

特集：ストレス応答分子：分子メカニズムの解明と病態の理解

ペルオキシレドキシンによる脳虚血後炎症を惹起するメカニズム

吉村 昭彦, 伊藤 美菜子, 近藤 泰介, 七田 崇

脳梗塞の病態では虚血によって神経細胞死が起こり、血流の再開によって活性酸素などが発生して組織傷害が促進される。その後炎症細胞が浸潤して神経細胞死が拡大する。脳内炎症を惹起する因子としては HMGB1 やペルオキシレドキシン (Prx) のような内因性組織因子 (DAMPs) が発見されている。このなかで Prx ファミリータンパク質は、細胞内においては過酸化物を還元する酸化ストレス抵抗性酵素である。しかし細胞外に放出されるとその共通構造である α 3-helix を介して Toll 様受容体 TLR2 と TLR4 依存的に浸潤マクロファージを活性化する。浸潤マクロファージは炎症性サイトカインを産生し、さらに γ δ T 細胞などからインターロイキン 17 (IL-17) を産生誘導して炎症を促進し、さらなる神経傷害を惹起する。このような一連の炎症メカニズムが解明されたことによって、新規の脳保護療法が開発できる可能性がある。

1. はじめに

脳卒中は、本邦の死因の第3位、寝たきりの原因の第1位であり、脳卒中の約7割を脳梗塞が占めている。総患者数は100万人を超え、がんに並ぶほど多いのにもかかわらず、脳梗塞に対する有効な治療法はいまだに乏しいのが現状であり、医療経済の点でも重要な課題である。脳梗塞は、脳血流の途絶による虚血によって脳組織が壊死に陥る病態であり、脳組織の壊死に伴って炎症が引き起こされる。脳虚血後炎症は病態の悪化、組織の修復に密接に関連しており、脳梗塞患者の予後に大きな影響を与える。しかしながら、脳梗塞における炎症のメカニズムはまだ十分に明らかになっておらず、これを標的とした治療法に乏しいのが現状である。したがって、脳虚血後炎症と組織傷害のメカニズムを明らかにすることによって新たな脳保護療法を開発できる可能性がある^{1,2)}。

虚血によって脳組織が壊死に陥ると、マクロファージや好中球などの炎症細胞が脳内に浸潤し、インターロイキン 1 β (IL-1 β) や腫瘍壊死因子 α (TNF- α) などの炎症性サイトカインを産生して炎症を促進する。特に IL-23 は、マクロファージよりもさらに遅れて脳内に浸潤する γ δ T 細胞から IL-17 を産生誘導することによって、さらなる炎症 (二次的な組織傷害) を引き起こす^{3,4)}。脳虚血の際には、マクロファージは血管内ではあまり炎症性サイトカインを産生しておらず、脳内に浸潤する際に何らかの機序で活性化されることにより高産生するようになる。以前より、脳内に浸潤したマクロファージの活性化には Toll 様受容体 (TLR) を介したシグナルが重要であることが示唆されていたが、その詳細なメカニズムは明らかになっていなかった⁵⁾。我々は脳内で TLR を活性化する因子としてペルオキシレドキシン (peroxiredoxin: Prx) を同定した⁶⁾。本稿では、脳虚血における Prx による浸潤マクロファージの活性化メカニズムを中心に概説する。

2. 脳梗塞におけるマクロファージ TLR の意義

本来、マクロファージなどの炎症細胞は、外敵である細菌やウイルスを構成する物質に反応して活性化する。しかし脳は無菌的な臓器であり、細菌やウイルスの構成成分が存在しない。では、脳内に浸潤したマクロファージはどの

慶應義塾大学医学部微生物免疫学教室 (〒160-8582 東京都新宿区信濃町 35)

Peroxiredoxin triggers post-ischemic inflammation
Akihiko Yoshimura, Minako Ito, Taisuke Kondo, and Takashi Shichita (Department of Microbiology and Immunology, Keio University School of Medicine, 35 Shinanomachi, Shinjyuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan)

ようなメカニズムで活性化され、炎症を引き起こすのか？ 2007年にChenらは無菌的な臓器における炎症では、死細胞によるTLR2, TLR4の活性化が重要な役割を持つことを報告した⁵⁾。実際に脳虚血再還流モデル（脳梗塞モデル）における組織傷害についてもTLR2, TLR4は炎症促進に働く。TLRは脳内の組織型マクロファージであるミクログリアにも発現している。我々は致死線量の放射線を照射した後に骨髓細胞を移植した骨髓キメラマウスを用いて一過性脳虚血再還流モデルの検討を行った（図1A）。骨髓移植では血液中のマクロファージはドナーの骨髓由来となるがミクログリアは宿主由来である。図1に示すように、ミ

クログリアを含む脳細胞のTLR2, TLR4ではなく、血液細胞のTLR2, TLR4が脳梗塞領域（=脳細胞が壊死した部位）の拡大に寄与することが明らかとなった⁶⁾。またTLR2欠損とTLR4欠損を比べるとTLR2欠損のほうが効果が大きく、TLR2/4両欠損マウスではさらに梗塞体積の減少が大きく相加効果が見られた（図1A）。

次に炎症性サイトカインの産生を検討した。虚血再還流後の炎症性サイトカイン産生は梗塞1日後から見られる。特にIL-23やIL-1 β は梗塞体積の拡大に重要である。TLR2欠損, TLR4欠損マウスでは脳梗塞部位の浸潤単核球における炎症性サイトカインの発現が低下し、TLR2/4両欠損マウスではほとんど見られなかった（図1B）。さらにTLR2欠損とTLR4欠損の効果を比較するとTLR2欠損のほうが大きく、これは梗塞体積の減少と関連していた（図1A, B）。

さらにセルソーターにより炎症細胞を分離して産生細胞を検討したところ、ミクログリアやその他の組織細胞、あるいはリンパ球ではなく、浸潤マクロファージが主なIL-23産生細胞であった。これらの結果より脳虚血後約24時間後に浸潤マクロファージがTLR2, TLR4を介して活性化されて炎症性サイトカインを放出し、さらに炎症を誘導して梗塞領域を拡大させることが明らかとなった。

3. 脳梗塞においてTLRを活性化するDAMPs

それでは、無菌的な臓器ではどのような分子がTLRを活性化するのだろうか？ 最近、様々な死細胞由来の成分がTLRを活性化できることが注目されている。これらはダメージ関連分子パターン（damage-associated molecular patterns: DAMPs）として知られており、脳由来の物質としてはhigh mobility group box 1（HMGB1）、熱ショックタンパク質（heat shock protein）、 β -アミロイド（ β -amyloid）などが研究されてきた⁷⁾。虚血による脳組織の傷害では、発症2~4時間後に神経細胞からHMGB1が放出される⁸⁾。細胞外に放出されたHMGB1は主に血管内皮細胞に作用して脳血液関門の破綻に関与し、組織傷害を進行させることが報告されている⁷⁾。HMGB1は脳虚血後早期（発症2~4時間後）に細胞外に放出され、発症12時間の時点では消失する。しかし、炎症細胞の脳内への浸潤は発症24時間以降に顕著になるため、HMGB1の細胞外放出は浸潤マクロファージの活性化と直接的に関連しているとは考えにくい。実際にHMGB1中和抗体を一過性脳虚血モデルマウスに投与すると梗塞体積が縮小して脳保護効果が認められる（図2）。しかし脳内に浸潤した血液細胞からの炎症性サイトカイン産生を抑制する効果は著明ではなかった⁶⁾。そこで我々は、脳虚血の際に浸潤マクロファージを活性化するDAMPsについて検索を行った⁶⁾。

マウス脳の抽出液を作製して、これをマウス培養骨髓樹

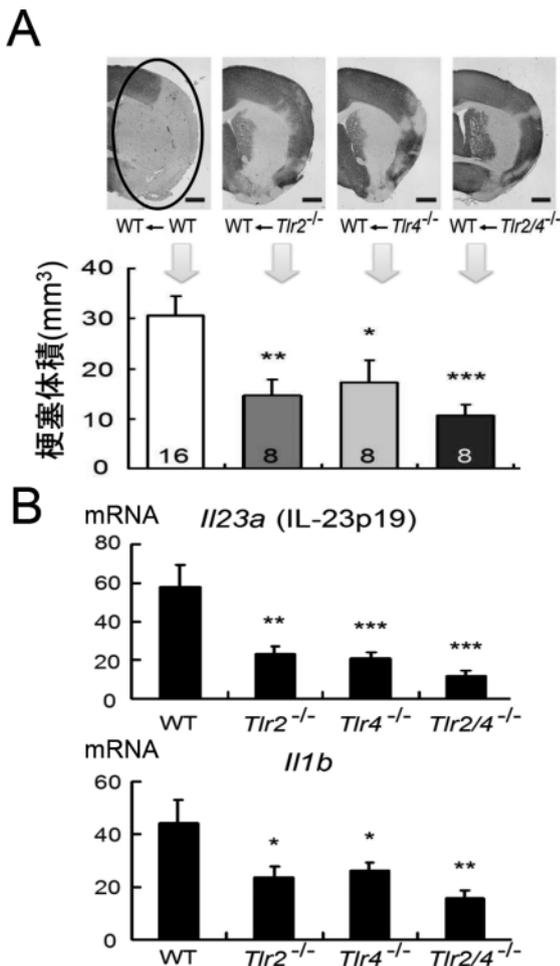
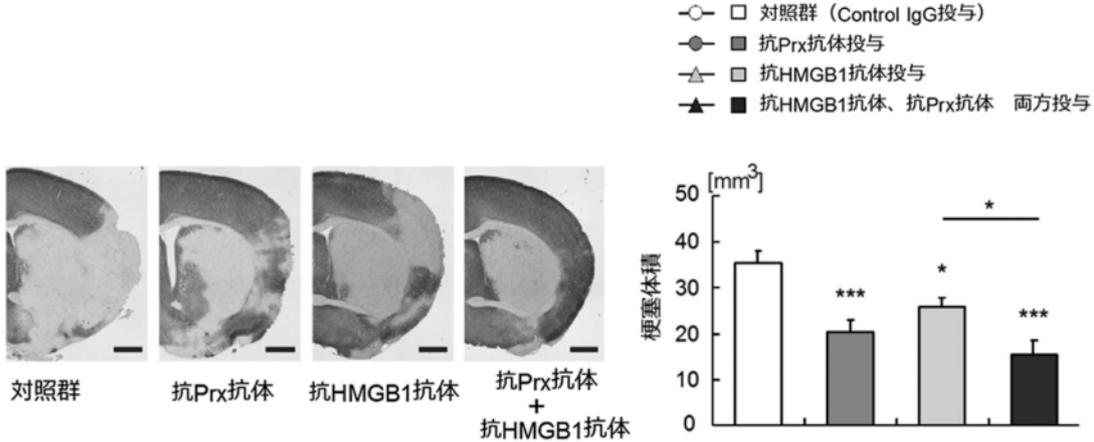


図1 脳梗塞と虚血後炎症におけるTLRの役割
一過性脳虚血再還流モデル（脳梗塞モデル）ではマウス頸動脈をナイロン糸で60分閉塞して虚血状態をつくりその後糸を抜くことで再還流を行う。(A) 骨髓キメラマウスにおける梗塞領域の染色（白い領域が壊死部分：楕円部）と梗塞体積。TLR2, TLR4, TLR2/4欠損マウスの骨髓を放射線照射した野生型(WT)マウスに移植し、梗塞モデルを施行し虚血4日目の組織を染色し梗塞体積を測定した。(B) 各欠損マウスに梗塞モデルを施行し、1日後に単核球分画を採取してmRNAを抽出してIL-23(上)およびIL-1 β (下)のmRNAレベルを定量PCRで測定した。

A



B

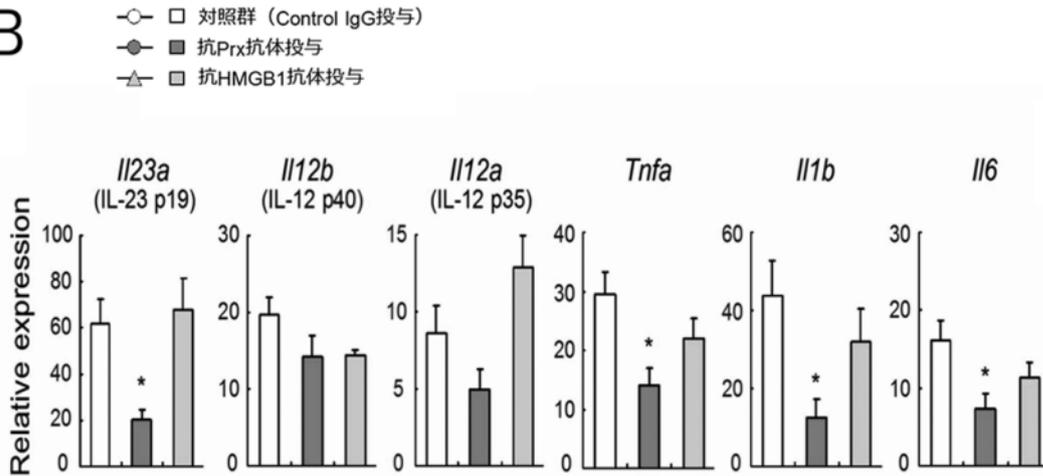


図2 一過性脳虚血モデルマウスにおける抗 Prx 抗体, 抗 HMGB1 抗体投与の効果
 (A) 脳虚血誘導直後に抗 Prx 抗体, 抗 HMGB1 抗体, またはその両方を投与して, 発症 4 日目の梗塞体積を示す。染色像は MAP2 染色で白い部分が梗塞部位。抗 Prx 抗体と抗 HMGB1 抗体によって梗塞体積が減少し, 両方組み合わせると相加効果が認められた。(B) 抗体の炎症性サイトカイン発現に対する効果。梗塞 1 日目の単核球分画のサイトカイン mRNA レベルを測定した。

状細胞に添加したところ, 樹状細胞が活性化されて IL-23 や IL-1 β , TNF- α などの炎症性サイトカインが産生された (図 3A)。浸潤マクロファージは量的に採取することが困難でありすでに活性化されているので IL-23 をよく産生することが知られている骨髄由来樹状細胞を用いている。脳抽出液にタンパク質分解酵素処理や熱処理を加えると, 樹状細胞の活性化が見られなくなることから, 脳抽出液中のタンパク質が重要であると考えられた。そこで脳抽出液をさらに分画し, ショ糖濃度勾配によって 15~25 kDa の分画が特に樹状細胞を活性化することがわかった。この分画を質量分析によって解析した。得られた候補タンパク質の組み替え体を作成し活性を調べたところ, Prx ファミリータンパク質が強力に樹状細胞を活性化して炎症性サイトカインを産生させることを発見した (図 3A)。

4. DAMPs としての Prx の役割

本来, Prx ファミリータンパク質 (Prx1~6 までの六つのサブタイプが存在する) は過酸化水素などの過酸化物を還元して水などに変える抗酸化酵素活性 (peroxiredoxin activity) を有しており, 様々な臓器における組織傷害では臓器保護効果を持つことが知られている⁹⁾。虚血によって脳組織では発症 12 時間後から Prx の発現が急激に上昇しており, 虚血ストレスによって細胞内に生じた活性酸素を代謝するために, 脳細胞内で Prx が産生誘導されたものと考えられる。

一方で DAMPs として働く Prx は, 虚血壊死によって細胞が破壊された際に細胞外に放出されたものではないかと考えられた。実際に Prx はがん細胞が放出する DAMPs としても報告されている¹⁰⁻¹²⁾。このように Prx は細胞内と細胞外で異なる二つの役割を持っており, 細胞内の Prx は組

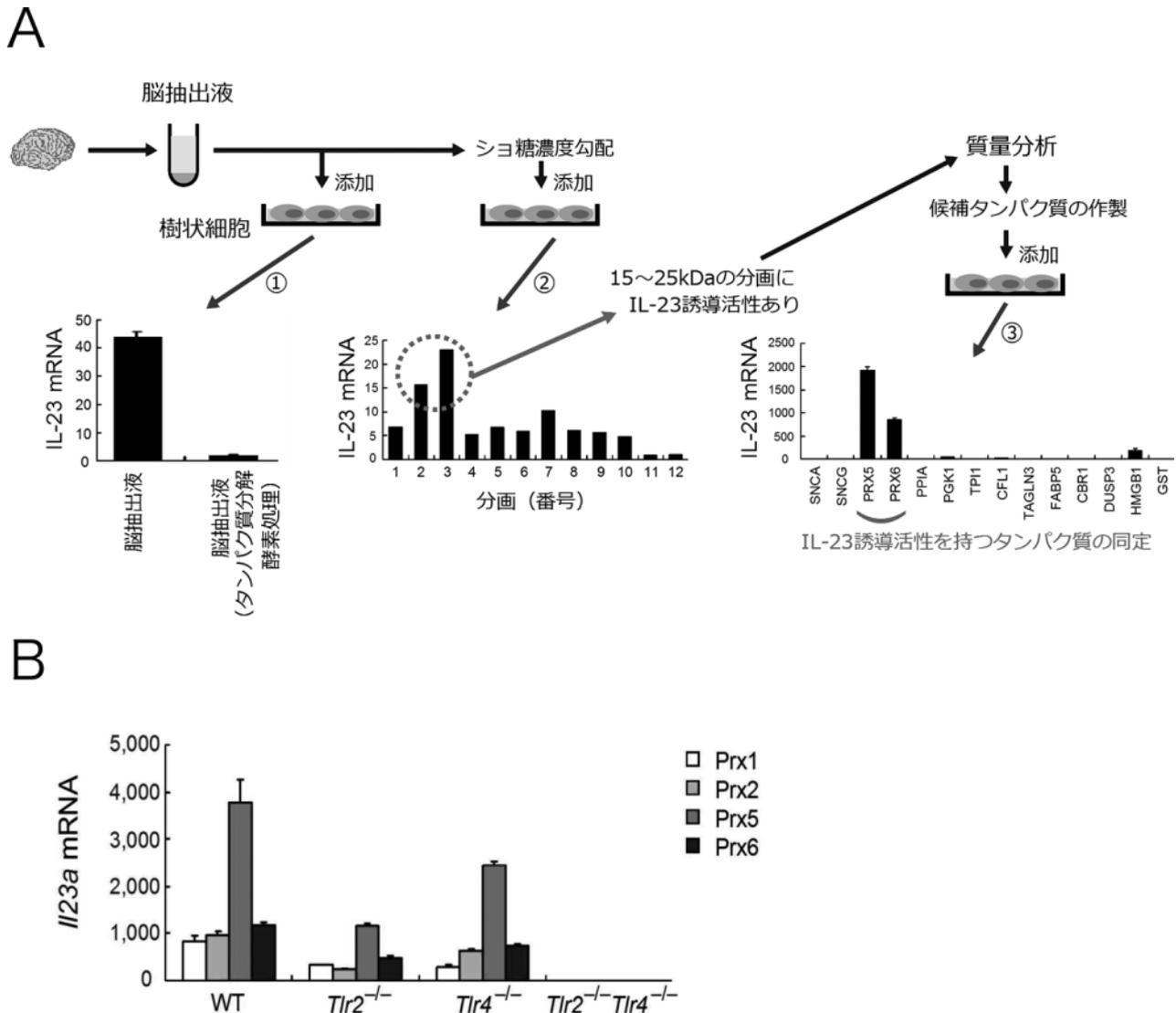


図3 脳抽出液中の DAMPs の検索

(A) ①脳抽出液を骨髄樹状細胞に添加すると IL-23 誘導活性が認められる。この分画をプロナーゼ処理すると活性が消失する。②ショ糖濃度勾配によって脳抽出液を分画後、15~25 kDa の分画 (分画 2, 3) に比較的強い IL-23 誘導活性を認めた。③質量分析によって分画 2, 3 を解析しこれらの分画に含まれる候補タンパク質の組み替え体を作製、樹状細胞に添加することによって IL-23 誘導活性を持つタンパク質を検索した。Prx に強い IL-23 誘導活性が認められた。(B) Prx ファミリータンパク質の TLR 欠損樹状細胞における IL-23 誘導活性。各 TLR2, TLR4, TLR2/4 欠損マウス由来の骨髄樹状細胞を Prx 組み替えタンパク質で刺激し IL-23mRNA レベルを測定した。

織保護に、細胞外の Prx は DAMPs として炎症惹起に働く可能性が考えられる (図 4)。実際に組み替え Prx1, Prx2, Prx5, Prx6 の骨髄樹状細胞における IL-23 誘導活性を測定したところ、すべてのファミリー分子に誘導活性が見られたが、Prx5 が最も強力であった (図 3B)。さらに TLR2 欠損、TLR4 欠損および TLR2/4 両欠損マウス由来の樹状細胞を用いたところ組み替え Prx の活性は TLR2/4、特に TLR2 に依存することが示された (図 3B)。この TLR 依存性の結果は TLR 欠損マウスを用いた *vivo* での梗塞体積やサイトカイン産生の減少と相関している (図 1 参照) こと

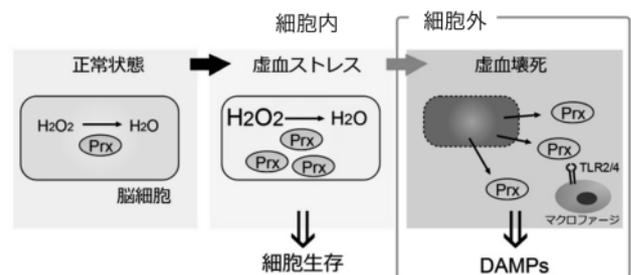


図4 Prx の細胞内外での機能

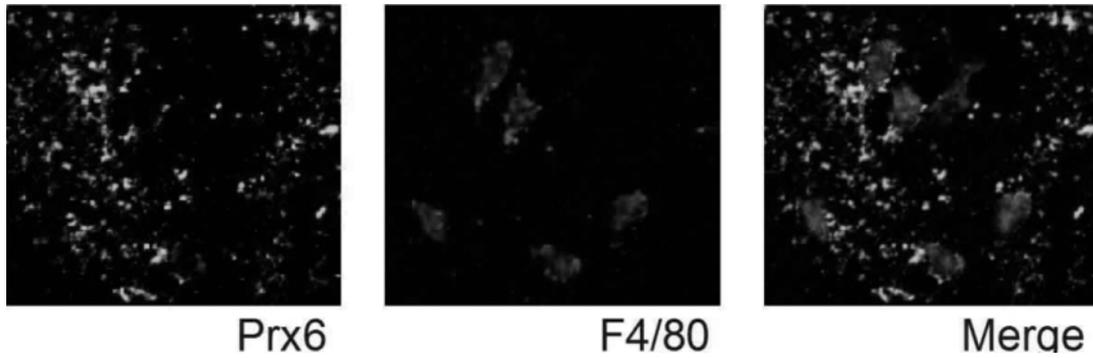


図5 脳梗塞巣における Prx とマクロファージとの接触
発症1日目の梗塞中心における免疫染色像を示す。左：Prx を含む壊死した組織の残骸。中：F4/80 陽性細胞（マクロファージ）が脳内に浸潤している。右：Prx6 を含む重ね合わせ像。

からも、Prx が脳梗塞後の炎症誘導にかかわる因子であることが示唆された。

実際に Prx の動態を明らかにするために脳虚血再還流モデルマウスを用いて、虚血脳内における Prx6 の発現の経時変化を免疫染色法によって調べた。Prx6 は虚血壊死に陥った領域に一致して強く発現しており、傷害された脳細胞の周囲に Prx6 を含む凝集物が多数存在していた(図5)。この Prx6 を含む凝集物は、浸潤マクロファージと細胞表面で接触している像が多数観察されたことから、虚血壊死に陥った脳細胞から細胞外に放出された Prx が浸潤マクロファージを活性化しているものと考えられた。このような Prx の細胞外放出は脳虚血発症12時間後から認められ、24時間後にピークを迎えてその後に減少しており、マクロファージが脳内に浸潤するタイミングと一致していた。

5. Prx による脳虚血後炎症の促進

実際に脳内で Prx がマクロファージの活性化と梗塞部位の拡大に寄与することを確かめるために Prx 中和抗体を脳虚血モデルマウスに投与した。抗 Prx 抗体を虚血直後もしくは虚血12時間後に投与すると脳保護効果が認められ、脳内に浸潤した炎症細胞からの IL-23 や IL-1 β , TNF- α などの炎症性サイトカイン産生が抑制されていた(図2)。しかし24時間後の抗体投与では効果はなかった。また TLR2/4 欠損マウスでは抗体による梗塞体積の減少が認められなかったことから、Prx 中和の効果は TLR2/4 依存性である。よって Prx は浸潤マクロファージを直接的に活性化し、炎症性サイトカインを産生誘導することによって炎症惹起に働く、第2の DAMPs であると考えられる。脳虚血後炎症では HMGB1 と Prx という、異なる時期に、異なる機能を持つ DAMPs が機能していることが明らかとなった(図2)。

Prx は培養樹状細胞に添加すると IL-23 や IL-1 β , TNF- α などの炎症性サイトカインを強く産生させる。しかし、TLR2 と TLR4 の両方を欠損した樹状細胞では Prx による

これらの炎症性サイトカインの産生が完全に欠失することから、Prx は TLR2 と TLR4 それぞれのシグナル経路を活性化すると考えられる。Prx が TLR2 と TLR4 を活性化するために必要な構造を、Prx の変異タンパク質を作製して調べたところ、Prx ファミリータンパク質に共通した α 3-helix 構造が重要であることが明らかとなった⁶⁾。 α 3-helix を構成するアミノ酸残基をアラニンに置換した Prx 変異タンパク質も同様にマクロファージ活性化能が低下し、Prx の α 3-helix 構造を GST と融合させたペプチドはマクロファージ活性化能を有していた。Prx の結晶構造解析によれば、 α 3-helix 構造は抗酸化活性を有するシステイン残基とはほぼ真反対の位置に存在し、Prx の表面にやや突出した位置に存在している(図6A)。この部分が TLR2/4 もしくは介在分子と相互作用する可能性が考えられる。現在のところ、Prx が直接的に TLR2, TLR4 に結合できるかどうかは明らかではないが、Prx に共通する α 3-helix 構造を標的とした薬剤の開発によって、強力な炎症抑制効果を持つ薬剤を開発できる可能性がある。

6. 細胞内 Prx の抗酸化作用

Prx は過酸化水素を水に還元する過酸化水素消去酵素である。過酸化水素を還元することにより自身の持つシステイン残基は酸化されて活性を失うが、チオレドキシシン(TRX)によって再還元される触媒サイクルを形成する(図6B)。細胞傷害性 DAMPs としての細胞外 Prx の作用と全く逆に、細胞内 Prx は細胞保護作用を有する。例えば Prx6 欠損マウスはパラコートによる酸化ストレスに感受性である¹³⁾。逆に Prx2 を脳で高発現させたトランスジェニックマウスは脳梗塞モデルに抵抗性を示す¹⁴⁾。そのほか多くの論文で Prx ファミリー分子の神経細胞保護作用が報告されている^{9, 15, 16)}。

現在 Prx ファミリーには、Prx1 から Prx6 の6個のアイソフォームが知られている。7番目の Prx として DJ-1 も報告されている¹⁷⁾。これらはその分子構造の違いから三つ

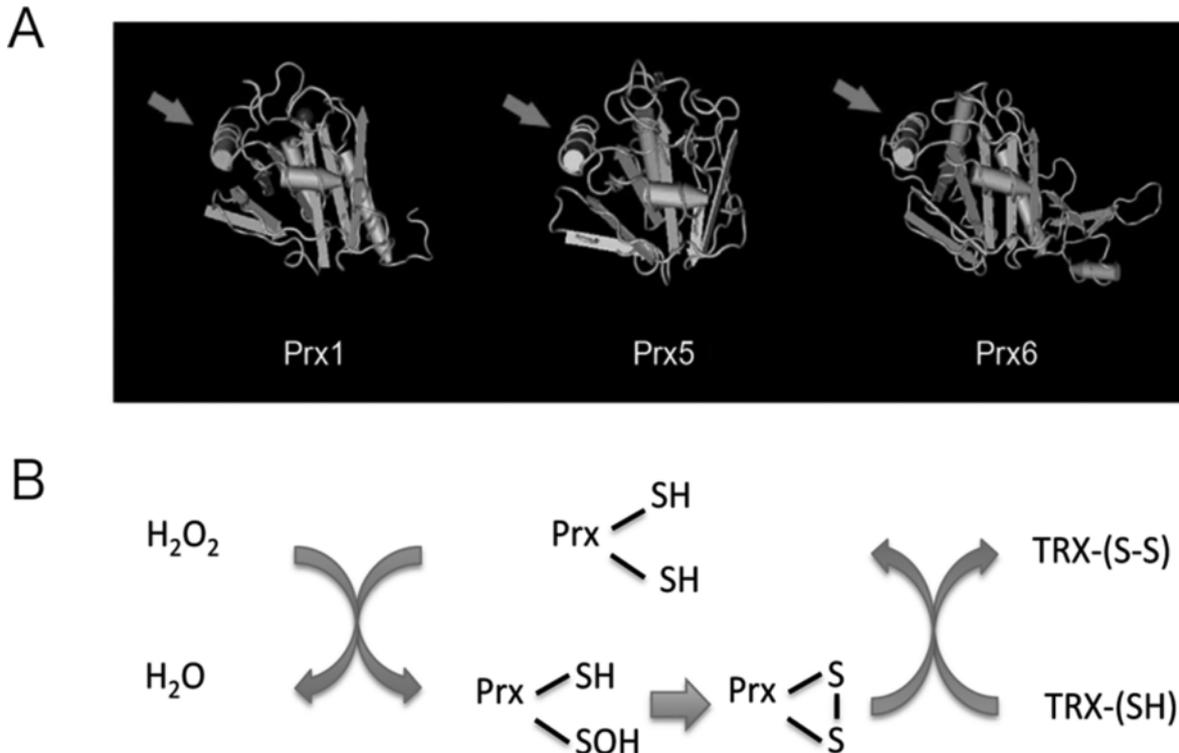


図6 Prxの構造と抗酸化作用

(A) Prxファミリータンパク質の構造. 矢印はPrxがDAMPsとして機能するために重要な α 3-helix構造を示す.

(B) Prxの過酸化水素還元メカニズム. Prx:ペルオキシレドキシシン, TRX:チオレドキシシン. SH, SOHなどはシステイン残基の酸化還元状態を示す.

のグループに分けられる¹⁸⁾.

1) 2-Cys Prx: N末端とC末端の両方によく保存されたシステイン残基をもち、その両方が活性に必要である. Prx1, 2, 3, 4.

2) atypical 2-Cys Prx: N末端にのみ保存されたシステイン残基をもち、活性の発現にはもう一つ別のシステイン残基を必要とする. Prx5.

3) 1-Cys Prx: N末端にのみシステイン残基をもち、活性発現にはこのシステイン残基のみが必要である. Prx6.

Prx1および2は細胞質, Prx3はミトコンドリア, Prx4は小胞体とリソソームおよび細胞外(分泌型), Prx5はペルオキシソームとミトコンドリア, Prx6は細胞質とミトコンドリアに存在するとされる.

免疫染色による検出では脳においては神経細胞にはPrx2, 3, 4, 5が, オリゴデンドロサイトにはPrx1, Prx4とPrx6が, アストロサイトではPrx6が, ミクログリアではPrx1が高発現している¹⁹⁾.

最近, 2-Cys型Prxは酸化ストレスや熱ストレスにより, 通常の低分子量タイプのPrxが構造変化を起こし, 高分子量複合体を形成することが明らかにされた. この高分子量複合体は分子シャペロンとしての機能を持ち, ストレスによって障害を受けたタンパク質の除去修復に関与するとさ

れる^{20,21)}. またPrx2のノックアウトマウスの細胞は, β -ガラクトシダーゼ陽性細胞の割合が野生型マウスの細胞に比べ30%くらい高く, 細胞老化が早い. Prx2は細胞老化を防御する役割を果たしていることが示唆されている²²⁾. またPrx1はAsk1とチオレドキシシンと競合して会合してAsk1の活性化を抑制し結果的にストレスによるアポトーシスを抑制する²³⁾. 最近Prxファミリーは細胞内酸化還元状態を制御することでサーカディアンリズムを形成する本体であると報告されている^{24,25)}.

7. 脳虚血後炎症にかかわるその他の因子と炎症細胞

以上のように細胞外PrxはTLR2, TLR4を介して, 浸潤マクロファージからIL-23やIL-1 β , TNF- α などの炎症性サイトカインを産生誘導する. 一方IL-23は糖鎖構造を認識するDectin経路を介しても産生誘導されることが知られているが, 脳虚血においてはDectin経路の関与についてはほとんど明らかになっていない²⁶⁾. また, IL-1 β は成熟タンパク質として細胞外に放出されるためにはin-flammasomeが活性化される必要があるがその経路についてもまだ十分に明らかになっていない²⁷⁾.

IL-23は脳虚血発症1日目に, ミクログリアではなく浸潤マクロファージから産生される. その後, 脳虚血発症

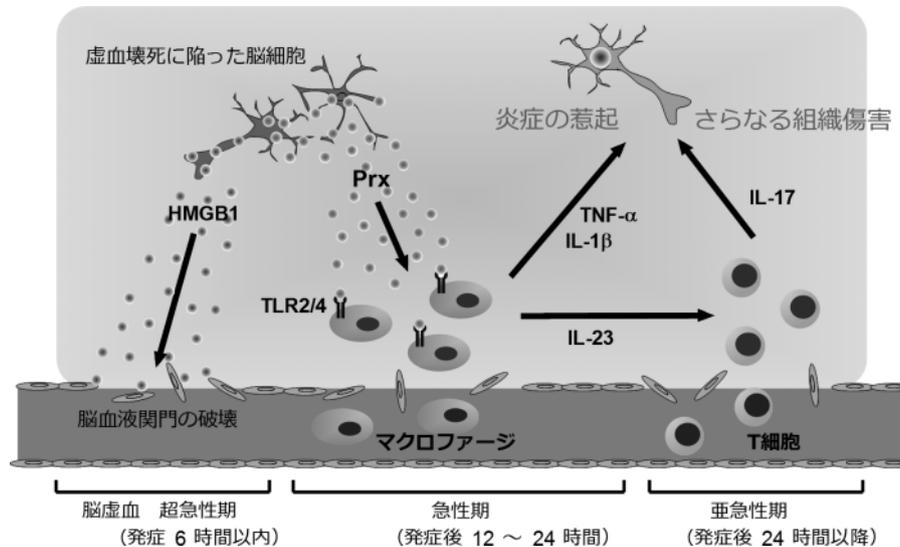


図7 脳虚血後炎症のメカニズム

発症6時間以内の超急性期では、脳細胞からHMGB1が放出され、これらは脳血液関門の破綻に寄与する。その後、脳内にマクロファージが浸潤するが、この時期には虚血壊死に陥った脳細胞からPrxが放出されて、TLR2、TLR4を介してマクロファージを活性化、IL-23やTNF- α 、IL-1 β などの炎症性サイトカインを産生させる。TNF- α 、IL-1 β は神経細胞に直接働いて細胞死を誘導するなど、神経傷害を促進する。IL-23はさらに遅れて亜急性期に浸潤するT細胞($\gamma\delta$ T細胞)からIL-17を産生誘導して、さらに炎症を促進、組織傷害を進行させる。

1~3日後にはT細胞が脳内に浸潤して炎症を促進すると考えられている。T細胞の1種である $\gamma\delta$ T細胞はIL-23の刺激によってIL-17を産生して炎症を促進、組織傷害に働く(図4)³⁾。このようなIL-23/IL-17経路に対しては、抗IL-23抗体、 $\gamma\delta$ T細胞除去抗体の投与により脳保護効果が認められる⁴⁾。一方で、CD4陽性ヘルパーT細胞も同様に脳内に浸潤してインターフェロン γ (IFN- γ)を産生し、IFN- γ は神経細胞に直接作用して細胞死を誘導することが報告されている。IFN- γ 欠損マウスにおける脳虚血による組織傷害の減弱は認められるとの報告と、認められないとする報告がある²⁸⁾。また、制御性T細胞(Treg)は虚血脳内においても浸潤が認められ、IL-10を産生してTNF- α やIFN- γ による炎症を抑制することによって脳保護効果をもたらすとされている²⁹⁾。

T細胞は、上記のように炎症性T細胞と抗炎症性T細胞が虚血脳内で機能するが、T細胞全体としては組織傷害性に働くと考えられている。T細胞を欠損するSCIDマウス等では著明な脳保護効果が報告されており、脳虚血後炎症におけるT細胞の寄与は大きいと考えられる³⁰⁾。FTY720は炎症組織にT細胞が浸潤する過程を阻害する免疫抑制剤であるが、脳虚血モデルにおける検討ではFTY720の投与による脳保護効果が複数報告されている^{3,31,32)}。FTY720は脳梗塞への臨床応用が期待されるものの、脳梗塞後の易感染状態(肺炎の併発など)を促進する可能性もあり検討が必要である。いずれにせよ今後も脳虚

血における自然免疫系と獲得免疫系の機能解明が進むことが期待される³³⁾。

8. おわりに

脳虚血後炎症は、虚血壊死に陥った脳細胞からHMGB-1やPrxが放出されることに始まり、脳内に浸潤したマクロファージが活性化されて炎症性サイトカインが産生され、さらにT細胞の浸潤によって炎症は促進される。これら一連の炎症メカニズムを標的として新規の脳保護療法が開発されることが期待される(図7)。特にPrxは細胞内では酸化ストレス除去、細胞保護因子として機能するのに対し、細胞外ではDAMPsとして機能する非常に興味深い分子である。このような両面性を生かした治療薬の開発が望まれる。

文 献

- 1) Macrez, R., Ali, C., Toutirais, O., Le Mauff, B., Defer, G., Dirnagl, U., & Vivien, D. (2011) *Lancet Neurol.*, 10, 471-480.
- 2) Iadecola, C. & Anrather, J. (2011) *Nat. Med.*, 17, 796-808.
- 3) Shichita, T., Sugiyama, Y., Ooboshi, H., Sugimori, H., Nakagawa, R., Takada, I., Iwaki, T., Okada, Y., Iida, M., Cua, D.J., Iwakura, Y., & Yoshimura, A. (2009) *Nat. Med.*, 15, 946-950.
- 4) Konoeda, F., Shichita, T., Yoshida, H., Sugiyama, Y., Muto, G., Hasegawa, E., Morita, R., Suzuki, N., & Yoshimura, A. (2010) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 402, 500-506.
- 5) Chen, C.J., Kono, H., Golenbock, D., Reed, G., Akira, S., &

- Rock, K.L. (2007) *Nat. Med.*, **13**, 851–856.
- 6) Shichita, T., Hasegawa, E., Kimura, A., Morita, R., Sakaguchi, R., Takada, I., Sekiya, T., Ooboshi, H., Kitazono, T., Yanagawa, T., Ishii, T., Takahashi, H., Mori, S., Nishibori, M., Kuroda, K., Akira, S., Miyake, K., & Yoshimura, A. (2012) *Nat. Med.*, **18**, 911–918.
 - 7) Marsh, B.J., Williams-Karnesky, R.L., & Stenzel-Poore, M.P. (2009) *Neuroscience*, **158**, 1007–1020.
 - 8) Zhang, J., Takahashi, H.K., Liu, K., Wake, H., Liu, R., Maruo, T., Date, I., Yoshino, T., Ohtsuka, A., Mori, S., & Nishibori, M. (2011) *Stroke*, **42**, 1420–1428.
 - 9) Patenaude, A., Murthy, M.R., & Mirault, M.E. (2005) *Cell. Mol. Life. Sci.*, **62**, 1063–1080.
 - 10) Ishii, T., Warabi, E., & Yanagawa, T. (2012) *J. Clin. Biochem. Nutr.*, **50**, 91–105.
 - 11) Riddell, J.R., Bshara, W., Moser, M.T., Spornyak, J.A., Foster, B.A., & Gollnick, S.O. (2011) *Cancer Res.*, **71**, 1637–1646.
 - 12) Riddell, J.R., Wang, X.Y., Minderman, H., & Gollnick, S.O. (2010) *J. Immunol.*, **184**, 1022–1030.
 - 13) Wang, X., Phelan, S.A., Forsman-Semb, K., Taylor, E.F., Petros, C., Brown, A., Lerner, C.P., & Paigen, B. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 25179–25190.
 - 14) Gan, Y., Ji, X., Hu, X., Luo, Y., Zhang, L., Li, P., Liu, X., Yan, F., Vosler, P., Gao, Y., Stetler, R.A., & Chen, J. (2012) *Antioxid. Redox Signal.*, **17**, 719–732.
 - 15) Hattori, F. & Oikawa, S. (2007) *Subcell. Biochem.*, **44**, 357–374.
 - 16) Ishii, T., Warabi, E., & Yanagawa, T. (2012) *J. Clin. Biochem. Nutr.*, **50**, 91–105.
 - 17) Andres-Mateos, E., Perier, C., Zhang, L., Blanchard-Fillion, B., Greco, T.M., Thomas, B., Ko, H.S., Sasaki, M., Ischiropoulos, H., Przedborski, S., Dawson, T.M., & Dawson, V.L. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 14807–14812.
 - 18) Rhee, S.G., Woo, H.A., Kil, I.S., & Bae, S.H. (2012) *J. Biol. Chem.*, **287**, 4403–4410.
 - 19) Jin, M.H., Lee, Y.H., Kim, J.M., Sun, H.N., Moon, E.Y., Shong, M.H., Kim, S.U., Lee, S.H., Lee, T.H., Yu, D.Y., & Lee, D.S. (2005) *Neurosci. Lett.*, **381**, 252–257.
 - 20) Kim, S.Y., Paeng, S.K., Nawkar, G.M., Maibam, P., Lee, E.S., Kim, K.S., Lee, D.H., Park, D.J., Kang, S.B., Kim, M.R., Lee, J.H., Kim, Y.H., Kim, W.Y., & Kang, C.H. (2011) *Plant. Sci.*, **181**, 119–124.
 - 21) Moon, J.C., Hah, Y.S., Kim, W.Y., Jung, B.G., Jang, H.H., Lee, J.R., Kim, S.Y., Lee, Y.M., Jeon, M.G., Kim, C.W., Cho, M.J., & Lee, S.Y. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 28775–28784.
 - 22) Nyström, T., Yang, J., & Molin, M. (2012) *Genes Dev.*, **26**, 2001–2008.
 - 23) Kim, S.Y., Kim, T.J., & Lee, K.Y. (2008) *FEBS Lett.*, **582**, 1913–1918.
 - 24) Edgar, R.S., Green, E.W., Zhao, Y., van Ooijen, G., Olmedo, M., Qin, X., Xu, Y., Pan, M., Valekunja, U.K., Feeney, K.A., Maywood, E.S., Hastings, M.H., Baliga, N.S., Merrow, M., Millar, A.J., Johnson, C.H., Kyriacou, C.P., O'Neill, J.S., & Reddy, A.B. (2012) *Nature*, **485**, 459–464.
 - 25) Kil, I.S., Lee, S.K., Ryu, K.W., Woo, H.A., Hu, M.C., Bae, S. H., & Rhee, S.G. (2012) *Mol. Cell*, **46**, 584–594.
 - 26) Gringhuis, S.I., den Dunnen, J., Litjens, M., van der Vlist, M., Wevers, B., Bruijns, S.C., & Geijtenbeek, T.B. (2009) *Nat. Immunol.*, **10**, 203–213.
 - 27) Abulafia, D.P., de Rivero Vaccari, J.P., Lozano, J.D., Lotocki, G., Keane, R.W., & Dietrich, W.D. (2009) *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **29**, 534–544.
 - 28) Yilmaz, G., Arumugam, T.V., Stokes, K.Y., & Granger, D.N. (2006) *Circulation*, **113**, 2105–2112.
 - 29) Liesz, A., Suri-Payer, E., Veltkamp, C., Doerr, H., Sommer, C., Rivest, S., Giese, T., & Veltkamp, R. (2009) *Nat. Med.*, **15**, 192–199.
 - 30) Hurn, P.D., Subramanian, S., Parker, S.M., Afentoulis, M.E., Kaler, L.J., Vandenbark, A.A., & Offner, H. (2007) *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **27**, 1798–1805.
 - 31) Wei, Y., Yemisci, M., Kim, H.H., Yung, L.M., Shin, H.K., Hwang, S.K., Guo, S., Qin, T., Alsharif, N., Brinkmann, V., Liao, J.K., Lo, E.H., & Waeber, C. (2011) *Ann. Neurol.*, **69**, 119–129.
 - 32) Hasegawa, Y., Suzuki, H., Sozen, T., Rolland, W., & Zhang, J. H. (2010) *Stroke*, **41**, 368–374.
 - 33) Meisel, C. & Meisel, A. (2011) *N. Engl. J. Med.*, **365**, 2134–2136.
-