

熊本大学学術リポジトリ

Kumamoto University Repository System

Title	ヒト動脈硬化病変における内因性カンナビノイドシステムの発現とその意義
Author(s)	菅村, 公一
Citation	
Issue date	2008-03-25
Type	Thesis or Dissertation
URL	http://hdl.handle.net/2298/14411
Right	

学位論文 Doctor's Thesis

ヒト動脈硬化病変における内因性カンナビノイドシステムの発現とその意義
(Expression and Significance of Endocannabinoid System in Human Atheroma)

菅村 公一
Koichi Sugamura

熊本大学大学院医学教育部博士課程臨床医科学専攻循環器病態学

指導教員

小川 久雄 教授
熊本大学大学院医学教育部博士課程臨床医科学専攻循環器病態学

2008年3月

学 位 論 文

Doctor's Thesis

論文題名 :

ヒト動脈硬化病変における内因性カンナビノイドシステムの発現とその意義
(Expression and Significance of Endocannabinoid System in Human Atheroma)

著 者 名 : 菅 村 公 一
(単名) Koichi Sugamura

指導教員名 : 熊本大学大学院医学教育部博士課程臨床医科学専攻循環器病態学 小川久雄 教授

審査委員名 :	分子遺伝学	尾池 雄一 教授
	代謝内科学	荒木 栄一 教授
	生体機能薬理学	光山 勝慶 教授
	病態生化学	山縣 和也 教授

2008年3月

目次

1. 要旨	—1~2
2. 発表論文	—3
3. 謝辞	—4
4. 略語一覧	—5
5. 研究の背景と目的	—6~12
5-1 肥満と心血管疾患	
5-2 内因性カンナビノイドシステム	
5-3 CB1 受容体拮抗薬	
5-4 動脈硬化と炎症	
5-5 本研究の目的	
6. 研究方法	—13~29
6-1 免疫組織学的染色および定量化	
6-2 冠動脈粥腫切除標本	
6-3 ヒト血中内因性カンナビノイド測定	
6-4 細胞培養	
1) ヒト末梢血単核球分離培養マクロファージ	
2) ヒト単球系細胞株 (THP-1) 由来培養マクロファージ	
6-5 reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) 解析	
6-6 定量的リアルタイム RT-PCR 解析	
6-7 蛋白抽出および Western blot 解析	
6-8 M-CSF, oxidized low-density lipoprotein (OxLDL) による CB1 receptor 発現への影響	
6-9 各種サイトカインおよび Matrix metalloproteinase (MMP-9) の測定	
6-10 Small interfering RNA (siRNA) を用いた CB1 受容体ノックダウン	
6-11 Rimonabant が cell viability に及ぼす影響	
6-12 細胞内 cAMP 測定	
6-13 リン酸化 c-Jun N-terminal Kinase (JNK) の検出	
6-14 動脈硬化自然発症マウスにおける in vivo での効果検証	
6-15 マウス大動脈の露出と展開	
6-16 マウス大動脈弁基部における動脈硬化	
6-17 マウス血清中の脂質とアディポネクチン測定	
6-18 統計解析	
7. 研究結果	—30~46
7-1 ヒト冠動脈粥腫には CB1 および CB2 受容体が発現している	
7-2 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	
7-3 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	
7-4 分化誘導による CB1 および CB2 受容体発現への影響	
7-5 M-CSF と OxLDL は CB1 発現を増強する	

7-6	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	
7-7	分化誘導による内因性カンナビノイド分解合成酵素の発現変化	
7-8	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	
7-9	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	
7-10	rimonabant (0.01-1.0 μ M) は有意な細胞毒性を示さない	
7-11	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	
7-12	CB1 受容体遮断は JNK リン酸化を抑制する	
7-13	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	
7-14	Rimonabant はマウス大動脈の動脈硬化病変を減弱させた	
8.	考察	—47~52
9.	結語	—53
10.	参考文献	—54~60

1. 要旨

〔目的〕 カンナビノイド1 (CB1) 受容体の特異的拮抗薬である rimonabant は肥満に対する新たな治療戦略のひとつである。近年、内因性のカンナビノイドシステムが末梢器官においても存在することが示されており、我々は CB1 受容体がヒト冠動脈粥腫に存在し、動脈硬化に対して rimonabant が何らかの有益性をもたらすのではないかと仮説を立て、これを検討した。

〔方法〕 安定狭心症、不安定狭心症患者における冠動脈粥腫切除標本について CB1 受容体 mRNA 発現を比較した。ヒト冠動脈粥腫病変を免疫組織学的方法にて染色し、CB1 受容体の発現を確認した。またヒト血液中内因性カンナビノイドを LC/MS/MS 法にて測定した。末梢血分離単核球および THP-1 細胞（ヒト単核球由来細胞株）とそれらを分化させ作成したマクロファージについて CB1 受容体 mRNA の発現を逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) 法、real-time PCR 法にて、受容体蛋白の発現を Western blot 法にて検証した。THP-1 細胞由来マクロファージを用いて、lipopolysaccharide (LPS) 刺激に対する炎症反応を rimonabant が抑制するかどうか培養液中の各種 cytokines と matrix metalloproteinase (MMP) -9 を測定して検討した。さらに、CB1 受容体遮断が細胞内 cAMP 濃度、c-JNK リン酸化に及ぼす影響を調べた。最後にアポ E 欠損マウスに rimonabant を投与し、動脈硬化に対する影響を調べた。

〔結果〕 不安定狭心症患者の冠動脈粥腫切除標本での CB1 受容体 mRNA 発現は安定狭心症患者と比較して有意に高値であった。免疫組織染色の画像分析では fibrous plaque よりも atheromatous plaque において有意に強い CB1 受容体の発現が認められ、それらは CD68 陽性領域と一致しておりマクロファージに強く発現していると考えられた。また血液中の内因性カンナビノイドは冠動脈疾患患者においてより高値であった。RT-PCR 法と Western blot 法によりヒト単核球由来マクロファージにおける CB1 受容体の発現が確認された。その発現は単球-マクロファージ分化過程と macrophage colony stimulating factor, Oxidized LDL により有意に増加した。THP-1 細胞由来マクロファージにおいて、LPS 刺激により誘導される interleukin (IL)-1 β , IL-6, IL-8, tumor necrosis factor- α および MMP-9 産生を有意に抑制した。CB1 受容体遮断は、細胞内 cAMP 濃度を増加させ、c-JNK リン酸化を抑制した。アポ E 欠損マウスにおいて rimonabant は動脈硬化発生を有意に減少させた。

〔結論〕 我々はヒト冠動脈粥腫、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こと、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ことを示した。CB1 受容体特異的阻害剤である Rimonabant は in vitro の培養マクロファージにおいて有意に炎症性伝達物質の産生を抑制することを示した。抗肥満の治療戦略である CB1 受容体阻害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。

Summary

Background: Cannabinoid 1 (CB1) receptor blockade with rimonabant represents a clinical therapeutic strategy for obesity. Recently, the role of endocannabinoid (EC) system has been described in peripheral organs. We determined whether the EC system could be involved in human atherosclerosis and CB1 receptor blockade could modulate pro-inflammatory activity in macrophages.

Methods and Results: mRNA expression levels of CB1 receptor in coronary atherectomy samples were significantly higher in patients with unstable angina than stable angina (3.62 ± 2.96 fold, $n=7$; $P<0.05$). Immunoreactive area analysis of coronary artery showed CB1 receptor expression was greater in lipid-rich atheromatous plaques than fibrous plaques, especially in CD68-macrophages ($9.5 \pm 1.2\%$ vs. $0.6 \pm 0.6\%$, $n=5$; $P<0.01$). Levels of blood ECs were significantly higher in patients with coronary artery disease (CAD; $n=20$) than those without CAD ($n=20$) (anandamide, 1.048 [0.687 - 1.387] vs. 0.537 [0.468 - 0.857] ; $P<0.01$, 2-arachidonoyl glycerol, 13.30 [6.65 - 16.21] vs. 7.67 [6.39 - 10.03] pmol/mL; $P<0.05$). In cultured macrophages, expression of CB1 receptor was significantly increased during monocyte-macrophage differentiation (1.78 ± 0.13 fold, $n=6$, $P<0.01$). CB1 receptor blockade in macrophages induced significant increase of cytosolic cyclic adenosine monophosphate ($+29.9 \pm 13.0\%$, $n=4$; $P<0.01$), inhibited phosphorylation of c-Jun N-terminal kinase ($-19.1 \pm 12.6\%$, $n=4$, $P<0.05$) and resulted in significant decrease in production of pro-inflammatory mediators (interleukin [IL]- 1β , $-28.9 \pm 10.9\%$; IL-6, $-24.8 \pm 7.6\%$; IL-8, $-22.7 \pm 5.2\%$; tumor necrosis factor- α , $-13.6 \pm 4.8\%$; matrix metalloproteinase-9, $-16.4 \pm 3.8\%$, $n=4$ -8; $P<0.01$). Oral administration of rimonabant (8mg/kg/day) to apoE-deficient mice significantly reduced the areas of atherosclerotic lesions in aorta (rimonabant; $12.6 \pm 4.0\%$, control; $9.7 \pm 2.3\%$, $P<0.05$).

Conclusions: Patients with CAD demonstrated the activation of EC system with elevated levels of blood ECs and increased expression of CB1 receptor in coronary atheroma. CB1 receptor blockade exhibited anti-inflammatory effects on macrophages, which might provide beneficial effects on atherogenesis.

2. 発表論文

①関連論文

1 編 1 冊

- ① 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*. In press.

②その他の論文

5 編 5 冊

1. Sugamura, K., Sugiyama, S., Kawano, H., Horio, E., Ono, S., Kojima, S., Kaikita, K., Sagishima, K., Sakamoto, T., Yoshimura, M., Kinoshita, Y., Ogawa, H. A Fulminant Myocarditis Survivor After 56 Hours of Non-Responsive Cardiac Arrest Successfully Retuned to Normal Life by Cardiac Resynchronization Therapy. *J Cardiol*. 48: 345-352, 2006.
2. Fukunaga, T., Soejima, H., Irie, A., Sugamura, K., Oe, Y., Tanaka, T., Nagayoshi, Y., Kaikita, K., Sugiyama, S., Yoshimura, M., Nishimura, Y., Ogawa, H. Relation Between CD4⁺ T-Cell Activation and Severity of Chronic Heart Failure Secondary to Ischemic or Idiopathic Dilated Cardiomyopathy. *Am J Cardiol*. 100: 483-488, 2007.
3. Sugiyama, S., Fukushima, H., Kugiyama, K., Maruyoshi, H., Kojima, S., Funahashi, T., Sakamoto, T., Horibata, Y., Watanabe, K., Koga, H., Sugamura, K., Otsuka, F., Shimomura, I., Ogawa, H. Pravastatin improved glucose metabolism associated with increasing plasma adiponectin in patients with impaired glucose tolerance and coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 194: e43-e51, 2007.
4. Miyata, K., Nakayama, M., Mizuta, S., Hokimoto, S., Sugamura, K., Oshima, S., Oike, Y., Sugiyama, S., Ogawa, H., Yamamura, KI. Elevated mature macrophage expression of human ABHD2 gene in vulnerable plaque. *Biochem Biophys Res Commun*. 365: 207-213, 2008.
5. 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*. 72: 1193-1197, 2008.

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教育部博士課程臨床医科学専攻循環器病態学分野 小川久雄教授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頂きました熊本大学大学院医学教育部博士課程臨床医科学専攻循環器病態学分野 杉山正悟准教授に深く感謝致しますとともに、共同研究者として御協力頂いた熊本大学大学院医学教育部博士課程生命医科学専攻細胞病理学分野 竹屋元裕教授、藤原章雄助教、分子遺伝学分野 宮田敬士先生、東京慈恵会医科大学 DNA 医学研究所分子細胞生物学講座 小幡徹准教授をはじめ多くの先生方に深く感謝申し上げます。

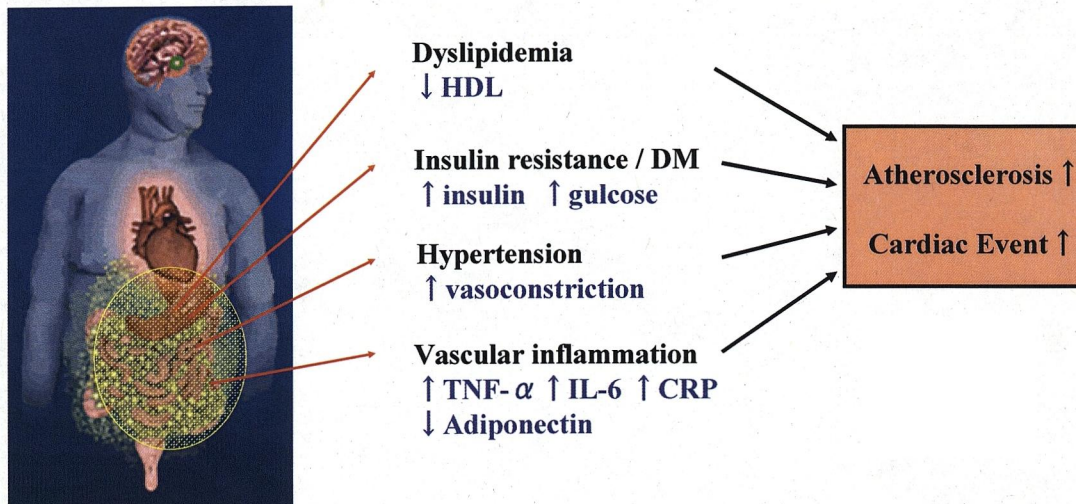
4. 略語一覽

2-AG:	2- arachidonoyl glycerol
ACE:	angiotensin-converting enzyme
AEA:	anandamide
AHA:	American Heart Association
ARB:	angiotensin II receptor antagonist
BMI:	body mass index
CAD:	coronary artery disease
cAMP:	cyclic adenosine mono phosphate
CB1:	cannabinoid 1
CB2:	cannabinoid 2
CRP:	C-reactive protein
DCA:	direct coronary atherectomy
DMSO:	dimethylsulfoxide
ECS:	endocannabinoid system
ELISA:	enzyme-linked immunosorbent assay
FAAH:	fatty acid amide hydrolase
GAPDH:	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GM-CSF:	granulocyte macrophage colony-stimulating factor
IL:	Interleukin
JNK:	c-Jun N-terminal kinase
HbA1c:	glycosylated hemoglobin A1c
HDL:	high-density lipoprotein
hs-CRP:	high-sensitivity C-reactive protein
LDL:	low density lipoprotein
LPS:	lipopolysaccharide
MAPK:	mitogen-activated protein kinase
M-CSF:	macrophage colony-stimulating factor
MMP:	matrix metalloproteinase
NAPE-PLD:	N-acyl-phosphatidyl-ethanolamine-selective phospholipase D
OxLDL:	oxidized low-density lipoprotein
PBMC:	peripheral blood mononuclear cells
PBS:	phosphate buffer saline
PMA:	phorbol 12-myristate 13-acetate
RT-PCR:	reverse transcriptase-polymerase chain reaction
sAP:	stable angina pectoris
SDS-PAGE:	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
siRNA:	small interfering RNA
SR-A:	class A macrophage scavenger receptor
TBS-T:	0.1% Tween-20/Tris buffer saline
TNF- α :	tumor necrosis factor- α
uAP:	unstable angina pectoris

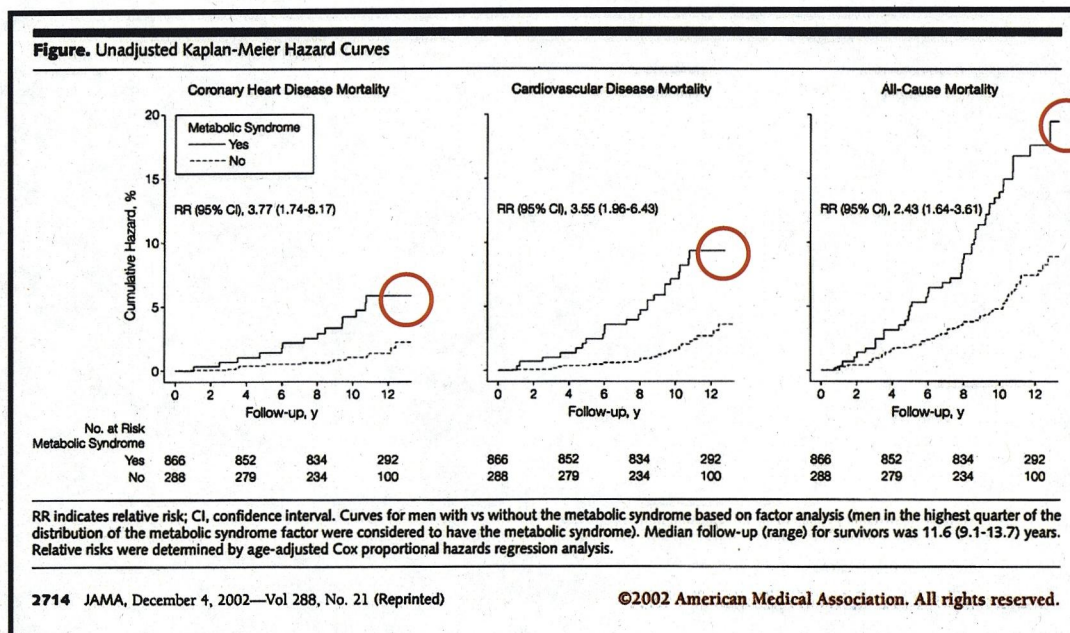
5. 研究の背景と目的

5-1 肥満と心血管疾患

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(1, 2)。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く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(3-5)。



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(6)。

Table 2 Success rate for reported study groups, subdivided according to initial treatment, energy level of initial diet and intensity of follow-up

	No. of patients	No. of study groups	Median success rate (range)
Overall success rate	2131	21	15% (0-49%)
Influence of initial treatment:			
Diet* alone**	1337	10	15% (6-28%)
Diet* plus group therapy	487	4	27% (14-31%)
Diet* plus behaviour modification	307	7	14% (0-49%)
Influence of energy level of initial diet:			
Very-low-calorie diet (300-600 kcal/24 h)**	304	8	14% (6-49%)
Conventional diet (800-1800 kcal/24 h)	1827	13	18% (0-31%)
Influence of intensity of follow-up:			
Passive follow-up**	597	10	10% (0-31%)
Active follow-up	1534	11	19% (13-49%)

* Conventional diet or very-low-calorie diet. ** Fasting was initially used in one study group.

Obesity review 1, 113-119, 2000

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。

5-2 内因性カンナビノイドシステム

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(7)。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。

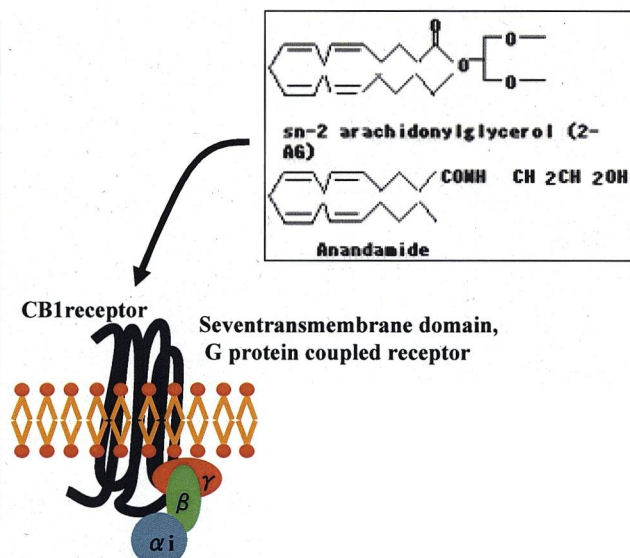
Table 3. History of Endocannabinoid System Research and Rimonabant Trials

1964	Isolation of Δ^9 THC, the active constituent of <i>Cannabis sativa</i>
1988	High-affinity cannabinoid binding site discovered in rat brain
1990	Cloning of the rat G-protein-coupled CB ₁ receptor
1991	Cloning of the human CB ₁ receptor
1992	Discovery of anandamide, the first endogenous cannabinoid
1993	Cloning of the peripheral CB ₂ receptor
1994	Characterization of the first selective CB ₁ receptor blocker, rimonabant
1995	Isolation of a second cannabinoid, 2-AG, in brain
2004	RIO-Lipids, RIO-Europe 1 year, STRATUS-US, and RIO-NA studies presented
2005	RIO-Europe and RIO-Lipids published
2006	RIO-Diabetes study presented
2006	RIO-NA study published

Adapted with permission from a presentation by Dr. J. P. Despres (Quebec Heart Institute, Ste. Foy, Quebec, Canada), and updated.

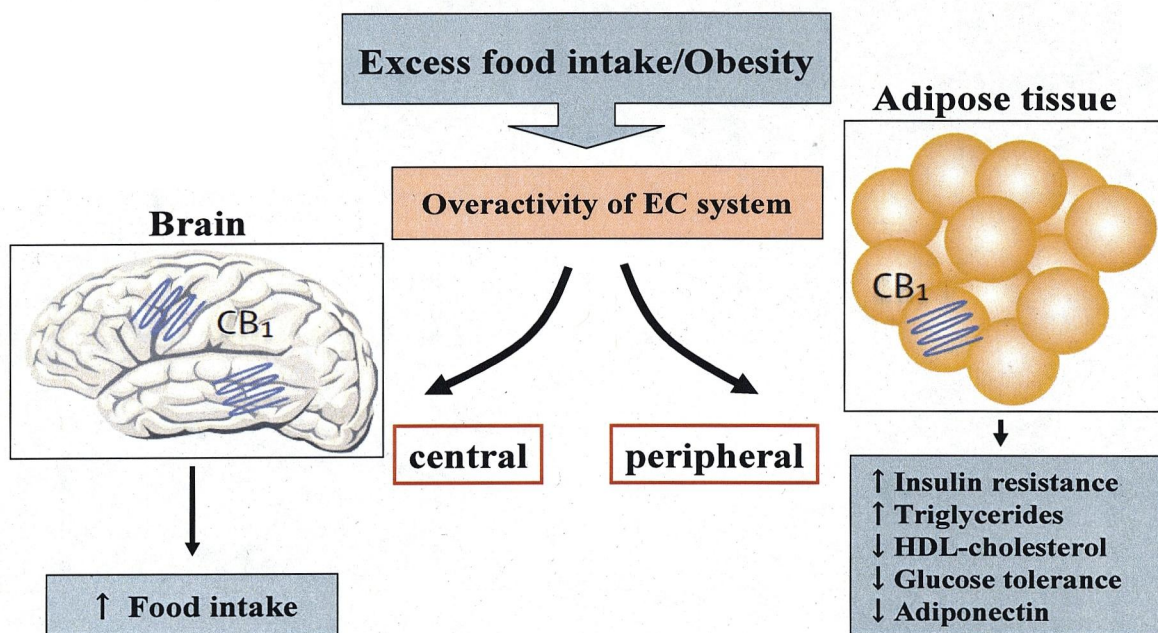
2-AG = 2-arachidonoylglycerol; CB₁ = cannabinoid receptor type 1; NA = North America; RIO = Rimonabant in Obesity, STRATUS = Studies with Rimonabant and Tobacco Use; THC = tetrahydrocannabinol; US = United States.

JACC Vol. 47, No. 10, 2006
May 16, 2006:1919-26



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(8)。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(9, 10)。食物の過剰摂取が続き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。

EndoCannabinoid System and Obesity

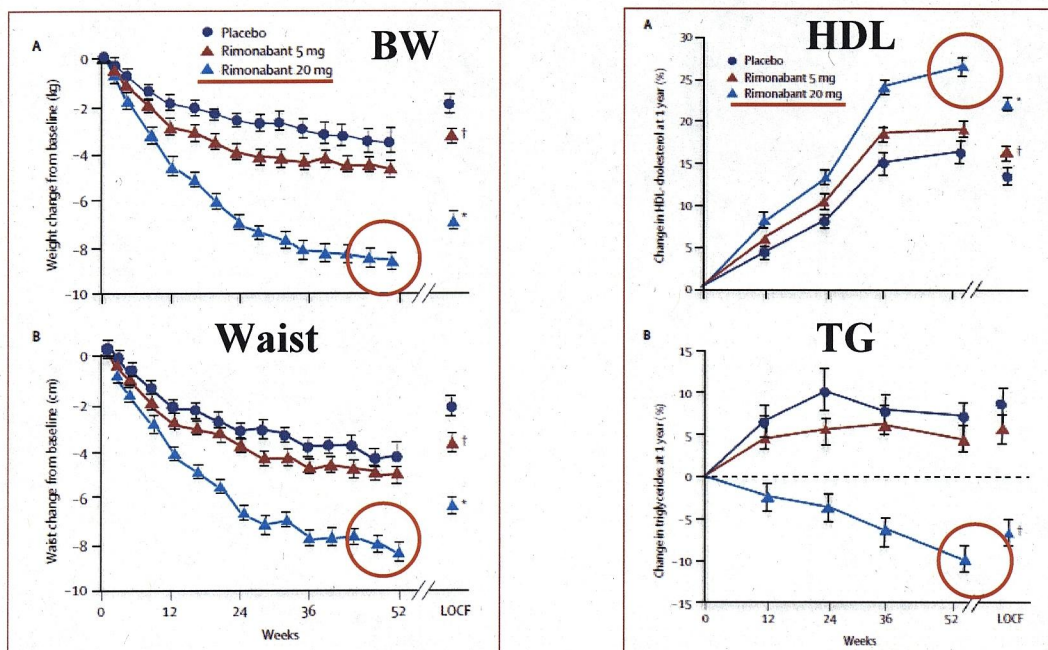


Lancet 365, 1389-97, 2005より改変

5-3 CB1受容体拮抗薬

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(11, 12)。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し、多くの心血管リスクファクターを改善した(13-16)。

Rimonabantによる体重減少、心血管リスク改善効果(RIO Europe Study)



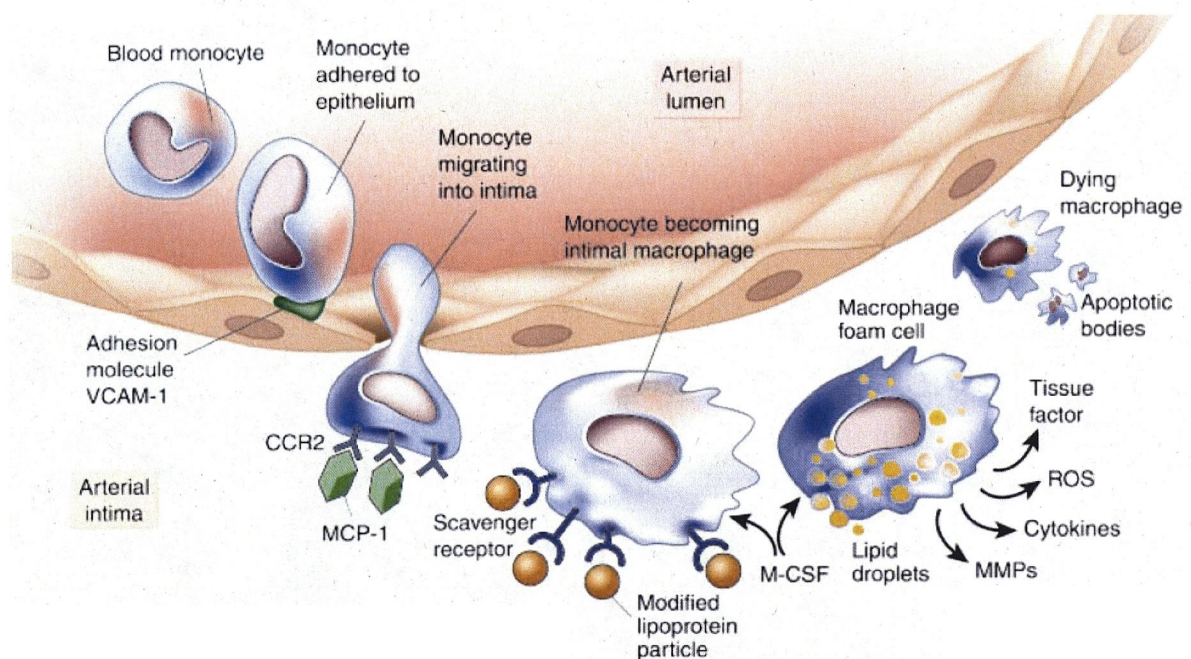
Lancet 365, 1389-97, 2005

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(17, 18)。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の潜在的重要性を示唆している。

5-4 動脈硬化と炎症

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(19)。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(20)。

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(14)、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(21)。

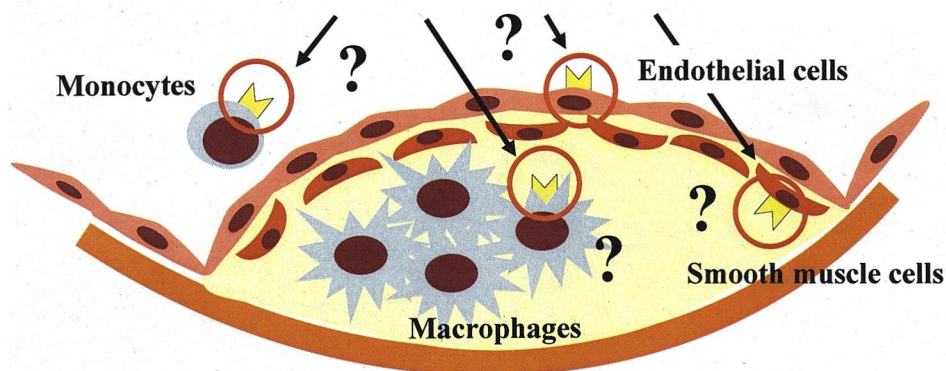


Libby, P. 2002. *Nature* 420:868-874.

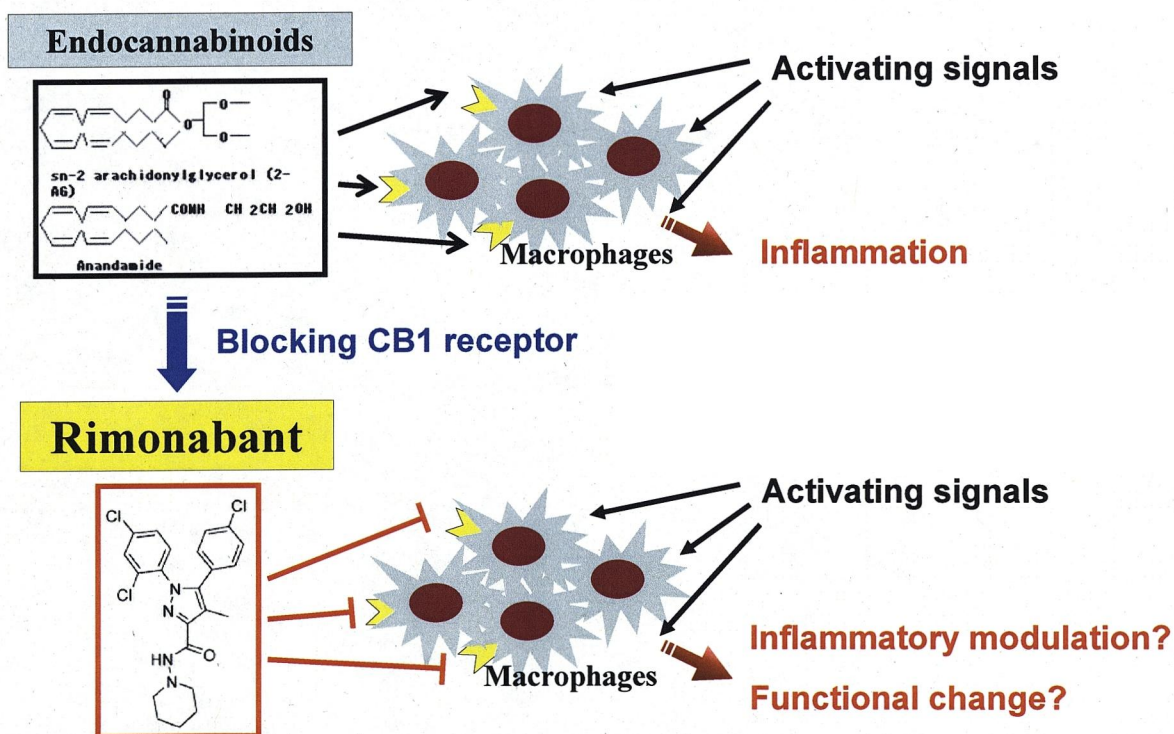
5-5 本研究の目的

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。

1. 動脈硬化病変にCB1受容体が存在するか？



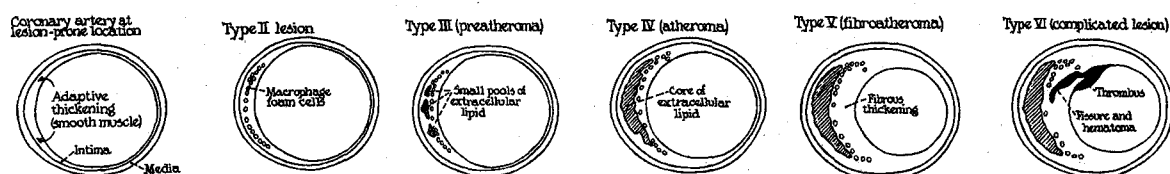
2. CB1受容体遮断は動脈硬化病変に何らかの効果을及ぼすか？



6. 研究方法

6-1 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(22, 23)。



Stary, H. C. et al. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1995;15:1512-1531

Current AHA Classification			
Terms for Atherosclerotic Lesions in Histological Classification		Other Terms for the Same Lesions Often Based on Appearance to the Unaided Eye	
Type I lesion	Initial lesion	Fatty dot or streak	Early lesion
Type II lesion			
IIa	Progression-prone type II lesion		
IIb	Progression-resistant type II lesion		
Type III lesion	Intermediate lesion (preatheroma)	Atheromatous plaque, fibrolipid plaque, fibrous plaque, plaque	Advanced lesions, raised lesions
Type IV lesion	Atheroma		
Va	Fibroatheroma (type V lesion)		
Vb	Calcific lesion (type VII lesion)		
Vc	Fibrotic lesion (type VIII)	Calcified plaque	
Type VI lesion	Lesion with surface defect and/or hematoma/hemorrhage and/or thrombotic deposit	Fibrous plaque	
		Complicated lesion, complicated plaque	

Virmani, R. et al. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2000 ;20:1262-1275

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。使用した各一次抗体とその希釈倍率は次の通り：anti-CB1 receptor (dilution 1:500, PA1-743; Affinity BioReagents, Golden, USA); anti-CB2 receptor (dilution 1:200, 101550; Cayman Chemical, Company, Ann Arbor, MI); anti-CD68 for macrophages (dilution 1:200, M6814; Dako, Glostrup, Denmark); anti-Factor VIII for endothelial cells (dilution 1:500, M0616; Dako); and anti- α -smooth muscle actin for smooth muscle cells (dilution 1:500, M0851; Dako)。CB1, CB2受容体抗体の特異性についてはこ

れまでの研究ですでに詳細検討されている抗体を使用した(24, 25)。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(26)、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。その後、4°C. overnightでインキュベーションした。Goat anti-rabbit Ig-conjugated peroxidase-labeled polymer amino acid (histofine; Nichirei, Tokyo, Japan), goat anti-mouse Ig-conjugated peroxidase-labeled dextran polymer (ENVISION/HRP; Dako) を二次抗体として使用し、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(24)。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 (Lumina Vision, Mitani Co., Fukui, Japan)を用いて算出した。

6-2 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(27)。

Braunwald Classification of Unstable Angina

Severity	Clinical circumstances		
	A. Develops in presence of extracardiac condition that intensifies myocardial ischemia (secondary UA)	B. Develops in absence of extracardiac condition (primary UA)	C. Develops within 2 wk after AMI (postinfarction UA)
I. New onset of severe angina or accelerated angina; no rest pain	IA	IB	IC
II. Angina at rest within past month but not within preceding 48 hr (Angina at rest, subacute)	IIA	IIB	IIC
III. Angina at rest within 48 hr (Angina at rest, acute)	IIIA	IIIB	IIIC

Patients with UA may also be divided into three groups depending on whether UA occurs 1) in the absence of treatment for chronic stable angina, 2) during treatment for chronic stable angina, or 3) despite maximal anti-ischemic drug therapy. These three groups may be designated by subscripts 1, 2, or 3, respectively.

Patients with UA may be further divided into those with and without transient ST-T wave changes during pain.

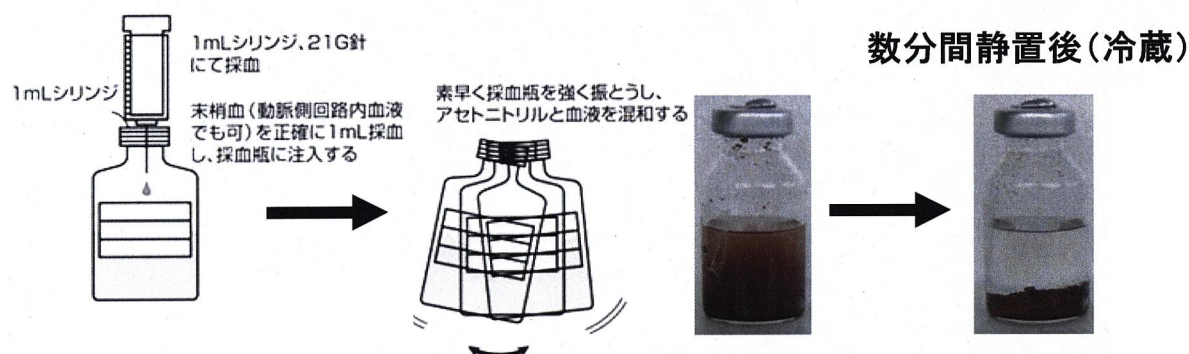
UA, unstable angina; AMI, acute myocardial infarction.

Circulation Vol 80, No 2, August 1989

なお、これらすべての患者から書面による同意を得ており、熊本大学大学院医学薬学研究部における倫理委員会が提唱するガイドラインに則して行われ、その承認を得ている。

6-3 ヒト血中内因性カンナビノイド測定

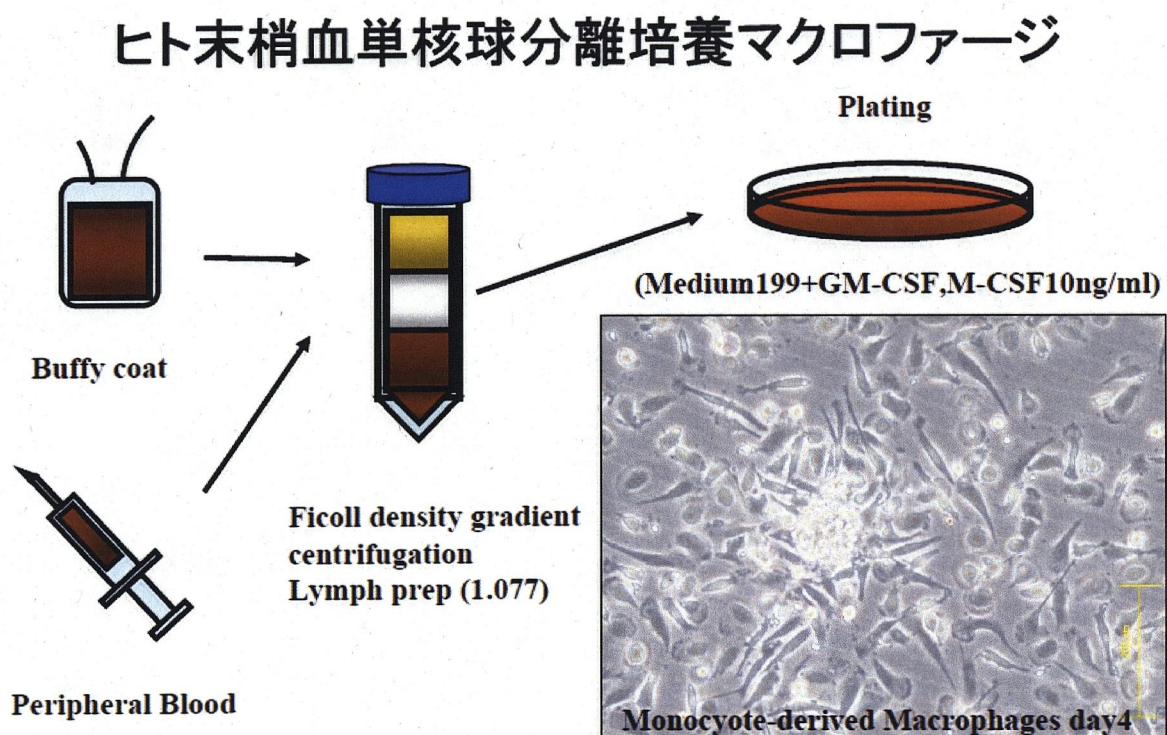
冠動脈造影予定の患者において、連続的に血中の内因性カンナビノイドを測定した。炎症性疾患、膠原病、活動性のある感染症、悪性腫瘍を合併する患者は除外した。冠動脈造影にて50%以上の狭窄病変を一枝以上もつものを冠動脈疾患と定義し、20人の患者を選出した。さらに年齢を調整した冠動脈疾患のない患者20人についても測定を行った。採血においては、その分解を可能な限り防ぐために、採血直後にアセトニトリル中に注入し激しく振盪する方法で行った。内因性カンナビノイド(AEA, 2-AG)の検出は液体クロマトグラフィー/質量分析システム(Q-trap and Analyst version 1.3.2; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)による測定を東京慈恵会医科大学DNA医学研究所分子細胞生物学講座 小幡徹准教授に行って頂いた(28)。



6-4 細胞培養

1) ヒト末梢血単核球分離培養マクロファージ

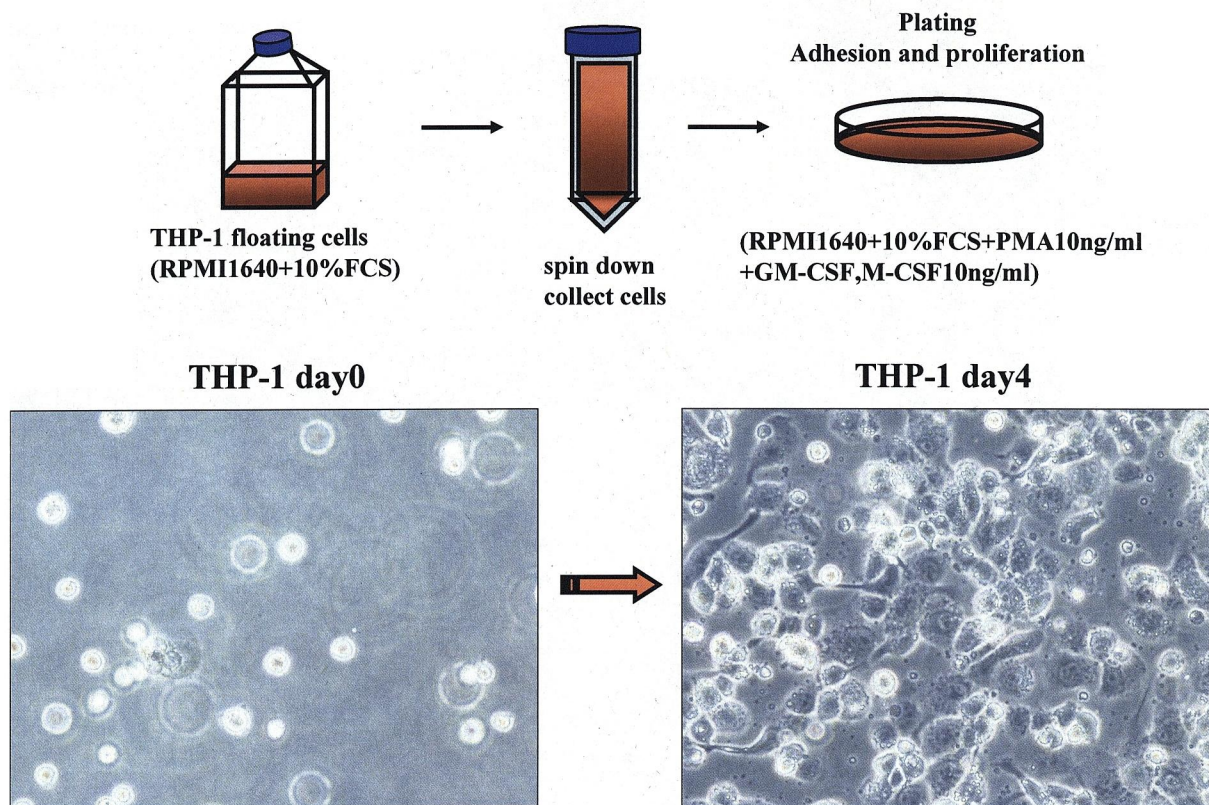
ヒト末梢血単核球 (peripheral blood mononuclear cells : PBMC) は熊本赤十字血液センターより譲渡された残余血 (buffy-coat) もしくは正常ボランティアより採血した血液から Lymphoprep (density=1.077 g/ml, Axis-Shield PoC AS, Oslo, Norway) を用いて比重遠心分離法にて単離した (29)。単離した単核球は 5% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) および 10 ng/ml macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) と 10 ng/ml granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) を含む medium-199 (GIBCO, Carlsbad, CA) で標準培養条件下にて培養した。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。



2) ヒト単核球系細胞株 (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 (Manassas, VA) 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 (GIBCO)にて4日間培養しマクロファージへと分化させた(30)。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。

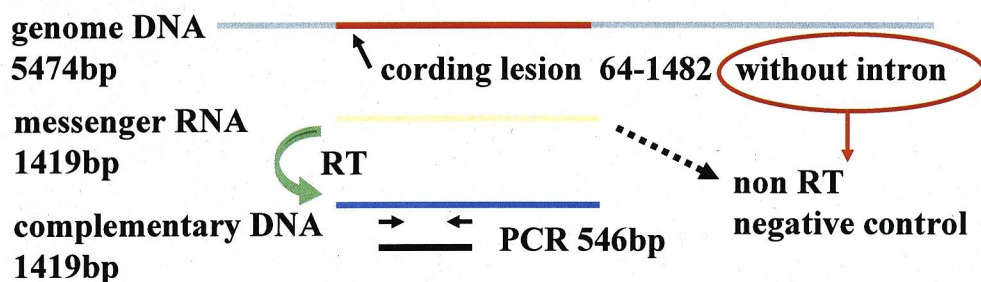
ヒト単核球系細胞株 (THP-1)



6-5 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 (Qiagen, Bulimba, Germany) を用いて抽出した。このtotal RNAのうち0.5 μ gを Quantitect Reverse Transcription Kit (Qiagen) を使用してcDNAを合成した。PCR 反応はTaKaRa Ex Taq HS (TaKaRa BIO INC. Otsu, Japan) を使用し、94°C, 5分の後、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。以降の図に示すように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。使用した各プライマー (Hokkaido bioscience) は次に示す通り human CB1 receptor, 5' - CGTGGGCAGCCTGTTCTCA -3' (sense) and 5' - GAGCATACTGCAGAATGCAAACACC -3' (anti-sense), (PCR product of 547 bp); human GAPDH, 5' - GAAGGTGAAGGTCTGGAGTC -3' (sense) and 5' - GAAGATGGTGATGGGATTTC-3' (anti-sense), (PCR product of 266 bp)。

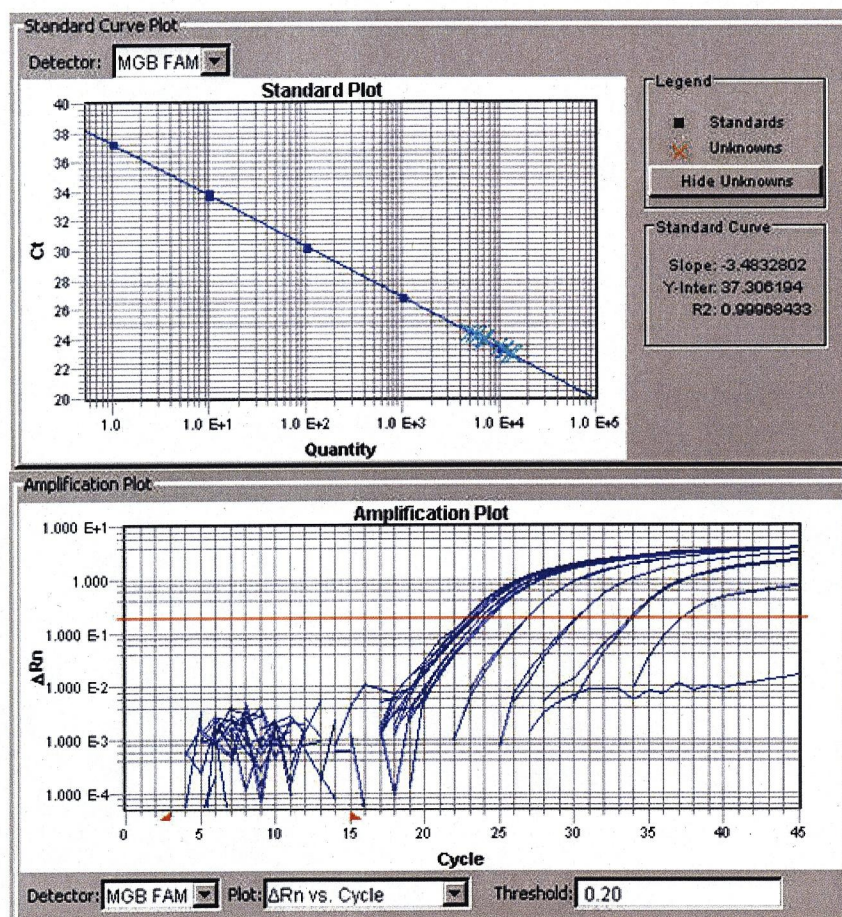
CB1 receptor mRNA Expression (Reverse Transcriptional - PCR)



6-6 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 (Applied Biosystems, Foster City, CA)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 (Applied Biosystems)を用いてABI Prism 7900 sequence detection system (Applied Biosystems)にて検出した。各プライマーのコードを次に示す：human CB1 receptor (Hs00275009), CB2 receptor (Hs00361490), GAPDH (Hs99999905), Class A macrophage scavenger receptor (SR-A; Hs00234007), fatty acid amide hydrolase (FAAH; Hs00757813) and N-acyl-phosphatidyl-ethanolamine-selective phospholipase D (NAPE-PLD; Hs01113995)。

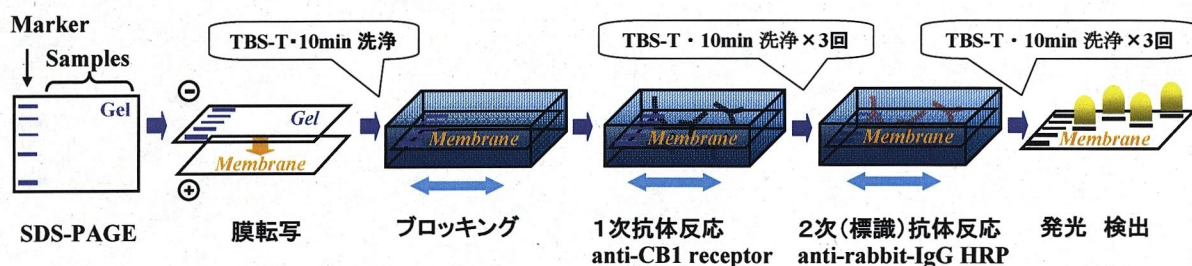
Real-time PCR analysis of cultured human macrophages



6-7 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(Pierce, Rockford, IL)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 (Pierce)を用いて測定した。各サンプルから10 μ g等量の蛋白を25 μ Lのsodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (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 (Millipore, Bedford, MA) にセミドライブロティング法にて転写した。続いて膜をブロッキング溶液(Super Block Blocking Buffer, Thermo scientific, Rockford, IL)で処理したのち、一次抗体(1:1000 anti-CB1 receptor, ab40860-100, abcam, Cambridge, UK)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(ECL plus, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)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。

Western Blot Analysis

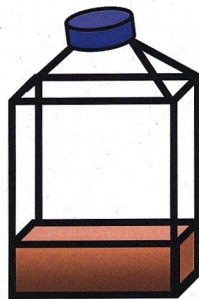


6-8 M-CSF, oxidized low-density lipoprotein (OxLDL)によるCB1 receptor 発現への影響

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 μ g/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。

OxLDL, M-CSFによるCB1 receptor 発現への影響

THP-1 floating cells



Adhesion



RPMI1640+10%FCS
+PMA10ng/ml



1day

Differentiation



collect cell lysite



RNA extraction



3-6days

RPMI1640+10%FCS
+M-CSF or OxLDL

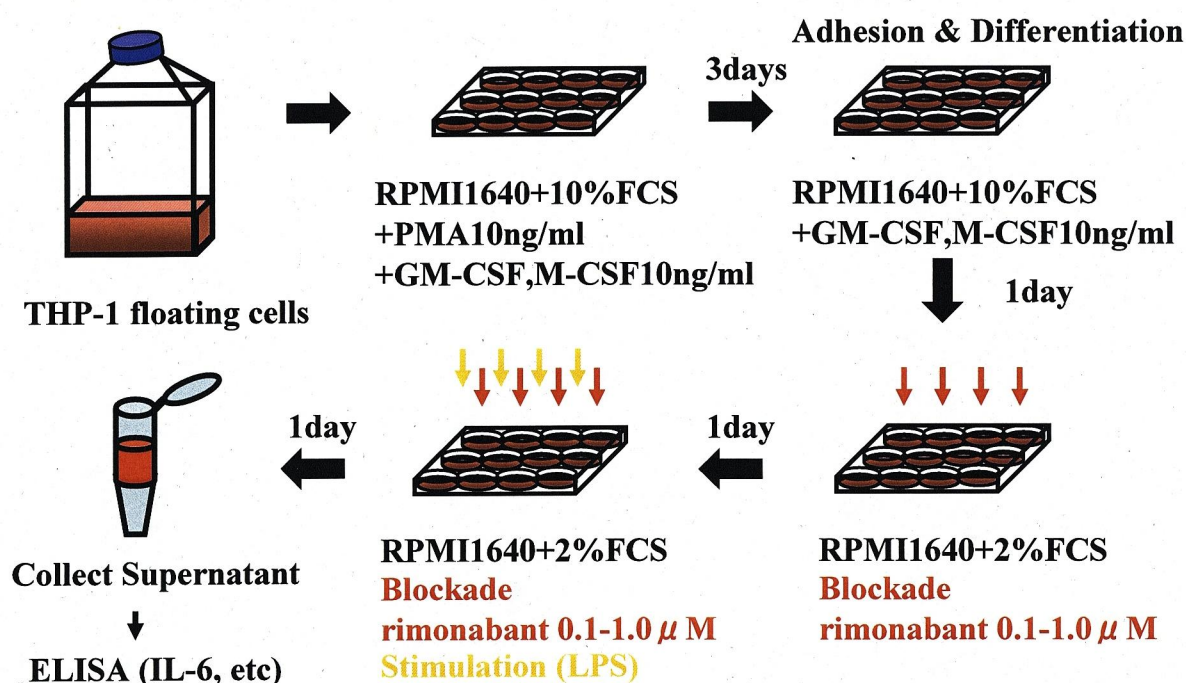
real-time PCR analysis

6-9 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: dimethylsulfoxide (DMSO) もしくは rimonabant 0.01, 0.1, 0.5, or 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 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) 20ng/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 へストックした。

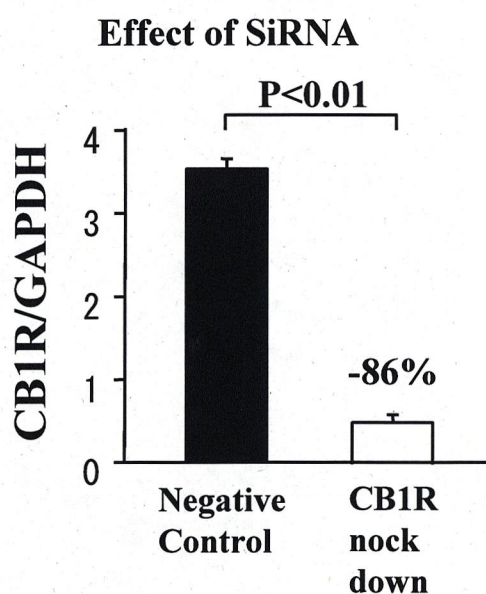
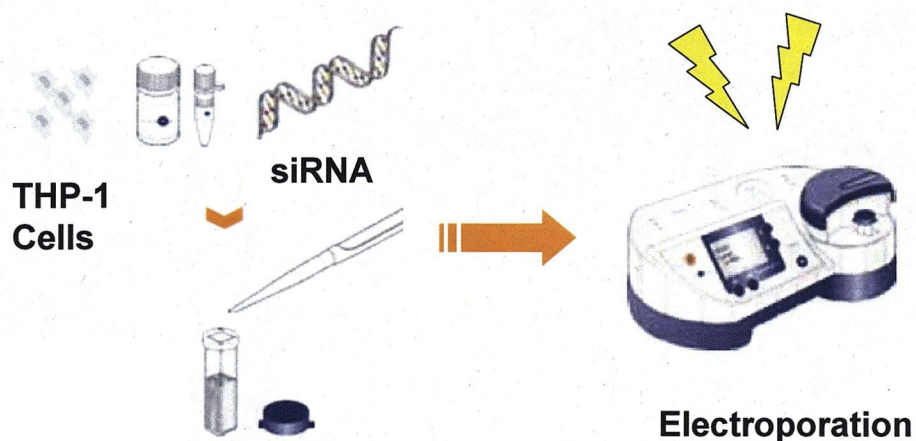
回収したメディウム中のinterleukin (IL)-1 β , IL-6, IL-8, tumor necrosis factor (TNF)- α , MMP-9 and IL-10の各項目について、ペア抗体を使用した enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) キットにて測定した。測定手技については各社のキットに指示される内容に従い行った (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10; R&D systems, TNF- α ; BioSource, MMP-9; GE Healthcare)。

ヒト培養マクロファージにおける薬理実験



6-10 Small interfering RNA (siRNA)を用いたCB1 受容体ノックダウン

THP-1 細胞は *RepCell* (CellSeed Inc. Tokyo, Japan) を用いて、これまでのプロトコールと同様で培養を行った。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 (Silencer Select ID: s3261, Ambion, Austin, TX) を Nucleofector 2 (Amaxa Biosystems) 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。

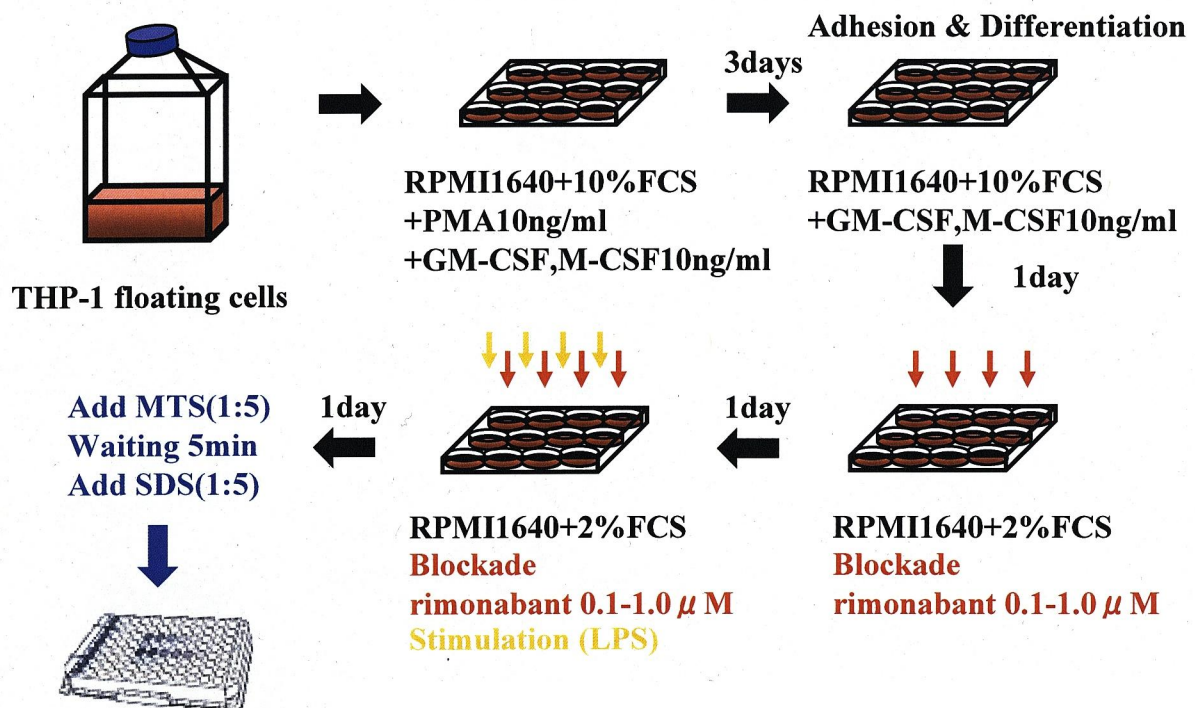


6-1-1 rimonabant が cell viability に及ぼす影響

さらに rimonabant のマクロファージにおける各種サイトカイン抑制効果が細胞毒性によるものでないことを証明するため、薬理実験の場合と同様に rimonabant および LPS で刺激後のマクロファージの cell viability を CellTiter 96 AQueos One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, Madison, Wisconsin) にて測定した。

キットの説明書に従い培養メディウム中に生細胞によって代謝され発色するテトラゾリウム化合物 (MTS) を含む試薬を 1:5 で添加、5 分間培養したのち、10% SDS を 1:5 の割合で添加して反応を停止させた。各溶液を回収して 96 well plate に移し吸光度計を用いて測定を行った。

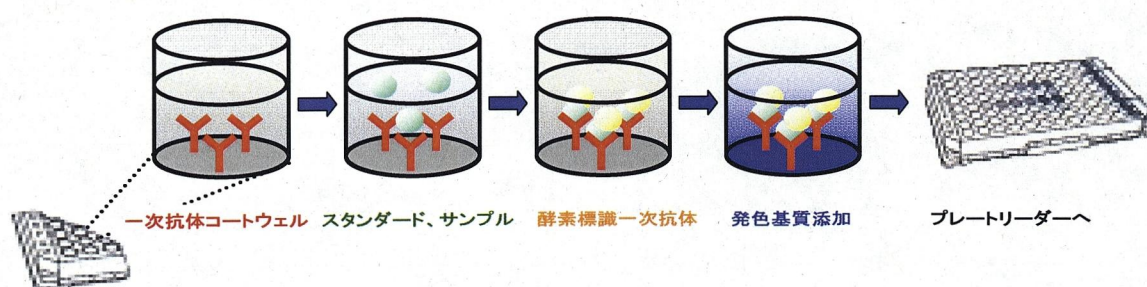
MTS による cell viability assay



6-12 細胞内 Cyclic Adenosine Mono Phosphate (cAMP) 測定

rimonabant 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 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 (Assay Designs, Ann Arbor, MI, U.S.A.)を用いて測定した。

Direct cAMP ELISA assay



6-13 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(6-7参照)にて検出を行った。使用した一次抗体を次に示す(1:1000 anti-phosphorylated JNK antibody #9251 and anti-JNK antibody #9252 Cell Signaling Technology, Danvers, MA)。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。

6-1-4 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^{shl}) 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 (下表に組成を示す: rimonabant 群は飼料中に薬剤を混入) 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。

(human equivocal dose) = animal dose in mg/kg x (animal weight in kg/human weight in kg)^{0.33}.

20/60 mg/kg = Xmg/kg * (27.5÷1000/60)^{0.33}. X= 9mg/kg/day

65 mg SR141716A/kg chow を作成した場合、

(65ug/g) × (3.5g/day)=227.5ug/day=0.2275mg/day÷27.5g=0.0083mg/g/day=8.3mg/kg/day となり、

ほぼ 20mg に相当する投与量である。

自然発症ApoE欠損マウス C57BL/6. KOR-Apoe^{shl}



動脈硬化誘発飼料(マウス)固型

カカオバター	7.5%	コレステロール	1.25%
コール酸塩	0.5%	ミルクカゼイン	7.5%
セルロース	1.25%	ビタミン混合	1.0%
ミネラル混合	1.0%	シュークロース	1.625%
グルコース	1.625%	デキストリン	1.625%
塩化コリン	0.125%	ラード	3.0%
CRF-1	72.0%		

	栄養素含量 概算(100g 中)	カロリー比 概算(%)
総カロリー	414kcal	
蛋白	22.6g	22
脂肪	16.5g	36
炭水化物	45.1g	42

参考文献

Beverly P. (1985): Variation in Susceptibility to Atherosclerosis among inbred strains of mice. Atherosclerosis 57, 65-73

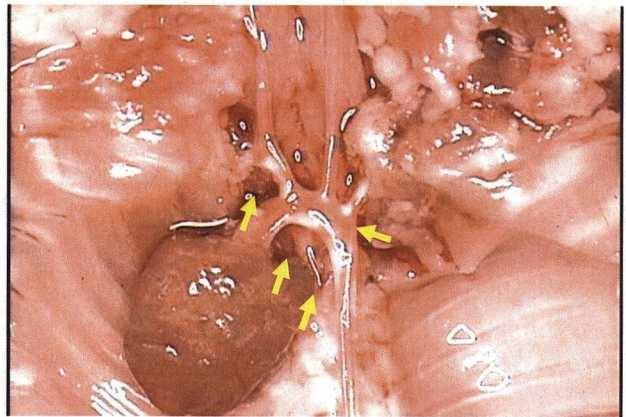
6-15 マウス大動脈の露出と展開

腹部正中切開でアプローチし腹部臓器を取り出した後、横隔膜を開き、胸骨正中切開を加え、頸部まで十分に解放した。大動脈弓部三分岐を傷つけないよう注意しながら胸骨裏面と心臓とをよく剥離し、胸骨を左右に開いてピンで止め視野を確保した。左右肺を取り除き、裏面の食道を切り離した。以後は左右頸動脈から中枢へ向かって血管周囲脂肪を少しずつ取り除き、横隔膜、腹腔内、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、昆虫針にて支持展開した。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。

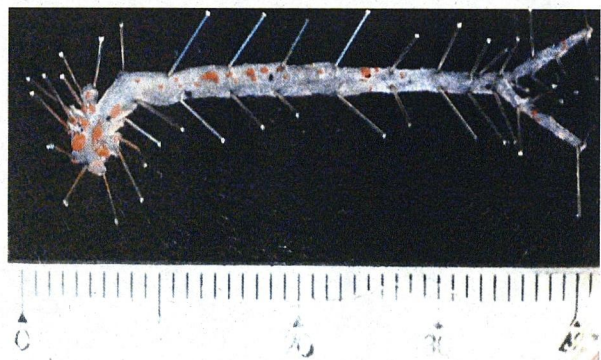
A 周囲脂肪剥離後



B 動脈硬化病変(矢印)



C 脂肪染色(展開後)



6-16 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4時間からovernight (4 °C) で固定、その後10%スクロース/PBS→15%スクロース/PBS→20%スクロース/PBSの順番でそれぞれ4時間からovernight (4 °C) 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。6-15, 16の手法はFujiwara, A らの手法を参考とした(31)。

6-17 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(大塚製薬株式会社)を用いて測定を行った。

6-18 統計解析

統計解析はStat-View-V ソフトウェア (SAS Institute) を用いて行った。データはすべて平均値 ± 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。

7. 研究結果

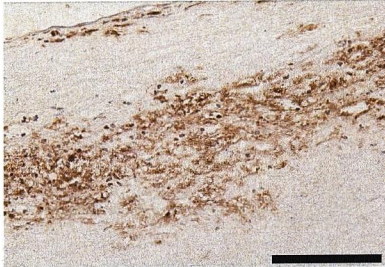
7-1 ヒト冠動脈粥腫にはCB1およびCB2受容体が発現している

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(図 1Aおよび 1D)。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(図 1Aおよび 1B)。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(図 1G 矢印, 矢頭 および 1H)。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; 図 1A)がfibrous plaques (type Vc; 図 1G)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, $P < 0.01$, 図 1J)。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(図 1I)。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(図1C, CB1受容体、図1F, CB2受容体)。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(図E)。各倍率は次の通り(A, B, D, E, G, H; $\times 200$, C, F, I; $\times 100$)。

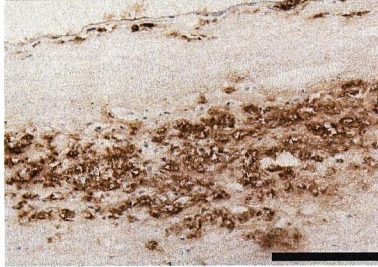
图 1

Atheromatous plaque area

A CB1 receptor



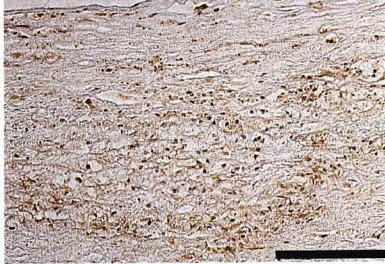
B CD68



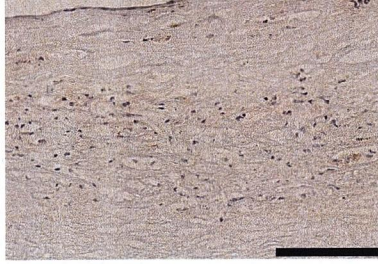
C CB1 receptor (skin)



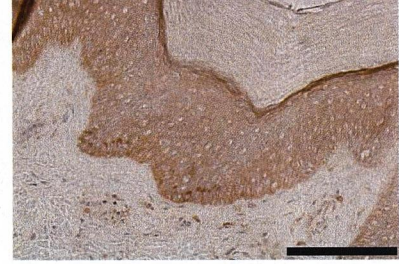
D CB2 receptor



E Control IgG

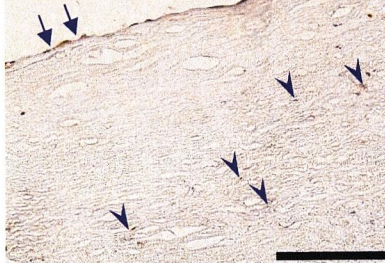


F CB2 receptor (skin)

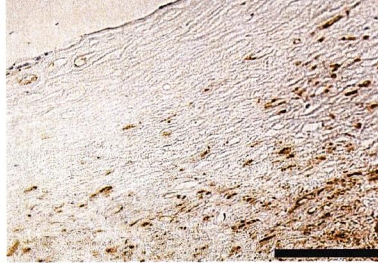


Fibrous plaque area

G CB1 receptor

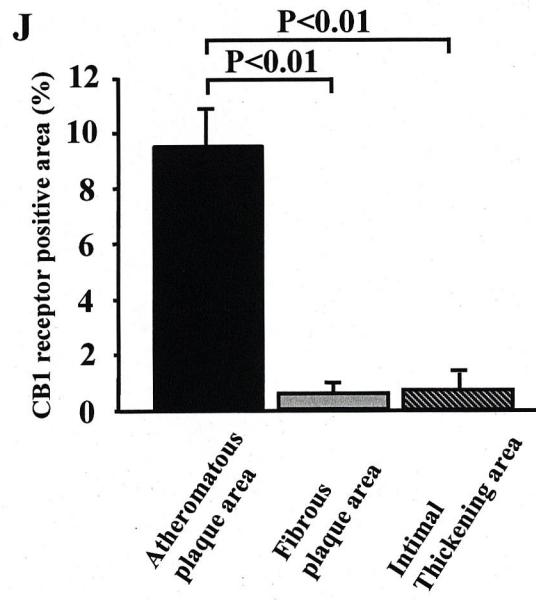
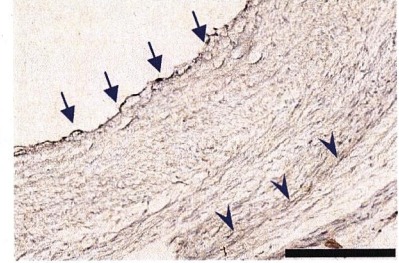


H α-SMA



Intimal thickening area

I CB1 receptor



7-2 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

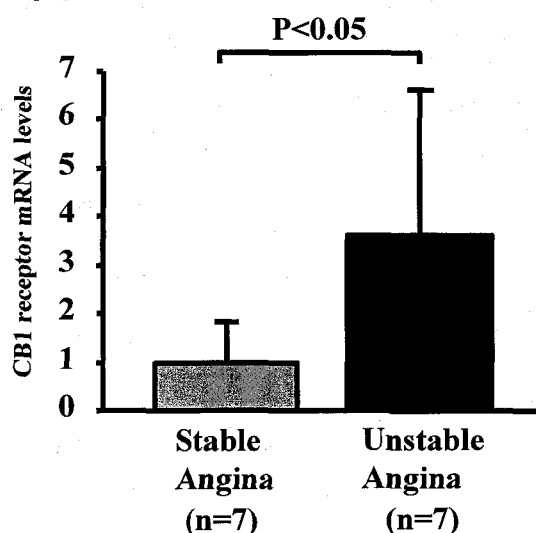
さらに我々はヒト冠動脈粥腫切除標本におけるCB1受容体の発現を調べた。粥腫切除標本はすべて責任病変から取られたもので、14検体のうち7検体がsAP患者から、残りの7検体がuAP患者から取られたものであった。両群において臨床背景リスクファクターについて有意差はなかった（表1）。これらの検体を使用してCB1受容体およびコントロールとしてglyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) のmRNA発現レベルをreal-time RT-PCR法で測定した。sAP患者に比較してuAP患者ではより高いCB1受容体のmRNA発現を示した (3.62 ± 2.96 倍 vs. sAP, $n=7$; $P<0.05$ 図2)。

表 1. 患者背景

Characteristics	stable-angina (n=7)	unstable-angina (n=7)	p-Value
Age (years)			
Mean	68.4 \pm 7.9	67.4 \pm 7.3	0.81
Range	56-76	56-80	
Men / Women	6/1	7/0	0.30
Hypertension	5(71%)	5(71%)	-
Dyslipidemia	3(43%)	2(28%)	0.58
Diabetes Mellitus	1(14%)	2(28%)	0.42
Smoking	2(28%)	4(57%)	0.28

Data are presented as mean \pm SD or number of patients (percents).

図 2

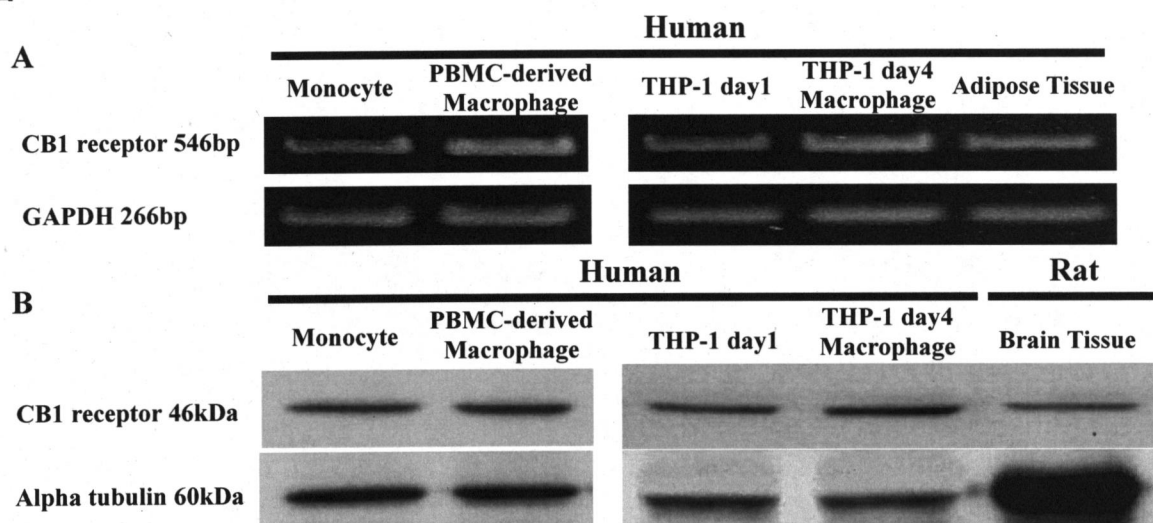


7-3 培養ヒトマクロファージにおけるCB1受容体mRNAおよび蛋白の発現

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。上段にCB1受容体の発現、下段に同一サンプルのGAPDHの発現を示す。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(図 3A)。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(図 3B)。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。

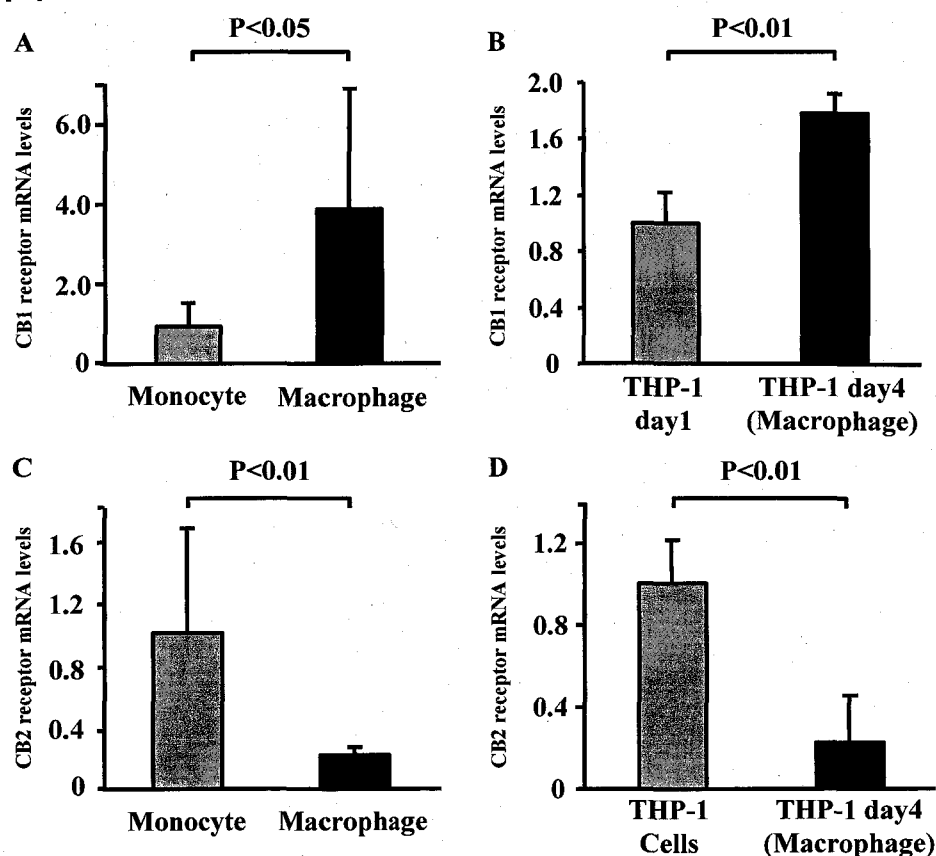
図 3



7-4 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, $n=6$, $P<0.05$, 図 4A)、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, $n=6$; $P<0.01$, 図 4B)。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, $n=6$; $P<0.01$, 図 4CおよびD)。

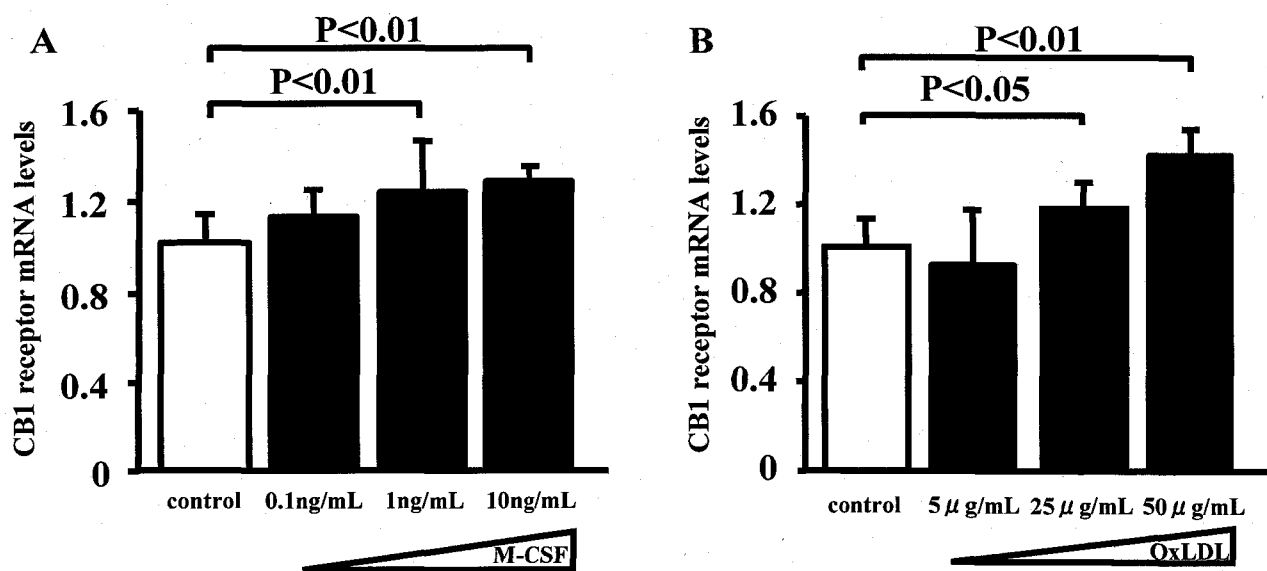
図 4



7-5 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 μ g/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(図 5A および 5B, n=6)。

図 5



これらの結果(7-4および7-5)は、ヒト培養マクロファージでは分化によりCB1受容体発現が増加し、分化したマクロファージではM-CSFやOxLDLの刺激によりさらに発現が増強される事を示し、我々がヒト冠動脈動脈硬化病変から得た結果(7-1, 7-2)を支持するものである。

7-6 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; $P<0.05$, 図 6A および B)。各群の臨床背景を表 2 に示す。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。表 3 に、全患者における内因性カンナビノイドと臨床パラメータの相関を示した。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。

図 6

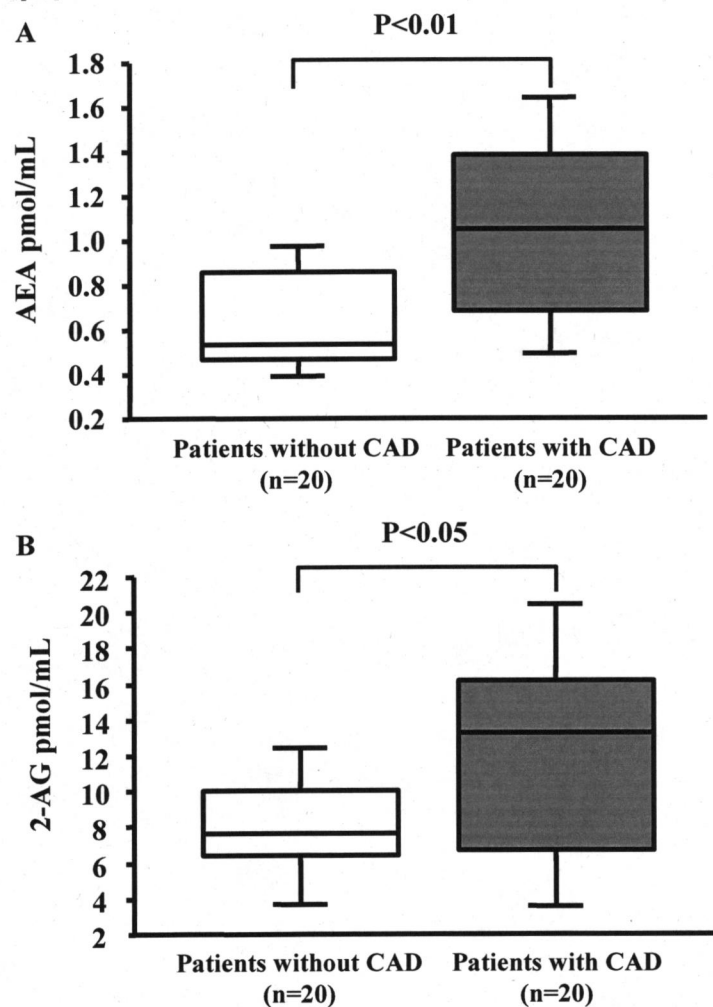


表 2. 患者背景の比較

Characteristics	patients without CAD (n=20)	patients with CAD (n=20)	p-Value
Age (years)			
Mean	61.7±14.9	63.0±11.6	0.76
Men / Women	11/9	5/5	0.32
Smoking	1 (5%)	5 (25%)	0.16
Hypertension	12 (60%)	6 (30%)	0.30
BMI (kg/m ²)	23.1±3.3	24.7±4.3	0.19
Body weight (kg)	60.8±12.3	55.6±16.9	0.31
Waist circumference (cm)	84.1±10.5	81.4±8.7	0.17
Total cholesterol (mg/dL)	190.6±30.0	178.7±36.6	0.27
LDL-cholesterol (mg/dL)	112.9±21.9	107.9±34.2	0.59
HDL-cholesterol (mg/dL)	59.0±15.3	9.4±19.0	0.09
Triglycerides (mg/dL)	109.5 (77.5-136.5)	46.0 (85.8-215.8)	0.20
hsCRP (mg/dL)	0.05 (0.02-0.14)	0.30 (0.13-0.83)	<0.01
HbA1c (%)	5.2±0.4	5.7±1.0	0.09
Fasting glucose (mg/dL)	100.6±25.0	107.9±27.7	0.40
Medications			
Aspirin	6 (30%)	20 (100%)	<0.001
Statins	8 (40%)	17 (85%)	<0.01
ACE inhibitors	0 (0%)	6 (30%)	<0.05
ARBs	7 (35%)	14 (70%)	0.06
Calcium channel blockers	14 (70%)	12 (60%)	0.74
β-blockers	2 (10%)	13 (65%)	<0.01
Nitrates	1 (5%)	5 (25%)	0.18

Data are presented as mean ±SD or number of patients (percents).

CAD, coronary artery disease; BMI, body mass index; LDL, low density lipoprotein; HDL, high density lipoprotein; hsCRP, high-sensitivity C-reactive protein; HbA1c, glycosylated hemoglobin A1c; ACE, angiotensin-converting enzyme; ARB, angiotensin II receptor antagonist

表 3. 血中カンナビノイド濃度と臨床パラメータの相関 (n=40)

Parameter	AEA		2-AG	
	r-Value	p-Value	r-Value	p-Value
Age (years)	0.06	0.70	0.11	0.51
BMI (kg/m ²)	0.43	<0.01	-0.04	0.81
Body weight (kg)	0.26	0.10	-0.11	0.50
Waist circumference (cm)	0.27	0.10	-0.10	0.55
Total cholesterol (mg/dL)	-0.03	0.79	-0.23	0.16
LDL-cholesterol (mg/dL)	0.03	0.59	-0.27	0.10
HDL-cholesterol (mg/dL)	-0.33	0.14	<0.01	0.98
Triglycerides (mg/dL)	0.41	0.02	0.02	0.91
hsCRP (mg/dL)	0.39	0.03	0.64	<0.001
HbA1c (%)	0.30	0.02	0.61	<0.01
Fasting glucose (mg/dL)	-0.06	0.67	0.38	<0.05

AEA, anandamide; 2-AG, 2-arachidonoyl glycerol; BMI, body mass index; LDL, low density lipoprotein; HDL, high density lipoprotein; hsCRP, high-sensitivity C-reactive protein; HbA1c, glycosylated hemoglobin A1c

さらに、ステップワイズ重回帰分析では、もっとも相関関係が認められたのは、AEA、2AGともにhsCRPであった (AEA: $R=0.48$, $P<0.01$, 2AG: $R=0.53$, $P<0.01$)。このことは、肥満や動脈硬化によるlow grade inflammationで上昇している可能性があることを示唆している。

7-7 分化誘導による内因性カンナビノイド分解合成酵素の発現変化

内因性カンナビノイドは細胞膜間にある酵素により、細胞ストレスや増殖刺激などの要求に応じて局所的に生成され、かつ速やかに分解除去されており、これらの酵素により調節を受けている(32, 33)。

我々の培養系においても、単球からマクロファージへの分化に従って、内因性カンナビノイド合成酵素 (NAPE-PLD) の mRNA は有意に増加し、分解酵素である (FAAH) の mRNA は有意に減少した (NAPE-PLD: $+45.0 \pm 9.6\%$, FAAH: $-24.3 \pm 7.5\%$, $n=6$; both $P<0.01$, 図7). さらに我々は、2%FBS を含むメディウム中のカンナビノイド濃度を測定してその存在を確かめた (AEA: 0.27 ± 0.05 , 2-AG: 33.7 ± 1.9 pmol/mL, $n=5$)。

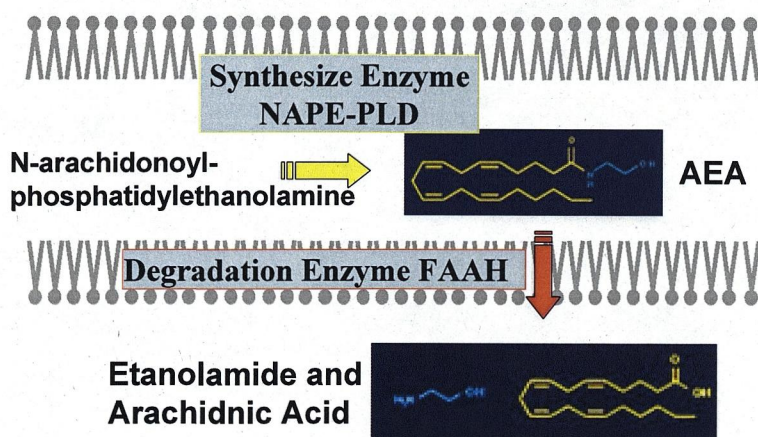
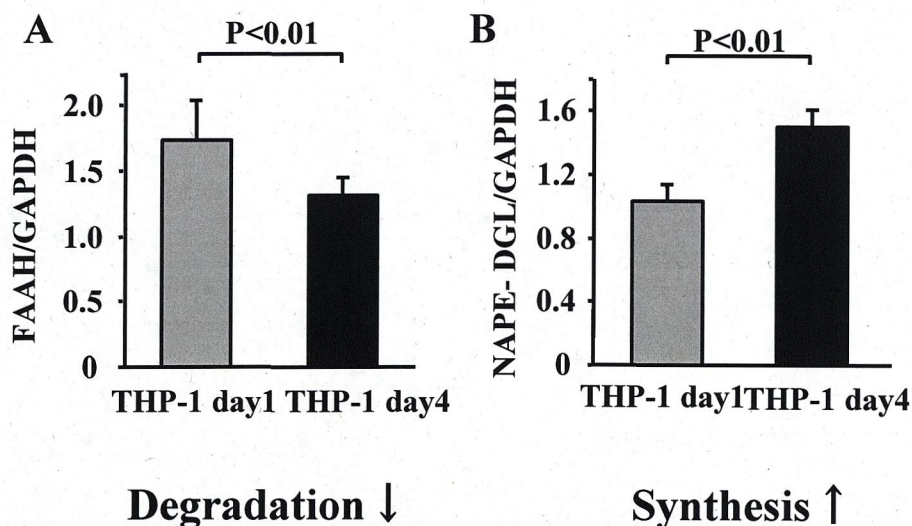


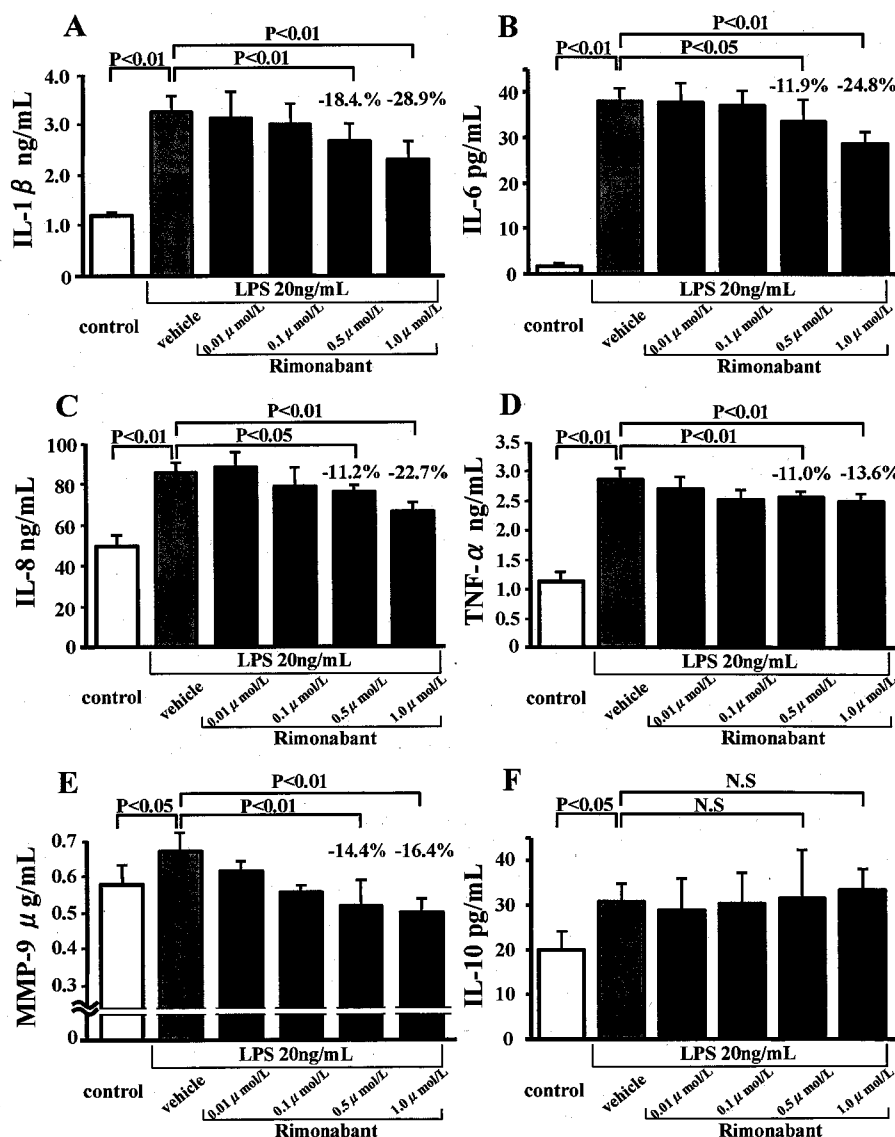
図 7



7-8 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(図 6A から 6E)。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 μ mol/L; $+2.6 \pm 35.3\%$, no significance [NS], 1.0 μ mol/L; $+8.5 \pm 15.6\%$, NS, n=4, 図 8F)。

図 8



7-9 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 $\mu\text{mol/L}$ and AM281 1.0 $\mu\text{mol/L}$)

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;

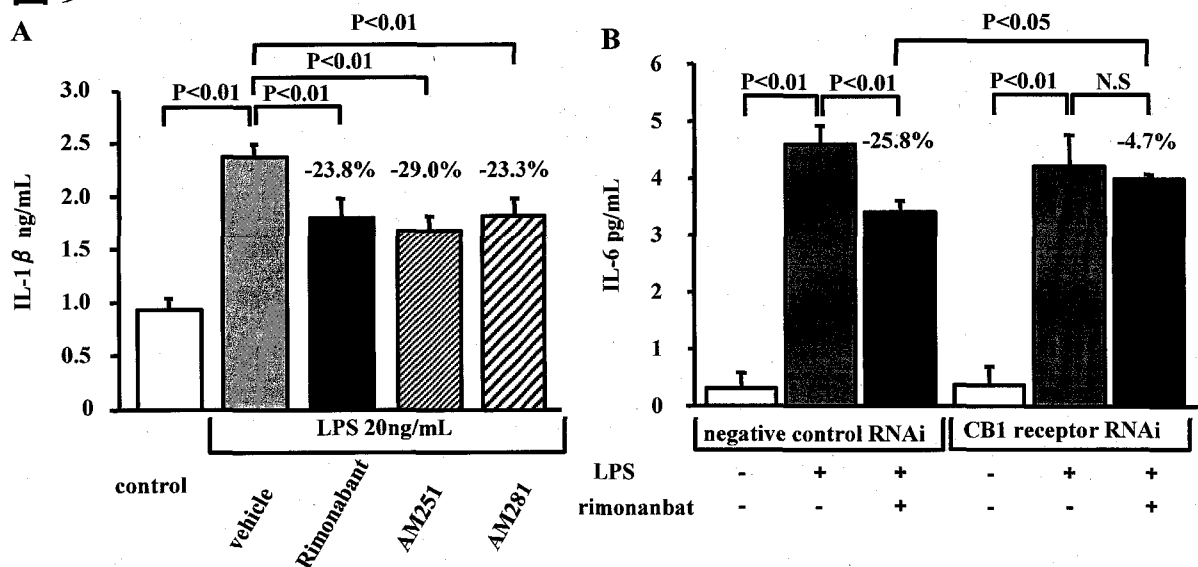
$-23.8 \pm 7.3\%$, AM251; $-29.0 \pm 5.0\%$, AM281; $-23.3 \pm 6.8\%$, $n=6$; $P<0.01$, 図 9A)。

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;

$-4.7 \pm 0.7\%$ vs. negative control RNAi; $-25.8 \pm 4.5\%$; $n=4$, $P<0.05$, 図 9B)。

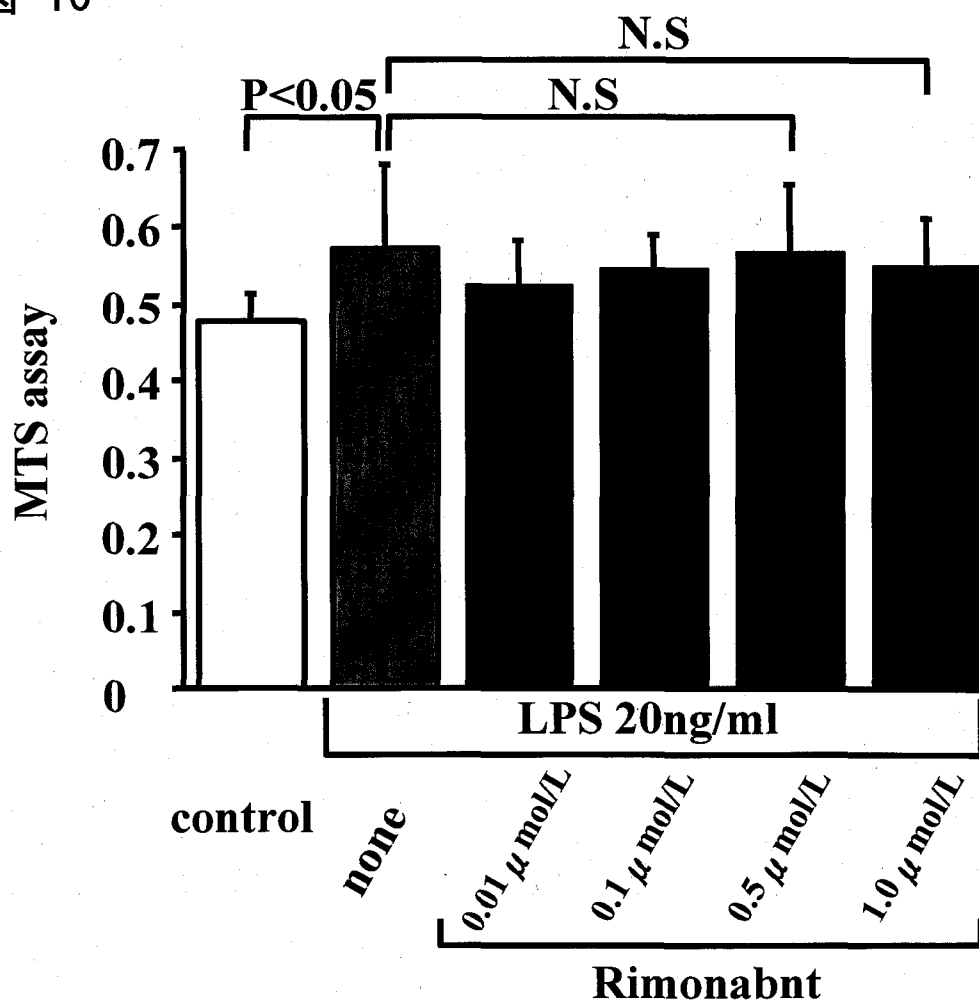
図 9



7-10 rimonabant (0.01-1.0 μ M)は有意な細胞毒性を示さない

薬理実験と同様に rimonabant および LPS 添加を行った細胞群の MTS assay による細胞活性評価は有意な低下を示さなかった。これは今回の実験系で使用した濃度の rimonabant には有意な細胞毒性がないことを示しており、rimonabant のマクロファージにおける各種サイトカイン抑制効果は細胞毒性による低下ではないことを表している。数値は細胞を含まない培養メディウムに MTS を添加した溶液を標準として差を求め比較した。

図 10



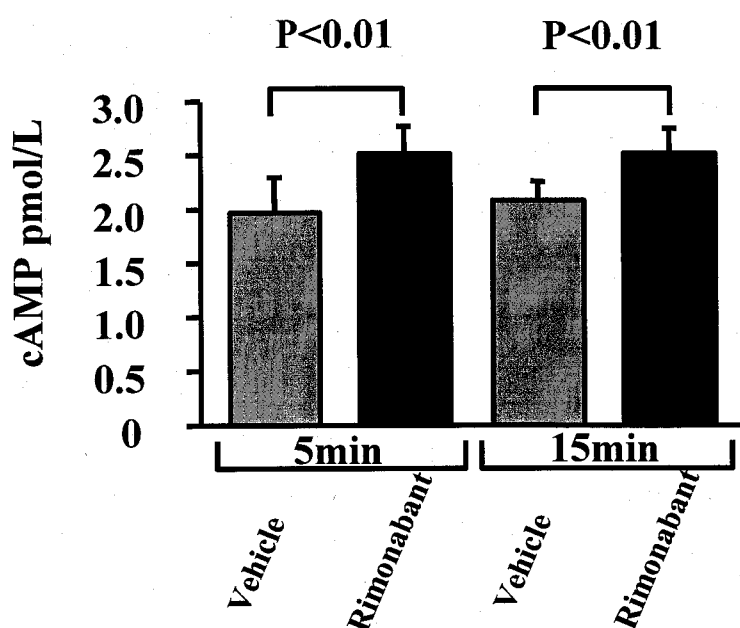
7-1-1 CB1受容体遮断はヒト培養マクロファージにおいてcAMP濃度を上昇させる

CB1 受容体 $G\alpha i/o$ 蛋白共役型受容体の一つで、 $G\alpha i/o$ が伝達するシグナルは古典的に細胞内 cAMP 濃度を抑制する効果を持つと考えられている(34)。そこで、我々はヒト培養マクロファージにおける CB1 受容体遮断の細胞内 cAMP 濃度への潜在的効果を検証した。rimonabant 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 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: $+29.9 \pm 13.0\%$, $P < 0.01$, 15 分後: $+20.2 \pm 11.0\%$, $P < 0.01$, $n=4$, 図 11)。

なお、臨床的に用いられる rimonabant のヒト最大血中濃度は以下の通りで、0.4-0.5 $\mu\text{mol/L}$ 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。

$$C_{\max} = 196 \pm 28.1 \text{ ng/ml} = (196 \pm 28.1) / 463.8 \text{ nmol/ml} = 0.423 \pm 0.061 \mu\text{mol/l}$$

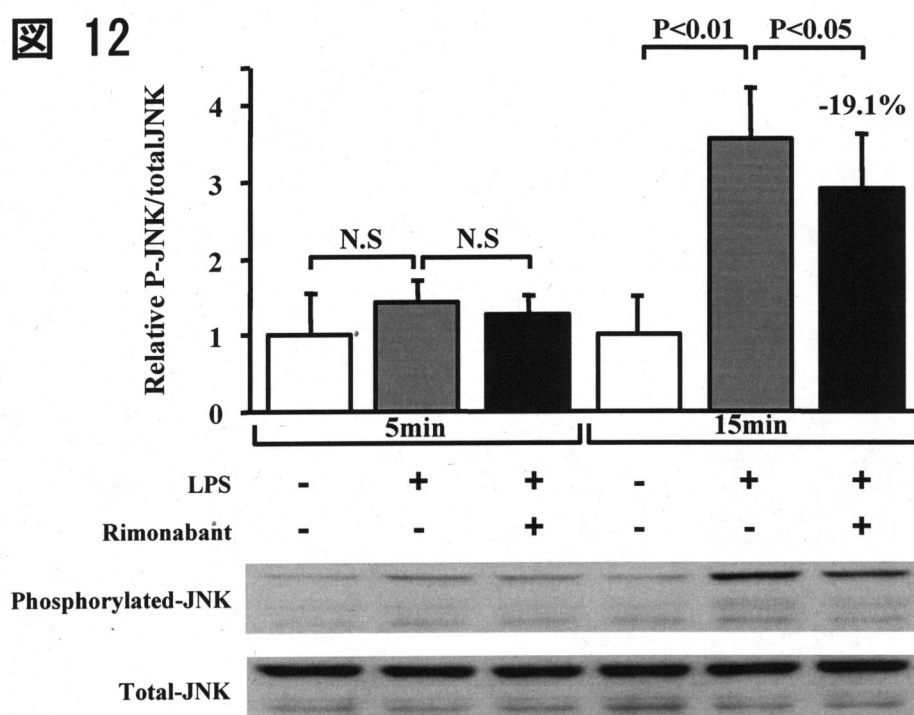
図 11



7-12 CB1受容体遮断はJNKリン酸化を抑制する

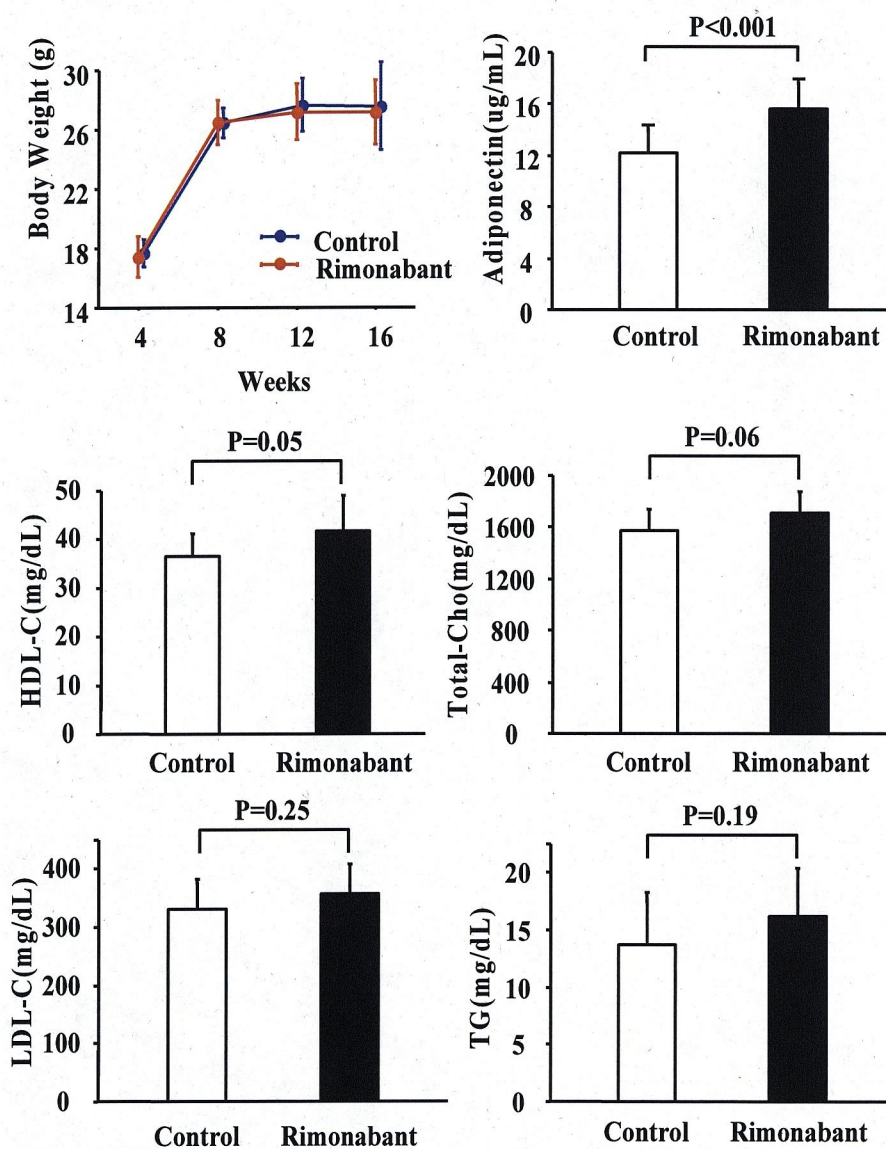
ウエスタンブロット解析から、Rimonabant 1.0 $\mu\text{mol/L}$ で24時間処理したのち、メディウム交換と共にLPS10ng/mL刺激を加えてから15分後のJNKリン酸化が有意に抑制され、CB1受容体遮断は炎症系カスケードの伝達機構のひとつであるMAPキナーゼ：JNKの抑制を介していることが示唆された ($-19.1 \pm 12.6\%$, $P < 0.05$, 図 12)。

図 12



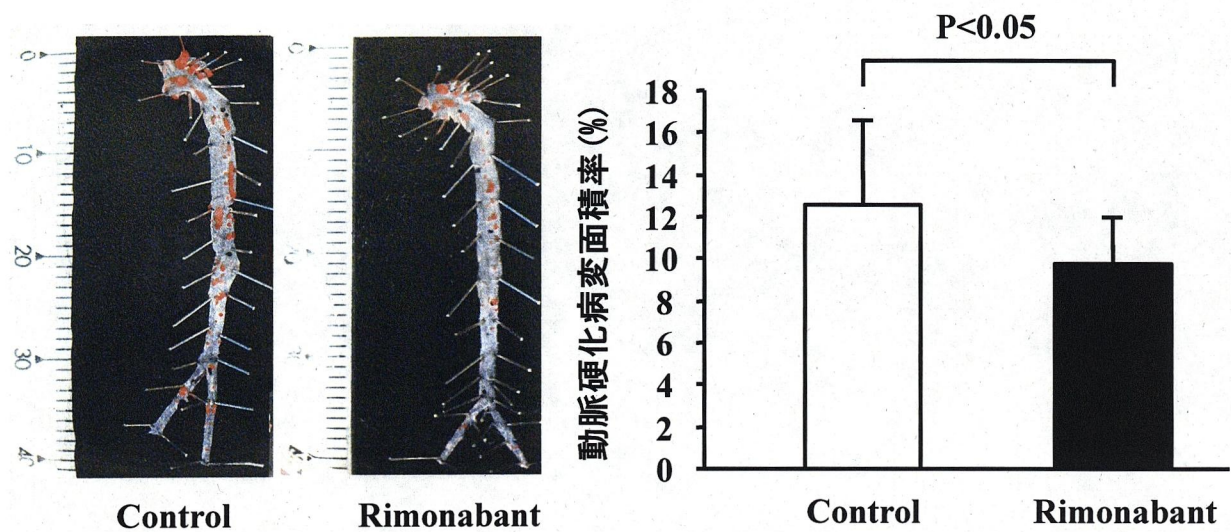
7-13 ApoE欠損マウスでのRimonabantによる体重および血清パラメータの変化

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。



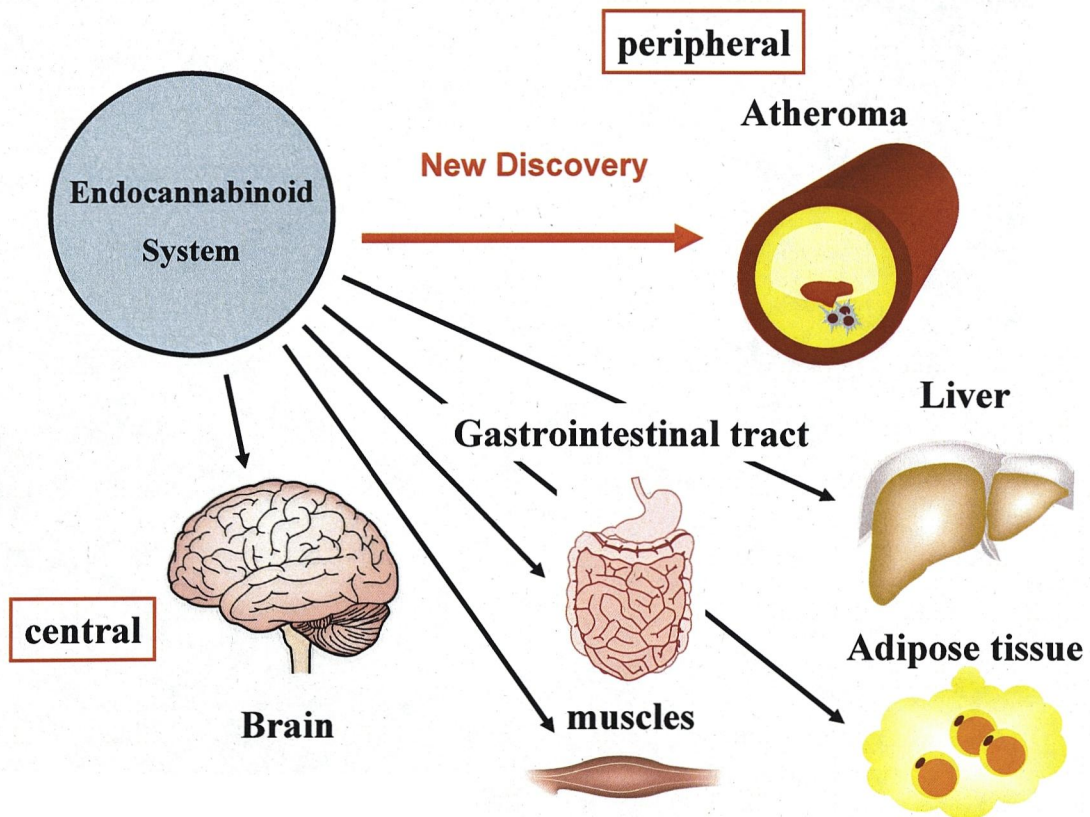
7-14 Rimonabant はマウス大動脈の動脈硬化病変を減少させた

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; $12.6 \pm 4.0\%$, Control; $9.7 \pm 2.3\%$, $P < 0.05$)。



8. 考察

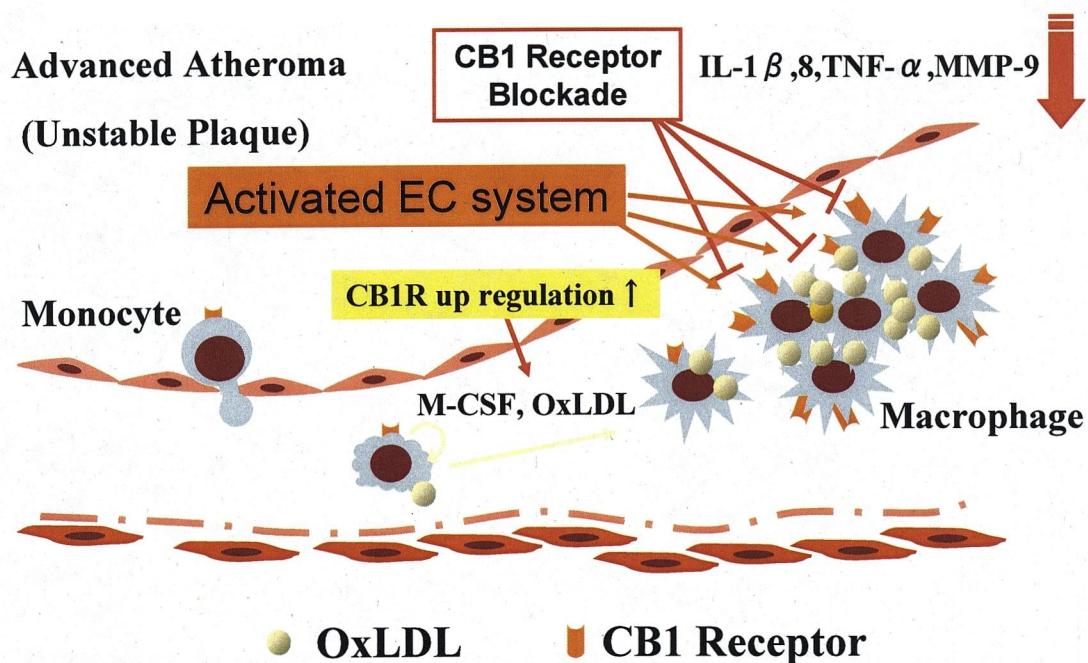
本研究にて我々はCB1受容体がヒト冠動脈粥腫、特に病変部のマクロファージに発現していること、また冠動脈疾患患者においてECSが活性化していることを示した。そして*in vitro* 培養マクロファージにおけるCB1受容体の発現はその分化過程と動脈硬化病変に存在し重要な役割を演じているM-CSFおよびOxLDL刺激によって増加することを証明した。さらに、CB1受容体特異的アンタゴニストであるRimonabantは、活性化したヒトマクロファージからの炎症促進性伝達物質であるIL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α および MMP-9を有意に減少させた。これらの結果は、ヒト冠動脈粥腫にECSが存在し、CB1受容体遮断がマクロファージにおける抗炎症作用を介して粥腫の炎症を調節している可能性があることを示している。



Lancet. Vol 365 April 16, 2005 より改変

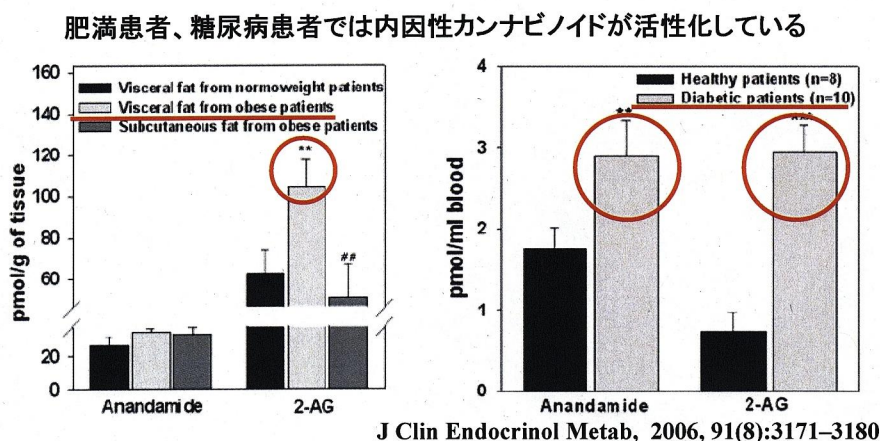
CB1受容体の発現は線維性plaqueやびまん性肥厚部よりもAHA分類のtype IVやVaといった脂質に富んだ病変により多く認められた。このようなtype IV や Vaのplaqueは不安定plaqueと認識されており、同部でのCB1受容体の過剰発現はplaque不安定性の増大に関係しているかもしれない。加えて、不安定狭心症患者のDCAサンプルでは安定狭心症患者と比較してCB1受容体mRNAの発現が増加していた。これらのデータは脆弱病変に於いて臨床的症状を起こしている領域でCB1受容体の発現がアップレギュレーションされていることを示しており、CB1受容体の発現は動脈硬化の進展と臨床症状に関連している可能性が考えられる。我々はヒト冠動脈粥腫においてCD68陽性マクロファージがCB1受容体を発現していることを示したが、これらの細胞はplaqueにあるECSで中心的な役割を果たしている可能性がある。動脈硬化の進展において、循環血中の単核球は動脈壁内へ移動し、成熟して病変部のマクロファージとなる。我々が示したような、CB1受容体の発現が単核球からマクロファージへの分化過程で増加する事実は、病変部マクロファージの特性と表現形が粥腫局所での微小環境や要因に依存していることに起因している。さらに動脈硬化病変に存在する、強力な動脈硬化発生の病態生理学的刺激因子であるM-CSFやOxLDLは*in vitro*において分化マクロファージのCB1受容体の発現を増加させた。このことは、これらの刺激因子が局所要因として冠動脈粥腫においてCB1受容体の発現を増強させている可能性を示唆している。動脈硬化の発生および急性冠症候群の病態生理において、マクロファージはplaque活性化の点で炎症を介して重要な役割を演じている(19, 35)。炎症性サイトカイン(IL-1 β , IL-6, IL-8 and TNF- α)によって伝達される炎症反応は動脈硬化のすべての段階において高い重要性をもっている(19)。さらに炎症性サイトカインはマクロファージからのMMP産生を引き起こす。MMPは細胞外マトリックスを減らし線維性

皮膜を菲薄化してplaque破綻の病態生理に関係している(36)。我々はヒト培養マクロファージにおいてRimonabantが炎症性サイトカインとMMP-9を有意に減少させることを示した。これに対して、IL-10は進展した動脈硬化を退縮させる保護的役割を果たしている(37)。今回の研究ではLPS刺激に対するヒト培養マクロファージからのIL-10産生はRimonabantによって変化を受けなかった。これは、CB1受容体遮断が血管領域においてIL-10の保護的役割を阻害しないことを意味している。Rimonabantによるマクロファージからの炎症性サイトカインとMMP-9の抑制は、動脈硬化発生の過程で調節的役割を果たすことを示唆している。Rimonabantはマクロファージの炎症活性を減弱することでplaqueの不安定性を改善する可能性がある。

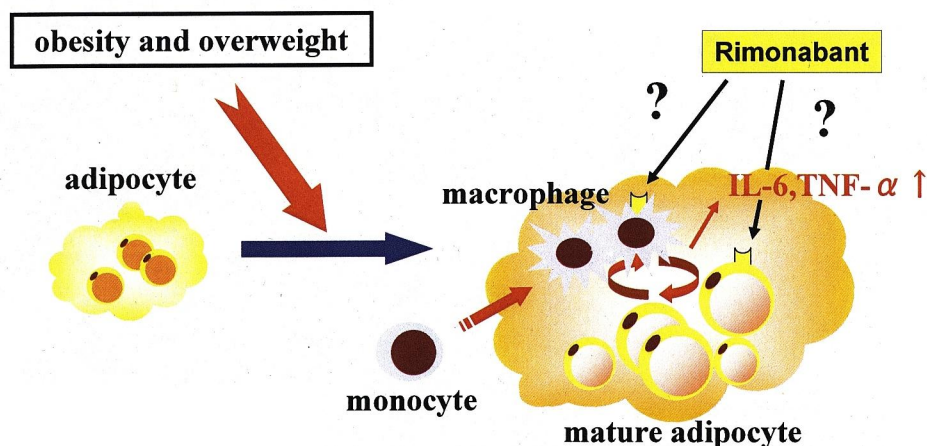


また最近の研究で脂肪細胞がIL-6やTNF- α を産生していることが報告されている。肥満では脂肪組織にマクロファージが浸潤しており、脂肪組織での炎症性刺激の重要な源となっている(38)。このように肥満そのものがインスリン抵抗性やリポ蛋白とは独立して炎症と動脈硬化を進展させる(39)。さらに、肥満や2型糖尿病に関連した高血糖の患者では、内臓脂肪と血清における内因性カンナビノイドが高値を示す

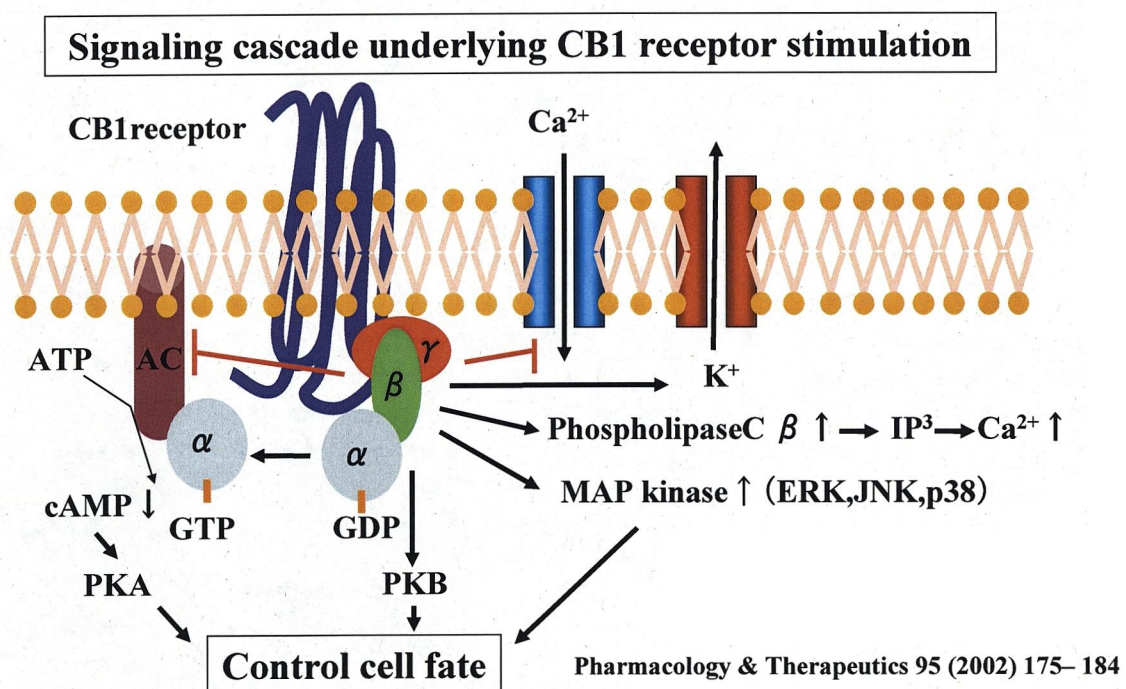
ことが報告されており、これは肥満者や多数の冠動脈危険因子をもつ患者ではECSが過剰発現していることを示唆している(40, 41)。我々が測定した冠動脈疾患患者での検討でも、内因性カンナビノイドの活性化が認められ、その上昇はBMI、中性脂肪、hsCRP、HbA1cなどの代謝性因子、炎症マーカーと有意な相関が認められた。



本研究でRimonabantはヒト培養マクロファージからのIL-6とTNF- α 産生を減少させており、脂肪組織のマクロファージにおいてもIL-6とTNF- α 産生を抑制し、肥満に関連した炎症過程を調節するかもしれない。これらの結果は、肥満患者の脂肪組織および粥腫中のマクロファージにおいてRimonabantが抗炎症効果を介して動脈硬化発生過程を調節する可能性があることを示唆している。それゆえ、CB1受容体遮断は肥満やメタボリックシンドロームの患者において、付加的な有益性を生み出す可能性がある。



本研究では *in vitro* のLPS刺激マクロファージにおいてRimonabantが炎症性サイトカインとMMP-9の産生を抑制することを示したが、Rimonabantの抗炎症性効果の詳細なメカニズムは未だよくわかっていない。CB1受容体アゴニストが基礎レベルもしくは薬物によるcAMP濃度の上昇を抑制することは、*in vitro* におけるカンナビノイド類の定量的機能的な生化学的解析により広く調べられている(34)。マクロファージでは、cAMPは貪食作用や反応性酸素種の産生および炎症性伝達物質の産生を含む細胞活性を抑制する効果を示す(42)。Goncalves de Moraesらは、活性化マクロファージにおいて、cAMPを特異的に上昇させるような物質はTNF- α 産生を抑制することを報告している(43)。我々はヒト培養マクロファージでRimonabantによるCB1受容体遮断が細胞内のcAMP濃度を上昇させ、MAPKのひとつであるJNKのリン酸化を抑制することを示した。Rimonabantの抗炎症効果の一端は、動脈硬化病変のマクロファージ細胞内cAMP上昇とJNKリン酸化抑制作用による可能性がある。以下にすでに報告があるCB1受容体刺激によるシグナル伝達のシェーマを示す(44)。

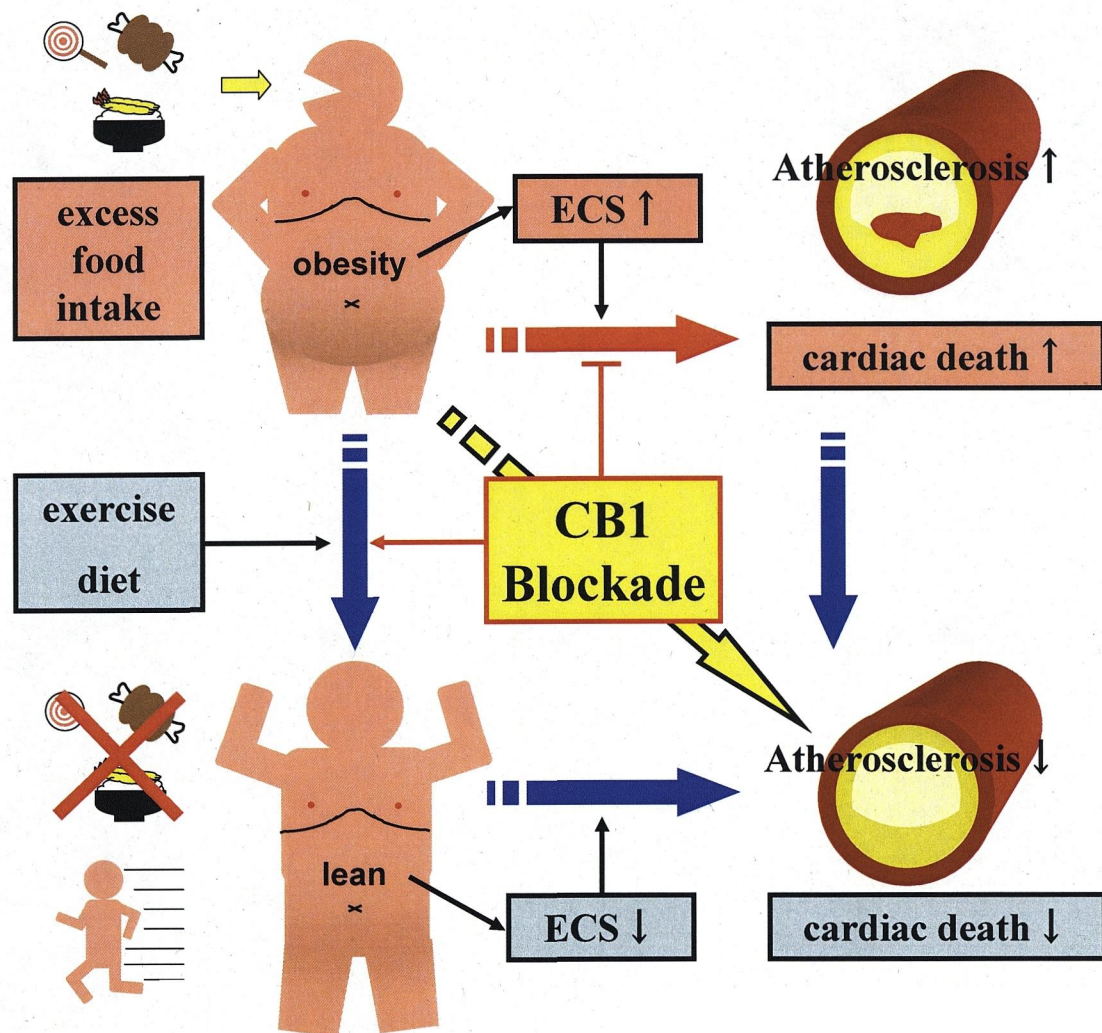


同時に、我々はヒト冠動脈粥腫においてCB2受容体の発現も確認した。しかし、その発現はCB1受容体の発現と比較すると際だったものではなく、さらにヒト単核球-マクロファージのCB2受容体発現はin vitro 培養における分化過程で減少した。Steffensらはマウスモデルにおいて、CB2受容体刺激が炎症抑制性に働き、抗動脈硬化作用を示す可能性があることを報告している(45)。我々は、マクロファージにおいて、特異的なCB1受容体アンタゴニストによりCB1受容体を遮断することは、より効果的な内因性CB2受容体活性を強化し付加的な抗炎症効果に結びつくと考えている。

最後に動脈硬化を発症するマウスモデルを使用した実験では、ヒト経口投与量に換算した量の Rimonabant 投与を行ったが体重減少は起きなかった。しかしアディポネクチン値は Rimonabant 投与群で有意に上昇していた。Rimonabant は脂肪細胞に作用してアディポネクチン値を上昇させることが報告されており、体重減少はなくとも末梢 ECS に有意な影響を及ぼしたと推定される(46)。今回の実験で動脈硬化病変が Rimonabant 投与によって有意に減少したことは、Rimonabant が末梢の ECS を介して動脈硬化病変に作用したことを示唆しており、中枢性の体重減少による効果とは別に動脈硬化病変に対して有益な効果を持つ可能性がある。

9. 結語

本研究では、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。



10. 参考文献

1. Grundy, S.M., Cleeman, J.I., Daniels, S.R., Donato, K.A., Eckel, R.H., Franklin, B.A., Gordon, D.J., Krauss, R.M., Savage, P.J., Smith, S.C., Jr., et al. 2005. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation* **112**:2735-2752.
2. Malik, S., Wong, N.D., Franklin, S.S., Kamath, T.V., L'Italien, G.J., Pio, J.R., and Williams, G.R. 2004. Impact of the metabolic syndrome on mortality from coronary heart disease, cardiovascular disease, and all causes in United States adults. *Circulation* **110**:1245-1250.
3. James, P.T., Rigby, N., and Leach, R. 2004. The obesity epidemic, metabolic syndrome and future prevention strategies. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* **11**:3-8.
4. Adams, K.F., Schatzkin, A., Harris, T.B., Kipnis, V., Mouw, T., Ballard-Barbash, R., Hollenbeck, A., and Leitzmann, M.F. 2006. Overweight, obesity, and mortality in a large prospective cohort of persons 50 to 71 years old. *N Engl J Med* **355**:763-778.
5. Lakka, H.M., Laaksonen, D.E., Lakka, T.A., Niskanen, L.K., Kumpusalo, E., Tuomilehto, J., and Salonen, J.T. 2002. The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. *Jama* **288**:2709-2716.
6. Ayyad, C., and Andersen, T. 2000. Long-term efficacy of dietary treatment of obesity: a systematic review of studies published between 1931 and 1999. *Obes Rev* **1**:113-119.

7. Gelfand, E.V., and Cannon, C.P. 2006. Rimonabant: a cannabinoid receptor type 1 blocker for management of multiple cardiometabolic risk factors. *J Am Coll Cardiol* **47**:1919-1926.
8. Di Marzo, V., and Matias, I. 2005. Endocannabinoid control of food intake and energy balance. *Nat Neurosci* **8**:585-589.
9. Cota, D., Marsicano, G., Tschop, M., Grubler, Y., Flachskamm, C., Schubert, M., Auer, D., Yassouridis, A., Thone-Reineke, C., Ortmann, S., et al. 2003. The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. *J Clin Invest* **112**:423-431.
10. Teixeira-Clerc, F., Julien, B., Grenard, P., Tran Van Nhieu, J., Deveaux, V., Li, L., Serriere-Lanneau, V., Ledent, C., Mallat, A., and Lotersztajn, S. 2006. CB1 cannabinoid receptor antagonism: a new strategy for the treatment of liver fibrosis. *Nat Med* **12**:671-676.
11. Carai, M.A., Colombo, G., and Gessa, G.L. 2005. Rimonabant: the first therapeutically relevant cannabinoid antagonist. *Life Sci* **77**:2339-2350.
12. Boyd, S.T., and Fremming, B.A. 2005. Rimonabant--a selective CB1 antagonist. *Ann Pharmacother* **39**:684-690.
13. Van Gaal, L.F., Rissanen, A.M., Scheen, A.J., Ziegler, O., and Rossner, S. 2005. Effects of the cannabinoid-1 receptor blocker rimonabant on weight reduction and cardiovascular risk factors in overweight patients: 1-year experience from the RIO-Europe study. *Lancet* **365**:1389-1397.
14. Despres, J.P., Golay, A., and Sjostrom, L. 2005. Effects of rimonabant on metabolic risk factors in overweight patients with dyslipidemia. *N Engl J Med*

353:2121-2134.

15. Pi-Sunyer, F.X., Aronne, L.J., Heshmati, H.M., Devin, J., and Rosenstock, J. 2006. Effect of rimonabant, a cannabinoid-1 receptor blocker, on weight and cardiometabolic risk factors in overweight or obese patients: RIO-North America: a randomized controlled trial. *Jama* **295**:761-775.
16. Scheen, A.J., Finer, N., Hollander, P., Jensen, M.D., and Van Gaal, L.F. 2006. Efficacy and tolerability of rimonabant in overweight or obese patients with type 2 diabetes: a randomised controlled study. *Lancet* **368**:1660-1672.
17. Jbilo, O., Ravinet-Trillou, C., Arnone, M., Buisson, I., Bribes, E., Peleraux, A., Penarier, G., Soubrie, P., Le Fur, G., Galiegue, S., et al. 2005. The CB1 receptor antagonist rimonabant reverses the diet-induced obesity phenotype through the regulation of lipolysis and energy balance. *Faseb J* **19**:1567-1569.
18. Gary-Bobo, M., Elachouri, G., Scatton, B., Le Fur, G., Oury-Donat, F., and Bensaid, M. 2006. The cannabinoid CB1 receptor antagonist rimonabant (SR141716) inhibits cell proliferation and increases markers of adipocyte maturation in cultured mouse 3T3 F442A preadipocytes. *Mol Pharmacol* **69**:471-478.
19. Libby, P. 2002. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* **420**:868-874.
20. Li, A.C., and Glass, C.K. 2002. The macrophage foam cell as a target for therapeutic intervention. *Nat Med* **8**:1235-1242.
21. Nissen, S.E., Nicholls, S.J., Wolski, K., Rodes-Cabau, J., Cannon, C.P., Deanfield, J.E., Despres, J.P., Kastelein, J.J., Steinhubl, S.R., Kapadia, S., et al. 2008. Effect of rimonabant on progression of atherosclerosis in patients with

- abdominal obesity and coronary artery disease: the STRADIVARIUS randomized controlled trial. *Jama* **299**:1547-1560.
22. Stary, H.C., Chandler, A.B., Dinsmore, R.E., Fuster, V., Glagov, S., Insull, W., Jr., Rosenfeld, M.E., Schwartz, C.J., Wagner, W.D., and Wissler, R.W. 1995. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **15**:1512-1531.
 23. Virmani, R., Kolodgie, F.D., Burke, A.P., Farb, A., and Schwartz, S.M. 2000. Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**:1262-1275.
 24. Casanova, M.L., Blazquez, C., Martinez-Palacio, J., Villanueva, C., Fernandez-Acenero, M.J., Huffman, J.W., Jorcano, J.L., and Guzman, M. 2003. Inhibition of skin tumor growth and angiogenesis in vivo by activation of cannabinoid receptors. *J Clin Invest* **111**:43-50.
 25. Benito, C., Romero, J.P., Tolon, R.M., Clemente, D., Docagne, F., Hillard, C.J., Guaza, C., and Romero, J. 2007. Cannabinoid CB1 and CB2 receptors and fatty acid amide hydrolase are specific markers of plaque cell subtypes in human multiple sclerosis. *J Neurosci* **27**:2396-2402.
 26. Isobe Y, N.P., Brown WR. 1977. Studies on translocation of immunoglobulins across intestinal epithelium: I: improvements in the peroxidase-labeled antibody method for application to study of human intestinal mucosa. *Acta*

- Histochem Cytochem.* **10**:161-171.
27. Hamm, C.W., and Braunwald, E. 2000. A classification of unstable angina revisited. *Circulation* **102**:118-122.
 28. Obata, T., Sakurai, Y., Kase, Y., Tanifuji, Y., and Horiguchi, T. 2003. Simultaneous determination of endocannabinoids (arachidonylethanolamide and 2-arachidonylglycerol) and isoprostane (8-epiprostaglandin F2alpha) by gas chromatography-mass spectrometry-selected ion monitoring for medical samples. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **792**:131-140.
 29. Sugiyama, S., Okada, Y., Sukhova, G.K., Virmani, R., Heinecke, J.W., and Libby, P. 2001. Macrophage myeloperoxidase regulation by granulocyte macrophage colony-stimulating factor in human atherosclerosis and implications in acute coronary syndromes. *Am J Pathol* **158**:879-891.
 30. Tsuchiya, S., Kobayashi, Y., Goto, Y., Okumura, H., Nakae, S., Konno, T., and Tada, K. 1982. Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a phorbol diester. *Cancer Res* **42**:1530-1536.
 31. Fujiwara, Y., Kiyota, N., Hori, M., Matsushita, S., Iijima, Y., Aoki, K., Shibata, D., Takeya, M., Ikeda, T., Nohara, T., et al. 2007. Esculeogenin A, a new tomato sapogenol, ameliorates hyperlipidemia and atherosclerosis in ApoE-deficient mice by inhibiting ACAT. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**:2400-2406.
 32. Engeli, S., and Jordan, J. 2006. The endocannabinoid system: body weight and metabolic regulation. *Clin Cornerstone* **8 Suppl 4**:S24-35.
 33. Puffenbarger, R.A. 2005. Molecular biology of the enzymes that degrade

- endocannabinoids. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* **4**:625-631.
34. Howlett, A.C., Barth, F., Bonner, T.I., Cabral, G., Casellas, P., Devane, W.A., Felder, C.C., Herkenham, M., Mackie, K., Martin, B.R., et al. 2002. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev* **54**:161-202.
 35. Ross, R. 1999. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* **340**:115-126.
 36. Jones, C.B., Sane, D.C., and Herrington, D.M. 2003. Matrix metalloproteinases: a review of their structure and role in acute coronary syndrome. *Cardiovasc Res* **59**:812-823.
 37. Mallat, Z., Besnard, S., Duriez, M., Deleuze, V., Emmanuel, F., Bureau, M.F., Soubrier, F., Esposito, B., Duez, H., Fievet, C., et al. 1999. Protective role of interleukin-10 in atherosclerosis. *Circ Res* **85**:e17-24.
 38. Shoelson, S.E., Lee, J., and Goldfine, A.B. 2006. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest* **116**:1793-1801.
 39. Yudkin, J.S., Juhan-Vague, I., Hawe, E., Humphries, S.E., di Minno, G., Margaglione, M., Tremoli, E., Kooistra, T., Morange, P.E., Lundman, P., et al. 2004. Low-grade inflammation may play a role in the etiology of the metabolic syndrome in patients with coronary heart disease: the HIFMECH study. *Metabolism* **53**:852-857.
 40. Engeli, S., Bohnke, J., Feldpausch, M., Gorzelniak, K., Janke, J., Batkai, S., Pacher, P., Harvey-White, J., Luft, F.C., Sharma, A.M., et al. 2005. Activation of the peripheral endocannabinoid system in human obesity. *Diabetes*

54:2838-2843.

41. Matias, I., Gonthier, M.P., Orlando, P., Martiadis, V., De Petrocellis, L., Cervino, C., Petrosino, S., Hoareau, L., Festy, F., Pasquali, R., et al. 2006. Regulation, function, and dysregulation of endocannabinoids in models of adipose and beta-pancreatic cells and in obesity and hyperglycemia. *J Clin Endocrinol Metab* **91**:3171-3180.
42. Aronoff, D.M., Canetti, C., Serezani, C.H., Luo, M., and Peters-Golden, M. 2005. Cutting edge: macrophage inhibition by cyclic AMP (cAMP): differential roles of protein kinase A and exchange protein directly activated by cAMP-1. *J Immunol* **174**:595-599.
43. Goncalves de Moraes, V.L., Singer, M., Vargaftig, B.B., and Chignard, M. 1998. Effects of rolipram on cyclic AMP levels in alveolar macrophages and lipopolysaccharide-induced inflammation in mouse lung. *Br J Pharmacol* **123**:631-636.
44. Guzman, M., Sanchez, C., and Galve-Roperh, I. 2002. Cannabinoids and cell fate. *Pharmacol Ther* **95**:175-184.
45. Steffens, S., Veillard, N.R., Arnaud, C., Pelli, G., Burger, F., Staub, C., Karsak, M., Zimmer, A., Frossard, J.L., and Mach, F. 2005. Low dose oral cannabinoid therapy reduces progression of atherosclerosis in mice. *Nature* **434**:782-786.
46. Bensaid, M., Gary-Bobo, M., Esclangon, A., Maffrand, J.P., Le Fur, G., Oury-Donat, F., and Soubrie, P. 2003. The cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716 increases Acrp30 mRNA expression in adipose tissue of obese fa/fa rats and in cultured adipocyte cells. *Mol Pharmacol* **63**:908-914.