Hypoxia/reoxygenation 処理によるヒト血管 内皮細胞傷害に対する PGE₁ の修飾作用

北川 晶・武永美津子・松本香代・川合眞一・水島 裕・五十嵐理慧*

Effect of PGE₁ on hypoxia or hypoxia/reoxygenation-treated human vascular endothelial cells

The aim of this study was to investigate about endothelial cell injury caused by hypoxia or hypoxia/reoxygenation and the effect of PGE₁ on the injury using human umbilical vein endothelial cells (HUVEC).

Under hypoxia, HUVEC shrank and peeled from dish, accompanied with reduced thymidine uptake, induced DNA fragmentation, and increased caspase-3 activity. On the other hand, under reoxygenation after hypoxia, HUVEC restarted proliferation as a result of decreasing caspase-3 activity in a time-dependent manner.

When PGE₁ was added prior to hypoxia, the number of living cells got fewer and caspase-3 activity was potentiated without changing of cAMP levels. In contrast, the addition of PGE₁ just before reoxygenation, increased the number of living cells and decreased caspase-3 activity with increasing cAMP levels. Under neither hypoxia nor reoxygenation, the gene expression of any prostaglandin EP receptors was not observed. In conclusion, PGE₁ showed opposite effects to be pro-apoptotic under hypoxia, and to be anti-apoptotic under reoxygenation, not through EP receptors.

Rec. 8/3/2001, Acc. 10/5/2001, pp53~60

Aki Kitagawa・Mitsuko Takenaga・Kayo Matsumoto・
Shinichi Kawai・Yutaka Mizushima・Rie Igarashi*

key words : apoptosis, hypoxia/reoxygenation, HUVEC, PGE₁

虚血/再灌流時には、血液中酸素濃度の低下や急激な上昇による酸化的ストレスによって血管内皮が傷害を受けて血管機能に支障をきたすことが知られている。血管内皮細胞は hypoxia 処理(虚血の *in vitro* モデル)により、ミトコンドリアの膜電位の低下による細胞骨格の破壊²⁾や、細胞内 cAMP レベルの低下^{3,4,6)}、PKC δ 活性の低下⁵⁾などさまざまな影響を受け細胞死に陥いることも報告されている¹⁾。一方、reoxygenation 処理(再灌流の *in vitro* モデル)では、cAMP レベルの低下⁷⁾や、アポトーシスの誘導^{8,9)}などの影響を受けることが明らかになっている。したがって、hypoxia, reoxygenation のいずれも、細胞内 cAMP レベル

の低下を伴った細胞機能の低下を招くと考えられる。

cAMP は生理活性物質が細胞膜受容体に結合したのち、アデニル酸シクラーゼにより ATP から誘導される物質であり、さらにプロテインキナーゼ(PK)A を活性化し、細胞の増殖や分化を調節することが知られている。cAMP レベルを変動させる物質の一つとしてプロスタグランジン E₁(PGE₁)がある。PGE₁は血管拡張作用、血小板凝集抑制作用、赤血球変形形態改善作用など多彩な薬理効果を持ち、種々の難治性血管病変の治療に利用されている¹⁰⁾。また、虚血-再灌流傷害については心筋に対する保護作用¹¹⁾、肝組織に対する保護作用¹²⁾が報告されている。肝移植片の保護作用については、炎症性サイトカインの抑制を介した内皮細胞の保護によるものであると考察されて

* The Second Department of the Institute of Medical Science, St. Marianna University School of Medicine
聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター第2部門
DDS 研究室

いる¹³⁾。したがって、PGE₁がhypoxiaやreoxygenation処理によって傷害を受けた内皮細胞に対してどのような作用を示すかは非常に興味深い、これまでその報告はきわめて少ない。

今回筆者らは、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC)を用いてhypoxiaおよびreoxygenation処理を行い、HUVECがどのような影響を受けるかを検討し、この系におけるPGE₁の作用について検討した。

材料と方法

(1) 細胞

ヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC)(Biowhitaker Inc., MD, USA)はCS-C Complete Medium(Biowhitaker Inc.)にペニシリン100 U/ml, ストレプトマイシン100 µg/mlを加えて37°C, 5% CO₂条件下で培養し、実験に供した。

(2) 薬剤

PGE₁(Sigma Chemical Co., MO, USA)は99.5%エタノールで20 mMに溶解し、-80°Cで保存した。使用時に培地で希釈して添加した。

(3) Hypoxiaおよびreoxygenation処理

播種後37°C, 5%CO₂条件下で18時間培養したのち、細胞をBBL GasPak™嫌気システム(Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, MD, USA)に密封し、培養した。これにより細胞の培養環境はO₂濃度が2%未満の状態となる(hypoxia)⁶⁾。この状態で一定時間培養後ガスバックから取り出し、通常の酸素濃度で培養した(reoxygenation)。

(4) 細胞状態の検討

① 位相差顕微鏡による形態観察

各処理後の細胞を正置型顕微鏡で観察・撮影を行った。

② 生理細胞の測定

各処理後の細胞を0.3%トリパンブルーPBS溶液で染色し、生細胞数をカウントした。

③ ³H-thymidine 取り込み量の測定

HUVECを24 well プレートに播種し(2×10⁴ cell/ml/well), 37°C, 5% CO₂条件下で18時間培養後、24時間hypoxia処理、および4時間reoxygenation

処理を行った。各wellに2 µCiの³H-thymidine(Amersham International, England)を添加し、37°C, 5% CO₂条件下で4時間インキュベートした。MicroBeta™(WALLAC)にて放射活性を測定し、取り込まれた³H-thymidine量を求めた。

④ 電気泳動によるDNA断片化の検出

HUVECをφ60 mmの培養ディッシュに播種し(3×10⁵ cell/5 ml/dish), 37°C, 5% CO₂条件下で18時間培養後、24時間hypoxia、および4時間reoxygenation処理を行った。細胞を接着細胞と培養上清に浮遊した細胞とにわけて回収し、常法によりフェノール抽法を行いDNAを得た。濃度を確認後2%アガロースゲルにて電気泳動を行った。エチジウムブロマイドにより染色しUVイルミネーターで観察、撮影した。

⑤ Caspase-3 活性の測定

HUVECをφ60 mmの培養ディッシュに播種し(3×10⁵ cells/5 ml/dish), 37°C, 5% CO₂条件下で18時間培養後、hypoxia、およびreoxygenation処理を行った。

一定培養時間後、CPP 32/Caspase-3 Colorimetric Protease Assay Kit(株MBL, 愛知)により細胞内caspase-3活性を測定した。結果は蛋白量当たりに換算して示した。

(5) 蛋白量の測定

Protein Assay Kit(Bio-Rad Laboratories Inc., CA, USA)により蛋白濃度を測定した。

(6) cAMP の測定

各処理を行った細胞を回収し溶解させたのち、cAMP EIA Kit(BioTrak Market Intelligence Co., CA, USA)により細胞内cAMP量を測定した。

(7) RT-PCR

HUVEC(1.5×10⁶ cell/10 ml/φ100 mm dish)を37°C, 5% CO₂条件下で18時間培養後、24時間hypoxia処理、および5分、60分、240分reoxygenation処理を行った。ISOGEN(株ニッポンジーン, 東京)によりRNAを抽出した。2.5 µgのRNAについてヒトプロスタグランジンEPレセプターcDNAのプライマーとして、

図 1 HUVEC の位相差顕微鏡像(×400)

HUVEC を hypoxia 条件下で培養した。また 24 時間 hypoxia 後 reoxygenation 処理を行った。このときの経時的な細胞の形態変化を位相差顕微鏡で観察した。

A : normoxia 24 hr, B : hypoxia 24 hr, C : hypoxia 48 hr, D : hypoxia 24 hr + reoxygenation 4 hr, E : hypoxia 24 hr + reoxygenation 24 hr

EP 1 upstream :

5'-CTCGCCGCGCTGGTGTGCAACAC-
GC-3'

downstream :

5'-GGCCTCCCAGGCGCTCGGTGTTAG-
GCC-3'¹⁴⁾

EP 2 upstream :

5'-TTCATCCGGCACGGGCGGACCGC-3'

downstream :

5'-GTCAGCCTGTTTACTGGCATCTG-
3'¹⁵⁾

EP 3 upstream :

5'-TGTGTGCGCGAGTACCGGCG-3'

downstream :

5'-CGGGCCACTGGACGGTGTACT-3'¹⁶⁾

EP 4 upstream :

5'-CCTCCTGAGAAAGACAGTGCT-3'

downstream :

5'-AAGACACTCTCTGAGTCCT-3'¹⁷⁾

および PCR Beads "Ready To Go" (Amersham Pharmacia biotech Inc., NJ, USA) を使用して

RT-PCR を行った。条件は 94°C15 分, 94°C→58°C→72°C 各 1 分×40 サイクル, 72°C10 分とした。反応終了後 2% アガロースゲルにて電気泳動を行い, エチジウムブロマイドで染色し UV イルミネーターで特定の長さの DNA バンドの検出を確認した。陽性対照として U 937 の RNA を用いて同条件で RT-PCR を行った¹⁷⁾。

(8) 統計処理

統計処理は Student's t 検定によって行い, $p < 0.05$ を有意とした。

結果と考察

HUVEC を hypoxia 条件下で培養することにより, 浮遊した顆粒状の細胞が時間依存的に増加するとともに接着細胞数の減少が認められた(図 1)。図 1C に示すように 48 時間後には接着細胞数の減少が顕著であった。hypoxia 条件で 24 時間培養後, 通常の酸素濃度下で培養(reoxygenation)すると, 処理 4 時間後には新たに浮遊してくる細胞は認められなかった(図 1D)。また reoxygenation 4 時間では顕著ではなかったが, 24 時間後に

図2 HUVECの ^3H -thymidine 取り込み量
HUVEC に hypoxia 処理を 24 時間行ったあと、reoxygenation 処理を 4 時間行った。それぞれの時間で ^3H -thymidine を添加してさらに 4 時間培養後、 ^3H の放射活性を測定して HUVEC の thymidine の取り込み量を求めた。正常な酸素濃度で終始培養を行った場合の thymidine 取り込み量を 100% として示した。(mean $\pm$ SD, $n=6$)

図3 Hypoxia/reoxygenation 処理後の HUVEC の DNA 断片化

HUVEC に hypoxia 処理を 24 時間行ったあと reoxygenation 処理を 4 時間行い、接着細胞と浮遊した細胞を含む培養上清をそれぞれ回収した。DNA はフェノールにて抽出し、2% アガロースゲルで電気泳動を行った。

図4 Hypoxia/reoxygenation 処理後の HUVEC の caspase-3 活性

HUVEC に 24~48 時間 hypoxia 処理を行った。また 24 時間の hypoxia 処理後、さらに 4~24 時間 reoxygenation 処理を行った。それぞれの時間での caspase-3 活性を測定した。蛋白量あたりの caspase-3 活性について、正常な酸素濃度で終始培養した場合を 100% として示した。(mean $\pm$ SD, $n=3$)

* : normoxia に対して $p < 0.01$

** : hypoxia 24 時間処理に対して $p < 0.01$

は接着細胞が通常の培養を行った細胞とほぼ同じ程度まで増殖したことが観察された(図1E)。

つぎにこれらの処理に伴う細胞機能の変化を調べるため、同様の培養条件で ^3H -thymidine 取り込み実験を行った。 ^3H -thymidine 取り込み量は hypoxia によって有意に減少した。つづく 4 時間の reoxygenation によって ^3H -thymidine の取り込み量に変化はなかった(図2)。hypoxia 後の接着細胞と浮遊した細胞をそれぞれ回収し DNA 抽出後アガロースゲル電気泳動を行った(図3)。normoxia 細胞にくらべ hypoxia のみを行った接着細胞では、若干の DNA 断片化が認められた。顕著な断片化を示したのは浮遊した細胞由来の DNA である。hypoxia および reoxygenation のいずれも明らかな DNA 断片化が認められた。したがって、hypoxia によってアポトーシスが誘導され、細胞接着力の低下により剥がれて浮遊する状態を経て、死に至るのではないかと考えられた。

一方、reoxygenation 後の接着細胞からの DNA 断片化は、hypoxia のみの接着細胞の断片化にくらべ明白ではなかった。つぎに hypoxia および reoxygenation 条件下で培養した HUVEC の caspase-3 活性を測定した(図4)。caspase-3 活

図 5 Hypoxia 開始時および reoxygenation 開始時に PGE₁ を添加したときの生細胞数の変化

- A: HUVEC に PGE₁ を添加して 24 時間の hypoxia 処理を行った。
 B: HUVEC に hypoxia 処理を 24 時間行ったあと、reoxygenation 処理を開始する際に PGE₁ を添加した、さらに 4 時間インキュベーションを行った、いずれも正常な酸素濃度で培養を行った場合の生細胞数を 100% として示した。(mean±SD, n=6)

図 6 Hypoxia 開始時および reoxygenation 開始時に PGE₁ を添加したときの caspase-3 活性

- A: HUVEC に PGE₁ を添加して 24 時間の hypoxia 処理を行った。
 B: HUVEC に hypoxia 処理を 24 時間行ったあと、PGE₁ を添加してから 4 時間の reoxygenation 処理を行った。蛋白量あたりの caspase-3 活性について、正常な酸素濃度で終始培養した場合を 100% として示した。(mean±SD, n=3)

性は hypoxia 24 時間で正常細胞の活性の 2 倍、28 時間で 3 倍以上、35 時間で約 4 倍と時間依存的な上昇が有意に認められた。hypoxia 処理時間を延長すると caspase-3 活性の低下がみられたが、これは生細胞の減少による全体の酵素活性の低下が原因であると考えられた。また hypoxia 処理 24

図 7 Hypoxia 開始時および reoxygenation 開始時に PGE₁ を添加したときの cAMP 量
 HUVEC に PGE₁ (2 μM) を添加して 24 時間 hypoxia 処理を行ったあと、well 当たりの cAMP 量を測定した。また、hypoxia 処理を 24 時間行ったあと reoxygenation 処理を開始する際に PGE₁ を添加し、さらにインキュベート後の well あたりの cAMP 量を測定した。(mean±SD, n=3)

時間後 reoxygenation を行うと、4 時間後には変化が認められなかったが、漸次活性は低下し 11 時間後には normoxia 細胞の活性レベルとなった。

HUVEC を含め種々の組織の静脈、動脈の血管内皮細胞が hypoxia によってアポトーシスを誘導することは、すでに多くの研究者が報告しており^{1,5,18,19}、筆者らの実験データはこれらとほぼ一致している。一方、reoxygenation によりアポトーシスがさらに誘導されるという報告があるが²⁰、筆者らの培養条件では少なくとも形態学的には明らかではなかった。

PGE₁ は種々の細胞に対して保護作用を示すことが報告されている^{12,22~24}。虚血-再灌流傷害についても PGE₁ が内皮細胞の保護を通じて肝移植片を保護することが Itasaka らによって報告されている¹³。しかし、血管内皮細胞の hypoxia/reoxygenation 系に対する PGE₁ の作用の報告は少ない。そこで筆者らは hypoxia および reoxygenation 条件下の HUVEC に対して PGE₁ がどのように作用するかを検討した。hypoxia によって有意に減少した生細胞数は、hypoxia 開始時に PGE₁ を添加したとき 0.02 μM 以上の濃度でさらに有意な減少を示した(図 5)。

一方、hypoxia 後 reoxygenation の開始時に

PGE₁を加えると、生細胞数が増加する傾向がみられ、2 μ M の添加では有意差が認められた。caspase-3 活性は、hypoxia 開始時に PGE₁を加えると濃度依存的に上昇し、2 μ M 添加群ではコントロールの約 1.4 倍となった ($p < 0.01$)。一方、reoxygenation の開始時に PGE₁を加えると 0.02 μ M では caspase-3 活性は有意に低下し ($p < 0.01$)、0.2 μ M でも有意差は得られなかったものの低下傾向がみられた (図 6)。

これらの結果は、PGE₁が hypoxia 条件下では pro-apoptotic に、reoxygenation 直前に加えた場合には anti-apoptotic に作用することを示している。すなわち PGE₁が条件によっては相反する作用を示すという興味深い知見が得られた。

Ogawa, Grammas らは、肺動脈、および脳動脈血管内皮細胞を hypoxia 処理すると cAMP 量が低下し内皮のバリアー機能が低下することを明らかにした^{3,4,6)}。また Hayashi らは、動脈内皮細胞で hypoxia によって誘導された cAMP レベルの低下により細胞の HGF 産生量が低下すること²¹⁾を示した。PGE₁は細胞内の cAMP レベルを上昇させる薬物として知られており、PGE₁の細胞保護効果は cAMP レベルの上昇を介しているという報告²⁴⁾もある。

筆者らは PGE₁の pro-apoptotic、あるいは anti-apoptotic な作用が cAMP レベルの変動を介しているか否かを検討するために hypoxia および reoxygenation による細胞中の cAMP レベルを測定し、PGE₁の作用を検討した (図 7)。細胞内の cAMP 量は hypoxia によって約 1/2 に減少した。この結果は Ogawa, Hayashi らの報告と一致している。hypoxia の開始時に PGE₁を添加した場合、hypoxia 処理によって減少した cAMP レベルはコントロールとほぼ同じ値で変動がみられなかった。PGE₁は hypoxia によって低下した cAMP レベルの変動を介さずシグナル伝達を行って pro-apoptotic な作用を示したことが示唆された。

一方、reoxygenation 開始時に PGE₁を添加した場合には、cAMP レベルが有意に上昇した。PGE₁による cAMP レベルの上昇は、EP 2, EP 4

図 8 Hypoxia および hypoxia/reoxygenation 処理による EP 4 レセプターの発現
HUVEC に hypoxia 処理を 24 時間行ったあと、reoxygenation 処理を 60 分、240 分行った。それぞれの時間で細胞の RNA を回収し、RT-PCR を行い、アガロースゲル電気泳動で EP 4 のバンドを確認した。U 937 細胞抽出 RNA に同じプライマーを用いて RT-PCR を行うと EP 4 のバンドが得られている。

レセプターを介してアデニル酸シクラーゼ活性を上昇させることにより生じると一般に考えられている。HUVEC に EP レセプターの発現がみられるという報告はこれまでないが、hypoxia あるいは reoxygenation によってこれらのレセプターが発現し、レセプターを介して cAMP レベルの上昇、PKA の活性化を経てアポトーシス誘導を抑制した可能性がある。そこで経時的な EP レセプター遺伝子の発現の有無を RT-PCR 法で検討し、結果を図 8 に示した。

U 937 細胞では EP 4 遺伝子の発現がみられたが、HUVEC ではどの条件においてもまったくみられなかった。ほかの EP 1, EP 2, EP 3 についても同様で、遺伝子発現は確認できなかった。したがって reoxygenation 条件下の HUVEC に対する PGE₁の anti-apoptotic な作用の発揮には、PGE レセプターを介さない可能性が示唆された。EP レセプター以外のシグナル伝達経路として、PG トランスポーターの関与が考えられる。

Kawamura らは NGF の欠乏によって神経細

胞に誘導されるアポトーシスを PGE_1 が抑制し、その際 PG トランスポーターが関与していることを報告している²⁵⁾。また Topper らは shear stress をかけたヒト静脈内皮細胞に PG トランスポーターが発現することを明らかにしている²⁶⁾。hypoxia 条件下における cAMP レベルの変動を介さない pro-apoptotic 作用については PG トランスポーターを介した作用である可能性がある。今後 hypoxia 条件下の HUVEC に PG トランスポーターが発現するかどうかについては、検討すべきである。

一方、reoxygenation 条件下には PGE レセプター以外の PG レセプター、たとえば IP 受容体などを介し、親和性が低いながらも cAMP レベルを上昇させてシグナル伝達した可能性も否定できないと考える。今後さらにレセプターとトランスポーターの両面から検討を重ねる予定である。

今回の検討において、HUVEC に対して PGE_1 が hypoxia 条件下では pro-apoptotic に、reoxygenation 条件下では anti-apoptotic に作用するという非常に興味ある知見を得た。 PGE_1 の細胞保護作用については多くの報告があるが、hypoxia 条件下で細胞傷害をさらに誘導するという結果はこれまでの報告と相反するものであり、非常に興味深いところである。

文 献

- 1) Stempien-Otero A, Karsan A, Cornejo CJ, Xiang H, Eunson T, Morrison RS, Kay M, Winn R, Harlan J : Mechanisms of hypoxia-induced endothelial cell death. Role of p 53 in apoptosis. *J Biol Chem* 274 : 8039-8045, 1999.
- 2) Nishimura Y, Romer LH, Lemasters JJ : Mitochondrial dysfunction and cytoskeletal disruption during chemical hypoxia to cultured rat hepatic sinusoidal endothelial cells : the pH paradox and cytoprotection by glucose, acidotic pH, and glycine. *Hepatology* 27 : 1039-1049, 1998.
- 3) Yan SF, Ogawa S, Stern DM, Pinsky DJ : Hypoxia-induced modulation of endothelial cell properties : regulation of barrier function and expression of interleukin-6. *Kidney Int* 51 : 419-425, 1997.
- 4) Grammas P, Moore P, Cashman RE, Floyd RA : Anoxic injury of endothelial cells causes divergent changes in protein kinase C and protein kinase A signaling pathways. *Mol Chem Neuropathol* 133 : 113-124, 1998.
- 5) Shizukuda Y, Helisch A, Yokota R, Ware JA : Downregulation of protein kinase c delta activity enhances endothelial cell adaptation to hypoxia. *Circulation* 100 : 1909-1916, 1999.
- 6) Ogawa S, Koga S, Kuwabara K, Brett J, Morrow B, Morris SA, Bilezikian JP, Silverstein SC, Stern D : Hypoxia-induced increased permeability of endothelial monolayers occurs through lowering of cellular cAMP levels. *Am J Physiol* 1262 : C 546-C 554, 1992.
- 7) Hastie LE, Patton WF, Hechtman HB, Shepro D : H_2O_2 induced filamin redistribution in endothelial cells is modulated by the cyclic AMP-dependent protein kinase pathway. *J Cell Physiol* 172 : 373-381, 1997.
- 8) Hogg N, Browning J, Howard T, Winterford C, Fitzpatrick D, Gobe G : Apoptosis in vascular endothelial cells caused by serum deprivation, oxidative stress and transforming growth factor-beta. *Endothelium* 7 : 35-49, 1999.
- 9) Aoki M, Nata T, Morishita R, Matsushita H, Nakagami H, Yamamoto K, Yamazaki K, Nakabayashi M, Ogihara T, Kaneda Y : Endothelial apoptosis induced by oxidative stress through activation of nf-kappaB : antiapoptotic effect of antioxidant agents on endothelial cells. *Hypertension* 38 : 48-55, 2001.
- 10) 水島 裕, 室田誠逸 : プロスタグランディンの種々の臨床応用. プロスタグランディンの臨床. (室田誠逸, 水島 裕・編), 医学書院, 東京, 1987, p 60-71.
- 11) Kawamura T, Nara N, Kadosaki M, Inada K, Endo S : Prostaglandin E_1 reduces myocardial reperfusion injury by inhibiting proinflammatory cytokines production during cardiac surgery. *Crit Care Med* 28 : 2201-2208, 2000.
- 12) Adachi N, Ochi T, Tabo E, Nagaro T, Arai T : Prostaglandin E_1 improves hepatic encephalopathy produced by ischaemia-reperfusion liver injury in rats. *Intensive Care Med* 26 : 1681-1684, 2000.
- 13) Itasaka H, Suehiro T, Wakiyama S, Yanaga K, Shimada M, Sugimachi K : The mechanism of hepatic graft protection against reperfusion injury by prostaglandin E_1 . *Surg Today* 29 : 526-532, 1999.
- 14) Funk CD, Furci L, FitzGerald GA, Grygorczyk R, Rochette C, Bayne MA, Abramovitz M, Adam M, Metters KM : Cloning and expression of a cDNA for the human prostaglandin E receptor EP1 subtype. *J Biol Chem* 268 : 26767-26772, 1993.
- 15) Regan JW, Bailey TJ, Pepperl DJ, Pierce KL, Bogardus AM, Donello JE, Fairbairn CE, Kedzie KM, Woodward DF, Gil DW : Cloning of a novel human prostaglandin receptor with characteristics of the pharmacologically defined EP2 subtype. *Mol Pharmacol* 146 : 213-220, 1994.
- 16) Yang J, Xia M, Goetzl EJ, An S : Cloning and expression of the EP3-subtype of human receptors for prostaglandin E_2 . *Biochem Biophys Res Commun* 198 : 999-1006, 1994.
- 17) Mori K, Tanaka I, Kotani M, Miyaoka F, Sando T,

- Muro S, Sasaki Y, Nakagawa O, Ogawa Y, Usui T, Ozaki S, Ichikawa A, Narumiya S, Nakao K : Gene expression of the human prostaglandin E receptor EP 4 subtype : Differential regulation in monocytoid and lymphoid lineage cells by phorbol ester. *J Mol Med* 74 : 333-336, 1996.
- 18) Matsushita H, Morishita R, Nata T, Aoki M, Nakagami H, Taniyama Y, Yamamoto K, Higaki J, Yasufumi K, Ogihara T : Hypoxia-induced endothelial apoptosis through nuclear factor-kappaB (NF-kappaB)-mediated bc 1-2 suppression : *in vivo* evidence of the importance of NF-kappaB in endothelial cell regulation. *Circ Res* 86 : 974-981, 2000.
 - 19) Zhang J, Tan Z, Tran : Chemical hypoxia-ischemia induces apoptosis in cerebromicrovascular endothelial cells. *Brain Res* 877 : 134-140, 2000.
 - 20) Mold C, Morris CA : Complement activation by apoptotic endothelial cells following hypoxia/reoxygenation. *Immunology* 102 : 359-364, 2001.
 - 21) Hayashi S, Morishita R, Nakamura S, Yamamoto K, Moriguchi A, Nagano T, Taiji M, Noguchi H, Matsumoto K, Nakamura T, Higaki J, Ogihara T : Potential role of hepatocyte growth factor, a novel angiogenic growth factor, in peripheral arterial disease : downregulation of HGF in response to hypoxia in vascular cells. *Circulation* 100 : II 301-II 308, 1999.
 - 22) Hanazaki K, Kuroda T, Kajikawa S, Amano J : Prostaglandin E₁ reduces thromboxane A₂ in hepatic ischemia-reperfusion. *Hepatogastroenterology* 47 : 807-811, 2000.
 - 23) Kishimoto S, Sakon M, Umeshita K, Miyoshi H, Taniguchi K, Meng W, Nagano H, Dono K, Ariyosi H, Nakamori S, Kawasaki T, Gotoh M, Monden M, Imajoh-Ohmi S : The inhibitory effect of prostaglandin E₁ on oxidative stress-induced hepatocyte injury evaluated by calpain- μ activation. *Transplantation* 69 : 2314-2319, 2000.
 - 24) Yamamoto M, Sato N, Tajima H, Furuue K, Ohira A, Honda Y, Yodoi J : Induction of human thiorodoxin in cultured human retinal pigment epithelial cells through cyclic AMP-dependent pathway ; involvement in the cytoprotective activity of prostaglandin E₁. *Exp Eye Res* 65 : 645-652, 1997.
 - 25) Kawamura T, Horie S, Maruyama T, Akira T, Imagawa T, Nakamura N : Prostaglandin E₁ transported into cells blocks the apoptotic signals induced by nerve growth factor deprivation. *J Neurochem* 72 : 1907-1914, 1999.
 - 26) Topper JN, Cai J, Stavarakis G, Anderson KR, Woolf EA, Sampson BA, Schoen FJ, Falb D, Gimbrone MA Jr : Human prostaglandin transporter gene(hPGT)is regulated by fluid mechanical stimuli in cultured endothelial cells and expressed in vascular endothelium *in vivo*. *Circulation* 98 : 2396-2403, 1998.