動脈硬化の発症と進展に関与する新規メカニズムの探索と治療法開発

所属機関　金沢医科大学　医学部
研究者名　梶　波　康　二

≪研究の概要≫

動脈硬化の発症と進展に関与する新規メカニズムの探索と治療法開発は、急速に進む高齢化社会を迎えている日本において重要な課題である。本研究では以下のアプローチによって動脈硬化症の発症と進展に係わる新しいメカニズムを探索し、それを実際の治療に応用する戦略開発を目指した。

第一に、動脈硬化病変の外膜で増殖する外膜微小血管(Vasa vasorum, VV)に着目し、VVの機能および動脈硬化病変調節機構を明らかにすることにより、VV増殖の調節を標的とした新しい動脈硬化病変治療法の開発を目指した。脂肪組織移植モデルを用いた検討により、外膜微小血管の増殖には移植した脂肪組織に含まれる血管細胞が関与する可能性が示唆された。またスラミンが、この外膜微小血管増殖抑制作用を持つこと、その機序としては多様な成長因子抑制作用を介していることを明らかにした。

第二に、動脈硬化の発症と進展における炎症の関与について、インフラマソーム活性化の観点から解明すべく、その可視化の系を作成したが、以後の検討に供するには不十分に留まった。一方、脂肪組織における慢性炎症に肥大化した脂肪細胞の細胞死がどのようなメカニズムで関与しているかを検討し、遊離核酸を増加させ、マクロファージTLR9を活性化させることで、脂肪組織の慢性炎症を惹起し、インスリン抵抗性の発症に関与することを明らかにした。

最後に、コレステロール低下療法による動脈硬化性心血管疾患予防の有効性・安全性規定因子探索を、脂質代謝系指標に加え、それ以外の代謝系指標へ拡大を試みた。また動脈硬化病変に形成される血栓に対する治療薬への反応性規定因子の探索を目指した。その結果、多因子疾患である動脈硬化治療に対する反応性は、生活習慣に代表される環境因子と遺伝子多型で規定された遺伝素因の相互関係によって説明できることがワルファリンにおいて明らかとなった。また薬物療法に伴う有害事象規定因子に人種特異的な免疫関連遺伝素因が関わる可能性が示唆された。さらには、古典的動脈硬化危険因子である耐糖能異常と酸化ストレスの関係が、終末糖化産物を介する新しい可能性が示唆された。

本研究の成果は、動脈硬化の発症と進展に関わる新しい治療ターゲットとして今後の発展が期待される。

梶波　康二	金沢医科大学医学部 循環器内科学教授	研究のデザインと統括、臨床的検討
佐田　政隆	徳島大学ヘルスバイオサイエンス研究部 循環器内科学教授	動脈壁と周囲脂肪組織における慢性炎症の可視化と病態解明
田中　君枝	東京大学 保健・健康推進本部 助教	動脈硬化病変における外膜微小血管の画像化と機能の解明

研究報告

Ⅰ　研究目的

日本では、生活習慣の欧米化と高齢者人口の急増ともに、動脈硬化性心血管疾患が増加している。またその発症により以後の生活の質が大きく損なわれることから、その病態の解明と有効な予防法ならびに治療法の確立は大きな社会課題である。その中で、コレステロールに代表される古典的危険因子のみでは説明のつかない未知のメカニズム探索が、動脈硬化症の克服に向けてのブレークスルーと期待される。本研究は、従来のわれわれの研究成果を踏まえ、以下のアプローチによって動脈硬化症の発症と進展に係わる新しいメカニズムを探索し、それを実際の治療に応用する戦略開発を目指すものである。

第一に、動脈硬化病変の外膜で増殖する外膜微小血管(Vasa vasorum, VV)に着目した。動脈硬化病変の進展に伴い血管外膜に VV の増殖が生じることが古くから指摘されており、血管外膜側からプラーク内に侵入して病変の拡大や不安定化に関与すると考えられている。VV の機能および動脈硬化病変調節機構を明らかにすることにより、VV 増殖の調節を標的とした新しい動脈硬化病変治療法の開発を目指す（田中)。

第二に、動脈硬化の発症と進展における炎症の関与について、インフラマソーム活性化の観点から解明するため、まずその可視化を試みた。in vitro ならびに in vivo でイメージングを行うとともに、動物実験で得られた成果の臨床的意義を、臨床材料を用いた検討への展開を目指す（佐田)。

最後に、コレステロール低下療法による動脈硬化性心血管疾患予防の有効性・安全性規定因子探索を、脂質代謝系指標に加え、それ以外の代謝系指標へ拡大を試みる。また動脈硬化病変に伴って形成される血栓の治療薬である抗凝固療法への反応性規定因子の探索を目指す。のみならず、動脈硬化の病態に関わる酸化ストレスについて、新たな高感度測定法の臨床的有用性の検討を目指す（梶波)。

Ⅱ　研究計画および材料と方法

１．動脈硬化における外膜微小血管の画像化と機能の解明　（田中）

１）マウスの腹部大動脈周囲に別のマウスの脂肪組織を移植するモデル作成についてマウスの側腹部皮膚を切開し背側から腹部大動脈に到達し脂肪組織を移植する手法を試みた。

２）高脂食を投与した高齢 ApoE 欠損マウスの大腿動脈をトマトレクチン潅流染色による血管内皮細胞染色後に観察し、外膜微小血管増殖を伴う動脈硬化病変の発症メカニズムを

検討した。

２．血管壁ならびに周囲脂肪組織における慢性炎症の可視化と病態解明　（佐田）

１）血管壁と血管周囲脂肪組織における慢性炎症の起点となるインフラマソームの活性化を可視化するため、インフラマソーム活性化によって生ずる Caspase1（ICE, Interleukin-1β変換酵素）活性化について FRET 現象を用い可視化する系の作成を目指した。

２）Caspase-1 が活性化した細胞はアポトーシスを生じて死亡するという知見にヒントを得て、肥満によって脂肪組織で慢性炎症が惹起されるメカニズムの解明を試みた。すなわち、インスリン抵抗性の発症要因として注目されている脂肪組織におけるマクロファージを中心とした慢性炎症は肥大化した脂肪細胞の細胞死が関与して惹起される。未解明なそのメカニズムとして、障害を受けた脂肪細胞から遊離した DNA がマクロファージ TLR9 を活性化し、脂肪組織の炎症に関与するとの仮説をたて検証した。

３．動脈硬化治療反応性規定因子の探索　（梶波）

１）動脈硬化性心血管疾患治療に頻用される抗凝固薬ワルファリンの薬効に及ぼすビタミンK摂取量の影響を、栄養薬理遺伝学的手法を用いて検討した。またそのメカニズム解明のため、ビタミン K 吸収に関わる腸管上皮トランスポーターNPC1L1 の機能的遺伝子多型の関与を検討した。

２）抗動脈硬化治療の一つであるコレステロール低下療法、特にスタチン治療継続困難例について、特に筋障害発症例の集積を全国 9 大学との共同研究チームとして集積し、その遺伝素因ならびに臨床所見を探索した。

３）欧米で行われたスタチンによる動脈硬化性心血管疾患予防効果を検討する大規模臨床研究サンプルを用いて候補遺伝子アプローチにて検討を行った。

４）冠動脈疾患患者の病態、さらには治療反応性を予測するためのバイオマーカー候補として、酸化ストレスの高感度測定法、ならびに終末糖化産物(AGE)の新規測定法を用いて、24 時間連続血糖測定による血糖変動指標との関係を検討した。また同方法を動脈硬化性心血管疾患の対照群として頻脈性不整脈患者において検討した。

Ⅲ　研究成果

１．動脈硬化における外膜微小血管の画像化と機能の解明　（田中）

１）GFP マウスの腹部大動脈周囲脂肪組織を、野生型マウス（C57 マウス）の腹部大動脈周囲に移植し、3 週間後に青色光下に実体顕微鏡で観察したところ、GFP 脂肪組織の生着が確認できた。GFP マウスの腹水から採取した炎症細胞を別のマウスの腹部大動脈周囲に留置するモデル作成も検討し、注入 6 週後の時点で腹部大動脈周囲組織のパラフィン包埋切片において GFP 陽性細胞の生着を確認した。

次に、GFP マウスの精巣上体脂肪組織を、高齢 ApoE 欠損マウスの大腿動脈周囲および、若年 ApoE 欠損マウスの部分結紮（頸動脈分岐部より頭側を、上甲状腺動脈を残して結紮）した総頸動脈周囲に移植し、一定期間飼育の後、トマトレクチン潅流による血管内皮細胞染色を行い、血管と周囲組織を採取し組織切片を作成した。蛍光二重免疫染色を行い観察

したところ、頸動脈には新生内膜が形成され外膜微小血管は増殖し、一部は GFP 陽性で、移植した脂肪組織由来と考えられた。新生内膜内微小血管にも、GFP 陽性細胞が認められた。

ApoE-/-マウスの頸動脈を部分結紮して８週後に観察したところ、著明な新生内膜形成を認めたが、外膜微小血管は少数認めるのみであった。一方、部分結紮した総頸動脈周囲に別の ApoE-/-マウスから採取した精巣上体脂肪組織を移植したところ、病変の大きさ(内膜/中膜比)は部分結紮のみの群と同等であったが、外膜微小血管密度は明らかな増加を認めた。この結果と、上記の GFP マウスの巣上体脂肪組織を移植した実験から得た結果より、このモデルにおける外膜微小血管の増殖には移植した脂肪組織に含まれる血管細胞が関与する可能性が考えられた（American Heart Association Scientific Session 2015 にて報告）。また、血管外膜増殖と炎症細胞集積が動脈硬化を拡大させる機序を検討するモデルとして、GFP マウスの腹水から採取したマクロファージを 34 週齢の ApoE-/-マウスの腹部大動脈外膜に留置して炎症細胞が外膜に集積した状態を作成し、高脂食を投与し 10 週後に観察したが、病変形成は認められなかった。

２）40 週齢 ApoE 欠損マウスの右大腿動脈周囲に、ポリ乳酸と混合して徐放化したスラミンを留置し（左大腿動脈周囲には gel のみを留置）、10 週間後に採取して比較したところ、スラミン投与側で動脈硬化病変の形成および外膜微小血管増殖が抑制されており、病変形成が修飾される可能性が示唆された。また同じく 40 週齢 ApoE 欠損マウスの大腿動脈を免疫染色にて観察したところ、血管新生因子 b-FGF の他、プリン受容体 P2Y6 や平滑筋細胞増殖因子 PDGF の発現も認め、スラミンの多様な成長因子抑制作用の影響が考えられた。

２．血管壁ならびに周囲脂肪組織における慢性炎症の可視化と病態解明　（佐田）

１）青色蛍光タンパク CFP と黄色蛍光タンパク YFP を結合した FRET コンストラクトを作成し、その感度、特異度を確認した。蛍光タンパクとして FRET 効果が最大となるアミノ酸配列を決定するとともに、同配列を二個ならびに三個含むタンパク質では、発光スペクトラムが黄色から青色に変化することを確認した。次に、この配列を三個含むタンパクを発現するプラスミドを RAW264.7 細胞にトランスフェクションし、stable line を６株樹立し、LPS２時間刺激後の ATP 負荷にて 30 分後には 425nm レーザー光励起で放出光が同定可能であり、Caspase1 活性化の可視化に成功した。

引き続き、青色蛍光タンパク CFP と黄色蛍光タンパク YFP を Caspase1 の認識配列であるアミノ酸配列 YEVDGW を含んだリンカーによって結合した FRET コンストラクトを作成し、大腸菌に発現させた遺伝子組み換えタンパクを用いて、in vitro 実験を繰り返した。当初の実験は成果が不十分であったため方針を転換し、proIL-1β をセンサーにして、切断をうけると蛍光物質 cp173Venus が核に移行するようなコンストラクトを作製した。しかし、このコントラストを強制発現させるだけで、無刺激下においても細胞毒性があることが判明した。そのため、pro-IL1β の生理活性を欠損させて、インフラマソーム結合能だけあるコンストラクトを各種作製したところ、N27-N116 までに毒性部位があることが判明した。切断部位は N27 と N116 であるため、毒性を欠如したコンストラクトでは、pro-IL1β をセンサーに使用できないことが判明した。そこで、doxycycline により発現を誘導することが可能な pTetOne Vector にコンストラクトをサブクローニングするととも

に、マクロファージ系 Cell line RAW264.7 細胞にトランスフェクションして、stable cell line 樹立を目指した。
２）高脂肪食負荷(HFD)下の肥満野生型（WT）マウスは、非肥満マウスに比べて、血漿中の ssDNA などの遊離核酸量が有意に多かった。障害脂肪細胞とマクロファージの相互作用に TLR9 が関与するかどうかを検討するため、WT と TLR9 欠損マウス（TLR9KO）から単離したマクロファージを、TNF-αの存在下で培養した脂肪細胞の培養上清で刺激したところ、WT マクロファージにおいて、MCP-1 の発現が有意に増加した。培養上清から抽出した遊離核酸も、WT マクロファージからの MCP-1 の発現を増加させた。生体内における TLR9 の役割を検討するため、TLR9KO マウスと WT マウスに HFD を行ったところ、内臓脂肪重量には差を認めなかったが、TLR9KO マウスでは、脂肪組織におけるインスリン感受性遺伝子の発現が高く、逆に炎症の程度は低かった。また、TLR9KO マウスは WT マウスに比べて、インスリン感受性が高かった。さらに TLR9 特異的阻害オリゴヌクレオチドの投与は、HFD 下の WT マウスのインスリン感受性を改善させた。以上より、肥大化した脂肪細胞の細胞死は、遊離核酸を増加させ、マクロファージ TLR9 を活性化させることで、脂肪組織の慢性炎症を惹起し、インスリン抵抗性の発症に関与することが明らかとなった。

３．動脈硬化治療反応性規定因子の探索　（梶波）
１）ワルファリン反応性の個人差におけるビタミン K 摂取量の影響は、ビタミンK代謝関連遺伝子(*VKORC1*)における機能的高頻度多型（－1639A/G）変異アレル保有者が、非保持者より有意に大きいことが明かとなった。またビタミン K 吸収には小腸上皮に発現するコレステロール吸収トランスポーターNPC1L1 が関与するとの知見に着想を得て、VKORC１遺伝子多型との相互関係を検討したところ、*VKORC1*－1639A/G 多型変異アレル保有者でのみ、rs2071183 多型野生型アレル G のホモ接合体(NPC1L1 活性が高く吸収能が高いと報告されている)でビタミン K 摂取量が有意に低値を示した。
２）筋障害を理由にスタチン投与困難となった本邦例について候補遺伝子アプローチ法にて関連遺伝子多型（SNP）の探索した結果、スタチン代謝に関連したトランスポーターを始め、欧米人で有意な関係が報告された遺伝子多型の寄与は少なく、代わってアジア人に頻度の高い HLA 遺伝子型が発症に関与することが明かとなった。現在ゲノムワイド連鎖解析を行い一次結果の解析へ展開している。
３）欧米におけるスタチンを用いた大規模臨床試験である PROSPER 研究において、余剰コレステロール引き抜きに関与する ABCA１遺伝子多型がスタチンによる動脈硬化性心血管イベント予防の有効性に有意に影響する、すなわち薬効規定因子であることを見出した。
４）糖尿病非合併冠動脈硬化症患者において、高感度測定法を用いて検討した酸化ストレスマーカーであるニトロチロシン血中濃度が、疾患重症度と相関すること見出した。経口ブドウ糖負荷試験や HbA1c では捉えることのできない血糖変動指標が、冠動脈硬化症の臨床的重症度と強く相関し、酸化ストレス指標ならびに終末糖化産物(AGE)がその病態に関わっていることも併せて見出した（論文投稿中）。また動脈硬化性心血管疾患の対照群として検討した頻脈性不整脈患者において、酸化ストレス指標が、アミノ酸代謝（グルタミン酸ならびにタウリンの血中濃度）と有意に相関することを見出した。

Ⅳ　考察

１．動脈硬化における外膜微小血管の画像化と機能の解明　（田中）

動脈硬化病変では、病変の拡大に伴い外膜 VV が増殖し、外膜側から病変内に侵入して、炎症細胞などを送り込む導管となる。また最近では、血管周囲脂肪組織から分泌される生理活性物質も、外膜 VV を介して動脈硬化病変に作用する可能性が示唆されている。動脈硬化モデルマウスの自然発症病変では明らかにできなかったが、頸動脈部分結紮モデルと血管外膜脂肪移植モデルを併用して観察したところ、GFP 陽性の血管外膜 VV を認めた。頸動脈部分結紮モデルのみでも著明な病変形成は認められたが、脂肪移植を行うと VV 増殖が増強されたことも合わせて、血管周囲脂肪組織中の血管細胞が VV 増殖に関与すると考えられた。また、スラミン局所投与により VV 増殖および病変進展の抑制を認めたことから、薬剤の局所投与が動脈硬化の新たな治療法となる可能性があると考えられた。

２．血管壁ならびに周囲脂肪組織における慢性炎症の可視化と病態解明　（佐田）

慢性炎症の起点となるインフラマソームの活性化を Caspase1 活性で評価する系の確立を目指した。様々な実験を繰り返し、細胞内で Caspase1 活性をモニターするためには、proIL-1β をセンサーに使用するしか方法がないことが判明したが、proIL-1β は強制発現すると毒性があり細胞死がおこることが判明した。そこで、doxycycline により発現を誘導することが可能な Tet On システムを利用して stable cell line を樹立しようとした。しかしその時、東京大学薬学部のグループから、Caspase-1 が活性化した細胞はアポトーシスを生じて死亡するという論文が出版された（Liu et al. Cell Rep. 2014;8:974-982.）。当初、予定していた低強度の Caspase1 活性化を可視化することが不可能であることが判明した。三年間様々な方法を試し奮闘したが、本プロジェクトは中断せざるを得なかった。

そこで、方向転換して、肥満によって脂肪組織で慢性炎症が惹起されるメカニズムの解明に取り組むことにした。肥大化した脂肪細胞の細胞死は、遊離核酸を増加させ、マクロファージ TLR9 を活性化させることで、脂肪組織の慢性炎症を惹起し、インスリン抵抗性の発症に関与することを明らかにすることができた。近年、動脈硬化やメタボリックシンドロームは慢性炎症が原因としてとらえられているが、生活習慣病で何故、無菌的慢性炎症が脂肪組織や血管壁で生じるか不明であった。今回の研究で、肥満が細胞死を生じさせて、自然免疫の病原体センサーを活性化することが明らかになった。今後、遊離核酸-TLR9 系を標的にした、動脈硬化、メタボリックシンドロームの新規治療法の開発に応用されることが期待される。

３．動脈硬化治療反応性規定因子の探索　（梶波）

多因子疾患である動脈硬化治療に対する反応性は、生活習慣に代表される環境因子と遺伝子多型で規定された遺伝素因の相互関係によって説明できることがワルファリンという実例をもって明らかとなった。

治療反応性の一つである有害事象の規定因子に人種特異的な免疫に関係する素因が関わる可能性が示唆される想定外の知見が得られた。今後その発症メカニズムの解明が期待されるとともに、人種特異的探索が重要であることが確認された。

従来から種々の角度から研究されてきた酸化ストレスが、終末糖化産物を介して耐糖能と動脈硬化をつなぐ病態に関与する可能性が示唆され、新しい治療ターゲットさらには治療反応性に関与する新しい領域として期待される。

V　研究成果の発表　（＊は謝辞記載あり）

田中君枝

Tanaka K, Sata M, Komuro I. Vascular cells originating from perivascular adipose tissues contribute to vasa vasorum neovascularization in atherosclerosis. (presented at American Heart Association Scientific Session 2015, November 9, 2015, Orlando, FL, USA) (論文作成中)

*__Tanaka K__, Sata M. Visualization of human coronary vasa vasorum in vivo.　**Circ J**. 2015;79(6):1211-2.

*Hara T, Fukuda D, **Tanaka K,** Higashikuni Y, Hirata Y, Yagi S, Yamada H, Soeki T, Wakatsuki T, Shimabukuro M, Sata M: Rivaroxaban, a novel oral anticoagulant, attenuates atherosclerotic plaque progression and destabilization in ApoE-deficient mice. **Atherosclerosis**. 242(2): 639-646, 2015

*Nishimoto S, Fukuda D, Higashikuni Y, **Tanaka K**, Hirata Y, Murata C, Kim-Kaneyama JR, Sato F, Bando M, Yagi S, Soeki T, Hayashi T, Imoto I, Sakaue H, Shimabukuro M, Sata M.　Obesity-induced DNA released from adipocytes stimulates chronic adipose tissue inflammation and insulin resistance. **Sci Adv**. 2016 Mar 25;2(3):e1501332.

*Salim HM, Fukuda D, Higashikuni Y, **Tanaka K,** Hirata Y, Yagi S, Soeki T, Shimabukuro M, Sata M: Dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, linagliptin, ameliorates endothelial dysfunction and atherogenesis in normoglycemic apolipoprotein-E deficient mice. **Vascul Pharmacol**. 79:16-23, 2016

Ueda T, Nakata Y, Yamasaki N, Oda H, Sentani K, Kanai A, Onishi N, Ikeda K, Sera Y, Honda ZI, **Tanaka K**, Sata M, Ogawa S, Yasui W, Saya H, Takita J, Honda H. ALKR1275Q perturbs extracellular matrix, enhances cell invasion and leads to the development of neuroblastoma in cooperation with MYCN. **Oncogene**. 2016 Feb 1. doi: 10.1038/onc.2015.519. [Epub ahead of print]

Higashikuni Y, **Tanaka K**, Kato M, Nureki O, Hirata Y, Nagai R, Komuro I, Sata M. Toll-like receptor-2 mediates adaptive cardiac hypertrophy in response to pressure overload through interleukin-1β upregulation via nuclear factor κB activation. **J Am Heart Assoc.** 2013 Nov 18;2(6):e000267.

Hirata Y, Kurobe H, Higashida M, Fukuda D, Shimabukuro M, **Tanaka K**, Higashikuni Y, Kitagawa T, Sata M. HMGB1 plays a critical role in vascular inflammation and lesion formation via toll-like receptor 9. **Atherosclerosis**. 2013 Dec;231(2):227-33.

佐田政隆

Kusunose K, Sato M, Yamada H, Saijo Y, Bando M, Hirata Y, Nishio S, Hayashi S, **Sata M**: Prognostic implications of non-invasive vascular function tests in high-risk atherosclerosis patients. **Circ J**. 80(4), 1034-1040, 2016

Bando M, Yamada H, Kusunose K, Fukuda D, Amano R, Tamai R, Torii Y, Hirata Y, Nishio S, Satomi J, Nagahiro S, **Sata M**: Noninvasive quantitative tissue characterization of carotid plaque using color-coded mapping based on ultrasound integrated backscatter. **JACC Cardiovasc Imaging**. 9(5):625-627, 2016

Shimabukuro M, Higa N, Masuzaki H, **Sata M**, Ueda S: Impact of individual metabolic risk components or its clustering on endothelial and smooth muscle cell function in men. **Cardiovas Diabetol**. 15(1): 77, 2016

Ueda T, Nakata Y, Yamasaki N, Oda H, Sentani K, Kanai A, Onishi N, Ikeda K, Sera Y, Honda Z, Tanaka K, **Sata M**, Ogawa S, Yasui W, Saya H, Takita J, Honda H: ALKR1275Q perturbs extracellular matrix, enhances cell invasion, and leads to the development of neuroblastoma in cooperation with MYCN. **Oncogene**. in press.

Shimabukuro M , Sato H, Izaki H, Fukuda D, Uematsu E,Hirata Y, Yagi S, Soeki T, Sakaue H, Kanayama H, Masuzaki H, **Sata M**: Depot- and gender-specific expression of NLRP3 inflammasome and toll-like receptors in adipose tissue of cancer patients. **Biofactors**. in press.

Oyama J, Murohara T, Kitakaze M, Ishizu T, Sato Y, Kitagawa K, Kamiya H, Ajioka M, Ishiara M, Dai K, Nanasato M, **Sata M**, Maemura K, Tomiyama H, Higashi Y, Kaku K, Yamada H, Matsuhisa M, Yamashita K, Bando YK, Kashihara N, Ueda S, Inoue T, Tanaka A, Node K, PROLOGUE Study Investigators: The effect of sitagliptin on carotid artery atherosclerosis in type 2 diabetes: The PROLOGUE randomized controlled trial. **PLoS Med**. in press.

Shimabukuro M, Okawa C, Yamada H, Yanagi S, Uematsu E, Sugasawa N, Kurobe H, Hirata Y, Kim-Kaneyama JR, Lei XF, Takao S, Tanaka Y, Fukuda D, Yagi S, Soeki T, Kitagawa T, Masuzaki H, Sato M, **Sata M**: The pathophysiological role of oxidized cholesterols in epicardial fat accumulation and cardiac dysfunction: A study in swine fed a high caloric diet with an inhibitor of intestinal cholesterol absorption, ezetimibe. **J Nutr Biochem**. in press.

Oyama J, Tanaka A, Sato Y, Tomiyama H, **Sata M**, Ishizu T, Taguchi I, Kuroyanagi T, Teragawa H, Ishizaka N, Kanzaki Y, Ohishi M, Eguchi K, Higashi Y, Yamada H, Maemura K, Ako J, Bando YK, Ueda S, Inoue T, Murohara T, Node K: Rationale and design of a multicenter randomized study for evaluating vascular function under uric acid control using the xanthine oxidase inhibitor, febuxostat: the PRIZE study. **Cardiovasc Diabeto**l. in press.

Yang ZH, Bando M, Sakurai T, Chen Y, Emma-Okon B, Wilhite B, Fukuda D, Pryor BV, Wakabayashi Y, Sampson M, Yu ZX, Sakurai A, Zarzour A, Miyahara H, Takeo J, Sakaue H, **Sata M**, Remaley AT: Long-chain monounsaturated fatty acid-rich fish oil attenuates the development of atherosclerosis in mouse models. **Mol Nutr Food Res**. in press.

Niki T, Wakatsuki T, Yamaguchi K, Taketani Y, Oeduka H, Kusunose K, Ise T, Iwase T, Yamada H, Soeki T, **Sata M**: Effects of the addition of eicosapentaenoic acid to strong statin therapy on inflammatory cytokines and coronary plaque components assessed by integrated backscatter intravascular ultrasound. **Circ J**. 80:450-460, 2016

Soeki T, **Sata M**: Inflammatory biomarkers and atherosclerosis. **Int Heart J**. 57:134-139, 2016

Nishimoto S, Fukuda D, Higashikuni Y, Tanaka K, Hirata Y, Murata C, Kim-Kaneyama J, Sato F, Bando M, Yagi S, Soeki T, Hayashi T, Imoto I, Sakaue H, Shimabukuro M, **Sata M**: Obesity-induced DNA released from adipocytes stimulates chronic adipose tissue inflammation and insulin resistance. **Sci Adv**. 2(3), e1501332, 2016

*Salim HM, Fukuda D, Higashikuni Y, Tanaka K, Hirata Y, Yagi S, Soeki T, Shimabukuro M, **Sata M**: Dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, linagliptin, ameliorates endothelial dysfunction and atherogenesis in normoglycemic apolipoprotein-E deficient mice. **Vascul Pharmacol**. 79:16-23, 2016

*Hara T, Fukuda D, Tanaka K, Higashikuni Y, Hirata Y, Yagi S, Yamada H, Soeki T, Wakatsuki T, Shimabukuro M, **Sata M**: Rivaroxaban, a novel oral anticoagulant, attenuates atherosclerotic plaque progression and destabilization in ApoE-deficient

mice. **Atherosclerosis.** 242(2): 639-646, 2015

Hirata Y, Yamada H, Kusunose K, Iwase T, Nishio S, Hayashi S, BandoS, Amano R, Yamaguchi K, Soeki T, Wakatsuki T, **Sata M**: Clinical utility of measuring epicardial adipose tissue thickness with echocardiography using a high-frequency linear probe in patients with coronary artery disease. **J Am Soc Echocardiogr**. 28:1240-1246, 2015

Motoki T, Kurobe H, Hirata Y, Nakayama T, Kinoshita H, Rocco KA, Sogabe H, Hori T, **Sata M**, Kitagawa T: PPAR-gamma agonist attenuates inflammation in aortic aneurysm patients. **Gen Thorac Cardiovasc Surg**. 63(10), 565-571, 2015

Tani A, Yamamoto S, Maegawa M, Kunimi K, Matsui S, Keyama K, Kato T, Uemura H, Kuwahara A, Matsuzaki T, Yasui T, Kamada M, Soeki T, **Sata M**, Irahara M: Arterial stiffness is increased in young women with endometriosis. **J Obstet Gynaecol**. 35(7), 711-715, 2015

Shimabukuro M, Saito T, Higa T, Nakamura K, Masuzaki H, **Sata M**; Fukuoka diabetologists group: Risk stratification of coronary artery disease in asymptomatic diabetic subjects using multidetector computed tomography. **Circ J**. 79:2422-2429, 2015

Yagi S, Aihara K, Fukuda D, Takashima A, Bando M, Hara T, Nishimoto S, Ise T, Kusunose K, Yamaguchi K, Tobiume T, Iwase T, Yamada H, Soeki T, Wakatsuki T, Shimabukuro M, Akaike M, **Sata M**: Reduced ratio of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid to arachidonic acid is associated with early onset of acute coronary syndrome. **Nutr J.** 14(1), 111, 2015

Kato Y, Yokoyama U, Yanai C, Ishige R, Kurotaki D, Umemura M, Fujita T, Kubota T, Okumura S, **Sata M**, Ishikawa Y: Epac1 deficiency attenuated vascular smooth muscle cell migration and neointimal formation. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 35: 2617-2625, 2015

Hayashi S, Yamada H, Fukui M, Ito H, **Sata M**: Correlation between arteriosclerosis and periodontal condition assessed by lactoferrin and α-antitrypsin levels in gingival crevicular fluid. **Int Heart J.** 56(6), 639-643, 2015

Higashi Y, Azuma N, Takeishi Y, Minamino T, Kihara Y, Node K, **Sata M**, Fukumoto Y, Origasa H, Matsuo H, Naritomi H, Fujita M, Shimizu W: Effect of a low-intensity pulsed ultrasound device, SX-1001, on clinical symptoms in buerger disease with limb ischemia. **Int Heart J**. 56(6), 632-638, 2015

Yamada H, **Sata M**: The role of pericardial fat: The good, the bad and the ugly. **J Cardiol**. 65: 2-4, 2015

Kimura S, Ueda Y, Ise T, Yagi S, Iwase T, Nishikawa K, Yamaguchi K, Yamada H, Soeki T, Wakatsuki T, Katoh S, Akaike M, Yasui N, **Sata M**: Impact of supervised cardiac rehabilitation on urinary albumin excretion in patients with cardiovascular disease. **Int Heart J**. 56: 105-109, 2015

Soeki T, Yamaguchi K, Niki T, Uematsu E, Bando S, Matsuura T, Ise T, Kusunose K, Hotchi J, Tobiume T, Yagi S, Fukuda D, Taketani Y, Iwase T, Yamada H, Wakatsuki T, Shimabukuro M, **Sata M**: Plasma microRNA-100 is associated with coronary plaque vulnerability. **Circ J**. 79: 413-418, 2015

Minami Y, Nakajima T, Ikutomi M, Morita T, Komuro I, **Sata M**, Sahara M: Angiogenic potential of early and late outgrowth endothelial progenitor cells is dependent on the time of emergence. **Int J Cardiol**. 186: 305-314, 2015

Takashima A, Shimabukuro M, Tabata M, Fukuda D, Uematsu E, Ishibashi-Ueda H, Takanashi S, **Sata M**: Histopathological heterogeneity of in-stent restenosis in four

coronary endarterectomy specimens. **Cardiovasc Pathol**. 24(3): 194-197, 2015

Niki T, Soeki T, Yamaguchi K, Taketani Y, Yagi S, Iwase T, Yamada H, Wakatsuki T, Shimabukuro M, **Sata M**: Elevated concentration of interferon-inducible protein of 10 kD (IP-10) is associated with coronary atherosclerosis. **Int Heart J**. 56: 269-272, 2015

Yagi S, Aihara K, Fukuda D, Takashima A, Hara T, Hotchi J, Ise T, Yamaguchi K, Tobiume T, Iwase T, Yamada H, Soeki T, Wakatsuki T, Shimabukuro M, Akaike M, **Sata M**: Effects of docosahexaenoic acid on the endothelial function in patients with coronary artery disease. **J Atheroscler Thromb**. 22: 447-454, 2015

Tanaka K, **Sata M**: Visualization of human coronary vasa vasorum in vivo. **Circ J.** 79(6): 1211-1212, 2015

Yamada H, **Sata M**: Does echocardiographic epicardial adipose tissue thickness become a useful biomarker? **J Atheroscler Thromb**. 22: 555-556, 2015

Kusunose K, Hotchi J, Takagawa Y, Nishio S, Ise T, Tobiume T, Yamaguchi K, Yagi S, Iwase T, Yamada H, Soeki T, Wakatsuki T, **Sata M**: Serial imaging changes during Immunogloblin G4-related disease with multiple pseudo tumors. **Circulation.** 131:1882-1883, 2015

Yamazaki H, Yamaguchi K, Soeki T, Wakatsuki T, Niki T, Taketani Y, Kitaoka A, Kusunose K, Ise T, Tobiume T, Yagi S, Iwase T, Yamada H, **Sata M**: Impact of indoxyl sulfate, a uremic toxin, on non-culprit coronary plaque composition assessed by integrated backscatter intravascular ultrasound. **Circ J.** 79:1773-1779, 2015

Bando M, Yamada H, Kusunose K, Fukuda D, Amano R, Tamai R, Torii Y, Hirata Y, Nishio S, Yamaguchi K, Soeki T, Wakatsuki T, **Sata M**: Comparison of carotid plaque tissue characteristics in patients with acute coronary syndrome or stable angina pectoris: assessment by iPlaque, transcutaneous carotid ultrasonography with integrated backscatter analysis. **Cardiovasc Ultrasound**. 13(1): 34, 2015

Shimabukuro M, Hasegawa Y, Higa M, Amano R, Yamada H, Mizushima S, Masuzaki H, **Sata M**: Subclinical carotid atherosclerosis burden in Japanese: comparison between Okinawa and Nagano residents. **J Atheroscler Thromb**. 22(8): 854-868, 2015

Bando S, Fukuda D, Soeki T, Nishimoto S, Uematsu E, Matsuura T, Ise T, Tobiume T, Yamaguchi K, Yagi S, Iwase T, Yamada H, Wakatsuki T, Shimabukuro M, **Sata M**: Expression of NLRP3 in subcutaneous adipose tissue is associated with coronary atherosclerosis. **Atherosclerosis**. 242(1): 407-414, 2015

Ikutomi M, Sahara M, Nakajima T, Minami Y, Morita T, Hirata Y, Komuro I, Nakamura F, **Sata M**: Diverse contribution of bone marrow-derived late-outgrowth endothelial progenitor cells to vascular repair under pulmonary arterial hypertension and arterial neointimal formation. **J Moll Cell Cardiol**. 86: 121-135, 2015

Tomiyama H, Kohro T, Higashi Y, Takase B, Suzuki T, Ishizu T, Ueda S, Yamazaki T, Furumoto T, Kario K, Inoue T, Koba S, Watanabe K, Takemoto Y, Hano T, **Sata M**, Ishibashi Y, Node K, Maemura K, Ohya Y, Furukawa T, Ito H, Ikeda H, Yamashina A: Reliability of measurement of endothelial function across multiple institutions and establishment of reference values in Japanese. **Atherosclerosis**. 242(2):433-442, 2015

Yagi S, Aihara K, Akaike M, Fukuda D, Salim HM, Ishida M, Matsuura T, Ise T, Yamaguchi K, Iwase T, Yamada H, Soeki T, Wakatsuki T, Shimabukuro M. Matsumoto T, **Sata M**: Predictive factors for efficacy of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in patients with type 2 diabetes mellitus. **Diabetes Metab J**. 39(4):342-347, 2015.

Shimabukuro M, Higa M, Kinjo R, Yamakawa K, Tanaka H, Kozuka C, Yabiku K, Taira SI, **Sata M**, Masuzaki H. Effects of the brown rice diet on visceral obesity and

endothelial function: the BRAVO study. **Br J Nutr**. 2014;111:310-320

Sahara M, Ikutomi M, Morita T, Minami Y, Nakajima T, Hirata Y, Nagai R, **Sata M**. Deletion of angiotensin-converting enzyme 2 promotes the development of atherosclerosis and arterial neointima formation. **Cardiovasc Res**. 2014;101:236-246

Matsumoto S, Shimabukuro M, Fukuda D, Soeki T, Yamakawa K, Masuzaki H, **Sata M**. Azilsartan, an angiotensin II type 1 receptor blocker, restores endothelial function by reducing vascular inflammation and by increasing the phosphorylation ratio Ser1177/Thr497 of endothelial nitric oxide synthase in diabetic mice. **Cardiovasc Diabetol.** 2014;31;13:30

Sawada N, Jiang A, Takizawa F, Safdar A, Manika A, Tesmenitsky Y, Kang KT, Bischoff J, Kalwa H, Sartoretto JL, Kamei Y, Benjamin LE, Watada H, Ogawa Y, Higashikuni Y, Kessinger CW, Jaffer FA, Michel T, **Sata M**, Croce K, Tanaka R, Arany Z. Endothelial PGC-1α mediates vascular dysfunction in diabetes. **Cell Metab**. 2014;19:246-258

Soeki T, Bando S, Uematsu E, Matsuura T, Niki T, Ise T, Kusunose K, Hotchi J, Ueda Y, Tomita N, Yamaguchi K, Yagi S, Fukuda D, Taketani Y, Iwase T, Yamada H, Wakatsuki T, Shimabukuro M, **Sata M**. Pentraxin 3 is a local inflammatory marker in atrial fibrillation. **Heart Vessels**. 2014;29:653-658

Hirata Y, Kurobe H, Higashida M, Fukuda D, Shimabukuro M, Higashikuni Y, Kitagawa T, **Sata M**. HMGB1 plays a critical role in vascular inflammation and lesion formation via toll-like receptor 9. **Atherosclerosis.** 2013;231:227-233

Sumi M, Tateishi N, Shibata H, Ohki T, **Sata M**. Quercetin glucosides promote ischemia-induced angiogenesis, but do not promote tumor growth. **Life Sciences.** 2013;93:814-819.

Kurobe, H., Matsuoka, Y., Hirata, Y., Sugasawa, N., Maxfield, MW., **Sata M**., Kitagawa, T. Azelnidipine suppresses the progression of aortic aneurysm in wild mice model through anti-inflammatory effects. **J Thorac Cardiovasc Surg**. 2013;146:1501-1508.

Higashikuni Y, Tanaka K, Kato M, Nureki O, Hirata Y, Nagai R, Komuro I, **Sata M**. Toll-like receptor-2 mediates adaptive cardiac hypertrophy in response to pressure overload through interleukin-1β upregulation via nuclear factor κB activation. **J Am Heart Assoc.** 2013;2:e000267

Soeki, T., Niki, T., Uematsu, E., Bando, S., Matsuura, T., Kusunose, K., Ise, T., Ueda, Y., Tomita, N., Yamaguchi, K., Koshiba, K., Yagi, S., Fukuda, D., Taketani, Y., Iwase, T., Yamada, H., Wakatsuki, T., Akaike, M., Shimabukuro, M., Kishimoto, I., Kangawa, K., **Sata M**. Ghrelin protects the heart against ischemia-induced arrhythmias by preserving connexin-43 protein. **Heart Vessels.** 2013;28:795-801

Yamaguchi K, Wakatsuki T, Soeki T, Niki T, Taketani Y, Oeduka H, Kusunose K, Ise T, Iwase T, Yamada H, **Sata M**. Effects of telmisartan on inflammatory cytokines and the coronary plaque component as assessed on integrated backscatter intravascular ultrasound in hypertensive patients. **Circ J**. 2013;78:240-247

梶波康二

Saito R, Takeda K, Aoki H, Fujibayashi K, Wakasa M, Motoyama A, Fujioka N, Akao H, Kawai Y, Tsuchiya T, Kitayama M, **Kajinami K**. Nutri-pharmacogenomic interaction of intestinal cholesterol transporter (NPC1L1) with VKORC1 as a determinant of warfarin anticoagulation. (presented at 80th Scientific Session of Japanese Circulation Society, March 19, 2016, 仙台国際会議場、仙台市)(論文作成中)

Kajinami K, Akao H, Sai K, Maekawa K, Japanese PGx Data Science Consortium, Saito Y. Genetic Background of Stain-Related Myopathy in Japanese. Circ J. 2015,

79(Suppl. I):I-2964. (抄録) (論文作成中)

*Watanabe M, Kawai Y, Kitayama M, Akao A, Motoyama A, Wakasa M, Saito R, Aoki A, Fujibayashi K, Tsuchiya T, Nakanishi H, Saito K, Takeuchi M, **Kajinami K**. Diurnal glycemic fluctuation is associated with severity of coronary artery disease in prediabetic patients: possible role of nitrotyrosine and glyceraldehyde-derived advanced glycation end products. (投稿中)

Fujita W, Matsunari I, Aoki H, Nekolla SG, **Kajinami K**. Prediction of all-cause death using 11C hydroxyephedrine positron emission tomography in Japanese patients with left ventricular dysfunction. **Ann Nucl Med.** 2016 (in press). DOI: 10.1007/s12149-016-1081-z

Kajinami K. Lipoprotein(a): revisiting a next therapeutic target. **Circ J** 2016;80:329-331.

*Takano S, Fujibayashi K, Fujioka N, Ueno E, Wakasa M, Kawai **Kajinami K**. Circulating glutamate and taurine levels are associated with the generation of reactive oxygen species in paroxysmal atrial fibrillation. **Disease Markers** 2016;2016:7650976. http://dx.doi.org/10.1155/2016/7650976

Tsuchiya T, Iida O, Shiraki T, Soga Y, Hirano K, Suzuki K, Yamaoka T, Miyashita Y, Kitayama M, **Kajinami K**. Clinical characteristics of patients with Rutherford category IV, compared with V and VI. **SAGE Open Med**. 2015 Jul 22;3:2050312115597087. doi: 10.1177/2050312115597087. eCollection 2015.

Akao H, Polisecki E, Schaefer EJ, Trompet S, Robertson M, Ford I, Jukema JW, de Craen AJ, Packard C, Buckley BM, **Kajinami K**; PROspective Study of Pravastatin in the Elderly at Risk Investigator. ABCA1 gene variation and heart disease risk reduction in the elderly during pravastatin treatment. **Atherosclerosis.** 2014 Jul;235(1):176-81. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2014.04.030.

Saito R, Takeda K, Yamamoto K, Nakagawa A, Aoki H, Fujibayashi K, Wakasa M, Motoyama A, Iwadare M, Ishida R, Fujioka N, Tsuchiya T, Akao H, Kawai Y, Kitayama M, **Kajinami K**. Nutri-pharmacogenomics of warfarin anticoagulation therapy: VKORC1 genotype-dependent influence of dietary vitamin K intake. **J Thromb Thrombolysis.** 2014 Jul;38(1):105-14.

Tanabe K, Kawai Y, Kitayama M, Akao H, Ishida R, Motoyama A, Wakasa M, Saito R, Aoki H, Fujibayashi K, Watanabe M, Tsuchiya T, Kimura H, Yoshida K, **Kajinami K**. Increased levels of the oxidative stress marker, nitrotyrosine in patients with provocation test-induced coronary vasospasm. **J Cardiol.** 2014 Aug;64(2):86-90.

Aoki H, Matsunari I, Nomura Y, Fujita W, Komatsu R, Miyazaki Y, Nekolla SG, **Kajinami K**. Myocardial sympathetic innervation, function, and oxidative metabolism in non-infarcted myocardium in patients with prior myocardial infarction. **Ann Nucl Med**. 2013 Jul;27(6):523-31.