

## 脳梗塞及び脳出血に対する抗血小板剤シロスタゾールの保護作用

石黒光紀,<sup>a,b</sup> 原 英彰<sup>\*,a</sup>**Protective Effects of Cilostazol against Transient Focal Cerebral Ischemia and Hemorrhagic Transformation**Mitsunori ISHIGURO<sup>a,b</sup> and Hideaki HARA<sup>\*,a</sup>

<sup>a</sup>Molecular Pharmacology, Department of Biofunctional Evaluation, Gifu Pharmaceutical University, 1-25-4 Daigaku-nishi, Gifu 501-1196, Japan, and <sup>b</sup>Departments of Neurosurgery, Gifu University Graduate School of Medicine, 1-1 Yanagido, Gifu 501-1194, Japan

(Received October 13, 2010)

Cilostazol, a selective inhibitor of phosphodiesterase III, is an antiplatelet drug and a vasodilator *via* increased cAMP levels. It has been approved for the treatment of ischemic symptoms in chronic peripheral arterial obstruction or intermittent claudication and for secondary prevention of cerebral infarction (CSPS I). Recently, cilostazol has been reported to be more effective than aspirin in the secondary prevention of all types of stroke in patients and, in particular, prevent the secondary attack of hemorrhagic stroke in patients (CSPS II). Laboratory investigations revealed that cilostazol has a neuroprotective effect against ischemic brain injury. The neuroprotective potential is dependent on its antiinflammatory and antiapoptotic effects mediated by scavenging hydroxyl radicals, decreasing formation of tumor necrosis factor- $\alpha$ , and inhibition of poly (ADP-ribose) polymerase activity. In addition, increasing evidence indicates that cilostazol may offer endothelial protection *via* both the inhibition of lipopolysaccharide-induced apoptosis and induced nitric oxide (NO) production by endothelial NO synthase activation. The breakdown of the barrier permeability of the blood brain barrier (BBB) often accelerates the progression of diseases such as cerebral ischemia. However, the molecular mechanisms involved in BBB disruption have not been fully determined. Identification of the molecules responsible for the disruption of the endothelial barrier may yield new therapeutic targets in intractable diseases. This article reviews the protective effects of cilostazol against transient focal cerebral ischemia and hemorrhagic transformation and its mechanism of action.

**Key words**—cilostazol; endothelial protection; hemorrhagic transformation; neuroprotection; neurovascular unit; tissue plasminogen activator (tPA)

**1. はじめに**

脳卒中は日本人の死因の第3位であり、日本人の全死亡数の約12%を占めている疾患である。また、総患者数は現在約270万人おり、毎年27万人（うち20万人が脳梗塞）が新たに発症すると報告されている。年々死亡率は医療の進歩によって減少しているものの重度介護を要する症例の3割近くが脳卒中などの脳血管疾患であり、全国民医療費の1割近くが脳卒中診療に費やされている。今後も高齢者の激増や、糖尿病、高脂血症などの生活習慣病の増

加により、脳卒中の患者は2020年には300万人を超すことが予想され、少子高齢化の続く2025年頃までは増加していくと予測されている。

脳卒中にはくも膜下出血、脳出血、脳梗塞の3つのタイプがあり、脳卒中データバンク2009によると、脳卒中全体の75.4%を脳梗塞が占めている。<sup>1)</sup> 心臓から脳に向かう血管が詰まると、酸素とブドウ糖が脳に供給されなくなり、エネルギー備蓄能に乏しい脳は血流が乏しくなると即座に梗塞をきたす。救急車で病院に搬送された時には、もはや梗塞のコア部分は壊死しており救済はできない。しかし、梗塞巣周囲には、虚血に陥り機能は低下していてもまだ壊死していないpenumbra周辺領域がある。この領域を救済する方法として、わが国でも、2005年10月より発症3時間以内の急性期脳梗塞患者に対

<sup>a</sup>岐阜薬科大学生体機能解析学大講座薬効解析学研究室 (〒501-1196 岐阜市大学西1-25-4), <sup>b</sup>岐阜大学医学部脳神経外科学講座 (〒501-1194 岐阜市柳戸1-1)

\*e-mail: hidehara@gifu-pu.ac.jp

本総説は、日本薬学会第130年会シンポジウムS47で発表したものを中心に記述したものである。

して血栓溶解 (tissue plasminogen activator; tPA 静注療法) 治療が始まり、積極的治療の対象となった。その治療により恩恵を受けられる患者さんが出てきているものの、実際の臨床現場ではまだまだ問題点が多く残されている。例えば、治療可能な時間が発症 3 時間以内と短く、tPA が劇的に奏功する脳梗塞の適応症例は 20 例中 1 例程度とも言われており (最近、4.5 時間以内であれば 3 時間以内と同程度の安全性が得られるという成績が報告されており、海外のガイドラインにもそれが反映されつつある)、<sup>2)</sup> 虚血下において刻々進行する神経機能障害や、非可逆的脳損傷をいかにして抑制し tPA 投与までの治療適応時間枠 (therapeutic time window) を広げるかという大きな問題は残されたままである。現状では、脳保護療法を併用し、これらの障害を抑制することは、より現実味を帯びた治療コンセプトである。また、脳保護は血管が再開通した際に生じる出血性変化をいかに抑制するかとも係わりが深いと言われている。例えば、血流再開に伴ってスーパーオキシドが生じ、細胞外基質を壊すような matrix metalloproteinase (MMP)-9 が増え、易出血性となることも報告されており、<sup>3)</sup> 再灌流障害の抑制という点からも脳保護薬を併用することは必要と考えられる。

## 2. Cilostazol (CSZ) の脳梗塞に対する臨床成績

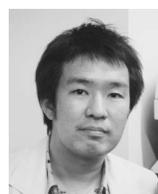
CSZ は、米国では末梢動脈疾患 (間欠性跛行) のみの適応承認であるが、日本人の脳梗塞 (心原性脳塞栓症を除く) 患者 1034 例を対象に脳梗塞の再発抑制を検討した試験 CSPS I (Cilostazol Stroke Prevention Study I) において、プラセボ群に比較して 40.3% ( $p=0.0205$ , Log-rank 検定) 有意に脳梗塞再発のリスクを軽減したことから、<sup>4)</sup> 脳梗塞の再発抑制に汎用されている抗血小板剤であり、脳卒中ガイドラインでも推奨されている薬剤である。また、米国にて行われた末梢動脈疾患患者を対象とした、CSZ 長期内服における試験 Cilostazol: A Study in Long-term Effects (CASTLE) においても心イベント発症を増加させることなく、脳血管イベント (脳卒中、TIA など) 発症リスクはプラセボ群と比較して有意に減少させた ( $p=0.029$ , Kaplan-Meier analysis)。<sup>5)</sup>

最近、脳梗塞患者の脳卒中再発予防における CSZ の有用性を世界で最もよく使用されている抗

血小板剤である aspirin (ASA) と比較検討した大規模臨床試験 CSPS II の成績が、最近報告された。<sup>6)</sup> 発症後 26 週以内の非心原性脳梗塞患者 2757 例を CSZ (100 mg を 1 日 2 回投与) 又は ASA (81 mg を 1 日 1 回投与) による治療に double-dummy 法を用いて無作為割付し、1-5 年間治療を継続、脳卒中発症に対する抑制効果及び安全性を比較するというものである。CSPS II では、一次エンドポイントのハザード比は 0.743 (95% 信頼区間: 0.564-0.981) であり、CSZ の ASA に対する非劣性が証明されただけでなく、CSZ 群の脳卒中再発率は ASA 群に比べ有意に低いことが証明された ( $p=0.0357$ , Log-rank 検定)。出血性イベントとしては脳出血、くも膜下出血及び入院を要する出血を集計したが、発症例数は CSZ 群 23 例 (年間発症率 0.77%)、ASA 群 57 例 (同 1.78%) であり、出血リスクは CSZ 群で有意に低かった ( $p=0.0004$ , Log-rank 検定)。

## 3. マウス局所脳梗塞モデルに対する CSZ の効果

CSZ は、血小板及び血管内皮細胞、血管平滑筋の phosphodiesterase 3 (PDE3) を選択的に阻害することにより、細胞内の cAMP 濃度を増加させ、抗血小板作用、血管内皮細胞保護作用、血管拡張作用、血管平滑筋細胞増殖抑制作用などを発揮する。<sup>7-9)</sup> また、CSZ は、動物における脳虚血モデルに対して、神経細胞保護作用や血管内皮保護作用を有するとの報告があり、<sup>10,11)</sup> 特に内皮細胞保護作用については、内皮細胞からの NO を増加させることにより、フォン・ウィルブランド因子 (vWF; von Willebrand factor)、アポトーシス抑制作用を示すことが報告されている。<sup>12,13)</sup> また、接着分子 vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) の抑制、サイトカインの放出抑制による抗炎症作用により内皮機能を改善するとの報告もある。<sup>14,15)</sup> われわれの研究室でも、マウス虚血モデルを用いて、CSZ がメタロチオネイン I/II を上昇させ、脳保護作用を



石黒光紀

1975 年愛知県生まれ。01 年岐阜大学医学部卒業後、脳神経外科医として勤務。07 年岐阜大学大学院医学研究科入学。09 年より岐阜薬科大学薬効解析学研究室に所属。

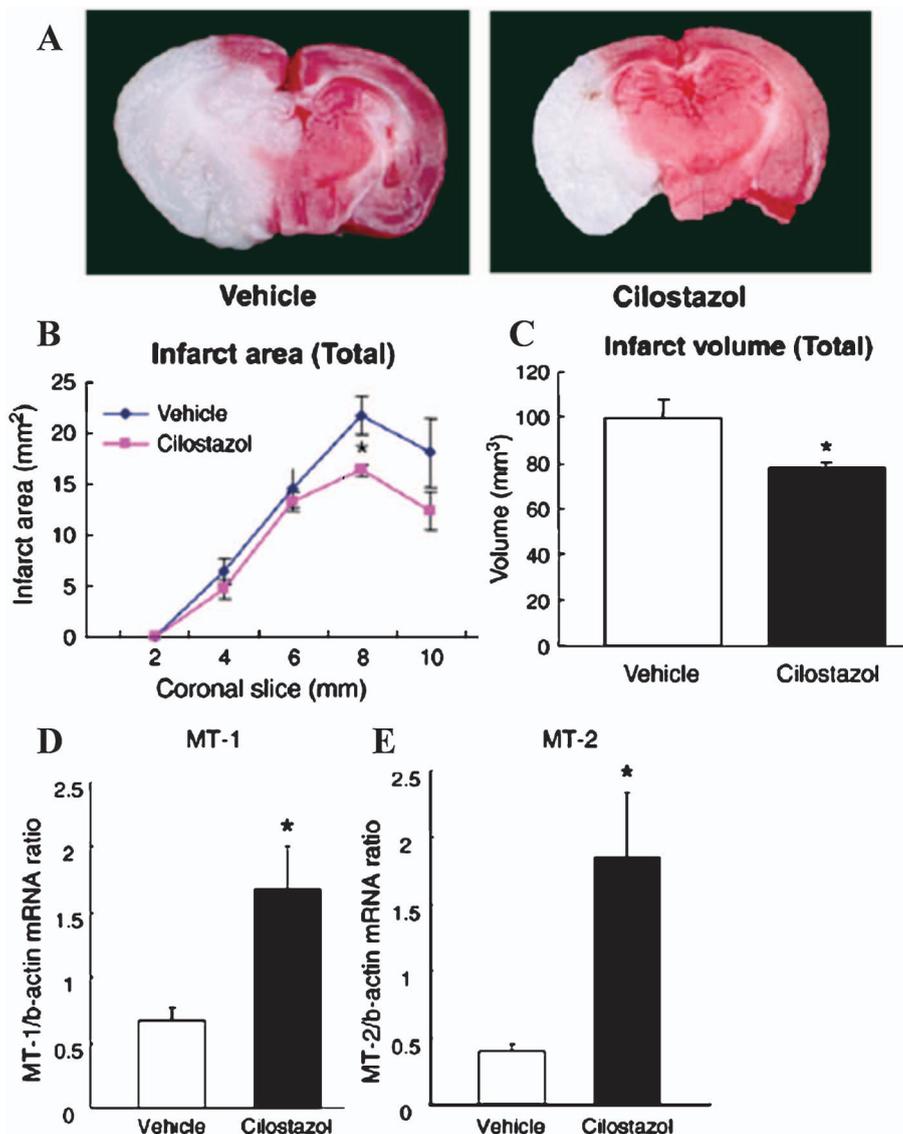


Fig. 1. Effects of Cilostazol on Infarction at 24 h after Permanent MCA Occlusion

Coronal sections of brains treated with vehicle or cilostazol with 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining (location; 1 mm posterior to bregma) showing infarct tissues (pale unstained region) (A). Cilostazol significantly reduced the infarct area (B) and volume (C). \* $p < 0.05$  vs. vehicle (Student's *t* test,  $n = 8-11$ ). Effect of cilostazol on metallothionein-1 and -2 mRNA expressions at 6 h after MCA occlusion. Cilostazol (30 mg/kg, i.p.) was administered three times (at -12 h, -1 h, and 0 h). Cilostazol significantly increased mRNA expressions of metallothionein-1 (D) and -2 (E) with RT-PCR. \* $p < 0.05$  vs. vehicle (Student's *t* test,  $n = 6-10$ ). Data are expressed as means  $\pm$  S.E.M. Data were cited from Ref. 16).

示す<sup>16)</sup>こと (Fig. 1) や常圧高酸素を併用することにより、低用量のCSZがendothelial NO synthase (eNOS)のリン酸化誘導し、神経保護作用を示すことを報告してきた (Fig. 2).<sup>17)</sup>

一方、脳の血管内皮細胞はtight junctionなどの特別なtransport systemで構成され、アストロサイトの足突起とともに血液脳関門 (blood brain barrier; BBB)を構成している。BBBは正常時は脳実質のイオンバランスや代謝性のホメオスタシスを本質的に維持しているが、一度病的な状態になると、脳血管の内皮細胞は血液脳関門の機能を変化させ、

神経細胞を障害し、最終的に細胞死に導くと言われている。

次にわれわれは、CSZが血管内皮保護作用だけでなく、その作用によるBBB保護作用があるのではないかと仮説を立て、マウス2時間虚血再灌流モデルを作製し、CSZが出血性梗塞を抑制するか否かを検討した。CSZは、虚血作製時に10 mg/kg腹腔内投与を行い、再灌流22時間後に、脑梗塞体積、神経症状、脳浮腫及び出血面積を比較することにより評価した。梗塞体積は、2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC)染色にて評価を行い、CSZ

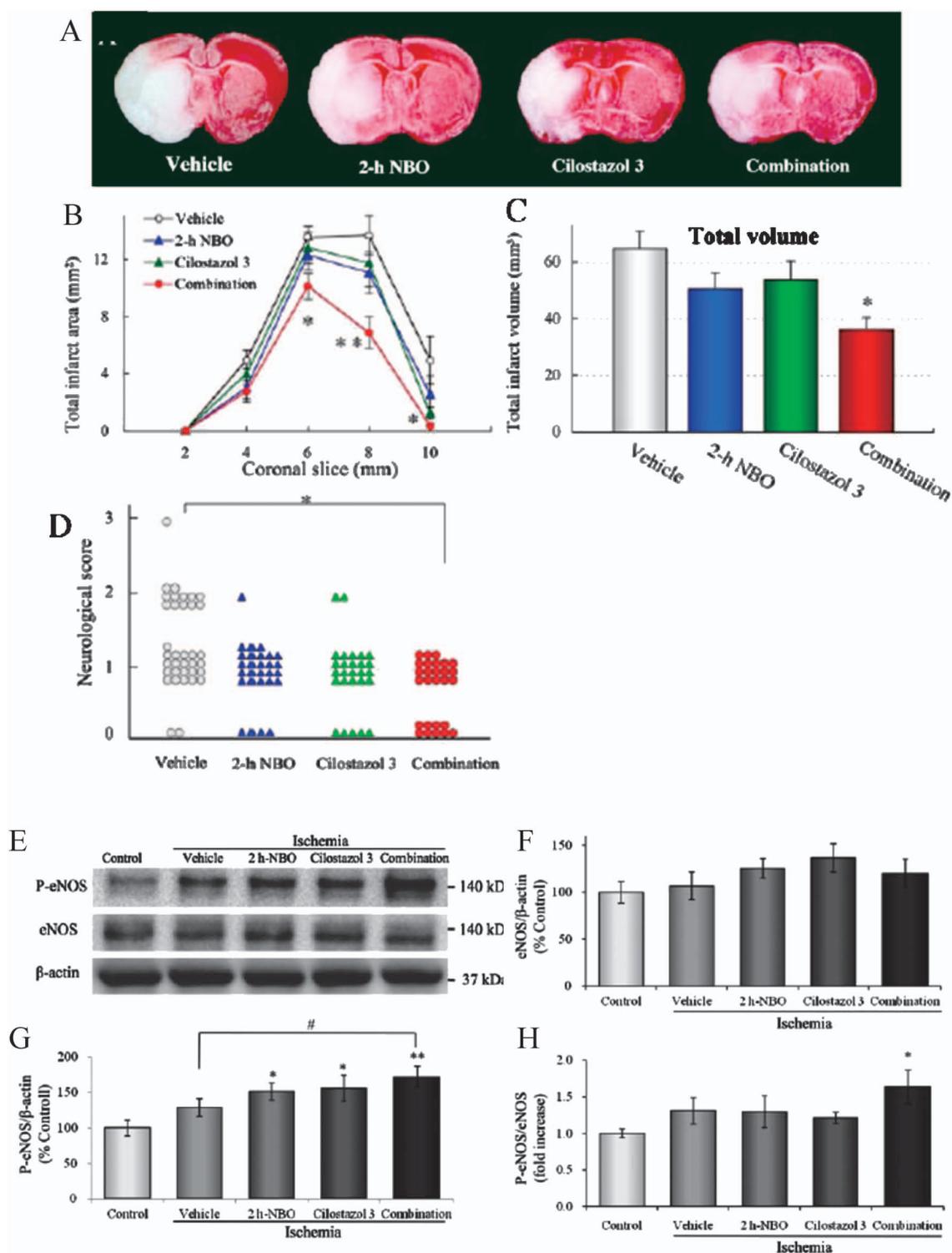


Fig. 2. Effects of NBO (Normobaric Hyperoxia) and Cilostazol on Infarction at 22 h after Reperfusion

Coronal sections of brains treated with vehicle (from extreme left), NBO, cilostazol, and NBO plus cilostazol with 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining (location; 1 mm anterior to bregma) showing infarct tissues (pale unstained region) (A). The other figures show the effects of combination therapy with NBO plus cilostazol regarding the total cerebral infarct area (B) and total infarct volume (C). Combination therapy significantly decreased total infarct area and volume. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs. vehicle (Student-Newman-Keuls test,  $n = 11-17$ ). Combination therapy significantly improved in the neurological scores at 22 h after reperfusion (D). \* $p < 0.05$  vs. vehicle (Mann-Whitney  $U$  test,  $n = 27-36$ ). Western blot analysis measured the levels of P-eNOS and eNOS (E). There were no differences among all groups in eNOS (F). NBO alone, cilostazol alone, and combination therapy with NBO plus cilostazol increase in P-eNOS. Moreover, P-eNOS was significantly greater in the combination therapy than vehicle (G). Combination therapy with NBO plus cilostazol increased the ratio of P-eNOS/eNOS (H). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs. control, # $p < 0.05$  vs. vehicle (Student's  $t$  test,  $n = 9-10$ ). Data are expressed as means  $\pm$  S.E.M. Data were cited from Ref. 17).

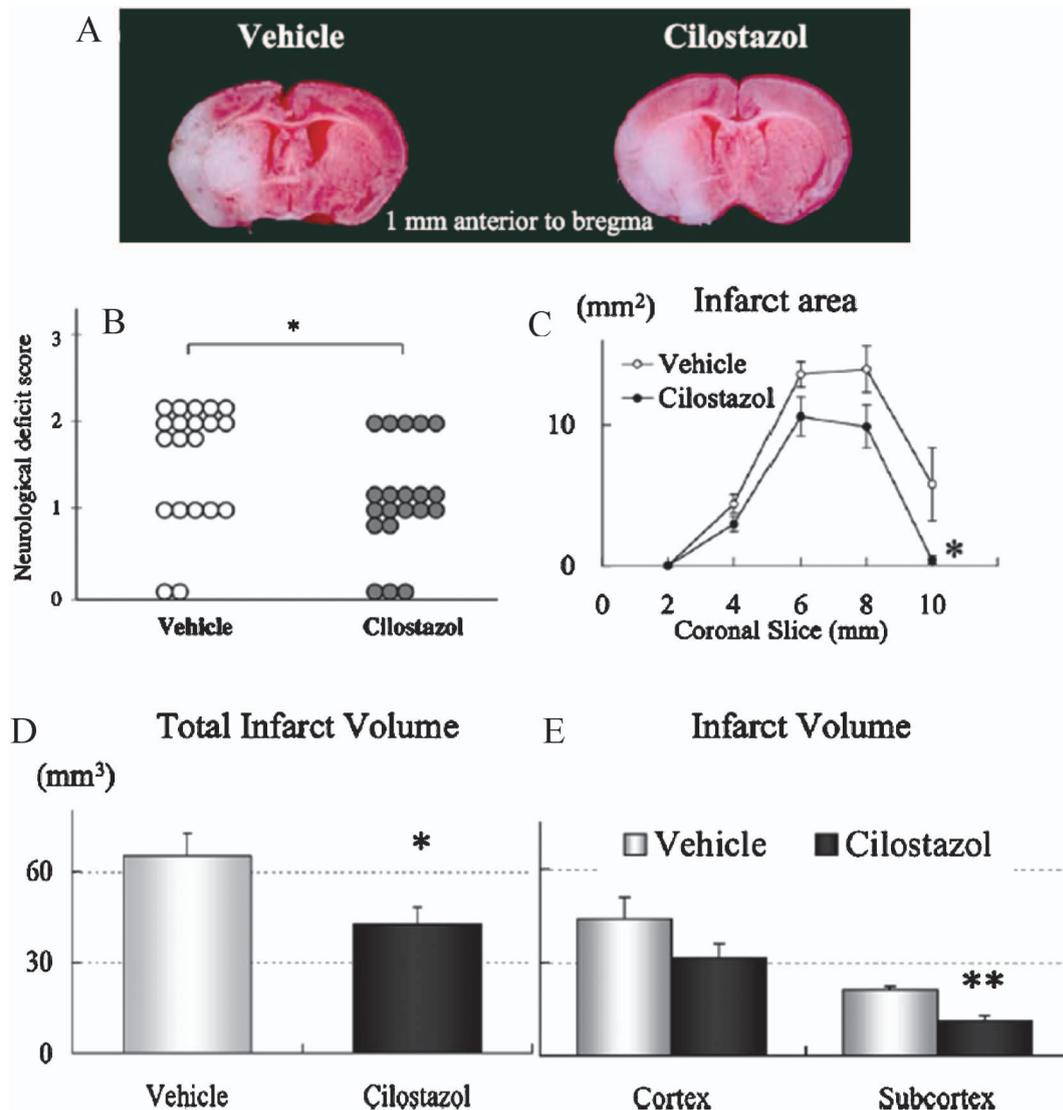


Fig. 3. Effect of Cilostazol on Parameters Related to Acute Injury at 22 h after Reperfusion

Coronal sections of brains treated with vehicle (left) or cilostazol (right) with 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining (location; 1 mm anterior to bregma) showing infarct tissues (pale unstained region) (A). Cilostazol significantly improved in the neurological scores at 22 h after reperfusion (B). \* $p < 0.05$  vs. vehicle (Mann-Whitney  $U$  test,  $n = 20$ ). The other figures show the effects of cilostazol regarding the total cerebral infarct area (C), total infarct volume (D) and infarct volume in cortex and subcortex (E). Cilostazol significantly decreased total infarct volume, especially in subcortex. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs. vehicle (Student's  $t$  test,  $n = 10$ ). Data are expressed as means  $\pm$  S.E.M. Data were cited from Ref. 18).

投与群が有意に梗塞体積を減少させ、特に皮質領域において梗塞体積を減少させた [Figs. 3 (A) and (C)-(E)]. また、脳浮腫の評価はエバンスブルーの血管外流出量を測定し、同様に CSZ 投与群が有意に血管外流出量を減少させた [Figs. 4 (A)-(C)]. さらに、梗塞領域内の出血部位 (500  $\mu\text{m}$  以上) の数を数えたところ、CSZ 投与群が有意に減少していた [Figs. 4 (D)-(H)]. これらの結果により、CSZ が出血性梗塞、それに伴う脳浮腫の発症、進行を抑制することにより、再灌流 22 時間後の神経所見の改善を認められた [Fig. 3 (B)].<sup>18)</sup>

#### 4. マウス tPA 出血性梗塞モデルに対する CSZ の効果

脳血管の急性閉塞後には再灌流に伴う出血性梗塞は起こり得るが、臨床的に大きな問題になるのは tPA 投与による血栓溶解療法後に生じる出血性梗塞である。出血性梗塞は脳梗塞後の約 0.6% に生じるが、tPA 投与後には約 10 倍に増加し、時として致死的となることもある。出血性梗塞の直接の原因は主として脳血管内皮細胞障害とその tight junction の解離と考えられている。tPA の有する血栓溶解以外の生物学的作用としてアストロサイトにお

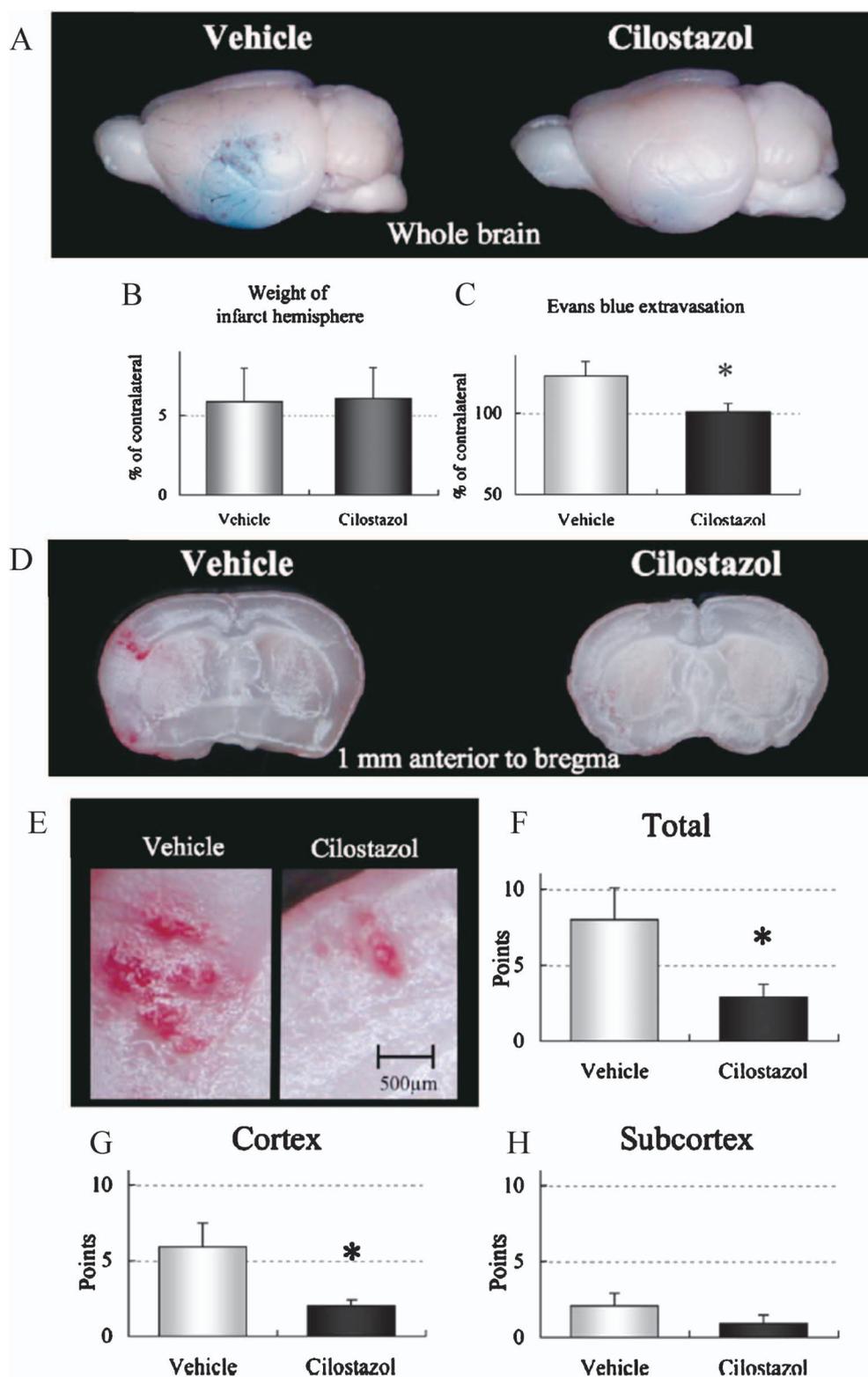


Fig. 4. Effect of Cilostazol on BBB Permeability, Assessed Using Evans Blue Extravasation at 22 h after Reperfusion

Whole brains treated with vehicle (left) or cilostazol (right) showing Evans blue extravasation in the dorsolateral cortex (pale stained region) (A). The other figures show the effects of cilostazol regarding weight of infarct hemisphere (B) and Evans blue extravasation in ischemic hemisphere (C). There was no significant difference in the weight of the ischemic hemisphere, but cilostazol effectively prevented Evans blue extravasation.  $*p < 0.05$  vs. vehicle (Student's *t* test,  $n = 13$ ). Effect of cilostazol on cerebral hemorrhage at 22 h after reperfusion. Coronal sections of brains treated with vehicle (left), cilostazol (right) with no staining (location; 1 mm anterior to bregma) showing hemorrhagic spots in the infarct area (D). We counted the number of hemorrhagic spots ( $> 500 \mu\text{m}$ ) for semiquantitative analysis of cerebral hemorrhage. (one spot counting as one point). Higher magnifications of hemorrhagic lesion area in vehicle (left, four points) and cilostazol group (right, one point) (E). Bar =  $500 \mu\text{m}$ . The other figures show the effects of cilostazol regarding the total hemorrhagic area (F), hemorrhagic area in cortex (G), and in subcortex (H). Cilostazol significantly decreased total hemorrhagic area, especially in cortex.  $*p < 0.05$  vs. vehicle (Mann-Whitney *U* test,  $n = 10$ ). Data are expressed as means  $\pm$  S.E.M. Data were cited from Ref. 18).

ける MMP-9 の誘導作用<sup>3)</sup>が推定され、BBB を破壊し出血性変化を惹起するという報告もある。また、血栓溶解に伴う虚血部の再灌流は活性酸素種 (reactive oxygen species; ROS) の発生をきたし、ROS は一部、MMP-9 の誘導作用を介して BBB 破綻に関与すると考えられている。<sup>19)</sup>したがって tPA 投与に際し、これら一連の障害メカニズムを抑制する薬剤の併用が有効であると考えられる。

当研究室では、CSZ がこの障害メカニズムを抑制するのではないかと仮説を立て、マウス tPA 出血性梗塞モデルを作製し検討した。6 時間虚血再灌流モデルを作製し、tPA を再灌流直前に 10 mg/kg 静脈内投与、その直後に栓子を引き抜くことにより脳血流を再開させ tPA 出血性梗塞モデルを作製した。CSZ は、20 mg/kg 腹腔内投与を行い、tPA による出血性梗塞を抑制するかどうか検討を行った。評価は、再灌流 18 時間後に、脳梗塞体積、神経症状、死亡率及び出血面積を比較することにより行った。梗塞体積は、対照群、tPA 単独群、tPA + CSZ 併用群の 3 群において変化は認められなかったが、tPA 単独群で増悪した出血面積は tPA + CSZ 併用群にて有意に抑制した。加えて、再灌流 18 時間後の BBB の評価を出血量、脳浮腫、MMP-9 activity にて行ったが、tPA 単独群で増悪した出血量、脳浮腫、MMP-9 activity とともに tPA + CSZ 併用群にて有意に抑制した。これらの結果より、tPA によって誘導された MMP-9 の上昇を CSZ が抑制することにより、BBB 障害が制御され、増悪した死亡率、神経症状の改善が認められた。<sup>20)</sup>

### 5. CSZ の tight junction に対する効果

血管内皮細胞におけるバリアー機構の本態についての報告では、血液と血管周囲組織との間での物質の移動は、内皮細胞間を通る経路 (paracellular pathway) と、内皮細胞の内腔側から内皮細胞内に取り込まれ反内腔側から組織内に移動する経路 (transcellular pathway) の 2 経路がある。血管バリアー機能は、主として paracellular pathway の抑制に依存しており、この paracellular pathway の抑制は、内皮細胞間に形成される複雑な tight junction 網に担われている<sup>21)</sup>ことから、われわれは tight junction の構造、機能に注目し、この tight junction 機能を規定する因子の 1 つである claudin に着

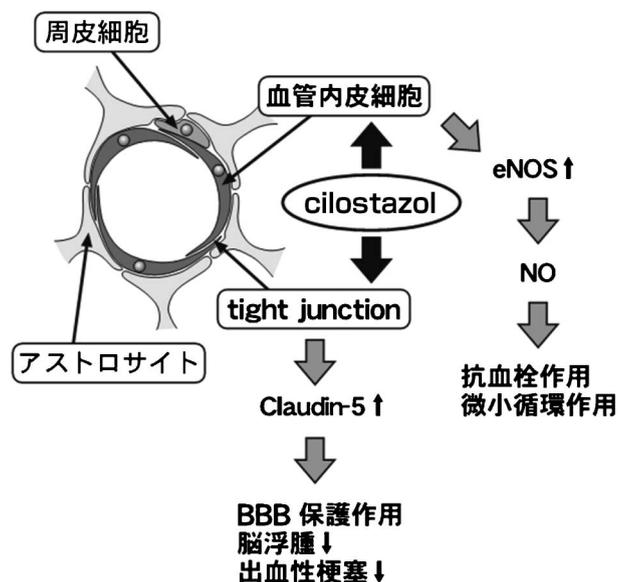


Fig. 5. Neurovascular Protective Mechanisms of Cilostazol against Cerebral Ischemia and Hemorrhagic Transformation

The neurovascular protective potentials of cilostazol are ascribed to its anti-platelet, vasodilatory effects, and endothelial protection induced nitric oxide (NO) production by endothelial NO synthase (eNOS) activation. In addition, they are ascribed to the inhibition of BBB opening by prevention the loss of claudin-5.

目した。バリアー機構を形成する神経組織の血管内皮細胞では、これまでに claudin-1, 3, 5, 12 の発現が報告されている。特に claudin-5 の欠損により血管バリアー機能が障害される<sup>22)</sup>ことから、血管バリアー機能の責任分子として claudin-5 の評価を行った。

電子顕微鏡を用いた血管内皮細胞の観察像によると、再灌流 18 時間後の血管内皮細胞像は、対照群と比較し、tPA 単独群では内皮細胞核の消失、微小血管周囲の浮腫の増悪を認めていたが、tPA + CSZ 併用群においては、核の消失を抑制し、血管周囲の浮腫の改善が認められた。また、ウエスタンブロット法にて claudin-5 の定量評価を行ったところ、tPA 単独群で減少した claudin-5 は tPA + CSZ 併用群にて改善が認められた。これらの結果より、CSZ が tPA によって障害された血管内皮細胞の tight junction の構成タンパク claudin-5 を保護することにより、BBB の破綻による脳浮腫を抑制したことが示唆された (Fig. 5)。<sup>20)</sup>

### 6. CSZ の neurovascular unit に対する効果

近年、脳梗塞急性期治療戦略を包括的に捉えるキーワードとして、neurovascular protection という概念が定着しつつあり、その中核になるのは、

neurovascular unit という機能単位を構成するニューロン、脳血管及び血管内皮細胞、そしてグリア系の細胞である。<sup>23)</sup> 脳虚血時には、この neurovascular unit の恒常性が破綻し、構成因子は相互に悪性サイクルを形成して脳梗塞の拡大をきたすと考えられている。そこで、われわれは neurovascular unit をターゲットにし、ヒト脳微小血管内皮細胞、周皮細胞及びアストロサイトを用いて、さらなるCSZのメカニズムを細胞レベルにて検討した。

培地内に tPA 300  $\mu\text{g}/\text{ml}$  を添加することにより作製した細胞障害モデルを用いて、CSZがtPAによって引き起こされた細胞障害を抑制するかどうかについて検討した。細胞障害の指標はLDH (lactate dehydrogenase) kit を用いて評価した。

3群ともに、tPA 300  $\mu\text{g}/\text{ml}$  を添加することにより細胞障害が出現し、ヒト脳微小血管内皮細胞及び周皮細胞の2群においてCSZがtPAによる細胞障害を抑制した。特に、ヒト脳微小血管内皮細胞において効果が顕著であったため、CSZのメカニズムの1つであるcAMPを用いて細胞実験を追加したところ、cAMPの添加においても同様にtPAによるヒト脳微小血管内皮細胞の障害は抑制された。これらの結果より、CSZがcAMPを上昇させる作用により血管内皮の保護効果を示すことが示唆された。<sup>20)</sup>

## 7. おわりに

わが国でも、米国に比べて10年以上も遅れてtPAを3時間以内の虚血性脳血管障害に使用できるようになった。一方、最近の臨床治験ではtPA適応患者の増加を考慮して、発症4.5時間以内まで治療適応時間枠の拡大が可能ではないかとする報告もあるが、この場合でもやはり症候性脳出血合併症は増加している。<sup>2,24)</sup> 今後のtPA療法の展開としては、脳保護薬を併用することにより重大な問題である出血合併症を軽減させるという報告<sup>25)</sup>もあり、これは、神経細胞、グリア細胞の保護だけでなく、虚血によって脆弱になった血管内皮細胞を保護することによるものと考えられている。本研究の結果から、脳梗塞急性期治療戦略の1つとしてCSZが脳梗塞、出血性梗塞の抑制に有効で、tPA障害に対する血管内皮保護をターゲットとした新しい治療戦略になり得ると考えられる。しかしながら、これらの知見が、脳梗塞若しくは出血性梗塞という複雑な

病態において共通の現象であるのか否かは現時点では明らかではない。ただ、出血性梗塞に対する治療戦略はいまだ、完全に確立しておらず、出血性梗塞の発症及び進展を阻止することができれば、脳梗塞による後遺症の重症度が改善される可能性はあり、今後の基礎研究並びに臨床試験のさらなる進展が期待されている。

## REFERENCES

- 1) Kobayashi S., "Nosocchu Data Bank 2009," Nakayama Shoten Co., Ltd., Tokyo, 2009.
- 2) Hacke W., Kaste M., Bluhmki E., Brozman M., Davalos A., Guidetti D., Larrue V., Lees K. R., Medeghri Z., Machnig T., Schneider D., von Kummer R., Wahlgren N., Toni D., *N. Engl. J. Med.*, **359**, 1317-1329 (2008).
- 3) Kelly P. J., Morrow J. D., Ning M., Koroshetz W., Lo E. H., Terry E., Milne G. L., Hubbard J., Lee H., Stevenson E., Lederer M., Furie K. L., *Stroke*, **39**, 100-104 (2008).
- 4) Matsumoto M., *Atheroscler. Suppl.*, **6**, 33-40 (2005).
- 5) Hiatt W. R., Money S. R., Brass E. P., *J. Vasc. Surg.*, **47**, 330-336 (2008).
- 6) Shinohara Y., Katayama Y., Uchiyama S., Yamaguchi T., Handa S., Matsuoka K., Ohashi Y., Tanahashi N., Yamamoto H., Genka C., Kitagawa Y., Kusuoka H., Nishimaru K., Tsushima M., Koretsune Y., Sawada T., Hamada C.; CSPS II group., *Lancet Neurol.*, **9**, 959-968 (2010).
- 7) Tanaka K., Gotoh F., Fukuuchi Y., Amano T., Uematsu D., Kawamura J., Yamawaki T., Itoh N., Obara K., Muramatsu K., *Stroke*, **20**, 668-673 (1989).
- 8) Tanaka T., Ishikawa T., Hagiwara M., Onoda K., Itoh H., Hidaka H., *Pharmacology*, **36**, 313-320 (1988).
- 9) Takahashi S., Oida K., Fujiwara R., Maeda H., Hayashi S., Takai H., Tamai T., Nakai T., Miyabo S., *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **20**, 900-906 (1992).
- 10) Choi J. M., Shin H. K., Kim K. Y., Lee J. H., Hong K. W., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **300**, 787-793 (2002).
- 11) Kim K. Y., Shin H. K., Choi J. M., Hong K.

- W., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **300**, 709–715 (2002).
- 12) Hashimoto A., Miyakoda G., Hirose Y., Mori T., *Atherosclerosis*, **189**, 350–357 (2006).
  - 13) Manickavasagam S., Ye Y., Lin Y., Perez-Polo R. J., Huang M. H., Lui C. Y., Hughes M. G., McAdoo D. J., Uretsky B. F., Birnbaum Y., *Cardiovasc. Drugs Ther.*, **21**, 321–330 (2007).
  - 14) Otsuki M., Saito H., Xu X., Sumitani S., Kouhara H., Kurabayashi M., Kasayama S., *Atherosclerosis*, **158**, 121–128 (2001).
  - 15) Nishio Y., Kashiwagi A., Takahara N., Hidaka H., Kikkawa R., *Horm. Metab. Res.*, **29**, 491–495 (1997).
  - 16) Wakida K., Morimoto N., Shimazawa M., Hozumi I., Nagase H., Inuzuka T., Hara H., *Brain Res.*, **1116**, 187–193 (2006).
  - 17) Nonaka Y., Koumura A., Hyakkoku K., Shimazawa M., Yoshimura S., Iwama T., Hara H., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **330**, 13–22 (2009).
  - 18) Nonaka Y., Tsuruma K., Shimazawa M., Yoshimura S., Iwama T., Hara H., *Neurosci. Lett.*, **452**, 156–161 (2009).
  - 19) Lee S. R., Guo S. Z., Scannevin R. H., Magliaro B. C., Rhodes K. J., Wang X., Lo E. H., *Neurosci. Lett.*, **417**, 1–5 (2007).
  - 20) Ishiguro M., Mishiro K., Fujiwara Y., Chen H., Izuta H., Tsuruma K., Shimazawa M., Yoshimura S., Satoh M., Iwama T., Hara H., *PLoS One*, **5**(12), e15178 (2010).
  - 21) Kniesel U., Risau W., Wolburg H., *Brain Res. Dev. Brain Res.*, **23**, 229–240 (1996).
  - 22) Nitta T., Hata M., Gotoh S., Seo Y., Sasaki H., Hashimoto N., Furuse M., Tsukita S., *J. Cell Biol.*, **161**, 653–660 (2003).
  - 23) del Zoppo G. J., *N. Engl. J. Med.*, **354**, 553–555 (2006).
  - 24) Wahlgren N., Ahmed N., Dávalos A., Hacke W., Millán M., Muir K., Roine R. O., Toni D., Lees K. R., *Lancet*, **372**, 1303–1309 (2008).
  - 25) Yamashita T., Kamiya T., Deguchi K., Inaba T., Zhang H., Shang J., Miyazaki K., Ohtsuka A., Katayama Y., Abe K., *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **29**, 715–725 (2009).