

## Mönckeberg 型動脈硬化症における細胞外マトリックスの 発現変動と骨粗鬆症治療薬の影響

斎藤英治, 長江慶之, 輪千浩史,\* 瀬山義幸

### The Variance of the Expressions of Extracellular Matrix Components and the Effects of the Anti-Osteoporotic Drugs on Mönckeberg's Arteriosclerosis

Eiji SAITOH, Yoshiyuki NAGAE, Hiroshi WACHI,\* and Yoshiyuki SEYAMA

Department of Clinical Chemistry, Hoshi University School of Pharmacy and Pharmaceutical  
Sciences, 2-4-41 Ebara, Shinagawa-ku, Tokyo, 142-8501, Japan

(Received October 15, 2007)

Mönckeberg-type arteriosclerosis occurs as a complication in diabetic, uremic patients and in postmenopausal women. It has been shown that arterial calcification generates loss of elasticity in tunica media. We have already reported that the expression of tropoelastin (TE), the precursor protein of elastin, is suppressed by arterial calcification, although no changes of mRNA expression of the other elastic fiber components, such as fibrillins, was observed. We examined the effects of bisphosphonates, known as anti-osteoporotic drugs, in inorganic phosphate (Pi)-induced calcified bovine aortic smooth muscle cells (BASMCs) (*in vitro* arterial calcification model). Treatment with the bisphosphonate risedronate, significantly inhibited calcium deposition in the arterial calcification model. Risedronate also inhibited suppression of TE mRNA expression and the progression of osteopontin (OPN) and core binding factor- $\alpha 1$  (Cbfa1), an osteogenic transcription factor, by BASMCs calcification. Basically, bisphosphonates could inhibit phenotypic transition such as SMC to osteoblast-like cell. Inhibitory effects of bisphosphonates were also shown in female Sprague-Dawley rats with calcinosis induced by administration of an over-dose of vitamin D<sub>2</sub> (*in vivo* arterial calcification model). It is known that arterial calcification is accelerated by oxidative low-density lipoprotein (oxLDL). Therefore we examined the effects of 7-ketocholesterol (7kc), a component of oxLDL, on *in vitro* arterial calcification. Thereupon, it was revealed that 7kc drastically accelerated Pi-induced calcification, and risedronate completely restored the calcification and mRNA expression accelerated by 7kc.

**Key words**—arterial calcification; risedronate; tropoelastin; 7-ketocholesterol

#### 1. はじめに

動脈硬化症は病変, 発症部位などにより粥状硬化症, Mönckeberg 型硬化症, 細動脈硬化症の 3 種に分類される. いずれのタイプの動脈硬化症においても石灰化は併発するとされている. この石灰化病変は病理学的に軟骨性化骨と膜性化骨に分けられる. 粥状硬化症に伴う動脈内膜の石灰化では通常の骨にみられる軟骨性化骨に類似し, 軟骨の II 型 collagen から I 型 collagen に置き換わる. また, 加齢による大動脈中膜の石灰化及び糖尿病患者の下肢動脈に

みられる Mönckeberg 型の中膜石灰化では頭蓋冠にみられる膜性化骨に類似し, 直接 I 型 collagen で石灰化が起きる特色が知られている. 動脈石灰化は大動脈での動脈硬化症に留まらず, 上記のような糖尿病や腎不全などの疾患における細動脈での共通病変<sup>1)</sup>であり, さらに冠動脈石灰化を伴う心筋梗塞のリスク増大と相関がある.<sup>2)</sup> 動脈の石灰化は閉経や老化との関連も多く報告されており, *klotho* 遺伝子変異老化モデル動物においても確認されている.<sup>3)</sup>

細胞レベルでの石灰化の要因に目を向けてみると, 細胞外においてアルカリ性ホスファターゼ (ALP) によるピロリン酸の分解により生じる無機リン酸 (Pi) イオンが細胞膜に存在するリン酸/ナトリウム共輸送体 (Pit-1) により動脈平滑筋細胞

星薬科大学臨床化学教室 (〒142-8501 東京都品川区荏原 2-4-41)

\*e-mail: wchrs\_1107@hoshi.ac.jp

本総説は, 日本薬学会第 127 年会シンポジウム SD4 で発表したものを中心に記述したものである.

内に流入することで、動脈の石灰化が惹起され、<sup>4)</sup> その結果動脈平滑筋細胞において骨形成に關与するタンパク質である Osteopontin (OPN), Osteocalcin などの発現が亢進し、間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化の際にみられる転写因子 Core binding factor- $\alpha$ 1 (Cbfa1) の発現も認められることから、Pi の上昇が動脈平滑筋細胞の骨芽細胞様への形質転換をもたらすのではないかと推測されている。<sup>5)</sup>

また、動脈の石灰化は動脈の重要な機能の1つである弾性力を低下させ、動脈を硬化させ、高血圧をはじめ循環機能を低下させる。当教室の過去の研究により石灰化に伴い動脈平滑筋細胞において弾性線維形成に關与するタンパク質の遺伝子発現低下<sup>6)</sup> や、弾性線維構成タンパク質である Elastin の可溶性前駆タンパク質としての Tropoelastin (TE) が動脈石灰化を抑制している可能性が示唆された。<sup>7)</sup> さらに、Elastin をはじめ細胞外マトリックスの分解能を有する matrix metalloproteinase (MMP) は石灰化に伴い活性化し、この活性を阻害することにより動脈石灰化が抑制される報告<sup>8)</sup> があることから、細胞外マトリックスの変性や分解が動脈石灰化発症において重要なファクターの1つであることが示唆されている。

## 2. 動脈石灰化と骨粗鬆症治療薬

動脈石灰化の成因として、加齢・閉経などで骨吸収が亢進することにより血中リン及びカルシウム濃度が上昇し、この結果、カルシウム・リンが骨から軟部組織である動脈などに移動した結果、リン酸カルシウムが生成・沈着するとされている。<sup>9)</sup> 実際に骨粗鬆症患者において動脈石灰化を併発するケースも多々ある。それを裏付けるかのように、vitamin K<sub>2</sub><sup>10)</sup> やビスフォスフォネート剤<sup>9,11)</sup> などのような骨粗鬆症治療薬が動脈石灰化抑制において有効であるという報告がある。骨形成に關与し、軟部組織におけるカルシウム調節因子である Matrix Gla protein (MGP) のノックアウトマウスにおいて動脈石灰化が促進することから、<sup>12)</sup> MGP の動脈石灰化抑制への寄与が近年注目されている。MGP では vitamin K を補因子とする  $\gamma$ -カルボキシラーゼによって触媒されることにより  $\gamma$ -カルボキシル残基が生成され、この残基は強く Ca<sup>2+</sup> 結合し、一方 vitamin K 欠乏で  $\gamma$ -カルボキシル化されない場合はこの Ca<sup>2+</sup> 結合能が失われる。したがって、MGP は vitamin

K 依存性のタンパク質であり、vitamin K<sub>2</sub> は MGP 生成に寄与することで動脈石灰化を抑制することが示唆されている。<sup>10)</sup> 一方、ビスフォスフォネートは石灰化動脈平滑筋細胞において前述の MGP 遺伝子発現を上昇させるという報告<sup>11)</sup> があるが、詳しい石灰化抑制メカニズムは明らかになっていない。ビスフォスフォネートは骨粗鬆症における破骨細胞のアポトーシス等を誘導することで強力な骨吸収抑制作用を示し、化学構造上に窒素を含有する第二世代以降のビスフォスフォネート (alendronate, risedronate 等) は hydroxymethylglutaryl-CoA (HMG-CoA) reductase 阻害剤であるスタチン系薬物と同様にメバロン酸経路に作用することも知られている。<sup>13-17)</sup> ビスフォスフォネートはメバロン酸経路に作用する farnesylpyrophosphate (FPP) synthase を阻害することが明らかになっており (Fig. 1)、ビスフォスフォネートは FPP 合成阻害により Rho や Ras, Rab などの低分子 guanosine 5'-triphosphate (GTP) 結合タンパク質 (G タンパク質) の翻訳後プレニル化を抑制し、これらを介したシグナル伝達を抑制する。近年、窒素含有ビスフォスフォネートは低分子 G タンパク質の抑制を介して、がん細胞の骨転移の抑制もしているのではないかと報告<sup>18)</sup> から、骨粗鬆症以外の疾患に対する効果も期待されている。メバロン酸経路においてビスフォスフォネートより上流に作用するスタチン系薬物が Rho を介した経路の阻害により動脈平滑筋細胞の石灰化を抑制しているという報告<sup>19)</sup> もあり、ビスフォスフォネートはメバロン酸経路等を介して動脈石灰化を抑制するのではという機構も推測されている。

## 3. ビスフォスフォネートによる動脈石灰化抑制

当教室では、無機リン酸塩を動脈平滑筋細胞に処理することで石灰化を誘導する *in vitro* 動脈石灰化モデル、<sup>4)</sup> 及び vitamin D<sub>2</sub> をリタイヤー雌性ラットに過剰投与することで動脈石灰化を誘発する *in vivo* 動脈石灰化モデルを用いて研究を行っている。*In vitro* 及び *in vivo* 動脈石灰化モデルにおいて、窒素含有第三世代ビスフォスフォネートである risedronate (RD) は用量依存的にカルシウム沈着量 (=石灰化の指標) を抑制した [Fig. 2(A)-(C)]。Vitamin D<sub>2</sub> 過剰投与によりラット胸部大動脈切片の中膜において von Kossa 染色陽性のリン酸カルシウムの沈着が生じ [Fig. 2(B)], RD の同時投与

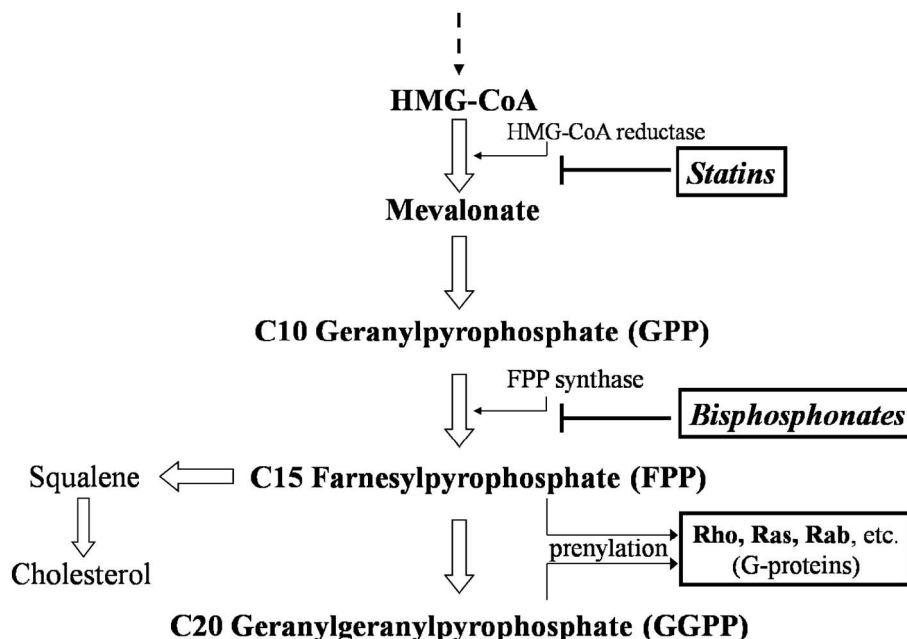


Fig. 1. Nitrogen-Containing Bisphosphonates Affect Mevalonate Pathway

Mevalonate pathway is the biosynthesis pathway of cholesterol and guanosin triphosphate (GTP)-binding proteins (G-proteins), such as Rho, Ras, and Rab. Nitrogen-containing bisphosphonates affect the mevalonate pathway as well as statins, inhibitors of hydroxymethylglutaryl CoA reductase. Nitrogen-containing bisphosphonates have an inhibitory effect of farnesylpyrophosphate (FPP) synthase in mevalonate pathway. Therefore, statins or nitrogen-containing bisphosphonates inhibit the post-translational prenylation of G-proteins.

により顕著にこの染色陰性のリン酸カルシウム沈着量の減少が確認された。 *In vitro* 及び *in vivo* 動脈石灰化モデルにおいて RD による劇的な石灰化抑制が認められたため、その作用点は石灰化発症の根幹をなす部分であることがうかがえる。

#### 4. 動脈石灰化抑制と細胞外マトリックス成分の挙動

前述のように動脈石灰化と Elastin 線維などの細胞外マトリックスの挙動は密接に関連することが示唆されているが、本研究においてもこれを裏付ける結果を得ている。動脈平滑筋細胞が石灰化により骨芽細胞様に形質転換することは前述の通りであるが、*in vivo* 動脈石灰化モデルにおいて動脈の全 RNA を抽出して得た reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) の結果 (Fig. 3) より、動脈平滑筋細胞のマーカー遺伝子である SM22 $\alpha$  と高分子型 caldesmon の mRNA 発現が石灰化により減少し、RD 投与によりその減少が抑制された。一方、骨芽細胞様分化マーカーとして用いた OPN 発現が石灰化により亢進し、RD 投与によりその亢進が抑制された。細胞外マトリックスに目を向けると、皮膚だけでなく骨基質にも多く存在する I 型 collagen の発現が石灰化により亢進し、RD 投与に

よりその発現も抑制された。これらのことから、動脈平滑筋細胞において本来の機能・性質が石灰化により失われ、骨化のような現象が生じることが示唆され、RD 投与により石灰化が劇的に抑制された結果、正常状態の動脈とほぼ変わらない状態を維持することが示唆された。

Vitamin D<sub>2</sub> による *in vivo* 動脈石灰化の誘導により、elastin 等を分解することが知られる MMP-2、-9 の活性の亢進が gelatin zymography により確認できた (Fig. 4)。このとき、RD の同時投与によりこれらの活性亢進が認められなかった。よって、RD は細胞外マトリックスの変性と分解を抑制した可能性も示唆された。

#### 5. 酸化コレステロールによる動脈石灰化亢進とこれらに対するビスフォスフォネートの抑制効果

動脈石灰化を亢進させる因子として、tumor necrosis factor- $\alpha$ , interferon- $\gamma$ , oncostatin M 等の炎症性メディエーターや 1, 25(OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub> 等が報告されている<sup>19)</sup>が、粥状動脈硬化症の危険因子である酸化低比重リポタンパク質 (oxLDL) も動脈石灰化を亢進することが知られており、<sup>20)</sup> oxLDL の主要構成成分の1つである酸化コレステロール (oxysterol) もまた動脈石灰化を亢進することが報

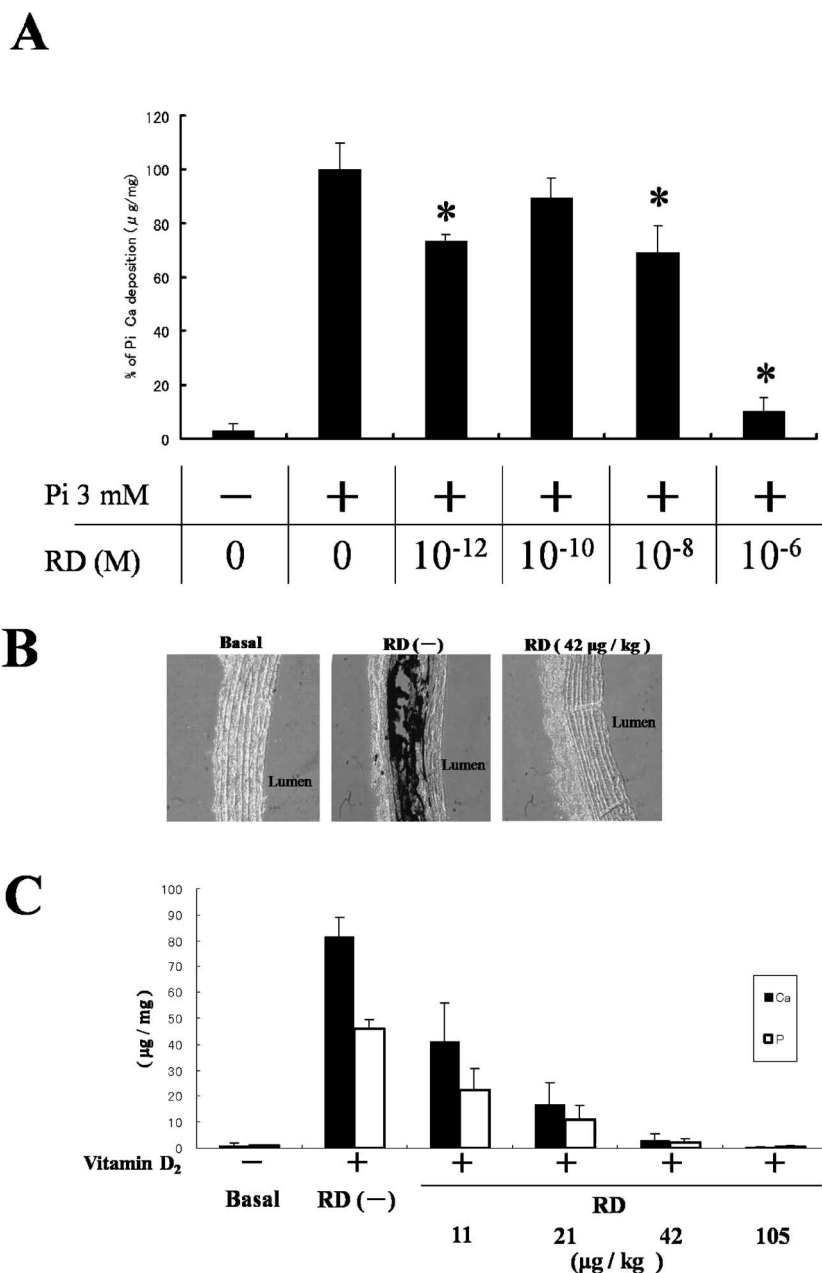


Fig. 2. Risedronate Suppressed the *In vitro* and *In vivo* Arterial Calcification Model

Risedronate (RD) inhibited *in vitro* (A) and *in vivo* (B and C) arterial calcification models were drastic. A; RD showed the inhibitory effect of the calcium deposition with dose dependent behavior *in vitro* arterial calcification models. Values are expressed as means  $\pm$  S.E. ( $n=4$ ). Differences compared with inorganic phosphate (Pi) alone (Pi=3 mmol/l) for each concentration were statistically significant ( $*p<0.005$ , Bonferroni/Dunn's test). B; RD inhibited the deposition of the hydroxyapatite detected by von Kossa staining (black-stained area were positive) on the sections of the vitamin D<sub>2</sub>-induced calcified rats arteries (*in vivo* arterial calcification model). By inducing the arterial calcification, tunica media were stained, and by administrating RD, the section were von Kossa staining-negative (magnification:  $\times 100$ ). C; RD inhibited the calcium (closed column) and phosphorus (open column) deposition on the rats arteries in *in vivo* calcification model with dose dependent behavior. Values are expressed as means  $\pm$  S.E. ( $n=3-6$ ).

告されている。<sup>21)</sup> 動脈石灰化症患者においてなんらかの脂質代謝異常が認められたり、前述のように粥状動脈硬化症の終末像においても内膜に石灰化を生じることから、oxysterol を生成するような脂質代謝異常と動脈石灰化には密接な関係があることが考えられる。われわれは粥状動脈硬化研究において汎

用される oxysterol である 7-ketocholesterol (7kc) を用いて研究を行うこととした。7kc は血管の内皮細胞や動脈平滑筋細胞のアポトーシスを誘導し、<sup>22)</sup> マクロファージを活性化<sup>23)</sup>して、硬化部位での不安定プラークを破綻させるといわれている。また ox-LDL は動脈平滑筋細胞においてアポトーシスを誘

導することで石灰化が亢進することが知られており、<sup>24)</sup> さらに 7kc は動脈石灰化の抑制因子ではないかと思われる TE の発現を抑制することが明らかになっていることから、7kc は動脈石灰化を亢進すると考え、研究を行った。

無機リン酸塩 (Pi) 誘導による *in vitro* 動脈石灰化モデルにおいて Pi と共存した 7kc は用量依存的

に石灰化を亢進させた (Fig. 5; 投稿中)。すなわち Pi (3 mmol/l) 存在下 7kc を 4  $\mu$ g/ml 同時処理することにより Pi 単独による石灰化誘導に比べ約 4 倍カルシウム沈着量が増加した。通常のアポトーシスの研究等では 7kc を約 40  $\mu$ g/ml 程度の濃度で用いることから、7kc はアポトーシスを強く誘導しないような低濃度においても劇的に石灰化を亢進させることが示唆された。なお、7kc 単独処理によって石灰化は生じなかった。ここで 7kc と Pi 共存による石灰化亢進状態において骨粗鬆症治療薬の効果を検討したところ、この石灰化に対し vitamin K<sub>2</sub> はほとんど抑制効果を示さなかった。しかし、RD (10<sup>-6</sup> mol/l) は 7kc と Pi 共存下での石灰化をほぼ完全に抑制できた (Fig. 6(A))。この時の各種 mRNA 発現を RT-PCR 法にて検討したところ [Fig. 6(B)], TE 及び動脈平滑筋細胞の特異的マーカーである SM  $\alpha$ -actin 2 の発現が Pi と 7kc の併用により顕著に抑制され、RD 処理によりその抑制が抑えられた。今回の結果より、動脈石灰化のパラメーターとして動脈平滑筋細胞特異的マーカー遺伝子の発現以外にも、弾性線維関連タンパクである TE の発現も石灰化の程度と負の相関があることが示唆され、TE も有用な石灰化の指標であることが示唆された。一方、OPN や Cbfa1 のような骨芽細胞様分化マーカーの mRNA 発現が Pi と 7kc の併用により顕著に促進し、RD 処理によりその促進が抑制された。動脈平滑筋細胞において RD 処理により、石灰化による各種 mRNA 発現の変動がほとんど生じていないことが示唆されたため、Pi による石灰化誘導過程における初期でありかつ根本的な作用点に RD が作用していることが考えられる。

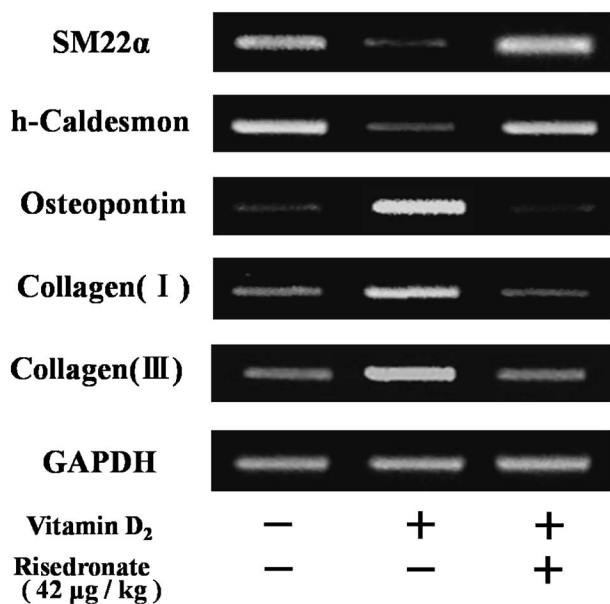


Fig. 3. mRNA Expressions on *In vivo* Arterial Calcification Model

SM22 $\alpha$  and h-Caldesmon, as aortic smooth muscle cell marker genes, mRNA expressions were suppressed by the vitamin D<sub>2</sub>-induced arterial calcification, and RD suppressed the decrease of mRNA of these aortic smooth muscle cell marker genes. On the contrary, osteopontin, and collagen I, as osteogenic marker genes, mRNA expressions were raised by the arterial calcification, and RD suppressed the increase of these osteogenic marker genes. Total RNA was isolated from the rat artery. SM22 $\alpha$ , high molecular weight caldesmon (h-Caldesmon), Osteopontin, type I collagen, type III collagen, and glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), as a house-keeping gene, mRNA expressions were visualized by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) method.

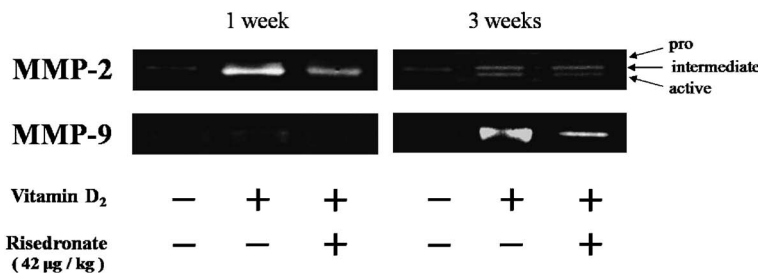


Fig. 4. Risedronate Suppressed the Activities of the Matrix Metalloproteinases on *In vivo* Arterial Calcification Model

MMP-2 activity increased by the vitamin D<sub>2</sub>-induced arterial calcification for 1 week and then RD suppressed the MMP-2 activity. MMP-9 activity increased by the calcification for 3 weeks and then RD suppressed the MMP-9 activity. The protein lysates, obtained from the arteries of *in vivo* arterial calcification model, were applied to gelatin zymography.

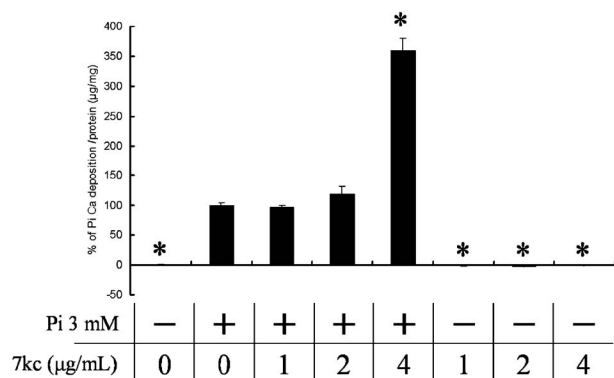


Fig. 5. 7-Ketocholesterol Accelerated the *In vitro* Arterial Calcification Model

7-ketocholesterol (7kc) dose-dependently accelerated the inorganic phosphate (Pi)-induced *in vitro* arterial calcification model. While 7kc could not induce the calcification alone. Values are expressed as means  $\pm$  S.E. ( $n=4$ ). Differences compared with inorganic phosphate (Pi) alone (Pi=3 mmol/l) for each concentration were statistically significant (\* $p<0.005$ , Bonferroni/Dunn's test).

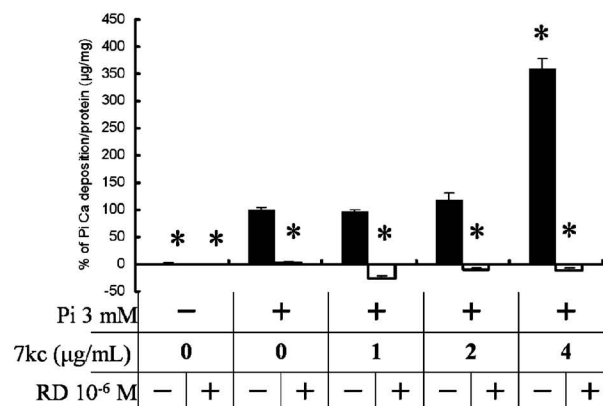
## 6. 動脈石灰化と Rho-Rho キナーゼシグナル伝達経路との関係

前述以外にも動脈石灰化を亢進する因子として, inducible nitric oxide synthase (iNOS) 阻害作用を示す dexamethasone などの血管収縮に関係する化合物も挙げられている.<sup>25)</sup> 血管収縮に係わるシグナル伝達の1つに Rho-Rho キナーゼを介した経路がある. Rho は前述のように G タンパク質の1つとして知られており, 血管収縮のほか細胞内ストレスファイバーの形成などの機能に関与している. Rho は Rho キナーゼの活性化に寄与し, 活性化した Rho キナーゼはミオシン軽鎖をリン酸化することでシグナル伝達を行っている. 近年, 炎症性メディエーター誘発の動脈石灰化に Rho が関与しているという報告<sup>19)</sup>があることから, 第5節で示した 7kc による *in vitro* 動脈石灰化亢進に Rho の影響があるのかを Rho キナーゼの特異的阻害剤である Y-27632 を用いて検討した (Fig. 7; 投稿中). Y-27632 処理によっても Pi 誘導石灰化自体は抑制しなかったが, 7kc と Pi 併用による石灰化亢進は抑制した. Pi 誘導石灰化に Rho キナーゼは関与していないという報告<sup>26)</sup>は, 今回の結果を支持した. よって, 7kc は Rho-Rho キナーゼシグナル伝達経路を介して動脈石灰化を亢進させることが示唆された.

## 7. おわりに

今回の研究により, 骨粗鬆症治療薬である RD が Pi 又は vitamin D<sub>2</sub> 誘発強力に動脈石灰化を抑制し,

## A



## B

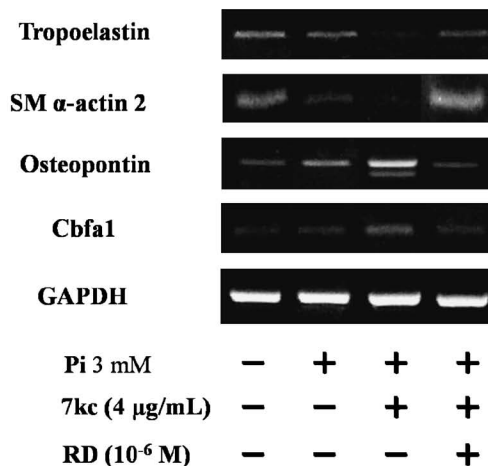


Fig. 6. Risedronate Inhibited the *In vitro* Arterial Calcification Model Accelerated by 7-Ketocholesterol

A; Risedronate (RD; 10<sup>-6</sup> mol/l) dramatically suppressed inorganic phosphate (Pi)-induced *in vitro* arterial calcification accelerated by 7-ketocholesterol. Values are expressed as means  $\pm$  S.E. ( $n=4$ ). Differences compared with Pi alone (Pi=3 mmol/l) for each concentration were statistically significant (\* $p<0.005$ , Bonferroni/Dunn's test). B; SM  $\alpha$ -actin 2, as marker gene of aortic smooth muscle cell, and tropoelastin mRNA expressions were suppressed dramatically by Pi plus 7kc, and RD suppressed the decrease of these mRNA. On the contrary, osteopontin, and Cbfa1, as osteogenic marker genes, mRNA expressions were raised dramatically by Pi plus 7kc, and RD suppressed the increase of these osteogenic marker genes. Total RNA was isolated from the bovine aortic smooth muscle cells. SM  $\alpha$ -actin 2, tropoelastin, osteopontin, Cbfa1, and glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), as a housekeeping gene, mRNA expressions were visualized by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) method.

oxLDL 生成などの脂質代謝異常による動脈石灰化亢進に対しても効果があることが示唆された. よって, 有用な骨粗鬆症治療薬であるビスフォスフォネートは, 骨粗鬆症と併発しやすい動脈石灰化に対しても劇的な予防効果があることが考えられるため, ビスフォスフォネートのニーズが高まるのではと期

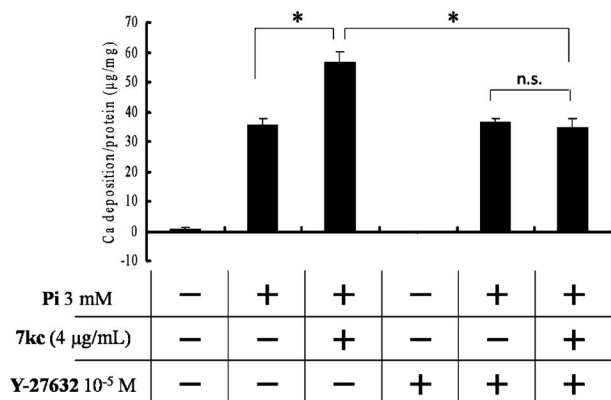


Fig. 7. 7-Ketocholesterol Accelerated the Pi-induced *In vitro* Calcification via Rho-Rho Kinase Signaling Pathway

Y-27632 ( $10^{-5}$  mol/l), a specific Rho kinase inhibitor, partially inhibited the inorganic phosphate (Pi)-induced *in vitro* arterial calcification accelerated by 7-ketocholesterol (7kc). On the contrary, Y-27632 could not inhibit the Pi-induced arterial calcification. Therefore, 7kc accelerated the Pi-induced arterial calcification via Rho-Rho kinase signaling pathway. Values are expressed as means  $\pm$  S.E. ( $n=4$ ). Differences compared with inorganic phosphate (Pi) alone (Pi=3 mmol/l) for each concentration were statistically significant (\* $p<0.0033$ , Bonferroni/Dunn's test).

待される。しかし、粥状動脈硬化症の動物モデルに対してビスフォスフォネートは動脈内膜の肥厚した病変部位（プラーク）の破綻を誘発するという報告<sup>27)</sup>や、がんの骨転移抑制のための注射用ビスフォスフォネート製剤では顎骨壊死（osteonecrosis of the jaw）の副作用報告<sup>28)</sup>があることから、まだ課題は残されていると言える。補助的な薬物との併用などでビスフォスフォネートの投与量を低下させ、このジレンマが解消されることも望まれる。

#### 付記

本総説における RD の作用の研究結果の一部は第 9 回 Vitamin K & Aging 研究会（2006 年）での発表内容の一部を用いた。

#### REFERENCES

- 1) Frink R. J., Achor R. W., Brown Jr. A. L., Kincaid O. W., Brandenburg R. O., *Am. J. Cardiol.*, **26**, 241–247 (1970).
- 2) Beadenkopf W. G., Daoud A. S., Love B. M., *Am. J. Roentgenol. Radium Ther. Nucl. Med.*, **92**, 865–871 (1964).
- 3) Kuro-o M., Matsumura Y., Aizawa H., Kawaguchi H., Suga T., Utsugi T., Ohyama Y., Kurabayashi M., Kaname T., Kume E., Iwasaki H., Iida A., Shiraki-Iida T., Nishika-

wa S., Nagai R., Nabeshima Y. I., *Nature*, **390**, 45–51 (1997).

- 4) Jono S., McKee M. D., Murry C. E., Shioi A., Nishizawa Y., Mori K., Morii H., Giachelli C. M., *Circ. Res.*, **87**, E10–17 (2000).
- 5) Steitz S. A., Speer M. Y., Curinga G., Yang H. Y., Haynes P., Aebersold R., Schinke T., Karsenty G., Giachelli C. M., *Circ. Res.*, **89**, 1147–1154 (2001).
- 6) Sugitani H., Wachi H., Mecham R. P., Seyama Y., *J. Atheroscler. Thromb.*, **9**, 292–298 (2002).
- 7) Wachi H., Sugitani H., Murata H., Nakazawa J., Mecham R. P., Seyama Y., *J. Atheroscler. Thromb.*, **11**, 159–166 (2004).
- 8) Qin X., Corriere M. A., Matrisian L. M., Guzman R. J., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **26**, 1510–1516 (2006).
- 9) Price P. A., Faus S. A., Williamson M. K., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **21**, 817–824 (2001).
- 10) Vermeer C., Thijssen H. H., Hamulyak K., *Bibl. Nutr. Dieta*, 159–170 (2001).
- 11) Shioi A., Nishizawa Y., Jono S., Koyama H., Hosoi M., Morii H., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **15**, 2003–2009 (1995).
- 12) Luo G., Ducey P., McKee M. D., Pinero G. J., Loyer E., Behringer R. R., Karsenty G., *Nature*, **386**, 78–81 (1997).
- 13) Rogers M. J., Frith J. C., Luckman S. P., Coxon F. P., Benford H. L., Monkkonen J., Auriola S., Chilton K. M., Russell R. G., *Bone*, **24**, 73S–79S (1999).
- 14) Coxon F. P., Helfrich M. H., Larijani B., Muzylak M., Dunford J. E., Marshall D., McKinnon A. D., Nesbitt S. A., Horton M. A., Seabra M. C., Ebetino F. H., Rogers M. J., *J. Biol. Chem.*, **276**, 48213–48222 (2001).
- 15) Reszka A. A., Halasy-Nagy J. M., Masarachia P. J., Rodan G. A., *J. Biol. Chem.*, **274**, 34967–34973 (1999).
- 16) Thompson K., Dunford J. E., Ebetino F. H., Rogers M. J., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **290**, 869–873 (2002).
- 17) Fisher J. E., Rogers M. J., Halasy J. M., Luckman S. P., Hughes D. E., Masarachia P. J., Wesolowski G., Russell R. G., Rodan G. A., Reszka A. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **96**, 133–138 (1999).

- 18) Merrell M. A., Wakchoure S., Lehenkari P. P., Harris K. W., Selander K. S., *Eur. J. Pharmacol.*, **570**(1–3), 27–37 (2007).
- 19) Kizu A., Shioi A., Jono S., Koyama H., Okuno Y., Nishizawa Y., *J. Cell. Biochem.*, **93**, 1011–1019 (2004).
- 20) Proudfoot D., Davies J. D., Skepper J. N., Weissberg P. L., Shanahan C. M., *Circulation*, **106**, 3044–3050 (2002).
- 21) Liu H., Yuan L., Xu S., Zhang T., Wang K., *Life Sci.*, **76**, 533–543 (2004).
- 22) Miyashita Y., Ozaki H., Koide N., Otsuka M., Oyama T., Itoh Y., Mastuzaka T., Shirai K., *J. Atheroscler. Thromb.*, **9**, 65–71 (2002).
- 23) Ozaki H., Miyashita Y., Watanabe H., Shirai K., *J. Atheroscler. Thromb.*, **12**, 308–314 (2005).
- 24) Proudfoot D., Skepper J. N., Hegyi L., Bennett M. R., Shanahan C. M., Weissberg P. L., *Circ. Res.*, **87**, 1055–1062 (2000).
- 25) Kirton J. P., Wilkinson F. L., Canfield A. E., Alexander M. Y., *Circ. Res.*, **98**, 1264–1272 (2006).
- 26) Son B. K., Kozaki K., Iijima K., Eto M., Kojima T., Ota H., Senda Y., Maemura K., Nakano T., Akishita M., Ouchi Y., *Circ. Res.*, **98**, 1024–1031 (2006).
- 27) Shimshi M., Abe E., Fisher E. A., Zaidi M., Fallon J. T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **328**, 790–793 (2005).
- 28) Bamias A., Kastritis E., Bamia C., Mouloupoulos L. A., Melakopoulos I., Bozas G., Koutsoukou V., Gika D., Anagnostopoulos A., Papadimitriou C., Terpos E., Dimopoulos M. A., *J. Clin. Oncol.*, **23**, 8580–8587 (2005).