

VEGF—t-PA 治療後の脳出血合併を抑える治療標的—

金澤 雅人^{1)*} 高橋 哲哉²⁾ 川村 邦雄³⁾ 下畑 享良⁴⁾

要旨：脳梗塞に対する組織プラスミノゲン・アクチベーター (tissue plasminogen activator; t-PA) 投与は、予後を改善させるが、症候性頭蓋内出血は t-PA 療法後の転帰不良に関連する要因である。我々は、出血合併を抑制し、予後を改善させる t-PA に併用する血管保護薬の開発を行っている。治療標的分子として血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor; VEGF) に注目し、血液脳関門 (blood-brain barrier; BBB) 破綻に関する検討を行った。発症 4 時間後に t-PA を投与すると、出血合併が生じる、脳塞栓モデルを用いた検討において、遅延した t-PA 投与が VEGF を著増させ、タンパク分解酵素マトリックス・メタロプロテナーゼ-9 を活性化、BBB 構成蛋白を分解し、出血合併を来すことを示した。さらに、VEGF-VEGF 受容体シグナルの抑制薬は、脳出血合併を抑制することを明らかにした。

(臨床神経 2019;59:699-706)

Key words：脳虚血、t-PA、出血合併、血管保護療法、血管内皮増殖因子

はじめに

脳梗塞急性期の内科的治療である血栓溶解薬「組織プラスミノゲン・アクチベーター (tissue plasminogen activator; t-PA)」の静注療法は、日米のガイドラインにおいてグレード A の治療である。しかし、発症から 4.5 時間までという短い治療可能時間のため、治療の恩恵を受ける患者数は全脳梗塞患者数のわずか 5%ほどと少なく、治療可能時間を延長するような新規療法の開発は喫緊の課題である。また、近年では血管内治療による再灌流療法の有効性も示されているが、実施可能な施設も限られ、血管内治療を行うときにも、はじめに t-PA 投与を行うことから、基本的には t-PA 療法が第一選択である。脳梗塞急性期において t-PA (アルテプラザー) を使用した臨床試験の統合分析から、発症から 4.5 時間を超えて治療を行った場合、脳出血を合併するリスクが高くなることが判明している¹⁾。必ずしも、出血合併が t-PA 投与の治療可能時間を規定するわけではないが、発症 4.5 時間以内の t-PA 投与でも症候性脳出血の合併リスクが高くなることが示されている²⁾³⁾。すなわち脳出血の合併を抑制する治療の開発は t-PA の治療を安全に行え、治療可能時間域を延長させる可能性を有し、予後を改善させるものと考えられる。我々は、t-PA に併用する血管保護薬の候補として、血管新生を含む血管リモ

デリング (血管を構成する細胞、内皮細胞、周皮細胞、アストロサイトおよび細胞外マトリックスの変化に伴った、血管構造および機能が変化すること) に関与する血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor; VEGF) シグナル経路の阻害が、治療可能時間を超えた t-PA 投与でも脳出血を抑制し、機能予後を改善させることを示した⁴⁾。本稿では、その治療戦略の機序と課題について概説する。

t-PA 療法における脳血管保護の必要性

1995 年、発症 3 時間以内の脳梗塞患者に対して t-PA 静注が有効であることが報告された。しかし、発症 3 時間という極めて短い治療可能時間のため適応症例が限られ、恩恵にあずかる症例は非常に限られていた。このため発症 6 時間以内の症例にまでに適応を拡大した ECASS-I/II, ATLANTIS という三つの study が行われた¹⁾。しかし、いずれもその有効性を証明することはできなかった。三つの study にて明らかとなったことは、治療可能時間を越えた t-PA 投与は、出血合併症が有意に増加することである。つまり、この出血合併症を減少させることができれば t-PA の治療可能時間を延長させ、さらに治療可能症例数を増加し、予後を改善させる可能性がある。また、最近示された wake up stroke, すなわち発症時刻

*Corresponding author: 新潟大学脳研究所臨床神経科学部門神経内科学分野 (脳神経内科) [〒 951-8585 新潟市中央区旭町通 1-757]

¹⁾ 新潟大学脳研究所臨床神経科学部門神経内科学分野 (脳神経内科)²⁾ 国立病院機構西新潟中央病院脳神経内科³⁾ 総合リハビリテーションセンターみどり病院リハビリテーション科⁴⁾ 岐阜大学大学院医学系研究科脳神経内科学分野

(Received July 15, 2019; Accepted August 15, 2019; Published online in J-STAGE on October 26, 2019)

doi: 10.5692/clinicalneurology-001346

不明の脳梗塞症例に対して、MRI-guideにより、拡散強調画像で高信号であっても、FLAIR画像の高信号が明らかでない場合では、発症早期であると推定され、t-PAを投与することで、機能予後を改善されることが示された(WAKE-UP study)⁵⁾。この報告を踏まえ、“発症時刻が不明でも、頭部MRI拡散強調画像の虚血性変化がFLAIR画像で明瞭でない場合には発症4.5時間以内の可能性が高い。このような症例に静注血栓溶解療法を行うことを、考慮しても良い”と2019年3月にガイドラインが改訂された⁶⁾。ただし、このMRI-guideによるt-PA投与の報告でも、全体では、機能予後を改善させた一方で、t-PA投与群は、非投与群と比べて、出血合併のオッズ比10.46 ($P = 0.03$)、3ヵ月後の死亡オッズ比3.38 ($P = 0.07$)であり、出血合併は有意に増えていた⁵⁾。つまり、MRI-guideであっても、必ずしも安全性が担保されているわけではないのが現状である。また、血管内治療も注目されているが、ガイドラインが大幅に変更された2015年の米国脳卒中協会のInternational Stroke Conferenceにおいても、血管内治療に伴う出血合併の軽減という観点から、血管保護の重要性が提唱されていた。以上の理由から、血管保護を目指した研究が注目されている。

血管保護を目的としたneurovascular protectionの考え方

遅延したt-PA投与は、血液脳関門(blood-brain barrier; BBB)を破綻させる。脳梗塞は神経細胞のみではなく、血管内皮細胞やアストロサイトといったBBBを構成する細胞にも虚血性細胞障害を引き起こす。また、t-PA自体も細胞外マトリックスや血管内皮基底膜の構成蛋白を分解するマトリックス・メタロプロテナーゼ(matrix metalloproteinase; MMP)を活性化させ、BBB破綻に関与すると考えられている⁷⁾。その結果、脳浮腫、脳出血の合併を招く。数多くの実験結果からも明らかのように、従来の神経細胞の生存・維持のみを目的とした「神経細胞保護」だけでは限界があり⁸⁾、神経細胞に加え、血管内皮細胞、周皮細胞、アストロサイト全体を単位として考え(neurovascular unit)、これらの病態理解と、虚血から保護する「神経血管保護(neurovascular protection)」へのパラダイム・シフトが起きている⁹⁾。

血管保護薬の開発が進んでいない理由

実験的脳虚血モデルを用いて、t-PAに併用し神経血管保護を実現する薬剤開発を目指した研究が近年実施されている。動物実験で有効性が示された薬剤の中で、臨床試験が実施されたものとしてミノサイクリン、シンバスタチン、NXY-059、エリスロポエチン、G-CSFがあった。ミノサイクリン、シンバスタチンなどはMMPの抑制効果も動物実験では示されていたが、ほとんどすべての薬剤で効果が示されず、Phase IIIまでには至っていない(総説参照¹⁰⁾¹¹⁾。唯一、臨床応用されているエダラボン併用療法も、t-PA投与による再灌流後の出血合併や機能予後を改善させるかは不明瞭である¹²⁾。t-PAに併

用する血管保護薬の開発は、この10年ほど様々なものがあったが、その初期には糸の先端の形状を変化させて、糸を動脈内に挿入し血管を閉塞させ、その後、糸を引き抜く物理的な再灌流モデルでの検討がほとんどであった¹³⁾。これでは、ヒトの脳梗塞を完全に再現しているとは言い難く、動物実験で有効であっても臨床応用が難しい理由として、適切な動物モデルでの検討が十分になされていなかったこともあげられる。

t-PAに併用する血管保護薬を検討するモデル

t-PAに併用する保護薬を検討するための動物実験では、ヒトの脳梗塞に類似した血栓による脳塞栓モデルを用い、さらにt-PAを投与すること¹³⁾での検討が望ましい。我々はラット塞栓性中大脳動脈閉塞モデルを用いた検討を行った⁴⁾¹³⁾。このモデルはラット血液にトロンピンを混入し作成した自家血栓を、カテーテルから中大脳動脈に注入し閉塞させる局所脳虚血モデルで、ヒトにおける脳梗塞のt-PA療法の再現を試みるモデルである。このモデルは手術が困難であり、梗塞のばらつきも大きく作成困難なモデルであるが、血管保護を目指した研究では必要なモデルである。その理由として、1. 治療可能時間内のt-PA投与で梗塞域が縮小し、機能予後が改善すること、2. 治療可能時間を越えてのt-PA投与ではBBBが破綻し、出血合併症が増加し、機能予後も増悪すること、3. t-PAにより血栓を溶解させるという点で臨床の脳梗塞の病態に極めて類似していることがあげられる。我々が用いているラット脳塞栓モデルはまさにこれらの条件を満たし、t-PAを投与しない永久虚血群、t-PA投与を脳虚血後1時間ないし4時間で行うt-PA 1h群、t-PA 4h群の比較で、t-PA 1h群では梗塞体積を著明に縮小させ、機能予後を改善させるが、t-PA 4h群では有意に出血量が増加し(Fig. 1)、致死率が増加する(10%未満→60%)⁴⁾。

t-PA療法後の脳出血の機序として、虚血に伴う内皮細胞障害や、それに引き続くBBBの破綻が重要視され、BBB破綻を来す分子として、強力なタンパク分解酵素であるMMPが考えられている。これは、1. 培養アストロサイトにおいてt-PAがMMPのサブタイプの一つであるMMP-9を活性化すること¹⁴⁾、2. MMP-9のノックアウトマウスを用いた検討で、BBB破綻が軽減すること¹⁵⁾、3. t-PA療法後に脳出血を合併し、死亡した剖検脳において、MMP-9陽性好中球が血管に集簇し、基底膜構成蛋白であるタイプIVコラーゲン発現が減じていたことが挙げられる¹⁶⁾。我々は、脳塞栓モデルでの検討で、t-PA 4h群ではMMP-9活性が、永久虚血群、t-PA 1h群より有意に上昇し、その結果、脳血管を構成する細胞外マトリックスであるタイプIVコラーゲンを分解していることを示し⁴⁾、さらにBBBが破綻し、出血を来すものと考えられた。以上より、本モデルは、ヒトにおけるt-PA療法後の脳出血の合併と類似した機序が見られることから、t-PA療法後の脳出血に対する血管保護薬の検討に適したモデルと考えられた。

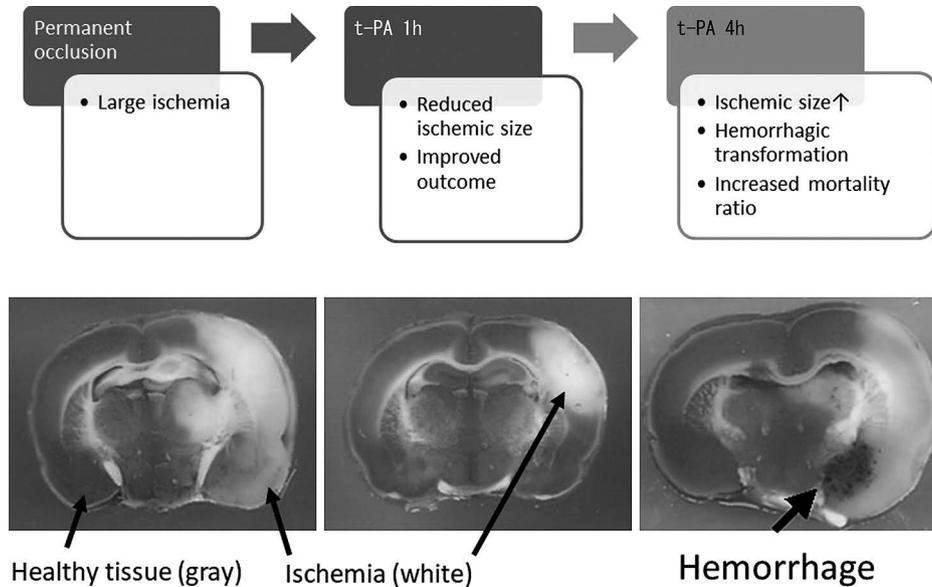


Fig. 1 Rat thromboembolic model that reproduces hemorrhagic transformation and shows increased mortality rate after delayed 4 h treatment of tissue plasminogen activator (t-PA). (revised figure from reference #4).

Representative figures of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC)-stained brain sections of rats from the permanent occlusion group (left), t-PA treatment at 1 h or 4 h after ischemia, t-PA 1 h group (middle) or t-PA 4 h group (right), at 24 h after ischemia. TTC staining indicates deep gray staining of normal brain tissue and white non-staining of the ischemic lesion. Hemorrhagic transformation is observed in t-PA 4 h group.

VEGF 抑制療法

我々は、ラット脳塞栓モデルを用い、血管保護を実現する標的分子として、VEGF に注目した研究を行ってきた⁴⁾。MMP-9 を活性化する分子としては複数あるが、そのなかに VEGF が含まれる¹⁷⁾。VEGF は血小板由来増殖因子 (platelet-derived growth factor; PDGF) のスーパーファミリーに属し、アミノ酸 120~190 程度のペプチドのホモ二量体蛋白質である (23 kDa のサブユニットがホモ二量体を形成し 45 kDa となる分泌性糖蛋白である)¹⁸⁾。その遺伝子発現は、低酸素刺激、サイトカイン、性ホルモン、ケモカイン、増殖因子などにより調節されるが、とくに低酸素誘導因子 1 (hypoxia inducible factor 1; HIF-1) はその発現を促進する重要な転写因子である¹⁹⁾。VEGF には複数のサブタイプが存在し、ヒトでは VEGF₁₂₁、VEGF₁₆₅、VEGF₁₈₀ が主なものであるが (数字はアミノ酸数を表す)、なかでも VEGF₁₆₅ は量も多く、活性も最も高い。

VEGF はその受容体である VEGF 受容体 1 型 (VEGFR1)、2 型 (VEGFR2) と結合して血管新生を制御する¹⁸⁾。このうち VEGFR2 は細胞外の VEGF 刺激を細胞内へ変換し、血管新生を亢進させる最も強力なシグナル伝達経路である。この VEGF-VEGFR シグナルは血管新生・維持において中心的役割を果たす¹⁸⁾。さらに病的血管新生にも関わることから、本シグナルを阻害する抗体医薬や低分子化合物は、肺がん、大腸がんなどの固形がんや加齢黄斑変性症に対する治療薬として臨床で広く用いられている。具体的には VEGF 中和抗体 (悪性腫瘍に対するベバシズマブ²⁰⁾、加齢黄斑変性症に対する

ラニズマブ²¹⁾、抗 VEGF₁₆₅ アプタマー (加齢黄斑変性症に対するペガブタニブ²²⁾、VEGF-Trap (加齢黄斑変性症と欧米で転移性大腸がんに適応があるアフリベルセプト²³⁾、VEGFR のチロシンキナーゼ阻害剤 (悪性腫瘍に対するスニチニブ²⁴⁾、ソラフェニブ²⁵⁾) が開発され、臨床応用されている (Table 1)。

脳虚血においても、VEGF は脳血管、神経細胞などに発現し、血管内皮細胞の増殖・遊走、血管透過性亢進、血管新生、および神経細胞保護を促す²⁶⁾²⁷⁾。実際に動物モデルにおける VEGF の投与は、BBB の破綻を増悪させ²⁷⁾、逆に VEGF の阻害は脳浮腫や BBB 破綻を緩和することが報告されていた²⁸⁾。しかしながら VEGF が t-PA 療法後の脳出血の合併に関与するか不明であったことから、我々は、t-PA 投与後の脳出血合併にも VEGF が関与すると仮説を立て、検証した⁴⁾。ラット脳塞栓モデルを用いた虚血 24 時間後の免疫組織化学の検討では、虚血辺縁域に VEGF が発現し、BBB を構成する血管内皮細胞とその周囲 (Fig. 2)、アストロサイトの end-foot、周皮細胞に局在していた。t-PA を投与しない永久虚血群、t-PA 1h 群、t-PA 4h 群の VEGF 発現量を比較するため、全脳抽出物に対するウェスタンブロットを抗 VEGF 抗体を用いて行ったところ、sham 手術群ではほとんど検出されなかった VEGF が、永久虚血群では検出され、さらに t-PA 4h 群では著明に増加し、永久虚血群・t-PA 1h 群と比べて有意に増加した ($P < 0.05$ および $P < 0.05$)。VEGF は血管内皮細胞、周皮細胞、アストロサイトに発現が認められた一方、VEGF が結合し活性化したリン酸化 VEGF 受容体は周皮細胞とアストロサイトの end-

Table 1 The characteristics of anti-vascular endothelial growth factor (anti-VEGF) drugs.

Drug	Bevacizumab ²⁰⁾³⁸⁾	Ranibizumab ²¹⁾³⁹⁾⁴⁰⁾	Pegaptanib ²²⁾⁴¹⁾	Aflibercept ²³⁾⁴²⁾
Structure and binding affinities	Recombinant monoclonal full-length antibody to human VEGF	Recombinant monoclonal antibody fragment Fab to human VEGF	A pegylated oligonucleotide that selectively binds VEGF ₁₆₅	A soluble decoy receptor incorporating domains of both VEGFR1 and VEGFR2 fused to the Fc region of human IgG1
Molecular size	149 kDa	48 kDa	28-base ribonucleic acid oligonucleotide with two branched 20 kDa polyethylene glycol moieties	115 kDa
Half-life	20 days	2.5 days (intravitreal)	1.5 days	5–6 days

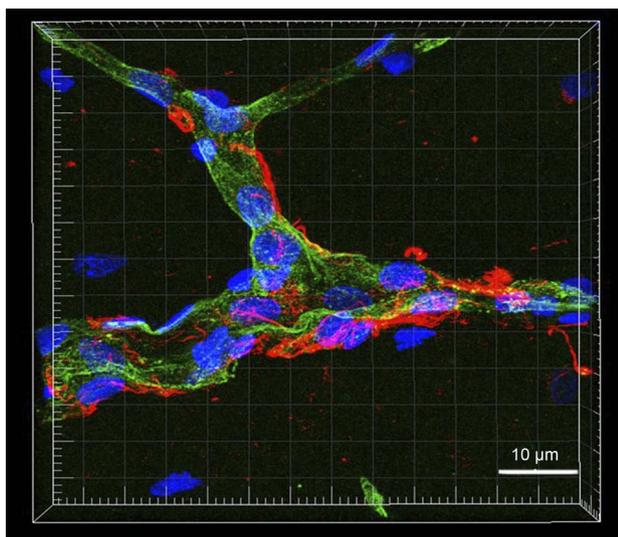


Fig. 2 Vascular endothelial growth factor (VEGF) expressions in a rat thromboembolic model.

Triple staining of VEGF (red), rat endothelial cell antigen-1 (RECA-1, a marker of endothelial cells; green), and 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI, nuclear staining; blue) were performed. Confocal microscopy studies revealed that VEGF colocalized with endothelial cells and cells surrounding endothelial cells.

footにおいて発現が認められた (Fig. 3)。つまり、治療可能時間を越えた t-PA 療法は、BBB における VEGF-VEGFR シグナルを介して MMP-9 の活性化を引き起こし、その結果、血管構成蛋白が分解され BBB の破綻を引き起こす可能性が示唆された。

治療可能時間を越えての t-PA 投与による BBB 破綻の治療として、VEGF-VEGFR シグナルの抑制が有効であると考え、t-PA 4h 群において t-PA と同時に抗ラット VEGF 中和抗体の経静脈投与を実施した⁴⁾。抗 VEGF 中和抗体の用量設定の検討で、30 μg と 100 μg の抗体投与を行ったところ、前者では、ウェスタンブロットでの VEGF 発現を抑制できなかったが、後者ではコントロール抗体投与群 ($P < 0.01$)、30 μg 抗 VEGF

中和抗体群 ($P < 0.05$) と比べて有意に発現を抑制した。そこで、抗 VEGF 抗体は、100 μg 投与を行うこととし、バイアスの防止のため、サンプルの無作為化、投与薬、機能評価は盲検化して (Animal Research: Reporting *In Vivo* Experiments ガイドラインに従った)、抗 VEGF 中和抗体と t-PA 投与併用療法を行ったところ、抗 VEGF 抗体 (RB-222) を投与した群では、VEGF 発現が免疫組織化学、ウェスタンブロットでコントロール抗体投与と比べて有意に抑制された ($P < 0.01$)。また、MMP-9 の活性化とタイプ IV コラーゲンの分解は抑制された ($P < 0.05$)。さらに、RB-222 投与によって、t-PA 4h 群の脳出血量を有意に減少し、機能予後を改善させた (それぞれ、 $P < 0.01$)。VEGF 受容体活性化阻害薬 SU1498 の腹腔投与も出血量を有意に低下させた ($P < 0.01$)。この結果は、t-PA 後の出血合併機序の一つとして、広く受け入れられるようになった²⁹⁾。

以上より、VEGF-VEGFR シグナルの抑制は、t-PA 療法に伴う脳出血に対して有効な治療戦略となる可能性が示唆された。また本治療は従来の脳虚血に対する神経細胞保護療法と異なり、標的が血管であるため薬剤が BBB を通過する必要はないという利点もある。

今後の課題

MRI-guide により、症例を選択することで発症時刻不明の脳梗塞でも、t-PA の有効性が示され⁵⁾、2019 年 3 月にガイドラインが改訂された。さらに、2019 年 5 月に自動解析灌流画像にて低灌流であっても救済可能な領域を認めた脳梗塞症例では、発症後 4.5~9 時間、または発症時刻不明の wake up stroke (睡眠から発症に気づいた起床までの時間が 9 時間以内の場合) でも、t-PA 投与は修正 Rankin スケールスコアが 0 または 1 に有意に改善させることが示された (EXTEND 試験)³⁰⁾。同報告では、副次アウトカムである修正 Rankin スケールのスコア分布の順序尺度に関する分析では、90 日時の修正 Rankin スケールスコアで 1 点以上の改善は、有意な差はみられなかったものの、この試験も含めた直近の類似試験のメタ解析で、90 日時の機能良好な患者 (修正 Rankin スケール 0~1)

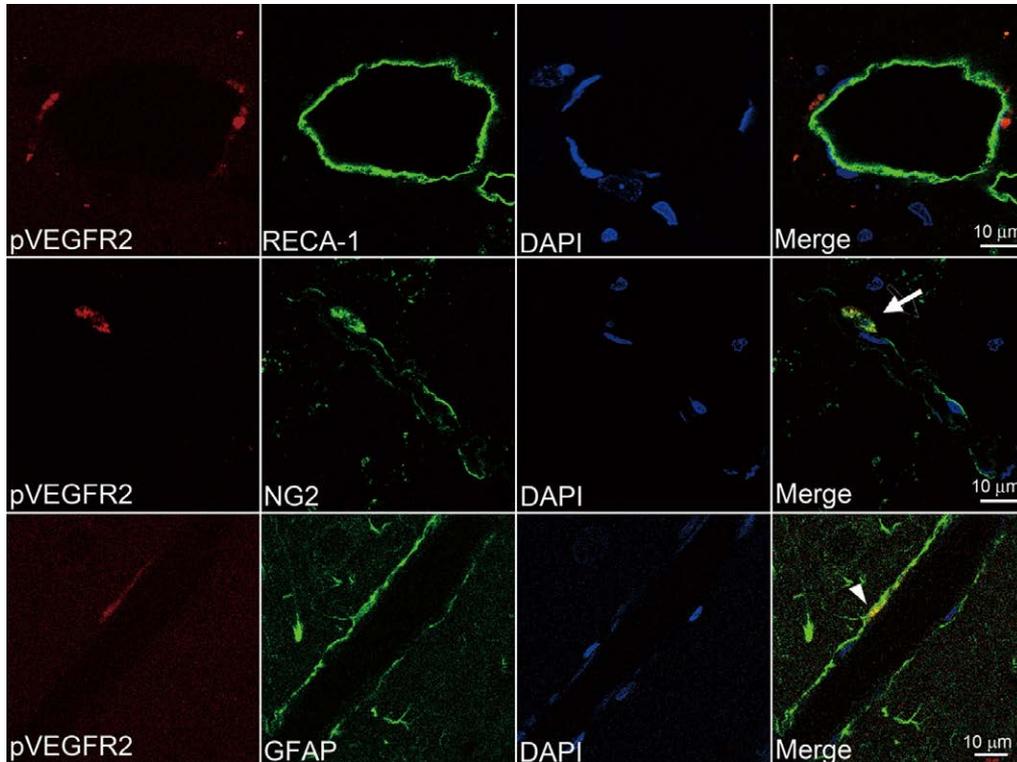


Fig. 3 Delayed tissue plasminogen activator (t-PA) treatment caused phosphorylation of vascular endothelial growth factor receptor-2 (pVEGFR2) in the neurovascular units.

Triple staining with pVEGFR2 (red), rat endothelial cell antigen-1 (RECA-1, green), or nerve/glial antigen 2 (NG2, a marker of pericytes, green), or glial fibrillary acidic protein (GFAP, a marker of astrocytes, green), and 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (blue). pVEGFR2 (Tyr 951) is expressed outside the endothelial cells (upper panels) and inside the pericytes (arrow; middle panels) and astrocytic foot processes (arrowhead; lower panels).

は、発症 4.5~9 時間までの wake up stroke において、t-PA 群 36%、プラセボ群 29%であった (調整オッズ比 1.86)³¹⁾。つまり、最近の複数の報告から、脳梗塞に対する t-PA 投与は時間だけでは、規定されないことが明白となっている。しかし、どの報告でも症候性脳出血は t-PA 投与群で有意に高頻度であり、血管保護を目指した研究は極めて臨床的意義が高いといえる。

急性期脳梗塞の治療法の確立を目指したトランスレーショナルリサーチでは、回復可能な虚血性ペナンプラをいかに定義し、いかに保護するかが重要である。虚血性ペナンプラとは、活動電位のような閾値を持つものと定義されてきたが³²⁾、新しい考え方として、細胞死のメディエーターと、神経細胞修復・血管修復のメディエーターが混在し、せめぎ合いが生じている領域というものがある³³⁾。この考え方によれば急性期において細胞死を抑制し、そのあと始まる神経細胞修復や血管修復に悪影響を及ぼさないような薬剤が脳梗塞治療の理想といえる。我々が、治療標的分子として同定した VEGF も急性期では BBB 破綻のメディエーターである一方、慢性期では血管新生を含む血管リモデリングに関与していることも明らかとなっている³⁴⁾³⁵⁾ (Fig. 4)。血管新生は、脳虚血後の機能回復を促進すること、予後に関係することはヒトの脳梗塞、

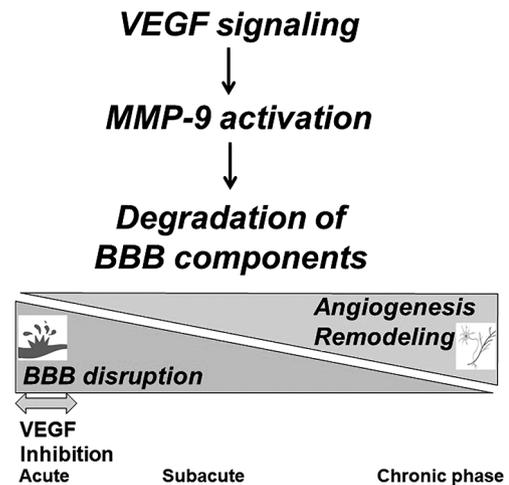


Fig. 4 The timing of vascular endothelial growth factor (VEGF) inhibition therapy after stroke (revised figure from reference #35).

We should bear in mind that VEGF has biphasic roles in ischemic stroke. In the acute phase, VEGF mediates blood-brain barrier (BBB) disruption and hemorrhagic transformation. In contrast, in the subacute to chronic phase, VEGF plays important roles in angiogenesis and neurogenesis, and contributes to a favorable outcome. Hence, we suggest that VEGF inhibition should only be performed during the acute phase of stroke.

多くの動物モデルでも示されている(総説参照³²⁾). 臨床で証明することは困難であるが, *in vitro* のデータでは, 血管新生と軸索進展, 神経細胞再生は関連している可能性も示されている^{32/36)}. 虚血後の反応として, VEGF が誘導されるが, BBB 破綻の予防のため VEGF を脳虚血後どの範囲まで抑制すべきか, 抑制後の長期的効果について検討が必要である. また, 抗 VEGF 薬は, その阻害作用や半減期が薬剤により大きく異なる^{37)~42)}(Table 1). どの薬剤が最適なものの検討は, 長期的な効果の点でも重要である. 私たちはげっ歯類での検討であったが, 人に近い霊長類での検討がより適切な動物モデルである. 動物愛護の問題もあり, 近年では実施困難となりつつあるが, 霊長類モデルでの検討も必要である. さらに, 応用を目指す上で, 臨床データも重要である. 解決すべき課題はさまざまであるが, 私たちは VEGF シグナル阻害による t-PA 療法後の血管保護療法に関する国内, 国外の特許を取得し, 米国にベンチャー企業 ShimoJani LLC を設立の上, 特許の使用許諾し, 臨床応用を目指した共同研究を進めている.

本報告の要旨は, 第 59 回日本神経学会学術大会にて講演した.

謝辞: ご指導ご助言をいただきました新潟大学脳研究所神経内科学分野西澤正豊名誉教授, 新潟大学統合脳機能研究センター五十嵐博中教授, 故中田力名誉教授に深謝申し上げます.

COI : 著者名 金澤雅人 : 研究費・助成金 : アステラス病態代謝研究会, 武田科学振興財団, 循環器病研究振興財団.

著者名 : 高橋哲哉, 川村邦雄 : 本論文に関連し, 開示すべき COI 状態にある企業, 組織, 団体はいずれもありません.

著者名 : 下畑享良 : 研究費・助成金 : 小野薬品工業. 講演料 : 第一三共株式会社, 大日本住友製薬. 米国 ShimoJani LLC の学術顧問である.

文 献

- Lees KR, Bluhmki E, von Kummer R, et al. Time to treatment with intravenous alteplase and outcome in stroke: an updated pooled analysis of ECASS, ATLANTIS, NINDS, and EPITHET trials. *Lancet* 2010;375:1695-1703.
- Emberson J, Lees KR, Lyden P, et al. Effect of treatment delay, age, and stroke severity on the effects of intravenous thrombolysis with alteplase for acute ischaemic stroke: a meta-analysis of individual patient data from randomised trials. *Lancet* 2014;384:1929-1935.
- Whiteley WN, Lees KR, Emberson J, et al. Risk of intracerebral haemorrhage with alteplase after acute ischaemic stroke: a secondary analysis of an individual patient data meta-analysis. *Lancet Neurol* 2016;15:925-933.
- Kanazawa M, Igarashi H, Kawamura K, et al. Inhibition of VEGF signaling pathway attenuates hemorrhage after tPA treatment. *J Cereb Blood Flow Metab* 2011;31:1461-1474.
- Thomalla G, Simonsen CZ, Boutitie F, et al. WAKE-UP Investigators. MRI-guided thrombolysis for stroke with unknown time of onset. *N Engl J Med* 2018;379:611-622.
- 静注血栓溶解 (rt-PA) 療法適正治療指針第三版. 2019 年 3 月日本脳卒中学会脳卒中医療向上・社会保険委員会静注血栓溶解療法指針改訂部会.
- Gursoy-Ozdemir Y, Qiu J, Matsuoka N, et al. Cortical spreading depression activates and upregulates MMP-9. *J Clin Invest* 2004;113:1447-1455.
- O'Collins VE, Macleod MR, Donnan GA, et al. 1,026 experimental treatments in acute stroke. *Ann Neurol* 2006;59:467-477.
- del Zoppo GJ. Perspective: stroke and neurovascular protection. *N Engl J Med* 2006;354:553-555.
- Shimohata T, Kanazawa M, Kawamura K, et al. Therapeutic strategies to attenuate hemorrhagic transformation after tissue plasminogen activator treatment for acute ischemic stroke. *Neurol Clin Neurosci* 2013;1:201-208.
- Kanazawa M, Takahashi T, Nishizawa M, et al. Therapeutic strategies to attenuate hemorrhagic transformation after tissue plasminogen activator treatment for acute ischemic stroke. *J Atheroscler Thromb* 2017;24:240-253.
- Aoki J, Kimura K, Morita N, et al. YAMATO Investigators. YAMATO Study (tissue-type plasminogen activator and edaravone combination therapy). *Stroke* 2017;48:712-719.
- Okubo S, Igarashi H, Kanamatsu T, et al. FK-506 extended the therapeutic time window for thrombolysis without increasing the risk of hemorrhagic transformation in an embolic rat stroke model. *Brain Res* 2007;1143:221-227.
- Lee SR, Guo SZ, Scannevin RH, et al. Induction of matrix metalloproteinase, cytokines and chemokines in rat cortical astrocytes exposed to plasminogen activators. *Neurosci Lett* 2007;417:1-5.
- Asahi M, Wang X, Mori T, et al. Effects of matrix metalloproteinase-9 gene knock-out on the proteolysis of blood-brain barrier and white matter components after cerebral ischemia. *J Neurosci* 2001;21:7724-7732.
- Rosell A, Cuadrado E, Ortega-Aznar A, et al. MMP-9-positive neutrophil infiltration is associated to blood-brain barrier breakdown and basal lamina type IV collagen degradation during hemorrhagic transformation after human ischemic stroke. *Stroke* 2008;39:1121-1126.
- Bergers G, Brekken R, McMahon G, et al. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol* 2000;2:737-744.
- Ferrara N, Hillan KJ, Gerber HP, et al. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2004;3:391-400.
- Pugh CW, Ratcliffe PJ. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med* 2003;9:677-684.
- Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004;350:2335-2342.
- CATT Research Group, Martin DF, Maguire MG, Ying GS, et al. Ranibizumab and bevacizumab for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 2011;364:1897-1908.
- Gragoudas ES, Adamis AP, Cunningham ET Jr, et al. VEGF Inhibition Study in Ocular Neovascularization Clinical Trial Group. Pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 2004;351:2805-2816.
- Heier JS, Brown DM, Chong V, et al. Intravitreal aflibercept

- (VEGF trap-eye) in wet age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 2012;119:2537-2548.
- 24) Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P, et al. Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2007;356:115-1124.
- 25) Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2008;359:378-390.
- 26) Zhang ZG, Zhang L, Tsang W, et al. Correlation of VEGF and angiopoietin expression with disruption of blood-brain barrier and angiogenesis after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002;22:379-392.
- 27) Zhang ZG, Zhang L, Jiang Q, et al. VEGF enhances angiogenesis and promotes blood-brain barrier leakage in the ischemic brain. *J Clin Invest* 2000;106:829-838.
- 28) van Bruggen N, Thibodeaux H, Palmer JT, et al. VEGF antagonism reduces edema formation and tissue damage after ischemia/reperfusion injury in the mouse brain. *J Clin Invest* 1999;104:1613-1620.
- 29) Jickling GC, Liu D, Stamova B, et al. Hemorrhagic transformation after ischemic stroke in animals and humans. *J Cereb Blood Flow Metab* 2014;34:185-199.
- 30) Ma H, Campbell BCV, Parsons MW, et al. Thrombolysis guided by perfusion imaging up to 9 hours after onset of stroke. *N Engl J Med* 2019;380:1795-1803.
- 31) Campbell BCV, Ma H, Ringleb PA, et al. Extending thrombolysis to 4-5-9 h and wake-up stroke using perfusion imaging: a systematic review and meta-analysis of individual patient data. *Lancet* 2019;394:139-147.
- 32) Kanazawa M, Takahashi T, Ishikawa M, et al. Angiogenesis in the ischemic core: A potential treatment target? *J Cereb Blood Flow Metab* 2019;39:753-769.
- 33) Lo EH. A new penumbra: transitioning from injury into repair after stroke. *Nat Med* 2008;14:497-500.
- 34) Sun Y, Jin K, Xie L, et al. VEGF-induced neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis after focal cerebral ischemia. *J Clin Invest* 2003;111:1843-1851.
- 35) 下畑享良, 金澤雅人, 川村邦雄ら. 【最新臨床脳卒中学 [上]—最新の診断と治療—】治療戦略を目指した研究 基礎研究 VEGF シグナル阻害による脳出血抑制. *日本臨床 増刊最新臨床脳卒中学 (上)* 2014;72:412-416.
- 36) Hatakeyama M, Ninomiya I, Kanazawa M. Angiogenesis and neuronal remodeling after ischemic stroke. *Neural Regen Res* 2020;15:16-19.
- 37) Avery RL, Castellarin AA, Steinle NC, et al. Systemic pharmacokinetics following intravitreal injections of ranibizumab, bevacizumab or aflibercept in patients with neovascular AMD. *Br J Ophthalmol* 2014;98:1636-1641.
- 38) Kazazi-Hyseni F, Beijnen JE, Schellens JHM. Bevacizumab. *The Oncologist* 2010;15:819-825.
- 39) Lucentis (ranibizumab injection). [Internet]. Maryland, USA: Food and Drug Administration, FDA; 2014 Oct. [cited 2019 Oct 10]. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2014/125156s105lbl.pdf
- 40) Ahn SJ, Ahn J, Park S, et al. Intraocular pharmacokinetics of ranibizumab in vitrectomized versus nonvitrectomized eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014;55:567-573.
- 41) Ruckman, J. Green LS, Beeson J, et al. 2'-Fluoropyrimidine RNA-based aptamers to the 165-amino acid form of vascular endothelial growth factor (VEGF 165). Inhibition of receptor binding and VEGF-induced vascular permeability through interactions requiring the exon 7-encoded domain. *J Biol Chem* 1998;273:20556-20567.
- 42) Holash J, Davis S, Papadopoulos N, et al. VEGF-Trap: a VEGF blocker with potent antitumor effects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:11393-11398.

Abstract

VEGF—A therapeutic target against hemorrhagic transformation after t-PA treatment—

Masato Kanazawa, M.D., Ph.D.¹⁾, Tetsuya Takahashi, M.D., Ph.D.²⁾,
Kunio Kawamura, M.D., Ph.D.³⁾ and Takayoshi Shimohata, M.D., Ph.D.⁴⁾

¹⁾Department of Neurology, Brain Research Institute, Niigata University

²⁾Department of Neurology, National Hospital Organization Nishiniigata Chuo Hospital

³⁾Department of Rehabilitation, Midori Hospital

⁴⁾Department of Neurology, Gifu University Graduate School of Medicine

Tissue plasminogen activator (t-PA) treatment is beneficial for patients with ischemic stroke within 4.5 h of stroke onset, because the risk of intracerebral hemorrhagic transformation (HT) increases with delayed t-PA treatment. The benefits of t-PA thrombolysis are heavily dependent on time to treatment. Development of vasoprotective drugs that attenuate HT after delayed t-PA treatment might improve the prognosis of stroke patients and extend the therapeutic time window of t-PA and endovascular thrombolysis. An angiogenic factor, vascular endothelial growth factor (VEGF), might be associated with the blood-brain barrier (BBB) disruption after focal cerebral ischemia. By using a rat thromboembolic model, delayed t-PA treatment at 4 h after ischemia promoted expression of VEGF in BBB, matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) activation, degradation of BBB components, and HT. We demonstrated that HT was inhibited by intravenous administration of an anti-VEGF neutralizing antibody/VEGF receptor antagonist. In addition, for clinical application, reverse translation studies, a path from bedside to bench, are necessary.

(Rinsho Shinkeigaku (Clin Neurol) 2019;59:699-706)

Key words: cerebral ischemia, t-PA, hemorrhagic transformation, vascular protection, vascular endothelial growth factor
