

虚血性脳障害メカニズムと抗酸化作用を有する食品の  
脳保護効果に関する基礎的研究

岩田 直洋

## 目次

| 総論の部                                    | 項  |
|---|----|
| 緒言                                      | 1  |
| 第1章 糖尿病態時の虚血性脳障害                        | 3  |
| 第1節 非糖尿病態および糖尿病態ラットの酸化ストレス度評価           |    |
| 第2節 虚血性脳障害と遺伝子発現パターン                    |    |
| 第3節 本章の小括                               |    |
| 第2章 脳障害時のシグナル伝達因子の作用解析                  | 17 |
| 第1節 虚血性脳障害の悪化に対する HMGB1 の関与             |    |
| 第2節 虚血性脳障害の悪化に対するサイトカインの関与              |    |
| 第3節 本章の小括                               |    |
| 第3章 エタネルセプトを用いた虚血性脳障害改善作用の検討            | 41 |
| 第1節 非糖尿病態ラットにおけるエタネルセプトの脳保護作用の検討        |    |
| 第2節 糖尿病態ラットにおけるエタネルセプトの脳保護作用の検討         |    |
| 第3節 本章の小括                               |    |
| 第4章 抗酸化能を有する食品・食品成分と医薬品による虚血性脳障害改善作用の検討 | 51 |
| 第1節 食品・食品成分の抗酸化能と虚血性脳障害改善作用の検討          |    |

第2節 虚血性脳障害におけるアスコルビン酸による保護作用メカニズム

第3節 虚血性脳障害における霊芝菌糸体培養培地抽出物による保護作用メカニズム

第4節 霊芝菌糸体培養培地抽出物による HMGB1 の放出抑制作用の検討 (*in vitro*)

第5節 霊芝菌糸体培養培地抽出物による虚血後の HMGB1 の放出抑制作用の検討 (*in vivo*)

第6節 霊芝菌糸体培養培地抽出物とエダラボンの併用効果

第7節 本章の小括

総括 . . . . . 84

謝辞 . . . . . 86

実験の部 . . . . . 87

第1章

第2章

第3章

第4章

引用文献 . . . . . 100

本論文で使用した略語一覧

AA : Ascorbic acid

AGEs : Advanced glycation end products

Akt : Serine/threonine-specific protein kinase, protein kinase B

AP-1 : Activator protein 1

BAP : Biological antioxidant potential

Bax : Bcl-2-associated X protein

BBB : Blood brain barrier

CAT : Catalase

CHOP : C/EBP homologous protein

COX-2 : Cyclooxygenase-2

CRP : C-reactive protein

CSF : Cerebrospinal fluid

DAPI : 4', 6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride

DCFH-DA : 2', 7'-Dichlorofluorescein diacetate

DHE : Dihydroethidium

DM : Diabetes mellitus

DPPH : 1, 1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl

d-ROMs : Diacron-reactive oxygen metabolites

Edv : Edaravone

ER : Endoplasmic reticulum

ERK1/2 : Extracellular signal-regulated kinase 1/2, p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204)

ETN : Etanercept

GFAP : Glial fibrillary acidic protein

GSH : Glutathione

GLUT : Glucose transporter

GPx : Glutathione peroxidase

HIF : Hypoxia Inducible Factor

Hsp : Heat shock protein

HMGB1 : High mobility group box 1

Iba1 : Ionized calcium-binding adaptor molecule 1

ICAM-1 : Intercellular adhesion molecule-1

IDF : International diabetes federation

IL-1 $\beta$  : Interleukin-1 beta

IL-6 : Interleukin-6

i.p. : Intraperitoneal  
i.v. : Intravenous  
LPS : Lipopolysaccharide  
MAK : Water-soluble extract from culture medium of *Ganoderma lucidum* mycelia  
MAPK : Mitogen-activated protein kinase  
MCAO/Re : Middle cerebral artery occlusion/Reperfusion  
MCP-1 : Monocyte chemotactic protein-1  
MMP-9 : Matrix metalloproteinase-9  
MPO : Myeloperoxidase  
MTT : 3-(4, 5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyl-2*H*-tetrazolium bromide  
NADPH : Nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate  
NeuN : Neuron specific nuclear protein  
NF- $\kappa$ B : Nuclear factor-kappa B  
NGF : Nerve growth factor  
NMDA : N-methyl-D-aspartate  
iNOS : Inducible nitric oxide synthase  
nNOS : Neuronal nitric oxide synthase  
non-DM : Non-diabetes mellitus  
OGD : Oxygen and glucose deprivation  
• OH : Hydroxyl radical  
ONOO<sup>-</sup> : Peroxynitrite  
PC12 : Pheochromocytoma-12  
PKC : Protein kinase C  
p38 MAPK : p38 mitogen-activated protein kinase  
p.o. : Per os  
QOL : Quality of life  
RAGE : Receptor for advanced glycation end products  
RECA-1 : Rat endothelial cell antigen  
RNS : Reactive nitrogen species  
ROS : Reactive oxygen species  
SOD : Superoxide dismutase  
STZ : Streptozotocin  
SVCT2 : Sodium-dependent vitamin C transporter  
TBARS : Thiobarbituric acid-reacting substances  
TIA : Transient ischemic attack  
TLR : Toll-like receptor

TNF- $\alpha$  : Tumor necrosis factor-alpha

TNFR : Tumor necrosis factor receptor

t-PA : Tissue-type plasminogen activator

TTC : 2, 3, 5-Triphenyltetrazolium chloride

TUNEL : Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate-biotin nick end  
labelling

XBP : X-box binding protein

## 総論の部

## 総論の部

### 緒言

脳血管疾患は、現在の日本人の死因の第 4 位に位置し、中でも脳梗塞による死因が高い割合を占めている [1]。脳梗塞は、寝たきりの主要な原因であり、脳血管疾患発症が患者の生活の質 (quality of life; QOL) を著しく低下させることから、日本のみならず世界的に大きな社会問題として、その対策が急務となっている。

脳は体重のわずか 2%ほどの臓器であるにもかかわらず、酸素消費量は全体の 20%を占めるために、活性酸素種 (ROS) を発生しやすい臓器である (酸素消費の 2~5%)。また、脳は神経細胞やグリア細胞、血管内皮細胞などから構成されており、グリア細胞および血管内皮細胞は虚血に対して比較的強く、神経細胞は虚血 (低酸素、低グルコース) に対して極めて脆弱である。一過性脳虚血発作 (TIA) は 24 時間以内に消滅する可逆的な脳血流の閉塞を特徴とするが、虚血に対して脆弱な神経細胞にあつては、一過性の虚血であっても神経細胞死が引き起こされる。また、脳虚血を繰り返して発症することで、脳梗塞を併発する確率が上昇する [2] と同時に、虚血および再灌流時に発生する酸化ストレスが引き金となり、神経細胞をアポトーシスに導く [3]。

2011 年の国際糖尿病連合 (IDF) の報告によると、糖尿病は、世界の成人人口のおよそ 8.3%にあたる 3 億 6600 万人が抱える疾病であり、年間 460 万人以上が糖尿病の合併症で死亡している。慢性的な高血糖は、ROS や活性窒素種 (RNS) などの酸化ストレスを増大させ、脳虚血やアテローム性動脈硬化症などの疾患に対する主要な危険因子となる [4-7]。これまでに、1 型および 2 型糖尿病モデル動物を用いた研究から、糖尿病併発時に虚血性脳障害が悪化すること [8-10]、実際、臨床現場における糖尿病患者では、非糖尿病患者と比べて脳卒中の発症率が約 2~3 倍高く、さらに予後不良や死亡率の増大をきたすこと [11, 12] が報告されているものの、その詳細なメカニズムは明らかではない。

著者は、糖尿病と一過性脳虚血の両疾患において、酸化ストレスに注目して医薬品の代替として疾病の予防を目的とした食品を探索し、それらの有効性や安全性について検証してきた。数十種類の天然物の中から血糖上昇抑制作用とともに抗酸化作用を示す食品を探索した結果、霊芝菌糸体を一定期間培養した後、培地ごと破碎して熱水抽出して得られた霊芝菌糸体培養培地抽出物 (MAK) が有効であることを明らかにした。さらに、ストレプトゾトシン (STZ) によって誘発した糖尿病態 (DM) ラットの過性脳虚血処置において、非糖尿病態 (non-DM) ラットに比べて顕著に脳障害が悪化することを確認し、これが MAK の経口投与によって抑制されることを見出した。このような虚血性脳障害のメカニズムの一因には、先に述べたように酸化ストレスや炎症関連因子の発現によるアポトーシスが大きな役割を占めるとされてきたものの、MAK は脳細胞に対してアポトーシスだけでなくネクローシスにおいても抑制作用を示す可能性が認められたことから、MAK の脳保護効果が、

従来の抗酸化作用のみでは説明ができず、その作用メカニズムの更なる検討が必要であると考えた。そこで、脳障害時の遺伝子発現パターン解析の結果に基づいて、MAKの脳保護作用のメカニズムを解明することにした。

本研究では、第1章において糖尿病態時の酸化ストレス状態を評価すると共に、一過性脳虚血時における脳細胞内の遺伝子発現についてDNAマイクロアレイによる網羅的な解析を行い、糖尿病態に一過性脳虚血を併発した際に生じる脳梗塞の増悪機序を推定した。第2章では、虚血性脳障害のメカニズムに、酸化ストレスや炎症関連因子によるアポトーシスが大きな役割を占めることから、非糖尿病態および糖尿病態ラットを用いてこれらの発現を比較・検討した。さらに、ネクローシスに注目し、この経路の引き金と考えられているhigh mobility group box 1 (HMGB1)の作用機序について検討するために、このタンパク質の細胞内の局在変化と障害の悪化との関連について評価した。第3章では、虚血性脳障害のメカニズムに基づいて、既存の薬剤による治療効果を判定した。さらに、第4章では、脳梗塞による障害の悪化のリスク軽減を目的として、代替医療に寄与できる機能性食品の評価とその有用性を提起すると共に食品と薬剤の併用効果について検討した。

## 第1章 糖尿病態時の虚血性脳障害

脳梗塞急性期の大脳皮質領域には、重度の障害をもたらす虚血中心部と可逆的な軽度あるいは中程度の障害をもたらす梗塞周辺（ペナンプラ）がある。

虚血中心部では、ミトコンドリア電子伝達系の障害、ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> の活性化に伴うアラキドン酸の遊離あるいは未だ詳細は明らかではないが病態下においてのみキサンチン脱水素酵素からキサンチン酸化酵素への変換が生じ、それらの過程で ROS が産生されることが報告されている [13]。

一方、ペナンプラにおける血管内皮細胞では、虚血で活性化した好中球の NADPH オキシターゼによりスーパーオキシドが産生され、血管内皮細胞が傷害を受けることから二次的な悪化が生じることも知られている。続いて、再灌流時には、虚血時の ROS 産生状態にある神経細胞に大量の血液が導入されるため、酸素の供給力が増大して ROS が爆発的に産生され、これによってミトコンドリアや細胞膜が損傷を受ける。同時に、虚血性神経細胞障害では、興奮性アミノ酸であるグルタミン酸の遊離と細胞内 Ca イオンの上昇をきたし、カルモジュリンの活性化を誘導して神経型一酸化窒素合成酵素 (nNOS) を介した ROS を産生する。また、ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> の活性化によりアラキドン酸カスケードが促進され、ROS 産生の増大によって再灌流時に生じるさまざまな反応が病態の悪化に寄与すると考えられている (Fig. 1-1 グルタミン酸・Ca 仮説) [13, 14]。

従って、一過性脳虚血などの脳血管疾患の治療あるいは予防のためには、脳虚血による障害悪化の機序を明らかにすることが重要と考えられることから、虚血直後の細胞内での遺伝子発現パターンを経時的に解析することで、障害のメカニズムを推定することにした。また、糖尿病態に脳虚血を併発させると非糖尿病態に比べて脳障害が増悪し、本来治療可能域であるペナンプラまでもが不可逆的な壊死に陥ることから、この悪化の原因を遺伝子の発現解析から推定することを試みた。

### 第1節 非糖尿病態および糖尿病態ラットの酸化ストレス度評価

虚血/再灌流による酸化ストレスの発生とその後のシグナル伝達については前記した通りであるが、糖尿病態時では酸化ストレスが顕著に上昇しているとの報告がある [15]。糖尿病態時の酸化ストレス産生の機序には、次の①～⑥が考えられている。①グルコースなどの還元糖が、タンパク質のアミノ基と非酵素的に Schiff 塩基を形成した後、アマドリ転移によって安定なアマドリ化合物を形成し、この化合物が自己酸化する過程で活性酸素が生成される。②その後、不可逆的な脱水・縮合を繰り返し、終末糖化産物 (AGEs) が形成される。AGEs は、内皮細胞上に存在する AGE 受容体と結合すると ROS の産出を促し、転写因子としての NF-κB を活性化してさまざまなサイトカインや増殖因子の分泌を促進させ、

炎症反応を惹起する。糖尿病態などの慢性的な高血糖状態では循環血液中や組織で AGEs が促進的に形成・蓄積され、酸化ストレスを上昇させる [15-17]。③高血糖状態ではポリオール代謝経路が活性化し、グルコースはフルクトースに変換される。フルクトースはグルコースよりもタンパク質を糖化する作用が強いことから、ROS の産生がさらに亢進し、ポリオール代謝に伴う NADPH の消費とそれによるグルタチオン還元酵素の低下と相まって、細胞内の酸化ストレス増強・細胞機能障害につながる。④プロテインキナーゼ C (PKC) の活性化により、血管細胞の NADPH オキシダーゼ活性を増強して、酸化ストレスの産生を亢進する。⑤AGEs が、スーパーオキシドジスムターゼ (SOD)、グルタチオンペルオキシダーゼ (GPx) などの抗酸化酵素活性を低下させるとともにグルタチオン、ビタミン C、ビタミン E などの低分子抗酸化因子の含量が低下する。⑥スーパーオキシドアニオン ( $O_2^-$ ) と NO の反応により、強力なニトロ化作用を有するパーオキシナイトライト ( $ONOO^-$ ) を産生して、タンパク質をニトロ化する。

糖尿病態では、上記①～⑥の現象が増幅して、酸化ストレスによる動脈硬化などが惹起され、細小血管障害および大血管障害が誘導される。 $O_2^-$ 、過酸化水素 ( $H_2O_2$ )、ヒドロキシラジカル ( $\cdot OH$ ) などの ROS は、DNA の損傷や脂質の過酸化、タンパク質の変性などを誘導し、生体に有害な反応を引き起こす。これら ROS は、糖尿病をはじめとした多くの疾患に関与するとの報告 [12, 18] から、疾病予防やその改善効果を目的とした酸化ストレスの軽減に注目が集まっている。

実験デザインを Fig. 1-2 に示した。1 週間馴化した 5 週齢の SD ラットに STZ (50 mg/kg) を単回で腹腔内投与し、血糖値が 300 mg/dL 以上の動物を 5 週間飼育して糖尿病態 (DM) ラットとして使用した。DM ( $282.1 \pm 57.3$  g) の体重は、緩衝液のみを投与した non-DM ( $412.3 \pm 27.5$  g) 群と比較して有意に減少し、また、血糖値 (non-DM :  $123.5 \pm 13.5$  mg/dL, DM :  $543.2 \pm 42.6$  mg/dL) は上昇した。

血中ヒドロペルオキシド濃度を指標とした d-ROMs テストから、体内酸化ストレス度を評価した。その結果、DM 群の酸化ストレス度 ( $252.8 \pm 32.9$  U.CARR) は、非糖尿病態 (non-DM) 群 ( $131.0 \pm 7.0$  U.CARR) の約 2 倍と有意に増加していた。さらに、BAP テストにより測定した抗酸化力は、non-DM 群 ( $1875.4 \pm 156.1$ ) と比較し、DM 群 ( $1475.7 \pm 67.1$ ) で有意に低下していた (Fig. 1-3)。さらに、脳組織の過酸化脂質含量は、non-DM 群と比べて、DM 群において分画したすべての脳部位において 1.3 から 2 倍程度有意に増加しており、この結果は、酸化ストレス度、抗酸化力の結果を反映して DM では脳組織が酸化ストレス状態であることを示していた (Fig. 1-4)。

生体のホメオスタシスの維持のため、ROS による種々の毒性に対して、内因性と外因性の除去機能の存在が重要となり、このうち内因性の ROS 除去は、SOD、カタラーゼ (CAT)、GPx などの抗酸化酵素が担っている。そこで、脳組織中の抗酸化酵素の活性を測定した結果、SOD、CAT および GPx 活性については、DM 群のほぼすべての脳部位において有意な

低下が認められた (Fig. 1-5)。

一方、生体内での ROS 除去方法として、ビタミン C のような抗酸化成分の摂取による外因性の ROS 除去も酸化ストレスの軽減に重要であると考えられている [19-22]。これまでに、DM では血中のビタミン C やビタミン E などの減少によって生体内の抗酸化力が低下し、 $O_2^-$  や  $H_2O_2$  が産生誘導されることによってタンパク質の非酵素的糖化修飾が増加することが明らかにされている [23]。また、糖化反応に伴い ROS が産生されることから、DM での抗酸化酵素活性の低下は、 $O_2^-$  や  $H_2O_2$  などの ROS 産生増大に起因していると考えられる。これらの結果から、DM の脳組織では、抗酸化酵素の活性低下によって抗酸化能が减弱し、酸化ストレスが増大していることが示唆された。

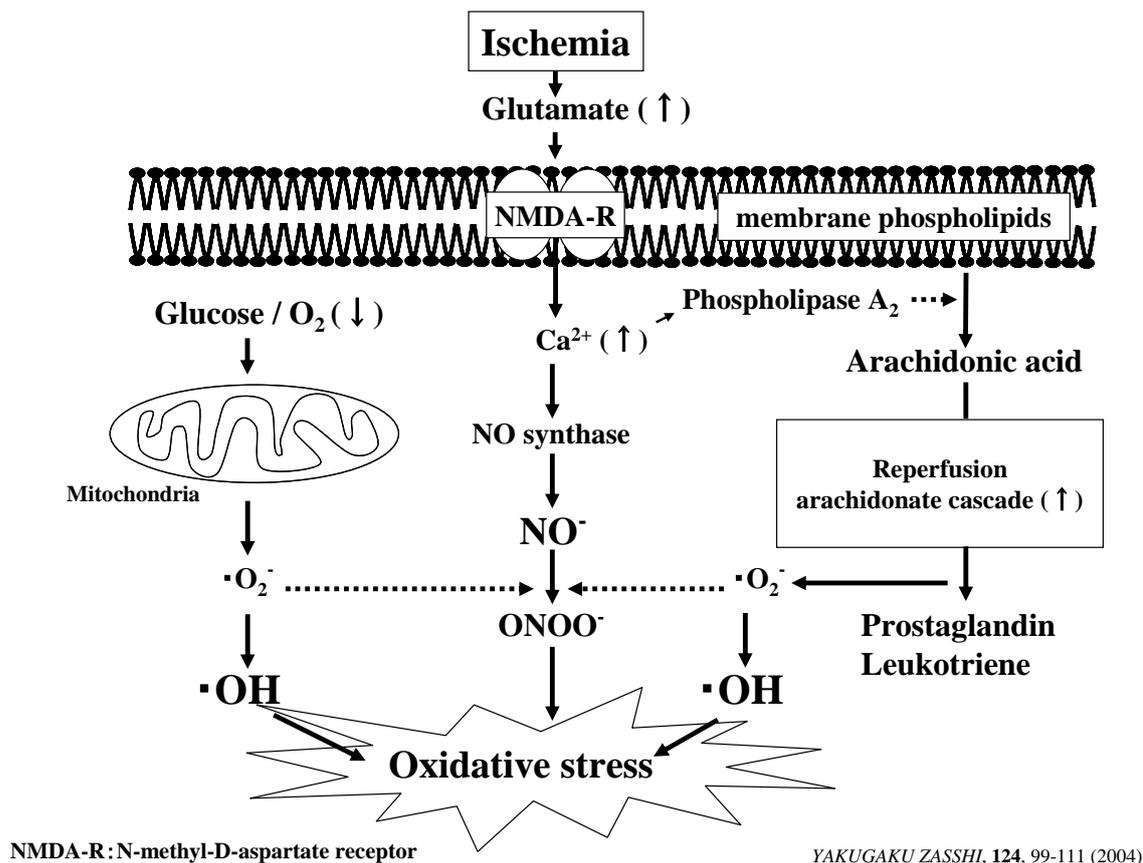


Fig. 1-1 The generation of ROS after cerebral ischemia.

**【Streptozotocin-induced diabetes mellitus model rats】**

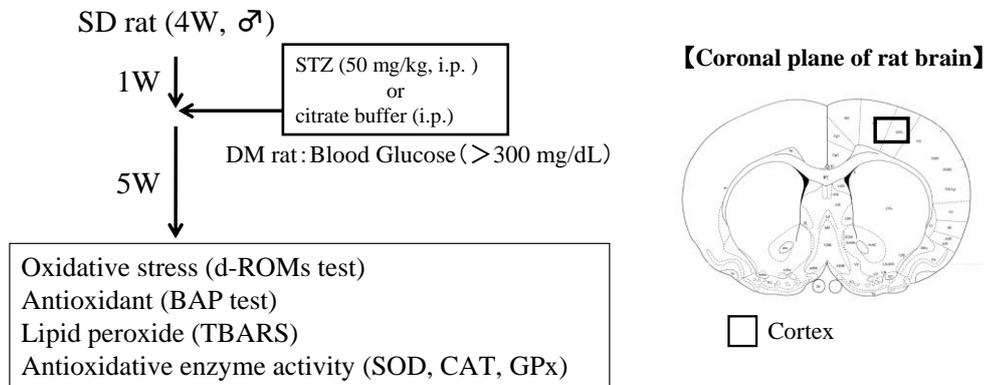


Fig. 1-2 The experimental design.

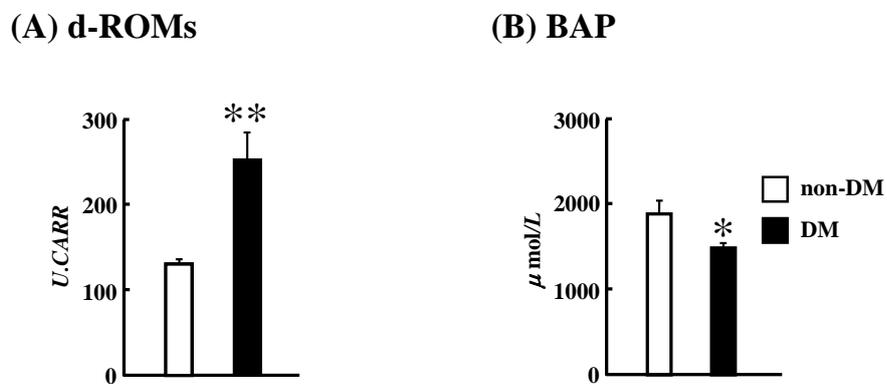


Fig. 1-3 Oxidative stress and antioxidant of diabetic rats.

(A) Total oxidative stress and (B) antioxidative capacity in plasma of the non-diabetic (non-DM) and the diabetic (DM) rats were determined by d-ROMs test and BAP test, respectively, both in non-DM and DM rats. The open column shows the non-DM group and the closed column shows the DM group. The results of the d-ROMs test were expressed in arbitrary units called “Carratelli units” (CARR U), where 1 CARR U corresponds to 0.08 mg/100 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Data are means ± S.D. of 4-8 rats per group. \*\*\**P* < 0.05, 0.01 for statistical significance compared to the non-DM group.

## TBARS

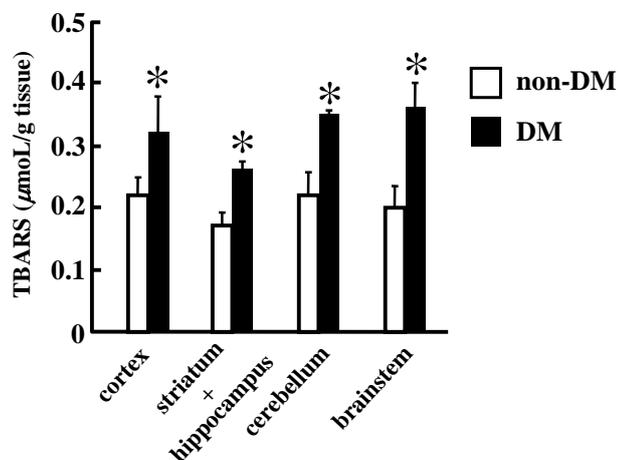


Fig. 1-4 Lipid peroxide of diabetic rat brain.

The level of lipid peroxidation in the brain of the non-diabetic (non-DM) and the diabetic (DM) rats were determined by TBARS assay. The open column shows the non-DM group and the closed column shows the DM group. Data are means  $\pm$  S.D. of 4-6 rats per group. \* $P < 0.01$  for statistical significance compared to each of the non-DM group.

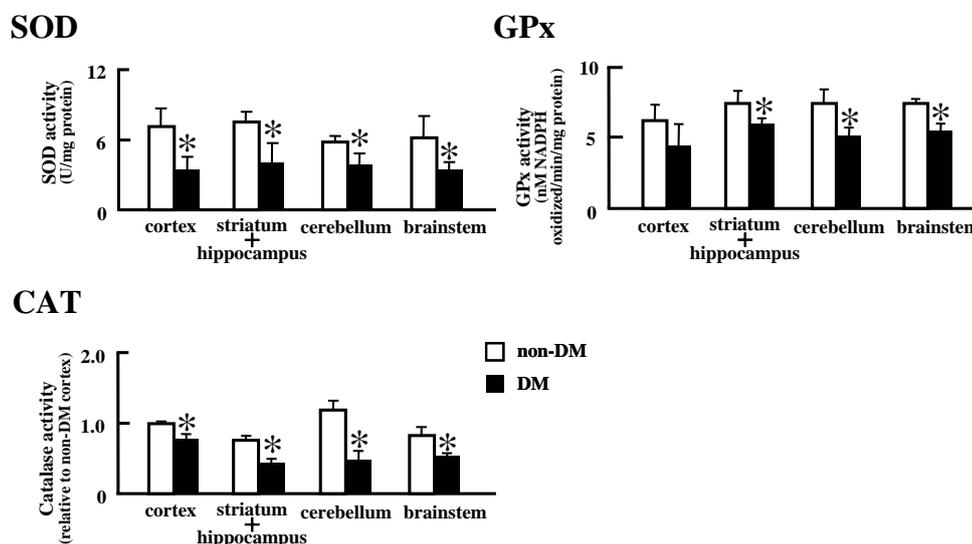


Fig. 1-5 Antioxidative enzyme (SOD, CAT and GPx) activities of diabetic rat brain.

The open column shows the non-DM group and the closed column shows the DM group. Data are means  $\pm$  S.D. of 4-6 rats per group. \* $P < 0.01$  for statistical significance compared to each of the non-DM groups.

## 第2節 虚血性脳障害と遺伝子発現パターン

虚血性脳障害において、梗塞病変は脳血管閉塞後から直ちに誘導され、数時間から数日をかけて虚血中心部からペナンプラに広がっていく。梗塞の進展には、まずミクログリアの活性化によって、IL-1 $\beta$ などの炎症性サイトカイン、monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)などのケモカインが産生される[24]。さらに、アストロサイトの活性化によってS100Bの産生・分泌が亢進して、これが神経細胞、ミクログリア、アストロサイトに作用して炎症性因子の発現を増加させ、病態を悪化させる[25]。近年、脳梗塞の原因となるアテローム硬化や細動脈硬化において、炎症マーカーのC-reactive protein (CRP)やIL-6などの炎症機転が深く関与していることから、炎症の進展を理解し、これらを制御することが脳保護に有望であると考えられている。また、脳虚血後では、炎症以外にもアポトーシスや小胞体(ER)ストレス、保護因子の発現など種々の反応が誘導され、特に糖尿病態時では、前述の因子の他にも様々な因子が加わり、障害悪化の機序は益々複雑なものとなる。

そこで、第2節では一過性脳虚血後の経時的な脳サンプルを採取して、脳障害を評価すると同時に、非糖尿病態と糖尿病態間における脳組織での網羅的な遺伝子の発現解析を行うことで、障害の進展とともに悪化のメカニズムを推定することにした。

### 【 Middle cerebral artery occlusion/Reperfusion model rats】

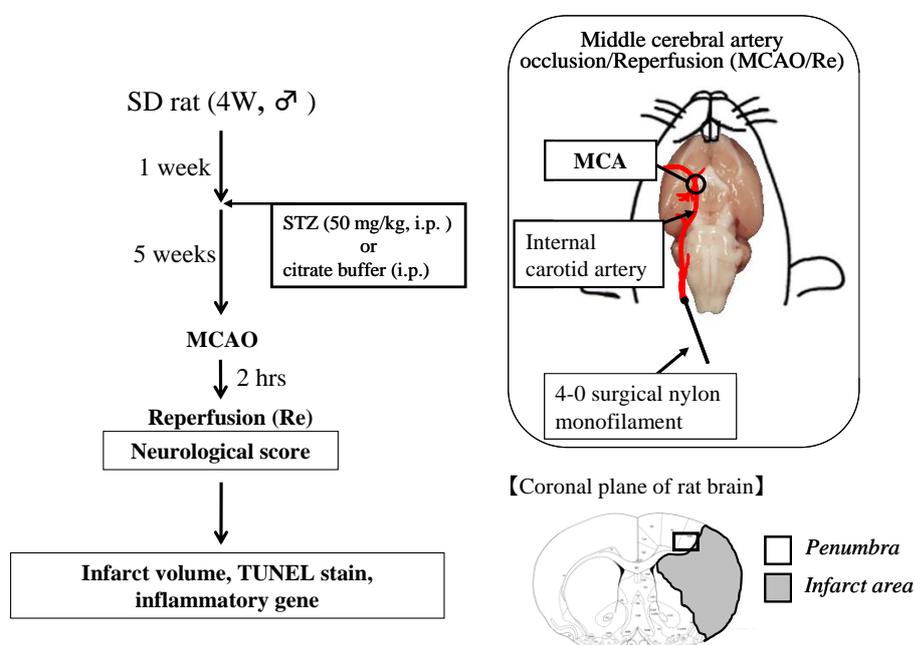
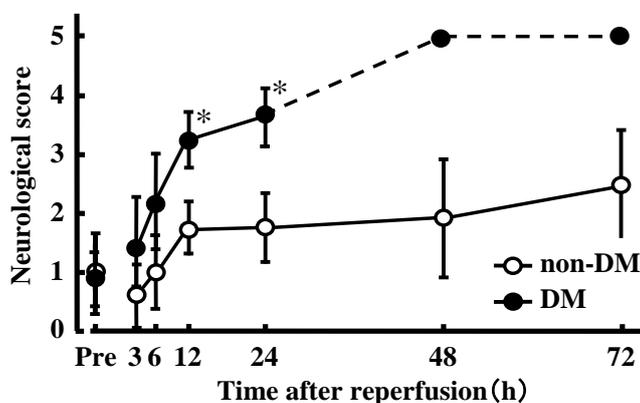


Fig. 1-6 The experimental design.

実験デザインを Fig. 1-6 に示した。10 週齢のラットに 2 時間の中大脳動脈閉塞 (MCAO) 処置後、non-DM 群では再灌流後 1、3、6、12、24、48、72 時間、DM 群では、0.5、1、3、6、12、24 時間での評価を行った。虚血処置後の運動機能を神経症状スコアにより評価した結果、MCAO 2 時間後において non-DM ( $1.3 \pm 0.48$ ) および DM ( $1.7 \pm 0.52$ ) ラットで有意な差は認められなかったが、再灌流 12 時間後において DM で神経症状が顕著に悪化した。因みに、non-DM 群では、再灌流後 72 時間後においても生存したのに対して、DM では、再灌流 24 時間以降のラットはすべて死亡した (Fig. 1-7)。



Grade 0: No deficit  
 Grade 1: Failure to extend right forepaw fully  
 Grade 2: Spontaneous circling or walking to contralateral side  
 Grade 3: Walking only when stimulated  
 Grade 4: Unresponsive to stimulation and a depressed level of consciousness  
 Grade 5: Death

Fig. 1-7 Neurological deficits in non-DM and DM rats induced by cerebral ischemia.

Post-ischemic neurological deficits were evaluated at 2 h of MCAO and various time points of reperfusion on a 5-point scale. The open circle shows the non-DM group and the closed circle shows the DM group. The dotted line represents that DM rats died from the severe ischemic damage until the 48-h time point of reperfusion. Data are means  $\pm$  S.D. (n = 5-8 per time point). \* $P < 0.01$  vs. corresponding values for the non-DM.

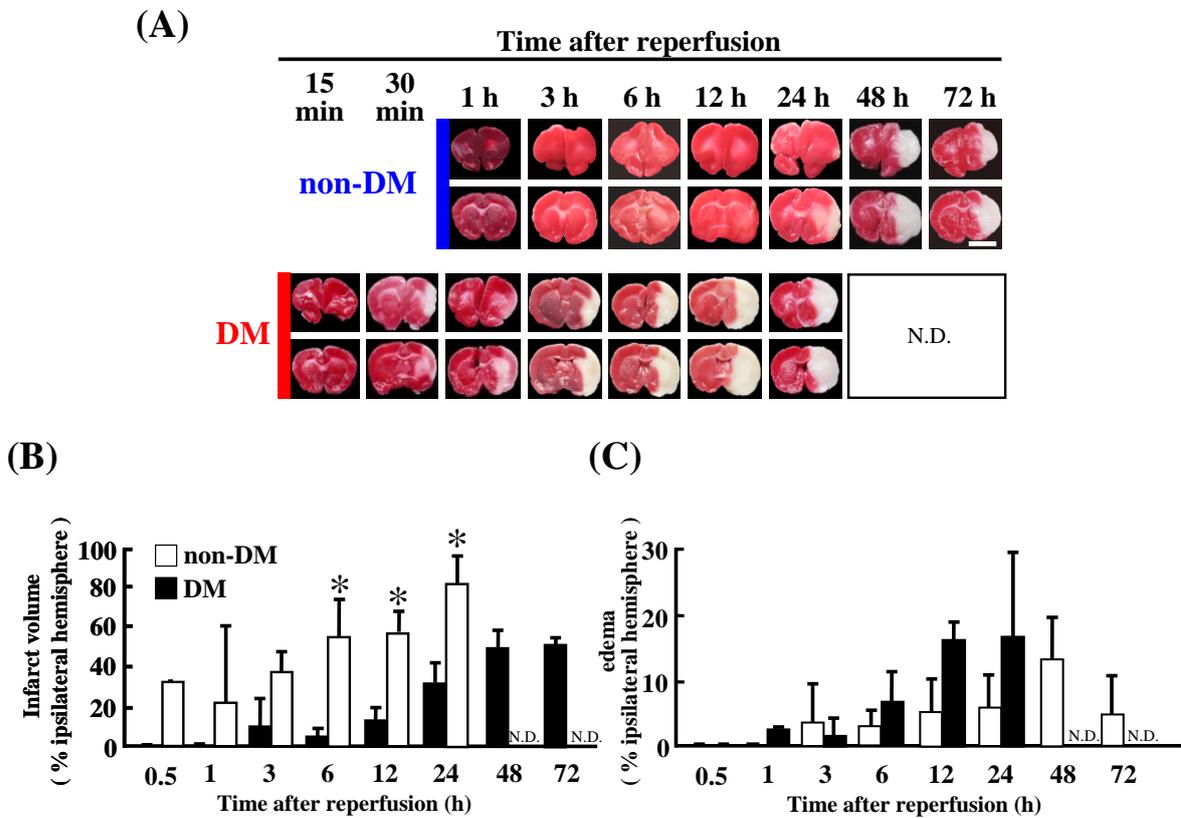


Fig. 1-8 Infarct volume and edema after cerebral ischemia.

(A) Representative photographs of coronal brain sections of DM and non-DM rats stained by TTC at various time points after MCAO/Re showing viable (red) and dead (white) tissues. (B) Infarct volume in ischemic hemispheres of the non-DM and DM groups after MCAO/Re by TTC staining. (C) Edema volume in ischemic hemispheres of the non-DM and DM groups after MCAO/Re. Infarct volume was calculated as follows: infarct volume (%) =  $[LV - (RV - MV)] / LV \times 100$  (MV: infarct volume, RV: right hemisphere volume, LV: left hemisphere volume). Hemispheric edema in the ischemic hemispheres was also calculated: edema (%) =  $(RV - LV) / LV \times 100$ . Scale bar = 5 mm. N.D. : not determined. Data are means  $\pm$  S.D. (n = 3-5 per time point). \* $P < 0.01$  vs. corresponding values for the non-DM.

次に、MCAO/Re 後に摘出した脳から 2 mm 厚の冠状切片を作製してトリフェニルテトラゾリウムクロライド (TTC) 染色し、梗塞巣体積および脳浮腫を測定した。その結果、non-DM では、虚血/再灌流後 12 時間から梗塞巣が形成されはじめ徐々に梗塞巣体積が増加し、48 時間以降に梗塞巣体積が同側半球の約 50% となった。一方、DM 群では、再灌流 30 分後の早期から梗塞巣が確認され、すでに 6 時間後において約 50% の梗塞巣が認められ、24 時間後では 80% 程度まで上昇した。また、DM 群では、浮腫の悪化が non-DM 群と比べて著しいことが認められた (Fig. 1-8)。

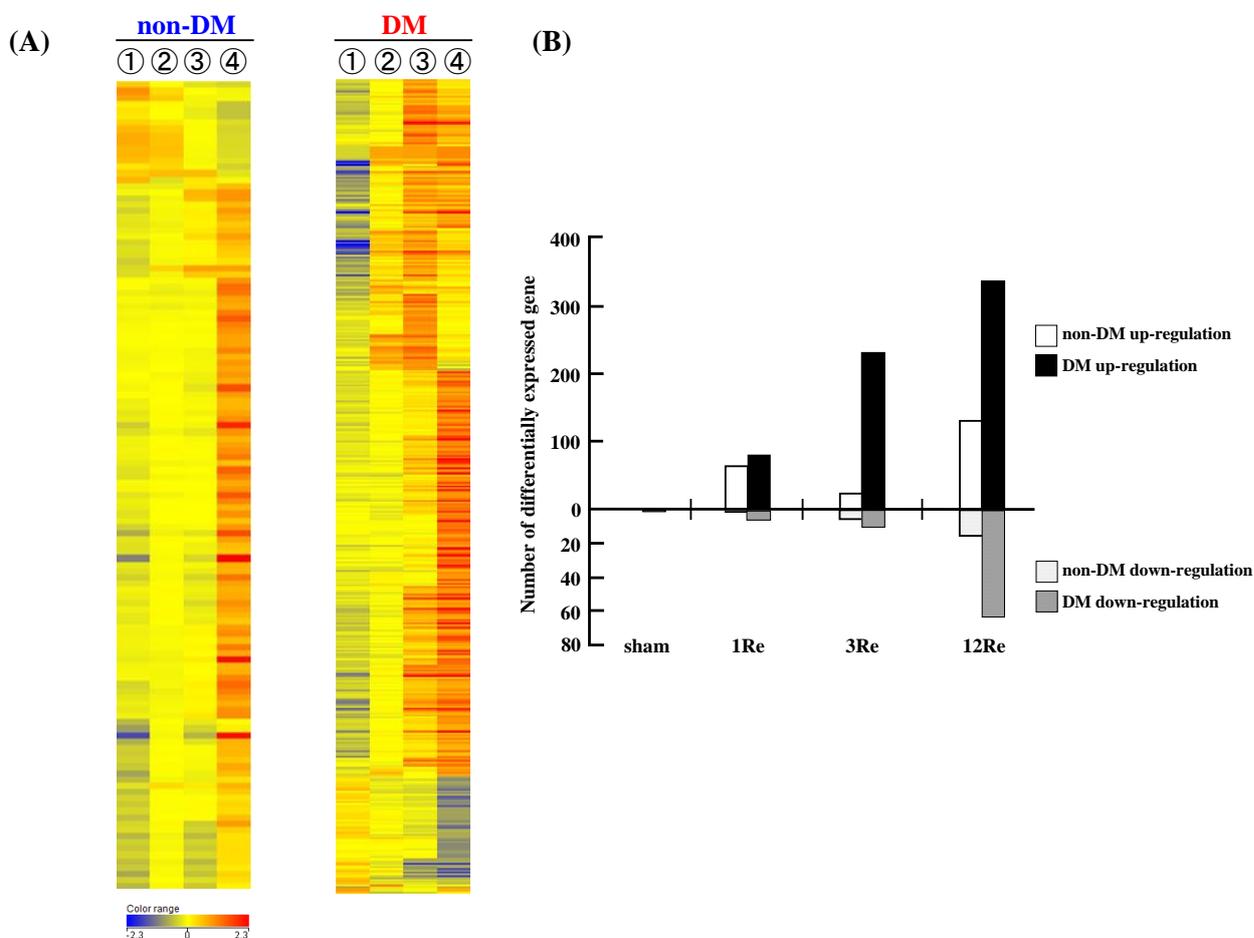
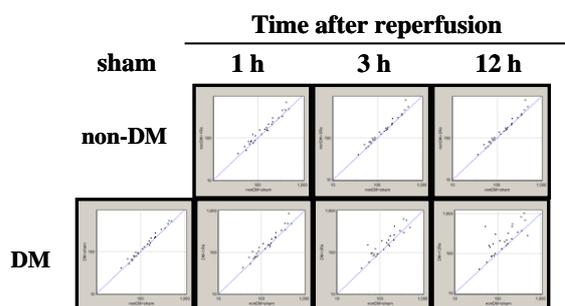


Fig. 1-9 Gene expression variation in ipsilateral cortexes in a transient middle cerebral artery occlusion rat model by DNA microarray analysis.

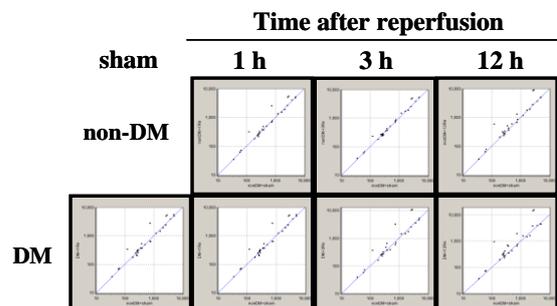
(A) Heat map in cluster analysis. ①sham, ②MCAO/Re 1 hr, ③MCAO/Re 3 hr, ④MCAO/Re 12 hr, (B) The numbers each bar indicate the selection of genes from the microarray data within a defined fold range of greater than 2.0-fold and less than 0.5-fold.

そこで、障害悪化のメカニズムを推定するために non-DM および DM 群の虚血/再灌流後の脳皮質ペナンプラから RNA を抽出し、遺伝子の発現パターンを DNA マイクロアレイ法により解析した。各データの normalization 後、non-DM の擬手術 (sham) 群を基準として全 27342 遺伝子の中から 2 倍以上に増減する遺伝子を抽出した。続いて、クラスタリング解析によって、虚血/再灌流 1、3、12 時間後と non-DM と DM 群とで比較した。その結果、non-DM の虚血/再灌流 1 時間では 64 遺伝子、3 時間で 28 遺伝子、12 時間で 145 遺伝子に変動が認められた。一方、DM では、sham と比較して虚血/再灌流 1 時間で 82 遺伝子、3 時間で 215 遺伝子、12 時間で 368 遺伝子と時間依存的に増加し、non-DM と比べて著しく変動遺伝子数が増加した。ところが、non-DM と DM 群の sham 間では、遺伝子の発現変動はほとんど認められなかった (Fig. 1-9)。そこで、変動遺伝子群の中から炎症、酸化ストレス、アポトーシスに関連する遺伝子に注目したところ、non-DM 群に比べて DM 群で早期から増加することが明らかになった (Fig. 1-10, Table 1)。以上の結果より、DM 群の脳組織では、虚血/再灌流後から遺伝子の発現変動が大きく、特に炎症や酸化ストレスに関連する遺伝子群が早期から誘発されることが明らかになった。

**(A) Inflammatory**



**(C) Oxidative Stress**



**(B) Apoptosis**

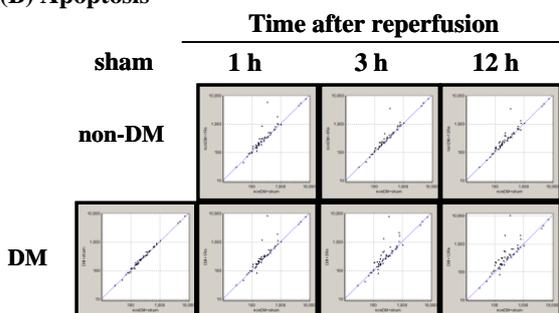
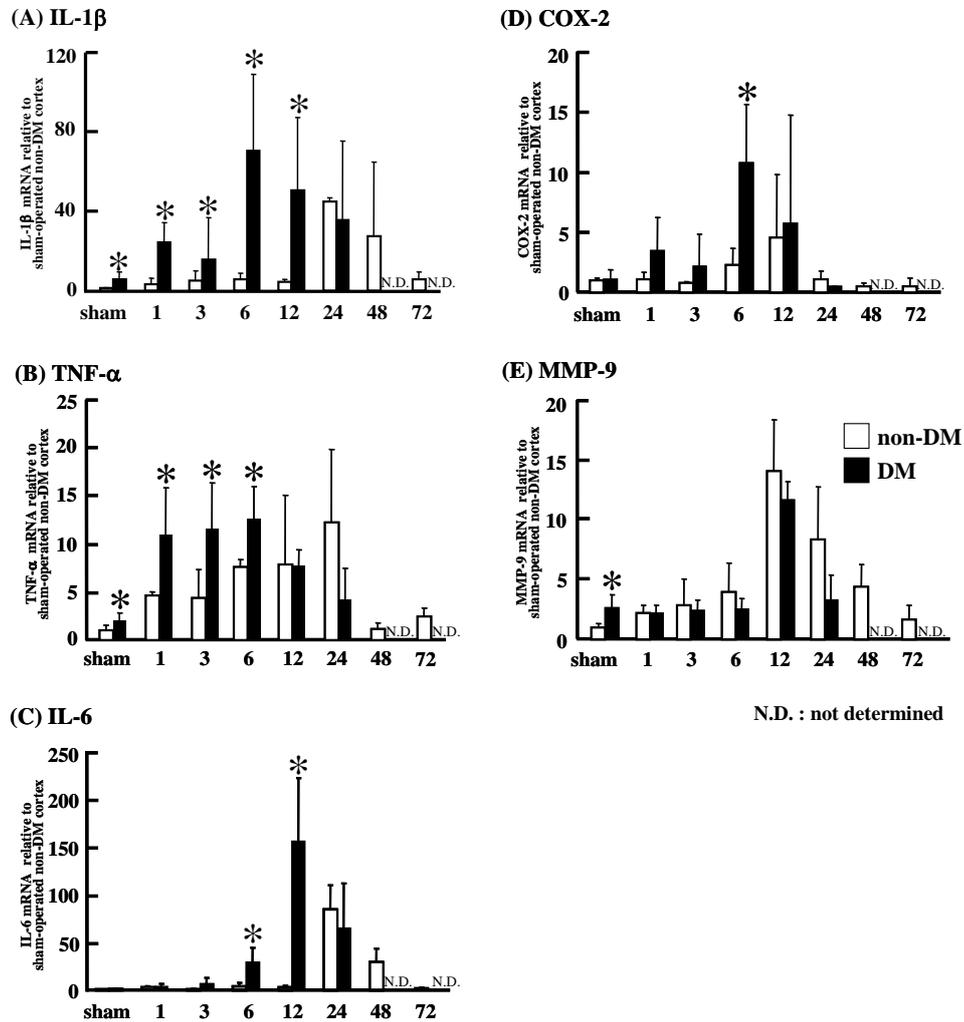


Fig. 1-10 Gene expression in penumbral cortex after cerebral ischemia by DNA microarray.

Expression levels of Inflammatory (A), apoptosis (B) and oxidative stress (C) gene expressions in the non-DM and DM rat penumbral cortexes after MCAO/Re were determined by Scatter plot.

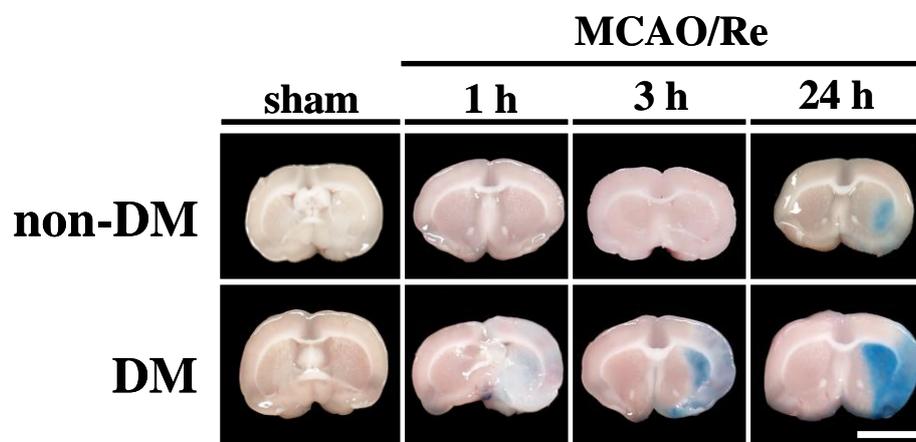
Table 1 Gene expression in penumbral cortex after cerebral ischemia in non-DM and DM rats.

| Genbank ID                  | Gene name  | Symbol         | Time after reperfusion / sham |      |      |       |      |       |       |       |
|-----------------------------|--|----------------|-------------------------------|------|------|-------|------|-------|-------|-------|
|                             |  |                | non-DM                        |      |      |       | DM   |       |       |       |
|                             |  |                | sham                          | 1Re  | 3Re  | 12Re  | sham | 1Re   | 3Re   | 12Re  |
| <b>Oxidative stress</b>     |  |                |                               |      |      |       |      |       |       |       |
| NM_138826                   | metallothionein 1a   | Mt1a           | 1.00                          | 1.87 | 1.73 | 3.14  | 0.86 | 1.95  | 4.03  | 5.69  |
| NM_012580                   | heme oxygenase (decycling) 1   | Hmox1          | 1.00                          | 2.58 | 1.88 | 4.76  | 0.93 | 2.73  | 3.00  | 7.63  |
| NM_021836                   | jun B proto-oncogene   | Junb           | 1.00                          | 3.38 | 1.02 | 1.72  | 1.28 | 3.61  | 4.22  | 2.56  |
| NM_019170                   | carbonyl reductase 1   | Cbr1           | 1.00                          | 1.10 | 2.13 | 1.21  | 1.00 | 1.10  | 2.13  | 1.21  |
| NM_001137564                | metallothionein 2A   similar to RIKEN cDNA 2300002M23  | Mt2A           | -                             | -    | -    | -     | 1.00 | 1.25  | 1.66  | 2.00  |
| NM_183403                   | glutathione peroxidase 2   | Gpx2           | -                             | -    | -    | -     | 1.00 | 1.10  | 1.69  | 2.99  |
| <b>Apoptosis</b>            |  |                |                               |      |      |       |      |       |       |       |
| NM_212504NM_031971NM_212546 | heat shock 70kD protein 1B (mapped)   heat shock 70kD protein 1A   heat shock protein 1-like | Hspa1b         | 1.00                          | 3.57 | 1.95 | 2.06  | 1.90 | 34.83 | 32.89 | 43.62 |
| NM_021835                   | Jun  | Jun            | 1.00                          | 2.17 | 1.39 | 1.57  | 1.00 | 2.32  | 2.59  | 2.44  |
| NM_031970                   | heat shock protein 1   | Hspb1          | 1.00                          | 6.31 | 2.21 | 11.94 | 1.01 | 10.15 | 7.09  | 21.40 |
| NM_133306                   | oxidized low density lipoprotein (lectin-like) receptor 1                                    | Olr1           | 1.00                          | 4.35 | 1.41 | 2.73  | 1.02 | 4.63  | 10.97 | 4.73  |
| NM_012922                   | caspace 3, apoptosis related cysteine protease   | Casp3          | -                             | -    | -    | -     | 1.00 | 0.99  | 1.78  | 2.03  |
| NM_012603                   | myelocytomatosis oncogene  | Myc            | -                             | -    | -    | -     | 1.00 | 1.44  | 1.70  | 2.29  |
| NM_012966                   | heat shock protein 1 (chaperonin 10)   | Hspe1          | -                             | -    | -    | -     | 1.00 | 1.48  | 1.59  | 2.05  |
| NM_001011901                | heat shock 105kDa/110kDa protein 1   | Hsph1          | -                             | -    | -    | -     | 1.00 | 1.79  | 2.13  | 2.60  |
| <b>Inflammatory</b>         |  |                |                               |      |      |       |      |       |       |       |
| NM_133519                   | interleukin 11   | Il11           | 1.00                          | 0.92 | 0.92 | 2.21  | 0.84 | 0.96  | 1.08  | 1.95  |
| NM_031055                   | matrix metalloproteinase 9   | Mmp9           | 1.00                          | 1.52 | 2.83 | 3.88  | 1.26 | 1.65  | 1.76  | 5.09  |
| NM_053963                   | matrix metalloproteinase 12  | Mmp12          | 1.00                          | 1.04 | 0.90 | 2.19  | 0.84 | 1.00  | 4.94  | 4.16  |
| NM_053819                   | TIMP metalloproteinase inhibitor 1   | Timp1          | 1.00                          | 4.26 | 2.84 | 32.03 | 1.41 | 4.88  | 24.13 | 45.25 |
| NM_031530                   | chemokine (C-C motif) ligand 2   | Ccl2           | 1.00                          | 8.14 | 3.63 | 57.95 | 0.89 | 9.86  | 30.83 | 52.79 |
| NM_001007612                | chemokine (C-C motif) ligand 7   | Ccl7           | 1.00                          | 1.07 | 1.05 | 4.10  | 0.88 | 1.21  | 1.73  | 3.65  |
| NM_053858                   | chemokine (C-C motif) ligand 4   | Ccl4           | 1.00                          | 4.56 | 1.36 | 2.33  | 1.13 | 6.55  | 12.25 | 8.37  |
| NM_181086                   | tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12a                                       | Tnfrsf12a      | 1.00                          | 1.21 | 1.12 | 2.09  | 1.00 | 1.17  | 1.69  | 2.51  |
| NM_001017478 NM_001105800   | chemokine (C-X-C motif) ligand 16   zinc finger, MYND domain containing 15                   | Cxcl16 Zmynd15 | 1.00                          | 1.50 | 1.83 | 5.19  | 1.05 | 1.40  | 3.23  | 10.17 |
| NM_013025                   | chemokine (C-C motif) ligand 3   | Ccl3           | 1.00                          | 4.14 | 1.78 | 3.71  | 1.12 | 6.59  | 11.92 | 11.41 |
| NM_053727                   | nuclear factor, interleukin 3 regulated  | Nfil3          | 1.00                          | 2.19 | 1.23 | 2.57  | 1.22 | 2.88  | 4.93  | 4.46  |
| NM_022194                   | interleukin 1 receptor antagonist  | Il1rn          | 1.00                          | 1.12 | 0.82 | 4.38  | 1.05 | 1.12  | 2.14  | 5.19  |
| NM_012589                   | interleukin 6  | Il6            | 1.00                          | 1.21 | 1.32 | 5.03  | 1.29 | 1.45  | 2.90  | 9.01  |
| NM_012967                   | intercellular adhesion molecule 1  | Icam1          | 1.00                          | 1.74 | 1.61 | 2.63  | 1.06 | 1.72  | 3.03  | 3.71  |
| NM_001013045                | chemokine (C-C motif) ligand 24  | Ccl24          | 1.00                          | 1.28 | 2.01 | 1.40  | 1.00 | 1.28  | 2.01  | 1.40  |
| NM_022194                   | interleukin 1 receptor antagonist  | Il1rn          | 1.00                          | 1.12 | 0.82 | 4.38  | 1.05 | 1.12  | 2.14  | 5.19  |
| NM_145789                   | interleukin 13 receptor, alpha 1   | Il13ra1        | -                             | -    | -    | -     | 1.00 | 1.00  | 1.49  | 2.51  |
| NM_022218                   | chemokine-like receptor 1  | Cmk1r1         | -                             | -    | -    | -     | 1.00 | 1.38  | 1.63  | 2.37  |
| NM_133380                   | interleukin 4 receptor, alpha  | Il4ra          | -                             | -    | -    | -     | 1.00 | 1.37  | 1.76  | 2.28  |
| NM_017019                   | interleukin 1 alpha  | Il1a           | -                             | -    | -    | -     | 1.00 | 1.59  | 1.43  | 2.37  |
| NM_031512                   | interleukin 1 beta   | Il1b           | -                             | -    | -    | -     | 1.00 | 1.46  | 1.04  | 3.37  |
| NM_013091                   | tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1a  | Tnfrsf1a       | -                             | -    | -    | -     | 1.00 | 1.31  | 1.89  | 2.43  |
| NM_053953                   | interleukin 1 receptor, type II  | Il1r2          | -                             | -    | -    | -     | 1.00 | 1.41  | 1.53  | 2.18  |
| NM_080889                   | interleukin 2 receptor, gamma  | Il2rg          | -                             | -    | -    | -     | 1.00 | 1.13  | 1.57  | 2.29  |
| NM_139089                   | chemokine (C-X-C motif) ligand 10  | Cxcl10         | 1.00                          | 1.07 | 2.05 | 0.97  | -    | -     | -     | -     |
| <b>Other</b>                |  |                |                               |      |      |       |      |       |       |       |
| NM_019905                   | annexin A2   | Anxa2          | 1.00                          | 1.21 | 1.15 | 3.23  | 0.91 | 0.99  | 1.73  | 4.89  |
| NM_138882                   | phospholipase A1 member A  | Pla1a          | 1.00                          | 1.40 | 1.57 | 2.13  | 0.94 | 1.21  | 2.42  | 4.82  |
| NM_024400                   | ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 1                                   | Adamts1        | 1.00                          | 2.67 | 1.37 | 3.93  | 1.21 | 3.04  | 5.15  | 7.89  |
| NM_017232                   | prostaglandin-endoperoxide synthase 2  | Ptgs2          | 1.00                          | 3.16 | 1.95 | 3.77  | 1.13 | 3.49  | 5.88  | 4.37  |
| NM_021583                   | prostaglandin E synthase   | Ptges          | 1.00                          | 2.21 | 1.90 | 3.23  | 0.92 | 2.11  | 6.13  | 6.86  |
| NM_013151                   | plasminogen activator, tissue  | Plat           | 1.00                          | 2.29 | 1.45 | 1.90  | 1.25 | 2.82  | 3.29  | 2.50  |
| NM_001004095                | S100 calcium binding protein A11 (calizzarin)  | S100a11        | 1.00                          | 1.00 | 1.11 | 2.04  | 0.78 | 1.12  | 1.39  | 2.76  |
| NM_133307                   | protein kinase C, delta  | Prkcd          | 1.00                          | 2.21 | 1.90 | 3.23  | 2.50 | 2.69  | 3.19  | 5.50  |
| NM_001100674                | mitogen activated protein kinase kinase 3  | Map2k3         | -                             | -    | -    | -     | 1.00 | 1.31  | 1.82  | 2.22  |
| AB042272                    | ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 4                                   | Adamts4        | -                             | -    | -    | -     | 1.00 | 1.28  | 1.50  | 2.74  |
| NM_001048044                | CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 3  | Cdc42ep3       | -                             | -    | -    | -     | 1.00 | 1.59  | 2.83  | 1.97  |
| NM_001105879                | Cdc42 GTPase-activating protein  | Cdgap          | -                             | -    | -    | -     | 1.00 | 1.18  | 1.77  | 3.02  |
| NM_053587                   | S100 calcium binding protein A9  | S100a9         | -                             | -    | -    | -     | 1.00 | 1.24  | 1.94  | 2.21  |



*Fig. 1-11* Gene expression of inflammatory cytokines and enzymes in penumbral cortex after cerebral ischemia.

Expression levels of IL-1 $\beta$  (A), TNF- $\alpha$  (B), IL-6 (C), COX-2 (D) and MMP-9 (E) mRNA in the non-DM and DM rat penumbral cortex after MCAO/Re were determined by real-time PCR analysis. The open column shows the non-DM group and the closed column shows the DM group. Data were normalized to  $\beta$ -actin and were expressed as mean  $\pm$  S.D. relative to the sham-operated non-DM (n = 4-6 per time point); \* $P$  < 0.05 vs. corresponding values for the non-DM.



*Fig. 1-12* Blood-brain barrier permeability by Evans blue stain.

Representative coronal brain sections of DM and non-DM rats stained by Evans blue at 1, 3 and 24 hr after MCAO/Re. Scale bar = 5 mm.

DNA マイクロアレイ解析の結果、虚血/再灌流処置により炎症関連遺伝子の発現が、DM 群で増加する傾向が認められたことから、*real time RT-PCR* 法を用いてさらに詳細な発現の推移を解析した。DM ラットの脳皮質ペナンプラでは、sham 群においてすでに  $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\beta$  の発現がそれぞれ約 2.0、5.6 倍に上昇しており、加えて、虚血/再灌流処置早期からこれらの発現が顕著に上昇した。一方、 $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\beta$  の下流に位置する  $\text{IL-6}$ 、 $\text{COX-2}$ 、 $\text{MMP-9}$  の発現は、虚血/再灌流後に両遺伝子の発現に遅れて経時的に上昇した。また、DM では non-DM ラットに比べて、これら遺伝子の発現が早期から上昇した。以上のことから、糖尿病態ラットの脳では、sham 群においてすでに炎症反応が誘発されている可能性が強く示唆された (Fig. 1-11)。

脳は、血液から脳脊髄液への物質の移動が血液脳関門 (BBB) によって厳密に隔てられている臓器である。一過性脳虚血において、血中では  $\text{IL-6}$  などのサイトカインの産生が増加し、脳組織では  $\text{MMP-9}$  の活性化を経て BBB が破綻することが知られており、これを介して脳組織内へサイトカインが流入し、障害を増悪させることが報告されている。  $\text{MMP-9}$  遺伝子の経時的な発現解析 (Fig. 1-11) から、DM の sham 群で有意に増加した  $\text{MMP-9}$  が、虚血処置によりさらに上昇することで BBB の障害が誘発されていると予測し、Evans blue 染色法を用いて透過性を解析した。MCAO 直後に鎖骨下静脈より Evans blue を投与し、再灌流後経時的に脳サンプルを摘出した結果、non-DM および DM 群において虚血処置なし (sham) では、BBB の破綻は認められなかった。non-DM 群では、虚血/再灌流 1 時間およ

び3時間後において透過は認められなかったが、24時間後において透過が確認された。一方、DMでは虚血/再灌流1時間後から脳への透過が認められ、早期からのBBB破綻が誘発されていることを示していた (Fig. 1-12)。以上の結果から、DMではnon-DM群に比べて虚血性脳障害が早期から進行し、その障害パターンは、炎症性関連因子の遺伝子発現パターンと類似していることが明らかになった。

### 第3節 本章の小括

本章では、ストレプトゾトシン誘発1型糖尿病態ラットにおいて、虚血/再灌流後の脳障害が非糖尿病態群と比べて顕著に悪化することから、その悪化メカニズムを解析することを目的とした。

血液サンプルを用いた結果から、糖尿病態では平常時から酸化ストレス状態にあり、さらに、脳組織において種々の抗酸化酵素の活性低下と過酸化脂質量の増加から、個体のみならず脳組織も酸化ストレス状態であることを示していた。

虚血/再灌流による脳障害は、非糖尿病態に比べて糖尿病態において、虚血早期から脳梗塞による障害が認められ、再灌流24時間以降はその悪化のために生存できなかった。そこで、脳障害悪化のメカニズムを詳細に解析するために、DNAマイクロアレイ法を用いて遺伝子の発現を網羅的に解析した。その結果、虚血/再灌流によって炎症や酸化ストレス、アポトーシス経路に関与する遺伝子の発現が時間推移とともに上昇し、さらに糖尿病態ではこれら遺伝子の発現変動が再灌流1時間後の早期から顕著に上昇していた。

脳浮腫は、細胞内の水分貯留を特徴とする細胞毒性浮腫と血液脳関門の障害・破綻による血管原性浮腫に分類されるが、臨床においては必ずしも明確に区別は出来ない。また、虚血/再灌流による脳梗塞の悪化には浮腫による影響も大きく、脳梗塞に伴うラット脳浮腫モデルの病態初期では、アストロサイトの足突起の浮腫（腫脹）の後にこの足突起が毛細血管内皮細胞から離れBBBが破綻する血管原性浮腫の病態へと移行すると考えられている [26]。そこで、血液脳関門の機能をEvans blue染色法を用いて検討した。Evans blueは、血中タンパク質と結合して高分子化し、平常時では血液脳関門を通過しないが、虚血/再灌流後にEvans blue溶液を投与すると、非糖尿病態ラットでは再灌流24時間後に脳組織中への漏洩が認められたのに対して、糖尿病態では再灌流1時間の早期から見られた。

以上の結果から、糖尿病態では、平常時から体内酸化ストレスが上昇し、脳組織では抗酸化酵素の活性低下とともに過酸化脂質が増加するものと考えられる。また、これらの酸化ストレス状態によって様々な炎症反応が惹起されており、更なる虚血/再灌流を刺激として過剰な炎症反応や細胞死が短時間のうちに誘導されたと考えられる。これらの過剰な反応が引き金となり血液脳関門の破綻が誘発され、糖尿病態では脳障害をさらに悪化させるものと考えられた。

## 第2章 脳障害時のシグナル伝達因子の作用解析

虚血性障害時の脳細胞では、様々な遺伝子やタンパク質の発現によって細胞保護や細胞死を制御している。

ペナンプラマーカーのストレスタンパク質である *heat shock protein 70 (hsp70)* は、虚血時の神経細胞に発現し、変性タンパク質の修復やユビキチン化を促進して脳保護に作用する。また、*hsp27* [27] や *αB-crystallin* [28] も、アストロサイトにおいて、*hemoxygenase-1 (HO-1)* [29] はアストロサイトに加えてミクログリア、さらには一部の神経細胞に発現し、脳保護に作用することが報告されている。一方、細胞死においては、*Bax* や *caspase* などのアポトーシス関連因子、*XBP* や *CHOP* などの小胞体ストレス因子が種々の細胞で発現して実行される。

脳は、神経細胞やグリア細胞のアストロサイト、ミクログリア、オリゴデンドロサイトなど複数の細胞から構成される器官であり、それぞれの細胞に特有の遺伝子やタンパク質が発現されるために脳障害のメカニズム解明を困難にしている。

第1章では、DNA マイクロアレイ法を用いた脳組織での網羅的な遺伝子の発現解析から、虚血性脳障害時には酸化ストレスに起因した炎症関連遺伝子の発現が深く関与していること、さらに、糖尿病態時では虚血/再灌流後の早期から急激な発現変動を及ぼし、結果的に広範な細胞死を誘発することが明らかになった。そこで本章では、虚血性脳障害後の炎症反応に着目し、近年この経路のトリガーとして注目されている *high mobility group box 1 (HMGB1)* を指標として非糖尿病態と糖尿病態のラットでその挙動を比較検討した。

### 第1節 虚血性脳障害の悪化に対する HMGB1 の関与

HMGB1 は、DNA の立体構造の維持に重要な役割を果たす DNA 結合性非ヒストンタンパク質として発見され、当初、転写調節、修復、炎症に関与することが報告されていたが [30]、1999 年に敗血症の致死性メディエーターとして重症度マーカーや治療標的物質としてその有用性がクローズアップされた [31]。そのアミノ酸配列は、種間で高い保存性を示し、215 個のアミノ酸残基の中で、げっ歯類とヒトでわずかに 2 残基が置換しているのみである [32]。HMGB1 は、通常すべての細胞の核内に存在しているが、活性化した単球やマクロファージ [31, 33]、成熟した樹状細胞 [34] や内皮細胞 [35] など、あるいは壊死した細胞では核内から受動的に細胞質ゾルを経て細胞外へ放出される [36] (Fig. 2-1)。細胞外へ遊離した HMGB1 は、様々な細胞膜上に存在する糖化タンパク質受容体 (receptor for advanced glycation end products : RAGE) あるいは toll-like receptor-2 (TLR2) や TLR4 などの受容体との相互作用を介して NF- $\kappa$ B を活性化し、炎症反応やアポトーシスを誘導する [32, 36] (Fig. 2-2)。マウスのグリア細胞を用いた実験から、添加した HMGB1 が TNF- $\alpha$ 、iNOS、COX-2 などの炎症関連因子を発現させることから [37]、HMGB1 自身に炎症作用や細胞障害作用

があることが明らかになった。つまり、細胞外に遊離した HMGB1 が周辺細胞に直接影響を与え、現在では、敗血症、急性肺損傷、外傷、術後、汎発性血管内凝固症候群、虚血/再灌流などの急性炎症だけでなく、慢性関節リウマチや動脈硬化などの慢性炎症、悪性腫瘍の増殖や浸潤、転移などさまざまな病態の **key mediator** と考えられるようになった [38-40]。

これまでに、脳虚血後の炎症経路に HMGB1 が深く関与することが報告されているが、DM における HMGB1-受容体の相互作用と脳障害悪化のメカニズムについて明確ではない。本研究では、DM ラット脳において一過性脳虚血後の細胞障害悪化への HMGB1 の関与について検討した。

核タンパク質 HMGB1 は、虚血などの傷害時に細胞外に放出され、それ自身が障害因子として作用することから、この現象を培養細胞で確認する為にラット副腎髄質褐色細胞腫由来の PC12 細胞に神経成長因子 (NGF) を添加して神経様細胞に分化誘導させて用いた。この細胞に HMGB1 を添加し、24 時間後の細胞生存率を MTT assay 法により評価した結果、HMGB1 の濃度に依存して生存率が低下した (Fig. 2-3)。

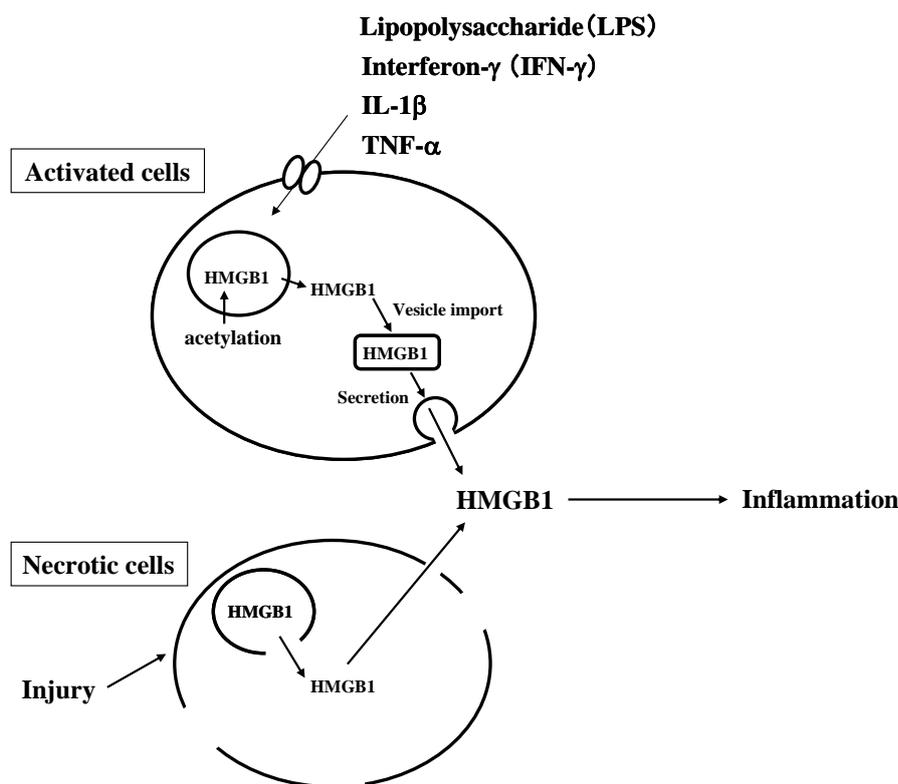


Fig. 2-1 Pathways of HMGB1 secretion.

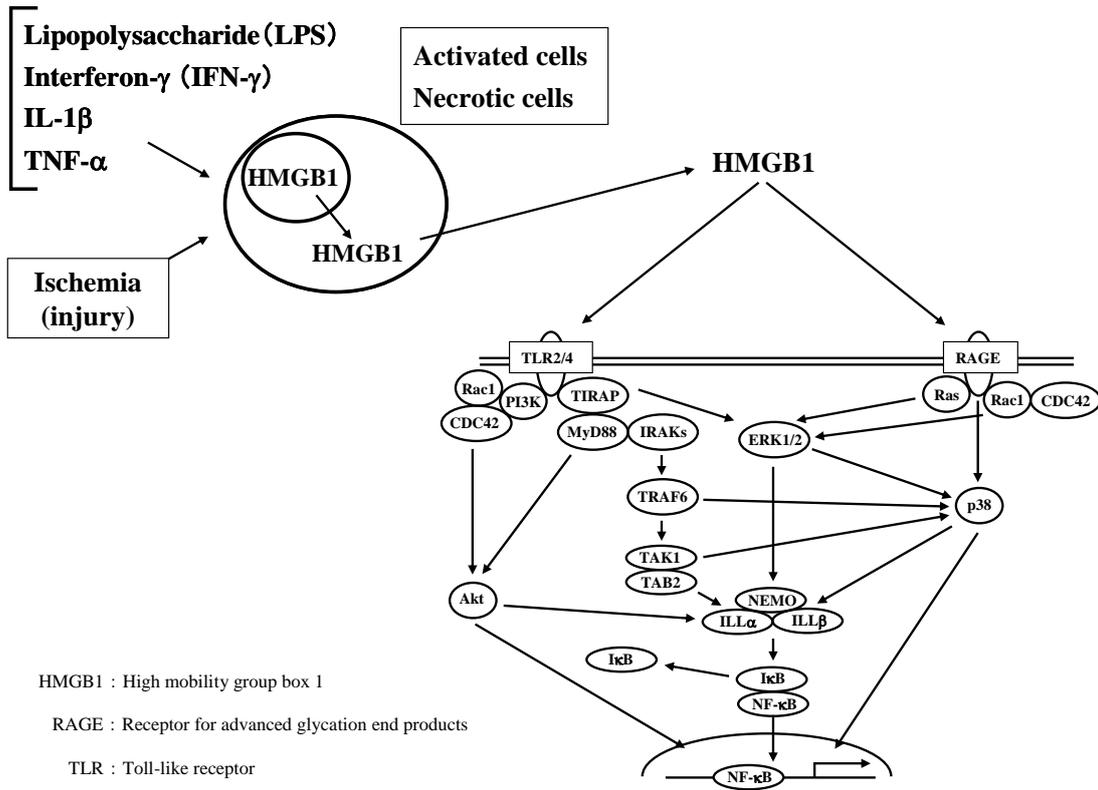


Fig. 2-2 HMGB1 signal transduction pathways.

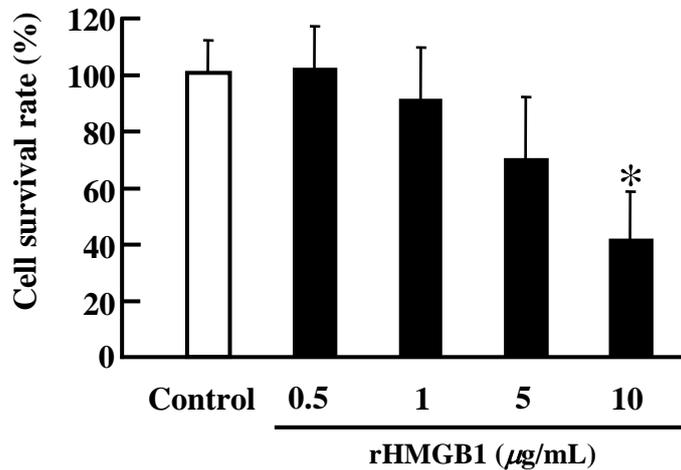


Fig. 2-3 The cell death induced by HMGB1 in PC12 cells.

PC12 cell ( $1 \times 10^5$  cells/well) were incubated with rHMGB1 (recombinant HMGB1) for 24 h and the cell survival were determined by MTT assay. The open column shows the non-DM group and the closed column shows the DM group. Data are means  $\pm$  S.D. (n = 6). \* $P < 0.01$  for statistical significance compared to the control.

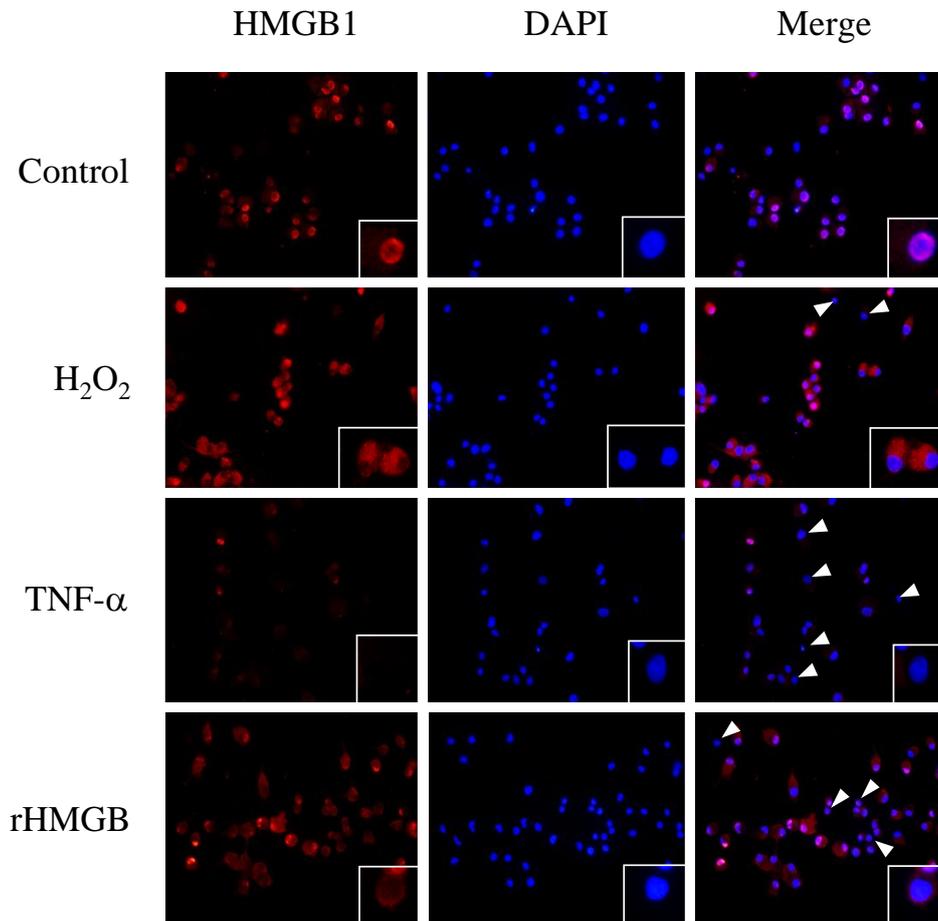


Fig. 2-4 Immunohistochemical staining of HMGB1 in PC12 cells.

PC12 cells were treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, TNF- $\alpha$  and rHMGB1, and then HMGB1 was stained with anti-HMGB1 antibody (red) and DAPI (blue). Arrowhead indicates, HMGB1 in cytoplasm.

続いて、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、TNF- $\alpha$ 、rHMGB 処置による細胞内 HMGB1 の局在性を免疫染色法により解析した。その結果、酸化ストレスの H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、TNF- $\alpha$ あるいは外因性 HMGB1 添加のすべての処置によって、細胞内 HMGB1 は核内から細胞質へ移行および細胞外へ放出することが確認でき、これまでの先行研究において報告されていることを再確認できた (Fig. 2-4)。

次に、脳組織を用いて虚血/再灌流後の経時的な脳皮質ペナンプラでの HMGB1 遺伝子の発現量を解析した。その結果、non-DM と DM 間で有意な差は認められず、また、虚血/再灌流処置後の変動も認められなかった (Fig. 2-5)。このことから、糖尿病態および虚血/再灌流処置は、HMGB1 遺伝子に対する発現には影響しないことが示唆された。

そこで、細胞内分布を免疫染色法により調査することにした。前記したように、脳組織は数種類の細胞から形成されていることから、細胞種を特定するために凍結脳サンプルの冠状切片を用いて、HMGB1 と核 (DAPI) 染色に加えて、ニューロン (NeuN)、アストロサイト (GFAP) あるいはミクログリア (Iba1) のマーカー抗体を用いた三重染色を行った。その結果、non-DM 群では、HMGB1 は調査したすべての細胞の核内に認められたが (Fig. 2-6)、虚血/再灌流 6 から 12 時間後にかけて核から細胞質へ徐々に移行した。これに対して、DM 群では、すでに sham 処置群において HMGB1 の一部が細胞質に移行していることが確認され、さらに虚血/再灌流早期に細胞質から細胞外に放出された (Fig. 2-7)。

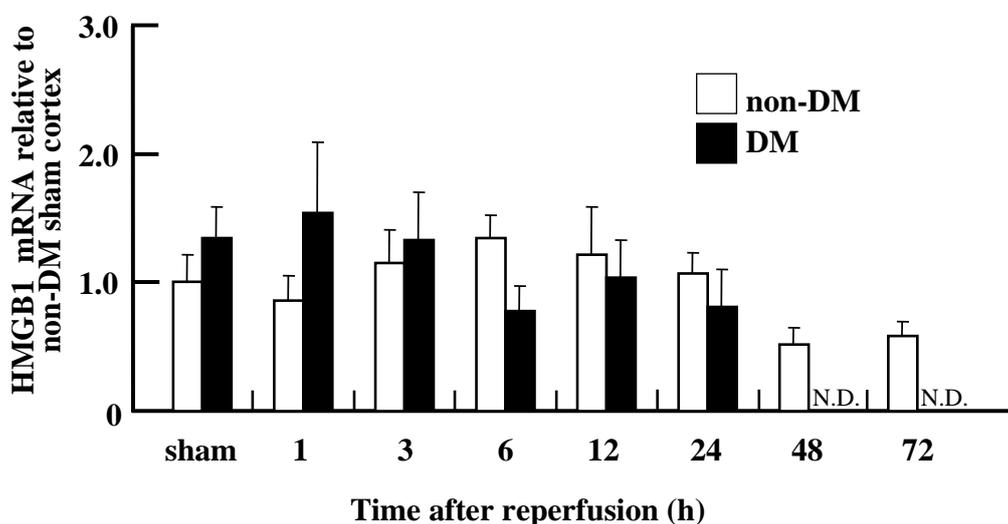
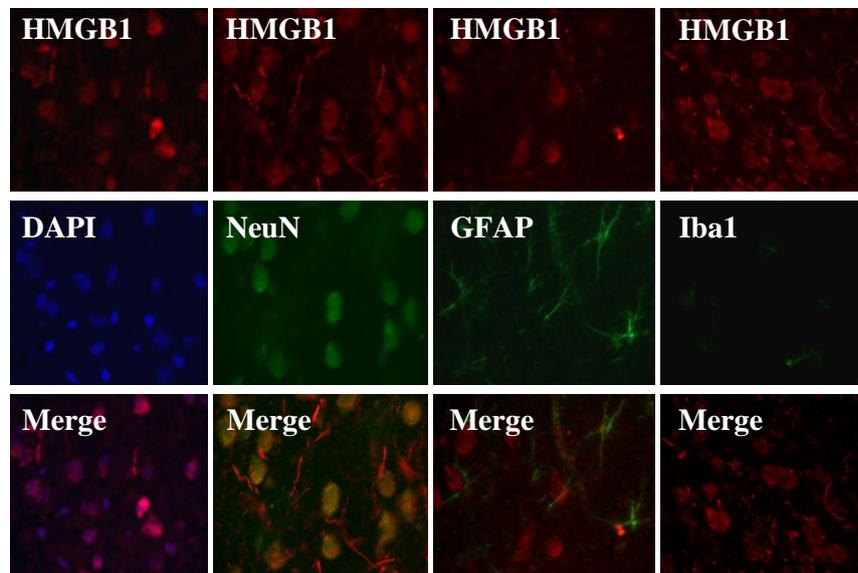


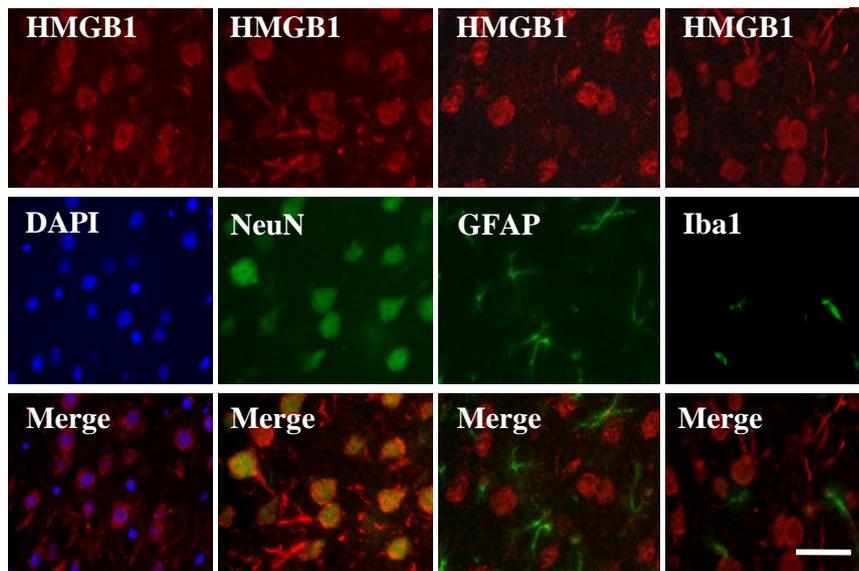
Fig. 2-5 Expression of HMGB1 gene following cerebral/ischemia in penumbra cortexes.

The quantity of HMGB1 mRNA (*Hmgb1*) in total RNA from ischemic penumbral cortexes was determined by real-time RT-PCR. The open column shows the non-DM group and the closed column shows the DM group. Data are means  $\pm$  S.D. (n = 4-6 per time point).

**(A) non-DM (sham)**



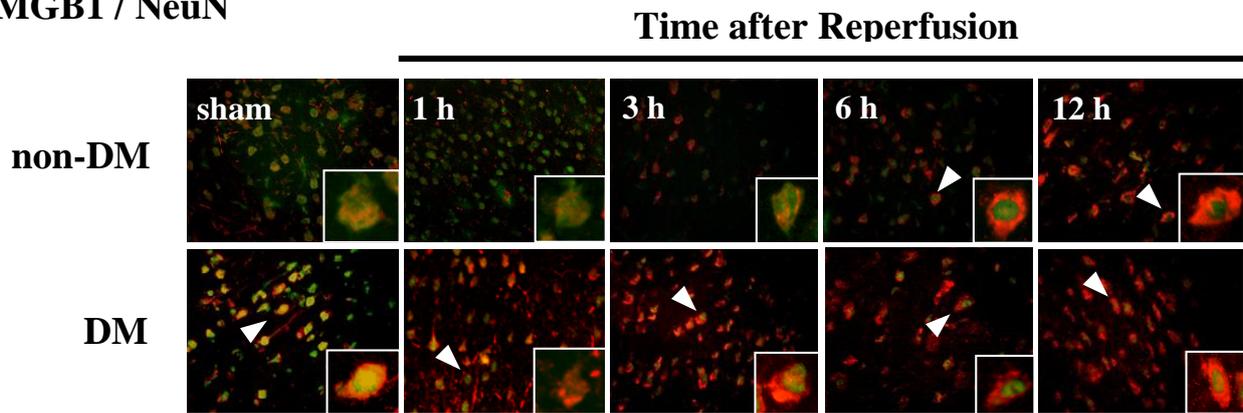
**(B) DM (sham)**



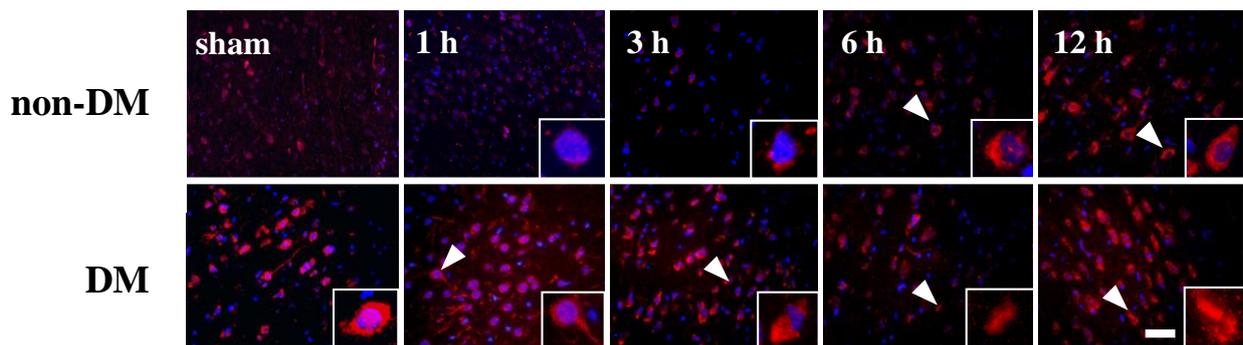
*Fig. 2-6* Immunohistochemical localization of HMGB1 in cortex.

Localization of HMGB1 in the sham-operated non-DM (A) and DM (B) rat cortical neurons was determined by immunostaining and confocal imaging. Scale bar = 20  $\mu$ m.

## HMGB1 / NeuN

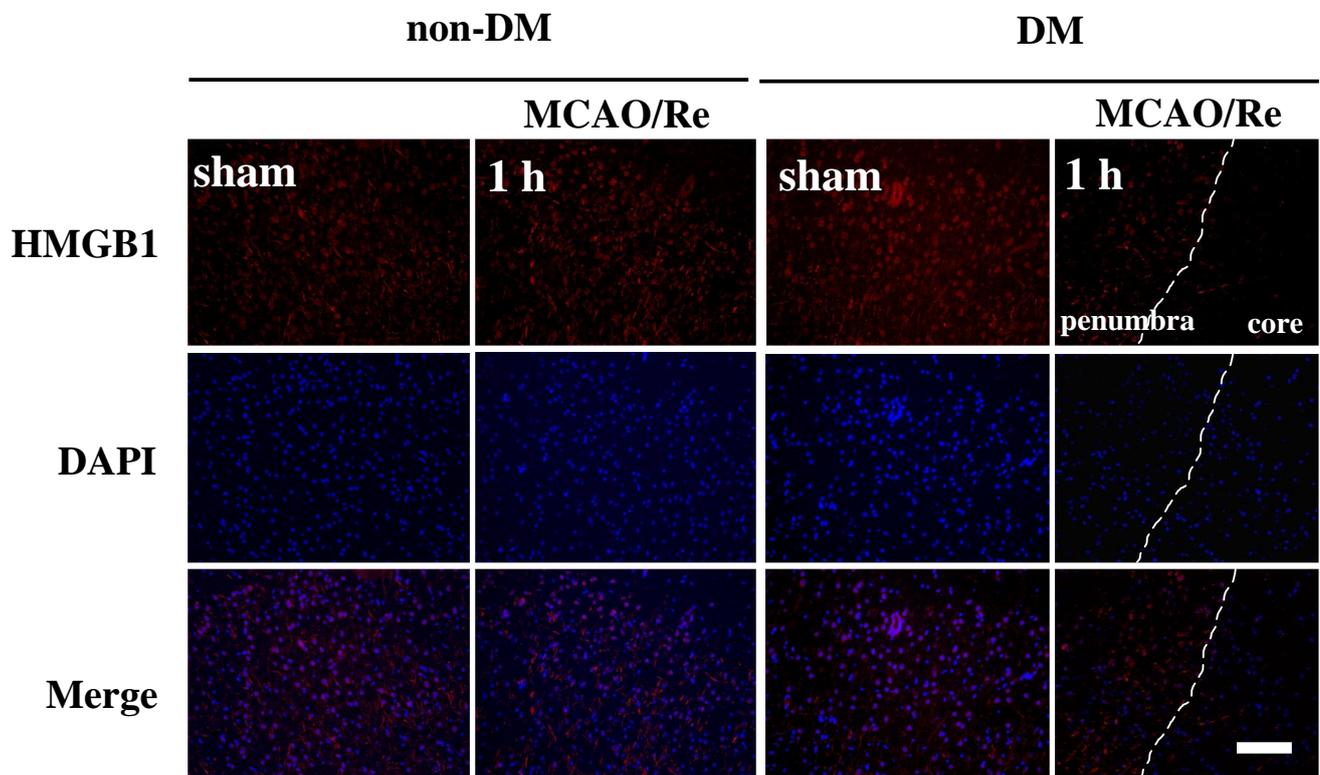


## HMGB1 / DAPI



*Fig. 2-7* Translocation of HMGB1 in cortical penumbras of non-DM or DM rats.

Nuclear localization of HMGB1 shows expression in neurons from normal rat brain and DM rat brain after MCAO/Re. Arrowheads, HMGB1 in cytoplasm. Insets are higher magnification micrographs of the cells indicated by arrowheads. Scale bar = 20  $\mu$ m.



*Fig. 2-8* Localization of HMGB1 in widespread cortex after cerebral ischemia in non-DM and DM rats.

HMGB1 immunostaining shows a distinct border corresponding to the cortical periinfarct region 1h after MCAO/Re in the DM rat. The dashed line demarcates the border between the core (right side) and penumbra (left side). HMGB1 immunoreactivity disappeared in the core of the ischemic lesion after MCAO/Re in the DM rat. Scale bar = 50  $\mu$ m.

続いて、虚血中心部の細胞について検討した。non-DM 群では、sham および虚血/再灌流 1 時間後において HMGB1 は未だ核に局在したが、DM 群の sham においてすでに HMGB1 が細胞質へ移行しており、虚血/再灌流 1 時間後には細胞内に HMGB1 は認められなかった。以上のことから、DM 群では虚血中心部位の HMGB1 が虚血早期から細胞外へ放出されるものと考えられた (Fig. 2-8)。

そこで、細胞外へ放出された HMGB1 の挙動をさらに追跡する為に、脳脊髄液 (CSF) と血液中の HMGB1 を Western blot 法によって測定した。その結果、CSF では、non-DM と DM 両群の sham とともに HMGB1 はほとんど検出されなかったのに対して、non-DM 群で脳虚血処置後経時的に増加した。一方、DM 群では、再灌流 1 時間後に急激に増加し、non-DM 群と比べて約 3.4 倍、12 時間後でも約 1.4 倍量存在した (Fig. 2-9)。さらに、血液中の HMGB1 量は、non-DM 群で徐々に増加したのに対して、DM 群では虚血/再灌流 1 時間の早期に急激に増加し、一旦 6 時間で減少し、その後上昇する 2 相性のパターンを示した。この間、常に non-DM 以上の存在量を示しており、この発現パターンは、脳障害の度合いと相関していた (Fig. 2-10)。

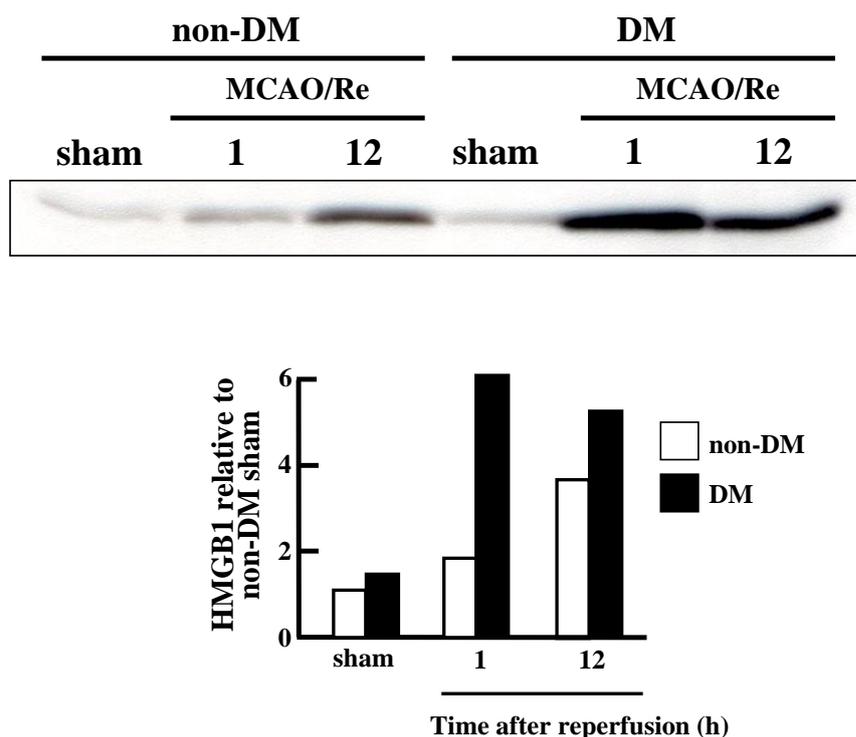


Fig. 2-9 Temporal change in cerebrospinal fluid HMGB1 levels after cerebral ischemia.

HMGB1 levels in CSF sample after MCAO/Re non-DM and DM were determined by Western blot (A). Expression of HMGB1 were quantified by densitometry analysis and expressed as bar charts (B). The open column shows the non-DM group and the closed column shows the DM group.

次に、細胞外に放出された HMGB1 量とシグナル伝達との関係について解析した。Receptor for advanced glycation end products (RAGE) は、脳においてニューロン、グリアおよび内皮細胞などに発現する免疫グロブリンスーパーファミリーの一種である [41-44]。RAGE のリガンドには、HMGB1 のほか advanced glycation end products (AGE)、 $\beta$ -amyloids および S100 タンパク質など様々な物質が報告されている [45]。中でも、リガンドとしての HMGB1 は、ラット初代神経培養細胞による [ $^{125}$ I] HMGB1 を用いた結合実験から RAGE との親和性がリガンドとして当初明らかにされた AGE よりも約 7 倍高いことが明らかになっている [46]。さらに、細胞膜上での HMGB1 と RAGE との相互作用の後、細胞内へのシグナル伝達は MAPKs のリン酸化を介して NF- $\kappa$ B シグナル経路を活性化することがマクロファージ [47]、好中球 [48] で報告されている。

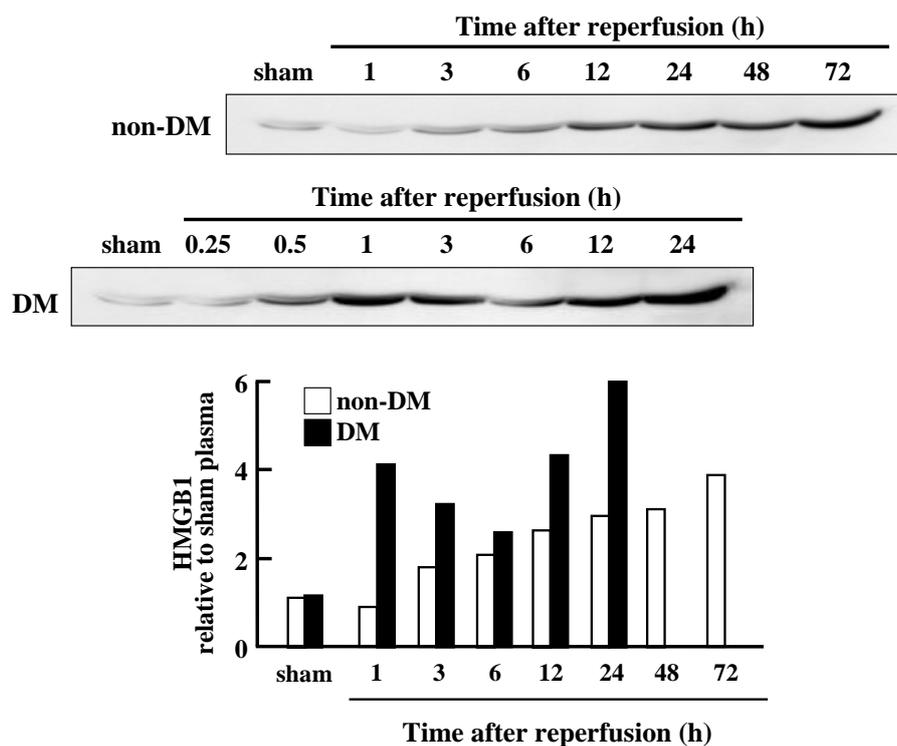
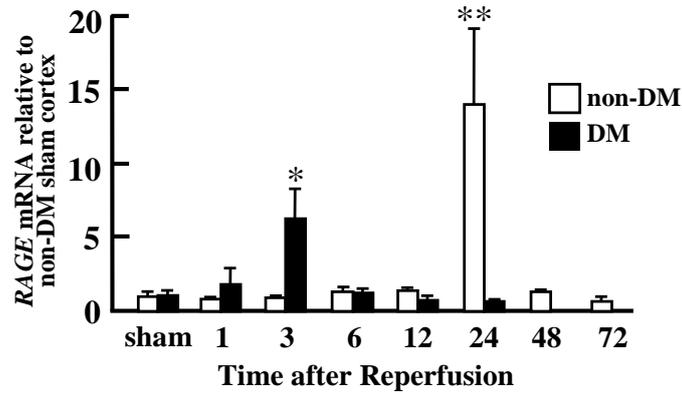


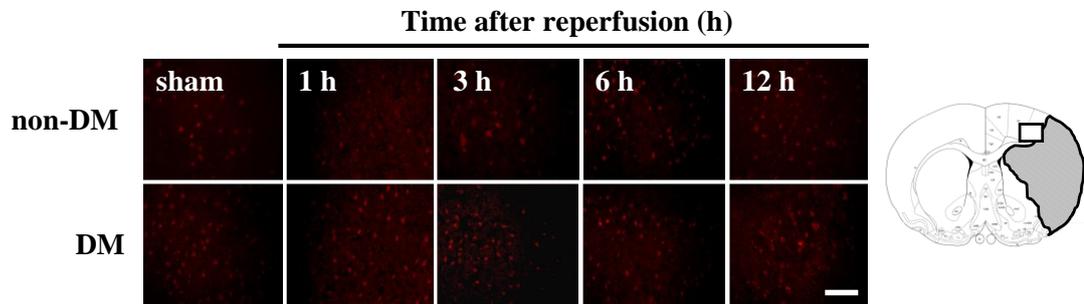
Fig. 2-10 Change in plasma HMGB1 levels after cerebral ischemia.

HMGB1 levels in the plasma sample after MCAO/Re non-diabetic and diabetic were determined by Western blot (A). The expression of HMGB1 was quantified by densitometry analysis and expressed as bar charts (B). The open column shows the non-DM group and the closed column shows the DM group.

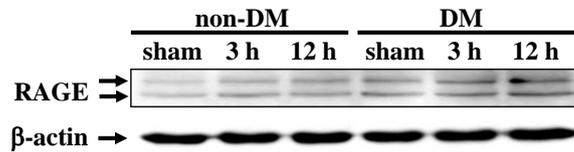
**(A)** *RAGE mRNA*



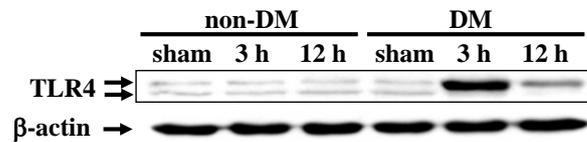
**(B)**



**(C)**

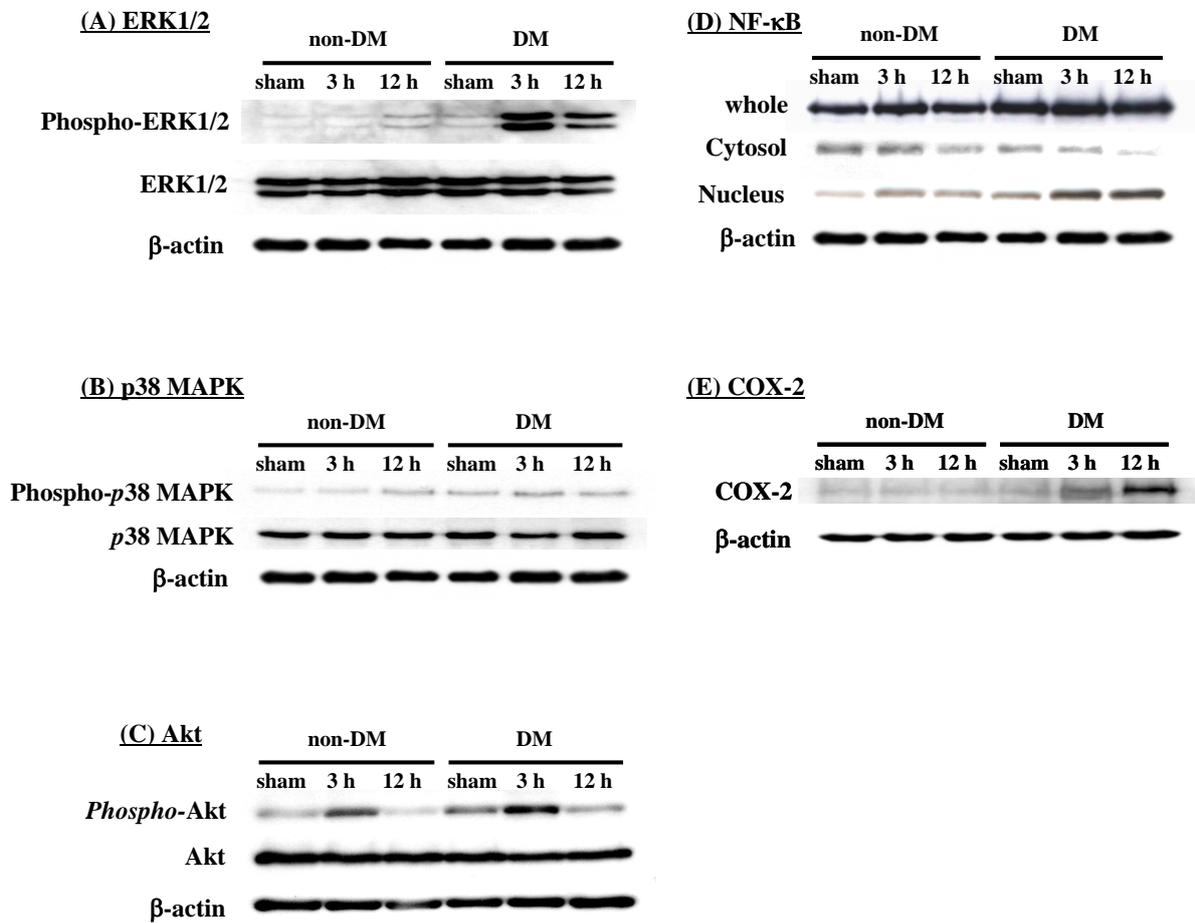


**(D)**



*Fig. 2-11* HMGB1-receptor expression in penumbral cortex after cerebral ischemia.

Expression levels of RAGE (A) mRNA in the non-DM and DM rat penumbral cortexes after MCAO/Re were determined by real-time PCR analysis. Data are means  $\pm$  S.D. ( $n = 4-6$  per time point). The expression of RAGE in rat brain was determined by immunostaining (B) and Western blot (C). The expression of TLR4 in rat brain was determined by Western blot (D). Scale bar = 100  $\mu$ m. Data are means  $\pm$  S.D. ( $n = 3-5$ ). \* $P < 0.05$  for statistical significance compared to the non-DM sham. \*\* $P < 0.01$  for statistical significance compared to the non-DM sham.



*Fig. 2-12* Protein expression of inflammatory signal in penumbral cortexes after cerebral ischemia. Expression levels of ERK1/2 (A), p38 (B), Akt (C) NF-κB (D) and COX-2 (E) protein in the non-DM and DM rat penumbral cortexes after MCAO/Re were determined by Western blot.

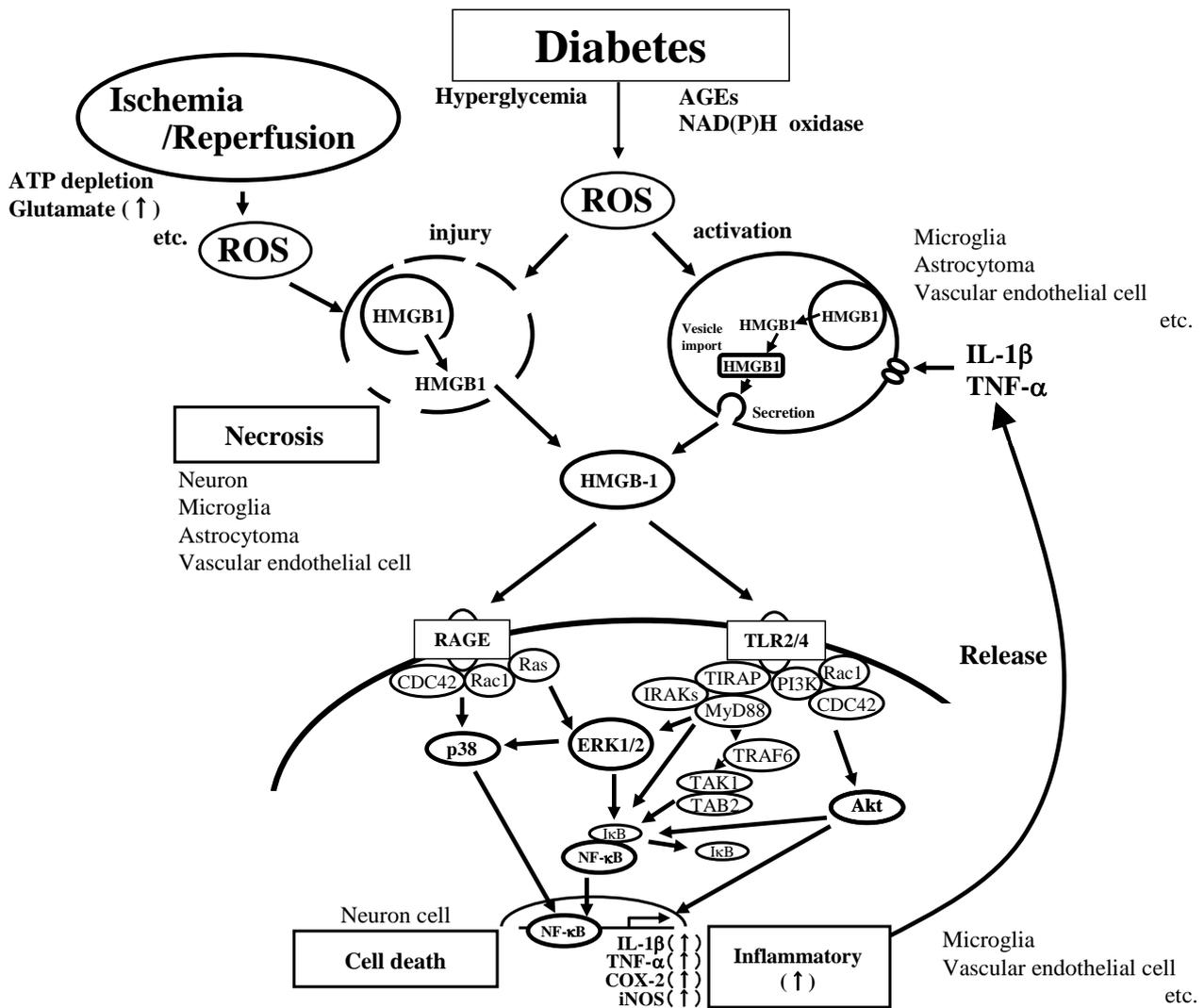


Fig. 2-13 HMGB1 secretion and signal transduction pathways.

HMGB1 can be released into the extracellular space actively from macrophages and monocytes or passively from necrotic cells. Extracellular HMGB1 interacts with different receptors such as RAGE or TLR2/4 and promotes inflammatory responses leading to MAPK and nuclear factor- $\kappa$ B activation. Diabetic state induces pro-inflammatory cytokines in the brain, conceivably via hyperglycemia and/or oxidative stress, accelerating intracellular translocation and the release of HMGB1 from neuronal cells after ischemic injury. Increase in extracellular HMGB1 may further induce the inflammatory response and cellular necrosis in the ischemic penumbra, leading to aggravation of ischemic injury in diabetic state.

そこで、RAGE の発現量を mRNA レベルと組織染色および Western blot 法によりタンパク質レベルで解析した。その結果、RAGE mRNA は、non-DM では徐々に増加し、24 時間後に一過的に発現量が上昇したものの、その後は急激に低下した。これに対し、DM 群において虚血初期 3 時間で約 5 倍有意に増加したが、その後速やかに低下した。タンパク質レベルにおいては、non-DM では再灌流 12 時間後まで徐々に増加したのに対して、DM ラットでは sham 群においてすでに発現が上昇しており、再灌流 12 時間後まで発現量に変化はなかった (Fig. 2-11 A-C)。

ところで、HMGB1 のもう一方の受容体と考えられる TLR は、自然免疫反応において重要な役割を果たす膜一回貫通型受容体ファミリーとして、おもに細菌、ウイルス、真菌など種々の病原微生物の構成成分を認識してシグナルを伝達する。細胞内へのシグナル伝達は、RAGE と同様に MAPKs の活性化を介した NF- $\kappa$ B による炎症経路の活性に関与していることが報告されている。近年、HMGB1 が、脳虚血後に TLR4 を介してニューロンとアストロサイトで MMP-9 の発現を上昇させることが報告され、HMGB1-TLR シグナル経路も炎症反応に深く関与していることが明らかになった [49]。そこで、TLR4 の発現を Western blot 法により解析したところ、non-DM 群において再灌流 12 時間後までは発現に変動は認められなかったのに対して、DM 群では再灌流 3 時間後に一過性の強い発現が認められ、12 時間後には減少した (Fig. 2-11 D)。以上のことから、糖尿病態において虚血後の細胞外への HMGB1 の放出増加と受容体の増加が、種々の細胞内シグナル伝達経路の活性化に寄与していると考えられた。

続いて、細胞内のシグナル伝達因子の活性化状態について解析した。non-DM 群においては、皮質ペナンプラの ERK1/2 と p38 のリン酸化、さらに NF- $\kappa$ B の核内移行が再灌流 12 時間後までわずかに増加した。これに対して、DM 群では再灌流 3 時間後で ERK1/2 のリン酸化が顕著であり、12 時間後でも確認された。また、p38 リン酸化および NF- $\kappa$ B の核内移行は、sham 群においてすでに認められ、虚血処置によってさらに増加した。また、Akt のリン酸化は、DM の sham 群で増加している点を除けば、両群とも再灌流 3 時間後にピークとなった。シグナル伝達の下流に位置する COX-2 の発現は、DM 群においてのみ再灌流 3 時間後から 12 時間後にかけて顕著に増加した (Fig. 2-12)。

以上の結果を総合すると、糖尿病態では非糖尿病態と比べて ROS の産生量が上昇しており、虚血/再灌流により HMGB1 の細胞内分布が早期から変化し、細胞外に放出された多量の HMGB1 が RAGE や TLR2/4 の受容体との相互作用を介して、細胞内シグナル伝達系を活性化させ、炎症および細胞死を惹起することが示唆された (Fig. 2-13)。

## 第2節 虚血性脳障害の悪化に及ぼすサイトカインの関与

第1章のDNAマイクロアレイ法を用いた網羅的な遺伝子の発現解析から、炎症関連遺伝子の発現が虚血早期から急激に上昇し、脳虚血急性期において炎症の関与が強く想定された。また、本章第1節では、炎症経路のメディエーターとして作用する核内タンパク質HMGB1の細胞内局在の解析結果から、非糖尿病態群に比べて糖尿病態では、虚血早期からHMGB1の細胞内分布が変化し、下流の炎症性シグナルを活性化すると考えられた。

これまでにHMGB1は、TNF- $\alpha$ やIL-1 $\beta$ などのサイトカイン刺激によってactivated cellsから放出され、炎症反応をさらに促進することが報告されており、虚血性脳障害におけるこれらサイトカインの発現を詳細に把握することが重要であると考えられる。

そこで、虚血/再灌流後の脳皮質ペナンプラのIL-1 $\beta$ の発現を経時的に解析した結果、非糖尿病態では虚血処置24時間後に増加が認められた。一方、糖尿病態のsham群では、非糖尿病態のsham群に比べて約3.5倍有意に増加しており、再灌流3時間後には非糖尿病態に比べて、約25倍の急激な増加が認められた (Fig. 2-14)。TNF- $\alpha$ については、非糖尿病態のsham群に比べ、虚血処置24時間後に約5倍の増加が認められた。一方、糖尿病態のsham群では、非糖尿病態のsham群に比べて約1.4倍増加しており、再灌流3時間後には非糖尿病態に比べて、約11倍急激な増加が認められ、そのレベルは再灌流24時間後も継続していた (Fig. 2-15)

また、炎症性関連因子であるCOX-2やiNOSの発現についても経時的に解析した。COX-2は、炎症反応の比較的下流に位置する炎症マーカーとして、NF- $\kappa$ Bなどの転写因子によって発現が制御されている。sham群 (non-DM;  $0.08 \pm 0.02$ , DM;  $0.13 \pm 0.08$ )、再灌流3時間 (non-DM;  $0.12 \pm 0.01$ , DM;  $0.50 \pm 0.04$ ) および24時間 (non-DM;  $0.27 \pm 0.03$ , DM;  $0.36 \pm 0.05$ ) のいずれにおいても、糖尿病態群においてCOX-2の発現が顕著に増大した (Fig. 2-16)。同様に、iNOSは非糖尿病態および糖尿病態群でMCAO/Re処置により経時的な発現上昇が認められたが、sham群、再灌流3時間、24時間のすべてにおいて、産生されるiNOS量は糖尿病態ラットで多かった (Fig. 2-17)。

炎症部位への白血球浸潤は、intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)などの細胞接着分子により制御されている。血管内皮細胞で発現するICAM-1は、炎症時の炎症性サイトカイン刺激によって急速に増加し、白血球の血管内皮細胞への遊走に関与する。その結果、炎症局所では白血球の血管外への浸潤が誘導されることから、次に脳組織でのICAM-1と白血球浸潤マーカーのMPO発現について解析した。非糖尿病態および糖尿病態両群において、虚血/再灌流処置後経時的にICAM-1の発現量の増加が認められた。また、非糖尿病態群と比較して、糖尿病態群のsham (non-DM;  $0.02 \pm 0.03$ , DM;  $0.12 \pm 0.02$ ) および再灌流24時間 (non-DM;  $0.29 \pm 0.07$ , DM;  $0.94 \pm 0.24$ ) で顕著に発現が増大した (Fig. 2-18)。また、MPOの発現も徐々に増加し、糖尿病態においては再灌流24時間後で、非糖尿病態と比較してMPO活性の増大が認められた (Fig. 2-19)。

以上の結果から、糖尿病態の脳皮質では、非糖尿病態に比べて平常時から炎症反応が誘発

されやすい状態にあり、虚血/再灌流による処置をきっかけとして爆発的な炎症関連因子の発現がペナンプラで認められた。つまり、この一連の反応が、脳梗塞巣の拡大に寄与するものと考えられ、炎症反応の制御が脳保護に重要である可能性が強く示唆された。

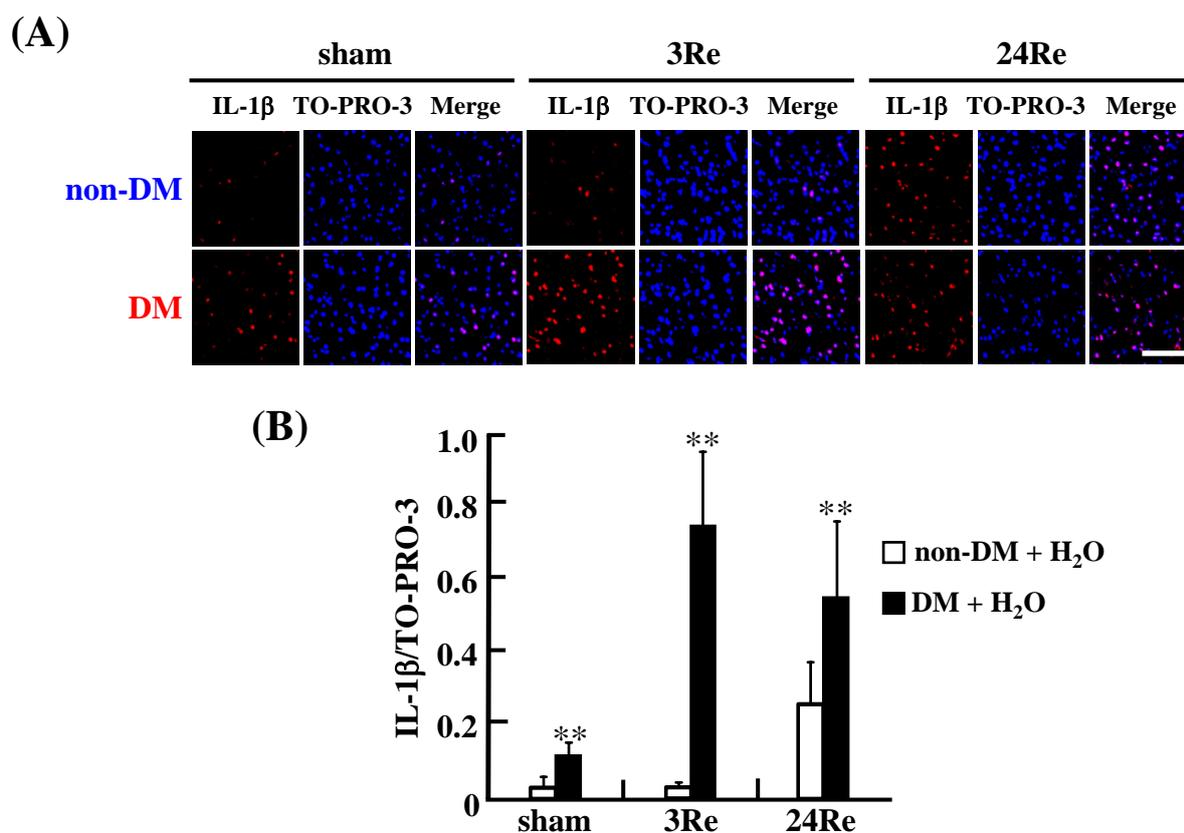


Fig. 2-14 Expression of IL-1 $\beta$  in the penumbral cortex after MCAO/Re in non-DM and DM rat brains.

Representative photographs of IL-1 $\beta$  immunostaining (red fluorescence) and nuclei by TO-PRO-3 (blue fluorescence) in the cortex coronal sections of the non-DM and DM rats (A). Quantitative analysis of IL-1 $\beta$  fluorescence intensity in the cortex (B). Scale bar = 100  $\mu$ m. Data are means  $\pm$  S.D. (n = 4). \*\* $P$  < 0.01 for statistical significance compared to the non-DM + H<sub>2</sub>O group.

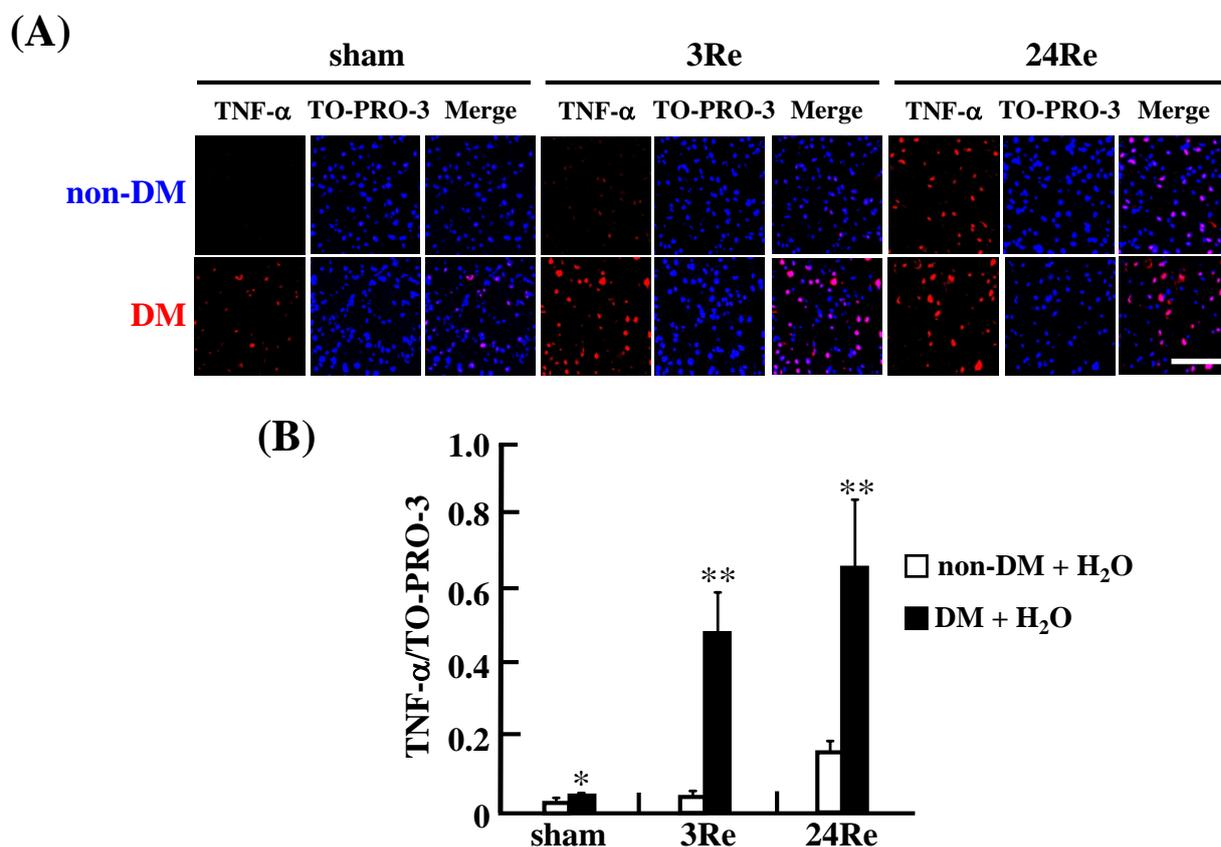


Fig. 2-15 Expression of TNF- $\alpha$  in the penumbral cortex after MCAO/Re in non-DM and DM rat brains.

Representative photographs of TNF- $\alpha$  immunostaining (red fluorescence) and nuclei by TO-PRO-3 (blue fluorescence) in the cortex coronal sections of the non-DM and DM rats (A). Quantitative analysis of TNF- $\alpha$  fluorescence intensity in the cortex (B). Scale bar = 100  $\mu$ m. Data are means  $\pm$  S.D. (n = 4). \*\* $P$  < 0.01 for statistical significance compared to the non-DM + H<sub>2</sub>O group.

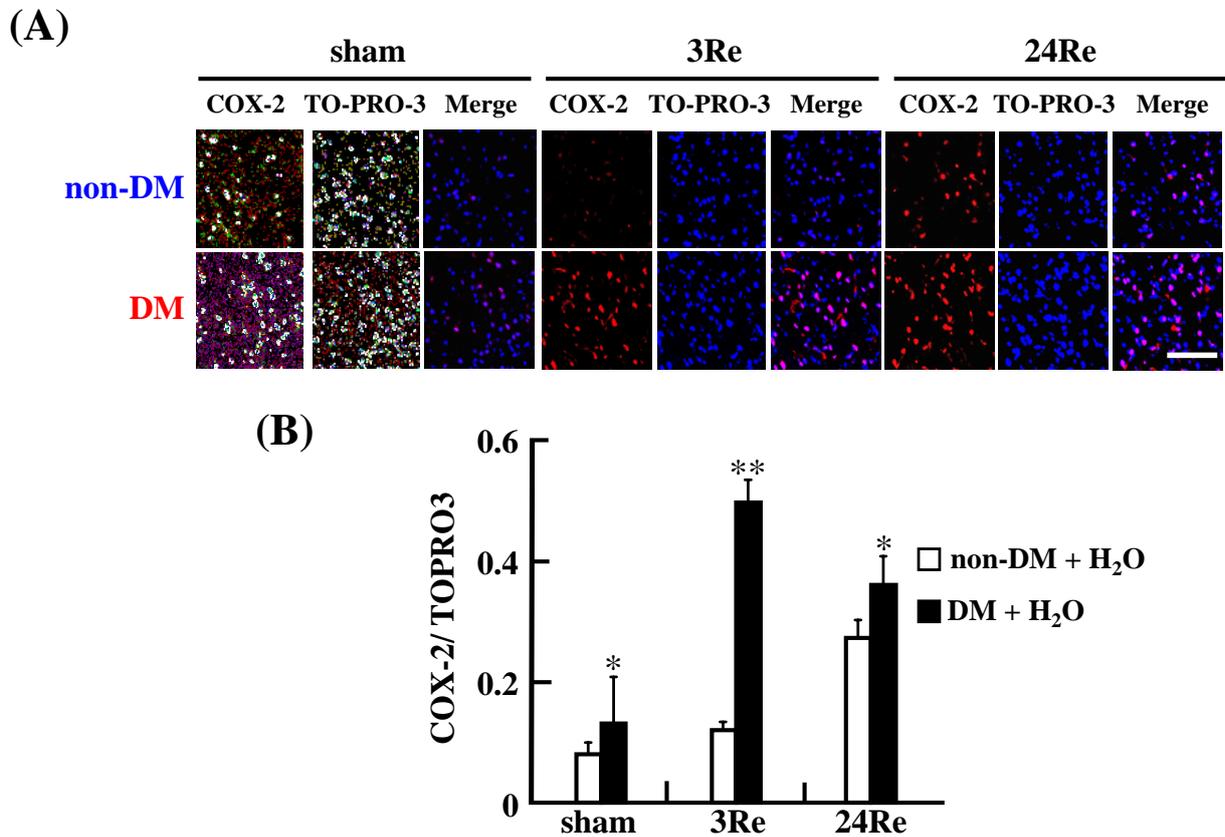


Fig. 2-16 Expression of COX-2 in the penumbral cortex after MCAO/Re in non-DM and DM rat brains.

Representative photographs of COX-2 immunostaining (red fluorescence) and nuclei by TO-PRO-3 (blue fluorescence) in the cortex coronal sections of the non-DM and DM rats (A). Quantitative analysis of COX-2 fluorescence intensity in the cortex (B). Scale bar = 100  $\mu$ m. Data are means  $\pm$  S.D. (n = 4). \*\* $p < 0.01$  for statistical significance compared to the non-DM + H<sub>2</sub>O group. \* $P < 0.05$  for statistical significance compared to the non-DM + H<sub>2</sub>O group.

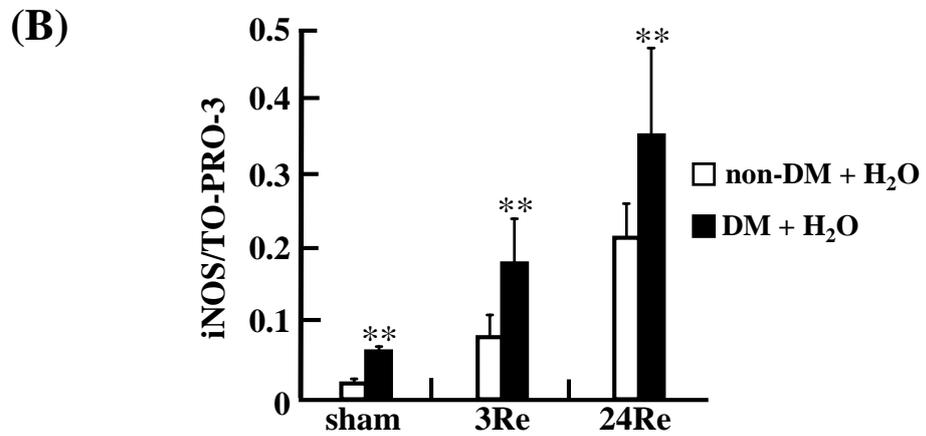
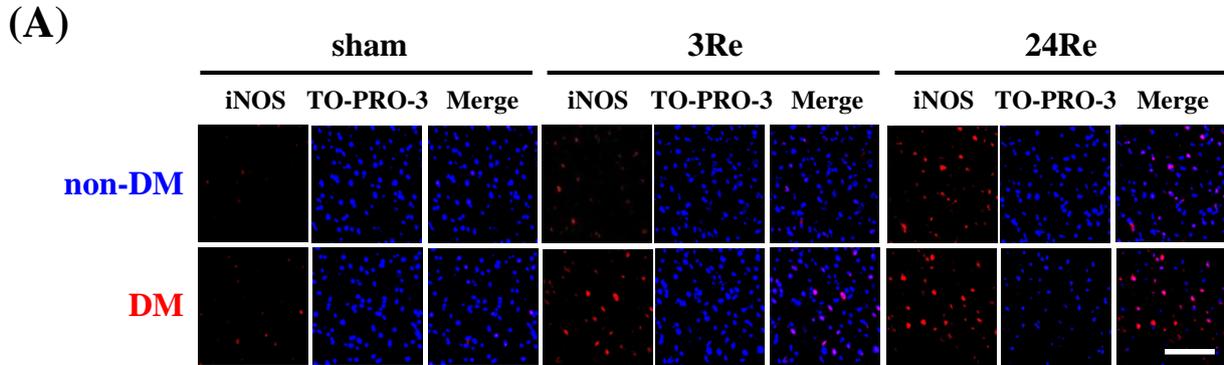
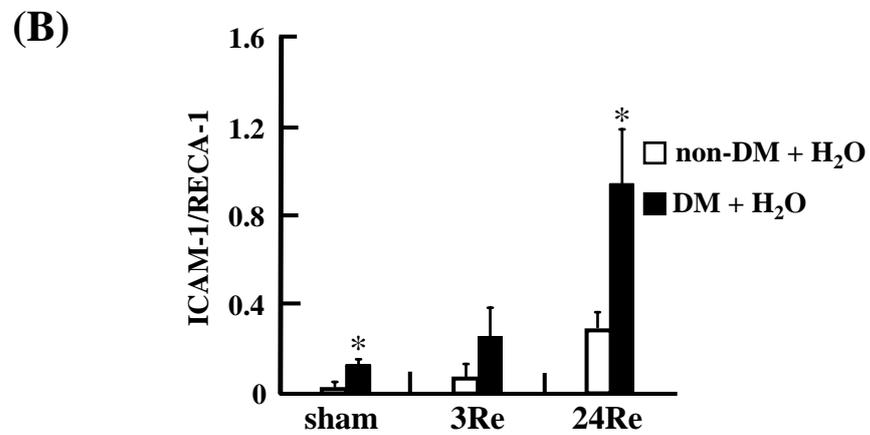
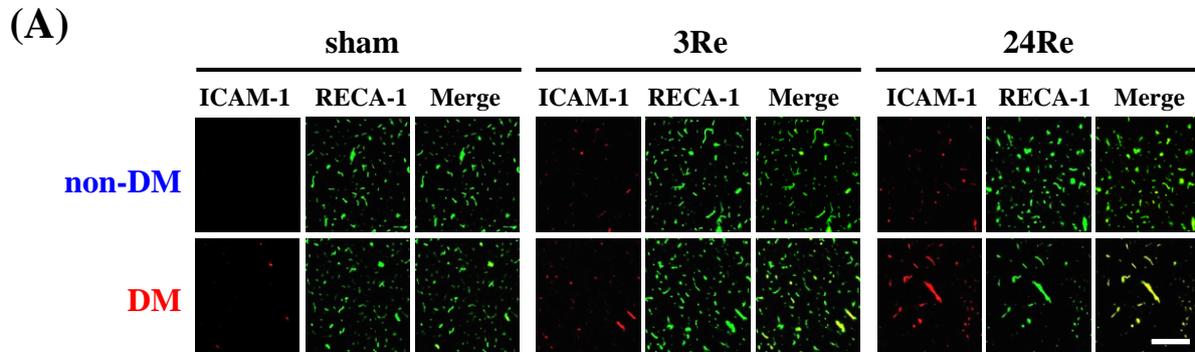


Fig. 2-17 Expression of iNOS in the penumbral cortex after MCAO/Re in non-DM and DM rat brains.

Representative photographs of iNOS immunostaining (red fluorescence) and nuclei by TO-PRO-3 (blue fluorescence) in the cortex coronal sections of non-DM and DM rats (A). Quantitative analysis of iNOS fluorescence intensity in the cortex (B). Scale bar = 100  $\mu$ m. Data are means  $\pm$  S.D. (n = 4).

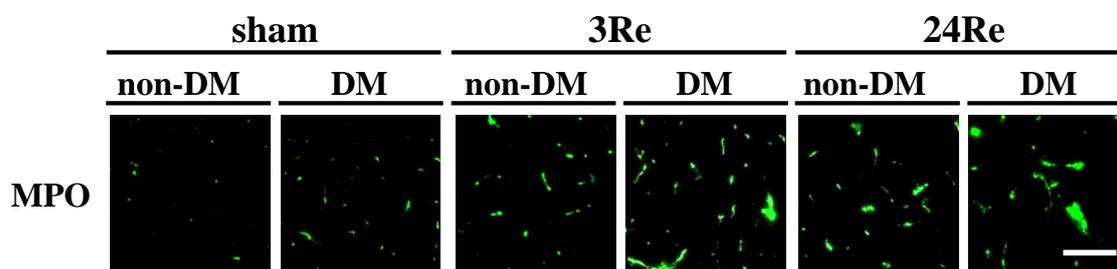
\*\* $P < 0.01$  for statistical significance compared to the non-DM + H<sub>2</sub>O group.



*Fig. 2-18* Expression of ICAM-1 in the penumbral cortex after MCAO/Re in non-DM and DM rat brains.

Representative photographs of ICAM-1 immunostaining (red fluorescence) and RECA-1 (green fluorescence) in the cortex coronal sections of non-DM and DM rats (A). Quantitative analysis of ICAM-1 fluorescence intensity in the cortex (B). Scale bar = 250  $\mu$ m. Data are means  $\pm$  S.D. (n = 4). \* $P$  < 0.05 for statistical significance compared to the non-DM + H<sub>2</sub>O group.

(A)



(B)

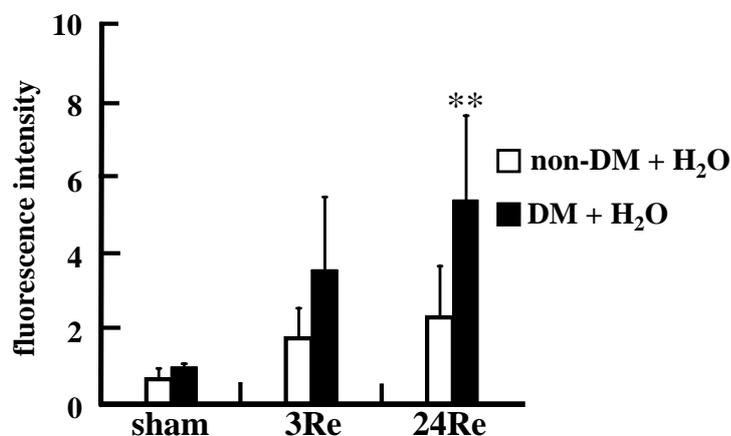


Fig. 2-19 Expression of MPO in the penumbral cortex after MCAO/Re in non-DM and DM rat brains.

Representative photographs of leukocytic infiltrate by MPO staining in the cortex coronal sections of non-DM and DM rats (A). Quantitative analysis of MPO fluorescence intensity in the cortex (B).

Scale bar = 100  $\mu$ m. Data are means  $\pm$  S.D. (n = 4). \*\*P < 0.01 for statistical significance compared to the non-DM + H<sub>2</sub>O group.

### 第3節 本章の小括

本章では、虚血/再灌流の早期に脳皮質ペナンプラおよび虚血中心部の神経細胞から HMGB1 が細胞外に放出され、炎症反応や細胞死を誘導することが明らかとなった。

糖尿病態ラット脳において、虚血/再灌流後の早期から急激に細胞死が生じることから、ネクローシス細胞より遊離される HMGB1 の経時的な局在性と虚血性脳障害との関連を調査した。核内に存在する HMGB1 は、炎症の初期反応で合成される TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ や LPS などの刺激によって、活性化したマクロファージや単球から能動的に、あるいはネクローシ

ス細胞から受動的に放出される。能動的放出においては、HMGB1のアセチル化[50]やリン酸化[51]により、核内への移動が制御される一方で、分泌型リソソームによって細胞外へ分泌される。また、HMGB1はアポトーシス細胞からは遊離されず、ネクローシスに陥った細胞から遊離することが報告されている[52]。近年、HMGB1は、急性肺障害[53]後の出血や肝臓の虚血/再灌流[54]後の肝損傷の早期メディエーターとして、同時に虚血性脳障害の一因とみなされている[49]。

本章における研究の結果から、脳虚血処置後のHMGB1遺伝子の発現誘導は認められず、非糖尿病態と糖尿病態の両群で差は認められなかった。しかし、免疫組織学的な解析から、非糖尿病態ラットのsham群における脳皮質では、量的に主要なHMGB1保有細胞のニューロンにおいて、核内HMGB1が虚血/再灌流後に細胞質へ移行した。これは、Quiらの報告[49]のように、虚血性脳障害の初期において、ニューロン細胞がHMGB1供給の主要な供給源であることを支持していた。一方、糖尿病態ラットにおいてHMGB1の細胞質への移行がすでにsham群で認められ、虚血/再灌流の開始1時間後には虚血中心部のすべての細胞からHMGB1が細胞外に放出された。

これまでに、HMGB1が虚血性脳障害の活性メディエーターとして、脳梗塞患者の血清中に高いレベルで存在することが報告されている[56]。そこで、細胞外に放出されたHMGB1の指標としてCSFと血漿中レベルの経時的な変化について解析したところ、非糖尿病態と糖尿病態ラットのsham群におけるCSF中のHMGB1量に差は認められなかったが、糖尿病態ラットでは、再灌流1時間後から顕著に増加したのに対して、非糖尿病態ラットでは再灌流12時間後まで徐々に増加した。また、血漿中のHMGB1量の推移は、CSF中のパターンと類似していた。

これらの結果は、一過性脳虚血後に糖尿病態ラットの脳神経細胞中のHMGB1が核から細胞質に移行後、直ちに細胞外へ放出され、HMGB1が炎症反応の早期に脳のみならず全身においてシグナル上流のinitiatorとして寄与する可能性を示唆していた。

これまでに、HMGB1単独での炎症誘発作用は弱く、IL-1 $\beta$ やLPSなど他の因子との共存下で著しく増強されることが報告されている[56, 57]。また、ネクローシス細胞からのHMGB1放出の他に、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ を介したHMGB1放出も虚血性脳障害悪化の重要な経路であると考えられることから、虚血/再灌流後の炎症性サイトカイン等の発現について解析した。その結果、糖尿病態ラットのsham群におけるIL-1 $\beta$ とTNF- $\alpha$ 遺伝子の発現は、非糖尿病態ラットと比べて、それぞれ約5.6倍、2.0倍の有意な上昇が認められた。また、matrix metalloproteinases-9 (MMP-9) 遺伝子の発現は、糖尿病態ラットのsham群で約2.6倍上昇したのに対して、脳虚血/再灌流後の非糖尿病態と糖尿病態群の増大パターンに差は認められなかった。MMP-9の誘導は、脳梗塞の悪化要因として、血液脳関門の破綻に寄与するとの知見から[58, 59]、本章の結果は、糖尿病態においてTNF- $\alpha$ やIL-1 $\beta$ の発現がHMGB1の遊離を刺激すると共にHMGB1が自らTNF- $\alpha$ やIL-1 $\beta$ の産生を誘導すると考えられ、炎症反応を増幅させる悪循環が生じている可能性が示唆された。

遊離した HMGB1 は、受容体である RAGE や TLR との相互作用により、細胞内シグナル伝達系を活性化させ、最終的に転写因子 NF- $\kappa$ B の活性化を誘導する [60]。虚血/再灌流後の障害悪化における受容体の存在は、リガンドとしての HMGB1 が細胞内シグナル伝達系活性化による炎症反応を評価する上で重要となる。興味深いことに、RAGE ノックアウトマウスを用いた場合や可溶性 RAGE 投与によって虚血/再灌流後の梗塞巣体積が減少することが報告されており [61]、RAGE の発現増加が虚血性脳障害の悪化に影響していると考えられる。そこで、RAGE の発現量を解析した結果、非糖尿病態では再灌流 12 時間後まで徐々に増大したのに対して、糖尿病態ラットでは sham 群においてすでに発現が上昇しており、再灌流 12 時間後まで安定して存在した。脳虚血時の RAGE の発現は、低酸素時に増加する転写因子 HIF-1 (Hypoxia inducible factor-1) によって誘導され [62, 63]、また、TNF が RAGE の inducer (誘導因子) として作用することも知られている。一方、高血糖状態では、ミトコンドリア電子伝達系から産生される ROS が RAGE の発現を増加させること [64]、そして、糖尿病態モデル動物の脳では RAGE の発現が増大し、抗酸化物質の投与によって発現が低下すること [65] から、酸化ストレスの減少が発現抑制に寄与するものと想定できる。今回、虚血処置前の糖尿病ラットにおいて、ROS や TNF の上昇が確認されており、これらが RAGE の発現増加に影響を与え、虚血/再灌流によるさらなる RAGE の発現増加が虚血性脳障害の悪化に寄与していると考えられる。また、HMGB1 は、脳虚血後にアストロサイトで発現する TLR4 を介して MMP-9 の発現を上昇させ、BBB を破綻させることで脳浮腫を惹起する [58, 66]。HMGB1 による MMP-9 の増加は、TNF- $\alpha$  の発現とは独立して誘導されると報告されており [66]、HMGB1-TLR シグナル経路も炎症反応の促進に大きく関与している [67]。

本章の研究結果から、非糖尿病態ラットの再灌流 12 時間後までは TLR4 の発現に変動は認められなかったのに対して、糖尿病態では再灌流 3 時間後に発現のピークが見られ、12 時間後には減少していた。このことから、糖尿病態における細胞外 HMGB1 放出および受容体の増加が、その後の細胞内のシグナル伝達を亢進させている可能性が考えられた。

非糖尿病態では、皮質ペナンプラの細胞内 ERK1/2 と p38 のリン酸化および NF- $\kappa$ B の核内移行が再灌流 12 時間後まで徐々に増加したのに対して、糖尿病態では再灌流 3 時間後の早期から ERK1/2 のリン酸化が認められた。糖尿病態ラットの p38 リン酸化および NF- $\kappa$ B の核内移行は、sham 群においてすでに認められ、虚血処置によってさらに増加しており、HMGB1-受容体相互作用後の細胞内シグナル伝達機構が亢進していることが示唆された。

これまでに、HMGB1 を標的とした治療戦略が実際に推進されており、ピルビン酸エチル処置によって心筋の虚血/再灌流時の HMGB1 発現が抑制され、また外傷性脳障害において HMGB1/TLR4/NF- $\kappa$ B 経路の活性化を抑制して脳保護を示すことが報告されている [68, 69]。また、メシル酸ナファモスタットの静脈内投与により、TNF- $\alpha$  の発現を抑制することで間接的に HMGB1 の発現も抑制され、エンドトキシンショックモデルにおける肺障害を軽減することが報告された [70]。加えて、抗 HMGB1 抗体の投与によって、脳虚血処置後の BBB

の保護や梗塞巣の減少も明らかになっており [71, 72]、HMGB1 を標的とした治療法の確立が注目されている。

近年、ヒトの血管内皮細胞を用いた研究から、高血糖によって誘導された ROS が HMGB1 と RAGE の発現を増加させることが報告された [64, 73]。これまでに著者らは、糖尿病態ラットにおいて体内酸化ストレスの増大および抗酸化力の低下、また、脳組織中の抗酸化酵素活性の低下に伴う過酸化脂質含量の増大を確認しており、脳内において酸化ストレスが亢進していることを明らかにしている [8]。従って、糖尿病態時の酸化ストレスの上昇が、HMGB1/RAGE の経路に大きく影響を及ぼすことで、結果的に虚血性脳障害を悪化させるものと考えられた。

以上、糖尿病態では、虚血性脳障害の早期にニューロン細胞から HMGB1 が放出され、種々のサイトカインの誘導と相まって炎症反応を惹起して悪循環を引き起こしていることが示唆された。即ち、細胞外 HMGB1 の増加は、糖尿病態における虚血性脳障害の悪化要因となり、虚血中心部に加えてペナンプラにおいて重篤な炎症反応と細胞死を引き起こすものと結論した。

### 第3章 エタネルセプトを用いた虚血性脳障害の改善作用の検討

現在、脳血管疾患に対する有効な治療法は、脳梗塞発症後の超急性期（発症4.5時間以内）での組織プラスミノゲン活性化因子（t-PA; アルテプラゼ）による血栓溶解療法のみであり、実際に血栓溶解療法を実施できた症例は時間的制約などにより全脳梗塞患者の3-4%と極めて少ないのが現状である。そのため、新しい治療法の開発を目指して研究が進められているものの、脳組織は血液脳関門の存在により他の臓器と比べて薬剤の移行が困難なことから、有効な治療薬の開発には至っていない。過去10年間に行われた178の脳梗塞に対する臨床試験のうち、これまでに開発された薬の中で有効性が確認された試験が2%以下、さらに有益な可能性を示したのは全体の23%に過ぎないとの報告がある [74]。その理由として、脳神経細胞死の進展過程が一樣ではなく、複雑な経路を経て発症に至ることから、1つの経路に作用する薬剤を投与しても、他のカスケードを迂回してシグナルが伝達されることから十分な効果が得られないことが考えられる。つまり、脳への移行性を示すtherapeutic windowが広い脳保護薬の開発が望まれている。

第1章においては、ラットの虚血/再灌流処置を行った脳組織を用いて遺伝子発現プロファイルを網羅的に解析したところ、炎症関連因子の発現が虚血/再灌流後の早期から顕著に増加し、特に、この反応は糖尿病態で顕著であることが明らかになった。そこで、第3章では、炎症関連因子のなかでもシグナル伝達の上流に位置するTNF- $\alpha$ に注目することにした。

エタネルセプト（etanercept; ETN）は、可溶性TNF- $\alpha$ レセプターとして遊離のTNF- $\alpha$ を捕捉中和して炎症のカスケードを遮断することで抗リウマチ作用、抗炎症作用を発揮する生物学的製剤である。現在、リウマチ薬としてのETNは、成人で10~25 mgを1日1回、週に2回、または、25~50 mgを1日1回、週に1回皮下投与することで治療効果を上げている。

本章では、ETNが虚血/再灌流初期に産生されるTNF- $\alpha$ の作用を阻害して一連の炎症反応を抑制し、その結果脳障害に対する抑制効果が認められるか否かについて検討することにした。

#### 第1節 非糖尿病態ラットにおけるエタネルセプトの脳保護作用の検討

近年、虚血性脳障害において生じる炎症反応を標的とした治療法の開発が注目されている。TNFは、当初マクロファージから産生され、細胞傷害性に働く因子として報告されたが [75]、その後、多くの細胞群（リンパ球、内皮細胞、心筋細胞、脂肪細胞、線維芽細胞）からも分泌されることが明らかとなり [76]、現在では、好中球の遊走性因子としての作用があることも明らかになっている [77]。分泌されたTNFは、分子量55 kDaのTNF receptor 1 (TNFR1)あるいは分子量75 kDaのTNFR2との結合で、生物学的作用を発揮する。TNFR1は、TNF- $\alpha$ に対する主要な受容体として多くの細胞に恒常的に発現しており、

これらの相互作用の結果、細胞内にシグナルを伝達してアポトーシスの誘導に関与すると共に、NF- $\kappa$ B や AP-1 などの転写因子を活性化し、炎症を誘発させる [78]。一方、TNFR2 は TNF- $\alpha$  と TNF- $\beta$  (lymphotoxin) の両者と相互作用して、細胞の生存に関与する [78]。炎症反応においては、TNF と TNFR1 の相互作用による影響が大きいと考えられることから、TNF- $\alpha$  の作用阻害は細胞内シグナル伝達を抑制して、細胞保護が期待できる。

我が国において2005年に承認されたTNF阻害薬のETNは、慢性関節リウマチの治療薬として用いられており、2分子のTNFR2とヒトIgGのFc部分を遺伝子組換えで結合させた完全ヒト型可溶性TNFレセプターである。この可溶性レセプターはTNF- $\alpha$ およびTNF- $\beta$ と結合して decoy receptor として働くことで、リガンドのTNFと細胞表面に発現するTNF受容体との相互作用を低下させて、その生物活性を阻害する。また、可溶性レセプターは、天然のTNF- $\alpha$  receptor と比べて、TNF- $\alpha$  との結合力が約50倍、生物活性は100~1000倍強く、さらに血中半減期も5~8倍長い特徴を有する。

虚血/再灌流処置後の血中 TNF- $\alpha$  量の推移を測定した結果、non-DM 群では経時的に徐々に増加し、再灌流 24 時間以降有意となり調査した中で 72 時間で最大となった。一方、DM 群では、虚血処置前から non-DM ラットの約 40 倍量の 2 pg/mL 程度検出されたものの、虚血/再灌流処置による TNF- $\alpha$  量の大きな変動はラットが生存した 24 時間まで認められなかった (Fig. 3-1)。

以上の結果より、non-DM ラットにおいては虚血/再灌流処置後 TNF- $\alpha$  量が増加すること、DM ラットでは、当初から相当量が検出されていることから、ETN を用いて TNF- $\alpha$  による炎症のカスケードを遮断することで脳障害に対する本薬剤の抑制効果を検討した。

実験デザインを Fig. 3-2 に示した。non-DM ラットに対する効果を判定する為に、10 週齢の SD ラットに 2 時間 MCAO 処置した後、再灌流 24 時間後に脳サンプルを採取した。ETN の投与は、投与量 (300、450 または 900  $\mu$ g/kg)、投与部位 (静脈内あるいは腹腔内)、投与時期 (虚血処置前、虚血直後あるいは再灌流直後) の 3 種類を組み合わせた条件下で行い効果を評価した。

non-DM 群では、虚血後に比べて再灌流後に神経症状が悪化した。ETN 投与群では、虚血/再灌流直後および虚血直後のどの投与量においても改善は認められなかったが、虚血/再灌流 24 時間前の ETN 450 および 900  $\mu$ g/kg 投与群で神経症状が有意に改善した (Fig. 3-3)。そこで、摘出した脳を TTC 染色し、梗塞巣体積を測定した結果、虚血/再灌流直後の ETN 投与群では、脳障害の改善は認められなかったが、虚血直後の 450  $\mu$ g/kg 投与で有意に低下したものの、900  $\mu$ g/kg では有意差は認められなかった。一方、虚血/再灌流 24 時間前では、すべての投与群で有意な改善効果が認められた (Fig. 3-4)。

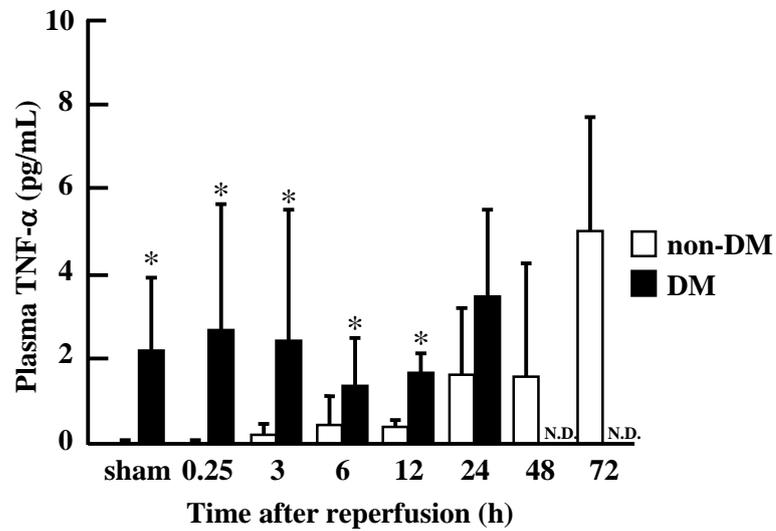


Fig. 3-1 TNF- $\alpha$  concentrations in plasma after cerebral ischemia.

The quantity of TNF- $\alpha$  in plasma after ischemia was determined by ELISA. The open column shows the non-DM group and the closed column is the DM group. Data are means  $\pm$  S.D. (n = 4-5 per time point). \* $P < 0.05$  vs. corresponding values for non-DM. N.D. : not determined.

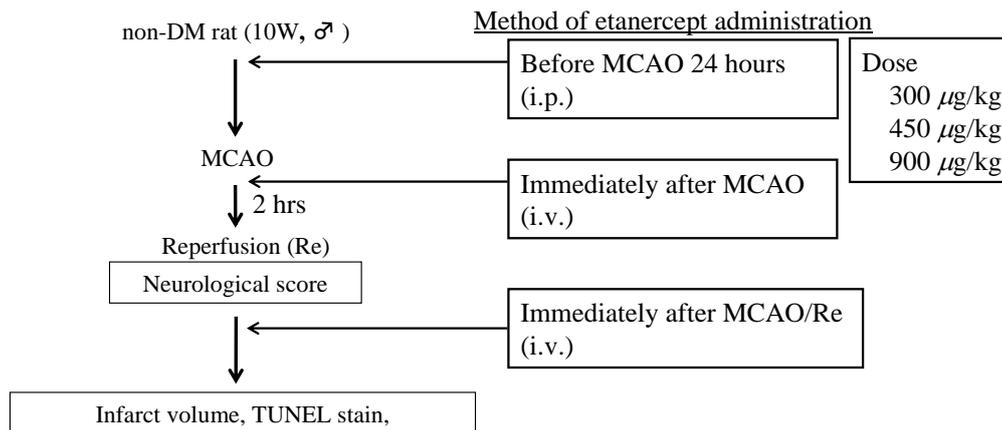


Fig. 3-2 The experimental design.

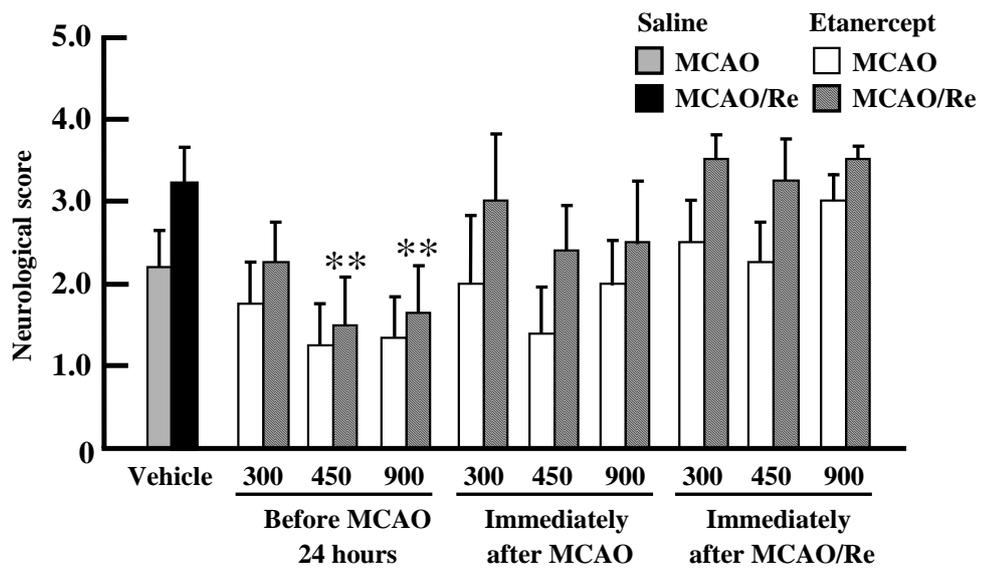
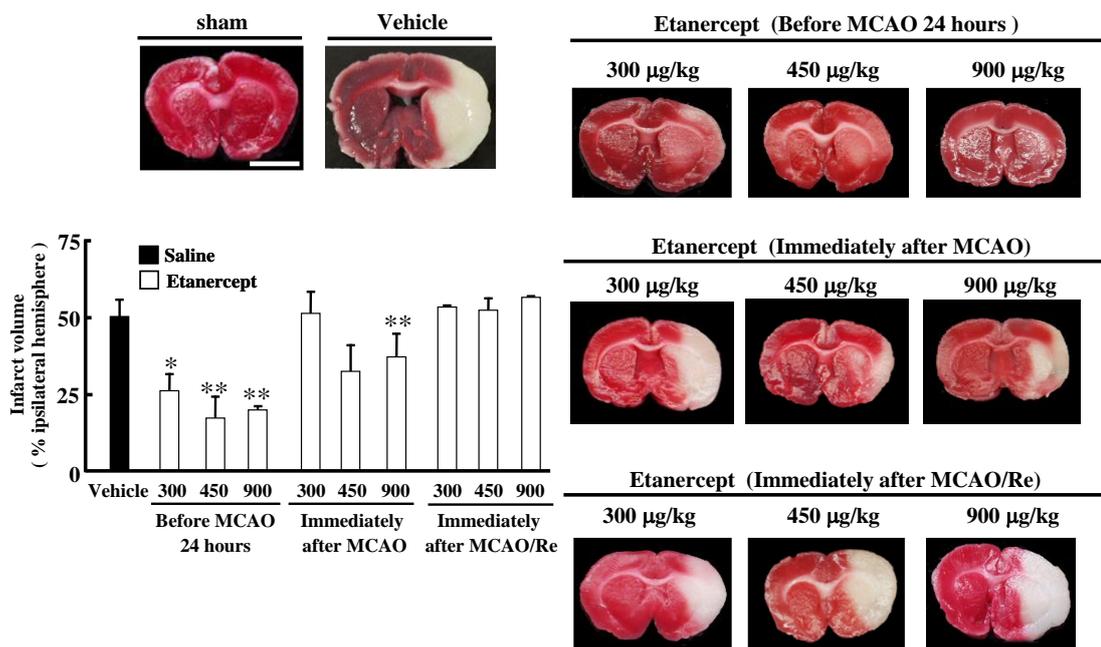


Fig. 3-3 Effects of ETN on neurological deficits induced by cerebral ischemia in non-DM rats.

Post-ischemic neurological deficits were evaluated at 2 h of MCAO and various ETN administration points after reperfusion. The shaded column shows the MCAO-vehicle; the closed column shows the MCAO/Re-vehicle; the open column shows the MCAO- ETN; the hatched column is the MCAO/Re- ETN. Data are means  $\pm$  S.D. (n = 3-6).  $*P < 0.01$  vs. corresponding values for the vehicle-MCAO/Re.



*Fig. 3-4* Effects of ETN on infarction induced by cerebral ischemia in non-DM rat brains.

Representative coronal brain sections of the non-DM rats and ETN group stained by TTC at various ETN administration points after reperfusion. The closed column shows the vehicle group and the open column is the ETN group. Scale bar = 5 mm. Data are means  $\pm$  S.D. (n = 3-6 per time point).  $^{***}P < 0.05, 0.01$  for statistical significance compared to the vehicle group.

## 第2節 糖尿病態ラットにおけるエタネルセプトの脳保護作用の検討

non-DM ラットにおいて ETN 投与による脳保護効果が認められたことから、次に DM ラットに対する効果を検討した。実験デザインを Fig. 3-5 に示した。non-DM 群において、虚血/再灌流直後の投与群において改善効果が認められなかったことから、DM 群ではこの投与条件は実施せず、代わりに DM 群の sham ですでに TNF- $\alpha$  の発現増加が認められたことから、糖尿病発症直後から ETN を繰り返し投与する反復投与群を作製することにした。

DM 群では、non-DM の vehicle 群に比べて神経症状の悪化が顕著であった。non-DM 群で効果が認められた虚血直後および虚血/再灌流 24 時間前単回投与において、神経症状の改善は認められなかった。しかし、本薬剤を 450  $\mu\text{g}/\text{kg}$  で反復投与した群では、虚血/再灌流後に改善傾向が認められ、900  $\mu\text{g}/\text{kg}$  投与群において有意であった (Fig. 3-6)。虚血直後および虚血/再灌流 24 時間前単回投与群において梗塞巣の減少は認められなかったが、ETN 450  $\mu\text{g}/\text{kg}$  の反復投与群においては、梗塞巣の減少傾向が見られ、900  $\mu\text{g}/\text{kg}$  投与において有意な改善が明らかになった (Fig. 3-7)。さらに、虚血/再灌流処置 24 時間後に摘出した脳を TUNEL 染色し、アポトーシスに対する ETN の効果を評価した結果、Figs. 3-4 & 3-7 の TTC 染色結果とほぼ相関して細胞死を有意に抑制することが認められた。しかし、TTC 染色において改善が見られた non-DM の ETN 450  $\mu\text{g}/\text{kg}$  虚血直後単回投与群では、アポトーシスの抑制は認められなかった。また、梗塞巣の改善傾向が認められた DM の ETN 450  $\mu\text{g}/\text{kg}$  の反復投与群では、アポトーシスの抑制は有意であった (Fig. 3-8)。

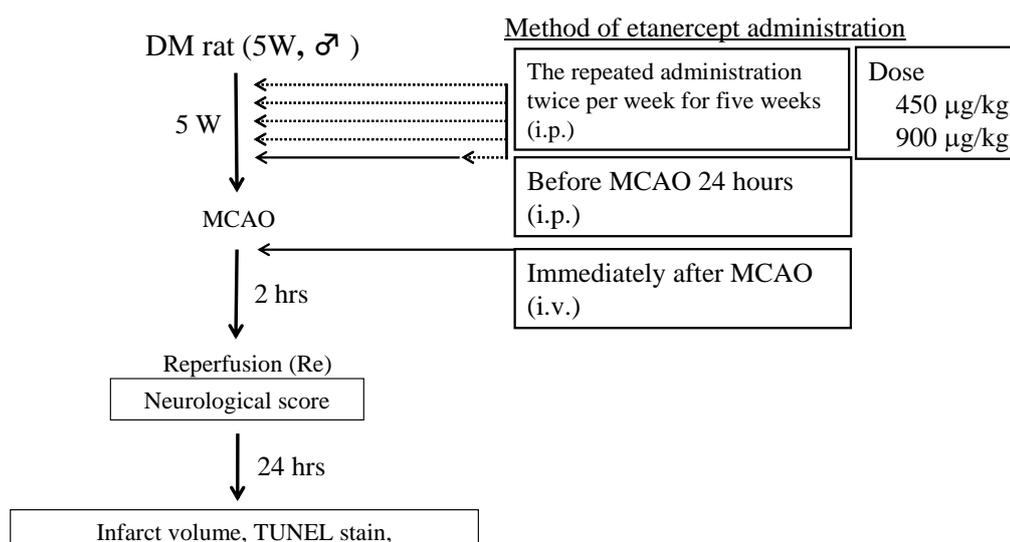


Fig. 3-5 The experimental design.

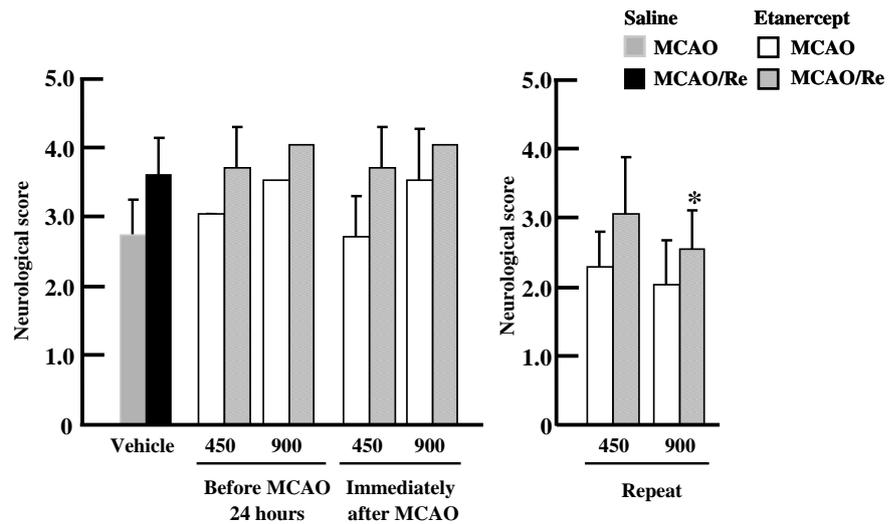


Fig. 3-6 Effects of ETN on neurological deficits induced by cerebral ischemia in DM rats.

Post-ischemic neurological deficits were evaluated at 2 h of MCAO and various ETN administration points after reperfusion. The shaded column shows the MCAO-vehicle and the closed column shows the MCAO/Re-vehicle and the open column shows the MCAO- ETN and the hatched column is the MCAO/Re- ETN. Data are means  $\pm$  S.D. (n = 5-7). \* $P < 0.05$  vs. corresponding values for vehicle.

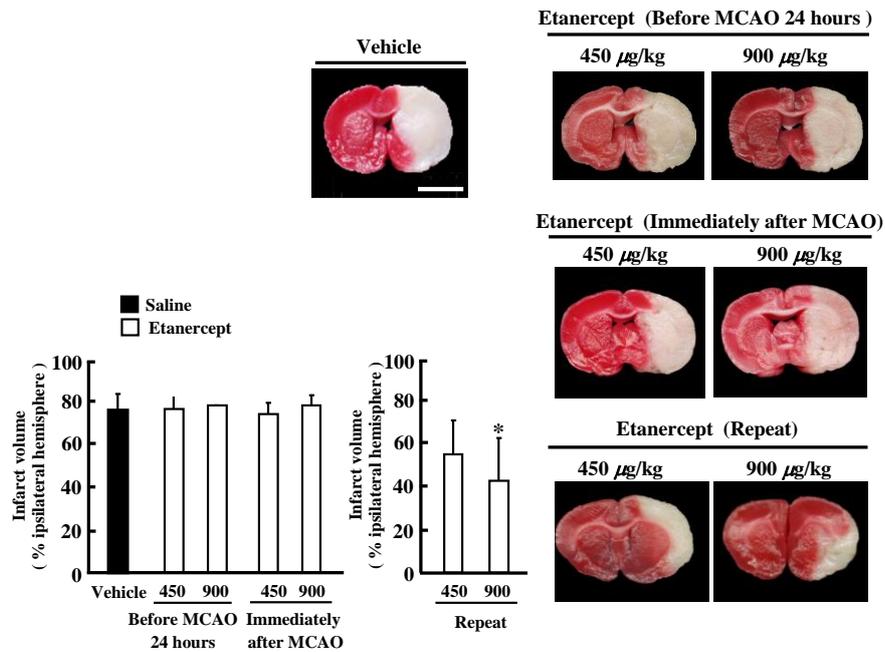


Fig. 3-7 Effects of ETN on infarction induced by cerebral ischemia in DM rat brains.

Representative coronal brain sections of DM rats and the ETN group stained by TTC at various ETN administration points after reperfusion. The closed column shows the vehicle group and the open column is the ETN group. Scale bar = 5 mm. Data are means  $\pm$  S.D. (n = 3-6 per time point).

\* $P < 0.05$  for statistical significance compared to the vehicle group.



炎症関連因子のなかでも作用発現の上流に位置する TNF- $\alpha$  に注目し、ETN が TNF- $\alpha$  の作用を阻害して炎症反応を遮断し、結果として脳障害の抑制作用を示すか否かを検討した。

non-DM 群では、虚血処置によって時間経過に伴って TNF- $\alpha$  が増加したが、DM では平常時から non-DM 群の 40 倍の TNF- $\alpha$  量が存在したものの、虚血による大きな変動は認められなかった。本論文ではデータに示さないが、TNF- $\alpha$  の受容体である TNFR1 の発現は、虚血処置により両群とも上昇することが認められ、TNF- $\alpha$  と受容体との相互作用による細胞内シグナル伝達の促進が炎症反応を惹起していることが示唆された。そこで non-DM 群において、再灌流後に ETN を静脈内投与した場合、いずれの投与量においても脳障害の改善作用は認められなかった。しかし、虚血直後の投与では、450  $\mu\text{g}/\text{kg}$  以上で改善が認められた。一方、虚血処置 24 時間前に 450  $\mu\text{g}/\text{kg}$  を腹腔内投与した場合は、梗塞巣の明らかな縮小とアポトーシス細胞の減少が認められた。薬剤による疾病治療の観点から、再灌流後の投与によって虚血性脳障害が改善されれば、先に述べたように実用性が高いことが想定できるが、今回の結果では、再灌流後の投与では全く効果が認められず、虚血後投与時にのみ改善効果があることが示された。一方、虚血処置前に投与することで、脳障害が顕著に軽減できることから、この投与方法は疾病の治療を目的としたものではなく、予防効果を期待する上で新たな知見を提示するものであった。

薬剤が脳において作用するためには、血液脳関門の透過性を考慮しなければならない。ラットにおいて、ETN の脳への移行率についてはデータを持ち合わせていないが、第 1 章で示したように虚血/再灌流によって経時的に血液脳関門の破綻をきたすことから、高分子化合物の ETN が脳細胞に透過する可能性がある。しかし、虚血/再灌流直後の ETN 投与では効果を示さなかった理由について、虚血により脳障害が速やかに誘発されること、また、虚血/再灌流後の比較的早期に作用する TNF- $\alpha$  が、炎症や細胞死に大きな役割を演じるほかに TNFR2 を介して細胞を保護する二面性を持つこと、さらに他のサイトカインが複雑に関与して虚血性脳障害を誘発することなどが原因と考えられる。一方、DM では、non-DM ラットで改善効果が認められたいずれの条件下においても脳梗塞巣の改善は認められなかった。しかし、DM 発症直後からの ETN 最大投与量 900  $\mu\text{g}/\text{kg}$  の計 10 回にわたる反復投与によってのみ脳保護効果が示された。

以上のことから、ETN は虚血性脳障害に対して脳保護効果を有する可能性が示唆されたものの、その効果の発現には投与方法に大きく依存することが明らかになった。特に、DM では、虚血/再灌流処置以前に相当数の繰り返し投与によってのみ効果を発揮した。本薬剤の虚血性脳障害における適用方法については今後の課題であるとともに、改善効果のメカニズムについても更なる検討が必要である。

#### 第4章 抗酸化能を有する食品・食品成分と医薬品による虚血性脳障害改善作用の検討

第3章では、non-DMとDMラットの脳虚血/再灌流処置において、生物学的製剤である抗リウマチ薬のETNによる治療効果を検討した。その結果、両ラット群とも虚血/再灌流後のETN投与では改善効果は認められなかった。しかし、non-DM群では虚血後および虚血処置前の単回投与で脳保護効果を示し、DM群では、糖尿病発症直後からのETN反復投与でのみ効果が認められた。薬物治療の概念では、病態発症前の脳虚血処置以前に適用することは通常ありえない。しかし、糖尿病が脳梗塞の危険因子であるとの考えにおいて、虚血/再灌流処置以前に炎症が誘発していることが原因となり、脳虚血の併発によって障害が著しく増悪することから、脳梗塞による障害を軽減する予防対策として、初期の炎症反応を低減させることで、障害の増悪が軽減できるのではないかと考えた。そこで、第4章では薬剤の代替として日常的に摂取する食品・食品成分により、脳梗塞の軽減が可能かどうかを検討することにした。

脳梗塞急性期治療の戦略には、血流改善療法と脳保護療法の二つがあり、特に後者は、脳細胞の保護と脳血管内皮細胞保護の両面に焦点を当てた治療法である。急性期の病態において酸化ストレスは重要な役割を演じ、この制御は急性期治療において最も重要なものとして、これまでに様々な薬剤が開発されてきた。そのような中で、 $\cdot\text{OH}$ ラジカルを中心とした酸化ストレスを抑制し、ラジカルの影響を受けやすい膜脂質損傷を抑制できるエダラボンが臨床において効果を示している。また、エダラボンは、血流改善療法で用いられるt-PAによる出血を低下させることから、両薬剤の併用が有効であると考えられている。さらに、2009年に提唱された日本脳卒中治療ガイドラインにおいて、エダラボン処置はグレードB（行うように勧められる）に位置付けられ、酸化ストレス抑制が脳保護に有効であることが示されている[80]。すでに、第1章においてラットの個体および虚血/再灌流後の脳組織の酸化ストレス度評価の結果から、虚血/再灌流後に著しい酸化ストレス状態に陥ること、また、non-DMに比べてDMラットの個体レベルの酸化ストレスが高く、さらに、脳組織の各領域においても高度に酸化ストレス状態であることが明らかになっている。

そこで、本章の第1節では、抗酸化能を有する食品・食品成分を一定期間投与したラットの虚血/再灌流後の脳保護効果を検討した。抗酸化能を有する食品として今回用いたMAKは、霊芝菌糸体をバガスと脱脂した米糠の混合固形培地に接種し、子実体発生直前に培地ごと破碎し、熱水抽出、噴霧乾燥したもので、これまでに抗腫瘍作用、血圧低下作用、血糖上昇抑制作用などが報告されている健康食品である。本実験では、アスコルビン酸(AA; ビタミンC)を抗酸化食品成分のポジティブコントロールとした。第2節では、AAの作用メカニズムを第3節ではMAKの作用メカニズムについて検討した。第4節および5節では、それぞれ脳保護効果のメカニズム解析とHMGB1の挙動について解析し、第6節では食品と医薬品の併用効果について、上述したMAKとエダラボンの併用効果について検討した。

## 第1節 食品・食品成分の抗酸化能と虚血性脳障害改善作用の検討

実験デザインを Fig. 4-1 に示した。5 週齢の SD ラットに STZ (50 mg/kg) を腹腔内に単回投与し、5 週間飼育して血糖値 300 mg/dL 以上のラットを糖尿病態 (DM) ラットとした。また、STZ 未処置ラットを非糖尿病態 (non-DM) ラットとして使用した。これら両群ラットの 8 週目から 2 週間 AA (100 mg/kg/day) あるいは霊芝菌糸体培養培地抽出物 (MAK; 1 g/kg/day) を経口投与した。続いて、10 週齢のラットに 2 時間の MCAO 処置した後、再灌流 24 時間後に脳サンプルを採取して効果を判定した。また、医薬品をポジティブコントロールとするために、脳保護薬のエダラボン (10 mg/kg/day) を単回投与した群あるいは 3 日間連続投与した群を作製して評価した。

non-DM 群において、虚血直後のエダラボン投与群では、再灌流 24 時間後において顕著な脳保護効果を示し、また、3 日間の連続投与においても梗塞巣の形成は認められなかった。さらに、虚血/再灌流直後の投与群において、若干の梗塞巣が 24、72 時間で確認されたが、vehicle 群と比べて顕著な改善効果であった。従って、non-DM ラットにおいて、エダラボンが虚血直後、再灌流後のいずれの場合においても脳保護効果を示すことから、本薬剤が虚血性脳障害の治療薬として有効であることが確認できた。一方、DM 群においては、虚血直後の投与群で、24 時間後の梗塞巣が減少傾向を示したものの、72 時間後にはペナンプラに相当する領域にも壊死が生じ、改善効果は認められなかった。また、虚血/再灌流直後投与群では、24、72 時間後のどちらも改善作用は認められなかった。以上の結果より、エダラボンは、non-DM 群に対して有効であるが、DM 群には効果を示さないと考えられた (Fig. 4-2)。

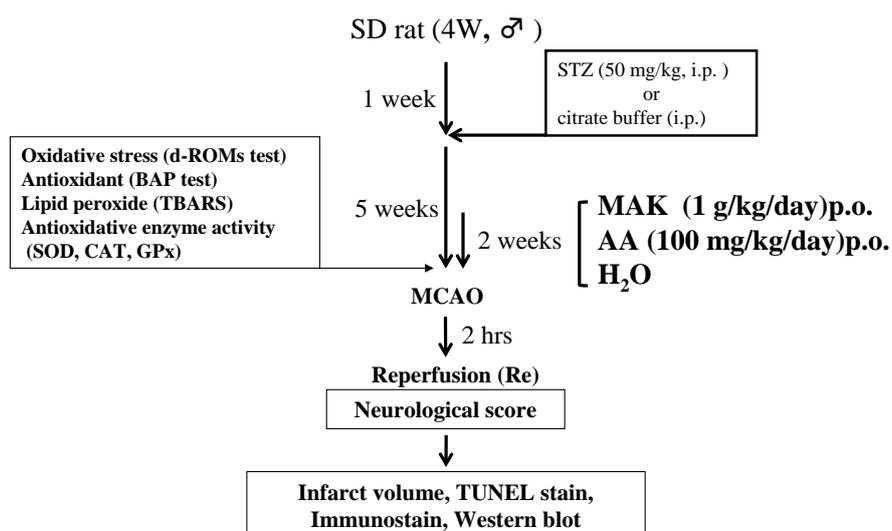
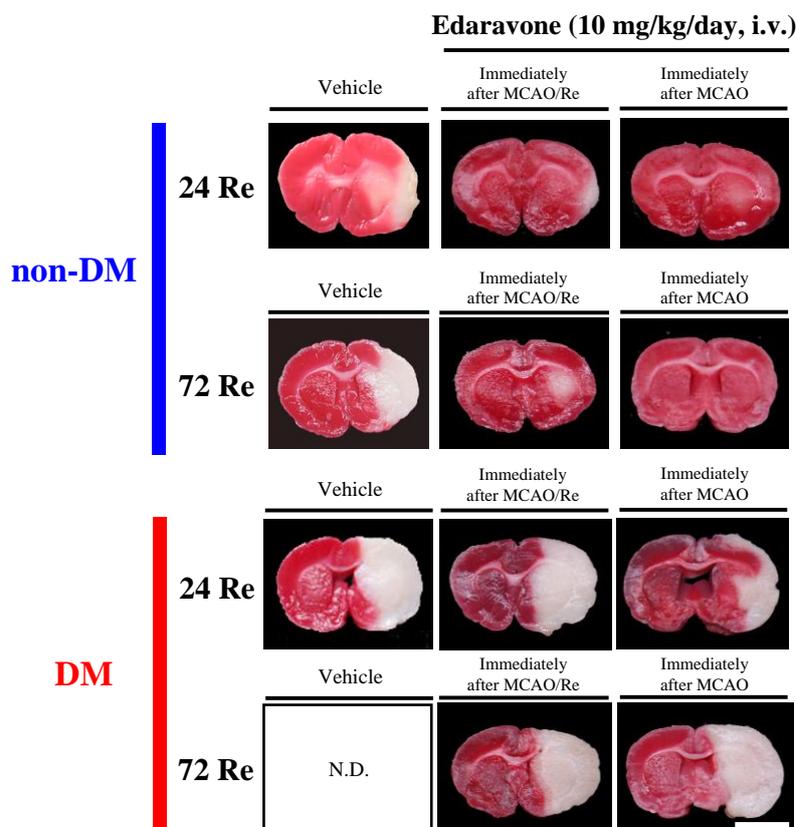


Fig. 4-1 The experimental design.



*Fig. 4-2* Effects of edaravone on infarction induced by cerebral ischemia in rats.

Representative data of TTC staining from the rats of the non-DM group, treated edaravone non-DM or DM group with MCAO with reperfusion (MCAO/Re). Rats were injected intravenously with saline or edaravone immediately after MCAO or MCAO/Re and sacrificed 1 and 3 days later. Scale bar = 5 mm. N.D.; not determined.

Table 2 Scavenging effect of the free radical.

**(A) Superoxide anion radical scavenger**

| Sample             | IC <sub>50</sub> (mg/mL) |
|--------------------|--------------------------|
| MAK                | 1.059                    |
| Edaravone          | 1.246                    |
| Ascorbic acid (AA) | 0.039                    |
| Vitamin E          | 47.616                   |

**(B) DPPH radical scavenger**

| Sample             | EC <sub>50</sub> (mg/mL) |
|--------------------|--------------------------|
| MAK                | 0.327                    |
| Edaravone          | 0.007                    |
| Ascorbic acid (AA) | 0.004                    |
| Vitamin E          | 0.114                    |

続いて、AA と MAK の抗酸化力を、スーパーオキシドアニオン消去能および DPPH ラジカル消去能として比較・評価した (Table 1)。AA は、エダラボンと比べてスーパーオキシドアニオン消去能が約 40 倍強く、また、安定な人工的ラジカルである DPPH ラジカルに対して約 1.8 倍強いことが認められた。一方、MAK の DPPH ラジカル消去能は、AA と比べて劣るもののスーパーオキシドアニオン消去能はエダラボンと同等であった。そこで次に、AA および MAK の 2 週間経口投与後の虚血/再灌流に対する脳保護効果について検討した。

水投与した non-DM 群の虚血/再灌流処置ラットでは、脳の線条体および皮質に梗塞巣 ( $27.8 \pm 4.2$ ) が認められたが、AA (100 mg/kg) 投与群では梗塞巣 ( $16.5 \pm 7.7$ ) が顕著に減少した。また、MAK (1 g/kg) 投与群においても、AA の効果以上に梗塞巣 ( $12.5 \pm 4.9$ ) の減少が確認できた。一方、DM ラットの水投与群における梗塞巣 ( $65.6\% \pm 7.5$ ) では、non-DM ラットの水投与群 ( $27.8\% \pm 4.2$ ) と比べ、視床や皮質全体に及ぶ著しい梗塞巣の拡大 (約 2.4 倍) が確認された。これに対して、AA 投与群では、皮質および視床の一部分にのみ梗塞巣 ( $23.0\% \pm 9.9$ ) が認められ、また、MAK 投与群においてもほぼ同様の改善効果 ( $18.2\% \pm 10.4$ ) が認められた。これらの結果から、脳保護薬のエダラボンは、non-DM ラットの虚血後および再灌流後の投与で有効であるものの、DM において有効性は見出されなかった (Fig. 4-2)。これに対して、AA や MAK を 2 週間投与したラットにおいて、non-DM および DM の両ラットの脳障害を顕著に軽減することが示された (Fig. 4-3)。

そこで、AA と MAK の脳保護効果メカニズムの一端を明らかにするため、これらラットの酸化ストレス度と抗酸化酵素活性について解析した。DM ラット ( $252.8 \pm 32.9$  U.CARR) の酸化ストレス度 (d-ROMs test) は、non-DM 群 ( $131.0 \pm 7.0$  U.CARR) に比べて約 2 倍有意に上昇していた。これに対して、DM ラットの AA の経口投与群では、non-DM 群のレベルにまで酸化ストレス度が低下しており ( $137.3 \pm 32.1$  U.CARR)、同様に MAK では AA に優る効果を示した ( $109.3 \pm 15.1$  U.CARR)。さらに、non-DM 時においても、未処置群と比べて MAK 投与により有意に低下した ( $84.3 \pm 2.6$  U.CARR)。これらのことから、生体内において MAK が強力な抗酸化食品として機能することが示唆された。一方、抗酸化力 (BAP test) は、水投与群で non-DM 群 ( $1875.4 \pm 156.1$ ) に比べ DM 群 ( $1475.7 \pm 67.1$ ) で約 1.3 倍有意に低下していた。このことから DM 群では酸化ストレスが増大する一方で、抗酸化能が低下していることが明らかになった。これに対して、DM 群に AA を投与した群 ( $1454.7 \pm 101.9$ ) では、抗酸化力に大きな変化は見られなかった。しかし、MAK 投与群 ( $1649.0 \pm 101.2$ ) では、抗酸化力の低下を回復する傾向が認められた (Fig. 4-4)。

加えて、DM 群の脳組織中の過酸化脂質含量は、分画したすべての脳部位において non-DM 群と比べ、1.3 から 2.0 倍程度有意に増加していた。これに対して、DM に AA 投与した群では、皮質、線条体+海馬、および脳幹で有意に過酸化脂質含量が低下した。non-DM 群間の比較では、AA 投与群の脳幹において有意な過酸化脂質含量の低下が認められた。一方、MAK 投与群においても AA 群と同様の結果を示し、さらに DM 群の小脳においても低下傾向が認められた。(Fig. 4-5)。

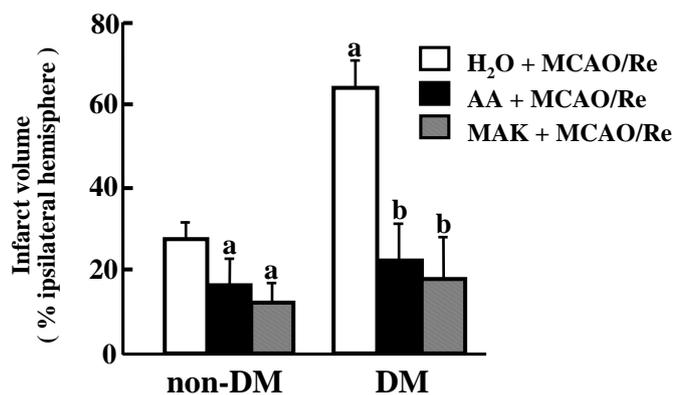
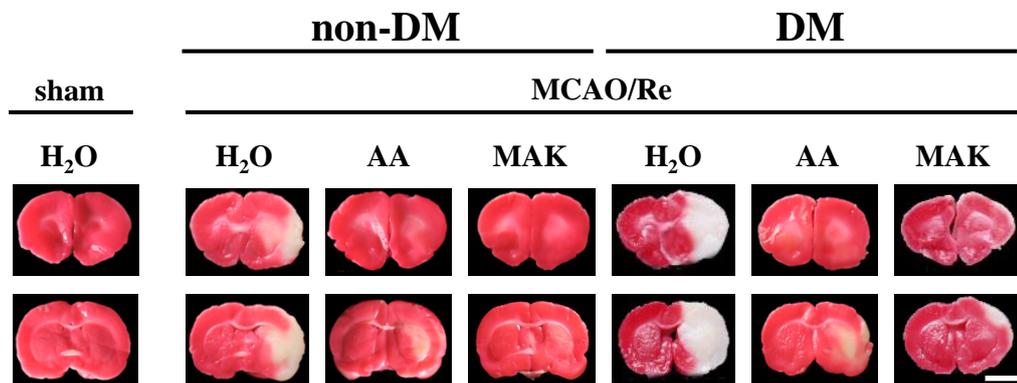


Fig. 4-3 Effects of antioxidant on infarction induced by cerebral ischemia in rats.

Representative data of TTC staining from the rats of the non-DM with sham operation group, distilled water administered (H<sub>2</sub>O) or AA or MAK supplemented non-DM or DM group with MCAO with reperfusion (MCAO/Re). AA (100 mg/kg body weight) or MAK (1 g/kg body weight) or water was administered once daily for 2 weeks by p.o. Scale bar = 5 mm. The data are presented as mean  $\pm$  S.D. (n = 6-10). <sup>a</sup>*P* < 0.05 vs. non-DM + H<sub>2</sub>O + MCAO/Re, <sup>b</sup>*P* < 0.01 vs. DM + H<sub>2</sub>O + MCAO/Re.

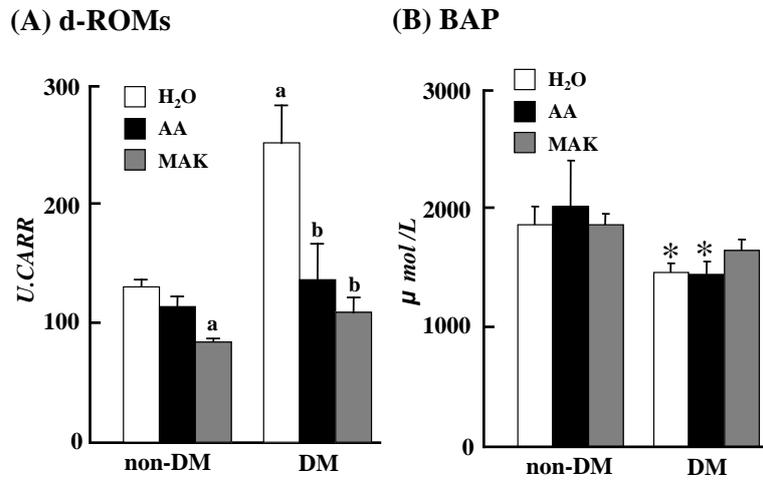


Fig. 4-4 Effects of antioxidant on oxidative stress induced by DM rats.

Effects of AA or MAK supplementation on total oxidative stress (A) and antioxidative capacity (B) in plasma of the non-DM and the DM rats determined by d-ROMs test and BAP test, respectively. Data are mean  $\pm$  S.D. of 6 - 7 rats per group. <sup>a</sup> $P < 0.05$ , 0.01 for statistical significance compared to the distilled water (H<sub>2</sub>O)-administered non-DM group. <sup>\*</sup> $p < 0.05$  compared to the H<sub>2</sub>O-administered DM group.

## TBARS

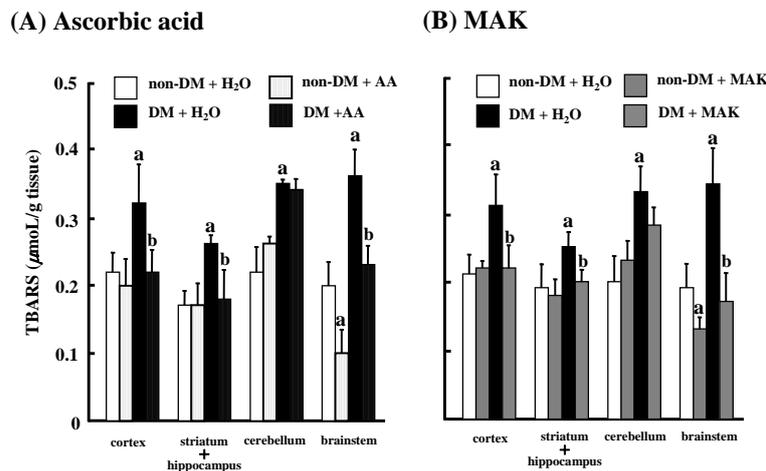


Fig. 4-5 Effects of antioxidant on lipid peroxide induced by DM rats.

Effect of AA and MAK supplementation on the level of lipid peroxidation in the brain of the non-DM and the DM rats determined by TBARS assay. Data are mean  $\pm$  S.D. of 6 - 7 rats per group. <sup>a</sup> $P < 0.01$  for statistical significance compared to the distilled water (H<sub>2</sub>O)-administered non-DM group. <sup>b</sup> $P < 0.01$  compared to the H<sub>2</sub>O-administered DM group.

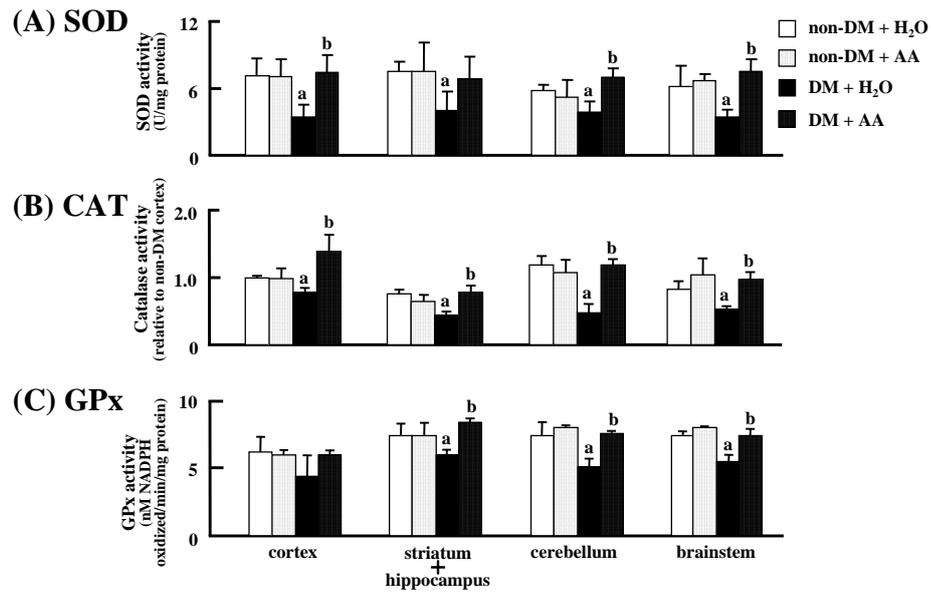


Fig. 4-6 Effects of ascorbic acid on antioxidative enzyme activity decreased by DM rats.

Effect of AA supplementation on the activities of SOD (A), CAT (B), and GPx (C) in the non-DM and the DM rat brain. Data are mean  $\pm$  S.D. of 6 - 7 rats per group. <sup>a</sup> $P < 0.01$  for statistical significance compared to the distilled water (H<sub>2</sub>O)-administered non-DM group. <sup>b</sup> $P < 0.01$  compared to the H<sub>2</sub>O-administered DM group.

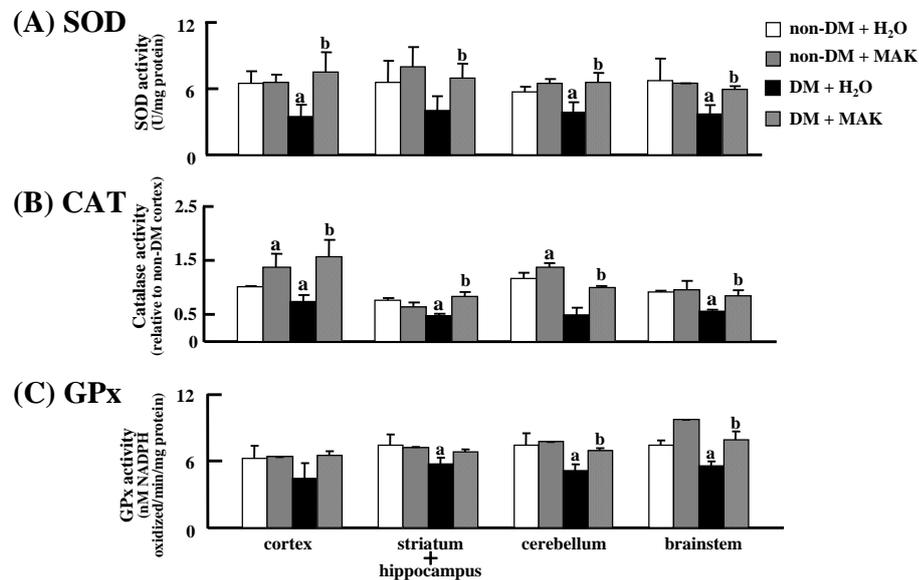


Fig. 4-7 Effects of MAK on antioxidative enzyme activity decreased by DM rats.

Effect of MAK supplementation on the activities of SOD (A), CAT (B), and GPx (C) in the non-DM and the DM rat brain. Data are mean  $\pm$  S.D. of 6 - 7 rats per group. <sup>a</sup> $P < 0.01$  for statistical significance compared to the distilled water (H<sub>2</sub>O)-administered non-DM group. <sup>b</sup> $P < 0.01$  compared to the H<sub>2</sub>O-administered DM group.

さらに、脳組織中の SOD、CAT および GPx の活性は、DM 群のほぼすべての脳部位において有意に低下した。これらの結果は、DM の脳組織では、抗酸化酵素の活性低下によって抗酸化能が減弱し、これに伴って酸化ストレスが増大することを示唆していた。しかし、DM 群に AA 投与した場合、酵素活性の低下が完全に抑制されており、non-DM 群との差は認められなかった。加えて、MAK 投与群においても AA 群とほぼ同様の結果を示し、DM 群における酵素活性の低下を顕著に抑制した。さらに、MAK 群では、non-DM 時においても皮質と小脳でカタラーゼの活性も上昇させた (Figs. 4-6 & 4-7)。

以上のことから、AA および MAK は、糖尿病態の平常時において低下する抗酸化酵素活性を非糖尿病態レベルにまで保ち、脳における過酸化脂質産生を有意に抑制することが明らかになった。糖尿病態での抗酸化酵素活性の維持は、虚血性脳障害において過剰に産生される酸化ストレスの除去にも寄与すると考えられる。そこで、第 2 節では AA の脳保護メカニズムを、第 3 節では MAK の脳保護メカニズムを検討することにした。

## 第 2 節 虚血性脳障害におけるアスコルビン酸による保護作用メカニズム

AA は、抗酸化物質を代表するビタミンであり、摂取された AA はトランスポーターを介して組織に蓄積される。特に、副腎、水晶体、脳などの組織に高濃度で保持され、生理機能を果たす。また、血中には AA をはじめ多くの抗酸化物質が存在するが、その中でも AA は過剰に産生された ROS をいち早く捕捉・消去する[81]。また、ラットやマウスなどは D-グルコースから AA を体内で生合成することが可能であり、ラットでは 1 日に 150 mg/kg (body weight) を肝臓で合成している。一方、ヒトなどの霊長類は、AA を体内で合成できないため食事等により摂取することが必須である。

前節の Fig. 4-3 で示したように、AA 投与が虚血性脳障害に対して non-DM および DM の両群で脳保護効果を示したことから、本節では AA による脳保護メカニズムを組織学的に解析した。その結果、DM の皮質ペナンプラでは、平常時において non-DM 群に比べてスーパーオキシド産生が約 1.8 倍有意に増加したのに対し、AA 投与によって non-DM レベルにまで抑制した。また、虚血/再灌流処置により脳におけるスーパーオキシド産生は両群で増加し、特に DM において発現増加は著しいものの、この作用は AA 投与によって抑制された (Fig. 4-8)。次いで、アポトーシスに対する AA の効果を評価した結果、non-DM 群に比べ、AA 投与により約 30% cleaved caspase-3 の発現が減少した。また、DM では non-DM 群に比べて虚血/再灌流処置で約 1.8 倍発現が上昇したのに対して、AA 投与は約 30% 発現を抑制した (Fig. 4-9)。虚血性脳障害の誘発において、炎症反応が重要な役割を果たすことから、関連するサイトカインの発現についても解析した。DM では、平常時から TNF- $\alpha$  や IL-1 $\beta$  の発現が亢進しており、AA 投与がこれら発現を有意に抑制した。また、虚血/再灌流処置により

さらに発現が上昇した両サイトカインを AA 投与が顕著に低下させた (Figs. 4-10 & 4-11)。non-DM 群の虚血/再灌流処置では、白血球浸潤マーカーの MPO 活性が sham に比べて約 6.8 倍上昇したのに対して、AA 投与では非糖尿病態レベルにまで低下した。しかし、DM 群では AA 投与により、MPO 活性の低下は認められなかった (Fig. 4-12)。

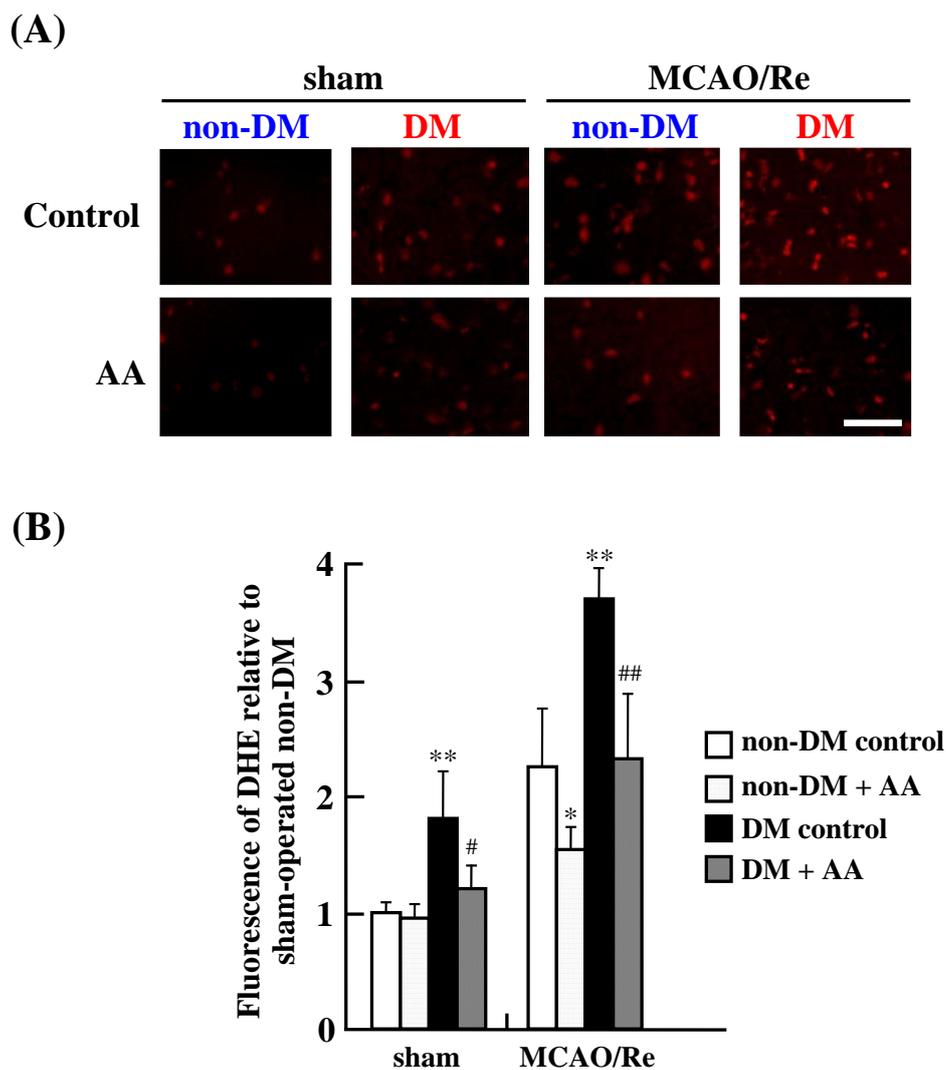
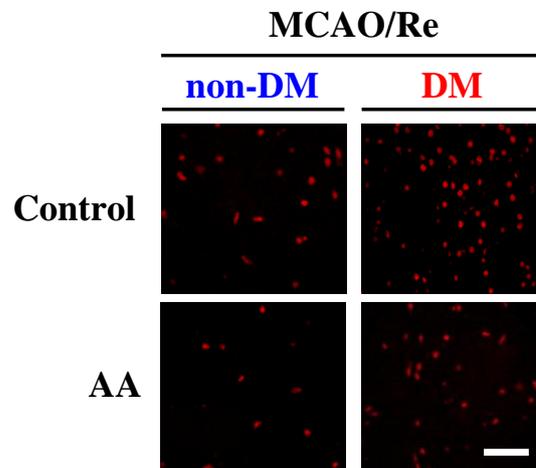


Fig. 4-8 Effects of AA supplementation on production of  $O_2^-$  after MCAO/Re in the brain of non-DM and DM rats.

(A) Representative photographs of superoxide production detected by DHE staining in coronal sections of the cortex from the non-DM and DM rats. (B) Quantitative analysis of DHE fluorescence intensity in the cortex. Scale bar = 50  $\mu$ m. The data are presented as mean  $\pm$  S.D. (n = 3-4). \* \*\* $P$  < 0.05, 0.01 compared with the non-DM control group. #, ## $P$  < 0.05, 0.01 compared with the DM control group.

(A)



(B)

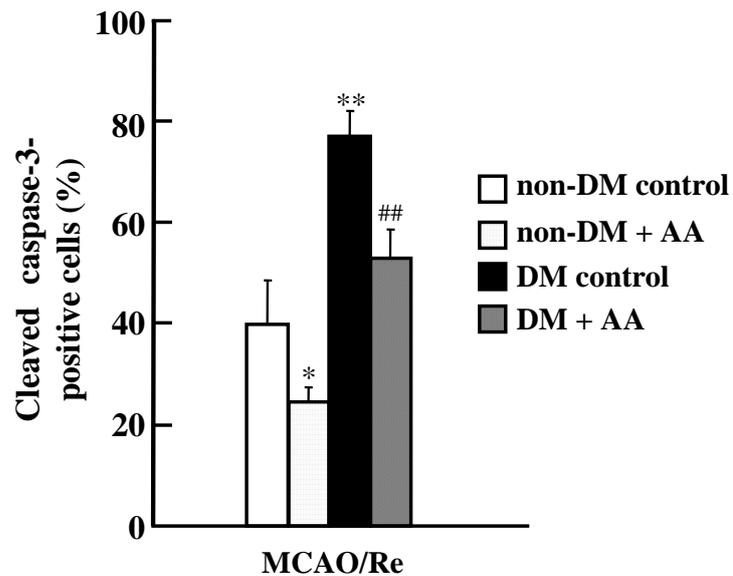
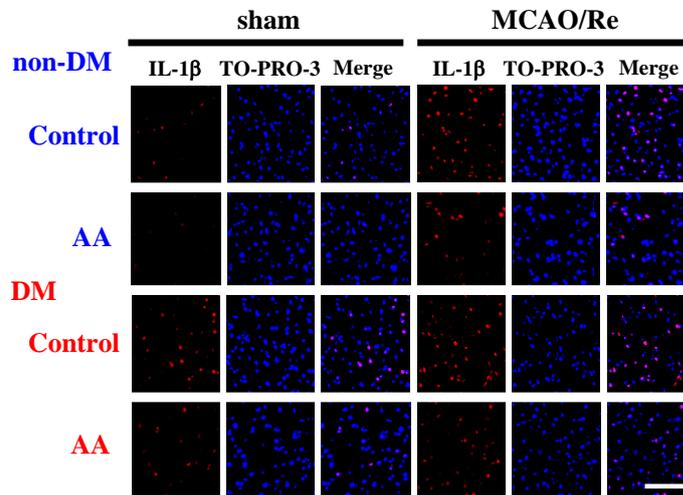


Fig. 4-9 Effects of AA supplementation on cleaved caspase-3 after MCAO/Re in the brain of non-DM and DM rats.

(A) Representative photographs of cleaved caspase-3 staining in the cortex coronal sections of non-DM and DM rats. (B) Quantitative analysis of cleaved caspase-3 positive cells (fluorescence intensity in the cortex). Scale bar = 100  $\mu$ m. The data are presented as mean  $\pm$  S.D. (n = 3-4). \* \*\* $P$  < 0.05, 0.01 compared with the non-DM control group. ## $P$  < 0.01 compared with the DM control group.

(A)



(B)

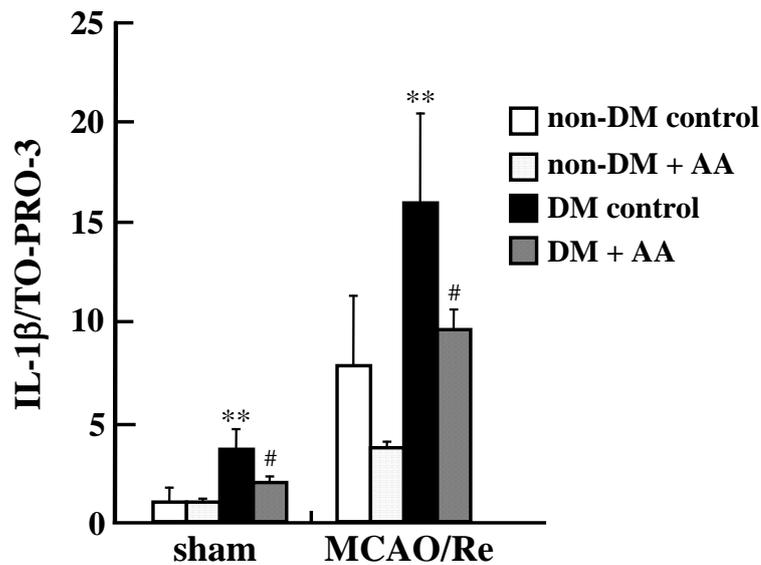
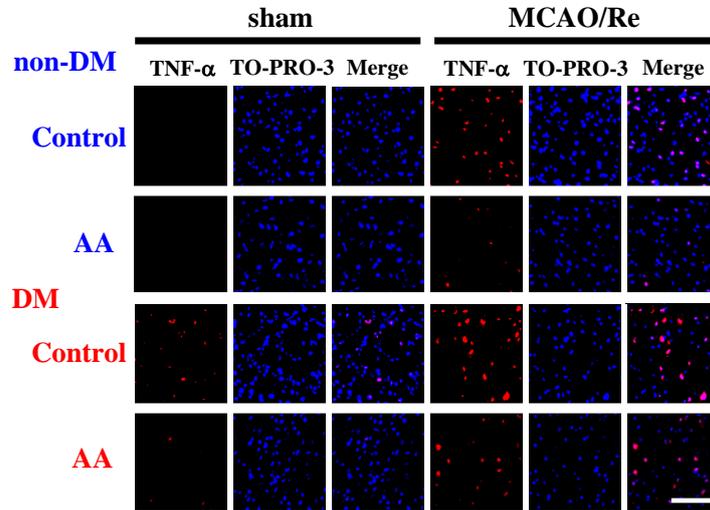


Fig. 4-10 Effects of AA supplementation on expression of IL-1 $\beta$  in the penumbral cortex after MCAO/Re in the brain of non-DM and DM rats.

(A) Representative photographs of IL-1 $\beta$  immunostaining (red fluorescence) and staining of nuclei by TO-PRO-3 (blue fluorescence) in the cortex coronal sections of non-DM and DM rats. (B) Quantitative analysis of IL-1 $\beta$  fluorescence intensity in the cortex. Scale bar = 100  $\mu$ m. The data are presented as mean  $\pm$  S.D. (n = 4). \*\* $P$  < 0.01 compared with the non-DM control group. # $P$  < 0.05 compared with the DM control group.

(A)



(B)

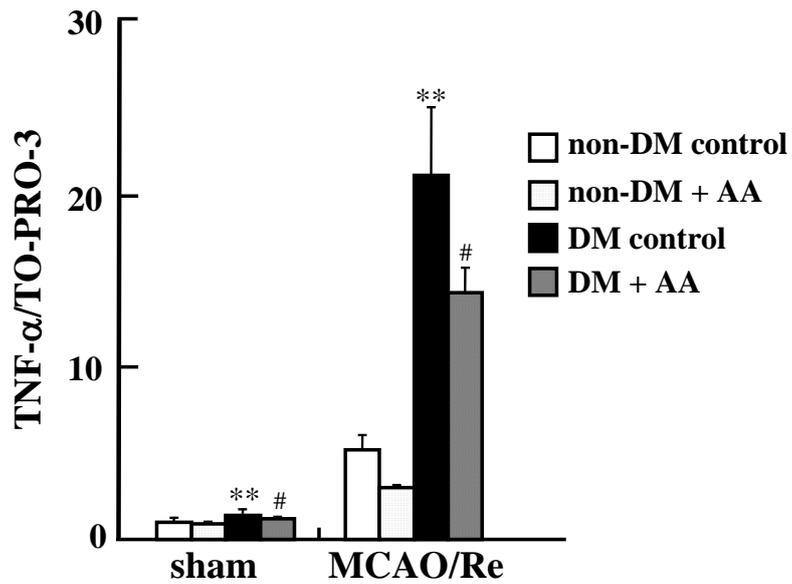
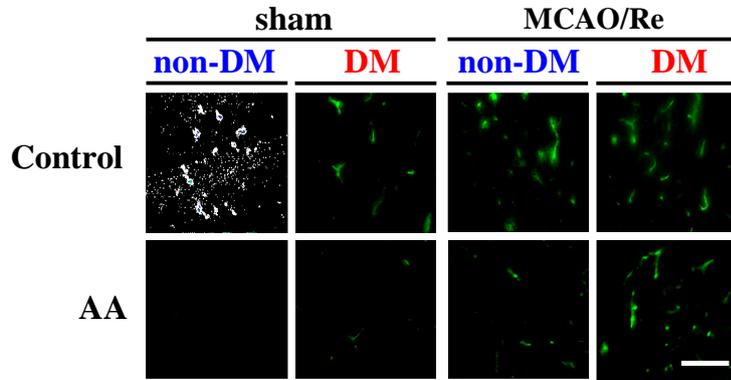


Fig. 4-11 Effects of AA supplementation on expression of TNF- $\alpha$  in the penumbral cortex after MCAO/Re in the brain of non-DM and DM rats.

(A) Representative photographs of TNF- $\alpha$  immunostaining (red fluorescence) and staining of nuclei by TO-PRO-3 (blue fluorescence) in the cortex coronal sections of non-DM and DM rats. (B) Quantitative analysis of TNF- $\alpha$  fluorescence intensity in the cortex. Scale bar = 100  $\mu$ m. The data are presented as mean  $\pm$  S.D. (n = 3-4). \*\* $P$  < 0.01 compared with the non-DM control group. # $P$  < 0.05 compared with the DM control group.

(A)



(B)

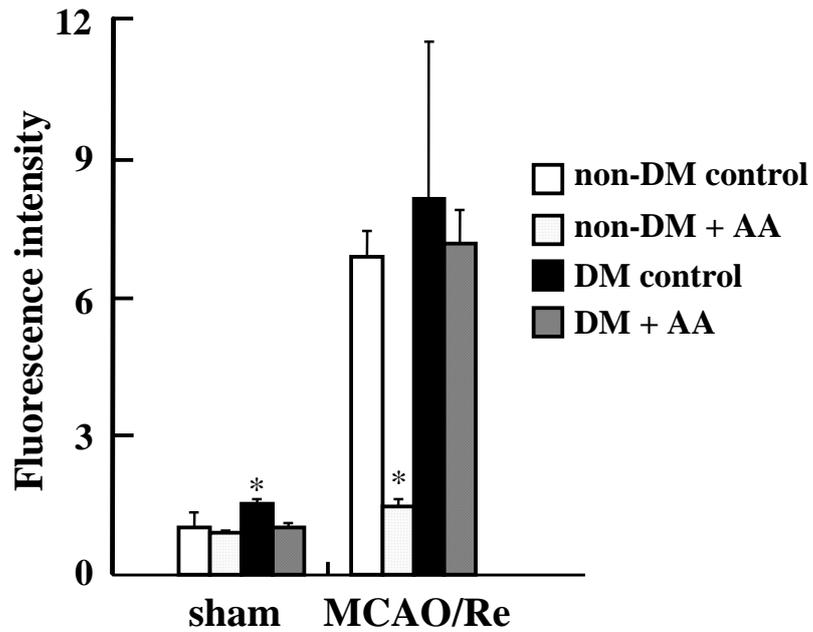
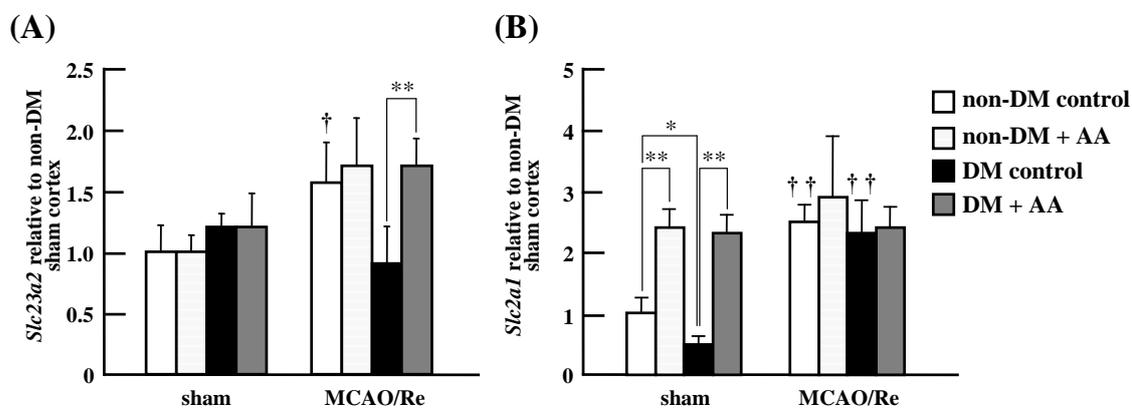


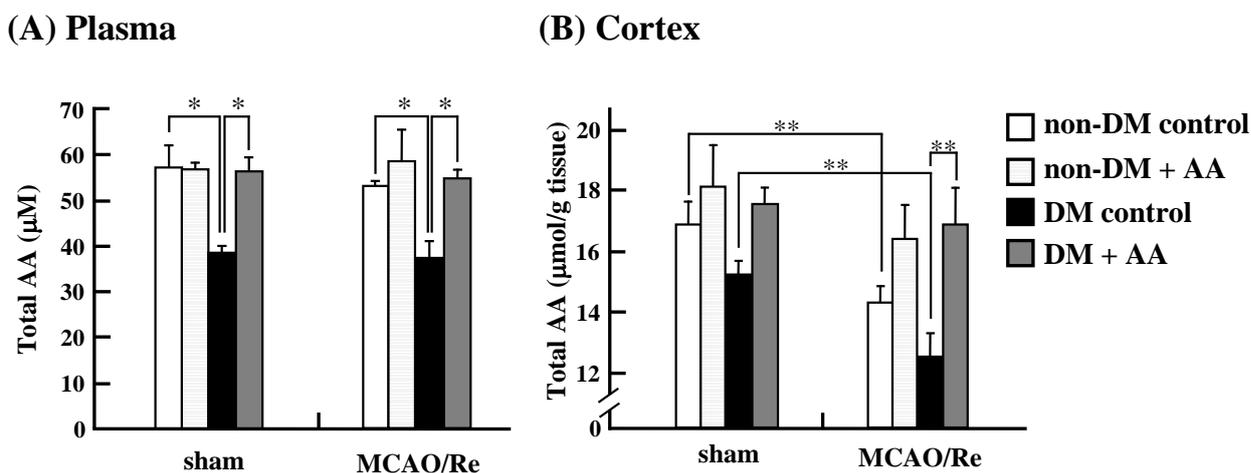
Fig. 4-12 Effects of AA supplementation on MPO expression after MCAO/Re in the brain of non-DM and DM rats.

(A) Representative photographs of leukocytic infiltrate by MPO staining in the cortex coronal sections of non-DM and DM rats. (B) Quantitative analysis of myeloperoxidase fluorescence intensity in the cortex. Scale bar = 100  $\mu$ m. The data are presented as mean  $\pm$  S.D. (n = 4). \* $P < 0.05$  compared with the non-DM control group.



**Fig. 4-13** Effects of AA supplementation on SVCT2 and GLUT1 mRNA expression in the ischemic penumbral cortex of non-DM and DM rats.

Expression levels of SVCT2 mRNA (*Slc23a2*) (A) and GLUT1 mRNA (*Slc2a1*) (B) were assessed using real-time PCR analysis of the penumbral cortex of non-DM and DM rats after MCAO/Re. The data are presented as mean  $\pm$  S.D. (n = 3–6).  $\dagger, \dagger\dagger P < 0.05, 0.01$  compared with the respective sham-operated controls.  $*, ** P < 0.05, 0.01$ .



**Fig. 4-14** Effects of AA supplementation on levels of total AA (AA+DHA) in the plasma and cortex of non-DM and DM rats.

Total AA (AA+DHA) levels in the plasma (A) and cortex (B) were measured in non-DM and DM rats after MCAO/Re. The data are presented as mean  $\pm$  SD (n = 3–6).  $*, ** P < 0.05, 0.01$ .

AA は、2 種類のトランスポーターを介して血液脳関門を通過し、脳への移行が制御されている。第 1 に、SVCT2 (sodium-coupled ascorbic acid transporter 2) は、脈絡叢およびニューロンに発現し、還元型の AA を輸送する。SVCT2 は、虚血/再灌流処置によって発現が増加し、AA の脳への移行を促進することが報告され [82]、AA 輸送は主に SVCT2 によるものと考えられている。第 2 に、GLUT1 (glucose transporter 1) は、血液脳関門およびニューロンに発現し、グルコースの輸送だけでなく酸化型 AA のデヒドロアスコルビン酸 (DHA) の輸送にも関与している。GLUT1 は、低酸素時に誘導される転写因子の HIF (hypoxia inducible factor) によって、発現が制御される [83]。このように、両トランスポーターは、虚血と密接に関与していることが知られているものの糖尿病態での発現についての詳細は明らかではない。そこで、SVCT2 (*Slc23a2*) および GLUT1 (*Slc2a1*) の遺伝子発現を解析した。その結果、SVCT2 (*Slc23a2*) は non-DM および DM の両群とも AA 投与に関わらず平常時での発現に差は認められなかった。一方、虚血/再灌流処置によって、non-DM 群では AA 投与に関わらず SVCT2 (*Slc23a2*) の発現が上昇したのに対して、DM 群では発現増加は見られず、AA 投与群においてのみ発現が増加した。GLUT1 (*Slc2a1*) の発現は、平常時の non-DM に比べて DM で抑制傾向であったが、AA 投与によって両群とも 2 倍程度上昇した。また、虚血/再灌流処置後では、non-DM および DM 群ともに GLUT1 (*Slc2a1*) 発現が顕著に上昇したが AA 投与による影響は認められなかった (Fig. 4-13)。

虚血初期では、脳組織のアスコルビン酸や GSH (glutathione) が枯渇するとの報告から [84, 85]、ミトコンドリア障害などによる過剰な ROS から組織を保護する上で AA の補充は重要である。先行研究において、糖尿病による高血糖状態では、D-グルコースの競合阻害により血液脳関門の GLUT1 発現が抑制されるとの報告 [86] は、今回の脳皮質における結果を支持するものであった。また、Seno らのヒト臍静脈内皮細胞を用いた報告によると、TNF- $\alpha$  や IL-1 $\beta$  が SVCT2 を抑制し、AA の輸送に影響を及ぼすことから [87]、虚血/再灌流後の糖尿病態において SVCT2 の発現減少には炎症の影響が深く関与しているものと考えられた。次いで、血漿中および脳組織内における AA 含量を測定した結果、血漿中では DM 群の sham および虚血/再灌流処置後の AA 量が減少し、AA 投与群で非糖尿病態レベルにまで改善していた。一方、脳組織では、non-DM の AA 投与群では、sham において AA 量が上昇した。また、虚血/再灌流処置によって non-DM と DM の両群で AA 量が低下したのに対して、AA 投与群では sham 群の状態まで AA 量が増加した (Fig. 4-14)。

以上の結果から、糖尿病態では、虚血/再灌流後に SVCT2 の発現増加が認められず、酸化ストレスによる血中の AA 枯渇を招いている可能性とともに、酸化型 AA の輸送に関与する GLUT1 の発現が平常時から減少傾向にあることから、これら 2 点が脳障害悪化の要因となっていると考えられた。これに対して、DM ラットへの AA 投与によって、non-DM 群と同レベルにまでトランスポーターの発現が改善していることから、AA の脳への移行量が高まった可能性が示唆された。従って、AA の脳への移行の増加によって脳の虚血/再灌流による過剰な ROS の産生を抑制し、過酸化脂質産生の抑制などが結果的に脳保護に寄与している

可能性が考えられた。

### 第3節 虚血性脳障害における霊芝菌糸体培養培地抽出物による保護作用メカニズム

第1節において、MAKがDMで上昇した体内酸化ストレスをnon-DMのレベルにまで低下させ、脳においては抗酸化酵素活性の低下や過酸化脂質の増加を顕著に抑制することを示した。しかし、MAKが虚血性脳障害に対して保護効果を有する結果を得ているものの、その詳細なメカニズムは明らかではない。

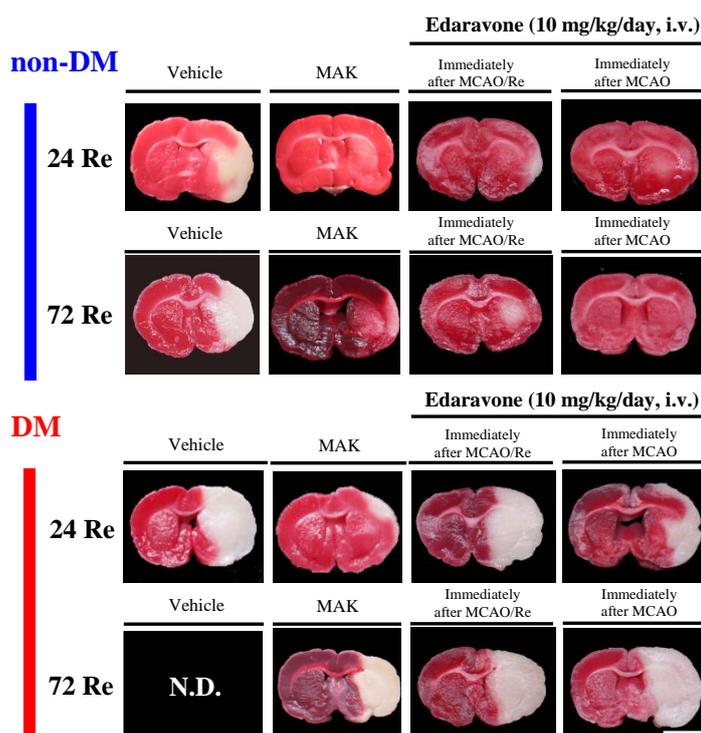


Fig. 4-15 Effects of MAK on infarction induced by cerebral ischemia in rats.

Representative data of TTC staining from the rats of the non-DM group, treated edaravone or MAK non-DM or DM group with MCAO with reperfusion (MCAO/Re). MAK (1 g/kg body weight) was administrated once daily for 2 weeks by p.o. Rats were administrated with MAK before MCAO/Re and sacrificed 1 and 3 days later. Scale bar = 5 mm. N.D.; not determined.

既に、虚血性脳障害では、虚血中心部位に生じる急性期の障害とともに 48 時間以降に徐々にペナンプラに障害が現れる遅延性神経細胞死が報告されている。これまで MAK による脳保護効果の検討は、虚血/再灌流 24 時間後であることから、今回 72 時間後の効果についても追加して評価することにし、エダラボンの効果と比較検討した。その結果、non-DM のエダラボン投与群では、虚血直後および虚血/再灌流直後に単回投与した 24 時間後の場合と、1 日 1 回 72 時間後まで反復投与した群において、梗塞巣の顕著な改善が認められた。一方、non-DM の MAK 投与群では、虚血/再灌流 24 時間後で顕著な改善が見られ、72 時間後においても 24 時間後と比較して梗塞巣は若干増加したものの vehicle 群と比べて減少した。これに対して DM では、non-DM 群で認められたようなエダラボンの効果は全く観察されず、MCAO 直後の投与では再灌流 24 時間後において若干の抑制傾向があったものの、72 時間後では全く改善が認められなかった。一方、DM の MAK 投与群では、虚血/再灌流 24 時間後においても顕著な改善が見られたが、再灌流 72 時間後においては梗塞巣の拡大が認められた。因みに、vehicle 群では再灌流 72 時間後までラットが生存しなかったのに対し、MAK 投与群では梗塞巣の減少は認められなかったものの約 70% (6 匹中 4 匹) の個体が生存した (Fig. 4-15)。

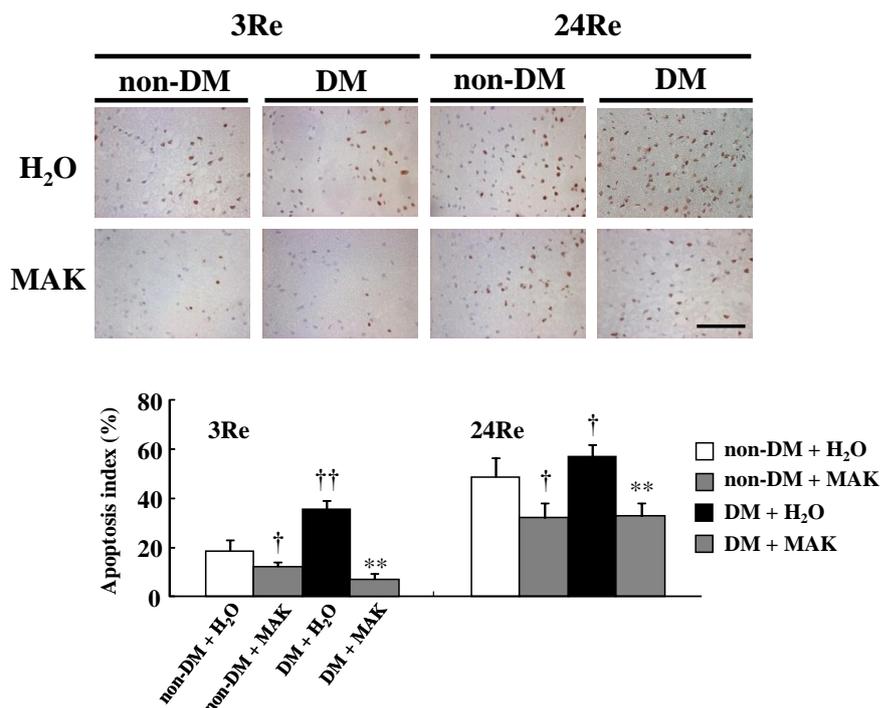


Fig. 4-16 Effects of MAK on neuronal apoptosis induced by cerebral ischemia in rats.

Representative photographs of apoptotic cells detected by TUNEL staining in the cortex coronal sections of non-DM and DM rats (A). Quantitative analysis of TUNEL-positive cells index in the cortex (B). Scale bar = 100  $\mu$ m. The data are presented as mean  $\pm$  S.D. (n = 4). †, ††, †††  $P$  < 0.05, 0.01 for statistical significance compared to the distilled water (H<sub>2</sub>O)-administered non-DM group. \* $P$  < 0.01 compared to the H<sub>2</sub>O-administered DM group.

虚血性脳障害の悪化には酸化ストレスに伴う炎症による影響も大きく関与している。これまでの結果から、DM 群の脳において炎症がすでに惹起されている可能性が示唆されていることから、これら炎症の制御も細胞死抑制に重要であると考えられる。そこで、虚血/再灌流処置により誘発された脳のアポトーシスに対する MAK の効果を、TUNEL 染色法により、また、炎症関連因子の発現を免疫組織染色法を用いて検討した。その結果、皮質ペナンプラの TUNEL 陽性細胞は、non-DM 群と比較して DM 群では再灌流 3 時間から有意に増加した。これに対して、non-DM および DM の MAK 投与群では、陽性細胞数が有意に減少した (Fig. 4-16)。

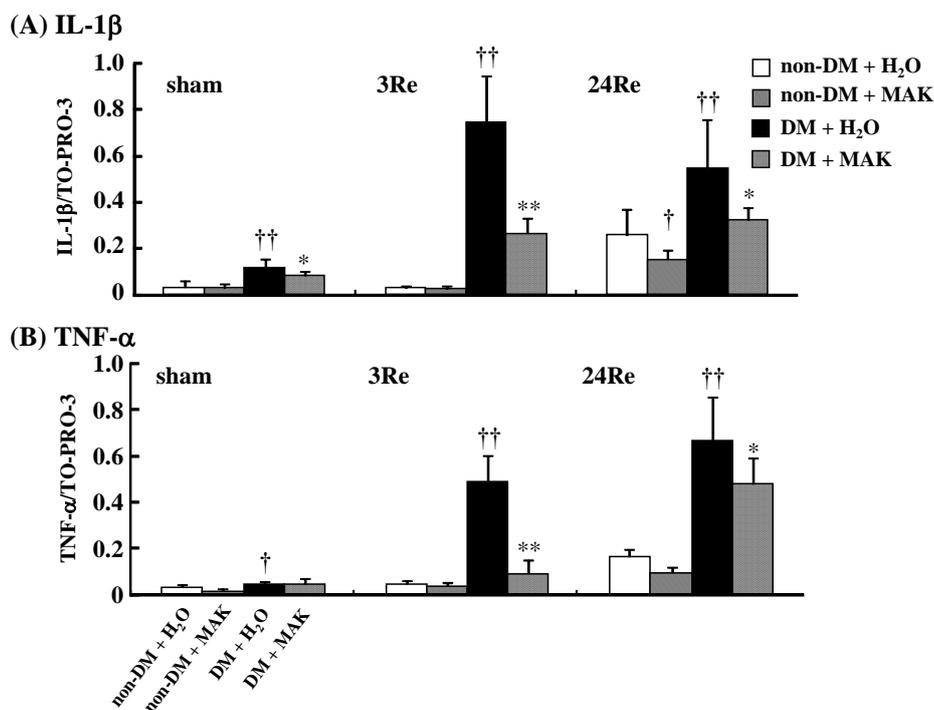


Fig. 4-17 Effects of MAK on expression of inflammatory cytokines in the penumbral cortex after cerebral ischemia in non-DM and DM rats.

Quantitative analysis of IL-1 $\beta$  (A) and TNF- $\alpha$  (B) fluorescence intensity in the cortex. The data are presented as mean  $\pm$  S.D. (n = 4).  $\dagger\dagger\dagger P < 0.05, 0.01$  for statistical significance compared to the distilled water (H<sub>2</sub>O)-administered non-DM group.  $***P < 0.05, 0.01$  compared to the H<sub>2</sub>O-administered DM group.

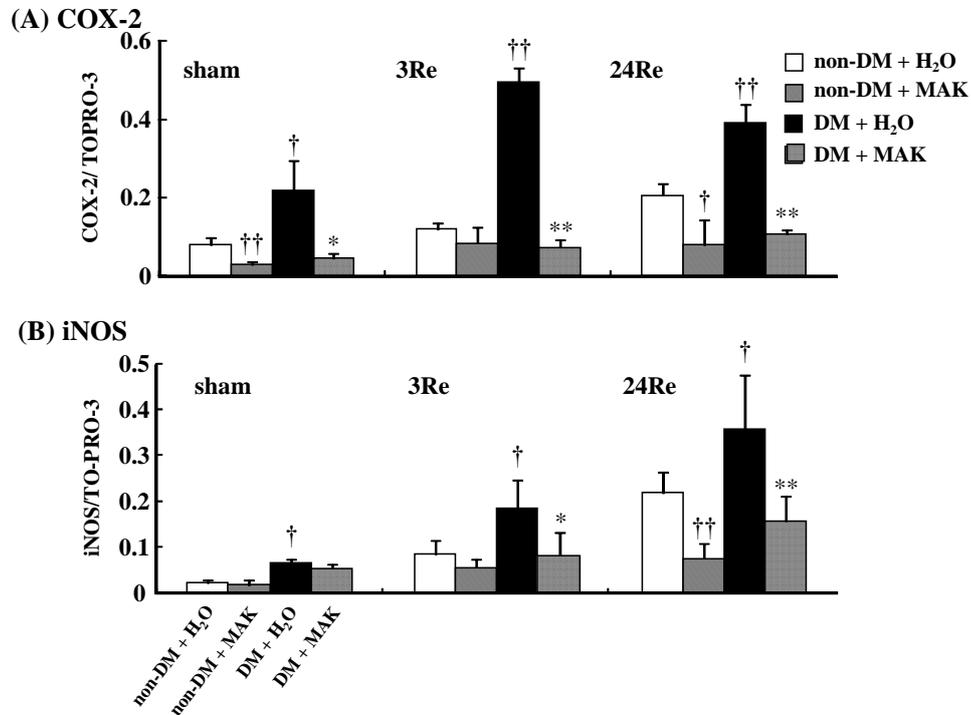


Fig. 4-18 Effects of MAK on expression of inflammatory factors in the penumbral cortex after cerebral ischemia in non-DM and DM rats.

Quantitative analysis of COX-2 (A) and iNOS (B) fluorescence intensity in the cortex. The data are presented as mean  $\pm$  S.D. (n = 4).  $\dagger, \dagger\dagger, \dagger\dagger\dagger P < 0.05, 0.01$  for statistical significance compared to the distilled water (H<sub>2</sub>O)-administered non-DM group.  $***P < 0.05, 0.01$  compared to the H<sub>2</sub>O-administered DM group.

続いて、虚血/再灌流処置後の炎症早期に発現する IL-1 $\beta$ および TNF- $\alpha$ 産生に対する MAK の影響を免疫組織染色により評価した (Fig. 4-17)。その結果、遺伝子の発現と相関して、DM 群の sham ですでに IL-1 $\beta$ は約 3.6 倍、TNF- $\alpha$ は約 1.4 倍と増加し、再灌流 3 時間で有意に増大した (IL-1 $\beta$  : non-DM ;  $0.03 \pm 0.01$ , DM ;  $0.75 \pm 0.20$ , TNF- $\alpha$  : non-DM ;  $0.04 \pm 0.02$ , DM ;  $0.49 \pm 0.11$ )。これに対して、MAK 投与群では、IL-1 $\beta$ および TNF- $\alpha$ の発現が再灌流 3 時間 (IL-1 $\beta$  : DM ;  $0.27 \pm 0.07$ , TNF- $\alpha$  : DM ;  $0.09 \pm 0.06$ ) から有意に抑制された。次に、炎症性サイトカインによって誘導される COX-2 および iNOS の発現を同様に評価した (Fig. 4-18)。

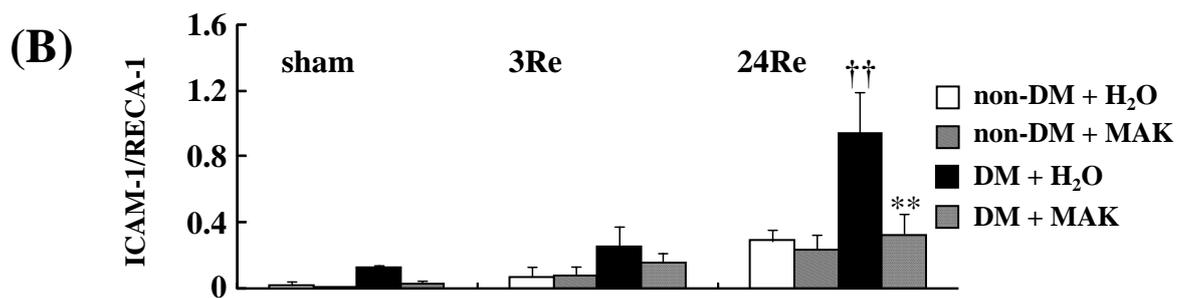
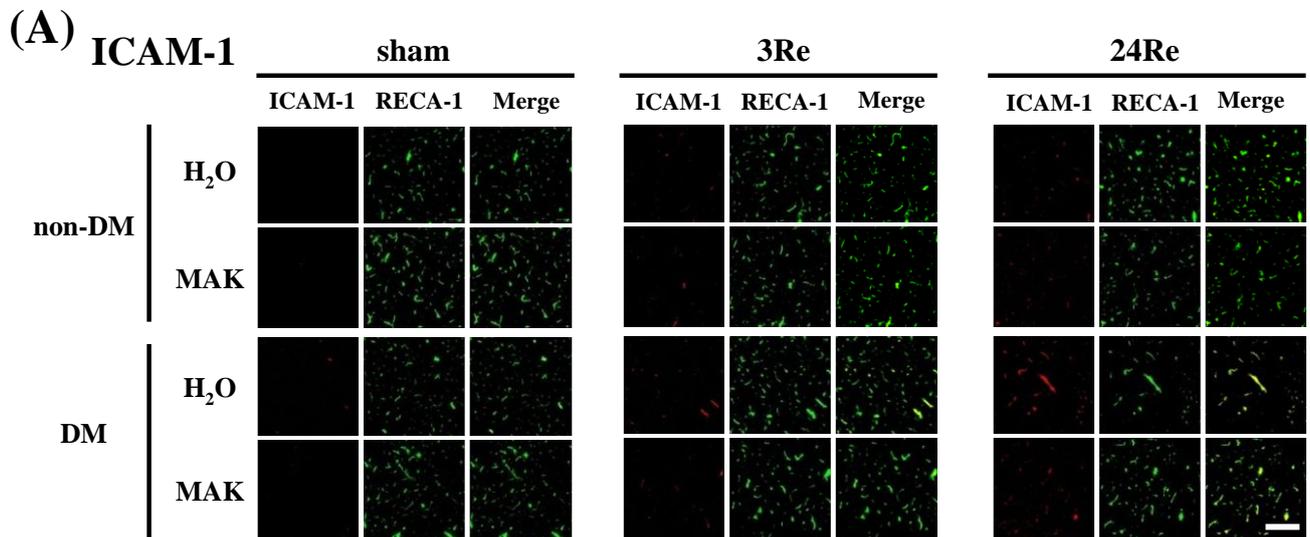


Fig. 4-19 Effects of MAK on expression of ICAM-1 in the penumbral cortex after cerebral ischemia in non-DM and DM rats.

Representative photographs of ICAM-1 immunostaining (red fluorescence) and RECA-1 (green fluorescence) in the cortex coronal sections of non-DM and DM rats (A). Quantitative analysis of ICAM-1 fluorescence intensity in the cortex (B). Scale bar = 250  $\mu$ m. The data are presented as mean  $\pm$  S.D. (n = 4).  $^{\dagger\dagger}P < 0.01$  for statistical significance compared to the distilled water (H<sub>2</sub>O)-administered non-DM group.  $^{**}P < 0.01$  compared to the H<sub>2</sub>O-administered DM group.

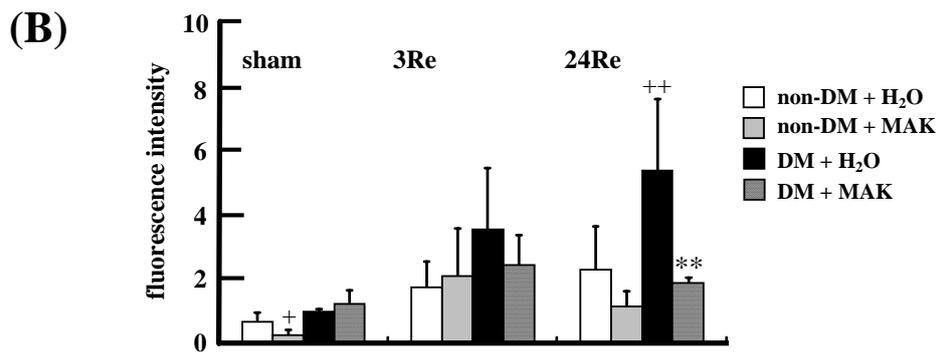
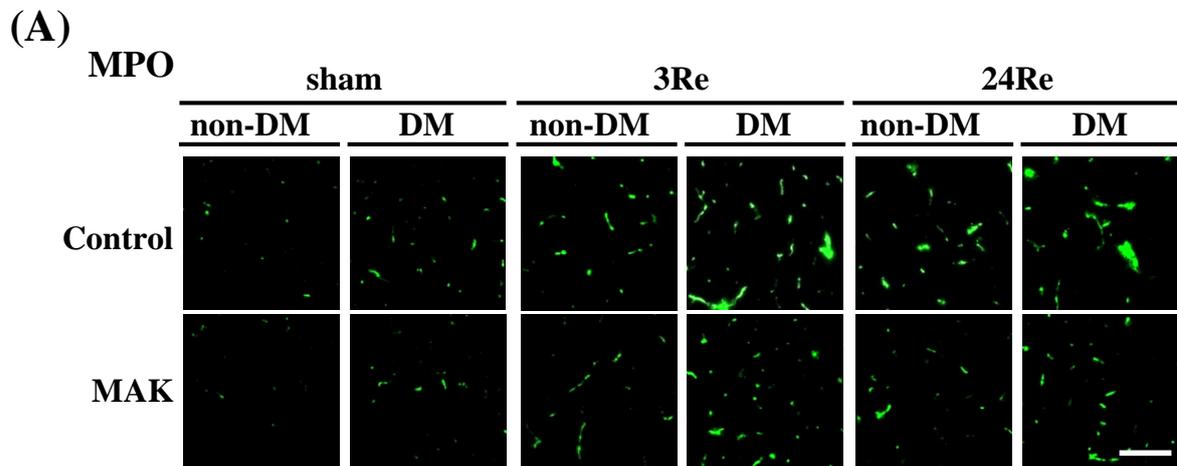


Fig. 4-20 Effects of MAK on production of MPO after cerebral ischemia in non-DM and DM rat brains.

Representative photographs of leukocytic infiltrate by MPO staining in the cortex coronal sections of non-DM and DM rats (A). Quantitative analysis of MPO fluorescence intensity in the cortex (B). Scale bar = 100  $\mu$ m. The data are presented as mean  $\pm$  S.D. (n = 4).  $^{+}$ ,  $^{++}$   $P < 0.05$ , 0.01 for statistical significance compared to the distilled water (H<sub>2</sub>O)-administered non-DM group.  $^{**}$   $P < 0.01$  compared to the H<sub>2</sub>O-administered DM group.

COX-2 は、sham (non-DM ;  $0.08 \pm 0.02$ , DM ;  $0.13 \pm 0.08$ )、再灌流 3 時間 (non-DM ;  $0.12 \pm 0.01$ , DM ;  $0.50 \pm 0.04$ ) および 24 時間 (non-DM ;  $0.27 \pm 0.03$ , DM ;  $0.36 \pm 0.05$ ) のいずれにおいても、DM 群でその発現が顕著に増大した。これに対して、MAK 投与群では、COX-2 の発現が有意に抑制された (sham: DM ;  $0.05 \pm 0.01$ , 3Re: DM ;  $0.08 \pm 0.02$ , 24Re: DM ;  $0.11 \pm 0.01$ )。さらに、iNOS について non-DM および DM 群で虚血/再灌流による経時的な発現が認められ、再灌流 24 時間においては non-DM ( $0.22 \pm 0.05$ ) と比較して DM ( $0.36 \pm 0.12$ ) で有意に増大した。これに対して、MAK 投与群 (non-DM;  $0.10 \pm 0.03$ , DM;  $0.16 \pm 0.05$ ) では、その発現が有意に抑制された。続いて、血管内皮において誘導される ICAM-1 は、non-DM および DM 群で虚血/再灌流後経時的に増加した。また、non-DM と比較して、DM の sham 群 (non-DM ;  $0.02 \pm 0.03$ , DM ;  $0.12 \pm 0.02$ ) および再灌流 24 時間 (non-DM ;  $0.29 \pm 0.07$ , DM ;  $0.94 \pm 0.24$ ) で顕著に発現が増大したのに対して、DM の MAK 群 ( $0.32 \pm 0.11$ ) ではその発現が有意に抑制された。しかし、non-DM の MAK 群において発現に変化は認められなかった (Fig. 4-19)。

さらに、虚血/再灌流処置により生じた酸化ストレスによるミクログリアの活性化状態を検討するため、フリーラジカルで活性化されるミエロペルオキシダーゼ (MPO) について評価した。その結果、虚血/再灌流により MPO 活性は増大し、DM においては 3 時間および 24 時間後で、non-DM と比較して増大した。これに対して、MAK 投与群では、虚血/再灌流処置により増大した MPO 活性が 24 時間後に有意に抑制された (Fig. 4-20)。

以上の結果から、MAK の 2 週間経口投与は、虚血/再灌流によって惹起される炎症反応を軽減し、細胞死を抑制することで脳保護効果を示すことが考えられた。

#### 第 4 節 霊芝菌糸体培養培地抽出物による HMGB1 の放出抑制作用の検討 (*in vitro*)

第 2 章 第 1 節において、DM ラットの虚血性脳障害悪化の一因に、細胞内 HMGB1 の局在変化が大きく関与していることが示唆された。その機序として、本来であれば神経細胞の核内に存在する HMGB1 が DM 群で細胞質に多く認められ、虚血早期に速やかに細胞外に放出されることで周辺細胞に対して炎症・細胞死を誘導すると考えるものである。ところで、先行研究から MAK は、脳細胞に対してアポトーシスだけでなく壊死に対しても抑制作用を示す可能性が示されていることから、MAK の脳保護効果と HMGB1 の細胞内挙動との関連を明らかにするため、第 4 節では、神経様培養細胞の PC12 細胞に対して、様々な刺激による HMGB1 の挙動に与える MAK の影響について検討することにした。

まず、PC12 細胞に  $1 \mu\text{g/mL}$  および  $100 \mu\text{g/mL}$  の MAK を前処置し、続いて擬似的な酸化ストレスとして  $250 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$  で 6 時間処置した後の細胞内の活性酸素種の生成量を測定し

た。その結果、MAKの濃度に依存して細胞の活性酸素種生成を抑制した (Fig. 4-21)。本章第1節において、MAKがDMラットの脳組織の酸化を抑制し、過酸化脂質量を低下させたことから、MAKが細胞内のROS産生を抑制すると考えられた。

続いて、虚血性脳障害時の炎症メディエーターとしてのHMGB1の細胞内挙動に与えるMAKの影響を評価した。擬似酸化ストレスのH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>処理細胞では、細胞核内から細胞質へのHMGB1の移行に加えて細胞外への放出が認められたのに対して、MAKを前処置した細胞では1 µg/mLの低濃度においてHMGB1の放出が抑制された (Fig. 4-22)。また、TNF-αやrecombinant HMGB1 (rHMGB1) で処置した細胞においても同様にHMGB1の移行・放出が確認できたが、その抑制作用は高濃度のMAK添加によって認められた (Figs. 4-22-4-24)。これらの結果は、酸化ストレス等による炎症の開始にMAKが効果的に作用する一方で、虚血障害後など炎症のプロセスがひとたび開始し、その過程で放出されたTNF-αやHMGB1に対しては十分効果を示さないことを示唆していた。

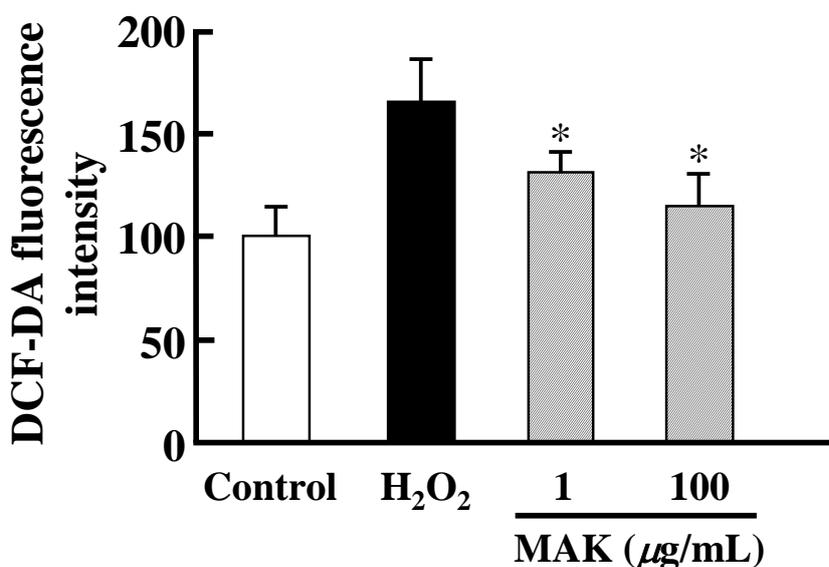
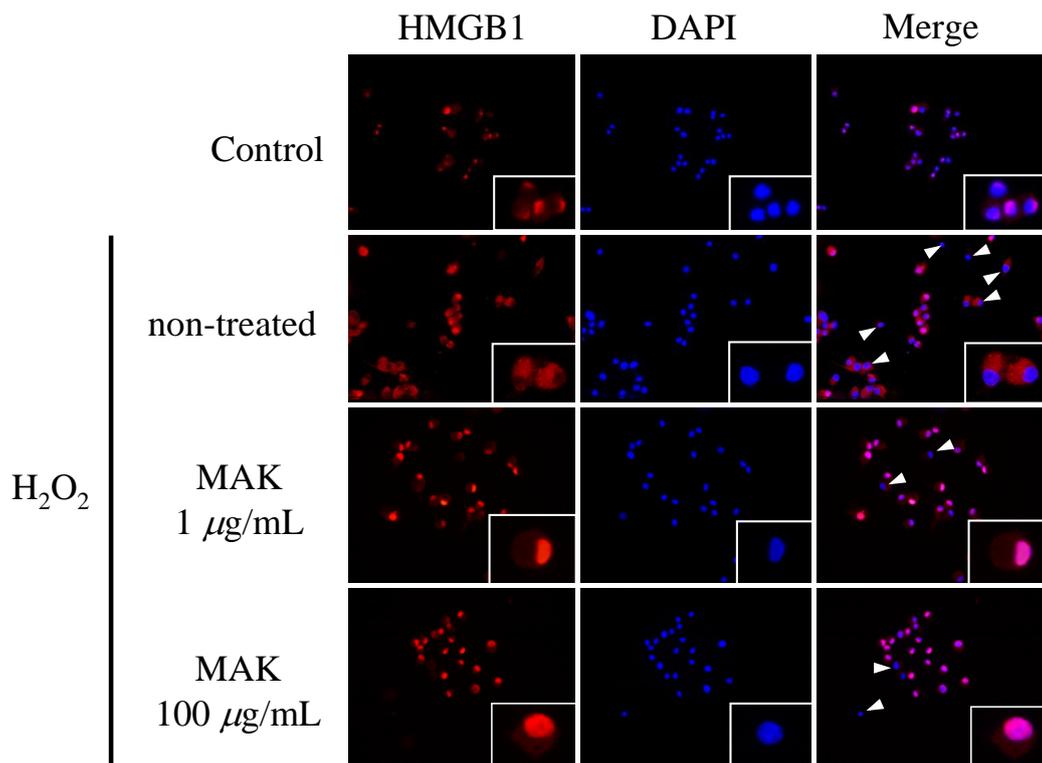


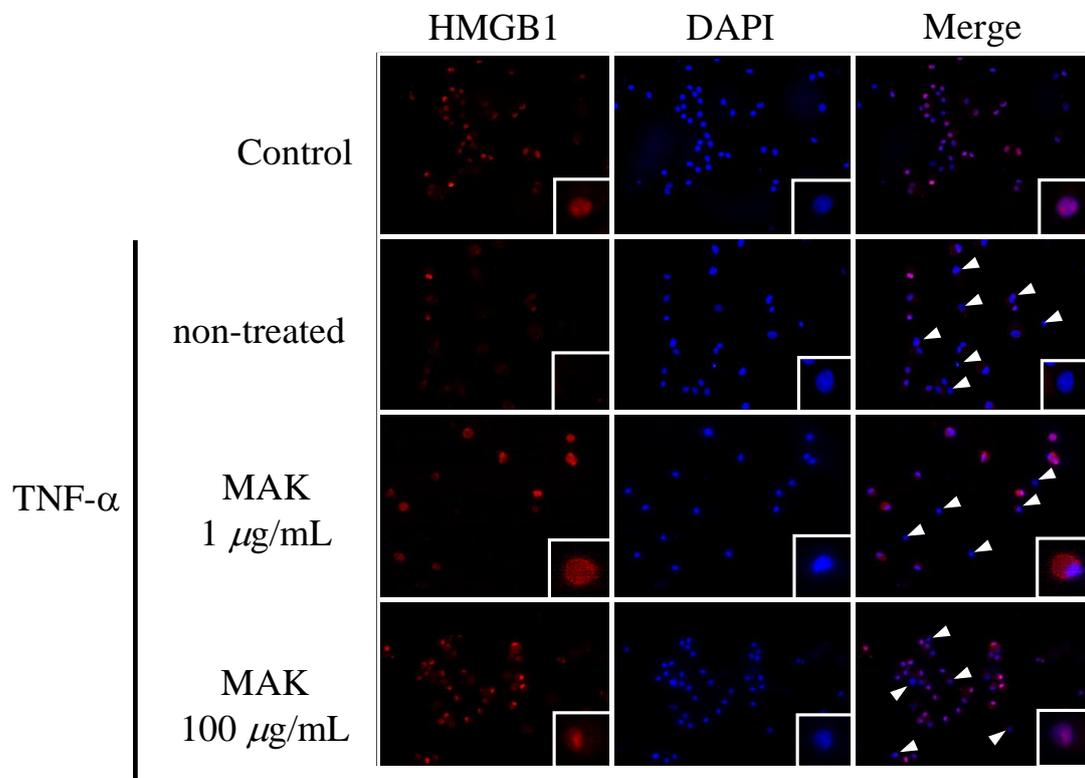
Fig. 4-21 Effects of MAK on production of DCF-DA after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment in PC12 cell.

PC12 cells ( $1 \times 10^5$  cells/well) were preincubated with MAK at the indicated doses for 1 h and then treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 6 h. Product of ROS were determined by DCFH-DA stain. The open column shows the control group and the closed column shows the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group and the hatched column shows the MAK group. Data are means  $\pm$  S.D. (n = 3-4). \* $P < 0.01$  for statistically significant compared to the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group.



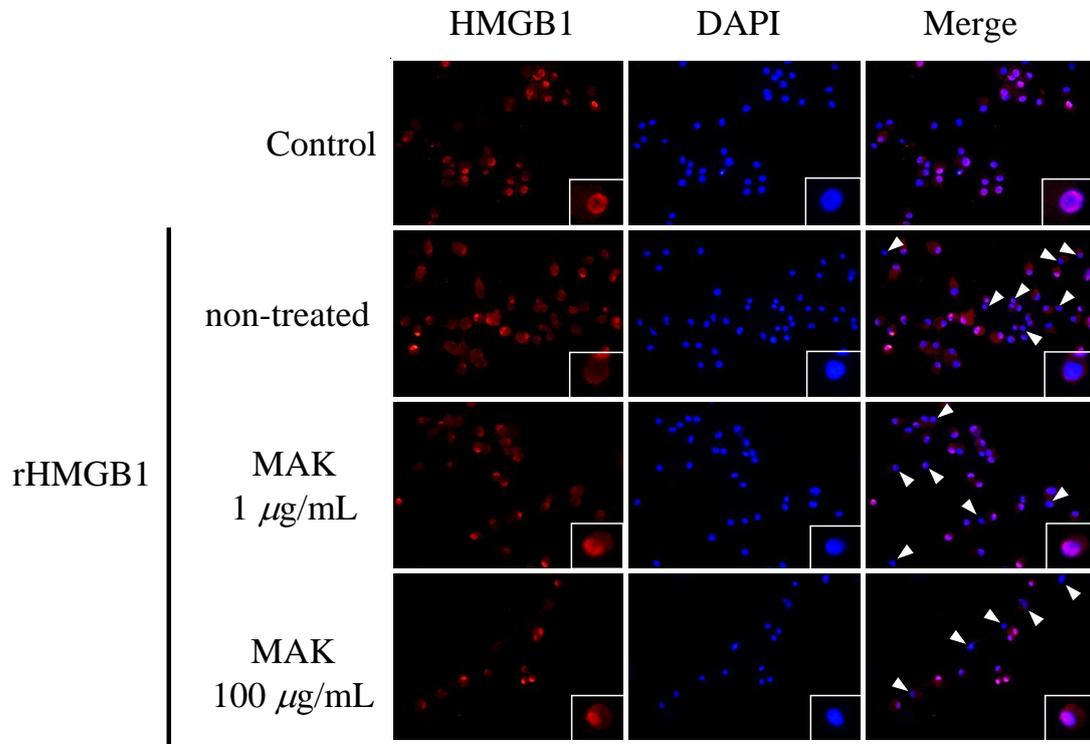
*Fig. 4-22* Effects of MAK on translocation of HMGB1 after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment in PC12 cell.

PC12 cells were preincubated with MAK at the indicated doses for 1 h and then treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 6 h. HMGB1 localization was determined by double fluorescent staining with anti-HMGB1 antibody (red) and DAPI (blue). Arrowheads, HMGB1 in cytoplasm.



*Fig. 4-23* Effects of MAK on translocation of HMGB1 after TNF- $\alpha$  treatment in PC12 cell.

PC12 cells were preincubated with MAK at the indicated doses for 1 h and then treated with TNF- $\alpha$  for 16 h. HMGB1 localization was determined by double fluorescent staining with anti-HMGB1 antibody (red) and DAPI (blue). Arrowheads, HMGB1 in cytoplasm.



*Fig. 4-24* Effects of MAK on translocation of HMGB1 after rHMGB1 treatment in PC12 cell.

PC12 cells were preincubated with MAK at the indicated doses for 1 h and then treated with rHMGB1 for 24 h. HMGB1 localization was determined by double fluorescent staining with anti-HMGB1 antibody (red) and DAPI (blue). Arrowheads, HMGB1 in cytoplasm.

## 第5節 靈芝菌糸体培養培地抽出物による虚血後の HMGB1 の放出抑制作用の検討 (*in vivo*)

前節の培養細胞を用いた実験から、MAKが細胞外の酸化ストレスに呼応して細胞内のROS生成を抑制するとともにHMGB1放出を低濃度で抑制することが明らかになった。一方、TNF- $\alpha$ やrHMGB1の場合では、HMGB1の細胞内分布の変動を高濃度のMAKによって抑制した。そこで、本節ではDMラットの脳虚血併発時の障害悪化に関わるネクローシスに注目し、この経路の引き金として考えられるHMGB1をマーカーとしてその挙動を調査することで、MAKの脳保護効果との関連を検討することにした。

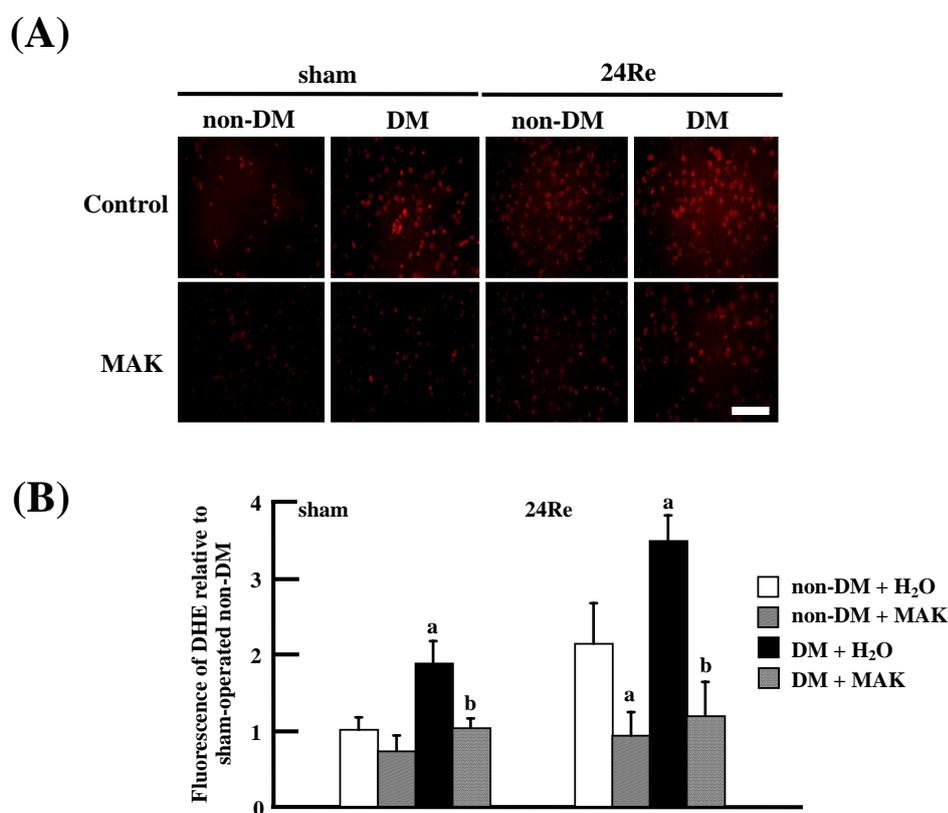
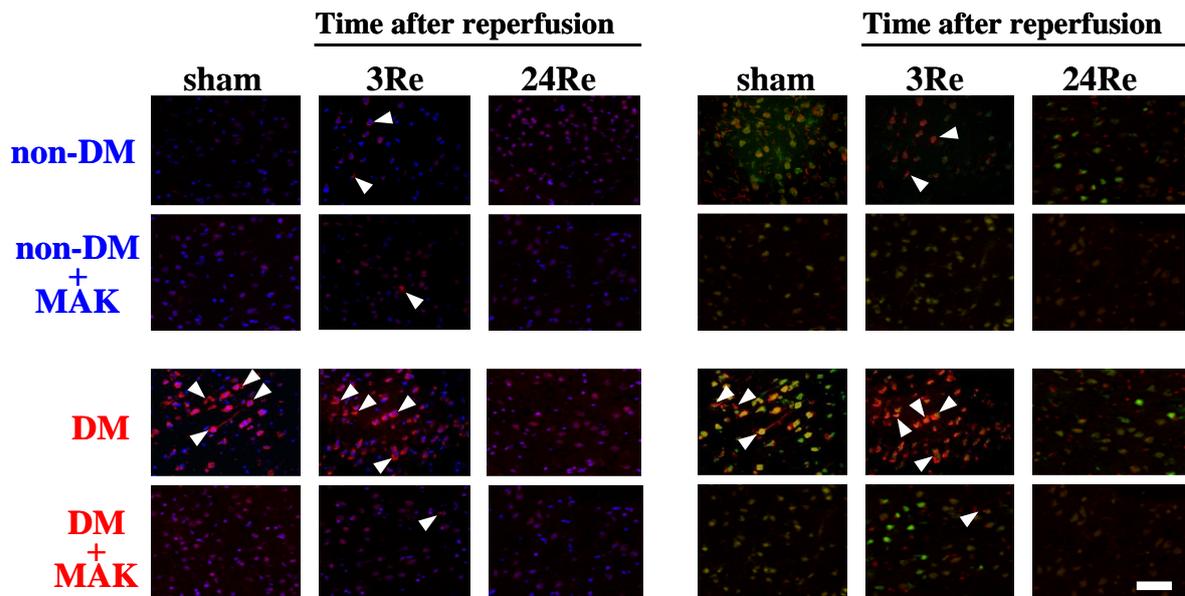


Fig. 4-25 Effects of MAK on production of superoxide after cerebral ischemia in non-DM and DM rat brains.

Rats were administered with MAK (1 g/kg body weight, once daily for 2 weeks by p.o.) before MCAO/Re and sacrificed 24 h later. Representative photographs of superoxide production detected by DHE staining in the cortex coronal sections of the non-DM and DM rats (A). Quantitative analysis of DHE fluorescence intensity in the cortex (B). Scale bar = 100  $\mu$ m. The data are presented as mean  $\pm$  S.D. (n = 4). <sup>a</sup>*P* < 0.01 for statistical significance compared to the distilled water (H<sub>2</sub>O)-administered non-DM group. <sup>b</sup>*P* < 0.01 compared to the H<sub>2</sub>O-administered DM group.

**(A) HMGB1 / DAPI**

**(B) HMGB1 / NeuN**



*Fig. 4-26* Effects of MAK against translocation of HMGB1 after cerebral ischemia in non-DM and DM rat brains.

Rats were administered with MAK (1 g/kg body weight, once daily for 2 weeks by p.o.) before MCAO/Re and sacrificed 3 h or 24 h later. Nuclear localization of HMGB-1 expression in neurons from non-DM rat brain and DM rat brain after MCAO/Re. Arrowheads, HMGB1 in cytoplasm. Insets are higher magnification micrographs of the cells indicated by arrowheads.

まず、虚血/再灌流後の脳組織内でのスーパーオキシド産生に対して、MAKが与える影響をDHE染色により解析した。その結果、shamのDM群では、すでにスーパーオキシドが約2倍有意に増加していたが、MAK投与によってnon-DM群と同レベルにまで減少した。一方、虚血/再灌流24時間後では、non-DMとDM群の両群ともにスーパーオキシドの産生が顕著に増加したが、MAK投与によって両群ともnon-DM群のshamと同程度にまで減少した (Fig. 4-25)。

DM の脳組織では、慢性的な酸化ストレス状態であり、第 1 章 第 1 節で示したように TBARS 値の増加にこの現象が起因しているものと考えられた。また、DM では虚血/再灌流処置によってスーパーオキシドの産生がさらに増加したが、MAK 投与によってその産生が顕著に抑制されたことから、MAK は慢性的な酸化ストレスのみならず虚血/再灌流による酸化ストレスを軽減すると考えられた。

虚血/再灌流後の HMGB1 の細胞内挙動に及ぼす MAK の作用を、脳皮質ペナンプラの冠状切片を用いた免疫蛍光染色により解析した。その結果、non-DM 群では、虚血/再灌流処置 24 時間後において神経細胞の HMGB1 が核内から細胞質へ移行することが認められたが、2 週間の MAK 投与ラットにおいては、この現象はほとんど確認されなかった。一方、DM 群では虚血/再灌流処置前から HMGB1 の細胞質移行が認められ、再灌流 3 時間後には相当量が移行したのに対して、MAK 投与群では HMGB1 の細胞外放出のみならず細胞質への移行も顕著に抑制された (Figs. 4-26 & 4-27)。これまでの実験から、虚血/再灌流後には、様々な炎症関連因子の産生が亢進することが明らかになっている。そこで、多くの因子の発現を司る NF-κB の挙動を調査したところ、non-DM 群では虚血により経時的な NF-κB の核移行が認められたのに対して、DM 群では、sham ですでに NF-κB の核内移行が観察され、虚血処置によりさらにその移行が促進された。一方、MAK 投与により核内移行が有意に抑制された (Fig. 4-28)。

以上の結果から、MAK は虚血/再灌流後の ROS 産生を抑制して炎症メディエーターの HMGB1 による細胞内情報伝達カスケードを遮断して炎症関連因子の発現やシグナル伝達系の活性化を抑制することで脳障害の増悪化を防ぐと考えられる。

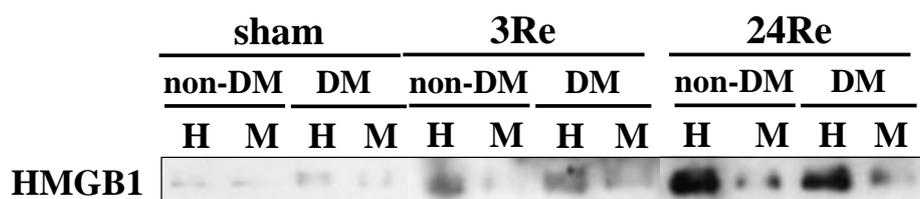


Fig. 4-27 Effects of MAK against release of HMGB1 after cerebral ischemia in non-DM and DM rat brains.

Rats were administered with MAK (1 g/kg body weight, once daily for 2 weeks by p.o.) before MCAO/Re and sacrificed 1 day later. HMGB1 levels in cerebrospinal fluid sample after MCAO/Re non-diabetic and diabetic determined by Western blot analysis. H, H<sub>2</sub>O; M, MAK.

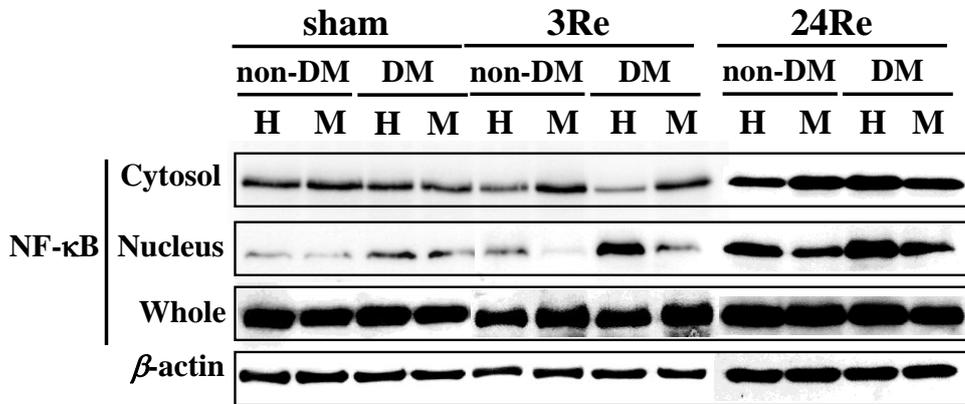


Fig. 4-28 Effects of MAK against NF- $\kappa$ B activation after cerebral ischemia in non-DM and DM rat brains.

Representative Western blot of NF- $\kappa$ B in cytoplasm and nucleus extracts from the non-DM and DM rat cortex. H, H<sub>2</sub>O; M, MAK.

#### 第 6 節 靈芝菌糸体培養培地抽出物とエダラボンの併用効果

本章第 2 節では、虚血/再灌流 24 および 72 時間後の梗塞巣における non-DM および DM におけるエダラボン、MAK それぞれ単独での脳保護効果について評価した。その結果、non-DM 群では、エダラボンが脳梗塞の軽減に有効であることを示す一方で、DM 群ではほとんど効果が認められなかった。これに対して、DM ラットに MAK を 2 週間経口投与した群では、虚血/再灌流 24 時間後の時点では梗塞巣の減少が認められたが、MAK 投与を中断した 72 時間後ではペナンプラ相当領域までもが壊死に陥った。そこで、MAK を 2 週間経口投与したラットに虚血/再灌流後エダラボン治療を実施して、MAK とエダラボンによる併用効果を non-DM と DM ラットで検討した。

実験デザインを Fig. 4-29 に示した。これまでのように non-DM および DM 群を作製し、8 週齢目から 2 週間 MAK (1 g/kg/day) を経口投与した。その後、2 時間の MCAO を行い、再灌流 24 時間および 72 時間後に脳組織を摘出した。一方、併用群は、MCAO 直後または再灌流直後からエダラボン (10 mg/kg/day) を静脈内投与し、24 時間および 72 時間後に評価した。

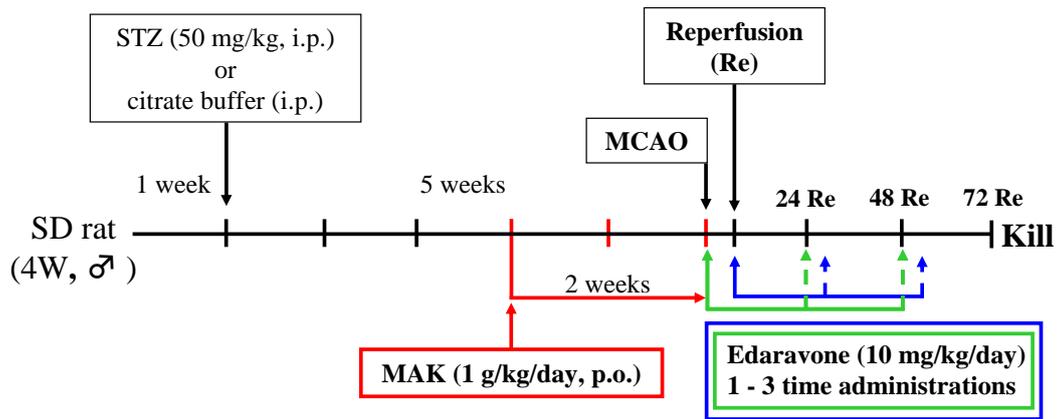


Fig. 4-29 The experimental design.

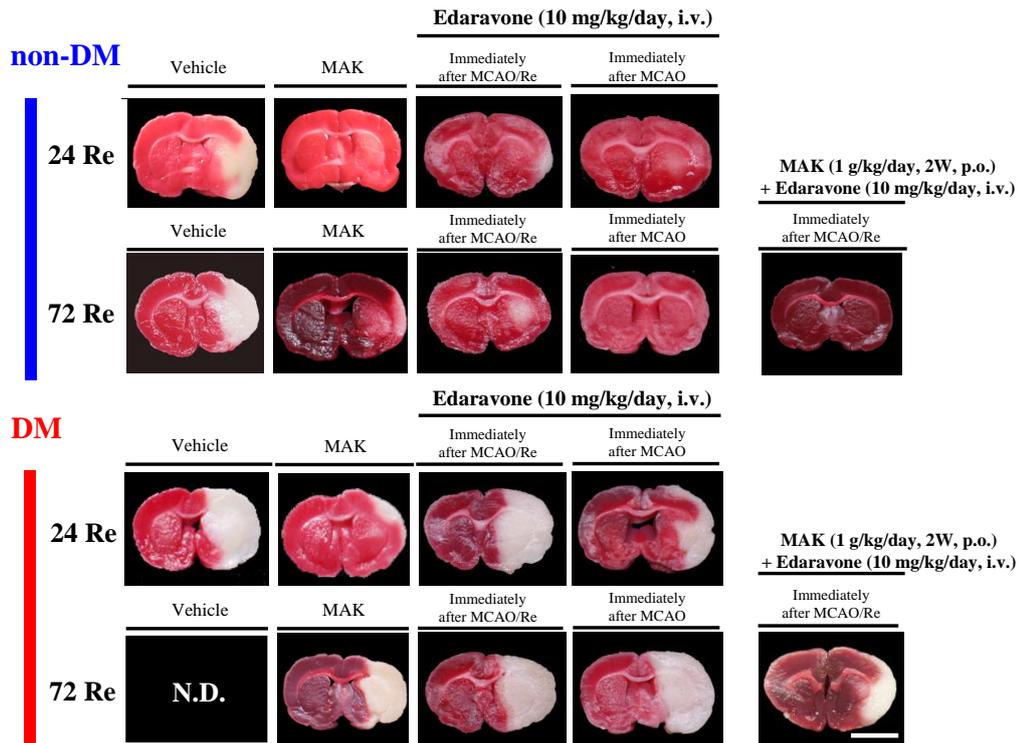


Fig. 4-30 Combined effects of MAK and edaravone administration against cerebral ischemia/reperfusion injury in non-DM and DM rats.

non-DM の MAK およびエダラボンの単独投与群では、虚血/再灌流 24 時間後で顕著な梗塞巣の改善が見られ、72 時間後においても 24 時間後と比較して梗塞巣は若干増加したものの vehicle 群と比べて梗塞巣の形成が抑制されていた。さらに 2 週間の MAK 投与に加えて MCAO/Re 直後にエダラボンを投与した併用群では、再灌流 72 時間においても梗塞巣はほとんど認められなかった。一方、DM の MCAO 直後のエダラボン投与群では、再灌流 24 時間後において若干の抑制傾向があったものの、72 時間後では全く改善が認められなかった。また、MCAO/Re 直後のエダラボン投与では効果が認められなかった。MAK 投与群では、虚血/再灌流 24 時間後においても顕著な改善が見られたものの、再灌流 72 時間後においては梗塞巣が拡大した。しかし、エダラボンとの併用群では再灌流 72 時間後においても梗塞巣の著しい減少が認められた (Fig. 4-30)。

## 第 7 節 本章の小括

本章では、脳障害の軽減を目的とした食品・食品成分による脳保護効果について検討した。第 1 節では、MAK や AA を一定期間経口投与した DM ラットにおいて、酸化ストレスが軽減するとともに脳障害の顕著な改善効果が示された。これらのことより、MAK や AA の長期摂取は DM ラット脳内の酸化ストレスを軽減し、虚血性脳障害に対する保護効果を示すものと考えられた。特に、虚血初期の脳組織では AA 量が著しく低下することから、ミトコンドリア障害などによる過剰な ROS から組織を保護する上で、AA の供給が必要なものと考えられた。

第 2 節では AA の 2 種類のトランスポーターの発現状況を調査した。その結果、DM では AA 輸送に関わる SVCT2 と GLUT1 の発現量が低下しており、AA 投与によりこれらトランスポーターの発現が改善され、AA の脳への移行量が高まることで虚血/再灌流による過剰な ROS 産生が抑制されたと考えられた。

第 3 節では、MAK の脳保護作用について検討した。先行研究から、MAK 中には非常に多くの抗酸化成分が含まれており、この中でシリンガ酸とバニリン酸に強い抗酸化作用があることが明らかになっている。すでにシリンガ酸が、2 型糖尿病マウスを用いた低酸素脳虚血 (H/I) 処置において脳保護効果を示すことが明らかにされており、今回の 1 型糖尿病ラットにおける脳保護効果に一部シリンガ酸の寄与が考えられる。さらに、虚血/再灌流時に惹起する炎症反応では、脳皮質ペナンプラにおいて TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、COX-2 の発現が増加するとともに MPO 活性が上昇するが、MAK の長期投与によってこれらの発現や活性が著しく抑制されることが明らかとなっている。加えて、糖尿病態群では施術以前から炎症反応が惹起されており、2 週間の MAK 経口投与によって非糖尿病態レベルにまで低下することから、MAK の抗炎症作用が虚血性脳障害に対する脳保護効果の一因となっていることが強く推察された。

さらに、第4節と第5節では、炎症メディエーターとしての HMGB1 の細胞内挙動を指標として、虚血性脳障害に対する MAK の作用メカニズムを検討した。培養細胞を用いた *in vitro* 実験から、MAK が過酸化水素処理により放出される HMGB1 を低下させること、さらに、脳組織を用いた検討から MAK はスーパーオキシド産生を抑制するとともに HMGB1 の放出を低下させて、多くの炎症関連因子の発現に関わる転写因子 NF- $\kappa$ B の活性化を抑制することが明らかになった。以上の結果から、MAK は虚血性脳障害に対して脳保護効果を有し、その作用機序が、障害時に過剰産生される ROS の産生抑制、これに続く HMGB1 の細胞外放出の低下によって炎症性関連因子の発現抑制と細胞死を防ぐと考えられた。

これまでに non-DM ラットによる虚血/再灌流後のエダラボン投与、あるいは2週間の MAK 投与の単独で24時間、および72時間後の脳障害が軽減されることが明らかになっている。これに対して、DM ラットにおいては、これら単独による脳障害の改善効果が極めて低いことから、第6節では、2週間の MAK 経口投与後のラットを用いて MCAO/Re 直後にエダラボンを投与する併用の脳保護効果を判定した。その結果、併用では、再灌流72時間の梗塞巣が著しく減少したことから、薬剤単独では効果を示さない条件下でも、抗酸化能を有する食品をあらかじめ摂取することによって、脳障害を軽減できる可能性が示唆された。即ち、食品・食品成分の摂取が単独で虚血性脳障害のリスク低減に有効であると同時に、医薬品との併用を適切に行うことで、これら単独での効果に優る治療実績が得られるものと考えられた。

## 総括

本研究では、糖尿病に一過性脳虚血を併発した際に生じる脳梗塞の増悪機序を明らかにすることを目的とすると共に、その治療・予防に寄与できる機能性食品の評価とその有用性を提起することを目的とした。第1章では、一過性脳虚血時の酸化ストレス状態を評価すると共に、脳細胞内の遺伝子発現についてDNAマイクロアレイ解析による網羅的な解析から、DMに一過性脳虚血を併発した際に生じる脳梗塞の増悪機序を推定した。第2章では、虚血性脳障害における細胞死に注目し、特にネクローシス経路の引き金として考えられているHMGB1を標的分子とし、病態間における基礎的な作用機序について検討した。ところで、脳血管疾患に対する有効な治療法は脳梗塞発症後の4.5時間以内でのt-PAによる血栓溶解療法のみであるが、時間的制約などにより、t-PA適用患者は全脳梗塞患者の3-4%と極めて少ないのが現状である。そこで、第3章ではこれまでの虚血性脳障害悪化のメカニズムに基づいた脳梗塞の治療として炎症に注目し、新規適用を目指した既存の薬剤であるETNによる治療効果を判定した。さらに、第4章では、脳梗塞による障害の悪化のリスク軽減を目的として、代替医療に寄与できる機能性食品の評価とその有用性を提起すると共に食品とエダラボンの併用効果について検討した。

本研究に基づき、以下の諸点を明らかにすることができた。

1. DNAマイクロアレイ法を用いた遺伝子発現の網羅的な解析結果から、虚血/再灌流により炎症や酸化ストレス、アポトーシス経路に関与する遺伝子の発現が時間推移とともに上昇した。さらに、糖尿病態では非糖尿病態ラットに比べてこれら遺伝子の発現変動が再灌流1時間後の早期から顕著に上昇しており、これらの変動が糖尿病態において脳障害を増悪させる一因となっていることが示された。
2. 糖尿病態では、平常時から体内酸化ストレスが上昇し、脳組織では抗酸化酵素の活性低下とともに過酸化脂質が増加した。また、これらの酸化ストレス状態によってすでに炎症反応が惹起されており、更なる虚血/再灌流を刺激として過剰な炎症反応や細胞死が短時間のうちに誘導されたと考えられる。これらの過剰な反応が引き金となり血液脳関門の破綻が誘発され、糖尿病態では脳障害をさらに悪化させるものと考えられた。
3. 糖尿病態では、虚血/再灌流後の早期から急激に細胞死が生じることから、ネクローシス細胞から遊離するHMGB1が早期の炎症反応を惹起すると考えられた。さらに、高血糖状態や、これに伴う酸化ストレスの増加が脳障害の更なる増悪に関与していることが示

唆された。即ち、細胞外 HMGB1 の増加は、虚血性脳障害の悪化要因となり、ペナンブ  
ラにおいて細胞死を誘導するものと推察された。

4. ETN は、虚血性脳障害に対して保護効果を有する可能性が示唆されたものの、その効果の発現は投与方法に大きく左右され、急性期の脳保護薬としての治療には必ずしも有効ではないと考えられた。
5. 糖尿病態の脳組織では、酸化ストレスの亢進による抗酸化酵素活性の低下に伴い、過酸化脂質の過剰な蓄積が認められ、さらに炎症が誘導されていた。この状態での脳虚血/再灌流処置は、脳障害を著しく悪化させた。一方、AA や MAK の 2 週間経口投与は、全身の酸化ストレスや脳の抗酸化酵素活性の低下を抑制すると共に過酸化脂質や炎症を非糖尿病態レベルにまで改善し、同様な施術後の脳障害を軽減することが明らかになった。
6. AA や MAK による虚血性脳障害に対する保護効果は、障害時に過剰に産生される ROS の抑制に続く HMGB1 の細胞外放出の低下によって、炎症性関連因子の発現抑制と細胞死を防ぐことによるものであると推察された。
7. MAK の継続的な摂取と一過性脳虚血発症後のエダラボンの投与は、糖尿病態時の虚血性脳障害を顕著に軽減させた。即ち、抗酸化食品の継続摂取は、虚血性脳障害を軽減すると同時に、薬剤による治療効果を高める可能性を示唆した。

以上、本研究では虚血性脳障害メカニズムを詳細に解明することができた。特に、糖尿病態下で脳虚血を併発した際の脳障害が増加するメカニズムについて、HMGB1 の寄与を明らかにすることができた。さらに、体内酸化ストレス度を軽減する食品・食品成分が、脳障害のリスク軽減に寄与する可能性を見出し、脳保護薬との併用が、患者の QOL 向上に極めて有効であるとする基礎的データが提供できた。

## 謝辞

本研究に際し、素晴らしい研究テーマを与えていただくと共に終始ご指導並びにご鞭撻を賜りました 城西大学大学院薬学研究科 生体防御学講座 日比野 康英 教授に深甚なる謝意を表します。

本研究に際し、終始ご懇篤なるご指導並びにご鞭撻を賜りました 城西大学大学院薬学研究科 薬品作用学講座 岡崎 真理 教授に深甚なる謝意を表します。

本研究に際し、終始ご指導並びにご助言を賜りました城西大学大学院薬学研究科 生体防御学講座 神内 伸也 助教に深甚なる謝意を表します。

本論文の審査をいただきました城西大学大学院薬学研究科 毒性学講座 川嶋 洋一 教授、城西大学大学院薬学研究科 薬物療法学講座 津田 整 教授に深謝の意を表します。

本研究を進めるにあたり、ご協力いただきました城西大学薬学部医療栄養学科 予防栄養学研究室 深谷 睦 助手並びに城西大学薬学部薬学科 医薬品化学研究室 玄 美燕 助手に深甚なる謝意を表します。また、本研究において、ご協力いただきました笠原 知里 修士、高村 恵美子 修士、中野 理加 修士、高山 寛子 修士にこの場を借りて厚く御礼申し上げます。

実験遂行に際して、城西大学薬学部医療栄養学科 生体防御学研究室の皆様のご協力並びにご理解の下に本研究を遂行できましたことを感謝致します。

## 実験の部

### 第1章 糖尿病態時の虚血性脳障害

#### 1. 実験動物

Sprague-Dawley系雄性ラット(4週齢, Sankyo Labo Service)を温度 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 10\%$ 、照度サイクル12時間(明期7:00~19:00)の環境下、固形飼料(CE-2; Japan SLC)および水を自由に摂取させ飼育した。1週間の予備飼育後、ラットに50 mg/kgでストレプトゾトシン(STZ; Wako)を腹腔内投与し、1週間後の血糖値が300 mg/dL以上の個体をさらに4週間飼育し、糖尿病態(DM)ラットとして実験に用いた。STZは、50 mMクエン酸緩衝液(pH 4.5)に用時調製して使用した。また、クエン酸緩衝液のみを投与し、同様に飼育したものを正常血糖(non-DM)ラットとした[8]。すべての動物実験は、総理府の「実験動物の飼育及び保管等に関する基準」に従うとともに、本研究計画の動物実験委員会による審査結果に基づいた学長承認を得て「城西大学動物実験規定」に従って実施した。

#### 2. 生体内酸化ストレスおよび抗酸化力の測定

10週齢SDラットの尾静脈から採取した10  $\mu\text{L}$ の血漿をd-ROMsテストキット(Wismerll)付属の酢酸緩衝液に加えて混和し、20  $\mu\text{L}$ 呈色クロモゲン(*N,N*-ジエチルパラフェニレンジアミン)を加え、活性酸素・フリーラジカル自動分析装置(F.R.E.E.; Free Radical Elective Evaluator)にて血中ヒドロペルオキシド濃度を指標として測定した。酸化ストレス単位1 CARR U.を、0.08 mg/dLの過酸化水素に相当するとした[88]。抗酸化力測定は、BAPテストキット(Wismerll)を用いて行った。三価鉄イオン試薬に呈色液を50  $\mu\text{L}$ 加えて混和し、血漿を10  $\mu\text{L}$ 加えて二価鉄に還元される作用をF.R.E.E.にて測定した。

#### 3. 脳組織中の過酸化脂質含量の測定

脳組織中の過酸化脂質含量は、チオバルビツール酸(TBA)法を用いて測定した。2週間の経口投与終了後、ラットの脳を摘出し、皮質、線条体+海馬、小脳、および脳幹の4部位に分画し、それぞれの組織サンプルに対して10% (w/v)になるようにプロテアーゼ阻害剤を含む1.15%塩化カリウム溶液を加え、ホモジナイザーで粉碎した。プロテアーゼ阻害剤は1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ペプスタチンA、1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ロイペプチン、10 mMフッ化フェニルメチルスルホン(PMSF; Wako)、1  $\mu\text{L}/\text{mL}$ アプロチニン(Bayer Medical)を用いた。キャップ付き試験管に0.2 mLの10% (w/v)組織ホモジネートおよび0.2 mLの8.1%ラウリル硫酸ナトリウム(SDS)、1.5 mLの20%酢酸緩衝液(pH 3.5)、0.05 mLの0.8%ブチルヒドロキソトルエン酢酸溶液、1.5 mLの0.8%1,3-ジエチル-2-チオバルビツール酸(Sigma Aldrich)、0.7 mL

の蒸留水を順に分注し、十分混和した後、5°C で 60 分間静置した。続いて 95°C で 60 分間煮沸した後、流水で 10 分間速やかに冷却して室温に戻した。続いて、1.0 mL の水および 1-ブタノール (Nacalai tesque) とピリジン (Wako) の混合物 (15 : 1 (v/v)) を 5.0 mL 加えて十分混和し、3,000 rpm、室温の条件下で 10 分間遠心し、有機層 (上層) の吸光度 (532 nm) を測定した。試料 1 g あたりの赤色色素量 ( $\mu\text{mol/g tissue}$ ) は、 $(A-A_0) / 156000 \times 5.8 / 10^3 \times 10^2 / 3 \times 10^6$  の計算式から算出した。それぞれの組織のタンパク質含量は Lowry 法により測定した [8, 89]。

#### 4. 脳組織中のスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) 活性の測定

脳組織中の SOD 活性は、SOD Assay Kit-WST (Dojindo) を用いて測定した。各脳部位の湿重量に対して 4 倍量のスクロース緩衝液 (250 mM スクロース, 10 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4), 1 mM エチレンジアミン四酢酸; EDTA) を加え、ホモジナイザーで粉砕した。粉砕後、78,000×g、4°C、60 分間遠心し、上清を測定試料として用いた。測定試料の SOD 活性を検量線から算出し、unit/mg protein で表した [8]。

#### 5. 脳組織中のカタラーゼ (CAT) 活性の測定

脳組織中の CAT 活性は、過酸化水素 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) の減少から算出した。10% (w/v) の脳組織ホモジネート 60  $\mu\text{L}$  を 1.94 mL の 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に混和し、1.0 mL の 59 mM 過酸化水素を添加した。その直後から 4 分間の吸光度 (240 nm) の変化を 10 秒毎に測定し、最初の 1 分間の測定値を用いて減少勾配を求め、unit/mg protein で算出した [8, 90]。

#### 6. 脳組織内のグルタチオンペルオキシダーゼ (GPx) 活性の測定

脳組織中の GPx 活性は、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (NADPH) の酸化から算出した。10% (w/v) の脳組織ホモジネート 100  $\mu\text{L}$  を 1.44 mL の 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0)、0.1 mL の 1 mM EDTA、0.1 mL の 1 mM アジ化ナトリウム、0.05 mL の 1 U/mL グルタチオン還元酵素、0.1 mL の 1 mM グルタチオン、0.1 mL の 0.2 mM NADPH に混和し、0.01 mL の 0.25 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  を添加した。その直後から 4 分間の吸光度 (340 nm) の変化を 10 秒毎に測定して減少勾配を求め、nM NADPH oxidized/min/mg protein で表した [20]。

#### 7. 中大脳動脈閉塞/再灌流 (MCAO/Re) モデルの作製

ラットをハロタン (Takeda Pharmaceutical) で麻酔 (導入 : 5%, 維持 : 1.5%) し、仰臥位に固定後、頸部を正中切開し、右総頸動脈から内頸動脈分岐部を露出し、総頸動脈と外頸動脈、さらに内頸動脈の翼口蓋枝を結紮した。先端を丸くした 4-0 外科用ナイロン糸製の塞栓子を右総頸動脈から内頸動脈を経て中大脳動脈起始部まで挿入し、血管を閉塞した。切開部を縫合した後、ヒーティングパッドと赤外線ランプによって、ラットの体温を 37°C に保温した。MCAO 処置から 120 分後、ラットを再度ハロタン麻酔し、塞栓子をゆっくりと

引き抜き、血液を再灌流 (Re) させた。その後、切開部を縫合し、餌および水が自由に摂取できる環境で飼育した。また、擬似手術処置 (sham-operation) 群には、正中切開のみを行った [8, 91]。また、手術が一定に行われていることを確認するため脳血流量を Doppler flowmetry (Unique Medical) を用いて測定した。

#### 8. 神経症状スコアの測定

MCAO 処置から 120 分および再灌流後経時的に、以下の 6 段階の評価基準に基づき神経症状をスコア化した [92]。

0: 障害のない状態

1: 前足に握力の低下などが見られる状態

2: 尾懸垂時に自発的な回転運動が見られる軽度障害

3: 自発的な回転運動が見られる中度障害

4: 自発的な行動が出来ず、かつ意識の低下が見られる高度障害

5: 死亡

#### 9. 脳梗塞単体積の測定

ラットをハロタン麻酔下で断頭し、摘出した脳組織をステンレス製ブレインマトリックスを用いて、2 mm 厚の脳切片を作成した。梗塞単体積を評価するために 2% 2, 3, 5-トリフェニルテトラゾリウムクロライド (TTC; Sigma) を含む PBS (pH7.4) 中で脳切片を 37°C、15 分間インキュベートした。TTC 染色した切片を 4% パラホルムアルデヒド (Wako) で浸漬固定し、デジタルカメラにより染色画像を撮影した。白色部分を脳梗塞領域とし、画像解析ソフト (Scion Image 1.62) を用いて各切片の吻側および尾側の両面の梗塞面積を計測し、平均の梗塞面積と切片厚 2 mm を用いて体積を算出した。各切片の体積を合計し、梗塞単体積 (%) = [左半球体積 - (右半球体積 - 梗塞体積)] / 左半球体積 × 100 の式から梗塞単体積を評価した。脳浮腫 (%) = (右半球体積 - 左半球体積) / 左半球体積 × 100 の式から脳の膨潤を評価した [92]。

#### 10. DNA microarray による遺伝子発現解析

虚血/再灌流後経時的に採取した脳皮質ペナンプラ領域のサンプルから RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて、Total RNA を抽出した。Total RNA を用いて、Trans Genic Inc. にて Affymetrix Rat Gene 1.0 ST Array による解析を委託した。データの解析は、Gene Viewer version 2.0 を用いた。

#### 11. 炎症関連遺伝子の発現

虚血/再灌流後経時的に採取した脳皮質ペナンプラのサンプルを RNA later に一晩 4°C にて浸漬し、-80°C で保存した。Total RNA の抽出は、RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いた。

また、PrimeScript™ RT reagent Kit (Takara Bio) により、Total RNA (0.5 µg) を鋳型として、5×Prime Script™ buffer 2 µL、PrimeScript™ RT Enzyme Mix I 0.5 µL、Oligo dT primer 0.5 µL、Random 6 mers 0.5 µL の存在下で、Mastercycler (Eppendorf; 37°C で 15 分間、85°C で 5 秒間、4°C 保持) で逆転写反応後、-80°C で保存した。Real-time PCR は、5 µL の 10 ng cDNA、0.8 µL の 10 pmol Target gene specific primers (Takara Bio)、10 µL の SYBR Premix EX Taq (Takara Bio)、4.2 µL の dH<sub>2</sub>O の存在下で、iCycler thermal cycler (Bio-Rad; 初期変性 95°C で 30 秒間 1 cycle, PCR 反応 95°C で 5 秒間、60°C で 34 秒間 50 cycle, 融解曲線分析) で行った。また、同様の条件下でβ-アクチンを内部標準として用いた。各遺伝子のプライマーは Table 1 に示す。

## 12. Evans blue 漏出の測定

ラットをハロタンで麻酔 (導入: 5%, 維持: 1.5%) して正中切開後、MCAO 処置直後に鎖骨下頸静脈から生理食塩水で調製した 4% Evans blue 溶液を 2.5 mL/kg で数分間かけて投与した。再灌流後、経時的に脳サンプルを摘出し、2 mm 厚の組織切片を作製した。梗塞側半球である右脳スライスに 3 mL の *N,N*-ジメチルホルムアミドを加え、ホモジナイザーで粉碎した。55°C で 18 時間インキュベートした後、20,000×g、20 分間遠心し、上清を測定試料として波長 620 nm の吸光度で測定した [93]。検量線より算出し、Evans blue Leakage (µg) として示した。

## 13. 統計処理

データは、平均値 ± 標準偏差として表示し、統計学的有意差は、二元配置分散分析後、Tukey-Kramer 法の多重比較により解析した。神経症状スコアに関しては、Kruskal-Wallis test による解析後、Mann-Whitney U test を行った。検定における有意水準は 5% とした。

## 第 2 章 脳障害時のシグナル伝達因子の作用解析

### 1. 培養細胞

ラット副腎髄質褐色細胞腫由来である PC12 細胞 (Health Science Research Resources Bank) を 100 mm dish (BD) に播種し、10% 非働化ウマ血清 (HS; Tissue Culture Biologicals)、5% 非働化ウシ血清 (FBS; Cell Culture Bioscience)、24 mM 炭酸水素ナトリウム (Wako)、Antibiotic-Antimycotic (100 unit/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, 0.25 µg/mL amphotericin B; GIBCO) を添加した RPMI1640 培地 (GIBCO) で、37°C、5% CO<sub>2</sub> 下で培養した。

## 2. PC12 細胞における生存率

PC12 細胞を 96 well plate (BD) に  $1 \times 10^5$  cells 播種し、4 日後に低血清培地 (0.1% HS, 0.05% FBS) で 50 ng/mL に調製した神経成長因子 (NGF; Nerve growth factor) を 3 日間添加し、神経突起を伸張して交感神経細胞様に分化させた。Recombinant HMGB1 (rHMGB1; 0.05, 1, 5, 10  $\mu$ g) を添加して 24 時間培養した後、培地を除いて 5 mg/mL で調製した MTT 試薬を 100  $\mu$ L 加え、37°C で 4 時間インキュベートした。上清を除いた後に、ジメチルスルホキシド (DMSO; Wako) を 100  $\mu$ L 加え、10 分間よく混和した。マルチラベルプレートカウンター (Wallac 1420 ARVOSx; PerkinElmer) を用いて蛍光波長 650/540 nm の吸光度を測定した。また、無処置群を生存率 100% として算出した。

## 3. PC12 細胞における免疫染色

PC12 細胞を poly-L-Lysine coated 4 chamber slide (IWAKI) に  $5 \times 10^4$  cells 播種し、4 日後に低血清培地 (0.1% HS, 0.05% FBS) で 50 ng/mL に調製した NGF を 3 日間添加し、神経突起を伸張して交感神経細胞様に分化させた。50  $\mu$ M の  $H_2O_2$  を 8 時間、20 ng/mL の TNF- $\alpha$  を 16 時間あるいは 5  $\mu$ g/mL の rHMGB1 を 24 時間添加後、PBS で洗浄し、4% パラホルムアルデヒドで 5 分間固定した [94-96]。ブロッキング剤 (ブロックエース; DS Pharma Biomedical) で 1 時間処理し、一次抗体 HMGB1 (1 : 400; Abcam) を 1 時間作用させた。続いて、二次抗体 Cy3 donkey anti-rabbit IgG 抗体 (1 : 100; Chemicon) を室温で 20 分間作用させた。TO-PRO<sup>®</sup>-3 iodide (1:5000; invitrogen) で 15 分間染色し、80% グリセリンで封入後、共焦点レーザー走査型顕微鏡 FV1000-D (OLYMPUS) を用いて観察した。

## 4. 脳組織における HMGB1 の細胞局在性および RAGE の発現

摘出したラット脳を 4% カルボキシメチルセルロースナトリウム (CMC; Leica) 凍結包埋剤を使用し、試料凍結装置 (UT-2000, FINETEC) を用いて、凍結ブロックを作製した。クライオスタット (CM3050S; Leica) を用いて凍結切片 (8  $\mu$ m 厚) を作製し、スライドガラス (SUPERFROST MICRO SLIDE GLASS; Matsunami Glass) にマウント後、3% ホルムアルデヒドで 45 分間固定した。洗浄後、ブロッキング剤 (ブロックエース; DS Pharma Biomedical) で 2 時間処理し、一次抗体である HMGB1 抗体 (1:500; Abcam)、RAGE 抗体 (1:200; Santa Cruz)、NeuN 抗体 (1:500; Chemicon)、Iba1 抗体 (1:500; abcom) あるいは GFAP 抗体 (1:300, BD) を 4°C で一晩作用させた。続いて、HMGB1 あるいは RAGE には二次抗体 Cy3 donkey anti-rabbit IgG 抗体を作用させ、NeuN 抗体、Iba1 抗体あるいは GFAP 抗体には FITC donkey anti-mouse IgG 抗体を室温で 2 時間作用させた。TO-PRO<sup>®</sup>-3 iodide (1:5000; invitrogen) で 15 分間染色し、80% グリセリンで封入後、共焦点レーザー走査型顕微鏡 FV1000-D (OLYMPUS) を用いて検鏡した [97]。

## 5. 細胞質および核画分の調製

ラット脳の皮質ペナンブラ領域を、10% (w/v) のホモジナイズ用緩衝液 (20 mM HEPES (pH 7.9), 1 mM 塩化マグネシウム, 0.5 mM EDTA, 1% ノニデット P-40, 1 mM グリコールエーテルジアミン四酢酸 (EGTA), 1 mM ジチオトレイトール (DTT), 0.5 mM PMSF, 4 µg/mL ペプスタチンA, and 4 µg/mL ロイペプチン) を加え、ホモジナイザーで粉碎した。4°C で5分間1,000×g で遠心した後、沈殿と上清に分け、上清画分を総抽出液とした。さらに、4°C で40分間105,000×g で遠心した上清を細胞質画分とした。また、沈殿を抽出用緩衝液 (20 mM HEPES (pH 7.9), 1.5 mM 塩化マグネシウム, 300 mM 塩化ナトリウム, 0.2 mM EDTA, 20% グリセロール, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 4 µg/mL ペプスタチンA, 4 µg/mL ロイペプチン) で再懸濁し、30分間氷上で静置した後、4°C で20分間15,000×g で遠心した上清を核抽出画分とした [98, 99]。

#### 6. Western blot法による細胞外タンパク質および細胞内シグナルの解析

電気泳動用サンプルは、40 µg の総抽出液、細胞質および核抽出画分のサンプルに、2× SDS サンプル緩衝液 (100 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 6.8), 4% SDS, 20% グリセロール, 4% 2-メルカプトエタノール, 0.1% ブロモフェノールブルー) を等量加えて調製した。電気泳動は、Mini PROTEAN 3 Cell (Bio-Rad) を用いて、10~12% SDS-ポリアクリルアミドゲルにより行った。泳動後、セミドライブロットティング装置 (Bio-Rad) を用いて、100 mA で1.5時間、タンパク質をPVDFメンブレン (Millipore) に転写した。続いて、メンブレンを5% スキムミルク含有のPBS-T溶液 (137 mM 塩化ナトリウム, 8.10 mM リン酸水素二ナトリウム, 2.68 mM 塩化カリウム, 1.47 mM リン酸二水素カリウム, 0.1% ポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノラウレート溶液) で一晩もしくは1.5時間ブロッキングした。一次抗体は、5% スキムミルク含有PBS-T溶液で希釈し、室温で1時間反応させた。メンブレンをPBS-T溶液で5分×5回、室温で洗浄後、二次抗体は、5% スキムミルク含有PBS-T溶液で希釈し、室温で1時間反応させた。メンブレンをPBS-T溶液で5分×5回洗浄した後、ECL もしくはECL plus detection reagents (Amersham Biosciences) を用いて、X線フィルム (Amersham Biosciences) に露光もしくはLight-Capture II (ATTO) で可視化した。各タンパク質の抗体はTable 2に示した。

#### 7. 脳組織における炎症関連因子の発現

本章4. と同様に脳組織切片を作製し、ブロッキングを行った。1次抗体としてIL-1β、TNF-α、COX-2、iNOSとNucN、ICAM-1とRECA-1をそれぞれ1%ブロッキングエースにて作用させ、4°C で一晩静置した。二次抗体として、IL-1β、TNF-α、COX-2、iNOS、ICAM-1にはCy3抗体を、NucNまたはRECA-1にはFITC抗体をPBSにて希釈し、室温で2時間作用させた。PBSで5分間、3回洗浄した後、TO-PRO-3を室温で15分間作用させ、細胞核を染色した。80% グリセリンで封入した後、共焦点レーザー走査顕微鏡 (IX81, OLYMPUS) で検鏡した。また、IL-1β、TNF-α、COX-2、iNOS、ICAM-1、MPOについては解析ソフト (FV10-ASW 1.7) を

用いてTO-PRO-3あたりのCy3の蛍光強度の割合から発現量を算出、ICAM-1はRECA-1あたりのCy3の蛍光強度の割合から発現量を算出した。各タンパク質の抗体はTable 3に示す。

## 8. 統計処理

データは、平均値 ± 標準偏差として表示し、統計学的有意差は、二元配置分散分析後、Tukey-Kramer 法の多重比較により解析した。神経症状スコアに関しては、Kruskal-Wallis test による解析後、Mann-Whitney U test を行った。検定における有意水準は5%とした。

## 第3章 エタネルセプトを用いた虚血性脳障害改善作用の検討

### 1. 実験動物

第1章 1. と同様に実験動物の飼育および STZ-誘発糖尿病態モデルの作製を行った。

### 2. 血漿タンパク質の測定

脳サンプル採取前にラットの下大静脈からシリンジを用いて血液 900  $\mu$ L を採取し、ヘパリン (1,000 単位/mL; Mochida Pharmaceutical) 100  $\mu$ L と混和し、3,000 rpm で 10 分間遠心して得られた上清 (血漿) を -30°C で保存した。血漿サンプルを用いて、レビス TNF- $\alpha$ -ラット測定キット (Shibayagi) により吸光度 450 nm (副波長 620 nm) で比色測定した。また、標準 TNF- $\alpha$ 濃度に対する標準曲線から未知検体中の濃度を算出した。

### 3. エタネルセプト投与

エタネルセプト (ETN; Takeda Pharmaceutical) は、注射用水 (Otsuka Pharmaceutical) を用いて 25 mg/mL を調製し、さらに生理食塩水を用いて投与量 300、450、900  $\mu$ g/kg となるように調製した。ラットをハロタンで麻酔 (導入 : 5%, 維持 : 1.5%) し、第1章 7. と同様にラットに虚血/再灌流処置を施した。投与時期は、正常血糖ラットにおいて虚血処置 24 時間前に ETN を腹腔内投与する群、虚血直後に鎖骨下静脈より投与する群、虚血/再灌流直後に鎖骨下静脈に投与する群の 3 つの条件を設けた。糖尿病態ラットにおいては、虚血処置 24 時間前に腹腔内投与、虚血直後に静脈内投与、STZ 投与直後から週 2 回で計 5 週間腹腔内に投与する反復投与の 3 つの条件を設け、投与濃度は先に示した 3 つを採用した。脳組織は、虚血/再灌流 24 時間後に採取した。

### 4. 神経症状の測定

第1章 8. と同様に MCAO 処置から 120 分および再灌流 24 時間後に 6 段階の評価基準に

基づき神経症状をスコア化した。

#### 5. 梗塞巣体積の測定

第1章9.と同様にTTC染色後、画像解析により算出した。

#### 6. アポトーシスの評価

クライオスタット (CM3050S; LEICA) を使用して 8  $\mu\text{m}$  厚の冠状切片を作製し、スライドガラスにマウントした後、100%メタノール (Wako) にて約2分間浸漬固定した。続いて、10 mM PBS (7.75 mM リン酸水素二ナトリウム, 1.90 mM リン酸二水素ナトリウム, 145 mM 塩化ナトリウム) で5分間、3回洗浄後、浸透化溶液 (3.88 mM クエン酸三ナトリウム二水和物; Wako, 0.1% Triton-100; Sigma) に氷上で2分間浸漬した。その後、TUNEL染色キット (Apoptosis *in situ* Detection Kit, Wako) を用いてアポトーシス陽性細胞を染色し、さらにマイヤー・ヘマトキシリン (Sakura Finetek Japan) による対比染色を行った。染色した切片をゼラチンで封入し、光学顕微鏡 (BX51W1; OLYMPUS) を用いて検鏡した。画像解析は、CCDカメラ (DP-50; OLYMPUS) および画像解析ソフト (Lumina Vision; MITANI) を用いて大脳皮質ペナンプラ領域の TUNEL 陽性細胞数をカウントした。Apoptosis index (%) = (TUNEL 陽性細胞数 / 全細胞数)  $\times$  100 として表した [100]。

#### 7. 統計処理

データは、平均値  $\pm$  標準偏差として表示し、統計学的有意差は、二元配置分散分析後、Tukey-Kramer 法の多重比較により解析した。神経症状スコアに関しては、Kruskal-Wallis test による解析後、Mann-Whitney U test を行った。検定における有意水準は5%とした。

### 第4章 抗酸化能を有する食品・食品成分と医薬品による虚血性脳障害改善作用の検討

#### 1. 実験動物

第1章1.と同様に実験動物の飼育およびSTZ-誘発糖尿病態モデルの作製を行った。

#### 2. 食品および薬剤投与 (単独群)

8週齢の正常血糖および糖尿病態ラットに、胃ゾンデを用いてMAK (1 g/kg)、ビタミンC (100 mg/kg; Wako) または蒸留水を1日1回、2週間経口投与した。MAKは、野田食菌工業 (株) において製造された「MAK」を使用した。MAKは、霊芝菌糸体をバガスと脱脂した米糠の混合固形培地に接種し、子実体発生直前に培地ごと破碎し、熱水抽出、噴霧乾

燥したものである。ラットをハロタンで麻酔（導入：5%，維持：1.5%）し、第1章7.と同様にラットに虚血/再灌流処置を施した。

エダラボン（Wako）は、生理食塩水で10 mg/kg となるように調製し、虚血直後および虚血/再灌流直後に鎖骨下静脈より投与した〔96〕。そして、虚血/再灌流24時間後にサンプルを採取した。また、1日1回3日間尾静脈よりエダラボンを10 mg/kg 投与し、72時間後にサンプルを採取した。

### 3. 食品および薬剤投与（併用群）

本章2.と同様に8週齢目から2週間 MAK (1 g/kg/day) を経口投与した後、2時間の MCAO を行い、MCAO 直後または再灌流直後からエダラボン (10 mg/kg/day) を静脈内投与し、24時間および72時間後に評価した。

### 4. 生体内酸化ストレスおよび抗酸化力の測定

第1章2.と同様に酸化ストレスと抗酸化力を測定した。

### 5. 脳組織中の過酸化脂質含量の測定

第1章3.と同様に過酸化脂質含量を測定した。

### 6. 脳組織中のスーパーオキシドジスムターゼ活性の測定

第1章4.と同様に SOD 活性を測定した。

### 7. 脳組織中のカタラーゼ活性の測定

第1章5.と同様に CAT 活性を測定した。

### 8. 脳組織内のグルタチオンペルオキシダーゼ活性の測定

第1章6.と同様に GPx 活性を測定した。

### 9. アポトーシスの評価

第2章6.と同様にアポトーシスの評価をした。

### 10. 脳組織における免疫染色

第2章7.と同様に炎症関連因子の発現を評価した。

### 11. 血漿中および脳組織のアスコルビン酸定量

第4章2.で示したように、2週間経口投与したラットに MCAO/Re 処置を施し、24時間後に脳および血漿を採取した。血漿は、10% メタリン酸を等量加えた後、10,000×g で15

分間遠心して得られた上清を-20°Cで保存した。血漿サンプルを用いて、アスコルビン酸定量キット (SHIMA LABORATORIES) により吸光度 530 nm で測定した。組織は、脳皮質ペナンプラを用いて、組織重量の 14 倍量の 5.4%メタリン酸を加えてホモジナイズした後、10,000×g で 15 分間遠心して得られた上清を-20°Cで保存した。組織中のアスコルビン酸も同様のキットを用いて測定した。

## 12. DCFH-DA 法による酸化ストレス抑制の評価

第1章 13. と同様に PC12 細胞を培養した。PC12 細胞を 96 well plate (BD) に  $1 \times 10^5$  cells 播種し、4 日後に低血清培地 (0.1% HS, 0.05% FBS) で 50 ng/mL に調製した NGF を 3 日間添加し、神経突起を伸張して交感神経細胞様に分化させた。MAK (0.01, 1, 100  $\mu\text{g/mL}$ ) を添加して 1 時間培養し、250  $\mu\text{M}$  となるように  $\text{H}_2\text{O}_2$  を 6 時間添加した。その後、培地を除き、低血清培地で調製した 2', 7'-ジクロロジヒドロフルオレセインジアセテート (DCFH-DA; Sigma) を 10  $\mu\text{M/well}$  で加えて、37°C で 30 分間作用させた。培地を除いて PBS を 100  $\mu\text{L}$  加え、10 分間よく混和した。マルチラベルプレートカウンター (Wallac 1420 ARVOsx; PerkinElmer) にて蛍光強度 (励起波長 485 nm、蛍光波長 535 nm) で測定し、蛍光強度から酸化ストレスを評価した。また、無処置群を 100%として算出した。[101, 102]

## 13. HMGB1 の細胞内分布の評価 (*in vitro*)

第1章 13. と同様に PC12 細胞を poly-L-Lysine coated 4 chamber slide (IWAKI) に  $5 \times 10^4$  cells 播種し、4 日後に低血清培地 (0.1% HS, 0.05% FBS) で 50 ng/mL に調製した NGF を 3 日間添加し、神経突起を伸張して交感神経細胞様に分化させた。MAK (0.01, 1, 100  $\mu\text{g/mL}$ ) を添加して 1 時間培養し、50  $\mu\text{M}$  の  $\text{H}_2\text{O}_2$  を 8 時間、20 ng/mL の TNF- $\alpha$  を 16 時間あるいは 5  $\mu\text{g/mL}$  の rHMGB1 を 24 時間添加後、PBS で洗浄し、4% パラホルムアルデヒドで 5 分間固定した [94-96]。ブロッキング剤 (ブロックエース; DS Pharma Biomedical) で 1 時間処理し、一次抗体 HMGB1 (1 : 400; Abcam) を 1 時間作用させた。続いて、二次抗体 Cy3 donkey anti-rabbit IgG 抗体 (1 : 100; Chemicon) を室温で 20 分間作用させた。TO-PRO<sup>®</sup>-3 iodide (1:5000; invitrogen) で 15 分間染色し、80% グリセリンで封入後、共焦点レーザー走査型顕微鏡 FV1000-D (OLYMPUS) を用いて観察した。

## 14. スーパーオキシド産生に対する抑制の評価

クライオスタットを用いて 8  $\mu\text{m}$  厚の冠状切片を作製後、スライドガラスにマウントした。その後、10  $\mu\text{mol/L}$  ジハイドロエチジウム (DHE; Sigma) を作用させ、遮光した加湿ケース内で 37°C、30 分間インキュベートし、共焦点レーザー走査顕微鏡 (IX81; OLYMPUS) にて観察した (Ex: 488 nm, Em: 574-595 nm)。DHE の蛍光強度を FV10-ASW ソフトを用いて数値化し、各群の強度を sham 群に対する相対値で表した [103]。

15. Western blot 法による HMGB1 および NF- $\kappa$ B の検出

第 1 章 17. と同様に細胞質および核画分を調製し、第 1 章 18. に従って Western blot を行った。HMGB1 は、血漿サンプルを用いて行い、NF- $\kappa$ B の核内移行は、抽出液、細胞質、核抽出画分から評価した。各タンパク質の抗体は Table 3 に示す。

16. 統計処理

データは、平均値  $\pm$  標準偏差として表示し、統計学的有意差は、二元配置分散分析後、Tukey-Kramer 法の多重比較により解析した。検定における有意水準は5%とした。

Table 3. PCR primers

| Gene                            |         | Sequence                           |
|---------------------------------|---------|------------------------------------|
| <i>Il-1<math>\beta</math></i>   | Forward | 5'-GCTGTGGCAGCTACCTATGTCTTG-3'     |
|                                 | Reverse | 5'-AGGTCGTCATCATCCCACGAG-3'        |
| <i>Tnf-<math>\alpha</math></i>  | Forward | 5'-AACTCGAGTGACAAGCCCGTAG-3'       |
|                                 | Reverse | 5'-GTACCACCAGTTGGTTGTCTTTGA-3'     |
| <i>Il-6</i>                     | Forward | 5'-ATTGTATGAACAGCGATGATGCAC-3'     |
|                                 | Reverse | 5'-CCAGGTAGAAACGGAACTCCAGA-3'      |
| <i>Cox-2</i>                    | Forward | 5'-GCGACTGTTCCAAACCAGCA-3'         |
|                                 | Reverse | 5'-TGGGTCGAACTTGAGTTTGAAGTG-3'     |
| <i>Mmp-9</i>                    | Forward | 5'-TCCAGTAGACAATCCTTGCAATGTG-3'    |
|                                 | Reverse | 5'-CTCCGTGATTCGAGAACTTCCAATA-3'    |
| <i>Hmgb1</i>                    | Forward | 5'-GGAAATTAAAGCAGGAGGTTCTTGTTGG-3' |
|                                 | Reverse | 5'-CTGCATCAGAGACAACCTGAAGATGG-3'   |
| <i>Rage</i>                     | Forward | 5'-ACCCTTAGCTGGCACTTGGATG-3'       |
|                                 | Reverse | 5'-GAGCTCTGACCGAAGCGTGA-3'         |
| <i><math>\beta</math>-actin</i> | Forward | 5'-GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA-3'      |
|                                 | Reverse | 5'-GACTCATCGTACTCCTGCTTGCTG-3'     |

Table 4. Antibody information.

| primary Antibody | Concentration            | secondary Antibody                                  | Concentration            |
|------------------|--------------------------|---|--------------------------|
| HMGB1            | 1:1,000 (Abcam)          | Anti-HRP conjugated donkey anti-rabbit IgG Antibody | 1:5,000 (GE Healthcare)  |
| RAGE             | 1:200 (Santa Cruz)       | Anti-HRP conjugated donkey anti-goat IgG Antibody   | 1:2,000 (Santa Cruz)     |
| TLR4             | 1:200 (Santa Cruz)       | Anti-HRP conjugated donkey anti-rabbit IgG Antibody | 1:5,000 (GE Healthcare)  |
| ERK1/2           | 1:2,000 (Cell Signaling) | Anti-HRP conjugated donkey anti-rabbit IgG Antibody | 1:5,000 (GE Healthcare)  |
| phospho-ERK1/2   | 1:500 (Cell Signaling)   | Anti-HRP conjugated donkey anti-rabbit IgG Antibody | 1:2,000 (GE Healthcare)  |
| p38 MAPK         | 1:200 (Cell Signaling)   | Anti-HRP conjugated donkey anti-rabbit IgG Antibody | 1:3,000 (GE Healthcare)  |
| phospho-p38 MAPK | 1:200 (Cell Signaling)   | Anti-HRP conjugated donkey anti-rabbit IgG Antibody | 1:3,000 (GE Healthcare)  |
| Akt              | 1:1,000 (Cell Signaling) | Anti-HRP conjugated donkey anti-rabbit IgG Antibody | 1:3,000 (GE Healthcare)  |
| phospho-Akt      | 1:1,000 (Cell Signaling) | Anti-HRP conjugated donkey anti-rabbit IgG Antibody | 1:3,000 (GE Healthcare)  |
| NF- $\kappa$ B   | 1:500 (Santa Cruz)       | Anti-HRP conjugated donkey anti-rabbit IgG Antibody | 1:2,000 (GE Healthcare)  |
| COX-2            | 1:500 (Cayman Chemical)  | Anti-HRP conjugated donkey anti-rabbit IgG Antibody | 1:2,000 (GE Healthcare)  |
| $\beta$ -actin   | 1:10,000 (Sigma)         | Anti-HRP conjugated donkey anti-mouse IgG Antibody  | 1:10,000 (GE Healthcare) |

Table 5. Antibody information.

| primary Antibody | Concentration           | secondary Antibody            | Concentration    |
|------------------|-------------------------|-------------------------------|------------------|
| IL-1 $\beta$     | 1:300 (Santa Cruz)      | Cy3 donkey anti-rabbit IgG 抗体 | 1:200 (Chemicon) |
| TNF- $\alpha$    | 1:200 (Hycult biotech)  | Cy3 donkey anti-rabbit IgG 抗体 | 1:200 (Chemicon) |
| COX-2            | 1:200 (Cayman Chemical) | Cy3 donkey anti-rabbit IgG 抗体 | 1:200 (Chemicon) |
| iNOS             | 1:200 (Santa Cruz)      | Cy3 donkey anti-rabbit IgG 抗体 | 1:200 (Chemicon) |
| NeuN             | 1:500 (MILLIPORE)       | FITC donkey anti-mouse IgG 抗体 | 1:200 (Zymed)    |
| ICAM-1           | 1:200 (Santa Cruz)      | Cy3 donkey anti-rabbit IgG 抗体 | 1:200 (Chemicon) |
| RECA-1           | 1:200 (abcam)           | FITC donkey anti-mouse IgG 抗体 | 1:200 (Zymed)    |

## 引用文献

- [1] 平成 24 年度 人口動態統計調査 厚生労働省
- [2] Li, Z.G., Britton, M., Sima, A.A., Dunbar, J.C., 2004. Diabetes enhances apoptosis induced by cerebral ischemia. *Life Sci.*, **76**, 249-262.
- [3] Stephens, J.W., Khanolkar, M.P., Bain, S.C., 2009. The biological relevance and measurement of plasma markers of oxidative stress in diabetes and cardiovascular disease. *Atherosclerosis*, **202**, 321-329.
- [4] Baynes, J.W., 1991. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes*, **40**, 405-412.
- [5] Stephens, J.W., Khanolkar, M.P., Bain, S.C., 2009. The biological relevance and measurement of plasma markers of oxidative stress in diabetes and cardiovascular disease. *Atherosclerosis*, **202**, 321-329.
- [6] Li, P.A., Liu, G.J., He, Q.P., Floyd, R.A., Siesjö, B.K., 1999. Production of hydroxyl free radical by brain tissues in hyperglycemic rats subjected to transient forebrain ischemia. *Free Radic. Biol.*, **27**, 1033-1040.
- [7] Wei, J., Quast, M.J., 1998. Effect of nitric oxide synthase inhibitor on a hyperglycemic rat model of reversible focal ischemia: detection of excitatory amino acids release and hydroxyl radical formation. *Brain Res.*, **791**, 146-156.
- [8] Iwata, N., Okazaki, M., Kasahara, C., Kamiuchi, S., Suzuki, F., Iizuka, H., Hibino, Y., 2008. Protective effects of a water-soluble extract from culture medium of *Ganoderma lucidum* mycelia against neuronal damage after cerebral ischemia/reperfusion in diabetic Rats. *J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.*, **61**, 119-127.
- [9] Li, Z.G., Britton, M., Sima, A.A., Dunbar, J.C., 2004. Diabetes enhances apoptosis induced by cerebral ischemia. *Life Sci.*, **76**, 249-262.
- [10] Rizk, N.N., Rafols, J., Dunbar, J.C., 2005. Cerebral ischemia induced apoptosis and necrosis in normal and diabetic rats. *Brain Res.*, **1053**, 1-9.
- [11] Biller, J., Love, B.B., 1993. Diabetes and stroke. *Med. Clin. North Am.*, **77**, 95-110.
- [12] Vinik, A., Flemmer, M. J., 2002. Diabetes and macrovascular disease. *Diabetes Complications*, **16**, 235-245.
- [13] Siesjo, B.K., Zhao, Q., Pahlmark, K., Siesjo, P., Katsura, K., Folbergrova, J., 1995. Glutamate, calcium, and free radicals as mediators of ischemic brain damage. *The Annals of Thoracic Surgery*, **59**, 1316-1320.
- [14] Ozben, T., Balkan, E., Balkan, S., Serteser, M., Gumuslu, S., 2005. Effects of MK-801 on nitrite and cGMP levels during focal cerebral ischemia in rats. *Nitric Oxide*, **13**, 210-205.
- [15] Vlassara, H., Uribarri, J., 2014. Advanced Glycation End Products (AGE) and Diabetes: Cause,

Effect, or Both? *Curr. Diab. Rep.*, **14**, 453.

- [16] Giacco, F., Brownlee, M., Oxidative stress and diabetic complications. 2010. *Circ. Res.*, **107**, 1058-1070.
- [17] Stitt, A.W., Li, Y.M., Gardiner, T.A., Bucala, R., Archer, D.B., Vlassara, H., 1997. Advanced glycation end products (AGEs) co-localize with AGE receptors in the retinal vasculature of diabetic and of AGE-infused rats. *Am. J. Pathol.*, **150**, 523-531.
- [18] Bullon, P., Newman, H.N., Battino, M., 2014. Obesity, diabetes mellitus, atherosclerosis and chronic periodontitis: a shared pathology via oxidative stress and mitochondrial dysfunction? *Periodontol. 2000*, **64**, 139-153.
- [19] Cornelli, U., Terranova, R., Luca, S., Cornelli, M., Alberti, A., 2001. Bioavailability and antioxidant activity of some food supplements in men and women using the D-Roms test as a marker of oxidative stress. *J. Nutr.*, **131**, 3208-3211.
- [20] Shah, Z.A., Gilani, R.A., Sharma, P., Vohora, S.B., 2005. Cerebroprotective effect of Korean ginseng tea against global and focal models of ischemia in rats. *J. Ethnopharmacol.*, **101**, 299-307.
- [21] Tirkey, N., Kaur, G., Vij, G., Chopra, K., 2005. Curcumin, a diferuloylmethane, attenuates cyclosporine- induced renal dysfunction and oxidative stress in rat kidneys. *BMC Pharmacol.* **5**, 15.
- [22] Montilla, P., Barcos, M., Munoz, M.C., Bujalance, I., Munoz-Castaneda, J.R., Tunez, I., 2005. Red wine prevents brain oxidative stress and nephropathy in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Biochem. Mol. Biol.*, **30**, 539-544.
- [23] Kennedy, L., Baynes, J.W., 1984. Non-enzymatic glycosylation and the chronic complications of diabetes: an overview. *Diabetologia.*, **26**, 93-98.
- [24] Mabuchi, T., Kitagawa, K., Ohtsuki, T., Kuwabara, K., Yagita, Y., Yanagihara, T., Hori, M., Matsumoto, M., 2000. Contribution of microglia/macrophages to expansion of infarction and response of oligodendrocytes after focal cerebral ischemia in rats. *Stroke*, **31**, 1735-1743.
- [25] Matsui, T., Mori, T., Tateishi, N., Kagamiishi, Y., Satoh, S., Katsube, N., Morikawa, E., Morimoto, T., Ikuta, F., Asano, T., 2002. Astrocytic activation and delayed infarct expansion after permanent focal ischemia in rats. Part I: enhanced astrocytic synthesis of s-100 beta in the periinfarct area precedes delayed infarct expansion. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **22**, 711-722.
- [26] Ikuta, F., Yoshida, Y., Ohama, E., Oyanagi, K., Takeda, S., Yamazaki, K., Watabe, K., 1983. Revised pathophysiology on BBB damage: the edema as an ingeniously provided condition for cell motility and lesion repair. *Acta Neuropathol. Suppl.*, **8**, 103-110.
- [27] Plumier, J.C., Armstrong, J.N., Wood, N.I., Babity, J.M., Hamilton, T.C., Hunter, A.J., Robertson, H.A., Currie, R.W., 1997. Differential expression of c-fos, Hsp70 and Hsp27 after photothrombotic injury in the rat brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, **45**, 239-246.

- [28] Piao, C.S., Kim, S.W., Kim, J.B., Lee, J.K., 2005. Co-induction of alphaB-crystallin and MAPKAPK-2 in astrocytes in the penumbra after transient focal cerebral ischemia. *Exp. Brain Res.*, **163**, 421-429.
- [29] Nimura, T., Weinstein, P.R., Massa, S.M., Panter, S., Sharp, F.R., 1996. Heme oxygenase-1 (HO-1) protein induction in rat brain following focal ischemia. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, **37**, 201-208.
- [30] Javaherian, K., Liu, J.F., Wang, J.C., 1978. Nonhistone proteins HMG1 and HMG2 change the DNA helical structure. *Science*, **199**, 1345-1346.
- [31] Wang, H., Bloom, O., Zhang, M., Vishnubhakat, J.M., Ombrellino, M., Che, J., Frazier, A., Yang, H., Ivanova, S., Borovikova, L., Manogue, K.R., Faist, E., Abraham, E., Andersson, J., Andersson, U., Molina, P.E., Abumrad, N.N., Sama, A., Tracey, K.J., 1999. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science*, **285**, 248-251.
- [32] Erlandsson, Harris, H., Andersson, U., 2004. The nuclear protein HMGB1 as a proinflammatory mediator. *Eur. J. Immunol.*, **34**, 1503-1512.
- [33] Bonaldi, T., Talamo, F., Scaffidi, P., Ferrera, D., Porto, A., Bachi, A., Rubartelli, A., Agresti, A., Bianchi, M.E., 2003. Monocytic cells hyperacetylate chromatin protein HMGB1 to redirect it towards secretion. *EMBO J.*, **22**, 5551-5560.
- [34] Lotze, M.T., Tracey, K.J., 2005. High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nat. Rev. Immunol.*, **5**, 331-342.
- [35] Mullins, G.E., Sunden-Cullberg, J., Johansson, A.S., Rouhiainen, A., Erlandsson-Harris, H., Yang, H., Tracey, K.J., Rauvala, H., Palmblad, J., Andersson, J., Treutiger, C.J., 2004. Activation of human umbilical vein endothelial cells leads to relocation and release of high-mobility group box chromosomal protein 1. *Scand. J. Immunol.*, **60**, 566-573.
- [36] Yang, H., Wang, H., Czura, C.J., Tracey, K.J., 2005. The cytokine activity of HMGB1. *J. Leukoc. Biol.*, **78**, 1-8.
- [37] Faraco, G., Fossati, S., Bianchi, M.E., Patrone, M., Pedrazzi, M., Sparatore, B., Moroni, F., Chiarugi, A., 2007. High mobility group box 1 protein is released by neural cells upon different stresses and worsens ischemic neurodegeneration in vitro and in vivo. *J. Neurochem.*, **103**, 590-603.
- [38] Suda, K., Kitagawa, Y., Ozawa, S., Saikawa, Y., Ueda, M., Abraham, E., Kitajima, M., Ishizaka, A., 2006. Serum concentrations of high-mobility group box chromosomal protein 1 before and after exposure to the surgical stress of thoracic esophagectomy: a predictor of clinical course after surgery? *Dis. Esophagus.*, **19**, 5-9.
- [39] Kuniyasu, H., Yano, S., Sasaki, T., Sasahira, T., Sone, S., Ohmori, H., 2005. Colon cancer cell-derived high mobility group 1/amphotericin induces growth inhibition and apoptosis in macrophages. *Am. J. Pathol.*, **166**, 751-760.

- [40] Yamada, S., Maruyama, I., 2007. HMGB1, a novel inflammatory cytokine. *Clin. Chim. Acta.*, **375**, 36-42.
- [41] Yan, S.D., Chen, X., Fu, J., Chen, M., Zhu, H., Roher, A., Slattery, T., Zhao, L., Nagashima, M., Morser, J., Migheli, A., Nawroth, P., Stern, D., Schmidt, A.M., 1996. RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature*, **382**, 685-691.
- [42] Deane, R., Du, Yan, S., Subramanyam, R.K., LaRue, B., Jovanovic, S., Hogg, E., Welch, D., Manness, L., Lin, C., Yu, J., Zhu, H., Ghiso, J., Frangione, B., Stern, A., Schmidt, A.M., Armstrong, D.L., Arnold, B., Liliensiek, B., Nawroth, P., Hofman, F., Kindy, M., Stern, D., Zlokovic, B., 2003. RAGE mediates amyloid-beta peptide transport across the bloodbrain barrier and accumulation in brain. *Nat. Med.*, **9**, 907-913.
- [43] Arancio, O., Zhang, H.P., Chen, X., Lin, C., Trinchese, F., Puzzo, D., Liu, S., Hegde, A., Yan, S.F., Stern, A., Luddy, J.S., Lue, L.F., Walker, D.G., Roher, A., Buttini, M., Mucke, L., Li, W., Schmidt, A.M., Kindy, M., Hyslop, P.A., Stern, D.M., Du, Yan, S.S., 2004. RAGE potentiates Abeta-induced perturbation of neuronal function in transgenic mice. *EMBO J.*, **23**, 4096-4105.
- [44] Bierhaus, A., Haslbeck, K.M., Humpert, P.M., Liliensiek, B., Dehmer, T., Morcos, M., Sayed, A.A., Andrassy, M., Schiekofer, S., Schneider, J.G., Schulz, J.B., Heuss, D., Neundörfer B., Dierl, S., Huber, J., Tritschler, H., Schmidt, A.M., Schwaninger, M., Haering, H.U., Schleicher E., Kasper, M., Stern, D.M., Arnold, B., Nawroth, P.P., 2004. Loss of pain perception in diabetes is dependent on a receptor of the immunoglobulin superfamily. *J. Clin. Invest.*, **114**, 1741-1751.
- [45] Huttunen, H.J., Rauvala, H., 2004. Amphoterin as an extracellular regulator of cell motility: from discovery to disease. *J. Intern. Med.*, **255**, 351-366.
- [46] Hori, O., Brett, J., Slattery, T., Cao, R., Zhang, J., Chen, J.X., Nagashima, M., Lundh, E.R., Vijay, S., Nitecki, D., Morser, J., Stern, D., Schmidt, A.M., 1995. The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a cellular binding site for amphoterin. Mediation of neurite outgrowth and co-expression of rage and amphoterin in the developing nervous system. *J. Biol. Chem.*, **270**, 25752-25761.
- [47] Huttunen, H.J., Fages, C., Kuja-Panula, J., Ridley, A.J., Rauvala, H., 2002. Receptor for advanced glycation end products-binding COOH-terminal motif of amphoterin inhibits invasive migration and metastasis. *Cancer Res.*, **62**, 4805-4811.
- [48] Park, J.S., Arcaroli, J., Yum, H.K., Yang, H., Wang, H., Yang, K.Y., Choe, K.H., Strassheim, D., Pitts, T.M., Tracey, K.J., Abraham, E., 2003. Activation of gene expression in human neutrophils by high mobility group box 1 protein. *Am. J. Physiol. Cell physiol.*, **284**, C870-C879.
- [49] Qiu, J., Nishimura, M., Wang, Y., Sims, J.R., Qiu, S., Savitz, S.I., Salomone, S., Moskowitz, M.A., 2008. Early release of HMGB-1 from neurons after the onset of brain ischemia. *J. Cereb.*

*Blood Flow Metab.*, **28**, 927-938.

- [50] Bonaldi, T., Talamo, F., Scaffidi, P., Ferrera, D., Porto, A., Bachi, A., Rubartelli, A., Agresti, A., Bianchi, M.E., 2003. Monocytic cells hyperacetylate chromatin protein HMGB1 to redirect it towards secretion. *EMBO J.*, **22**, 5551-5560.
- [51] Oh, Y.J., Youn, J.H., Ji, Y., Lee, S.E., Lim, K.J., Choi, J.E., Shin, J.S., 2009. HMGB1 is phosphorylated by classical protein kinase C and is secreted by a calcium-dependent mechanism. *J. Immunol.*, **182**, 5800-5809.
- [52] Scaffidi, P., Misteli, T., Bianchi, M.E., 2002. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature*, **418**, 191-195.
- [53] Kim, J.Y., Park, J.S., Strassheim, D., Douglas, I., Diaz, del. Valle. F., Asehnoune, K., Mitra, S., Kwak, S.H., Yamada, S., Maruyama, I., Ishizaka, A., Abraham, E., 2005. HMGB1 contributes to the development of acute lung injury after hemorrhage. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, **288**, L958-965.
- [54] Tsung, A., Sahai, R., Tanaka, H., Nakao, A., Fink, M.P., Lotze, M.T., Yang, H., Li, J., Tracey, K.J., Geller, D.A., Billiar, T.R., 2005. The nuclear factor HMGB1 mediates hepatic injury after murine liver ischemia-reperfusion. *J. Exp. Med.*, **201**, 1135-1143.
- [55] Goldstein, R.S., Gallowitsch-Puerta, M., Yang, L., Rosas-Ballina, M., Huston, J.M., Czura, C.J., Lee, D.C., Ward, M.F., Bruchfeld, A.N., Wang, H., Lesser, M.L., Church, A.L., Litroff, A.H., Sama, A.E., Tracey, K.J., 2006. Elevated high-mobility group box 1 levels in patients with cerebral and myocardial ischemia. *Shock*, **25**, 571-574.
- [56] Hreggvidsdottir, H.S., Ostberg, T., Wähämaa, H., Schierbeck, H., Aveberger, A.C., Klevenvall, L., Palmblad, K., Ottosson, L., Andersson, U., Harris, H.E., 2009. The alarmin HMGB1 acts in synergy with endogenous and exogenous danger signals to promote inflammation. *J. Leukoc. Biol.*, **86**, 655-662.
- [57] Dintilhac, A., Bernués, J., 2002. HMGB1 interacts with many apparently unrelated proteins by recognizing short amino acid sequences. *J. Biol. Chem.*, **277**, 7021-7028.
- [58] Tu, X.K., Yang, W.Z., Liang, R.S., Shi, S.S., Chen, J.P., Chen, C.M., Wang, C.H., Xie, H.S., Chen, Y., Ouyang, L.Q., 2011. Effect of baicalin on matrix metalloproteinase-9 expression and blood-brain barrier permeability following focal cerebral ischemia in rats. *Neurochem. Res.*, **36**, 2022-2028.
- [59] Justicia, C., Panés, J., Solé, S., Cervera, A., Deulofeu, R., Chamorro, A., Planas, A.M., 2003. Neutrophil infiltration increases matrix metalloproteinase-9 in the ischemic brain after occlusion/reperfusion of the middle cerebral artery in rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **23**, 1430-1440.
- [60] Yang, Q.W., Wang, J.Z., Li, J.C., Zhou, Y., Zhong, Q., Lu, F.L., Xiang, J., 2010. High-mobility group protein box-1 and its relevance to cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **30**, 243-254.
- [61] Muhammad, S., Barakat, W., Stoyanov, S., Murikinati, S., Yang, H., Tracey, K.J., Bendszus, M.,

- Rossetti, G., Nawroth, P.P., Bierhaus, A., Schwaninger, M., 2008. The HMGB1 receptor RAGE mediates ischemic brain damage. *J. Neurosci.*, **28**, 12023-12031.
- [62] Zhai, D.X., Kong, Q.F., Xu, W.S., Bai, S.S., Peng, H.S., Zhao, K., Li, G.Z., Wang, D.D., Sun, B., Wang, J.H., Wang, G.Y., Li, H.L., 2008. RAGE expression is up-regulated in human cerebral ischemia and pMCAO rats. *Neurosci. Lett.*, **445**, 117-121.
- [63] Pichiule, P., Chavez, J.C., Schmidt, A.M., Vannucci, S.J., 2007. Hypoxia-inducible factor-1 mediates neuronal expression of the receptor for advanced glycation end products following hypoxia/ischemia. *J. Biol. Chem.*, **282**, 36330-36340.
- [64] Yao, D., Brownlee, M., 2010. Hyperglycemia-induced reactive oxygen species increase expression of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) and RAGE ligands. *Diabetes*, **59**, 249-255.
- [65] Aragno, M., Mastrocola, R., Medana, C., Restivo, F., Catalano, M.G., Pons, N., Danni, O., Boccuzzi, G., 2005. Up-regulation of advanced glycated products receptors in the brain of diabetic rats is prevented by antioxidant treatment. *Endocrinology*, **146**, 5561-5567.
- [66] Qiu, J., Xu, J., Zheng, Y., Wei, Y., Zhu, X., Lo, E.H., Moskowitz, M.A., Sims, J.R., 2010. High-mobility group box 1 promotes metalloproteinase-9 upregulation through Toll-like receptor 4 after cerebral ischemia. *Stroke*, **41**, 2077-2082.
- [67] Yang, Q.W., Lu, F.L., Zhou, Y., Wang, L., Zhong, Q., Lin, S., Xiang, J., Li, J.C., Fang, C.Q., Wang, J.Z., 2011. HMGB1 mediates ischemia-reperfusion injury by TRIF-adaptor independent Toll-like receptor 4 signaling. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **31**, 593-605.
- [68] Hu, X., Cui, B., Zhou, X., Xu, C., Lu, Z., Jiang, H., 2012. Ethyl pyruvate reduces myocardial ischemia and reperfusion injury by inhibiting high mobility group box 1 protein in rats. *Mol. Biol. Rep.*, **39**, 227-231.
- [69] Su, X., Wang, H., Zhao, J., Pan, H., Mao, L., 2011. Beneficial effects of ethyl pyruvate through inhibiting high-mobility group box 1 expression and TLR4/NF- $\kappa$ B pathway after traumatic brain injury in the rat. *Mediators Inflamm.*, 807142.
- [70] Hagiwara, S., Iwasaka, H., Noguchi, T., 2007. Nafamostat mesilate inhibits the expression of HMGB1 in lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *J. Anesth.*, **21**, 164-170.
- [71] Zhang, J., Takahashi, H.K., Liu, K., Wake, H., Liu, R., Maruo, T., Date, I., Yoshino, T., Ohtsuka, A., Mori, S., Nishibori, M., 2011. Anti-high mobility group box-1 monoclonal antibody protects the blood-brain barrier from ischemia-induced disruption in rats. *Stroke*, **42**, 1420-1428.
- [72] Liu, K., Mori, S., Takahashi, H.K., Tomono, Y., Wake, H., Kanke, T., Sato, Y., Hiraga, N., Adachi, N., Yoshino, T., Nishibori, M., 2007. Anti-high mobility group box 1 monoclonal antibody ameliorates brain infarction induced by transient ischemia in rats. *FASEB J.*, **21**, 3904-3916.
- [73] Tang, D., Kang, R., Zeh, H.J. 3rd, Lotze, M.T., 2011. High-mobility group box 1, oxidative

- stress, and disease. *Antioxid Redox Signal.*, **14**, 1315-1335.
- [74] Kidwell C.S., Liebeskind D.S., Starkman S., Saver J.L., 2001. Trends in acute ischemic stroke trials through the 20th century. *Stroke*, **32**, 1349-1359.
- [75] Carswell, E.A., Old, L.J., Kassel, R.L., Green, S., Fiore, N., Williamson, B., 1975. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **72**, 3666-3670.
- [76] Ware, C.F., 2005. Network communications: lymphotoxins, LIGHT, and TNF. *Annu. Rev. Immunol.*, **23**, 787-819.
- [77] Lokuta, M.A., Huttenlocher, A., 2005. TNF-alpha promotes a stop signal that inhibits neutrophil polarization and migration via a p38 MAPK pathway. *J. Leukoc., Biol.*, **78**, 210-219.
- [78] Park, K.M., Bowers, W.J., 2010. Tumor necrosis factor-alpha mediated signaling in neuronal homeostasis and dysfunction. *Cell Signal.*, **22**, 977-983.
- [79] Fujikawa, K., Kawakami, A., Eguchi, K., 2007. Etanercept : recombinant human soluble tumor necrosis factor receptor fusion protein. *Nippon Rinsho*, **65**, 1211-1217.
- [80] 脳卒中治療ガイドライン 2009. 脳卒中合同ガイドライン委員会, 協和企画, 2009.
- [81] Yamamoto, I., 2004. Development of provitamin C agents, AA-2G and 6-Acyl-AA-2G, for the basic science research and clinical applications. *Vitamin.*, **78**, 127-140.
- [82] Gess, B., Sevimli, S., Strecker, J.K., Young, P., Schäbitz, W.R., 2011. Sodium-dependent vitamin C transporter 2 (SVCT2) expression and activity in brain capillary endothelial cells after transient ischemia in mice. *PLoS One*, **6**, e17139.
- [83] Jones, N.M., Bergeron, M., 2001. Hypoxic preconditioning induces changes in HIF-1 target genes in neonatal rat brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **21**, 1105-1114.
- [84] Flamm, E.S., Demopoulos, H.B., Seligman, M.L., Poser, R.G., Ransohoff, J., 1978. Free radicals in cerebral ischemia. *Stroke*, **9**, 445-457.
- [85] Rehncrona, S., Folbergrová, J., Smith, D.S., Siesjö, B.K., 1980. Influence of complete and pronounced incomplete cerebral ischemia and subsequent recirculation on cortical concentrations of oxidized and reduced glutathione in the rat. *J. Neurochem.*, **34**, 477-486.
- [86] Minamizono, A., Tomi, M., Hosoya, K., 2006. Inhibition of dehydroascorbic acid transport across the rat blood-retinal and -brain barriers in experimental diabetes. *Biol. Pharm. Bull.*, **29**, 2148-2150.
- [87] Seno, T., Inoue, N., Matsui, K., Ejiri, J., Hirata, K., Kawashima, S., Yokoyama, M., 2004. Functional expression of sodium-dependent vitamin C transporter 2 in human endothelial cells. *J. Vasc. Res.*, **41**, 345-351.
- [88] Trotti, R., Carratelli, M., Barbieri M., 2002. Performance and clinical application of a new, fast method for the detection of hydroperoxides in serum. *Panminerva Med.*, **44**, 37-40.
- [89] Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by

- thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.*, **95**, 351-358.
- [90] Tirkey, N., Kaur, G., Vij, G., Chopra, K., 2005. Curcumin, a diferuloylmethane, attenuates cyclosporine-induced renal dysfunction and oxidative stress in rat kidneys. *BMC Pharmacol.*, **15**, 5, 15.
- [91] Nakada, Y., Yokoyama, O., Komatsu, K., Komada, K., Yotsuyanagi, S., Niikura, S., Nagasaka, Y., Namiki M., 2000. Effects of aniracetam on bladder overactivity in rats with cerebral infarction. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **293**, 921-928.
- [92] Kaundal, R.K., Shah, K.K., Sharma, S.S., 2006. Neuroprotective effects of NU1025, a PARP inhibitor in cerebral ischemia are mediated through reduction in NAD depletion and DNA fragmentation. *Life. Sci.*, **79**, 2293-2302.
- [93] Kim, G.W., Gasche, Y., Grzeschik, S., Copin, J.C., Maier, C.M., Chan, P.H., 2003. Neurodegeneration in striatum induced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid: role of matrix metalloproteinase-9 in early blood-brain barrier disruption? *J. Neurosci.*, **24**, 8733-8742.
- [94] Youn, J.H., Shin, J.S., 2006. Nucleocytoplasmic shuttling of HMGB1 is regulated by phosphorylation that redirects it toward secretion. *Immunol.*, **177**, 7889-7897.
- [95] Kikuchi, K., Kawahara, K., Biswas, K.K., Ito, T., Tancharoen, S., Morimoto, Y., Matsuda, F., Oyama, Y., Takenouchi, K., Miura, N., Arimura, N., Nawa, Y., Meng, X., Shrestha, B., Arimura, S., Iwata, M., Mera, K., Sameshima, H., Ohno, Y., Maenosono, R., Yoshida, Y., Tajima, Y., Uchikado, H., Kuramoto, T., Nakayama, K., Shigemori, M., Hashiguchi, T., Maruyama, I. 2009. Minocycline attenuates both OGD-induced HMGB1 release and HMGB1-induced cell death in ischemic neuronal injury in PC12 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **385**, 132-136.
- [96] Kikuchi, K., Kawahara, K., Tancharoen, S., Matsuda, F., Morimoto, Y., Ito, T., Biswas, K.K., Takenouchi, K., Miura, N., Oyama, Y., Nawa, Y., Arimura, N., Iwata, M., Tajima, Y., Kuramoto, T., Nakayama, K., Shigemori, M., Yoshida, Y., Hashiguchi, T., Maruyama, I., 2009. The free radical scavenger edaravone rescues rats from cerebral infarction by attenuating the release of high-mobility group box-1 in neuronal cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **329**, 865-874.
- [97] Faraco, G., Fossati, S., Bianchi, M.E., Patrone, M., Pedrazzi, M., Sparatore, B., Moroni, F., Chiarugi, A., 2007. High mobility group box 1 protein is released by neural cells upon different stresses and worsens ischemic neurodegeneration in vitro and in vivo. *J. Neurochem.*, **103**, 590-603.
- [98] Meldrum, D.R., Shenkar, R., Sheridan, B.C., Cain, B.S., Abraham, E., Harken, A.H., 1997. Hemorrhage activates myocardial NFkappaB and increases TNF-alpha in the heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **29**, 2849-2855.
- [99] Aragno, M., Mastrocola, R., Medana, C., Restivo, F., Catalano, M.G., Pons, N., Danni, O., Boccuzzi, G., 2005. Up-regulation of advanced glycated products receptors in the brain of diabetic rats is prevented by antioxidant treatment. *Endocrinology*, **146**, 5561-5567.

- [100] Li, Z.G., Britton, M., Sima, A.A., Dunbar, J.C., 2004. Diabetes enhances apoptosis induced by cerebral ischemia. *Life Sciences*, **76**, 249-262.
- [101] Pan, C., Giraldo, G.S., Prentice, H., Wu, J.Y., 2010. Taurine protection of PC12 cells against endoplasmic reticulum stress induced by oxidative stress. *J. Biomed. Sci.*, **24**, 1:S17.
- [102] Jung, J.Y., Han, C.R., Jeong, Y.J., Kim, H.J., Lim, H.S., Lee, K.H., Park, H.O., Oh, W.M., Kim, S.H., Kim, W.J., 2007. Epigallocatechin gallate inhibits nitric oxide-induced apoptosis in rat PC12 cells. *Neurosci. Lett.*, **411**, 222-227.
- [103] Muranyi, M., Ding, C., He, Q., Lin, Y., Li, P.A., 2006. Streptozotocin-induced diabetes causes astrocyte death after ischemia and reperfusion injury. *Diabetes.*, **55**, 349-355.