

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590869
 研究課題名（和文）脆弱動脈硬化病変におけるメタボリックシンドロームの関与と
 血管内皮細胞障害の検討
 研究課題名（英文）Study about the Involvement of Metabolic Syndrome and
 Endothelial Dysfunction in Vulnerable Atherosclerosis
 研究代表者
 杉山 正悟（SUGIYAMA SEIGO）
 熊本大学・大学院医学薬学研究部・准教授
 研究者番号：90274711

研究成果の概要： CB1 受容体がヒト冠動脈粥腫に存在し、動脈硬化に対して CB1 受容体遮断が何らかの有益性をもたらすかどうかを検討した。ヒト冠動脈粥腫、特にマクロファージに一致して CB1 受容体が発現している事、冠動脈疾患患者では内因性カンナビノイドシステムが活性化している事が示された。抗肥満の治療戦略である CB1 受容体拮抗薬 rimonabant は動脈硬化病変におけるマクロファージの炎症性 cytokine 産生を抑制し、抗動脈硬化作用を有する可能性がある事が示された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 内科系臨床医学、循環器内科学

キーワード： 血管病態学、動脈硬化、メタボリックシンドローム、肥満

1. 研究開始当初の背景

肥満、特に腹部肥満はメタボリックシンドロームと密接に関係しており、心血管疾患の罹患率と死亡率の増加に寄与している。その理由として、肥満（特に腹部肥満）になると複数の心血管危険因子が合併してることが知られている。肥満は全世界で急速に進行している疫学的問題の一つであり、肥満を特徴とするメタボリックシンドロームは心血管疾患罹患率と早期死亡リスクの上昇に関連している。こうした点から肥満者には心血管疾患のリスクを減らすような生活スタイル改善プログラムへの参加を促すべきであるが、実際には体重減少の意志がある肥満者でも生活スタイルの改善のみでは長期にわたり持続的な減量を維持することは難しい。こ

のような事実から、抗肥満薬物療法は心血管疾患の予防治療のため、ライフスタイル改善に付加した重要な治療法の一環として認識されつつある。

1990年にマリファナの主成分である cannabidiol の生体内受容体として7回膜貫通型のG蛋白共役型受容体が発見された。さらに1992年には、この受容体の内因性リガンドである anandamide が同定され、内因性カンナビノイドシステム（Endocannabinoid System; ECS）の存在が確認された。その後もリガンドと受容体の発見があり、現在では、2つの代表的内因性リガンド（Anandamide; AEA, 2-arachidonoyl glycerol; 2-AG）と2つのGタンパク共役型受容体、カンナビノイド1型（Cannabinoid 1; CB1）受容体とカン

ナビノイド2型 (Cannabinoid 2; CB2) 受容体で構成されることがわかっている。CB1 受容体は、ヒトでは472個のアミノ酸で構成され、共役しているG蛋白はGoまたはGiであり、リガンドによる刺激はアデニル酸シクラーゼの阻害、電位依存性カルシウムチャンネルの抑制、電位依存性カリウムチャンネルの活性化、mitogen-activated protein kinase (MAPK)の上昇などを引き起こす。CB1 受容体はマリファナの精神作用研究から発見された経緯から中枢神経系、特に淡蒼球、線条体、黒質、海馬、小脳の分子層、大脳皮質などに多く発現することが知られている。

このECSはエネルギーバランス、摂食、脂質糖代謝の生理学的調節にも深く関与することが報告されている。またCB1 受容体は中枢神経系だけでなく、末梢でも脂肪組織や肝臓にも発現することが示されている。食物の過剰摂取が続く肥満になると中枢や末梢においてECSの過剰な活性化がおこり、その刺激はさらなる食物摂取とインスリン抵抗性の増大やHDLの低下、アディポネクチンの低下を起こすことが示されている。

これらECSに関連する薬剤は多く開発されているが、その中で初めて臨床応用可能となったものがrimonabantであり、強力なCB1 受容体アンタゴニスト作用を示すCB1 受容体拮抗薬である。rimonabantは臨床的に有効性を示すことが多くの大規模臨床試験で証明されており、その持続的投与は有意な体重減少とウエスト径の減少をもたらす、多くの心血管リスクファクターを改善した。それゆえ、rimonabantによるCB1 受容体遮断は、肥満とそれに関連した代謝異常に対する新たな治療戦略になると考えられる。このrimonabantによる心血管リスクファクターに対する有益な効果は体重減少から予想されるものよりも大きかったため、多くの研究者たちがrimonabantには脂肪からのアディポネクチンの分泌や脂肪産生とエネルギーバランスの制御といった体重に非依存性の効果があると考えている。こうした研究は特に肥満に関連した心血管疾患の病態における末梢ECSの潜在的な重要性を示唆している。

脂肪線条から進行した粥腫への発展まで、動脈硬化のすべての時期を通して炎症はその病因、病態に重要な役割を演じており、特にマクロファージの集積はプラークの炎症、破綻と急性冠症候群に深く関係している。動脈硬化発生においてマクロファージの炎症活性を減弱するようにデザインされた治療は急性冠症候群の予防および治療に付加的な価値を持つ可能性がある。

すでに行われた大規模臨床試験にて、CB1 受容体遮断はhigh sensitive-C reactive protein(hs-CRP)を減少させることが示されており、さらに最近行われた冠動脈血管内超

音波検査を用いたCB1 受容体遮断薬による動脈硬化の退縮を検討した臨床試験では、二次エンドポイントである全動脈硬化体積を減少させることが示された。

2. 研究の目的

本研究において、我々はECSがヒトの動脈硬化病変に存在し、rimonabantが動脈硬化に関連した炎症プロセスを修飾するのではないかという仮説を立て、これを検証した。そのため、我々はCB1 受容体の存在をヒト冠動脈粥腫において証明し、rimonabantがヒトマクロファージにおいて何らかの抗炎症効果を示すかどうか、また実際に生体への投与で動脈硬化の発生に影響を及ぼすかを検討した。

3. 研究の方法

免疫組織学的染色および定量化ヒト冠動脈新鮮凍結標本をAmerican Heart Association (AHA)の組織学的分類に従い、diffuse intimal thickening (type I, $n=5$), atheromatous plaques (type IV or Va, $n=5$), fibromuscular plaques (type Vc, $n=5$)の3群に分け免疫組織学的染色を行い比較検討した。凍結切片は6 μ m厚にカットし、4%パラホルムアルデヒドで固定した。免疫組織学的染色はペルオキシダーゼを用いた酵素抗体法にて行った。内因性ペルオキシダーゼ活性阻害についてはIsobeらが報告した方法を用い、二次抗体の非特異的反応阻害のため5%正常ヤギ血清/phosphate-buffer salineで20分処理した。3,3'-diaminobenzidineにて発色させ、hematoxylinで後染色(核染色)を行ったのち封入した。CB1, CB2 受容体のネガティブコントロールとしてnormal rabbit IgG antibodyを一次抗体として同様の手技を行った。また、すでにCB1,2 受容体の発現が報告されているヒト皮膚組織(生検標本の正常部位)をポジティブコントロールとして用いた。各々の切片は低倍率($\times 100$)の条件において、CB1 受容体染色陽性領域のplaque領域に対する割合をcomputer-assisted image analysis softwareを用いて算出した。

冠動脈粥腫切除標本経皮的冠動脈インターベンションを施行された14名の患者から冠動脈粥腫切除標本を得た。そのうちの7名は安定狭心症(sAP)、残りの7名が不安定狭心症(uAP)の患者であった。不安定狭心症は安静時に胸痛があり、心電図で少なくとも連続する2誘導において0.1mV以上の一過性ST上昇もしくは下降が認められたものと定義した。Braunwaldが提唱した不安定狭心症分類ではIIBに該当する。

ヒト血中内因性カンナビノイド測定冠動脈造影予定の患者において、連続的に血中の内因性カンナビノイドを測定した。炎症性疾患、膠原病、活動性のある感染症、悪性腫瘍を合

併する患者は除外した。冠動脈造影にて 50%以上の狭窄病変を一枝以上もつものを冠動脈疾患と定義し、20人の患者を選出した。さらに年齢を調整した冠動脈疾患のない患者20人についても測定を行った。採血においては、その分解を可能な限り防ぐために、採血直後にアセトニトリル中に注入し激しく振盪する方法で行った。内因性カンナビノイド(AEA, 2-AG)の検出は液体クロマトグラフィー/質量分析システムにより測定した。

細胞培養 1) ヒト末梢血単核球分離培養マクロファージ ヒト末梢血単核球(peripheral blood mononuclear cells: PBMC)は熊本赤十字血液センターより譲渡された残余血(buffy-coat)もしくは正常ボランティアより採血した血液から Lymphoprep (density=1.077 g/ml)を用いて比重遠心分離法にて単離した。単離した単核球は 5% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) および 10 ng/ml macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) と 10 ng/ml granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) を含む medium-199 で標準培養条件にて培養した。4日間の培養ののち、これらの細胞を“ヒト末梢血単核球分離培養マクロファージ”として実験に使用した。**細胞培養 2) ヒト単球系細胞株 (THP-1) 由来培養マクロファージ** またヒト単核球系細胞株(THP-1)を American Type Culture Collectionより購入し、10% FBS, 10 ng/ml GM-CSF, 10 ng/ml M-CSF and 1.6 nmol/L Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) を添加した RPMI-1640 medium にて 4日間培養しマクロファージへと分化させた。その後、これらの細胞を“THP-1 細胞由来培養マクロファージ”として実験に使用した。**reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) 解析** 単核球、マクロファージ、脂肪組織、DCA サンプルの total RNA を RNA easy mini kit を用いて抽出した。この total RNA のうち 0.5 µg を Quantitect Reverse Transcription Kit を使用して cDNA を合成した。PCR 反応は TaKaRa Ex Taq HS を使用し、94 °C, 5分、94 °C, 1分、62 °C, 30秒、72 °C, 1分を 40 サイクル行い、72 °C, 5分 で最終エクステンションを行った。産生された PCR 産物は 2.0% アガロースゲルにて電気泳動した。CB1 受容体の genome DNA は intron を持たない構造であるため、逆転写酵素を加えずに同様の反応を行った total RNA からのサンプルをネガティブコントロールとし、genome DNA のコンタミネーションがないことを確認した。

定量的リアルタイム RT-PCR 解析 リアルタイム RT-PCR では、Assays-on-Demand Gene Expression Products として市販されている TaqMan probe をそれぞれ使用し、TaqMan

Universal Master Mix kit を用いて ABI Prism 7900 sequence detection system にて検出した。**蛋白抽出および Western blot 解析** 蛋白抽出についてはプロテアーゼ阻害剤を添加した氷冷溶解バッファー(50 mmol/L Tris HCl pH 8, 150 mmol/L NaCl, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, and 0.1% SDS)にて細胞および組織を溶解させ、マイクロチューブに回収後、20秒間のソニケーションの後、振盪しながら 4 °C で 30分反応させ、12,000 x g で 20分遠心し、上清を Western blot 解析のため回収した。蛋白濃度は BCA protein assay reagent kit を用いて測定した。各サンプルから 10 µg 等量の蛋白を 25 µL SDS-PAGE sample buffer に溶解し、95 °C, 5分 で加熱処理した。サンプルを 10% SDS-PAGE にて分離したのち、polyvinylidene difluoride 膜にセミドライプロテイング法にて転写した。続いて膜をブロッキング溶液で処理したのち、一次抗体反応、ペルオキシダーゼ結合二次抗体反応の順に進め、化学発光試薬にて検出したものを X線フィルムに撮影した。各レーンでのタンパク量が同一であることを評価するため、stripping を行った後、alpha-tubulin にて再染色を施行した。

M-CSF, oxidized low-density lipoprotein (OxLDL) による CB1 receptor 発現への影響 M-CSF と OxLDL がマクロファージの CB1 受容体発現に及ぼす影響を調べるため、THP-1 細胞を PMA にて 24時間刺激し、接着及び分化を誘導してマクロファージとした。その後、各濃度の M-CSF (0.1, 1.0, 10 ng/ml) で 72時間、もしくは OxLDL (5, 25, 50 µg/ml) で 6日間培養した。CB1 受容体 mRNA の発現を real-time RT-PCR で解析した。**各種サイトカインと Matrix Metalloproteinase (MMP-9) の測定** rimonabant のマクロファージにおける効果を検証するため、4日間培養した THP-1 細胞由来マクロファージを用いて薬理実験を行った。まず 2% FBS を含む RPMI-1640 にメディウム交換したのち、vehicle もしくは rimonabant 0.01, 0.1, 0.5, or 1.0 µmol/L を添加した。24時間後に再び、2% FBS を含む RPMI-1640 にメディウム交換し各濃度の rimonabant を添加した後、lipopolysaccharide (LPS) 20 ng/ml で刺激した。さらに 24時間後に培養メディウムを回収し、400 x g, 1分遠心して上清を回収、-80 °C にストックした。回収したメディウム中の interleukin (IL)-1, IL-6, IL-8, tumor necrosis factor (TNF)- α , MMP-9 and IL-10 の各項目について、ペア抗体を使用した enzyme-linked immunosorbent assay キットにて測定した。**Small interfering RNA (siRNA) を用いた CB1 受容体ノックダウン** THP-1 細胞は RepCell を用いて、これまでのプロトコールと同様に培養を行った。4日間

の培養の後、温度低下により細胞を遊離させた。これらの細胞に CB1 受容体 mRNA を標的とした siRNA を Nucleofector 2 とそのキットを用いたエレクトロポレーションにより導入した。導入後の細胞を再度プレーティングして、24 時間培養したのち、CB1 mRNA のノックダウンを real time PCR 法にて確認した。細胞内 Cyclic Adenosine Mono Phosphate (cAMP) 測定 rimonabant 1.0 μ mol/L もしくは vehicle にて処理した細胞を 0.1 mol/L HCl/1% Triton X-100 溶解液にて 5 分後、15 分後に反応停止させ、回収した溶液を室温、600 x g, 2 分で遠心したのち上清を測定に使用した。これら溶液中の cAMP levels は Correlate-EIA™ Direct cAMP assays キットを用いて測定した。リン酸化 c-Jun N-terminal kinase (JNK) の検出 Rimonabant による CB1 受容体遮断の JNK に対する影響を評価するため、rimonabant による 24 時間の培養後、LPS による刺激から 5、15 分後に細胞溶液を回収してウエスタンブロット法にて検出を行った。定量化は全 JNK に対するリン酸化 c-JNK の比を取って比較を行った。動脈硬化自然発症マウスによる in vivo での効果検証 Rimonabant が生体内において、実際に動脈硬化の発生を抑制するかどうかを検証するため、自然発症 ApoE 欠損マウス (C57BL/6.KOR-Apoe^{sh1}) を Rimonabant 投与群 (n=12) と対照群 (n=12) の 2 群に分け、動脈硬化誘発飼料で 3 ヶ月間飼育を行った。Rimonabant の投与量は、ヒトでの投与量 20mg に相当する量を ApoE マウスにおける平均摂食量 3.5g/day と平均体重 27.5g として FDA の推奨式に従い計算した。マウス大動脈の露出と展開 大動脈弓部三分岐から下大動脈分岐までを周囲脂肪を剥離して大動脈を摘出した。摘出した大動脈は PBS 中で一方向へ連続的に割を入れて展開した。その後、Sudan III にて脂肪染色を行い、大動脈全体の面積に占める動脈硬化領域を計算した。マウス大動脈弁基部における動脈硬化大動脈基部を含む心臓は、4% PFA で固定を行い、OCT コンパウンドで包埋した。切片は大動脈弁の基部、昼間部、遠位部に分けて作成し、Oil Red O による染色後に各々の面積を計算して比較を行った。マウス血清中の脂質とアディポネクチン測定 マウス血清中の脂質に関しては、Skylight Biotch 社に委託し、高速ゲル濾過 HPLC 法にて計測した。また、アディポネクチン値については、マウス/ラットアディポネクチン ELISA キットを用いて測定を行った。統計解析 統計解析は Stat-View-V ソフトウェアを用いて行った。データはすべて平均値 \pm 標準偏差で表記した。2 群間の差については対応のない t 検定もしくは Mann-Whitney U-test にて比較した。3 群以上の比較は一元配置分散分析法により行った。性差、喫煙歴、

高血圧症、脂質代謝異常、糖尿病の頻度は分割表分析により 2 群間比較を行った。P 値 0.05 未満を統計学的有意と判定した。血中カンナビノイドと臨床パラメータの相関は単回帰分析およびステップワイズ重回帰分析により行った。

4. 研究成果

ヒト冠動脈粥腫には CB1 および CB2 受容体が発現しているまず、ヒト冠動脈において動脈硬化の種々の段階における CB1 および CB2 受容体の発現を確認した。進展した動脈硬化病変において、CB1 受容体は CB2 受容体よりも強く発現していた。CB1 受容体陽性細胞の多くは進展した動脈硬化領域に認められ、CD68 陽性細胞領域と一致していた。このことはヒト動脈硬化病変に存在するマクロファージに CB1 受容体が存在することを示している。また血管内皮細胞 (Factor VIII-positive) および血管平滑筋細胞の一部 (smooth muscle α -actin-positive) も同様に弱いながら免疫染色陽性反応を示し CB1 受容体を発現していた。AHA による動脈硬化病変の組織学的分類で、CB1 受容体陽性領域を比較すると lipid-rich atheromatous plaques (type IV or Va) が fibrous plaques (type Vc) よりも強い発現を示した (CB1 receptor positive area to plaque area; atheromatous plaque; $9.5 \pm 1.2\%$ n=5, fibrous plaque $0.6 \pm 0.6\%$ n=5, $P < 0.01$)。diffuse intimal thickening についてもその発現割合は fibrous plaque とほぼ同程度であった。なお、抗体の特異性を確認するため、すでに CB1, 2 受容体発現が報告されている皮膚組織において同一手技で行った染色をポジティブコントロールとした。ネガティブコントロールについては一次抗体にウサギ正常 IgG 抗体を用いた。不安定プラークでより強い CB1 受容体 mRNA の発現が認められるさらに我々はヒト冠動脈粥腫切除標本における CB1 受容体の発現を調べた。粥腫切除標本はすべて責任病変から取られたもので、14 検体のうち 7 検体が sAP 患者から、残りの 7 検体が uAP 患者から取られたものであった。両群において臨床背景リスクファクターについて有意差はなかった。これらの検体を使用して CB1 受容体およびコントロールとして GAPDH の mRNA 発現レベルを real-time RT-PCR 法で測定した。sAP 患者に比較して uAP 患者ではより高い CB1 受容体の mRNA 発現を示した (3.62 ± 2.96 倍 vs. sAP, n=7; $P < 0.05$)。培養ヒトマクロファージにおける CB1 受容体 mRNA および蛋白の発現マクロファージにおける CB1 の発現を確認するため、培養ヒトマクロファージにおける mRNA および蛋白の発現を検証した。その結果、PBMC、PBMC 由来マクロファージおよび THP-1 由来マクロファージに CB1 受容体 mRNA の発現が認

められた。ヒト脂肪組織 (adipose tissue) はポジティブコントロールとして使用した。Western blot 解析ではヒト単核球およびマクロファージで CB1 受容体蛋白の発現が認められ、その発現強度は単核球よりもマクロファージにより強かった。使用した CB1 受容体抗体は 46kDa の蛋白を認識する抗体で、交差反応性を持つラット脳組織をポジティブコントロールとした。**分化誘導による CB1 および CB2 受容体発現への影響**単核球からマクロファージへの分化が CB1 受容体の発現におよぼす影響を調べるため、real-time RT-PCR 法を用いて発現量を調査した。PBMC 由来マクロファージでは CB1 受容体の発現は *in vitro* での培養とともに増加し (3.88 ± 2.95 倍, n=6, P<0.05)、THP-1 由来マクロファージにおいても *in vitro* での培養とともに CB1 受容体の発現が有意に増加した (1.78 ± 0.13 fold, n=6; P<0.01)。同時に確立されたマクロファージ分化マーカーである class A macrophage scavenger receptor (SR-A) の発現は CB1 受容体の発現と有意に相関していた (r=0.93, n=20; P<0.01)。これに対して PBMC および THP-1 由来マクロファージにおける CB2 受容体の発現は *in vitro* での培養とともに有意に減少した (PBMC-derived macrophages: 0.22 ± 0.04 倍 n=6; THP-1 cell-derived macrophages: 0.23 ± 0.23 倍, n=6; P<0.01)**M-CSF と OxLDL は CB1 発現を増強する**動脈硬化病変にその存在が確認され刺激因子となっている物質のひとつである M-CSF と OxLDL がマクロファージの CB1 受容体発現に及ぼす影響を調べた。THP-1 細胞を PMA にて 24 時間刺激し、接着及び分化を誘導してマクロファージとした。その後、各濃度の M-CSF (0.1, 1.0, 10 ng/ml) で 72 時間、もしくは OxLDL (5, 25, 50 μg/ml) で 6 日間培養した。CB1 受容体 mRNA の発現を real-time RT-PCR で解析した。その結果、M-CSF と OxLDL は分化したマクロファージにおいて濃度依存性に CB1 受容体の発現を有意に増強した (n=6)**冠動脈疾患患者における内因性カンナビノイド血中濃度**血中の内因性カンナビノイド濃度は冠動脈疾患のない患者と比較して冠動脈疾患のある患者において有意に高値であった (AEA: 1.048 [0.687 to 1.387] vs. 0.537 [0.468 to 0.857] pmol/mL; P<0.01, 2-AG: 13.30 [6.65 to 16.21] vs. 7.67 [6.39 to 10.03] pmol/mL; P<0.05)。冠動脈疾患のある患者では冠動脈疾患のない患者に比べて hsCRP が有意に高値であった。AEA は BMI, triglycerides, hsCRP および glycosylated hemoglobin A1c (HbA1c)、2-AG は hsCRP, HbA1c および fasting glucose と有意な相関を認めた。ヒト培養マクロファージにおいて **CB1 受容体遮断は炎症性サイトカインおよび MMP-9 産生を減少させるが、IL-10 産生は影**

響を受けないリモナバントによる CB1 受容体遮断は、ヒト培養マクロファージにおいて LPS 刺激に対する各種炎症性サイトカインおよび MMP-9 産生を濃度依存性に有意に抑制した。これに対して、IL-10 の産生は減少せず、有意差はないものの増加傾向であった (IL-10 産生変化率: rimonabant 0.5 μmol/L; +2.6 ± 35.3%, no significance [NS], 1.0 μmol/L; +8.5 ± 15.6%, NS, n=4)**CB1 受容体遮断による抗炎症効果は CB1 受容体依存性である**リモナバント以外の CB1 受容体遮断薬 (AM251 1.0 μmol/L and AM281 1.0 μmol/L) を使用した場合でも、リモナバントと同様の効果が認められた (rimonabant; -23.8 ± 7.3%, AM251; -29.0 ± 5.0%, AM281; -23.3 ± 6.8%, n=6; P<0.01)。また、RNA 干渉法により CB1 受容体をノックダウンしたマクロファージでは対照と比較して、リモナバントによる IL-6 産生抑制効果が有意に減少した (CB1 receptor RNAi; -4.7 ± 0.7% vs. negative control RNAi; -25.8 ± 4.5%; n=4, P<0.05,)**CB1 受容体遮断はヒト培養マクロファージにおいて cAMP 濃度を上昇させる** rimonabant 1.0 μmol/L 添加 5 分後および 15 分後の細胞内 cAMP 濃度は control と比較して有意に上昇していた (5 分後の変化率: +29.9 ± 13.0%, P<0.01, 15 分後: +20.2 ± 11.0%, P<0.01, n=4)。なお、臨床的に用いられる rimonabant のヒト最大血中濃度は、0.4-0.5 μmol/L と計算され、今回の実験系で用いた濃度は臨床用量に近い。**CB1 受容体遮断は JNK リン酸化を抑制する**ウエスタンブロット解析から、Rimonabant 1.0 μmol/L で 24 時間処理したのち、メディウム交換と共に LPS10ng/mL 刺激を加えてから 15 分後の JNK リン酸化が有意に抑制され、CB1 受容体遮断は炎症系カスケードの伝達機構のひとつである MAP キナーゼ: JNK の抑制を介していることが示唆された (-19.1 ± 12.6%, P<0.05)**ApoE 欠損マウスでの Rimonabant による体重および血清パラメータの変化**Rimonabant 投与は ApoE 欠損マウスにおいて有意な体重減少をもたらさなかった。肥満でないマウスでは体重減少効果がないことが既に報告されており、この結果と合致する。血清脂質については、HDL を含めて全体に Rimonabant 投与群で増加傾向を示していたが、いずれも有意差は認められなかった。これに対して、血清アディポネクチン値は Rimonabant 群で有意な上昇が認められた。**Rimonabant はマウス大動脈の動脈硬化病変を減少させた**SudanIV 染色した展開マウス大動脈の総面積に占める動脈硬化病変の面積を比較したところ、Rimonabant 投与群では、Control 群と比較して動脈硬化病変の発生が有意に減少した (Rimonabant; 12.6 ± 4.0%, Control; 9.7 ± 2.3%, P<0.05)

まとめ：ヒト冠動脈粥腫、特に病変部のマクロファージにおいて CB1 受容体が発現していることを確認した。さらに抗肥満薬である CB1 受容体特異的アンタゴニスト、Rimonabant がヒト培養マクロファージにおいて抗炎症効果を持つことを示した。CB1 受容体遮断は、動脈硬化病変で ECS の調節を介してマクロファージの炎症活性を制御し、抗動脈硬化作用を示す可能性がある。Rimonabant による肥満治療は心血管危険因子の改善のみでなく、動脈硬化病変においても直接的に有益な作用をもたらすかもしれない。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

Sugamura K, Sugiyama S, Nozaki T, Matsuzawa Y, Izumiya Y, Miyata K, Nakayama M, Kaikita K, Obata T, Takeya M, Ogawa H. Activated endocannabinoid system in coronary artery disease and anti-inflammatory effects of cannabinoid 1 receptor blockade on macrophages. Circulation. 査読有り 2009;119:28-36.

Sugamura K, Sugiyama S, Matsuzawa Y, Nozaki T, Horibata Y, Ogawa H. Benefit of adding pioglitazone to successful statin therapy in nondiabetic patients with coronary artery disease. Circ J. 査読有り 2008;72:1193-7.

[学会発表](計2件)

野崎 俊光、杉山 正悟ほか Usefulness of Endothelial Microparticles as a Quantitative Marker of Endothelial Dysfunction for Cardiovascular Disease 第73回日本循環器学会 2009.3.20.大阪

松澤 泰志、杉山 正悟ほか Abdominal Obesity is a Therapeutic Target to Improve Endothelial Dysfunction in Patients with Metabolic Syndrome 第73回日本循環器学会 2009.3.22.大阪

6 . 研究組織

(1)研究代表者

杉山 正悟 (SUGIYAMA SEIGO)

熊本大学・大学院医学薬学研究部・准教授
研究者番号：90274711

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし