

原著

ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 α (PPAR α) の培養内皮細胞における $\text{Cu}^{2+}\text{Zn}^{2+}$ -SOD, Mn^{2+} -SOD, NADPHオキシダーゼへの作用

後藤 誠一, 井上 郁夫, 林 健二

The Effects of Ligands / Activators of the Peroxisome Proliferated-Activated Receptor (PPAR) on the Expression of the Superoxide Scavenger Enzyme, Cu^{2+} , Zn^{2+} -Superoxide Dismutase (CuZn-SOD), Mn^{2+} -Superoxide Dismutase (Mn-SOD), and the Superoxide Generating Enzyme Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (NADPH) Oxidase in Primary Cultures of Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC)

Seiichi Gotoh, Ikuo Inoue, Kenji Hayashi (Fourth Department of Medicine, Saitama Medical School, Moroyama, Iruma-gun, Saitama 350-0495, Japan)

We examined the effects of ligands / activators of the peroxisome proliferated-activated receptor (PPAR) on the expression of the superoxide scavenger enzyme, Cu^{2+} , Zn^{2+} -superoxide dismutase (CuZn-SOD), Mn^{2+} -superoxide dismutase (Mn-SOD), and the superoxide generating enzyme nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase in primary cultures of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). Bezafibrate, which is a ligand / activator for PPAR α , increased the CuZn-SOD, Mn-SOD, and catalase gene and protein expression levels in endothelial cells. In addition, the levels of mRNA and protein for phorbol myristate acetate (PMA)-stimulated 22-kDa α -subunit (p22phox), 47-kDa α -subunit (p47phox) and 67-kDa α -subunit in NADPH oxidase were decreased by treatment with PPAR α ligands / activators. These results suggest that PPAR α gene and protein expression in endothelial cells may play a physiological role as not only lipid metabolism but also active oxygen turnover and / or their elimination system, although the details of these mechanisms is now in progress.

Keywords: PPAR, CuZn-SOD, Mn-SOD, NADPH, PMA, p22phox, p47phox*J Saitama Med School 2002;29:27-34*

(Received November 29, 2001)

緒言

ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 (PPAR) は、ステロイドホルモン受容体ファミリーに属し、糖・脂質代謝に関与する種々の標的遺伝子を調節している転写因子である¹⁾。げっ歯類、ヒトおよび両生類では3種類のPPAR, すなわちPPAR α , Nuc1 (PPAR β またはPPAR δ), およびPPAR γ が報告されている。PPAR α は、肝臓、網膜、消化管粘膜、腎臓の遠位尿細管、心臓、筋肉および褐色脂肪組織に発現することが報告されている²⁾。また、PPAR β / δ / Nuc1は、普遍的に発現し³⁾、PPAR β は両生類で、PPAR δ

はマウスで、Nuc1は哺乳類で、それぞれ同定されている。一方、PPAR γ は脂肪組織で選択的に発現している転写因子で、脂肪細胞の分化と関連しているとの報告がある⁴⁾。

PPARは種々の脂肪酸によって特異的に活性化されるが、PPAR α は、エイコサペンタエン酸 (EPA) のような多価不飽和脂肪酸 (PUFA) および多くの高脂血症治療薬であるフィブラート系薬ベザフィブラート⁵⁾、クロフィブラート、フェノフィブラート⁶⁾などにより活性化されることが報告されている。PPAR γ は、15-デオキシ- δ 12, δ 14-プロスタグランジンJ2 (PGJ2)⁷⁻⁸⁾、ならびにトログリタゾン⁹⁾ およびピオグリタゾン¹⁰⁾ のような種々の血糖降下薬であるチアゾリジン系薬により活性化される。しかし、PPAR β / δ / Nuc1選択的

リガンドは、これまでに確認されていない。

最近, PPAR α はロイコトリエンB4/アラキドン酸により生じた炎症の持続期間に影響を及ぼすことが報告され¹¹⁾, さらに, PPAR γ は, 炎症反応と深く関与している腹腔マクロファージで強力に発現していることが報告されている¹²⁾. これらの所見より, PPAR α および PPAR γ は, 動脈硬化および炎症性病変の病態生理学的変化になんらかの役割を果たしていることが示唆されている。

動脈硬化および炎症は, 内皮細胞, 血管平滑筋細胞, 単球, 好中球, リンパ球および血小板など種々の細胞が関与している. これらの細胞の中で, 内皮細胞が血小板機能, 凝固および血管の緊張に重要で, かつ中心的な役割を果たしており, 炎症反応の初期病変として最近注目されてきている. 興味深いことに, 血管内皮の機能障害は動脈硬化の初期段階で生じており, 特に高脂血症, 高血圧, 糖尿病, 喫煙などの動脈硬化の危険因子がある場合に認めれ, それらが集積するとさらに著しく血管内皮の機能が低下すると言われている. 最近, 我々は PPAR α が血管内皮細胞に発現し, デキサメタゾンおよびインスリンのようなホルモンにより制御されていることを報告した¹³⁾. さらに, PPAR α が肝臓での CuZn-SOD の発現と関連していることも明らかにした¹⁴⁾. そこで, 今回我々は, PPAR α による血管内皮細胞の CuZn-SOD, Mn-SOD, カタラーゼ, NADPH オキシダーゼの制御・調節が, PPAR α の発現を変動させることにより, 血管内皮細胞の酸化ストレスをどのように変化させるかを検討した。

材料と方法

細胞の処理

ヒト培養臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) (lot#31091) は, Cell Systems (Kirkland, Wash, USA) より購入した. これらの細胞が全て内皮細胞であることを確認するため, 間接免疫蛍光顕微鏡検査により内皮細胞を第VIII因子関連抗原でチェックした. HUVEC は, 10% ウシ胎児血清 (FBS), HEPES (15 mM), 酸性線維芽細胞成長因子 (FGF) およびヘパリンを加えた培地 (CS-4ZO-500 (大日本製薬)) にて培養した. 培地は週2回交換し, HUVEC は3週間以内に, 2~3回継代した時点で使用した. 組織試料は直ちに液体窒素中で凍結し, 全RNAを抽出するまで-80°Cで保管した.

ベザフィブラートナトリウム (ベザフィブラート) はキッセイ薬品工業株式会社より提供された. ベザフィブラートは, 最終濃度 0.5 μ M, 1 μ M, 2 μ M, 10 μ M または 30 μ M で用い, 培養細胞は上記薬剤と6時間, 12時間および24時間インキュベートした.

逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR)

PPAR α , PPAR β / δ /Nuc1 および PPAR γ の発現レベルを検討するために逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) を実施し, 定量的 RT-PCR によりいくつかの実験を実施した. 市販のキット (Isogen, Nippon Gene Co. Ltd., Toyama, Japan) を用いて, HUVEC (10⁷ 細胞) から分離した全RNAを, オリゴ (dT) プライマーおよび市販のキット (GeneAmp RNA PCR Kit, Perkin Elmer, NJ, USA) を用いて DNA 合成のテンプレートとして用いた. 逆転写反応は, 42°C で15分間 cDNA の合成を最大にした後, 99°C で5分間加熱して終了させて実施した. 得られた cDNA を PCR のテンプレートとして用いた.

PPAR α RT-PCR 用のオリゴヌクレオチドプライマーは, cDNA 配列を増幅するためにデザインし, 合成オリゴヌクレオチドプライマーは, Nippon Flour Mills (kanagawa, Japan) より入手した. PPAR α に使用したプライマーは, 正のプライマーが 5'-AGA AACTTCAACA-TGAACAAGGTCA-3', 逆のプライマーは 5'-GCCAGGAC-GATCTCCACAGCAAAT-3'. PPAR β / δ /Nuc1 に用いたプライマーは, 正のプライマーが 5'-AGCAGCCTCT-TCCTCAACGACCAG-3', 逆のプライマーは 5'-GGTC-TCGGTTTCGGTCTTCTTGAT-3'. PPAR γ に用いたプライマーは, 正のプライマーが 5'-CCCTCATGGCAATT-GAATGTCGTG-3', 逆のプライマーは 5'-TCGCAGGCT-CTTAGAACTCCCT-3'. CuZn-SOD に用いたプライマーは, 正のプライマーが 5'-GGCGTCATTCCTTC-GAGCAGAAG-3', 逆のプライマーは 5'-GGCAATCCCA-ATCACACCACAAGC-3'. NADPH オキシダーゼの 22-kd α -サブユニット (P22phox) に使用したプライマーは, 正のプライマーが 5'-GGTTGTGTGCCTGCTGGAGT-3', 逆のプライマーは 5'-TGGGCGGCTGCTTGATGGT-3'. 47-kd-サブユニット (p47phox) に使用したプライマーは, 正のプライマーが 5'-ACCCAGCCAGCACTATGT-GT-3', 逆のプライマーは 5'-AGTAGCCTGTGACGTGCTCT-3'. 67-kd-サブユニット (p67phox) に使用したプライマーは, 正のプライマーが 5'-CGAGGGAACCAGCT-GATAGA-3', 逆のプライマーは 5'-CATGGGAACACTG-AGCTTCA-3'. グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) mRNA の発現を内部標準として測定した.

PCR 反応は, 変性温度は (94°C で30秒間) および伸張温度は (72°C で90秒間) で, アニール温度は (50°C で50秒間) で, 増幅サイクル数は33サイクルで, それぞれ実施した. PCR 産物は7.5% ポリアクリルアミドゲル (NPU-7.5タイプ, Atto, Tokyo, Japan) で分離・泳動し, 泳動後DNAを10 μ g/mlの濃度で臭化エチジ

ウムにて染色した。mRNAのレベルと一致するバンドの強度は、紫外線 (UV) ボックス画像システムを用いて評価した (Atto)。

DNAシーケンシング

自動塩基配列決定装置 (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer, Perkin Elmer, Foster City, CA, USA) を用いて RT-PCR産物の直接塩基配列決定を行い、全てのDNA塩基配列は両側からのDNA鎖を読むことにより確認した。

PPARs, CuZn-SOD, Mn-SOD, カタラーゼおよびp47phox, p67phox, p22-phoxのウエスタンブロッティング

それぞれの蛋白発現を評価するため、ウエスタンブロッティングを実施した。2次抗体はAmersham ECLキットを用いて検出した。処理済試料を10%ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE) に適用し、ニトロセルロース膜 (Millipore) に半乾燥ブロッティングを用いて転写し、さらに、膜をTBS-Tween/5%スキムミルクで一夜処理し、ヤギ-抗ヒトPPARs, CuZn-SOD, Mn-SOD, カタラーゼおよびp47phox, p67phox抗体とともに1時間インキュベートした。ヒトPPARs, CuZn-SOD, Mn-SOD, カタラーゼおよびp47phoxに対する抗体は、それぞれ Santa Cruz, Binding Site, Transduction Laboratoriesより得られ、p22phoxの抗体は大阪大学生化学、谷口直之先生より提供していただいた。洗浄後、膜を2次抗体とともにインキュベートし、検出は化学発光検出システムを用いて実施した。

ヒト全長PPAR α およびRXR α のクローニング

ヒト全長PPAR α およびRXR α の開始コドンと終始コドンを含んで、ヒト全長PPAR α およびRXR α が得られるようにプライマーを設定し、ヒト肝臓細胞のライブラリーより精製した。さらに、PCR産物を制限酵素NotI/SalIによりpCI-neo 哺乳類発現ベクター (Promega, WI, USA) に挿入し、形質変換させた大腸菌に導入した。アンピシリン耐性コロニーを培養し、得られたpCI-neo 哺乳類発現ベクターを上記のシーケンサーにて塩基配列を確認し、ヒト全長PPAR α およびRXR α を得て、それぞれ pCI-neo-PPAR α , pCI-neo-RXR α とした。

ベザフィブラートのPPAR α の転写活性

PPAR α の促進剤であるベザフィブレートが、実際、PPAR α の転写活性を増加させるかを検討した。転写因子であるPPAR α が結合する領域 (direct repeat 1: AGGTCA (1) AGGTCA) を含む、細胞内レチノール結合蛋白IIのプロモーターをラット全血より調整したゲノムDNAより精製し、ルシフェラーゼ遺伝子の上流のKpn I/Nco I (pGL3-Basic) (Promega, WI, USA) に挿

入し、pCRBPII-Lucとし、TfxTM-50 Reagent (Promega, WI, USA) を用い、マニュアルに従いpCI-neo-PPAR α とpCRBPII-Lucをヒト腎由来293 T細胞にトランスフェクトした。転写活性はRenillaルシフェラーゼベクター (pRL-TK) (Promega, WI, USA) で補正し、ベザフィブラートを添加していない転写活性をコントロールとして表した。

PPAR α 過剰発現によるCuZn-SOD, Mn-SOD, カタラーゼおよびp47phoxの発現への作用

血管内皮細胞でのPPAR α の作用をさらに確認するため、血管内皮細胞にpCI-neo-PPAR α を遺伝子導入した。3 μ gのPPAR α をTfxTM-50Reagent (Promega, WI, USA) を使用し、1 \times 10⁶ 個のHUVEC/100-mm dishにマニュアルにしたがってトランスフェクトした。トランスフェクト24時間後、培養液中にベザフィブラートを添加し、さらに24時間反応させた。遺伝子導入後、PPAR α の蛋白発現をウエスタンブロッティングにて評価し、PPAR α が過剰発現された血管内皮細胞において、上記した酸化ストレスに関連する酵素の蛋白発現レベルを評価した。

統計解析

パラメトリックなデータは、平均値 \pm SDで表した。群間差はSchefféのF検定により評価した。

結果

10% FBSで処理をしたHUVECにおけるRT-PCRによるPPAR α の発現をPPAR β / δ /Nuc1およびPPAR γ 遺伝子mRNAの発現と比較した。PPAR α の遺伝子発現は、PPAR β / δ /Nuc1の1/2で、PPAR γ のそれと比較して2倍強かった (Fig. 1-AおよびB)。

ベザフィブレートによって、FBSを含む培地でのHUVECのPPAR α のmRNA発現がcontrolに比較して有意に増加した (Fig. 2)。また、ベザフィブレートによって、FBSを含まない培地でのHUVECのPPAR α の蛋白発現が、12時間で最大であったが、FBSを含む培地では、12から24時間処理した場合が最大であった (Fig. 3)。さらに、ベザフィブレートによるPPAR α の蛋白質レベルの濃度依存性を検討したところ、12時間後、FBSの有無に関わらず、2 μ Mで最大の発現量を示した (Fig. 4)。さらに、ベザフィブレートによるPPAR α /RXR α の転写活性を検討したところ、濃度依存的にその転写活性も増加した (Fig. 5)。

PPAR α の蛋白発現および転写活性を増加させるベザフィブレートは、HUVECにおいて、活性酸素の消去系酵素であるCuZn-SODのmRNA (Fig. 6-AおよびB) および蛋白 (Fig. 6-C) 発現を増加させた。

活性酸素の産生系酵素である酢酸ミリスチン酸

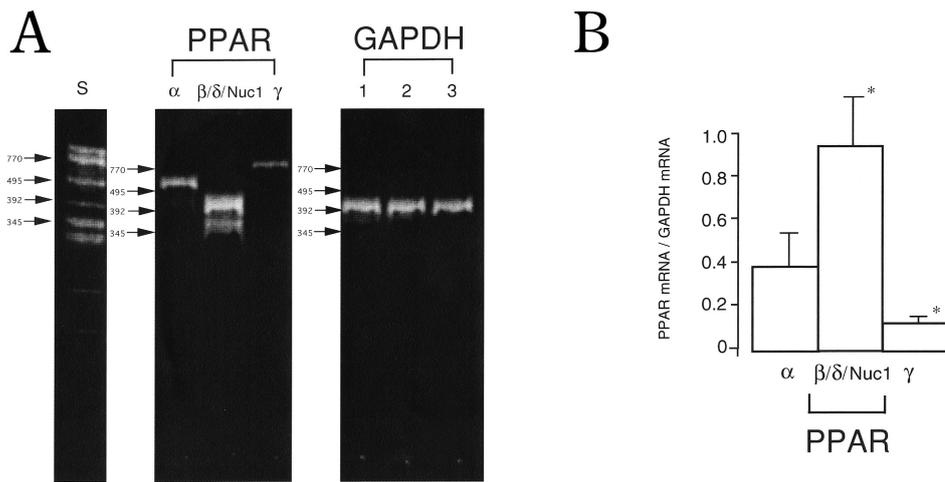


Fig. 1. The appearance of PPAR α , PPAR $\beta / \delta / \text{Nuc}1$, PPAR γ with 10% FBS by RT-PCR in HUVEC. Gene appearance of PPAR α was 1/2 of those of PPAR $\beta / \delta / \text{Nuc}1$, and was 2 times of those of PPAR γ . Data indicate the mean \pm SD, * $p < 0.05$ vs PPAR α .

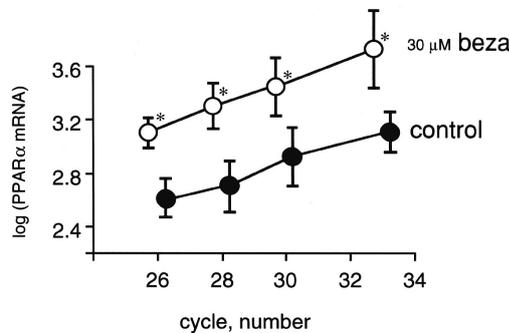


Fig. 2. Change of PPAR α mRNA of HUVEC by bezafibrate. Bezafibrate significantly increased the PPAR α gene expression. Data indicate the mean \pm SD, * $p < 0.05$ vs control.

Dose-dependent effect (protein: 30 μg)
incubation for 12h by bezafibrate

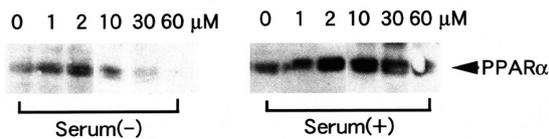


Fig. 4. Dose-dependent effect of bezafibrate on protein appearance of PPAR α in HUVEC. The change of PPAR α protein levels by bezafibrate was maximum at 2 μM .

Time-dependent effect (protein: 30 μg)
incubation by 1 μM bezafibrate

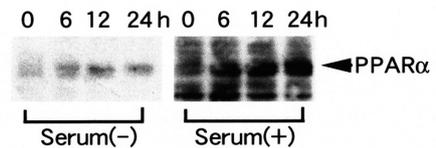


Fig. 3. Time-dependent effect of bezafibrate on protein appearance of PPAR α in HUVEC. The change of PPAR α protein levels by bezafibrate was maximum in 12hours.

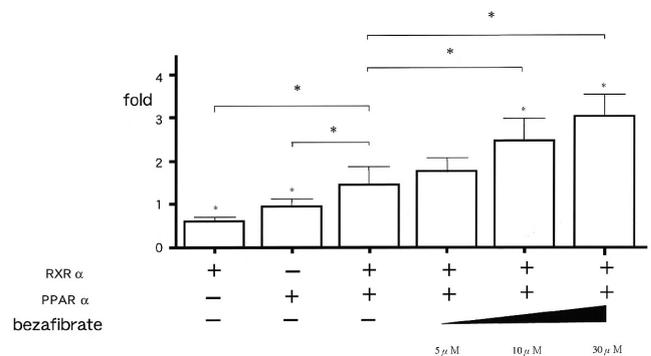


Fig. 5. Transcription activity of PPAR $\alpha / \text{RXR} \alpha$ by bezafibrate. The transcription activity of PPAR $\alpha / \text{RXR} \alpha$ was significantly increased by bezafibrate. Data indicate the mean \pm SD, * $p < 0.05$.

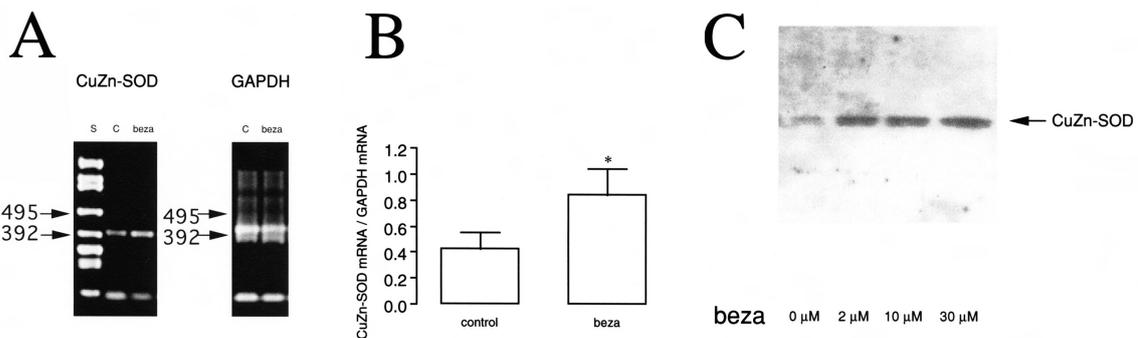


Fig. 6. The effect of bezafibrate on CuZn-SOD mRNA and protein levels. Bezafibrate significantly increased the CuZn-SOD mRNA and protein levels in HUVEC. Data indicate the mean \pm SD, * $p < 0.05$ vs control.

ホルボール (PMA) を添加したところ, NADPH オキシダーゼの 22-kDa α -サブユニット (p22phox), 47-kDa α -サブユニット (p47phox), 67-kDa α -サブユニット (p67phox) の遺伝子発現は増加したが, ベザフィブラートを併用するとその発現量は PMA 添加に比較して低下した (Fig. 7).

さらに, PPAR α を過剰発現させた HUVEC では, ベザフィブラート存在下で PPAR α の蛋白量は増加するが, 同時に CuZn-SOD, Mn-SOD の蛋白質レベルが有意に増加し, p22phox 蛋白質レベルは著しく低下した (Fig. 8).

考案

今回の我々の成績により, 血管内皮細胞で PPAR α の他に, PPAR β / δ / Nuc1 および PPAR γ も発現することが示唆され (Fig. 1), PPAR α のリガンド/促進因子であるベザフィブラート (Fig. 2 および 3) によって, 血管内皮細胞の CuZn-SOD および Mn-SOD の発現が誘導され, NADPH オキシダーゼの発現が低下する

ことが明らかとなった (Fig. 4, 6 および 8).

過剰な活性酸素は, 炎症および虚血状態など, 病的状態に関連する多くの組織傷害のメディエーターとして重要な役割を果たしている. 活性酸素は, CuZn-SOD および Mn-SOD などの消去系酵素と, NADPH オキシダーゼなどの消去系酵素のバランスによって調節されている.

内皮細胞自身, O₂⁻ および H₂O₂ を放出し, 過剰な活性酸素は, 内皮細胞で発現する CuZn-SOD, Mn-SOD, カタラーゼにより代謝され, 結果的に H₂O および O₂ になる. なかでも, CuZn-SOD, Mn-SOD は選択的に活性酸素を捕捉することが知られている. 外因性 CuZn-SOD を投与することは用量依存的に組織に対し有毒であることが報告されているが¹⁵⁾, Wang ら¹⁶⁾ は, 最近, 内因性 CuZn-SOD の過剰な発現によって, 虚血組織の傷害が防止されたことを報告している. さらに, Wang らは, ヒト CuZn-SOD を過剰に発現させたトランスジェニックマウスの内皮細胞で, CuZn-SOD の発現が増加したと述べている. さらに, Fang ら¹⁷⁾ も, 内

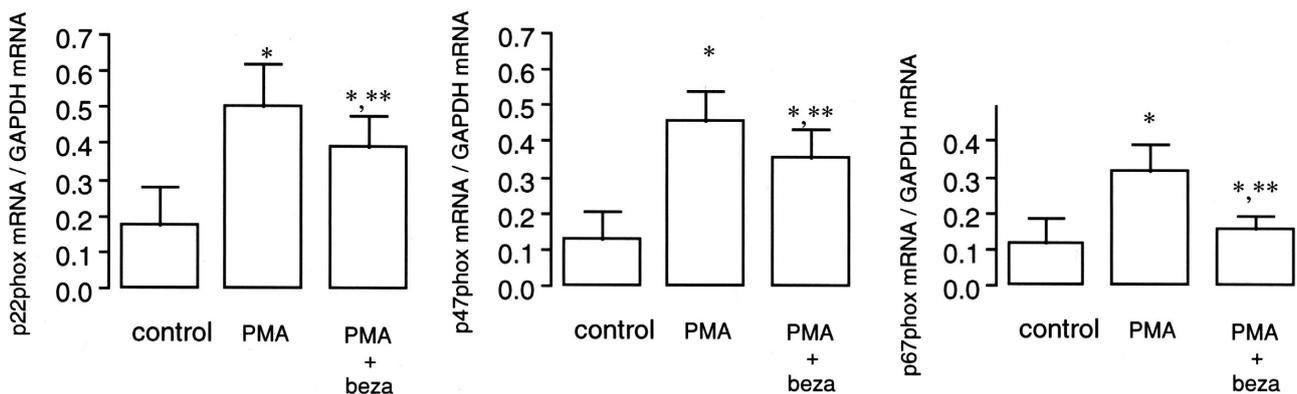


Fig. 7. The effect of bezafibrate on p22phox, p47phox, p67phox mRNA levels. Bezafibrate significantly attenuated the mRNA levels, which were induced by PMA. Data indicate the mean \pm SD, * p < 0.05 vs control, ** p < 0.05 vs PMA.

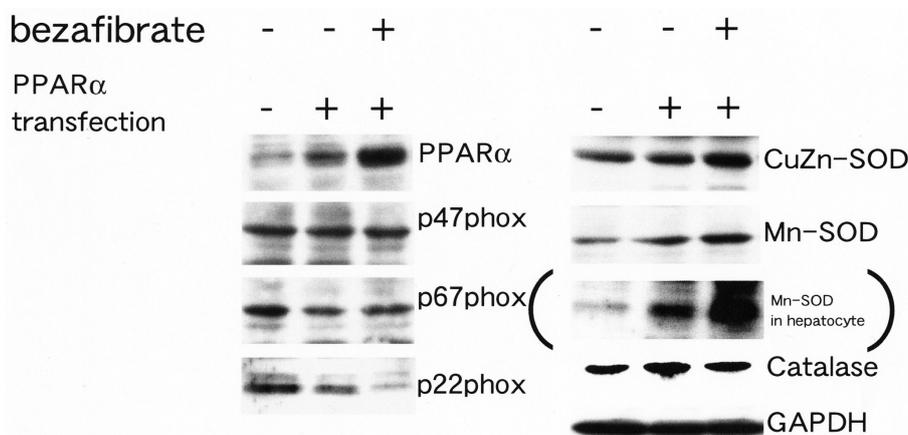


Fig. 8. The effect of bezafibrate on CuZn-SOD, Mn-SOD, catalase, p22phox, p47phox, p67phox protein levels. Bezafibrate markedly decreased the p22phox and increased the CuZn-SOD, Mn-SOD, catalase protein levels in PPAR α -transfected HUVEC.

因性CuZn-SODの過剰発現によって、内皮細胞による酸化された低密度リポ蛋白質の上昇が阻害されることを報告した。以上の結果は、内因性CuZn-SOD活性を上昇させることで、アテローム硬化性変化を防止することができることを示している。

さらに、CuZn-SODおよびMn-SODは、活性酸素を捕捉することで、一酸化窒素(NO)の生物学的半減期を延長することも報告されている¹⁸⁻¹⁹⁾。Davdaら²⁰⁾は、PPAR α の誘導の影響が少ないオレイン酸が、*in vivo*で内皮型一酸化窒素シンターゼ(NOS)の活性上昇を認めないことを報告しているし、Okudaら²¹⁾は、PPAR α を誘導するEPAはHUVECからのNOの産生を増大させることも報告している。以上、NOの産生の増加は、PPAR α 活性化によるCuZn-SODおよびMn-SODの誘導に関連している可能性がある。しかしながら、preliminary dataではあるが、我々はPPAR α を活性化するフィブラート系薬で処理することにより、内皮細胞のニトロチロシン含有量が低下することも明らかにしている。ニトロチロシンの生成は、傷害された組織で生じるペルオキシ亜硝酸に起因すると思われる、過剰なNOがスーパーオキドと相互作用してペルオキシ亜硝酸を生じることによる。以上の結果よりフィブラート系薬は、内皮型NOSを高め、さらに、過剰に産生されたNOを抑制させる作用を有していることも示唆している。フィブラート系薬が、誘導型NOSをも抑制している可能性も考えられる。

最近、我々は、PPAR α のリガンド/促進因子であるベザフィブラートが、*in vivo*における肝CuZn-SOD遺伝子の発現と肝PPAR α mRNAレベルとが有意に正の相関を示すことを報告したが¹⁴⁾、今回の我々の結果から、内皮細胞においても、活性酸素を捕捉するCuZn-SODに加えて、Mn-SOD遺伝子の発現も、PPARによって制御されていることが明らかとなった。Kimら²³⁾は、すでにCuZn-SOD遺伝子の1.5-kb上流領域のクローンを作成し、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体の反応領域(PPRE)が、CuZn-SOD遺伝子上流の-797領域にあることを明らかにしている。したがって、PPAR α リガンド/促進因子は、CuZn-SOD遺伝子の転写を、PPREに結合することによって活性化させる可能性が考えられる。実際、PPAR α のリガンド/促進因子を培地に加えることにより、内皮細胞のCuZn-SOD遺伝子の発現は増加し、その蛋白発現も増加した(Fig. 6)。今回我々の成績は、CuZn-SOD遺伝子のみならず、Mn-SOD遺伝子の発現も、PPAR α によって制御されている可能性を示唆しており、今後、Mn-SOD遺伝子の上流領域の解析も必要と思われる。

活性酸素は消去系酵素とともに産生系酵素によっ

ても調節を受けていて、最近になり血管内皮細胞および血管平滑筋細胞での活性酸素の産生系酵素としてNADPH oxidaseが注目されている。NADPH oxidaseは、そのサブユニットである細胞質型のp47phoxとp67phoxが、膜結合型糖蛋白のgp91phoxとp22phoxに結合することによって活性酸素を産生する²⁴⁾。血管内皮細胞および血管平滑筋細胞でのNADPH oxidaseの詳細な働きは明らかではないが、我々の検討では、PMAで刺激された状態において、ベザフィブラートの投与により、血管内皮細胞のp22phox、p47phox、p67phoxのmRNAレベルは有意に低下するとの結果が得られている。また、動脈硬化の強い血管での血管内皮細胞および血管平滑筋細胞のp22phoxの発現は増強しているとの報告もある²⁵⁾。フィブラート系薬の抗動脈硬化作用の一部は、スタチン系薬の抗動脈硬化作用の如く²⁶⁾、血管内皮細胞および血管平滑筋細胞での過剰なNADPH oxidaseの活性の鎮静化作用による可能性もある。しかしながら、血管壁でのPPARとNADPH oxidaseとの関わりについては、まだ詳細には検討されてはいない。今後、NADPH oxidaseのサブユニットであるp22phoxをはじめとして、その他のサブユニットであるp47phox、p67phox、gp91phoxの調節機構の解明が必要となる。

結 論

PPAR α のリガンド/促進因子であるベザフィブラートは、PPAR α の過剰発現したHUVECでCuZn-SOD、Mn-SODの蛋白発現を増加させ、p22phox、p47phoxの蛋白発現は低下させた。以上より、血管内皮細胞におけるPPAR α は、活性酸素産生・消去系に関与する酵素に作用し、動脈硬化抑制作用を有していることが示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導御高閣を賜りました埼玉医科大学第四内科学教室片山茂裕主任教授に深謝いたします。また、本研究に御協力を頂きました佐藤さわ子実験助手ならびに渡辺こずえ実験助手に感謝いたします。

文 献

- 1) Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 1990;347:645-50.
- 2) Lemberger T, Braissant O, Juge-Aubry C, Keller H, Saladin R, Staels B, et al. PPAR tissue distribution

- and interactions with other hormone-signaling pathways. *Ann NY Acad Sci* 1996;804:231-51.
- 3) Schoonjans K, Staels B, Auwerx J. The peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. *Biochim Biophys Acta* 1996;1302:93-109.
 - 4) Tontonoz P, Hu E, Graves RA, Budavari AI, Spiegelman BM. mPPAR γ 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev* 1994;8:1224-34.
 - 5) Inoue I, Noji S, Shen M-Z, Takahashi K, katayama S. The peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) regulates the plasma thiobarbituric acid-reactive substance (TBARS) level. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;237:606-10.
 - 6) Gebel T, Arand M, Oesch F. Induction of the peroxisome proliferator activated receptor by fenofibrate in rat liver. *FEBS Lett* 1992;309:37-40.
 - 7) Forman BM, Tontonoz P, Chen J, Brun RP, Spiegeiman BM, Evans RM. 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J₂ is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR γ . *Cell* 1995;83:803-12.
 - 8) Kliewer SA, Lenhard JM, Willson TM, Patel I, Morris DC, Lehmann JM. A prostaglandin J₂ metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor γ and promotes adipocyte differentiation. *Cell* 1995;83:813-9.
 - 9) Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SA. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ). *J Biol Chem* 1995;270:12953-6.
 - 10) Hu E, Kim JB, Sarraf P, Spiegeiman BM. Inhibition of adipogenesis through MAP kinase-mediated phosphorylation of PPAR γ . *Science* 1996;274:2100-3.
 - 11) Devchand PR, Keller H, Peters JM, Vazquez M, Gonzalez FJ, Wahli W. The PPAR α -leukotriene B₄ pathway to inflammation control. *Nature* 1996;384:39-43.
 - 12) Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK. The peroxisome proliferator-activated receptor- γ is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 1998;391:79-82.
 - 13) Inoue I, Shino K, Noji S, Awata T, Katayama S. Expression of peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) in primary cultures of human vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;246:370-4.
 - 14) Inoue I, Noji S, Awata T, Takahashi K, Nakajima T, Sonoda M, et al. Bezafibrate has an antioxidant effect: peroxisome proliferator-activated receptor α is associated with Cu²⁺, Zn²⁺-superoxide dismutase in the liver. *Life Science* 1998;63:135-44.
 - 15) Omar BA, Gad NM, Jordan MC, Striplin SP, Russell WJ, Downey JM, et al. Cardioprotection by Cu,Zn-superoxide dismutase is lost at high doses in the reoxygenated heart. *Free Radical Biol Med* 1990;9:465-71.
 - 16) Wang P, Chen H, Qin H, Sankarapandi S, Becher MW, Wong PC, et al. Overexpression of human copper, zinc-superoxide dismutase (SOD1) prevents postischemic injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:4556-60.
 - 17) Fang X, Weintraub NL, Rios CD, Chappell DA, Zwacka RM, Engelhardt JF, et al. Overexpression of human superoxide dismutase inhibits oxidation of low-density lipoprotein by endothelial cells. *Circ Res* 1998;82:1289-97.
 - 18) Rubanyi GM, Vanhoutte PM. Oxygen-derived free radicals, endothelium, and responsiveness of vascular smooth muscle. *Am J Physiol* 1986;250:H815-21.
 - 19) Gryglewski RJ, Palmer RM, Moncada S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature* 1986;320:454-6.
 - 20) Davda RK, Stepniakowski KT, Lu G, Ullian ME, Goodfriend TL, Egan BM. Oleic acid inhibits endothelial nitric oxide synthase by a protein kinase C-independent mechanism. *Hypertension* 1995;26:764-70.
 - 21) Okuda Y, Kawashima K, Sawada T, Tsurumaru K, Asano M, Suzuki S, et al. Eicosapentaenoic acid enhances nitric oxide production by cultured human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;232:487-91.
 - 22) Beckman JS, Ye YZ, Anderson PG, Chen J, Accavitti MA, Tarpey MM, et al. Extensive nitration of protein tyrosines in human atherosclerosis detected by immunohistochemistry. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1994;375:81-8.
 - 23) Kim YH, Park KH, Rho HM. Transcriptional activation of the Cu, Zn-superoxide dismutase gene through the AP2 site by ginsenoside Rb2 extracted from a medicinal plant, *Panax ginseng*. *J Biol Chem*

- 1996;271:24539-43.
- 24) Munzel T, Hink U, Heitzer T, Meinertz T. Role for NADPH/NADH oxidase in the modulation of vascular tone. *Ann N Y Acad Sci* 1999;874:386-400.
- 25) Azumi H, Inoue N, Takeshita S, Rikitake Y, Kawashima S, Hayashi Y, et al. Expression of NADH/NADPH oxidase p22phox in human coronary arteries. *Circulation* 1999;100:1494-8.
- 26) Rueckschloss U, Galle J, Holtz J, Zerkowski HR, Morawietz H. Induction of NAD(P) H oxidase by oxidized low-density lipoprotein in human endothelial cells. *Circulation* 2001;104:1767-72.
-