

博士学位論文

血管炎症および動脈硬化に対する  
**Neopterin** の抑制作用

白井 玲美奈

東京薬科大学 生命科学研究科 心血管医科学研究室

## 目次

1. 略語一覧.....	4
2. 序論.....	5
3. 実験材料.....	8
4. 方法.....	9
4.1. ヒト血液と冠動脈硬化病変のサンプル採取.....	9
4.2. ヒト単球初代培養.....	9
4.3. Cholesterol Esterification Assay.....	10
4.4. Cholesterol Efflux Assay.....	10
4.5. Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR).....	10
4.6. 単球接着アッセイ.....	11
4.7. 細胞遊走アッセイ.....	12
4.8. 細胞増殖アッセイ.....	12
4.9. アポトーシスアッセイ.....	13
4.10. Western Blotting.....	13
4.11. ザイモグラフィー.....	14
4.12. 動物実験.....	14
4.13. 動物パラメータ測定.....	14
4.14. 動脈硬化病変の評価.....	15
4.15. 統計解析.....	15
5. 結果.....	17
5.1. Non-CAD および CAD 患者の冠動脈硬化病変における Neopterin の発現.....	17
5.2. Non-CAD および CAD 患者における血漿中 Neopterin 濃度.....	18
5.3. ヒト大動脈内皮細胞の増殖に対する Neopterin の作用.....	21
5.4. ヒト大動脈内皮細胞における炎症分子の mRNA 発現に対する Neopterin の作用.....	22
5.5. ヒト大動脈内皮細胞における炎症分子のタンパク質発現に対する Neopterin の作用.....	23
5.6. ヒト大動脈内皮細胞へのヒト単球接着に対する Neopterin の作用.....	24
5.7. ヒト単球由来マクロファージの炎症性フェノタイプに対する Neopterin の作用.....	25
5.8. ヒト単球由来マクロファージの泡沫化に対する Neopterin の作用.....	26

5.9. ヒト単球由来マクロファージの泡沫化関連タンパク質発現、 Cholesterol Efflux に対する Neopterin の作用 .....	27
5.10. ヒト大動脈平滑筋細胞の遊走に対する Neopterin の作用 .....	29
5.11. ヒト大動脈平滑筋細胞の増殖に対する Neopterin の作用 .....	30
5.12. ヒト大動脈平滑筋細胞のアポトーシスに対する Neopterin の作用 .....	31
5.13. ヒト大動脈平滑筋細胞のシグナル伝達に対する Neopterin の作用 .....	32
5.14. ヒト大動脈平滑筋細胞の細胞外マトリックス (ECM) 発現に対する Neopterin の作用.....	34
5.15. <i>ApoE</i> <sup>-/-</sup> マウスにおける外因性 Neopterin 投与または 内因性 Neopterin 阻害による動脈硬化病変の進展への影響 .....	35
5.16. <i>ApoE</i> <sup>-/-</sup> マウスにおける大動脈弁輪部の動脈硬化性プラーク内の Neopterin 発現と炎症性変化.....	38
5.17. <i>ApoE</i> <sup>-/-</sup> マウスにおける大動脈弁輪部の動脈硬化性プラーク内の CD4+および CD8+ T 細胞浸潤に対する Neopterin の作用.....	40
5.18. <i>ApoE</i> <sup>-/-</sup> マウスにおける動脈硬化性プラークの安定化に対する Neopterin の作用.....	41
6. 考察 .....	42
7. 結論 .....	46
8. 謝辞 .....	47
9. 引用文献 .....	48

## 1. 略語一覽

ABCA1	ATP-Binding Cassette Transporter A1	LDL	Low-Density Lipoprotein
ABCG1	ATP-Binding Cassette Transporter G1	LXR- $\alpha$	Liver X Receptor- $\alpha$
ACAT-1	Acyl-CoA:Cholesterol Acyltransferase-1	MARCO	Macrophage Receptor With Collagenous Structure
AngII	Angiotensin II	MCP-1	Monocyte Chemotactic Protein-1
ApoA1	Apolipoprotein A1	M-CSF	Macrophage Colony Stimulating Factor
ApoE	Apolipoprotein E	MMP	Matrix Metalloproteinase
Bax	Bcl-2 Associated X	MRC1	Mannose Receptor C Type 1
BSA	Bovine Serum Albumin	NCEH	Neutral Cholesterol Ester Hydrolase
CAD	Coronary Artery Disease	NF- $\kappa$ B	Nuclear Factor- $\kappa$ B
CD36	Cluster of Differentiation 36	PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis
CD68	Cluster of Differentiation 68	PBS	Phosphate Buffered Saline
CE	Cholesterol Ester	PI3K	Phosphoinositide 3-Kinase
DAPI	6-Diamidino-2-Phenylindole	PKC	Protein Kinase C
ECM	Extracellular Matrix	PPAR- $\gamma$	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$
EC	Endothelial Cell	ROS	Reactive Oxygen Species
EG	Endothelial Growth	RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
ERK	Extracellular Signal-Regulated Kinase	SMA	Smooth Muscle Actin
FBS	Fetal Bovine Serum	SmGM	Smooth Muscle Cell Growth Medium
FC	Free Cholesterol	SR-BI	Scavenger Receptor Class B Type I
GAPDH	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase	TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloproteinase
GTP	Guanosine Triphosphate	TNF- $\alpha$	Tumor Necrosis Factor- $\alpha$
HAEC	Human Aortic Endothelial Cell	TUNEL	Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-Mediated Deoxyuridine Triphosphate-Biotin Nick End Labelling
HASMC	Human Aortic Smooth Muscle Cell	VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule-1
HDL	High-Density Lipoprotein	VSMC	Vascular Smooth Muscle Cell
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule-1		
IL-6	Interleukin-6		

## 2. 序論

動脈硬化は、血管内皮の傷害により引き起こる血管壁の慢性炎症である [1]。血管内皮細胞 (EC) に炎症が起こると、炎症性サイトカインである Interleukin-6 (IL-6) や Monocyte Chemotactic Protein-1 (MCP-1)、更には接着分子である Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1)、Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1)、E-Selectin の発現を誘導する。これらの要因により、単球や T 細胞の新生内膜への接着および浸潤を招き、Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) や Interferon- $\gamma$  などの炎症性サイトカイン発現を誘導する。内皮下に浸潤した単球由来マクロファージは、酸化 Low-Density Lipoprotein (LDL) を取り込み泡沫細胞となり、集簇して脂質コアを形成する [1,2]。マクロファージの泡沫化とは、細胞質内コレステロールエステル (CE) の過剰蓄積である。酸化 LDL 受容体の Cluster of Differentiation 36 (CD36) と Cholesterol Efflux に関わる ATP-Binding Cassette Transporter A1 (ABCA1) や ABCG1、Scavenger Receptor Class B Type I (SR-BI) のバランスに依存している [2]。また、細胞内コレステロールエステル化酵素の Acyl-CoA:Cholesterol Acyltransferase-1 (ACAT-1)、その加水分解酵素 Neutral Cholesterol Ester Hydrolase (NCEH) のアンバランスによっても CE の過剰蓄積が引き起こる [2,3]。マクロファージは炎症性 M1 或いは抗炎症性 M2 のフェノタイプに分類され、そのバランスが動脈硬化病変形成に関与すると考えられている [4]。泡沫細胞の集簇と共に、血管平滑筋細胞 (VSMC) の遊走・増殖や EC の過剰な増殖、VSMC からの細胞外マトリックス (ECM) すなわち Collagen、Matrix Metalloproteinase (MMP)、Tissue Inhibitor of Metalloproteinase (TIMP)、Fibronectin、Elastin の合成により動脈硬化病変は形成されていく [1,5] (図 1)。

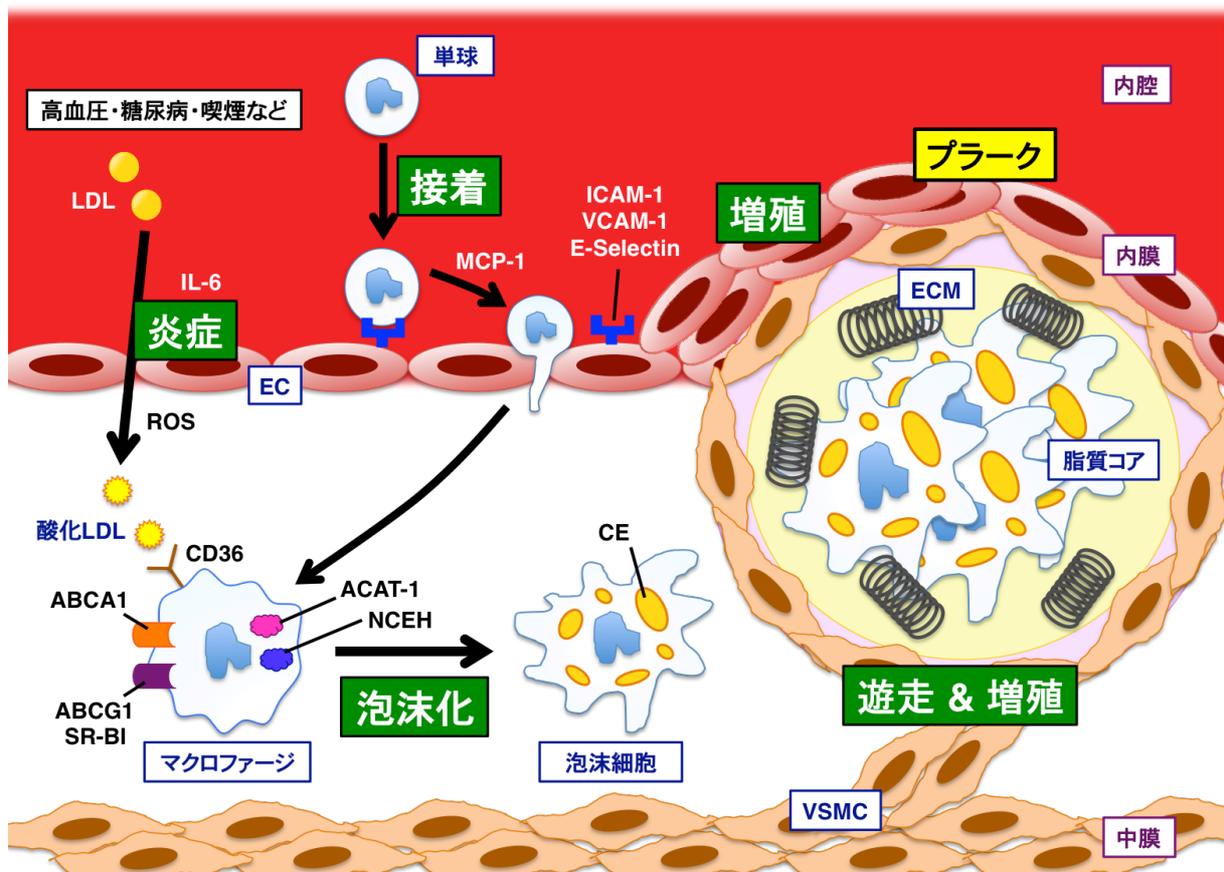


図 1: 動脈硬化の初期病変形成のメカニズム

ABCA1: ATP-Binding Cassette Transporter A1, ABCG1: ATP-Binding Cassette Transporter G1, ACAT-1: Acyl-CoA:Cholesterol Acyltransferase-1, CD36: Cluster of Differentiation 36, CE: Cholesterol Ester, EC: Endothelial Cell, ECM: Extracellular Matrix, ICAM-1: Intercellular Adhesion Molecule-1, IL-6: Interleukin-6, LDL: Low-Density Lipoprotein, MCP-1: Monocyte Chemotactic Protein-1, NCEH: Neutral Cholesterol Ester Hydrolase, ROS: Reactive Oxygen Species, SR-BI: Scavenger Receptor Class B Type I, VCAM-1: Vascular Cell Adhesion Molecule-1, VSMC: Vascular Smooth Muscle Cell.

Neopterin は Guanosine Triphosphate (GTP) の代謝産物で、活性化 T リンパ球から放出された Interferon- $\gamma$  の刺激によりマクロファージから産生される [6,7]。Neopterin は単球/マクロファージの活性化マーカーとしても知られているが [8]、その受容体は未だに同定されていない。更に、Neopterin は抗酸化作用を持つことも報告されている [9]。冠動脈疾患 (CAD) 患者では血漿中 Neopterin 濃度が高値であり [10]、ヒト冠動脈・頸動脈・大動脈硬化病変で強発現している [11,12,13]。Neopterin は、ABCA1、ABCG1 の発現を抑制し、Liver X Receptor- $\alpha$  (LXR- $\alpha$ ) を介して Apolipoprotein A1 (ApoA1) や High-Density Lipoprotein (HDL) による Cholesterol Efflux を抑制することでヒト急性単球性白血病細胞株 (THP-1) 由来マクロファージの泡沫化を促進することが報告されている [14]。しかし、Neopterin の動脈硬化病変形成との因果関係は明らかでない。

本研究の目的は、血管炎症および動脈硬化に対する Neopterin の作用を解明する事である。本研究では、CAD 患者における冠動脈病変内と血漿中の Neopterin 発現レベルを解析する。また、Neopterin によるヒト EC の増殖および炎症・単球接着に対する作用、ヒト単球由来マクロファージ (HMDM) の炎症性フェノタイプおよび泡沫化に対する作用、ヒト大動脈平滑筋細胞 (HASMC) の遊走・増殖・ECM 産生に対する作用を *In Vitro* で検討する。更に、動脈硬化モデルである *ApoE*<sup>-/-</sup>マウスの動脈硬化病変への制御作用を *In Vivo* で検討する。

### 3. 実験材料

Neopterin (Cat#N1656) およびポリクローナル Rabbit 抗 Neopterin 抗体 (Cat#MBS223305) は LKT Laboratories (St. Paul, MN, USA) および My Biosource (San Diego, CA, USA) から購入し、全ての実験において用いた。Neopterin Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Kit (Cat#IB5003) は Immuno-Biological Laboratories (Hamburg, Germany) から購入した。本 ELISA Kit は、Neopterin に 100%の免疫反応性を示し、7,8-Dihydro-Neopterin には 2.0%、5,6,7,8-Tetrahydro-Neopterin には<0.44%しか反応を示さない。Neopterin の検出限界値は、0.7 nmol/L である。測定内誤差は 4.3–11.7%、測定間誤差は 8.8–13.8%である。

## 4. 方法

### 4.1. ヒト血液と冠動脈硬化病変のサンプル採取

本臨床研究は、ヘルシンキ宣言に則り、昭和大学および東京薬科大学の倫理委員会の承認を得た後、135名の全被験者からインフォームドコンセントを得て施行された。緊急カテーテル治療のため昭和大学病院に入院したCAD患者92名（男性64名、女性28名；年齢40–82歳）およびNon-CAD患者43名（男性17名、女性26名；年齢50–82歳）を対象とし、全例から血液サンプルを採取した。CAD患者のうち22名が不安定狭心症（心筋梗塞に移行しやすい狭心症）、67名が急性心筋梗塞（心筋梗塞発症から3日以内）、2名が亜急性心筋梗塞（心筋梗塞発症後3–30日経過）、1名が陳旧性心筋梗塞（心筋梗塞発症後30日以上経過）である。血漿中 Neopterin 濃度は年齢と相関するため [15]、CAD 群と同一年齢になるよう抽出した Non-CAD 群には軽度の高血圧、糖尿病、脂質異常症を有する患者が含まれていた。また、感染症や炎症性疾患は血漿中 Neopterin 濃度を増加させる要因であるため [16]、両疾患患者は研究対象から除外した。血漿中 Neopterin 濃度の測定は、Neopterin ELISA Kit を用いて行った。

ヒト冠動脈の動脈硬化病変の解析には、国立循環器病研究センターのバイオバンクより2000年から2010年までの期間に提供されたヒト冠動脈のパラフィン包埋切片を用いた。CAD患者として心筋梗塞の既往歴を有する12名（男性8名、女性4名；年齢60–87歳）の狭窄・非狭窄冠動脈、Non-CAD患者として冠動脈病変を有さない拡張型心筋症患者4名（男性4名；19–39歳）の正常冠動脈において3–4  $\mu\text{m}$  の連続切片を作製し、各種免疫染色（Neopterin、CD68、 $\alpha$ -SMA）を行った [17–20]。全ての免疫染色は国立循環器病研究センター病理部で共同研究により行われた。

### 4.2. ヒト単球初代培養

東京薬科大学の倫理委員会の承認を得て、被験者からインフォームドコンセントを得た上で実施された。健常者19名（男性7名、女性12名；年齢19–24歳）から採血し、ヒト末梢単核球を分離した。その後、抗CD14マイクロビーズ抗体（Cat#130-050-201; Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA）により単球を調製し、3.5-cm Dishに  $1 \times 10^6$  cells/1 mLになるように播種し、Cholesterol Esterification AssayとWestern Blottingを行った [17–26]。細胞は37°C、5% CO<sub>2</sub>条件下で培養し、培地にはRPMI-1640 (Cat#R8758; Sigma, St. Louis, MO, USA) にヒト血清を10%、

ストレプトマイシン 0.05 mg/mL、ペニシリン 50 U/mLになるように調製したものを用い、Neopterin各濃度 (0–200 nmol/L) を添加し、7日間培養した。3日毎に各濃度のNeopterinを含む培地に交換した。

#### 4.3. Cholesterol Esterification Assay

ヒト単球を10%ヒト血清含有RPMI-1640培地で7日間培養し、分化したHMDMにNeopterin (0–200 nmol/L) と 50 µg/mLの酸化LDL、ウシ血清アルブミン (BSA; Cat#O3008; Sigma) に結合させた100 µmol/Lの<sup>3</sup>H]オレイン酸 (Cat#NET289; PerkinElmer, Yokohama, Japan) を添加し、更に19時間培養した [17–24]。細胞内から抽出した脂質を薄層クロマトグラフィーにより分離し、CE分画部におけるコレステロール-<sup>3</sup>H]オレイン酸の放射活性を測定することで、HMDMにおける泡沫化の程度を評価した。

#### 4.4. Cholesterol Efflux Assay

ヒト単球を10%ヒト血清含有RPMI-1640培地で7日間培養し、分化したHMDMにNeopterin (0, 200 nmol/L) と <sup>3</sup>H]コレステロール (74 kBq/mL) (Cat#NET139; PerkinElmer) で標識した酸化LDL (50 µg/mL) を添加し、更に24時間培養してマクロファージを泡沫化させた。上記濃度のNeopterinを含む0.1% BSA含有の無血清RPMI-1640培地で2時間培養後、50 µg/mLのApoA1またはHDL (Cat#11P-101, Cat#80P-HD101; Academy Bio-Medical, Houston, TX, USA) を含む0.1% BSA含有の無血清RPMI-1640培地で更に16時間培養した [17,26]。その後、培養上清を回収し、15,000 rpmで10分間遠心し、細胞片を取り除いた。細胞はPhosphate-Buffered Saline (PBS) で2回洗浄し、0.3 mLの1 N NaOHで溶解した。培養上清および細胞における<sup>3</sup>H]コレステロールの放射活性を液体シンチレーションカクテルを用い測定し、Cholesterol Effluxを算出した [17,26]。

#### 4.5. Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

ヒト大動脈内皮細胞 (HAEC; Cat#KA-4009; Kurabo, Osaka, Japan) には、Humedia-EG2 (Cat#KE-2150S; Kurabo) 培地を用いた。HAECを播種後、200 nmol/LのNeopterinで30分前処理を行った。その後、Neopterinおよび10 ng/mLのTNF-α (Cat#300-01A; PeproTech, Rocky Hill,

NJ, USA) 含有培地に交換して 4 時間刺激した [17]。Total RNA は High Pure RNA Isolation Kit (Cat#11828665001; Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) を用いて抽出し、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Cat#4368814; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いて cDNA 合成を行った。IL-6、MCP-1、ICAM-1、VCAM-1、E-Selectin、Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH) の mRNA を GoTaq<sup>®</sup> Green Master Mix (Cat#M7122; Promega, Madison, WI, USA) を用いて、2%アガロースゲル電気泳動により検出した [17,19–22,24]。ここで用いたプライマー配列については表 1 に記載した。

表 1. RT-PCR で用いたプライマー配列

Gene		Primer Sequence (5'→3')	Product Size (bp)
IL-6	Forward	ATGAACTCCTTCTCCACAAGCGC	628
	Reverse	GAAGAGCCCTCAGGCTGGACT	
MCP-1	Forward	CAATAGGAAGATCTCAGTGC	189
	Reverse	GTGTTCAAGTCTTCGGAGTT	
ICAM-1	Forward	CGACTGGACGACAGGGATTGT	290
	Reverse	ATTATGACTGCGGCTGCTACC	
VCAM-1	Forward	TCCCTACCATTGAAGATACTGGAAA	146
	Reverse	GCTGACCAAGACGGTTGTATCTC	
E-Selectin	Forward	CCTACAAGTCCTCTTGTGCCTTC	206
	Reverse	ACAGGCGAACTTGCACACA	
GAPDH	Forward	ACCACAGTCCATGCCATCAC	451
	Reverse	TCCACCACCCTGTTGCTGTA	

#### 4.6. 単球接着アッセイ

HAECを24 Wellプレートに播種し、Humedia-EG2培地でコンフルエントになるまで16時間培養した。Neopterin各濃度 (0–200 nmol/L) で30分前処理の後、10 ng/mLのTNF- $\alpha$ で4時間刺激した。引き続き、Cell Trace™ Calcein Red-Orange (Cat#C34851; Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) で蛍光標識した $1 \times 10^5$ 個のTHP-1細胞 (Cat# JCRB0112; Health Science Research Resources Bank, Osaka, Japan) を24 Wellプレートに播種してあるHAECと1時間共培養し、未接着のTHP-1単球を除くために4回Wash後、接着したTHP-1単球を蛍光顕微鏡 (IX70; Olympus, Tokyo, Japan) で撮影した。単球接着は画像解析ソフト (ImageJ; NIH, Bethesda, MD, USA) を用いて評価した [17,22,27]。

#### 4.7. 細胞遊走アッセイ

6–8継代目のHASMC (Cat#C2571; Lonza) を8 Well Culture Slideに $3 \times 10^3$  cells/250  $\mu$ Lになるように播種し、SmGM-2培地 (Cat#CC3182; Lonza) で3–5時間培養した。その後、無血清SmGM-2培地に交換し、Neopterin (0–100 nmol/L) または抗Neopterin抗体 (25  $\mu$ L/mL) で30分前処理の後、Angiotensin II (AngII; Cat#A9525; Sigma) 500 nmol/Lを添加して16時間、10分毎に撮影した。1 Well当たり10個の細胞を任意に抽出し、16時間分の移動距離の総和を算出し、その平均を求めた。細胞培養間の撮影にはタイムラプス顕微鏡 BIOREVO BZ-9000 (Keyence, Osaka, Japan) を用いた [17–24]。

#### 4.8. 細胞増殖アッセイ

2–8継代目のHAEC、HASMCを $1 \times 10^4$  cells/100  $\mu$ Lで96 Well Plateに播種し、各々の培地 (Humedia-EG2、SmGM-2) で24時間培養した。Neopterin (0–100 nmol/L) または抗Neopterin抗体 (10  $\mu$ L/mL)、c-Src阻害剤 (0.1  $\mu$ mol/L Saracatinib; Cat#A10108; Adooq Bioscience, Irvine, CA, USA)、MAPK/ERK Kinase (MEK) 1/2 阻害剤 (10  $\mu$ mol/L SL327; Cat#S4069; Sigma) を添加して48時間培養した。その後、WST-8溶液 (Cell Count Reagent SF; Cat#07553-44; Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) 10  $\mu$ Lを加えて1時間反応させ、生細胞から生成されたホルマザン量をマイクロプレートリーダー (Tecan, Kawasaki, Japan) を用いて波長450 nmにおける吸光度を測定することで増殖を評価した [17–24]。

#### 4.9. アポトーシスアッセイ

12 Well PlateにHASC MC ( $3 \times 10^5$  cells/1 mL) を播種し、24時間培養後、Neopterin各濃度 (0, 200 nmol/L)で48時間培養した。細胞をPBSで希釈した4% Paraformaldehyde (PFA) で固定し、In Situ Apoptosis Detection Kit (Cat#MK-500; Takara Bio, Otsu, Japan) を用いてTerminal Deoxynucleotidyl Transferase-Mediated Deoxyuridine Triphosphate-Biotin Nick End Labeling (TUNEL) 染色 [17,21,22] を行い、6-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI; Cat#342-07431; Dojindo, Kumamoto, Japan) で核を染色した。各サンプルにおいてランダムに3箇所を撮影し、1視野毎にTUNEL染色ポジティブの細胞数を計測し、平均値を求めた。

#### 4.10. Western Blotting

HMDM、HAEC、HASC MCにおいて、Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) を行った後にWestern Blottingにて以下の抗体を用いそれぞれのタンパク質発現を検討した。1次抗体には、Neopterin (Cat#MBS223305; My Biosource)、ACAT-1、CD68、E-Selectin、ICAM-1 (Cat#sc-20951, sc-17832, sc-137054, sc-8439; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)、CD36 (Cat#AF1955; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)、NCEH (Cat#14021-AP; ProteinTech, Chicago, IL)、ABCA1、ABCG1、SR-BI、Collagen-1 (Cat#NB400-105, NB400-132, NB400-131, NB600-408; Novus Biologicals, Littleton, CO, USA)、Collagen-3、Fibronectin、Phospho-Nuclear Factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) p65 (Ser529)、 $\alpha$ -Tubulin、MMP-2 (Cat#GTX102997, GTX112794, GTX50254, GTX112141, GTX104577; GeneTex, Irvine, CA, USA)、MMP-9 (Cat#E11-0275C; EnoGene, Atlanta, GA, USA)、TIMP-2 (Cat#250884; Abbiotec, San Diego, CA, USA)、Elastin、MARCO (Cat#bs-1756-R, bs-2659R; Bioss, Woburn, MA, USA)、MRC1 (Cat#LS-C40886-100; LifeSpan BioSciences, Seattle, WA, USA)、Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ; Cat#21649; Signalway Antibody, College Park, MD, USA)、Phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr204)、Phospho-Akt (Ser/Thr) (Cat#4376, 9614b; Cell Signaling Technology, Tokyo, Japan)、c-Src (Cat#BS1330; Bioworld Technology, St. Louis Park, MN)、SMemb (Cat#7602; Yamasa, Tokyo, Japan)、Raf-1、LXR- $\alpha$ 、Phosphoinositide 3-Kinase (PI3K)、Bcl-2、Bcl-2 Associated X Protein (Bax)、VCAM-1 (Cat#ab32025, ab3585, ab40755, ab32124, ab32503, ab134047; Abcam, Cambridge, UK)、 $\beta$ -Actin (Cat#A1978; Sigma) に対する特異抗体を用い、2次抗体には各々に適した抗体を使用した [17-24]。

#### 4.11. ザイモグラフィー

MMP-2 と MMP-9 の酵素活性をゼラチンザイモグラフィーKit (Cat#AK45; Cosmo Bio, Tokyo, Japan) を用いて解析した [17,19,21,22]。Neopterin 各濃度 (0–100 nmol/L) を添加した無血清 SmGM-2 培地で 48 時間培養した HASMC の培養上清を回収した。培養上清をサンプル調整バッファーと混合し、0.1%ゼラチン含有ゲルで SDS-PAGE を行った。その後、洗浄液で 1 時間洗浄し、37°C で 20 時間酵素反応させ、Coomassie Brilliant Blue 染色した。

#### 4.12. 動物実験

本動物実験は、US National Research Council の動物実験ガイドラインに則り、東京薬科大学の動物実験委員会の承認を得て行われた。

##### 実験 1 : 外因性Neopterin投与による動脈硬化病変進展の検討

日本SLC株式会社 (Hamamatsu, Japan) から購入した26匹の雄性*Apoe*<sup>-/-</sup>マウス (C57BL/6. KOR/StmSlc-*Apoe*<sup>shl</sup> mice) を用いた。13週齢より、高コレステロール食餌 (16.5% 脂肪、1.25% コレステロール、0.5% コール酸ナトリウム、Cat#F2HFD1; Oriental Yeast, Tokyo, Japan) を与えた [17–19,21–23]。17週齢において、8匹は投与前コントロールとして解剖した。残りの18匹を2群に分け、10匹はPBS、8匹はNeopterinを、21週齢までの4週間、毎日腹腔内投与した。Neopterinの投与量は、参考文献から1.2 μmol/kg/日に設定した [28–31]。

##### 実験 2 : Neopterin中和抗体投与による動脈硬化病変進展の検討 (内因性Neopterinの阻害)

日本 SLC 株式会社から購入した 11 匹の雄性 *Apoe*<sup>-/-</sup>マウス (BALB/c. KOR/StmSlc-*Apoe*<sup>shl</sup> mice) に、13 週齢より高コレステロール食餌を開始した。17 週齢で 2 群に分け、6 匹には PBS、5 匹には抗 Neopterin 抗体 (2.5 μL/kg/時) を浸透圧ミニポンプ (Cat#Alzet Model 1002; DURECT Corporation, Cupertino, CA, USA) を用いて 4 週間投与した。マウスの皮下へのポンプの植え込みは、Medetomidine-Midazolam-Butorphanol 三種混合麻酔下 (0.3 mg/kg、4.0 mg/kg、5.0 mg/kg、腹腔内投与) で迅速に行われ、2 週間毎に新しいポンプと入れ替えた。

#### 4.13. 動物パラメータ測定

投与前の17週齢および投与後の21週齢時において、保温器に固定したマウスを無麻酔下でTail-Cuff法 (Kent Scientific, Torrington, CT, USA) にて収縮期および拡張期血圧を測定した。

また17週齢または21週齢時に、4時間絶食後にMedetomidine-Midazolam-Butorphanol三種混合麻酔下で開腹して、大静脈から全血を採取した。遠心分離で得られた血漿を用い、空腹時血糖値、総コレステロール値を酵素法 (Denka Seiken, Tokyo, Japan)、HDLコレステロール値を沈殿法 (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) で測定した [17-19,21-23]。また、血漿中のNeopterin濃度およびPentraxin-3濃度をELISA Kit (Cat#IB5003; Immuno-Biological Laboratories および Cat#MPT30; R&D Systems) を用い測定した。

#### 4.14. 動脈硬化病変の評価

17週齢または21週齢マウスを深麻酔下での採血後、直ちに開胸し、心尖部からPBSを灌流して心臓内および血管内を洗浄し、引き続き4% PFA灌流にて大動脈を固定し、心臓および大動脈を摘出した。大動脈に付着している脂肪および結合組織を注意深く取り除いた。胸腹部の大動脈の展開標本の内腔面と大動脈弁輪部の輪切り切片においてOil Red O染色を行い、動脈硬化病変の面積やプラークの大きさを測定した。大動脈弁輪部においては連続切片を作製して、Neopterin、Interferon- $\gamma$ 、MCP-1の発現、血管炎症、単球/マクロファージ、CD4 $^{+}$ ・CD8 $^{+}$ T細胞の浸潤、ECおよびVSMCの含有量を、各々、抗Neopterin抗体 (Cat#MBS223305; My Biosource)、抗Interferon- $\gamma$ 抗体 (Cat#ab9657; Abcam)、抗MCP-1抗体 (Cat#ab7202; Abcam)、抗Pentraxin-3抗体 (Cat#bs-5783R; Bioss)、抗MOMA-2抗体 (Cat#MAB1852; Millipore, Billerica, MA)、抗CD4抗体 (Cat#ab183685; Abcam)、抗CD8抗体 (Cat#ab22378; Abcam)、抗Podocalyxin抗体 (Cat#AF1556; R&D)、抗 $\alpha$ -Smooth Muscle Actin抗体 ( $\alpha$ -SMA; Cat#C6198; Sigma)を用い染色した [17-19,21-23]。特異的に染色された部位を画像編集ソフト (Photoshop; Adobe, San Jose, CA, USA) を用い当該面積を設定し、それらの面積を定量 (ImageJ; NIH, Bethesda, MD) した。更に、プラークの不安定化を大動脈弁輪部におけるPentraxin-3の高発現、並びにマクロファージ含有量 ( $\mu\text{m}^2$ )/VSMC含有量 ( $\mu\text{m}^2$ ) の比率の増加を指標に評価した [17,22,32]。

#### 4.15. 統計解析

母集団の正規分布の評価にはKolmogorov-Smirnov検定を用いた。正規分布のデータは平均値 (Mean)  $\pm$  標準誤差 (SEM)、非正規分布のデータは中央値 (25パーセンタイル、75パーセンタイル) で表した。正規分布の2群間においては対応のないStudent t検定、非正規分布の2群間においてはノンパラメトリックMann-Whitney U検定を用いた。3群間以上の場合で

は一元配置分散分析 (ANOVA) 後に Bonferroni Post-Hoc 検定を行った。頻度や割合 (%) を表すカテゴリー変数は Fisher Exact 検定を行った。統計解析は、Statview-J 5.0 (SAS Institute, Cary, NC, USA) を用いて行い、 $P < 0.05$  をもって統計学的に有意差とした。

## 5. 結果

### 5.1. Non-CAD および CAD 患者の冠動脈硬化病変における Neopterin の発現

Non-CAD 患者 4 例と CAD 患者 12 例の冠動脈において、Neopterin 発現レベルを解析した。Non-CAD 患者および CAD 患者の正常および非狭窄冠動脈には Neopterin はほとんど発現していなかった (図 2A,B)。しかし、CAD 患者の狭窄冠動脈において、冠動脈の脂肪線条やプラーク内のマクロファージ泡沫細胞の集簇部分に一致して Neopterin が強発現していたことを確認した (Data Not Shown)。冠動脈硬化病変における Neopterin 発現レベルは冠動脈疾患の重症度に伴って増加していた (図 2B-D)。

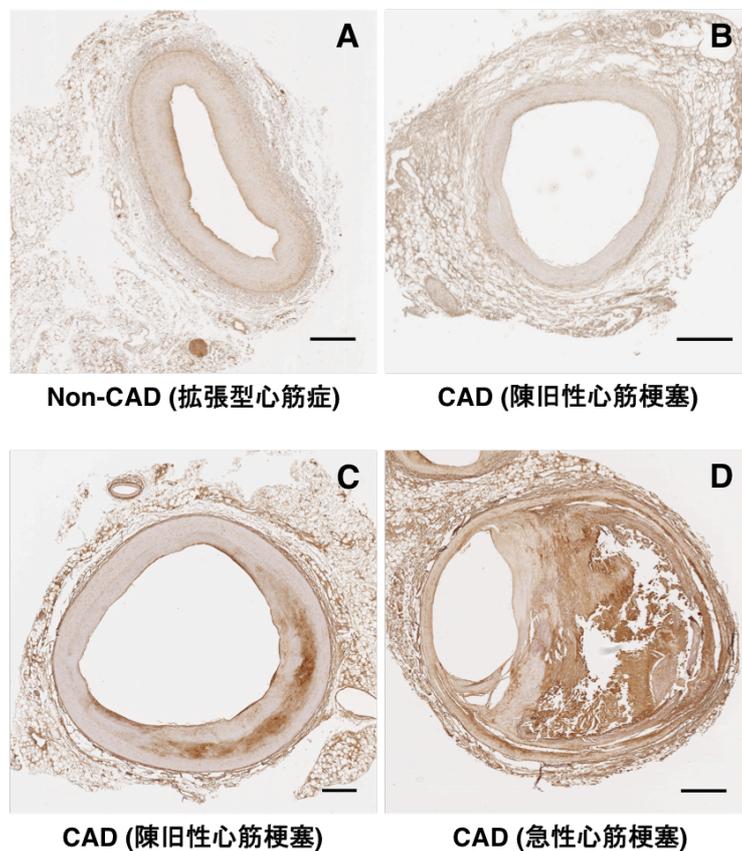


図 2. Non-CAD および CAD 患者のヒト冠動脈硬化病変における Neopterin 発現。

A-D, Non-CAD 患者 (A: 男性、31 歳)、CAD 患者 (B: 女性、83 歳、C: 男性、70 歳、D: 男性、62 歳) の冠動脈を抗 Neopterin 抗体で染色した。但し、染色した冠動脈は急性冠動脈イベントの責任病変とは限らない。Scale Bar = 500  $\mu$ m。

## 5.2. Non-CAD および CAD 患者における血漿中 Neopterin 濃度

Non-CAD 患者 43 例と CAD 患者 92 例において血漿中 Neopterin 濃度を比較した。表 2 に示す如く、Non-CAD 群に比べ CAD 群において、性別 (男性)、喫煙、糖尿病の割合、血漿中の高感度 C 反応性タンパク (Hs-CRP) 濃度が有意に高く、高血圧、脂質異常症、高血圧治療薬 (AngII 受容体拮抗剤) の服用率、血漿中 HDL コレステロール濃度が有意に低かった (表 2)。年齢、糖尿病治療薬、高血圧治療薬 [Angiotensin 変換酵素 (ACE) 阻害剤、カルシウム拮抗剤、 $\beta$  ブロッカー剤]、脂質異常症治療薬 (スタチン、フィブラート) の服用率や血漿中 LDL コレステロール濃度については両群間には有意差は認められなかった (表 2)。

図 3 に示すように、血漿中 Neopterin 濃度は、Non-CAD 群に比べ CAD 群では有意に高値であった ( $9.7 \pm 0.6$  vs.  $12.3 \pm 1.0$  nmol/L,  $P < 0.05$ )。CAD 群において、血漿中 Neopterin 濃度は亜急性心筋梗塞 + 陳旧性心筋梗塞患者群に比べ、急性心筋梗塞 + 不安定狭心症患者群 (急性冠症候群) では高い傾向にあった ( $8.4 \pm 1.5$  vs.  $12.4 \pm 1.0$  nmol/L,  $P = 0.4620$ )。

表 2. 患者背景

	Non-CAD 患者 (n = 43)	CAD 患者 (n = 92)
年齢 (歳)	64.3 ± 1.3	67.6 ± 1.1
男性 (%)	39.5	69.6*
喫煙 (%)	25.6	69.6 <sup>†</sup>
糖尿病 (%)	11.6	28.3 <sup>‡</sup>
高血圧 (%)	100.0	66.3 <sup>†</sup>
脂質異常症 (%)	51.2	30.4 <sup>‡</sup>
糖尿病治療薬 (%)	7.0	14.1
AngII 受容体拮抗剤 (%)	62.8	32.6*
ACE 阻害剤 (%)	2.3	3.3
カルシウム拮抗剤 (%)	51.2	33.7
β ブロッカー剤 (%)	9.3	9.8
スタチン (%)	32.6	23.9
フィブラート (%)	11.6	7.6
LDL コレステロール (mg/dL)	122.2 ± 4.8	118.2 ± 3.8
HDL コレステロール (mg/dL)	59.3 ± 2.3	45.0 ± 1.3 <sup>†</sup>
Hs-CRP (mg/dL)	0.1 ± 0.0	1.2 ± 0.3 <sup>§</sup>

Values = Mean ± SEM or %. \* $P < 0.005$ , <sup>†</sup> $P < 0.0001$ , <sup>‡</sup> $P < 0.05$ , <sup>§</sup> $P < 0.01$  vs. Non-CAD 患者.

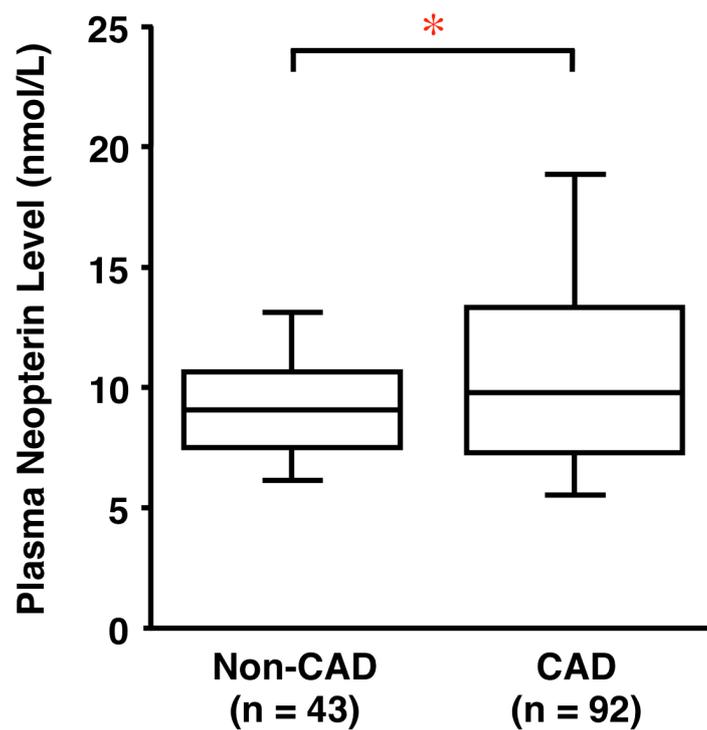


図 3. Non-CAD および CAD 患者の血漿中 Neopterin 濃度。

Non-CAD 患者 43 例と CAD 患者 92 例の血漿中 Neopterin 濃度を ELISA で測定し、濃度の比較を箱ひげ図で示した。Box の中心線は中央値、下端線は 25 パーセントイル、上端線は 75 パーセントイル、Box 外の下部バーは 10 パーセントイル、上部バーは 90 パーセントイルを示す。\* $P < 0.05$ .

### 5.3. ヒト大動脈内皮細胞の増殖に対する Neopterin の作用

Neopterin は、HAEC の増殖を 1、10 nmol/L において有意に抑制した (図 4)。

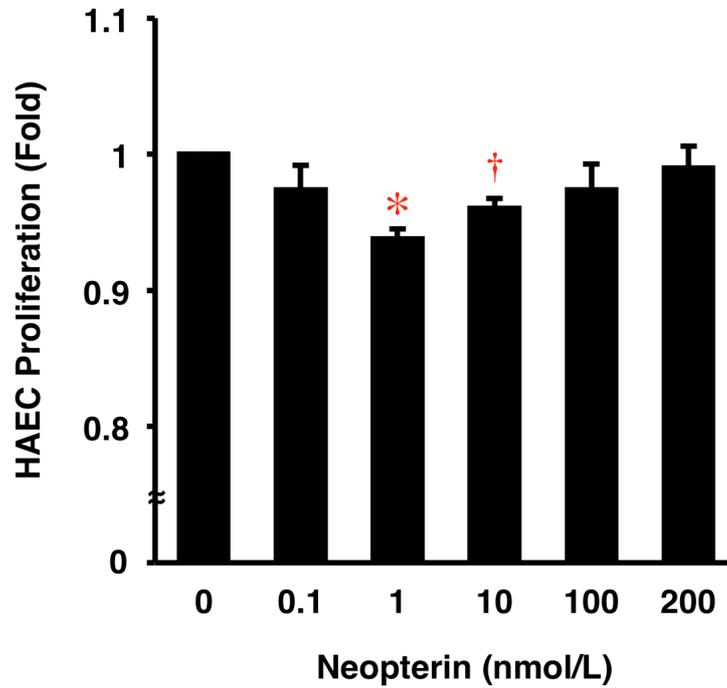


図 4. HAEC の増殖に対する Neopterin の作用。

5% FBS-Humedia-EG2 培地で培養した HAEC を Neopterin 各濃度で 48 時間刺激し、細胞増殖を WST-8 法で評価した (n = 5)。\* $P < 0.005$ , † $P < 0.05$  vs. 0 nmol/L of Neopterin.

#### 5.4. ヒト大動脈内皮細胞における炎症分子の mRNA 発現に対する Neopterin の作用

HAEC において、Neopterin には IL-6、MCP-1、ICAM-1、VCAM-1、E-Selectin の mRNA 発現に対し有意な作用を認めなかった (図 5)。しかし、Neopterin (200 nmol/L) は、TNF- $\alpha$  (10 ng/mL) 誘導性の MCP-1、ICAM-1、VCAM-1 の mRNA 発現を有意に抑制したが、IL-6、E-Selectin の mRNA 発現に対しては有意な作用を示さなかった (図 5)。

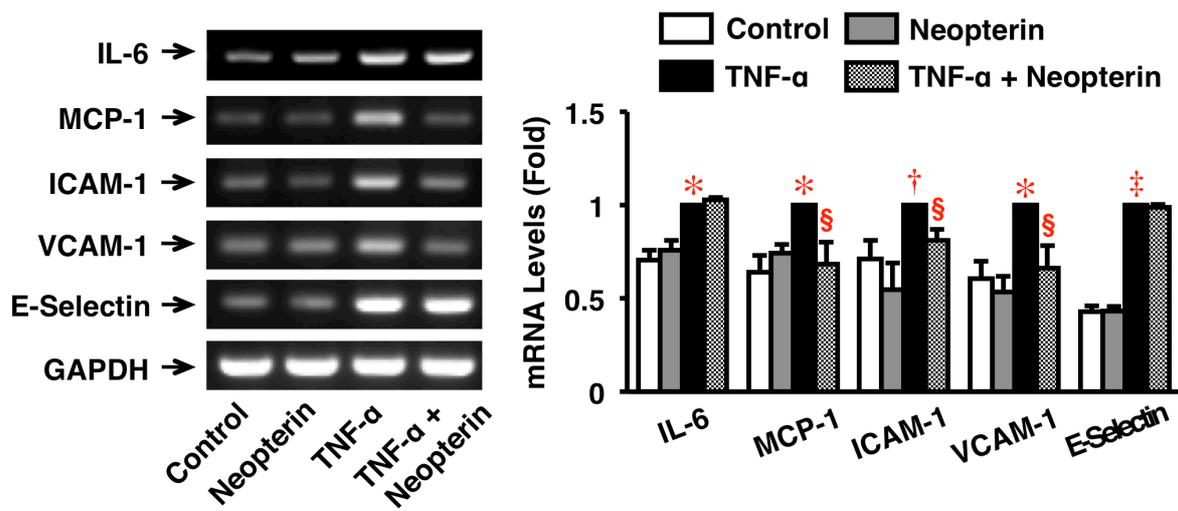


図 5. HAEC における炎症反応の mRNA 発現に対する Neopterin の作用。

IL-6、MCP-1、ICAM-1、VCAM-1、E-Selectin の mRNA 発現を RT-PCR によって検討した。HAEC を Neopterin (200 nmol/L) で 30 分前処理し、次いで Neopterin (200 nmol/L) + TNF- $\alpha$  (10 ng/mL) 存在下で 4 時間培養した。各分子の発現は GAPDH で補正後、グラフ化した (n = 5)。\* $P$  < 0.005, † $P$  < 0.05, ‡ $P$  < 0.0001 vs. Corresponding Control; § $P$  < 0.05 vs. Corresponding TNF- $\alpha$ .

## 5.5. ヒト大動脈内皮細胞における炎症分子のタンパク質発現に対する Neopterin の作用

HAECにおいて、TNF- $\alpha$  (10 ng/mL) は ICAM-1、VCAM-1、E-Selectin、NF- $\kappa$ B のタンパク質発現またはリン酸化を有意に促進した。Neopterin (200 nmol/L) は、TNF- $\alpha$  (10 ng/mL) 誘導性の ICAM-1 と VCAM-1 のタンパク質発現を有意に抑制し、NF- $\kappa$ B のリン酸化を有意に抑制した。しかし、Neopterin (200 nmol/L) は、E-Selectin のタンパク質発現に対しては有意な作用を示さなかった (図 6A-D)。このようにタンパク質発現と mRNA 発現の変化は一致していた (図 5,6)。以上から、Neopterin は NF- $\kappa$ B のリン酸化抑制を介し、炎症性サイトカインおよび接着因子発現を抑制することが示唆された。

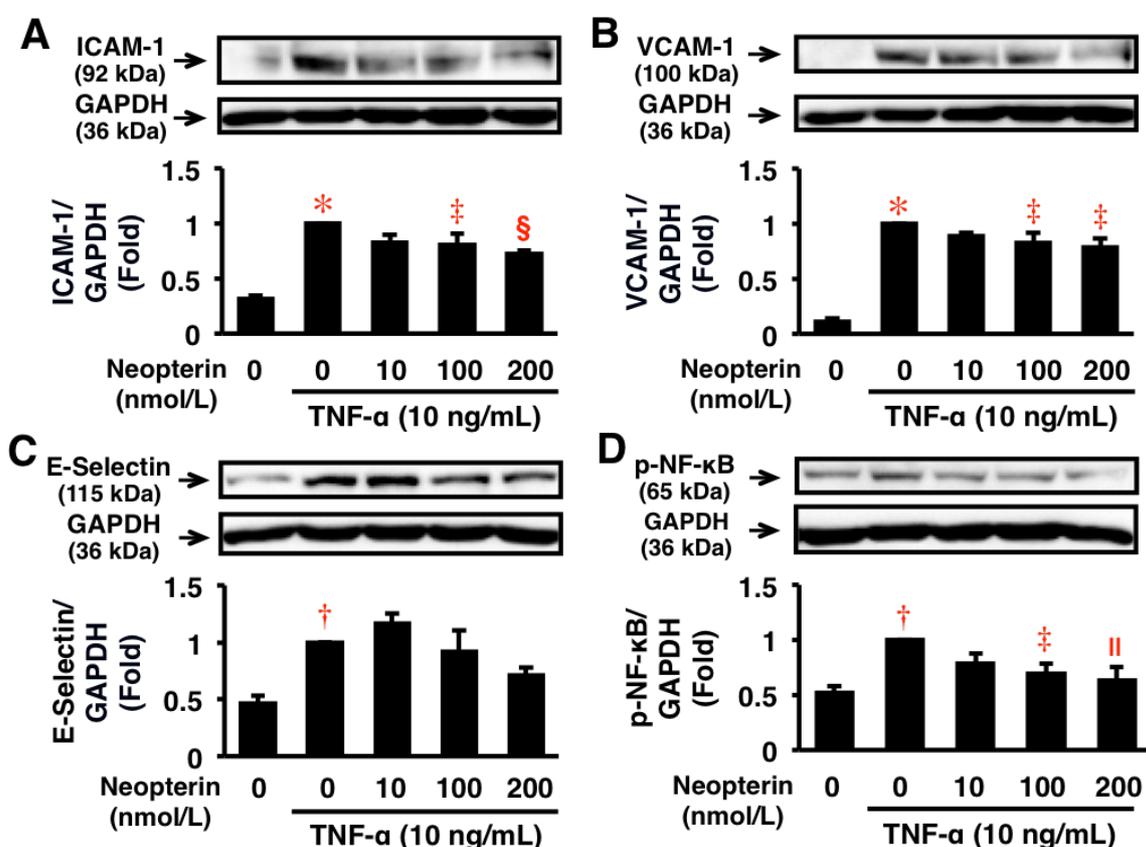


図 6. HAEC における炎症反応のタンパク質発現に対する Neopterin の作用。

A-D, HAEC の ICAM-1、VCAM-1、E-Selectin のタンパク質発現、NF- $\kappa$ B のリン酸化を Western Blotting によって解析した。条件は前述 (図 5) の通りである。各分子の発現は GAPDH で補正後、グラフ化した (n = 5)。\* $P$  < 0.0001, † $P$  < 0.005 vs. 0 nmol/L of Neopterin (TNF- $\alpha$  (-)); ‡ $P$  < 0.05, § $P$  < 0.005, || $P$  < 0.01 vs. 0 nmol/L of Neopterin (TNF- $\alpha$  (+)).

## 5.6. ヒト大動脈内皮細胞へのヒト単球接着に対する Neopterin の作用

HAEC への THP-1 細胞接着は、TNF- $\alpha$  (10 ng/mL) 4 時間刺激で 98 倍に増加した (図 7)。Neopterin は、TNF- $\alpha$  誘導性の単球接着を 10–200 nmol/L において有意に抑制し、200 nmol/L において最大 85%抑制した (図 7)。

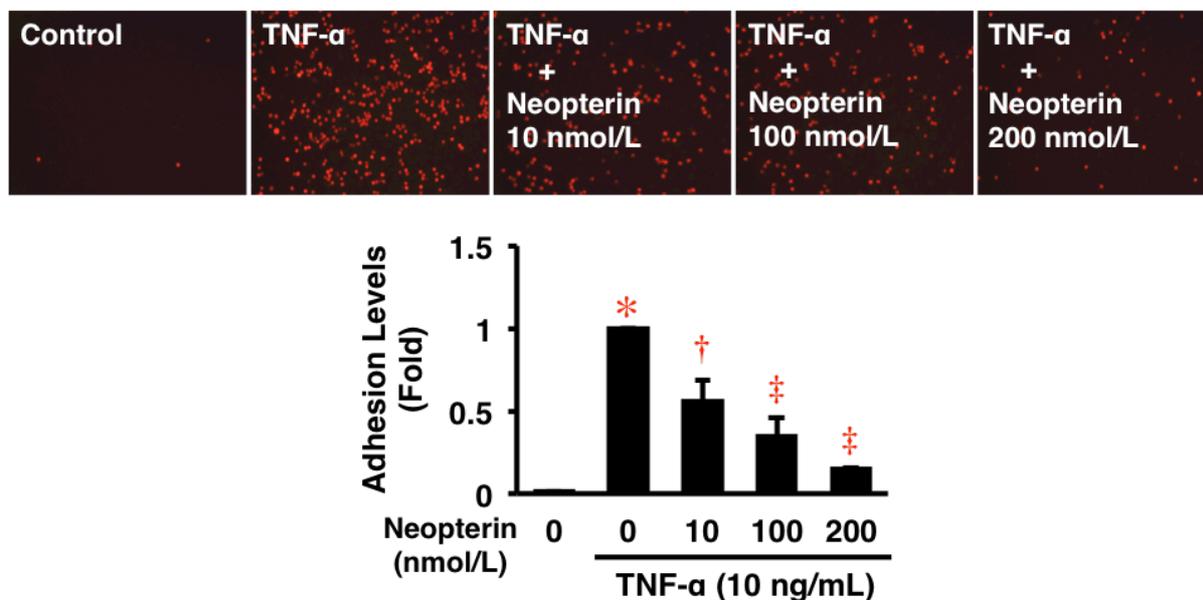


図 7. HAEC のヒト単球接着に対する Neopterin の作用。

コンフルエントの HAEC を 0.5% FBS-Humedia-EG2 で 16 時間培養し、Neopterin 各濃度で 30 分前処理後、TNF- $\alpha$  (10 ng/mL) で 4 時間培養した。引き続き、Calcein Red-Orange 標識した THP-1 単球を HAEC 上に播種し、1 時間共培養した。未接着の THP-1 単球を除くために Wash 後、接着した THP-1 単球を蛍光顕微鏡で観察、撮影した (n = 5)。Baseline (1 Fold) = 30755.4  $\pm$  3828.2 Pixels. \* $P$  < 0.0001 vs. 0 nmol/L of Neopterin; † $P$  < 0.001, ‡ $P$  < 0.0001 vs. 10 ng/mL of TNF- $\alpha$ .

### 5.7. ヒト単球由来マクロファージの炎症性フェノタイプに対する Neopterin の作用

ヒト単球を 6 日間培養し、単球からマクロファージへ分化させたところ、マクロファージの分化マーカーである CD68 のタンパク質発現は増加したが、Neopterin は単球からマクロファージへの分化 (CD68 タンパク質発現) には影響を及ぼさなかった (図 8)。しかし、3 日目、6 日目において、Neopterin は炎症性 M1 マーカーである MARCO タンパク質発現を有意に抑制し、抗炎症性 M2 マーカーである MRC1 タンパク質発現を有意に促進した (図 8)。同時に、Neopterin は NF- $\kappa$ B のリン酸化を有意に抑制し、PPAR- $\gamma$  発現を有意に促進した (図 8)。以上から Neopterin はマクロファージのフェノタイプを抗炎症性の M2 優位にし、炎症を抑制することが示唆された。

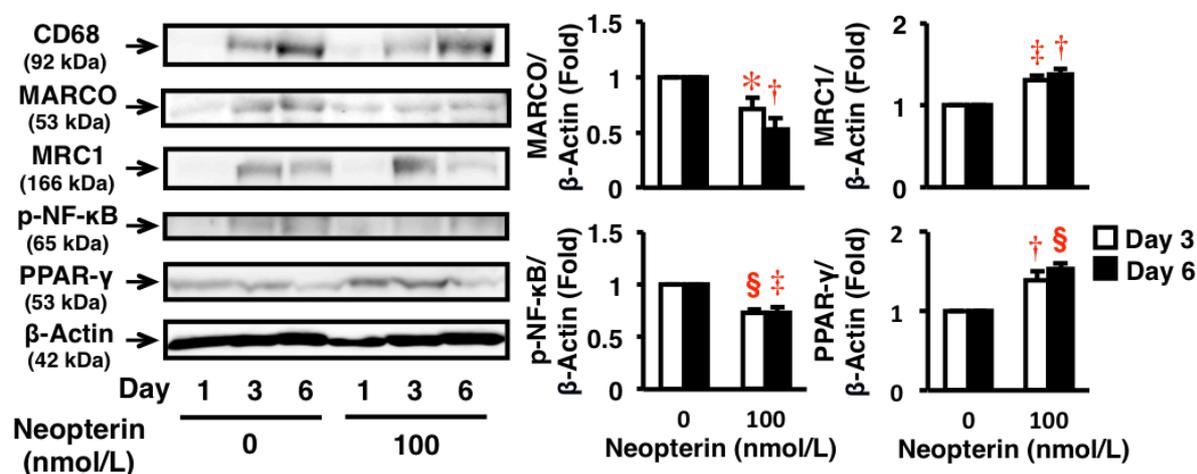


図 8. HMDM の炎症性フェノタイプに対する Neopterin の作用。

ヒト単球を Neopterin (100 nmol/L) で 1-6 日間培養した。回収した単球またはマクロファージにおいて、CD68 (マクロファージ分化マーカー)、MARCO (炎症性 M1 マーカー)、MRC1 (抗炎症性 M2 マーカー)、PPAR- $\gamma$ 、 $\beta$ -Actin のタンパク質発現や NF- $\kappa$ B のリン酸化を Western Blotting にて解析した。各分子の発現は  $\beta$ -Actin で補正後、グラフ化した (MARCO: n = 4, CD68, MRC1, p-NF- $\kappa$ B, PPAR- $\gamma$ ,  $\beta$ -Actin: n = 5)。\* $P$  < 0.05, † $P$  < 0.005, ‡ $P$  < 0.0005, § $P$  < 0.0001 vs. 0 nmol/L of Neopterin on Corresponding Day.

### 5.8. ヒト単球由来マクロファージの泡沫化に対する Neopterin の作用

Neopterin は、酸化 LDL による HMDM の泡沫化を 5–100 nmol/L において有意に抑制し、100 nmol/L において最大 23%抑制した (図 9)。

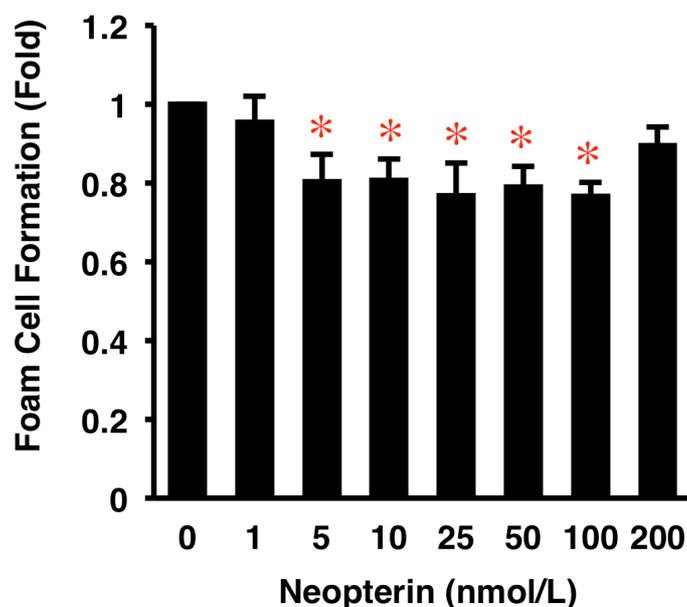


図 9. HMDM の泡沫化に対する Neopterin の作用。

ヒト単球を 10%ヒト血清および Neopterin 各濃度 (0–200 nmol/L) を含有した RPMI-1640 培地で 7 日間培養しマクロファージに分化させ、同濃度の Neopterin、50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の酸化 LDL、100  $\mu\text{mol}/\text{L}$  の  $^3\text{H}$ オレイン酸を添加して 19 時間培養した。泡沫化の程度は、コレステロール- $^3\text{H}$ オレイン酸の細胞内放射活性を測定して評価した ( $n = 5$ )。Baseline of Control =  $3.97 \pm 0.53$  nmol/mg Cell Protein. \* $P < 0.05$  vs. 0 nmol/L of Neopterin.

### 5.9. ヒト単球由来マクロファージの泡沫化関連タンパク質発現、Cholesterol Efflux に対する Neopterin の作用

酸化 LDL による HMDM の泡沫化を抑制した分子メカニズムとして、Neopterin (10、25 nmol/L) による CD36 タンパク質発現の有意な抑制 (37、33%)、並びに Neopterin (100、200 nmol/L) による ABCA1 タンパク質発現の有意な促進 (1.6、1.5 倍) が認められた。また、Neopterin (200 nmol/L) による ABCG1 タンパク質発現の有意な促進 (1.9 倍) が認められた。Neopterin は 100、200 nmol/L において LXR- $\alpha$  タンパク質発現を有意に促進 (1.7、2.9 倍) したが、ACAT-1、NCEH、SR-BI タンパク質発現には有意な作用を示さなかった (図 10A)。更に、HMDM における ApoA1 (ABCA1 の作用) や HDL (ABCG1 の作用) による Cholesterol Efflux に対する Neopterin の作用を検討したところ、Neopterin (200 nmol/L) は ApoA1 または HDL による Cholesterol Efflux を各々13%、8%ほど有意に増加させた (図 10B)。

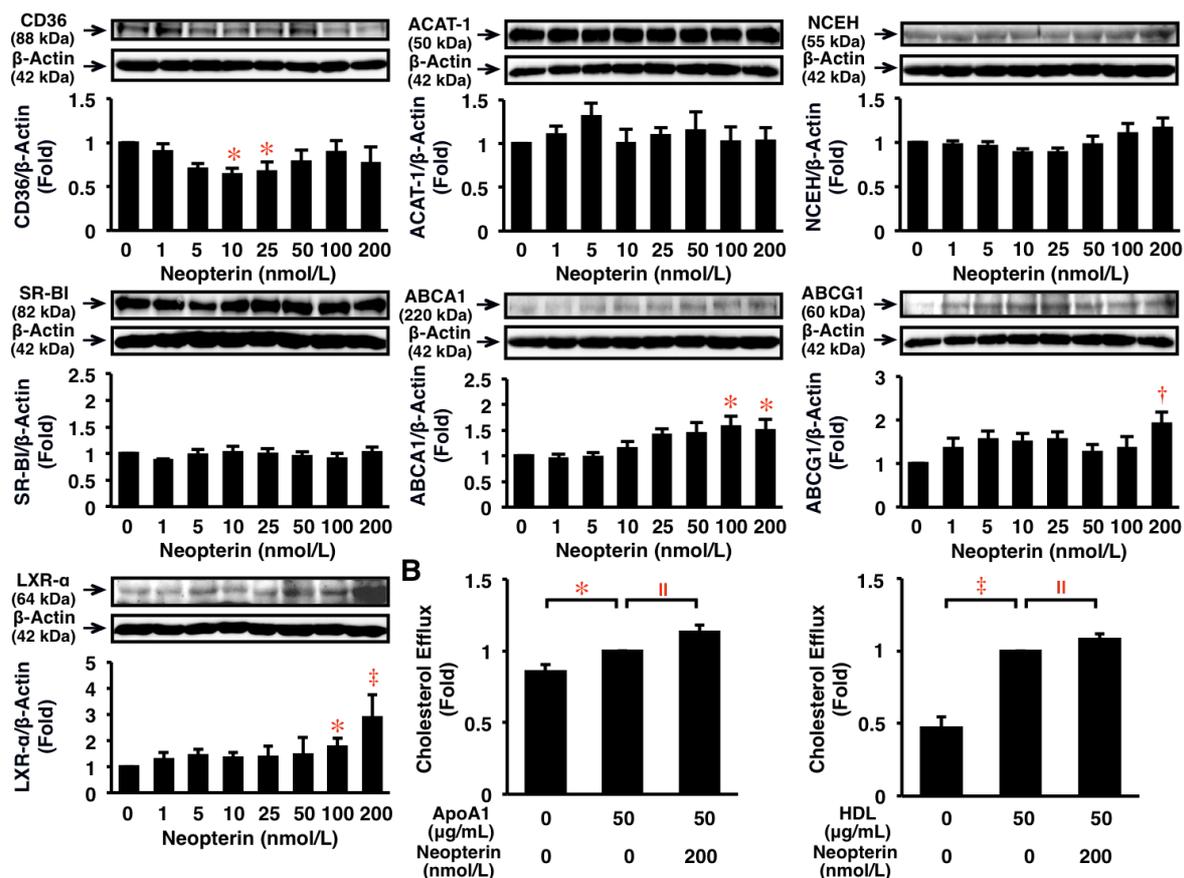


図 10. HMDM の泡沫化関連タンパク質発現、Cholesterol Efflux に対する Neopterin の作用。

A, 酸化 LDL を添加する前の培養 7 日目の細胞を回収し、CD36、ACAT-1、NCEH、SR-BI、ABCA1、ABCG1、LXR- $\alpha$ 、 $\beta$ -Actin のタンパク質発現を Western Blotting にて解析した (n = 6)。各分子の発現は  $\beta$ -Actin で補正後、グラフ化した。\* $P < 0.05$ , † $P < 0.005$ , ‡ $P < 0.0005$  vs. 0 nmol/L of Neopterin. B, HMDM を [ $^3$ H]コレステロールで標識した酸化 LDL (50  $\mu$ g/mL) で 24 時間培養し、ApoA1 (50  $\mu$ g/mL) または HDL (50  $\mu$ g/mL) を含有する無血清培地で更に 16 時間培養した。Cholesterol Efflux の程度は、培養上清および細胞溶解液の [ $^3$ H]コレステロールを測定して評価した (ApoA1: n = 4, HDL: n = 3)。ApoA1 または HDL において Neopterin 無しの条件を 1 Fold として示した。Baseline (1 Fold) = 16.5  $\pm$  3.2% (ApoA1), = 33.8  $\pm$  4.9% (HDL). \* $P < 0.05$ , † $P < 0.0005$ , ‡ $P < 0.05$ .

### 5.10. ヒト大動脈平滑筋細胞の遊走に対する Neopterin の作用

HASMC において、Neopterin (10、100 nmol/L) は AngII (500 nmol/L) 誘導性の遊走を有意に抑制した (図 11A)。しかし、Neopterin による遊走の抑制は抗 Neopterin 抗体により有意にキャンセルされた (図 11B)。

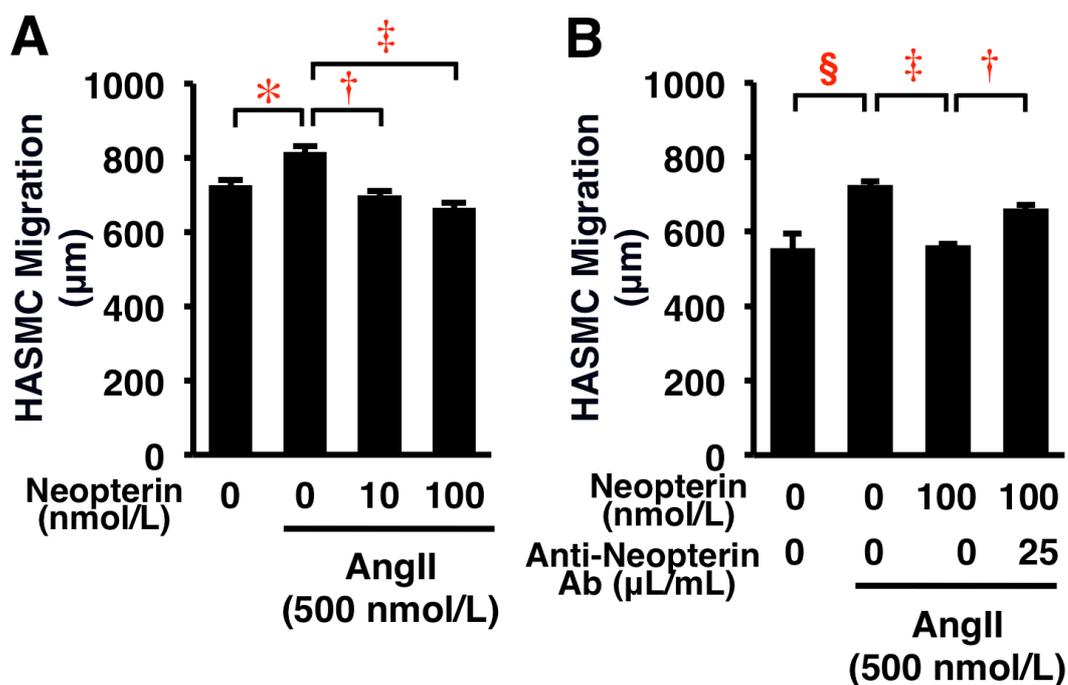


図 11. HASMC の遊走に対する Neopterin の作用。

**A,B**, HASMC を無血清 SmGM-2 培地と AngII、Neopterin、抗 Neopterin 抗体 (25 μL/mL) で培養し、BIOREVO BZ-9000 にて 10 分毎に撮影した。1 Well 当たり 10 個の細胞を任意に抽出し、16 時間分の移動距離の総和を算出し、それらの平均を求めた (A: n = 4, B: n = 7)。

\* $P < 0.01$ , † $P < 0.0005$ , ‡ $P < 0.0001$ , § $P < 0.05$ .

### 5.11. ヒト大動脈平滑筋細胞の増殖に対する Neopterin の作用

Neopterin (50–200 nmol/L) は HASMC の増殖を有意に抑制した (図 12A)。また、Neopterin (200 nmol/L) における HASMC の増殖は、抗 Neopterin 抗体、c-Src 阻害剤 (Saracatinib) や MEK1/2 阻害剤 (SL327) によって有意にキャンセルされた (図 12B)。

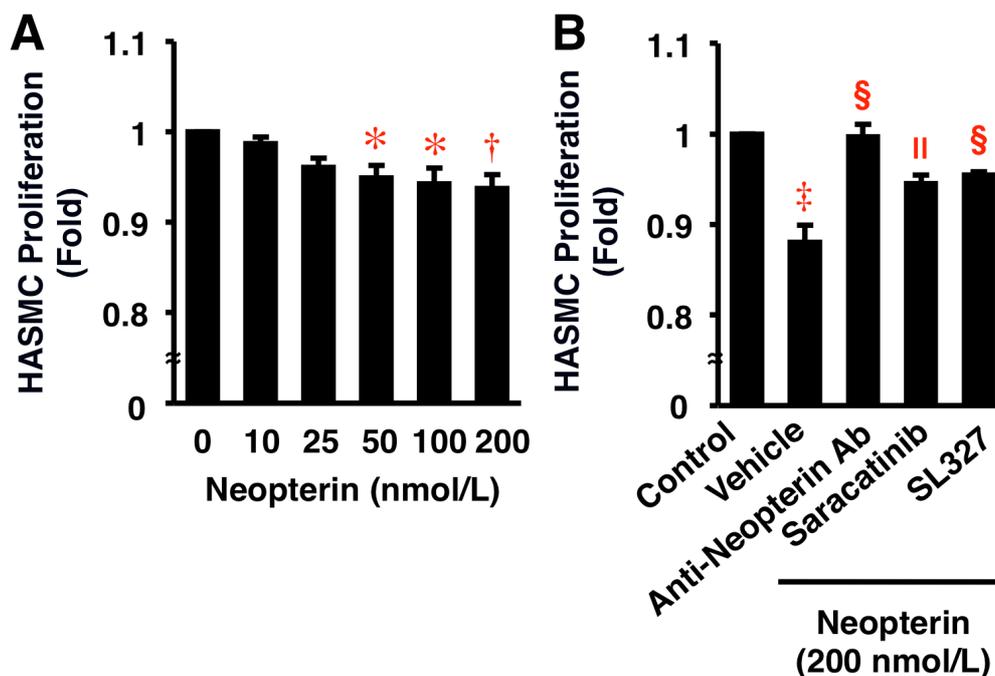


図 12. HASMC の増殖に対する Neopterin の作用。

A,B, HASMC を 5% FBS-SmGM-2 培地と Neopterin 各濃度または抗 Neopterin 抗体 (10  $\mu\text{L}/\text{mL}$ )、c-Src 阻害剤 (Saracatinib, 0.1  $\mu\text{mol}/\text{L}$ )、MEK1/2 阻害剤 (SL327, 10  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ) で処理し、48 時間後の細胞増殖を WST-8 法にて評価した (A:  $n = 5$ , B:  $n = 7$ )。\* $P < 0.05$ , † $P < 0.01$  vs. 0 nmol/L of Neopterin; ‡ $P < 0.0001$  vs. Control (0 nmol/L of Neopterin); § $P < 0.005$ , || $P < 0.05$  vs. Vehicle of Neopterin.

### 5.12. ヒト大動脈平滑筋細胞のアポトーシスに対する Neopterin の作用

Neopterin は、HASMC の遊走・増殖を有意に抑制したが、Neopterin (200 nmol/L) においてアポトーシスは誘導していなかった (図 13)。

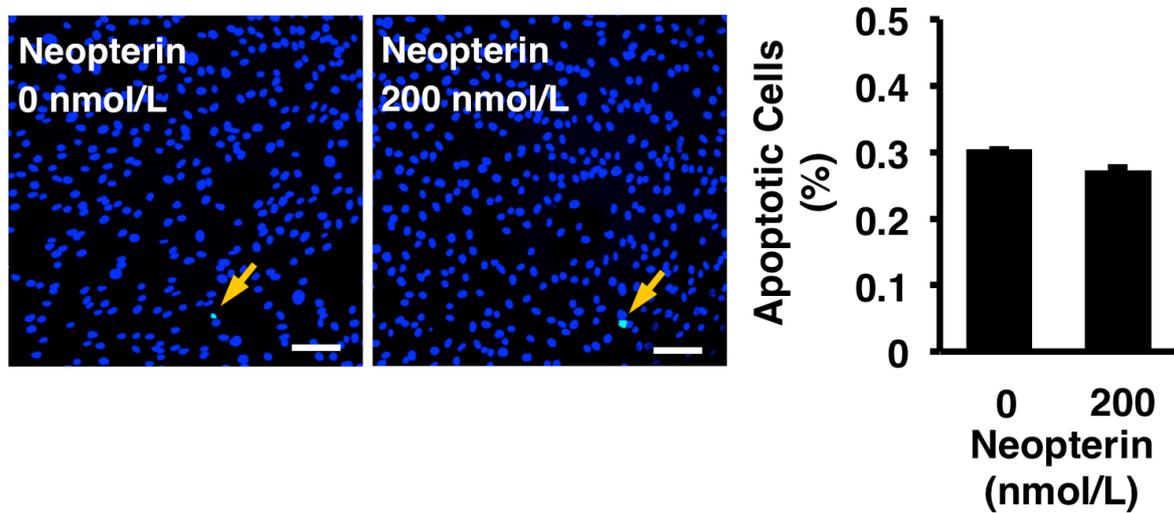


図 13. HASMC のアポトーシスに対する Neopterin の作用。

HASMC を 5% FBS-SmGM-2 培地と Neopterin (0, 200 nmol/L) で 48 時間培養後、TUNEL 法にてアポトーシス細胞を染色 (緑色) した。核を DAPI で染色 (青色) した。グラフはアポトーシス細胞の割合をパーセンテージで示した (n = 3)。Scale Bar = 100  $\mu$ m.

### 5.13. ヒト大動脈平滑筋細胞のシグナル伝達に対する Neopterin の作用

HASMC のシグナル伝達分子に対する Neopterin (200 nmol/L) の時間依存性 (0、24、48 時間) の作用を検討した。Neopterin (200 nmol/L) は、SMemb、c-Src、Raf-1、ERK1/2 のタンパク質発現やリン酸化を抑制傾向に、PI3K、Akt のタンパク質発現やリン酸化を増加傾向にした。その他の p38、Bax、Bcl-2 のタンパク質発現には変化は認められなかった (図 14A)。上記で変化のあったシグナル伝達分子に関して、48 時間での濃度依存性 [Neopterin (0、200 nmol/L)] の作用を更に検討した。Neopterin (200 nmol/L) による 48 時間刺激によって SMemb、c-Src、Raf-1、ERK1/2 のタンパク質発現やリン酸化を有意に抑制し、PI3K のタンパク質発現と Akt のリン酸化を有意に促進した。NF- $\kappa$ B のリン酸化には有意な変化は認められなかった (図 14B)。

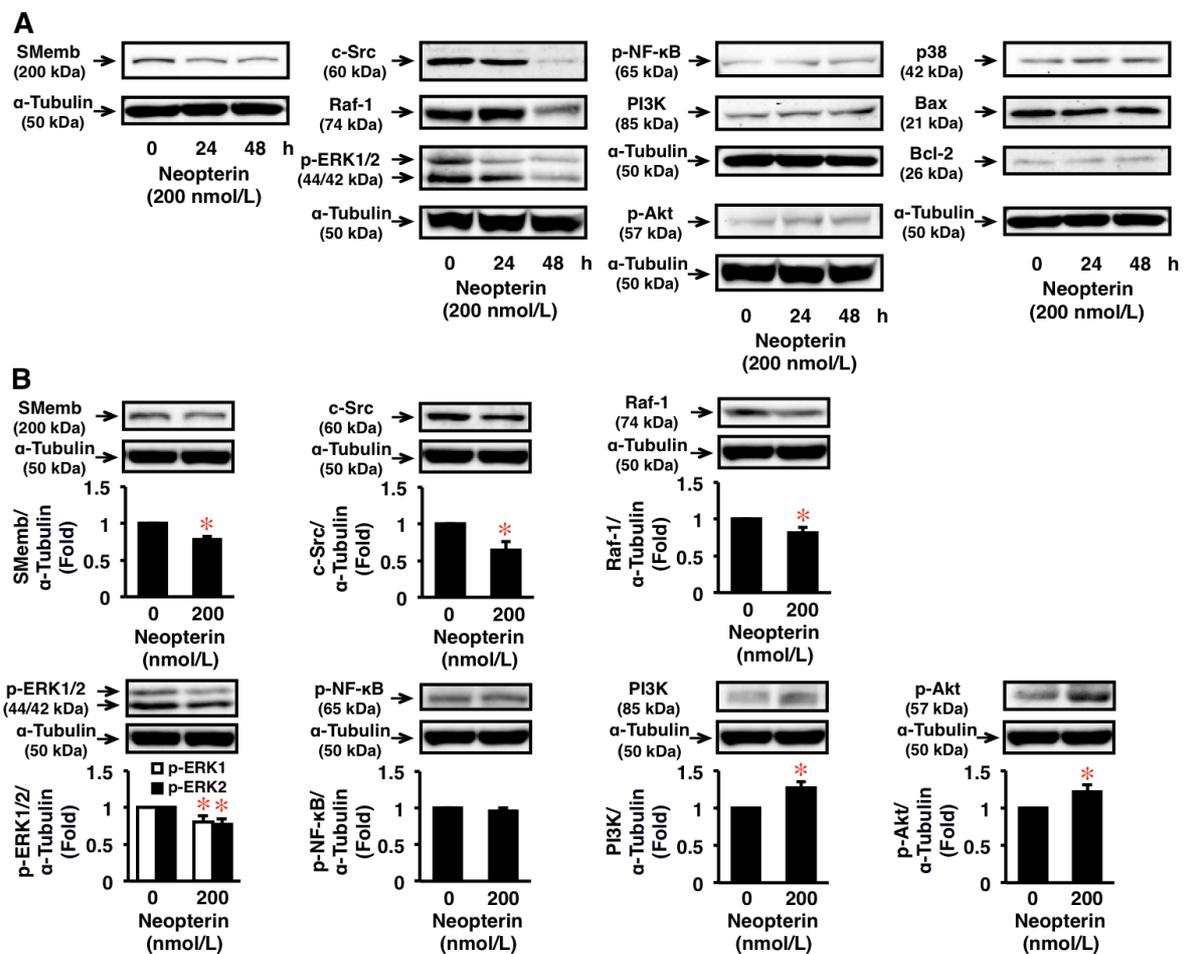


図 14. HASMC のシグナル伝達に対する Neopterin の作用。

**A, B**, 増殖型マーカーと細胞内シグナルへの Neopterin の作用を Western Blotting にて解析した。**A**, HASMC を Neopterin (200 nmol/L) で 0、24、48 時間培養した。再現性を確認するため、独立した実験を最低 2 回行った。**B**, HASMC を Neopterin (200 nmol/L) で 48 時間培養した。各分子の発現は  $\alpha$ -Tubulin で補正後、グラフ化した ( $n = 4-6$ )。\* $P < 0.05$  vs. 0 nmol/L of Neopterin.

#### 5.14. ヒト大動脈平滑筋細胞の ECM 発現に対する Neopterin の作用

Neopterin は、Fibronectin、MMP-2、TIMP-2 のタンパク質発現を濃度依存性に有意に促進した (図 15A)。しかし、Neopterin は Collagen-1、Collagen-3、Elastin、MMP-9 のタンパク質発現については有意な変化を示さなかった (図 15A)。更に、MMP-2 と MMP-9 の活性を検討したところ、Neopterin は MMP-2 活性を有意に増加させ、MMP-9 活性を増加させる傾向にあった (図 15B)。

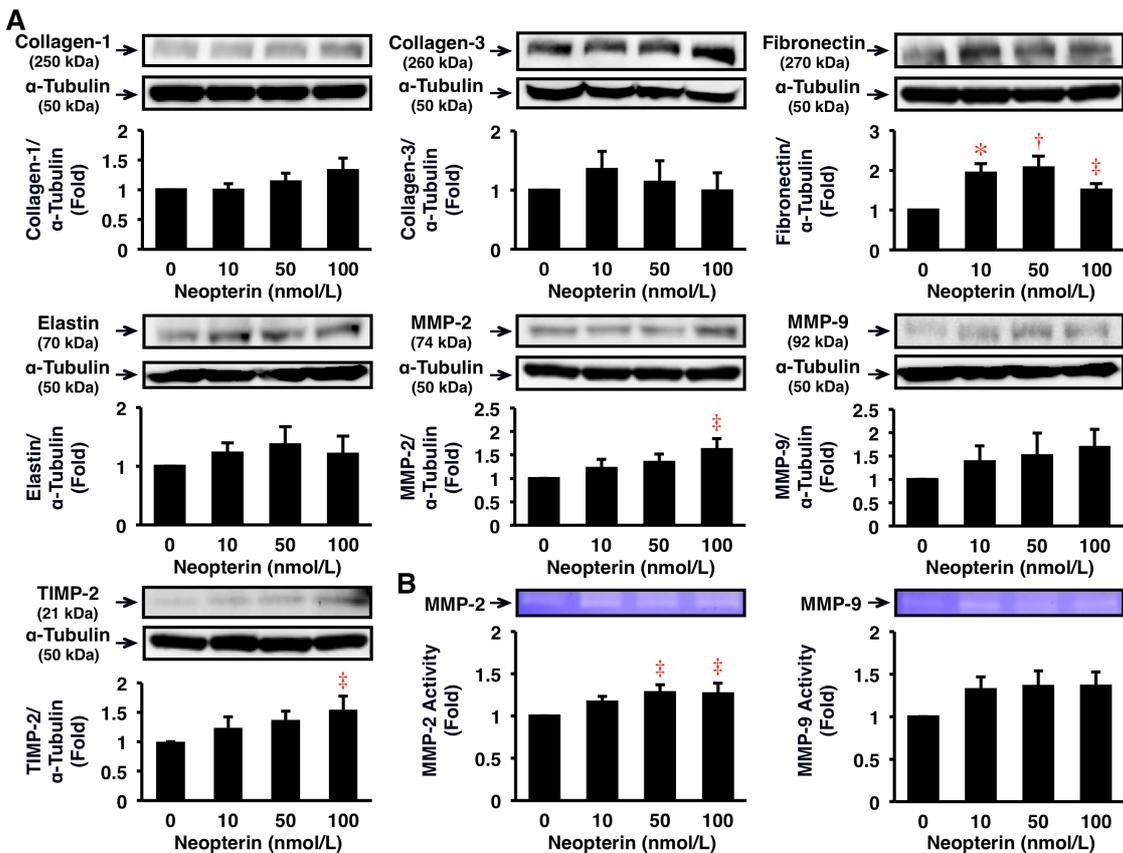


図 15. HASMC の ECM 発現に対する Neopterin の作用。

**A**, HASMC を無血清 SmGM-2 培地において、各濃度の Neopterin で 24 時間刺激し、Collagen-1、Collagen-3、Fibronectin、Elastin、MMP-2、MMP-9、TIMP-2、 $\alpha$ -Tubulin のタンパク質発現を Western Blotting にて解析した。各分子の発現は  $\alpha$ -Tubulin で補正後、グラフ化した ( $n = 4$ )。 **B**, MMP-2 および MMP-9 の活性を測定した。HASMC を無血清 SmGM-2 培地において、各濃度の Neopterin で 24 時間刺激した。培養上清の MMP-2 および MMP-9 の活性をゼラチンザイモグラフィーによって測定した ( $n = 4$ )。 \* $P < 0.001$ , <sup>†</sup> $P < 0.0005$ , <sup>‡</sup> $P < 0.05$  vs. 0 nmol/L of Neopterin.

### 5.15. *ApoE*<sup>-/-</sup>マウスにおける外因性 Neopterin 投与または内因性 Neopterin 阻害による動脈硬化病変の進展への影響

実験 1 において 17 週齢と 21 週齢のコントロール、Neopterin 投与の 3 群間では、食餌量、体重、収縮期・拡張期血圧、血漿中の血糖・総コレステロール・Non-HDL コレステロール・HDL コレステロール濃度に有意差を認めなかった (表 3)。17 週齢と比較して 21 週齢コントロール群では、血漿中 Pentraxin-3 濃度が有意に増加していた (表 3)。21 週齢において、コントロール群と比較して、Neopterin 投与群では血漿中 Neopterin 濃度は 1.4 倍に有意に増加し、血漿中 Pentraxin-3 (表 3) 濃度は有意に減少していた。17 週齢と比較して 21 週齢コントロール群の *ApoE*<sup>-/-</sup>マウスでは、胸腹部大動脈および大動脈弁輪部の動脈硬化病変は 4.5 倍および 2 倍に有意に増加していた (図 16A,B,D,E,K,L)。しかし、21 週齢コントロール群と比較して Neopterin 投与群においては、胸腹部大動脈および大動脈弁輪部の動脈硬化病変は 35%および 17%減少していた (図 16B,C,E,F,K,L)。大動脈弁輪部の動脈硬化病変における Neopterin 発現は週齢 (17 週齢→21 週齢) に伴い増加していた (図 17A,D)。

実験 2 において Neopterin 中和抗体を *ApoE*<sup>-/-</sup>マウスに投与したところ、コントロール群と比較して Neopterin 中和抗体投与群では胸腹部大動脈および大動脈弁輪部の動脈硬化病変は 1.4 倍および 1.3 倍に有意に増加していた (図 16G-J,M,N)。

表 3. *ApoE*<sup>-/-</sup>マウスの食餌量、体重、血圧、血漿パラメータ

	17 週齢 コントロール (n = 8)	21 週齢 コントロール (n = 10)	21 週齢 Neopterin (n = 8)
食餌量 (g/day)	4.4 ± 0.2	4.4 ± 0.5	4.6 ± 0.1
体重 (g)	27.1 ± 0.7	29.2 ± 0.8	27.4 ± 0.8
収縮期血圧 (mm Hg)	115.0 ± 1.6	113.3 ± 4.8	103.6 ± 4.5
拡張期血圧 (mm Hg)	95.0 ± 1.6	86.4 ± 7.3	85.1 ± 3.3
血糖 (mg/dL)	285.8 ± 39.9	256.8 ± 36.5	288.9 ± 15.2
総コレステロール (mg/dL)	1686.6 ± 82.9	1764.3 ± 33.5	1613.1 ± 95.7
Non-HDL コレステロール (mg/dL)	1679.0 ± 83.3	1753.4 ± 37.2	1606.7 ± 95.6
HDL コレステロール (mg/dL)	5.6 ± 0.5	7.0 ± 0.9	6.4 ± 0.4
Pentraxin-3 (ng/mL)	108.9 ± 7.7	204.4 ± 15.3*	143.5 ± 9.3 <sup>†</sup>
Neopterin (nmol/L)	1.28 ± 0.21	1.36 ± 0.19	1.93 ± 0.10 <sup>‡</sup>

Values = Mean ± SEM. \**P* < 0.0001 vs. 17 週齢コントロール; <sup>†</sup>*P* < 0.01, <sup>‡</sup>*P* < 0.05 vs. 21 週齢コントロール.

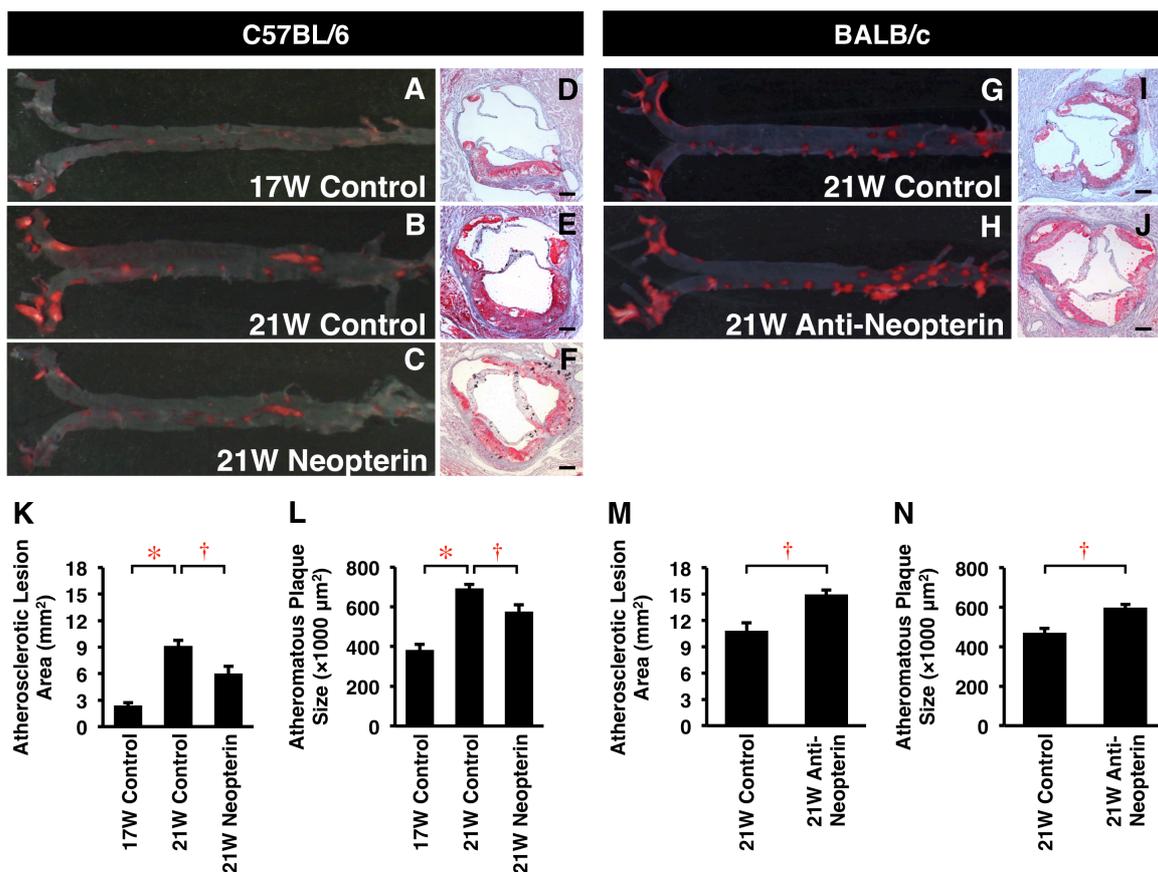


図 16. *Apoe*<sup>-/-</sup>マウスにおける外因性 Neopterin 投与または内因性 Neopterin 阻害による動脈硬化病変の進展への影響。

実験 1: *Apoe*<sup>-/-</sup>マウス (C57BL/6) 18 匹のうち、10 匹は PBS、8 匹は Neopterin (1.2 μmol/kg/日) を 4 週間腹腔内投与した。8 匹は投与前に 17 週齢コントロール群として解剖した。実験 2: *Apoe*<sup>-/-</sup>マウス (BALB/c) 11 匹のうち、6 匹は PBS、5 匹は抗 Neopterin 抗体 (2.5 μL/kg/時) を浸透圧ミニポンプにて 4 週間持続投与した。摘出した胸腹部大動脈 (A-C,G,H)、大動脈弁輪部 (D-F,I,J) を Oil Red O で染色した。各群間で大動脈硬化病変面積 (K,M)、動脈硬化性プラークサイズ (L,N) を比較した。\**P* < 0.0001, †*P* < 0.05. Scale Bar = 200 μm.

### 5.16. *ApoE*<sup>-/-</sup>マウスにおける大動脈弁輪部の動脈硬化性プラーク内の Neopterin 発現と炎症性変化

実験 1 において Neopterin 発現は単球/マクロファージ集簇部に一致していた (図 17A)。また、Neopterin 投与によって動脈硬化病変に有意に強発現していた (図 17A,D)。17 週齢と比較して 21 週齢コントロール群では、単球/マクロファージの浸潤 (図 17A,B)、VSMC の含有量 (図 17A,C)、Interferon- $\gamma$ 、MCP-1、Pentraxin-3 (図 17A,E-G) の発現が有意に増加していた。21 週齢コントロール群と比較して Neopterin 投与群では、単球/マクロファージの浸潤 (図 17A,B)、VSMC の含有量 (図 17A,C)、MCP-1、Pentraxin-3 (図 17A,F,G) の発現が有意に減少していたが、Interferon- $\gamma$  (図 17A,E) 発現には有意な差は認められなかった。

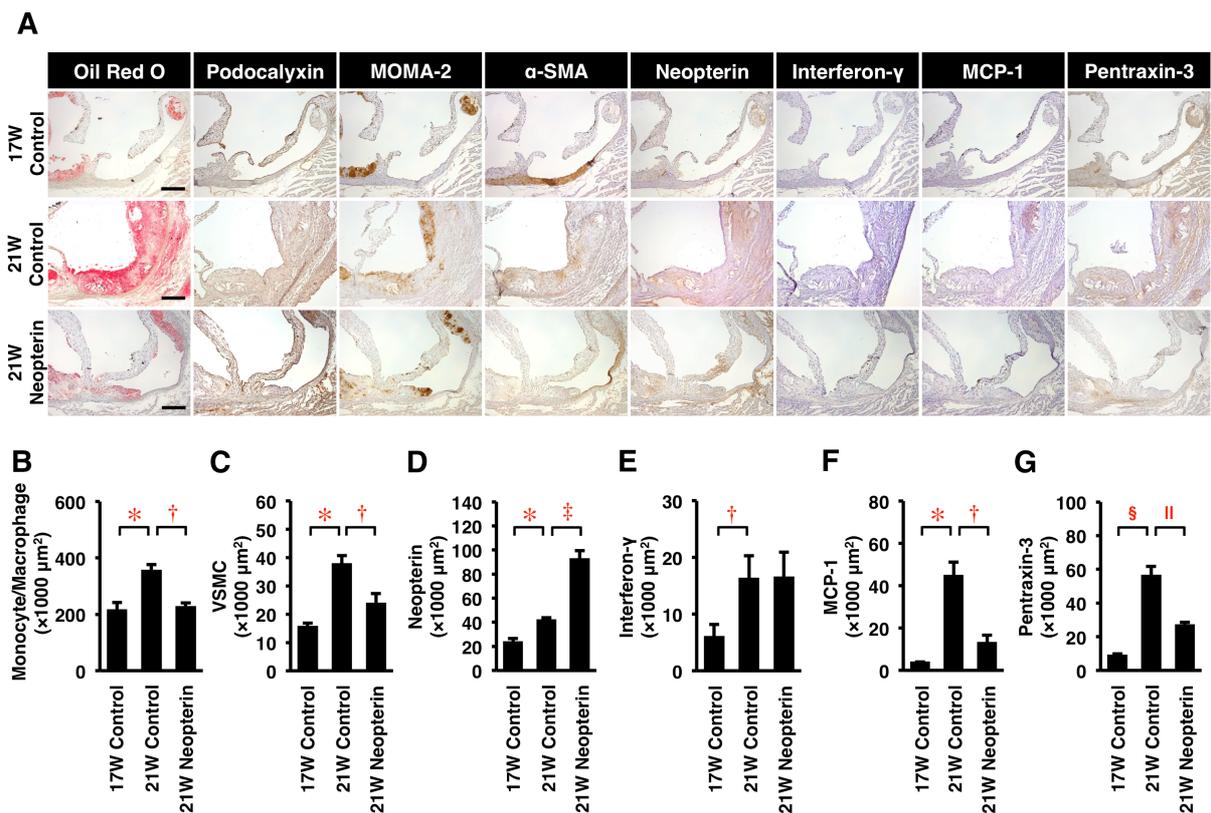


図 17. 外因性 Neopterin 投与による大動脈弁輪部の動脈硬化性プラーク内の Neopterin 発現と炎症性変化

実験 1: *ApoE*<sup>-/-</sup>マウス (C57BL/6) 8 匹は投与前の 17 週齢コントロール群として解剖し、10 匹は PBS、8 匹は Neopterin (1.2  $\mu\text{mol/kg/日}$ ) を 4 週間腹腔内投与した。A, 大動脈弁輪部を Oil Red O、Podocalyxin (EC マーカー)、MOMA-2 (単球/マクロファージマーカー)、 $\alpha$ -SMA (VSMC マーカー)、Neopterin、Interferon- $\gamma$ 、MCP-1、Pentraxin-3 の抗体で染色した。核染色には Hematoxylin を用いた。3 群間において、MOMA-2 (B)、 $\alpha$ -SMA (C)、Neopterin (D)、Interferon- $\gamma$  (E)、MCP-1 (F)、Pentraxin-3 (G) の発現を比較検討した。\* $P < 0.005$ , † $P < 0.05$ , ‡ $P < 0.0001$ , § $P < 0.0005$ , || $P < 0.001$ . Scale Bar = 200  $\mu\text{m}$ .

### 5.17. *Apoe*<sup>-/-</sup>マウスにおける大動脈弁輪部の動脈硬化性プラーク内の CD4+および CD8+T 細胞浸潤に対する Neopterin の作用

大動脈弁輪部の動脈硬化病変において、17 週齢と比較して 21 週齢コントロール群では、CD4+ T 細胞は増加傾向にあり、CD8+ T 細胞は有意に増加していた (図 18 A-C)。21 週齢コントロール群と比較して Neopterin 投与群では、CD8+ T 細胞 (図 18A,C) が有意に減少し、CD4+ T 細胞も減少傾向にあった (図 18A,B)。図 17E に示したように、Neopterin 投与により大動脈弁輪部における Interferon- $\gamma$  発現に有意な変化が認められなかったことは、Neopterin による CD4+ T 細胞浸潤が十分に抑制されていなかったことに起因すると考えられた。

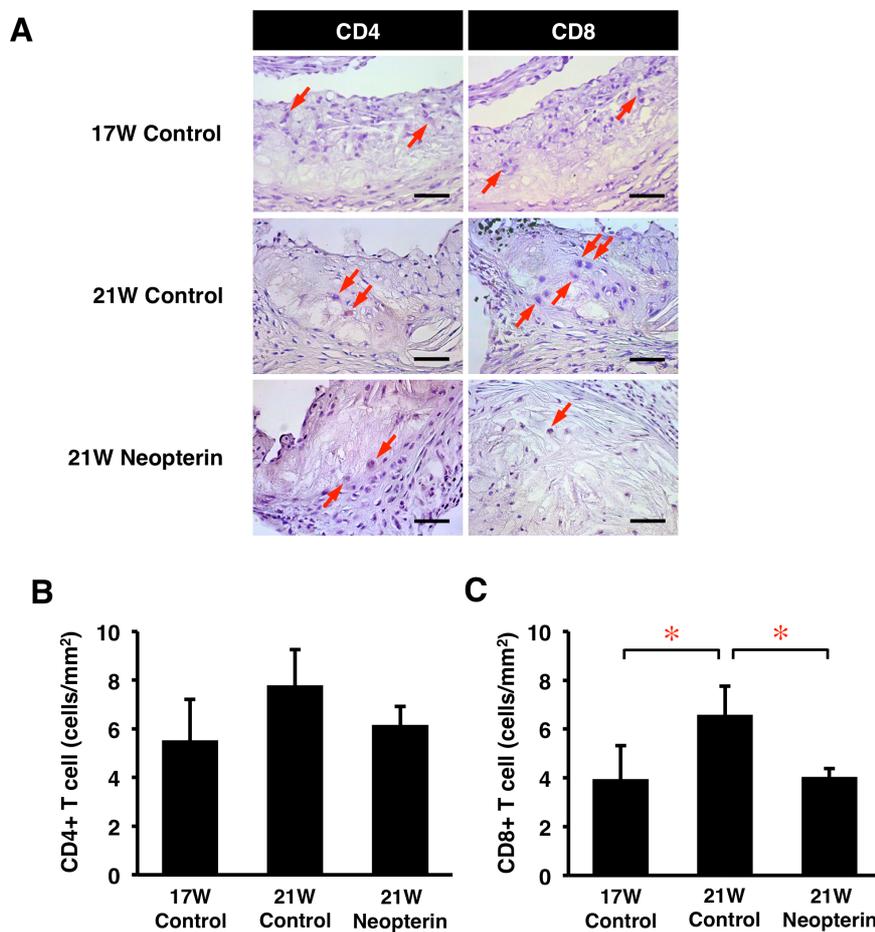


図 18. *Apoe*<sup>-/-</sup>マウスへの外因性 Neopterin 投与による動脈硬化病変内 T 細胞浸潤に対する作用。

実験 1 の *Apoe*<sup>-/-</sup>マウス (C57BL/6) における大動脈弁輪部の動脈硬化性プラークを CD4、CD8 抗体で染色した。核染色には Hematoxylin を用いた。A, 矢印は CD4+ T 細胞、CD8+ T 細胞を示す。Scale Bar = 50  $\mu$ m. C, \*P < 0.05.

### 5.18. *ApoE*<sup>-/-</sup>マウスにおける動脈硬化性プラークの安定化に対する Neopterin の作用

週齢 (17 週齢→21 週齢) とともに、大動脈弁輪部の動脈硬化性プラーク内のマクロファージ含有量 ( $\mu\text{m}^2$ )/VSMC 含有量 ( $\mu\text{m}^2$ ) の比率が有意に増加していた。しかし、21 週齢コントロール群と比較して Neopterin 投与群では、動脈硬化病変内のマクロファージ含有量 ( $\mu\text{m}^2$ )/VSMC 含有量 ( $\mu\text{m}^2$ ) の比率が有意に減少していた (図 19)。このことから、Neopterin はプラークを破綻させず安定化させることに寄与すると考えられた。

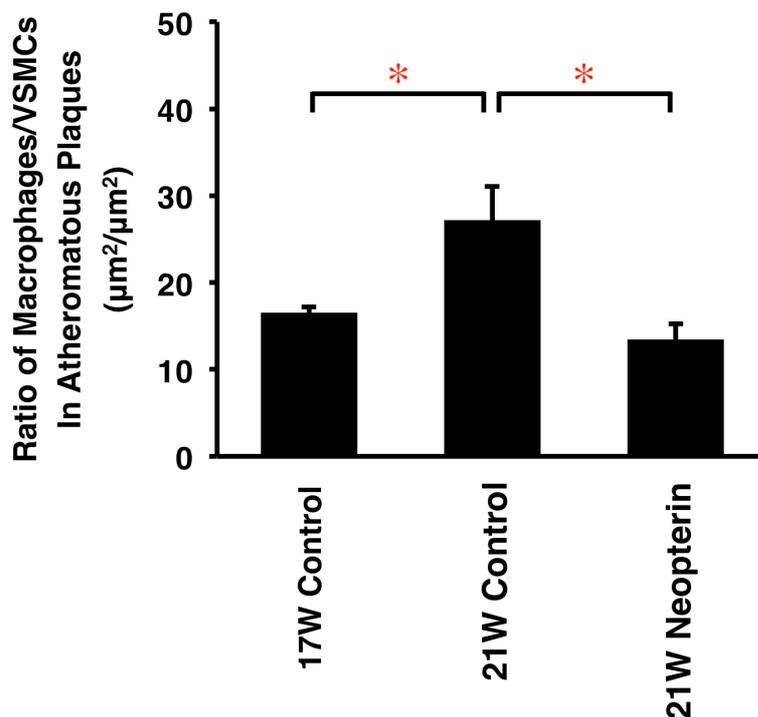


図 19. *ApoE*<sup>-/-</sup>マウスへの外因性 Neopterin 投与によるプラーク安定化に対する作用。

実験 1 の *ApoE*<sup>-/-</sup>マウス (C57BL/6) において、図 17 で示した大動脈弁輪部の動脈硬化性プラーク内のマクロファージ含有量 ( $\mu\text{m}^2$ )/VSMC 含有量 ( $\mu\text{m}^2$ ) の比率を 17 週齢コントロール群 (n = 8)、21 週齢コントロール群 (n = 9)、Neopterin (1.2  $\mu\text{mol}/\text{kg}/\text{日}$ ) 投与群 (n = 8) の 3 群間で比較検討した。\* $P < 0.05$ .

## 6. 考察

本研究において、Non-CAD 患者と比較して CAD 患者の冠動脈病変内の Neopterin 発現および血漿中 Neopterin 濃度が増加していたことはこれまでの報告と一致していた [10,11,13,33,34]。しかし、Neopterin による血管炎症および動脈硬化に対する抑制作用を本研究で世界に先駆けて明らかにした。Neopterin は EC・単球/マクロファージの炎症と単球-EC 接着を抑制した。また、Neopterin はマクロファージの泡沫化とともに VSMC の遊走・増殖も抑制した。Neopterin は VSMC において Fibronectin、MMP-2、TIMP-2 のタンパク質発現を促進しており、血管炎症によるリモデリングとの関連が示唆された。Neopterin が 3 種類の血管細胞に多面的に作用していたため、それぞれの細胞には Neopterin の受容体が存在する可能性があることは明らかである。In Vitro における Neopterin のそれぞれの作用は微弱であるように思えるが、In Vivo においては複合的にそれらが作用し、Neopterin の動脈硬化病変形成に対する抑制作用は非常に顕著であった。最終的に、*ApoE*<sup>-/-</sup>マウスへの外因性 Neopterin 投与により、動脈硬化性プラーク内の単球/マクロファージ・T 細胞の浸潤、大動脈病変および血漿中 Pentraxin-3 濃度の減少によって、動脈硬化病変進展は抑制された。更に、抗 Neopterin 抗体の投与による内因性 Neopterin 阻害は、*ApoE*<sup>-/-</sup>マウスにおける動脈硬化病変進展を促進させた。以上のことから、冠動脈硬化病変での Neopterin 強発現は動脈硬化病変の進展を抑えるために代償的に Neopterin が産生されていたと推察された。

本項では、本研究と過去の報告におけるマクロファージ泡沫化に対する Neopterin の作用の相違点について考察する。Yan らは、Neopterin 高濃度 (100  $\mu\text{mol/L}$ ) において ABCA1 の mRNA 発現および Cholesterol Efflux 抑制を介して THP-1 細胞由来マクロファージの泡沫化を促進することを報告した [14]。この時間・濃度依存性の作用は LXR- $\alpha$  を介していた。THP-1 細胞はプロテインキナーゼ C (PKC) 作動薬である Phorbol-12-Myristate-13-Acetate によって単球からマクロファージへ分化誘導させる。マクロファージへ分化後、酸化 LDL 含有の無血清培地に置き換えることで泡沫細胞となる。本研究では、HMDM において Neopterin は LXR- $\alpha$  を介し、ABCA1 や ABCG1 タンパク質発現を有意に促進し、ApoA1 や HDL による Cholesterol Efflux も同様に増加した。このことから Neopterin (5–100 nmol/L) は HMDM における酸化 LDL 誘導性のマクロファージ泡沫化を抑制した。先の報告と比較し、我々の実験プロトコールでは、10%ヒト血清含有培地、異なる細胞・Neopterin 濃度を用いたことで、結果に差異が生じ

たとえられる。加えて、Giesege らは高濃度 ( $\geq 100 \mu\text{mol/L}$ ) の 7,8-Dihydro-Neopterin による抗酸化・抗アポトーシス作用を報告した [35–37]。これらの報告 [14,35–37] と比較し、我々の実験系で用いた初代培養の HMDM および Neopterin 濃度は、ヒトの生理的条件により近いと言える。

Neopterin の特異的な受容体は未同定である。Neopterin のシグナル伝達経路は十分に報告されていなかった。本研究で初めて明らかにした HMDM における Neopterin による炎症促進性 M1 フェノタイプ抑制、炎症抑制性 M2 フェノタイプ促進には、NF- $\kappa$ B の Downregulation と PPAR- $\gamma$  の Upregulation が関与していた [4]。Neopterin は EC における NF- $\kappa$ B の Downregulation により炎症反応を抑制した。一般的に、マクロファージの泡沫化および CD36 発現、VSMC の遊走・増殖は PKC/ERK1/2 経路を介している [38–40]。Fibronectin および MMP 発現は Akt 経路を介している [41,42]。本研究において、Neopterin は c-Src/Raf-1/ERK1/2 経路を介して VSMC の増殖を抑制し、PI3K/Akt 経路を介して Fibronectin、MMP-2、TIMP-2 発現を促進したと考えられる。

本項では、*In Vitro* および *In Vivo* における Neopterin の濃度について考察する。第一に、健常ヒト血漿中濃度 ( $\sim 5\text{--}10 \text{ nmol/L}$ ) と比べ、HAEC、HMDM、HASMC で作用を認めた Neopterin の濃度は比較的高かった (最大で約 40 倍)。血管壁では、マクロファージから多量の Neopterin がオートクライン/パラクラインで産生される [6,11,12]。これまでの報告では、他の血管作動性物質 (閉塞動脈における Serotonin) の局所レベルは、冠動脈イベントにおいて 33 倍増加しているという報告がある [43]。従って、Neopterin の病変局所でのレベルが他の血管作動性物質と同様に増加することは驚くべきことではない。第二に、本研究で用いた健常ヒト血清中 Neopterin 濃度は  $8.5 \text{ nmol/L}$  であった。従って、HMDM の培地にはヒト血清を 10%の割合で含有していたので、 $0.85 \text{ nmol/L}$  の Neopterin が含有されていたが、実験で添加した Neopterin の濃度と比較すると影響はほとんどない。第三に、HAEC の炎症反応や、単球接着、マクロファージ泡沫化および泡沫化関連分子発現、HASMC の遊走・増殖・ECM 産生への Neopterin の作用濃度は異なっていた。これは、細胞が異なることや、シグナル伝達経路が異なることが影響していると考えられる。また、HMDM において泡沫化 ( $5\text{--}100 \text{ nmol/L}$ ) と ABCG1 発現 ( $200 \text{ nmol/L}$ ) へ作用した Neopterin 濃度が異なっていたことは、酸化 LDL の有無による差と、シグナル伝達の違いに依存すると考えられる。Neopterin は至適濃度よりも過剰な濃度であると未同定の受容体発現や細胞内シグナル伝達を Downregulation することで、

二相性の作用を示したと推察された。最後に、*Apoe*<sup>-/-</sup>マウスにおいて、21 週齢コントロール群と比較して外因性 Neopterin 投与群では血漿中 Neopterin 濃度が 1.4 倍有意に増加していたが、この濃度は予想されていた濃度より高くはなかった。循環血液中の Neopterin の半減期は 90 分であり [44]、*Apoe*<sup>-/-</sup>マウスへの腹腔内投与 4 時間後の血液では腎排泄等の何らかの理由で血漿中の Neopterin は減少していたと推察された。

本研究において、我々は *In Vitro*、*In Vivo* における Neopterin の動脈硬化保護作用を立証した。並びに他の研究でも示されていたように CAD 患者の循環血液中および冠動脈病変における Neopterin の高発現を確かめた [10,11,13,33,34,45]。更に、他の研究と同様に [34]、循環血液中 Neopterin 濃度は慢性冠動脈疾患 (安定 CAD) 患者より急性冠動脈疾患 (不安定 CAD) 患者で高値だった。本研究における Neopterin の *In Vitro* と *In Vivo* での抗炎症・抗動脈硬化作用と CAD 患者での Neopterin 強発現との矛盾は、IL-6 が急性期では抗炎症作用かつ慢性期では炎症促進作用の二面性作用を発揮するように [46]、Neopterin の作用が動脈硬化の末期では動脈硬化促進に転じている可能性も全く否定できない。しかしながら、Neopterin の動脈硬化病変での強発現や血中濃度の増加は、動脈硬化病変の進展を抑えるために代償的に Neopterin が増加したものと推察された。本研究から、外因性 Neopterin は血管炎症と動脈硬化の予防・治療に貢献し、内因性 Neopterin は血管炎症と動脈硬化の進展を阻止するために必要であったことから裏付けられる。更に、動脈硬化病変進展における内因性 Neopterin の役割を明確にするためには、Neopterin を過剰発現またはノックアウトした *Apoe*<sup>-/-</sup>マウスでの今後の解析が必要である。また、臨床的には、今回の CAD 患者の 5 年予後を調査・解析して、Neopterin の血中濃度が高かったことが、心血管保護に働き、主要心血管イベント (心血管死、心筋梗塞の再発、心不全等) が少ないかどうかを検証していくつもりである。

本研究は、病態生理学および動脈硬化病変の治療における Neopterin の役割を解明した。Incretins、Adiponectin、Omentin-1、Urocortin-1、Catestatin-1、Tumor Necrosis Factor-Stimulated Gene-6 [16–18,20,47–49] と同様に Neopterin は 3 種類全ての血管細胞で動脈硬化病変形成抑制作用を発揮し、Neopterin は動脈硬化病変形成を抑制する治療薬として有用であると示唆された。今後、動物実験や臨床実験において Neopterin の薬力学、薬物動態学的な更なる研究が必要である。

最後に、本研究における Limitation について論じる。動物実験において、2 系統 (C57BL/6、BALB/c) の *Apoe*<sup>-/-</sup>マウスを用いた。これは C57BL/6 系統 *Apoe*<sup>-/-</sup>マウスが一時的に入手不可能

になったためである。これら2系統の違いとして、C57BL/6系統 *ApoE*<sup>-/-</sup>マウスはTh1型、BALB/c系統 *ApoE*<sup>-/-</sup>マウスはTh2型のプロトタイプであることが知られている。例えば、C57BL/6系統 *ApoE*<sup>-/-</sup>マウスから単離したCD4<sup>+</sup> T細胞はInterferon- $\gamma$  (Th1型サイトカイン) を多量に分泌し、Phorbol 12-Myristate 13-Acetate と Ionomycin 刺激下でIL-4 (Th2型サイトカイン) 産生は微量である。一方、BALB/c系統 *ApoE*<sup>-/-</sup>マウスから単離したCD4<sup>+</sup> T細胞はIL-4を多量に産生し、Interferon- $\gamma$  の産生は微量である [50]。従って、C57BL/6系統 *ApoE*<sup>-/-</sup>マウスと比較してBALB/c系統 *ApoE*<sup>-/-</sup>マウスは動脈硬化病変形成の進展が穏やかである [50]。しかし、我々はそれぞれの *ApoE*<sup>-/-</sup>マウスの系統に一致してコントロールを用意した。従って、本研究における独立した2つの動物実験は信頼できる。しかし、可能であればC57BL/6系統とBALB/c系統 *ApoE*<sup>-/-</sup>マウスへのNeopterin中和抗体投与による動脈硬化病変形成進展に対する作用を今後評価していきたい。

## 7. 結論

本研究において、Neopterin は EC・マクロファージの炎症反応、EC・VSMC の増殖、マクロファージの泡沫化を抑制することで動脈硬化病変進展を抑制することを明らかにした。これらの結果により、臨床的には Neopterin は動脈硬化や冠動脈形成術後の再狭窄の予防における新たな治療標的となることが示唆された。今後、虚血/再灌流障害、大動脈炎、動脈瘤、糖尿病性血管障害のような炎症性心血管疾患における Neopterin の役割の解明のため、更なる研究展開が必要である。

## 8. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、多くの皆様の御指導・御支援を賜りました。謹んで感謝を申し上げます。

渡部琢也先生 (東京薬科大学 生命科学部 心血管医科学研究室 教授) には研究遂行、論文作成に当たり、終始御指導・御鞭撻を賜りました。伊東史子先生 (同上 准教授) には実験機器・試薬の提供など温かい御指導・御協力を頂きました。佐藤健吾先生 (同上 助教) には実験技術のみならず科学的思考など多くの御指導を頂きました。

また、松山高明先生 (昭和大学 医学部 法医学講座 教授)、植田初江先生 (国立循環器病研究センター 病理部 部長)、木庭新治先生 (昭和大学 医学部 内科学講座 循環器内科部門 教授)、小林洋一先生 (同上 教授)、平野勉先生 (昭和大学 医学部 内科学講座 糖尿病・代謝・内分泌内科部門 教授) には臨床検体の提供・解析に御協力・御尽力を頂きました。田中正人先生 (東京薬科大学 生命科学部 免疫制御学研究室 教授)、柳茂先生 (東京薬科大学 生命科学部 分子生化学研究室 教授)、山内淳司先生 (東京薬科大学 生命科学部 分子神経科学研究室 教授) には副指導教員として御指導を頂きました。

更に、東京薬科大学 生命科学部 心血管医科学研究室の皆様、東京薬科大学 生命科学部の多くの先生方には実験を遂行するに当たり御協力を頂きました。

本論文の図表は、自著論文 (引用文献 17) の図表から改訂して使用することを *Journal of the American Heart Association* から許可を得ております。

また、本研究は日本学術振興会 特別研究員奨励費 (DC2, 17J02716) および東京薬科大学の永井國太郎記念大学院生命科学研究科学生奨学金を受けて遂行されたものであり、ここに感謝の意を表します。

## 9. 引用文献

1. Hansson GK, Libby P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol*. 2006;6:508–519.
2. Yu XH, Fu YC, Zhang DW, Yin K, Tang CK. Foam cells in atherosclerosis. *Clin Chim Acta*. 2013;424:245–252.
3. Igarashi M, Osuga J, Uozaki H, Sekiya M, Nagashima S, Takahashi M, Takase S, Takanashi M, Li Y, Ohta K, Kumagai M, Nishi M, Hosokawa M, Fledelius C, Jacobsen P, Yagyu H, Fukayama M, Nagai R, Kadowaki T, Ohashi K, Ishibashi S. The critical role of neutral cholesterol ester hydrolase 1 in cholesterol removal from human macrophages. *Circ Res*. 2010;107:1387–1395.
4. Paoli FD, Staels B, Chinetti-Gbaguidi G. Macrophage phenotypes and their modulation in atherosclerosis. *Circ J*. 2014;78:1775–1781.
5. Obikane H, Abiko Y, Ueno H, Kusumi Y, Esumi M, Mitsumata M. Effect of endothelial cell proliferation on atherogenesis: a role of p21<sup>Sdi/Cip/Waf1</sup> in monocyte adhesion to endothelial cells. *Atherosclerosis*. 2010;212:116–122.
6. Huber C, Batchelor JR, Fuchs D, Hausen A, Lang A, Niederwieser D, Reibnegger G, Swetly P, Troppmair J, Wachter H. Immune response-associated production of neopterin. Release from macrophages primarily under control of interferon-gamma. *J Exp Med*. 1984;160:310–316.
7. Schroecksnadel K, Frick B, Winkler C, Fuchs D. Crucial role of interferon- $\gamma$  and stimulated macrophages in cardiovascular disease. *Curr Vasc Pharmacol*. 2006;4:205–213.
8. Fuchs D, Weiss G, Wachter H. Neopterin, biochemistry and clinical use as a marker for cellular immune reactions. *Int Arch Allergy Immunol*. 1993;101:1–6.
9. Kojima S, Icho T, Kajiwara Y, Kubota K. Neopterin as an endogenous antioxidant. *FEBS Lett*. 1992;304:163–166.
10. Murr C, Grammer TB, Meinitzer A, Kleber ME, März W, Fuchs D. Immune activation and inflammation in patients with cardiovascular disease are associated with higher phenylalanine to tyrosine ratios: the ludwigshafen risk and cardiovascular health study. *J Amino Acids*. 2014;2014:783730.

11. Adachi T, Naruko T, Itoh A, Komatsu R, Abe Y, Shirai N, Yamashita H, Ehara S, Nakagawa M, Kitabayashi C, Ikura Y, Ohsawa M, Yoshiyama M, Haze K, Ueda M. Neopterin is associated with plaque inflammation and destabilisation in human coronary atherosclerotic lesions. *Heart*. 2007;93:1537–1541.
12. Sugioka K, Naruko T, Hozumi T, Nakagawa M, Kitabayashi C, Ikura Y, Shirai N, Matsumura Y, Ehara S, Ujino K, Itoh A, Haze K, Becker AE, Yoshiyama M, Ueda M. Elevated levels of neopterin are associated with carotid plaques with complex morphology in patients with stable angina pectoris. *Atherosclerosis*. 2010;208:524–530.
13. van Dijk RA, Rijs K, Wezel A, Hamming JF, Kolodgie FD, Virmani R, Schaapherder AF, Lindeman JH. Systematic evaluation of the cellular innate immune response during the process of human atherosclerosis. *J Am Heart Assoc*. 2016;5:e002860.
14. Yan JQ, Tan CZ, Wu JH, Zhang DC, Chen JL, Zeng BY, Jiang YP, Nie J, Liu W, Liu Q, Dai H. Neopterin negatively regulates expression of ABCA1 and ABCG1 by the LXR $\alpha$  signaling pathway in THP-1 macrophage-derived foam cells. *Mol Cell Biochem*. 2013;379:123–131.
15. Grammer TB, Fuchs D, Boehm BO, Winkelmann BR, Maerz W. Neopterin as a predictor of total and cardiovascular mortality in individuals undergoing angiography in the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health study. *Clin Chem*. 2009;55:1135–1146.
16. Sheldon J, Riches PG, Soni N, Jurges E, Gore M, Dadian G, Hobbs JR. Plasma neopterin as an adjunct to C-reactive protein in assessment of infection. *Clin Chem*. 1991;37:2038–2042.
17. Shirai R, Sato K, Yamashita T, Yamaguchi M, Okano T, Watanabe-Kominato K, Rena Watanabe R, Matsuyama T, Ishibashi-Ueda H, Koba S, Kobayashi Y, Hirano T, Watanabe T. Neopterin counters vascular inflammation and atherosclerosis. *J Am Heart Assoc*. 2018;7:e007359.
18. Watanabe K, Watanabe R, Konii H, Shirai R, Sato K, Matsuyama T, Ishibashi-Ueda H, Koba S, Kobayashi Y, Hirano T, Watanabe T. Counteractive effects of omentin-1 against atherogenesis. *Cardiovasc Res*. 2016;110:118–128.
19. Watanabe R, Watanabe H, Takahashi Y, Kojima M, Konii H, Watanabe K, Shirai R, Sato K, Matsuyama T, Ishibashi-Ueda H, Iso Y, Koba S, Kobayashi Y, Hirano T, Watanabe T. Atheroprotective effects of tumor necrosis factor-stimulated gene-6. *JACC Basic Transl Sci*. 2016;1:496–509.

20. Naito C, Hashimoto M, Watanabe K, Shirai R, Takahashi Ya, Kojima M, Watanabe R, Sato K, Iso Y, Matsuyama T, Suzuki H, Ishibashi-Ueda H, Watanabe T. Facilitatory effects of fetuin-A on atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2016;246:344–351.
21. Hasegawa A, Sato K, Shirai R, Watanabe R, Yamamoto K, Watanabe K, Nohtomi K, Hirano T, Watanabe T. Vasoprotective effects of urocortin 1 against atherosclerosis in vitro and in vivo. *PLoS One*. 2014;9:e0110866.
22. Sato K, Shirai R, Hontani M, Shinooka R, Hasegawa A, Kichise T, Yamashita T, Yoshizawa H, Watanabe R, Matsuyama T, Ishibashi-Ueda H, Koba S, Kobayashi Y, Hirano T, Watanabe T. Potent vasoconstrictor kisspeptin-10 induces atherosclerotic plaque progression and instability: reversal by its receptor GPR54 antagonist. *J Am Heart Assoc*. 2017;6:e005790.
23. Konii H, Sato K, Kikuchi S, Okiyama H, Watanabe R, Hasegawa A, Yamamoto K, Itoh F, Hirano T, Watanabe T. Stimulatory effects of cardiotrophin 1 on atherosclerosis. *Hypertension*. 2013;62:942–950.
24. Yamamoto K, Tajima Y, Hasegawa A, Takahashi Y, Kojima M, Watanabe R, Sato K, Shichiri M, Watanabe T. Contrasting effects of stanniocalcin-related polypeptides on macrophage foam cell formation and vascular smooth muscle cell migration. *Peptides*. 2016;82:120–127.
25. Watanabe T, Nishio K, Kanome T, Matsuyama T, Koba S, Sakai T, Sato K, Hongo S, Nose K, Ota H, Kobayashi Y, Katagiri T, Shichiri M, Miyazaki A. Impact of salusin- $\alpha$  and - $\beta$  on human macrophage foam cell formation and coronary atherosclerosis. *Circulation*. 2008;117:638–648.
26. Xu G, Watanabe T, Iso Y, Koba S, Sakai T, Nagashima M, Arita S, Hongo S, Ota H, Kobayashi Y, Miyazaki A, Hirano T. Preventive effects of heregulin- $\beta_1$  on macrophage foam cell formation and atherosclerosis. *Circ Res*. 2009;105:500–510.
27. Inoue K, Kobayashi M, Yano K, Miura M, Izumi A, Mataka C, Doi T, Hamakubo T, Reid PC, Hume DA, Yoshida M, Aird WC, Kodama T, Minami T. Histone deacetylase inhibitor reduces monocyte adhesion to endothelium through the suppression of vascular cell adhesion molecule-1 expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26:2652–2659.
28. Kanbe E, Hatta Y, Tsuboi I, Harada T, Koshinaga M, Inoue T, Aizawa S. Effects of neopterin on the hematopoietic microenvironment of senescence-accelerated mice (SAM). *Biol Pharm Bull*. 2006;29:43–48.

29. Aisaki K, Tsuboi I, Harada T, Oshima H, Yamashita A, Hirabayashi Y, Kanno J, Inoue T, Aizawa S. Neopterin, inflammation-associated product, prolongs erythropoiesis suppression in aged SAMP1 mice due to senescent stromal-cell impairment. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2012;237:279–286.
30. Balogh A, Mittermayr M, Schlager A, Balogh D, Schobersberger W, Fuchs D, Margreiter J. Mechanism of neopterin-induced myocardial dysfunction in the isolated perfused rat heart. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1724:17–22.
31. Icho T, Kojima S, Hayashi M, Kajiwara Y, Kitabatake K, Kubota K. Suppression of ischemia-reperfusion injury in murine models by neopterins. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1995;130:27–31.
32. Shindo A, Tanemura H, Yata K, Hamada K, Shibata M, Umeda Y, Asakura F, Toma N, Sakaida H, Fujisawa T, Taki W, Tomimoto H. Inflammatory biomarkers in atherosclerosis: pentraxin 3 can become a novel marker of plaque vulnerability. *PLoS One*. 2014;9:e100045.
33. Liu ZY, Li YD. Relationship between serum neopterin levels and coronary heart disease. *Genet Mol Res*. 2013;12:4222–4229.
34. Schumacher M, Halwachs G, Tatzber F, Fruhwald FM, Zweiker R, Watzinger N, Eber B, Wilders-Truschnig M, Esterbauer H, Klein W. Increased neopterin in patients with chronic and acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol*. 1997;30:703–707.
35. Giese SP, Amit Z, Yang YT, Shchepetkina A, Katouah H. Oxidant production, oxLDL uptake, and CD36 levels in human monocyte-derived macrophages are downregulated by the macrophage-generated antioxidant 7,8-dihydroneopterin. *Antioxid Redox Signal*. 2010;13:1525–1534.
36. Baird SK, Reid L, Hampton MB, Giese SP. OxLDL induced cell death is inhibited by the macrophage synthesised pterin, 7,8-dihydroneopterin, in U937 cells but not THP-1 cells. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1745:361–369.
37. Shchepetkina AA, Hock BD, Miller A, Kennedy MA, Giese SP. Effect of 7,8-dihydroneopterin mediated CD36 downregulation and oxidant scavenging on oxidised low-density lipoprotein induced cell death in human macrophages. *Int J Biochem Cell Biol*. 2017;87:27–33.

38. Lin CS, Lin FY, Ho LJ, Tsai CS, Cheng SM, Wu WL, Huang CY, Lian CH, Yang SP, Lai JH. PKC $\delta$  signalling regulates SR-A and CD36 expression and foam cell formation. *Cardiovasc Res*. 2012;95:346–355.
39. Blanc A, Pandey NR, Srivastava AK. Synchronous activation of ERK 1/2, p38MAPK and PKB/Akt signaling by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in vascular smooth muscle cells: potential involvement in vascular disease. *Int J Mol Med*. 2003;11:229–234.
40. Hong H, McCullough CM, Stegemann JP. The role of ERK signaling in protein hydrogel remodeling by vascular smooth muscle cells. *Biomaterials*. 2007;28:3824–3833.
41. Kim JH, Lee TY, Park J, Ha H, Kang SW, Kim YS. Effects of tautomycin on proliferation and fibronectin secretion in vascular smooth muscle cells and glomerular mesangial cells. *Transplant Proc*. 2005;37:1959–1961.
42. Seo KW, Lee SJ, Ye BH, Kim YW, Bae SS, Kim CD. Mechanical stretch enhances the expression and activity of osteopontin and MMP-2 via the Akt1/AP-1 pathways in VSMC. *J Mol Cell Cardiol*. 2015;85:13–24.
43. Leosco D, Fineschi M, Pierli C, Fiaschi A, Ferrara N, Bianco S, Longobardi G, Pisani E, Bravi A, Rengo F. Intracoronary serotonin release after high-pressure coronary stenting. *Am J Cardiol*. 1999;84:1317–1322.
44. Fuchs D, Stahl-Hennig C, Gruber A, Murr C, Hunsmann G, Wachter H. Neopterin—its clinical use in urinalysis. *Kidney Int*. 1994;47:S8–S11.
45. Ragab M, Hassan H, Zaytoun T, Refai W, Rocks B, Elsammak M. Evaluation of serum neopterin, high-sensitivity C-reactive protein and thiobarbituric acid reactive substances in Egyptian patients with acute coronary syndrome. *Exp Clin Cardiol*. 2005;10:250–255.
46. Xing Z, Gauldie J, Cox G, Baumann H, Jordana M, Lei XF, Achong MK. IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J Clin Invest*. 1998;101:311–320.
47. Nagashima M, Watanabe T, Terasaki M, Tomoyasu M, Nohtomi K, Kim-Kaneyama J, Miyazaki A, Hirano T. Native incretins prevent the development of atherosclerotic lesions in apolipoprotein E knockout mice. *Diabetologia*. 2011;54:2649–2659.

48. Kojima M, Ozawa N, Mori Y, Takahashi Y, Watanabe-Kominato K, Shirai R, Watanabe R, Sato K, Matsuyama T, Ishibashi-Ueda H, Koba S, Kobayashi Y, Hirano T, Watanabe T. Catestatin prevents macrophage-driven atherosclerosis but not arterial injury-induced neointimal hyperplasia. *Thromb Haemost.* 2018;118:182-194.
49. Watanabe T, Sato K, Itoh F, Noguchi Y, Fujimoto K, Koyama T, Shichiri M. Emerging roles for vasoactive peptides in diagnostic and therapeutic strategies against atherosclerotic cardiovascular diseases. *Curr Protein Pept Sci.* 2013;14:472–480.
50. Schulte S, Sukhova GK, Libby P. Genetically programmed biases in Th1 and Th2 immune responses modulate atherogenesis. *Am J Pathol.* 2008;172:1500–1508.