

酸化ストレスによる血管内皮細胞
のアポトーシス誘導

— エストロゲンの抗動脈硬化作用における意義 —

須藤 紀子

酸化ストレスによる血管内皮細胞 のアポトーシス誘導

—エストロゲンの抗動脈硬化作用における意義—

須藤 紀子

目 次

1. 背景・目的	-----	1
2. 方法	-----	3
3. 結果	-----	11
4. 考察	-----	29
5. 文献	-----	35

1. 背景・目的

血管内皮細胞は正常な血管のホメオスタシスを維持するうえでさまざまな生理機能を有する。これまでの多くの研究は、血管内皮が傷害されると白血球や血小板の接着亢進、透過性亢進、凝固能亢進などの現象がもたらされ¹⁾、また血管内皮による血管作動物質やサイトカイン、成長因子の産生亢進といった内皮機能自体の変化がみられることを報告してきた^{2)~4)}。一方内皮が広範に剥離 (denudation) されると、新生内膜肥厚や中膜肥厚が観察され、「血管内皮傷害 (および内皮機能の変化) が動脈硬化初期病変形成の機序である」という、Ross らの "response-to-injury hypothesis" ⁵⁾ が実証されてきたと考えられている。

臨床的に内皮を傷害する物質として、酸化 LDL ⁶⁾ や喫煙、虚血・再還流^{7)~21)}、高血圧²²⁾、糖尿病^{23), 24)} などによって生じる hydrogen peroxide や superoxide などの free radical ^{25), 26)} の関与が重要視されている。最近 in vitro の実験において、酸化 LDL ^{27)~30)} や hydrogen peroxide・superoxide などの free radical ^{29), 31)}、TNF α などある種のサイトカイン^{32), 33)} により血管内皮細胞にアポトーシスが誘導されることが報告された。これらの報告は、これまでのような denudation による広範な内皮剥離と同様のメカニズムで、アポトーシスによる内皮傷害が動脈硬化初期病変形成に関与すると仮定している。しかし、in vivo で血管内皮のアポトーシスを観察した報告はない。さらに血管内皮細胞のアポトーシスが動脈硬化病変の形成に関与しているかどうかを直接検討した報告も全くない。

一方、心血管病変の発症率や死亡率に性差があることはよく知られている。閉経前女性の心血管病変の発症頻度は低く、男性の 1/2 以下であるが、閉経後増加し、70 歳以上では性差は認められなくなる³⁴⁾。これは閉経に伴うエストロゲンの減少が原因と考えられており、事実、閉経後女性に対するエストロゲン補充療法は動脈硬化性疾患のリスクを改善するという多くの報告がある^{35), 36)}。

エストロゲンは主に脂質代謝の改善を介した間接的な抗動脈硬化作用を有する^{37)~39)}と報告されてきたが、近年、血管平滑筋細胞や血管内皮細胞にエストロゲン受容体が発

現していることが報告^{9)~11)}され、エストロゲンによる血管組織への直接作用が注目されるようになった。エストロゲンの血管への直接作用として、血管平滑筋細胞では、内皮非依存性血管拡張作用^{12),13)}や増殖抑制作用¹⁴⁾が報告されており、内皮細胞については内皮依存性血管拡張作用^{15)~17)}が報告されている。また内皮細胞とエストロゲンの作用について、近年Salvayreら²³⁾は *in vitro* で酸化LDLによる直接的・間接的な血管内皮障害についてエストロゲンが保護的作用を示すことを報告した。またエストロゲンはサイトカインによる血管内皮傷害に対しても保護的に作用する¹⁸⁾ことが報告されている。一方、*in vivo* の実験においてエストロゲンは内皮再生を促進することで新生内膜肥厚を抑制する²⁰⁾ことが報告され、エストロゲンによる直接的な内皮の保護作用も抗動脈硬化作用の一機序と考えられるようになってきた。しかし、フリー・ラジカル等、酸化LDL以外の酸化ストレスに対するエストロゲンの作用を検討した報告はまだない。近年女性の喫煙率が増加しており、フリー・ラジカルとエストロゲンの関係を検討することは意義深い。

以上の背景をもとに、本研究では *in vivo* および *in vitro* で酸化ストレスにより血管内皮細胞のアポトーシスを誘導し、内皮アポトーシスの動脈硬化への関与とエストロゲンの効果およびその機序について検討することを目的とした。攻撃因子としてはフリー・ラジカルの一つである hydrogen peroxide (H_2O_2) を用いた。まず(1)ラットを用い、*in vivo* で H_2O_2 による内皮傷害モデルを作製し、この傷害におけるアポトーシスの関与について検討する。次に(2)アポトーシスを介した内皮傷害に対するエストロゲンの効果を検討する。また(3)内皮のアポトーシスが内膜肥厚形成に関与するのか、そしてエストロゲンがこれを抑制するかどうかについても検討する。*in vitro* においては、まず(4)ウシ培養血管内皮細胞を用い、 H_2O_2 によるアポトーシスの誘導を生化学的・形態学的手法で確認する。次に *in vivo* 同様、(5) *in vitro* でのアポトーシスに対するエストロゲンの効果について検討する。さらに、(6)エストロゲンのアポトーシス抑制機序に関して、アポトーシス関連遺伝子産物である P53, Bcl-2, Bax 蛋白の発現について検討する。

2. 方法

2-1. 化学物質

Hydrogen peroxide (H_2O_2 30% solution) は和光純薬 (大阪) より購入した。17 β -estradiol (0.5mg) pellet および placebo pellet は Innovative Reserch (Sarasota, FL, USA) より購入した。Evans blue, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), HANKS' balanced salts, phenol red-free DMEM, phenol red-free HANKS' balanced salts, β -estradiol water soluble (E2), 2-hydroxy-propyl- β -cyclodextrin (HPLC), MTT (3-(4,5-dimethyl-thiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide), 4-aminoantipyrine, horseradish peroxidase, catalase は Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) より購入した。RNase, DNase-free, Proteinase K は Boehringer Mannheim (Mannheim, Germany) より購入した。Hoechst 33342 は Calbiochem-Novabiochem Corporation (La Jolla, CA, USA) より購入した。fetal bovine serum (FBS) は Intergen Company (Purchase, NY, USA) より、dextran-coated charcoal 処理したFBS (DCC-FBS) は HyClone Laboratories, Inc. (Logan, Utah, USA) より購入した。rabbit polyclonal anti-Bax antibody は Santa Cruz biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) から、mouse monoclonal anti-Bcl-2 antibody および mouse monoclonal anti-p53 antibody は Transduction Laboratories (Lexington, Kentucky, USA) から、mouse monoclonal anti-estrogen receptor (ER) antibody は Affinity Bioreagents (Neshanic Station, NJ) から購入した。

2-2. 動物

日本生物材料センター (東京) より購入したWistar系雌性ラットを用いた。

ラットは空調 (約 22℃)、照明 (12 時間 on、12 時間 off) 設備の整った部屋で飼育した。

2-3. 卵巣摘除とエストロゲン補充

8 週齢の雌ラットの両側卵巣摘除 (OVX) を sodium pentobarbital (50mg / kg, IP) (Abbott) 麻酔下に行った。2 週間の回復期間後、OVX ラットをランダムにエストロゲ

ン補充 (E2) 群 (n=29)、Placebo 群 (n=31)、OVX 群 (n=29) の 3 群に分けた。エストロゲン補充は 0.5mg 3 week release または 60 day release の pellet (Innovative Research) を背部の皮下に埋め込むことで行った。Placebo 群には、これに対応する pellet を同様に皮下に埋め込んだ。実験は OVX 後 4 週、エストロゲン補充後 2 週で行った。

2-3. 過酸化水素暴露による血管内皮の傷害

全数で 90 匹、12~16 週齢の Wistar 系雌ラット (OVX 後 4~8 週、E2 補充後 2 週) を用いた。H₂O₂ による傷害は以下の手順で行った (図 1)。

sodium pentobarbital (50mg / kg, IP) 麻酔下で、ラット頸部中央の皮膚を切開し、右総頸動脈を露出し、肩甲舌骨筋近位側 (①) および bifurcation (②) に糸をかけた。次に外頸動脈 (③④) と内頸動脈 (⑤) に糸をかけた。④の糸を結紮し、①、⑤の糸で血流をコントロールした。③、④の間に小切開を加え、カテーテル (PE10, BECTON DICKINSON) を総頸動脈遠位端まで挿入した。血管内を生理食塩水でフラッシュし、完全に内腔の血液を除去した後、②を結紮し、生理食塩水を吸引、代わって各濃度の H₂O₂ 30 μ l を注入し、5 分間暴露した。H₂O₂ を再度吸引し、①、②、⑤の糸を緩め、血液を再還流させた。カテーテルを抜去し、③の糸を結紮、皮膚を縫合して手術を終了した。

また本法と従来の方法である balloon injury による内皮剥離状態の比較をするため、OVX ラット (n=2) を用いて balloon injury を行った。balloon injury はこれまでの報告²⁸⁾ に従い、2F Fogarty カテーテル先端の balloon を生理食塩水で膨らまし、肩甲舌骨筋近位端から bifurcation まで引き抜くことで行った。直後に傷害血管を Evans blue と Hoechst 33342 で二重染色し、10mM H₂O₂ 傷害群と比較した。

次に血管内皮細胞にアポトーシスを誘導する過酸化水素の濃度を検討するため、OVX ラットを用いて、0.01mM~10mM までの各濃度 (n=2) で傷害し、直後の内皮傷害について Evans blue 染色で検討した。

さらに 0.01mM、10mM H₂O₂ で、傷害後の内皮再生の経時的変化を Evans blue 染色で観察した。

アポトーシスを誘導する H_2O_2 濃度を決定後、この濃度の H_2O_2 で傷害し、0 時間 (n=3)、3 時間 (n=4)、6 時間 (n=4)、24 時間 (n=4)、1 週 (n=3)、2 週 (n=3) で、Evans blue 染色後に傷害血管を摘出、血管内腔の見開き標本を作製し、内皮傷害の程度を評価した。さらに同標本を Hoechst 33342 で蛍光染色し、傷害後のアポトーシスについて検討した。

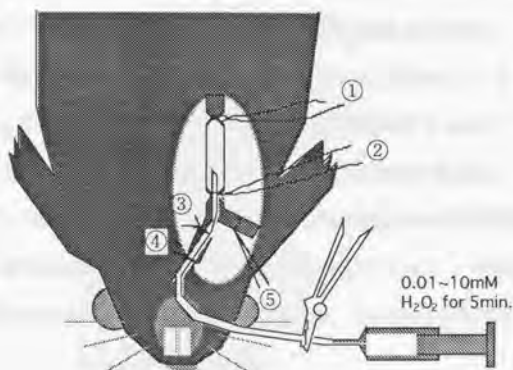


図 1. H_2O_2 による総頸動脈の傷害方法

2-4. 血管内皮傷害の評価

傷害された内皮の評価は Evans blue dye (60mg / kg of body weight) (Sigma Chemical Co.) による生体染色で行った。内皮が剥離された部位は Evans blue により青く染色されるが、内皮残存部位は染色されず白く残るので同定できる。

sodium pentobarbital (50mg / kg, IP) 麻酔下で、右鎖骨下静脈より Evans blue dye (60mg / kg of body weight) を注入し、30 分間還流させた後、脱血により屠殺した。左心室に 21 G 針を挿入し、下大静脈を小切開後、ヘパリン添加 phosphate-buffered saline (PBS) を用いて 90 mmHg の圧で 5 分間還流、続けて 100% methanol で 5 分間還流固定を行った。 H_2O_2 で傷害を受けた右総頸動脈の肩甲骨筋近位端から bifurcation までを取り出し、血

管内腔が見えるように見開き標本とし、100% methanol で後固定を行った^{25), 26)}。実体顕微鏡 (SMZ-2T, Nikon, 東京) で傷害された部位の観察および撮影を行い、 H_2O_2 の濃度による内皮傷害の違いや傷害後内皮の経時的変化について検討した。

2-5. H_2O_2 による血管内皮細胞傷害におけるアポトーシスの分析

Evans blue による生体染色を行った傷害後 3 時間 (n=4)、6 時間 (n=4)、24 時間 (n=4)、1 週間 (n=3)、2 週間 (n=3) の標本を PBS (-)、室温で 2 時間洗浄した後、Hoechst 33342 ($8 \mu\text{g/ml}$ in PBS(-)) で 37°C 、30 分間染色した²⁷⁾。蛍光顕微鏡下 ($125\times$) でランダムに 6 視野撮影し、残存している正常細胞とアポトーシス細胞の数を数えた。クロマチンの凝縮や、核の断片化、アポトーシス小体などアポトーシス特有の形態学的変化を示したものをアポトーシス細胞とした。結果は % apoptotic cell (アポトーシス細胞数 / 全細胞数 \times 100)、apoptotic cell numbers / 6 high power field (hpf)、intact cell numbers / 6 hpf として表した。

2-7. 内膜肥厚の評価

過酸化水素による内皮傷害後の内膜肥厚度および内膜肥厚に対するエストロゲンの影響をみるため、E2 群、Placebo 群で、手術後 1 週、2 週、4 週 (各 n=2~5) で脱血により屠殺し、傷害した右総頸動脈を摘出した。ホルマリン固定後、 $5 \mu\text{m}$ のパラフィン切片を作製し、横断面で Elastica van Gieson 染色を行って内膜肥厚度を計測した。内膜肥厚度は、computer digitizer (NIH Image; version 1.62) を用いて中膜および新生内膜の面積をそれぞれ測定し、中膜の面積に対する新生内膜の面積の比 (I/M ratio) として計算した。

内膜肥厚に対する動脈硬化リスクファクターやエストロゲンの影響をみるために、手術 2 週後で、16 時間絶食後の血清脂質 (総コレステロール、HDL コレステロール、トリグリセリド)、血清 estradiol 濃度を測定した。また、屠殺前日に覚醒下で収縮期血圧を tail-cuff 法 (UR-1000 / UR-5000, Ueda Inc., 東京) で測定した。

2-8. 免疫染色

内皮細胞におけるエストロゲン・レセプターの発現をみるため、免疫染色を行った。培養血管内皮細胞をPBSで3回洗浄後、4% paraformaldehyde で室温で10分間固定し、acetone: ethanol (1:1) で1分間処理した。0.03% hydrogen peroxide in 100% methanol で30分間処理して内因性の peroxidase をブロックし、さらに 10% goat serum in PBS で30分間 incubate し、非特異的結合を阻止した。これらの処置後、細胞を mouse monoclonal (estrogen receptor 1:100) 抗体 (Affinity Bioreagents) または mouse IgG1 (1:100) とともに4℃で overnight 反応させた。続いて horseradish peroxidase 結合 streptavidin (Histofine SAB-PO kit, Nichirei) と室温で1時間反応させた後、3,3'-diaminobenzidine substrate kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA) で発色させ、Meyer's hematoxylin で counterstaining を行なってから脱水、マウントした。

2-9. 細胞培養とアポトーシスの誘導

培養細胞は、ウシ頸動脈より物理的剥離により得られた血管内皮細胞 (BCEC)²⁸⁾；継体数4~8を用いた。すべての細胞は10% FBS + DMEM (culture medium) で実験まで培養した。

エストロゲンを用いる実験では、dextran-coated charcoal にて処理しステロイドを除去したFBS (DCC-FBS)、および弱いエストロゲン作用を有する phenol red を含まない DMEM (phenol red-free DMEM)、Hanks' balanced salt (phenol red free Hanks' balanced salt) を用いた。通常エストロゲンを用いる実験では溶媒にエタノールを使用するが、エタノールは hydroxyl radical の消去剤として作用する可能性があるため、エストロゲンとしては β -estradiol water soluble (E2) を、control としてはその compounds である 2-hydroxy-propyl- β -cyclodextrin (HPLC) を用いた。

培養細胞が 80% confluent となったとき、ランダムに3群 (control 群、 H_2O_2 (+) 群、 H_2O_2 (+) + E2 群) に分けた。培養上清を除去し、PBS (-) で3回洗浄し、E2 群には各濃度の E2 を、control 群、 H_2O_2 (+) 群には HPLC を加え 24 時間、37℃、5% CO_2 で pre-incubate

した。このときの培養液は 5% DCC-FBS + phenol red-free DMEM を用いた。

続いて、phenol red free Hank's solution で 2 回洗浄後、37℃ で 1 時間、0.1mM H_2O_2 に暴露し、アポトーシスを誘導した²⁹⁾。再度 phenol red free Hank's solution で 2 回洗浄し、10% DCC-FBS + phenol red-free DMEM で 24 時間後まで培養した。

2-1-0. DNA Fragmentation の検出

0.1mM H_2O_2 に 1 時間暴露し、24 時間後に細胞を採取した。2500 rpm で 5 分間遠心し、上清を捨てた。lysis buffer (50mM Tris-HCl, pH7.8, 10mM EDTA · 2Na, 0.5% w/v sodium-N-lauroylsarcosinate) 100 μ l と RNase 2 μ l (10mg/ml) を加え、50℃ で 30 分間 incubate した。さらに Proteinase K 2 μ l (10mg/ml) を加え、50℃ で 1 時間 incubate した。5M NaCl 20 μ l, Isopropanol 120 μ l を加え、-20℃ に overnight 置いた。15000 rpm で遠心後、TE buffer (10mM Tris-HCl, pH 7.4, 1mMEDTA, pH 8.0) 30 μ l を加え DNA を抽出し、2% agarose gel で電気泳動を行った。ethidium bromide で発色し、これを UV トランスイルミネーターで検出した。

2-1-1. Cell Viability assay

Cell Viability の評価は MTT (3-(4,5-dimethyl-thiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay で行った³⁰⁾。これは生細胞のミトコンドリアにある succinic dehydrogenase が MTT の tetrazolium (淡黄色) を開裂し、不溶性の暗青色色素 MTT-formazan をつくる反応を利用したものである。MTT-formazan の形成は時間と生細胞の比率に依存する。

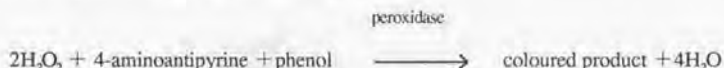
BCEC を 12-well plates で subconfluent となるまで培養し、E2 および 0.1mM H_2O_2 処理を行い、24 時間後に MTT solution (5mg/ml in PBS) 250 μ l / well 加え、37℃ で 2 時間 incubate した。さらに lysing bufer (20% w/v of SDS in 50% DMF, pH 4.7) 1ml / well を加え、37℃ で overnight incubate し、600 nm で吸光度を測定した。

2-1-2. DNA chromatin morphology

細胞をcoverslips上でsubconfluentとなるまで培養し、前述のように各濃度のE2でpretreatment後、0.1mM H_2O_2 でアポトーシスを誘導した。24時間後、PBSで3回洗浄し、1% Glutaraldehydeにて室温で30分間固定した。再度PBSで洗浄し、細胞を1mM Hoechst 33342で10分間染色した。蛍光顕微鏡下(250×)でランダムに10視野観察、撮影した。全細胞数に対するアポトーシス細胞数の割合を% apoptotic cellとして定量した。in vivoの実験と同様に、クロマチンの凝縮や、核の断片化、アポトーシス小体などアポトーシス特有の形態学的変化を示したものをアポトーシス細胞とした。

2-1 3. H_2O_2 の活性

E2が H_2O_2 の消去剤として作用するかどうかを検討するため、 H_2O_2 群、E2+ H_2O_2 群、control群として H_2O_2 +catalase群を用い、培養上清中の H_2O_2 の活性を測定した。測定はhorseradish peroxidase (HRP) 法³¹⁾により行った。



H_2O_2 添加後経時的に培養上清をとり、これにRegent (4-aminioantipyrine 0.10g / 100ml, phenol 0.234g / 100ml, 0.1M phosphate buffer 1ml / 100ml, pH6.9) と 2×10^{-8} M HRPを加え、520nmで吸光度を測定した。

2-1 4. Western Blot Analysis

細胞をice cold PBSで2回洗浄し、RIPA buffer (50mM Tris-HCl, pH8.0, 150mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.5% w/v Deoxycholic acid, 0.1% w/v SDS, 0.4mM Na_3VO_4 , 1mM PMSF)を加え、4℃で30分間溶解させた。sonication後、15000 rpmで20分間遠心し上清を集め、各サンプルの蛋白濃度をmicro BCA protein assay kit (Pierce)を用いて測定した。12% SDS-polyacrylamide gelsで1レーン当たり30μgの蛋白を電気泳動した。PVDF membrane (Bio-Rad)にtransferした後、10% nonfat dry milk (in TBS-T: 20mM Tris, 137mM NaCl,

0.1% Tween 20, pH 7.6)、4℃で blocking を overnight 行った。1次抗体には rabbit polyclonal (Bax 1: 250) 抗体 (Santa Cruz biotechnology) および mouse monoclonal (Bcl-2 1:250, p53 1: 500) 抗体 (Transduction Laboratories) を用い、室温で1時間 incubate した。続いて2次抗体 (horseradish-peroxidase 標識 抗 rabbit (1:4000 in TBS-T) 抗体 (Amersham) または horseradish-peroxidase 標識抗 mouse (1:4000 in TBS-T) 抗体 (Amersham)) で、室温、1時間 incubate し、the enhanced chemiluminescence system (Amersham) で検出を行った。なお抗体と反応後はいずれも TBS-T にて 10 分間、5 回洗浄を繰り返した。

2-15. 統計

本文および図表中の数値はすべて、mean \pm SE で表した。データは one-factor ANOVA にて解析し、有意差検定は Student Newman-Keuls' test で行った。p<0.05 を有意とした。

3. 結果

3-1. 体重・収縮期血圧・血清脂質濃度・血清estradiol濃度に対する estradiol containing pellet の効果

まず動脈硬化に影響を与える因子として体重、収縮期血圧、血清脂質について、E2 群と Placebo 群とで比較した。体重は Placebo 群で著明に高値を示した ($p<0.01$)。一方、収縮期血圧や血清脂質は 2 群間で有意差を認めなかった。血清 estradiol 濃度は E2 群で Placebo 群の約 5 倍 ($p<0.01$) となっていた (表 1)。

表 1. 過酸化水素によるラット血管内皮傷害モデルにおける体重 (BW)、収縮期血圧 (SBP)、血清脂質、および血清estradiol (E2) 濃度

	Placebo (n=6)	E2 (n=6)
BW (g)	289.0 \pm 8.1	245.0 \pm 6.3*
SBP (mmHg)	149.0 \pm 3.9	160.0 \pm 4.9
T-Chol (mg/dl)	81.0 \pm 3.3	95.8 \pm 7.2
HDL-C (mg/dl)	38.5 \pm 0.9	44.3 \pm 2.6
TG (mg/dl)	18.8 \pm 3.6	22.3 \pm 6.7
E2 (pg/ml)	6.7 \pm 0.4	34.8 \pm 9.3*

表中の数値はmean \pm SE。* ; $p < 0.01$ vs Placebo., BW; 体重, SBP; 収縮期血圧, T-Chol; 総コレステロール, HDL-C; HDLコレステロール, TG; トリグリセリド, E2; estradiol

3-2. 過酸化水素による血管内皮傷害

(1) 内皮傷害における過酸化水素濃度の検討

H₂O₂ の濃度と内皮傷害の強さとの関係を調べるため、まずOVX ラット(各 n=2) を用いて、0.01mM~10mM H₂O₂ の各濃度で内皮傷害を行った。傷害直後に Evans blue 染色を行い内皮傷害の程度を検討した。図 2 に示すように、vehicle である生理食塩水では内皮

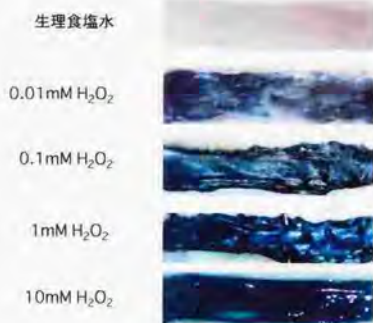


図2 各濃度の H_2O_2 による傷害直後の Evans blue 染色

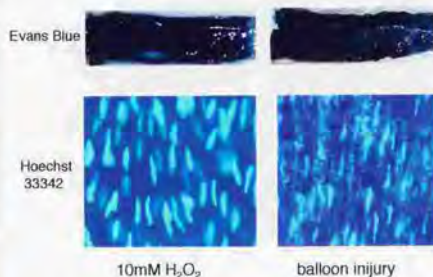


図3 10mM H_2O_2 による傷害とballoon injury との比較

Evans blue による染色では色の濃さから内皮の傷害はどちらも同程度にみえるが、Hoechst 33342 染色をみると、10mM H_2O_2 による傷害では平滑筋の損傷は軽度なのに対して、balloon injuryでは平滑筋細胞に壊滅様の損傷を与えていることがわかる。

は傷害されず、0.01mM H_2O_2 ではまだらな内皮の剥離が認められた。0.1mM H_2O_2 以上では内皮はび慢性に剥離され、 H_2O_2 の濃度が高くなるのに従い、Evans blue に強く染色された。これは H_2O_2 の濃度依存的に内皮傷害が強くなることを示していると考えられた。

10mM H_2O_2 による傷害では内皮はEvans blueに濃染され、肉眼的にはballoon injuryによる内皮剥離と同程度の傷害に見えた(図3上図)。しかしこれをHoechst 33342染色でみると、10mM H_2O_2 では内皮のみが剥離し、平滑筋細胞の形態は比較的保たれているのに対し、balloon injuryでは内皮の剥離のみならず、平滑筋細胞の壊滅も観察された(図3下図)。

(2) 内皮傷害後の経時的变化

肉眼的に内皮がほぼ完全に剥離される

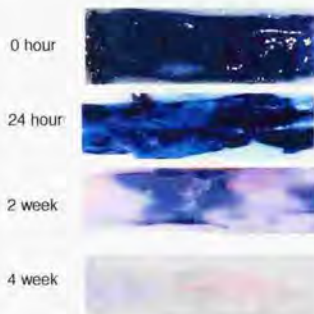


図4 10mM H_2O_2 によるinjury後の傷害内皮の経時的变化 (Evans blue 染色)

10mM H_2O_2 による傷害後の内皮再生の経時的变化をOVXラット (n=2) で観察した。図4に示すように24時間後には、まだらな内皮の再生が認められ、4週間までに内皮はほぼ完全に再生された。これは、これまでに報告されている balloon injury 後の内皮再生過程²⁰⁾ とほぼ一致していた。

ところで今回の研究の目的

は血管内皮細胞のアポトーシスについて検討することである。内皮を完全に剥離するとアポトーシスは観察されない。このため濃度に関する検討結果と合わせて、生理的濃度であり²¹⁾、なおかつ傷害後まだらな内皮の残存を示す 0.01mM H_2O_2 をアポトーシスを誘導する傷害濃度とし、以後の実験には 0.01mM H_2O_2 を用いた。

0.01mM H_2O_2 による傷害後の経時的变化を E2 群 (n=2~7) と Placebo 群 (n=3~5) の2群間で Evans blue 染色を行い比較検討した。図5に示すように、E2 群、Placebo 群ともに Evans blue による染色は傷害後6時間までは徐々に強くなった。これは傷害後に内皮剥離が進行することを示しており、傷害後にアポトーシスによって生じる内皮の脱落が関与しているものと考えられた。傷害後24時間以降は内皮の再生を示す白い部分が増加し、1~2週間後にはほぼ完全に内皮は再生した。Evans blue 染色による観察では、傷害後の内皮の経時的变化に両群で明らかな差異は認められなかった。

3-2. H_2O_2 による傷害後の血管内皮細胞のアポトーシスに関する分析

正常血管の見開き標本を Hoechst 33342 で蛍光核染色すると、内皮細胞は血管の走行方向に並ぶ一層の比較的大きな楕円形の核として認められる。一方平滑筋細胞は内皮

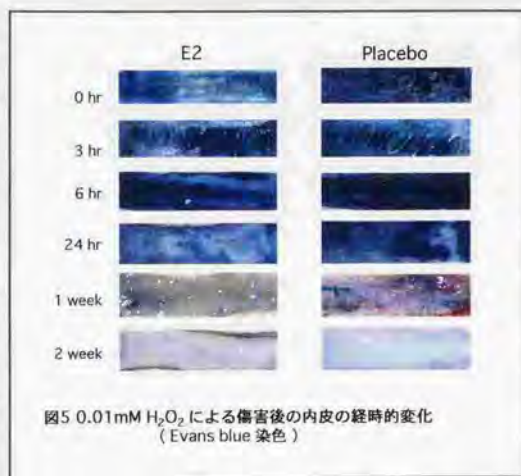


図5 0.01mM H_2O_2 による傷害後の内皮の経時的变化 (Evans blue 染色)

と直交する方向に走る紡錘状の核として観察される (図6 125×)。

図7 (125×) に傷害後 Hoechst 33342 蛍光核染色で観察されたアポトーシス像を示す。アポトーシスと判定した内皮細胞ではクロマチンの凝縮 (図7a) や核の断片化 (図7b)、アポトーシス小体 (図7c) などアポトーシスに特徴的な形態が観察された。

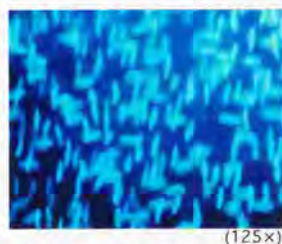


図6 Hoechst 33342 蛍光核染色による正常血管内皮像

Hoechst 33342 染色により、正常内皮は血管の走行に平行な楕円形の核として認められる。一方平滑筋細胞は血管の走行と垂直方向に走る紡錘状の核として認められる。(上図左右方向が血管の走行方向)

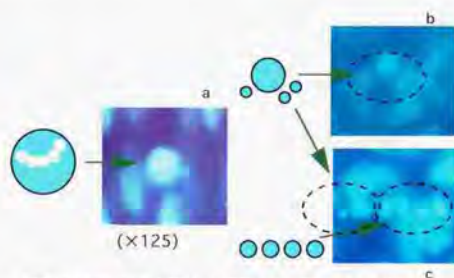


図7 in vivo での血管内皮細胞のアポトーシス像
(Hoechst 33342 蛍光核染色)

aはクロマチンの凝縮像、bは核の断片化像、cはアポトーシス小体像およびそれぞれの模式図を示したものである。なお点線の黒丸によりアポトーシスを起こす前の内皮細胞1個の大きさを模式的に示した。

図8は0.01mM H_2O_2 による傷害6時間後の同一標本を Evans blue と Hoechst 33342 で二重染色し、それぞれ実体顕微鏡と蛍光顕微鏡 (弱拡大 12×) で観察したものである。内皮が剥離され Evans blue に濃染した部位 (図8-a、○印) は Hoechst 33342 蛍光核染色には染まらず、発色していない部分 (図8-b、○印) に一致していた。一方 Evans blue に染まらない部位 (図8-a、★印)、すなわち内皮が残存している部分は Hoechst 33342 で染色され、強く発色している部分に一致した (図8-b、★印)。この Hoechst 像を拡大したものが図9-bであり、正常内皮が多く観察された。また Hoechst 染色、Evans blue 染色ともにまだらに染められた部分 (図9-a) は拡大すると、正常内皮が剥離し、アポトーシス細胞が多く見られる部分 (図9-c) に一致していた。

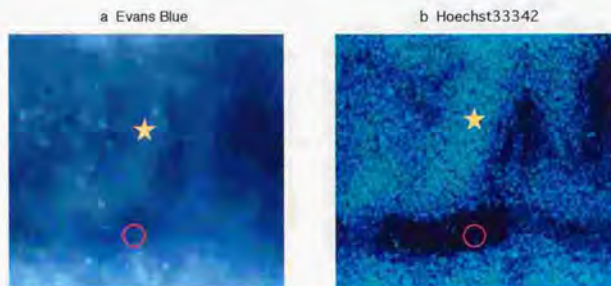


図8 同一標本におけるEvans blue 染色と
Hoechst33342 蛍光核染色の対比

赤丸：内皮が剥離している部分。Evans blue で青く染まり、Hoechstでは核が染色されない。
星印：内皮が残存している部分。Evans blueに染色されず、Hoechstで核が蛍光染色される。

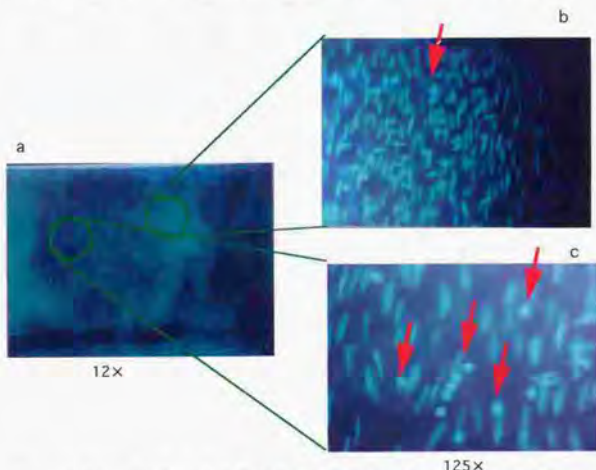


図9 0.01mM H_2O_2 による傷害 6 時間後の Hoechst 33342 染色像

a 図○内を拡大したのが b, c である。b 図は a 図で核が濃染されている部分の拡大図で、正常内皮が多く、アポトーシスはあまり認められなかった。c 図は a 図で核がまばらに染色されているところの拡大図で、正常内皮の多くは剥離し、アポトーシスが強く認められた（矢印）。

これら in vivo での内皮細胞のアポトーシスや正常細胞数の経時的变化および内皮のアポトーシスに対するエストロゲンの効果について、1 標本の Hoechst 染色像からランダムに 6 視野のアポトーシス細胞数と正常細胞数を数えることで検討した。

(1) 傷害後のアポトーシス細胞数

まずアポトーシス細胞の絶対数について経時的变化とエストロゲンの効果について検討した。アポトーシス細胞の絶対数は $0.01\text{mM H}_2\text{O}_2$ で傷害後、E2 群では 24 時間後ピーク (31.0 ± 6.1) となり、Placebo 群では 6 時間後にピーク (62.5 ± 4.5) となった。24 時間および 6 時間以降は両群ともアポトーシス細胞は経時的に減少した。また群間での検討では、6 時間後のアポトーシス細胞数は E2 群で Placebo 群の約 1/2 と有意 ($p < 0.01$) に抑制されていた (図 10)。

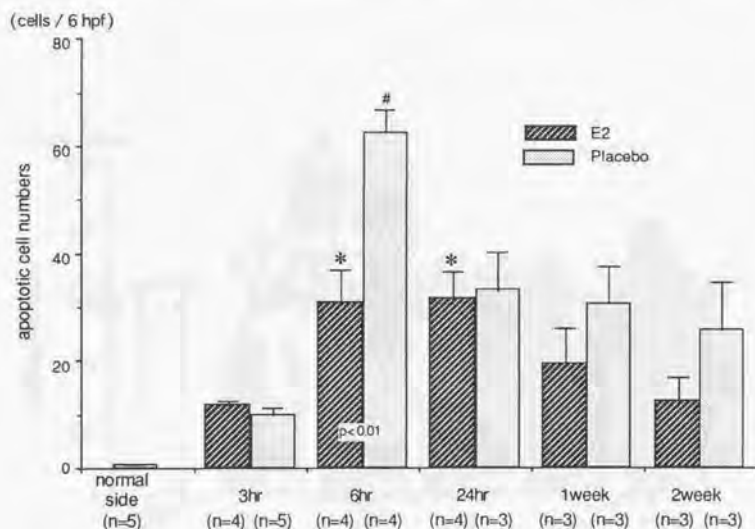


図 10 $0.01\text{mM H}_2\text{O}_2$ による傷害後のアポトーシス細胞数と E2 の効果

E2 群と Placebo 群で、 $0.01\text{mM H}_2\text{O}_2$ で傷害後、経時的に血管を摘出し、en face で Hoechst 33342 で染色を行い、1 標本につき 6 視野中のアポトーシス細胞数を数えた。

* : $P < 0.01$ vs E2 treatment at 3hr & 2W

: $P < 0.01$ vs Placebo treatment at 3hr

mean \pm SE

(2) 傷害後の正常細胞数

次に正常細胞数の経時的变化とエストロゲンの効果について検討した。正常細胞数は両群ともに傷害後 24 時間まで有意に減少した。その後増加に転じ、E2 群では 1 週後、Placebo 群では 2 週後に非傷害側の正常細胞数と同レベルまで回復した。これは傷害後 24 時間まではアポトーシスによる内皮脱落が進行し、その後内皮再生により正常細胞数が増加していることを示すものと考えられた。群間の比較では、6 時間後、24 時間後の正常細胞数は E2 群で Placebo 群の約 2 倍 (E2 vs Placebo; 303.8 ± 46.3 , 280.8 ± 42.3 vs 174.0 ± 9.4 , 136.0 ± 49.4) 残存していた。また 1 週後の正常細胞数は E2 群で Placebo 群の 1.5 倍と有意に増加 (E2 vs Placebo; 654.0 ± 70.0 vs 424.0 ± 20.3) していた (図 11)。

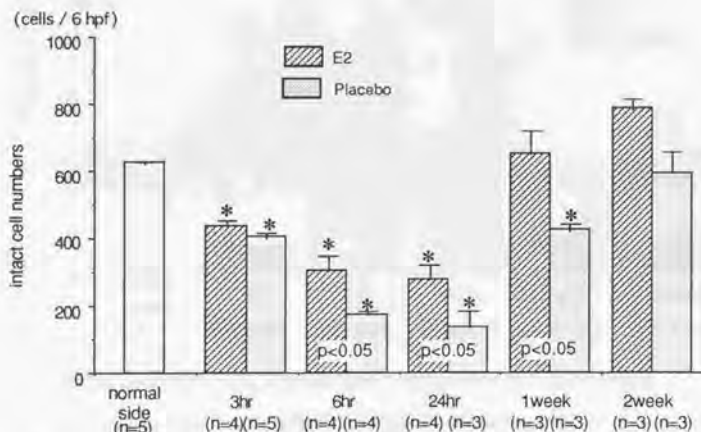


図 11 0.01mM H_2O_2 による傷害後の正常細胞数の経時的变化と E2 の効果

0.01mM H_2O_2 による傷害後、経時的に摘出血管を Hoechst 33342 で染色し、1 標本当たり 6 視野の残存あるいは再生してきた正常内皮細胞数を数え、経時的变化と E2 の効果について検討した。

* : p < 0.01 vs normal side
mean \pm SE

(3) % apoptotic cell

最後に全細胞数に対するアポトーシス細胞数の割合を % apoptotic cell とし、経時の変化とエストロゲンの効果について検討した。図 12 に示したように % apoptotic cell は Placebo 群では傷害 6 時間後にピーク ($26.5 \pm 1.9\%$) となり、E2 群では 24 時間後にピーク ($10.6 \pm 2.0\%$) となった。群間の比較では % apoptotic cell は 6 時間後、24 時間後ともに E2 群で Placebo 群の 1/2 以下に抑制されていた (E2 vs Placebo; $9.3 \pm 1.2\%$, $10.6 \pm 2.0\%$ vs $26.5 \pm 1.9\%$, $24.3 \pm 9.2\%$)。

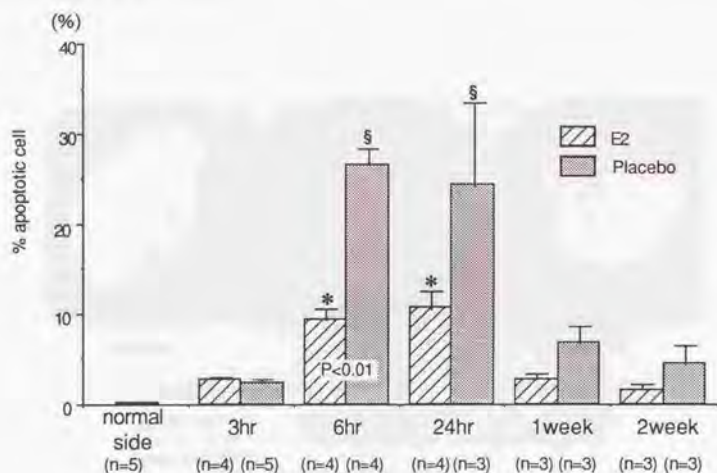


図12 0.01mMH₂O₂による傷害後の % apoptotic cell と E2 の効果

Hoechst 33342 染色後、蛍光顕微鏡下で数えた 1 標本当たり 6 視野の全細胞数に対するアポトーシス細胞数の割合を % apoptotic cell とし、E2 群と Placebo 群とで経時の変化について比較検討した。

* ; $p < 0.01$ vs E2 treatment at 3hr, 1W & 2W

§ ; $p < 0.01$ vs Placebo treatment at 3hr, 1W & 2W

mean \pm SE

3-3. H_2O_2 による内皮傷害と内膜肥厚の関係

0.01mM H_2O_2 によるアポトーシスを介した内皮傷害が内膜肥厚の形成に関与するかどうかを検討した。

まず 0.01mM H_2O_2 という低濃度の過酸化水素による傷害が内膜肥厚に関与するかどうかを検討するため、0.01mM H_2O_2 と vehicle である生理食塩水および結紮のみ（内腔に血液を満たしたまま結紮するのみ; Sham ope）とで 2 週後の内膜肥厚を検討した。図 1 3 に示したように、0.01mM H_2O_2 では新生内膜肥厚が観察されたが、生理食塩水や結紮のみでは新生内膜肥厚は認められず、0.01mM H_2O_2 による内皮傷害が内膜肥厚の形成に関与していると考えられた。

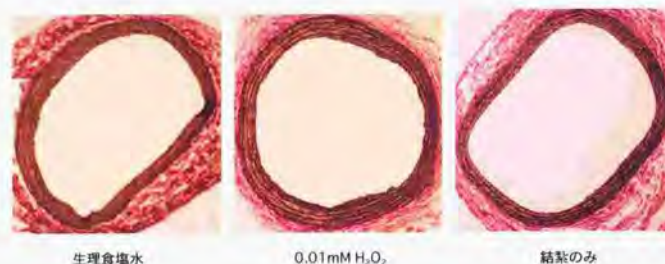


図 1 3 生理食塩水・結紮・0.01mM H_2O_2 が新生内膜肥厚に与える影響

12 週齢の OVX ラットの右頸動脈を方法で述べたように、生理食塩水、結紮のみ、0.01mM H_2O_2 で 5 分間処置し、2 週間後の内膜肥厚の程度を比較検討した。

(Elastica van Gieson 染色 32×)

次に 0.01mM H_2O_2 という低濃度の過酸化水素による内皮傷害後の内膜肥厚がピークとなる時期を検討するため、内膜肥厚の経時的変化をみた。内膜肥厚度は方法のところで示したように、NIH image を用いて新生内膜および中膜の面積を測定し、これを中膜の面積に対する新生内膜の面積比 (I/M ratio) として表した。I/M ratio は図 1 4 に示すように、傷害後 2 週でピーク (0.16 ± 0.08) となった。

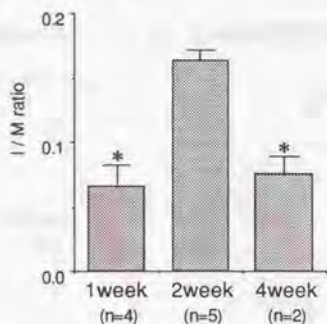


図14 0.01mM H₂O₂による傷害後の
新生内膜肥厚の経時的変化

12週齢のOVXラットの右頸動脈を
0.01mM H₂O₂で傷害し、1-4週後の
新生内膜肥厚の程度について比較検討した。
mean ± SE, n=()

*: p<0.01 vs 2 week

I/M ratio (intima / media ratio):
中膜の面積に対する内膜の面積比

以上の結果から、内皮傷害後の内膜肥厚に関するエストロゲンの効果については傷害後2週で検討した。図15に傷害2週後の血管断面のElastica van Gieson染色像を示した。両群ともに内膜肥厚が観察されるが、Placebo群ではE2群に比し高度な内膜肥厚が観察された。

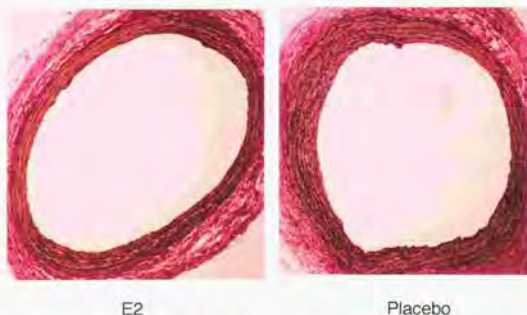


図15 0.01mM H₂O₂によるinjury後の新生内膜肥厚に対するE2の効果

E2群とplacebo群のラットに0.01mM H₂O₂によるinjuryを行い、
2週後の内膜肥厚度を比較し、E2の効果について検討した。
(Elastica van Gieson 染色 32×)

内膜肥厚度を E2 群 (n=4) と Placebo 群 (n=5) で比較したところ、I/M ratio は E2 群で Placebo 群の 1/2 以下と有意に抑制されていた (E2 vs Placebo; 0.07 ± 0.022 vs 0.16 ± 0.008 、図 16)。

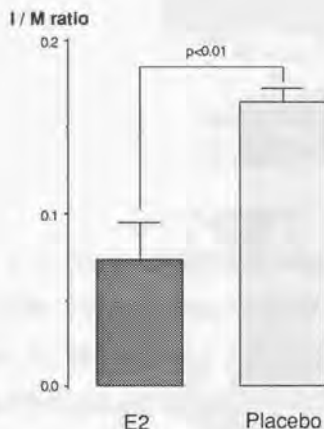


図 16 0.01mM H_2O_2 による傷害後の
内膜肥厚に対する E2 の効果

E2 群と Placebo 群で H_2O_2 による傷害 2 週後の
I/M ratio を比較した。
mean ± SE, E2: n=4, Placebo: n=5,
I/M ratio (intima / media ratio);
中膜の面積に対する内膜の面積比

3-4. ウシ頸動脈血管内皮細胞 (BCEC) におけるエストロゲン受容体 (ER) の発現

今回の実験に使用したウシ頸動脈血管内皮細胞における ER の発現を検討するため、monoclonal anti-ER antibody (MA1-310) を用いて免疫組織学的染色を行った。この抗体は human, calf, rat および mouse の組織の ER と反応し、他の steroid receptor である androgen receptor や progesterone receptor, glucocorticoid receptor とは cross-react しない。negative control には normal mouse IgG1 を用いた。図 17 に示すように、BCEC の核や核周囲の細胞質および一部の細胞質が褐色に染色され、BCEC における ER の発現が確認された。また control は染色されなかった。

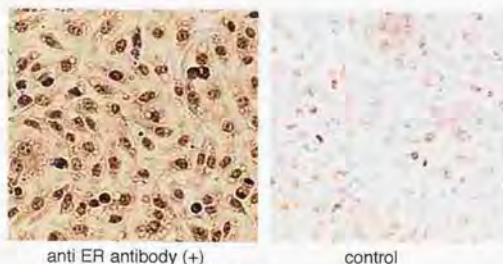


図17 抗 ER 抗体による免疫組織学的検討

培養血管内皮細胞を monoclonal anti-ER antibody で染色した。control には normal mouse IgG を用いた。核、核周囲の細胞質が褐色に染色され、ER の発現が認められた。(125X)

3-5. 過酸化水素暴露後の内皮細胞の形態学的変化

BCEC を各濃度の H_2O_2 に1時間暴露し、24 時間後の形態学的変化を位相差顕微鏡で観察した。図18に示したように、in vitro の場合、0.001mM 群、0.01mM 群ではほとんど形態学的変化を認めなかったが、0.05mM で内皮の剥離を軽度認め、残存内皮がその脱落したスペースに広がり出していた。0.1mM では剥離の程度がさらに強くなり、アポトーシス細胞も観察された。0.2mM になると細胞のほとんどは dish から剥離していた。

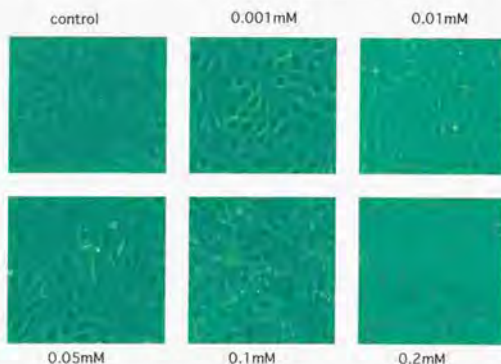


図18 H_2O_2 による injury 後の培養血管内皮細胞の形態学的変化
(位相差顕微鏡 25X)

3-6. DNA Fragmentationの検出

0.1mM H_2O_2 暴露により 24 時間後に認められた dish からの内皮の剥離がアポトーシスによるのかどうかを検討するため、agarose gel 電気泳動法により DNA Fragmentation の検出を行った。 H_2O_2 暴露により ladder pattern が認められ、アポトーシスであることが確認された (図 19)。



図19 agarose gel 電気泳動法による DNA Fragmentation の検出

0.1mM H_2O_2 暴露 24 時間後に、DNA を抽出し、agarose gel 電気泳動を行った。右レーンに示したように DNA ladder pattern が検出され、低濃度の H_2O_2 によりアポトーシスが誘導されることを確認した。
(左レーンは 123 base pair マーカー)

3-7. Cell Viability の検討

ミトコンドリア機能を測定する Viability assay は早期の段階から細胞死を検出できる。本実験では H_2O_2 暴露 24 時間後のアポトーシスに対する E2 の効果を MTT assay にて評価した。E2 (-) かつ H_2O_2 (-) 群 (control 群) の細胞生存率を 100% としたときの各群の細胞生存率を % Cell Viability として表した。 H_2O_2 単独の群では細胞生存率は $72.2 \pm 3.5\%$ ($p < 0.01$) まで減少したが、E2 で pretreatment することにより細胞生存率は回復し、E2 10^{-9} M では $87.5 \pm 4.5\%$ ($p < 0.01$) となった。一方 E2 単独群の細胞生存率 ($100.2 \pm 1.3\%$) は control 群の値 ($100.0 \pm 2.1\%$) と変わらず、E2 単独では 24 時間後の細胞生存率に影響を与えなかった (図 20)。

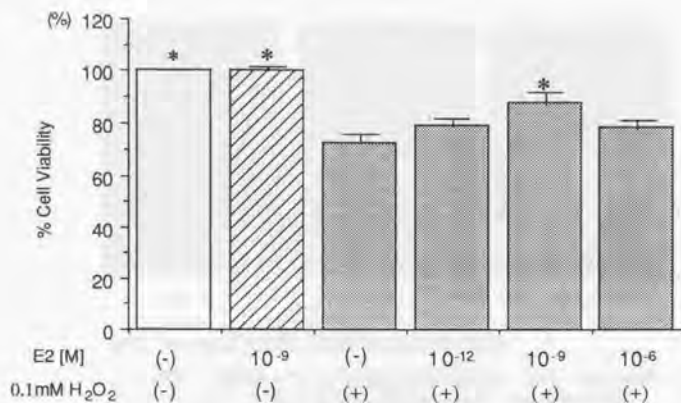


図20 MTT assay による細胞生存率

各濃度の E2 で pretreatment 後、0.1mM H₂O₂ に 1 時間暴露し、24 時間後の細胞生存率を MTT assay にて検討した。E2 は H₂O₂ による細胞死を抑制し、細胞生存率を回復させた。

一方、E2 単独では 24 時間後の細胞生存率に影響を与えなかった。

BCEC (bovine carotid endothelial cell) : 継代数 7~8、n=5、
mean ± SE、*: p<0.05 vs E2 (-) & H₂O₂ (+)

3-8. Hoechst 33342 蛍光核染色による形態学的観察

coverslip 上で培養した BCEC を E2 で pretreatment した後 H₂O₂ に暴露し、24 時間後の内皮の形態を Hoechst 33342 蛍光核染色により観察した。アポトーシスをおこした細胞では、クロマチンの凝縮や核の断片化、アポトーシス小体の出現などのアポトーシス特有の形態学的変化が認められた (図 21、矢印)。図 21 は control 群、H₂O₂ 群、H₂O₂ + E2 群の Hoechst 33342 染色像を示したものである。いずれの群においてもアポトーシス細胞が観察されたが、H₂O₂ 群では control 群や H₂O₂ + E2 群に比べより多くのアポトーシス細胞が認められた。またこれら 3 群は同一倍率で撮影した写真であるが、内皮の剥離は H₂O₂ 群で著明で、接着細胞数が control 群の約半数となっていたが、E2 群では内皮の剥離は軽度抑制されていた。

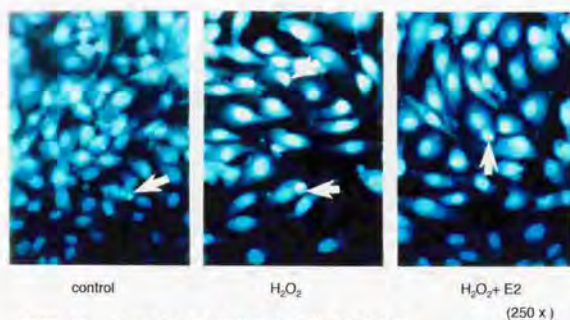


図21 Hoechst 33342 染色による形態学的観察

H_2O_2 暴露 24 時間後、クロマチンの凝縮や核の断片化、アポトーシス小体等アポトーシス特有の形態学的変化が認められた(矢印)。内皮細胞の剥離は H_2O_2 群で著明で、E2 群では軽度抑制されていた。

3-9. Hoechst 33342 染色によるアポトーシスの定量化

H_2O_2 による血管内皮細胞のアポトーシスに対するE2の効果を定量化するため、coverslip上で培養した BCEC の Hoechst 33342 染色像を用いた。control 群、 H_2O_2 群、各濃度 E2 で pretreatment した E2 群を H_2O_2 でアポトーシス誘導後 Hoechst 33342 で染色し、蛍光顕微鏡下で1検体につきランダムに10視野撮影した。10視野中のアポトーシス細胞数と正常細胞数を数え、全細胞数に対するアポトーシス細胞数の割合を % apoptotic cell として定量化した。図22に示したように、 H_2O_2 群では control 群の約3倍の % apoptotic cell が認められた [$5.2 \pm 0.3\%$ (H_2O_2 群) vs $1.8 \pm 0.3\%$ (control 群); $p < 0.01$]。またこの % apoptotic cell は E2 で pretreatment することにより濃度依存的に抑制され、E2 10^{-8} M では H_2O_2 群の約 1/2 となった [$5.2 \pm 0.3\%$ (H_2O_2 群) vs $4.2 \pm 0.4\%$ (E2 10^{-12} M 群); $p < 0.05$ 、 $3.6 \pm 0.2\%$ (E2 10^{-11} M 群); $p < 0.01$ 、 $3.3 \pm 0.5\%$ (E2 10^{-10} M 群); $p < 0.01$ 、 $3.0 \pm 0.3\%$ (E2 10^{-9} M 群); $p < 0.01$ 、 $2.7 \pm 0.2\%$ (E2 10^{-8} M 群); $p < 0.01$ & $3.1 \pm 0.3\%$ (E2 10^{-6} M 群); $p < 0.01$]。

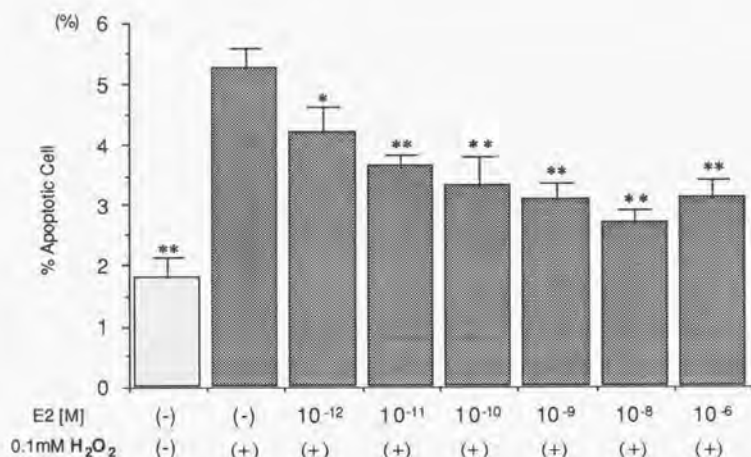


図2.2 H₂O₂による血管内皮のアポトーシスに対するE2の抑制効果

coverslip上のBCECをE2でpretreatmentし、0.1mM H₂O₂に暴露24時間後にHoechst 33342で蛍光核染色を行い、ランダムに10視野を観察した。アポトーシス細胞数および観察視野全体の細胞数を数え、全細胞数に対するアポトーシス細胞数の割合を% apoptotic cellとして表した。E2は濃度依存的にH₂O₂によるアポトーシスを抑制した。BCEC (bovine carotid endothelial cells): 継代数4~8, n=4
 % apoptotic cell = apoptotic cells / total cells × 100
 mean ± SE, *** P < 0.05, 0.01 vs Vehicle and H₂O₂ (+)

3-1 0. H₂O₂消去系としてのE2の可能性

Cell ViabilityやHoechst 33342染色像による定量化の結果から、E2がH₂O₂による血管内皮細胞のアポトーシスを抑制することは確認された。この効果はE2が細胞外でH₂O₂の活性を消去してしまうことに基づくものなのか、あるいは細胞内のメカニズムを介したE2の作用によるものなのかを検討するため、培養上清中のH₂O₂の活性をHorseradish Peroxidase法にて測定した。control群にはH₂O₂の消去剤であるcatalaseをH₂O₂とともに加えた。図2.3に示したように、control群ではcatalaseによりH₂O₂は完全に消去されたが、E2はH₂O₂の活性に全く影響を与えず、経時的な変化もH₂O₂単独群とほとんど変わらなかった。

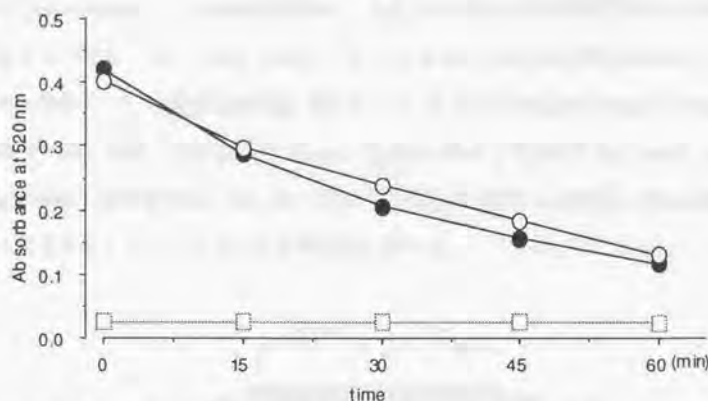


図23 E2 の H_2O_2 活性に与える影響

各時間で培養上清中の H_2O_2 濃度を Horseradish Peroxidase 法にて測定した。
縦軸は 520 nm で測定した吸光度、横軸は時間 (分) を示した。
● は H_2O_2 に E2 を加えた群、○ は H_2O_2 単独群、□ は control 群で
 H_2O_2 に消去剤である catalase を加えた群である。

3-9. アポトーシス関連蛋白の発現に関する検討

E2 は細胞外の H_2O_2 活性に影響を与えないことから、 H_2O_2 によるアポトーシス誘導と E2 の抑制効果には細胞内のメカニズムが関与していると考えられた。これまでの報告では E2 によるアポトーシス抑制の機序として、エストロゲン受容体を介した Bcl-2/Bax ratio の増加、P53 蛋白の抑制などが報告されている。また H_2O_2 によるアポトーシス誘導の機序は NF- κ -B を介する報告が多いが、Bax 蛋白の発現を増加させることも報告されている。

本研究における E2 のアポトーシス抑制の機序に、これらの pro-apoptotic mediator である P53, Bax および anti-apoptotic mediator である Bcl-2 蛋白の発現が関与しているかどうかを Western blot 法を用いて検討した。pro-apoptotic mediator である P53 蛋白および anti-apoptotic mediator である Bcl-2 蛋白は、E2 による pretreatment や H_2O_2 への暴露に関らず、発現量に変化は認められなかった。しかし、pro-apoptotic mediator である Bax 蛋白の

発現は E2 pretreatment により完全に抑制され、 H_2O_2 への暴露で弱い発現を認めるものの、vehicle 群と比べ抑制されていた。このことから E2 は Bax 蛋白の発現抑制を介してアポトーシスを抑制していると考えられた (図 24)。なおこの実験は 3 回繰り返し行い、同様の結果が得られた。また P53 の E2 (+)、 H_2O_2 (-) のバンドが濃くみえるが、これは SDS-PAGE の際、最外側で流したためこのように見えるもので、3 回繰り返した結果から発現の亢進を示すものではないことを確認している。

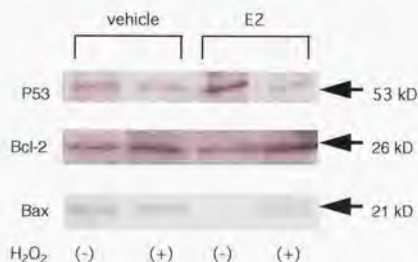


図24 アポトーシス関連遺伝子産物の発現

H_2O_2 暴露により P53, Bcl-2 いずれの蛋白も発現量に変化を認めなかったが、E2 前処置により Bax 蛋白発現の減少を認めた。

4. 考察

これまでの多く研究において、血管内皮の剥離が新生内膜肥厚を引き起こすと報告されてきた²⁾。また血管内皮の剥離の方法としては、さまざまな動物に対する balloon injury が主に用いられてきた^{20), 25), 33)}。balloon injury では中膜を損傷せずに内皮だけを剥離することは困難なため、内皮の損傷そののみが新生内膜肥厚の原因となっていると断言できない。また手技的にも小動物に対する balloon injury は困難で、これに対してはポリエチレンカフ被覆による内膜肥厚モデル³⁴⁾や angioplasty wire による内膜肥厚モデル³⁴⁾などが用いられてきた。

血管内皮は superoxide や hydrogen peroxide (H_2O_2) といった活性酸素により傷害を受けやすい性質を持つ^{35), 36), 39)}。本研究ではこの性質を利用し、 H_2O_2 を用いた内皮傷害モデルの作製を試みた。

まず血管内腔を H_2O_2 に暴露することで内皮を傷害するモデルを作製し、内皮傷害の程度やアポトーシスの関与さらに新生内膜肥厚との関係について調べ、新しい動脈硬化モデルとして適切であるかどうかを検討した。次にこのモデルにおけるエストロゲンのアポトーシス抑制効果や内膜肥厚抑制効果についても検討した。

本法で試みた内皮傷害モデルの報告はこれまでにないことから、OVX ラットを用いて、まず傷害する H_2O_2 の濃度について検討した。各濃度の H_2O_2 により濃度依存的な傷害を内皮に加えられることが、傷害直後の Evans blue 染色で確認された。10mM H_2O_2 では肉眼的に balloon injury と同等のほぼ完全な内皮剥離が得られた。しかしこの濃度では内皮のアポトーシスは観察できない。0.01mM H_2O_2 は喫煙や炎症細胞などにより生体内に生じる生理的な H_2O_2 濃度であり^{37), 38), 39)}、なおかつこの濃度でまだらな内皮の脱落が得られたことから本研究での内皮傷害濃度を 0.01mM H_2O_2 とした。Asahara ら²⁵⁾ によれば、balloon injury による内皮傷害後の内皮再生は 4 週後まで続くとしている。肉眼的に balloon injury と同程度の傷害を与える 10mM H_2O_2 による傷害後の内皮再生は 2 週以降も続き、4 週後にほぼ完全な内皮再生が観察され、balloon injury 後の再生過程とほぼ同様

の経過であると考えられた。しかし、本研究で用いた 0.01mM H_2O_2 による傷害では2週後までにほぼ完全な内皮の再生が認められ、弱い傷害ではより早期に内皮再生がおこることが示唆された。

H_2O_2 による内皮傷害と balloon injury との内皮再生に関する決定的な違いは、balloon injury が傷害部位の内皮を完全剥離し、内皮再生も内皮の残存する両端から傷害部中央に向かって再生してくるのに対し、 H_2O_2 による内皮傷害では H_2O_2 の濃度に応じたまだらな内皮の脱落とそこからのまだらな再生を示すことである。このことは Evans blue 染色した標本を Pollman ら²¹⁾ の手法を応用し、en face で Hoechst 33342 による二重染色をすることで確認した。また Hoechst 染色像から、 H_2O_2 による内皮傷害は濃度に応じて内皮を部分的に剥離し、平滑筋細胞にはあまり影響を与えないことが観察されたのに対し、balloon injury では内皮剥離だけではなく、血管平滑筋細胞にも挫滅様の機械的損傷を与えていることが確認された(図3)。

H_2O_2 による内皮傷害後の傷害部位内皮の正常細胞数の経時的变化をみると、正常細胞数は3時間後から有意に減少し、24時間後で nadir となり、2週後には非傷害側とは同数まで再生した。

in vitro では低濃度の H_2O_2 が血管内皮細胞に遅発性のアポトーシスを誘導する²²⁾ ことが知られている。そこで24時間後までの正常細胞数の減少にアポトーシスが関与しているかどうかを Hoechst 33342 染色で検討した。正常細胞数の減少とは対照的に形態学的にアポトーシスを起こした細胞は3時間後から出現し、6時間後～24時間後にピークとなった。この結果は生体内の内皮傷害にアポトーシスを介した機序が関与していることを示唆している。

エストロゲンの血管に対する抗酸化作用としては、LDL コレステロールの酸化防止や酸化 LDL による内皮細胞障害の防御など脂質代謝改善作用に関する報告^{23), 29)} が主であり、活性酸素種に対するエストロゲンの抗酸化作用についての報告はない。また in vitro の系では、エストロゲンが $\text{TNF-}\alpha$ による血管内皮細胞のアポトーシス¹⁹⁾ や free radical による神経細胞のアポトーシス⁴¹⁾ を抑制することがすでに報告されたが、in vivo

の系で血管内皮のアポトーシスに対するエストロゲンの作用を検討した報告もまだない。我々の結果では、エストロゲンは *in vivo* でも傷害 6 時間後の内皮のアポトーシスを有意に抑制した。しかし傷害 3 時間後の正常細胞数は E2 群と Placebo 群で差が認められず、 H_2O_2 による直後の傷害は両者に差がないと考えられた。したがって傷害 6 時間後と 24 時間後の正常細胞数が E2 群で Placebo 群の約 2 倍残存していることは、エストロゲンにより内皮のアポトーシスが抑制されたため、その後の内皮の脱落が抑制され正常細胞が残存したことを示すものであると考えられる。一方、24 時間以降の正常細胞数の増加は内皮の再生を示すものである。しかし 1 週後の正常細胞数は E2 群も Placebo 群も共に 24 時間後の約 3 倍に増加し、今回の実験結果からでは E2 群で有意に内皮再生が促進されたとはいえない。また 1 週後では正常側と同程度に細胞数が回復しているため、エストロゲンの内皮再生促進効果をみるには傷害後 48 時間あるいは 72 時間といった内皮再生途上にある正常細胞数に関する検討が必要と考えられ、これは今後の検討課題である。

以上の結果から、エストロゲンには free radical に対する抗酸化作用を介して血管内皮のアポトーシスを抑制することが示唆された。

本研究による内皮傷害が動脈硬化の初期病変となりうるかどうかを検討するため、傷害後の新生内膜肥厚についても実験をおこなった。まず OVX ラットを用いて 0.01mM H_2O_2 で傷害後の内膜肥厚度の経時的变化について検討した。その結果、内膜肥厚度は傷害 2 週後にピークとなった。このため内膜肥厚に関する検討はすべて 2 週後で行った。また H_2O_2 の vehicle である生理食塩水や手技的問題（結紮による影響）が内膜肥厚に与える影響をみるため、これらの処置による内膜肥厚についても検討したが、生理食塩水や結紮による内膜肥厚は認められず、0.01mM という低濃度の過酸化水素による内皮傷害が内膜肥厚形成に関与していると考えられた。これまでの報告によると、balloon injury 2 週後の I/M ratio は 1.2²⁰⁾、カフ被覆モデルでは 0.4²⁴⁾ であり、0.01mM H_2O_2 による傷害後の I/M ratio は 0.18 と他の傷害に比し低い値を得た。一方我々の基礎検討では 10mM H_2O_2 による傷害では I/M ratio は 0.6 で、balloon injury の約 1/2、0.01mM H_2O_2 の約 3 倍の肥厚であった。このことは内膜肥厚度が内皮傷害の強さに対応したものである

ことを示唆している。われわれの観察では、10mM H_2O_2 は平滑筋への損傷が少なくかつ内皮をほぼ完全に剥離する濃度である。balloon injury による著明な内膜肥厚は内皮の剥離の他に平滑筋への直接的な機械損傷も関与していると推測される。

次に H_2O_2 による傷害後の新生内膜肥厚に対するエストロゲンの効果について調べた。エストロゲンが血管傷害後の新生内膜肥厚を抑制することについては、これまでに多くの報告がなされている^(41, 42, 34)。この機序として、エストロゲンの血管平滑筋細胞に対する直接的な遊走・増殖抑制作用⁽¹⁴⁾や、内皮の再生促進作用^(21, 43)などの他、脂質代謝^(43, 8), 24)や血圧^(41, 4)など動脈硬化のリスクファクターの改善を介した間接的な作用が示唆されてきた。今回の実験では血清脂質や血圧については2群間で差を認めず、これらのリスクファクターの内膜肥厚への関与は否定的であった。一方血清 estradiol 濃度は 35pg/ml と生理的濃度⁽⁴⁶⁾ではあるが、placebo 群の約 5 倍と高値を示し、 H_2O_2 による傷害後の内膜肥厚抑制は生理的濃度の E2 の効果によるものと考えられた。

前述のようにエストロゲンには脂質代謝改善作用介した抗動脈硬化作用のあることが知られている。近年血管内皮細胞や血管平滑筋細胞におけるエストロゲン受容体の発現が報告され^(9, 10, 11), 49)、エストロゲンの血管に対する直接作用とそれによる抗動脈硬化作用が示唆されている。事実、エストロゲンによる内皮依存性血管拡張作用⁽⁵⁰⁾や血管作動性物質の産生調節⁽⁵¹⁾、血管平滑筋細胞における内皮非依存性血管拡張作用⁽⁵²⁾や増殖抑制作用⁽¹⁴⁾が相次いで報告されてきた。

アポトーシスによる血管内皮細胞傷害は本研究の in vivo の結果からも、動脈硬化病変の進展に関与することが示唆された。すでに、Spyridopoulosら⁽¹⁹⁾はエストロゲンがエストロゲン受容体を介した機序で TNF- α による血管内皮のアポトーシスを抑制すると報告し、Alvarezらは⁽⁵³⁾エストロゲンがエストロゲン受容体を介した機序で細胞マトリックスの崩壊による血管内皮のアポトーシスを抑制すると報告した。本研究の in vitro の検討においても、エストロゲンは細胞内の機序を介して H_2O_2 による内皮細胞のアポトーシスを抑制し、細胞生存率を上昇させた。エストロゲンは血管内皮細胞の増殖促進作用

を有する⁵⁴⁾ことが知られているが、我々の *in vitro* の実験条件では、E2 群と control 群とで 24 時間後の細胞生存率に変化はなかった。このことから H_2O_2 暴露後の E2 群の細胞生存率の増加はエストロゲンによる内皮細胞の増殖促進作用によるのではなく、アポトーシス抑制効果によるものであると考えられた。

これまでの報告^{19), 55)}は、エストロゲンによる血管内皮細胞のアポトーシス抑制がいずれもエストロゲン受容体を介した機序であると述べている。エストロゲンが細胞外の H_2O_2 濃度に影響を与えないことより、本研究におけるエストロゲンの効果も細胞内の機序、すなわちエストロゲン受容体を介した作用の可能性が考えられ、これについても今後エストロゲンの受容体拮抗剤などを用いた検討が必要であると考ええる。

エストロゲンによる血管内皮細胞のアポトーシス抑制の機序で protooncogene について検討した報告はない。エストロゲンによるアポトーシス抑制の機序に関しては、乳癌細胞や生殖器における bcl-2 family の関与、とりわけ Bcl-2 発現の増加による Bcl-2/Bax ratio 増加や、エストロゲンによる P53 の発現の減少を介したアポトーシス抑制に関する報告がほとんどである。一方 H_2O_2 誘導によるアポトーシスについては、human premonocyte で zinc が Bax 蛋白の発現を低下させ、Bcl-2/Bax ratio を増加させアポトーシスを抑制したという報告⁵⁶⁾がある。Bcl-2 はアポトーシスを抑制し、Bax は促進するが、この正確な機構はいまだ不明である。Bax によるアポトーシス誘導の機序としては、Bax それ自体が細胞小器官に損傷を与えるという説⁵⁶⁾や、Bcl-2 と Bax はヘテロ二量体を形成するが、Bcl-2 の Bax 結合ドメインを変異させると Bcl-2 のアポトーシス抑制作用が消失するという説⁵⁷⁾が報告されている他、Bax のアポトーシス誘導には caspase 依存性と非依存性の経路があり、非依存性の経路では Bax によるミトコンドリア外膜の透過性の変化や穿孔をおこすようなチャンネル形成によりアポトーシスを起こすとする説もある⁵⁸⁾。本研究のアポトーシス関連遺伝子産物に関する検討では、エストロゲンによる Bax 蛋白の発現の低下が認められた。Bcl-2 蛋白や P53 蛋白の発現量に変化を認めなかったことより、Bax 蛋白発現の低下による相対的な Bcl-2/Bax ratio 増加がエストロゲンによるアポトーシス抑制をもたらしたものであると考えられる。本研究で使用した血管内皮細胞

にはエストロゲン受容体が発現している。またエストロゲンで24時間前処置後アポトーシスを誘導してからBax蛋白の発現を見ているため、このエストロゲンの作用時間からは、エストロゲンのアポトーシス抑制効果はエストロゲン受容体を介したgenomicな作用である可能性が高い。しかし、実際にエストロゲン受容体を介した作用であるかどうか、さらにそこから下流のBaxへの情報伝達経路については今後の検討が必要である。

以上まとめると、

- 1) 低濃度過酸化水素を用いた傷害により新しい動脈硬化モデルを作製した。
- 2) このモデルでは *in situ* で内皮のアポトーシスを介した内皮傷害が観察された。
- 3) このモデルでは低濃度過酸化水素によるアポトーシスを介した内皮傷害が原因と考えられる内膜肥厚が観察された。
- 4) エストロゲンはこのモデルにおいて、内皮のアポトーシスを抑制し、新生内膜肥厚を抑制した。
- 5) *in vitro* においてもエストロゲンは H_2O_2 による血管内皮細胞のアポトーシスを抑制した。また本研究におけるエストロゲンのアポトーシス抑制には、エストロゲンによるBax蛋白発現の抑制を介した機序が関与していると考えられた。

本研究で用いた過酸化水素やエストロゲンはともに生理的濃度である。したがって本研究の結果は虚血・再還流や、喫煙に伴い産生される free radical による血管傷害のメカニズムの一部、またエストロゲンの脂質代謝以外の抗酸化作用や抗動脈硬化作用を、エストロゲンによる内皮のアポトーシス抑制作用の面から説明するものであると考えられる。本研究は Ross らの提唱する "response to injury hypothesis" をアポトーシスによる内皮傷害から新生内膜肥厚形成まで *in vivo* でかつ経時的に検証した初めての報告と言える。また本法は傷害物質やその濃度を変えることで内皮の傷害程度を微細にコントロールすることが可能であり、今後血管壁に対する生体内の攻撃因子や防御因子の動態を研究するため有用な方法であると考えられる。

5. 文献

- 1) Kannel WB, Hjortland MC, McNamara PM, Gordon T. Menopause and risk of cardiovascular disease: The Framingham Study. *Ann Intern Med.* 1976;85:447-452
- 2) Belchets PE. Hormonal treatment of postmenopausal women. *N Engl J Med.* 1994;330:1062-1071
- 3) Grady D, Rubin SM, Petitti DB, Fox CS, Black D, Ettinger B, Ernster VL, Cummings SR. Hormone therapy to prevent disease and prolong life in postmenopausal women. *Ann Intern Med.* 1992;117:1016-1037
- 4) Kushwaha RS, Hazzard WR. Exogenous estrogens attenuate dietary hypercholesterolemia and atherosclerosis in the rabbit. *Metabolism.* 1981;30:359-366
- 5) Adams MR, Clarkson TB, Kaplan JR, Koritnik DR. Experimental evidence in monkeys for beneficial effects of estrogen on coronary artery atherosclerosis. *Transplant Proc.* 1989;21:3662-3664
- 6) Rijkema AHM, van der Sanden AA, Ruijs AHC. Effects of post-menopausal oestrogen-progestogen replacement therapy on serum lipids and lipoproteins: a review. *Maturitas.* 1990;12:259-285
- 7) Lobo RA. Clinical review 27: effects of hormonal replacement on lipids and lipoproteins in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab.* 1991;73:925-930
- 8) Walsh BW, Schiff I, Rosner B, Greenberg L, Ravnkar V, Sacks FM. Effects of postmenopausal estrogen replacement on the concentrations and metabolism of plasma lipoproteins. *N Engl J Med.* 1991;325:1196-1204
- 9) Orimo A, Inoue S, Ikegami A, Hosoi T, Akishita M, Ouchi Y, Muramatsu M, Orimo H. Vascular smooth muscle cells as target for estrogen. *Biochem Biophys Res Commun* 1993, 195:730-736
- 10) Karas RH, Paterson BL, Mendelsohn ME. Human vascular smooth muscle cells contain functional estrogen receptor. *Circulation.* 1994;89:1943-1950

- 11) Losordo DW, Kearney M, Kim EA, Jekanowski J, Isner JM. Variable expression of the estrogen receptor in normal and atherosclerotic coronary arteries of premenopausal women. *Circulation*. 1994;89:1501-1510
- 12) Jiang C, Sarrel PM, Lindsay DC, Poole-Wilson PA, Collins P. Endothelium-independent relaxation of rabbit coronary artery by 17β -oestradiol in vitro. *Br J Pharmacol*. 1991;104:1033-1037
- 13) Jiang C, Sarrel PM, Poole-Wilson PA, Collins P. Acute effect of 17β -estradiol on rabbit coronary artery contractile response to endothelin-1. *Am J Physiol*. 1992;263:H271-275
- 14) Akishita M, Ouchi Y, Miyoshi H, Kozaki K, Inoue S, Ishikawa M, Eto M, Toba K, Orimo H. Estrogen inhibits cuff-induced intimal thickening of rat femoral artery: effects on migration and proliferation of vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis*. 1997;130:1-10
- 15) Williams JK, Adams MR, Klopstein HS. Estrogen modulates responses of atherosclerotic coronary arteries. *Circulation*. 1990;81:1680-1687
- 16) Reis SE, Gloth ST, Blumenthal RS, Resar JR, Zacur HA, Gerstenblith G, Brinker JA. Ethinyl estradiol acutely attenuates abnormal coronary vasomotor responses to acetylcholine in postmenopausal women. *Circulation*. 1994;89:52-60
- 17) Gilligan DM, Badar DM, Panza JA, Quyyumi AA, Cannon RO. Acute vascular effects of estrogen in postmenopausal women. *Circulation*. 1994;90:786-791
- 18) Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*. 1993;362:801-809
- 19) Spyridopoulos I, Sullivan AB, Kearney M, Isner JM, Losordo DW. Estrogen-receptor-mediated inhibition human endothelial cell apoptosis: Estradiol as a survival factor. *Circulation*. 1997;95:1505-0514
- 20) Krasinski K, Spyridopoulos I, Asahara T, van der Zee R, Isner JM, Losordo DW. Estradiol accelerates functional endothelial recovery after arterial injury. *Circulation*. 1997;95:1768-1772
- 21) Forde RC, Fitzgerald DJ. Reactive oxygen species and platelet activation in reperfusion

injury. *Circulation* .1997;95:787-789

22) Martin A, Zulueta J, Hassoun P, Blumberg JB, Meydani M. Effect of vitamin E on hydrogen peroxide production by human vascular endothelial cells after hypoxia / reoxygenation. *Free Radic Biol Med*. 1996;20(1):99-105

23) de Bono DP. Free radicals and antioxidants in vascular biology: the roles of reaction kinetics, environment and substrate turnover. *Q J Med*. 1994;97:445-453

24) Negre-Salvayre A, Pieraggi MT, Mabile L, Salvayre R. Protective effect of 17 β -estradiol against the cytotoxicity of minimally oxidized LDL to cultured bovine aortic endothelial cells. *Atherosclerosis*. 1993;99:207-217

25) Asahara T, Bauters C, Pastore C, Kearney M, Rossow S, Bunting S, Ferrara N, Symes JF, Isner JM. Local delivery of vascular endothelial growth factor accelerates reendothelialization and attenuates intimal hyperplasia in balloon-injured rat carotid artery. *Circulation*. 1995;91:2793-2801

26) Clowes AW, Clazzo RE, Karnovsky MJ. A morphologic and permeability study of luminal smooth muscle cells after arterial injury in the rat. *Lab Invest*. 1978;39(2):141-150

27) Pollman MJ, Hall JL, Mann MJ, Zhang L, Gibbons GH. Inhibition of neointimal cell bcl-x expression induces apoptosis and regression of vascular disease. *Nature Med*.1998;4:222-227

28) Ishikawa M, ouchi Y, Akishita M, Kkozaki K, Toba K, Namiki A, Yamaguchi T, Orimo H. Immunocytochemical detection of parathyroid hormone-related protein in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*.1994;199:547-551

29) de Bono DP, Yang WD. Exposure to low concentration of hydrogen peroxide causes delayed endothelial cell death and inhibits proliferation of surviving cells. *Atherosclerosis*.114(1995)235-245

30) Hansen MB, Nielsen SE, Berg K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth / cell kill. *J Immunol Methods*. 1989;119:203-210

31) Frew JE, Jones P, Scholes G. Spectrophotometric determination of hydrogen peroxide and organic hydroperoxides at low concentrations in aqueous solution. *Anal chim*

acta.1983;155:139-150

32) Scott-Burden T, Vanhoutte PM. The endothelium as a regulator of vascular smooth muscle proliferation. *Circulation*. 1993;87(suppl V):V-51-V-55

33) White CR, Shelton J, Chen SJ, Darley-USmar V, Allen L, Nabors C, Sanders PW, Chien YF, Oparil S. Estrogen restores endothelial cell function in an experimental model of vascular injury. *Circulation*. 1997;96(5):1624-30

34) Sullivan TR, Jr., Karas RH, Aronovitz M, Faller GT, Ziar JP, Smith JJ, O'Donnell TF, Jr., Mendelsohn ME. Estrogen inhibits the response-to-injury in a mouse carotid artery model. *J Clin Invest*. 1995;96:2482-2488

35) Ageer A, Gordon JL. Differential effects of hydrogen peroxide on indices of endothelial cell function. *J Exp Med*. 1984;159:592-603

36) Whorton AR, Montgomery ME, Kent RS. Effect of hydrogen peroxide on prostaglandin production and cellular integrity in cultured porcine aortic endothelial cells. *J Clin Invest* 1985;76:295

37) Sacks T, Moldow CF, Craddock PR, Bowers TK, Jacob HS. Oxygen radicals mediate endothelial cell damage by complement stimulated granulocytes. *J Clin Invest*. 1987;61:1161

38) Martin WJ. Neutrophils kill pulmonary endothelial cells by hydrogen peroxide dependent pathway. An in vitro model of neutrophil mediated lung injury. *Annu Rev Respir Dis*. 1984;130:209

39) Rifci VA, Khachadurian AK. The inhibition of low-density lipoprotein oxidation by 17-beta estradiol. *Metabolism*. 1992;41(10):1110-1114

40) Behl C, Widmann M, Trapp T, Holsboer F. 17 β -estradiol protects neurons from oxidative stress-induced cell death in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995;216(2):473-482

41) Chen S-J, Li H, Durand J, Oparil S, Chen Y-F. Estrogen reduces myointimal proliferation after balloon injury of rat carotid artery. *Circulation*. 1996;93:577-584

42) Adams MR, Kaplan JR, Manuck SB, Koritnik DR, Parks JS, Wolfe MS, Clarkson TB.

Inhibition of coronary artery atherosclerosis by 17 β -estradiol in ovariectomized monkeys: lack of an effect of added progesterone. *Arteriosclerosis*.1990;10:1051-1057

43) Karas RH, Bieber HE, Baur WE, Mendelsohn ME. Estrogen enhances vascular endothelial growth factor (VEGF) gene expression in human vascular smooth muscle cells. *Circulation*. 1996;94(suppl I):I-595. Abstract

44) Ouchi Y, Share L, Crofton JT, Iitake K, Brooks D. Sex differences in the development of deoxycorticosterone-salt hypertension in the rat. *Hypertension*.1987;9:172-177

45) Hoeg JM, Willis SR, Weinberger MH. Estrogen attenuation of the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol*. 1977;233:H369-373,

46) Iams SG, Wexler BC. Inhibition of the development of spontaneous hypertension in SH rats by gonadectomy or estradiol. *J Lab Clin Med*.1979;94:608-616

47) Saruta T, Nakamura R, Kondo K, Matuki S. Oestrogen hypertension in rats. *Clinical Science Molec. Med*. 1975;48:457-460

48) Smith MS, Freman ME, Neill JD. The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology*. 1975;96:219-226

49) Venkov CD, Rankin AB, Vaughan DE. Identification of authentic estrogen receptor in cultured endothelial cells. A potential mechanism for steroid hormone regulation of endothelial function. *Circulation* 1996, 94:727-733

50) Bell DR, Rensberger HJ, Koritnik DR, Koshy A. Estrogen pretreatment directly potentiates endothelium-dependent vasorelaxation of porcine coronary arteries. *Am J Physiol*. 1995; 268:H377-H383

51) Hayashi T, Yamada K, Esaki T, Kuzuya M, Satake S, Ishikawa T, Hidaka H, Iguchi A. Estrogen increases endothelial nitric oxide by a receptor-mediated system. *Biochem Biophys Res Commun* 1995, 214:847-855

52) Han SZ, Karaki H, Ouchi Y, Akishita M, Orimo H. 17 β -estradiol inhibits Ca^{2+} influx and

Ca²⁺ release induced by Thromboxane A2 in porcine coronary artery. *Circulation*.1995;91:2619-2626

53) Alvarez RJ jr., Gips SJ, Moldovan N, Wilhide CC, Milliken EE, Hoang AT, Hruban RH, Silverman HS, Dang CV, Goldschmidt-Clermont PJ. 17 β -estradiol inhibits apoptosis of endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;237:372-381

54) Morales DE, McGowan KA, Grant DS, Maheshwari S, Bhartiya D, Cid MC, Kleinman HK, Schnaper W. Estrogen promotes angiogenic activity in human umbilical vein endothelial cells in vitro and in a murine model. *Circulation*. 1995;91:755-763

55) Fukamachi Y, karasaki Y, Sugiura T, Itoh H, Abe T, Yamamura K, Higashi K. Zinc suppresses apoptosis of U937 cells induced by hydrogen peroxide through an increase of the Bcl-2/Bax ratio. *Biochem Biophys Res Commun* .1998;246(2):364-369

56) Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family : arbiters of cell survival. *Science*. 1998;281:1322-1326

57) Yin XM, Oltvai ZN, Korsmeyer SJ. BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature*.1994;369:321-323

58) Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science*. 1998;281:1309-13

59) Ross R. Atherosclerosis - a problem of the biology of arterial wall cells and their interactions with blood components. *Arteriosclerosis*. 1981; 1: 293-311

60) Sata M, Walsh K. TNF α regulation of Fas ligand expression on the vascular endothelium modulates leukocyte extravasation. *Nature Med*. 1998; 4: 415-420

61) Ross R. Atherosclerosis - an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1998; 340 : 115-126

62) Steinbrecher UP, Zhang HF, Lougheed M. Role of oxidatively modified LDL in atherosclerosis. *Free Radic Biol Med*. 1990; 9 : 155-168

63) Sharma RC, Crawford DW, Kramsch DM, Sevanian A, Jiao Q. Immunolocalization of native antioxidant scavenger enzymes in early hypertensive and atherosclerotic arteries. Role of oxygen free radicals. *Arterioscler Thromb*. 1992; 12 : 403-415

- 64) Tsao PS, Niebauer J, Buitrago R, Lin PS, Wang BY, Cooke JP, Chen YD, Reaven GM. Interaction of diabetes and hypertension on determinants of endothelial adhesiveness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998; 18 : 947-953
- 65) Tribe RM, Poston L. Oxidative stress and lipids in diabetes : a role in endothelium vasodilator dysfunction?. *Vasc Med.* 1996; 1: 195-206
- 66) Varani J, Ward PA. Mechanisms of endothelial cell injury in acute inflammation. *Shock.* 1994; 2 : 311-319
- 67) Escargueil-Blanc I, Meilhac O, Pieraggi MT, Amal JF, Salvayre R, Negre-Salvayre A. Oxidized LDLs induce massive apoptosis of cultured human endothelial cells through a calcium-dependent pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997; 17: 331-339
- 68) Dimmeler S, Haendeler J, Galle J, Zeiher AM. Oxidized low-density lipoprotein induces apoptosis of human endothelial cells by activation of CPP32 - like proteases. *Circulation.* 1997; 95:1760-1763
- 69) Harada-Shiba M, Kinoshita M, Kamido H, Shimokado K. Oxidized low density lipoprotein induces apoptosis in cultured human umbilical vein endothelial cells by common and unique mechanisms. *J Biol Chem.* 1998; 273: 9681-9687
- 70) Sata M, Walsh K. Oxidized LDL activates Fas-mediated endothelial cell apoptosis. *J Clin Invest.* 1998; 102 : 1682-1689
- 71) Hermann C, Zeiher AM, Dimmeler S. Shear stress inhibits H₂O₂-induced apoptosis of human endothelial cells by modulation of the glutathione redox cycle and nitric oxide synthase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997; 17: 3588-3592
- 72) Spyridopoulos I, Brogi E, Kearney M, Sullivan AB, Cetrulo C, Isner JM, Losordo DW. Vascular endothelial growth factor inhibits endothelial cell apoptosis induced by tumor necrosis factor - alpha : balance between growth and death signals. *J Mol Cell Cardiol.* 1997; 29:1321-1330
- 73) Karsan A, Yee E, Harlan JM. Endothelial cell death induced by tumor necrosis factor - alpha is inhibited by the Bcl - 2 family member, A1. *J Biol Chem.* 1996; 271: 27201-27204





Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM Kodak

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

