

ピタバスタチンの抗動脈硬化作用
に関する研究

2011年
北原 真樹

目次

	頁
要旨	3
序論	7
第1章 バルーン内皮傷害(BCI)誘発内膜肥厚モデルでのピタバスタチンの抗動脈硬化作用	
1節 はじめに	10
2節 実験の方法と材料	
(2-1) 動物および化合物	11
(2-2) 動物実験	12
(2-3) 血清サンプルの調製	15
(2-4) 培養細胞実験	15
(2-5) 蛋白測定	17
(2-6) 統計処理	17
3節 結果	
(3-1) 血清脂質へのピタバスタチンの影響	17
(3-2) 頸動脈 BCI 動脈内膜肥厚に対するピタバスタチンの作用	19
(3-3) 頸動脈 BCI 動脈内膜細胞増殖に対するピタバスタチンの作用	20
(3-4) 頸動脈 BCI 内膜肥厚に対するピタバスタチン、プラバスタチンおよびシンバスタチンの作用	22
(3-5) BCI 内膜肥厚部細胞外マトリックス含量へのピタバスタチンの作用	23
(3-6) BCI 内膜肥厚部 TGF- β 含量へのピタバスタチンの作用	26
(3-7) 培養平滑筋細胞 (SMC) および牛副腎皮質上皮細胞 (SBAC) 増殖に対するピタバスタチンの作用	26
(3-8) 初代培養 SMC の細胞外フィブロネクチン産生に対するピタバスタチンの作用	29
4節 考察	30
第2章 ピタバスタチンの糖尿病ラット動脈および平滑筋細胞におけるオステオポンチン発現に対する作用	
1節 はじめに	34
2節 実験の方法と材料	
(2-1) 試薬と材料	35
(2-2) 細胞培養	35
(2-3) 動物実験	35

(2-4) ウェスタンブロットィング解析	36
(2-5) ノーザンブロットィング解析	36
(2-6) 統計解析	37
3節 結果	
(3-1) ラット培養血管平滑筋細胞 OPN 発現への LDL の影響	37
(3-2) ラット培養血管平滑筋細胞 OPN 発現に対するピタバスタチンの作用	37
(3-3) ピタバスタチンの OPN 発現抑制作用へのメバロン酸、GGPP および FPP の添加効果	37
(3-4) STZ 誘発糖尿病ラット大動脈および腎臓における OPN 発現に対する ピタバスタチンの効果	39
4節 考察	41
第3章 慢性N ^o -nitro-L-arginine methylester (L-NAME)負荷中等度高コレステ ロール血症モデルでのピタバスタチンの抗動脈硬化作用	
1節 はじめに	43
2節 実験の方法と材料	
(2-1) 動物および化合物	45
(2-2) 動物実験	45
(2-3) リポ蛋白調製	48
(2-4) 内皮細胞への単球の接着と内皮細胞接着因子 cell-ELISA	48
(2-5) マクロファージ泡沫化	49
(2-6) 統計処理	
3節 結果	
(3-1) ウサギ血清脂質とピタバスタチンの影響	50
(3-2) コレステロール負荷、L-NAME 投与ウサギ粥状動脈硬化の作成	52
(3-3) レステロール負荷、L-NAME 投与ウサギ粥状動脈硬化に対するピタ バスタチンの影響	52
(3-4) HUVEC への THP-1 細胞の接着に対するピタバスタチンの影響	55
(3-5) マクロファージ泡沫化に対するピタバスタチンの影響	57
4節 考察	58
総括	65
参考文献	67
主論文目録	82
謝辞	83
審査	84

要旨

【背景と目的】 LDL コレステロールは冠動脈疾患の危険因子である。3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) 還元酵素阻害剤は肝臓でのコレステロール合成を阻害することで LDL 受容体の発現を亢進し LDL コレステロールを低下させ、冠動脈疾患を予防する。ピタバスタチンは本邦で発明、開発された HMG-CoA 還元酵素阻害剤であり、強力な LDL 低下作用を有し、冠動脈内膜肥厚を抑制することが明らかにされている。しかし、ピタバスタチンの直接的な抗動脈硬化作用の実験的証明はなされていない。今回、バルーンカテーテル血管内皮傷害(BCI)内膜肥厚モデルおよびL-NAME 負荷高コレステロール血症ウサギおよびストレプトゾトシン (STZ) 誘発糖尿病ラットを用いたピタバスタチンの抗動脈硬化作用を明らかにし、細胞生物学的研究でその特徴的機序を明らかにした。

【実験 1】 BCI 誘発内膜肥厚モデルでのピタバスタチンの抗動脈硬化作用

【方法】ニュージーランド白色ウサギにピタバスタチンを 0.1-1 mg/kg 強制経口投与し、その後バルーンカテーテルにて左総頸動脈を擦過し内皮を障害した。3 週間投与飼育を継続した後、頸動脈を摘出し病理解析による内膜肥厚と組織免疫学的染色による細胞外マトリックス面積をコンピューター画像解析により測定した。細胞増殖試験ではバルーン内皮擦 1 週後に 5-bromo-2'-deoxyuridine (Br-dU) を静脈内投与し頸動脈を摘出し、抗 Br-dU 抗体で内膜肥後部の増殖細胞数と総細胞数を測定した。動脈硬化巣由来内膜平滑筋細胞(intimal SMC)および正常動脈由来中膜平滑筋細胞(medial SMC)を用い、細胞増殖を細胞数計測により測定した。また、酵素法にて調製した平滑筋細胞(primary SMC)を用い、細胞基底フィブロネクチン(FN)を ELISA にて測定した。

【結果】ピタバスタチンは 0.1-1 mg/kg の用量において BCI 内膜肥厚を 18-70 % 抑制した。その抑制の機序としては、ピタバスタチン 1 mg/kg 投与群での内膜肥厚部での細胞数およ

び細胞増殖の抑制は、各々14 %および28 %であった。細胞外マトリックス成分を組織免疫学的染色では、内膜肥厚部 FN 染色面積の 52 % 減少していた。培養平滑筋細胞において、ピタバスタチンは、1 μM で intimal SMC 細胞増殖を 8 %、medial SMC 細胞増殖を 9 % 抑制、4 μM で intimal SMC 細胞増殖を 34 %、medial SMC 細胞増殖を 26 %抑制したのに対し、primary SMC の FN 産生を 0.1 μM で 18 %、1 μM で 37 %有意に抑制した。ピタバスタチンの細胞増殖抑制および FN 産生抑制作用はメバロン酸の添加により消失した。

[考察]ピタバスタチンは正常コレステロール値の BCI ウサギ動脈硬化を、極めて低用量において用量依存的に抑制した。その作用機序としては、平滑筋細胞の増殖抑制よりもむしろ細胞外マトリックスである FN の産生を強く抑えることによるものと推察された。メバロン酸添加試験より、ピタバスタチンの細胞増殖抑制作用と FN の産生抑制作用は HMG-CoA 還元酵素阻害に基づくものと推測された。以上のことより、平滑筋細胞では、細胞増殖より FN 産生がピタバスタチンへの感受性が高く、より強くメバロン酸経路の制御を受けているものと推察された。

【実験 2】ラット糖尿病モデル血管および血管平滑筋細胞におけるオステオポンチン (OPN) 発現に対するピタバスタチンの作用

[方法]ラットに STZ を投与し糖尿病は発症させ、同時にピタバスタチン 3 mg/kg を強制経口投与した。7日後の大動脈および腎臓の RNA と抽出し、OPN mRNA をノーザンブロットイングにより測定した。ラット大動脈より平滑筋細胞を培養し、LDL とピタバスタチンで 48 時間培養後の培養上清中の OPN 含量をウェスタンブロットイング法にて測定した。

[結果]STZ 誘発糖尿病ラット動脈および腎臓で OPN 遺伝子発現の増加を確認した。ピタバスタチンは糖尿病における OPN 発現増加を著明に抑制した。血管平滑筋細胞を LDL 処理することで培養上清中 OPN 分泌が増加し、ピタバスタチンはその増加を濃度依存的に抑制した。この抑制作用は、メバロン酸およびその代謝物のゲラニルゲラニルピロリン酸の

添加により消失したが、ファルネシルピロリン酸では消失しなかった。

[考察]ピタバスタチンは糖尿病状態における血管および腎臓 OPN 発現上昇を抑制することから、糖尿病における動脈硬化の進展を直接的に抑制しうることが示唆された。この作用は、メバロン酸添加およびゲラニルゲラニルピロリン酸の添加により消失し、メバロン酸経路のゲラニルゲラニル化修飾蛋白を介した新たなスタチンの多面的作用といえる。

【実験 3】慢性 N-omega-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) 負荷中等度高コレステロール血症モデルにおけるピタバスタチンの抗動脈硬化作用

[方法]L-NAME 負荷高コレステロール血症モデルでは血中コレステロールを 300-500 mg/dL とし、ヒトの高脂血症と同程度にした動脈硬化モデルを作成した。コントロールとして最初の 1 週間で、L-NAME 負荷を段階的に増量しつつコレステロール負荷を 1% から 0.2% に低減した後 8 週間飼育した。ピタバスタチンは負荷 1 週後より強制経口投与し 8 週後に大動脈を摘出し病理解析を行った。ヒト単球由来白血病細胞である THP-1 細胞あるいはヒト臍帯静脈内皮細胞の HUVEC をピタバスタチンで処理した後、THP-1 を蛍光標識し HUVEC への接着を見た。HUVEC 細胞表面接着因子を cell ELISA にて測定した。RAW264.7 マクロファージをピタバスタチンで処理した後、酸化 LDL で 48 時間培養し細胞内コレステロール蓄積量を計測した。

[結果]慢性的に L-NAME 負荷し、低容量の食餌性コレステロールの負荷によりウサギ大動脈に動脈硬化を発症したモデルを開発する事が出来た。ピタバスタチンは 0.1-0.3 mg/kg の用量で粥状動脈硬化形成と内膜肥厚を抑制した。その抑制機構には内膜でのマクロファージの蓄積と脂肪蓄積の抑制が顕著であった。培養細胞での検討の結果、ピタバスタチンは THP-1 細胞の HUVEC への接着の抑制を特に THP-1 細胞を処理したときに示した。RAW264.7 マクロファージを用いた泡沫化検討では、ピタバスタチンの 10-30 nM で細胞内コレステロールエステル(CE)含量を減少させることが認められた。ピタバスタチンの

THP-1 の HUVEC への細胞接着抑制はメバロン酸の添加により消失したが、RAW264.7 マクロファージでの 10-30 nM での CE 蓄積抑制作用はメバロン酸添加で消失しなかった。

[考察]ウサギにおいて、L-NAME を負荷することで、中程度の高コレステロール血症でも短期間で粥状内膜肥厚が形成され、L-NAME と高コレステロール血症が相互作用しあうことで動脈硬化が促進されることが推測された。ピタバスタチンは血清コレステロールに影響を及ぼさない低用量で粥状内膜肥厚を抑制し、その作用は単球細胞の血管内皮への接着とマクロファージの泡沫化抑制に基づくものと推測された。また、メバロン酸添加効果から、単球の内皮細胞への接着抑制は HMG-CoA 還元酵素阻害による Rho の阻害を介していると思われるが、ピタバスタチンの 10-30 nM での泡沫化抑制作用は HMG-CoA 還元酵素阻害を介さないピタバスタチン特有の作用と推測された。この濃度は、臨床血中濃度付近であり、ピタバスタチンはヒト臨床用量での血中濃度付近で単球あるいはマクロファージに作用し直接的に抗動脈硬化作用を示すものと推測された。

【総括】ピタバスタチンは平滑筋細胞の増殖には作用することなくフィブロネクチン産生とオステオポンチン発現、分泌を抑制し、また、他のスタチンにない低濃度でのマクロファージ泡沫化抑制を示した。以上からピタバスタチンは臨床現場において、その強力な LDL 低下作用に加え、単球マクロファージ系細胞に強く作用し、直接的な抗動脈硬化作用を示しうることは見出された。

序論

20 世紀では先進国が、21 世紀になり発展途上国でも飽食の時代に入り、生活習慣病が全世界的に万延しつつあり、悪性新生物とともにこれらの疾患に起因した心血管死は常に死因の上位に位置し社会的問題となっている。その中でも 1960 年代のフラミンガムスタディーに代表される種々の疫学調査により、LDL コレステロール値が冠動脈疾患の心血管イベントおよび心血管イベント死と相関することが世界中の全人類において示されている。

1980年代後半に開発された 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A(HMG- CoA) reductase 阻害剤（スタチン）は、肝臓でのコレステロール合成を阻害し強力血中コレステロール低下作用を示す。スタチンの開発以降、多くの脂質介入試験がなされ、1994年には、スカンジナビア諸国の高脂血症患者を対象にシンバスタチンを5年間にわたって投与した Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S試験) が発表され血清コレステロールの35%低下が初めて示された。プラバスタチンを使用した Management of Elevated Cholesterol In The Primary Prevention Group Of Adult Japanese Study (MEGA試験) では、日本人で血中コレステロール値が高い患者さんを5-7年間にわたって治療した場合の効果が調べられた。さらに1990年後半からは、ストロングスタチンが市場に出るようになり、より強力なLDLコレステロール低下が実現された結果、冠動脈疾患患者を対象にした2年間のA Study To Evaluate the Effect of Rosuvastatin On Intravascular Ultrasound-Derived Coronary Atheroma Burden (ASTEROID試験) では、LDLコレステロールの50%低下と動脈硬化内膜面積の減少が示され、動脈硬化の退縮効果が示された。その後、冠動脈疾患における心血管イベント発症を予防の関係が詳細に研究され、アトルバスタチンの Myo-cardial Ischemia Reduction With Aggressive Cholesterol Lowering (MIRACL試験) やロスバスタチンのASTEROID試験から、スタチン治療による強化LDLコレステロール低下療法の結果、LDLコレステロールの2mg/dLの低下が1%の冠動脈疾患死の予防に繋がることが示された。また、近年、糖尿病

患者の心血管イベント一次予防または二次予防におけるスタチンの有用性がさまざまな大規模臨床試験で検討され、Collaborative Atorvastatin Diabetes Study (CARDS試験) ではアトルバスタチンの効果が証明されている。

一方、1990年当初からスタチンには細胞増殖抑制など血中コレステロール低下作用以外の作用が存在することが報告されている。とりわけ、動脈硬化疾患の病態に関与する作用としては、平滑筋細胞の増殖および遊走抑制、血管内非細胞の炎症抑制作用、炎症性細胞の活性化抑制作用、マクロファージの泡沫化抑制作用などが多岐に渡り報告されている。これらの作用はLDLコレステロール低下作用以外のいわゆる“多面的作用”として知られており、スタチンのメバロン酸経路を阻害することにより生ずる冠動脈疾患予防効果の一因として考えられている。

動脈硬化における内膜肥厚の機序として、Ross らの血管内皮傷害説と Libby らの唱える炎症説があり、LDL 由来の変性 LDL が血管内皮を傷害し炎症反応を惹起させることがわかっている。したがって、スタチンによる強力な LDL 低下作用は変性 LDL を減少させ血管内皮傷害や炎症を抑制するとされている。これまでに、スタチンの実験的抗動脈硬化作用は、コレステロールを外因的に負荷した極度の高コレステロール血症モデル（ウサギ、ブタ）や遺伝的高コレステロール血症動物（WHHL ウサギ）、遺伝子改変動物（ApoE-KO マウス、LDL 受容体-KO マウス）あるいは動脈血管内皮傷害誘発内膜肥厚モデルにおいて確認されてきている。従来のコレステロール負荷高コレステロール血症モデルでは、コレステロールを外因的に負荷するが故にフィードバック制御により肝臓での HMG-CoA 還元酵素が低下していること、また、ヒト高脂コレステロール症における血清コレステロール値に比し極端に高い血清コレステロール値であることから、本来のヒトでの作用を類推することが困難といえる。

ピタバスタチンは、鈴木と北原らにより発明された日本国内で初となる全合成 HMG-CoA 還元酵素阻害剤であり、その LDL コレステロール低下作用についてはいくつ

かの基礎および臨床試験にて証明されてきた。ピタバスタチンにおいても、本邦で冠動脈疾患患者を対象にした二次予防試験、Japan Assessment of Pitavastatin and Atorvastatin in Acute Coronary Syndrome(JAPAN-ACS)、にて、その内膜肥厚進展抑制効果が証明された。しかし、本薬剤の直接的な抗動脈硬化作用とその有用性についてはまだ不明確なところが多い。

一方、近年のメタボリックシンドロームの概念により、ヒトでの動脈硬化病態にはマクロファージの泡沫化に繋がる変性 LDL や高濃度 LDL の他、糖尿病状態、高血圧状態などに潜む様々な促進因子が互いに相互作用することが、その治療と薬剤評価の困難さを招いている。実際のヒトでの抗動脈硬化作用を類推するには、ヒトの高脂血症と同等な高コレステロール血症に相当するモデル動物や糖尿病モデル動物での抗動脈硬化作用を見る必要がある。今回の研究では、ピタバスタチンの直接的な作用による抗動脈硬化作用とヒトでの病態に近いモデル動物での抗動脈硬化作用を確認することを目的として2種類の実験的動脈硬化モデルと糖尿病モデルでの効果を検討し、さらにピタバスタチンの抗動脈硬化作用の機序を細胞生物学的および分子生物学的な手法で解明した。

第1章 バルーン内皮障害(BCI)誘発内膜肥厚モデルでのピタバスタチンの抗動脈硬化作用

1節：はじめに

動脈硬化病変における内膜肥厚とその不安定化は狭心症のような急性冠動脈疾患を引き起こす原因である。進行した動脈硬化内膜肥厚部は平滑筋細胞 (SMC) とマクロファージおよびその周囲を取り巻く細胞外マトリックスに富み fibrous plaque と呼ばれる (1)。動脈硬化の形成過程のひとつに Ross らが提唱した血管内皮傷害説がある。これは、血管内皮の傷害が引き金となり、その刺激により放出された様々な因子により、SMC の遊走や増殖が惹起されるものである(2-4)。血管内皮の傷害には酸化 LDL や炎症細胞などの化学的因子や血流やバルーンカテーテルあるいはステントなどの物理的な因子が報告されている(5-7)。そして、その後の SMC の血管中膜層から内膜層への遊走と内膜層での増殖は、内膜肥厚の進展における重要な過程となっている(8,9)。とくに、ヒトでの急性冠動脈狭窄(ACS) 時の経皮的血管形成術 (PTCA) あるいはステント留置術では、術後の内膜肥厚による再狭窄が問題となっている。そのため、細胞周期の阻害や SMC の遊走あるいは増殖を阻害することが内皮傷害後の内膜肥厚を抑制することが内膜肥厚抑制の手段のひとつとされている。

シンバスタチンのような HMG- CoA reductase 阻害剤が酵素阻害作用に基づくメバロン酸産生の抑制を介して SMC の遊走と増殖を阻害し (10,11)、バルーンカテーテル内皮傷害による内膜肥厚を抑制することが報告されている (12,13)。しかし、実際の臨床において、SMC の増殖と遊走を制御し急性冠動脈疾患におけるプラーク破綻や PTCA 術後再狭窄を抑制するには十分な作用とはいえない。そのため、内膜肥厚に関わる SMC の遊走、増殖のみならず、プラークの不安定化に関わるマクロファージの蓄積やマトリックスの蓄積と分解の制御もまた重要である。I 型コラーゲンやフィブロネクチンといった細胞外マトリ

ックスの蓄積はプラーク破綻後の血管リモデリングにおけるマクロファージの蓄積と関連している(14,15)。これらの細胞外マトリックスは SMC の形質を静止型 (contractile) から増殖型 (synthetic) に誘導し、SMC の遊走と増殖を増長する (16-19)。内膜肥厚部での細胞外マトリックスの抑制はプラークを安定化し、ACS や PTCA 後の血管再狭窄の予防に繋がること考えられている。

これまでに、ウサギやラットでバルーンカテーテルを用いた頸動脈内皮擦過誘発動脈内膜肥厚モデルがこれらの内膜肥厚のモデルとして開発され、さまざまな薬剤の内膜肥厚抑制作用の検証に用いられてきている。また、本モデルは正常コレステロールであり、高コレステロール血症に起因しないモデルであり、本モデルでの効果はコレステロール低下作用に起因しない作用と考えられる。ピタバスタチン (NK-104) は鈴木と北原らにより発明された新規な HMG- CoA reductase 阻害剤であり、強力な血清コレステロール低下作用と血清トリグリセリド低下作用を示す(20)。今回、私は、本モデルにおけるピタバスタチンの内膜肥厚抑制作用とプラーク安定化を証明し、その機序を細胞生物学的手法で解明した。

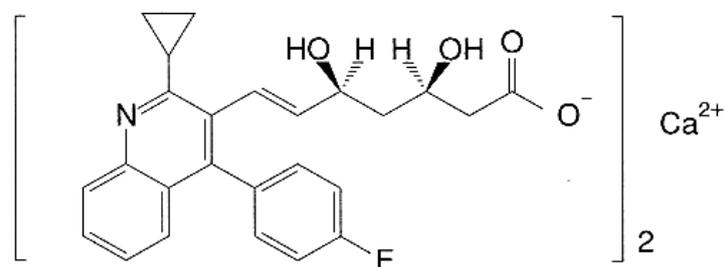
2 節： 実験の方法と材料

(2-1) 動物および化合物

ニュージーランド白色ウサギ (雄、2-2.5 kg 体重) を北山ラベス株式会社より購入し通常食を自由摂取にて飼育、維持した。馴化飼育の後、耳介静脈より採血し、血清総コレステロールを測定し、各群の血清総コレステロールの平均が同等になるよう 8 匹ずつに分けた。

ピタバスタチン ((+)-monocalcium bis{(3R,5S,6E)-7-[2-cyclopropyl-4-(4-fluorophenyl)-3-quinolyl]-3,5-dihydroxy-6-hrptanoate}), CAS147526-32-7) は日産化学工業株式会社小野田工場で製造され品質保証されたもの(Lot:104P9201)を使用した。シンバスタチンおよびプラ

バスタチンは各々万有製薬および第一三共製薬より購入した。メバロノラク톤は Sigma-Aldrich から購入した。Br-dU cell labeling reagent および抗 Br-dU 抗体は Amersham(BE Healthcare Science)社より購入した。モノクローナル抗ヒトフィブロネクチン抗体は Dako 社より、ポリクローナル抗 I 型コラーゲン抗体は Advance 社より、ポリクローナル抗ウサギフィブロネクチン抗体は Cappel 社より購入した。TGF-β ELISA (Quantikine, human TGF-β ELISA kit) キットは R&D systems 社より購入した。



ピタバスタチン

(+)-monocalcium bis{(3R,5S,6E)-7-[2-cyclopropyl-4-(4-fluorophenyl)-3-quinolyl]-3,5-dihydroxy-6-heptanoate

(2-2) 動物実験

動物実験は日産化学工業株式会社生物科学研究所動物実験倫理規定に基づいて行った。

(2-2-1) 薬液と投与

薬物は 0.5%カルボキシメチルセルロース溶液に懸濁または溶解した。飼育期間中毎朝ウサギの体重を測定し、薬物投与液を 1 日 1 回午前中に給餌前にゴムゾンデにより強制経口投与した。ピタバスタチンの投与量は、0.1、0.3 および 1.0 mg/kg/day とした。コントロール群には投与溶媒のみを投与した。

(2-2-2) 頸動脈 BCI 内膜肥厚試験

33羽のウサギを用い、8羽ずつ4群に分けた。薬物をウサギに1週間投与した後、ネンブタール麻酔下にてBCI術を施した。すなわち、左外頸動脈を切開し、3Fフォガティカテーテルを大動脈の頸動脈分岐部まで挿入し、一定の抵抗で引けるように一定圧にてバルーンを拡張させ、1 mm/secの早さで総計動脈内膜を擦過した。この操作を3回繰り返した。その後、外頸動脈を結紮し血流を内頸動脈にて維持した。カテーテルを引くときの抵抗および引く早さは事前の検討で、血栓形成による血流遮断が起きない条件を設定した。ピタバスタチンに対する比較薬としてプラバスタチンとシンバスタチンを用い、各々、投与量を10 mg/kg および3 mg/kg とした。投与量の設定は、臨床において使用されている投与量から、薬効が同等と思われる投与量比から算出した。バルーンカテーテル内皮擦過後25日間投与を継続した。投与最終日の翌日、ネンブタール麻酔下にて右頸動脈より全採血にて安楽死させた。左右の総頸動脈を摘出した。以後、左右の頸動脈は同等に処理した。頸動脈の末梢側3分の2を中性緩衝10%ホルマリンにて固定化し、中枢側3分の1から凍結切片作製用に凍結標本を作製した。1週間ホルマリン固定化の後、その中枢側2分の1を用い4等分し、4箇所切片をパラフィンブロックに包埋した。ヘマトキシリン-エオシン染色（核染色）およびエラスチカ-ファン-ギズン染色（マトリックス染色）および免疫染色に供した。ホルマリン固定切片の末梢側2分の1はDNA含量測定に供した。画像解析（Luzex 3U; Nikon）にて内膜肥厚部および中膜部の面積を測定した。

（2-2-3）内膜肥厚部 DNA 含量

（2-2-2）にて得られたホルマリン固定頸動脈切片を用い、病理解析に使用した残り切片を用い、DNA含量を測定した。すなわち、0.4 N アンモニア中ポリトロンにて組織切片をホモジナイズした後、その上清を回収しエタノールにて沈殿させた。沈殿物を10 mM Tris HCl (pH 7.4), 1 mM EDTA に溶解し diaminobenzoic acid を用いた蛍光法（励起波長：420 nm, 蛍光波長：520 nm）にて測定した(21)。標準物質としてサケ精子由来 DNA を用いた。

DNA 測定値は血管総面積で補正した。内膜肥厚部 DNA 含量は、左総頸動脈総 DNA 含量から右総計動脈総 DNA 含量を差し引いて求めた(22)。

(2-2-4) 免疫組織染色

BCIによる内膜肥厚における細胞外マトリックス成分を見る目的で、(2-2-2)にて得られた頸動脈のホルマリン固定切片および凍結切片を用いて、フィブロネクチンとI型コラーゲンの免疫組織染色を行った。フィブロネクチンについては labeled streptavidin biotinylated antibody(LSAB)法にて行った。すなわち、ホルマリン固定パラフィン包埋切片0.1%トリプシンにて1時間インキュベートし部分消化を行い、内因性のペルオキシダーゼ活性は0.6%過酸化水素水にて45分処理して失活化させた。得られた切片を、抗ヒトフィブロネクチン抗体(1:100希釈)を用い、二次抗体としてビオチン化抗IgGとパーオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを用い diaminobenzidine (DAB) 発色にて検出した。I型コラーゲンについては凍結切片をアセトンで固定化した後、抗ヒトI型コラーゲン抗体(1:100希釈)を用い、フィブロネクチンと同様にして発色検出した。細胞数を測定するために、連続切片にてヘマトキシリン-エオジン染色を行った。

(2-2-5) 動脈硬化血管内 TGF-β含量の測定

BCIを施行した後21日後に左頸動脈を摘出し、全血管を用いてTGF-β含量を測定した。すなわち、血管を50 mM Tris HCl (pH 9)、1 mM EDTA 中にてポリトロンを用いてホモジナイズした。そのホモジネートを8,000 x gにて15分遠心分離し上清を回収した。活性化TGF-βは、150 μLの上清を用い30 μLの1 N HClを添加し、10分間室温にて置きアシディフィケーションした後、30μLの1.2 N NaOH/HEPESにて中和してELISAにて測定した。不活性化型TGF-βは、上清を未処理のままELISAにて測定した。測定値はo-phenylenediamineの490 nmの発色吸光値(OD490)にて表した。

(2-2-6) 内膜細胞増殖試験

ウサギに薬物を1週間経口投与した後、(2-2-2)と同様にして左総頸動脈にBCIを施行した。施行後9日後に、耳介静脈よりBr-dU cell labeling reagentを10 mL/kg投与した。3時間後、左右の総頸動脈を摘出し、中性緩衝10%ホルマリンにて固定した(23)。頸動脈の中央部3分の1の同一の4箇所を切り出しパラフィン包埋し、抗Br-dU抗体による免疫染色を行った。二次抗体にはビオチン化抗マウスIgG抗体とパーオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを用い、DABで検出した。連続切片にてヘマトキシリン-エオジン染色を行い、核陽性細胞数と抗Br-dU陽性細胞数を計測した。

(2-3) 血清サンプルの調製

血液をウサギ耳介静脈より採取した。血液を室温に1時間放置後3,000 rpmにて10分間遠心し、血清を分離した。血清総コレステロール、遊離コレステロール、トリグリセリド、リン脂質およびHDLコレステロールを測定した。総コレステロールはデタミナーTC555(協和メディックス)、遊離コレステロールはデタミナーFC555(協和メディックス)、トリグリセリドはデタミナーTG(協和メディックス)、リン脂質はデタミナーPL(協和メディックス)およびHDLコレステロールはデタミナーHDL(協和メディックス)にて測定した。

(2-4) 培養細胞実験

(2-4-1) ウサギ大動脈中膜 SMC (medialSMC) および内膜 SMC (intimalSMC) の調製と培養

Intimal SMCは、1%コレステロール、0.5%コロール酸含有食にて13週飼育後バルーンカテーテルにて内皮を擦過したニュージーランド白色ウサギ大動脈の内膜肥厚部を中膜

より剥離し、その切片を用いたexplant法にて調製した(24)。Medial SMCは、正常未処置ニュージーランド白色ウサギ大動脈の中膜を外膜より剥離し、その切片を用いたexplant法にて調製した。細胞は 10 % FBS (三菱化成) 含有ダルベッコ変法イーグル(DME)培地 (日水製薬) にて 37 °C、5% CO₂、100 % 湿度にて培養した。2 継代細胞を用いて増殖試験に供した。ウシ副腎皮質細胞 (Bovine adrenocortical cell, SBAC) はAmerican Type Culture Collection (ATCC) より購入し 10 % FBS含有Ham-F12K (Sigma) 培地にて培養した。

(2-4-2) 細胞増殖試験

細胞増殖は methylthiazole tetrazolium (MTT) assay にて行った(25)。すなわち、T-75 フラスコにてコンフルエントに培養した intimal SMC、medialSMC および SBAC をトリプシン処理し、得られた細胞を(2-4-1)の培地に分散し、96 well plate に 1 well あたり 10,000 細胞になるように播種した。6 時間培養した後、ピタバスタチンを含有する培地に交換した。48 時間培養後細 MTT を 0.2 mg/mL 含有する培地に交換し 4 時間培養した後、細胞のジメチルスルホキシド(DMSO)にて可溶化し 550 nm にて吸光度を測定した。全ての試験は 1 ポイント 3 連の well にて行った。

(2-4-3) ウサギ初代培養 SMC の調製とフィブロネクチン測定

ウサギ初代培養SMC (primary SMC) はコレステロール食負荷ニュージーランド白色ウサギ大動脈中膜部から酵素消化法にて調製した。すはわち、内膜肥厚部を除去した大動脈から中膜部を外膜より剥離し、適当な大きさに細切した。切片を 0.1 % コラゲナーゼ、0.05 % エラスターゼ/DME培地にて 37 °Cで 2 時間インキュベーションした。消化液を 1,500 回転で遠心分離し、沈降した細胞をDME培地にて 3 回洗浄した。得られた細胞をピタバスタチンを含有する 10 % FBS含有DMEに分散し、48-well plateに 1 well あたり 50,000 細胞になるように播種した。6 日間培養後、細胞を 0.1 N NH₄OHにて可溶化した。wellの

底の残査を用いてフィブロネクチンを測定した。フィブロネクチンの測定は、一次抗体に抗ウサギフィブロネクチン抗体（1:200 希釈）を用い、二次抗体にパーオキシダーゼ標識抗体（1:1,000 希釈）を用い、*o*-phenylenediamineにて発色させた。全ての試験は 1 ポイント 3 連のwellにて行った。

（2－5）蛋白測定

血管ホモジネートおよび細胞溶解液の蛋白は BCA 測定試薬（Pierce）を用いて、牛血清アルブミンを標準蛋白として測定した。

（2－6）統計処理

動物実験データは平均±標準誤差、培養細胞実験データは平均±標準偏差で表した。統計解析は動物数の異なる多群間比較を two-tailed Dunnett's により行い、ANOVA による分散解析を併用した。

3 節： 結果

（3－1）血清脂質へのピタバスタチンの影響

ウサギ血清脂質を表 1-1 に示した。ウサギにピタバスタチンを 0.1、0.3 および 1.0 mg/kg を投与した。血清サンプルを投与前（0 week）、投与 1 週後（1 week）、投与 2 週後（2 week）、投与 4 週後（4 week）に採取した。血清総コレステロールは、ピタバスタチンの 0.3 mg/kg 投与および 1.0 mg/kg 投与において、投与前に比し 4 週間投与後で、31.6%（21.2 mg/dL から 14.5 mg/dL に）および 47.9%（22.6 mg/dL から 12.1 mg/dL に）となり、各々有意に低下した。また、血清リン脂質においてもコレステロールと同様にピタバスタチンにより低下した。さらに、ピタバスタチンの 0.3 mg/kg 投与群において、血清トリグリセリドの低下

(17.0 mg/dL から 10.2 mg/dL に) が認められた。今回の試験では肝障害マーカーのグルタミン酸ピルビン酢酸トランスアミラーゼ(GPT)およびグルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミラーゼ GOT の軽微な上昇傾向がピタバスタチンの 0.3 mg/kg と 1.0 mg/kg 投与群で認められたが、筋障害マーカーであるクレアチンホスホキナーゼ(CPK)および乳酸脱水素酵素(LDH)の増加は認められなかった。

表1-1. Effect of NK-104 on serum lipid levels in rabbits fed normal chow diet with balloon-injured left carotid artery

		0 week (pre)	1 week	2 weeks	4 weeks
Total cholesterol (mg/dl)					
Control	n=8	21.7±1.3	15.6±1.6	20.3±1.4	18.9±1.4
NK-104 (0.1 mg/kg)	n=8	21.7±2.2	13.1±1.3	17.1±1.4	16.9±1.2
NK-104 (0.3 mg/kg)	n=8	21.2±2.0	13.6±2.0	14.5±0.9**	14.5±1.2*
NK-104 (1.0 mg/kg)	n=6	22.6±1.9	11.9±2.4	12.7±0.8**	12.1±1.0**
Phospholipids (mg/dl)					
Control	n=8	61.4±5.2	41.7±4.4	56.5±2.7	52.7±2.7
NK-104 (0.1 mg/kg)	n=8	49.3±4.4	33.2±1.9	48.4±1.6*	44.2±2.1*
NK-104 (0.3 mg/kg)	n=8	47.2±3.2	28.6±2.8	44.8±2.2**	39.9±1.8**
NK-104 (1.0 mg/kg)	n=6	53.9±3.7	27.1±3.5	47.9±1.5	40.4±2.4**
Triglyceride (mg/dl)					
Control	n=8	29.2±5.1	23.6±5.0	21.4±3.5	17.2±2.2
NK-104 (0.1 mg/kg)	n=8	20.2±3.0	21.7±3.6	14.7±2.2	12.2±1.6
NK-104 (0.3 mg/kg)	n=8	17.0±2.4	19.3±2.2	11.7±1.0*	10.2±0.9*
NK-104 (1.0 mg/kg)	n=6	26.2±5.1	28.4±5.0	29.9±3.0	23.3±4.7

Data are reported as the mean ± S.E., and n is the number of animals. * and ** indicate significant differences from the values of control group at P < 0.05 and 0.01, respectively.

(3-2) 頸動脈 BCI 動脈内膜肥厚に対するピタバスタチンの作用

内皮擦過動脈内膜肥厚に対するピタバスタチンの用量依存的な作用を図1-1に示した。

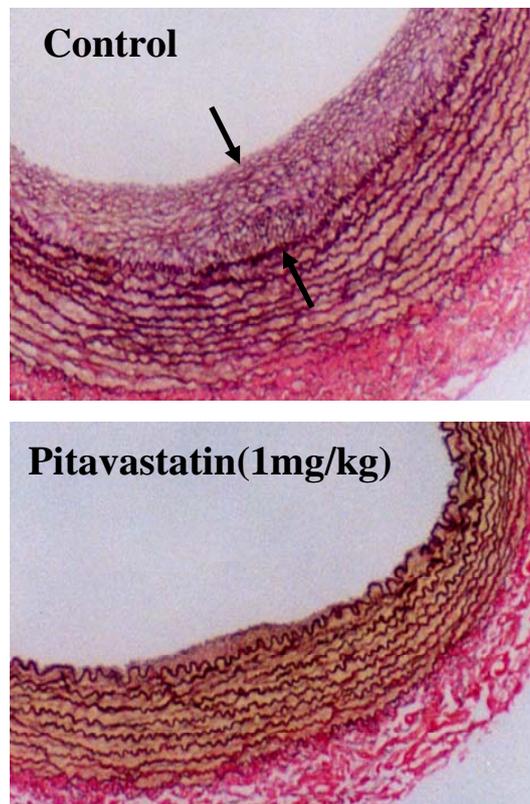


図1-1a. Representative photographs of HE staining of the arterial cross sections. Arrows indicate thickened intimal lesion.

図1-1aは内皮擦過動脈内膜肥厚の病理組織EV染色像を示す。図1-1bに画像解析による内膜肥厚部面積/中膜面積比 (intimal/medial ratio: I/M ratio)を表した。内膜肥厚は、内非擦過施行した左頸動脈では顕著に観察されたが、シャム施行の右頸動脈では内膜は単層の内皮が維持されており、内膜部に肥厚は観察されなかった。コントロール群の I/M ratio は 0.347 ± 0.050 であり、ピタバスタチンは用量依存的に I/M ratio を低下させ、その I/M ratio は、0.1 mg/kg, 0.3 mg/kg および 1.0 mg/kg で、各々 0.286 ± 0.076 (17.6% 抑制)、 0.150 ± 0.040

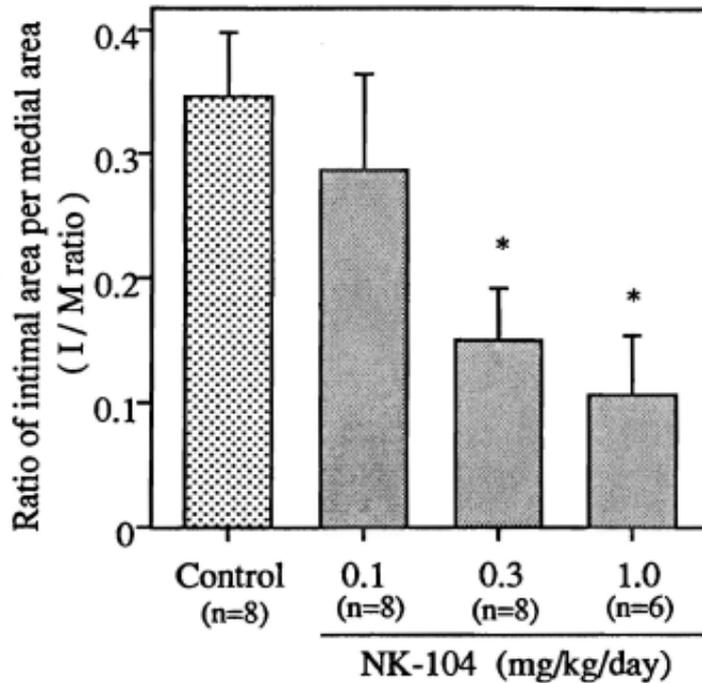


図1-1b. Dose-dependent effect of NK-104 on neointimal thickening in balloon catheter injured rabbit carotid aorta. The value for individual animals is the mean of four cross-sectioned segments of the carotid artery, and intimal thickening is represented as the ratio of area of intima to media. Each column and bar represent the mean \pm S.E., and values significantly different from the control at $P < 0.05$ are indicated by *. n = number of animals.

(56.8 % 抑制) および 0.106 ± 0.047 (69.5 % 抑制) であった。頸動脈血管内膜DNA含量を図1-2に示した。コントロール群では $48.8 \pm 6.1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ であったが、ピタバスタチンの0.3 mg/kg投与群では $31.2 \pm 0.28 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (36.1 % 抑制)、1.0 mg/kg投与群では $34.8 \pm 7.1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (28.7 % 抑制) であった。ピタバスタチンの動脈内膜肥厚抑制作用が、内膜部での細胞数の減少によることが推察された。

(3-3) 頸動脈 BCI 動脈内膜細胞増殖に対するピタバスタチンの作用

ピタバスタチンの動脈内膜肥厚抑制作用が、内膜部での細胞数の減少によることが推察

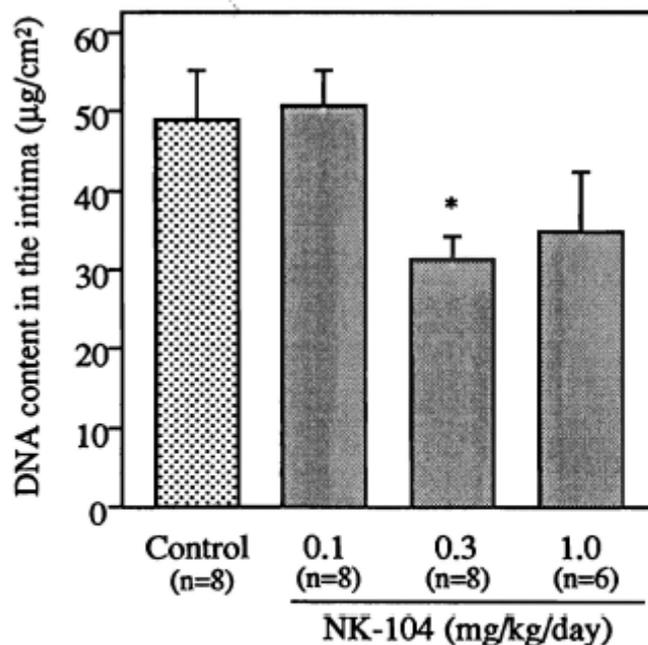


図1-2. Dose-dependent effect of NK-104 on the intimal DNA content in balloon catheter injured rabbit carotid aorta. Each column and bar represent the mean \pm S.E., and the values significantly different from the control at $P < 0.05$ are indicated by *. n = number of animals.

されたことから、ピタバスタチンの動脈内膜肥厚抑制作用および内膜 DNA 増加抑制作用の機序を解明する目的で、内膜肥厚部での細胞増殖に対する作用を *in vivo* Br-dU の取り込みを用いて検討した。BCI 頸動脈における内膜細胞数と内膜 Br-dU 取り込み細胞数を図 1-3 に示した。コントロール群の内皮擦過頸動脈内膜細胞数は単位面積当たり $2,206 \pm 391$ で、Br-dU 陽性細胞数は単位面積当たり $1,301 \pm 142$ であった。Br-dU 陽性細胞数は、ピタバスタチン 0.1 mg/kg 投与群および 1.0 mg/kg 投与群で、各々、 $1,301 \pm 142$ および 939 ± 50 (27.8% 抑制、 $p < 0.05$) と、用量依存的に有意に減少した。また、内膜総細胞数は、ピタバスタチン 0.1 mg/kg 投与群および 1.0 mg/kg 投与群で、各々、 $2,206 \pm 391$ および $1,883 \pm 155$ (14% 抑制) と用量依存的に減少する傾向にあった。総細胞数から Br-dU 陽性細胞を差し引いた非増殖細胞についてはピタバスタチンによる減少は認められなかった。ピタ

バスタチンの動脈内膜肥厚抑制作用は細胞数の減少および細胞増殖の抑制のみでは十分に説明できないものであった。

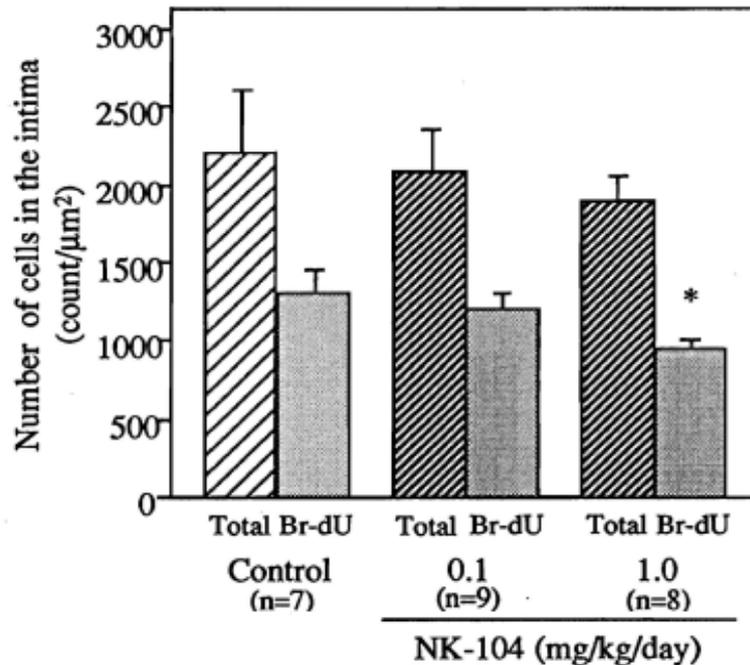


図1-3. Effect of NK-104 on SMC proliferation in the intima. The value for individual animals is the mean of four cross-sectioned segments of the carotid artery per rabbit. Each column and bar represent the mean \pm S.E., and values significantly different from the control at $P < 0.05$ are indicated by *. n = number of animals.

(3-4) 頸動脈 BCI 内膜肥厚に対するピタバスタチン、プラバスタチンおよびシンバスタチンの作用

ピタバスタチン以外のスタチンの BCI 内膜肥厚に対する作用を見た結果を図1-4に示す。ピタバスタチン 1.0 mg/kg 投与減では I/M ratio を 76.7 % 抑制 (IM ratio として 0.332 ± 0.068 から 0.075 ± 0.031 に) 抑制したのに対し、プラバスタチン 10 mg/kg では 27.6 %、シンバスタチン 3.0 mg/kg では 34.5 % の抑制であった。このときの血清総コレステロールの低下は、ピタバスタチン、プラバスタチンおよびシンバスタチンで、各々、29 %、21 %

および27%と同等であった。

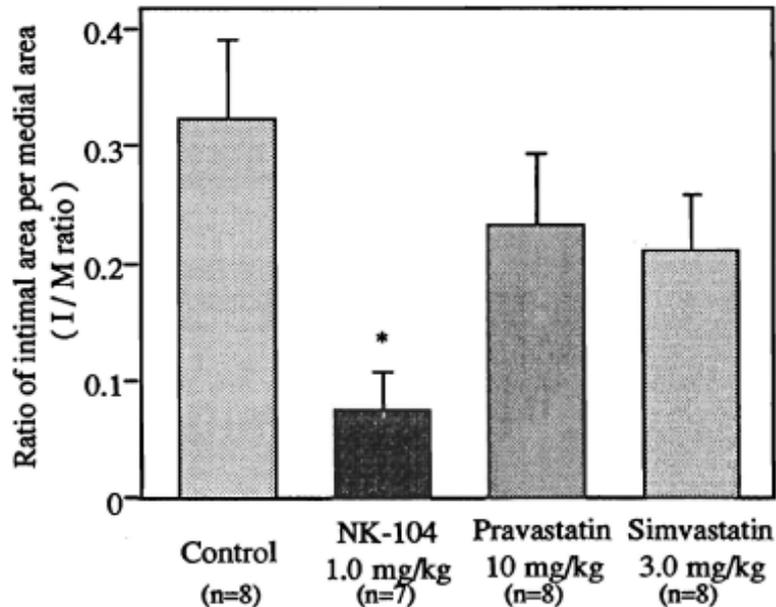


図1-4. Effects of NK-104, pravastatin and simvastatin on the neo-intimal thickening after balloon injury. The values for individual animals and the intimal thickening are as in Fig. 1. Each column and bar represent the mean \pm S.E., and values significantly different from the control at $P < 0.05$ are indicated by *. n=number of animals.

(3-5) BCI 内膜肥厚部細胞外マトリックス含量へのピタバスタチンの作用

ピタバスタチンの内膜肥厚抑制作用が、内膜細胞数では説明できなかったことから、内膜細胞外マトリックス蓄積へのピタバスタチンの作用を検討した。バルーンカテーテル内皮擦過動脈切片の抗フィブロネクチン抗体および抗I型コラーゲン抗体による免疫染色像を図1-5に示した。フィブロネクチンは、コントロール群では内膜肥厚部全体に瀰漫性に染色され、一方、ピタバスタチンの1.0 mg/kg投与群では、フィブロネクチンの存在は僅かであり内膜表層に限局していた。I型コラーゲンは、コントロール群では内膜肥厚部全体に瀰漫性に染色され、とくに、内膜表層で強く染色されたが、中膜層での染色は弱かった。一方、ピタバスタチンの1.0 mg/kg投与群では、I型コラーゲンの内膜層での存在

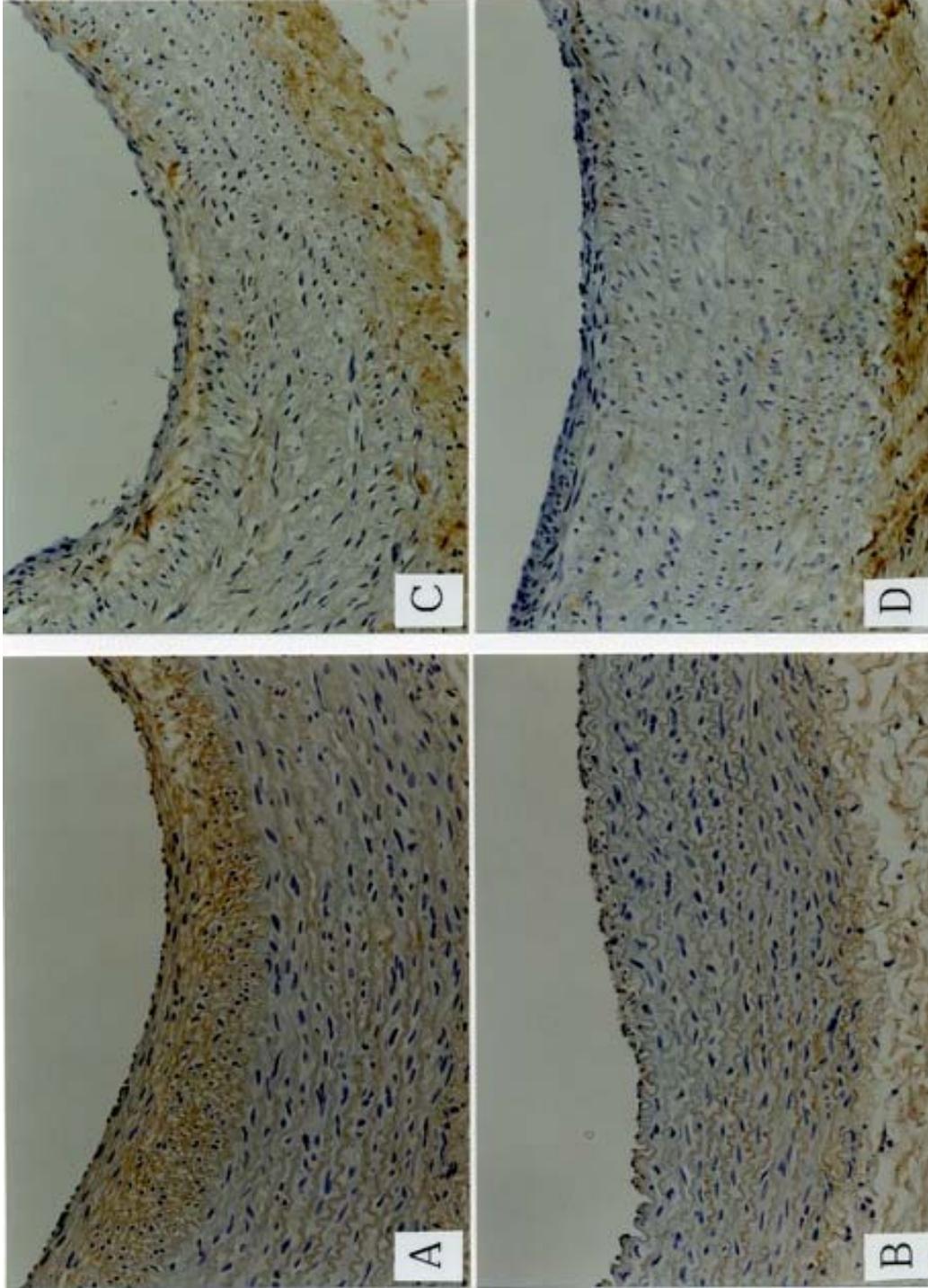


FIG 1 – 5. Representative photographs of immunostaining for fibronectin and type I collagen in the artery. Panels A and B show fibronectin staining and panels C and D show type I collagen staining. Panels A and C are the control, while B and D are the NK-104 group

は僅かであり中膜での存在が確認された。画像解析により免疫染色陽性面積を測定し面積率で表した結果を図1-6に示す。コントロール群ではフィブロネクチン陽性面積率は81.4%、I型コラーゲン陽性面積率は37.7%であった。内膜肥厚部での細胞外マトリック

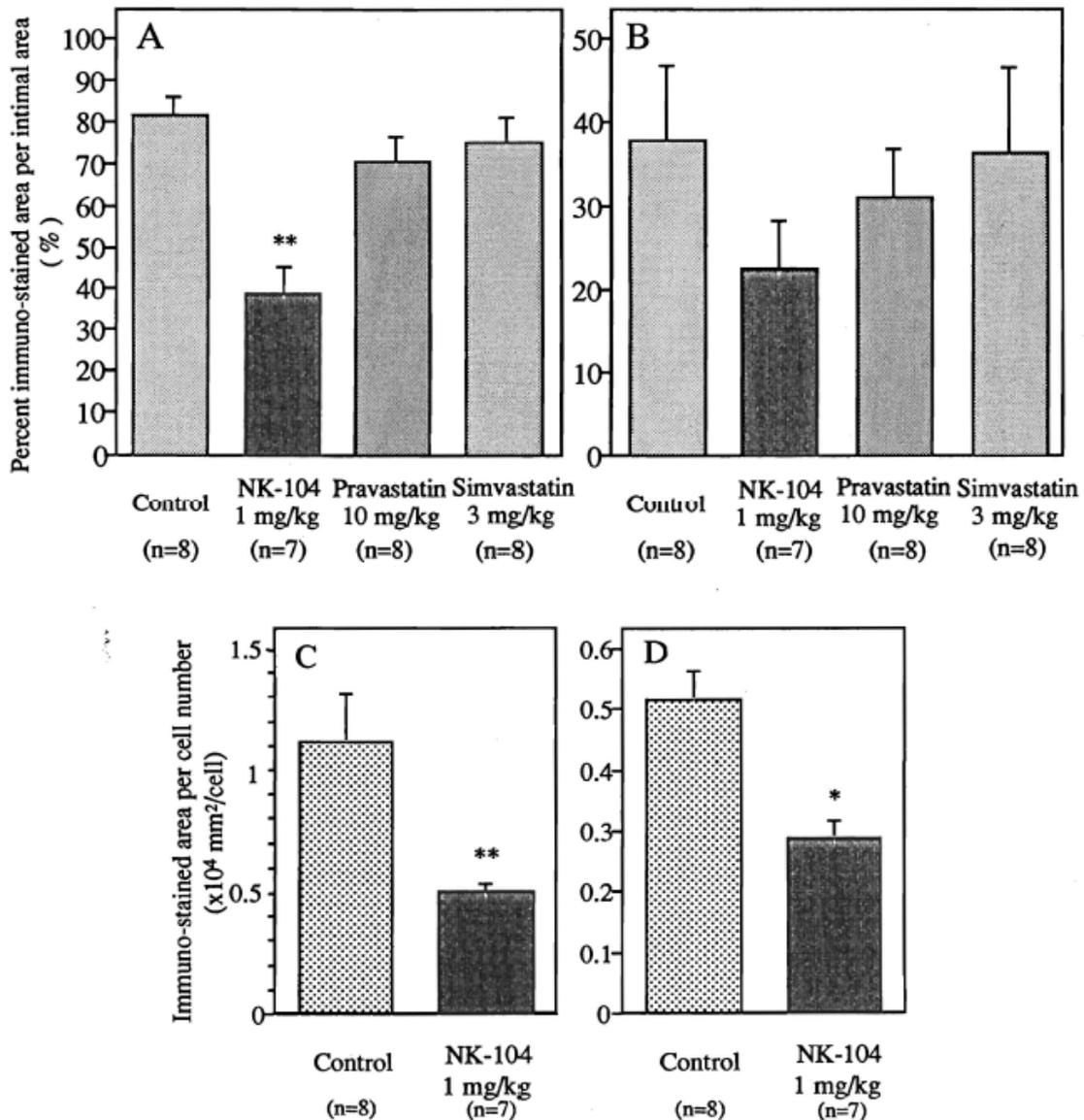


図1-6. Effects of NK-104, pravastatin and simvastatin on fibronectin and type I collagen in the intima. The mean value of four cross-sectioned segments stained with antibodies against fibronectin (panels A and C) and type I collagen (panels B and D) is given for individual animals. The content of each extracellular matrix was demonstrated as the immunostained area in the intima adjusted with the whole intimal area (panels A and B) or number of cells involved in the immunostained area (panels C and D). Each column and bar represent the mean \pm S.E., and values significantly different from the control at $P < 0.05$ and $P < 0.01$ are indicated by * and **, respectively. n=number of animals.

スの組成としては、コラーゲンよりフィブロネクチンが主要なマトリックスであった。ピタバスタチンの 1.0 mg/kg 投与群ではフィブロネクチン陽性面積率および I 型コラーゲン陽性面積率は、おのおの 39.1 % (52.0 % 抑制) および 22.5 % (40.3 % 抑制) であり、フィブロネクチンについては有意な抑制が認められた。プラバスタチンおよびシンバスタチンの作用は弱いものであった。フィブロネクチン陽性面積率と I 型コラーゲン陽性面積率をそれぞれ内膜細胞数あたりに換算したところ、ピタバスタチンの作用より顕著しなり、フィブロネクチンにおいては 55.2 % (1.116 ± 0.189 から 0.500 ± 0.026 に) および I 型コラーゲンにおいては 44.5 % (0.517 ± 0.042 から 0.287 ± 0.025 に) の抑制が認められた。ピタバスタチンの抑制作用は I 型コラーゲンよりフィブロネクチンでより強い作用であった。

(3-6) BCI 内膜肥厚部 TGF- β 含量へのピタバスタチンの作用

動脈硬化内膜 TGF- β 含量を図 1-7 に示した。正常動脈では、総 TGF- β および活性型 TGF- β は、各々、 578.3 ± 21.6 pg/mg および 16.8 ± 2.4 pg/mg であった。BCI 内膜肥厚部動脈では、総 TGF- β および活性型 TGF- β 含量は、各々、 1.0894 ± 42.7 pg/mg および 26.8 ± 3.1 pg/mg と増加していた。ピタバスタチン 1.0 mg/kg 投与群では、BCI 内膜肥厚部動脈では、総 TGF- β および活性型 TGF- β 含量は、各々、 1583.2 ± 123.6 pg/mg および 37.3 ± 6.1 pg/mg とコントロールに比し上昇していた。

(3-7) 培養 SMC および SBAC 増殖に対するピタバスタチンの作用

ピタバスタチンの intimal SMC、medial SMC および SBAC 細胞増殖への影響とメバロン酸添加のピタバスタチンの作用に対する影響を表 1-2 に示した。ピタバスタチンは濃度依存的に intimal SMC および medial SMC の増殖を同程度抑制し、intimal SMC では 1 μ M で 8.5 %、4 μ M で 34.1 % の、medial SMC では 1 μ M で 7.4 %、4 μ M で 26.5 % の抑制を示し、intimal SMC では 4 μ M 以上で medial SMC では 8 μ M 以上で有意であった。一方 SBAC

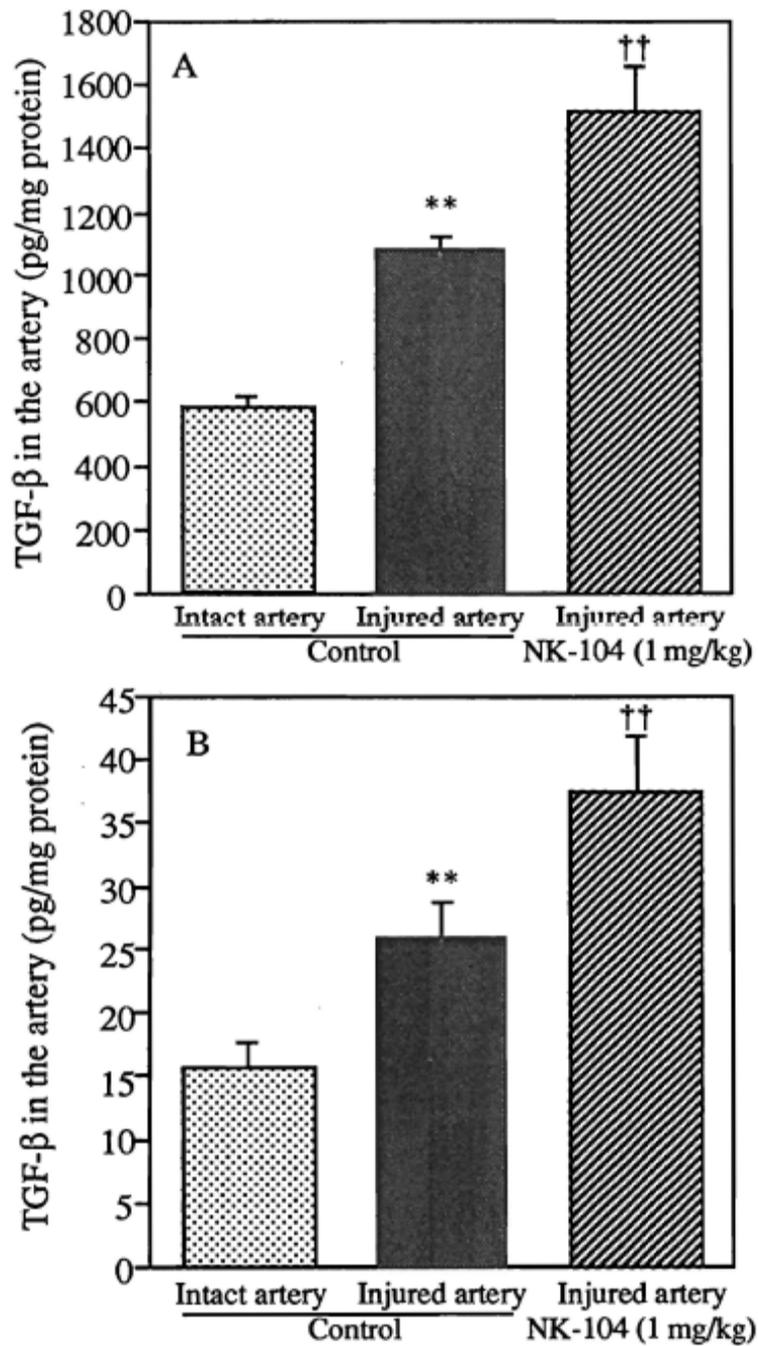


Fig 1-7. Effect of NK-104 on TGF- β contents in balloon-injured carotid artery in rabbits. Panel A shows the total TGF- β contents and panel B shows activated form TGF- β . Each column and bar represent the mean \pm S.E., and ** indicates a significant difference from the uninjured normal artery of the control at $P < 0.01$, while †† indicates a significant difference from the injured thickened artery of the control at $P < 0.01$. n = number of animals.

表1-2. Effects of NK-104 and mevalonolactone on cell growth in rabbit arterial intimal SMC and medial SMC

	Intimal SMC		Medial SMC		SBAC	
	OD550 (fold increase, %)		OD550 (fold increase, %)		OD550 (fold increase, %)	
Effect of NK-104						
Initial	0.071		0.092		0.062	
Control	0.283 ± 0.030 (3.99, 100)		0.279 ± 0.033 (3.03, 100)		0.315 ± 0.056 (5.081, 100)	
NK-104 0.5 μM	0.270 ± 0.027 (3.80, 95.2)		0.268 ± 0.037 (2.91, 96.1)		0.364 ± 0.036 (5.871, 115)	
1.0 μM	0.259 ± 0.027 (3.65, 91.5)		0.258 ± 0.030 (2.80, 92.6)		0.364 ± 0.013 (5.871, 115)	
2.0 μM	0.215 ± 0.020 (3.03, 75.9)		0.235 ± 0.023 (2.55, 84.3)		0.321 ± 0.012 (5.177, 102)	
4.0 μM	0.187 ± 0.019 (2.63, 65.9)*		0.205 ± 0.019 (2.23, 73.5)		0.267 ± 0.018 (4.306, 84.7)	
8.0 μM	0.151 ± 0.017 (2.13, 53.4)*		0.163 ± 0.013 (1.77, 58.5)*		0.211 ± 0.009 (3.403, 67.0)*	
Effect of mevalonolactone						
Control	0.291 ± 0.040		0.275 ± 0.042		Not tested	
NK-104 (8 μM)	0.138 ± 0.017		0.149 ± 0.010		Not tested	
+ Mevalonolactone						
30 μM	0.265 ± 0.043		0.216 ± 0.023		Not tested	
100 μM	0.294 ± 0.041		0.273 ± 0.047		Not tested	

Values are reported as the mean ± S.E. of OD550 in the 10 lines of intimal SMC (n = 10), 8 lines of medial SMC (n = 8) or two repeats of triplicate well cultures of SBAC (n = 6), fold increase from the initial value and percent of the control in the fold increase (%). The initial value is the mean of the values at the beginning of the treatment. * indicates a significant difference from the control at P < 0.05.

細胞増殖に対しては、ピタバスタチンは4 μM 以上で抑制作用を示し、8 μM で33%の有意な抑制を示した。Intimal SMC および medial SMC におけるピタバスタチンの8 μM の抑制作用は、メバロン酸添加により完全に消失した。

(3-8) 初代培養 SMC (primary SMC) の細胞外フィブロネクチン産生に対するピタバスタチンの作用

ピタバスタチンの primary SMC の細胞外フィブロネクチン産生への影響とメバロン酸添加のピタバスタチンの作用に対する影響を表1-3に示した。吸光度を細胞数で補正した値で表した。コントロールでは 0.0720 ± 0.0038 であったのに対しピタバスタチン処理では0.1 μM からその低下が認められ、1 μM で37.1% (0.0453 ± 0.0070)、10 μM で56.2% (0.0315 ± 0.0051) の有意な抑制が認められた。このピタバスタチンの抑制作用はメバロン酸の添加により減弱した。

表1-3. Effect of NK-104 and mevalonolactone on fibronectin formation in the basement lesion in primary cultured rabbit aortic SMC

	OD490 (Fibronectin)	OD490/ μg protein (Fibronectin/cell)	%Control
Control	0.920 ± 0.049	0.0720 ± 0.0038	100
NK-104 (0.1 μM)	0.870 ± 0.361	0.0595 ± 0.0247	82.6
NK-104 (1 μM)	$0.576 \pm 0.089^*$	$0.0453 \pm 0.0070^*$	62.9
NK-104 (10 μM)	$0.424 \pm 0.069^*$	$0.0315 \pm 0.0051^*$	43.8
NK-104 (10 μM) + Mevalonolactone (100 μM)	0.700 ± 0.296	0.0628 ± 0.0265	

Values are reported as the mean \pm S.D. from a triplicate set of wells in three strains of cell cultures. * indicates the significant differences from the control at $P < 0.05$. The absorbance of 490 nm (OD490) in the basal wells is 0.179.

4節：考察

PTCA の開発により動脈狭窄疾患の治療がおおきく進歩した。しかし、PTCA では、バルーンカテーテルによる内皮傷害が起因となる内膜肥厚が生じ、その結果、PTCA 施行患者の 30~40% に再狭窄が起り PTCA の再施行を要することから、その予防が課題となっている (27,28)。細胞増殖抑制剤あるいは細胞増殖因子の抗体やアンチセンスオリゴヌクレオチドが、血管 SMC の増殖を抑制することで BCI 後の新生内膜肥厚を抑制することが報告されている (8,9,29,30)。最近では高癌剤として開発されているパクリタキセルや免疫抑制剤として開発されているラパマイシンが SMC 増殖抑制効果を有し、PTCA 再狭窄を予防することが報告されている。しかし、実際に臨床で再狭窄の予防が SMC 増殖抑制そのものにどの程度依存しているかについては明らかではない。今回、私は、BCI 後の内膜肥厚におけるメバロン酸経路とイソプレノイドの産生の意義と HMG-CoA reductase 阻害剤であるピタバスタチンの作用性について検証した。

ピタバスタチンは 0.3~1.0 mg/kg で用量依存的に内膜肥厚を抑制した (図 1-1)。この用量では臨床で認められている作用と同等の血清コレステロールの低下作用が認められた (表 1-1)。このことは、ピタバスタチンが臨床で高コレステロール血症の治療に使用される用量でバルーン内皮傷害誘発新生内膜肥厚を抑制しうることを示唆する。フルバスタチンにおいても大腿動脈において、血清コレステロール低下とともに血管内膜肥厚を抑制することが報告されている (31)。

次にピタバスタチンの内膜肥厚部の細胞数を見る目的で DNA 含量を測定したところ、内膜 DNA 含量の抑制の程度は内膜肥厚 (I/M ratio) の抑制の程度に比し小さく、限定的なものであった (図 1-2)。さらに、内膜肥厚部 SMC の増殖に対するピタバスタチンの作用を見たところ、細胞増殖の抑制は DNA 含量の抑制と同様の結果であった (図 1-3)。これらの結果は、ピタバスタチンの内皮傷害後の新生内膜肥厚の抑制作用の一部には、その SMC 増殖抑制作用が関与していることが示唆される。 $[^3\text{H}]$ -チミジンを用いた実験では、バ

ルーン傷害後の内膜肥厚部においてチミジンを取り込んでいない細胞は、血管中膜層から内膜層へ遊走してきた細胞であることが報告されている (32)。また、HMG-CoA reductase 阻害剤は細胞内イソプレノイド合成を阻害し、p21^{ras}のイソプレニル化を抑制してSMCの増殖と遊走を抑制することが報告されている (10,11,33)。また、Br-dU陰性の細胞数については、ピタバスタチンは影響を与えていなかった。今回の結果では、ピタバスタチンは、SMCの中膜から内膜への遊走を阻害することなく増殖のみを阻害している可能性が示唆された。実際、培養SMCを用いた検討ではピタバスタチンはSMC増殖をHMG-CoA reductase阻害作用に依存して抑制することが示された (表1-2)。BAYw-6228 (Bayer) は脂溶性スタチンとして、あらゆる種類の細胞に対して親和性を持ち、低濃度からintimal SMCの増殖を抑制する (34)。ピタバスタチンは、intimal SMCの細胞増殖抑制したが、medial SMCあるいはSBACの場合よりも低い濃度で抑制することが示され、中膜の正常SMCより内膜の増殖SMCに対してより選択性が高いものと思われた。この選択性はコレステロール合成阻害作用においても同様に認められている (未公表データ)。

ピタバスタチンの内膜肥厚抑制作用は、同等の血清コレステロール低下作用を示す用量で、プラバスタチンやシンバスタチンよりも強いものであった (図1-4)。プラバスタチンはその水溶性のため、肝外組織への作用や SMC への作用は比較的弱いことが報告されている (35,36)。今回のピタバスタチンの内膜肥厚抑制作用は、ピタバスタチンが持つ、中膜 SMC の遊走への作用より内膜 SMC の増殖に対して、より強い抑制作用によるものと考えられた。

今回の試験では、ピタバスタチンの内膜肥厚抑制作用は、その内膜細胞数抑制 (DNA 含量低下) や内膜細胞増殖抑制作用 (Br-dU 陽性細胞数低下) だけでは説明できない部分が認められた。そこで、内膜肥厚を形成する因子のひとつである細胞がマトリックスに注目した。フィブロネクチンは、バルーン傷害血管の内膜肥厚部に得意的に、その細胞外および細胞内に発現が認められ、その面積は内膜肥厚部の8割を占めていた (図1-6A)。一

方、I型コラーゲンは内膜、中膜の両方で発現が認められたが、内膜肥厚部よりもむしろ中膜で発現が多かった(図1-6B)。これらの結果から、バルーン内皮傷害による新生内膜肥厚には平滑筋細胞とともに細胞外マトリクスが大量に蓄積しており(1)、中でもフィブロネクチンは、内皮傷害血管内膜肥厚部に特異的に蓄積していることから、その病態形成と性質において重要な役割を演じている可能性が示唆された。ピタバスタチンの1.0 mg/kg投与は内皮障害血管内膜肥厚部のフィブロネクチン発現量およびI型コラーゲン発現量とともに抑制した(図1-6A,B)。その抑制の程度は、細胞数の低下より強いもので、さらに、内膜肥厚部におけるフィブロネクチン蓄積に対するピタバスタチンの抑制作用は、内膜細胞増殖、内膜細胞数低下あるいはI型コラーゲン蓄積に対する抑制作用より強いものであった。つまり、ピタバスタチンは肥厚部における細胞数と細胞外マトリクスの組成を変化させて、細胞数優位な内膜肥厚にし、また、細胞外マトリクス内組成もフィブロネクチン優位をI型コラーゲン優位に変化させたと言える。

ピタバスタチンの細胞増殖抑制作用およびフィブロネクチン蓄積抑制作用を検証するため、内皮傷害内膜肥厚部でのTGF- β 含量を定量した。TGF- β は細胞増殖を負に制御する他、フィブロネクチンの遺伝子発現および細胞からの分泌を正に制御する(37)。TGF- β II受容体mRNA発現の増加や外因性のTGF- β Iが内膜肥厚を促進することがBCIモデルにおいて報告されている(38)。逆に、内因性のTGF- β 活性化は内膜肥厚を抑制することも報告されている(39)。ピタバスタチン投与による内膜肥厚部TGF- β の増加とその活性化はSMCの細胞増殖に対し抑制的に作用するとともに、内因的TGF- β 活性化に起因する動脈硬化抑制作用を示唆している結果と思われる。しかし、フィブロネクチン蓄積抑制との関係については今回のデータからは説明ができなかった。ピタバスタチンは、今回のBCI傷害血管内膜でのフィブロネクチンmRNA発現やTGF- β typeII受容体mRNA発現には影響を及ぼさなかった(未公開データ)。Primary SMCを用いた細胞基底へのフィブロネクチン産生をピタバスタチンは0.1 μ Mで18%、1 μ Mで37%抑制した。この作用はピタバスタチンのSMC

増殖に対する作用より強かった。このことは、BCI 内膜肥厚モデルにおけるピタバスタチンの内膜肥厚抑制が、SMC の細胞増殖よりもむしろ細胞外フィブロネクチン産生抑制に起因するものであることを示唆している。ピタバスタチンの細胞増殖抑制作用もフィブロネクチン産生抑制作用もメバロン酸添加により消失することは、いずれもメバロン酸経路に関わる因子がその制御に関与していることを意味しており、SMC ではフィブロネクチン産生がよりメバロン酸経路への依存度が高いことを示唆している。しかし、フィブロネクチン産生に関わるメバロン酸経路やピタバスタチンのTGF- β 増加作用とその意味はなおも不明であり今後の研究を待たねばならない。

本実験から、ピタバスタチンが、BCI 内膜肥厚を低用量で抑制し、その内膜肥厚部をフィブロネクチンに富む病態から細胞とコラーゲン線維に富む病態にし、より安定なプラークにしていることが示唆され、内膜肥厚抑制だけでなくプラーク破綻の抑制にも効果を発揮していることを示しているものと思われる。

第2章 ピタバスタチンの糖尿病ラット動脈および平滑筋細胞におけるオステオポンチン発現に対する作用

1節 はじめに

ピタバスタチンは臨床において強力に高脂血症患者の血清総コレステロールとLDLコレステロールを低下させる。また、糖尿病においてもその合併症である高コレステロール血症を強力に改善する効果を示す(LIVES Study)。さらに、LIVES studyの5年間にわたる追跡調査の結果ピタバスタチンが糖尿病患者のhA1c値を悪化させないこと、また5年間持続的にHDLコレステロールを上昇させ続けることが明らかとなり、その有用性が証明されつつある。

一方、スタチンは糖尿病において冠動脈疾患に対し予防的効果を示すことが報告されている(40)。その作用機序としては、血管内細胞機能の正常化、炎症反応の抑制、プラーク安定化あるいは血栓形成抑制など、様々な多面的作用が報告されている(41)。

オステオポンチン(OPN)は平滑筋細胞をはじめ種々の細胞で発現が確認されているリン酸化を受ける分泌蛋白である(42)。また、OPNは動脈硬化巣の石灰化部位で発現が亢進していることが報告されている(43)。OPN中和抗体の投与がバルーン内皮傷害動脈硬化モデルにおいて内膜肥厚を抑制することが報告されている(44)。さらに、竹本らは、糖尿病血管においてOPNの発現が亢進していること、培養平滑筋細胞において高糖条件培養でヘキサミン経路と同様にPKCを介したOPN発現が上昇すること、platelet-derived growth factor(PDGF)による平滑筋細胞の増殖および遊走をOPNが促進することが報告されている(45, 46)

以上のことから、本章では、ピタバスタチンが糖尿病モデルでの直接的抗動脈硬化作用を検証する目的で、ラット動脈および平滑筋細胞において誘導されるOPN発現に対する作用を見た。また、糖尿病におけるピタバスタチンの有用性を見るため、腎臓における

OPN の発現についても検討を行った。

2 節 実験の方法と材料

(2-1) 試薬と材料

ラット OPN cDNA プローベは Mark Thiede 博士より供与された DE52 イオン交換樹脂は Whatman より、抗モノクローナルラット OPN 抗体(MPIIIB10)は American Research Products より購入した。パーオキシダーゼ標識抗マウス IgG 抗体は Amersham Pharmacia Biotech(現 GE Science)より、メバロン酸、ゲラニルゲラニルピロホスフェート(GGPP)、ファルネシルピロホスフェート(FPP)は Sigma より購入した。GGPP あるいは FPP は膜透過性が悪いため、また培養液中のチオール基との反応を回避するため(47)、リポソームとして実験直前に添加した。ピタバスタチンは日産化学工業株式会社にて製造された。ヒト血清 LDL は Havel らの超遠心法 (48)にて調製した。

(2-2) 細胞培養

ラット動脈平滑筋細胞は、雄性ウイスター系ラット大動脈より森崎らの方法にて explant 法で調製した(49)。4~9 継代した細胞を用い 6 cm 培養皿にコンフルエントになるまで培養し 24 時間無血清培地にて starvation した。その後、LDL (0~200 $\mu\text{g protein/mL}$)とピタバスタチン (0~8 μM)、あるいはメバロン酸 (0~100 μM) あるいは GGPP (0~15 μM)または FPP (0~30 μM)を含有する無血清培地にて 48 時間培養した。培養上清を回収しウェスタンブロッティングにて解析した。細胞は mRNA を抽出しノーザンブロッティングした。細胞数を計測し、処理による細胞数に差がないことを確認している。

(2-3) 動物実験

体重約 200g の雄性ウイスターラットを用い、尾静脈より streptozotocin (STZ)を 50mg/kg

投与した(50)。STZ 投与と同時にピタバスタチン (0.5%カルボキシメチルセルロース溶液懸濁) を強制経口投与し、7日間、1日1回投与した。コントロール群には溶媒のみを投与した。実験最終日に、過剰の Sodium 5-ethyl-5-(1-methylbutyl) barbiturate の麻酔により屠殺、採血し、大動脈と腎臓を摘出した。実験終了時の体重および血糖値は、正常コントロールラットで 383.3 ± 12.0 g と 8.0 ± 0.4 mM (mean \pm s.e., $n=3$)、正常ピタバスタチン投与ラットで 373.3 ± 8.8 g と 7.8 ± 0.8 mM ($n=3$)、STZ 投与コントロールラットで 325.0 ± 8.6 g と 31.6 ± 1.6 mM ($n=3$)、STZ 投与ピタバスタチン投与ラットで 322.5 ± 6.3 g と 30.1 ± 1.0 mM ($n=3$) であった。ピタバスタチン投与は血糖値、摂餌量および体重には影響を及ぼさなかった。なお、本動物実験は千葉大学の動物実験倫理委員会の規定に従って実施された。

(2-4) ウェスタンブロッティング解析

培養上清中 OPN 含量はウェスタンブロッティングにより行った(46)。DE52gel スラリーと培養上清を混和して DE52gel に吸着したオステオポンチンを回収し、SDS-10%ポリアクリルアミドゲル電気泳動し、ニトロセルロース膜にブロットした。ブロット膜を BSA にてブロッキングし抗 OPN 抗体 (1:1000 希釈) およびパーオキシダーゼ結合抗マウス IgG (1:5000 希釈) にて ECL 法で検出した。

(2-5) ノーザンブロッティング解析

摘出組織から ISOGEN にて total RNA を抽出し、 32 P 標識 OPN cDNA プローベを用いた竹本らの報告 (46) に準じて、ノーザンブロッティング法により OPN mRNA を定量解析した。すなわち、RNA 定量内部標準 mRNA の検出には、 32 P 標識 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) cDNA プローベを用いた。蛍光強度および放射能強度の測定は EPSON イメージングスキャナー ES8000 を用いて検出し、NIH image1.44 ソフトにて定量した。

(2-6) 統計解析

データは平均±標準誤差で示し、student's t-test にて有意差検定した。

3節 結果

(3-1) ラット培養血管平滑筋細胞 OPN 発現への LDL の影響

竹本らは、健常者血清で血中オステオポンチン濃度とコレステロール値との間に負の相関があることを報告している(51)。そこで、ここでは、培養細胞を用いた OPN 発現への LDL の影響を見るため、ラット大動脈平滑筋細胞を用いた実験を行った。平滑筋細胞を LDL 含有培地にて 48 時間培養することで培地中に放出された OPN の減少が認められ、同時に、細胞内 OPN mRNA 発現量の減少も確認された (図 2-1a,2-1b)。

(3-2) ラット培養血管平滑筋細胞 OPN 発現に対するピタバスタチンの作用

(3-1) において LDL の添加で OPN 発現の減少が認められた。このことは、LDL によるフィードバック抑制機構を介した細胞内コレステロール合成低下が OPN 発現の低下を来たしたことを推測させる結果である。そこで、次に、細胞内のコレステロール合成を阻害するピタバスタチン(NK-104)の平滑筋細胞の OPN 発現に対する作用を見た。ピタバスタチンはラット動脈平滑筋細胞において培養上清中 OPN 分泌蛋白および細胞内 mRNA 発現の何れにおいても濃度依存的に抑制した (図 2-1c,2-1d)。同様の作用は他のスタチンであるアトルバスタチンでも確認された(図 2-1e)。

(3-3) ピタバスタチンの OPN 発現抑制作用へのメバロン酸、GGPP および FPP の添加効果

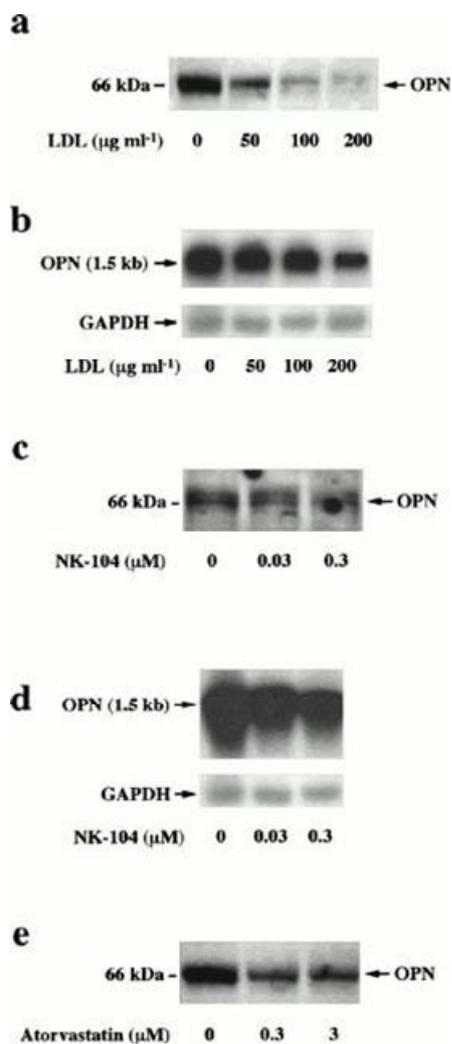


図2-1. Effects of LDL and NK-104 on OPN expression in cultured rat aortic SMCs. After serum starvation for 24h, medium was replaced with another serum-free medium containing the indicated concentrations of LDL (a,b), NK-104 (c,d), or atorvastatin (e), and incubation continued at 37° C for 48h. After incubation, the conditioned medium and the cells were processed for Western blotting (a,c,e) and Northern blotting (b,d), respectively. (a,c,e) OPN was semipurified from the medium using DE52 gel and subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The materials were transferred to nitrocellulose membranes, and the membranes were immunoblotted with the anti-OPN antibody. (b,d) Total RNA was isolated from the cells, separated by agarose gel electrophoresis, and transferred to nylon membranes. The membranes were hybridized with ³²P-labelled rat OPN cDNA probe or rat GAPDH cDNA probe, and signals were detected by autoradiography. The blots shown in this figure are representative of three independent experiments providing essentially similar results.

(3-2)の実験で見られたスタチンのオステオポンチン発現抑制作用が、HMG-CoA 還元酵素阻害の基づくものか否かを確認する目的で、ピタバスタチンの作用に対する HMG-CoA 還元酵素の代謝物であるメバロン酸およびその後の代謝物である GGPP および FPP の添加効果を見た。図2-2a に示すごとく、ピタバスタチンの平滑筋細胞培養上清への OPN 産生抑制作用はメバロン酸の添加によりほぼ完全に消失した。このことは HMG-CoA 還元酵素阻害によるメバロン酸産生の低下が OPN 産生を低下させているものと示唆している。さらに、OPN 産生に関与するメバロン酸から後のメバロン酸経路の代謝産物の検索をするため、ピタバスタチンの作用に対する GGPP および FPP の効果を見た

ころ GGPP の添加でピタバスタチンの作用が消失したが、FPP の添加ではピタバスタチンの作用は消失しなかった (図 2-2c,2-2e)。同様の結果は、細胞 mRNA 発現を見たノーザンブロット解析においても認められた (図 2-2b,d,f)。

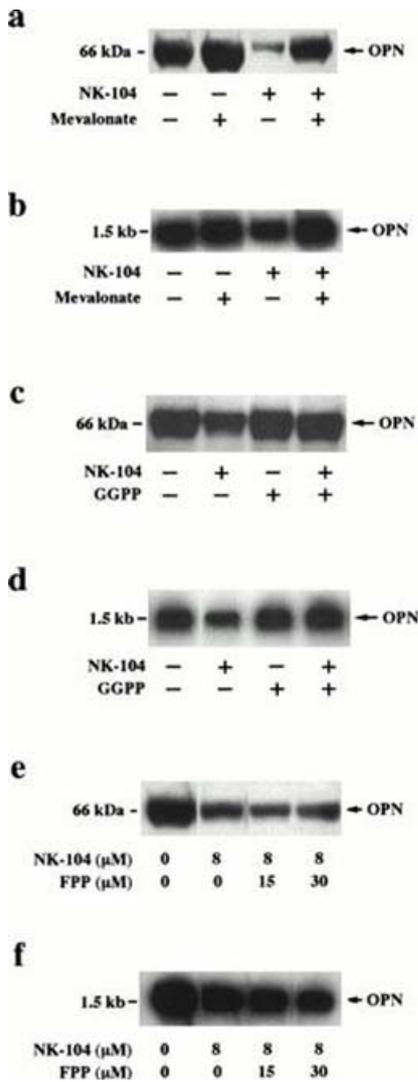


図2-2. Mevalonate and GGPP, but not FPP, prevent NK-104-induced inhibition of OPN expression in cultured rat aortic SMCs. After serum starvation for 24h, medium was replaced with another serum-free medium and cells were incubated with or without 8 μM NK-104 at 37° C for 48h in the presence or absence of 100 μM mevalonate (a,b), 15 μM GGPP (c,d) and 15–30 μM FPP (e,f). After incubation, the conditioned medium and the cells were processed for Western blotting (a,c,e) and Northern blotting (b,d,f), respectively, as described in the legend to Figure 1. The blots shown in this figure are representative of three independent experiments providing essentially similar results.

(3-4) STZ 誘発糖尿病ラット大動脈および腎臓における OPN 発現に対するピタバスタチンの効果

糖尿病モデルラットにおいて、血管および腎臓で OPN 発現の亢進し、糖尿病による動

脈硬化、石灰化および糖尿病性腎症への OPN の関与が報告されている(52, 46, 40, 53)。

そこで糖尿病におけるピタバスタチンの抗動脈硬化作用、抗腎症作用を明らかにする目的で、STZ 誘発糖尿病モデルラットにおける血管および腎臓での OPN 発現に対するピタバスタチンの作用を検討した。図 2-3 に示すごとく、ノーザンブロット解析の結果、動脈および腎臓において糖尿病で OPN 発現の増加を確認した。ピタバスタチン (3 mg/kg) は正常動物では OPN 発現には影響を及ぼさないが、糖尿病モデルにおいて血管および腎臓の両組織において OPN 発現を著明に抑制した (図 2-3-b,c)。

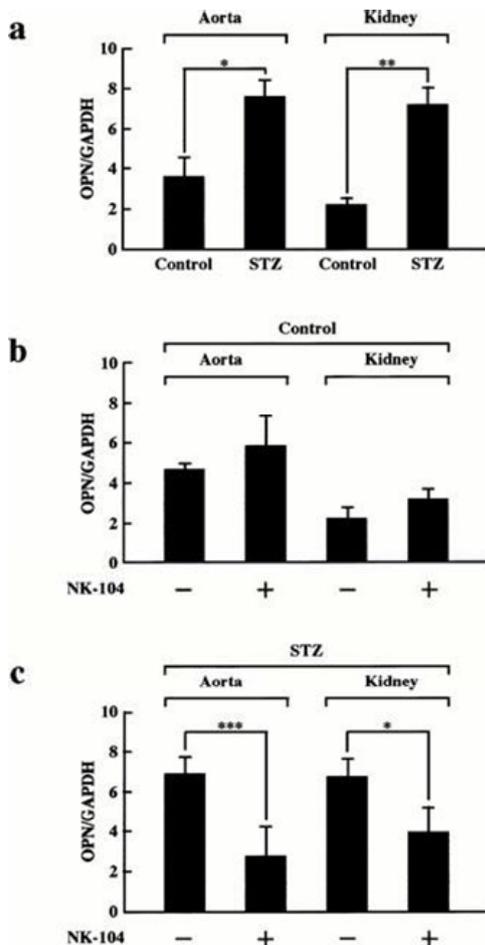


図2-3. Effect of oral administration of NK-104 on OPN expression in aorta and kidney of STZ-induced diabetic rats. NK-104 (3mgkg⁻¹) was orally administered once a day to STZ-induced diabetic rats (n=3) and control rats (n=3). After 7 days of administration, the aortas and kidneys were excised and processed for Northern blotting as described in the legend to Figure 1. The level of OPN transcript was estimated by the ratio of OPN signal to GAPDH signal on autoradiograms measured with the image analyzer. Data are mean±s.e.mean of triplicate determinations. *P<0.05; **P<0.005; ***P<0.01.

4節 考察

今回の結果から、培養平滑筋細胞で LDL およびピタバスタチンによる細胞内コレステロール合成抑制が OPN 発現を低下させることが明らかとなった。ピタバスタチンの抑制作用はメバロン酸に添加により消失したことから、メバロン酸経路の代謝産物が OPN 発現の制御に重要な役割を担っていると推察された。さらに、ピタバスタチンの STZ 誘発糖尿病モデルラットへの投与は血管および腎臓での OPN 発現を抑制した。このことは、ピタバスタチンが、糖尿病において、その合併症である動脈硬化や腎症の予防あるいは治療において有用な薬物になりうることを示唆するものである。

メバロン酸経路の代謝産物で OPN の発現制御に関与する分子を検索した。すなわち、ピタバスタチンの作用をブロックするため、メバロン酸代謝産物のイソプレノイドを添加した。その結果 FPP はピタバスタチンの作用に影響を及ぼさなかったが、GGPP はピタバスタチンの作用を減弱させた。GGPP は FPP とイソペンテニルピロリン酸から合成されるが、イソペンテニルピロリン酸もまたメバロン酸代謝産物であるため、ピタバスタチンによりその合成が阻害されている。したがって、FPP のみではピタバスタチン存在下では GGPP が合成されないものと思われる。細胞内で多くの蛋白がイソプレニル化を受けることが報告されており、とくに Ras, Rho, Rac あるいは Rac といった低分子量 G 蛋白は細胞の機能に大きく関与する。これらの低分子量 G 蛋白のイソプレニル化は、その細胞内局在に深く関与し、その機能発現に重要な意味を持つ(54, 55)。今回の結果は、平滑筋細胞において、細胞内でイソプレニル化される蛋白でファルネシル化される Ras 低分子量 G 蛋白ではなく、ゲラニルゲラニル化される Rho あるいは Ras, Rac, CD44 が OPN 発現制御の関わっていることを示唆するものである。

ヒト、ブタおよびマウスにおいて OPN プロモータに *cis-acting consensus sequences* が存在することが報告されている(56)。OPN プロモータで遺伝子発現に関わる領域が報告されている。Ets-1-like element は OPN 発現を正に制御することが報告されている(57)。また、

Vitamin D response element、は骨芽細胞においてジヒドロキシコレカルシフェロールによって誘導される OPN 発現に関与している(58)。CCAAT box binding factor, CBF は fibrosarcoma において *v-src* を介した OPN 発現を惹起する(59)。培養平滑筋細胞においては upstream stimulatory factor 1 が、正常の静止型から傷害で誘導される増殖型への細胞形質の変化に伴い増加する OPN 発現に関与する(60)。OPN 発現制御には OPN プロモーターの E-box binding sequence (CAGGTG)と GC-rich region が必要とされている。今回のピタバスタチンに反応する OPN 発現制御がこれらの転写因子を介しているか否か、また、ゲラニルゲラニル化される蛋白がこれらの転写因子に作用しているか否かについては、なお今後の詳細な研究が必要である。

ピタバスタチンは STZ 誘発糖尿病ラットにおいて大動脈および腎臓における OPN 発現を有意に低下させた(図 2-3)。このことは、ピタバスタチンが糖尿病における血管および腎臓での OPN 発現増加メカニズムがピタバスタチンにより影響を受けるメカニズムであることを示唆している。糖尿病において、血管および腎臓で OPN 発現が増加する機序はまだ解明されていないがピタバスタチンが作用しうることは、ひとつの手懸かりとなるであろう。そして、糖尿病合併症における治療のひとつの手段を提供するものであろう。

スタチンが血清コレステロール低下作用とともに、*in vivo*, *in vitro* で冠動脈疾患への作用を併せ持つ報告が出されてきている(61)。本研究では、ピタバスタチンにおいても、バルーン内皮傷害動脈硬化ウサギ、L-NAME 負荷高コレステロール血症誘発粥状動脈硬化ウサギにおいて抗動脈硬化作用を有することが明らかになり、臨床でも JAPA-ACS study で内膜肥厚進展抑制作用が確認されている(62)。さらに、ここでは、糖尿病合併症としての動脈硬化に対してもピタバスタチンが OPN の発現を抑制することで、進展抑制効果を発揮しうることを示唆される。しかし、その機序と臨床での作用の実証、そして、糖尿病における動脈硬化の進展における OPN の意義については、今後の更なる研究が必要である。

第3章 慢性N^o-nitro-L-arginine methylester (L-NAME)負荷中等度高コレステロール血症モデルでのピタバスタチンの抗動脈硬化作用

1節 はじめに

第1章では、バルーンカテーテルの物理的な内皮傷害によって誘導される内膜肥厚に対するモデルに対するピタバスタチンの効果を確認した。そこで、本章では、高コレステロール血症により誘導される粥状動脈硬化に対するピタバスタチンの効果を確認した。

粥状動脈硬化の内膜肥厚部では、マクロファージと脂質に富むコアの表面を薄い fibrous cap が覆うプラークで破綻が起こることが急性心筋梗塞の引き金となる。このプラークの破綻は血清コレステロールの低下により抑制されることが報告されている (63)。スタチンは強力に血清コレステロールを低下させることで動脈硬化を抑制するとされている。ピタバスタチンは HMG-CoA reductase を阻害する (20)ことで強力に血清コレステロールを低下させる (64,65)。臨床においても高脂血症患者において他のストロングスタチンに比し、安全に且つ強力に血清コレステロールを低下させる作用を示す (66, 67, 68)。

従来より粥状動脈硬化モデルとしては高コレステロール食誘発高コレステロール血症ウサギが使われている。最近では、血清コレステロール値や血圧あるいは心拍数がよりヒトに近いことから豚での粥状動脈硬化がよりヒトに近い病体を示すといわれている (69, 70)。しかし、豚は、体重が大きくその扱いに熟練が必要であり飼育施設も限られており、実験動物としては一般的に普及していないのが現状である。ウサギの場合0.3~1%のコレステロール含有食による飼育で血清コレステロール値が1,000~2,000 mg/dLまで上昇し、8~10週間で通常の粥状動脈硬化が形成される。しかし、この高コレステロール血症はヒトでの高脂血症よりはるかに高い値でありヒトへの外挿が困難である。そこで、今回私は、ヒトの高脂血症と同等の血清コレステロールで粥状動脈硬化を容易に形成するウサギモデルができれば、ヒトでの薬物の抗動脈硬化作用を外挿できると考え、本モデルの構築を試みピ

タバスタチンの作用を検証した。

ピタバスタチンは Watanabe heritable hyperlipidemic (WHHL) rabbits においては、0.5 mg/kg の飲水投与で血清トリグリセリドを低下させることが報告されている(71)。また、ピタバスタチンは WHHL rabbits において、内膜肥厚部での monocyte chemoattractant protein1 (MCP1)、 matrix metallo protease (MMP) 3 および MMP9 の発現を低下させることでプラーク安定化作用を有することが示唆されている (72)。Hayashi らは、卵巣摘出ウサギに 0.3% コレステロール食を負荷した高コレステロール血症でピタバスタチンが抗動脈硬化作用を示すことから、高コレステロール血症下での Nitric oxide (NO) が動脈内膜肥厚に何らかの関与をしていることを報告している (73)。このモデルでは、ホルモンの制御下において極度の高コレステロール血症を呈したピタバスタチンによる血清コレステロール低下作用が見られる。そのためピタバスタチンの粥状動脈硬化に対する作用がコレステロール低下に依存しない直接的な作用か否かは明確にはなっていない。実際のヒトでの高コレステロール血症患者での、ピタバスタチンの粥状動脈硬化に対する直接的作用を見るには、その病態形成の初期反応であるマクロファージ蓄積への作用を確かめる必要があり、そのためには、ヒトの粥状動脈硬化症に近い中程度の高コレステロール血症にて誘導した粥状動脈硬化モデルが必要と思われた。

L-NAME(12 mg/day)の持続的静脈投与により、0.5% コレステロール食負荷ウサギにおいて、単球の血管内皮への接着浸潤を促進することで早期に新生内膜肥厚を引き起こすことが報告されている(74)。しかし、一方では、Nakamuraらは、0.5% コレステロール食負荷ウサギに 8 ヶ月間L-NAMEを飲水投与したが大動脈および冠動脈内膜肥厚の増強は確認できなかった(75)。従って、このモデルでは、L-NAME水での飲水負荷では血管内皮での NOSの阻害に十分なL-ニトロアルギニン濃度に到達したにも関わらず血中NO₃濃度は低かった起因すると推察された。そこで、血清コレステロール値を適度に保ちつつ動脈にマクロファージの蓄積と泡沫化を誘導しうるモデルの構築には、L-NAME負荷と食餌性コレス

テロール負荷のバランスが重要と考えた。

今回、私は、ピタバスタチンを用い、ヒトでの病態に近い高コレステロール血症で、より短期間でヒトに近い粥状動脈硬化病巣を形成するモデルを開発し、ピタバスタチンの効果を証明した。すなわち、軽度のコレステロール添加食にて中等度の高コレステロール血症を誘導したウサギに食餌性に漸増法にて L-NAME を摂取させ、慢性的に NOS を阻害させることで、中程度高コレステロール血症でも短期間に泡沫化マクロファージの蓄積とコレステロールの蓄積を伴う粥状動脈硬化を作成することができる新しいモデルを考案し、その粥状動脈硬化に対してピタバスタチンが抑制作用を検証した。

2 節： 実験の方法と材料

(2-1) 動物および化合物

ニュージーランド白色ウサギ (雄、2~2.5 kg 体重) を北山ラベス株式会社より購入し通常食を自由摂取にて飼育、維持した。馴化飼育の後、耳介静脈より採血し、血清総コレステロールを測定し、各群の血清総コレステロールの平均が同等になるよう 8 匹ずつに分けた。コレステロール添加食 RC4 はオリエンタル酵母株式会社より購入した。

ピタバスタチンは日産化学工業株式会社小野田工場で製造され品質保証されたもの (Lot:104P9201) を使用した。アトルバスタチンはアステラス製薬より購入した。メバロノラクトン、ファルネソールおよびゲラニルゲラニオールはシグマアルドリッチから購入した。抗マクロファージ抗体 (RAM11) および、抗平滑筋細胞 β アクチン抗体 (HHF35) は DAKO より購入した。

(2-2) 動物実験

動物実験は日産化学工業株式会社生物科学研究所動物実験倫理規定に基づいて行った。

(2-2-1) L-NAME 添加、コレステロール食負荷動脈硬化モデルの作製とピタバスタチン投与

中程度高コレステロール血症により短期間にて泡沫化マクロファージ含有プラークを有する粥状動脈硬化ウサギの作製プロトコルを図3-1に示した。

雄のニュージーランド白色ウサギ (2.5~2.7 kg) 24羽を正常食にて馴化飼育した後、1%コレステロール含有食にて3日間飼育した。その後、L-NAME (シグマ-アルドリッチ) を添加した0.2% コレステロール含有食にて飼育した。L-NAMEの添加量は、0.075% から開始し、1週間かけて漸増法にて0.125%、0.175%に増加させ、その後、0.175%で維持した。L-NAME の負荷量は、0.075% L-NAME 食、0.125% L-NAME 食および0.175%で、各々約 30 mg/kg、約 50 mg/kgおよび 70 mg/kgに相当する。L-NAME 添加食の作製を以下に示す。L-NAME を最小限の精製水に溶解し、エタノールを添加して 70% エタノール溶液とする。この L-NAME の 70% エタノール溶液を所定の濃度になるようにコレステロール含有食 RC-4 に均一に噴霧した。その後 23~25 °Cにて暗所にて一晚自然乾燥させた後に使用した。餌は1日1回 100 gを与えた。1週間後に耳介静脈より血液サンプルを採取し、血清脂質を測定し、各群の血清TCが同等になるように、24羽を8羽ずつ3群に分け、薬物の投与を開始し、0.175% L-NAME、0.2% コレステロール含有食にて8週間飼育した。投与は、毎午前9時~10時に1日1回、ゴム製ゾンデにより強制経口投与にて行った。コントロール群には投与溶媒のみを投与した。

実験期間中の採血は図3-1に示したスケジュールで耳介静脈より行った。血液サンプルから血清を分離し、TCおよびTGを各々デタミナーTCII (協和メディックス) およびデタミナーTGII (協和メディックス) にて測定した。High-density lipoprotein (HDL) コレステロールはリンタングステン酸沈殿法 (和光純薬工業株式会社) にて測定した。実験最終日に、ペントバルビタール (ネンブタール) 麻酔下にて全採血により安楽死させ、大動脈を摘出した。弓部および胸部大動脈を用い解析を行った。弓部の基支部および辺遠部からは

病理組織染色を行った。

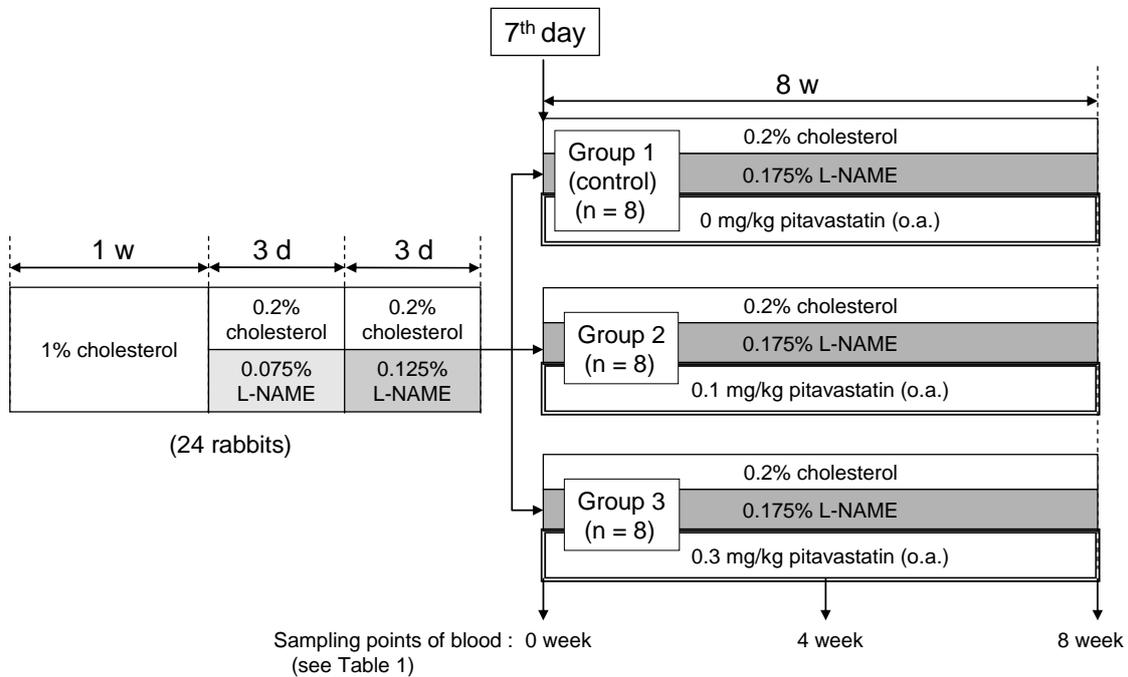


図3-1. Experimental schedule of cholesterol feeding and administration of L-NAME and pitavastatin. The feeding regimen of cholesterol chow and administration of L-NAME and pitavastatin is summarized. Rabbit were fed a cholesterol diet containing L-NAME and pitavastatin was given orally once a day. L-NAME, N ω -nitro-L-arginine methyl ester.

(2-2-2) 薬液と投与

薬物は投与溶媒 (0.5% カルボキシメチルセルロース溶液) に懸濁または溶解した。飼育期間中毎朝ウサギの体重を測定し、薬物投与液を1日1回午前中に給餌前にゴムゾンデにより強制経口投与した。ピタバスタチンの投与量は、0.1 および 0.3 mg/kg/day とした。

(2-2-3) 病理標本と免疫組織学的標本の作製

弓部および胸部大動脈ホルマリン切片からズダン III 染色による脂質染色を行い、脂質沈着面積を測定した。弓部大動脈ホルマリン固定クロスセクションのパラフィン包埋標本を用いて、ヘマトキシリン-エオジン (HE) 染色を行い、内膜肥厚面積を測定した。弓部

大動脈クロスセクションの脂質蓄積領域は、凍結切片のオイルレッド O 染色にて行った。弓部大動脈ホルマリン固定クロスセクションのパラフィン包埋標本を用いて、抗マクロファージ抗体 (RAM11) によるマクロファージ染色を、また、抗平滑筋細胞抗体 (HHF35) による平滑筋細胞染色を行った。各染色における陽性部位の面積の測定は画像解析装置 (Luzex 3U: ニコン) にて行った。

(2-3) リポ蛋白調製

ヒト血清由来 LDL を健常人ボランティアより得た血清から超遠心法にて $1.006 < d < 1.063$ 画分として調製した。すなわち、血清に 20% v/v の PBS を重層し 37,000 rpm にて 14~24 時間超遠心 (Beckman, Ti-3.5rotor) し、その上層に浮上した PBS 画分を除去し、下層を回収した。下層を KBr にて比重を 1.063 に調製し、KBr にて比重 1.063 に調製した PBS を重層し 40,000 rpm にて 24~36 時間超遠心 (Beckman, Ti-7.5rotor) し、その上層に浮上した画分を回収した。最後に PBS にて透析したのち、窒素気流下にて 4°C、暗所保存した。LDL のアセチル化は Basu らの方法 (76) に準じ、無水酢酸を用いた方法にて行った。LDL の酸化は、Douset らの方法 (77) に準じ、LDL 中に空気混入させ、ガラス管内にて 254 nm の紫外線を 1 cm 高から 2 時間照射することにより、使用直前に調製した。

(2-4) 内皮細胞への単球の接着と内皮細胞接着因子 cell-ELISA

ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC、クロンテック) は、ゲラチンコートした 48-well プラックプレートに 5% FBS 含有 EBM 培地 (Bio Whittaker Incorporated) にて単層にコンフルエントまで培養した後、10 ng/mL tumour necrosis factor- α (TNF- α) にて 8 時間培養し細胞接着試験に供した。TNF- α 刺激前、コンフルエント HUVEC をピタバスタチン含有培地にて 48 時間培養した。ヒト急性単核球白血病細胞 (THP-1、American Type of Cell Culture) は 10% FBS 含有 RPMI1640 で培養し接着試験に供した。THP-1 細胞培養液中に BCECF-AM

(10 mg/mL、和光) を添加して 30 分培養した後、余剰の BCECF-AM を洗浄除去し、BCECF-AM 標識細胞を 10% FBS 含有 RPMI1640 培地に再懸濁した。細胞数をコールターカウンターにて計測し、細胞密度が 10^6 cells/mL になるように調製し、その 0.2 ml (2×10^5 細胞) を TNF- α 刺激 HUVEC 培養細胞上に播種した。2 時間培養後、非接着 THP-1 細胞を洗浄除去し、接着した THP-1 細胞の蛍光を測定した (励起波長 : 485 \pm 20 nm、測定波長 : 530 \pm 25 nm)。細胞接着試験前にピタバスタチン含有培地にて 48 時間培養した。

また、HUVEC は、細胞接着試験の直前に、Rho キナーゼ阻害剤の Y-27632 (0.3~10 μ M) あるいは Toxin B (0.5 μ g/mL) にて 1 時間培養し TNF- α にて 8 時間培養し細胞接着試験に供した。一方、THP-1 細胞についても細胞接着試験の直前に Y-27632 (0.3~10 μ M) あるいは Toxin B (0.5 μ g/mL) にて 8 時間培養し細胞接着試験に供した。

HUVEC は TNF- α 処理 8 時間後に、抗ヒト ICAM1 抗体 (BBIG-I1, R&D system inc) および抗ヒト VCAM1 抗体 (BBIG-V1, R&D system inc) を用いた cell-ELISA 法にて細胞表面 ICAM1 および VCAM1 を測定した。

(2-5) マクロファージ泡沫化

RAW267.4 マウス腹腔内マクロファージ (American Type of Cell Culture) を 10% FBS 含有 DME 培地にて 12-well プレートにてコンフルエントまで培養した。細胞をピタバスタチン、シンバスタチンあるいはアトルバスタチン含有培地にて 48 時間培養し薬物前処理した。さらに、前処理時の濃度の薬物存在下に、酸化 LDL またはアセチル LDL の 200 コレステロール μ g/mL 含有培地にて 2 日間培養した。細胞を PBS で洗浄、回収し、コールターカウンターにて細胞数を計測した。細胞脂質を、4 倍量 (v/v) のヘキサン : イソプロパノール (2:1) にて抽出し、1% トライトン含有エタノールにて 96-well プレートに分注し、総コレステロール (TC) はデタミナー TCH にて、遊離コレステロール (FC) はデタミナー FC にて各々測定した。

(2-6) 統計処理

動物試験データは平均±SE、培養細胞試験データは平均±SDにて示した。統計処理はSASあるいはANOVAを用いたDunnettの多群間比較あるいはStudent's t-testにて行った。

3節 結果

(3-1) ウサギ血清脂質とピタバスタチンの影響

すべての群で毎日のL-NAME含有食摂取率はほぼ100%であり、各群の体重は群間で差異を認めなかった。コントロール群、ピタバスタチン0.1 mg/kg群およびピタバスタチン0.3 mg/kg群で、体重は投与前が、各々2.77 ± 0.05 kg、2.76 ± 0.05 kgおよび2.80 ± 0.05 kgで、試験終了時が、各々2.97 ± 0.08 kg、2.88 ± 0.06 kgおよび2.89 ± 0.08 kgであった。

ピタバスタチンの血清TC、TGおよびHDL-C値への影響を表3-1に示した。血清TCおよびTG値は試験開始時(0 week)には各群で差がないが、1%コレステロール食にて1週間飼育することで血清TCはおよそ700 mg/dLにまで上昇した。その後、L-NAME添加、0.2%コレステロール食にすることで、血清TCは徐々に下がり、4週間後には300~350 mg/dLで安定した。L-NAME添加、0.2%コレステロール、0.1%コロール酸含有食にてヒトの高脂血症と同等の中程度の高コレステロール血症(~350 mg/dL)が作成されることが確かめられた。また、L-NAME添加は血清TC値に影響を及ぼさないことが確かめられた。

ピタバスタチン投与により血清TC値に変動を認めなかったが、血清HDL-Cの若干の上昇傾向がピタバスタチン0.3 mg/kg群において示された。L-NAME添加食負荷後、コントロール群において試験開始時からの血清TGの上昇が認められた [13.08 ± 2.22 mg/dL

表3-1 Effect of pitavastatin on serum cholesterol, HDL-cholesterol and triglyceride levels

Groups	Total cholesterol (mg·mL ⁻¹)			HDL cholesterol (mg·mL ⁻¹)			Triglycerides (mg·mL ⁻¹)		
	0 week	4 weeks	8 weeks	0 week	4 weeks	8 weeks	0 week	4 weeks	8 weeks
Control	4.34 ± 0.49	3.73 ± 0.95	3.53 ± 1.03	0.25 ± 0.06	0.25 ± 0.09	0.24 ± 0.08	0.13 ± 0.02	0.48 ± 0.14	0.46 ± 0.10
Pitavastatin (0.1 mg·kg ⁻¹)	4.65 ± 0.66	2.97 ± 0.81	3.66 ± 0.62	0.26 ± 0.05	0.24 ± 0.08	0.24 ± 0.08	0.13 ± 0.04	0.25 ± 0.60	0.36 ± 0.10
Pitavastatin (0.3 mg·kg ⁻¹)	4.47 ± 0.60	3.33 ± 0.58	3.74 ± 0.56	0.25 ± 0.04	0.25 ± 0.06	0.28 ± 0.06	0.12 ± 0.02	0.21 ± 0.06	0.21 ± 0.03

* $P < 0.05$, significantly different from control (Dunnett's test).

Rabbits were treated as described in [Figure 1](#). Blood samples were collected before (0 week) and after the fourth week of pitavastatin administration, and the end of experimental period (8 weeks), as shown in [Figure 1](#). Each value represents mean \pm SE.

(0 週)、 47.98 ± 13.80 mg/dL (4 週)、 45.97 ± 9.69 mg/dL (8 週)] が血清 TC には変動が認められなかった。ピタバスタチン 0.3 mg/kg 群において、8 週目の血清 TG が 20.92 ± 3.37 mg/dL とコントロール群に比し低値を示した。

(3-2) コレステロール負荷、L-NAME 投与ウサギ粥状動脈硬化の作成

正常血清脂質において L-NAME のみを添加したとき、8 週間飼育時の大動脈内膜肥厚は、弓部大動脈において surface involvement (SI) で $0.33 \pm 0.13\%$ 、内膜肥厚部面積/中膜面積比 (intimal/medial ratio: I/M ratio) で 0.09 ± 0.03 であった。一方、0.3% コレステロール食負荷にて 8 週間飼育時の大動脈内膜肥厚は、弓部大動脈において SI で $55.4 \pm 19.6\%$ 、I/M ratio で 0.20 ± 0.07 であった。しかし、0.3% コレステロール食負荷では、血清コレステロールレベルを 800 mg/dL であり、ヒト高脂血症に比し高いものであった。

(3-3) コレステロール負荷、L-NAME 投与ウサギ粥状動脈硬化に対するピタバスタチンの影響

(3-2) の試験結果から、L-NAME 添加量をそのままに維持し、食餌中コレステロール含量を 0.2% まで減らしたモデルを検討した。図 3-2 に大動脈内膜肥厚の SI を示す。その結果、中程度の高コレステロール血症とともに内膜肥厚、すなわち、大動脈緒弓部 SI : $75.0 \pm 5.3\%$ 、胸部大動脈 S I : $16.5 \pm 3.9\%$ が形成された。このときの I/M ratio は、弓部大動脈で 0.30 ± 0.05 、胸部大動脈で 0.32 ± 0.12 であった (図 3-4 A and 4 B)。

弓部大動脈および胸部大動脈の SI を図 3-2 に示した。ピタバスタチンの投与により用量依存的な SI の低下が認められ、ピタバスタチン 0.3 mg/kg 投与においてはコントロール群に比し有意に低かった。コントロール群およびピタバスタチン 0.3 mg/kg 投与群の代表的な弓部大動脈基支部クロスセクションの HE 染色像を図 3-3 A および 3 B に示した。intima/media 比についてはピタバスタチン 0.3 mg/kg 投与群において、弓部大動脈基支部

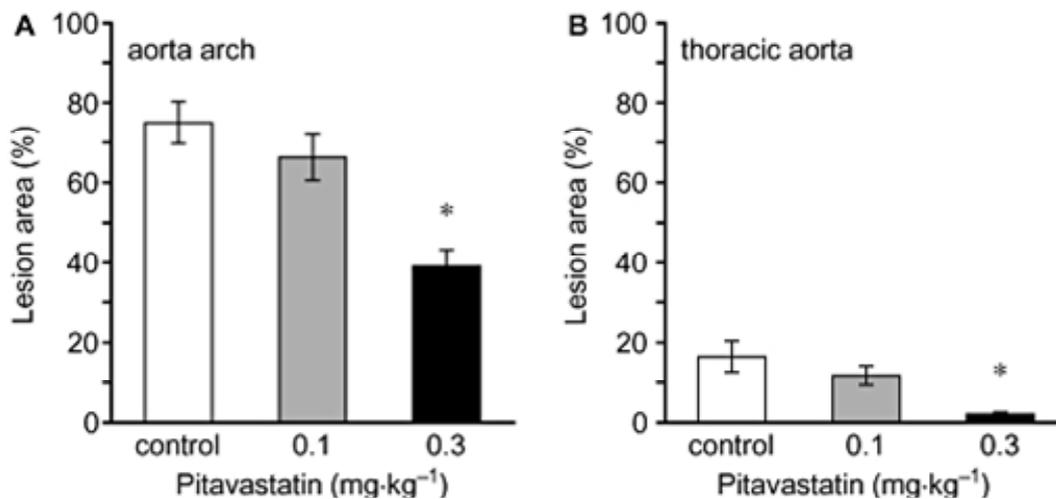


図3-2. Effect of pitavastatin on the area of atherosclerotic surface lesions in the aortic arch (A) and thoracic aorta (B). Rabbits were treated with 0.1 and 0.3 mg·kg⁻¹ pitavastatin once a day during the experimental period. The aortic arch and thoracic aorta were stained with Sudan III. Each column represents mean \pm SE. Asterisk (*) indicates significant difference from control at $P < 0.05$ by Dunnett's test.

(aortic arch) および弓部大動脈辺遠部 (thoracic aorta) とも低値であった (図 3-4 A および 4 D)。

コントロール群およびピタバスタチン 0.3 mg/kg 群の弓部大動脈基支部 (aortic arch) クロスセクションの Oil red O 染色、RAM11 染色および HHH35 染色の各像を図 3-3 に示した。コントロール群では、内膜肥厚部における Oil red O 染色および RAM11 染色による脂質蓄積とマクロファージ蓄積が観察され、とくに内腔側の fibrous cap での染色が強かった。脂質染色部位とマクロファージ染色部位は共通して認められた。平滑筋細胞 (HHF35) は主に中膜で認められ、内膜の深層部に一部観察された。ピタバスタチン投与群において内膜での脂質沈着とマクロファージ蓄積の減少が認められた (図 3-4)。Oil Red O 染色面積は、ピタバスタチンの 0.3 mg/kg 群で、弓部大動脈においては、コントロール群の $9.5 \pm 2.7\%$ から $3.3 \pm 1.6\%$ に、胸部大動脈においては、コントロール群の $16.7 \pm 3.5\%$ から $3.6 \pm 1.3\%$ に減少した。RAM11 染色面積は、ピタバスタチンの 0.3

mg/kg 群で、弓部大動脈においては、コントロール群の $4.0 \pm 1.8\%$ から $1.0 \pm 0.8\%$ に、胸部大動脈においては、コントロール群の $7.6 \pm 4.6\%$ から $0.9 \pm 0.4\%$ に減少した。内膜肥厚部での HHF35 染色は僅かであり面積測定の限界以下であった。これらの結果は、本モデルにおける動脈内膜肥厚がマクロファージの蓄積によるものであり平滑筋細胞の蓄積によるものではないことを示唆しているものと思われる。ピタバスタチンは、この内膜でのマクロファージの蓄積とコレステロールの沈着を阻害することで粥状動脈内膜肥厚を抑制しているものと推察された。そこで次に、ピタバスタチンの単球の血管内皮細胞への接着に及ぼす影響を見た。

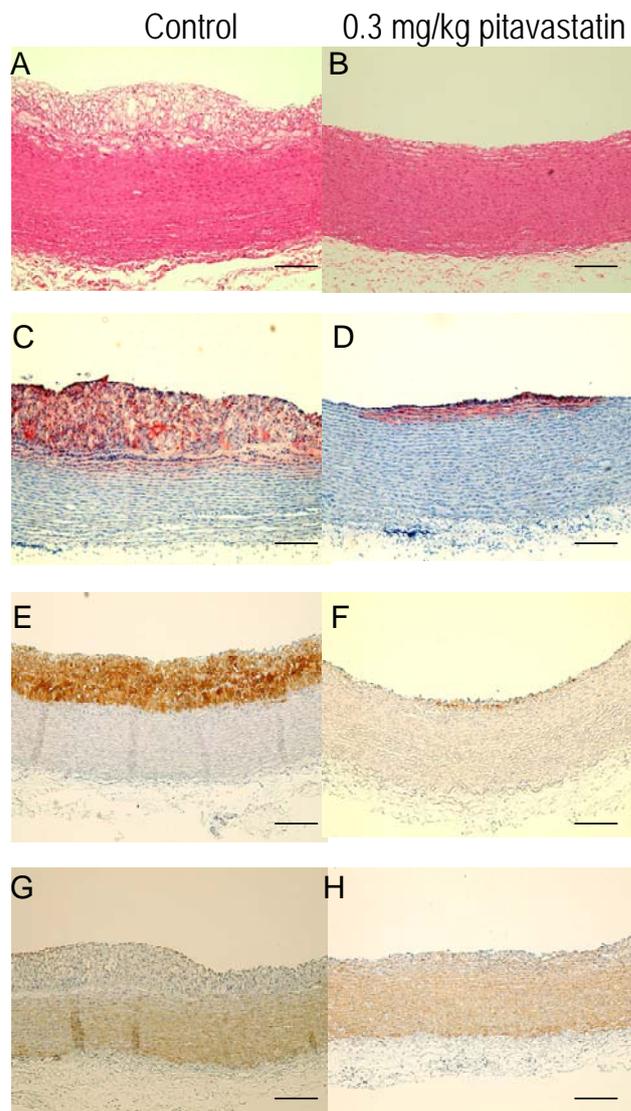


図3-3. Cross-sections from a typical aortic arch. Rabbits were treated as described in Figure 1. Panels A and B, H&E staining; panels C and D, Oil Red O staining; panels E and F, immunostaining using anti-macrophage antibody (RAM11); panels G and H, immunostaining using anti-smooth muscle actin antibody (HHF35). Panels A, C, E and G were control rabbits and panels B, D, F and H were pitavastatin (0.3 mg/kg)-treated rabbits. Bar denotes 200 μm in each photograph.

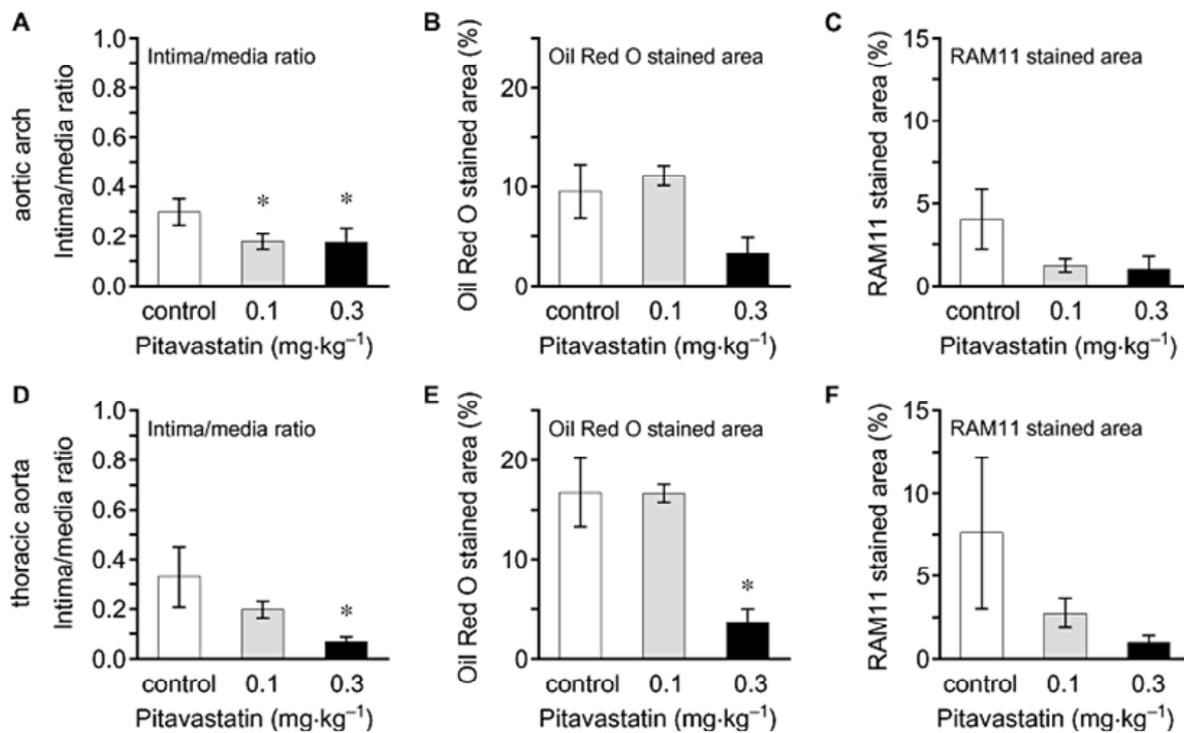


図3-4. Quantification of the atherosclerotic areas of cross-sections in the aortic arch and thoracic aorta. The ratio of intima/media was calculated by measurement of each area of H&E-stained cross-section using LUZEX. Quantitative analysis of areas of lipid deposition and macrophage content was performed in Oil Red O-stained cross-sections and RAM11-immunostained cross-sections by LUZEX respectively. Graphs A-C show the data from the aortic arch samples, and graphs D-F that from the thoracic aorta samples. A and D, ratio of intima/media; B and E, percentage of Oil Red O-stained area; C and F, percentage of RAM 11-stained area. Each column represents mean \pm SE. Asterisk (*) indicates significant difference from control at $P < 0.05$ by Dunnett's test.

(3-4) HUVEC への THP-1 細胞の接着に対するピタバスタチンの影響

ピタバスタチンが新生内膜においてマクロファージの接着浸潤を抑制しているか否かを検証する目的で、培養細胞を用いた、HUVEC への THP-1 細胞接着に対するピタバスタチンの影響を見た。TNF- α で刺激後の HUVEC への THP-1 細胞の接着をピタバスタチンは濃度依存的に抑制した (図 3-5 A) HUVEC 側をピタバスタチンで処理したときはピタバスタチンの最高濃度 (1,000 nM) においてのみ THP-1 細胞の接着が抑制されたが、THP-1 細胞側をピタバスタチンで処理したときは、ピタバスタチンの 100-300 nM で THP-1 細胞の接着が抑制された。HUVEC 細胞表面の接着因子発現へのピタバスタチンの作用を見たところ、HUVEC 細胞表面 ICAM-1 発現においては、ピタバスタチンの 0.2 μ M

での上昇と、2 μM での低下が認められ、一方、HUVEC 細胞表面 VCAM-1 については、

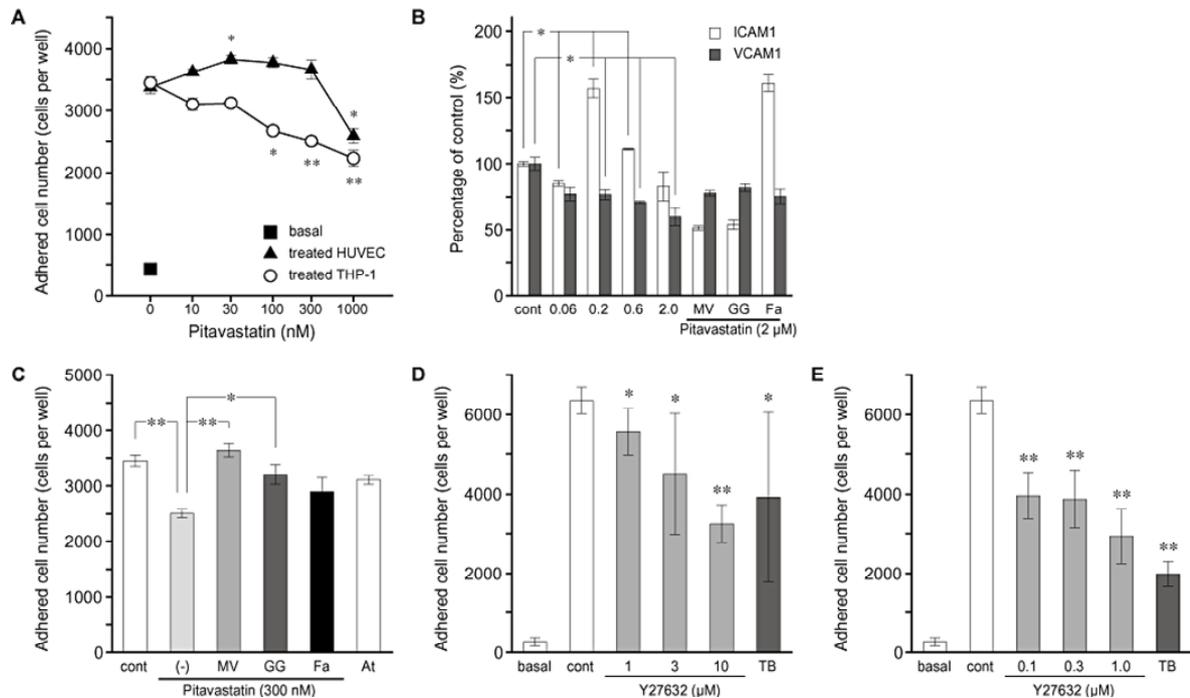


図3-5. Effect of pitavastatin on THP-1 monocyte adhesion to human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). (A) Dose-dependent manner of pitavastatin treatment. At the confluency of HUVEC culture, THP-1 cells or HUVECs were treated with pitavastatin for 48 h. HUVECs were treated with TNF- α (10 ng·mL⁻¹) for 8 h and THP-1 cells were labelled with BCECF-AM. THP-1 cells (2×10^5 cells per well) were loaded on HUVECs and incubated for 2 h. The square at the lower left of the Figure represents the number of untreated THP-1 cells adherent to untreated HUVEC. (B) Effect of pitavastatin on cell surface expression of ICAM-1 and VCAM-1 in HUVECs. HUVECs were treated with pitavastatin alone or combined with mevalonic acid lactone (MV, 100 μM), geranylgeraniol (GG, 15 μM) or farnesol (Fa, 15 μM) for 48 h. (C) Effect of MV, GG and Fa on THP-1 cell adhesion. HUVECs were treated with pitavastatin (300 nM) alone or combined with MV (100 μM), GG (15 μM) or Fa (15 μM) for 48 h. (D) Adhesion of THP-1 cells to HUVECs treated with Y-27632. HUVECs were treated with Y-27632 for 1 h before TNF- α treatment. (E) Adhesion of THP-1 cells treated with Y-27632 to HUVECs. THP-1 cells were treated with Y-27632 for 6 h before adhesion assays. Basal, number of THP-1 cells adherent to non-treated HUVEC; cont, control; At, atorvastatin (600 nM); TB, toxin B (0.15 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Each column or point represents mean \pm SD from a triplicate set of culture wells. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$, significant difference from control (Student's *t*-test). HUVECs, human umbilical vein endothelial cells.

ピタバスタチンの低濃度から高濃度で濃度依存的な低下が認められた(図3-5B)。THP-1細胞をピタバスタチン存在下でメバロン酸あるいはゲラニルゲラニオールを同時に処理すると、THP-1細胞のHUVECへの接着は未処理(コントロール)と同等であり、ピタバスタチンの抑制作用は完全に消失した(図3-5C)。しかし、ピタバスタチン存在下にファルネソールを同時に処理すると、THP-1細胞のHUVECへの接着は、完全には未処理

(コントロール) のレベルには戻らなかった (図 3-5 C)。アトルバスタチンにおいても、有意ではなかったが、600 nM の濃度で THP-1 細胞の HUVEC への接着の抑制傾向が認められた (図 3-5 C)。Rho-dependent kinase 阻害剤である Y-27632 および Toxin B を THP-1 細胞および HUVEC に処理したところ、HUVEC を処理した場合においてのみ THP-1 細胞の HUVEC への接着の抑制が認められ、THP-1 細胞を処理したときには抑制は認められなかった (図 3-5 D、5 E)。

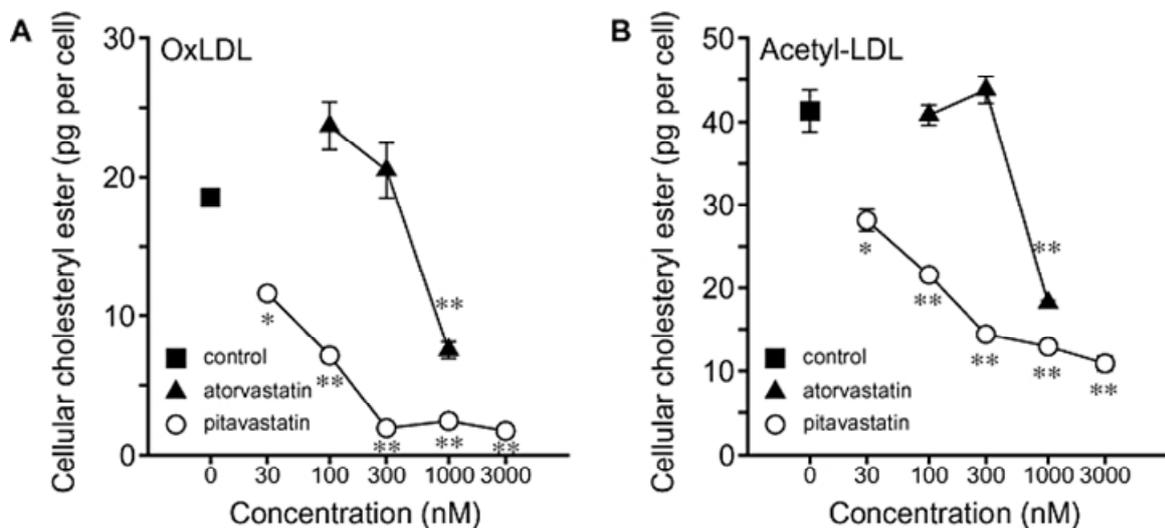


図3-6. Effect of pitavastatin on cholesteryl ester content of RAW264.7 macrophages. RAW264.7 cells were treated with pitavastatin or atorvastatin for 48 h, then cells were treated with oxidized human plasma LDL (A) or acetylated human plasma LDL (B) for 48 h. Preparation of oxidized LDL and acetylated LDL is described in the *Methods*. The squares on the left of the Figures represent the levels of cholesteryl ester in RAW264.7 macrophages, without statin, on incubation with oxidized LDL (A) or acetylated LDL (B). Each point represents mean \pm SD from a triplicate set of culture wells. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$, significant difference from control [or pitavastatin (-)] (Dunnett's test). LDL, low-density lipoprotein.

(3-5) マクロファージ泡沫化に対するピタバスタチンの影響

ピタバスタチンのRAW264.7 マウス腹腔内マクロファージ泡沫化に対する作用を図 3-6 に示した。ピタバスタチンはRAW264.7 マクロファージの酸化LDLによる細胞内コレステロールエステル蓄積 (泡沫化) を濃度依存的に抑制し、その IC_{50} は 56.3 nMであった。この作用はアセチル化LDLによる細胞内コレステロールエステル蓄積 (泡沫化) 抑制作用

(IC₅₀ : 116 nM) より強かった。また、ピタバスタチンの抑制作用はアトルバスタチンの作用 (酸化LDLでのIC₅₀ : 826 nM、アセチル化LDLでのIC₅₀ : 880 nM) より強いものであった。酸化LDLおよびアセチル化LDLでのマクロファージ泡沫化に対するピタバスタチンの抑制作用はメバロン酸の添加により完全に消失した (表3-2)。酸化LDLにおいては、ピタバスタチンの抑制作用はファルネソールにより約 50% が消失したが、ゲラニルゲラニオールの添加ではその抑制作用の 11% 程度しか消失しなかった。一方、アセチル化LDLでは、ファルネソールあるいはゲラニルゲラニオールの添加で、いずれも 20% 程度の消失であった。

4節 考察

今回、私は、ウサギにおいて食餌性に L-NAME を摂取させ慢性的に NOS を阻害させることで、中程度高コレステロール血症でも短期間に粥状動脈硬化を作成することができる新しいモデルを考案し、その粥状動脈硬化に対するピタバスタチンの作用を見たところ、このモデルでの粥状動脈硬化内膜肥厚がマクロファージの蓄積と泡沫化によるものであり、ピタバスタチンはマクロファージの蓄積と泡沫を抑制することで抗粥状動脈硬化作用を示すことを認めた。

L-NAME を用いた動脈硬化モデル作成に関して、私は、L-NAME が負荷されるタイミングを考慮して、飲水時ではなく摂餌時に変更し、L-NAME を混餌にて投与した。その結果、コレステロール負荷の低い高コレステロール血症下において、食餌性に L-NAME を漸増的に負荷していくことで、ヒトの高コレステロール血症患者に近い粥状動脈硬化を作成することを考案し、8週間で粥状動脈硬化を作成することに成功した。

長期間の L-NAME 投与により血清 TC の変動はなかったが血清 TG の上昇が認められた (表3-1)。また、ピタバスタチンの投与は血清コレステロール値の低下は示さなかつ

表3-2. Effect of mevalonic acid lactone (mevalonolactone), geranylgeraniol or farnesol on the inhibition by pitavastatin of the accumulation of cholesteryl esters in RAW macrophages

	Cellular cholesteryl ester (pg per cell)	
	Oxidized LDL	Acetylated LDL
Control	18.5 ± 0.6	41.3 ± 2.5
Pitavastatin (300 nM) + none	1.7 ± 0.4	10.9 ± 0.9
Pitavastatin (300 nM) + mevalonolactone 50 μM	23.0 ± 1.2	48.1 ± 2.2
Pitavastatin (300 nM) + geranylgeraniol 15 μM	3.6 ± 0.3	17.5 ± 0.1
Pitavastatin (300 nM) + farnesol 15 μM	9.9 ± 1.2	17.0 ± 0.8

* $P < 0.01$ significantly different from control; Dunnett's test.

Treatment of RAW264.7 cells and measurement of lipids were carried out as described in [Figure 6](#). Mevalonic acid lactone (mevalonolactone), geranylgeraniol or farnesol was added in combination with 300 nM pitavastatin.

LDL, low-density lipoprotein.

たが、L-NAME 負荷で上昇した血清 TG の低下が認められた。血清 TG の L-NAME による上昇は、慢性的な NOS の阻害が、肝臓でのカルニチン-パルミトイル CoA トランスフェラーゼ (CPT) 活性を抑制し、その結果血清 TG が上昇したものと考えられる (78, 79)。ピタバスタチンがいくつかの実験動物で抗 TG 血症作用を示すことが報告されており (41, 65, 71, 80)、ピタバスタチンの血清 TG 低下作用の機序としては超低比重リポ蛋白 (VLDL) の肝臓からの分泌抑制と小腸でのミクロソーム TG 転送蛋白 (MTP) 活性の抑制と推察されている (65, 81, 82)。これらのことから、ウサギにおいて、慢性的な NOS の阻害が、肝臓での CPT を抑制し肝臓での TG 合成を亢進させるとともに VLDL の分泌とを亢進させ、小腸での MTP 活性を増強したと考えられる。そして、ピタバスタチンによる血清 TG の上昇抑制は、ピタバスタチンがこれらの L-NAME 誘導性変化に対し対抗した結果と考えられる。

今回、慢性的 NOS 阻害による粥状動脈硬化に対するピタバスタチンの抑制作用が認められた。これまでに、スタチン類が HUVEC において Rho 活性の抑制介して内皮 NOS (eNOS) の mRNA 発現を増加させ (83, 84) 内皮細胞での eNOS 産生を増加させること (85, 86, 87) が報告されている。今回の慢性的 NOS 阻害粥状動脈硬化モデルにおいて、ピタバスタチンが、動脈内皮での eNOS 発現の増加を介して、血管壁での L-NAME の作用を打ち消していることが考えられる。とはいうものの、実際にピタバスタチンが L-NAME 負荷ウサギにおいて血管の eNOS 発現を上昇させ血管トーンスを改善しているかは今後の検討課題である。麻酔下での大腿動脈カニューレーションにより、血圧を測定したところ L-NAME 負荷あるいはピタバスタチン投与による血圧の変動は確認されなかった (未公開データ)。ウサギ摘出血管のリング標本を用いた検討では、アセチルコリンによる収縮に対してピタバスタチンは 10 μ M で約 20 % 抑制したが 3 μ M 以下では抑制作用を示さなかった (未公開データ)。今回のウサギでのピタバスタチンの血中濃度は、これまでのいくつかの動物試験 (88, 89, 90) から換算すると、nM オーダーと推定され、血管収縮に対する作用が出

るには不十分であったと考える。

慢性的な NOS の阻害は血管内皮の接着因子の他付言を上昇させることが知られている (51)。スタチンは、HUVEC と THP-1 細胞あるいはヒト CD14 (+) 単球を用いた実験にて、血管内皮細胞への単球の接着を抑制することが報告されている (91, 92, 93, 94)。ピタバスタチンで処理した THP-1 細胞の HUVEC への接着細胞数が顕著に減少したのに対し、ピタバスタチンで処理した HUVEC への THP-1 細胞の数は減少しなかった。ピタバスタチンによる粥状動脈硬化病変へのマクロファージ蓄積量の減少は、ピタバスタチンが単球の接着能を低下させることで単球の内皮への接着を低下させたことによるものと推察される。ピタバスタチンの THP-1 細胞接着抑制作用がメバロン酸の添加あるいはゲラニルゲラニオール添加によって消失したことは THP-1 細胞の接着への抑制作用が HMG-CoA 還元酵素阻害をかしたイソプレノイド産生阻害作用を介したものであることを示唆している。内皮細胞への単球の接着においてスタチンが Rho G 蛋白の不活性化を介して、単球あるいは内皮細胞上の接着因子の発現を抑制していると報告されている (95, 96, 97)。今回、Rho kinase 阻害剤である Y-27632 あるいは rho kinase pathway を阻害する Toxin B が THP-1 細胞の内皮細胞への接着を抑制することから (図 3-7)、今回の試験においても単球と内皮細胞の接着には Rho/Rho kinase 経路が関与していることが推察され、ピタバスタチンが、その経路を阻害している可能性が示唆された。これらの事実はピタバスタチンが、高コレステロール血症において Rho G 蛋白の不活性化を介し、循環中の単球および血管内皮細胞の細胞表面への細胞接着因子の発現を抑制していることを示唆している。Razai-Majd らは高コレステロール血症患者において循環中単球および内皮細胞での接着因子がスタチン治療により減少することを報告しており、今回の結果はこの知見を支持するものである (98, 99)。さらに、今回は、ピタバスタチンの内皮細胞表面の ICAM-1 および VCAM-1 の抑制は、高濃度において認められ、高濃度での THP-1 細胞の内皮細胞への接着の低下は、内皮細胞表面へのこれらの接着因子の発現抑制によるものと思われる。高濃度スタチンが内皮細胞表面

の ICAM-A および VCAM-1 発現を抑制することはいくつかの他のスタチンでも報告されている(97, 100, 101)。

ピタバスタチンは RAW264.7 マウス腹腔内マクロファージにけるアセチル化 LDL あるいは酸化 LDL によるコレステロールエステル蓄積を抑制した。この作用は、アセチル化 LDL による泡沫化より酸化 LDL による泡沫化において、低濃度から認められ効果が強かった。従来より、ロバスタチンは高濃度処理においてヒト単球由来マクロファージのタイプ AI スカベンジャー受容体 (SR-AI) および CD36 の mRNA 発現を抑制し酸化 LDL によるコレステロールエステル蓄積を抑制することが報告されている(102, 103)。ピタバスタチンにおいても RAW264.7マクロファージの CD36 mRNA および SR-AI mRNA 発現が低下することが認めており、高濃度では、これらの発現抑制がマクロファージ内コレステロールエステル蓄積抑制に寄与しているかもしれない（非公開データ）。メバロン酸の添加によりピタバスタチンの高濃度での抑制作用が消失した（表 3-2）。このことは、RAW264.7 マクロファージにおけるピタバスタチンの高濃度での細胞内コレステロールエステル蓄積抑制作用が、HMG-CoA 還元酵素阻害作用による作用であることが示唆される。またゲラニルゲラニオールの添加ではピタバスタチンの作用の消失は不完全であることから、RAW264.7 マクロファージにおけるピタバスタチンの作用の一部は、イソプレノイド合成抑制とは独立した作用機序によることを示唆している。RAW264.7 マクロファージにおける酸化 LDL によるコレステロールエステル蓄積に対するピタバスタチンの作用がファルネソールの添加によりゲラニルゲラニオールよりも強く抑制された。血管平滑筋細胞では、酸化 LDL 刺激時の細胞遊走がゲラニルゲラニルピロリン酸ではなくファルネシルピロリン酸の添加でより強く促進されることが報告されている (104)。RAW264.7 マクロファージの酸化 LDL によるコレステロールエステル蓄積には、ゲラニルゲラニル化される G 蛋白よりもファルネシル化される G 蛋白がより強く関与していることが推測される (see Figure 7) (105)。

第1章において、ピタバスタチンがウサギのBCI血管内膜肥厚を顕著に抑制することを示し、この作用が血管平滑筋細胞の内膜での増殖抑制によることを示した(106)。一般的にスタチンは抗炎症作用により、そのコレステロール低下作用とは独立して angiotensin II によって惹起される血管リモデリングを抑制することが報告されている(84)。また、ピタバスタチンはカルシウム依存性カリウムチャンネルの活性化を抑制し慢性的 NOS 阻害による血管リモデリングを抑制することが報告されている (86)。また、ピタバスタチンは平滑筋細胞へ作用する濃度域(106)で血管内皮細胞の接着因子発現を抑制する。これまでスタチンの多面的作用として種々の抗動脈硬化作用に関連する作用が報告されてきている(図2-7 (105, 107, 108))。

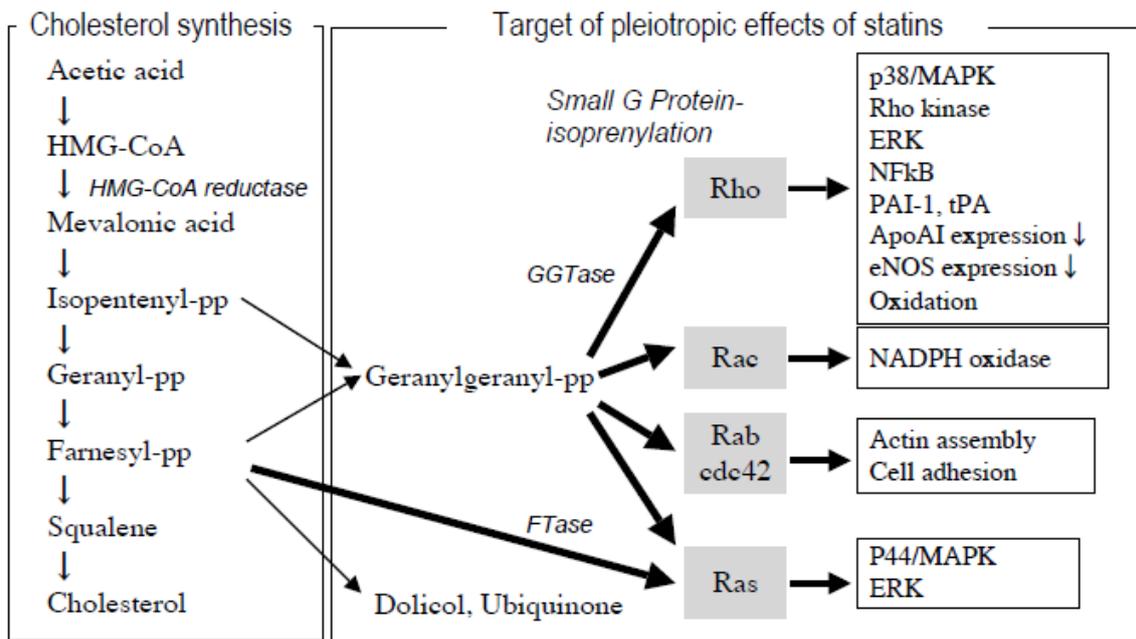


図3-7. The mevalonate pathway and the pleiotropic effects of statins. Statins exert pleiotropic effects, via the inhibition of HMG-CoA reductase. This figure was summarized from previous reports (105, 107, 108)

これまで報告されてきているスタチンの多面的作用は、そのほとんどは薬理的濃度の10～100倍高い濃度であり実効性にはなお議論が必要である。ピタバスタチンの血管平滑筋細胞や血管内皮細胞への作用においても薬理的濃度の10～100倍高い濃度での作用であ

り、マクロファージへの作用の10～100倍高い濃度での作用であった。このことは、ピタバスタチンが実際の臨床使用の場において、その薬理学的濃度で、平滑筋細胞や内皮細胞へは作用することなく、単球あるいはマクロファージへ作用して抗動脈硬化作用を発揮しうることを示唆している。

第3章では、ピタバスタチンがTHP-1の内皮への接着とRAW264.7マクロファージの泡沫化抑制作用が、薬理学的な濃度域で認められ、実際の生体内での作用は、マクロファージへの作用による抗炎症作用と泡沫化抑制作用が発揮された結果と思われる。スタチンは多面的作用として多くの抗動脈硬化作用に関連する細胞機能制御作用を有することが報告されてきているが、このことは、ピタバスタチンが単球/マクロファージ細胞により選択的に作用し、血管内膜の炎症部位への単球の浸潤とマクロファージの泡沫化を効果的に抑制しうることを示唆している。Suzukiらはピタバスタチンを用いWHHLウサギ粥状動脈硬化においてMMP産生を抑制そして、このことは、動脈硬化内膜肥後部のプラークを安定化へ導き、冠動脈疾患発症を抑制する一因となりうる作用と期待される。

総括

今回の研究から、ピタバスタチンがウサギおよびラットにおいて、低用量で抗動脈硬化作用を示すことが明らかとなった。その機序としては、ピタバスタチンが、平滑筋細胞においては、細胞増殖を抑制することなくフィブロネクチンの産生と糖尿病状態で誘導されるオステオポンチン発現を抑制し、単球マクロファージにおいては、臨床使用時の血中濃度付近において単球の血管内皮細胞への接着と酸化LDLによる泡沫化を抑制することが明らかとなった。ピタバスタチンは臨床では1-2 mg/bodyで使用されており、アトルバスタチンの10 mgと比較しても安全でかつ強力な薬効を示す(LIVALO effectiveness and safety (LIVES) Study)(109)。ピタバスタチンとアトルバスタチンの臨床での7日間服薬時の血中濃度は67.5 nMおよび9.3 nMであり、今回の研究から、ピタバスタチンの臨床での血中濃度はマクロファージへの作用が可能な濃度であり、臨床においても十分マクロファージでの今回のコレステロールエステル減少作用が発揮されうるものと推測される。実際、ピタバスタチン投与による内膜肥厚抑制効果が日本人を対象にした大規模臨床試験、JAPA-ACS study (108)で確認されており、ウサギにおけるL-NAME負荷実験的動脈硬化症において低用量のピタバスタチンが内膜肥厚を抑制することも本稿第3章で確認している。

スタチンはそのHMG-CoA還元酵素阻害によるイソプレノイド合成阻害作用に基づく低分子量G蛋白の機能抑制を介し、様々な多面的作用を有することが報告されてきている。血管平滑筋細胞におけるフィブロネクチン産生抑制作用とオステオポンチン産生抑制作用は、今回、新たに見出された多面的作用である。その作用はこれまでの多面的作用より低濃度で発現することから、実際の臨床における抗動脈硬化作用の機序の一部と考えられる。

マクロファージにおける低濃度でのコレステロールエステル蓄積抑制は、メバロン酸経路を介さないこれまでのスタチンにはないユニークな作用であり、本薬剤の臨床での有用性を証明するとともに、この作用機序の解明は、今後のマクロファージ脱泡沫化による動

脈硬化症の治療と冠動脈疾患の効果的な抑制の新たな戦略を構築するターゲットを提供
してくれるものであり、今後更なる研究に発展することと信じてやまない。

参考文献

- (1) Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis--an update. *N Engl J Med.* 1986; 314: 488-500.
- (2) Clowes AW, Schwartz SM. Significance of quiescent smooth muscle migration in the injured rat carotid artery. *Circ Res.* 1985; 56: 139-45.
- (3) Clowes AW, Reidy MA, Clowes MM. Kinetics of cellular proliferation after arterial injury. I. Smooth muscle growth in the absence of endothelium. *Lab Invest.* 1983; 49: 327-33.
- (4) Schwartz SM, Campbell GR, Campbell JH. Replication of smooth muscle cells in vascular disease. *Circ Res.* 1986; 58: 427-44.
- (5) Austin GE, Ratliff NB, Hollman J, Tabei S, Phillips DF. Intimal proliferation of smooth muscle cells as an explanation for recurrent coronary artery stenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol.* 1985; 6: 369-75.
- (6) Steele PM, Chesebro JH, Stanson AW, Holmes DR Jr, Dewanjee MK, Badimon L, Fuster V. Balloon angioplasty. Natural history of the pathophysiological response to injury in a pig model. *Circ Res.* 1985; 57: 105-12.
- (7) Reidy MA. A reassessment of endothelial injury and arterial lesion formation. *Lab Invest.* 1985; 53: 513-20.
- (8) Erickson LA, Bonin PD, Wishka DG, Morris J, Dalga RJ, Williams DJ, Wilson GJ, Hoover JL, Simmons CA, Humphrey SJ, Shebuski RJ. In vitro and in vivo inhibition of rat vascular smooth muscle cell migration and proliferation by a 2-aminochromone U-86983. *J Pharmacol Exp Ther.* 1994; 271: 415-21.
- (9) Morishita R, Gibbons GH, Ellison KE, Nakajima M, Zhang L, Kaneda Y, Ogihara T, Dzau VJ. Single intraluminal delivery of antisense cdc2 kinase and proliferating-cell nuclear antigen oligonucleotides results in chronic inhibition of neointimal hyperplasia. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; 90: 8474-8.

- (10) Hidaka Y, Eda T, Yonemoto M, Kamei T. Inhibition of cultured vascular smooth muscle cell migration by simvastatin (MK-733). *Atherosclerosis*. 1992; 95: 87-94.
- (11) Habenicht AJ, Glomset JA, Ross R. Relation of cholesterol and mevalonic acid to the cell cycle in smooth muscle and swiss 3T3 cells stimulated to divide by platelet-derived growth factor. *J Biol Chem*. 1980; 255: 5134-40.
- (12) Soma MR, Donetti E, Parolini C, Mazzini G, Ferrari C, Fumagalli R, Paoletti R. HMG CoA reductase inhibitors. In vivo effects on carotid intimal thickening in normocholesterolemic rabbits. *Arterioscler Thromb*. 1993; 13: 571-8.
- (13) Gellman J, Ezekowitz MD, Sarembock IJ, Azrin MA, Nochomowitz LE, Lerner E, Haudenschild CC. Effect of lovastatin on intimal hyperplasia after balloon angioplasty: a study in an atherosclerotic hypercholesterolemic rabbit. *J Am Coll Cardiol*. 1991; 17: 251-9.
- (14) Liptay MJ, Parks WC, Mecham RP, Roby J, Kaiser LR, Cooper JD, Botney MD. Neointimal macrophages colocalize with extracellular matrix gene expression in human atherosclerotic pulmonary arteries. *J Clin Invest*. 1993; 91: 588-94.
- (15) van Zanten GH, de Graaf S, Slootweg PJ, Heijnen HF, Connolly TM, de Groot PG, Sixma JJ. Increased platelet deposition on atherosclerotic coronary arteries. *J Clin Invest*. 1994; 93: 615-32.
- (16) Yamamoto M, Yamamoto K, Noumura T. Type I collagen promotes modulation of cultured rabbit arterial smooth muscle cells from a contractile to a synthetic phenotype. *Exp Cell Res*. 1993; 204: 121-9.
- (17) Hedin U, Bottger BA, Forsberg E, Johansson S, Thyberg J. Diverse effects of fibronectin and laminin on phenotypic properties of cultured arterial smooth muscle cells. *J Cell Biol*. 1988; 107: 307-19.
- (18) DiMilla PA, Stone JA, Quinn JA, Albelda SM, Lauffenburger DA. Maximal migration of

- human smooth muscle cells on fibronectin and type IV collagen occurs at an intermediate attachment strength. *J Cell Biol.* 1993; 122: 729-37.
- (19) Newman SL, Tucci MA. Regulation of human monocyte/macrophage function by extracellular matrix. Adherence of monocytes to collagen matrices enhances phagocytosis of opsonized bacteria by activation of complement receptors and enhancement of Fc receptor function. *J Clin Invest.* 1990; 86: 703-14.
- (20) Aoki T, Nishimura H, Nakagawa S, Kojima J, Suzuki H, Tamaki T, Wada Y, Yokoo N, Sato F, Kimata H, Kitahara M, Toyoda K, Sakashita M, Saito Y. Pharmacological profile of a novel synthetic inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *Arzneimittelforschung.* 1997; 47: 904-9.
- (21) Kissane JM, Robins E. The fluorometric measurement of deoxyribonucleic acid in animal tissues with special reference to the central nervous system. *J Biol Chem.* 1958; 233: 184-8.
- (22) Bilder GE, Kasiewski CJ, Costello RJ, Hodge TG, Perrone MH. Electrode cuff-induced changes in DNA and PDGF gene expression in the rat carotid artery. *Atherosclerosis.* 1993; 100: 103-12.
- (23) Hanke H, Strohschneider T, Oberhoff M, Betz E, Karsch KR. Time course of smooth muscle cell proliferation in the intima and media of arteries following experimental angioplasty. *Circ Res.* 1990; 67: 651-9.
- (24) Fisher-Dzoga K, Jones RM, Vesselinovitch D, Wissler RW. Ultrastructural and immunohistochemical studies of primary cultures of aortic medial cells. *Exp Mol Pathol.* 1973; 18: 162-76.
- (25) Björkerud S, Björkerud B. Lipoproteins are major and primary mitogens and growth promoters for human arterial smooth muscle cells and lung fibroblasts in vitro. *Arterioscler Thromb.* 1994; 14: 288-98.

- (26) Kimura I, Naitoh T, Okabe M, Kimura M. Platelet-derived growth factor (PDGF) accelerates induction of competence, and heparin does not inhibit PDGF-induced competence in primary cultured smooth muscle cells of rat aorta. *Jpn J Pharmacol.* 1992; 59: 51-6.
- (27) Holmes DR Jr, Vlietstra RE, Smith HC, Vetrovec GW, Kent KM, Cowley MJ, Faxon DP, Gruentzig AR, Kelsey SF, Detre KM, Van Raden MJ, Mock MB. Restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty (PTCA): a report from the PTCA Registry of the National Heart, Lung, and Blood Institute. *Am J Cardiol.* 1984; 53: 77C-81C.
- (28) Serruys PW, Luijten HE, Beatt KJ, Geuskens R, de Feyter PJ, van den Brand M, Reiber JH, ten Katen HJ, van Es GA, Hugenholtz PG. Incidence of restenosis after successful coronary angioplasty: a time-related phenomenon. A quantitative angiographic study in 342 consecutive patients at 1, 2, 3, and 4 months. *Circulation.* 1988; 77: 361-71.
- (29) Powell JS, Clozel JP, Müller RK, Kuhn H, Hefti F, Hosang M, Baumgartner HR. Inhibitors of angiotensin-converting enzyme prevent myointimal proliferation after vascular injury. *Science.* 1989; 245: 186-8.
- (30) Lindner V, Reidy MA. Proliferation of smooth muscle cells after vascular injury is inhibited by an antibody against basic fibroblast growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991; 88: 3739-43.
- (31) Bando T, Mitani H, Niihashi M, Kusumi Y, Ishikawa J, Kimura M, Totsuka T, Sakurai I, Hayashi S. Inhibitory effect of fluvastatin at doses insufficient to lower serum lipids on the catheter-induced thickening of intima in rabbit femoral artery. *Eur J Pharmacol.* 1996; 315: 37-42.
- (32) Jawien A, Bowen-Pope DF, Lindner V, Schwartz SM, Clowes AW. Platelet-derived growth factor promotes smooth muscle migration and intimal thickening in a rat model of balloon angioplasty. *J Clin Invest.* 1992; 89: 507-11.

- (33) Leonard S, Beck L, Sinensky M. Inhibition of isoprenoid biosynthesis and the post-translational modification of pro-p21. *J Biol Chem.* 1990; 265: 5157-60.
- (34) Igarashi M, Takeda Y, Mori S, Ishibashi N, Komatsu E, Takahashi K, Fuse T, Yamamura M, Kubo K, Sugiyama Y, Saito Y. Suppression of neointimal thickening by a newly developed HMG-CoA reductase inhibitor, BAYw6228, and its inhibitory effect on vascular smooth muscle cell growth. *Br J Pharmacol.* 1997; 120: 1172-8.
- (35) Tsujita Y, Kuroda M, Shimada Y, Tanzawa K, Arai M, Kaneko I, Tanaka M, Masuda H, Tarumi C, Watanabe Y, Fujii S. CS-514, a competitive inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase: tissue-selective inhibition of sterol synthesis and hypolipidemic effect on various animal species. *Biochim Biophys Acta.* 1986; 877: 50-60.
- (36) Scott WA. Hydrophilicity and the differential pharmacology of pravastatin. 1990; *Round Table Series; Royal Soc Med Services.* 16, 17-25
- (37) Massagu J. The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol.* 1990; 6: 597-641.
- (38) Kanzaki T, Tamura K, Takahashi K, Saito Y, Akikusa B, Oohashi H, Kasayuki N, Ueda M, Morisaki N. In vivo effect of TGF- beta 1. Enhanced intimal thickening by administration of TGF- beta 1 in rabbit arteries injured with a balloon catheter. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995; 15: 1951-7.
- (39) Grainger DJ, Kemp PR, Liu AC, Lawn RM, Metcalfe JC. Activation of transforming growth factor-beta is inhibited in transgenic apolipoprotein(a) mice. *Nature.* 1994; 370: 460-2.
- (40) Macdonald TM, Butler R, Newton RW, Morris AD. Which drugs benefit diabetic patients for secondary prevention of myocardial infarction? DARTS/MEMO Collaboration. *Diabetic Med.* 1998; 15: 282-9.
- (41) Rosenson R. S., Tangney C. Antiatherothrombotic properties of statins. *JAMA.* 1998; 279: 1643-50

- (42) Buter WT. The nature and significance of osteopontin. *Connect Tissue Res.* 1989; 23: 123-36.
- (43) Shanahan CM, Cary NR, Metcalfe JC, Weissberg PL. High expression of genes for calcification-regulating proteins in human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest.* 1994; 93: 2393-402.
- (44) Liaw L, Lombardi DM, Almeida MM, Schwartz SM, Deblois D, Giachelli CM. Neutralizing antibodies directed against osteopontin inhibit rat carotid neointimal thickening after endothelial denudation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997; 17: 188-93.
- (45) Takemoto M, Yokote K, Nishimura M, Shigematsu T, Hasegawa A T, Kon S, Uede T, Matsumoto T, Saito Y, Mori S. Enhanced expression of osteopontin in human diabetic artery and analysis of its functional role in accelerated atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20: 624-8.
- (46) Takemoto M, Yokote K, Yamazaki M, Ridalla L, Butler WT, Matsumoto T, Tamura K, Saito Y, Mori S. Enhanced expression of osteopontin by high glucose in cultured rat aortic smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999; 258: 722-6.
- (47) Nishimura M, Tanaka T, Yasuda T, Kurakata S, Kitagawa M, Yamada K, Saito Y, Hirai A. Collagen secretion and growth of mesangial cells require geranylgeranylpyrophosphate. *Kidney Int.* 1999; 55: 520-8.
- (48) Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest.* 1955; 34: 1345-53.
- (49) Morisaki N, Takahashi K, Shiina R, Zenibayashi M, Otabe M, Yoshida S, Saito Y. Platelet-derived growth factor is a potent stimulator of expression of intercellular adhesion molecule-1 in human arterial smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994; 200: 612-8.
- (50) Kanzaki T, Ishikawa Y, Morisaki N, Shirai K, Saito Y, Yoshida S. Abnormal metabolism of

Lipids. 1987; 22: 704-10.

- (51) Takemoto M, Tada K, Nakatsuka K, Moriyama Y, Kazui H, Yokote K, Matsumoto T, Saito Y, Mori S. Effects of aging and hyperlipidemia on plasma osteopontin level. *Jpn J Geriatr*. 1999; 36: 799–802
- (52) Towler DA, Bidder M, Latifi T, Coleman T, Semenkovich CF. Diet-induced diabetes activates an osteogenic gene regulatory program in the aortas of low density lipoprotein receptor-deficient mice. *J Biol Chem*. 1998; 273: 30427-34.
- (53) Fischer JW, Tschöpe C, Reinecke A, Giachelli CM, Unger T. Upregulation of osteopontin expression in renal cortex of streptozotocin-induced diabetic rats is mediated by bradykinin. *Diabetes*. 1998; 47: 1512-8.
- (54) Casey PJ, Solski PA, Der CJ, Buss JE. p21Ras is modified by a farnesyl isoprenoid. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989; 86: 8323-27.
- (55) Danesi R, Mclellan CA, Myers CE. Specific labeling of isoprenylated proteins: application to study inhibitors of the post- translational farnesylation and geranylgeranylation. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995; 206: 637–643.
- (56) Denhardt DT, Guo X. Osteopontin: a protein with diverse functions. *FASEB J*. 1993; 7: 1475–1482.
- (57) Guo X, Zhang YP, Mitchell DA, Denhardt DT, Chambers AF. Identification of a ras-activated enhancer in the mouse osteopontin promoter and its interaction with a putative ETS-related transcription factor whose activity correlates with the metastatic potential of the cell. *Mol Cell Biol*. 1995; 15: 476-87
- (58) Noda M, Vogel RL, Craig AM, Prah J, Deluca HF, Denhardt DT. Identification of a DNA sequence responsible for the binding of the 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ enhancement of mouse secreted phosphoprotein 1 (SPP-1 or

- osteopontin) gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990; 87: 9995-9.
- (59) Tezuka K, Denhardt DT, Rodan GA, Harada S. Stimulation of mouse osteopontin promoter by v-Src is mediated by a CCAAT box-binding factor. *J Biol Chem*. 1996; 271: 22713-7.
- (60) Malyankar UM, Hanson R, Schwartz SM, Ridall AL, Giachelli CM. Upstream stimulatory factor 1 regulates osteopontin expression in smooth muscle cells. *Exp Cell Res*. 1999; 250: 535-7.
- (61) Corsini A, Bellosta S, Baetta R, Fumagalli R, Paoletti R, Bernini F. New insights into the pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of statins. *Pharmacol Therapeut* 1999; 84: 413-8.
- (62) Hiro T, Kimura T, Morimoto T, Miyauchi K, Nakagawa Y, Yamagishi M, Ozaki Y, Kimura K, Saito S, Yamaguchi T, Daida H, Matsuzaki M; JAPAN-ACS Investigators. Effect of intensive statin therapy on regression of coronary atherosclerosis in patients with acute coronary syndrome: a multicenter randomized trial evaluated by volumetric intravascular ultrasound using pitavastatin versus atorvastatin (JAPAN-ACS [Japan assessment of pitavastatin and atorvastatin in acute coronary syndrome] study). *J AM Coll Cardiol*. 2009; 21: 293-302
- (63) Aikawa M, Rabkin E, Okada Y, Voglic SJ, Clinton SK, Brinckerhoff CE, Sukhova GK, Libby P. Lipid lowering by diet reduces matrix metalloproteinase activity and increases collagen content of rabbit atheroma: a potential mechanism of lesion stabilization. *Circulation*. 1998; 97: 2433-44.
- (64) Suzuki H, Aoki T, Tamaki T, Sato F, Kitahara M, Saito Y. Hypolipidemic effect of NK-104, a potent HMG-CoA reductase inhibitor, in guinea pigs. *Atherosclerosis*. 1999; 146: 259-70.
- (65) Suzuki H, Yamazaki H, Aoki T, Tamaki T, Sato F, Kitahara M, Saito Y. Hypolipidemic effect of NK-104 and other 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors in guinea

- pigs. *Arzneimittelforschung*. 2001; 51: 38-45.
- (66) Kajinami K, Koizumi J, Ueda K, Miyamoto S, Takegoshi T, Mabuchi H. Effects of NK-104, a new hydroxymethylglutaryl-coenzyme reductase inhibitor, on low-density lipoprotein cholesterol in heterozygous familial hypercholesterolemia. Hokuriku NK-104 Study Group. *Am J Cardiol*. 2000; 85: 178-83.
- (67) Saito Y, Yamada N, Teramoto T, Itakura H, Hata Y, Nakaya N, Mabuchi H, Tushima M, Sasaki J, Goto Y, Ogawa N. Clinical efficacy of pitavastatin, a new 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor, in patients with hyperlipidemia. Dose-finding study using the double-blind, three-group parallel comparison. *Arzneimittelforschung*. 2002; 52: 251-5.
- (68) Yokote K, Bujo H, Hanaoka H, Shinomiya M, Mikami K, Miyashita Y, Nishikawa T, Kodama T, Tada N, Saito Y. Multicenter collaborative randomized parallel group comparative study of pitavastatin and atorvastatin in Japanese hypercholesterolemic patients: collaborative study on hypercholesterolemia drug intervention and their benefits for atherosclerosis prevention (CHIBA study). *Atherosclerosis*. 2008; 201: 345-52.
- (69) Bonetti PO, Wilson SH, Rodriguez-Porcel M, Holmes DR Jr, Lerman LO, Lerman A. Simvastatin preserves myocardial perfusion and coronary microvascular permeability in experimental hypercholesterolemia independent of lipid lowering. *J Am Coll Cardiol*. 2002; 40: 546-54.
- (70) Crespo J, Martínez-González J, Rius J, Badimon L. Simvastatin inhibits NOR-1 expression induced by hyperlipemia by interfering with CREB activation. *Cardiovasc Res*. 2005; 67: 333-41.
- (71) Suzuki H, Yamazaki H, Aoki T, Kojima J, Tamaki T, Sato F, Kitahara M, Saito Y. Lipid-lowering and antiatherosclerotic effect of NK-104, a potent 3-hydroxy-3-methylglutaryl

- coenzyme A reductase inhibitor, in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits.
Arzneimittelforschung. 2000; 50: 995-1003.
- (72) Suzuki H, Kobayashi H, Sato F, Yonemitsu Y, Nakashima Y, Sueishi K. Plaque-stabilizing effect of pitavastatin in Watanabe heritable hyperlipidemic (WHHL) rabbits. *J Atheroscler Thromb*. 2003; 10: 109-16.
- (73) Hayashi T, Rani P JA, Fukatsu A, Matsui-Hirai H, Osawa M, Miyazaki A, Tsunekawa T, Kano-Hayashi H, Iguchi A, Sumi D, Ignarro LJ. A new HMG-CoA reductase inhibitor, pitavastatin remarkably retards the progression of high cholesterol induced atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis*. 2004; 176: 255-63.
- (74) Cayatte AJ, Palacino JJ, Horten K, Cohen RA. Chronic inhibition of nitric oxide production accelerates neointima formation and impairs endothelial function in hypercholesterolemic rabbits. *Arterioscler Thromb*. 1994; 14: 753-9.
- (75) Nakamura M, Abe S, Tanaka M. Oral administration of NO synthase inhibitor failed to promote arteriosclerotic lesions in the aorta and the coronary arteries of rabbits fed cholesterol. *Atherosclerosis*. 1998; 141: 53-60.
- (76) Basu SK, Goldstein JL, Anderson GW, Brown MS. Degradation of cationized low density lipoprotein and regulation of cholesterol metabolism in homozygous familial hypercholesterolemia fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1976; 73: 3178-82.
- (77) Dousset N, Negre-Salvayre A, Lopez M, Salvayre R, Douste-Blazy L. Ultraviolet-treated lipoproteins as a model system for the study of the biological effects of lipid peroxides on cultured cell. I. Chemical modifications of ultraviolet-treated low-density lipoproteins. *Biochim Biophys Acta*. 1996; 1045: 219-23.
- (78) Khedara A, Goto T, Morishima M, Kayashita J, Kato N. Elevated body fat in rats by the dietary nitric oxide synthase inhibitor, L-N omega nitroarginine. *Biosci Biotechnol Biochem*.

- 1999; 63: 698-702.
- (79) Khedara A, Kawai Y, Kayashita J, Kato N. Feeding rats the nitric oxide synthase inhibitor, L-N (omega) nitroarginine, elevates serum triglyceride and cholesterol and lowers hepatic fatty acid oxidation. *J Nutr.* 1996; 126: 2563-7.
- (80) Aoki T, Yoshinaka Y, Yamazaki H, Suzuki H, Tamaki T, Sato F, Kitahara M, Saito Y. Triglyceride-lowering effect of pitavastatin [corrected] in a rat model of postprandial lipemia. *Eur J Pharmacol.* 2002; 444: 107-13.
- (81) Ooyen C, Zecca A, Bersino AM, Catapano AL. NK-104, a potent 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor, decreases apolipoprotein B-100 secretion from Hep G2 cells. *Atherosclerosis.* 1999; 145: 87-95.
- (82) Yamamoto K, Todaka N, Goto H, Jayasooriya AP, Sakono M, Ogawa Y, Fukuda N. Effect of NK-104, a new synthetic HMG-CoA reductase inhibitor, on triglyceride secretion and fatty acid oxidation in rat liver. *Life Sci.* 1999; 65: 1493-1502.
- (83) Hernandez-Perera O, Perez-Sala D, Navarro-Antolin J, Sanchez-Pascuala R, Hernandez G, Diaz C, Lamas S. Effects of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors, atorvastatin and simvastatin, on the expression of endothelin-1 and endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *J Clin Invest.* 1998; 101: 2711-935.
- (84) Martínez-González J, Raposo B, Rodriguez C, Badimon L. 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibition prevents endothelial NO synthase downregulation by atherogenic levels of native LDLs: balance between transcriptional and posttranscriptional regulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001; 21: 804-9.
- (85) Sumi D, Hayashi T, Thakur NK, Jayachandran M, Asai Y, Kano H, Matsui H, Iguchi A. A HMG-CoA reductase inhibitor possesses a potent anti-atherosclerotic effect other than serum lipid lowering effects--the relevance of endothelial nitric oxide synthase and superoxide anion

- scavenging action. *Atherosclerosis*. 2001; 155: 347-57.
- (86) Morikawa S, Takabe W, Mataka C, Kanke T, Itoh T, Wada Y, Izumi A, Saito Y, Hamakubo T, Kodama T. The effect of statins on mRNA levels of genes related to inflammation, coagulation, and vascular constriction in HUVEC. Human umbilical vein endothelial cells. *J Atheroscler Thromb*. 2002; 9: 178-183.
- (87) Terata Y, Saito T, Fujiwara Y, Hasegawa H, Miura H, Watanabe H, Chiba Y, Kibira S, Miura M. Pitavastatin inhibits upregulation of intermediate conductance calcium-activated potassium channels and coronary arteriolar remodeling induced by long-term blockade of nitric oxide synthesis. *Pharmacology*. 2003; 68: 169-76.
- (88) Kojima J, Fujino H, Abe H, Yosimura M, Kanda H, Kimata H. Identification of metabolites of NK-104, an HMG-CoA reductase inhibitor, in rat, rabbit and dog bile. *Biol Pharm Bull*. 1999; 22: 142-50.
- (89) Fujino H, Yamada I, Shimada S, Kojima J. Metabolic fate of pitavastatin, a new inhibitor of HMG-CoA reductase--effect of cMOAT deficiency on hepatobiliary excretion in rats and of *mdr1a/b* gene disruption on tissue distribution in mice. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2002; 17: 449-56.
- (90) Fujino H, Yamada I, Shimada S, Nagao T, Yoneda M. Metabolic fate of pitavastatin (NK-104), a new inhibitor of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase. Effects on drug-metabolizing systems in rats and humans. *Arzneimittelforschung*. 2002; 52: 745-53.
- (91) Gerszten RE, Garcia-Zepeda EA, Lim YC, Yoshida M, Ding H, Gimbrone MA Jr, Luster AD, Lusinskas AFW, Rosenzweig A. MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. *Nature*. 1999; 398: 718-23.
- (92) Teupser D, Bruegel M, Stein O, Stein Y, Thiery J. HMG-CoA reductase inhibitors reduce adhesion of human monocytes to endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001; 289:

838-44.

- (93) Yoshida M, Sawada T, Ishii H, Gerszten RE, Rosenzweig A, Gimbrone MA Jr, Yasukochi Y, Numano F. HMG-CoA reductase inhibitor modulates monocyte endothelial interaction under physiologic flow condition in vitro: involvement of Rho GTPase dependent mechanism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001; 21: 1165-71.
- (94) Kojima C, Kawakami A, Takei T, Nitta K, Yoshida. M. Angiotensin-converting enzyme inhibitor attenuates monocyte adhesion to vascular endothelium through modulation of intracellular zinc. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007; 323: 855-60.
- (95) Niwa S, Totsuka T, Hayashi S. Inhibitory effect of fluvastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, on the expression of adhesion molecules on human monocyte cell line. *Int J Immunopharmacol.* 1996; 18: 669-75.
- (96) Serrano CV Jr, Yoshida VM, Venturinelli ML, D'Amico E, Monteiro HP, Ramires JA, da Luz PL. Effect of simvastatin on monocyte adhesion molecule expression in patients with hypercholesterolemia. *Atherosclerosis.* 2001; 157: 505-12.
- (97) Bernot D, Benoliel AM, Peiretti F, Lopez S, Bonardo B, Bongrand P, Juhan-Vague I, Nalbone G. Effect of atorvastatin on adhesive phenotype of human endothelial cells activated by tumor necrosis factor alpha. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2003; 41: 316-24.
- (98) Rezaie-Majd A, Prager GW, Bucek RA, Scherthaner GH, Maca T, Kress HG, Valent P, Binder BR, Minar E, Baghestanian M. Simvastatin reduces the expression of adhesion molecules in circulating monocytes from hypercholesterolemic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23: 397-403.
- (99) Stulc T, Vrablik M, Kasalova Z, Ceska R, Marinov I. Atorvastatin reduces expression of leukocyte adhesion molecules in patients with hypercholesterolemia. *Atherosclerosis.* 2003; 166: 197-8.

- (100) Downar-DZ, Siennicka A, Kaczmarczyk M, Kołodziej B, Naruszewicz M. Simvastatin modulates TNF α -induced adhesion molecules expression in human endothelial cells. *Life Science*. 2004; 75: 1287-1302.
- (101) Landsberger M, Wolff B, Jantzen F, Rosenstengel C, Vogelgesang D, Staudt A, Dahm J, Felix S. Cerivastatin reduces cytokine-induced surface expression of ICAM-1 via increased shedding in human endothelial cells. *Atherosclerosis*. 2007; 190: 43-52.
- (102) Pietsch A, Erl W, Lorenz RL. Lovastatin reduces expression of the combined adhesion and scavenger receptor CD36 in human monocytic cells. *Biochem Pharmacol*. 1996; 52: 433-9.
- (103) Umetani N, Kanayama Y, Okamura M, Negoro N, Takeda T. Lovastatin inhibits gene expression of type-I scavenger receptor in THP-1 human macrophages. *Biochim Biophys Acta*. 1996; 1303: 199-206.
- (104) Mahadevana VS, Campbella M, McKeowna PP, Bayraktutana U. Internal mammary artery smooth muscle cells resist migration and possess high antioxidant capacity. *Cardiovascular Research*. 2006; 72: 60-8.
- (105) Konstantinopoulos PA, Karamouzis MV, Papavassiliou AG. Post-translational modifications and regulation of the RAS superfamily of GTPases as anticancer targets. *Nat Rev Drug Discov* 2007; 6: 541-55.
- (106) Kitahara M, Kanaki T, Toyoda K, Miyakoshi C, Tanaka S, Tamaki T, Saito Y. NK-104, a newly developed HMG-CoA reductase inhibitor, suppresses neointimal thickening by inhibiting smooth muscle cell growth and fibronectin production in balloon-injured rabbit carotid artery. *Jpn J Pharmacol*. 1998; 77: 117-28.
- (107) Endres M. Statins and stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2005; 25: 1093-110.
- (108) Alegret M, Silvestre JS. Pleiotropic effects of statins and related pharmacological experimental approaches. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 2006; 28: 627-56.

(109) Teramoto T, Shimano H, Yokote K, Urashima M. Effects of pitavastatin (LIVALO Tablet) on high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) in hypercholesterolemia. *J Atheroscler Thromb.* 2009; 16: 654-61.

主論文目録

本学位論文の内容は下記の発表論文による。

- (1) **Kitahara M**, Kanaki T, Toyoda K, Miyakoshi C, Tanaka S, Tamaki T, Saito Y. NK-104, a newly developed HMG-CoA reductase inhibitor, suppresses neointimal thickening by inhibiting smooth muscle cell growth and fibronectin production in balloon-injured rabbit carotid artery. *Jpn J Pharmacol.* 1998; 77(2): 117-28

- (2) **Kitahara M**, Kanaki T, Ishii I, Saito Y. Atherosclerosis induced by chronic inhibition of the synthesis of nitric oxide in moderately hypercholesterolaemic rabbits is suppressed by pitavastatin. *Br J Pharmacol.* 2010; 159(7): 1418-28.

- (3) Takemoto M, **Kitahara M**, Yokote K, Asaumi S, Take A, Saito Y, Mori S. NK-104, a 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor, reduces osteopontin expression by rat aortic smooth muscle cells. *Br J Pharmacol.* 2001; 133(1): 83-8.

謝辞

本研究の博士論文提出の機会を与えていただき、本論文の作成、審査にあたり、主査の
労と論文を御校閲賜り終始御懇篤なご指導とご鞭撻を賜りました千葉大学大学院薬学研究
院（千葉大学医学部附属病院） 北田光一教授に深謝いたします。

本論文の審査において副査の労を賜り論文を御校閲いただき、多大なるご鞭撻を賜りま
した千葉大学大学院薬学研究院 堀江利治教授、千葉大学大学院薬学研究院 上野光一教
授、千葉大学大学院薬学研究院 小林弘教授、千葉大学大学院薬学研究院 村山俊彦教授
に深謝いたします。

本研究の遂行、論文作成において、終始御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜りました、千葉
大学 齋藤康学長（元千葉大学医学部細胞治療学講座教授）に深謝いたします。

本研究ならびに論文発表、作成にあたり、終始多大なる御指導と御鞭撻を賜りました千
葉大学大学院薬学研究院 石井伊都子准教授に心より感謝いたします。

本研究の遂行、論文作成において、多大なる御協力と御指導を賜りました、日産化学工
業株式会社生物科学研究所医薬研究部 金木達朗研究員、豊田恭美氏（元同研究員）、玉
田千枝氏（旧姓宮越、元同研究員）および田中作彌氏（元日産化学工業株式会社生物科学
研究所医薬研究部部長）ならびに玉木太郎氏（元興和株式会社研究員）に感謝いたします。

本研究の遂行、論文作成において、懇篤なる御協力と御指導を賜りました千葉大学大学
院医学研究院細胞治療学講座 横手幸太郎教授、竹本稔准教授、浅海直氏（元同研究員）、
竹綾子氏（元同研究員）ならびに東京都健康長寿医療センター 森聖二郎部長に深謝いた
します。

本研究の遂行において、多大なる御協力と御指導を賜りました、日産化学工業株式会社
坂下光明医薬品事業部長および山下徹氏に深謝いたします。

審査

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	千葉大学教授（薬学研究院）	薬学博士	北田 光一
副査	千葉大学教授（薬学研究院）	薬学博士	堀江 利治
副査	千葉大学教授（薬学研究院）	薬学博士	上野 光一
副査	千葉大学教授（薬学研究院）	薬学博士	小林 弘
副査	千葉大学教授（薬学研究院）	薬学博士	村山 俊彦