

ヒト動脈硬化性病変における
peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- α
および PPAR- γ の発現増加

日本大学医学部病態病理学系病理学分野

末吉 純久

申請年 2014 年

指導教員 根本 則道

ヒト動脈硬化性病変における
peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- α
および PPAR- γ の発現増加

日本大学医学部病態病理学系病理学分野

末吉 純久

申請年 2014 年

指導教員 根本 則道

目次

1. 概要.....	1
2. 緒言.....	3
2.1 粥状動脈硬化の病理(進展過程).....	3
2.2 Peroxisome Proliferator-Activated Receptors: PPARs.....	5
2.3 PPARs サブタイプ、組織分布および機能.....	6
2.4 PPAR- α および PPAR- γ と粥状硬化.....	7
2.5 本研究の目的.....	8
3. 対象と方法.....	10
3.1 ヒト大動脈組織片.....	10
3.2 全 RNA の抽出.....	10
3.3 Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR).....	11
3.4 病理組織学的解析のための組織標本作製.....	13
3.5 免疫組織化学的染色.....	13
3.6 Western blotting.....	15
3.7 細胞増殖.....	16
3.8 CD68-陽性細胞の形態計測学的解析.....	16
3.9 統計学的解析.....	17
4. 結果.....	18
4.1 PPAR- α および PPAR- γ mRNA の発現.....	18
4.2 PPAR- γ タンパク質発現.....	19
4.3 細胞増殖.....	20
4.4 マクロファージ数.....	20
5. 考察.....	21
6. まとめ.....	23
7. 謝辞.....	25
Table 1 General data of examined cases and the number of samples used.....	26
Table 2 Primer sequences and expected product size.....	27
Table 3 Expression rates of PPAR- α and PPAR- γ in human aorta.....	28
Figure 1. Study methodology.....	29
Figure 2. Expression of PPAR- α and PPAR- γ mRNA in human aortas.....	30
Figure 3. Comparison of the mRNA expression level in atheromatous plaques with	

that in the DIT in individual cases, and between the PPAR- α and PPAR- γ mRNA expression levels within each atheromatous sample for each type of lesion.	31
Figure 4. PPAR- γ protein expression in DIT, fatty streaks, and atheromatous plaques.	32
Figure 5. Localization of the PPAR- γ protein in the aorta.	33
Figure 6. PPAR- γ protein expression analyzed by Western blotting.	34
Figure 7. Percentage of Ki67-positive cells (a) and total number of cells (b) in the intima of human aorta, and comparison of PPAR mRNA expression with cell proliferation (c).	35
Figure 8. Comparison of the mRNA expression of PPAR- α (a) and PPAR- γ (b) with the macrophage proliferation.	36
Figure 9. Comparison of the mRNA expression of PPAR- α (a) and PPAR- γ (b) with the percentage of CD68-positive area in DIT and fatty streak.	37
8. 引用文献	38

1. 概要

【目的】ペルオキシゾーム増殖薬活性化受容体(Peroxisome Proliferator-Activated Receptors: PPARs)は脂質代謝、グルコースの恒常性維持機構、炎症応答、およびその他の生物学的反応に関わる遺伝子の制御を行う核内受容体スーパーファミリーに属するリガンド依存的な転写制御因子である。本研究はヒト粥状硬化の発症の機構を解明するのを目的として設計したもので、粥状硬化性病変における PPAR サブタイプの mRNA とタンパク質の発現およびこの発現と血管内膜細胞の増殖活性およびマクロファージ浸潤との関連を調べた。

【方法】剖検 35 症例から大動脈を採取し、組織学的にび慢性内膜肥厚(diffuse intimal thickening: DIT)、脂肪線条および粥腫の 3 つの型に分類した。各病変を二分割し、一片は PPARs mRNA あるいはタンパク質発現を Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)法あるいは Western blotting 法により調べ、他片は抗 PPAR- γ 抗体、抗 CD68 抗体、抗 Ki67 抗体を用いた免疫組織化学的染色を実施した。

【結果】PPAR- α および PPAR- γ mRNA は、DIT に比べ粥腫と脂肪線条に高頻度に発現し、かつ発現レベルも有意に高かった。粥腫と脂肪線条の両者において、PPAR- α mRNA 発現レベルは PPAR- γ mRNA 発現レベルと相関していた。粥腫の PPAR- γ タンパク質発現レベルは、DIT における発現レベルより有意に高かった。PPAR- γ タンパク質は粥腫の主にマクロファージの核に認められたが、その他、単核球、内膜平滑筋細胞および血管内皮細胞の核内にも局在した。粥腫では内膜細胞増殖活性が有意に増加したが、この増殖と PPAR- α および PPAR- γ mRNA 発現は関連しなかった。DIT および脂肪線条の両者において、PPAR- α および PPAR- γ mRNA 発現と内膜に浸潤した

マクロファージ数との関連は認めなかった。

【考察】粥腫において、PPAR- α および PPAR- γ mRNA 量は DIT に比較して有意に増加し、脂肪線条から粥腫へと重症化するにつれて増加する傾向が見られた。また、脂肪線条と粥腫において PPAR- α の発現は PPAR- γ の発現と相関関係が見られた。さらに、粥状硬化性病変における PPAR- γ 発現増加は主にマクロファージに認められたが、血管内膜のマクロファージ浸潤と相関関係が見られないことから、ある特定のマクロファージのみが PPAR- γ を発現していることが示唆された。また、PPARs は細胞増殖を調節するといわれているが、マクロファージの増殖とは関連しなかった。

【結論】 PPAR- α および PPAR- γ 発現増加は粥腫の形成と関連すること、PPAR- γ 発現増加は動脈硬化性病変進展過程の早期から関与することを示唆している。

2. 緒言

本章では、本研究の背景と目的について述べる。2.1 では、粥状硬化の病理、特に進展過程について歴史的背景をふまえて述べる。2.2～2.3 では PPARs に関する知見を述べ、2.4 では PPARs と粥状動脈硬化症との関連を述べる。以上 2.1～2.4 をふまえて 2.5 では本研究の目的について述べる。

2.1 粥状動脈硬化の病理(進展過程)

粥状動脈硬化は、多数の因子が関与している複雑な疾患である。その特徴は、動脈壁に徐々に脂肪が蓄積すること(粥腫)であり、この粥腫が破裂すると冠動脈などでは血流が途絶し心筋梗塞を発症する。現在、粥状動脈硬化は内皮機能障害、血管平滑筋細胞の増殖、およびマクロファージ泡沫細胞形成に導く炎症性細胞における脂質の蓄積に特徴づけられる慢性的炎症性状態とされ、その発生・進展に関する概念は、「傷害反応説 (response-to-injury hypothesis)」の後、広く「炎症説」に集約され今日に至っている[1, 2]。

び慢性内膜肥厚(diffuse intimal thickening: DIT)は、発生機序は不明であるが、既に小児期から認められる形態変化であることから生理的な適応現象と考えられている[3]。DIT の病理学的特徴は、1) 規則的な平滑筋細胞と弾性線維を含む間質の増生による内膜肥厚であること、2) 脂質沈着を認めないこと、3) マクロファージ浸潤は殆ど無く、または内膜表層に少数認められるのみであることである。DIT は、American Heart Association 動脈硬化病

型分類における Type-I あるいは Type-II へと進展し、粥状動脈硬化の発生基盤となりやすい、即ち、動脈硬化を発生し易い領域(atherosclerosis-prone region)の一つであると考えられている[3, 4]。

ヒト粥状動脈硬化の早期病変である脂肪線条の病理学的特徴は、1) 肥厚内膜深部または全層に認められる細胞外と細胞内における脂質の沈着、2) マクロファージの内膜内浸潤・集積、3) これらの病理学的変化に伴う内膜の間質ならびに細胞分布の変化に特徴づけられる[5-7]。一方、粥腫の病理学的特徴は動脈内膜下の脂質蓄積および平滑筋細胞、マクロファージ、Tリンパ球の浸潤およびそれらの組織崩壊物の蓄積を結合組織が被覆した隆起病変である。

単球・マクロファージの浸潤経路は、早期病変では内膜表層からと推定されているが、病変の進展と共に内膜内に新生血管が出現し、新生血管からの単球・マクロファージの浸潤も重要な経路と考えられている[8]。

また、単球・マクロファージの浸潤誘導機序については早期動脈硬化病変では不明であるが、早期の脂質沈着部ないしその周囲の内膜平滑筋細胞に単球走化性蛋白-1 (monocyte chemotactic protein-1: MCP-1)発現を認めること、また沈着脂質の多くは酸化脂質であることから、酸化ストレスにより DIT 深部の平滑筋細胞に発現した MCP-1 が単球・マクロファージの内膜内への浸潤に関与している可能性が示唆されている[5]。

粥状硬化症の進展に伴い合併病変（臓器梗塞などの動脈硬化関連疾患）が問題となるが、それには粥腫の不安定化(不安定プラーク)に炎症が関与していると考えられている[1, 2]。不安定プラークとは病理形態学的三要因、すなわち、1) エステル化コレステロールに富む偏在性粥腫であること、2) 粥腫を被覆する線維性被膜が菲薄であること、3) 被膜に高度なマクロファ

ージなどの炎症細胞浸潤を認めるが、平滑筋細胞は少ないこと、である[9]。

居石ら[10]は、ヒト冠動脈硬化内膜内新生血管の病理学的研究から、粥腫内に認められる血管新生過程は内膜の傷害に対する修復反応であり、また新生血管の周囲に密な炎症細胞の集簇を伴っていることは、動脈硬化が進行性、かつ活動性であることを示しているため、血管新生は動脈硬化病巣の炎症を促進するのみならず、粥腫不安定化の病理学的要因の一つであると述べ、粥状動脈硬化症の進展・発生病態に関する概念として「炎症・修復説」を提唱している。

2.2 Peroxisome Proliferator-Activated Receptors: PPARs

ペルオキシゾーム増殖薬活性化受容体(Peroxisome Proliferator-Activated Receptors: PPARs)は、ペルオキシゾーム増殖薬と呼ばれる合成化合物の遺伝子転写に対する作用を媒介する核内受容体として初めてクローニングされた[11]。その後間もなく、エイコサノイドや脂肪酸にも PPAR を介した遺伝子転写の調節能があり、脂質代謝、グルコースホメオスタシス、炎症応答とその他の生物学的過程に関連する遺伝子の制御を行う核内受容体スーパーファミリーに属するリガンド依存的な転写制御因子であることが明らかとなった。分子レベルでは、PPARs は他の核内ホルモン受容体と同様に作用する。PPARs は、9-cis retinoic acid をリガンドとする核内受容体であるレチノイド X 受容体(retinoic X receptor: RXR)とヘテロダイマーを形成し、標的遺伝子のプロモータ/エンハンサー領域に存在する特定のペルオキシゾーム増殖因子応答配列(peroxisome-proliferator-response element: PPRE)

と呼ばれる DNA 配列(シスエレメント)に結合する。次に、ここにホルモン(リガンド)が結合すると、それに応答して転写を活性化する[12, 13]。

西欧社会において、糖尿病、肥満、動脈硬化症、癌などの慢性疾患が死亡原因の多くを占めているが、これらの疾患には、PPARs が関与していると推定されている[14]。

2.3 PPARs サブタイプ、組織分布および機能

PPARs は、3つのサブタイプ、PPAR- α 、PPAR- β/δ および PPAR- γ が同定され、異なる組織分布と生物学活性を持つことが分かっている。PPAR- α は主に肝臓、心臓、筋肉、腎臓と褐色脂肪組織において発現され、脂肪酸異化の制御を行う。PPAR- α はフィブレート等の脂質降下剤により活性化され、トリグリセリド代謝に作用する、あるいは肝臓における HDL 代謝や胆汁酸合成および異化を調節することで血漿脂質輸送を制御する。PPAR- γ は脂肪細胞およびマクロファージ内で高度に発現され、脂肪細胞分化、脂質貯蔵およびグルコースホメオスタシスを制御する。また、チアゾリジン系薬剤などの抗糖尿病薬で活性化され、インスリン抵抗性を持つ患者や II 型糖尿病患者のグルコースの恒常性維持機構を制御する。PPAR- β/δ はほとんど全ての組織に発現し、脂肪細胞および骨格筋において脂質代謝やエネルギー代謝に関与する[15]。

2.4 PPAR- α および PPAR- γ と粥状硬化

PPAR- α の活性化は *in vivo* と *in vitro* において血管平滑筋細胞の増殖を抑制する[16]。この研究は、PPAR- α アゴニストがサイクリン依存性キナーゼ抑制因子(cyclin-dependent kinase inhibitor: CDKI, p16INK4a)を誘発することで休止した血管平滑筋細胞の細胞周期への再入に重要なイベントを阻止することを示唆している。PPAR- γ アゴニストは網膜芽腫遺伝子生成物のリン酸化を抑制し、CDKI p27Kip1 および CDKI p21Cip1 を分解することで細胞周期の制御も行っている[17]。また、Zandbergen ら[18]は、G0/G1 switch gene 2 (G0S2)が PPARs の直接的なターゲット遺伝子であることを発見し、G0S2 が線維芽細胞の成長停止と脂肪細胞分化に影響を与えることを示している。このため、PPARs の活性化は血管壁細胞の増殖および移動を抑制することで粥状硬化の形成から組織を守る可能性がある。

PPAR- α および PPAR- γ アゴニストは、病変内への単球とリンパ球の補充とそれに続く分化および活性化を促すシグナル依存性転写因子を妨げることによっていくつかの炎症応答遺伝子の発現を抑制することが実験的に示されている[19-21]。また、いくつかの研究では PPAR- α と PPAR- γ の両方が Liver X receptor- α (LXR- α)の発現を誘発し、それにより ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1)およびコレステロール流出に関連するその他の遺伝子の発現が活性化されることで、培養マクロファージにおけるコレステロール流出を促進することが示されている[22, 23]。Li ら[24]は、PPAR- α および PPAR- γ アゴニストが low density lipoprotein (LDL)レセプター欠損マウスにおける泡沫細胞形成および粥状硬化を阻止するが、PPAR- β/δ アゴニストは阻止しないことを示した。この研究は PPAR- α および PPAR- γ アゴニ

ストが異なる ABCA1 非依存性経路で *in vivo* の泡沫細胞形成を阻止することを示している。PPAR- α による泡沫細胞形成の阻止には LXR- α が必要であったが、PPAR- γ による阻止は LXR- α に依存していなかった。活性化した PPAR- γ はコレステロールエステル化を減少させ、ATP-binding cassette transporter G1 (ABCG1) の発現を誘発し、LXR なしで HDL 依存性のコレステロール流出を促進した。これらの研究は PPARs がマクロファージにおけるコレステロールホメオスタシスに影響を与える受容体特異的機構を明らかにし、PPAR- α および PPAR- γ 遺伝子発現の制御が粥状硬化の形成時における血管イベントにとって重要であることを示唆している。しかし、ヒトにおける粥状硬化の発症の分子機構はまだわかっていない。

2.5 本研究の目的

PPAR- α および PPAR- γ は、粥状硬化性病変においてマクロファージ、血管平滑筋細胞、リンパ球、および内皮細胞で発現されることが報告されている。しかしヒトにおいて研究された病変数は限られており、いくつかの報告では研究に関わった患者数が明記されていなかった[25-29]。我々は、ヒト大動脈において同一の大動脈組織と粥状硬化性病変内に PPAR- α および PPAR- γ を検知した[30]。しかし、ヒト大動脈壁における PPAR サブタイプの詳細な比較研究は行われていない。また、PPARs の発現が粥状硬化の形成に重要な役割を果たす血管内膜内におけるマクロファージ浸潤および細胞増殖にどのように関わっているかはヒト大動脈において研究されていない。ヒト動脈硬化病変と、現在、汎用されている動脈硬化動物モデルの

病変とは病理学的に多くの点で異なりがあることから、ヒト粥状動脈硬化症の病態解析、適切な診断・治療ならびに予防法の確立の為には、ヒト病変における基礎的・臨床的研究が重要である。ヒトにおける粥状動脈硬化の発症において PPARs がどのように関わっているのかの機構を明らかにするため、我々は同一個体における粥状硬化性病変内にある PPAR サブタイプの発現パターンを比較し、ヒト大動脈壁内の細胞増殖やマクロファージ浸潤との関係について調べた。

3. 対象と方法

3.1 ヒト大動脈組織片

剖検 35 例(女性 12 例、男性 23 例; 平均年齢 64.4 歳、13 歳~88 歳)から大動脈組織片(湿重量 62~1260 mg)を採取した。大動脈組織片は、1 例を除き全て死亡から 4 時間以内、1 例のみ死亡から 6 時間後に採取した(Table 1)。脂肪線条または粥腫を含む粥状硬化性病変を正常な部分から肉眼的に切り離し、各病変を縦に二分割した(Figure 1)。一片は、全 RNA 抽出あるいはタンパク抽出を行うまで、ただちに -80°C で保存した。全 RNA は、ほぼ全ての検体で死亡から 3 ヶ月以内に抽出した。他の一片は組織学的分析のため 10%中性緩衝ホルマリン液で浸漬固定した。本研究は、日本大学医学部附属板橋病院規約による研究承認(1998 年 5 月承認)され、全患者のご遺族から文書による同意を得た上で行った。

3.2 全 RNA の抽出

線維脂肪組織の混入を防ぐため外膜を除いた大動脈片(72 片)から TRIzol®試薬(Invitrogen Corp., Carlsbad, CA USA)を用いた acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform 法により全 RNA を抽出した[31]。検体の RNA の質の均一性を確認するため、抽出した全 RNA を分光光度計を用いて 260 nm 値を測定し、または Agilent bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, California)を用いて RNA integrity number (RIN)を測定した。小さな組

織検体から抽出した核酸を DNase で処理すると、RNA が分解あるいは破壊されることを踏まえ[32]、DNase での処理は本研究では行わなかった。

3.3 Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

RT-PCR を製造業者のプロトコールに従い、THERMOSCRIPT™ RT-PCR System (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA USA)を用いて行った。

相補的 DNA(cDNA)は全 RNA 1 μg を用いて生成した。全 RNA を random hexamer(5 ng)と DEPC 水を 65°C で 5 分間予加熱し、氷冷した。次に dTTP、dCTP、dGTP および dATP を各 1mM ずつ、40 units の RNaseOUT™、および 5 mM dithiothreitol(DTT)を 75 mM 酢酸カリウム、8 mM 酢酸マグネシウム、および 50 mM Tris-acetate を含む 20 μL の cDNA 合成緩衝液(pH 8.4)と一緒に添加した。次に、混合物を 5 分間 25°C でインキュベートした。

ThermoScript™ 逆転写酵素(15 units)、dNTPs、RNaseOUT™、DTT と cDNA 合成緩衝液からなる PCR mixture を、random hexamer のアニーリングを行うため、25°C で 10 分間インキュベートし、次に 65°C で 50 分インキュベートした後 85°C で 5 分間加熱し、反応を停止させた。cDNA ストックは -20°C で保存した。

2 μL の第一鎖 cDNA 溶液をプラチナ Taq DNA ポリメラーゼを 2 ユニット、1.5 mM MgCl₂、dNTP 混合物(各 0.2 mM)、各 0.2 μM のセンスおよびアンチセンスプライマーを含む全 50 μL の溶液と反応緩衝液内で増幅した。PCR サイクリング条件は次の通りである。初期変性工程を 94°C で 2 分間、変性を 40 サイクル 94°C で 30 秒毎、アニーリングを 55°C で 30 秒間、伸

長反応工程を 72°C で 60 秒間、そして最終伸長反応を 1 サイクル、75°C で 10 分間行った。RT mixture を含む、あるいは含まない無菌水による PCR を陰性対照とした。

全ての反応はサーマルサイクラー(GeneAmp PCR System 2400, Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT)を用いて行った。

PPAR 発現を確認するため、PPAR- α 用に 2 つのプライマーを PPAR- γ 用に 3 つのプライマーセットを作製した。センスプライマーとアンチセンスプライマーはデータバンクから取得したヒト PPARs(GenBank accession no. NM005036 および NM005037)の cDNA 塩基配列から設計した。各プライマーセットには同じ PCR 試薬濃度とサイクリング条件を用いた(Table 2)。

PCR 産物(10 μ L/sample)を 1.5% アガロースゲルを含む Tris-borate EDTA (TBE)緩衝液(89 mM Tris-base, 89 mM boric acid, 2 mM EDTA, pH 8.0)を用いて電気泳動で分離した。ゲルを 1 μ g/mL エチジウムブロマイドで染色し、280 nm UV 光ボックスで写真撮影した。ゲルを CCD カメラ(Printgraph, AE-6911CX, ATTO Corp., Tokyo, Japan)でデジタル画像として捉え、バンドの強度を public-domain National Institutes of Health Image program (version 1.61, the U.S. National Institutes of Health)により定量化した。DNA 分子量マーカーには Φ X174-Hinc II digest (Takara Shuzo, Kyoto, Japan)を使用した。遺伝子発現量は、各遺伝子の発現定量値を内在性コントロール β -actin 発現定量値で割った相対値で表した。

3.4 病理組織学的解析のための組織標本作製

大動脈(74 組織検体) をパラフィン包埋した。回転式マイクロトーム (RM2155, Leica Microsystems AG, Wetzlar, Germany) を用いて連続パラフィン切片を 4- μm 厚で作製し、病変を評価するためヘマトキシリン-エオシン (H.E.) 染色、アルシアンブルー (pH 2.5) 染色、およびエラスチカ - ワンギーソン染色を行った。「2.1 粥状動脈硬化の病理(進展過程)」で記載した病理学的特徴に基づき、これらを DIT、脂肪線条または粥腫の 3 つのグループに分類した。3 つのグループ間で年齢(DIT、脂肪線条および粥腫の平均年齢はそれぞれ 60.0 歳、59.5 歳および 69.7 歳)、性別および病歴において有意な差は認められなかった。

3.5 免疫組織化学的染色

免疫組織化学的染色は Avidin/Biotinylated Enzyme Complex (ABC) 法 (VECTASTAIN Elite ABC kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) によって行った。

脱パラフィン後、切片を再水和し、10 mM クエン酸ナトリウム緩衝剤 (pH 6.0) 内で 30 分間マイクロ波加熱した。1% 過酸化水素/メタノール内に組織切片を 20 分間浸して内因性ペルオキシダーゼ活性を失活し、下降エタノール系列で検体を再水和した。切片はリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で 10 分間洗浄し、非特異性結合を防ぐため、抗 PPAR- γ 抗体および抗 CD68 抗体染色用は 1.5% 正常ウマ血清で、抗 Ki67 抗体染色用は 5% スキムミルク

(Wako Pure Chemical Industries, Ltd, Osaka, Japan)で切片を 30 分間処理した。次に切片を 10 倍希釈したマウスモノクローナル抗 PPAR- γ 抗体(E-8; Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA)と 4°C で 16 時間、あるいは 20 倍希釈した抗 Ki67 抗体(MIB-1; DAKO A/S, Glostrup, Denmark)または 50 倍希釈した抗 CD68 抗体(PG-M1; DAKO A/S, Glostrup, Denmark)と室温で 1 時間反応させた。PBS で数回洗浄後、切片をビオチン化ウマ抗マウス IgG と 30 分間インキュベートした後、アビジン-ビオチン化パーオキシターゼ複合体 (Vector Laboratories Inc.)を室温で 30 分間反応させ、DAB(3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, DAKO A/S)で発色させた。マイヤーのヘマトキシリンで核染色の後、脱水、透徹および封入し光学顕微鏡で観察した。また、陰性対照として同蛋白濃度の正常ウサギ血清あるいは、抗マウス IgG2a 抗体(DAKO A/S, Glostrup, Denmark)を一次抗体の代わりに切片と反応させ、その後上記と同様の処理を行った。抗 PPAR- γ 抗体については、別の 2 つの抗体(rabbit polyclonal antibody, Cell Signaling Technology, Inc., MA, USA および mouse monoclonal antibody A3409A, Perseus Proteomics Inc., Tokyo, Japan)の解析から同様の発現パターンを得た。

免疫二重染色について、脱パラフィン化した切片を抗 Ki67 抗体とインキュベートし、次に切片をビオチン化ウマ抗マウス IgG で処理した後、アビジン-ビオチンアルカリホスファターゼ複合体で処理した。Vector Red で発色を行った後、一次抗体を外すため切片を 0.1 M グリシン-HCl(pH2.2)で 60 分間処理した。2 回目の染色は、抗 CD68 抗体と Histofine Simple Stain MAX PO を用いて行い、DAB で発色を行った。核染色にはマイヤーのヘマトキシリンを用いた。

3.6 Western blotting

剖検 5 例(60 歳～81 歳、Table 1 の Case No.31-35)から採取した大動脈片(粥腫 : n = 3、DIT : n = 3)を用いた。各検体を半分に切断し、一片は Western blotting に使用し、他の一片は病変の組織学的検索のために 10%中性緩衝ホルマリン液で浸漬固定した。Western blotting は、大動脈片を氷冷溶解緩衝液(50 mM Tris-HCl, pH 6.8; 10% glycerol, 2% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide [SDS] and 0.002% bromophenol blue)で溶解した。組織溶解液を 40°C で 15 分間 3000-G で遠心分離し、上澄液のタンパク質濃度を BCA protein assay kit (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA)で定量した。50 μ g のタンパク質を 10% SDS-polyacrylamide gel 上に電気泳動分離してから、ニトロセルロース膜に移した。5% fat-free milk を含む 0.1% Tween 20/PBS(PBS-T)溶液で膜を 1 時間処理し、1000 倍に希釈した抗 PPAR- γ 抗体 (A3409A, Perseus Proteomics Inc., Tokyo, Japan)と 40°C で 16 時間インキュベートした。ターゲットタンパク質を ECL Advance Western Blotting Detection kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)で検知した。化学発光性は Light-Capture AE-6972(ATTO Corp., Tokyo, Japan)で検知し、CS Analyzer version 2.07 software (ATTO Corp.)で数量化した。内在性コントロールには β -actin の発現を用いた。

3.7 細胞増殖

DIT(n = 18)、脂肪線条(n = 13)、および粥腫(n = 40)の血管内膜内の抗 Ki67 抗体と反応した増殖性細胞数を光学顕微鏡下で数えた。Ki67-陽性細胞指標は、各スライドで 20~40 の視野(ランダムな高倍率視野; 倍率: 400×)において、全核数が 1000 以下であった 8 つの検体を除き、少なくとも 1000 個の核をカウントした後、陽性細胞のパーセント(Ki67-陽性核数/全核数)として表した。全核数は、Ki67 陽性核とヘマトキシリン染色核を合算した。全核数を全細胞数とした。

3.8 CD68-陽性細胞の形態計測学的解析

血管内膜における抗 CD68 抗体陽性領域を DIT (n = 17)と脂肪線条(n = 13)病変の各スライドで形態計測学的に分析した。各スライドに付き、倍率 25×の顕微鏡画像を 3 枚デジタルカメラ(Olympus DP12; Olympus Corp., Tokyo, Japan)で撮影し、TIFF 形式で保存した。画像は、Scion Image program (National Institutes of Health, modified by Scion Corp., Frederick, MD, USA) を用いて解析し、CD68-陽性 (マクロファージ) 面積対全血管内膜面積の比率(CD68-陽性面積/全血管内膜面積)を算出してマクロファージ数とした。

3.9 統計学的解析

結果は平均±標準誤差として表記し、一元配置分散分析(ANOVA)で分析後、Dunnettの多重比較検定を行った。相関関係はノンパラメトリックなスピアマンの相関係数を用いて計算した。P値が0.05未満の場合に有意であるとした。

4. 結果

4.1 PPAR- α および PPAR- γ mRNA の発現

いくつかの DIT と脂肪線条、また粥腫全例において PPAR- α と PPAR- γ mRNA の両方が検知された(Figure 2 a)。PPAR- α と PPAR- γ mRNAs が認められた頻度は粥腫でもっとも高く(それぞれ 35/45 例、42/45 例)、次に脂肪線条(それぞれ 8/13 例、13/13 例)、次に DIT(それぞれ 9/18 例、15/18 例)であった(Table 3)。

PPAR- α mRNA の発現量は病変型の重症度に比例して増加する傾向が見られた。粥腫においてプライマー1で検知した PPAR- α mRNA の発現量は DIT より有意に高く(3.7 倍、 $p < 0.05$)、粥腫においてプライマー2で検知した発現量は DIT の3倍であったが、その差は統計的に有意ではなかった(Figure 2 b)。脂肪線条および粥腫においてプライマー3から5を用いて検知した PPAR- γ mRNA 発現量は DIT よりも有意に高かった(Figure 2 c)。プライマー3で検知した PPAR- γ mRNA 発現量は PPAR- α mRNA 発現量と比較して、粥腫と脂肪線条の両方で高かった(Figure 2 b and c)。各患者の検体では同様の傾向が認められ、粥腫における発現量がもっとも高かった(Figure 3 a)。14 例では、粥腫における PPAR- α と PPAR- γ mRNA 発現量を DIT における量と比較し、PPAR- α mRNA 発現量を同じ大動脈から採取した PPAR- γ mRNA 発現量と比較した。DIT における PPAR- α と PPAR- γ の mRNA 発現量は比例していなかった。脂肪線条および粥腫では PPAR- α と PPAR- γ mRNA 発現量の間に関連関係が認められた(Figure 3 b)。

4.2 PPAR- γ タンパク質発現

PPAR- γ 陽性細胞を含む検体数は、DIT で 7/18 例(39%)、脂肪線条で 7/13 例(54%)、粥腫で 27/40 例(68%)であり、粥状硬化性病変でより高頻度に認められた。いくつかの DIT では、粘液腫性大動脈内膜を炎症性細胞が浸潤していた(Figure 4 a)。これらの例では、PPAR- γ タンパク質発現はいくつかの大動脈内膜平滑筋細胞でも発現されているが、主に単球/マクロファージの核で認められ、これらが抗 CD68 抗体と反応した(Figure 4 b and c)。脂肪線条において CD68-陽性領域で PPAR- γ 発現陽性を観察した(Figure 4 d, e and f)。粥腫では PPAR- γ タンパク質はマクロファージと凝集した脂質に富むコアの周囲の領域(Figure 4 g, h and i)とプラークショルダー(Figure 4 j, k and l)で主に発現されていた。PPAR- γ と CD68 の発現陽性領域はマクロファージ集簇塊とプラークショルダーの両方で重なっているが、粥腫における内皮細胞、単核球細胞、および大動脈内膜平滑筋細胞のいくつかの核も抗 PPAR- γ 抗体と反応しており(Figure 5 a, b, c and e)、頻度は単球/マクロファージ、大動脈内膜平滑筋細胞、内皮細胞の順で高かった。大動脈中膜平滑筋細胞の細胞質でも微弱ではあるが抗 PPAR- γ 抗体との反応が見られた(Figure 5 d)。

陰性対照として抗マウスモノクローナル IgG1 抗体で染色した連続切片では大動脈壁において陽性シグナルが認められなかった(データ非表示)。

Western blotting により、PPAR- γ タンパク質発現量が DIT と比較して粥腫において有意に増加することがわかった($p=0.0033$, Figure 6)。

4.3 細胞増殖

抗 Ki67 抗体染色により求めた増殖性細胞数は病変型の重症度に比例して増加する傾向が見られた。粥腫の Ki67-陽性細胞指標は DIT より有意に高く (2.2-fold, $p < 0.05$, Figure 7 a)、粥腫の全細胞数は DIT のそれと同等であった (Figure 7 b)。しかし、DIT、脂肪線条あるいは粥腫における PPAR- α および PPAR- γ mRNA の発現量と Ki67-陽性細胞指標は相関が見られなかった (Figure 7 c)。PPAR- γ タンパク質発現頻度がマクロファージ、大動脈内膜平滑筋細胞、粥腫の内皮細胞の順で高かったことからマクロファージの増殖活性を二重染色で調べた。8 例の剖検例 (年齢 56 歳~88 歳) から採取した 10 例の粥腫では、CD68-陽性マクロファージにおける Ki67-陽性細胞指標は PPAR- α および PPAR- γ mRNA の発現量との相関を示さなかった (Figure 8)。

4.4 マクロファージ数

いくつかの DIT において、PPARs タンパク質が主にマクロファージ内で観察されたことから、PPARs mRNA 発現と DIT と脂肪線条におけるマクロファージ数との関連を調べた。脂肪線条の CD68-陽性領域は DIT と比べ 7.8-倍であった ($3.54 \pm 0.87\%$, $n = 13$ に対し $0.45 \pm 0.09\%$, $n = 17$, $p < 0.01$)。しかし、DIT および脂肪線条の両者において、PPAR- α と PPAR- γ mRNA の発現量とマクロファージ数との間に相関関係は認められなかった (Figure 9)。

5. 考察

本研究では、脂肪線条および粥腫における PPAR- γ mRNA 発現および粥腫における PPAR- α mRNA 発現が DIT における発現量よりも有意に高いことを示し、これらの PPARs 発現が脂肪線条から粥腫へと重症化するにつれて増加する傾向があることを示した。これは、これら PPARs の発現が粥腫形成に関連し、PPAR- γ がヒト粥状硬化の初期段階（脂肪線条の形成）に関連している可能性を示唆している。

DIT において、PPAR- α あるいは PPAR- γ mRNA 発現が粥腫に相当するくらい高発現例が 3 例認められた (Case No. 22, 24 および 30, Figure 3 a)。これらの例において PPAR- γ タンパク質が主に粥状硬化の初期病巣を示す軽度の細胞外マトリクス沈着が見られる血管内膜内のマクロファージにて認められたことから、DIT と脂肪線条のマクロファージの数を測定した。しかし、DIT と脂肪線条では、PPAR- α および PPAR- γ mRNA 発現とマクロファージ数との間には相関関係は認められなかった。これらの所見は、ある特定の単球/マクロファージのみが PPARs を発現し、細胞内外の脂質含有量および各病変内の炎症性反応が PPARs 発現を促進し、それが粥状硬化の形成につながる可能性を示唆している。各症例の DIT において PPAR- α および PPAR- γ mRNA 発現量が相関関係を示さないという我々の所見は、コレステロールや血糖値などの循環血に関連した全身性要因ではなく、大動脈血管壁内の個々の病変の炎症性反応がヒトの大動脈における PPAR- α と PPAR- γ の発現誘導に影響を与えるという考えを示唆するものである。PPARs が最終的に細胞を脂質の過負荷から守るための脂質センサーとして機能するという報告[12]と、スカベンジャー受容体が媒介する取込みを通

じて PPAR- γ を転写的に活性化する oxidized low density lipoprotein [26, 33, 34]、タンパク質の酸化生成物[35]、過酸化脂質由来の主要なアルデヒドである 4-hydroxy-2 nonenal (4-HNE) [36]、および C 反応性タンパク質[37]がヒト粥状硬化内に蓄積するという報告がこの可能性のあることを支持している。

PPARs による細胞増殖の誘導に関してはまだ論争が続いている。PPAR- α と PPAR- γ は血管平滑筋細胞に対する増殖阻害活性を持ち、線維芽細胞の成長停止を誘導するターゲット遺伝子である G0S2 を共有する。しかし、最近の別の研究では、PPAR- α は血管平滑筋細胞が S 期に入るのを防ぐが、PPAR- γ は血管平滑筋細胞増殖に影響を与えないことが示された[38]。また、PPAR- α と PPAR- γ の機能は乳がん細胞において、PPAR- α は増殖を促進し、PPAR- γ は抑制に関連している[39]。我々が観察したヒトの大動脈では、粥腫において増殖性細胞数および PPARs mRNA 発現量は増加したが、抗 Ki67 抗体を用いて分析した細胞増殖活性は、DIT、脂肪線条、または粥腫における PPAR- α および PPAR- γ の発現量と相関関係が見られなかった。PPAR- γ タンパク質が粥腫の他の細胞と比べ、マクロファージでより頻繁に発現されていたことから、マクロファージの増殖量を調べたが、粥腫における PPAR- α および PPAR- γ mRNAs 発現量との相関関係は認められなかった。これらのデータは、単球/マクロファージを含む細胞増殖がどの病変型においても PPARs の発現量とは関連しないことを示唆している。

PPAR- γ タンパク質は内皮細胞、マクロファージ、単核球細胞の核および粥腫の大動脈内膜平滑筋細胞で発現を認めた。この事はその他の報告と一致している[26-29]。本研究において大動脈中膜平滑筋細胞の細胞質は抗 PPAR- γ 抗体と弱く反応したが、この反応は各例における RT-PCR による

mRNA の発現との相関関係は見られなかった。

本研究では、脂肪線条と粥腫において PPAR- α と PPAR- γ 発現の相関関係が認められた。この PPAR- α および PPAR- γ mRNA 発現誘導は、動脈硬化性病変進展を遅らせることを目的とする適応性反応であることが示唆された。PPAR- α と PPAR- γ アゴニストの両方が細胞外マトリクスメタロプロテアーゼ誘発因子を抑制し、その結果 matrix metalloproteinase 9 分泌とマクロファージおよび泡沫細胞の活性を低減し[40]、増加した泡沫細胞形成の抑制[41, 42]および Zucker 糖尿病肥満ラットにおけるグルコース耐性の改善につながっている[43]。臨床研究において、PPAR- α アゴニスト[44]あるいは PPAR- γ アゴニスト[45]で糖尿病患者を治療した場合、粥状硬化性病変の促進を抑制した。PPAR- α と PPAR- γ の両者が粥状硬化につながる一連のイベントに保護的に関わるというこれらの報告と脂肪線条と粥腫において PPAR- α と PPAR- γ 発現の相関関係を認めた本研究知見を併せて考えると、PPARs アゴニストや PPAR- α/γ コアゴニストを併用して治療することで粥状硬化の抑制に相乗効果が期待されることを示唆している。

6. まとめ

PPAR- α および PPAR- γ mRNA は、粥腫と脂肪線条に高頻度に発現した。また、PPAR- α および PPAR- γ mRNA は、いくつかの DIT にも発現した。

粥腫における PPAR- α および PPAR- γ mRNA 発現レベルは、DIT における発現レベルより有意に高かった。さらに、DIT における PPAR- α および PPAR- γ mRNA 発現レベルは、粥腫における PPAR- α および PPAR- γ

mRNA 発現レベルに比例していなかった。このことは、PPAR- α および PPAR- γ mRNA 発現誘導は、循環血に関連した全身性要因ではなく大動脈血管壁内の個々の病変の炎症性反応により調節されていることを示唆している。

PPAR- γ タンパク質は、粥腫のマクロファージ、単核球、内膜平滑筋細胞および血管内皮細胞の核内に局在を認めた。PPAR- γ タンパク質発現は、いくつかの DIT に認めた。それらの発現は、内膜浸潤マクロファージ、炎症性細胞および活性化平滑筋細胞に認めた。

粥腫では、細胞増殖活性が有意に増加した。しかし、PPAR- α および PPAR- γ mRNA 発現と細胞増殖活性との関連は認めなかった。また、PPAR- α および PPAR- γ mRNA 発現は、DIT および脂肪線条の両者において内膜浸潤マクロファージ数とも関連は認めなかった。

本研究は、ヒト動脈壁における PPAR- α および PPAR- γ 発現増加は粥腫の形成と関連すること、PPAR- γ 発現増加は動脈硬化性病変進展過程の早期から関与することを示唆している。

7. 謝辞

本研究は、日本大学医学部病態病理学系病理学分野で、三俣昌子教授による御指導のもとに行ったものである。研究について終始適切な助言を賜り、また丁寧に指導して頂き、深く感謝いたします。

本研究の遂行に当たり、日本大学医学部病態病理学系病理学分野 櫻井勇名誉教授および根本則道主任教授には、研究のご許可から論文の指導まで幅広い御指導をいただきました。心より感謝いたします。

有益なご意見ならびに実験のご協力をいただきました日本大学医学部病態病理学系病理学分野 関係諸氏に深く感謝いたします。

最後に本研究の施行にあたり、快く協力して頂いた患者様およびご家族の皆様へ深く感謝いたします。本当にありがとうございました。

Table 1 General data of examined cases and the number of samples used.

Case number	Gender	Age (years)	Clinical diagnosis	Sampling time after death	Classification of aortic lesions by microscopically		
					Diffuse intimal thickening n = 21	Fatty streak n = 13	Atheromatous plaque n = 48
1	Female	68	Liver cirrhosis	1 hr 24 m	...	3	...
2	Female	88	Arterial obstruction of lower extremities	1 hr 49 m	...	1	1
3	Male	51	Bronchopneumonia	3 hrs 16 m	...	1	2
4	Male	73	Urinary bladder carcinoma	3 hrs 35 m	1	...	1
5	Female	64	Cerebral infarction	2 hrs 40 m	1	...	1
6	Female	25	Multiple sclerosis	6 hrs 19 m	1	1	...
7	Female	84	Uterine cervical cancer	1 hr 22 m	1	...	2
8	Male	68	Lung cancer	2 hrs 8 m	1
9	Female	72	Non-Hodgkin's lymphoma	1 hr 26 m	1	...	1
10	Male	79	Urinary bladder carcinoma	2 hrs 37 m	3
11	Female	54	Cardiac asthma	2 hrs 57 m	1	...	3
12	Male	13	Acute lymphocytic leukemia	2 hrs 32 m	1
13	Female	67	Rectal cancer with metastasis	3 hrs 25 m	...	1	2
14	Female	73	Malignant lymphoma	3 hrs 43 m	1	...	1
15	Male	75	Gastric carcinoma with metastasis	3 hrs 25 m	1	...	1
16	Male	72	Renal cell carcinoma of right kidney	2 hrs 57 m	1
17	Male	84	Papillary carcinoma of the thyroid gland	2 hrs 38 m	3
18	Male	70	Laryngeal carcinoma with metastasis	3 hrs	1
19	Male	67	Polmonary thrombo-embolism	3 hrs 44 m	1	...	2
20	Male	56	Cerebral infarction	3 hrs 4 m	1	...	2
21	Female	68	Progressive systemic sclerosis	1 hr 58 m	1	1	1
22	Male	68	Urinary bladder carcinoma	3 hrs 13 m	1	...	2
23	Male	47	Hepatocellular carcinoma	2 hrs 35 m	1
24	Male	73	Liver cirrhosis with hepatocellular carcinoma	2 hrs	1	...	2
25	Male	68	Fulminant hepatitis	1 hr 48 m	3
26	Male	35	Hodgkin's disease	2 hrs 3 m	1	2	...
27	Male	71	Pleomorphic carcinoma of right lung with	2 hrs 2 m	1	1	1
28	Male	66	Sepsis	1 hr 22 m	...	1	3
29	Female	64	Diabetic mellitus and its related lesions	1 hr 44 m	...	1	2
30	Male	57	Hepatocellular carcinoma	2 hrs 55 m	1	...	3
31	Male	60	Gastric carcinoma with metastasis	2 hrs 25 m	1
32	Male	63	Malignant lymphoma	3 hrs 40 m	1
33	Female	61	Lung cancer	2 hrs 16 m	1
34	Male	81	Bronchopneumonia	2 hrs 45 m	2
35	Male	69	Multiple myeloma	2 hrs 45 m	1

Ellipsis indicates not collected

Table 2 Primer sequences and expected product size.

Gene	Primer	Sequence	Primer Location	Expected Product Size (bp)
PPAR- α	Primer 1	Sense	CCA GTA TTT AGG ACG CTG TCC	374-394
		Antisense	AAG TTC TTC AAG TAG GCC TCG	845-865
PPAR- α	Primer 2	Sense	GAG ATT TCG CAA TCC ATC GGC	318-338
		Antisense	AAG TTC TTC AAG TAG GCC TCG	845-865
PPAR- γ	Primer 3	Sense	TCT CTC CGT AAT GGA AGA CC	235-254
		Antisense	GCA TTA TGA GAC ATC CCC AC	689-708
PPAR- γ	Primer 4	Sense	TTG AAT GTC GTG TCT GTG GA	498-517
		Antisense	CTT TTG GCA TAC TCT GTG AT	1061-1080
PPAR- γ	Primer 5	Sense	TCT CTC CGT AAT GGA AGA CC	235-254
		Antisense	CTT TTG GCA TAC TCT GTG AT	1061-1080

Table 3 Expression rates of PPAR- α and PPAR- γ in human aorta.

Microscopic Findings	DIT	Fatty streak	Atheromatous plaque
Gene/No. of specimens	18	13	45
PPAR- α	9 (50.0%)	8 (61.5%)	35 (77.8%)
PPAR- γ	15 (83.3%)	13 (100.0%)	42 (93.3%)

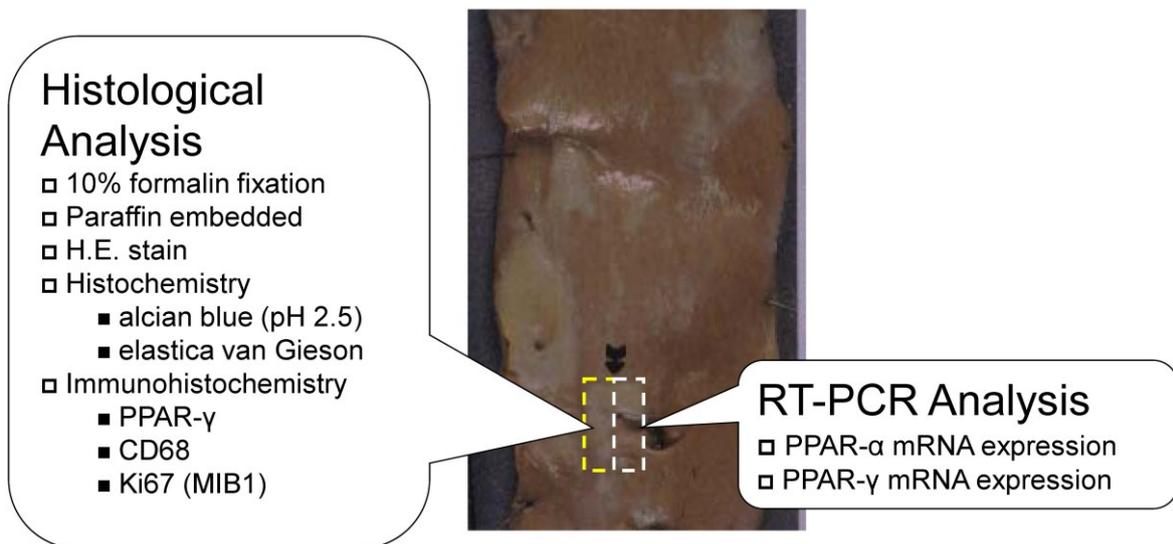


Figure 1. Study methodology.

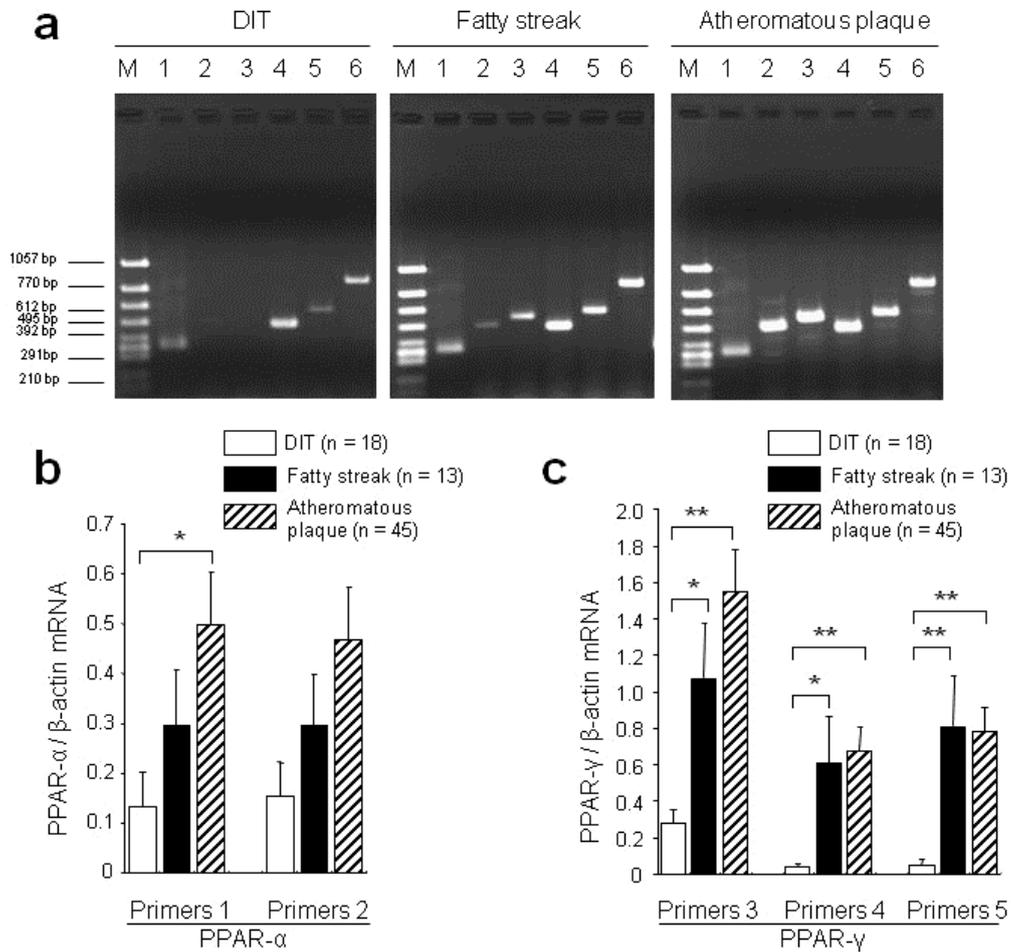


Figure 2. Expression of PPAR- α and PPAR- γ mRNA in human aortas. PPAR- α and PPAR- γ mRNA expression in the aorta from a representative case (a). M: molecular weight markers; 1: β -actin; 2: PPAR- α (Primers 1: 491 bp); 3: PPAR- α (Primers 2: 547 bp); 4: PPAR- γ (Primers 3: 473 bp); 5: PPAR- γ (Primers 4: 582 bp); 6: PPAR- γ (Primers 5: 845 bp). Densitometric analysis of the PPAR- α (b) and PPAR- γ (c) mRNA expression. The total RNA extracted from individual aortic specimens was analyzed by RT-PCR using primers 1 and 2, which are specific for PPAR- α , and using primers 3, 4, and 5, which are specific for PPAR- γ . Values were normalized to the β -actin mRNA and are expressed as means \pm SEM. *, **: significantly different from the DIT at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively (Dunnett's test).

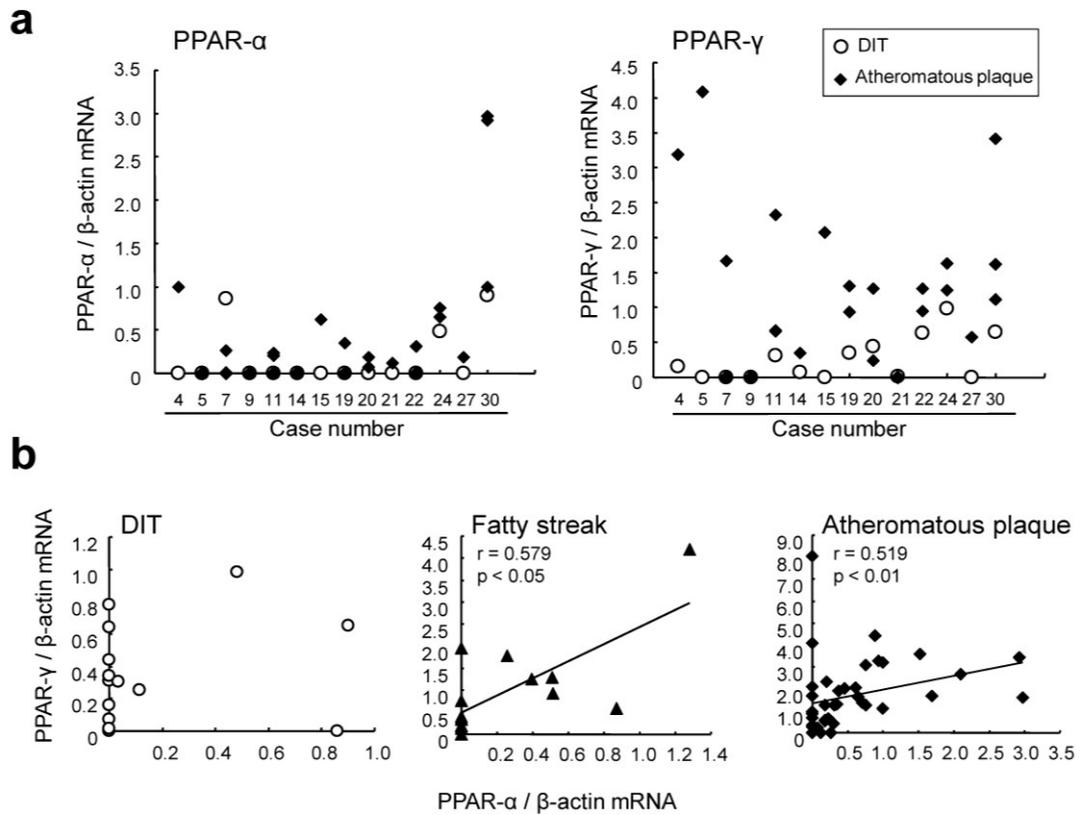


Figure 3. Comparison of the mRNA expression level in atheromatous plaques with that in the DIT in individual cases, and between the PPAR- α and PPAR- γ mRNA expression levels within each atheromatous sample for each type of lesion.

In each individual case ($n = 14$), the expression levels of PPAR- α and PPAR- γ in the DIT were not proportional to those in the atheromatous plaque (a). The expression level of PPAR- α correlated with that of PPAR- γ in the fatty streaks and atheromatous plaques (b).

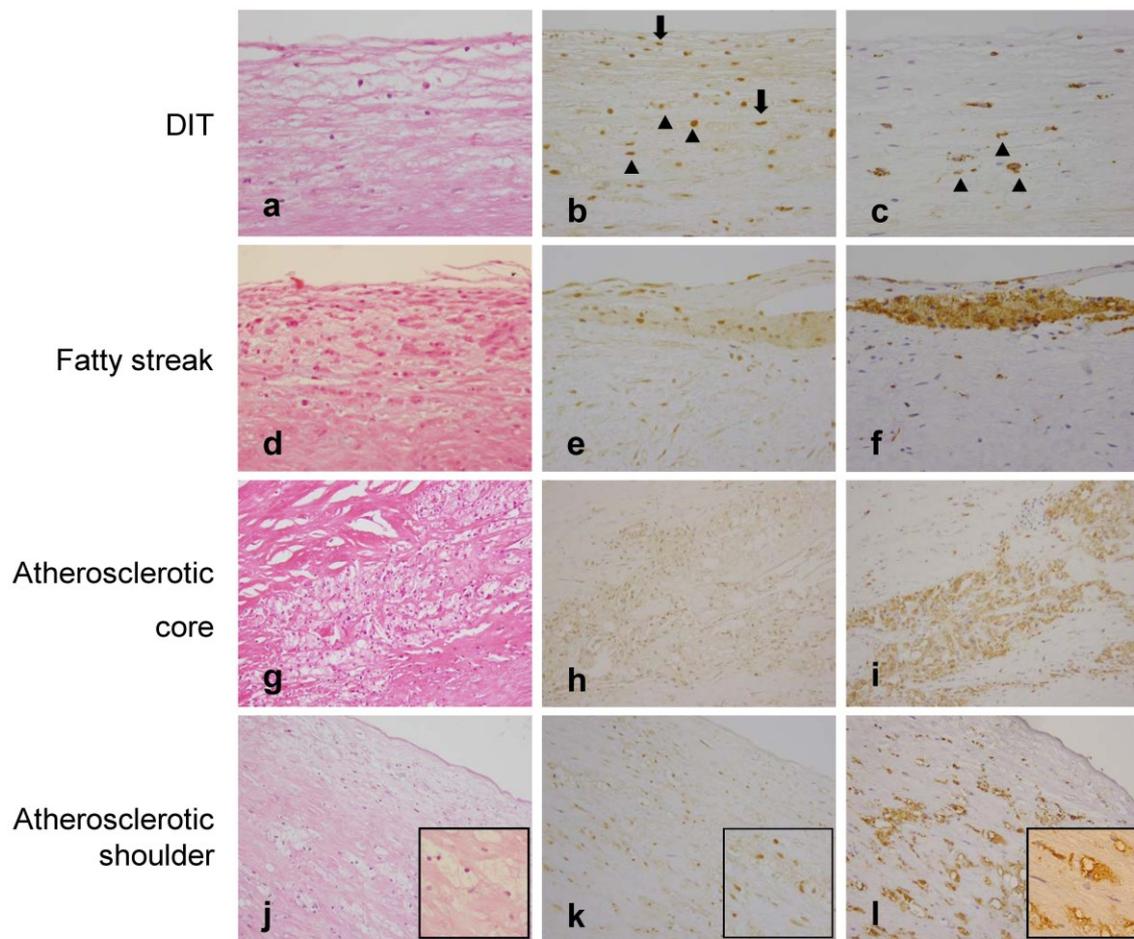


Figure 4. PPAR- γ protein expression in DIT, fatty streaks, and atheromatous plaques.

Sections from DIT (a, b, and c), fatty streaks (d, e, and f) and atheromatous plaques (g to l) were stained with hematoxylin and eosin (a, d, g, and j), or reacted with the anti-PPAR- γ antibody (b, e, h, and k) or anti-CD68 antibody to detect macrophages (c, f, i, and l), and visualized by the avidin-biotin complex method. PPAR- γ was detected in the nuclei of macrophages in the DIT (arrowheads in b and c) and in fatty streaks, and in intimal smooth muscle cells (arrow in c). Comparison of CD68-positive staining and PPAR- γ immunoreactivity indicated that the PPAR- γ protein was mainly localized to macrophages. The boxed areas are shown in higher magnification in the same panel. Original magnification $\times 100$ and $\times 250$ (boxed area in j, k, and l).

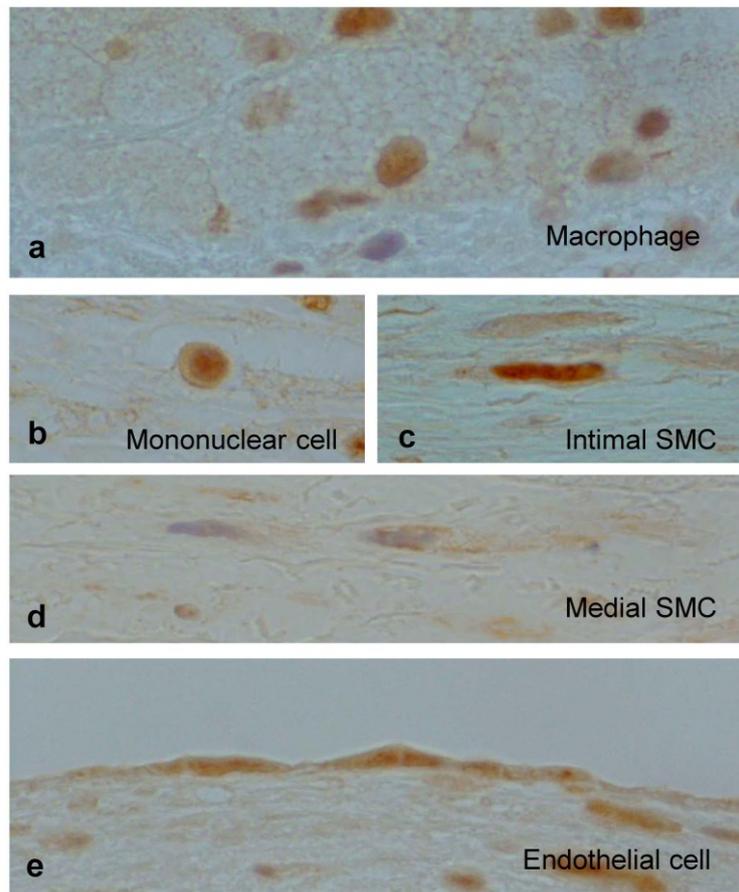


Figure 5. Localization of the PPAR- γ protein in the aorta.

The PPAR- γ protein was expressed in the nuclei of macrophages (a), mononuclear cells (b), intimal smooth muscle cells (c), and endothelial cells (e), and also weakly in the cytoplasm of medial smooth muscle cells (d). ABC method counterstained with hematoxylin. Original magnification $\times 250$.

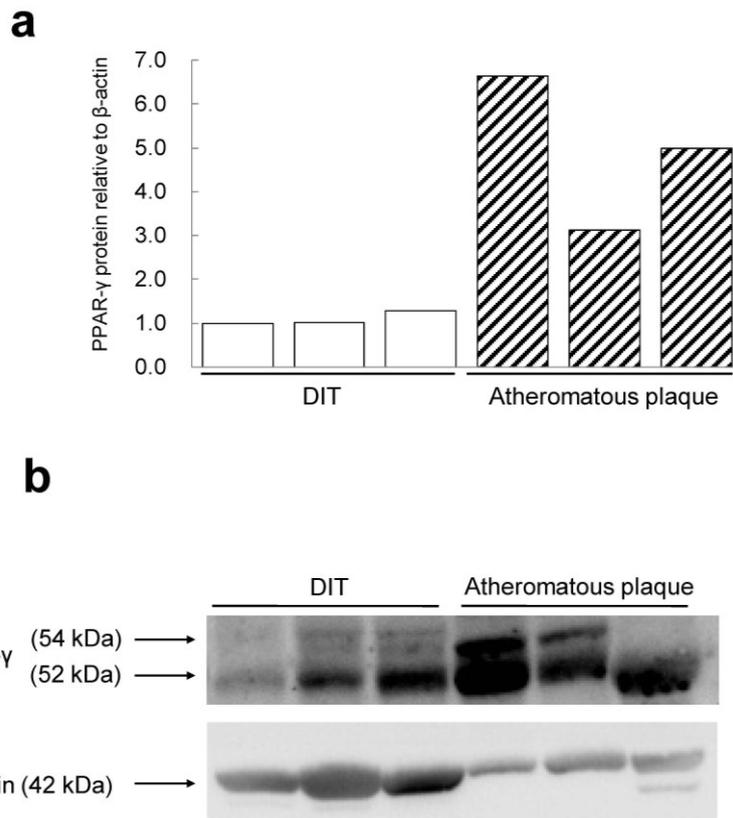


Figure 6. PPAR- γ protein expression analyzed by Western blotting. Six samples from human aortas, composed of 3 DIT and 3 atheromatous plaques, were obtained from 5 autopsied individuals (b). The same blot was reprobated with a specific anti- β -actin antibody and then relative ratios were quantified (a).

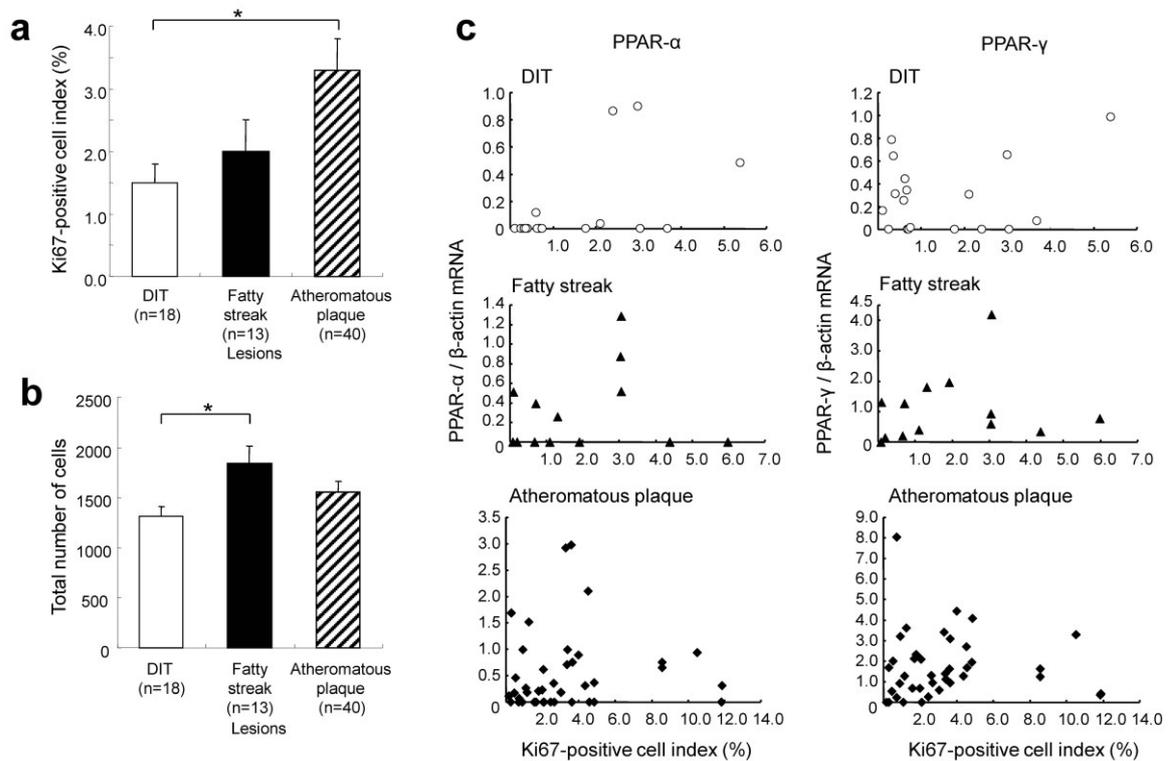


Figure 7. Percentage of Ki67-positive cells (a) and total number of cells (b) in the intima of human aorta, and comparison of PPAR mRNA expression with cell proliferation (c).

Sections from DIT (n = 18), fatty streak (n = 13), and atheromatous plaques (n = 40) were immunohistochemically stained with the anti-Ki67 antibody to detect proliferating cells, using the avidin-biotin complex method. (a) The Ki67-positive cells in the intima was calculated (number of Ki67-positive nuclei / total number of nuclei). (c) The labeling indexes of cell growth did not correlate with the expression levels of PPAR- α (left panel) or PPAR- γ mRNA (right panel) in the DIT (open circles), fatty streak (solid triangles), or atheromatous plaques (solid squares).

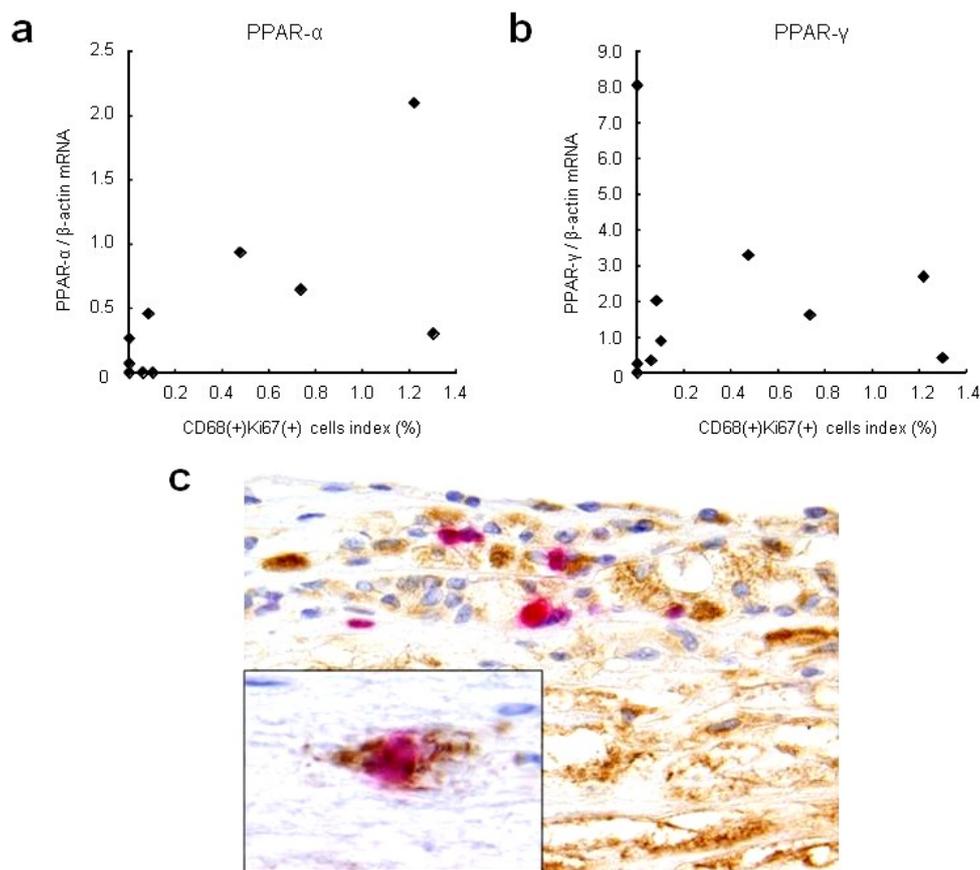
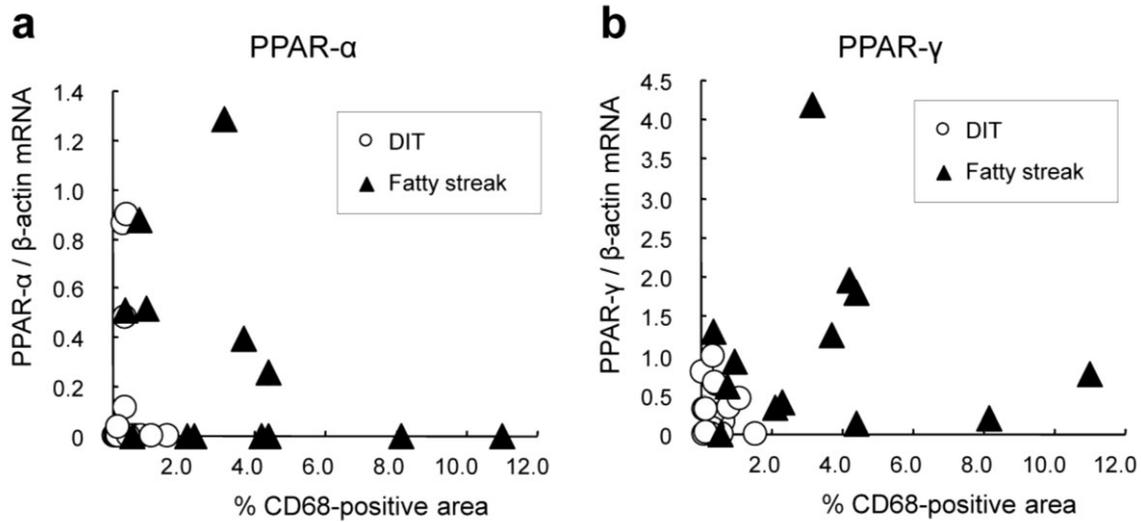


Figure 8. Comparison of the mRNA expression of PPAR- α (a) and PPAR- γ (b) with the macrophage proliferation.

The Ki67-positive cell index in CD68-positive macrophages was analyzed by double staining in atheromatous plaque, and was indicated at horizontal axis. C: Double immunostaining for CD68 (brown cytoplasm) and Ki-67 (red nuclei) in atheromatous plaque. Inset: high power view of Ki67-positive and CD68-positive macrophage. The labeling indexes of macrophage growth did not correlate with the expression levels of PPAR- α or PPAR- γ mRNA in atheromatous plaque.



8. 引用文献

- [1] Ross R. Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.* 340 (1999) 115-126.
- [2] Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420 (2002) 868-874.
- [3] Nakashima Y, Chen YX, Kinukawa N, Sueishi K. Distributions of diffuse intimal thickening in human arteries: preferential expression in atherosclerosis-prone arteries from an early age. *Virchows Arch.* 441 (2002) 279-288.
- [4] Stary HC, Blankenhorn DH, Chandler AB, Glagov S, Insull WJ, Richardson M, Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD. A definition of the intima of human arteries and of its atherosclerosis-prone regions. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb.* (1992) 120-134.
- [5] Nakashima Y, Fujii H, Sumiyoshi S, Wight TN, Sueishi K. Early human atherosclerosis: accumulation of lipid and proteoglycans in intimal thickenings followed by macrophage infiltration. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27 (2007) 1159-1165.
- [6] Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull WJ, Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation.* 89 (1994) 2462-2478.
- [7] Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Schwartz SM. Lessons from sudden coronary death. A comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 20 (2000) 1262-1275.

- [8] Kumamoto M, Nakashima Y, Sueishi K. Intimal neovascularization in human coronary atherosclerosis: its origin and pathophysiological significance. *Hum Pathol.* (1995) 450-456.
- [9] Davies MJ, Thomas AC. Plaque fissuring--the cause of acute myocardial infarction, sudden ischaemic death, and crescendo angina. *Br Heart J.* 53 (1985) 363-373.
- [10] 居石克夫: ヒト動脈硬化症の発生, 進展に関する最近の話題 「貯留反応説」と新生血管の多面性. *福岡医誌.* 100 (2009) 1-12.
- [11] Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 347 (1990) 645-650.
- [12] Chawla A, Repa J, Evans R, Mangelsdorf D. Nuclear receptors and lipid physiology: Opening the X-files. *Science* 294 (2001) 1866-1870.
- [13] Barbier O, Torra IP, Duguay Y, Blanquart C, Fruchart JC, Glineur C, Staels B. Pleiotropic actions of peroxisome proliferator-activated receptors in lipid metabolism and atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22 (2002) 717-726.
- [14] Kersten S, Desvergne B, Wahli W. Roles of PPARs in health and disease. *Nature* 405 (2000) 421-424.
- [15] Yessoufou A, Wahli W. Multifaceted roles of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) at the cellular and whole organism levels. *Swiss Med Wkly.* 140 (2010) w13071.
- [16] Gizard F, Amant C, Barbier O, Bellosta S, Robillard R, Percevault F, Sevestre H, Krimpenfort P, Corsini A, Rochette J, Glineur C, Fruchart JC, Torpier G, Staels B. PPARalpha inhibits vascular smooth muscle cell proliferation underlying intimal hyperplasia by inducing the tumor suppressor p16. *J. Clin. Invest.* 115 (2005) 3228-3238.
- [17] Wakino S, Kintscher U, Kim S, Yin F, Hsueh WA, Law RE. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands inhibit retinoblastoma

- phosphorylation and G1--> S transition in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 22435-22441.
- [18] Zandbergen F, Mandard S, Escher P, Tan NS, Patsouris D, Jatkoe T, Rojas-Caro S, Madore S, Wahli W, Tafuri S, Muller M, Kersten S. The G0/G1 switch gene 2 is a novel PPAR target gene. *Biochem. J.* 392 (2005) 313-324.
- [19] Li AC, Palinski W. Peroxisome proliferator-activated receptors: How their effects on macrophages can lead to the development of a new drug therapy against atherosclerosis. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 46 (2006) 1-39.
- [20] Israelian-Konarakaki Z, Reaven PD. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and atherosclerosis: From basic mechanisms to clinical implications. *Cardiology* 103 (2005) 1-9.
- [21] Takano H, Hasegawa H, Zou Y, Komuro I. Pleiotropic actions of PPARgamma activators thiazolidinediones in cardiovascular diseases. *Current Pharmaceutical Design* 10 (2004) 2779-2786.
- [22] Chawla A, Boisvert WA, Lee CH, Laffitte BA, Barak Y, Joseph SB, Liao D, Nagy L, Edwards PA, Curtiss LK, Evans RM, Tontonoz P. A PPAR gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis. *Mol. Cell* 7 (2001) 161-171.
- [23] Chinetti G, Lestavel S, Bocher V, Remaley AT, Neve B, Torra IP, Teissier E, Minnich A, Jaye M, Duverger N, Brewer HB, Fruchart JC, Clavey V, Staels B. PPAR-alpha and PPAR-gamma activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway. *Nat. Med.* 7 (2001) 53-58.
- [24] Li AC, Binder CJ, Gutierrez A, Brown KK, Plotkin CR, Pattison JW, Valledor AF, Davis RA, Willson TM, Witztum JL, Palinski W, Glass CK. Differential inhibition of macrophage foam-cell formation and atherosclerosis in mice by PPARalpha, beta/delta, and gamma. *J. Clin.*

- Invest. 114 (2004) 1564-1576.
- [25] Staels B, Koenig W, Habib A, Merval R, Lebret M, Torra IP, Delerive P, Fadel A, Chinetti G, Fruchart JC, Najib J, Maclouf J, Tedgui A. Activation of human aortic smooth muscle cells is inhibited by PPARalpha but not by PPARgamma activators. *Nature* 393 (1998) 790-793.
- [26] Ricote M, Huang J, Fajas L, Li A, Welch J, Najib J, Witztum JL, Auwerx J, Palinski W, Glass CK. Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) in human atherosclerosis and regulation in macrophages by colony stimulating factors and oxidized low density lipoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95 (1998) 7614-7619.
- [27] Marx N, Sukhova G, Murphy C, Libby P, Plutzky J. Macrophages in human atheroma contain PPARgamma: differentiation-dependent peroxisomal proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) expression and reduction of MMP-9 activity through PPARgamma activation in mononuclear phagocytes in vitro. *Am. J. Pathol.* 153 (1998) 17-23.
- [28] Law RE, Goetze S, Xi XP, Jackson S, Kawano Y, Demer L, Fishbein MC, Meehan WP, Hsueh WA. Expression and function of PPARgamma in rat and human vascular smooth muscle cells. *Circulation* 101 (2000) 1311-1318.
- [29] Chinetti G, Gbaguidi FG, Griglio S, Mallat Z, Antonucci M, Poulain P, Chapman J, Fruchart JC, Tedgui A, Najib-Fruchart J, Staels B. CLA-1/SR-BI is expressed in atherosclerotic lesion macrophages and regulated by activators of peroxisome proliferator-activated receptors. *Circulation* 101 (2000) 2411-2417.
- [30] Sueyoshi S, Yamada T, Niihasi M, Kusumi Y, Oinuma T, Esumi M, Tsuru K, Imai S, Nemoto N, Sakura I, Mitsumata M. Expression of

- peroxisome proliferator-activated receptor subtypes in human atherosclerosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 947 (2001) 429-432.
- [31] Chomczynski P, Sacchi N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 161 (1987) 156-159.
- [32] Jemiolo B and Trappe S. Single muscle fiber gene expression in human skeletal muscle: validation of internal control with exercise. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320 (2004) 1043-1050.
- [33] Fukuchi M, Watanabe J, Kumagai K, Baba S, Shinozaki T, Miura M, Kagaya Y, Shirato K, Normal and oxidized low density lipoproteins accumulate deep in physiologically thickened intima of human coronary arteries. *Lab. Invest.* 82 (2002) 1437-1447.
- [34] Nagy L, Tontonoz P, Alvarez JG, Chen H, Evans RM. Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma. *Cell* 93 (1998) 229-240.
- [35] Upston JM, Niu X, Brown AJ, Mashima R, Wang H, Senthilmohan R, Kettle AJ, Dean RT, Stocker R. Disease stage-dependent accumulation of lipid and protein oxidation products in human atherosclerosis. *Am. J. Pathol.* 160 (2002) 701-710.
- [36] Kumagai T, Matsukawa N, Kaneko Y, Kusumi Y, Mitsumata M, Uchida K. A lipid peroxidation-derived inflammatory mediator: identification of 4-hydroxy-2-nonenal as a potential inducer of cyclooxygenase-2 in macrophages. *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 48389-48396.
- [37] Meuwissen M, van der Wal AC, Niessen HW, Koch KT, de Winter RJ, van der Loos CM, Rittersma SZ, Chamuleau SA, Tijssen JG, Becker AE, Piek JJ. Colocalisation of intraplaque C reactive protein, complement, oxidised low density lipoprotein, and macrophages in stable and unstable angina and acute myocardial infarction. *J. Clin. Pathol.* 59 (2006) 196-201.

- [38] Zahradka P, Wright B, Fuerst M, Yurkova N, Molnar K, Taylor CG. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma ligands differentially affect smooth muscle cell proliferation and migration. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 317 (2006) 651-659.
- [39] Venkata NG, Robinson JA, Cabot PJ, Davis B, Monteith GR, Roberts-Thomson SJ, Mono(2-ethylhexyl)phthalate and mono-n-butyl phthalate activation of peroxisome proliferator activated-receptors alpha and gamma in breast. *Toxicol. Lett.* 163 (2006) 224-234.
- [40] Zhang J, Ge H, Wang C, Guo TB, He Q, Shao Q, Fan Y. Inhibitory effect of PPAR on the expression of EMMPRIN in macrophages and foam cells. *Int. J. Cardiol.* 117 (2007) 373-380.
- [41] Sauerberg P, Pettersson I, Jeppesen L, Bury PS, Mogensen JP, Wassermann K, Brand CL, Sturis J, Woldike HF, Fleckner J, Andersen AS, Mortensen SB, Svensson LA, Rasmussen HB, Lehmann SV, Polivka Z, Sindelar K, Panajotova V, Ynddal L, Wulff EM. Novel tricyclic-alpha-alkyloxyphenylpropionic acids: dual PPARalpha/gamma agonists with hypolipidemic and antidiabetic activity. *J. Med. Chem.* 45 (2002) 789-804.
- [42] Ye JM, Iglesias MA, Watson DG, Ellis B, Wood L, Jensen PB, Sorensen RV, Larsen PJ, Cooney GJ, Wassermann K, Kraegen EW. PPARalpha/gamma ragaglitazar eliminates fatty liver and enhances insulin action in fat-fed rats in the absence of hepatomegaly. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 284 (2003) E531-540.
- [43] Bergeron R, Yao J, Woods JW, Zycband EI, Liu C, Li Z, Adams V, Berger JP, Zhang BB, Moller DE, Doebber TW. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-alpha agonism prevents the onset of type 2 diabetes in Zucker diabetic fatty rats: A comparison with PPARgamma agonism. *Endocrinology* 147 (2006) 4252-4262.
- [44] Vakkilainen J, Steiner G, Ansquer JC, Aubin F, Rattier S, Foucher C,

- Hamsten A, Taskinen MR. Relationships between low-density lipoprotein particle size, plasma lipoproteins, and progression of coronary artery disease: the Diabetes Atherosclerosis Intervention Study (DAIS). *Circulation* 107 (2003) 1733-1737.
- [45] Minamikawa J, Tanaka S, Yamauchi M, Inoue D, Koshiyama H. Potent inhibitory effect of troglitazone on carotid arterial wall thickness in type 2 diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83 (1998) 1818-1820.

研 究 業 績

氏 名

末吉 純久

1	発表	①一般発表	20	
		②特別発表	なし	
2	論文	① 原著論文	5 (共	5)
		② 症例報告	なし	
		③ 総説	なし	
3	著書		なし	

以上

1 発表

①一般発表

1. 新橋真理, 楠美嘉晃, 芳賀孝之, 濱田智美, 中村仁美, 末吉純久, 齊藤 誠, 桜井 勇: 大動脈における fatty raised lesion と fibrous plaque の組織学的検討, 平成 9 年度日本動脈硬化学会冬季大会, 広島, 1997 年 11 月
2. S. Sueyoshi, T. Oinuma, T. Yamada, I. Sakurai, T. Ueno, E. Saito, T. Fujioka: The Effect of Minimally Oxidized Low Density Lipoprotein (MMLDL) on Cultured Smooth Muscle Cell and Endothelium. Xth International Vascular Biology Meeting, August 23-27, 1998, Cairns, Australia.
3. S. Sueyoshi, T. Oinuma, T. Yamada, I. Sakurai, M. Kobayashi: Analyses of Glycated Low Density Lipoprotein on Cultured Human Smooth Muscle Cell and Endothelium, With or Without Oxidation Growth Factor and Apoptosis. The American College of Angiology. 45th Annual World Assembly. October 11-16, 1998, New Orleans, USA
4. 新橋真理, 末吉純久, 楠美嘉晃, 鹿 巍, 絹川典子, 大野 力, 佐藤 裕, 齊藤 誠, 谷口由樹, 清水智雄, 坂東 勉, 桜井 勇: 家兔動脈硬化病変の脂質沈着様式と血清脂質の変動に関する検討, 平成 10 年度日本動脈硬化学会冬季大会, 千葉, 1998 年 11 月
5. 新橋真理, 末吉純久, 楠美嘉晃, 鹿 巍, 佐藤 裕, 森 雅博, 高野達哉, 谷口由樹, 松本秀俊, 根本則道, 桜井 勇: 家兔動脈硬化退縮モデルにおける同一病変の推移についての検討, 第 31 回日本動脈硬化学会総会, 宮崎, 1999 年 6 月

6. Oinuma T, Ohni S, Yamada T, Sakurai I, Sueyoshi S, and Fujioka T: The Effect of Modified Low Density Lipoprotein on Vascular Cells –Especially Interaction between Endothelium and Smooth Muscle Cell–. The American College of Angiology. 46th Annual World Assembly. October 3-8, 1999, Hawai, USA

7. S. Sueyoshi, M. Niihasi, T. Oinuma, T. Yamada, N. Nemoto, M. Mitsumata, S. Imai, and I. Sakurai: Expression of peroxisome proliferator-activated receptors in atherosclerosis of human aorta. Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology, supplements, 32:480, 2000. XIth International Vascular Biology Meeting, September 5-9, 2000, Geneva, Switzerland.

8. Tsutomu Yamada, Sumihisa Sueyoshi, Satoshi Iwasa, Aleemuzzaman Sheikh, Toshinori Oinuma, Yoshiaki Kusumi, Masako Mitsumata, Takayuki Fujioka: A Study on Atherosclerotic Regression and Expression of Peroxisome Proliferator-activated Receptors with Refferences of Centrally Depressed Atherosclerotic Plaque: The American College of Angiology. 47th Annual World Assembly. October 29-November 3, 2000, Oriando, U.S.A.

9. Sumihisa Sueyoshi, Tsutomu Yamada, Yoshiaki Kusumi, Mari Niihasi, Mariko Esumi, Norimichi Nemoto, Isamu Sakurai, and Masako Mitsumata: A study on expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) subtype in human atherosclerosis. The Sixth Saratoga International Conference on Atherosclerosis, April 3-6, 2001, Tokyo, Japan.

10. 山田 勉, 末吉純久, 生沼利倫, 大荷澄江, 三俣昌子, 上野高浩, 藤岡考之, 上松瀬勝男: 高齢者動脈硬化退縮の検討(7) 陥凹性病変における PPARs 発現の意義, 第 43 回日本老年医学会学術集会, 大阪, 2001 年 6 月
11. 山田 勉, 生沼利倫, 末吉純久, 新橋眞理, 三俣昌子, 上野高浩, 藤岡考之, 長谷川憲司, 長岡 均, 板倉弘重: 高コレステロール食負荷家兎動脈硬化性病変におよぼす *Lentinus edodes mycelia* の影響についての検討, 第 33 回日本動脈硬化学会総会, 東京, 2001 年 6 月
12. Mari Niihasi, Sumihisa Sueyoshi, Yoshiaki Kusumi, Isamu Sakurai, Masako Mitsumata: Intravascular Ultrasound Assessment of Arterial Remodeling in the Atherosclerotic Lesions in Rabbit Aorta. *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology, supplements*, 32:480, 2002. XIIth International Vascular Biology Meeting, May 12-16, 2002, Karuizawa, Japan.
13. Y. Kusumi, S. Sueyoshi, M. Niihasi, M. Mitsumata: Homocysteine induces osteoblast differentiation of fibroblasts in vitro. *Atherosclerosis, supplements*, 4:122, 2003. XIIIth International Symposium on Atherosclerosis, September 28-October 2, 2003, Kyoto, Japan.
14. T. Yamada, T. Oinuma, S. Sueyoshi, M. Mitsumata, H. Watanabe, T. Ueno, T. Fujioka, K. Hasegawa, H. Nagaoka, and H. Itakura: Effects of *Lentinus edodes mycelia* on Dietary-Induced Atherosclerosis in Rabbit Aorta with Morphometric Analyses. *Atherosclerosis, supplements*, 4:163, 2003. XIIIth International Symposium on Atherosclerosis, September 28-October 2, 2003, Kyoto, Japan.

15. S. Sueyoshi, T. Yamada, M. Esumi, Y. Kusumi, M. Niihasi, K. Tsuru, S. Imai, N. Nemoto, I. Sakurai, and M. Mitsumata: Variable expression of peroxisome proliferator-activated receptors in human atherosclerosis. *Atherosclerosis, supplements*, 4:217, 2003. XIIIth International Symposium on Atherosclerosis, September 28-October 2, 2003, Kyoto, Japan.
16. 波多野 弁, 楠美嘉晃, 末吉純久, 林 紀乃, 三俣昌子: 冠状動脈石灰化病変における COX2 の発現, 第 93 回日本病理学会総会, 札幌, 2004 年 6 月
17. Sumihisa Sueyoshi, Yoshiaki Kusumi, Mariko Esumi, Tsutomu Yamada, Kiyoyuki Tsuru, Shigeru Imai, Norimichi Nemoto, Isamu Sakurai and Masako Mitsumata: Expression of Peroxisome Proliferator-activated Receptor (PPAR) alpha and PPARgamma in Human Aorta. 第 36 回日本動脈硬化学会総会, 福岡, 2004 年 7 月
18. 楠美嘉晃, 三俣昌子, 波多野弁, 末吉純久: ヒト冠動脈石灰化巣における酸化ストレスの存在, 第 9 回血管病理研究会, 東京, 2004 年 10 月
19. 波多野 弁, 末吉純久: メタボリック症候群及び動脈硬化性病変における PPARs の役割について, 第 97 回日本病理学会総会 ワークショップ, 金沢, 2008 年 5 月
20. 末吉純久, 三俣昌子, 楠美嘉晃, 新橋真理, 江角真理子, 山田 勉, 櫻井 勇: ヒト動脈硬化性病変における PPAR- α 及び PPAR- γ の発現増加, 第 13 回血管病理研究会, 東京, 2008 年 10 月

2 論文

①原著論文

1. 佐藤裕, 新橋真理, 末吉純久: 血管内エコーによる家兎大動脈粥状硬化と血管リモデリングの病態把握. 日大医学雑誌, 59(10): 492-498, 2000.
2. Sumihisa Sueyoshi, Tsutomu Yamada, Mari Niihasi, Yoshiaki Kusumi, Toshinori Oinuma, Mariko Esumi, Kiyoyuki Tsuru, Shigeru Imai, Norimichi Nemoto, Isamu Sakurai, and Masako Mitsumata: Expression of peroxisome proliferator-activated receptor subtypes in human atherosclerosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 947:429-432, 2001.
3. 山田 勉, 末吉純久, 大荷澄江, 生沼利倫, 三俣昌子, 渡辺英幸, 松本太郎, 上野高浩, 藤岡考之, 上松瀬勝男: 高齢者動脈硬化症の退縮に関する研究 (4) 中心性陥凹を呈する動脈硬化性病変と peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) 発現についての検討. 日本老年医学会雑誌, 41:105-111, 2004.
4. Yamada T, Satoh S, Sueyoshi S, Mitsumata M, Matsumoto T, Ueno T, Uehara K, Mizutani T: Ubiquitin-positive foam cells are identified in the aortic and mitral valves with atherosclerotic involvement. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*. 16:472-479, 2009.

5. Sumihisa Sueyoshi, Masako Mitsumata, Yoshiaki Kusumi, Mari Niihasi, Mariko Esumi, Tsutomu Yamada, Isamu Sakurai: Increased expression of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- α and PPAR- γ in human atherosclerosis. *Pathology - Research and Practice*. 206:429-438, 2010.

② 症例報告 該当なし

③ 総説 該当なし

3 著書 該当なし