脳梗塞治療におけるリポソーム DDS 製剤の有用性

Usefulness of Liposomal Neuroprotectants for the Treatment of Ischemic Stroke

福田 達也

静岡県立大学大学院 薬学研究院
医薬生命化学
〒422-8526
静岡市駿河区谷田 52-1

Tatsuya FUKUTA
Department of Medical Biochemistry,
University of Shizuoka Graduate
School of Pharmaceutical Sciences
52-1 Yada, Suruga-ku, Shizuoka
422-8526, Japan

浅井 知浩

静岡県立大学大学院 薬学研究院
医薬生命化学
〒422-8526
静岡市駿河区谷田 52-1

Tomohiro ASAI
Department of Medical Biochemistry,
University of Shizuoka Graduate
School of Pharmaceutical Sciences
52-1 Yada, Suruga-ku, Shizuoka
422-8526, Japan

奥 直人

静岡県立大学大学院 薬学研究院
医薬生命化学
〒422-8526
静岡市駿河区谷田 52-1

Naoto OKU
Department of Medical Biochemistry,
University of Shizuoka Graduate
School of Pharmaceutical Sciences
52-1 Yada, Suruga-ku, Shizuoka
422-8526, Japan

論文要旨：脳梗塞は本邦において死因別死亡率第4位，要介護に至る原因疾患の第1位である脳血管疾患の約6割を占め，世界的にも克服が望まれている。臨床では，唯一の世界的な治療薬である組織プラスミノゲン活性化因子（Tissue plasminogen activator；t-PA）製剤を用いた血栓溶解療法が，標準治療として行われている。しかし，t-PAは脳出血や脳細胞傷害を惹起する危険性に加え，有効な治療可能時間（Therapeutic time window；TTW）が発症4.5時間以内とされていることから，適応患者が限定されている。また血流再開後に生じる二次的な障害，脳虚血／再灌流障害も患者予後不良に至る一因として問題とされている。ゆえに，上記問題の改善を可能とする新たな脳保護薬の開発が切望されている。脳梗塞時の特徴的な現象として，虚血巣周辺における血液脳関門（Blood-brain barrier；BBB）の透過性亢進が挙げられる。我々はこれまでに，脳梗塞により生じたBBBの隙に注目し，ナノサイズのリポソームが脳虚血時，および再灌流後の早期から病巣部位へ移行することを見出してきた。また，再灌流後早期からのリポソーム DDS による脳保護薬デリバリーが，脳虚血／再灌流障害の治療に有用であることを，ラット脳梗塞モデルにおける検討から明らかとしてきた。さらに，t-PAによる血流再開を再現することが可能なモデルを用い，リポソーム DDS 製剤の血流再開前投与によって，脳出血への関与が知られるt-PAの有害効果を軽減，そしてTTWを延長できる可能性を示してきた。本稿では，我々が見出してきたリポソーム DDS 製剤を用いた脳梗塞治療の有用性について概説させて頂く。

Abstract: Ischemic stroke is a leading cause of severe disability and death in the world. Tissue plasminogen activator (t-PA) for thrombolytic therapy is the only approved therapeutic agent worldwide for acute ischemic stroke. However, patients received t-PA therapy are extremely limited due to the narrow therapeutic time window (TTW) and the risk of cerebral hemorrhage. In addition, cerebral ischemia/reperfusion (I/R) injury is a serious problem for the patient's prognosis. Hence, development of more effective therapies has been most desirable. As a distinctive phenomenon after an ischemic stroke, it has been reported that vascular permeability of the blood-brain barrier (BBB) is increased around the ischemic region. Our previous studies revealed that nano-sized liposomes can accumulate in the ischemic region via the disintegrated BBB and that liposomal delivery of neuroprotective agents should be effective for the treatment of cerebral I/R injury. In addition, our recent study demonstrated that combination treatment with liposomal neuroprotectants and t-PA could suppress the deleterious effects of t-PA and prolong its TTW in an ischemic stroke model rat prepared by the photochemically induced thrombosis method. In this review, we introduce our recent findings on ischemic stroke therapy by using liposomal drug delivery systems.

Key words: liposome, ischemic stroke, blood-brain barrier, tissue plasminogen activator, photochemically induced thrombosis

1 はじめに

脳血管障害は、我が国において死因別死亡率第4位、要介護に至る原因疾患第1位と克服が切望される疾患の1つであり、虚血性の脳梗塞がその約6割を占める。脳梗塞は血栓等により脳血管が閉塞され虚血が生じ、壊死に至る病態である。脳梗塞発症時に、重度の血流不全により不可逆的な細胞死に至る虚血コア領域の周辺には、適切な血流再開や脳保護により、細胞死から可逆的に保護することが可能とされるペナンプラ領域が存在する¹⁾。臨床においては、組織プラスミノゲン活性化因子 (Tissue plasminogen activator ; t-PA) 製剤による血栓溶解療法が超急性期の標準治療として行われ、適切な血流再開はペナンプラ領域を救うことができる。しかし、t-PAは投与開始が遅延するに伴い、致死性の副作用である脳出血や脳細胞傷害を惹起する危険性等から、有効な治療可能時間 (Therapeutic time window ; TTW) は発症4.5時間以内とされており、適応患者は極めて限定されている。また、t-PA療法や外科的手術、カテーテルやステントを用いた血管内治療により血流が再開し、虚血を脱したとしても、酸化ストレスや炎症等起因する二次的な障害、脳虚血/再灌流障害が生じ、さらなる脳障害、患者予後の悪化につながる²⁾。脳虚血や再灌流に伴う障害の抑制を可能とする脳保護薬としてラジカルスカベンジャーのエダラボンが認可されているものの、日本や中国、インドといった国のみの適応となっており³⁾、世界で標準的に用いられている治療薬はt-PAのみである。したがって、t-PA療法の問題の改善、さらには虚血/再灌流障害の抑制を可能とする新規治療薬の開発が求められている。

全身投与による脳への薬物送達を考えた際に、脳の恒

常性維持に寄与している血液脳関門 (Blood-brain barrier ; BBB) が障壁となる。これまで開発されてきた種々の候補化合物はBBBの透過性の乏しさに起因する低薬効や、非特異的な薬剤分布による予期せぬ副作用が臨床試験に向けて問題とされてきた⁴⁾。これらの問題を解決するには、標的指向性の付与や投与量の低減を可能とするリポソーム薬物送達システム (Drug delivery system ; DDS) の応用が有用な手段と考え、我々は研究を進めてきた。脳梗塞時の特徴的な現象として虚血巣周辺においてBBBの破綻が生じ、その透過性が亢進することが実験動物・ヒトにおいて報告されている^{5, 6)}。がん治療DDSにおいては、不完全で脆弱な構造をしている腫瘍新生血管の間隙を利用したEnhanced permeability and retention (EPR) 効果によるパッシブターゲティングが有用な戦略として知られているが、同様な機構による脳梗塞部位への薬物送達が、リポソームを用いることにより達成される可能性がある (Fig. 1A)。本稿では、リポソームDDSを用いた脳梗塞治療薬開発に関する我々の知見について紹介する。

2 脳虚血/再灌流部位へのリポソーム集積

本研究では、ナイロン栓子の中大脳動脈への挿入・引き抜きにより脳虚血/再灌流を誘導することが可能な、栓子法による一過性中大脳動脈閉塞 (Transient middle cerebral artery occlusion ; t-MCAO) ラットを脳梗塞モデル動物として用い⁷⁾、検討を進めてきた。虚血時間を1時間に設定し、初めに脳虚血/再灌流後の脳細胞傷害の経時的推移を2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride (TTC) 染色により観察した。その結果、虚血側半球での明らかな脳細胞傷害は、再灌流3時間後から観察され、その後は時間経過に伴う傷害の拡大が認められた。そこ

で、約 100 nm 径に調整したポリエチレングリコール (Polyethylene glycol ; PEG) 修飾リポソームを蛍光標識し、再灌流後各時間に静脈内投与を行い、その 1 時間後の脳内分布を蛍光イメージングにより観察した。虚血側半球におけるリポソームの集積は再灌流直後の投与から観察され、その後 3 時間後まで集積域の増大が認められた (Fig. 1B)。これらの結果から、脳虚血／再灌流による顕著な脳細胞死が生じる以前の再灌流後早期から BBB が破綻し、その間隙を介して、リポソームによる病巣部位選択的な薬物送達が可能であることが考えられる。さらに、再灌流直後に投与した PEG リポソームはその 24 時間後においても虚血部位へ滞留している様子が認められ (Fig. 1C)、EPR 効果と同様な機構によるリポソームの蓄積が示唆された。以上の結果より、再灌流後早期から虚血部位へリポソームによって脳保護薬を送達することにより、脳虚血／再灌流障害からペナンプラ領域を効果的に保護できる可能性が示された⁸⁾。

3 リポソーム化脳保護薬を用いた脳虚血／再灌流障害治療

上記の結果を踏まえ、脳保護薬として強力な抗アポトーシス効果を有する Asialo-erythropoietin (AEPO) をリポソームに搭載し、脳虚血／再灌流障害治療に対する治療効果を t-MCAO ラットを用いて検討した。AEPO は、神経細胞やグリア細胞等の細胞膜表面に発現する EPO 受容体に結合することでその効果を発揮することから、障害部位へ移行後の速やかな薬効発現を期待し、リポソーム表面の PEG 先端に修飾することとした (Fig. 2A)。AEPO は血中半減期が極めて短いことから、十分な脳保護効果を発揮するうえでは高用量または頻回投与が必要とされていたが、リポソーム化によって血中滞留性の向上、および障害部位への到達量増加が期待できる。実際に、 $[^{125}\text{I}]$ で標識した AEPO を用い、再灌流直後にリポソーム化 AEPO ($[^{125}\text{I}]$ AEPO-Lip) を投与し、その体内動態を解析したところ、再灌流 3、24 時間後において遊離の $[^{125}\text{I}]$ AEPO と比較して有意に高い血中滞留性、および虚血側半球への集積が認められた。また脳凍結切片を作製し、詳細な分布を免疫組織学的に観察したところ、虚血側半球においてのみ AEPO-Lip の血管外への漏出が認められ、血管内皮細胞や神経細胞周辺への顕著な集積が観察された。脳虚血／再灌流後には神経細胞や脳血管内皮細胞において EPO 受容体の発現上昇が知られており、リポソーム表面への AEPO 修飾はそれら細胞への標的化に寄与したことが推察される。さらに、AEPO-Lip の t-MCAO ラットにおける治療効果を評価したところ、対照群と比較して抗

アポトーシス効果を介して有意に高い脳保護効果を示し (Fig. 2B)、脳梗塞患者の予後に大きく影響する運動能低下の改善も認められた (Fig. 2C)。これらの結果より、AEPO-Lip が脳虚血／再灌流障害治療に有効であることが示唆された^{8, 9)}。

また我々は、AEPO の他にも脳梗塞に対する保護効果が報告されている低分子医薬品のリポソーム化製剤を用い、再灌流障害治療へ応用してきた。具体的には免疫抑制剤として上市されているタクロリムス (FK506)、および脳血管障害の 1 つに分類されるくも膜下出血の手術後の脳血管攣縮治療薬である塩酸ファスジル (Fasudil) をリポソーム化した。いずれの薬剤をリポソームに保持させた場合にも、遊離の薬剤と比較して高い脳保護効果を有するという結果を得た^{10, 11)}。以上より、脳保護薬のリポソーム化は脳梗塞部位への効率的な薬物送達を実現する手段として有用であることが考えられ、リポソーム DDS による治療戦略が脳虚血／再灌流障害治療に有用であることが示唆された。

4 リポソームの虚血時投与による脳保護薬デリバリー

これまで脳梗塞からの血流再開後にリポソームによって脳保護薬をデリバリーすることで、脳虚血／再灌流障害を抑制できることを示してきた。一方、脳梗塞治療における臨床のニーズとしては、脳虚血／再灌流障害の克服に加え、標準治療である t-PA 製剤による脳への有害作用の緩和、そして短い TTW の延長が挙げられる。臨床において、t-PA の適応を決定するまでには脳梗塞が疑われる患者の脳出血の有無、梗塞部位を特定するための診断を行う等の過程があり、患者の病院への到着から最低でも 1 時間を要するとされている。t-PA 投与開始が遅延した場合には、脳組織へ移行した t-PA が更なる BBB の破綻や障害を引き起こし、出血や患者予後不良に繋がる可能性がある。脳梗塞時の BBB の透過性亢進は、再灌流後のみならず虚血時においても生じることが報告されていることから、t-PA による血流再開前の虚血後早期よりリポソームを用いて脳保護薬を送達することで、BBB および脳組織の保護が可能となれば、t-PA の有害作用や再灌流障害の抑制、それによる TTW の延長が期待できる。また、t-PA が適応できず、他の処置を行うことになった患者に対しても、虚血時から脳を保護することで予後改善に寄与することが考えられる。そこでまず、粒子径約 100 nm に調整した蛍光標識リポソームを MCAO ラットに対して虚血 1 時間後に静脈内投与し、栓子を引き抜かず虚血状態を維持させ、投与 1 時間後に脳スライスを作製後、蛍光イメージングを実施した。その結果、非虚血側半球と比較して虚血側において

リポソームの高い蛍光が認められ、共焦点顕微鏡による組織切片の観察から、リポソームが血管外へ漏出している様子が認められた。また、当研究室で確立された 1- ^{18}F Fluoro-3, 6-dioxatetracosane を用いた Solid-phase transition 法により PEG リポソームをポジトロン放出核種で標識し、虚血時に静脈内投与した後の脳内分布を、Positron emission tomography (PET) により観察した。投与後早期は梗塞部位において血流低下によるシグナルの減弱が認められたものの、時間経過とともにシグナル強度の増加が認められた (Fig. 3A)。また ^3H Cholesteryl hexadecyl ether で PEG リポソームを放射標識し、その脳内分布を解析した結果からも同様のリポソームの集積が観察された (Fig. 3B)。これらの結果より、脳虚血後早期から虚血コア領域およびその周辺のペナンプラ領域への、リポソームによる脳保護薬送達が可能であることが示唆された¹²⁾。虚血領域へリポソームが移行する詳細なメカニズムは明らかではないが、虚血巣周辺で形成された側副血行路や中大脳動脈由来のわずかな血流 (虚血コアは通常の <20%, ペナンプラ領域は 20-40% との報告もある¹³⁾), あるいは脳浮腫を引き起こす原因でもある血漿の流れによってリポソームが脳組織へ移行している可能性を考えている。

そこで次に、脳虚血後に生じるカルシニューリンの活性化を阻害することで脳保護効果を発揮する FK506 のリポソーム化製剤 (FK-Lip) を用い、リポソームによる虚血時からの脳保護薬送達の有用性について検討した。なお、MCAO ラットの虚血時間は 2 時間とし、臨床における血栓溶解療法を模倣するため、栓子を引抜き再灌流させた。また、リポソームの投与は再灌流 1 時間前に実施した。本スケジュールにて、虚血 24 時間後における脳保護効果を TTC 染色により評価したところ、FK-Lip 投与群は対照の PBS 投与群、同用量の FK506 投与群と比較して有意に脳細胞傷害を抑制した。また、その脳保護効果は特に虚血コアから比較的遠位に位置する皮質領域において顕著であったため、脳虚血/再灌流の病態進行に寄与する活性酸素種の一つであるスーパーオキシドアニオン (O_2^-) の産生に対する効果を評価した。その結果、再灌流 3 時間後という早期の時間から、皮質領域における O_2^- の産生が有意に抑制されており、虚血時に投与した FK-Lip が有効に作用することで、再灌流後の傷害の拡大を効果的に抑制したことが考えられる。また、 O_2^- などの活性酸素種は BBB の破綻にも関与することから、t-PA による血栓溶解療法後に誘発される脳出血に対しても抑制効果を発揮することが期待される。以上の結果より、再灌流後のみならず、血流再開前の虚血時からリポソームを用いた脳保護薬送達が有効

であることが示唆された¹⁴⁾。

5 Photochemically induced thrombosis 法によるモデルラットにおけるリポソームの脳内挙動

ここまでは、栓子法による脳梗塞モデルを用いて、リポソーム DDS の有用性を明らかとした検討について紹介させて頂いた。栓子法で作製したモデルは、ナイロン栓子の中大脳動脈起始部への挿入、引抜きにより容易に脳虚血/再灌流を誘導できることから、脳梗塞モデルとして汎用されている。一方、栓子法モデルでは、血栓溶解剤 t-PA を用いた血流再開を再現できないといった難点がある。t-PA による血栓溶解療法は治療可能時間 (TTW) 以内に開始できれば脳梗塞による障害を効果的に抑制できるとされているが、投与開始が遅延した場合においては、致死性の副作用である脳出血のリスクの増大や脳細胞傷害の誘発が報告されている¹⁵⁾。したがって、脳保護薬の有用性を評価するにあたり、t-PA による影響を考慮した検討を行うことは重要である。実際、これまでの脳梗塞治療に向けた種々の脳保護薬開発の失敗の歴史を経て、候補化合物単剤による有用性のみならず t-PA との併用効果の検討が、臨床応用に向けた必須な取り組みであるとされている¹⁶⁾。そこで我々は、t-PA を用いた再灌流を再現できる脳梗塞モデルとして Photochemically induced thrombosis (PIT) 法による MCAO ラットを導入し、リポソーム製剤と t-PA の併用療法の有用性を明らかにすべく、検討を行った (Fig. 4A)。PIT 法によるモデルは、光増感反応により血管内に人工的に血栓を形成させるもので、その形成過程がヒトの虚血性疾患の病態 (血管内皮の傷害、血小板の活性化・凝集など) と類似していることが知られている¹⁷⁾。また、齧歯類のような小動物からサルなどの大動物まで応用可能であることから、基礎から臨床への橋渡しをする際のトランスレーショナルリサーチに適しているモデルとされている。よって、PIT 法によるモデルにおいてリポソーム DDS の有用性を明らかにすることは、脳梗塞部位を標的としたリポソーム製剤の臨床応用への基盤構築に繋がることを期待される。まず PIT 法による MCAO ラットにおいて、リポソームによる虚血部位への脳保護薬送達が可能かどうかを検討した。粒子径約 100 nm の蛍光標識した PEG リポソームを梗塞後各時間に静脈内投与し、その 1 時間後の脳内分布を in vivo imaging system (IVIS) により解析した。加えて、リポソームの投与時間を変化させたときの脳細胞傷害の程度を TTC 染色によって観察した。その結果、栓子法による MCAO ラットにおける検討に類似して、TTC 染色による顕著な傷害が認められる以前の虚血後早期から、虚血側半球にお

けるリポソームの集積が認められた(Fig. 4B)。また ^3H 標識 PEG リポソームを用いた検討から、虚血1時間後に静脈内投与したリポソームの虚血部位への経時的な集積が認められた。これらの結果から、PIT モデルにおいて t-PA による血流再開前から、リポソームによる虚血部位への脳保護薬送達が可能であることが示唆された¹⁸⁾。

6 リポソーム製剤と血栓溶解剤の併用療法

脳保護薬搭載リポソームと t-PA の併用効果を検討するにあたり、PIT モデルにおいて t-PA 処置が有意な脳保護効果を示す時間、すなわち治療可能時間 (TTW) を虚血24時間後における脳細胞傷害を指標に評価した。その結果、虚血2時間後までの t-PA 処置によって対照群と比較して有意な脳保護効果が認められた一方、虚血3時間後の投与では治療効果はわずかであり、広域にわたる傷害が観察された。これらの結果から、PIT モデルにおける t-PA の TTW は虚血2時間程度であることが示唆された。したがって以降の検討では t-PA の投与時間を虚血3時間後に設定し、リポソーム製剤との併用効果を検討した。また、脳保護薬として脳梗塞治療への有用性が報告され、臨床試験第Ⅲ相まで進んだ背景もある Rho-kinase 阻害剤ファスジル (Fasudil) を用いた。ファスジルはくも膜下出血後の脳血管攣縮治療に用いられている。脳梗塞後には Rho-kinase が活性化し、炎症細胞の浸潤や酸化ストレス、血管内皮細胞の傷害が生じるとの報告がある¹⁹⁾。また、t-PA により生じるプラスミンが Rho-kinase を活性化させ、脳出血への関与が知られる Matrix metalloproteinase (MMP)-2,9 の活性化や BBB の破綻が促進されるとの報告も成されている^{20, 21)}。したがって、ファスジルは Rho-kinase 阻害による神経細胞保護効果のみならず、t-PA 処置による出血性増大に関与する有害作用を抑制できることが期待される。そこでまず、t-PA 処置による BBB の透過性への影響と、リポソーム化ファスジル (Fasudil-Lip) の血管保護効果について検討した。また、Fasudil-Lip は虚血1時間後に静脈内投与し、BBB の透過性は脳を摘出する1時間前に静脈内投与したエバンスブルーの脳実質への漏出量を指標に評価した。その結果、虚血6, 24時間後において、t-PA によって BBB の透過性亢進が認められた一方、Fasudil-Lip 併用群では6時間後においてその亢進が抑制されている傾向が観察され、24時間後においては有意に抑制されていた。また、MMP-2,9 の活性を組織学的に観察したところ、t-PA 処置によって広域にわたる活性の増大が認められた。一方、Fasudil-Lip の併用により、特に虚血コアより離れた周辺領域において MMP の活性が抑制された。これらの結果から、Fasudil-Lip

の併用によって、t-PA により誘発される脳出血性の増大が抑制できることが示唆された。また同領域においては、脳梗塞急性期の炎症への関与が特に報告されている好中球の浸潤が抑制されている様子も観察された。次に、t-PA/Fasudil-Lip 併用療法による治療効果を評価したところ、虚血24時間後において併用投与群は各単独投与群と比較して有意に脳細胞傷害を抑制した (Fig. 5)。さらに、t-PA の投与時間を虚血3時間後から4.5時間後と遅くした場合においても t-PA/Fasudil-Lip 併用群は有意に高い脳保護効果を示し、PIT モデルにおいて2時間後程度と同定された t-PA の TTW が4.5時間となり、少なくとも2時間以上延長できる可能性が示された。これらの結果から、t-PA 処置前からのリポソームによる脳保護薬送達によって、臨床における t-PA 療法の問題を改善できる可能性が示され、リポソーム DDS 製剤と血栓溶解剤の併用療法が脳梗塞治療に有用であることが示唆された¹⁸⁾。

7 おわりに

本稿では、我々が行ってきたリポソーム DDS を用いた脳梗塞治療に関する研究を紹介させて頂いた。脳梗塞時の BBB の透過性亢進は、実験動物のみならず患者においても生じることが報告されている^{6, 22)}。したがって、BBB の間隙を利用したリポソーム DDS による脳梗塞治療戦略は、ヒトにも応用できることが期待される。また、薬剤をリポソーム脂質膜へ修飾したり、膜中あるいは内水相に内封など、薬剤の物性に合わせたリポソームへの搭載が可能であることから、種々の候補化合物への適用性がある。最近、「リポソーム製剤の開発に関するガイドライン」が発表され、その開発、臨床応用を推進する基盤が作られてきた。今後更なる研究成果が蓄積することで、リポソーム DDS による治療戦略が、難航する新規脳保護薬の創出に向けた一助となることを期待する。

謝 辞

本研究遂行に当たり、PET 測定と解析、および PIT モデルの作製指導等でお世話になりました浜松ホトニクス株式会社塚田秀夫博士に感謝いたします。また FK506 をご供与頂きましたアステラス製薬株式会社、Fasudil chloride をご供与頂きました旭化成ファーマ株式会社、リポソーム脂質をご供与頂きました日本精化株式会社に感謝いたします。研究を遂行した石井貴之博士ほか、学部・大学院学生に感謝します。尚、この研究は科学研究費補助金 (No. 16H05081, 14J10730)、および平成27年度公益財団法人三菱財団自然科学研究助成 (No. 27108) の支援の下に行われました。

Fig. 1 脳虚血／再灌流後における BBB の透過性亢進とリポソームの脳内分布 (A) スキーム, (B) upper 虚血再灌流 0 h, 3 h 後の脳切片 TTC 染色 (矢印は傷害部位) lower 虚血再灌流 0 h, 3 h 後に投与した蛍光標識リポソームの分布 (C) 虚血再灌流 0 h 後に投与したリポソームの 24 時間後の残留状態

Fig. 2 AEPO 修飾リポソームによる脳虚血／再灌流障害の治療効果 (A) AEPO リポソームのスキーム, (B) 虚血再灌流後薬剤等を投与し, 24 時間後の脳切片 TTC 染色 (白色が障害部位) (C) 虚血再灌流後薬剤等を投与し, 図に示す日数後に運動能評価 (21 ポイントが正常値)

文 献

- Lo, E. H. A new penumbra: transitioning from injury into repair after stroke. *Nat. Med.* **14**, 497-500 (2008).
- Iadecola, C.; Anrather, J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nat. Med.* **17**, 796-808 (2011).
- Hishida, A. Clinical analysis of 207 patients who developed renal disorders during or after treatment with edaravone reported during post-marketing surveillance. *Clin. Exp. Nephrol.* **11**, 292-296 (2007).
- Moretti, A.; Ferrari, F.; Villa, R. F. Neuroprotection for ischaemic stroke: current status and challenges. *Pharmacol. Ther.* **146**, 23-34 (2015).
- Fagan, S. C.; Hess, D. C.; Hohnadel, E. J.; Pollock, D. M.; Ergul, A. Targets for vascular protection after acute ischemic stroke. *Stroke* **35**, 2220-2225 (2004).
- Latour, L. L.; Kang, D. W.; Ezzeddine, M. A.; Chalela, J. A.; Warach, S. Early blood-brain barrier disruption in human focal brain ischemia. *Ann. Neurol.* **56**, 468-477 (2004).
- Nagasawa, H.; Kogure, K. Correlation between cerebral blood flow and histologic changes in a new rat model of middle cerebral artery occlusion. *Stroke* **20**, 1037-1043 (1989).
- Ishii, T.; Asai, T.; Oyama, D.; Fukuta, T.; Yasuda, N.; Shimizu, K.; Minamino, T.; Oku, N. Amelioration of ce-

Fig. 3 脳虚血時に静脈内投与したリポソームの脳内挙動

Fig. 4 PIT 法による脳梗塞モデルにおけるリポソームの虚血部位への集積
(A) PIT 法のスキーム, (B) 虚血後各時間におけるの脳切片 TTC 染色 (左図) 及びリポソームの集積 (右図)

Fig. 5 t-PA/Fasudil リポソーム併用療法による脳保護効果

- rebral ischemia-reperfusion injury based on liposomal drug delivery system with asialo-erythropoietin. *J. Control. Release* **160**, 81-87 (2012).
- 9) Ishii, T.; Asai, T.; Fukuta, T.; Oyama, D.; Yasuda, N.; Agato, Y.; Shimizu, K.; Minamino, T.; Oku, N. A single injection of liposomal asialo-erythropoietin improves motor function deficit caused by cerebral ischemia/reperfusion. *Int. J. Pharm.* **439**, 269-274 (2012).
 - 10) Ishii, T.; Asai, T.; Oyama, D.; Agato, Y.; Yasuda, N.; Fukuta, T.; Shimizu, K.; Minamino, T.; Oku, N. Treatment of cerebral ischemia-reperfusion injury with PEGylated liposomes encapsulating FK506. *FASEB J.* **27**, 1362-1370 (2013).
 - 11) Fukuta, T.; Asai, T.; Sato, A.; Namba, M.; Yanagida, Y.; Kikuchi, T.; Koide, H.; Shimizu, K.; Oku, N. Neuroprotection against cerebral ischemia/reperfusion injury by intravenous administration of liposomal fasudil. *Int. J. Pharm.* **506**, 129-137 (2016).
 - 12) Fukuta, T.; Ishii, T.; Asai, T.; Nakamura, G.; Takeuchi, Y.; Sato, A.; Agato, Y.; Shimizu, K.; Akai, S.; Fukumoto, D.; Harada, N.; Kawaguchi, A.T.; Oku, N. Real-time trafficking of PEGylated liposomes in the rodent focal brain ischemia analyzed by positron emission tomography. *Artif. Organs* **38**, 662-666 (2014).
 - 13) Belayev, L.; Khoutorova, L.; Atkins, K. D.; Eady, T. N.; Hong, S.; Lu, Y.; Obenaus, A.; Bazan, N. G. Docosahexaenoic acid therapy of experimental ischemic stroke. *Transl. Stroke Res.* **2**, 33-41 (2011).
 - 14) Fukuta, T.; Ishii, T.; Asai, T.; Sato, A.; Kikuchi, T.; Shimizu, K.; Minamino, T.; Oku, N. Treatment of stroke with liposomal neuroprotective agents under cerebral ischemia conditions. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **97**, 1-7 (2015).
 - 15) Wang, W.; Li, M.; Chen, Q.; Wang, J. Hemorrhagic transformation after tissue plasminogen activator reperfusion therapy for ischemic stroke: mechanisms, models, and biomarkers. *Mol. Neurobiol.* **52**, 1572-1579 (2015).
 - 16) O'Collins, V. E.; Macleod, M. R.; Donnan, G. A.; Howells, D. W. Evaluation of combination therapy in animal models of cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **32**, 585-597 (2012).
 - 17) Umemura, K.; Higo, K.; Sakata, T.; Yuki, S.; Iwata, K.; Yamaguchi, K. Effects of alteplase, a thrombolytic agent, in a rat photothrombotic middle cerebral artery occlusion model. *Pathophysiol. Haemost. Thromb.* **36**, 245-250 (2008).
 - 18) Fukuta, T.; Asai, T.; Yanagida, Y.; Namba, M.; Koide, H.; Shimizu, K.; Oku, N. Combination therapy with liposomal neuroprotectants and tissue plasminogen activator for treatment of ischemic stroke. *FASEB J.* **31**, in press (2017).
 - 19) Mueller, B. K.; Mack, H.; Teusch, N. Rho kinase, a promising drug target for neurological disorders. *Nat. Rev. Drug Discov.* **4**, 387-398 (2005).
 - 20) Niego, B.; Freeman, R.; Puschmann, T. B.; Turnley, A. M.; Medcalf, R. L. t-PA-specific modulation of a human blood-brain barrier model involves plasmin-mediated activation of the Rho kinase pathway in astrocytes. *Blood* **119**, 4752-4761 (2012).
 - 21) Ishiguro, M.; Kawasaki, K.; Suzuki, Y.; Ishizuka, F.; Mishiro, K.; Egashira, Y.; Ikegaki, I.; Tsuruma, K.; Shimazawa, M.; Yoshimura, S.; Iwama, T.; Hara, H. A Rho kinase (ROCK) inhibitor, fasudil, prevents matrix metalloproteinase-9-related hemorrhagic transformation in mice treated with tissue plasminogen activator. *Neuroscience* **220**, 302-312 (2012).
 - 22) Simpkins, A.; Dias, C.; Leigh, R. National Institutes of Health Natural History of Stroke Investigators. Identification of reversible disruption of the human blood-brain barrier following acute ischemia. *Stroke* **47**, 2405-2408 (2016).