

学位申請論文

シロスタゾールはAMPキナーゼを活性化し、糖尿病における血管内皮機能を改善する

獨協医科大学 内科学（内分泌代謝）

鈴木 國弘

要 旨

目的 血管内皮機能障害はアテローム性動脈硬化発症に重要な役割をはたしている。我々はシロスタゾールの動脈硬化抑制効果がAMPキナーゼ（AMPK）活性化に関与したものであるかを血管内皮細胞で調べた。また2型糖尿病モデルラットにおいてその投与が血管内皮機能を改善させるかを調べた。

方法, 結果 ヒト臍帯血管内皮細胞（HUVEC）においてシロスタゾールはAMPKやその下流シグナルであるアセチルCoAカルボキシラーゼのリン酸化を時間依存性に促進した。AMPKの活性化は内皮型一酸化窒素合成酵素（eNOS）のリン酸化やそれに続くNO産生の増加を認め、一方でサイトカインによる転写因子nuclear factor- κ B（NF- κ B）の活性を抑制し、接着因子VCAM-1の遺伝子発現を抑制した。シロスタゾール投与でAMPKに対するsiRNAで処理したHUVECでは、明らかにeNOS活性、NO産生能は低下、NF- κ Bの抑制は減弱し、また2型糖尿病モデルラットでは、明らかに血管内皮機能が改善した。大動脈では、シロスタゾール投与でtetrahydrobiopterin（BH4）が増加していた。このBH4レベルの改善も血管内皮機能の改善に貢献している可能性が考えられた。

結論 シロスタゾールによる血管内皮機能改善や抗動脈硬化作用はAMPKの活性化によりもたらされることが示唆された。これは、選択的ホスホジエステラーゼ阻害による血小板凝集抑制、血管拡張作用に加え、重要な作用であると考えられる。

Key Words : AMPキナーゼ, OLETF rat, 血管内皮機能, 接着因子, テトラヒドロピオプテリン

緒 言

血管内皮障害は動脈硬化の発症、進展、また動脈硬化性疾患の発症に多大な影響を与える。血管内皮障害は種々のリスクファクターと関与して動脈硬化を促進させる¹⁻³⁾。このことは冠動脈に代表され、それゆえに血管内皮障害をもったひとの急性冠症候群の発症につながる^{4,5)}。したがって血管内皮機能は動脈硬化のマーカーと考えられ、心血管イベントの発症の指標とされている。実際にNO放出刺激に対する抵抗血管の拡張で測定される血管内皮機能は^{7,8)}、動脈硬化に関連する種々の心血管イベントと関連している⁹⁻¹²⁾。NOは内皮由来血管弛緩

因子であるばかりでなく、抗炎症作用、抗血栓作用、動脈硬化の進展予防を有することから、内皮細胞でのNO産生はしばしば内皮機能の指標として用いられている¹³⁾。ゆえに内皮機能障害の改善という治療戦略は動脈硬化抑制作用において多大な恩恵をもたらす可能性がある。

シロスタゾールはホスホジエステラーゼ3（PDE3）の選択的阻害薬であり、細胞内のcAMP濃度を増加させ血小板機能抑制、末梢血管も拡張させる¹⁴⁾。それゆえにシロスタゾールは末梢閉塞性動脈疾患（peripheral arterial disease, PAD）の虚血症状（間欠性跛行など）の改善や脳梗塞の予防のための抗血小板薬として使用されている^{14,15)}。臨床前試験では、シロスタゾールは血清除去、高血糖、リポポリサッカライド（LPS）などで誘導される内皮細胞のアポトーシスを抑制し^{16,17)}、また、接着因子やmonocyte chemoattractant protein-1（MCP-1）の発現を抑制し、内皮細胞への単球接着を抑制することが

平成19年10月18日受付, 平成19年11月12日受理
別刷請求先: 鈴木國弘

〒321-0293 栃木県下都賀郡壬生町北小林880
獨協医科大学 内科学（内分泌代謝）

報告されている^{18~20)}。

PAD患者では間欠性跛行が見られ、血流依存性血管拡張反応 (FMD) が減弱している^{21,22)}。上腕動脈のFMDは独立したPAD患者の心血管因イベントの予測因子で、ankle-brachial pressure index (ABPI) と同様に予後判定に役立ち、現時点では最もすぐれた予知判定手法と考えられている。シロスタゾールは1999年にFood and Drug administration (FDA) から間欠性跛行の改善や脳梗塞の予防薬として承認を受けており、全身血管の障害を持っていると考えられるPAD患者に対してシロスタゾールがそれ自身で血管保護的、抗動脈硬化的な作用を有するかは大変重要な問題である。

今回我々はHUVECを用いてシロスタゾールがeNOSを活性化してNOの産生を高めるかどうかを調べた。そしてサイトカインの誘導するNF- κ B活性化を抑制するかどうかを調べ、その機序を検討した。PADがおこる危険性は非糖尿病患者に比べて糖尿病で著しく増加し、PADを合併する糖尿病患者では虚血イベントが容易に発症する。そこで本研究では、シロスタゾールが2型糖尿病モデルラットにおいて血管内皮障害を改善しうかも調べた。

方 法

1. 培養細胞

HUVECはClonetics社 (San Diego, CA, USA) より購入し、培地は5%ウシ胎児血清を含むEBMを用いた。3~4世代継代し、細胞を実験に用いた。マウスSVEC40 (murine endothelial cell line : SV40 transformed) は10%ウシ胎児血清を含むDulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) で培養し、実験に用いたが、形態的にも典型的内皮細胞の像を示していた。

2. ウェスタンブロット解析

標準的なプロトコールに従ってSDS-PAGEを行った。メンブレンに蛋白転写終了後特異的抗体、horseradish peroxidase標識二次抗体を用いて免疫染色を行った。検出バンドの確認にはchemiluminescence detection kit (Amersham, Biosciences, Piscataway, NJ) を使用し、その定量化にはLumiVision Analyzer (Aisia, Kariya, Japan)を用いた。一次抗体はphospho-AMPK α (Thr-172) antibody, AMPK antibody, phospho-ACC (Ser-79) antibody, phospho-eNOS (Ser-1177) antibody, phospho-Akt (Thr-308) antibody, Akt antibody, phospho-I κ B- α (Thr-172) antibody, I κ B- α antibody (BD Biosciences, San Jose, CA) を用いた。

3. NO_xの測定

培養内皮細胞からのNO産生は以前報告した方法で測定した²³⁾。すなわち、1時間培養後の培養液中のNO₂⁻およびNO₃⁻濃度をHPLC (ENO10, Eicom Co, Kyoto, Japan) を用いて測定した。

4. eNOS活性の測定

シトルリンの合成をこれまでの報告による方法で多少変えて測定した。すなわち、細胞をL-[³H]arginineと15分反応させ、Dowex AG50WX-8 (Na + form) より流出した [³H]citrullineを液体シンチレーションカウンターで測定した。結果はmg細胞蛋白あたりで表した。

5. Nuclear Factor kappaB (NF- κ B) 活性

既報のごとく²⁶⁾、SVEC4細胞にNF- κ B結合領域に結合したルシフェラーゼレポーター遺伝子を含んだプラスミドを安定導入し、その細胞株のルシフェラーゼ活性を測定することで、NF- κ B活性化を判定した。

6. siRNA処理

AMPK α 1 siRNA (10 nM) を細胞に導入し、48時間後、eNOS活性あるいはNF- κ B活性を測定した。

7. 実験動物

4週齢雄Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) ラット (28週齢で2型糖尿病を発症する) とコントロール群としてLong-Evans Tokushima Otsuka (LETO) ラットは大塚製薬より入手した。コントロール群LETOラット、糖尿病群 (OLETFラット)、糖尿病/シロスタゾール群 (OLETFラット/0.1%シロスタゾール含飼料) の3群 (各群ともn=8) にわけて、24週間飼育した。シロスタゾール投与量は、ヒトあるいはラットの実験結果に基づいて決めた。実験は獨協医科大学の動物実験ガイドラインに準拠して行った。

8. 血液データ、血圧の測定

体重、血糖値、血圧、(Rat BP, Softron Co, td. Tokyo, Japan) を各群において測定した。

9. 大動脈リングを用いた等尺張力測定

大動脈リングの等尺張力測定は過去の報告を参考として行った²⁷⁾。フェントバルビタールにて麻酔し、瀉血を行った。胸部大動脈付着脂肪組織を除去後、5mm程度の長さに切断した。この検体は37°C、95% O₂、5% CO₂のKrebs液の中で2つのフックで固定し、等尺性張力を測定した。1gの張力をかけて60分平衡状態とし、そし

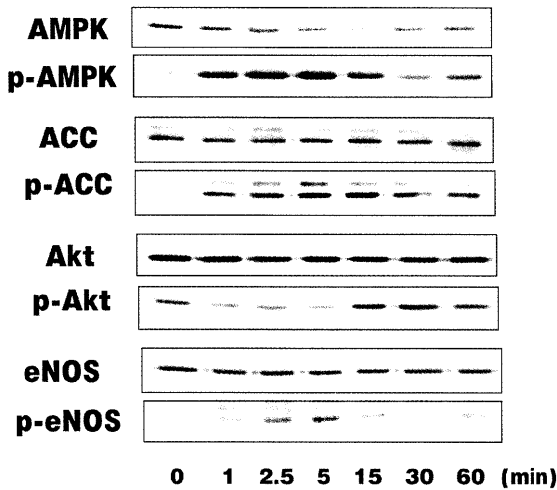


Fig. 1 シロスタゾールは血管内皮細胞にてAMPKを活性化する。

100 μmol/Lシロスタゾール投与後のAMPK, ACC, Akt, eNOSのリン酸化反応の時間経過

てフェニレフリン (10^{-7} M) にて収縮させ、アセチルコリン (10^{-9} – 10^{-5} M) にて血管弛緩反応を観察した。

10. HUVEC, ラット大動脈 mRNA の Real Time PCR
mRNA の定量化のため、2 μg の total RNA を逆転写して cDNA を得た。逆転写はオリゴスクレオチドプライマー、SuperScript pre-amplification system (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) を用いた。Real Time PCR は通常 50 μg で行い、1 × SYBR Green RealTime Master Mix (Toyobo, Tokyo, Japan) buffer を使い 1 μg の cDNA と 200 μg のプライマーを必要とする。PCR の反応はすべて LineGene system (BioFlux, Tokyo, Japan) を使い、95°C 5分、95°C 15秒、60°C 15秒、72°C 30秒を 30 cycle、72°C 30秒で行った。HUVEC の VCAM-1, ラット大動脈から eNOS, GTPCH, DHFR の個々の mRNA 発現を測定し、それぞれ GAPDH との比として結果を示した。

11. ラット大動脈における BH4 濃度の測定

Biopterin (BH4 とその酸化物) とプテリン (2-amino-4-hydroxypteridine, AHP) の測定は既報のごとく施行した²⁹⁾。BH4 濃度は酸性にて酸化した biopterin 量 (総 biopterin) からアルカリで酸化した biopterin (BH2 + biopterin) を減じることによって求めた。

12. 統計処理

データは平均 ± SD で表した。多群間の比較は ANOVA 解析と Fisher's protected least significant dif-

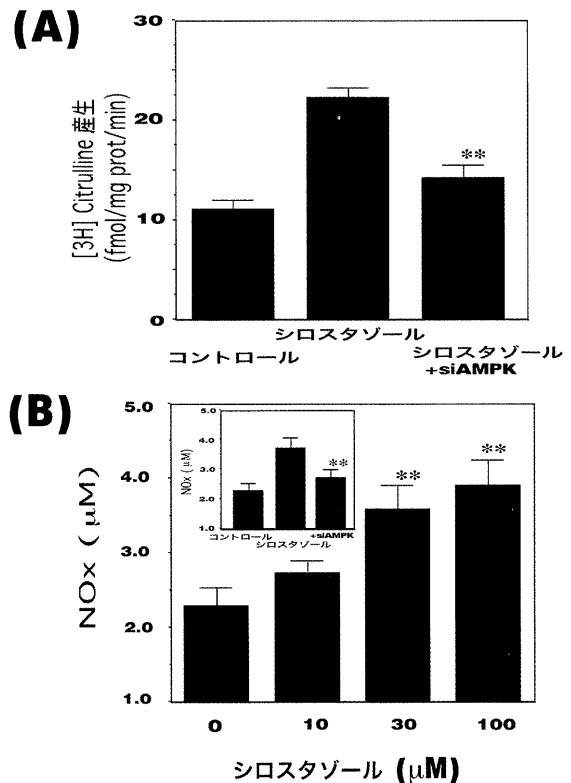


Fig. 2 (A) シロスタゾールは eNOS の活性を増大するが、これは AMPK siRNA (10 nM) 処理によって有意に減弱する。(B) シロスタゾールは濃度依存的に NO 産生を増大する。Inset: シロスタゾールは NO 産生を増大するが、これは AMPK siRNA (10 nM) 処理によって有意に減弱する。

平均 ± SD (n = 4). *p < 0.05, **p < 0.01

Cil: シロスタゾール (100 μmol/L), siAMPK: シロスタゾール + AMPK siRNA

ference test で行い、P < 0.05 を有意差ありとした。

結 果

1. HUVEC においてシロスタゾールは AMPK を活性化する。

シロスタゾール投与にて時間依存性に AMPK が活性化された (AMPK とその下流にある ACC のリン酸化を調べた。) (Fig. 1) eNOS のリン酸化 (Ser1177) も 5 分で最大となって認められた。しかし、Akt は脱リン酸化が先行しその後リン酸化が生じると異なる時間経過を示した。

2. HUVEC において eNOS 活性、NO 産生はシロスタゾールによって誘導される。

シロスタゾール投与 15 分後のシトルリンの合成を測定することで eNOS の活性を測定した。シロスタゾール

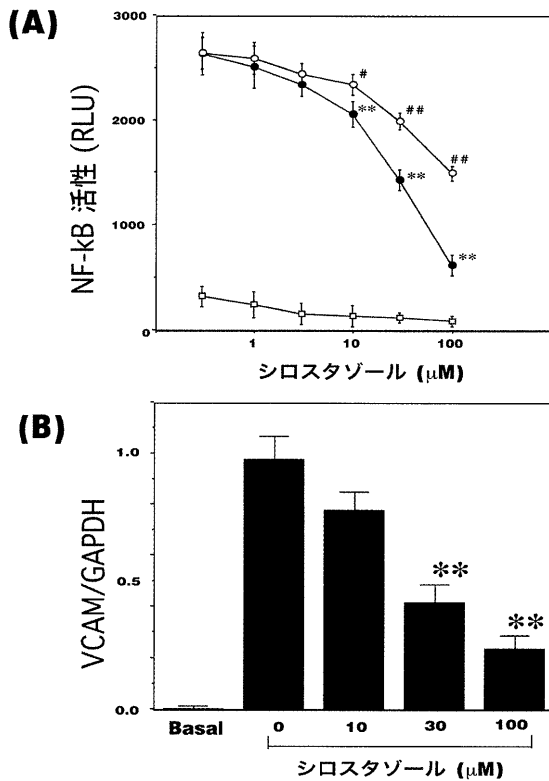


Fig. 3

(A) シロスタゾールはTNF α によるNF- κ B活性を抑制する。シロスタゾールは用量依存性にTNF α によるNF- κ B転写活性を抑制する。またAMPKのsiRNA処理(10nM)によってその抑制効果は有意に減弱した。

□: TNF α 刺激なし。

●: AMPKsiRNA処理(-)

○: AMPKsiRNA処理(+)

平均 \pm SD (n=4), **p<0.01対シロスタゾール投与(-), p<0.05, **p<0.01, 対同濃度のシロスタゾール投与

(B) シロスタゾールはTNF α によるVCAM-1のmRNA発現を抑制する。シロスタゾールは用量依存性にVCAM-1 mRNAの発現を抑制する。

平均 \pm SD **p<0.01

投与でeNOS活性は増加しており、またAMPKをsiRNA処理したHUVECではeNOSの活性は有意に抑制されていた(Fig.2A)。シロスタゾールは用量依存性にNO産生(NO $_2$ +NO $_3$ として測定)を増加させた(Fig.2B)。Fig.2B内の図はシロスタゾールによるNO産生がAMPK siRNA処理で有意に減少することを示している。

3. シロスタゾールはNF- κ Bの活性を抑制する。

我々は、はじめにSVEC4においてTNF α 刺激下2時間後のNF- κ B活性を検討した。TNF α は基礎値の7倍にNF- κ Bを活性化した。シロスタゾールは用量依存性にTNF α 刺激によるNF- κ B活性を抑制した(Fig.3)。こ

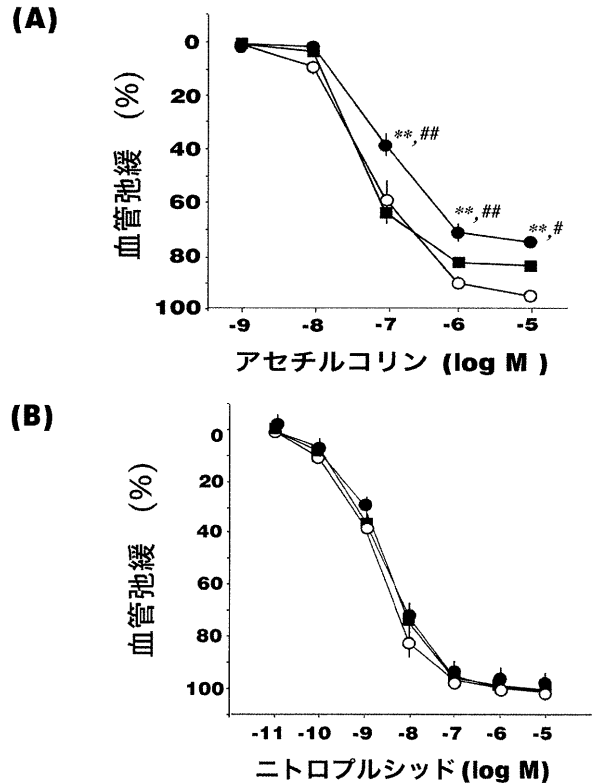


Fig. 4

(A) 胸部大動脈リングにおけるアセチルコリンによる内皮依存性血管弛緩反応 (B) ニトロプルシッドに対する内皮非依存性血管弛緩反応

○: LETO

●: OLETF

■: OLETF/シロスタゾール

平均 \pm SD (n=8~10)

**p<0.01, 対LETO, *p<0.05, **p<0.01, 対OLETF/シロスタゾール

の用量依存性の抑制はAMPK siRNA処理によって部分的にはあるが有意に減弱した(Fig.3)。

4. HUVECにおいてシロスタゾールはTNF α 刺激によるVCAM-1のmRNAの発現を抑制する。

TNF α 刺激下16時間のVCAM-1の発現は明らかに亢進していたが、NF- κ BインヒビターであるBAY11-7082投与にて著明に抑制されており¹⁸⁾、このことから、VCAM-1の発現亢進はNF- κ B依存性と考えられる。シロスタゾールは、濃度依存的にTNF α 刺激によるVCAM-1の発現を抑制していた。

5. ラットの体重、血糖、血圧。

体重はOLETFラットで増加していた(表1)。しかし、OLETFラットの体重増加はシロスタゾール投与によ

表1 ラットの体重, 血糖, 収縮期血圧

	体重 (g)	血糖 (mg/dl)	収縮期血圧 (mmHg)
LETO	572 ± 19	153 ± 58	123 ± 9.0
OLETF	670 ± 40 ^{AA}	325 ± 30 ^{AA}	126 ± 8.2
OLETF/シロスタゾール	637 ± 30 ^{AA, B}	336 ± 42 ^{AA}	118 ± 8.6

n = 8, ^AP < 0.05, ^{AA}P < 0.01 vs. LETO ; ^BP < 0.05 vs. OLETF

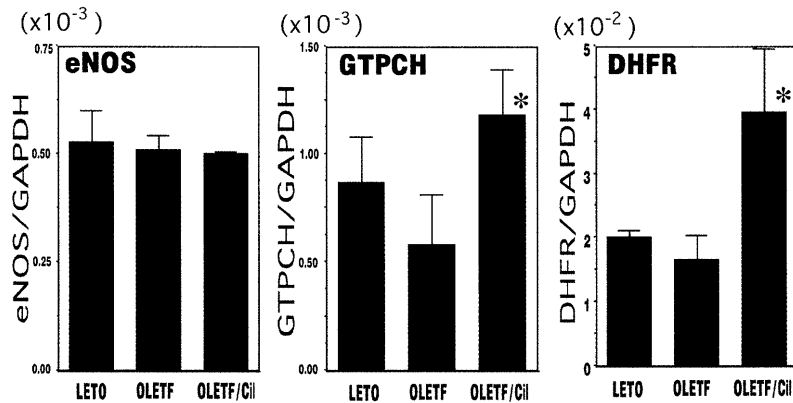


Fig. 5 ラット大動脈組織中のeNOS, GTPCH, DHFR mRNA発現
それぞれeNOS/GAPDH, GTPCH/GAPDH, DHFR/GAPDHとして表した。

表2 ラット大動脈のビオプテリン含量

	TotalBP	BH4	BP/BH2	AHP	BP + AHP
LETO	365 ± 17	221 ± 21	144 ± 12	154 ± 10	519 ± 25
OLETF	295 ± 14	122 ± 9	177 ± 10	119 ± 12	414 ± 18
OLETF/シロスタゾール	310 ± 12	159 ± 11*	151 ± 8*	109 ± 9	419 ± 16

(pmol/g tissue)

BP: ビオプテリン, BH4: テトラヒドロビオプテリン,

BH2: ジヒドロキシビオプテリン, AHP: 2-アミノ-4-ヒドロキシプテリジン

n = 3~4, *P < 0.05 vs. OLETF

て明らかに減少した。血糖はLETOラットと比較し、OLETFラット、OLETF/シロスタゾール群で上昇していた。収縮期血圧はOLETF/シロスタゾール群で低い傾向が見られたが、統計学的に有意な血圧の差は3群間で認められなかった。

6. 2型糖尿病ラット大動脈の血管内皮機能に及ぼすシロスタゾールの効果

eNOSのアゴニストであるアセチルコリンによる血管弛緩反応はコントロール群であるLETO群と比較してOLETFラット群で明らかに減弱していた。しかし、シロスタゾール投与によりその内皮機能障害は完全に改善していた (Fig. 4A)。一方、NOドナーであるニトロプルシッド投与では3群の血管弛緩反応に差はみられなかつ

た。すなわち血管平滑筋のNOに対する反応に差はないことが考察された (Fig. 4B)。

7. 2型糖尿病ラット大動脈におけるビオプテリン, eNOS, GTPCH, DHFR mRNAに対するシロスタゾールの効果

BH4濃度はLETOと比較してOLETFラットで減少していたがシロスタゾール投与にて部分的に改善していた。一方、BP/BH2はLETOと比較してOLETFラットで増加していたが、シロスタゾール投与で有意に減少していた。またビオプテリンの分解を明らかにするために、AHP濃度を測定したが、OLETF群ではAHP濃度がシロスタゾール投与群と比較して、若干上昇していた。これはOLETFラットはBH4の酸化の増大によるビオプテリ

ンの分解の促進とシロスタゾールによるその抑制を示唆しているのかも知れない(表2)。3群の大動脈におけるeNOSのmRNAの発現は同等であったが、GTPCH、DHFRのmRNA発現はシロスタゾール群では明らかに大きかった(Fig.5)。

考 察

今回我々はシロスタゾールがAMPKのリン酸化を促進することで、AMPKを活性化することを示した。HUVECにおいて、活性化したAMPKはeNOSの1177番目のSerをリン酸化し、それを活性化した。また、NF- κ Bの活性を抑制することで、接着因子の発現を減少させた。今回の実験で、精密なAMPK活性化を測定するためのキナーゼアッセイはおこなっていないが、シロスタゾールが172番目のThrをリン酸化し、AMPK活性を高めていると考えられ¹⁹⁾、さらに下流シグナルであるACCの79番目のSerのリン酸化も確認している。Aktのリン酸化はeNOSのリン酸化に遅れて生じており、本研究において、eNOSのリン酸化はAkt非依存性的と考えられる。

シロスタゾールはヒトの大動脈の内皮細胞においてeNOSのリン酸化、活性化を起こすことが報告されている²⁹⁾。本研究において、我々はHUVECにおいてシロスタゾールがAMPKを活性化することを示した。おそらくAMPKの活性化がeNOSの活性化を引き起こす上流にあると思われる。なぜなら、siRNA処理にてAMPKの発現を8割抑制するとシロスタゾールによるeNOS活性とNO産生が有意に抑制されているからである。

またシロスタゾールによって血管内皮細胞でのTNF α 刺激によるNF- κ B活性化とVCAM-1の発現が抑制された。内皮細胞をAMPK siRNAで処理することで、シロスタゾールによるTNF α 刺激時のNF- κ B活性化抑制効果が減弱していた。よって、シロスタゾールによるAMPK活性がNF- κ Bの活性の抑制につながるものと考えられる。また選択的PDE3阻害作用は、血管内皮細胞においてもcAMPの上昇をもたらすと考えられる。したがってcAMPによるNF- κ Bの抑制効果も一部関与している可能性は否定できないが、本研究ではcAMP系によるNF- κ B抑制機序についての検討しておらず、今後の課題と考えられる。

糖尿病ラットにシロスタゾールを経口投与すると、血管内皮機能障害が有意に改善した。一方、大動脈リングのニトロプルシッドに対する反応は各群において差がなかった。このことよりシロスタゾールが内皮機能依存的血管拡張を特異的に改善したものと考えられる。さらにシロスタゾールは糖尿病ラット大動脈のBH4を増加させた。これは*de novo*系合成酵素GTPCHとsalvage系合

成酵素DHFRの発現の上昇によると考えられ、シロスタゾールによるBH4レベルの上昇はeNOS活性化とならんで、糖尿病ラットにおいて内皮機能障害の回復に貢献している可能性が考えられる。本研究では糖尿病でBH4レベルが低下し、それがシロスタゾールで改善することを示したが、これは以前報告されているようにシロスタゾールの生体内における抗酸化作用によると思われる³⁰⁾。糖尿病は血管での活性酸素産生が増加し、NOの生物活性が減弱していることが知られている。ゆえに、このシロスタゾールの抗酸化作用もまた糖尿病ラットの血管内皮障害の改善に貢献していると思われる。

今回我々は0.1%シロスタゾール含有食を糖尿病ラット与えた。この食事を1週間ラットに与えるとシロスタゾールの血中濃度は2~2.5 μ g/mlとなるという成績があり、またヒトにシロスタゾールの標準的投与量である100mg/日の投与で血中濃度は1~1.2 μ g/mlとなることを考えると、今回のシロスタゾールの投与量は適切な量であると思われる。

結 論

我々は内皮細胞においてシロスタゾールはAMPKを活性化しNO産生を高めVCAM-1発現を抑制することを報告した。糖尿病ラットへのシロスタゾールの経口投与は血管内皮弛緩反応を回復させた。シロスタゾールの内皮依存性の効果はeNOS活性化とBH4の増加にあると考えられる。すでに報告されているメトホルミン³¹⁾や、チアゾリジン誘導体³²⁾、アディポネクチン³³⁾、レプチン³⁴⁾等のいくつかの薬物やアディポサイトカインに見られる生体改善効果あるいは、生体保護効果がそれらのAMPK活性化と関連するものであることを考えると、シロスタゾールのAMPK活性化能もよいものであることが期待される。シロスタゾールは血管内皮細胞においてAMPKを活性化し、内皮機能保護的、抗動脈硬化的に働くと考えられ、このことはシロスタゾールの選択的PDE3阻害による抗血栓、末梢血管拡張作用に加え、重要な作用と考えられる。

謝 辞 稿を終えるにあたり、シロスタゾール含有飼料、OLETF/LETOラットを提供して頂いた大塚製薬株式会社に謝意を表します。また本研究にご協力、ご尽力くださいました内分泌代謝内科、笠井貴久男教授をはじめ、服部良之先生、薬理学、内田幸介先生に深謝致します。

文 献

- 1) Celermajer DS, Sorensen KE, Bull C, Robinson J, Dean-

- field JE. : Endothelium-dependent dilation in the systemic arteries of asymptomatic subjects relates to coronary risk factors and their interaction. *J Am Coll Cardiol.*, **24** : 1468-1474, 1994.
- 2) Vogel RA. : Cholesterol lowering and endothelial function. *Am J Med.*, **107** : 479-487, 1999.
- 3) Quyyumi AA. : Endothelial function in health and disease : new insights into the genesis of cardiovascular disease. *Am J Med.*, **105** : 32S-39S, 1998.
- 4) Okumura K, Yasue H, Matsuyama K, et al. : Effect of acetylcholine on the highly stenotic coronary artery : difference between the constrictor response of the infarct-related coronary artery and that of the non infarct-related artery. *J Am Coll Cardiol.*, **19** : 752-758, 1992.
- 5) Bogaty P, Hackett D, Davies G, Maseri A. : Vasoreactivity of the culprit lesion in unstable angina. *Circulation.*, **90** : 5-11, 1994.
- 6) Vita JA, Keaney JF. : Endothelial function a barometer for cardiovascular risk? *Circulation.*, **106** : 640-642, 2002.
- 7) Creager MA, Cooke JP, Mendelsohn ME, et al. : Impaired vasodilation of forearm resistance vessels in hypercholesterolemic humans. *J Clin Invest.*, **86** : 228-234, 1990.
- 8) Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, et al. : Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet.*, **340** : 1111-1115, 1992.
- 9) Perticone F, Ceravolo R, Pujia A, et al. : Prognostic significance of endothelial dysfunction in hypertensive patients. *Circulation.*, **104** : 191-196, 2001.
- 10) Neunteufl T, Heher S, Katzenschlager R, et al. : Late prognostic value of flow-mediated dilation in the brachial artery of patients with chest pain. *Am J Cardiol.*, **86** : 207-210, 2000.
- 11) Heitzer T, Schlinzig T, Krohn K, Meinertz T, Munzel T. : Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation.*, **104** : 2673-2678, 2001.
- 12) Gokce N, Keaney JF, Hunter LM, et al. : Risk stratification for postoperative cardiovascular events via noninvasive assessment of endothelial function : a prospective study. *Circulation.*, **105** : 1567-1573, 2002.
- 13) Landmesser U, Hornig B, Drexler H. : Endothelial function : a critical determinant in atherosclerosis? *Circulation.*, **109**(21, Suppl. 1) : II27-II33, 2004.
- 14) Kambayashi J, Liu Y, Sun B, et al. : Cilostazol as a unique anti-thrombotic agent. *Curr Pharm Des.*, **9** : 2289-2302, 2003.
- 15) Gotoh F, Tohgi H, Hirai S. : Cilostazol stroke prevention study : a placebo-controlled double blind trial for secondary prevention of cerebral infarction. *J Stroke Cerebrovasc Dis.*, **9** : 147-157, 2000.
- 16) Morishita R, Higaki J, Hayashi SI, et al. : Role of hepatocyte growth factor in endothelial regulation : prevention of high d-glucose-induced endothelial cell death by prostaglandins and phosphodiesterase type 3 inhibitor. *Diabetologia.*, **40** : 1053-1061, 1997.
- 17) Kim KY, Shin HK, Choi JM, Hong KW. : Inhibition of lipopolysaccharide-induced apoptosis by cilostazol in human umbilical vein endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther.*, **300** : 709-715, 2002.
- 18) Nishio Y, Kashiwagi N, Takahara N, Hidaka H, Kikkawa R. : Cilostazol, a cAMP phosphodiesterase inhibitor, attenuates the production of monocyte chemoattractant protein-1 in response to tumor necrosis factor- α in vascular endothelial cells. *Horm Metab Res.*, **29** : 491-495, 1997.
- 19) Otsuki M, H. Saito H, Xu X, et al. : Cilostazol represses vascular cell adhesion molecule-1 gene transcription via inhibiting NF- κ B binding to its recognition sequence. *Atherosclerosis.*, **158** : 121-128, 2001.
- 20) Park SY, Lee JH, Kim YK, et al. : Cilostazol prevents remnant lipoprotein particle-induced monocyte adhesion to endothelial cells by suppression of adhesion molecules and monocyte chemoattractant protein-1 expression via lectin-like receptor for oxidized low-density lipoprotein receptor activation. *J Pharmacol Exp Ther.*, **312** : 1241-1248, 2005.
- 21) Gokce N, Keaney JF Jr, Hunter LM, et al. : Predictive value of noninvasively determined endothelial dysfunction for long-term cardiovascular events in patients with peripheral vascular disease. *J Am Coll Cardiol.*, **41** : 1769-1775, 2003.
- 22) Silvestro A, Scopacasa F, Oliva G, et al. : Vitamin C prevents endothelial dysfunction induced by acute exercise in patients with intermittent claudication. *Atherosclerosis.*, **165** : 277-283, 2002.
- 23) Hattori Y, Suzuki M, Hattori S, Kasai K. : Globular adiponectin upregulates nitric oxide production in vascular endothelial cells. *Diabetologia.*, **46** : 1543-1549,

- 2003.
- 24) Bredt DS, Snyder SH. : Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc Natl Acad Sci USA.*, **86** : 9030-9033, 1989.
- 25) Heller R, Unbehaun A, Schellenberg B, Mayer B, Werner-Felmayer G, Werner ER. : L-Ascorbic acid potentiates endothelial nitric oxide synthesis via a chemical stabilization of tetrahydrobiopterin. *J Biol Chem.*, **276** : 40-47 2001.
- 26) Hattori Y, Suzuki M, Hattori S, Kasai K. : Vascular smooth muscle cell activation by glycated albumin (Amadori adducts). *Hypertension.*, **39** : 22-28, 2002.
- 27) Wang X, Hattori Y, Satoh H, Iwata C, Banba N, Monden T, Uchida K, Kamikawa Y, Kasai K. : Tetrahydrobiopterin prevents endothelial dysfunction and restores adiponectin levels in rats. *Eur J Pharmacol.*, **555** : 48-53, 2007.
- 28) Fukushima T, Nixon JC. : Analysis of reduced form of biopterin in biological tissues and fluids. *Anal. Biochem.* **102**, 176-188.
- 29) Hashimoto A, Miyakoda G, Hirose Y, Mori T. : Activation of endothelial nitric oxide synthase by cilostazol via a cAMP/protein kinase A- and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent mechanism. *Atherosclerosis.*, **189** : 350-357, 2006.
- 30) Lee JH, Oh GT, Park SY, et al. : Cilostazol reduces atherosclerosis by inhibition of superoxide and tumor necrosis factor-alpha formation in low-density lipoprotein receptor-null mice fed high cholesterol. *J Pharmacol Exp Ther.*, **313** : 502-509, 2005.
- 31) Zhou G, Myers R, Li Y, et al. : Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest.*, **108** : 1167-1174, 2001.
- 32) Fryer LG, Parbu-Patel A, Carling D. : The Anti-diabetic drugs rosiglitazone and metformin stimulate AMP-activated protein kinase through distinct signaling pathways. *J Biol Chem.*, **277** : 25226-25232 2002.
- 33) Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, et al. : Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase, *Nat Med.*, **8** : 1288-1295, 2002.
- 34) Minokoshi Y, Kim YB, Peroni OD, et al. : Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase, *Nature.*, **415** : 339-343, 2002.