復はアストロサイトの活性化が関与していると考えられる。

<t-PA の脳梗塞治療効果と脳出血併発>

- ・ MCA 閉塞後 2 時間での t-PA 投与は脳出血の誘発なしに，梗塞巣体積を減少させ，治療効果を示した。
- ・ MCA 閉塞後 4 時間での t-PA 投与は，梗塞巣体積に変化は認められず，また，大量の脳出血を併発していた。

以上の結果から，脳虚血後 2 時間以内の t-PA 投与では治療効果を発揮することができたが，

臨床でも言われているように長時間の虚血に対しては t-PA が治療効果を示さないことが動物実験でも明らかとなった。更に、治療域を超えた（4 時間以上）t-PA 投与では大量の脳出血を併発し、むしろ致命的症状を招いていることが認められた。発症から 4.5 時間以内という短時間で t-PA を使用できる症例は限られており、t-PA 以上の therapeutic time window と脳出血を誘発しにくい新たな治療法が必要である。

<ADAMTS13 の脳梗塞時における病態生理学的役割の解明>

- ・ 30 分 MCA 閉塞後、24 時間後の梗塞巣体積は、ADAMTS13 KO (KO) マウスでは Wild Type (WT) マウスに比べ、優位な増加が認められた。
- ・ 30 分 MCA 閉塞後、再灌流後の脳血流量は WT マウスに比べ、KO マウスでは有意な脳血流量低下が認められた。
- ・ 30 分 MCA 閉塞後、24 時間後の炎症反応（MPO 活性、血漿中 HMGB1 濃度）は、WT マウスに比べ KO マウスでは両炎症マーカーとも上昇したことにより、KO マウスでは強い炎症が起きていることが認められた。

以上の結果より、脳梗塞時における ADAMTS13 の病態生理学的役割としては、血栓溶解作用による血流改善作用と、抗炎症作用により脳保護効果をもたらしているということが明らかになった。

<ADAMTS13 の脳梗塞治療効果>

- ・ MCA 閉塞後 4 時間での ADAMTS13 タンパク投与は、脳出血の誘発なしに、梗塞巣体積を減少させた。
- ・ ADAMTS13 のマルチドメインの一つである Thrombospondin1 が、脳梗塞後の炎症反応の惹起に関わる受容体 CD36 と結合し、CD36 のリガンドと拮抗することで、抗炎症作用を示すことが認められた。

以上の結果より、ADAMTS13 は、t-PA では治療域を超えていた 4 時間という長時間の脳虚血に対しても、脳出血の誘発なしに、治療効果を発揮することが明らかになった。また、CD36 のリガンドによる情報伝達を ADAMTS13 が拮抗することが明らかとなった。

<結論>

本研究により、新たな血栓溶解薬の候補として着目した ADAMTS13 は、ずり応力依存的に血栓溶解を示す特徴から、t-PA 療法で懸念されている脳出血の併発といった問題を克服できる可

能性を秘めている。また, ADAMTS13 は血栓溶解作用のみならず, CD36 を介した直接的な抗炎症作用も発揮することが明らかとなった。同じ血栓溶解薬である t-PA には, 抗炎症作用を持つといった報告等はなく, ADAMTS13 は t-PA 以上の治療効果を期待することができる。また, 脳梗塞後 1~3 日目の亜急性期まで CD36 による炎症反応が現れるため, 抗炎症作用を備え持つ ADAMTS13 は亜急性以降まで治療効果を発揮することができ, 脳梗塞治療の重要な課題であった therapeutic time window の拡大も期待することができる (図 40)。現在の日本は本格的な高齢化社会に突入し, 脳梗塞の発症率・再発率は今後更に増加するものと考えられ, 脳梗塞に対する医療ニーズは非常に高く, 脳梗塞治療の更なる発展は必要不可欠であると言える。ADAMTS13 は一次構造が既知であるため, 今後研究が進展することで有効なアミノ酸配列を特定することが可能になると予想される。このことは, 脳梗塞の治療薬開発の有益な情報となるのみならず, 一塩基多型等の遺伝情報と併せることで, 脳梗塞の危険因子として情報を提供することも期待できる。これらの研究により, 将来の脳梗塞医療の発展に貢献することを期待したい。

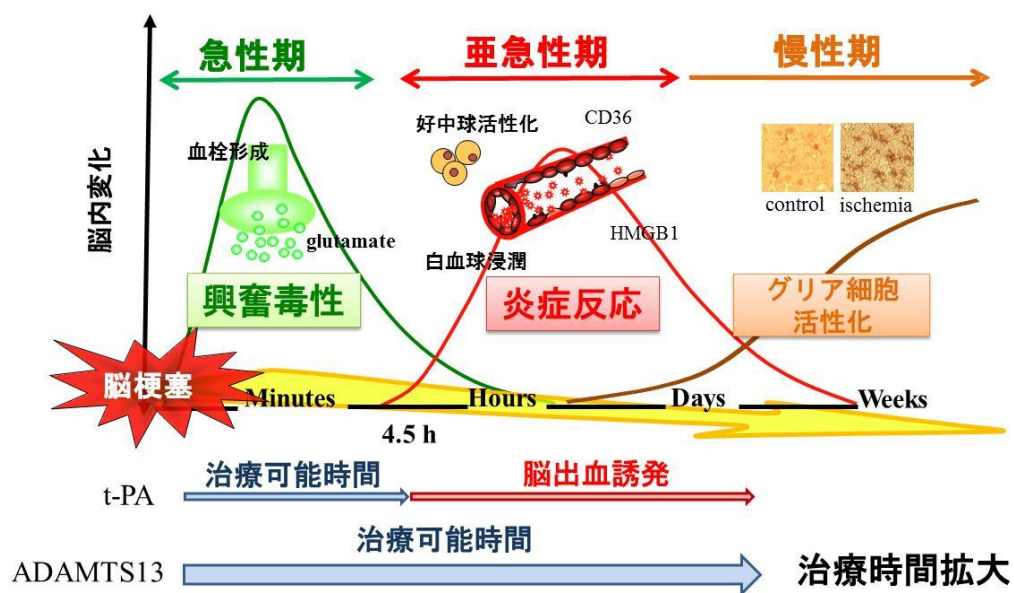


図 40

参考文献

1. 厚生労働省. 平成 20 年患者調査の概要
2. Hata J, Tanizawa Y, Kiyohara Y, et al. Ten year recurrence after first ever stroke in a Japanese community. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2005; 76: 368-372.
3. 生活習慣病予防研究会 (編): 2001 年生活習慣病のしおり. 社会保険出版, 東京, 2001.
4. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group: Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *N Engl J Med*. 1995; 333(24), 1581-1587.
5. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group: Effect of intravenous recombinant tissue plasminogen activator on ischemic stroke lesion size measured by computed tomography. NINDS. *Stroke*. 2000; 31(12), 2912-2919.
6. Umemura K. *Folia Pharmacol. Jpn*. 109, 175-185, 1997.
7. Rothman S. Synaptic release of excitatory amino acid neurotransmitter mediates anoxic neuronal death. *J Neurosci*. 1984; 4:1884-1891.
8. Wieloch T, Lindvall O, Blomqvist P, et al. Evidence for amelioration of ischemic neuronal damage in the hippocampal formation by lesions of the perforant path. *Neurol Res*. 1985; 7:24-26.
9. Fagg GE, Foster AC, Ganong AH. Excitatory amino acid synaptic mechanisms and neuronal function. *Trends Pharmacol. Sci*. 1986; 7:357-363.
10. Hayakawa K, Mishima K, Nozako M, et al. Delayed treatment with cannabidiol has a cerebroprotective action via a cannabinoid receptor-independent myeloperoxidase-inhibiting mechanism. *J Neurochem*. 2007; 102(5):1488-96.
11. Kazuo Kitagawa. Anti - inflammation strategy: potential brain protection in cerebral ischemia. *Folia Pharmacol. Jpn*. 2009; 104:202-206.
12. Soejima k, Kokame K, Matsumoto M. About ADAMTS13. 2009; *Jpn J Thromb Hemost*. 20: 377-397.
13. Ruggeri ZM. Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions. *J Thromb Haemost*. 2003; 1(7), 1335-1342.
14. Dong JF, Moake JL, Nolasco L, et al. ADAMTS13 rapidly cleaves newly secreted ultralarge von Willebrand factor multimers on the endothelial surface under flowing conditions. *Blood*. 2002; 100(12): 4033-4039.
15. Zhao BQ, Chauhan AK, Canault M et al. von Willebrand factor-cleaving protease ADAMTS13 reduces ischemic brain injury in experimental stroke. *Blood*. 2009;

- 114(15):3329-3334.
16. Sadler JE. Von Willebrand factor, ADAMTS13, and thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*. 2008; 112:11-18.
 17. Furlan M, Robles R, Galbusera M, et al. von Willebrand factor-cleaving protease in Thrombotic thrombocytopenic purpura and the hemolytic-uremic syndrome. *N Engl J Med*.1998; 339:1578-1584.
 18. Shida Y, Nishio K, Sugimoto M, et al. Functional imaging of shear-dependent activity of ADAMST13 in regulation mural thrombus growth under whole blood flow conditions. *Blood*. 2008; 111(3):1295-1298.
 19. Amanda K, Robert S, Christopher P, et al. ADAMTS13 binds to CD36: a potential mechanism for platelet and endothelial localization of ADAMTS13. *TRANSFUSION*. 2009; 49:206-213.
 20. Silverstein RL, Li W, Park YM, et al. Mechanisms of cell signaling by the scavenger receptor CD36: implications in atherosclerosis and thrombosis.*Trans Am Clin Climatol Assoc*. 2010; 121:206-20.
 21. Elisabetta M, Mara F, Alessandra G, et al. Atrovastatin downregulates monocyte CD36 expression, nuclear NF- κ B and TNF α levels in type 2 diabetes. *J Atheroscler Thromb*. 2010; 17:000-000.
 22. Cho S, Park EM, Febbraio M, Anrather J, et al. The class B scavenger receptor CD36 mediates free radical production and tissue injury in cerebral ischemia. *J Neurosci*. 2005; 9:25(10):2504-12.
 23. Ho YH, Frieda P, Lewis MY, et al. Regulated Expression of CD36 During Monocyte to Macrophage Differentiation: Potential Role of CD36 in Foam Cell Formation. *Blood*. 1996; 87: 2020 – 2028.
 24. Lee CH, Moon SM, Yoo KY, et al. Long-term changes in neuronal degeneration and microglial activation in the hippocampal CA1 region after experimental transient cerebral ischemic damage. *Brain Res*. 2010;1342:138-49.
 25. Cragolini AB, Huang Y, Gokina P, et al. Nerve growth factor attenuates proliferation of astrocytes via the p75 neurotrophin receptor. *Glia*. 2009; 57(13):1386-92.
 26. Li L, Lundkvist A, Andersson D, et al. Protective role of reactive astrocytes in brain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2008; 28(3):468-81.
 27. Chan PH. Role of oxidants in ischemic brain damage. *Stroke*. 1996; 27(6):1124-1129.

28. Klebanoff SJ. Myeloperoxidase. *Proc Assoc Am Physicians*. 1999; 111(5):383-389.
29. Wang H, Bloom O, Zhang M, et al. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science*. 1999; 285, 248–251.
30. Kim JB, Sig Choi J, Yu YM, et al. HMGB1, a novel cytokine-like mediator linking acute neuronal death and delayed neuroinflammation in the postischemic brain. *J Neurosci*. 2006; 26, 6413-6421.
31. Xu H, Yao Y, Su Z, et al. Endogenous HMGB1 contributes to ischemia/reperfusion-induced myocardial apoptosis by potentiating the effect of TNF{alpha}/JNK. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010.
32. Liu K, Mori S, Takahashi HK. Anti-high mobility group box 1 monoclonal antibody ameliorates brain infarction induced by transient ischemia in rats. *FASEB J*. 2007; 21(14):3904-16.
33. Muhammad S, Barakat W, Stoyanov S, et al. The HMGB1 receptor RAGE mediates ischemic brain damage. *J Neurosci*. 2008; 12;28(46):12023-31.
34. Wang H, Bloom O, Zhang M, et al. HMGB1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science*. 1999; 285:248-251.
35. Hayakawa K, Mishima K, Nozako M, et al. Delayed treatment with minocycline ameliorates neurologic impairment through activated microglia expressing a high-mobility group box1-inhibiting mechanism. *Stroke*. 2008; 39(3), 951-8.
36. Draude G, Lorenz RL. TGF-beta1 downregulates CD36 and scavenger receptor A but upregulates LOX-1 in human macrophages. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000; 278(4):H1042-8. 37
37. Kennedy DJ, Kuchibhotla S, Westfall KM, et al. A CD36-dependent pathway enhances macrophage and adipose tissue inflammation and impairs insulin signalling. *Cardiovasc Res*. 2010.
38. Sunghee Cho, Eun-Mi Park, Maria Febbraio, et al. The Class B Scavenger Receptor CD36 Mediates Free Radical Production and Tissue Injury in Cerebral Ischemia. *The Journal of Neuroscience*. 2005; 25(10):2504 –2512.
39. 日本脳卒中学会. 2013. 脳卒中ガイドライン.
40. Fujioka M, Hayakawa K, Mishima K, et al. ADAMTS13 gene deletion aggravates ischemic brain damage: a possible neuroprotective role of ADAMTS13 by ameliorating postischemic hypoperfusion. *Blood*. 2010; 115(8):1650-3.

41. Shu-Tong Y, Hui S, Na-Na Y, et al. Oxidized low density lipoprotein induces macrophage endoplasmic reticulum stress via CD36. *Acta Physiologica Sinica*. 2010; 62 (5): 433-440.
42. Alarcón R, Fuenzalida C, Santibáñez M, et al. Expression of scavenger receptors in glial cells. Comparing the adhesion of astrocytes and microglia from neonatal rats to surface-bound beta-amyloid. *J Biol Chem*. 2005; 280(34):30406-15.
43. Pijuan-Thompson V, Grammer JR, Stewart J, et al. Retinoic acid alters the mechanism of attachment of malignant astrocytoma and neuroblastoma cells to thrombospondin-1. *Exp Cell Res*. 1999; 25:249(1):86-101.
44. Husemann J, Silverstein SC. Expression of scavenger receptor class B, type I, by astrocytes and vascular smooth muscle cells in normal adult mouse and human brain and in Alzheimer's disease brain. *Am J Pathol*. 2001;158(3):825-32.
45. Stewart CR, Stuart LM, Wilkinson K, et al. CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. *Nat Immunol*. 2010; 11(2):155-61.
46. Stuart LM, Deng J, Silver JM, et al. Response to *staphylococcus aureus* requires CD36 mediated phagocytosis triggered by the COOH-terminal cytoplasmic domain. *J Cell Biol*. 2005; 170:477-485
47. Lv B, Wang H, Tang Y, et al. High-mobility group box 1 protein induces tissue factor expression in vascular endothelial cells via activation of NF-kappaB and Egr-1. *Thromb Haemost*. 2009; 102(2):352-9.
48. Yang QW, Wang JZ, Li JC, et al. High-mobility group protein box-1 and its relevance to cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2010; 30(2):243-54.
49. Ohgami N, Nagai R, Ikemoto M, CD36 serves as a receptor for advanced glycation endproducts (AGE). *Journal of Diabetes and Its Complications*. 2002; 16:56-59.
50. Sternberg Z, Ostrow P, Vaughan M, et al. AGE-RAGE in Multiple Sclerosis Brain. *Immunol Invest*. 2011; 40(2):197-205.

謝辞

本稿を終わるにあたり、本研究に終始懇切なる御指導と御鞭撻を賜りました福岡大学薬学部生体機能制御学教室の三島 健一教授、本多 健治講師、佐野 和憲講師および福岡大学薬学部臨床疾患薬理学教室の岩崎 克典教授、桂林 秀太郎准教授、窪田 香織助教に深謝致します。また、本研究の遂行にあたり、多大なる御指導と御助言を賜りました入江 圭一助教、松尾 宏一准教授に感謝の意を表します。また、公私共に多大な御助言と御協力を頂いた早川 和秀氏、渡辺 拓也助教、長尾 昌紀氏に心より深く感謝致します。また、共に実験を行ってくださった山下 侑太氏、明瀬 孝之氏に深く感謝致します。更に、共同研究者として、多くの議論、実験を共に行ってくださった特別実習生の土斐崎 友紀女史、安村 真子女史、中富 千哉子女史、西上 知佐女史、野田 尚子女史、水野 寧子女史、山崎 元貴氏をはじめとする福岡大学薬学部生体機能制御学教室の皆様にも深く感謝申し上げます。また、本研究に尊い命を提供して頂きました実験動物諸霊に深く感謝致します。最後に、学生生活を通じ始終精神的、経済的御支援を賜りました家族、そして私を支えてくださった方々に心より感謝致します。

誠にありがとうございました。