

# 学 位 論 文

## Doctor's Thesis

フルバスタチンによる内皮型一酸化窒素合成酵素に対する転写活性の上昇作用:

-786T/C 遺伝子多型との関連

(Increase in the Transcriptional Activity of the Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene

With Fluvastatin: A Relation With the -786T/C Polymorphism)

阿部 浩二

**Koji Abe**

熊本大学大学院医学研究科博士課程内科学専攻循環器内科学

指導: 小川 久雄 教授

2006 年 3 月

# 学 位 論 文

## Doctor's Thesis

論文題名: フルバスタチンによる内皮型一酸化窒素合成酵素に対する  
転写活性の上昇作用: -786T/C 遺伝子多型との関連

(Increase in the Transcriptional Activity of the Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene  
With Fluvastatin: A Relation With the -786T/C Polymorphism)

著者名: 阿部 浩二  
Koji Abe

指導教官: 熊本大学大学院医学研究科博士課程循環器内科学  
小川 久雄 教授

審査委員名: 代謝内科学担当教授	荒木 栄一
生体機能薬理学担当教授	光山 勝慶
腎臓内科学担当教授	富田 公夫

2006年3月

## 目次

1. 要旨	4-6
2. 発表論文	7
3. 謝辞	8
4. 略語一覧	9-10
5. 研究の背景と目的	11-26
5-1 冠攣縮	
5-2 冠攣縮の特徴	
5-3 冠攣縮とアセチルコリン	
5-4 冠攣縮と一酸化窒素(NO)	
5-5 冠攣縮と喫煙	
5-6 冠攣縮と酸化ストレス	
5-7 冠攣縮の遺伝的因子	
5-8 内皮型一酸化窒素合成酵素(eNOS)とNO	
5-9 eNOS 遺伝子	
5-10 冠攣縮とeNOS 遺伝子多型	
5-11 eNOS 遺伝子と-786T/C 遺伝子多型	
5-12 -786T/C 遺伝子多型とRPA1	
5-13 HMG-CoA 還元酵素阻害薬	
5-14 HMG-CoA 還元酵素阻害薬の多面的効果	
5-15 HMG-CoA 還元酵素阻害薬とeNOS 遺伝子発現	
5-16 本研究の目的	

6. 研究方法	27-29
6-1 細胞培養	
6-2 eNOS 遺伝子の-786T/C 遺伝子型の同定	
6-3 リアルタイム RT-PCR 法による各遺伝子発現の定量分析	
6-4 eNOS mRNA 安定化の検討	
6-5 ルシフェラーゼリポータージーンアッセイ	
6-6 統計学的解析	
7. 研究結果	30-34
7-1 eNOS 遺伝子発現に対するスタチンの効果	
7-2 eNOS mRNA の安定化に対するスタチンの効果	
7-3 eNOS 遺伝子の転写活性に対するスタチンの効果	
7-4 HUVECs における eNOS 遺伝子の-786T/C 遺伝子型の同定	
7-5 eNOS 遺伝子発現に対する-786T/C 遺伝子多型とフルバスタチンの効果	
7-6 RPA1 遺伝子発現に対するスタチンの効果	
8. 考察	35-38
9. 結語	39
10. 参考文献	40-46

## 1. 要 旨

【目的】 これまでに HMG-CoA 還元酵素阻害薬 (スタチン) は一酸化窒素 (NO) の産生を増加させることが報告されているが、その詳細なメカニズムは、明らかになっていない。本研究の目的は、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVECs) においてフルバスタチンとシンバスタチンによる内皮型一酸化窒素合成酵素 (eNOS) の遺伝子発現、mRNA の安定化、転写活性を検討し、さらに、これらのスタチンの作用が、eNOS 遺伝子の -786T/C 遺伝子多型によって違いがあるか、さらには、-786C アリルの eNOS 遺伝子においてその転写活性を抑制する Replication Protein A1 (RPA1) の遺伝子発現に影響するかを検討することである。

【方法】 定量的リアルタイム RT-PCR 法にて、eNOS 遺伝子、RPA1 遺伝子の遺伝子発現を検討した。転写阻害薬であるアクチノマイシン D を用いて、mRNA の安定化を検討した。ルシフェラーゼリポータージーンアッセイにて、eNOS 遺伝子の転写活性を検討した。

【結果】 フルバスタチン、シンバスタチン共に、eNOS の遺伝子発現を時間および濃度依存的に増加させた。フルバスタチンは、転写活性および mRNA の安定化を共に増強させたが、シンバスタチンは、転写活性を上昇させることはなく、mRNA の安定化を増強させるのみであった。フルバスタチンの転写活性増加作用は、-786T アリルに比べて、-786C アリルのほうが強く、フルバスタチンによる eNOS 遺伝子発現も、-786T/T 遺伝子型に比べて、-786C/C 遺伝子型の HUVECs で大きかった。フルバスタチンは、RPA1 の遺伝子発現を時間および濃度依存的に減少させた。

【考察】 フルバスタチンは eNOS 遺伝子の転写活性と mRNA の安定化を増加させることで、eNOS 遺伝子の発現を上昇させた。フルバスタチンの eNOS 遺伝子の転写活性に対する効果は、-786 C アリルでより増強し、フルバスタチンによる eNOS 遺伝子発現も、-786C/C 遺伝子型で大きかった。これは、RPA1 遺伝子の発現を減少させたことによる可能性が示された。シンバスタチンは、

mRNA の安定化を増加させることだけで、eNOS 遺伝子の発現を上昇させ、-786T/C 遺伝子多型による差は見られなかった。

【結論】フルバスタチンは、eNOS 遺伝子の発現を上昇させることで、内皮の NO 産生をより増強させ、冠動脈疾患の患者、特に-786C アリルを持つ患者においては、より有益である可能性が示唆された。

## Summary

**[Background]** HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial nitric oxide (NO) production; however, the precise mechanism of this statin-induced increase in NO production remains to be elucidated. We examined endothelial nitric oxide synthase (eNOS) mRNA levels, mRNA stability, and the transcriptional activities of the eNOS gene in human umbilical vein endothelial cells treated with fluvastatin and simvastatin. We further examined whether the effects of these statins differ dependent upon the -786T/C polymorphism in the eNOS gene, and whether these statins affect gene expression of replication protein A1 (RPA1), which is known to reduce the transcriptional activity of the eNOS gene with the -786C allele. **[Method]** Utilizing real-time RT-PCR, we examined eNOS and RPA1 mRNA levels. We examined eNOS mRNA stability using the transcriptional inhibitor actinomycin D, and the transcriptional activity of the eNOS gene utilizing luciferase reporter gene assays. **[Results]** Fluvastatin significantly increased eNOS mRNA levels and mRNA stability, and decreased RPA1 mRNA levels. Luciferase reporter gene assays revealed that fluvastatin significantly increased the transcriptional activity of the eNOS gene. The effect of fluvastatin was stronger in the -786C/C genotype than in the -786T/T genotype. Simvastatin increased eNOS mRNA levels and mRNA stability, but did not affect the transcriptional activity of the eNOS gene. **[Conclusions]** Fluvastatin increased eNOS mRNA levels by enhancing both the transcriptional activity and mRNA stability. The effect of fluvastatin on the transcriptional activity was augmented in the -786C/C genotype, probably because of a decrease in RPA1 gene expression. Simvastatin increased eNOS mRNA levels only by enhancing mRNA stability. The present study suggests that fluvastatin increases endothelial NO activity and thus may be more beneficial to patients with the -786C allele.

## 2. 参考論文

### ① 関連論文

1. Koji Abe, Masafumi Nakayama, Michihiro Yoshimura, Shota Nakamura, Teruhiko Ito, Megumi Yamamuro, Tomohiro Sakamoto, Yoshihiro Miyamoto, Yasunao Yoshimasa, Yoshihiko Saito, Kazuwa Nakao, Hirofumi Yasue, Hisao Ogawa.  
Increase in the transcriptional activity of the endothelial nitric oxide synthase gene with fluvastatin: a relation with the -786T>C polymorphism. *Pharmacogenet Genomics*. 15: 329-336. 2005.

### ② その他の論文

1. Masafumi Nakayama, Michihiro Yoshimura, Tomohiro Sakamoto, Yukio Shimasaki, Shota Nakamura, Teruhiko Ito, Koji Abe, Megumi Yamamuro, Yoshihiro Miyamoto, Yoshihiko Saito., Kazuwa Nakao, Hirofumi Yasue, Hisao Ogawa.  
Synergistic interaction of T<sup>-786</sup>→C polymorphism in the endothelial nitric oxide Synthase gene and smoking for an enhanced risk for coronary spasm. *Pharmacogenetics*. 13: 683-688, 2003.
2. Satoru Suzuki, Michihiro Yoshimura, Masafumi Nakayama, Yuji Mizuno, Eisaku Harada, Teruhiko Ito, Shota Nakamura, Koji Abe, Megumi Yamamuro, Tomohiro Sakamoto, Yoshihiko Saito, Kazuwa Nakao, Hirofumi Yasue, Hisao Ogawa.  
Plasma level of B-type natriuretic peptide as a prognostic maker after acute myocardial infarction: a long-term follow-up analysis. *Circulation*. 110: 1387-1391. 2004.
3. Masafumi Nakayama, Michihiro Yoshimura, Tomohiro Sakamoto, Koji Abe, Megumi Yamamuro, Makoto Shono, Satoru Suzuki, Tsunenori Nishijima, Yoshihiro Miyamoto, Yoshihiko Saito., Kazuwa Nakao, Hirofumi Yasue, Hisao Ogawa.  
A -786T>C polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene reduces serum nitrite/nitrate from the heart due to an intracoronary injection of acetylcholine. *Pharmacogenet Genomics*. 2006 (in press).



### 3. 謝 辞

本研究を行うにあたり、全面的に御支援下さいました熊本大学大学院医学薬学研究部循環器病態学 小川久雄教授、泰江弘文前教授(現熊本加齢医学研究所所長)、京都大学大学院医学研究科臨床病態医科学 中尾一和教授、奈良県立医科大学第一内科学 斎藤能彦教授、国立循環器病センター動脈硬化・代謝内科 吉政康直部長、宮本恵宏先生に深甚なる謝意を表します。

また、本研究において直接御指導をいただきました熊本大学大学院医学薬学研究部循環器病態学 中山雅文先生、吉村道博助教授をはじめ多くの先生方に深く感謝いたします。

#### 4. 略語一覽

- Ach: acetylcholine
- AP-1: activating protein-1
- AP-2: activating protein-2
- AT1: angiotensin type 1
- BH4: tetrahydrobiopterin
- CaM: calmoduline
- cGMP: cyclic guanosine 5'-monophosphate
- EDRF: endothelial derived relaxing factor
- ERBE: estrogen-response element
- eNOS: endothelial nitric oxide synthase
- FAD: flavin adenosine dinucleotide
- FMN: flavin mononucleotide
- FPP: farnesylpyrophosphate
- GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
- GC: guanylyl cyclase
- GGPP: geranylgeranylpyrophosphate
- GMP: guanosine 5'-monophosphate
- GMSA: gel mobility shift assay
- GTP: guanosine 5'-triphosphate
- HMG-CoA: 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A
- hs-CRP: high sensitivity-C reactive protein
- HUVECs: human umbilical vein endothelial cells
- IL-1 $\beta$ : interleukin-1 $\beta$
- IL-6: interleukin-6
- iNOS: inducible nitric oxide synthase
- IRS: insulin receptor substrate
- LDL: low-density lipoprotein
- L-NMMA: N<sup>G</sup>-monomethyl L-arginine
- Lyso-PC: lysophosphatidylcholine
- MHC: major histocompatibility
- MMP: matrix metalloproteinase

- NADPH: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
- NF-1: nuclear factor-1
- NF-IL6: nuclear factor-interleukin 6
- NF- $\kappa$ B: nuclear factor- $\kappa$ B
- nNOS: neuronal nitric oxide synthase
- NO: nitric oxide
- NOS: nitric oxide synthase
- ox-LDL: oxidized-low density lipoprotein
- PCR: polymerase chain reaction
- PCR-SSCP: polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism
- PI3K: phosphatidylinositol-3-kinase
- PKB: protein kinase B
- PKG: protein kinase G
- PLC: phospholipase C
- ROS: reactive oxygen species
- RT-PCR: reverse transcription-polymerase chain reaction
- SSRE: shear stress responsive element
- STR: short tandem repeat
- TGF- $\beta$ : transforming growth factor- $\beta$
- TNF- $\alpha$ : tumor necrosis factor- $\alpha$
- VEGF: vascular endothelial growth factor
- VNTR: variable number of tandem repeat

## 5. 研究の背景と目的

### 5-1 冠攣縮

狭心症の病態は複雑であるが、主たるものとして、動脈硬化による器質性狭窄が原因となるものと、冠動脈の攣縮(冠攣縮)が原因となるものがある。冠動脈のトーンスは、血管弛緩因子と収縮因子のバランスにより保たれており、そのバランスが極端に崩れて、収縮性が異常に亢進すると冠攣縮が生じる。冠攣縮が起こると、冠血流が低下し、心筋虚血がおこるだけでなく、血小板凝集を高め、血液の凝固を促進し、線溶能を落として血栓が形成されやすくなる。そのため、冠攣縮は、狭心症だけでなく、冠動脈血栓が病因である急性冠症候群(急性心筋梗塞、虚血性突然死、不安定狭心症)など虚血性心疾患全般の発症において、重要な役割を果たしていることが明らかにされてきている[1, 2]。

### 5-2 冠攣縮の特徴

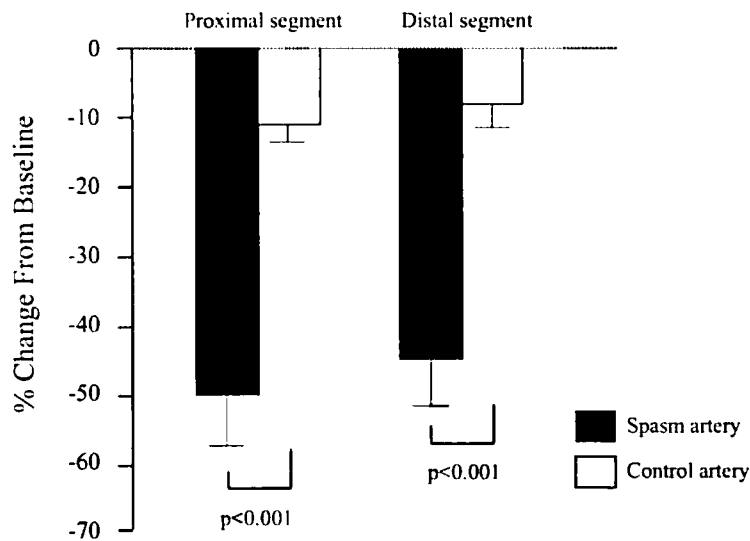
冠攣縮には、日内変動が見られ、夜間から早朝にかけての安静時に生じやすい。しかも発作の2/3は自覚症状のない、いわゆる無症候性心筋虚血発作である。冠攣縮は、早朝には軽労作でも誘発されることがあるが、午後からはかなりの激しい運動によっても誘発されないのが普通である。しかし、早朝に運動によって誘発されるといっても、早朝の最初の運動、あるいはいきなり行った運動によって誘発されやすく、warming upしながら徐々に運動量を上げていく場合は誘発されにくい[3]。すなわち、冠攣縮には、運動耐容能の著明な日内変動があるのみならず、運動のタイプにより発作の誘発されやすさが異なる。また、精神的ストレス、アルコール過摂取時にも起きやすい。発作は、いわゆる胸痛を始め、背部痛や上腕、下顎の痛みとしてくることがある。殆どの場合、発作は、一過性であるが、時として重症化し、心筋梗塞、致死性不整脈を誘発することがある。また、冠攣縮誘発検査として、アセチルコリンの冠動脈注が行われている

### 5-3 冠攣縮とアセチルコリン

冠攣縮は、少量のアセチルコリン(50 $\mu$ g, 100 $\mu$ g)の少量を直接冠動脈内に注入することにより、全身の血行動態に変動をきたすことなしに、効率的に誘発される[4]。アセチルコリンに対する冠動

脈の反応を正常者群と冠攣縮性狭心症群とで比較した結果、冠攣縮性狭心症の患者においては、冠動脈はアセチルコリンにより著明に収縮していることが示された（図 1） [5]。この反応は、アトロピンにより遮断されるので、アセチルコリンはムスカリン受容体を介して直接冠攣縮を誘発すると考えられる。アセチルコリンは血管内皮が正常であれば、血管を拡張させるが、内皮を剥離したり、あるいは内皮に障害があったりすると血管を収縮する。これは、血管の内皮が正常であればアセチルコリンによるムスカリン受容体の刺激により、内皮細胞から平滑筋を強力に弛緩する内皮由来血管弛緩因子 (EDRF) が分泌されるためである[6]。

図1：冠動脈径に対するアセチルコリン50  $\mu$ g 注入の効果



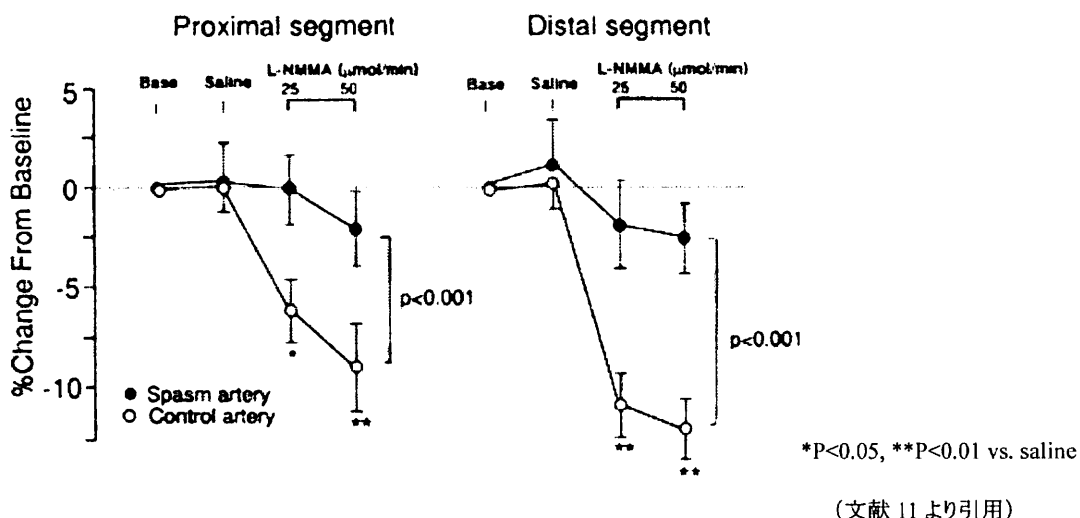
(文献 5 より引用)

#### 5-4 冠攣縮と一酸化窒素 (NO)

EDRF は、①半減期が数秒ときわめて短い、②可溶性グアニル酸シクラーゼ (GC) を活性化し、産生されるサイクリック GMP (cGMP) を介して平滑筋を弛緩する、③オキシヘモグロビンの処置により作用を失う、④スーパーオキシドジスムターゼにより作用が増強されるなどの性質をもつ物質であることが明らかになり、EDRF が NO であることが薬理的に証明された[7, 8]。冠攣縮患者の冠動脈は、アセチルコリン以外にも同じく内皮依存性弛緩物質であるヒスタミンやセロトニン、エルゴノビンなどにより攣縮が誘発され、また、ニトログリセリンにより冠動脈は著明に拡張する[1,9]。ニトログリセリンを含めた亜硝酸薬は生体内で NO に変換され、これが血管平滑筋の可溶性グアニル酸シクラーゼを刺激して cGMP を増加させて血管を拡張させる[10]。正常の血管内皮からは NO が生成

放出されるので、冠攣縮をきたす動脈がニトログリセリンに対して過敏に反応するのは、これら動脈において内皮から NO の生成が低下しているためである可能性がある。NO は、NO 合成酵素 (NOS) により、L-アルギニンが L-シトルリンに変換さえる際に産生されるが、この生成は L-NMMA によって阻害される[10]。冠攣縮患者の冠動脈における NO 産生が障害されているかの検討では、コントロール例では、L-NMMA の注入により内径が収縮したのに対し、冠攣縮例では、内径の変化は認められなかった (図 2) [11]。

図 2



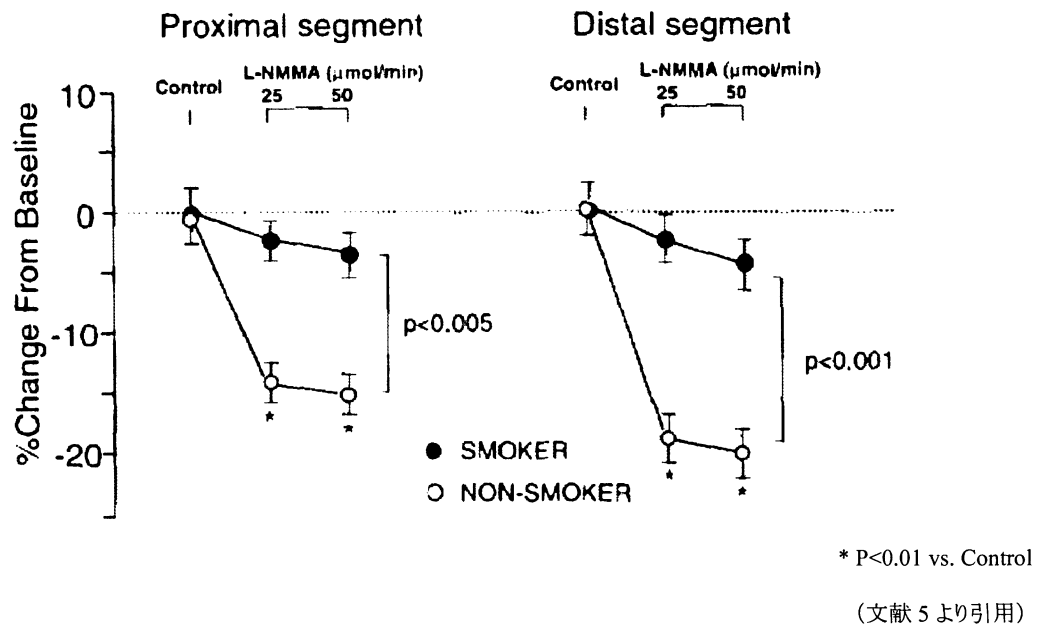
この結果から、健常人においては、冠動脈で産生・放出される NO は、血管収縮を抑制するが、冠攣縮症例の冠動脈においては基礎的な NO の産生・放出が不足し、血管の収縮性を高めていることが示された。冠攣縮を引き起こす冠動脈においてニトログリセリンによって著明に冠動脈が拡張する理由はここにあると思われる。また、アセチルコリンやセロトニン、エルゴノピン、およびヒスタミンなどの内皮依存性弛緩物質による冠攣縮が惹起されるのは、これらの物質による内皮からの NO の放出が障害されていることと関連があると考えられる。

### 5-5 冠攣縮と喫煙

喫煙が動脈硬化の危険因子であることがよく知られているが、動脈硬化に基づく器質性狭心症に比べても、冠攣縮性狭心症においては喫煙率が有意に高く、喫煙が冠攣縮ときわめて密接な関連を有する[12]。事実、通常の冠動脈造影時に L-NMMA を喫煙者の冠動脈内に注入して、

その前後で冠動脈内径の変化を計測した結果、喫煙者では L-NMMA の注入に対して内径の変化は認められず、さらに冠動脈のアセチルコリンによる収縮反応もほとんど影響を受けなかった (図 3)[5]。このことから、喫煙者では、冠攣縮と同様に冠動脈における basal およびアセチルコリン刺激の両条件下で NO の産生・放出が減少ないし欠如していることが明らかになった。従って、喫煙は内皮からの NO 産生・放出を障害することにより冠攣縮を来たしやすくすると考えられる。

図 3

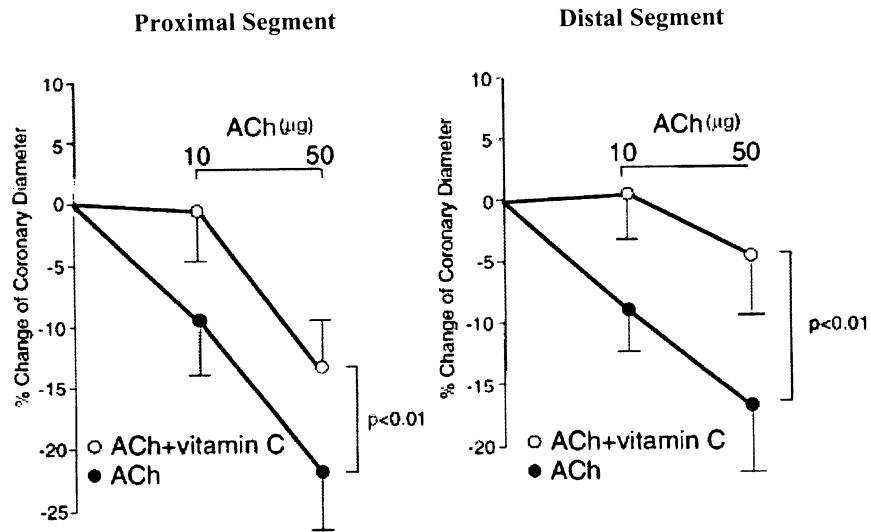


## 5-6 冠攣縮と酸化ストレス

活性酸素は、アテローム性動脈硬化部位において増加し、内皮を直接障害し、また内皮 NO を不活化することによって、血管内皮依存性拡張反応の低下を惹起させることが知られている。喫煙者または冠動脈硬化疾患を有する患者においては酸化ストレスが増加し、血管トーン亢進の原因の一つとなっている。抗酸化作用を有するビタミン C の冠攣縮性狭心症患者の冠動脈トーンに対する検討では、冠攣縮性狭心症患者においては、アセチルコリンに対する冠動脈収縮反応の亢進がビタミン C 投与により減弱したが、正常対照者においては、ビタミン C は、アセチルコリンに対する冠動脈径の反応に有意な作用を与えなかった (図 4、5)[13]。この結果は、冠攣縮の機序に酸化ストレスが関与していることを示すもので、冠攣縮性狭心症における酸化ストレス増加の原因として高い喫煙率がまず考えられるが、非喫煙者の冠攣縮性狭心症患者においても抗酸化剤が有効であることより、他にも原因の存在を示唆させた。

図4

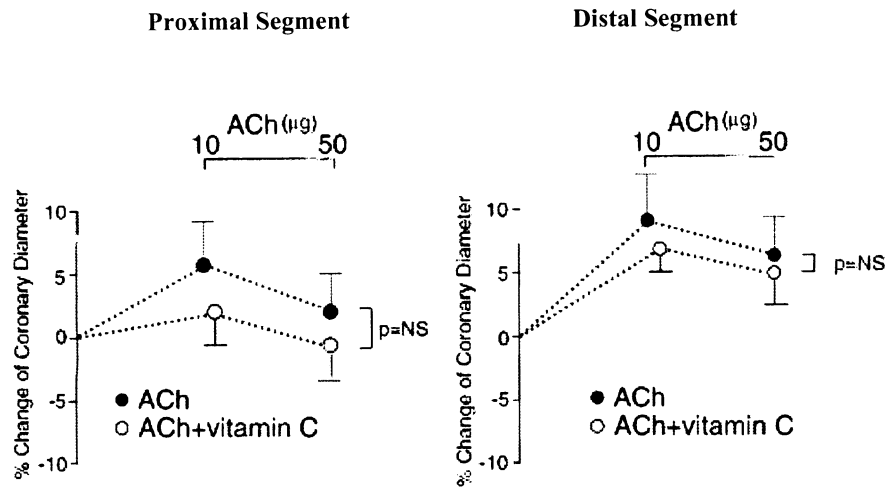
冠攣縮を有する冠動脈におけるアセチルコリンによる収縮反応に対するビタミンCの効果



(文献 13 より引用)

図5

対照正常者の冠動脈におけるアセチルコリンによる収縮反応に対するビタミンCの効果



(文献 13 より引用)

### 5-7 冠攣縮の遺伝的因子

泰江、小川らが中心となって行った厚生省班研究の結果では、わが国における狭心症症例 2251 例のうち 921 例 (40.9%) の高頻度で冠攣縮が認められた。また、アセチルコリン負荷試験でみた冠攣縮の頻度では、白人に比較して日本人が有意に高かったことも報告されている[14]。このことは、遺伝的・人種的な要因が冠攣縮の発症機序にかかわっている可能性が示唆された。こ



れまでの我々の研究により、その発症に血管内皮機能の低下が関与していることが明らかしてきた。つまり冠動脈からのNOの分泌が低下することが冠攣縮の大きな要因であることから、その後、我々は血管内皮にてNOを産生するeNOS遺伝子と冠攣縮を検討した。

## 5-8 内皮型一酸化窒素合成酵素(eNOS)とNO

NOは、L-アルギニンからNOSによって生成されるが、NOSには、nNOS(neuronal NOS: NOS1)、iNOS(inducible NOS: NOS2)、eNOS(endothelial NOS: NOS3)の3種類が同定されている。その中で、eNOSは、ウシの大動脈内皮細胞で最初に同定された[15]。eNOSは、constitutive NOSともいわれ、通常の条件下にて血管内皮細胞に存在するが、ヒトの組織の様々な細胞でも発現している[16]。

血管内皮細胞のeNOSは、蛋白翻訳後にpalmitoylation、myristoylationを受けた後、細胞膜のカベオラに移行し、カベオラに存在するカベオリン-1と結合して活性が抑制される[17]。セロトニン、アセチル

コリンあるいはブラジキニンなどの血管作用性物質や内皮に対する血流によるすり応力(shear stress)の刺激により細胞内の $Ca^{2+}$ 濃度が上昇すると、 $Ca^{2+}$ /カルモジュリン(CaM)が、eNOSのカルモジュリン結合領域に結合することで、eNOSとカベオリン-1が分離し、eNOSが活性化され、NOを産生、放出させる(図6)。

さらに、eNOSの活性化に

よるNO産生には $Ca^{2+}$ 依存性の経路だけではなく、 $Ca^{2+}$ 非依存性の経路もあることが知られている(図7)。

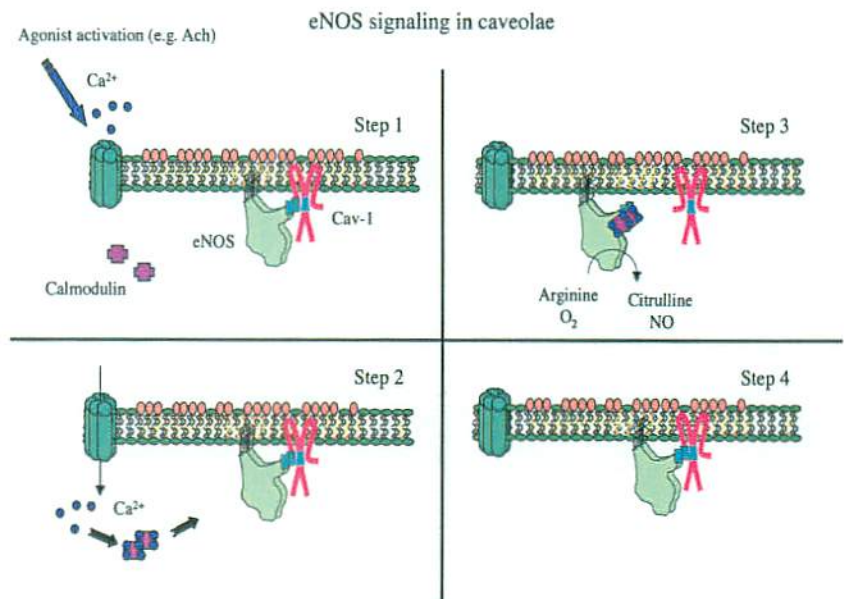
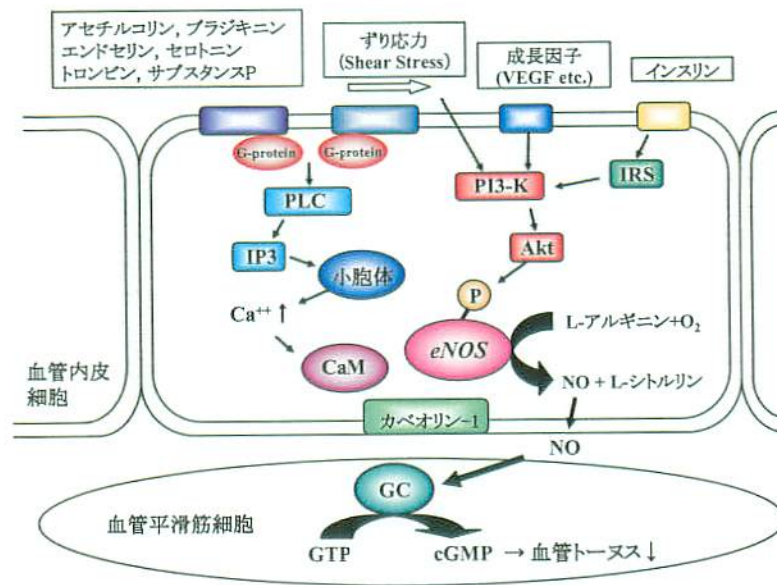


図6 カベオラにおけるeNOSシグナリング

Step1: カベオリン-1(Cav-1)によるeNOS活性抑制、Step2: アゴニスト刺激が $Ca^{2+}$ 流入をきたし、calmodulinを活性化する。Step3:  $Ca^{2+}$ /calmodulinがeNOSに結合することにより、eNOSは、Cav-1から遊離し、NOが産生される。Step4: Cav-1が再度eNOSに結合し、サイクル終了。(Razani B, et al. Pharmacol Rev. 54: 431-467, 2002より引用)

図 7



セリン/スレオニンキナーゼである Akt (PKB)により eNOS の N 末端の 1179 番目のセリン残基がリン酸化させることで eNOS が  $Ca^{2+}$  非依存性に活性化させることが明らかになり、血流のずり応力による eNOS 活性化/NO 産生に PI3 キナーゼ (PI3K) を介する Akt の活性化が関与することが報告されている[18]。血管内皮細胞において、eNOS より産生された NO は、血管平滑筋細胞の可溶性グアニン酸シクラーゼを活性化して cGMP 濃度を上昇させ、その後、cGMP 依存性プロテインキナーゼ (PKG) の活性化による血管拡張の誘発と維持を行うだけでなく、図 8 に示すように白血球の内皮細胞への接着抑制 [19]、血小板凝集抑制[20]、血管平滑筋細胞の遊走・増殖抑制[21]などの作用を示し、血管のホメオスターシスを維持するのに重要な

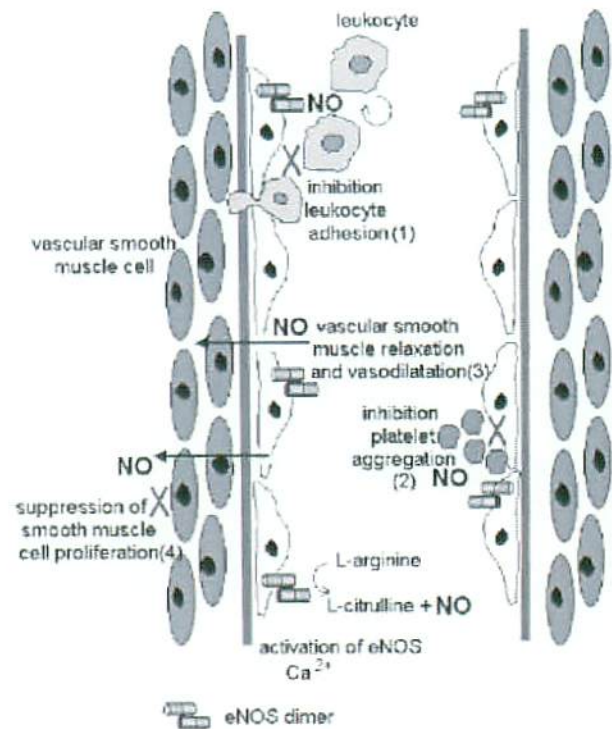


図 8 血管系における eNOS の作用

内皮由来の NO は、白血球の内皮細胞への接着の抑制(1)、血小板凝集の抑制(2)の作用を呈する。血管平滑筋の弛緩(3)にて血管のトーンを制御し、血管平滑筋細胞の増殖も抑制する(4)。(Albrecht EW, et al. J Pathol. 199: 8-17, 2003 より引用)



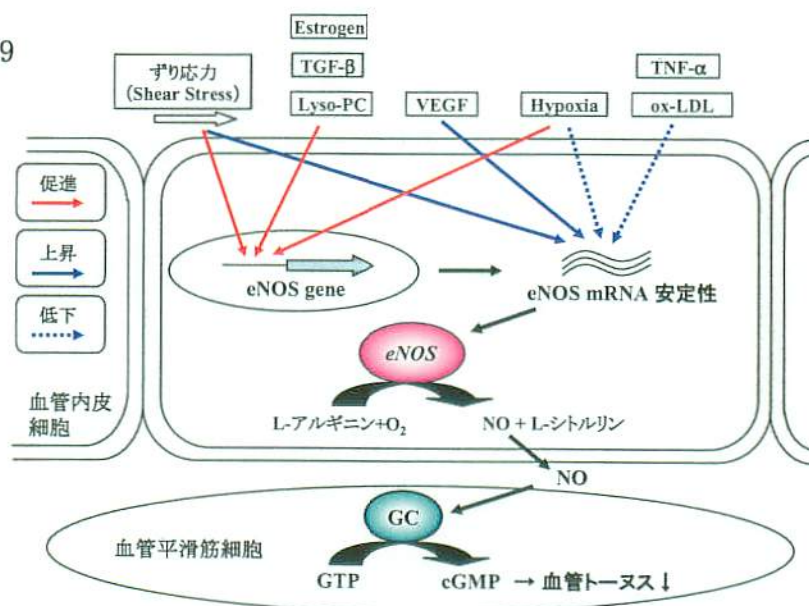
役割を果たしている。

### 5-9 eNOS 遺伝子

1993年に Marsden らによりヒト eNOS 遺伝子がクローニングされた[22]。ヒト eNOS 遺伝子は、染色体の 7q35-36 に存在し、26 エクソンからなる全長 21kb の遺伝子である。eNOS 遺伝子のプロモーター領域には、TATA box はなく、定常的に遺伝子発現を行わせる Sp1 や GATA 配列が存在する[23]。AP-1, AP-2, NF-1, NF-IL6, NF- $\kappa$ B, p53 のような転写因子が結合する部位も、プロモーター領域には多く存在している。また、ずり応力 (shear stress) の応答配列である SSRE があり、ずり応力に対して転写レベルで調節を受けていると考えられ、さらに ERE も存在していることから、エストロゲンによる調節もを受けていると考えられている[24]。

eNOS 遺伝子発現は、転写レベルだけでなく、転写後の mRNA の安定性にも影響される[25]。ずり応力は、転写活性上昇だけでなく、eNOS mRNA の安定性も上昇させることで、eNOS 遺伝子発現を上昇させる。しかしながら、エストロゲン、TGF- $\beta$ 、酸化 LDL の主要リン脂質である Lysophosphatidylcholine (Lyso-PC) などは転写活性上昇によって、VEGF は eNOS mRNA の安定性の上昇によって、eNOS 遺伝子発現を上昇させる。また、低酸素状態 (hypoxia) は、転写活性は上昇させるが、eNOS mRNA の安定性は低下させる。TNF- $\alpha$ 、酸化 LDL (ox-LDL) は、eNOS mRNA の安定性を低下させる。よって、さまざまな状況下において、種々の因子により eNOS 遺伝子の発現は調節されている (図 9)。

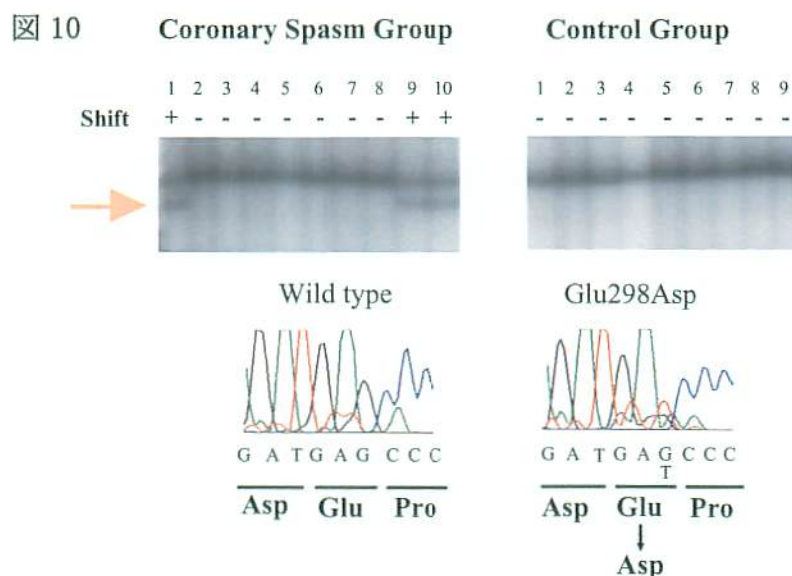
図 9



## 5-10 冠攣縮とeNOS 遺伝子多型

我々は、冠攣縮症例においてeNOS 遺伝子多型を検索した結果、eNOS 遺伝子のエクソン7に存在するGlu298Aspの変異と、5'転写調節領域に存在するT-786C、A-922G、T-1468Aの点変異を見出した。

まず、我々は、PCR-SSCP法およびダイレクトシーケンシング法を用いて、eNOS 遺伝子のエクソン7において298番目のアミノ酸であるグルタミン酸がアスパラギン酸に変わるミスセンス変異(Glu298Asp)を発見し(図10)、Glu298Asp変異の頻度は、冠攣縮の患者で有意に高頻度であることを報告した(表1)[26]。このGlu298Asp変異に関しては、その後、本態性高血圧症[27]ならびに心筋梗塞[28]とも関連していることがわかった。



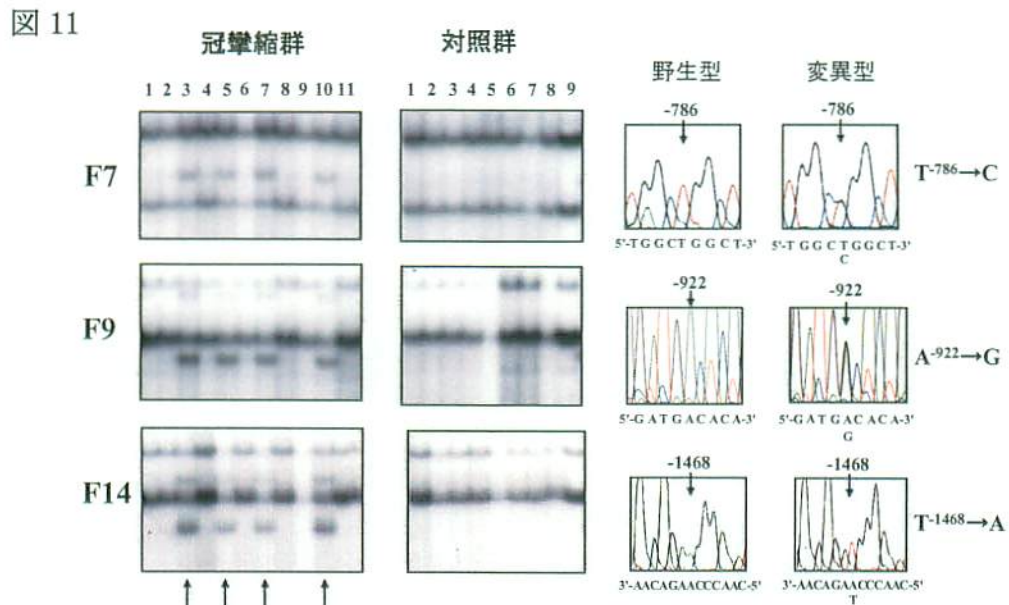
(文献26より改変引用)

表1

	Control (n=100)	Coronary spasm (n=113)	Odds ratio (95% CI)	P value
eNOS/TT (Glu298Asp homozygote)	0/100 (0%)	1/113 (0.9%)	-	-
eNOS/TG (Glu298Asp heterozygote)	9/100 (9%)	23/113 (20.3%)	-	-
eNOS/GG (wild type)	91/100 (91.0%)	89/113 (78.8%)	-	-
T allele vs G allele	-	-	2.47 (0.87-6.99)	0.071
TT and TG vs GG <sup>a</sup>	-	-	2.73 (1.23-6.07)	0.014

(文献26より引用)

次に、eNOS 遺伝子の 5' 転写調節領域で、転写開始点より上流 1468、922、786 塩基対に完全に連鎖し同一アレル上に存在する 3ヶ所の SNPs (T-786C、A-922G、T-1468A) があることを発見し (図 11)、この変異が、冠攣縮性狭心症患者群に有意に多く認めることを示した (表 2) [29]。また、この変異は、冠攣縮だけでなく冠動脈に有意狭窄のない心筋梗塞症例の 50%にこの変異を認めた[30]。



(文献 29 より改変引用)

表 2: 冠攣縮群および対照群における eNOS 遺伝子変異 (T-786→C, A-922→G, T-1468→A) の頻度

	対照群 (n=161)	冠攣縮群 (n=174)	Odds ratio (95% CI)	p value
eNOS mutant allele / T-786→C, A-922→G, and T-1468→A				
Abnormal homozygote	0/161 (0%)	3/174 (2%)	—	—
Heterozygote	11/161 (7%)	48/174 (28%)	—	—
Normal homozygote	150/161 (93%)	123/174 (70%)	—	—
<b>Additive effect</b>	—	—	<b>5.19 (1.85-17.60)</b>	<b>&lt;0.0001</b>
<b>Dominant effect</b>	—	—	<b>5.65 (2.82-14.66)</b>	<b>&lt;0.0001</b>
Recessive effect	—	—	infinite	0.1798

(文献 29 より改変引用)

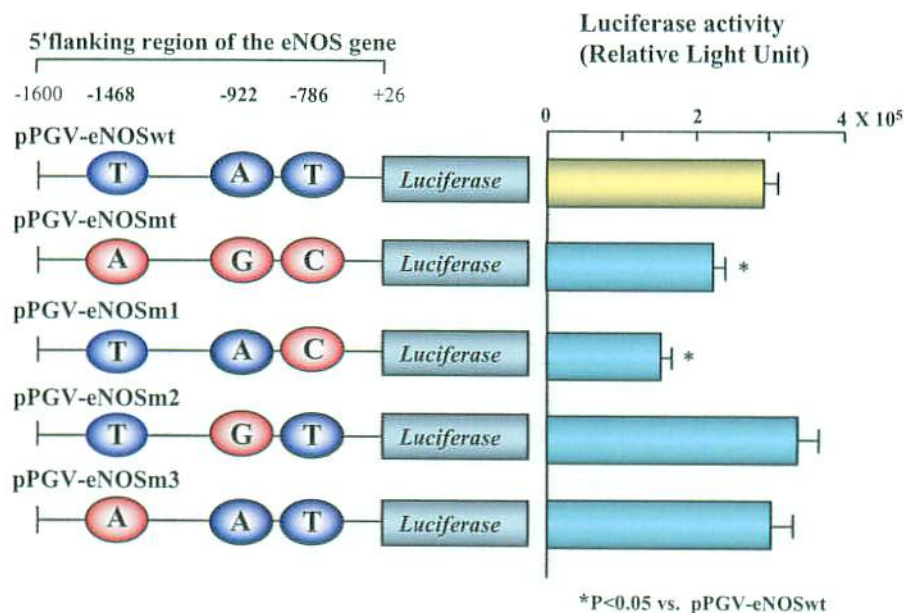


また、我々は、最近この変異を有している症例では、アセチルコリンの冠動脈内注入により NO 産生が著明に低下していることを明らかにした[31]。さらに、この変異を有する冠攣縮症例の 21.8%が冠攣縮の再発作により再入院をしており（コントロール症例 7.5%）、この変異が薬剤抵抗性の難治性冠攣縮と関連していることも示している。

### 5-11 eNOS 遺伝子と-786T/C 遺伝子多型

5'転写調節領域に存在した 3ヶ所の SNPs に関しては、さらに、この変異が eNOS にどのような機能異常をもたらすかについて検討するために、ルシフェラーゼリポーター遺伝子アッセイを用いて eNOS 遺伝子の転写活性の解析を行った結果、3つの変異のうち、T-786C 変異のみが、有意に eNOS 遺伝子の転写活性を低下させることが明らかとなった（図 12）[29]。

図 12

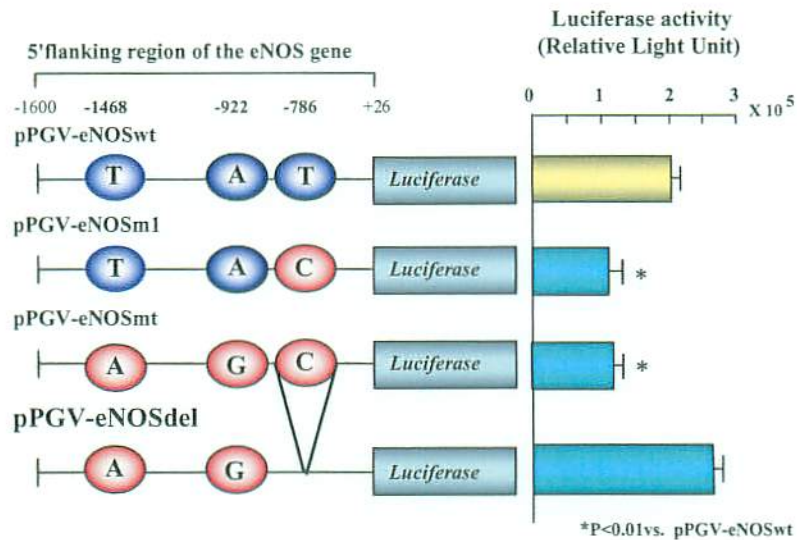


(文献 29 より改変引用)

## 5-12 -786T/C 遺伝子多型と RPA1

我々は、T-786C 変異周囲の 11 塩基対を欠如したコンストラクトを用いて、eNOS 遺伝子の転写活性を検討したところ、野生型の活性へ戻ることを明らかにした (図 13) [32]。

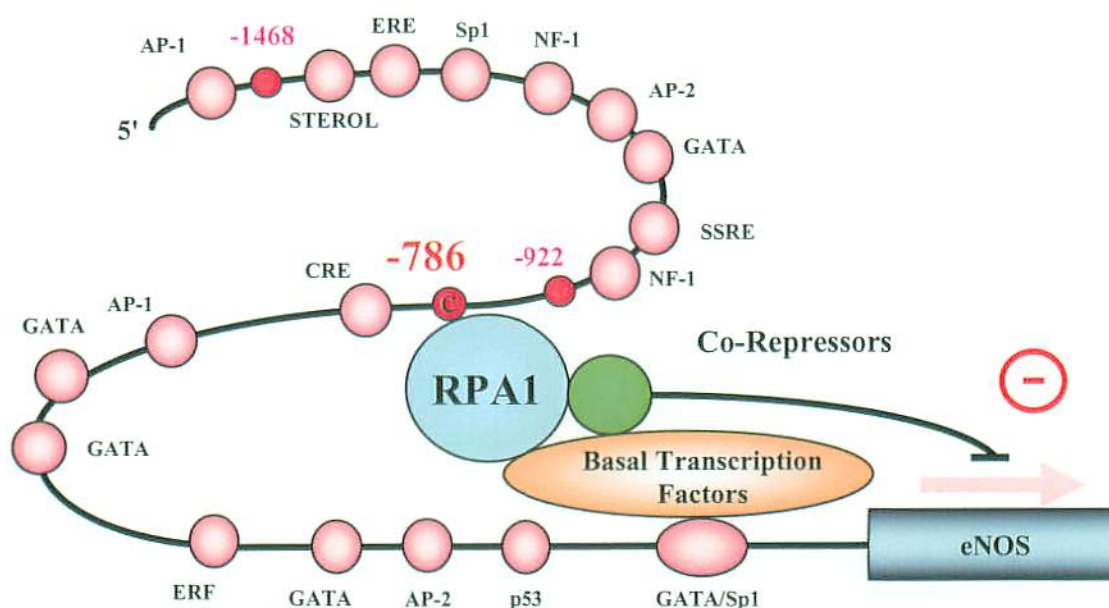
図 13



(文献 32 より改変引用)

このことから、T-786C 変異を有する配列になんらかの repressor として働く転写因子が結合し、それが eNOS の転写活性を抑制することが考えられた。実際に、核蛋白質を抽出し、GMSA を行ったところ、T-786C 変異プローブのみ、シフトバンドを認め、T-786C を有する配列に何らかの転写因子が示された。このシフトバンドを形成する蛋白を精製し、アミノ酸配列をスクリーニングした結果、T-786C に結合する転写因子が Replication Protein A1 (RPA1) であることが判明した[32]。RPA1 は、3 量体 (70kDa, 32kDa, 14kDa) である Replication Protein A (RPA) の中の 70kDa のサブユニットにあたり、一般的に一本鎖 DNA と結合し作用する蛋白である[33]。RPA は、酵母 DNA では、DNA の複製、修復、組み換え、抑制因子として働くことが示されている[34]が、ヒトにおいて初めて、2 本鎖 DNA と結合し repressor として機能することが示された。この結果、この RPA1 が、変異した塩基 (-786C) に結合しやすく、eNOS 遺伝子の転写活性を抑制することで、NO 産生を低下させることで、虚血性心疾患と関連することが判明した (図 14)。

図 14



### 5-13 HMG-CoA 還元酵素阻害薬

コレステロール生合成の律速酵素である HMG-CoA 還元酵素の阻害薬（スタチン）は、強力な血清コレステロール低下作用を有する。1989 年、第一剤目のスタチンとして、プラバスタチンが発売されて以来、相次いで新しいスタチンが開発され、現在わが国では、プラバスタチン、シンバスタチン、フルバスタチン、アトルバスタチン、ピタバスタチン、ロスバスタチンの 6 剤が使用可能となっている。

アテローム性動脈硬化により、多くの心血管疾患は引き起こされている[35]。アテローム性動脈硬化の進展には、様々な因子や過程に依存しているが、アテローム性動脈硬化の進展と血清コレステロール値の間には、有意な関連があることが示されている[36, 37, 38]。最近の大規模臨床研究の結果からは、高コレステロール血症で動脈硬化性疾患をもつ患者において、スタチンが冠動脈疾患の罹患率を減少させ、動脈硬化性疾患の 1 次予防、2 次予防に効果があることが次々と報告されている[39, 40, 41, 42]。血清コレステロール値は、冠動脈のアテローム性動脈硬化症と強く相関している[43]ため、一般的にスタチンによるコレステロール低下作用が、心血管疾患において、有益な効果をもたらす主要な機序であると考えられている。事実、短時間の血漿 LDL アフェレーシスにより内皮依存性の血管拡張が



改善する[44]ことは、スタチンが内皮機能を回復させる機序の1つに血清コレステロール値の低下があることを示唆している。しかしながら、West of Scotland Coronary Prevention (WOSCOP) や Cholesterol and Recurrent Events (CARE) などの大規模臨床研究のサブグループ解析では、スタチン治療群とプラセボコントロール群間で、同等のコレステロール値にもかかわらず、スタチン治療群が、プラセボコントロール群より有意に冠動脈疾患の危険性が低いことが示されたり[41, 42]、コレステロール低下を目的とした大規模臨床研究のメタ解析にて、コレステロール低下に対して、スタチン治療群と他のコレステロール低下薬による治療群を比較した結果、同等のコレステロール値にもかかわらず、スタチン治療群が、有意に心筋梗塞の危険性が低いことが示されたりした[45, 46]。また、Myocardial Ischemia Reduction With Aggressive Cholesterol Lowering (MIRACL) trial では、急性冠症候群発症から24~96時間後のスタチン治療開始が、16週間と早い段階で虚血イベントを抑制することが報告された[47]。このMIRACL trialの結果は、16週間の時点にてLDLコレステロール値は、平均40%低下していたが、血管リモデリングに対して十分な変化をもたらすには、16週間という期間ではあまりにも短すぎると考えられた。あるいは、正常コレステロール患者を対象とした試験で、スタチンを単回投与した後、3時間以内に内皮機能の改善が認められたり[48]、血性コレステロール値の有意な低下の前に内皮機能の回復が認められる試験も報告された[49]。このような結果から、スタチンには、コレステロール低下作用以外の有益な作用 (pleiotropic effect: 多面的効果)、特に内皮機能改善に対する作用があることが認められるようになった。

#### 5-14 HMG-CoA 還元酵素阻害薬の多面的効果

スタチンの多面的効果として、内皮機能の改善[50]、酸化ストレスの減少[50, 51]、血管炎症の減少[52]、血管平滑筋増殖の抑制[53]、アテロームプラーク安定の増強[54]などの作用が報告されている。また、血管壁細胞において、スタチンは、遺伝子発現や蛋白活性に様々な影響を及ぼしている (表3) [55]。

表3: 血管壁細胞に対するスタチンの作用

Endothelial Cells	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ eNOS expression and activity</li> <li>↑ Tissue-type plasminogen activator expression</li> <li>↓ Plasminogen activator inhibitor-1 expression</li> <li>↑ Endothelin-1 synthesis and expression</li> <li>↓ ROS</li> <li>↓ Proinflammatory cytokine (IL-1<math>\beta</math>, IL-6, cyclooxygenase-2) expression</li> <li>↑ Peroxisome proliferator-activated receptor-<math>\alpha</math> expression</li> <li>↓ HMC class II antigen expression</li> </ul>
Smooth Muscle Cells	<ul style="list-style-type: none"> <li>↓ Migration and proliferation</li> <li>↓ ROS</li> <li>↓ Rac-1 mediated NADH oxidase activity</li> <li>↓ AT1 receptor expression</li> <li>↑ Apoptosis</li> </ul>
Platelets	<ul style="list-style-type: none"> <li>↓ Platelet reactivity</li> <li>↓ Thromboxane A2 biosynthesis</li> </ul>
Monocyte/Macrophages	<ul style="list-style-type: none"> <li>↓ Macrophage growth</li> <li>↓ MMP expression and secretion</li> <li>↓ Tissue factor expression and activity</li> <li>↓ Inducible NO synthase expression</li> <li>↓ Proinflammatory cytokine (TNF-<math>\alpha</math>, IL-1<math>\beta</math>, IL-6) expression</li> <li>↓ Monocyte chemoattractant protein-1 secretion</li> <li>↓ IL-8 secretion</li> <li>↓ MHC class II antigen expression</li> </ul>
Vascular Inflammation	<ul style="list-style-type: none"> <li>↓ hs-CRP level</li> <li>↓ Leukocyte-endothelial cell adhesion</li> <li>↓ Adhesion molecule expression</li> <li>↓ Nuclear factor-<math>\kappa</math>B activation</li> </ul>

(文献 55 より改変引用)

この多面的効果の機序として、内皮の NO 産生の増加と関連していることが示唆されている[56, 57]。事実、スタチンは、内皮機能障害につながる低酸素下[58]および酸化 LDL 存在下[59]において、低下した eNOS の活性化を回復させたり、Akt を介して eNOS を活性化させ、NO 産生を増強させること[60]が報告されている。Akt は、細胞代謝やアポトーシスなど様々な細胞プロセスの主要な調節因子である[61]。通常、受容体チロシンキナーゼと G 蛋白共役受容体を刺激するとホスファチジルイノシトール 3 (PI3) キナーゼが活性化され、PI3 キナーゼ産物、すなわち 3'リン脂質が Akt のリン酸化と活性化を惹起する[62]。事実、wortmannin などの PI3 キナーゼ阻害薬は、Akt の活性化に及ぼすスタチンの作用を遮断する[60]。よって、スタチンは、PI3 キナーゼ/Akt 経路を介して eNOS を活性化させ、NO 産生を増加させるが、スタチンが PI3 キナーゼを活性化させる正確な機序はまだ明らかではない。

#### 5-15 HMG-CoA 還元酵素阻害薬と eNOS 遺伝子発現

1999 年、Laufs らによって、シンバスタチンは、eNOS 遺伝子の転写活性を増強させることなく、eNOS mRNA の安定化の増強だけで eNOS の遺伝子発現を上昇させることが報告された[59]。この報告以降、スタチンは eNOS 遺伝子の転写活性を亢進させないと一般的に考えられてきた。しかし、スタチンによる eNOS への関与は多彩であり、スタチンの種類によってもその作用が異なる可能性が指摘されつつあるが、その詳細なメカニズムは未だ明らかではない。

#### 5-16 本研究の目的

本研究では、フルバスタチンとシンバスタチンの eNOS 遺伝子発現への作用を、mRNA 安定化と転写活性を測定し、比較検討した。また、スタチンの eNOS 遺伝子発現への作用が、eNOS 遺伝子の-786T/C 遺伝子多型によって違いがみられるか、さらにそうであれば、-786C アリルの eNOS 遺伝子においてその転写活性を抑制する RPA1 の遺伝子発現に影響するかどうかを検討した。

## 6. 実験方法

### 6-1 細胞培養

ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVECs) は、CAMBREX 社 (USA) より、購入し、2%FBS、hEGF (10 ng/L)、Hydrocortisone (1 mg/L)、BBE (12 mg/L)、抗生物質 GA-1000 を含む血管内皮細胞用の基礎培地 (EGM ブリットキット) を培養液として、ゼラチンコーティングした 6 ウェルディッシュに 37°C、5%CO<sub>2</sub> 大気下にて培養を行った。細胞は、スタチン添加前に 0.4%FBS を含む内皮の基礎培養液で 12 時間培養した。また、-786T/T 遺伝子型あるいは-786C/C 遺伝子型の HUVECs における 48 時間後のフルバスタチン添加における eNOS 遺伝子発現の実験では、フルバスタチン添加前に 2%FBS を含む内皮の基礎培養液にて 12 時間培養した。本実験では、4 回までの継代の細胞を使用した。

### 6-2 eNOS 遺伝子の-786T/C 遺伝子型の同定

培養した HUVECs より、genomic DNA の抽出を行った後、eNOS 遺伝子のプロモーター領域において、転写開始点より上流 786 塩基対を含むように-1553 から+44 の PCR 産物 (1597 塩基対) が増幅できるように作成した。

Forward Primer; 5'-CCATTA ACTGGAACCTAGGAA-3'

Reverse Primer: 5'-CCACGCTCTTCAAGTTGCCCAT-3'

上記に示すプライマーを用いて、PCR 産物を作成した。PCR は、template DNA 2μl、Forward Primer (20 μM) 1 μl、Reverse Primer (20 μM) 1 μl、dNTP (2.5mM) 8μl、10×LA PCR Buffer 5μl、25mM MgCl<sub>2</sub> 5μl、D<sub>2</sub>O 27.5 μl、Takara LA Taq DNA polymerase 0.5 μl の計 50 μl の系で、94°C 30 秒、55°C 30 秒、72°C 1 分 30-40 サイクルで行った。

PCR 産物は、エチレンブロマイド染色によるアガロースゲル電気泳動にて確認し、各バンドから Wizard PCR Preps DNA Purification System (Promega, USA) を用いて、精製を行った。精製した PCR 産物を再度、アガロースゲル電気泳動にて、確認した後、精製した PCR 産物を ABI 310 Sequence Detection System (Applied Biosystems, USA) を用いてダイレクトシーケンシングし、既知の遺伝子配列と比較することで、各 HUVECs の-786T/C 遺伝子多型を同定した。

### 6-3 リアルタイム RT-PCR 法による各遺伝子発現の定量分析

HUVECs からの total RNA は、Qiagen RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Germany) を用いて抽出し

た。

eNOS 遺伝子および RPA1 遺伝子発現の定量分析は、TaqMan ケミストリーを用いた 2 ステップリアルタイム RT-PCR 法にて行った。尚、それぞれの遺伝子発現を補正するために、house keeping gene である GAPDH を用いた。各遺伝子に対するプライマーおよびプローブは下記に示す。

#### eNOS

Forward Primer; 5'-GCATCACCAGGAAGAAGACCTT-3'

Reverse Primer; 5'-TTCACCTCGCTTCGCCATCA-3'

TaqMan Probe; 5'-FAM-TCTTCACGGCGTTGGCCACTTCTT-TAMRA-3'

#### RPA1

Forward Primer; 5'-GCCTATAAGCTTCGTGGATGGT-3'

Reverse Primer; 5'-CCGCTCT TTAGATCAGAGATGGA-3'

TaqMan Probe; 5'-FAM-ACCATCTAAGGCTTGTCCTTCTGCGTCA-TAMRA-3'

#### GAPDH

Forward Primer; 5'-GAAGGTGA AGGTCGGAGTC-3'

Reverse Primer; 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTTC-3'

TaqMan Probe; 5'-FAM-CAAGCTTCCCGTTCTCAGCC-TAMRA-3'

HUVECs より抽出した全 RNA 約 1 $\mu$ g に対し、プライマーとして oligo(dT)を用い、TaqMan Transcription Reagents にて逆転写させ、鋳型 cDNA を作成した。鋳型 cDNA 100 ng、各プライマー 400 nmol/L、TaqMan プローブ 200 nmol/L、および 1 $\times$  TaqMan Universal Master Mix を含む 25  $\mu$ L の混合液を作成し、ABI PRISM 7700 Sequence Detection System を用いて、50 $^{\circ}$ C $\times$ 2 分間、95 $^{\circ}$ C $\times$ 10 分間の加熱処理後、PCR 反応 (95 $^{\circ}$ C $\times$ 15 秒間、60 $^{\circ}$ C $\times$ 1 分間を 40 回)を行った。

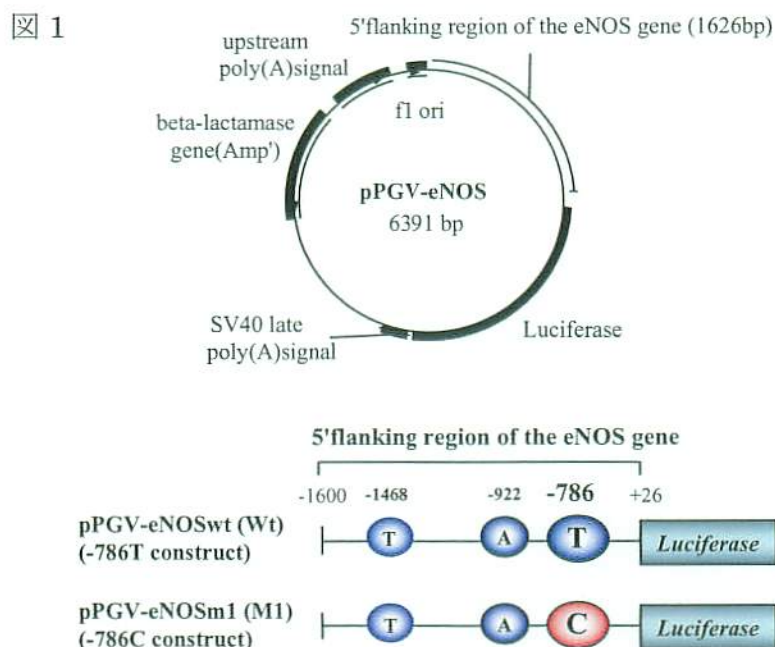
検量線作成には、eNOS、RPA1 および GAPDH の PCR 産物を導入したプラスミド DNA の希釈系列を用いた。各サンプルの eNOS、RPA1 遺伝子の発現量は、GAPDH 遺伝子発現を定量し、サンプル毎に補正した。

#### 6-4 eNOS mRNA 安定化の検討

eNOS mRNA 安定化の実験では、細胞は、スタチン添加前に転写阻害薬であるアクチノマイシン D (5 $\mu$ g/ml) で 1 時間、前処置を行った後、実験を行った。

## 6-5 ルシフェラーゼリポーター遺伝子アッセイ

-786Cあるいは-786Tを含んだ1626塩基対のeNOS遺伝子のプロモーター領域(nucleotide position -1600 to +26)を組み込んだeNOSプロモーター/*Photinus pyralis*ルシフェラーゼリポーター遺伝子プラスミドを作成した(図1)。*-786T*を含むプラスミドをpPGV-eNOSwt (Wt)、*-786C*を含むプラスミドをpPGV-eNOSm1 (M1)とした。



この各プラスミド(1 $\mu$ g)は、内在性コントロールとして、単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼプロモーター領域を含んだチミジンキナーゼプロモーター/*Renilla reniformis*ルシフェラーゼリポーター遺伝子プラスミド(pRL-TK control Vector)2 $\mu$ gと共に、TransIT-LT2を用いて細胞内へ導入した。プラスミド導入8時間後、新鮮な培養液へ交換し、この際にスタチン添加を行い、さらに48時間培養した。その後、reporter lysis buffer (PLD-30)を用いて、細胞の回収を行い、PicaGene Dual Luciferase Assay Systemを用いてLuminometerにて*Photinus pyralis*ルシフェラーゼ活性および*Renilla reniformis*ルシフェラーゼ活性を測定した。これにより、eNOS遺伝子の転写活性は、*Photinus pyralis*ルシフェラーゼ活性/*Renilla reniformis*ルシフェラーゼ活性の比で評価した。

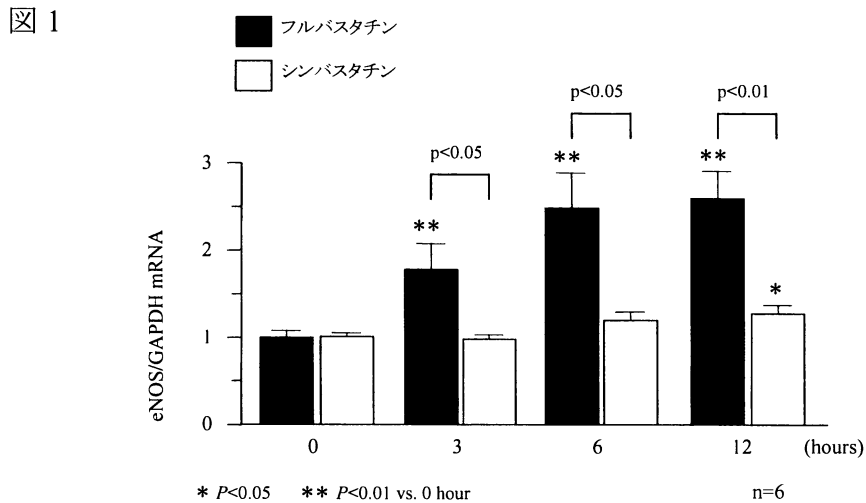
## 6-6 統計学的解析

結果は、平均値 $\pm$ 標準誤差にて表記した。統計学的解析は、unpaired t testを用い、P値0.05未満を有意と判断した。

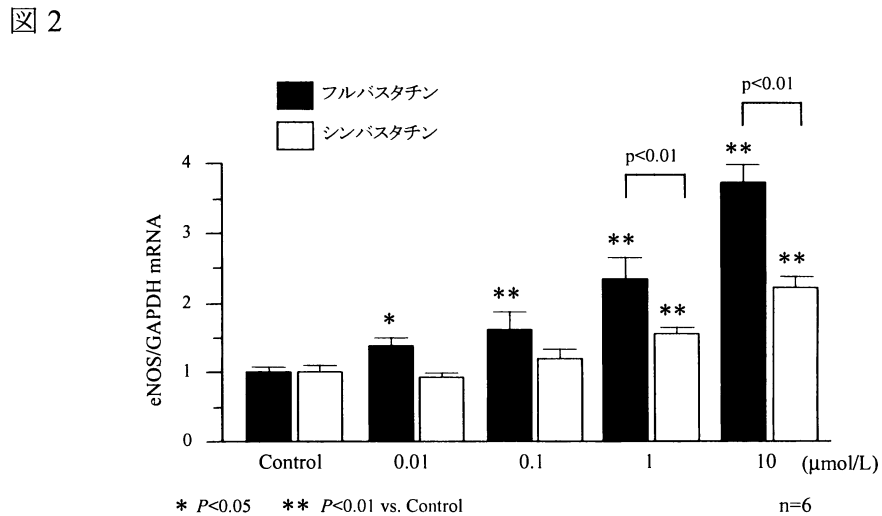
## 7. 実験結果

### 7-1 eNOS 遺伝子発現に対するスタチンの効果

フルバスタチン (1 $\mu$ mol/L) およびシンバスタチン (1 $\mu$ mol/L) の時間における eNOS 遺伝子発現に対する効果を図 1 に示す。フルバスタチンとシンバスタチンは、時間依存性に eNOS 遺伝子発現を上昇させることが確認された。その効果は、同時間において、フルバスタチンがシンバスタチンより有意に強かった。



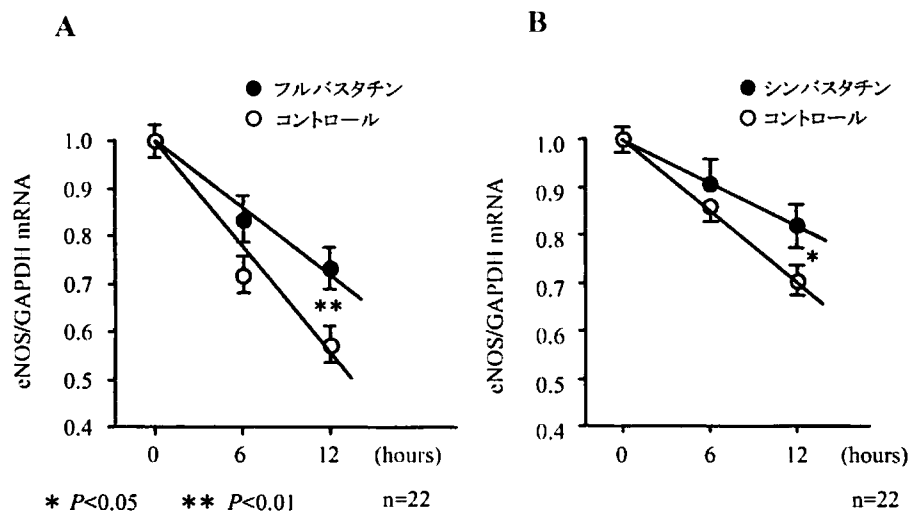
フルバスタチンおよびシンバスタチンの濃度における eNOS 遺伝子発現に対する効果を図 2 に示す。フルバスタチンとシンバスタチンは、添加 12 時間後において、濃度依存性に eNOS 遺伝子発現を上昇させることが確認された。その効果は、同濃度において、フルバスタチンがシンバスタチンより有意に強かった。



### 7-2 eNOS mRNA の安定化に対するスタチンの効果

フルバスタチンとシンバスタチンの eNOS mRNA の安定化に対する効果を、それぞれ図 3 の(A)と(B)に示す。フルバスタチンのコントロール群では、転写阻害薬であるアクチノマイシン D (5 $\mu$ g/ml) だけで前処置を行い、eNOS mRNA levels は、ベースライン(0 時間)に比べて、6 時間で 71.5 $\pm$ 3.8%、12 時間で 57.3 $\pm$ 3.8%まで減少したが、フルバスタチン (1 $\mu$ mol/L) を添加しておく、eNOS mRNA levels は、ベースライン(0 時間)に比べて、6 時間で 85.8 $\pm$ 3.0%、12 時間で 70.4 $\pm$ 3.1% の減少であった。従って、フルバスタチンは、12 時間後に mRNA の安定性を 1.28 倍増加させた ( $p<0.01$ )。同様に、シンバスタチンは、12 時間で mRNA の安定性を 1.16 倍増加させた( $p<0.05$ )。

図 3



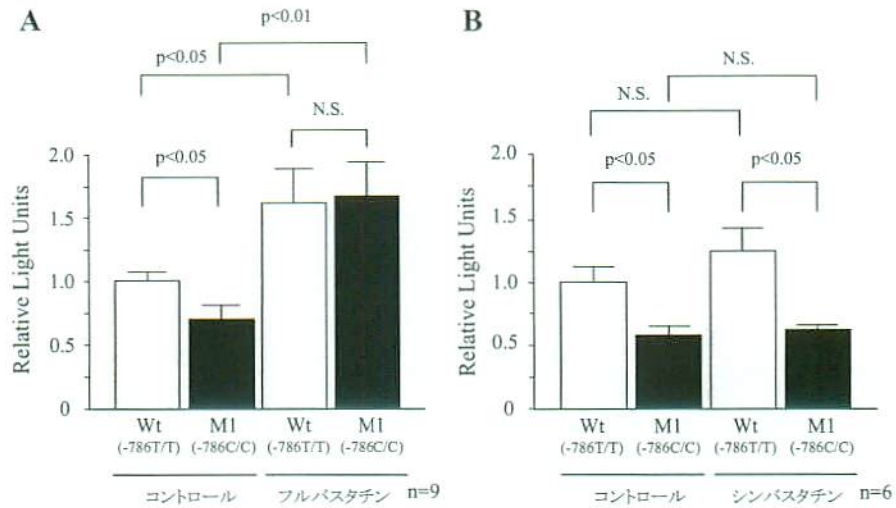
### 7-3 eNOS 遺伝子の転写活性に対するスタチンの効果

フルバスタチン (1  $\mu$ mol/L) は、図 4(A)に示す如く、コントロールに比べて eNOS 遺伝子の転写活性を、-786T の eNOS 遺伝子プロモーターを含むプラスミドで、1.6 $\pm$ 0.3 倍 ( $p<0.05$ )、-786C の eNOS 遺伝子プロモーターを含むプラスミドで 2.4 $\pm$ 0.4 倍 ( $p<0.01$ ) 上昇させた。元々、コントロール状態では、eNOS 遺伝子の転写活性は、-786C の eNOS 遺伝子プロモーターを含むプラスミドが、-786T の eNOS 遺伝子プロモーターを含むプラスミドに比べて、-30 $\pm$ 11%低下していた ( $p<0.05$ )。しかしながら、フルバスタチン添加後には、-786T に比べて、-786C のプラスミドでより転写活性を増強するために、-786T と-786C のプラスミド間に存在していた転写活性の差はみられなくなった。



シンバスタチン(1  $\mu\text{mol/L}$ )は、図 4(B)に示す如く、eNOS 遺伝子の転写活性に影響を与えることはなかったため、コントロール状態およびシンバスタチン添加の状態共に、プラスミド間の eNOS 遺伝子の転写活性の差が存在したままで、変化することはなかった。

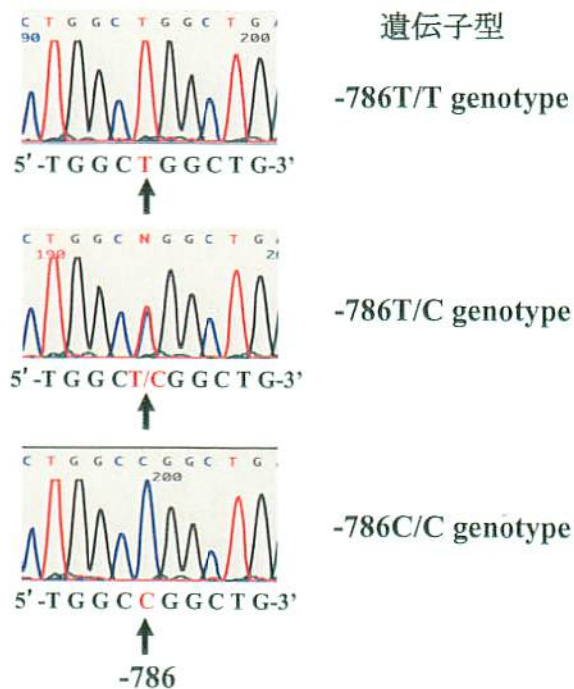
図 4



#### 7-4 HUVECs における eNOS 遺伝子-786T/C 遺伝子型の同定

図 5 に示す如く、HUVECs の eNOS 遺伝子をダイレクトシーケンシングした結果、-786T/C 遺伝子型を同定した。

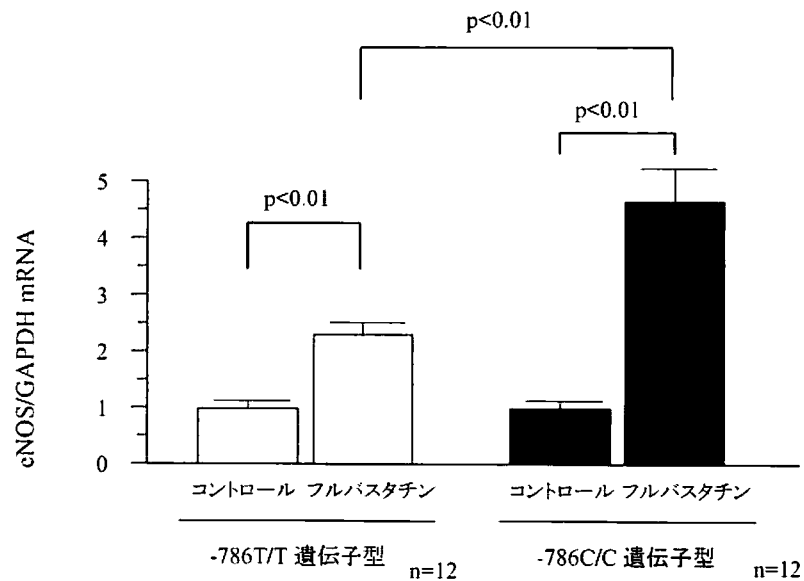
図 5



### 7-5 eNOS 遺伝子発現に対する-786T/C 遺伝子多型とフルバスタチンの効果

フルバスタチン(1 $\mu$ mol/L)は、図 6 に示す如く、-786T/T 遺伝子型の HUVECs の eNOS 遺伝子発現をコントロールに比べて、 $2.3 \pm 0.2$  倍上昇させ ( $p < 0.01$ )、-786C/C 遺伝子型の HUVECs の eNOS 遺伝子発現を  $4.7 \pm 0.5$  倍上昇させた ( $p < 0.01$ )。よって、フルバスタチンの-786C/C 遺伝子型に対する eNOS 遺伝子の発現率は、-786T/T 遺伝子型に比べて、有意に高かった ( $p < 0.01$ )。

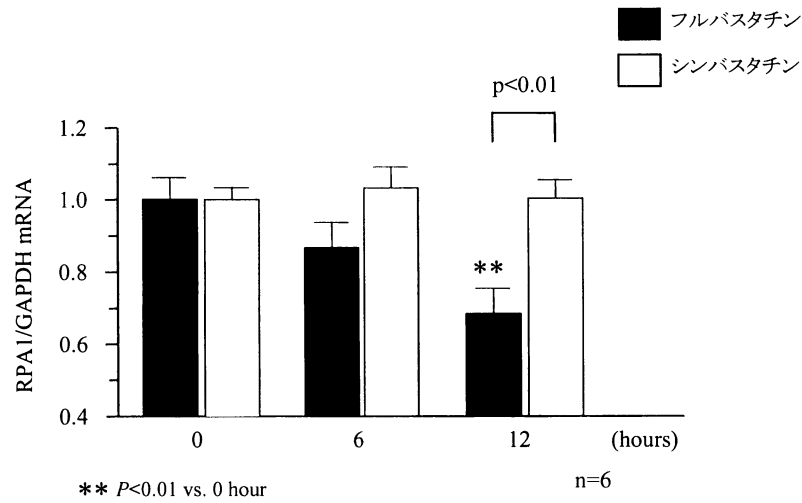
図 6



### 7-6 RPA1 遺伝子発現に対するスタチンの効果

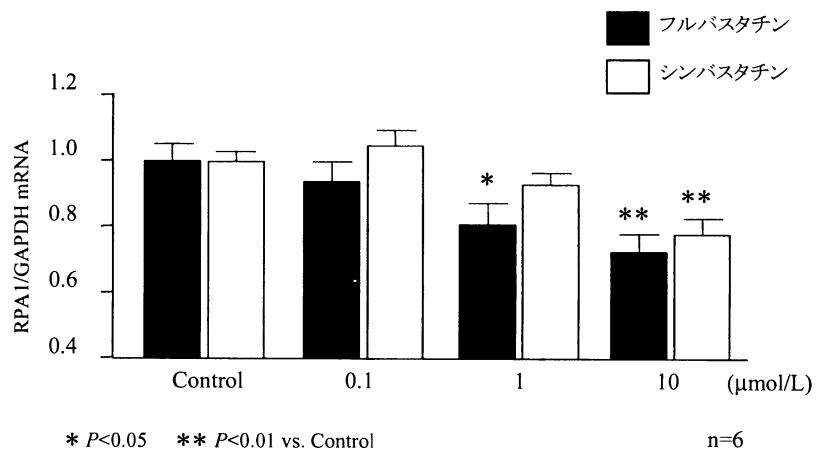
フルバスタチン (1 $\mu$ mol/L) およびシンバスタチン (1 $\mu$ mol/L) の時間における RPA1 遺伝子発現に対する効果を図 7 に示す。フルバスタチンは、時間依存性に RPA1 の遺伝子発現を減少させることが確認された。シンバスタチンに関しては、1  $\mu$ mol/L の濃度では、RPA1 遺伝子発現に影響しなかった。

図 7



フルバスタチンおよびシンバスタチンの濃度における RPA1 遺伝子発現に対する効果を図 8 に示す。フルバスタチンは、添加 12 時間後において、濃度依存性に RPA1 遺伝子発現を減少させたが、シンバスタチンに関しては、1  $\mu\text{mol/L}$  の濃度までは、RPA1 遺伝子発現に影響しなかったが、10  $\mu\text{mol/L}$  の濃度では、 $22.1 \pm 4.6\%$  の RPA1 遺伝子発現の減少が見られた。

図 8



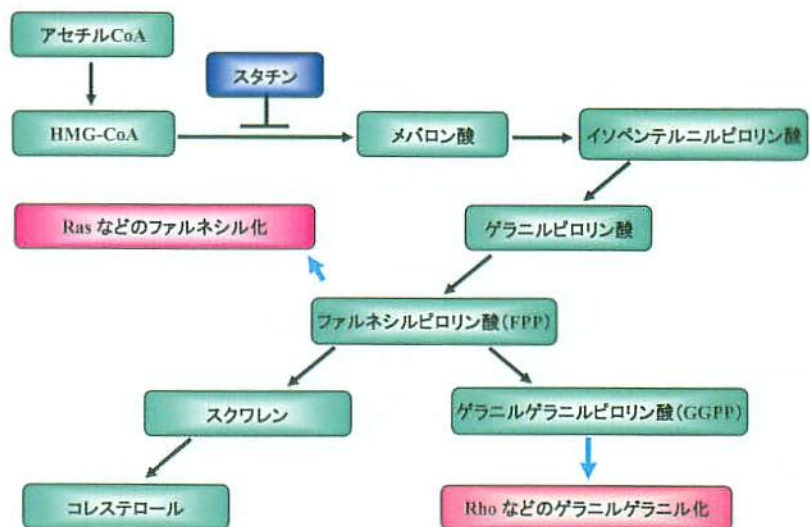
## 8. 考察

スタチンの pleiotropic effect に対する研究として、以前から内皮細胞において各種のスタチンが eNOS 遺伝子の発現を上昇させることは報告されている[59, 63, 64]。今回、我々の研究においても、フルバスタチンとシンバスタチンが共に、eNOS 遺伝子の発現を上昇させることを確認した。しかしながら、同時間、同濃度において、その効果は、フルバスタチンでより大きかった。このことは、eNOS 遺伝子の発現に対するスタチンの作用機序に違いがある可能性を示唆させるものであった。

続いて、eNOS 遺伝子の発現に対するフルバスタチンとシンバスタチンの違いを検討するために、eNOS mRNA の安定性と eNOS 遺伝子の転写活性を検討した結果、フルバスタチンは、mRNA の安定性と転写活性共に増加させ、eNOS 遺伝子を上昇させるのに対し、シンバスタチンは、mRNA の安定性だけを増加させて、eNOS 遺伝子を増加させることが確認された。Laufs らは、スタチンは、eNOS 遺伝子の転写活性には影響を与えず、mRNA の安定性だけを増加させ、eNOS 遺伝子を増加させることを報告している[59]が、この時には、シンバスタチンを用いて行われた結果であった。事実、本研究で行ったシンバスタチンの結果は、彼らの結果と同様であった。従って、フルバスタチンは、シンバスタチンとは異なり、転写活性を増加させる作用を持つことで、eNOS 遺伝子の発現をより上昇させることが示唆され、また、スタチン間には、eNOS 遺伝子の発現のメカニズムにおいて違いがみられることがわかった。

スタチンにおける eNOS mRNA の安定性増加のメカニズムは、Laufs らが、Rho の翻訳後脂質修飾(ゲラニルゲラニル化)を抑制するによると報告している[65]。スタチンが、コレステロール生合成を抑制する際には、メバロン酸からコレステロールに至る代謝経路の中間代謝産物も抑制する(図 1)。その中間産物のうちイソプレノイドとよばれるファルネシルピロリン酸(FPP)とゲラニルゲラニルピロリン酸(GGPP)は

図 1



様々な蛋白の翻訳後脂質修飾に機能している。細胞質に存在する低分子 G 蛋白である Rho は、GGPP による翻訳後脂質修飾にて細胞膜に移行し、活性化する。Rho の活性は、アクチン繊維の形成や集合を刺激し、細胞骨格を変化させ、再構築に導くことが確認されている[66]。スタチンによる eNOS mRNA の安定性増加は、Rho 由来の細胞内骨格の変化を抑制することによると考えられている。今回の実験結果であるフルバスタチンとシンバスタチンによる eNOS 遺伝子発現の違いは、転写活性への作用の有無で説明できたが、-786T/C 遺伝子多型間のフルバスタチンによる eNOS 遺伝子発現の違いについては、eNOS mRNA の安定性増加では、十分に説明はできない。

本研究では、フルバスタチンが eNOS 遺伝子の転写活性を増加させる作用を持つことだけではなく、さらにその効果は、-786T/C 遺伝子多型間で違っていることを示した。-786T アリル、-786C アリル共に eNOS 遺伝子の転写活性を上昇させたが、その効果は、-786T アリルに比べて-786C アリルでより強かったため、元々、コントロール状態でアリル間にみられた転写活性の差が、フルバスタチン添加後には消失してしまった。実際に、-786T/T 遺伝子型と-786C/C 遺伝子型のヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVECs) を用いて、このルシフェラーゼリポーター遺伝子アッセイでの結果を検討したが、フルバスタチンが、-786T/T 遺伝子型に比べて、-786C/C 遺伝子型の細胞で eNOS 遺伝子発現がより大きいことを確認した。尚、シンバスタチンは、-786T/C 遺伝子多型に関係なく、eNOS 遺伝子の転写活性には、影響しないことも確認した。

我々は、以前、RPA1 が eNOS 遺伝子の-786C アリルに特異的に結合することで、-786T アリルに比べて、-786C アリルの eNOS 遺伝子の転写活性を有意に抑制することを報告した[32]が、フルバスタチンの転写活性への違いが RPA1 による可能性を考えて、フルバスタチンの RPA1 遺伝子発現への作用を検討したところ、フルバスタチンは、RPA1 の遺伝子発現を減少させた。この結果は、フルバスタチンが、RPA1 産生を減少させることで、-786C アリルの eNOS 遺伝子の転写活性をより増強させたことを示唆している。一方、シンバスタチンは、1  $\mu\text{mol/L}$  までの濃度では、RPA1 の遺伝子発現には影響せず、この結果、-786T/C 遺伝子多型に関係なく、eNOS 遺伝子の転写活性にも影響しなかったと考えられる。

実験で使用する薬剤の濃度は、非常に重要であると思われる。実際の臨床現場で使用される投与量であるフルバスタチン 40mg の血中濃度のピークは、448 ng/mL (1.03  $\mu\text{mol/L}$ )と報告されている(表 1)[67]。従って、今回の実験で使用したフルバスタチンの使用量は、フルバスタチンを投与されている患者さんの血中濃度と非常に近似していた。一方、同じく臨床的な投与量であるシンバスタチン 40mg の血中濃度のピークは、10-34 ng/mL (0.02-0.08  $\mu\text{mol/L}$ )であり、本研究で用い

たシンバスタチンの量は、非常に高濃度であった。

表 1

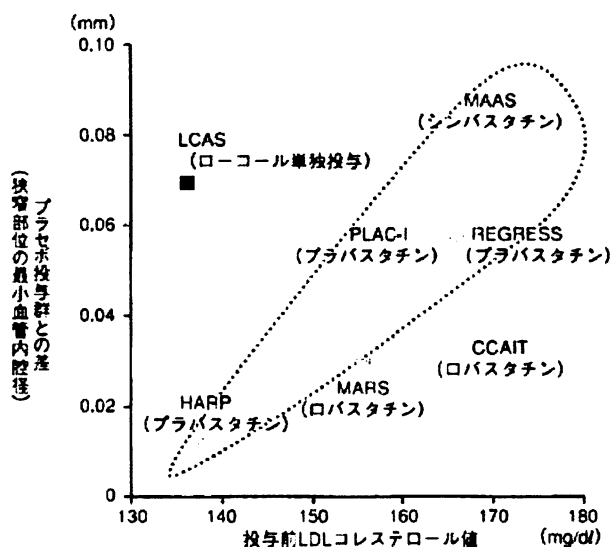
Parameter	Atorvastatin	Cerivastatin	Fluvastatin	Lovastatin	Pravastatin	Simvastatin
Absorption						
Fraction absorbed (%)	30	98	98	30	34	60-80
$T_{max}$ (hr)	2-3	2.5	0.5-1	2-4	0.9-1.6	1.3-2.4
$C_{max}$ (ng/mL)	27-66	2	448	10-20	45-55	10-34
Bioavailability (%)	12	60	19-29	5	18	5
Effect of food	↓13%	0	↓15% to ↑25%	↑50%	↓30%	0
Distribution						
Fraction bound (%)	80-90	>99	>99	>95	43-55	94-98
Lipophilicity, $C \log P$ (octanol/water)	4.06 (1,482)	1.47 (29.51)	3.24 (1738)	4.27 (18,620)	-0.22 (0.60)	4.68 (47,860)
Metabolism						
Hepatic extraction (%)	>70	NA	>68	>70	46-66	78-87
Systemic metabolites	Active	Active	Inactive	Active	Inactive	Active
Clearance (L/hr/kg)	0.25	0.20	0.97	0.26-1.1	0.81	0.45
Excretion						
$t_{1/2}$ (hr)	15-30	2.1-3.1	0.5-2.3	2.9	1.3-2.8	2-3
Urinary excretion (%)	Negligible	30	6	10	20	13
Fecal excretion (%)	Major route	70	90	83	71	58

Based on a 40 mg oral dose, with the exception of cerivastatin (0.2 mg). NA, no available data at present;  $t_{1/2}$ , terminal elimination half-life.

(文献 67 より引用)

本研究では、eNOS の遺伝子発現に対するフルバスタチンとシンバスタチンの違いが明らかとなった。フルバスタチンとシンバスタチンは、共に HMG-CoA 還元酵素阻害薬ではあるが、これらのスタチン間にみられる構造的な違いが、eNOS および RPA1 の遺伝子発現に違いをもたらしたのかもしれない。本研究の結果のようなスタチン間の効果の違いは、臨床試験でも認められる。フルバスタチンを用いた Lipoprotein and Coronary Atherosclerosis Study (LCAS) 試験では、動脈硬化進展抑制効果が示されている[68]が、他のスタチンによる同様な試験でも、投与前のコレステロールが高いほど進展抑制効果が強く現れており(図 2)、これは、コレステロール低下に基づく結果と考えられていた。しかしながら、LCAS 試験では、投与前コレステロール値が正常付近であるにもかかわらず、進展抑制効果が強くみられており、コレステロール低下以外の作用で、他のスタチンとは異なる作用の関与が指摘されている。

図 2



(文献 68 より改変引用)

本研究では、フルバスタチンによる eNOS 遺伝子の転写活性増加や RPA1 の遺伝子発現減少のメカニズムは、まだ十分に明らかになっていない。コレステロール減少には依存しない比較的早期から、eNOS の遺伝子発現の上昇が誘発されることから、フルバスタチンは、HMG-CoA 還元酵素の阻害とは非依存的に、直接あるいは転写因子を介して、eNOS の遺伝子発現に作用すると考えられる。実際、単核球や内皮細胞において、HMG-CoA 還元酵素の阻害とは非依存的に、スタチンが作用を及ぼすことが報告されている[69, 70]。フルバスタチンが RPA1 の遺伝子発現を減少させる作用に関して、HMG-CoA 還元酵素の阻害に依存するかどうかなどについて明らかにするには、さらなる研究が必要と思われる。

当教室では、冠攣縮の研究を行うなかで、内皮由来の NO の生理学的活性が不十分となるような血管内皮障害がその病因であることを報告してきた。この原因として、喫煙などの環境因子だけでなく、eNOS 遺伝子の遺伝子多型に見られるような遺伝的因子も明らかにした。遺伝的因子に関しては、冠攣縮だけでなく、急性心筋梗塞などを含めた冠動脈疾患までにも関連してきた。ヒトの冠動脈を含めた動脈硬化をおこした血管病変でも、eNOS 蛋白や NO 産生が著しく低下し、内皮由来の NO の生理学的活性が障害されている[71, 72, 73]。最近の報告では、日本人の冠攣縮性狭心症の患者より見出させた eNOS 遺伝子の-786 T/C 遺伝子多型が、Caucasians においても、冠動脈疾患と関連があることが示された[74]。以上のことから、冠動脈疾患において内皮機能障害を改善する方法のひとつとして、障害された NO 産生を回復することが重要であろう。eNOS の遺伝子発現を上昇させることは、NO 産生の改善につながると考えられる。従って、eNOS の遺伝子発現を上昇させるフルバスタチンは、冠動脈疾患の患者にとって有効である可能性が考えられ、さらに、-786C/C 遺伝子型で eNOS 遺伝子発現が大きかったことから、特に、-786C アリルの患者においては、その効果は大きいと考えられる。そのためにも、冠動脈疾患とくに冠攣縮を病態とした疾患を対象としたフルバスタチンの臨床研究が必要である。

## 9. 結 語

本研究は、フルバスタチンが、eNOS 遺伝子の転写活性と mRNA の安定化を増加させることで、eNOS 遺伝子の発現を上昇させることを示した。また、フルバスタチンの eNOS 遺伝子の転写活性に対する効果は、-786T アリルに比べて、-786 C アリルでより増強し、フルバスタチンによる eNOS 遺伝子発現も、-786C/C 遺伝子型で大きかった。従って、フルバスタチンは、eNOS 遺伝子の発現を上昇させることで、内皮の NO 産生をより増強させ、冠動脈疾患の患者、特に-786C アリルをもつ患者においては、より有益である可能性が示唆された。



## 10. 文 献

1. Yasue H, Omote S, Takizawa A, Nagao M, Miwa K, Tanaka S. Exertional angina pectoris caused by coronary artery spasm: effects of various drugs. *Am J Cardiol.* 1979;43:647-652.
2. Yasue H, Omote S, Takizawa A, Nagao M. Coronary artery spasm in ischemic heart disease and its pathogenesis. *Circ Res.* 1983;52:1147-1152.
3. Yasue H, Omote S, Takizawa A, Nagao M, Miwa K, Tanaka S. Circadian variation of exercise capacity in patients with Prinzmetal's variant angina: role of exercise-induced coronary arterial spasm. *Circulation.* 1979;59:938-948.
4. Yasue H, Horio Y, Nakamura N, Fujii H, Imoto N, Sonoda R, et al. Induction of coronary artery spasm by acetylcholine in patients with variant angina: possible role of the parasympathetic nervous system. *Circulation.* 1986;74:955-963.
5. Kugiyama K, Yasue H, Ohgushi M, Motoyama T, Kawano H, Inobe Y, et al. Deficiency in nitric oxide bioactivity in epicardial coronary arteries of cigarette smoker. *J Am Coll Cardiol.* 1996;28:1161-1167.
6. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 1980;288:373-376.
7. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* 1987;327:524-526.
8. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1987;84:9265-9268.
9. Okumura K, Yasue H, Matsuyama K, et al. Diffuse disorder of coronary artery vasomotility in patients with coronary spastic angina. Hyperreactivity to the constrictor effects of acetylcholine and the dilator effects of nitroglycerin. *J Am Coll Cardiol.* 1996;27:45-52.
10. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 1991;43:109-142.
11. Kugiyama K, Yasue H, Okumura K, Ogawa H, Fujimoto K, Nakao K, et al. Nitric oxide activity is deficient in spasm arteries of patients with coronary spastic angina. *Circulation.* 1996;94:266-272.
12. Takaoka H, Yoshimura M, Ogawa H, Kugiyama K, Nakayama M, Shimasaki Y, et al. Comparison of the risk factors for coronary artery spasm with those for organic stenosis in a Japanese population: role of cigarette smoking. *Int J Cardiol.* 2000;724:121-126.

13. Kugiyama K, Motoyama T, Hirashima O, Ohgushi M, Soejima H, et al. Vitamin C attenuates abnormal vasomotor reactivity in spasm coronary arteries in patients with coronary spastic angina. *J Am Coll Cardiol.* 1998;**32**:103-109.
14. Prinstipino C, Beltrame JF, Finocchiaro ML, Hattori R, Fujita M, Mongiardo R, et al. Major racial deficiencies in coronary constridor response between Japanese and Caucasians with myocardial infarction. *Circulation.* 2000;**101**:1102-1108.
15. Forstermann U, Pollock JS, Schmidt HH, Heller M, Murad F. Calmodulin-dependent endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase activity is present in the particulate and cytosolic fraction of bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991;**88**:1788-1792.
16. Li H, Wallerath T, Forstermann U. Physiological mechanisms regulating the expression of endothelial-type NO synthase. *Nitric Oxide.* 2002;**7**:149-164.
17. Michel JB, Feron O, Sacks D, Michel T. Reciprocal regulation of endothelial nitric-oxide synthase by Ca<sup>2+</sup>-calmodulin and caveolin. *J Biol Chem.* 1997;**272**:15583-15586.
18. Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, et al. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature.* 1999;**399**:597-601.
19. Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;**88**:4651-4655.
20. Scott-Burden T, Schini VB, Elizondo E, Junquero DC, Vanhoutte PM. Platelet-derived growth factor suppresses and fibroblast growth factor enhances cytokine-induced production of nitric oxide by cultured smooth muscle cells. Effects on cell proliferation. *Circ Res.* 1992;**71**:1088-1100.
21. Garg UC, Hassid A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest.* 1989;**83**:1774-1777.
22. Marsden PA, Heng HH, Scherer SW, Stewart RJ, Hall AV, Shi XM, et al. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem.* 1993;**268**:17478-17488.
23. Karantzoulis-Fegaras F, Antoniou H, Lai SL, Kulkarni G, D'Abreo C, et al. Characterization of the human endothelial nitric-oxide synthase promoter. *J Biol Chem.* 1999;**274**:3076-3093.

24. MacRitchie AN, Jun SS, Chen Z, German Z, Yuhanna IS, Sherman TS, et al. Estrogen upregulates endothelial nitric oxide synthase gene expression in fetal pulmonary artery endothelium. *Circ Res.* 1997;**81**:355-362.
25. Li H, Wallerath T, Forstermann U. Physiological mechanisms regulating the expression of endothelial-type NO synthase. *Nitric Oxide.* 2002;**7**:132-147.
26. Yoshimura M, Yasue H, Nakayama M, Shimasaki Y, Hitoshi Sumida, Seigo Sugiyama, et al. A missense Glu298Asp variant in the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm in the Japanese. *Hum Genet.* 1998;**108**:65-69.
27. Miyamoto Y, Saito Y, Kajiyama N, Yoshimura M, Shimasaki Y, Nakayama M, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension. *Hypertension.* 1998;**32**:3-8.
28. Shimasaki Y, Yasue H, Yoshimura M, Nakayama M, Kugiyama K, Ogawa H, et al. Association of the missense Glu298Asp variant of the endothelial nitric oxide synthase gene with myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 1998;**31**:1506-1510.
29. Nakayama M, Yasue H, Yoshimura M, Shimasaki Y, Kugiyama K, Ogawa H, et al. T<sup>-786</sup>→C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm. *Circulation.* 1999;**99**:2864-2870.
30. Nakayama M, Yasue H, Yoshimura M, Shimasaki Y, Ogawa H, Kugiyama K, et al. T<sup>-786</sup>→C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with myocardial infarction, especially without coronary organic stenosis. *Am J Cardiol.* 2000;**86**:628-634.
31. Nakayama M, Yoshimura M, Sakamoto T, Abe K, Yamamuro M, Shono M, et al. A -786T>C polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene reduces serum nitrite/nitrate from the heart due to an intracoronary injection of acetylcholine. *Pharmacogenet Genomics.* 2006 (in press).
32. Miyamoto Y, Saito Y, Nakayama M, Shimasaki Y, Yoshimura T, Yoshimura M, et al. Replication protein A1 reduces transcription of the endothelial nitric oxide synthase gene containing a -786T→C mutation associated with coronary spastic angina. *Hum Mol Genet.* 2000;**9**:2629-2637.
33. Bochkarev A, Pfuetzner RA, Edwards AM, Frappier L. Structure of the single-stranded-DNA-binding domain of replication protein A bound to DNA. *Nature.* 1997;**385**:176-181.

34. Wold MS, Kelly T. Purification and characterization of replication protein A, a cellular protein required for in vitro replication of simian virus 40 DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;**85**:2523-2527.
35. Kastelein JJ. The future of best practice. *Atherosclerosis*. 1999;**143**:S17-S21.
36. Gordon T, Kannel WB. Premature mortality from coronary heart disease: the Framingham study. *JAMA*. 1971;**215**:1617-1625.
37. Iso H, Jacobs DR Jr, Wentworth D, Neaton JD, Cohen JD. Serum cholesterol levels and six-year mortality from stroke in 350,977 men screened for the multiple risk factor intervention trial. *N Engl J Med*. 1989;**320**:904-910.
38. Sytkowski PA, Kannel WB, D'Agostino RB. Change in risk factors and the decline in mortality from cardiovascular disease: the Framingham Heart Study. *N Engl J Med*. 1990;**322**:1635-1641.
39. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet*. 1994;**344**:1383-1389.
40. Prevention of cardiovascular events and death with pravastatin in patients with coronary heart disease and a broad range of initial cholesterol levels: the Long-Term Intervention With Pravastatin in ischemic Disease (LIPID) Study Group. *N Engl J Med*. 1998;**339**:1349-1357.
41. Sacks FM, Pfeffer MA, Moye LA, Rouleau JL, Rutherford JD, Cole TG, et al. The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels: Cholesterol and Recurrent Events Trial investigators. *N Engl J Med*. 1996;**335**:1001-1009.
42. Shepherd J, Cobbs SM, Ford I, Isles CG, Lorimer AR, MacFarlane PW. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia: West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *N Engl J Med*. 1995;**333**:1301-1307.
43. Klag MJ, Ford DE, Mead LA, He J, Whelton PK, Liang KY, et al. Serum cholesterol in young men and subsequent cardiovascular disease. *N Engl J Med*. 1993;**328**:313-318.
44. Tamai O, Matsuoka H, Itabe H, Wada Y, Kohno K, Imaizumi T. Single LDL apheresis improves endothelium-dependent vasodilatation in hypercholesterolemic humans. *Circulation*. 1997;**95**:76-82.
45. Brown BG, Zhao XQ, Sacco DE, Albers JJ. Lipid lowering and plaque regression: new insights into prevention of plaque disruption and clinical events in coronary disease. *Circulation*. 1993;**87**:1781-1791.

46. Pekkanen J, Linn S, Heiss G, Suchindran CM, Leon A, Rifkind BM, et al. Ten-year mortality from cardiovascular disease in relation to cholesterol level among men with and without preexisting cardiovascular disease. *N Engl J Med.* 1990;**322**:1700-1707.
47. Schwartz GG, Olsson AG, Ezekowitz MD, Ganz P, Oliver MF, Waters D, et al. Effects of atorvastatin on early recurrent ischemic events in acute coronary syndrome: the MIRACL study: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2001;**285**:1711-1718.
48. Omori H, Nagashima H, Tsurumi Y, Takagi A, Ishizuka N, Hagiwara N, et al. Direct in vivo evidence of a vascular statin: a single dose of cerivastatin rapidly increases vascular endothelial responsiveness in healthy normocholesterolaemic subjects. *Br J Clin Pharmacol.* 2002;**54**:395-399.
49. O'Driscoll, Green D, Taylor RR. Simvastatin, an HMG-coenzyme: a reduction inhibitor, improves endothelial function within 1 month. *Circulation.* 1997;**95**:1126-1131.
50. Mason RP, Walter MF, Jacob RF. Effects of HMG-CoA reductase inhibitors on endothelial function: role of microdomains and oxidative stress. *Circulation.* 2004;**109**(suppl):II34-41.
51. Rikitake Y, Kawashima S, Takeshita S, Yamashita T, Azumi H, Yasuhara M, et al. Anti-oxidative properties of fluvastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, contribute to prevention of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis.* 2001;**154**:87-96.
52. Sukhova GK, Williams JK, Libby P. Statins reduce inflammation in atheroma of nonhuman primates independent of effects on serum cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;**22**:1452-1458.
53. Indolfi C, Cioppa A, Stabile E, Di Lorenzo E, Esposito G, Pisani A, et al. Effects of hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor simvastatin on smooth muscle cell proliferation in vitro and neointimal formation in vivo after vascular injury. *J Am Coll Cardiol.* 2000;**35**:214-221.
54. Libby P, Aikawa M. Mechanism of plaque stabilization with statins. *Am J Cardiol.* 2003;**91**(suppl):4B-8B.
55. Takemoto M, Liao JK. Pleiotropic effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;**21**:1712-1719.
56. Wolfrum S, Jensen KS, Liao JK. Endothelium-dependent effects of statins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;**23**:729-736.
57. Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation.* 2004;**109**(suppl):III27-32.

58. Lauf U, Futa VL, Liao JK. Inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG) CoA reductase blocks hypoxia-mediated down-regulation of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem.* 1997;297:31725-31729.
59. Laufs U, La Fata V, Plutzky J, Liao JK. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation.* 1998;97:1129-1135.
60. Kureishi Y, Luo Z, Shiojima I, Bialik A, Fulton D, Lefer DJ, et al. The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. *Nat Med.* 2000;6:1004-1010.
61. Coffey PJ, Jin J, Woodgett JR. Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3 kinase activation. *Biochem J.* 1998;335:1-13.
62. Downward J. Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. *Curr Opin Cell Biol.* 1998;10:262-267.
63. Hernandez-Perera O, Perez-Sala D, Navarro-Antolin J, Sanchez-Pascuala R, Hernandez G, Diaz C, et al. Effects of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors, atorvastatin and simvastatin, on the expression of endothelin-1 and endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *J Clin Invest.* 1998;101:2711-2719.
64. Hattori Y, Nakanishi N, Akimoto K, Yoshida M, Kasai K. HMG-CoA reductase inhibitor increases GTP Cyclohydrolase I mRNA and tetrahydrobiopterin in vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:176-182.
65. Laufs U, Liao JK. Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase. *J Biol Chem.* 1998;273:24266-24271.
66. Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science.* 1998;279:509-514.
67. Corsini A, Bellosta S, Baetta R, Fumagalli R, Paoletti R, Bernini Franco. New insights into the pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of statins. *Pharmacol Ther.* 1999;84:413-428.
68. Herd JA, Ballantyne CM, Farmer JA, et al. Effects of fluvastatin on coronary atherosclerosis in patients with mild and moderate cholesterol elevations (Lipoprotein and Coronary Atherosclerosis Study (LCAS)). *Am J Cardiol.* 1997;80:278-286.
69. Weitz-Schmidt G, Welzenbach K, Brinkmann V, Kamata T, Kallen J, Bruns C, et al. Statins selectively inhibit leukocyte function antigen-1 by binding to a novel regulatory integrin site. *Nat Med.* 2001;7:687-692.

70. Wagner AH, Gebauer M, Guldenzoph B, Hecker M. 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase-independent inhibition of CD40 expression by atorvastatin in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;**22**:1784-1789.
71. Oemar BS, Tschudi MR, Godoy N, Brovkovich V, Malinski T, Lüscher TF. Reduced endothelial nitric oxide synthase expression and production in human atherosclerosis. *Circulation.* 1998;**97**:2494-2498.
72. Quyyumi AA, Dakak N, Mulcahy D, Andrews NP, Husain S, Panza-JA, et al. Nitric oxide activity in the atherosclerotic human coronary circulation. *J Am Coll Cardiol.* 1997;**29**:308-317.
73. Tomasian D, Keaney JF, Vita JA. Antioxidants and the bioactivity of endothelium-derived nitric oxide. *Cardiovasc Res.* 2000;**47**:426-435.
74. Rossi GP, Cesari M, Zanchetta M, Colonna S, Maiolino G, Pedon L, et al. The T-786C endothelial nitric oxide synthase genotype is a novel risk factor for coronary artery disease in Caucasian patients of the GENICA study. *J Am Coll Cardiol.* 2003;**41**:930-937.