

アクリル化タンパク質の動脈硬化病巣における局在と
マクロファージ泡沫化に与える影響

2017 年

先端医学薬学専攻 医療薬学研究室

叶川 友里

目次

略語一覧		1
序論		2
第 1 章	実験材料および方法	
1 - 1	試薬	5
1 - 2	動物	5
1 - 3	飼料	5
1 - 4	血漿の調製	5
1 - 5	コレステロール定量	5
1 - 6	タンパク定量	6
1 - 7	PC-Acro 定量	6
1 - 8	MDA 定量	6
1 - 9	β VLDL、LDL および VLDL の調製	6
1 - 10	Western blot 分析	6
1 - 11	アクロレイン化 β VLDL による THP-1 マクロファージのコレステロール蓄積の解析	7
1 - 12	免疫組織化学染色	8
1 - 13	統計処理	8
第 2 章	実験結果	
2 - 1	高コレステロール食給餌による血漿中コレステロール濃度の変化	9
2 - 2	高コレステロール食給餌による血漿中 PC-Acro 濃度の変化	9
2 - 3	高コレステロール食給餌による血漿中 MDA 濃度の変化	9
2 - 4	高コレステロール食給餌が血漿中タンパク質のアクロレイン化に与える影響	10
2 - 5	高コレステロール食給餌が血漿中タンパク質の MDA 化に与える影響	10
2 - 6	血漿中 β VLDL のアクロレインおよび MDA 化タンパク質の検出	10
2 - 7	アクロレイン化 β VLDL による THP-1 マクロファージのコレステロール蓄積の解析	11
2 - 8	大動脈弓部凍結切片の免疫組織化学染色	11
第 3 章	考察	20

総括	23
参考文献	24
論文目録	31
謝辞	32

略語一覧

文章中では以下の略語を用いた。

ABC	: avidin:biotinylated enzyme complex
ApoB	: apolipoprotein B
β VLDL	: beta-migrating very low-density lipoprotein
BCA	: bicinchonic acid
BPB	: bromophenol blue
BSA	: bovine serum albumin
CAPS	: 3-(cyclohexylamino)-1-propanesulfonic acid
CBB	: Coomassie Brilliant Blue R-250
DAB	: 3, 3'-diaminobenzidine
EDTA	: ethylenediaminetetraacetic acid
FBS	: fetal bovine serum
HDL	: high-density lipoprotein
HRP	: horseradish peroxidase
LDL	: low-density lipoprotein
MDA	: malondialdehyde
PBS	: phosphate-buffered saline
PC-Acro	: protein-conjugated acrolein
PFA	: paraformaldehyde
PMA	: phorbol-12-myristate-13-acetate
PVDF	: polyvinylidene difluoride
RPMI	: Roswell Park Memorial Institute
SDS	: sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	: sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
SFCA	: surfactant-free cellulose acetate
SMC	: smooth muscle cell
SR	: scavenger receptor
SR-A1	: scavenger receptor A1
TBARS	: thiobarbituric acid reactive species
TBS	: Tris-buffered saline
Tris	: 2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol
VLDL	: very low-density lipoprotein

序論

アテローム性動脈硬化症は、動脈壁が肥厚することにより虚血性心疾患や脳梗塞の引き金となる動脈病変である。動脈硬化病巣にはリポタンパク質を取り込むことによりコレステロールを過剰に蓄積した泡沫細胞が存在する (Fig. 1) [1]。泡沫細胞は、マクロファージおよび平滑筋細胞由来のものであり、マクロファージ由来の泡沫細胞は、アテローム性動脈硬化症の初期病変である脂肪線条を形成する。さらに泡沫化したマクロファージは、サイトカインの産生およびアポトーシスを引き起こし、アテローム性動脈硬化症の進展を促進する [2]。従って、マクロファージの泡沫化を引き起こす因子の同定は、アテローム性動脈硬化症の発症や進展を制御する上で重要である。

Low-density lipoprotein (LDL) は LDL 受容体を介しマクロファージに取り込まれるが、LDL 受容体は細胞内のコレステロール量増加によりダウンレギュレーションを受けるため、LDL はマクロファージの泡沫化を引き起こさない [3]。一方、酸化修飾された LDL はスカベンジャー受容体を介しマクロファージに取り込まれるため、酸化 LDL はマクロファージにおけるコレステロールの蓄積に主要な役割を果たすと考えられている [4]。しかし、ヒト動脈硬化病巣から単離した LDL の酸化は、マクロファージのスカベンジャー受容体に認識されるほど進んでいないことが報告されており [5]、酸化 LDL の動脈硬化症に対する寄与には不明な点が残されている。当研究室では、アхроレインで修飾された LDL は、酸化 LDL より細胞内のコレステロール量を有意に増加させ、マクロファージの泡沫化に寄与することを報告した [6]。従って、アхроレインにより修飾されたリポタンパク質は、マクロファージの泡沫化の誘導を介し、アテローム性動脈硬化症の発症に重要な役割を果たす可能性が考えられる。

脂質異常症は、アテローム性動脈硬化症のリスク因子である [7]。高コレステロール食を給餌したウサギは、アテローム性動脈硬化症のモデル動物として用いられており、血漿中において β -migrating very low-density lipoprotein (β VLDL) を含むコレステリルエステルに富んだりポタンパク質が増加する [8, 9]。ヒトでは血液中の β VLDL は III 型脂質異常症の患者で増加し、アテローム性動脈硬化症の早期発症を伴う [10]。In vitro において β VLDL はマクロファージの泡沫化に寄与することが報告されている [11-13]。さらに、ヒト血液中の酸化 LDL 濃度は、総 LDL 濃度の 0.5% より少なく、動脈硬化症を発症させる因子として十分ではないと考えられる [14]。以上の報告は、酸化 LDL だけではなく β VLDL がマクロファージにおけるコレステロール蓄積の主要因子であること、および修飾された β VLDL が動脈硬化症の発症に関与する可能性を示している。

アクロレインは毒性が強く、反応性が高い α, β -不飽和アルデヒドであり、脂質の過酸化により生成する。その反応性の高さから生体内ではタンパク質中の求核性が高いリジン、システイン、ヒスチジン残基に付加する [15]。ヒト動脈硬化病巣においてアクロレインが結合したタンパク質 (protein-conjugated acrolein, PC-Acro) が検出されており [16]、血液中の PC-Acro 濃度は動脈硬化症の進展と相関することが報告されている [17]。アクロレインの産生経路として2つの経路が上げられる。1つは、喫煙といった有機物の過熱により産生される経路であり、喫煙は冠動脈硬化症のリスク因子として知られている [18]。もう1つは、細胞障害時に放出されるポリアミンから産生する経路であり、この現象は脳梗塞のモデルマウスにおいて認められている [19]。その他に慢性腎臓病 [20] やアルツハイマー病 [21] の患者で血液中の PC-Acro 濃度が上昇することが報告されており、細胞傷害時にアクロレインが産生されることが示されている。現在、血液中の PC-Acro 濃度は、脳梗塞リスク評価の分子マーカーとして使用されており [22]、脳梗塞と動脈硬化症の発症は相関することが報告されている [23]。動脈硬化病巣は血管内皮細胞の障害から始まることが示唆されており [24]、内皮細胞の障害部位からアクロレインが産生される可能性がある。以上の知見から、生体内で β VLDLはアクロレインにより修飾されている可能性が考えられるが、アクロレイン化 β VLDLのアテローム性動脈硬化症に対する役割は明らかとなっていない。

本研究では、アテローム性動脈硬化症におけるアクロレイン化 β VLDLの役割を明らかにすることを目的とし、動脈硬化症モデル動物を用い動脈硬化病巣における PC-Acro の局在を検討した。また、アクロレイン化 β VLDLの動脈硬化症に対する寄与を明らかにするため、PC-Acro 濃度および酸化 LDL の指標としてマロンジアルデヒド (MDA) 濃度を測定した。さらに、THP-1 マクロファージを用いアクロレイン化 β VLDLがマクロファージの泡沫化に与える影響を解析した。

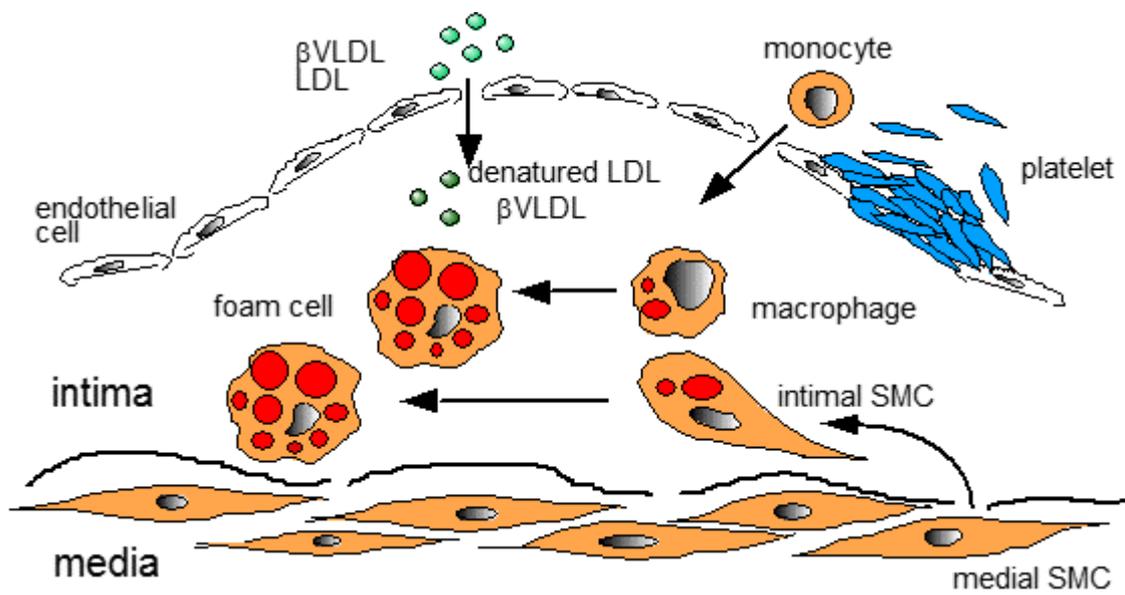


Fig.1 Foam cell formation in atherosclerotic lesions

SMC, smooth muscle cell; LDL, low-density lipoprotein; β VLDL, β -migrating very low-density lipoprotein.

第1章 実験材料および方法

1-1 試薬

試薬類とその入手方法は実験方法の各項に付記した。特に表示のない限り、和光純薬株式会社および Sigma-Aldrich 株式会社より購入した特級試薬を用いた。

1-2 動物

オスのニュージーランド白色兎 (6 週令、体重 1.8–2.2 kg) を、高杉実験動物より購入した。ウサギは、普通食 (control diet) 高コレステロール食 (high-cholesterol diet) を給餌する群に割り付け、各群 5 羽用いた。

1-3 試料

普通食として RC-4 (オリエンタル酵母工業株式会社) を用いた。高コレステロール食は RC-4 に 0.5% のコレステロールを加えた飼料を用いた (オリエンタル酵母工業株式会社)。給餌は 1 日 100 g を 8 週間行った。ただし、採血の前日は絶食とした。

1-4 血漿の調製

2 週間に 1 度、耳介中心動脈より採血を行った。8 週間の給餌終了後、ペントバルビタール (50 mg/kg) による麻酔下で頸動脈より血液を回収した。得た血液に 1 u/mL の濃度になるようにヘパリンナトリウム溶液を添加し、1,000 × g、10 分間の遠心により得た上清を血漿として用いた。

1-5 コレステロール定量

総コレステロール濃度はコレステロール E-テストワコーを、遊離コレステロール濃度は遊離コレステロール E-テストワコーをそれぞれ用いて酵素法により定量した。コレステリルエステル濃度は、総コレステロール濃度と遊離コレステロールの濃度の差から求めた。さらに、リンタングステン酸 Mg 法により血漿より non-high-density lipoprotein (HDL) 画分を沈殿させ、上清を HDL 画分として得た。Non-HDL 画分のコレステロール濃度は、血漿と HDL 画分のコレステロール濃度の差より算出した。

1-6 タンパク定量

タンパク定量は BCA Protein Assay Reagent Kit (Thermo Fisher Scientific) を用い、キットのプロトコールに従って行った。標準品として BSA を用いた。標準液とサンプルの希釈には、それぞれサンプルの調製の際に用いた溶液を用いた。

1-7 PC-Acro 定量

血漿中 PC-Acro の定量は、抗アクロレインモノクローナル抗体 (mAb5F6、日油株式会社) を用いた ELISA 法により、キットのプロトコールに従って行った。

1-8 MDA 定量

血漿中 MDA の定量は、thiobarbituric acid reactive species (TBARS) assay 法により行った。血漿 60 μL に 20 μL のトリクロロ酢酸を添加し、4°C で 10 分間インキュベートした。4°C、16,100 $\times g$ 、20 分間の遠心により得られた上清 60 μL に 10 μL の 0.1125 M の過塩素酸、10 μL の 40 mM の 2-チオバルビツール酸を添加した。反応液を 94°C で 60 分間インキュベート後、532 nm における吸光度を測定した。標準液は 400 mM の 1, 1, 3, 3-テトラメトキシプロパンを 50°C で 60 分間インキュベーションし、加水分解により得られた MDA を用いた。

1-9 β VLDL、LDL および VLDL の調製

β VLDL (density < 1.006 g/mL) は high-cholesterol diet を 8 週間給餌したウサギの血漿より Goldstein らの方法 [11] に従って超遠心法を用いて調製した。Very-low density lipoprotein (VLDL)、LDL は健常人ボランティアより採取した血漿より段階的超遠心法を用いて調製した。 β VLDL の β 位への移動性は、ユニバーサルゲル (Helena Laboratories) を用いたアガロースゲル電気泳動を行った後、Fat Red 7B (MP Biomedicals) による脂質染色にて確認した。

1-10 Western blot 分析

コントロールとして、LDL にアクロレイン (東京化成工業) を添加し 37°C で 24 時間インキュベーションを行うことによりアクロレイン化 LDL を調製したものを用いた。血漿および β VLDL は 30 μg protein、アクロレイン化 LDL および LDL は 1 μg protein に sample buffer (4% SDS、200 mM Tris-HCl pH 6.8、20% glycerol、

5 mM EDTA、0.01% BPB、10% 2-mercaptoethanol) を加え、98°C で β VLDL は 5 分、その他は 90 秒間インキュベートし、泳動サンプルとした。6、10% のポリアクリルアミドゲルまたは 3–10% 濃度勾配ゲル (ATTO) と electrode buffer (0.1% SDS、0.3% Tris、1.44% glycine) を用いて電気泳動を行った。泳動後のゲルを 100 V で 2 時間、CAPS buffer (10 mM CAPS pH 11.0、10% methanol) 中で PVDF 膜 (Millipore) に転写した。ブロッキングは 5% skim milk/T-TBS (20 mM Tris-HCl pH 7.4、0.15 M NaCl、0.1% Tween-20) で行った。一次抗体としてマウスモノクローナル抗アクロレイン抗体 (mAb5F6、日油株式会社) を 1,000 倍希釈、ラビットポリクローナル抗 apoB 抗体 (Santa Cruz Biotechnology) を 500 倍希釈、マウスモノクローナル抗 MDA 抗体 (日油株式会社) を 1,000 倍希釈して用いた。また二次抗体として HRP 標識抗ラビット IgG 抗体 (Cell Signaling Technology) を 10,000 倍希釈、HRP 標識抗マウス IgG 抗体 (GE Healthcare) を 5,000 倍希釈して用いた。検出は ECL Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare) または Immobilon Western (Millipore) のプロトコールに従い、LAS 1000 plus (FUJIFILM) で行った。

1 - 11 アクロレイン化 β VLDL による THP-1 マクロファージのコレステロール蓄積の解析

アクロレイン化 β VLDL は、 β VLDL (0.4 mg/protein mL) と 0.02 mM、0.2 mM または 2 mM のアクロレインを 37°C で 24 時間反応させ調製した。氷上で反応を停止した後、0.9% NaCl で透析を行い、未反応のアクロレインを除去した。 β VLDL、アクロレイン化 β VLDL は RPMI-1640 で透析し、SFCA 膜 0.45 μ m シリジフィルターでろ過滅菌を行った後に細胞に添加した。

ヒト単球性白血病細胞株 THP-1 は培養液として 10% FBS (Thermo Scientific HyClone)、100 units/mL ペニシリン、100 μ g/mL ストレプトマイシンを含む RPMI-1640 培地 (10% FBS/RPMI) を用い、37°C、5% CO₂ で培養した。150 nM PMA を含む 10% FBS/RPMI を用い、12 well plate (Corning) に 1.0×10^6 cells/mL で THP-1 を播種した。37°C、5% CO₂ で 2 日間培養し接着した細胞をマクロファージ様細胞の THP-1 マクロファージと称した。200 μ g の β VLDL もしくはアクロレイン化 β VLDL を添加し、48 時間培養した。培地除去後、リポタンパクを吸着させるために cold 0.1% BSA/PBS を添加し氷上で 5 分間インキュベーションする操作を 2 回行った。さらに cold PBS で細胞を 2 回洗浄した後、hexane : isopropanol (2 : 1, v/v) で細胞からコレステロールを 2 回抽出した。コレステロールを 95% エタノールで溶解し上記に示した方法で定量を行った。

1 - 12 免疫組織化学染色

ウサギ大動脈を PBS で灌流後、4% PFA で固定した。その後、大動脈を 4 つの部位に分け [25]、10%、20%、30% スクロース/0.1 M PBS で順に脱水し、O.C.T compound (Sakura Finetek) で包埋し-80°C で凍結した。凍結切片は、クライオスタット (CM1850; Leica) により厚さ 5 μm のものを作成した。大動脈弓部の凍結切片を染色に用いた。

VECTASTAIN Elite ABC Kit (Vector Laboratories) のプロトコールに準じて免疫組織化学染色を行った。切片は 10% の正常ヤギ血清でインキュベートした。一次抗体として抗ラビットマクロファージ抗体 (RAM11、Dako North America) を 1,000 倍希釈、マウスモノクローナル抗アクロレイン抗体 (mAb5F6、日油株式会社) を 1,000 倍希釈、抗ヒトマッスルアクチン抗体 (HHF35、Dako North America) を 200 倍希釈、抗 CD31 抗体 (JC07A、Dako North America) を 100 倍希釈して用いた。二次抗体としてビオチン標識 IgG 抗体を用いた。染色は VECTASTAIN Elite ABC (avidin : biotinylated enzyme complex) 試薬とジアミノベンジジン溶液により行った。また対比染色として核をマイヤーヘマトキシリン溶液で染色した。風乾後、CC/Mount (Diagnostic Biosystems) で封入し、顕微鏡で観察した。

1 - 13 統計処理

データは平均値±標準偏差として表記した。有意差検定は対応のない Student's *t*-test または一元配置分散分析法の Bonferroni 法により行った。

第2章 実験結果

2-1 高コレステロール食給餌による血漿中コレステロール濃度の変化

8週間給餌後、体重はコントロール食給餌群と高コレステロール食給餌群の2群間で違いはなかった (2.55 ± 0.09 kg vs. 2.70 ± 0.19 kg)。血漿中の総コレステロール濃度 (Fig. 2A)、non-HDL 画分のコレステロール濃度 (Fig. 2B) は高コレステロール食給餌群において有意に高かった。一方、HDL コレステロール濃度は、2群間で違いはなかった (Fig. 2C)。

2-2 高コレステロール食給餌による血漿中 PC-Acro 濃度の変化

高コレステロール食給餌が血漿中 PC-Acro 濃度に与える影響を検討するため、血漿中 PC-Acro 濃度の経時的な変化を解析した。各群の給餌開始時点における PC-Acro 濃度の平均値を1としたときの相対的な変化を評価した。コントロール食給餌群では8週間の給餌期間中、血漿中の PC-Acro 濃度は変わらなかった。一方、高コレステロール食給餌群において、血漿中の PC-Acro 濃度は給餌2週目から増加し、給餌6週目に最も高い値を示した (Fig. 2D)。群間での有意な差は認められなかったが、血漿中の PC-Acro 濃度はコントロール食給餌群に比べ高コレステロール食給餌群において高い傾向が認められた。

2-3 高コレステロール食給餌による血漿中 MDA 濃度の変化

アテローム性動脈硬化症における PC-Acro の寄与を明らかにするため、酸化 LDL の指標として MDA 濃度を測定した。各群の給餌開始時点における MDA 濃度の平均値を1としたときの相対的な変化を評価した。コントロール食給餌群では8週間の給餌期間中、血漿中の MDA 濃度は変わらなかった。高コレステロール食給餌群において、血漿中の MDA 濃度は給餌4週目から増加し、給餌6週目に最も高い値を示した (Fig. 2E)。群間での有意な差は認められなかったが、血漿中の MDA 濃度はコントロール食給餌群に比べ高コレステロール食給餌群において高い傾向が認められた。

2-4 高コレステロール食給餌が血漿中タンパク質のアクロレイン化に与える影響

アクロレイン化を受けた血漿中タンパク質を検討するために Western blot 法による解析を行った。低分子量領域では 50 kDa および 67 kDa のタンパク質がアクロレイン化を受けていた (Fig. 3)。これまでの報告から 50 kDa のタンパク質は IgG 重鎖、67 kDa のタンパク質はアルブミンである可能性が考えられる [26, 27]。以上のタンパク質の発現強度をデンシトリーにより定量し、給餌開始時点のバンド強度を 1 としたときの相対的な変化を 2 群間で比較した。給餌期間中、低分子量領域のタンパク質の発現強度に変化は認められなかった。高分子量領域では 250 kDa 以上のタンパク質がアクロレイン化を受けていた (Fig. 3)。有意な差は認められなかったが、高分子量領域のタンパク質の発現強度は高コレステロール食給餌群において給餌 6 週目より増加する傾向が認められた。

2-5 高コレステロール食給餌が血漿中タンパク質の MDA 化に与える影響

MDA 化を受けた血漿中タンパク質についても Western blot 法による解析を行った。アクロレイン化を受けたタンパク質と同様に、50 kDa、67 kDa および高分子量領域のタンパク質は MDA 化を受けていた (Fig. 4)。以上のタンパク質の発現強度をデンシトリーにより定量し、給餌開始時点のバンド強度を 1 としたときの相対的な変化を 2 群間で比較した。給餌期間中、低分子量領域のタンパク質の発現強度に変化は認められなかった。有意な差は認められなかったが、高分子量領域のタンパク質の発現強度は高コレステロール食給餌群において給餌 6 週目より増加する傾向が認められた (Fig. 4)。

2-6 血漿中 β VLDL のアクロレインおよび MDA 化タンパク質の検出

高コレステロール食給餌群で認められた高分子量領域のアクロレイン化タンパク質の増加が、高コレステロール食給餌ウサギの血漿中で増加する β VLDL 中の ApoB がアクロレインにより架橋を形成したタンパク質に由来する可能性が考えられた。そのため、血漿中 β VLDL のアクロレインおよび MDA 化を Western blot 法により解析した。抗 ApoB 抗体を用いた結果、ApoB の分子量に相当する 512 kDa 付近にバンドが検出されたことに加え、1,000 kDa を超える高分子量領域においても ApoB を含む高分子量のタンパク質が検出された (Fig. 5B)。抗 PC-Acro、抗 MDA 抗体を用いた結果、抗 ApoB 抗体を用いて検出されたバンドと同じ位置にバンドが検出され (Fig. 5D, 5E)、 β VLDL 中の ApoB および ApoB

を含む高分子量領域のタンパク質は、アクロレインおよびMDA化を受けていることが示された。また、抗IgG抗体を用いた結果、高分子量領域においてバンドが検出された (Fig. 5C)。

2-7 アクロレイン化 β VLDLによるTHP-1マクロファージのコレステロール蓄積の解析

β VLDLがアクロレイン化を受けていることが示されたため、アクロレイン化 β VLDLがマクロファージの泡沫化に与える影響を解析した。アガロース電気泳動より、 β VLDLの移動度はヒトVLDLより小さく、ヒトLDLより大きかったため (Fig. 6A)、用いた β VLDLは β 位への移動性を持つことが確認された。 β VLDLの移動度はアクロレインの濃度依存的に増加した (Fig. 6A)。 β VLDLおよび0.02–2 mMのアクロレインと β VLDLを24時間反応させ調製したアクロレイン化 β VLDLをTHP-1マクロファージに48時間負荷し、細胞内コレステロール量を定量した (Fig. 6B)。2 mMのアクロレインを用いて調製したアクロレイン化 β VLDLを負荷したTHP-1マクロファージは、 β VLDLを負荷したTHP-1マクロファージに比べ総コレステロール、遊離コレステロール、コレステリルエステル濃度がそれぞれ1.9倍、1.6倍、2.4倍に有意に増加した。

2-8 大動脈弓部凍結切片の免疫組織化学染色

大動脈弓部におけるPC-Acroの局在について検討するため、免疫組織化学染色を行った。染色にはDABを用いたため、抗原となるタンパク質が存在する箇所は茶褐色に染色される。一次抗体を用いずに染色を行った切片では、二次抗体による非特異的な染色は認められなかった (Fig. 7A, 7C, 7E, 7G, 7I, 7K, 7M, 7O)。コントロール食給餌群の大動脈弓部においてRAM11による茶褐色部位は確認されなかった。そのため、コントロール食給餌群の大動脈弓部にマクロファージは集積していないことが示された (Fig. 7B)。PC-Acroは、コントロール食給餌群の大動脈弓部の血管内腔側において検出された (Fig. 7F)。また、血管中膜に血管平滑筋細胞 (Fig. 7J)、血管内腔側に内皮細胞の存在が確認された (Fig. 7N)。

高コレステロール食給餌群の大動脈弓部では内膜肥厚が見られ、RAM11による茶褐色部位が確認された。そのため、高コレステロール食給餌群の大動脈弓部にマクロファージが集積していることが示された (Fig. 7D)。PC-Acroは、高コレステロール食給餌群の大動脈弓部の血管内腔側および内膜と中膜の境界域において検出された (Fig. 7H)。血管平滑筋細胞は、血管中膜に加え血管内腔側

にも多く見られた (Fig. 7L)。内皮細胞は血管内腔側において存在が確認された (Fig. 7P)。

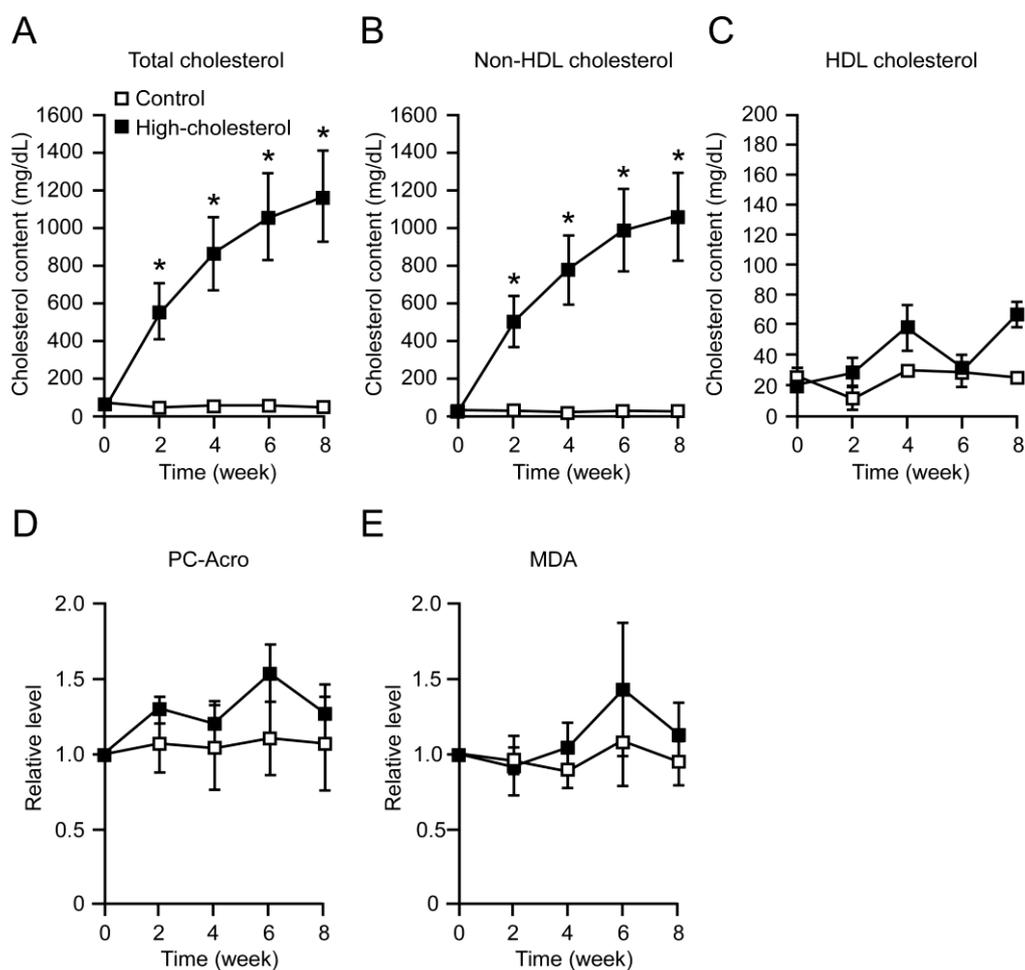


Fig.2 Effect of a high-cholesterol diet on the plasma levels of cholesterol, PC-Acro, and MDA.

A–C: Cholesterol levels in plasma. D: PC-Acro levels in plasma were normalized relative to the level at 0 week (control diet group, 0.38 ± 0.08 nmol/mg protein; high-cholesterol diet group, 0.27 ± 0.05 nmol/mg protein). E: MDA levels in plasma were normalized relative to the level at 0 week (control diet group, 0.87 ± 0.14 nmol/mL; high-cholesterol diet group, 0.76 ± 0.06 nmol/mL). Each point represents the mean \pm SD (control, n = 5; high-cholesterol diet, n = 5). * $p < 0.01$, significantly different from the control diet group.

PC-Acro

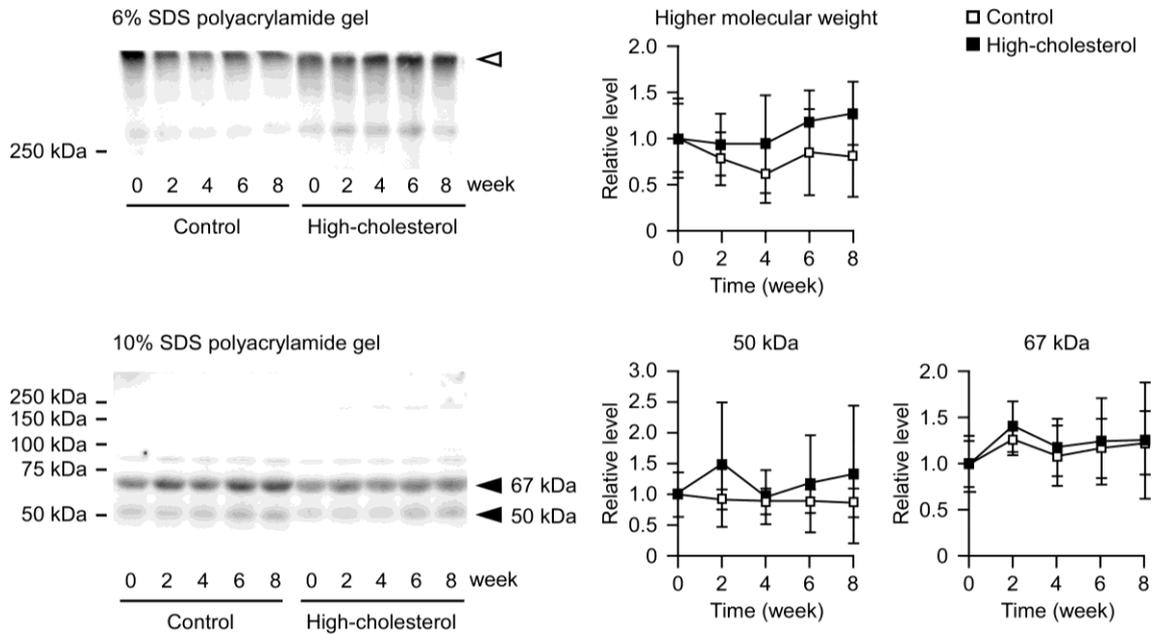


Fig.3 Effect of a high-cholesterol diet on PC-Acro levels in rabbit plasma.

Total protein (30 μg) was subjected to SDS-PAGE with a 6% or 10% polyacrylamide gel. Representative patterns of western blot analysis are shown. Band intensity was normalized relative to the intensity at 0 week. Each point represents the mean \pm SD (control diet group, $n = 5$; high-cholesterol diet group, $n = 5$). The white arrowhead indicates the expected size of apoB cross-linked with acrolein, and described as “higher molecular weight”.

MDA

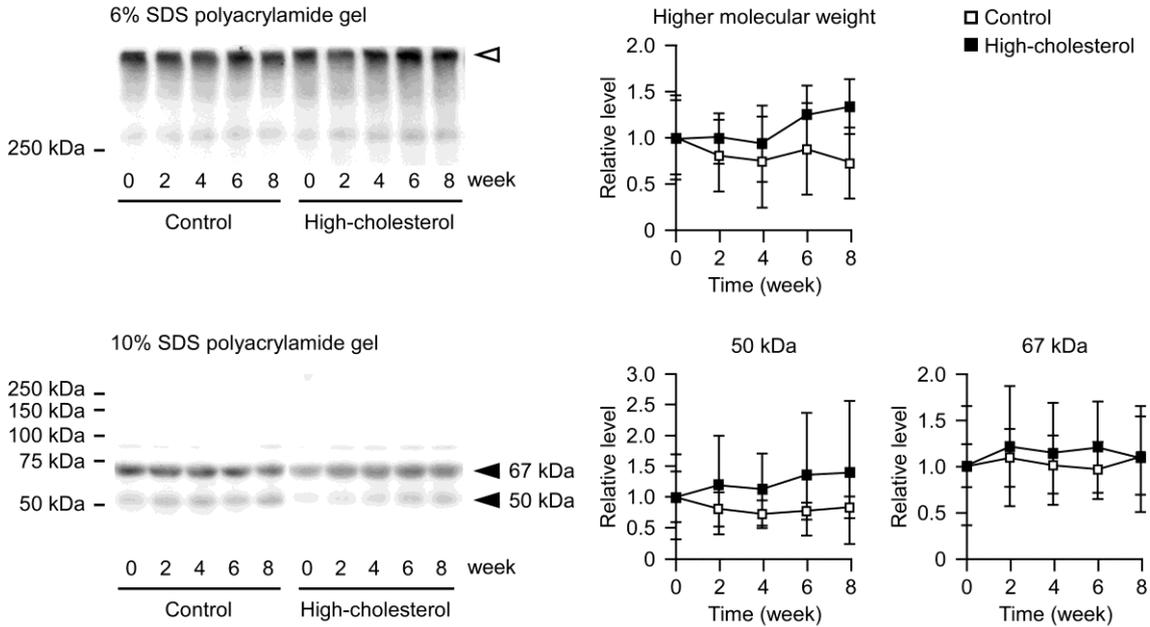


Fig.4 Effect of a high-cholesterol diet on MDA-conjugated protein levels in rabbit plasma.

Total protein (30 μ g) was subjected to SDS-PAGE with a 6% or 10% polyacrylamide gel. Representative patterns of western blot analysis are shown. Band intensity was normalized relative to the intensity at 0 week. Each point represents the mean \pm SD (control diet group, n = 5; high-cholesterol diet group, n = 5). The white arrowhead indicates the expected size of apoB cross-linked with MDA, and described as “higher molecular weight”.

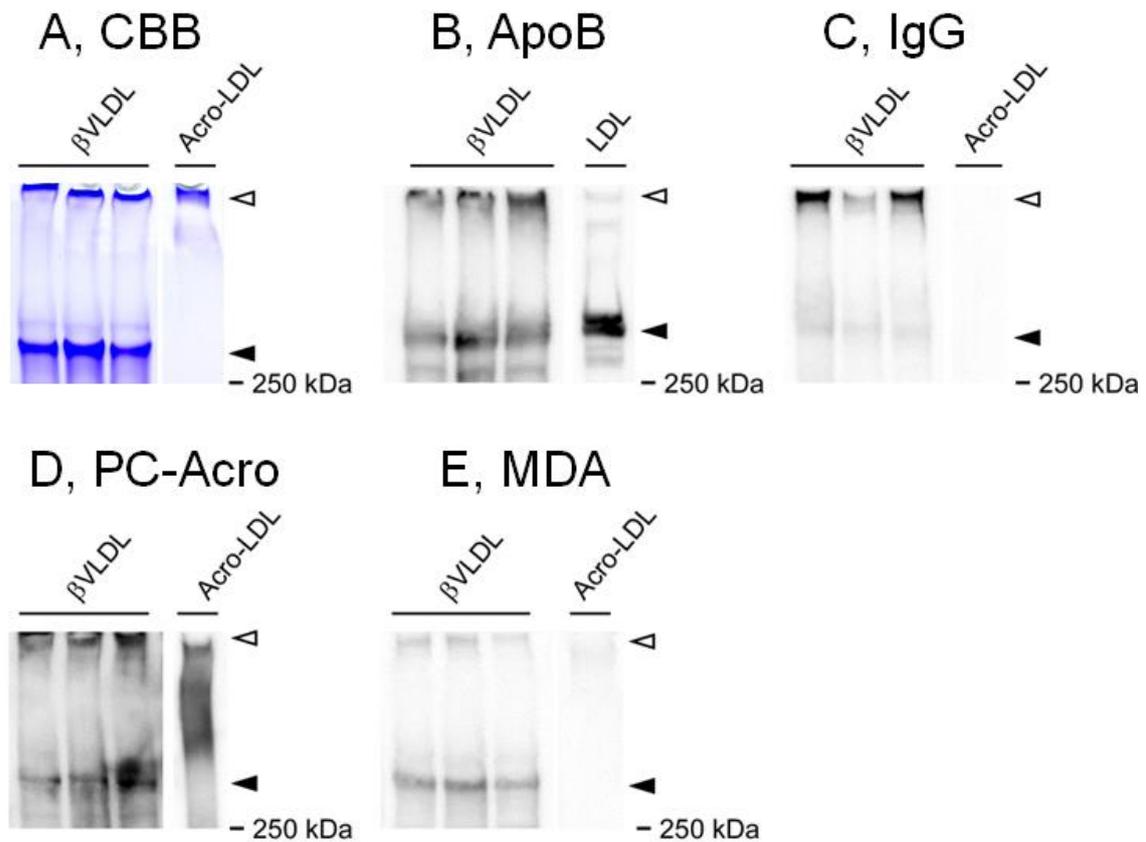


Fig.5 Detection of PC-Acro and MDA-conjugated protein in rabbit βVLDL.

Total protein (30 μg) was subjected to SDS-PAGE with a 3-10% gradient polyacrylamide gel. A: CBB staining after SDS-PAGE. B: Detection of apoB. C: Detection of IgG. D; Detection of AC-Acro. E: Detection of MDA. The black arrowhead indicates the expected size of apoB. The white arrowhead indicates the expected size of apoB cross-linking with acrolein.

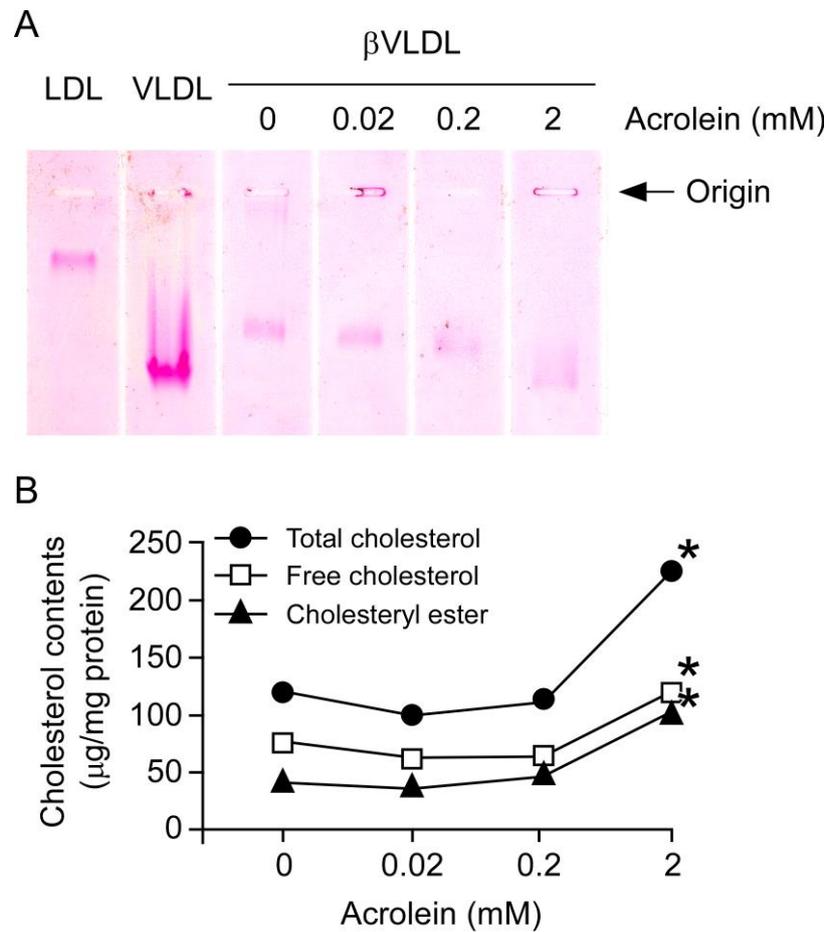


Fig.6 Cholesterol accumulation in THP-1 macrophages induced by acrolein-conjugated βVLDL.

A: Agarose gel electrophoresis of LDL, VLDL and acrolein-conjugated βVLDL. Acrolein-conjugated βVLDL was prepared by using the indicated concentration of acrolein. B: Cholesterol contents of THP-1 macrophages incubated with 0.2 mg cholesterol/mL acrolein-conjugated βVLDL for 48 hr. Each represents the mean ± SD (n=3), and error bars smaller than the symbols are not shown. * $p < 0.01$, significantly different from the control.

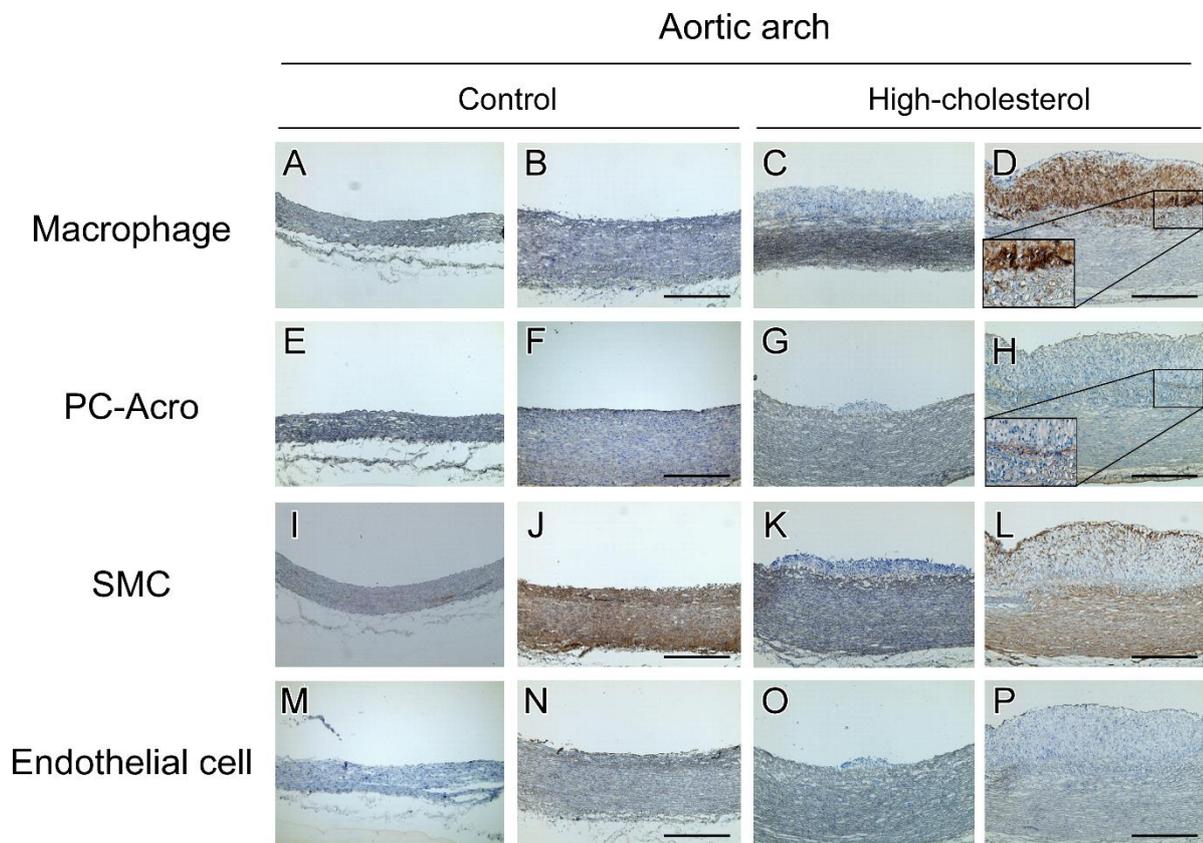


Fig.7 Immunohistochemistry of the aortic arch in high-cholesterol diet rabbits.

A, C, E, G, I, K, M, O: Immunostaining without primary antibody (negative control); B, D: Immunostaining using an anti-macrophage antibody (RAM11); F, H: Immunostaining using an anti-Acro-Lys antibody (mAb5F6); J, L: Immunostaining using an anti- α -muscle actin antibody (HHF35); N, P: Immunostaining using an anti-CD31 antibody (JC07A). A, B, E, F, I, J, M, N: control diet group; C, D, G, H, K, L, O, P: high-cholesterol diet group. Brown area is positive immunostaining and blue area is nuclear staining produced with hematoxylin. Insets: enlarged image. Scale bars: 200 μ m.

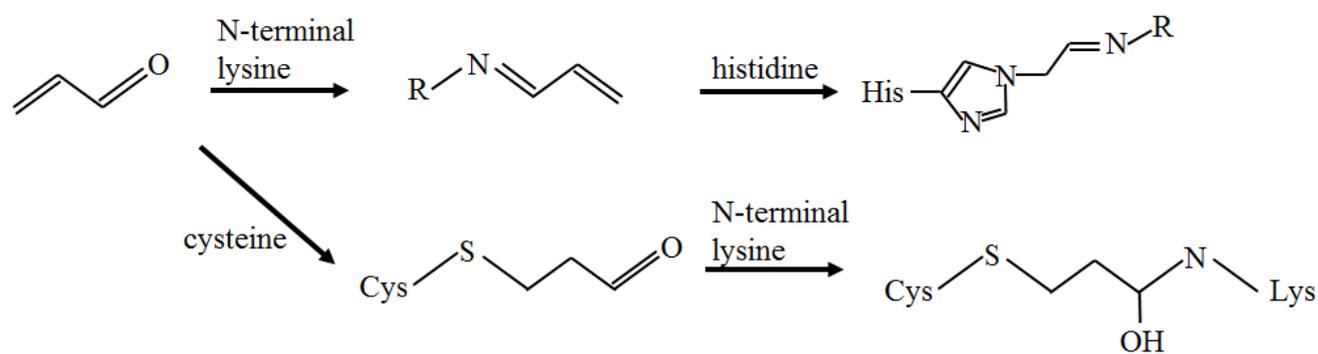


Fig.8 Proposed mechanism of protein cross-linking by acrolein.

Cys, cysteine; His, histidine; Lys, lysine.

第3章 考察

本研究では、アテローム性動脈硬化症におけるアクロレイン化 β VLDL の役割を明らかにすることを目的とし、動脈硬化症モデル動物として高コレステロール食を給餌したウサギを用い、アテローム性動脈硬化病巣における PC-Acro の局在やアクロレイン化 β VLDL がマクロファージの泡沫化に与える影響を解析した。

高コレステロール食を給餌したウサギの動脈硬化病巣において、PC-Acro はアテローム性動脈硬化病変が発症する内膜と中膜の境界域で検出され、マクロファージの集積する部位に局在した (Fig. 7D, 7H)。高コレステロール食を給餌したウサギの血漿中において、 β VLDL を主として含む non-HDL 画分のコレステロール濃度は有意に増加した (Fig. 2A-C)。加えて、血漿中の PC-Acro 濃度は高コレステロール食給餌後 2 週目から増加した (Fig. 2D)。Western blot 分析によって、高コレステロール食を給餌した動物で増加する β VLDL 中の ApoB はアクロレイン化されていることが示された (Fig. 5B, 5D)。 β VLDL はマクロファージによって取り込まれ、アテローム性動脈硬化症の進行に関与することが報告されている [11-13]。本研究で、アクロレイン化 β VLDL は THP-1 マクロファージのコレステロール量を増加させることを示した (Fig. 6B)。従って、アクロレインで修飾された β VLDL はマクロファージの泡沫化を介し、動脈硬化症の発症に重要な役割を果たすことが示唆された。

MDA 化された LDL をはじめとする酸化 LDL は、マクロファージの泡沫化を引き起こす主要なリポタンパク質であると考えられている [4]。一方、Nakajima らは、酸化 LDL はアテローム性動脈硬化症の発症に主要な役割を果たさず、動脈硬化症が形成された結果生じる産物である可能性を提唱している [14]。本研究で、高コレステロール食給餌ウサギ血漿中の PC-Acro 濃度は給餌 2 週目より増加した (Fig 2D)。一方、脂質の過酸化により生成する MDA 濃度は給餌 4 週目より増加し (Fig. 2E)、高コレステロール食を給餌したウサギの生体内では酸化よりアクロレインによる障害が先に生じる可能性が考えられる。加えて、ウサギ血漿中の PC-Acro は MDA 化されたタンパク質と同じように高コレステロール食給餌によって誘導された (Fig 3)。抗酸化作用をもつビタミン E や B は心筋梗塞や脳梗塞といった心血管イベントを低下させないことが報告されている [28, 29]。さらに、アクロレイン化 β VLDL は、効率的にマクロファージに取り込まれることを示した (Fig. 6B)。従って、アクロレインにより修飾された β VLDL および LDL は動脈硬化症の進行に関与する可能性が示された。N-アセチルシステインや N-ベンジルヒドロキシルアミンはアクロレイン除去作用を有する [30,

31]。これらのアクロレイン除去剤は β VLDL や LDL のアクロレイン化を抑制しアテローム性動脈硬化症を抑制する治療薬への利用が期待される。

免疫組織化学染色による解析で PC-Acro は給餌条件に関係なくウサギの血管内皮細胞の管腔側で確認された (Fig. 7F, 7H)。ポリアミノキシダーゼによるポリアミンからのアクロレインの産生は脳梗塞のような細胞障害時に増加する [32]。血管内皮細胞の管腔側は常に血流と接し、血流によって生じるシアストレスによる刺激に持続的にさらされている [33]。従って、アクロレインは血管内皮細胞においてシアストレスによる細胞障害を介し産生されると考えられる。高コレステロール食給餌ウサギの大動脈弓部の内膜肥厚部位において、PC-Acro は内膜と中膜の境界域に限局的に存在したため (Fig. 7H)、PC-Acro は動脈硬化症の発症に主要な役割を果たすことが示唆された。さらに、アクロレイン化 β VLDL は効率的に THP-1 マクロファージに取り込まれ、マクロファージの泡沫化を引き起こした (Fig. 6B)。従って、アクロレインにより修飾された β VLDL はアテローム性動脈硬化症の発症部位に局在する候補因子となると考えられる。

高コレステロール食給餌ウサギの血漿中において β VLDL を主として含む ApoB 画分のコレステロール濃度が増加した (Fig. 2B)。加えて、血漿中の PC-Acro 濃度 (Fig 2D) および高分子量領域のアクロレイン化を受けたタンパク質の発現量は増加した (Fig. 3)。アクロレインは、システインとリジン残基 (Fig. 8) [34, 35] またはリジンとヒスチジン残基間 [36] (Fig. 8) で架橋を形成することが報告されている。従って、高コレステロール食給餌ウサギにおいて発現量の増加が認められた高分子量領域のアクロレイン化タンパク質は、 β VLDL 由来の ApoB がアクロレインにより架橋したタンパク質であると考えられる。アクロレインは、細胞障害時に細胞内から放出されるポリアミンがポリアミノキシダーゼにより代謝され産生される [19]。血管を結紮し血流を減少させたウサギ頸動脈の血管内皮細胞は、コントロールのウサギ頸動脈の血管内皮細胞よりアポトーシスを起こした細胞が増加したことが報告されている [37]。高コレステロール食を給餌したウサギの大動脈弓部では内膜肥厚が形成されていた (Fig. 7D)。従って、高コレステロール食を給餌したウサギでは大動脈弓部の内膜肥厚による血流の減少を介し、血管内皮細胞からのアクロレインの産生がより促進され、ApoB がアクロレインにより架橋を形成したタンパク質が増加したと考えられる。現在、血液中の PC-Acro 濃度は脳梗塞のリスク判定のマーカーとして用いられている [32]。さらなる検討は必要ではあるが、ApoB がアクロレインにより架橋したタンパク質の発現量はアテローム性動脈硬化症の発症を診断するためのマーカーとして有用である可能性が考えられる。

マクロファージに発現するリポタンパク質を取り込む受容体の発現量の変化は、マクロファージの泡沫化の制御を担う。 β VLDL は LDL 受容体 [38, 39]、VLDL

受容体 [40, 41]、スカベンジャー受容体 (SR) [42] によってマクロファージに取り込まれることが報告されている。LDL 受容体は、細胞内コレステロール量の増加によりダウンレギュレーションを受けるため、動脈硬化病巣の形成に重要ではないと考えられている [3]。一方、VLDL 受容体および SR は細胞内コレステロール量の増加によるダウンレギュレーションを受けない [43-45]。さらに、高コレステロール食を給餌したウサギの動脈硬化病巣において、VLDL 受容体および SR の発現量は動脈硬化症の進行に伴い増加することが報告されており [46]、これらの受容体は動脈硬化病巣において β VLDL によるマクロファージの泡沫化に重要な役割を果たしていることが考えられる。酸化 β VLDL によるマクロファージの泡沫化に対する影響を検討した研究では、酸化 β VLDL のマクロファージへの取り込み、分解は β VLDL によって阻害されず、酸化 LDL により阻害されたことが報告されている [47]。酸化 LDL は多価陰イオンを認識する SR-A1 によってマクロファージに取り込まれる [48]。当研究室において、アクロレイン化 LDL は未変性の LDL より負に帯電していることや SR-A1 の発現量増加を誘導し、SR-A1 によりマクロファージに取り込まれることを報告した [6]。本研究で、高コレステロール食を給餌したウサギ血漿中の β VLDL はアクロレイン化されており (Fig. 5)、 β VLDL はアクロレインの濃度に依存して負に帯電していることを明らかにした (Fig. 6A)。以上の報告から、アクロレイン化 β VLDL は SR-A1 の発現量増加の誘導を介しマクロファージの泡沫化や動脈硬化病巣の形成に関与する可能性が考えられる。

総括

本研究では、アテローム性動脈硬化症におけるアクロレイン化 β VLDL の役割について検討した。

PC-Acro はアテローム性動脈硬化病変のマクロファージが集積する部位に局在した。加えて、動脈硬化症モデル動物であるウサギにおいて β VLDL はアクロレイン化されており、アクロレイン化 β VLDL は効率的に THP-1 マクロファージに取り込まれ細胞内のコレステロール量の増加に寄与した。従って、アクロレイン化 β VLDL は、アテローム性動脈硬化症の発症および進行に関与する可能性が示された。

参考文献

1. 渡辺 健太. アクロレイン化 LDL によるマクロファージの泡沫化に関する研究. 千葉大学博士学位論文 2013.
2. Ross R: **Atherosclerosis--an inflammatory disease**. *N Engl J Med* 1999, **340**(2):115-126.
3. Dawson PA, Hofmann SL, van der Westhuyzen DR, Südhof TC, Brown MS, Goldstein JL: **Sterol-dependent repression of low density lipoprotein receptor promoter mediated by 16-base pair sequence adjacent to binding site for transcription factor Sp1**. *J Biol Chem* 1988, **263**(7):3372-3379.
4. Kunjathoor VV, Febbraio M, Podrez EA, Moore KJ, Andersson L, Koehn S, Rhee JS, Silverstein R, Hoff HF, Freeman MW: **Scavenger receptors class A-I/II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages**. *J Biol Chem* 2002, **277**(51):49982-49988.
5. Steinbrecher UP, Loughheed M: **Scavenger receptor-independent stimulation of cholesterol esterification in macrophages by low density lipoprotein extracted from human aortic intima**. *Arterioscler Thromb* 1992, **12**(5):608-625.
6. Watanabe K, Nakazato Y, Saiki R, Igarashi K, Kitada M, Ishii I: **Acrolein-conjugated low-density lipoprotein induces macrophage foam cell formation**. *Atherosclerosis* 2013, **227**(1):51-57.
7. Libby P, Ridker PM, Hansson GK: **Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis**. *Nature* 2011, **473**(7347):317-325.
8. Gordon GB, Bush DE, Weisman HF: **Reduction of atherosclerosis by**

- administration of dehydroepiandrosterone. A study in the hypercholesterolemic New Zealand white rabbit with aortic intimal injury.** *J Clin Invest* 1988, **82**(2):712-720.
9. Ouchi Y, Tabata RE, Stergiopoulos K, Sato F, Hattori A, Orimo H: **Effect of dietary magnesium on development of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits.** *Arteriosclerosis* 1990, **10**(5):732-737.
 10. Mahley RW, Huang Y, Rall SC: **Pathogenesis of type III hyperlipoproteinemia (dysbetalipoproteinemia). Questions, quandaries, and paradoxes.** *J Lipid Res* 1999, **40**(11):1933-1949.
 11. Goldstein JL, Ho YK, Brown MS, Innerarity TL, Mahley RW: **Cholesteryl ester accumulation in macrophages resulting from receptor-mediated uptake and degradation of hypercholesterolemic canine beta-very low density lipoproteins.** *J Biol Chem* 1980, **255**(5):1839-1848.
 12. Mahley RW, Innerarity TL, Brown MS, Ho YK, Goldstein JL: **Cholesteryl ester synthesis in macrophages: stimulation by beta-very low density lipoproteins from cholesterol-fed animals of several species.** *J Lipid Res* 1980, **21**(8):970-980.
 13. Tabas I, Lim S, Xu XX, Maxfield FR: **Endocytosed beta-VLDL and LDL are delivered to different intracellular vesicles in mouse peritoneal macrophages.** *J Cell Biol* 1990, **111**(3):929-940.
 14. Nakajima K, Nakano T, Tanaka A: **The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis: the comparison of atherogenic effects on oxidized LDL and remnant lipoproteins in plasma.** *Clin Chim Acta* 2006, **367**(1-2):36-47.
 15. Aldini G, Orioli M, Carini M: **Protein modification by acrolein: relevance to**

- pathological conditions and inhibition by aldehyde sequestering agents.** *Mol Nutr Food Res* 2011, **55**(9):1301-1319.
16. Uchida K, Kanematsu M, Sakai K, Matsuda T, Hattori N, Mizuno Y, Suzuki D, Miyata T, Noguchi N, Niki E *et al*: **Protein-bound acrolein: potential markers for oxidative stress.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95**(9):4882-4887.
 17. Yoshida M, Higashi K, Kobayashi E, Saeki N, Wakui K, Kusaka T, Takizawa H, Kashiwado K, Suzuki N, Fukuda K *et al*: **Correlation between images of silent brain infarction, carotid atherosclerosis and white matter hyperintensity, and plasma levels of acrolein, IL-6 and CRP.** *Atherosclerosis* 2010, **211**(2):475-479.
 18. Dong JZ, Moldoveanu SC: **Gas chromatography-mass spectrometry of carbonyl compounds in cigarette mainstream smoke after derivatization with 2,4-dinitrophenylhydrazine.** *J Chromatogr A* 2004, **1027**(1-2):25-35.
 19. Saiki R, Park H, Ishii I, Yoshida M, Nishimura K, Toida T, Tatsukawa H, Kojima S, Ikeguchi Y, Pegg AE *et al*: **Brain infarction correlates more closely with acrolein than with reactive oxygen species.** *Biochem Biophys Res Commun* 2011, **404**(4):1044-1049.
 20. Sakata K, Kashiwagi K, Sharmin S, Ueda S, Irie Y, Murotani N, Igarashi K: **Increase in putrescine, amine oxidase, and acrolein in plasma of renal failure patients.** *Biochem Biophys Res Commun* 2003, **305**(1):143-149.
 21. Waragai M, Yoshida M, Mizoi M, Saiki R, Kashiwagi K, Takagi K, Arai H, Tashiro J, Hashimoto M, Iwai N *et al*: **Increased protein-conjugated acrolein and amyloid- β 40/42 ratio in plasma of patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease.** *J Alzheimers Dis* 2012, **32**(1):33-41.

22. Igarashi K, Kashiwagi K: **Protein-conjugated acrolein as a biochemical marker of brain infarction.** *Mol Nutr Food Res* 2011, **55**(9):1332-1341.
23. O'Leary DH, Polak JF, Kronmal RA, Manolio TA, Burke GL, Wolfson SK: **Carotid-artery intima and media thickness as a risk factor for myocardial infarction and stroke in older adults. Cardiovascular Health Study Collaborative Research Group.** *N Engl J Med* 1999, **340**(1):14-22.
24. Ross R: **The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s.** *Nature* 1993, **362**(6423):801-809.
25. Uchida M, Ishii I, Inoue C, Akisato Y, Watanabe K, Hosoyama S, Toida T, Ariyoshi N, Kitada M: **Kefiran reduces atherosclerosis in rabbits fed a high cholesterol diet.** *J Atheroscler Thromb* 2010, **17**(9):980-988.
26. Higashi K, Yoshida M, Igarashi A, Ito K, Wada Y, Murakami S, Kobayashi D, Nakano M, Sohda M, Nakajima T *et al*: **Intense correlation between protein-conjugated acrolein and primary Sjögren's syndrome.** *Clin Chim Acta* 2010, **411**(5-6):359-363.
27. Hirose T, Saiki R, Uemura T, Suzuki T, Dohmae N, Ito S, Takahashi H, Ishii I, Toida T, Kashiwagi K *et al*: **Increase in acrolein-conjugated immunoglobulins in saliva from patients with primary Sjögren's syndrome.** *Clin Chim Acta* 2015, **450**:184-189.
28. Lonn E, Bosch J, Yusuf S, Sheridan P, Pogue J, Arnold JM, Ross C, Arnold A, Sleight P, Probstfield J *et al*: **Effects of long-term vitamin E supplementation on cardiovascular events and cancer: a randomized controlled trial.** *JAMA* 2005, **293**(11):1338-1347.
29. Lonn E, Yusuf S, Arnold MJ, Sheridan P, Pogue J, Micks M, McQueen MJ,

- Probstfield J, Fodor G, Held C *et al*: **Homocysteine lowering with folic acid and B vitamins in vascular disease.** *N Engl J Med* 2006, **354**(15):1567-1577.
30. Saiki R, Nishimura K, Ishii I, Omura T, Okuyama S, Kashiwagi K, Igarashi K: **Intense correlation between brain infarction and protein-conjugated acrolein.** *Stroke* 2009, **40**(10):3356-3361.
31. 齋木 遼太郎. ポリアミンから産生されるアクロレインの脳梗塞における影響. 千葉大学博士学位論文 2010.
32. Tomitori H, Usui T, Saeki N, Ueda S, Kase H, Nishimura K, Kashiwagi K, Igarashi K: **Polyamine oxidase and acrolein as novel biochemical markers for diagnosis of cerebral stroke.** *Stroke* 2005, **36**(12):2609-2613.
33. Tarbell JM, Shi ZD, Dunn J, Jo H: **Fluid Mechanics, Arterial Disease, and Gene Expression.** *Annu Rev Fluid Mech* 2014, **46**:591-614.
34. Cai J, Bhatnagar A, Pierce WM, Jr.: **Protein modification by acrolein: formation and stability of cysteine adducts.** *Chem Res Toxicol* 2009, **22**(4):708-716.
35. Furuhashi A, Nakamura M, Osawa T, Uchida K: **Thiolation of protein-bound carcinogenic aldehyde. An electrophilic acrolein-lysine adduct that covalently binds to thiols.** *J Biol Chem* 2002, **277**(31):27919-27926.
36. Ishii T, Yamada T, Mori T, Kumazawa S, Uchida K, Nakayama T: **Characterization of acrolein-induced protein cross-links.** *Free Radic Res* 2007, **41**(11):1253-1260.
37. Cho A, Mitchell L, Koopmans D, Langille BL: **Effects of changes in blood flow rate on cell death and cell proliferation in carotid arteries of immature rabbits.** *Circ Res* 1997, **81**(3):328-337.

38. Ellsworth JL, Kraemer FB, Cooper AD: **Transport of beta-very low density lipoproteins and chylomicron remnants by macrophages is mediated by the low density lipoprotein receptor pathway.** *J Biol Chem* 1987, **262**(5):2316-2325.
39. Koo C, Wernette-Hammond ME, Innerarity TL: **Uptake of canine beta-very low density lipoproteins by mouse peritoneal macrophages is mediated by a low density lipoprotein receptor.** *J Biol Chem* 1986, **261**(24):11194-11201.
40. Takahashi S, Kawarabayasi Y, Nakai T, Sakai J, Yamamoto T: **Rabbit very low density lipoprotein receptor: a low density lipoprotein receptor-like protein with distinct ligand specificity.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992, **89**(19):9252-9256.
41. Sakai J, Hoshino A, Takahashi S, Miura Y, Ishii H, Suzuki H, Kawarabayasi Y, Yamamoto T: **Structure, chromosome location, and expression of the human very low density lipoprotein receptor gene.** *J Biol Chem* 1994, **269**(3):2173-2182.
42. Herijgers N, Van Eck M, Korporaal SJ, Hoogerbrugge PM, Van Berkel TJ: **Relative importance of the LDL receptor and scavenger receptor class B in the beta-VLDL-induced uptake and accumulation of cholesteryl esters by peritoneal macrophages.** *J Lipid Res* 2000, **41**(7):1163-1171.
43. Goldstein JL, Ho YK, Basu SK, Brown MS: **Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979, **76**(1):333-337.
44. Freeman M, Ekkel Y, Rohrer L, Penman M, Freedman NJ, Chisolm GM,

- Krieger M: **Expression of type I and type II bovine scavenger receptors in Chinese hamster ovary cells: lipid droplet accumulation and nonreciprocal cross competition by acetylated and oxidized low density lipoprotein.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991, **88**(11):4931-4935.
45. Suzuki J, Takahashi S, Oida K, Shimada A, Kohno M, Tamai T, Miyabo S, Yamamoto T, Nakai T: **Lipid accumulation and foam cell formation in Chinese hamster ovary cells overexpressing very low density lipoprotein receptor.** *Biochem Biophys Res Commun* 1995, **206**(3):835-842.
46. Hiltunen TP, Luoma JS, Nikkari T, Ylä-Herttuala S: **Expression of LDL receptor, VLDL receptor, LDL receptor-related protein, and scavenger receptor in rabbit atherosclerotic lesions: marked induction of scavenger receptor and VLDL receptor expression during lesion development.** *Circulation* 1998, **97**(11):1079-1086.
47. Parthasarathy S, Quinn MT, Schwenke DC, Carew TE, Steinberg D: **Oxidative modification of beta-very low density lipoprotein. Potential role in monocyte recruitment and foam cell formation.** *Arteriosclerosis* 1989, **9**(3):398-404.
48. Prabhudas M, Bowdish D, Drickamer K, Febbraio M, Herz J, Kobzik L, Krieger M, Loike J, Means TK, Moestrup SK *et al*: **Standardizing scavenger receptor nomenclature.** *J Immunol* 2014, **192**(5):1997-2006.

主論文目録

本学位論文内容は下記の発表論文による。

1. Y. Kanogawa, M. Fujiyoshi, Y. Nakazato, K. Watanabe, M. Kurihara, A. Takezawa, M. Uchida, K. Igarashi, T. Suzuki, N. Ariyoshi, I. Ishii: Beta-migrating very low-density lipoprotein conjugates with acrolein in high-cholesterol diet-fed rabbits and localizes to atherosclerotic lesions with macrophages. *Int J Clin Exp Pathol* 2016; 9 (11): 11149-11158.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜り、また本論文の御校閲を戴きました千葉大学医学部附属病院薬剤部長 石井伊都子 教授に謹んで厚く御礼申し上げます。

本研究に際し、終始御懇切な御指導、御鞭撻を賜りました千葉大学医学部附属病院副薬剤部長 鈴木貴明 講師に謹んで厚く御礼申し上げます。

本研究を通じて、終始御懇切な御指導、御鞭撻を賜り、また本論文の御校閲を戴きました千葉大学大学院薬学研究院 藤吉正哉 助教に謹んで厚く御礼申し上げます。

本研究に際し、御指導、御鞭撻を頂きました千葉大学大学院薬学研究院 五十嵐一衛 名誉教授に謹んで御礼申し上げます。

本研究において、御指導、御助言を頂き、測定にご協力頂きましたアミンファーマ研究所 斎木遼太郎 博士に深く御礼申し上げます。

本研究において、多大なる御助言と御協力を頂きました、内田雅士 博士、渡辺健太 博士を始めとする千葉大学医学部附属病院薬剤部の皆様に深く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、多大なる御協力と御助言を頂きました、千葉大学大学院薬学研究院 医療薬学研究室の名取知美さんをはじめとする現研究員の皆様および御卒業された先輩方、後輩に心より感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、数多くの動物達がその生命を捧げてくれた事に対し畏敬の念を表します。

最後に、研究室での生活を送るにあたり、終始温かく見守り、支えてくださった家族と友人に心より感謝致します。

本学位論文の審査は千葉大学大学院薬学研究院で指名された下記の審査委員により行われた。

主査	千葉大学大学院教授 (薬学研究院)	医学博士	神崎	哲人
副査	千葉大学大学院教授 (薬学研究院)	医学博士	高野	博之
副査	千葉大学大学院教授 (薬学研究院)	薬学博士	村山	俊彦