
原 著

プロスタグランディン E1 製剤による血管平滑筋
細胞培養系における VEGF - A splice variant の
発現パターン変化

(Real - time PCR を用いたラット VEGF - A splice variant の定量化)

三 島 健 人

新潟大学大学院医歯学総合研究科
生体機能調節医学専攻器官制御医学講座
呼吸循環外科学分野専攻
(主任：林 純一教授)

Characterization of VEGF - A variants in Cultured Vascular Smooth Muscle Cells
Treated with Prostaglandin E1 and Lipo - PGE1
(A Quantitative Method for Rat VEGF - A variants with Real - Time PCR)

Takehito MISHIMA

*Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences
Division of Thoracic and Cardiovascular Surgery*

要 旨

血管内皮細胞増殖因子 (VEGF - A) は血管の再生において重要な役割をすることが示されているが, splicing によるいくつかの variant の存在が知られている。また, アンタゴニストとして働く variant の存在も最近示されている。しかし, これらを分離して検出する抗体が存在しないことから, 今回 real - time PCR を用いた定量性のある検出系を開発した。一方, 閉塞性動脈硬化症の治療にはプロスタグランディン E1 製剤が頻用されるが, 血管拡張作用, 血小板凝集抑制作用は良く理解されているものの, 動脈硬化性病変の主役を演じる血管平滑筋細胞に対する影響は十分に知られていない。プロスタグランディン E1 とリポ化プロスタグランディン E1 製剤およびその drug delivery system である lipid microsphere の血管平滑筋細胞に対する効果を検討するために, 今回開発した機能性 VEGF - A mRNA splice variant (VEGF - A120, VEGF - A164, VEGF - A188) および抑制性 splice variant (VEGF - A164b) の定量法を用いた。ラット

Reprint requests to: Takehito MISHIMA
Division of Thoracic and Cardiovascular Surgery
Niigata University Graduate School of
Medical and Dental Sciences
1 - 757 Asahimachi - dori Chuo - ku,
Niigata 951 - 8510 Japan

別刷請求先：〒951 - 8510 新潟市中央区旭町通 1 - 757
新潟大学医学部第二外科 三島健人

血管平滑筋細胞培養系において血清刺激とプロスタグランジン製剤を合わせて投与することにより、有意な機能性 VEGF-A164 の増加を認めた。VEGF-A164b は、血清刺激と PGE1, lipid microsphere を添加した群で有意に上昇したが、lipoPGE1 では有意な上昇を認めなかった。このような反応性の差は、リポ化による効果の可能性がある。機能性および抑制性の VEGF-A splice variant を合わせて解析することにより、血管再生における VEGF-A の反応性がより良く理解できる可能性が示された。

キーワード：閉塞性動脈硬化症，血管平滑筋細胞，プロスタグランジン E1，VEGF-A，splice variants

緒 言

閉塞性動脈硬化症は四肢の動脈が動脈硬化により狭窄あるいは閉塞し、虚血状態にいたる疾患である。手術によるバイパス手術およびステント治療、薬物療法としてプロスタグランジン製剤、アスピリン療法、シロスタゾール等が臨床で使用される他、骨髄細胞の移植による血管新生療法も注目されている。

臨床で使用されているプロスタグランジン製剤は強い血管拡張作用、血小板凝集抑制能¹⁾²⁾をもつとされ、手術中の血圧コントロール、先天性心疾患での動脈管閉塞の防止、閉塞性動脈硬化の治療薬として用いられている。プロスタグランジン E1 が動脈の内膜肥厚を抑制するという報告がある一方で³⁾、動脈硬化性病変の主役を演じる血管平滑筋細胞に対する影響は十分に理解されていない。また、プロスタグランジン E1 には肺で急速に不活性化されるという欠点があり、lipid microsphere を drug delivery system として用いるプロスタグランジン E1 のリポ化製剤は、プロスタグランジン E1 の肺での不活性化を抑えることを目的に開発された⁴⁾。

VEGF-A は血管新生因子として注目されるが、mRNA 翻訳時の splicing により Exon の結合に変化が起り、何種類かの variant を作り出す。ヒトでは通常アミノ酸数が 121 個 (VEGF-A121)、165 個 (VEGF-A165)、189 個 (VEGF-A189)、206 個 (VEGF-A206) の 4 種類が存在する⁵⁾。また、VEGF-A145, VEGF-A183 といった稀な亜型も報告されている⁶⁾。正常な組織においては、VEGF-A121 と VEGF-A165 で全 VEGF-A mRNA mas-

sage の 78 % を占め、cell-adherent variant VEGF-A189 が 22 % を占める⁷⁾。更に、Exon8a が Exon8b に置き換わり、抑制性の VEGF-A の機能を持つ variant が報告されている⁸⁾⁻¹⁰⁾ (本論文では抑制性の variant についてはアミノ酸数の後に b をつけることにより区別することとした)。ラットにおける VEGF-A splice variant はアミノ酸数が 1 少ない構造を取る¹¹⁾。タンパク質レベルで抑制性 variant を区別する抗体が現在のところ手に入らないため、real-time PCR による定量性の解析系を作成することとした。ヒトにおいて、real-time PCR の系を用いた VEGF-A splice variant の検出法が報告されている。ラットの系では機能性 variant の検出の報告はあるが¹²⁾、抑制性 variant の報告はまだない。

今回、SYBR green を用いた real-time PCR を利用し、VEGF-A mRNA splice variant (VEGF-A120, VEGF-A164, VEGF-A188) の定量法および抑制性 splice variant, VEGF-A164b の定量法を開発し、ラット血管平滑筋細胞の培養系に対するリポ化プロスタグランジン E1 の作用について検討したので報告する。

材料と方法

動物

すべての動物実験は新潟大学動物実験ガイドラインに沿い、委員会の承認を得て行った。雄ラット (Lewis, 6 週令) をチャールズリバーより購入し、Specific Pathogen Free の状態で飼育し、実験に用いた。

血管平滑筋細胞の分離と培養

ラットをイソフルレン吸入で麻酔し、腹部大動脈、下大静脈を切断し、瀉血により犠牲死させたのち、胸部大動脈を切除した。血管平滑筋細胞は Explant 法を用いて分離した¹³⁾。大動脈外膜をメスを用いて剥離、内膜は綿棒で擦過し、動脈壁を2～3mm大に細切した後、10%牛胎児血清、penicillin (100 μ g/ml)、streptomycin (100 μ g/ml)、および L-glutamine (100U/ml) を含む D-MEM 培養液中で湿潤環境下に5% CO₂ インキュベーター内で培養し、組織片から培養皿上に移動してきた細胞を増殖させ実験に用いた。第4継代から第8継代までを実験で用いた。

薬剤

リポ化プロスタグランディン E1 (lipoPGE1) は三菱ウエルファーマ社(東京)との共同研究として提供を受けた。リポ化製剤の Drug Delivery System として用いられている lipid microsphere (イントラリポス) は大塚大鵬製薬より購入した。牛胎児血清は Sigma-Aldrich 社より購入した。その他の培養試薬は GIBCO 社のものを用いた。messenger RNA の抽出には TRIzol Reagent (Invitrogen 社) を用い、Real-time PCR には Reva Tra Ace- α -[®] (TOYOBO 社)、SYBR[®] Premix Ex Taq[™] (タカラバイオ株式会社) を使用した。プライマー合成は Sigma-Genosys 社に委託した。

プライマーデザイン

ラット VEGF-A 遺伝子の配列は National Center for Biotechnology Information のデータベースより取得した (association number: NM_031836.1)。Exon および Intron の配列は <http://www.ensembl.org/> より検索した (図 1)。sense あるいは antisense プライマーの 3' 末端 3～5 塩基が Exon の接合部をターゲットにするように、annealing 温度を 60℃前後、プライマー長を 20mer 程度になるように PRIMER 3.0 (<http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/>) を用いてプライマーをデザインした。Light Cycler

(Loche) ならびに Ex Taq SYBR Green Premix (TaKaRa) を用いて、ラット肝臓、大動脈より得られた cDNA を鋳型にしてポジティブコントロールを作成、melting curve および電気泳動にて single の PCR 産物であることを確認し、更にターゲットとしたシーケンスが得られているかを PCR 産物のシングルパスシーケンスをシーケンサーを用いて確認した。Microcn フィルター (YM-100; Millipore) にて PCR product を精製、スペクトロフォトメーターで PCR 産物の copy 数を定量、希釈列を作成し、real-time PCR のスタンダードとして用いた。また、内部標準として β -actin を用いた (表 1)。

血管平滑筋細胞培養系と薬剤の添加

血管平滑筋細胞は 6 well plate 上で培養し、48 時間の serum starvation の後、血清刺激ならびに PGE1, lipoPGE1, あるいは lipid microsphere を添加した。lipid microsphere は lipoPGE1 1ng に対して、0.4mg の組成で作られているため、それぞれ PGE1, lipoPGE1 を 50ng/ml, lipid microsphere を 2mg/ml で添加した。2時間培養後に細胞を採取、mRNA を抽出した。

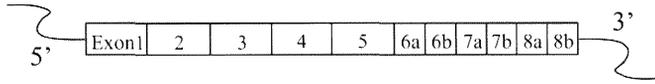
mRNA の抽出および cDNA の合成

PBS で洗浄後、TRIzol 法を用いて、mRNA を分離した。cDNA の合成は RivaTra Ace (Toyobo) を用いて行った。Reverse Transcription 反応の設定は取扱説明書に従った。反応には oligo d (T) 20 プライマーを用いて、反応温度 42℃ 50分、99℃ 5分で行った。

定量性 Real-Time PCR

各 cDNA に対応したプライマーと SYBR[®] Premix Ex Taq[™], Light cycler (Loche) で PCR 反応を行った。反応液は 2× SYBR[®] Premix Ex Taq[™] (Perfect Real Time) (Takara) を 10 μ l, sense プライマー (10 μ M) および antisense プライマー (10 μ M) 各 1 μ l, H₂O 7 μ l に逆転写の終わったサンプルを 100 倍希釈にしたものを 1 μ l の合計 20 μ l を作製した。PCR 反応は 95℃ 10 秒

A VEGF-A gene structure



B VEGF-A splice variants

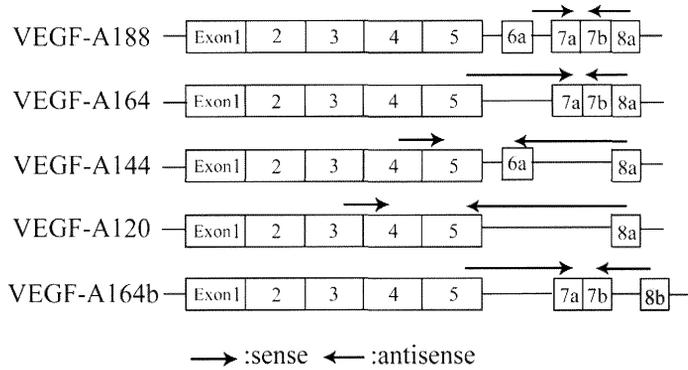


図1

A : VEGF-A gene structure

ラットの VEGF-A 遺伝子は、9 番染色体に存在し、1 から 8 番までの Exon が存在する。

B : VEGF-A splice variants

VEGF-A188 は 1 から 8 番までの Exon を有するが、VEGF-A164 は Exon6 を、VEGF-A144 は Exon7 を、VEGF-A120 は Exon6, 7 を欠いている。抑制性 variant VEGF-A164b の Exon8b は COOH 末端の塩基が一部変化しており機能性 variant が用いる Exon8a に対し 8b と表現される。矢印はプライマーが annealing する部位を示した。

表1 プライマーリスト

Product	sense	antisense
VEGF-A	CCACCATGCCAAGTGGTC	ACTCCAGGGCTTCATCATTG
VEGF-A188	TAAATCCTGGAGCGTTCACTG	CGCCTTGGCTTGTCCACAT
VEGF-A188b	TAAATCCTGGAGCGTTCACTG	CATGGTTAATCGGTCTTTCC
VEGF-A164	GATAGAACAAAGCCAGAAAATCAC	CGCCTTGGCTTGTCCACAT
VEGF-A164b	GATAGAACAAAGCCAGAAAATCAC	GGTGAGAGGTCTGCAAGTACG
VEGF-A144	CAGATGTGAATGCAGACCAAAG	GCCTTGGCTTGTCCACATACG
VEGF-A144b	CAGATGTGAATGCAGACCAAAG	TCTTTCCGGTGAGAGGTACG
VEGF-A120	AATGATGAAGCCCTGGAGTG	GCCTTGGCTTGTCCACATTTT
VEGF-A120b	AATGATGAAGCCCTGGAGTG	CCGGTGAGAGGTTTTTCTGG
β-actin	CCGTGAAAAGATGACCCAGAT	ACCCTCATAGATGGGCACAG

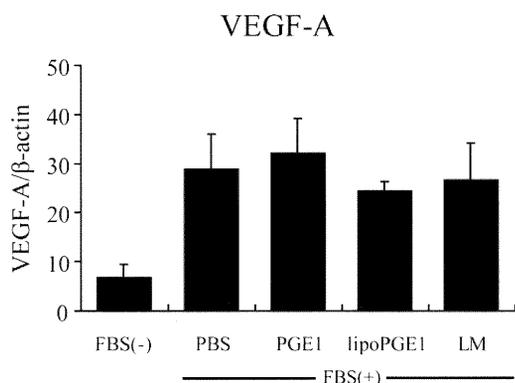


図2 薬剤投与2時間後の VEGF-A 全発現量の比較

血清の添加により血管平滑筋細胞からの VEGF-A 発現総量は有意に増加した ($p = 0.008$). PGE1, lipoPGE1 及び lipid microsphere を加えた場合にも無血清の場合に比べると有意な増加を認めたが、血清刺激単独群に比べて明らかな発現量の変化は認められなかった。

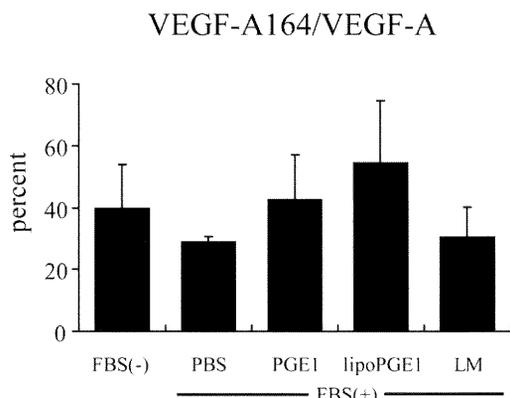


図3 薬剤投与2時間後の VEGF-A 全発現量に占める VEGF-A164 発現量の割合

VEGF-A 総量に占める VEGF-A164 の割合は 29% から 54% であったが、血清刺激や各種薬剤の添加による群間の有意差は認められなかった。

を1サイクル行った後、95℃、5秒；60℃、10秒で40サイクル行った後、melting curveを確認した。LightCycler Software version 3.5を用いてスタンダードの10倍希釈列からコピー数を算出した。サンプル間の比較は、特に記載のない場合、β-actinに対する相対的発現量として表した。

統計学的解析

結果は3サンプル以上の mean ± SD で表記した。有意差検定は one-way ANOVA, Bonferroni's Multiple Comparison Test を用い、有意水準は $P < 0.05$ とした。

結 果

VEGF-A mRNA の発現

血管平滑筋細胞の牛胎児血清刺激2時間後の VEGF-A 遺伝子の発現は β-actin を内部コントロールとして比をとると、薬剤の添加の有無にかかわらず、無血清の培養系に比べて、優位な増加

を示した (図2, $P < 0.05$)。PGE1, lipoPGE1, lipid microsphere 間では優位差を認めなかった。また、VEGF-A164 の VEGF-A の中で占める割合は 30% ~ 50% とばらつきはあるものの、血清や薬剤添加による有意差は認められなかった (図3)。

VEGF-A164 および VEGF-A164b mRNA の発現

VEGF-A164 の発現において有意差を認めたのは、血清刺激をしていない培養系と血清刺激に PGE1 あるいは lipoPGE1 を添加した系の間のみであった (図4, $p < 0.05$)。しかしながら、VEGF-A164b に関しては、血清刺激と PGE1, lipid microsphere を添加した群で有意に上昇したが、lipoPGE1 では、有意な上昇を認めなかった (図5)。また、PGE1 と lipoPGE1 の間に差を認め、PGE1 刺激ではより抑制性 variant である VEGF-A164b の増加が認められた。しかし、VEGF-A164/VEGF-A164b 比には有意差を認めなかった (図6)。

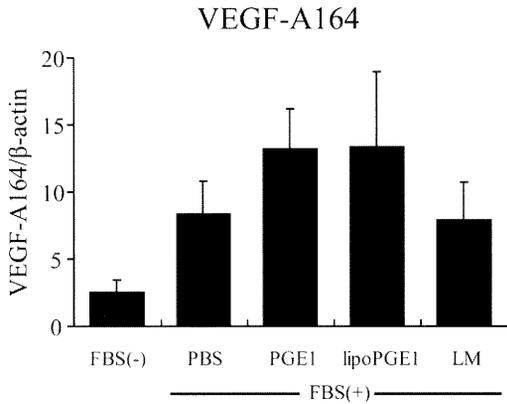


図4 薬剤投与2時間後の VEGF-A164 発現量の比較

無血清の状態に比べ、血清刺激単独や lipid microsphere を加えた場合の VEGF-A164 の有意な増加は認められなかった。しかし、さらに PGE1 及び lipoPGE1 を加えた場合の増加は有意であった。(それぞれ $p = 0.026$, $p = 0.023$)。血清刺激群と各種薬剤を加えた群間に有意差は認められなかった。

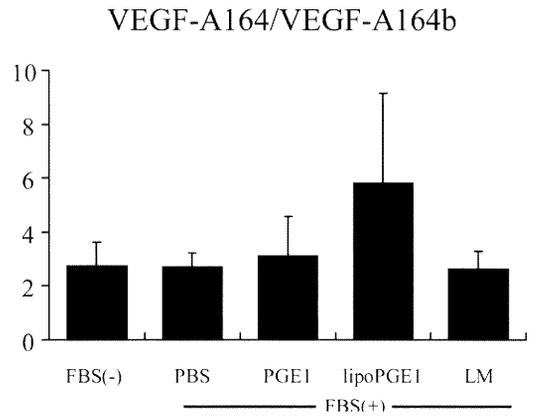


図6 薬剤投与2時間後の VEGF-A164 及び VEGF-A164b 発現量の比

血清刺激がない場合、VEGF-A164 は VEGF-A164b の 2.7 倍発現していた。VEGF-A164 及び VEGF-A164b 発現量の比の、血清刺激や各種薬剤による明らかな増減は認められなかった。

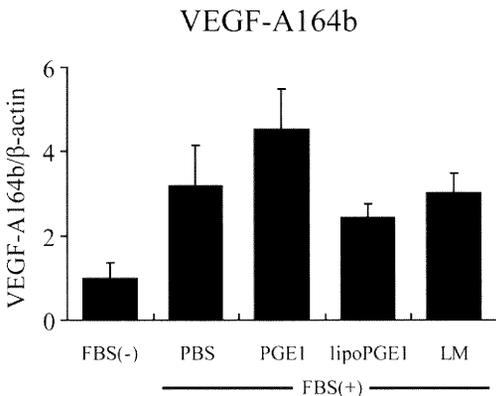


図5 薬剤投与2時間後の VEGF-A164b 発現量の比較

VEGF-A164b は、血清刺激により有意に増加した ($p = 0.025$)。PGE1 や lipid microsphere を加えた場合にも無血清の場合に比べ有意に増加したが(それぞれ $p = 0.001$, $p = 0.041$)、lipoPGE1 を加えた場合の増加は有意ではなかった。PGE1 添加群では lipoPGE1 に比べ有意に VEGF-A164b の発現量が増加した ($p = 0.034$)。

VEGF-A120 および VEGF-A188 mRNA の発現

VEGF-A120 は無血清の培養系に対して、lipoPGE1 添加群のみ有意差をもって増加したが、血清や PGE1, lipid microsphere の添加群では増加は有意ではなかった(図7)。VEGF-A188 は無血清の培養系に対して、血清刺激および各薬剤の添加による有意差は認められなかった(図8)。

考 察

本研究では、①ラット血管平滑筋細胞における VEGF-A および機能性 splice variant である VEGF-A164, VEGF-A120, VEGF-A188, および抑制性の VEGF-A164b の mRNA 産生を SYBR green を用いた real-time PCR を利用して定量化できること。②機能性 VEGF-A (164, 120) が血清刺激で増加すること。③無血清の培養、および 10% 牛胎児血清刺激下では、抑制性 VEGF-A164b は機能性 variant VEGF-A164 の 3分の1程度の発現を示すこと④血管平滑筋細胞における機

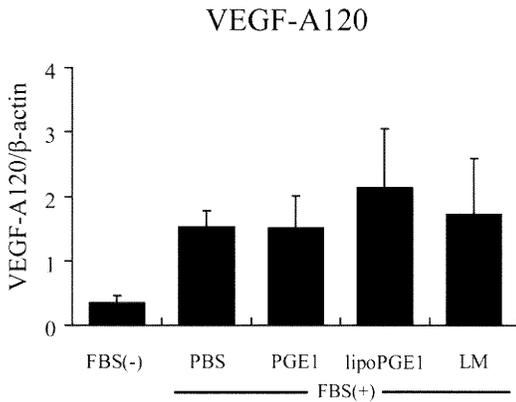


図7 薬剤投与2時間後の VEGF-A120 発現量の比較

血清刺激による VEGF-A120 発現の増加は有意ではなかった。PGE1 や lipid microsphere 添加群も発現量の増加は有意ではなかったが、lipoPGE1 添加により有意な増加を認めた ($p = 0.048$)。

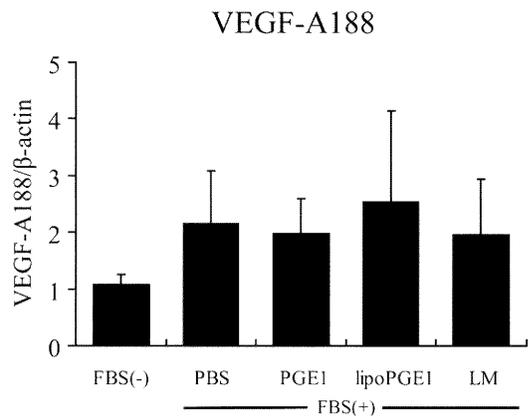


図8 薬剤投与2時間後の VEGF-A188 発現量の比較

無血清の場合に比べ、血清刺激や各種薬剤添加による明らかな増加は認められなかった。

能性 variant と抑制性 variant の産生割合がプロスタグランジン E1 製剤により変化する可能性があることを示した。

VEGF-A とチロシンキナーゼ受容体 (VEGFR-1, -2) システムは、生理的血管新生あるいは病的血管新生において中心的役割を演じるが⁶⁾、これら受容体にアンタゴニストとして働く VEGF-A の variant が結合すれば、VEGF-A の生理的機能を抑制することになる。

今回対象とした血管平滑筋細胞の牛胎児血清刺激の培養系は、動脈硬化性病変における初期病態に重要と考えられる血管平滑筋細胞増殖のモデルと考えられる¹⁴⁾。活動期の動脈硬化性病変では、様々なサイトカインおよび成長因子が豊富に存在する可能性が高い¹⁵⁾¹⁶⁾。従って、このような抑制型 VEGF-A variant の産生が増加している可能性がある。VEGF-A の総量が血管内皮細胞の増殖に影響を及ぼすのは当然だが、このような variant の存在も大きな問題と考える。今回のシリーズでは抑制性 variant (VEGF-A 164b) が、機能的 variant (VEGF-A 164) の3分の1程度に認められた。このようなメカニズムが動脈硬化病巣の血

管内皮細胞の増殖を抑え、内膜病変部の修復を抑制する作用があるのかもしれない。アスピリン治療¹⁷⁾¹⁸⁾、細胞保護因子 Heme Oxygenase type1/一酸化炭素系による動脈硬化性病変の抑制¹⁹⁾、あるいは NFκB デコイによる血管平滑筋細胞の増殖抑制²⁰⁾等の現象を VEGF-A splice variant という視点で見直して見ると興味深い。また、この VEGF-A164/164b 比を増加させることができれば、血管内皮の増殖を促進し、血管新生の一助となる可能性がある。今後、ラットを用いた in vivo の系で検討したいと考えている。

従来の VEGF-A mRNA 総量を定量する方法では、抑制性 variant を含んだ分画を定量していることになるので、機能的 VEGF splice variant の薬理作用を反映したものでない可能性がある。見方を変えると、VEGF-A は splicing というプロセスを介すことで、自らの作用を調節する機序を持っているのかも知れない。

今回、血清刺激で VEGF-A 総量はプロスタグランジン E1, リポ化製剤, lipid microsphere の投与により増加したが、lipo-PGE1 の添加群のみ VEGF-A 164b の増加を認めなかった。splice

variantの発現にPGE1とlipoPGE1との間で違いがあることから、この2剤の血管平滑筋細胞に対する効果に違いがあることが示唆される。今回の実験では、VEGF-A 164/164bで有意差を認めなかった。これらのvariantが生体内細胞内あるいは局所でどのように分布するのか、単なる濃度と比率というものがどういう意味をなすのかを今後in-vivoの実験を含めた検討をしてゆきたい。この実験で示されたように、VEGF splice variantのほとんどがVEGF-A 164と164bの形で存在することを考えるとVEGF-Aの上昇のみならず、VEGF-A 164bの変化や、VEGF-A164/164b比の評価が意味を持つてくる事象があり得る。

今回、すべてのsplice variantについて検討すべく、プライマーを設計して検討したが(表1)、プライマー dimmerが問題となり比較に至らなかったvariantがあった。また、VEGF-A164以外でコピー数が少なく、スタンダードを作成することすら困難であったものも存在する。Exonのつなぎ目をアニーリングサイトとして用いてプライマーを設計する本法は、SYBR Greenを用いた実験系ではプライマーデザイン上の限界があり、非特異的合成を抑える工夫が必要である。TaqMan Probe等 probeを用いたhybridize法、バッファの改良によるdimmer産生の抑制等、試薬の改良が進んでおり、本実験系もこれらを利用することにより、今回検出できなかった抑制性variantについても最適化できる可能性がある。

組織工学、再生医療分野では血管再生が重要な意味を持っている。他方、動脈硬化においては、血管平滑筋細胞の増殖が狭窄の原因となっている。また、ガンの治療においては、血管増殖の抑制が大きな意味を持つ。もし、血管の再生、抑制を思うようにコントロールできれば、様々な病態のコントロールを可能にする可能性がある。今回の解析システムを発展させ、すべてのsplice variantに着目して検討し、VEGF-A splice variantsの動態について詳細に検討されれば、これらの領域でのVEGF-Aの役割を更に詳細に検討することができると考えられる。

謝 辞

本研究全般にわたり、ご指導ご助言をいただきました。新潟大学大学院医歯学総合研究科呼吸循環外科 林純一教授、羽賀 学先生に心より深謝申し上げます。

参 考 文 献

- 1) Masters TN, Born GV and Robicsek F: Platelet-anti-aggregating and hemodynamic effects of adenosine and prostaglandin E1. *Thorac Cardiovasc Surg* 30: 14-20, 1982.
- 2) Schror K and Hohlfeld T: Mechanisms of anti-ischemic action of prostaglandin E1 in peripheral arterial occlusive disease. *Vasa* 33: 119-124, 2004.
- 3) Umemura K, Watanabe S, Kondo K, Hashimoto H and Nakashima M: Inhibitory effect of prostaglandin E1 on intimal thickening following photochemically induced endothelial injury in the rat femoral artery. *Atherosclerosis* 130: 11-16, 1997.
- 4) Mizushima Y, Yanagawa A and Hoshi K: Prostaglandin E1 is more effective, when incorporated in lipid microspheres, for treatment of peripheral vascular diseases in man. *J Pharm Pharmacol* 35: 666-667, 1983.
- 5) Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC and Abraham JA: The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem* 266: 11947-11954, 1991.
- 6) Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S and Poltorak Z: Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 13: 9-22, 1999.
- 7) Wellmann S, Taube T, Paal K, Graf VEH, Geilen W, Seifert G, Eckert C, Henze G and Seeger K: Specific reverse transcription-PCR quantification of vascular endothelial growth factor (VEGF) splice variants by LightCycler technology. *Clin Chem* 47: 654-660, 2001.
- 8) Woolard J, Wang WY, Bevan HS, Qiu Y, Morbidelli L, Pritchard-Jones RO, Cui TG,

- Sugiono M, Waine E, Perrin R, Foster R, Digby - Bell J, Shields JD, Whittles CE, Mushens RE, Gillatt DA, Ziche M, Harper SJ and Bates DO: VEGF165b, an inhibitory vascular endothelial growth factor splice variant: mechanism of action, in vivo effect on angiogenesis and endogenous protein expression. *Cancer Res* 64: 7822 - 7835, 2004.
- 9) Cui TG, Foster RR, Saleem M, Mathieson PW, Gillatt DA, Bates DO and Harper SJ: Differentiated human podocytes endogenously express an inhibitory isoform of vascular endothelial growth factor (VEGF165b) mRNA and protein. *Am J Physiol Renal Physiol* 286: F767 - 773, 2004.
- 10) Bates DO, Cui TG, Doughty JM, Winkler M, Sugiono M, Shields JD, Peat D, Gillatt D and Harper SJ: VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma. *Cancer Res* 62: 4123 - 4131, 2002.
- 11) Burchardt M, Burchardt T, Chen MW, Shabsigh A, de la Taille A, Buttyan R and Shabsigh R: Expression of messenger ribonucleic acid splice variants for vascular endothelial growth factor in the penis of adult rats and humans. *Biol Reprod* 60: 398 - 404, 1999.
- 12) Pufe T, Wildemann B, Petersen W, Mentlein R, Raschke M and Schmidmaier G: Quantitative measurement of the splice variants 120 and 164 of the angiogenic peptide vascular endothelial growth factor in the time flow of fracture healing: a study in the rat. *Cell Tissue Res* 309: 387 - 392, 2002.
- 13) Martinez - Gonzalez J, Berrozpe M, Varela O and Badimon L: Heterogeneity of smooth muscle cells in advanced human atherosclerotic plaques: intimal smooth muscle cells expressing a fibroblast surface protein are highly activated by platelet - released products. *Eur J Clin Invest* 31: 939 - 949, 2001.
- 14) Alexander RW: Theodore Cooper Memorial Lecture. Hypertension and the pathogenesis of atherosclerosis. Oxidative stress and the mediation of arterial inflammatory response: a new perspective. *Hypertension* 25: 155 - 161, 1995.
- 15) von der Thusen JH, Kuiper J, van Berkel TJ and Biessen EA: Interleukins in atherosclerosis: molecular pathways and therapeutic potential. *Pharmacol Rev* 55: 133 - 166, 2003.
- 16) Fan J and Watanabe T: Inflammatory reactions in the pathogenesis of atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb* 10: 63 - 71, 2003.
- 17) de Gaetano G: Low - dose aspirin and vitamin E in people at cardiovascular risk: a randomised trial in general practice. Collaborative Group of the Primary Prevention Project. *Lancet* 357: 89 - 95, 2001.
- 18) Yang HM, Kim HS, Park KW, You HJ, Jeon SI, Youn SW, Kim SH, Oh BH, Lee MM, Park YB and Walsh K: Celecoxib, a cyclooxygenase - 2 inhibitor, reduces neointimal hyperplasia through inhibition of Akt signaling. *Circulation* 110: 301 - 308, 2004.
- 19) Otterbein LE, Zuckerbraun BS, Haga M, Liu F, Song R, Usheva A, Stachulak C, Bodyak N, Smith RN, Csizmadia E, Tyagi S, Akamatsu Y, Flavell RJ, Billiar TR, Tzeng E, Bach FH, Choi AM and Soares MP: Carbon monoxide suppresses atherosclerotic lesions associated with chronic graft rejection and with balloon injury. *Nat Med* 9: 183 - 190, 2003.
- 20) Yoshimura S, Morishita R, Hayashi K, Yamamoto K, Nakagami H, Kaneda Y, Sakai N and Ogihara T: Inhibition of intimal hyperplasia after balloon injury in rat carotid artery model using cis - element 'decoy' of nuclear factor - kappaB binding site as a novel molecular strategy. *Gene Ther* 8: 1635 - 1642, 2001.

(平成 20 年 1 月 10 日受付)