

抗細胞死薬を用いた新しい COPD の治療法の開発

17590805

平成 17 年度～平成 18 年度科学研究費補助金

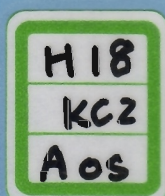
(基盤研究 (C) (2)) 研究成果報告書



平成 19 年 4 月

研究代表者 青柴和徹

東京女子医科大学医学部講師



はしがき

わが国で胃粘膜保護薬として開発された、Heat shock proteins (HSPs)の誘導薬である Geranylgeranylacetone (GGA) が喫煙曝露による肺気腫を発症予防するかについて研究した。Heat shock proteins (HSPs)の誘導薬である Geranylgeranylacetone (GGA) が喫煙曝露による肺気腫を発症予防するかについて研究した。5 週齢の雄性 Hartley 系モルモットを無処置で溶媒（アラビアゴム液）を経口投与する群（G1：n=8）、無処置で GGA を経口投与する群（G2：n=8）、喫煙させて溶媒を投与する群（G3：n=10）、喫煙させて GGA を投与する群（G4：n=10）に分けた。G3 及び G4 のモルモットに対しては、毎週 5 日、12 週間連続して 1 日 5 時間の喫煙曝露を行なった。G1 及び G3 に対しては GGA の媒体を、G2 及び G4 に対しては GGA 200mg/kg を毎喫煙前に強制経口投与した。肺胞の形態計測の結果では、GGA を経口投与して喫煙曝露を行なった動物群（G4）では溶媒投与して喫煙曝露した動物群（G3）に比べて肺胞壁間平均距離（mean linear intercept: Lm）の増大が 38%抑制され、肺胞腔内容積比率（V_{valv.air}）の増加が 50%減少していた。さらに抗 SS-DNA 抗体や M30 抗体を用いた免疫組織化学染色や TUNEL 染色による検討では、GGA を経口投与して喫煙曝露を行なった動物群（G4）では肺胞壁細胞のアポトーシスが有意に抑制されていた。一方、肺組織の好中球数、マクロファージ、CD4+T リンパ球数、CD8+T リンパ球数については GGA の影響はみられなかった。

さらに生後 8 週齢の雄性 Sprague-Dawley 系ラットを溶媒（アラビアゴム液）を経口投与して溶媒（CMC 液）を皮下注射する群（G1）、GGA 200mg/kg を経口投与して溶媒（CMC 液）を注射する群（G2）、溶媒を経口投与して Vascular endothelial growth factor (VEGF) 阻害薬 SU5416 (2mg/kg、カルビオケム社) を皮下注射する群（G3）、GGA を経口投与して SU5416 を皮下注射する群（G4）に分けた。VEGF 受容体阻害薬喫煙させて溶媒を投与する群（G3）及び喫煙させて GGA 200mg/kg を投与する群（G4）に分けた。GGA または溶媒（アラビアゴム液）の経口投与は 3 週間連日行ない、SU5416 または溶媒（CMC）の皮下注射は 1 週間ごとに 3 回行なった。SU5416 の皮下注射とともに GGA を経口投与したラットでは SU5416 とともに溶媒のみを経口投与した群に比べて、肺胞壁間平均距離の増大が 62%抑制され、肺胞腔内容積比率の増加が 85%減少していた。さらに GGA の経口投与は、SU5416 による肺血管内皮細胞の細胞死を有意に抑制す

ることが示された。

以上の結果から、GGA の経口投与は炎症には影響せずに、肺胞細胞の死を抑制することにより喫煙曝露による肺気腫の発症を予防することが示された。。
以上の結果から、GGA の経口投与はモルモットやラットにおける肺気腫の発症を予防することが示された。

研究組織

研究代表者：青柴和徹（東京女子医科大学医学部講師）

研究分担者：亀山伸吉（東京女子医科大学医学部助手）

交付決定額（配分額）

（金額単位：千円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 17 年度	1,900,000	0	1,900,000
平成 18 年度	1,500,000	0	1,500,000
平成 年度			
平成 年度			
平成 年度			
総計	3,400,000	0	3,400,000

研究発表

(1) 学会誌等

1. 青柴和徹 COPD の発症メカニズム 呼吸器疾患 state of arts ver.5 医学のあゆみ 別冊:18-19, 2007
2. 青柴和徹 肺胞細胞のアポトーシスの病因論的意義 COPD の発症メカニズム 日本臨床 65:629-632, 2007
3. 青柴和徹 病態形成における肺胞の役割 慢性閉塞性肺疾患-最近の動向 最新医学 62:30-35, 2006.
4. 青柴和徹 COPD におけるアポトーシスと関連する遺伝子異常 日胸 65:12:1064-1069, 2006.
5. 青柴和徹 呼吸器疾患に対する日本人の遺伝的的感受性 The Lung perspective 14: 383-386, 2006
6. 青柴和徹 COPD の研究の動向 医学のあゆみ 218:1019-1022, 2006
7. 永井厚志、青柴和徹、近藤光子、玉置淳 COPD : 病態形成機序の解明と治療法の開発 最新医学 61(2):306-336;2006.
8. 青柴和徹 肺気腫進展におけるアポトーシスの役割 呼と循 54(1):21-25, 2005
9. Tsuji T, Aoshiha K, Nagai A. Alveolar cell senescence in pulmonary emphysema patients. Am J Respir Crit Care Med 174: 886-893, 2006

(2) 口頭発表

1. Aoshiha K, Nagai A. An antiulcer drug geranylgeranylcyesteine inhibits alveolar cell death by enhancing heat shock protein expression. 2005 American Thoracic Society Conference 2005. 5. 22. San Diego
2. 青柴和徹 肺胞細胞の細胞死と老化 COPD の病因と病態-気道病変から肺胞病変まで- 第 45 回日本呼吸器学会総会シンポジウム 2005.4.16 千葉

(3) 出版物 なし

研究成果による工業所有権の出願・取得 なし

Heat shock protein誘導薬を用いたCOPDに対する新しい治療法の開発

はじめに

COPD をもたらす肺胞病変は肺胞の慢性・進行性の破壊・消失により特徴づけられる肺気腫である。その成因については 40 年前に提唱されたプロテアーゼ・抗プロテアーゼ不均衡説が信じられてきたが、私どもはこれまでの研究から細胞死が肺気腫の機序に重要であることを明らかにしてきた。すなわち 1) 気腫肺では肺胞上皮細胞や肺血管内皮細胞の細胞死が増加していること¹、2) 動物肺に細胞死を誘導すると気腫病変が生じること²、3) 気腫肺では修復のための細胞増殖も亢進していること¹、4) 修復が充分に行われない原因として喫煙刺激とテロメアの短縮による細胞老化が関与すること³を見いだした。以上の研究成績から私どもは肺気腫の新しい発症機序として「細胞死と老化仮説」を提唱した (図 1)。この仮説に基づけば、肺胞細胞の防御 (細胞死の抑制) が肺気腫に対する新たな予防・治療法の標的になるものと考えられる。

細胞死を防御する重要な蛋白質は喫煙や酸化ストレスなどにより誘導される heat shock proteins (HSPs) である。例えば喫煙刺激を受けた細胞では HSPs が誘導されて細胞死から防御する作用のあることが知られている。一方、近年の研究成績では日本において 1984 年から広く使用されている胃粘膜保護薬 Geranylgeranylacetone (GGA) が HSPs の発現を特異的に誘導することにより胃酸、活性酸素、虚血、エタノールなどによる細胞死 (アポトーシス、ネクロー

シス) を強力かつ広範囲に防御することが明らかにされている。そこで私どもは GGA が肺胞細胞の HSPs を誘導することにより、喫煙曝露による細胞死と肺気腫の発症を抑制するのではないかと考えて *in vitro* および *in vivo* の実験を行った。

対象と方法

1. 細胞実験

ヒト正常肺胞上皮細胞 (ScienCell 社) およびヒト細小肺血管内皮細胞 (Clonotech 社) を subconfluent 密度まで培養し、 10^{-8} - 10^{-5} M濃度の GGA (エーザイより供与) に 6 時間前処理したのち、GGA を除去してタバコ煙濃縮液 (0.01 - 1%)、過酸化水素 (0.2 - 1 mM)、増殖因子欠乏培地、anoikis 刺激 (細胞接着阻害プレートに培養) に曝露した。2 - 24 時間後に細胞を回収し、アラマーブルーアッセイ法 (細胞死)、ヘキスト 33342 核染色法 (アポトーシス)、カスパーゼ-3 活性測定 (アポトーシス)、LDH 遊離率の測定 (ネクローシス)、トリパンブルーアッセイ法 (ネクローシス) を用いて細胞死に対する抑制効果を定量評価した。また HSP-60、70、90 の蛋白質発現をウエスタンブロッティング法により確認した。HSP 発現のコントロールとして 42°C、15 分間温熱処理をした細胞を用いた。

2. 動物実験

1) 喫煙肺気腫モデル

生後 4 週齢の雄性 Hartley 系モルモットを無処置で溶媒 (アラビアゴム液)

を経口投与する群 (G1)、同じく無処置で GGA 200mg/kg (エーザイより供与) を経口投与する群 (G2)、喫煙させて溶媒を投与する群 (G3) 及び喫煙させて GGA 200mg/kg を投与する群 (G4) に分けた。G3 及び G4 のモルモットに対しては、毎週 5 回 (月～金曜日)、10 週間喫煙させた。G1 及び G3 に対しては GGA の媒体を、G2 及び G4 に対しては GGA 200mg/kg を毎喫煙前に強制経口投与した。喫煙曝露の方法としては、モルモットを 10 角形のアクリル製固定器に中央のチャンバーに頭部だけを出して固定し、両切りタバコ Peace (タール 29mg、ニコチン 2.5mg、日本タバコ社) の煙をポンプでチャンバー内に送り込み、タバコ煙を吸入させた。タバコ煙を約 10 分間 (タバコ 1 本分) 曝露した後、チャンバー内に煙が充満した状態で 20 分間放置した。これを 1 日に連続 10 回 (5 時間) 繰り返した。喫煙曝露の終了後、肺組織を摘出し、左肺を 10%ホルマリン液を用いて 25 cm 水柱圧にて肺を拡張固定した。その後 3 μ m の薄切切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施し通常の方法を用いて形態計測を行なった。右肺については O.C.T.コンパウンドを気管内に注入して肺を拡張した後凍結固定し、3 μ m の薄切切片を作製した。

2) VEGF 阻害肺気腫モデル

生後 8 週齢の雄性 Sprague-Dawley 系ラットを溶媒 (アラビアゴム液) を経口投与して溶媒 (CMC 液) を皮下注射する群 (G1)、GGA 200mg/kg を経口投与して溶媒 (CMC 液) を注射する群 (G2)、溶媒を経口投与して Vascular endothelial growth factor (VEGF) 阻害薬 SU5416 (2mg/kg、カルビオケム社) を皮下注射する群 (G3)、GGA を経口投与して SU5416 を皮下注射する群 (G4) に分けた。

VEGF 受容体阻害薬喫煙させて溶媒を投与する群 (G3) 及び喫煙させて GGA 200mg/kg を投与する群 (G4) に分けた。GGA または溶媒 (アラビアゴム液) の経口投与は 3 週間連日行ない、SE5416 または溶媒 (CMC) の皮下注射は 1 週間ごとに 3 回行なった。その後肺組織を摘出し、10%ホルマリン液を用いて 25 cm 水柱圧にて肺を拡張固定した。その後 3 μ m の薄切切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施して形態計測を行なった。

3. Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling

(TUNEL) 染色

ホルマリン固定したパラフィン切片に市販のキット (Takara In Situ Apoptosis Detection Kit、タカラ社) を用いて TUNEL 染色を施した。TUNEL 陽性細胞をジアミノベンチジン反応により可視化したのち、単位肺胞壁長あたりの陽性細胞数を測定した。

4. 免疫組織化学染色

一次抗体として、抗 single-stranded DNA (ssDNA) 抗体 (ダコ社)、抗サイトケラチン抗体 (シグマ社)、抗断片化サイトケラチン抗体 (M30、アレキシス社)、抗モルモット CD4+ T リンパ球抗体 (セロテック社)、抗モルモット CD8+ T リンパ球抗体 (セロテック社)、抗モルモットマクロファージ抗体 (セロテック社)、抗好中球エラスターゼ抗体 (サンタクルズ社) を用いた。抗サイトケラチン抗体、抗 ssDNA 抗体、抗断片化サイトケラチン抗体についてはパラフィン包埋切片を用い、抗 CD4+ T リンパ球抗体、抗 CD8+ T リンパ球抗体、抗

マクロファージ抗体、抗好中球エラスターゼ抗体については凍結切片を用いた。二次抗体にはペルオキシダーゼ結合またはアルカリフォスファターゼ結合抗 IgG 抗体 (Envision、ダコ社) を用い、ジアミノベンチジン溶液または NBT/BCIP 溶液を用いて陽性細胞を可視化した。その後、単位肺胞壁長あたりの陽性細胞数を測定した。抗 ssDNA 抗体で染色した標本については、抗サイトケラチン抗体を用いて二重染色を行なった。

5. 統計解析

エクセル統計を用いて多群間の比較を行なった。すなわち一元配置分散分析 (ANOVA) 法により解析したのちに、Tukey-Kramer 法による Post-hoc 解析を行なった。 $p < 0.05$ のときに有意差ありと判定した。

結果

1. 細胞実験

ヒト正常肺胞上皮細胞およびヒト細小肺血管内皮細胞に GGA を曝露すると 10^{-6} M 以上の濃度で HSP-60、70、90 の蛋白質発現を増強させた (図 2)。さらに喫煙刺激、活性酸素 (過酸化水素)、増殖因子欠乏 (VEGF など)、anoikis による細胞死 (アポトーシス、ネクローシス) を濃度依存性に抑制した (図 3)。

2. 動物実験

1) 喫煙肺気腫モデル

G1 群 (溶媒のみ) と G2 群 (GGA のみ) は $n = 8$ 、G3 群 (溶媒 + 喫煙) と

G4 群 (GGA + 喫煙) は $n = 10$ で実験を開始した。10 週間の実験期間中に、G2 群のうち 1 匹が GGA の気管内誤挿入のために死亡した。また G3 群のうち 5 匹、G4 群の 3 匹が喫煙曝露中または直後に死亡した。

10 週間喫煙曝露したモルモットでは、肺胞径の拡大 ($Lm: 79.4 \pm 1.4 \mu\text{m}$ vs. $54.9 \pm 0.6 \mu\text{m}$ for untreated animals, $p < 0.01$)、肺胞表面積の減少 ($Sa/Lv: 504.0 \pm 8.9 \text{ cm}^{-1}$ vs. $726.1 \pm 7.6 \text{ cm}^{-1}$ for untreated animals, $p < 0.01$)、肺胞内容積比率 ($V_{\text{valv.air}}: 84.2 \pm 0.4\%$ vs. $78.3 \pm 0.5\%$ for untreated animals, $p < 0.01$) の増加を伴う気腫病変が形成された (図 3)。喫煙曝露と同時に GGA を経口投与したモルモットでは喫煙曝露とともに溶媒のみを経口投与した群に比べて、肺胞径の拡大 ($70.2 \pm 0.8 \mu\text{m}$, $p < 0.01$)、肺胞表面積の減少 ($570.0 \pm 6.4 \text{ cm}^{-1}$, $p < 0.05$) および肺胞内容積比率の増加 ($81.3 \pm 0.3\%$, $p < 0.01$) が有意に改善した。以上の結果から、GGA は喫煙曝露による気腫病変の発症を抑制することが明らかにされた。

GGA による喫煙曝露肺気腫の抑制機序を検討するために、肺胞細胞の細胞死を評価した。喫煙曝露したモルモットでは、喫煙を曝露していない動物に比べて TUNEL 染色陽性 (アポトーシス) 肺胞細胞、ssDNA 陽性 (アポトーシスおよびネクローシス) 肺胞細胞、断片化サイトケラチン陽性 (アポトーシス) 肺胞上皮細胞が有意に増加していた (図 4)。喫煙による肺胞細胞の細胞死の増加は、GGA の経口投与により有意に抑制された (図 4)。一方、喫煙曝露により肺胞領域のマクロファージ、好中球および CD8+ T リンパ球数が有意に増加したが、GGA の経口投与による影響はみられなかった (図 5)。以上の結果から、GGA は喫煙による肺の炎症には影響しないが、肺胞細胞の細胞死を防御することにより肺気腫の発症を予防するものと考えられた。

2) VEGF 受容体阻害肺気腫モデル

VEGF 受容体阻害剤 (SU5416) の皮下注射により肺胞血管内皮細胞にアポトーシスが生じると肺気腫病変が形成されることが報告されている。本研究で VEGF 受容体阻害剤 (SU5416) を 1 週間ごとに 3 回皮下注射したラットにおいても、肺胞径の拡大 (Lm: $60.8 \pm 1.6 \mu\text{m}$ vs. $51.8 \pm 1.3 \mu\text{m}$ for untreated animals、 $p < 0.01$)、肺胞表面積の減少 (Sa/Lv: $660.3 \pm 15.9 \text{ cm}^{-1}$ vs. $775.0 \pm 19.2 \text{ cm}^{-1}$ for untreated animals、 $p < 0.01$)、肺胞内容積比率 (Vvalv.air: $78.8 \pm 0.9\%$ vs. $72.9 \pm 0.3\%$ for untreated animals、 $p < 0.01$) の増加を伴う気腫病変が形成された (図 6)。SU5416 の皮下注射とともに GGA を経口投与したラットでは SU5416 とともに溶媒のみを経口投与した群に比べて、肺胞径の拡大 ($55.2 \pm 0.8 \mu\text{m}$ 、 $p < 0.01$)、肺胞表面積の減少 ($724.7 \pm 11.3 \text{ cm}^{-1}$ 、 $p < 0.05$) および肺胞内容積比率の増加 ($73.8 \pm 0.8\%$ 、 $p < 0.01$) が有意に改善した。さらに GGA の経口投与は、SU5416 による肺血管内皮細胞の細胞死を有意に抑制することが示された (図 7)。以上の結果から、GGA は VEGF 阻害薬による気腫病変の発症を抑制することが明らかにされた。

考案と結論

本研究の成績から、1) GGA は HSPs を誘導して肺胞上皮細胞や血管内皮細胞のアポトーシスやネクローシスを抑制すること、2) 動物に連日経口投与すると喫煙や血管内皮細胞のアポトーシスによる肺気腫の発症が 38%抑制されること、3) 肺気腫の抑制効果は抗炎症効果ではなく、肺胞細胞の防御効果によ

ることが明らかにされた。この成績は細胞死の抑制が COPD に対する新しい治療戦略になりうることを示している。GGA は日本で開発された胃粘膜保護薬であり、すでに 20 年におよぶ使用経験が得られている。高齢者の慢性疾患である COPD の治療薬には、薬剤としての有効性とともにより 1) コンプライアンス（経口薬が望ましい）、2) 安全性、3) 経済性（廉価）の要件が必要であるが、GGA は過去の使用経験からこれらの要件を満たす薬剤と考えられる。肺胞細胞の防御という新しい観点から既存の薬剤を応用することにより、早期に臨床実用化が可能な COPD の治療法を開発できる可能性が考えられた。

参考文献

1. Yokohori N, Aoshiba K, Nagai A: Increased levels of cell death and proliferation in alveolar wall cells in patients with pulmonary emphysema. *Chest* 2004; 125: 626-32.
2. Aoshiba K, Yokohori N, and Nagai A. Alveolar wall apoptosis causes lung destruction and emphysematous changes. *Am J Respir Mol Cell Biol* 2003; 28: 555-562.
3. Tsuji T, Aoshiba K, Nagai A. Cigarette smoke induces senescence in alveolar epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004; 31: 643-649.
4. Kasahara Y, Tuder RM, Taraseviciene-Stewart L, Le Cras TD, Abman S, Hirth PK, Waltenberger J, Voelkel NF. Inhibition of VEGF receptors causes lung cell apoptosis and emphysema. *J Clin Invest* 2000; 106:1311-1319.

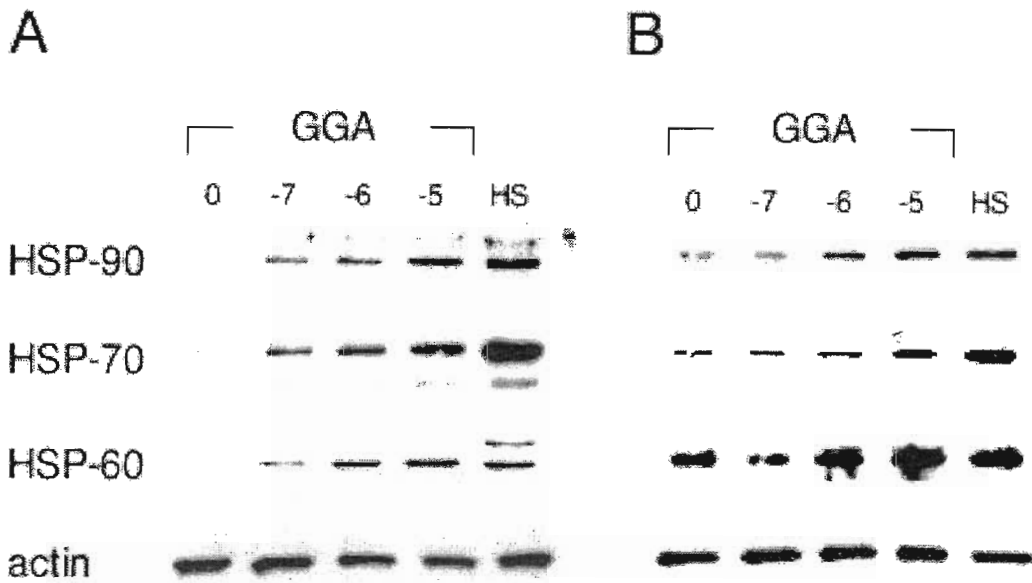


図1 GGAによるHSPの発現誘導。ヒト肺微小血管内皮細胞(A)またはヒト正常II型肺胞細胞(B)を培養し、GGA(10^{-7} ~ 10^{-5} M)を6時間曝露または42°C、15分間の温熱曝露ののちに、HSP-60、HSP-70、HSP-90の発現をウエスタンブロッティング法により解析した。

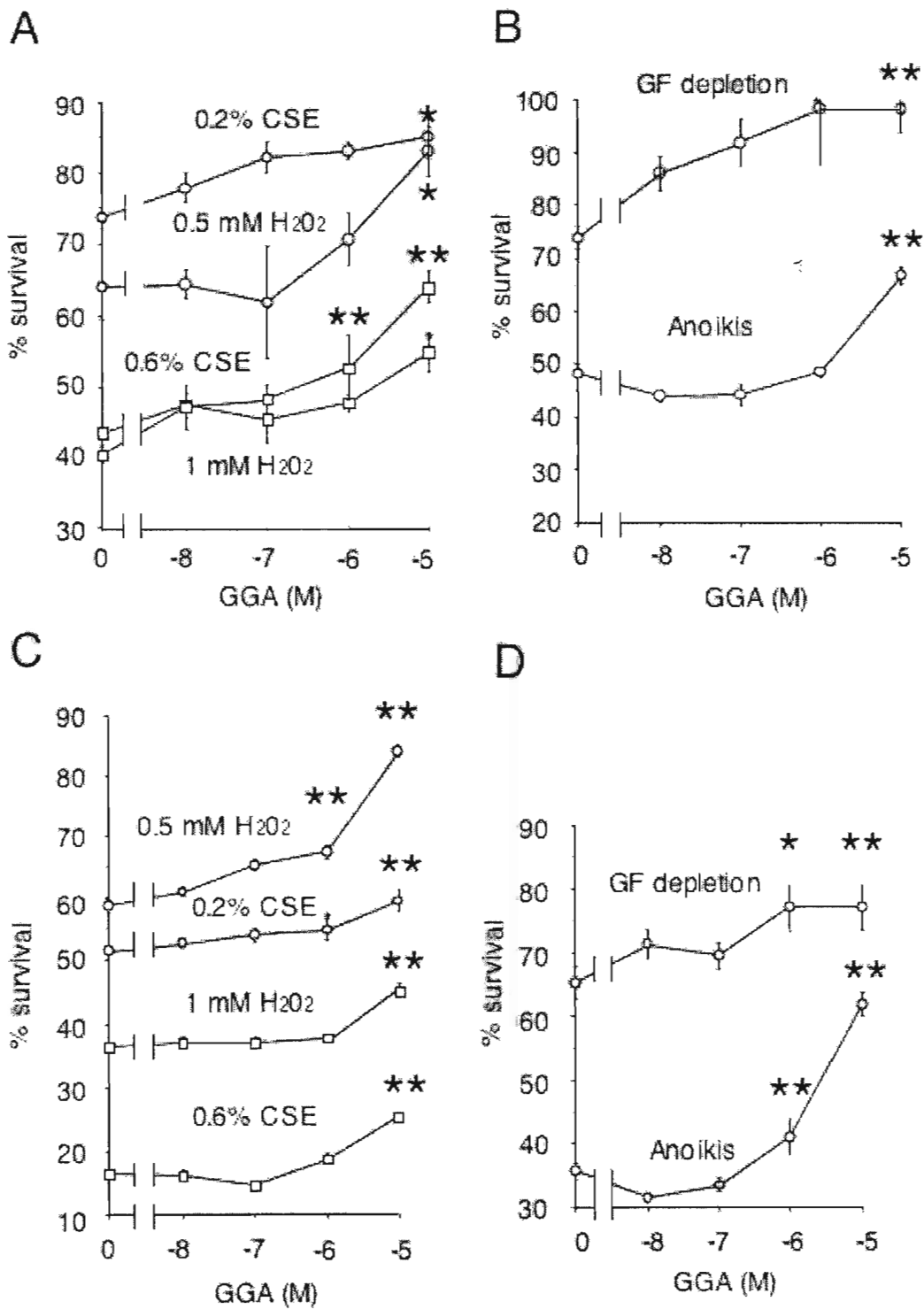


図2 GGAによる細胞死の抑制。ヒト正常II型肺胞細胞(A、B)またはヒト肺微小血管内皮細胞(C、D)を培養し、溶媒またはGGA(10⁻⁸ ~ 10⁻⁵M)を添

加後、細胞傷害性刺激[0.2%または0.6%喫煙濃縮(CSE)液、0.5 mMまたは1 mM H₂O₂ 溶液、細胞増殖因子欠乏培地、anoikis 刺激]を加え、24 時間後の細胞生存率をアラマーブルーアッセイ法により測定した。* P < 0.05, ** P < 0.01 vs. cells not treated with GGA。

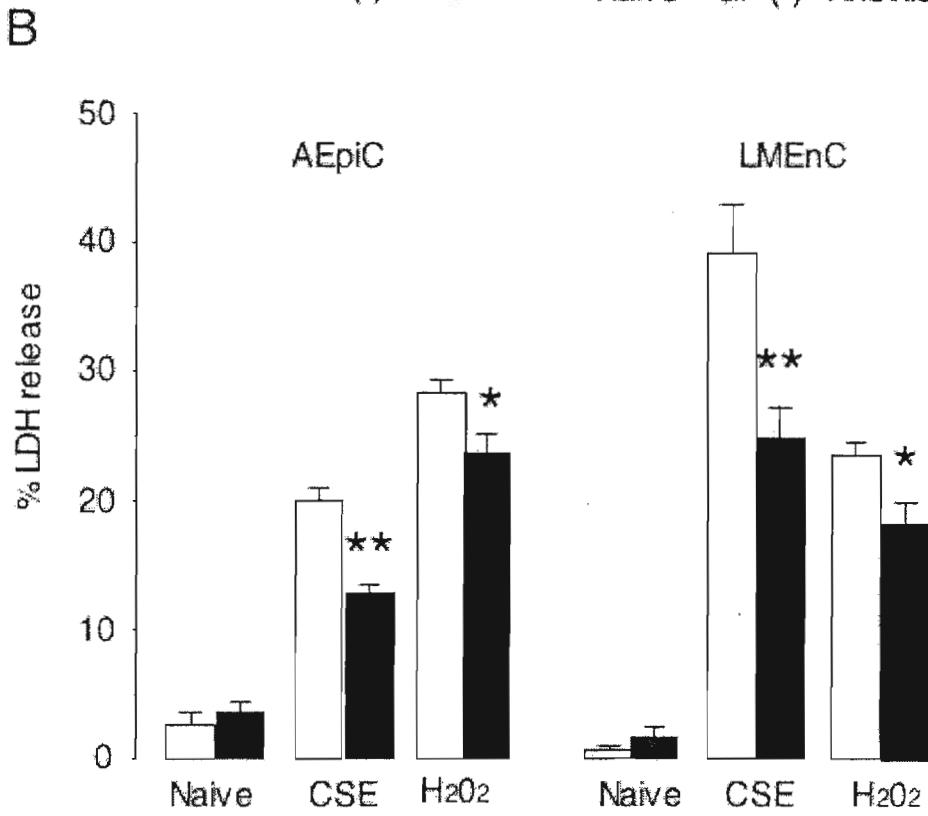
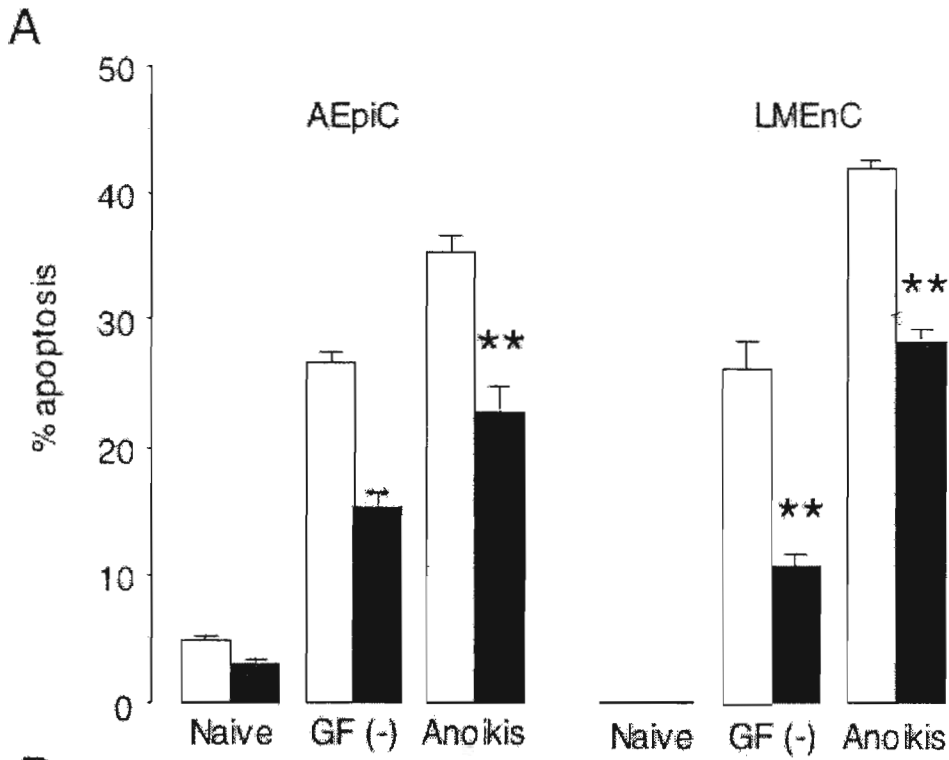


図3 GGAによるネクローシスとアポトーシスの抑制。ヒト正常II型肺胞細胞 (AEpiC) またはヒト肺微小血管内皮細胞 (LMEnC) を培養し、溶媒 (open bars) または 10^{-5} M GGA (closed bars) を添加後、細胞傷害性刺激 (0.2% CSE 溶液、 H_2O_2 溶液、細胞増殖因子欠乏培地、anoikis 刺激) を加えた。24 時間後に細胞をヘキスト 33342 溶液を用いて核染色を行ない、アポトーシス細胞の割合を数えた。また上清中の LDH を測定し、ネクローシスの指標とした。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. cells not treated with GGA。

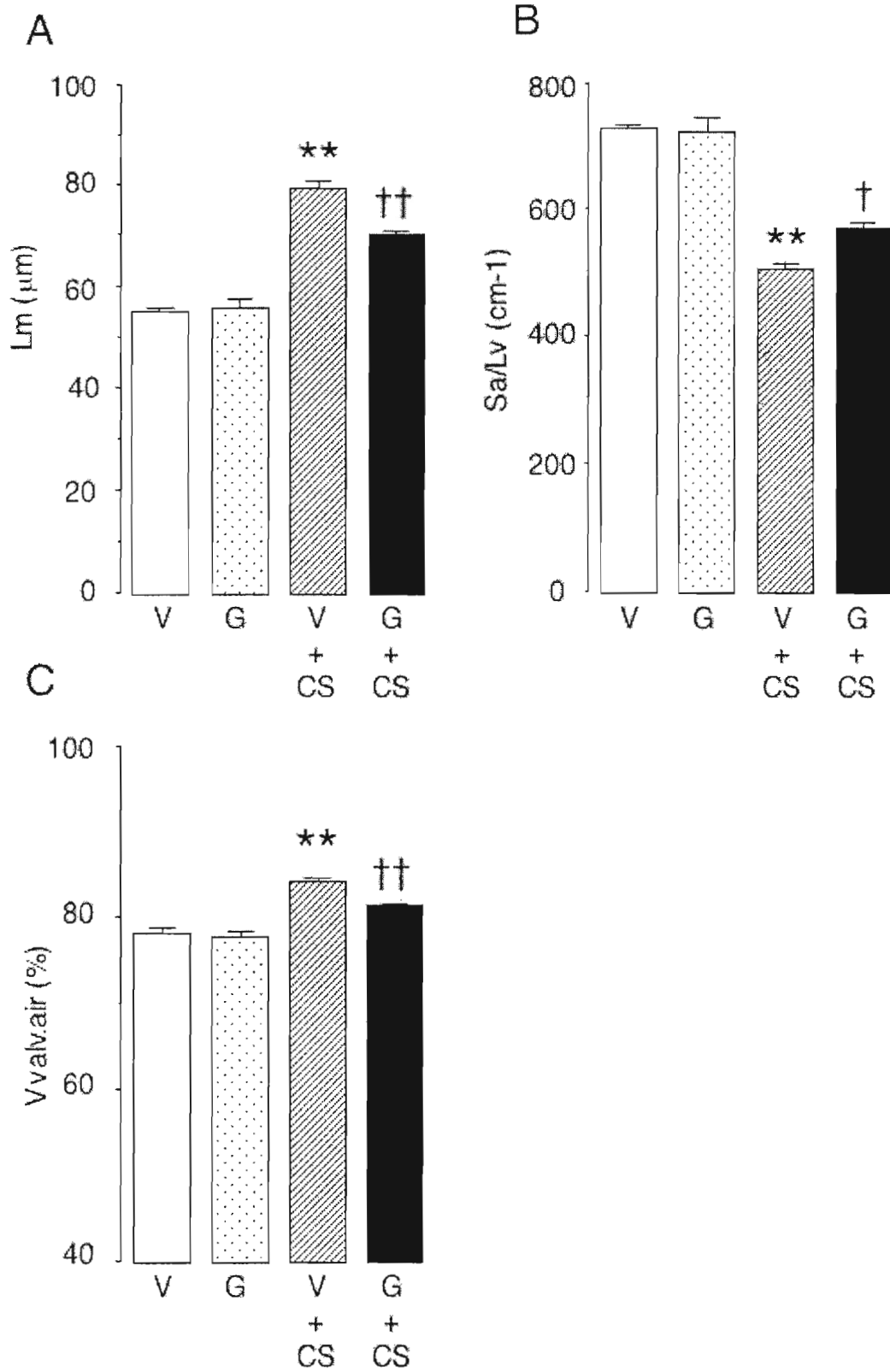


図4 喫煙曝露肺気腫に対するGGAの抑制効果。V：溶媒を経口投与した群

(G1：n=9)；G：GGAを経口投与した群(G2：n=8)；V+CS：溶媒を経口投与して喫煙曝露した群(G3：n=5)；G+CS：GGAを経口投与して喫煙曝露した群(G4：n=7)。^{**} P<0.01 vs. G1、[†] P<0.05、^{††} P<0.01 vs. G3。Lm：Mean linear intercepts (肺胞壁間平均直線距離)、Sa/Lv：Surface area/Lung volume (肺容積あたりの肺胞表面積)、V_{alv.air}：Volume fraction of alveolar air (肺胞腔内容積比率)。

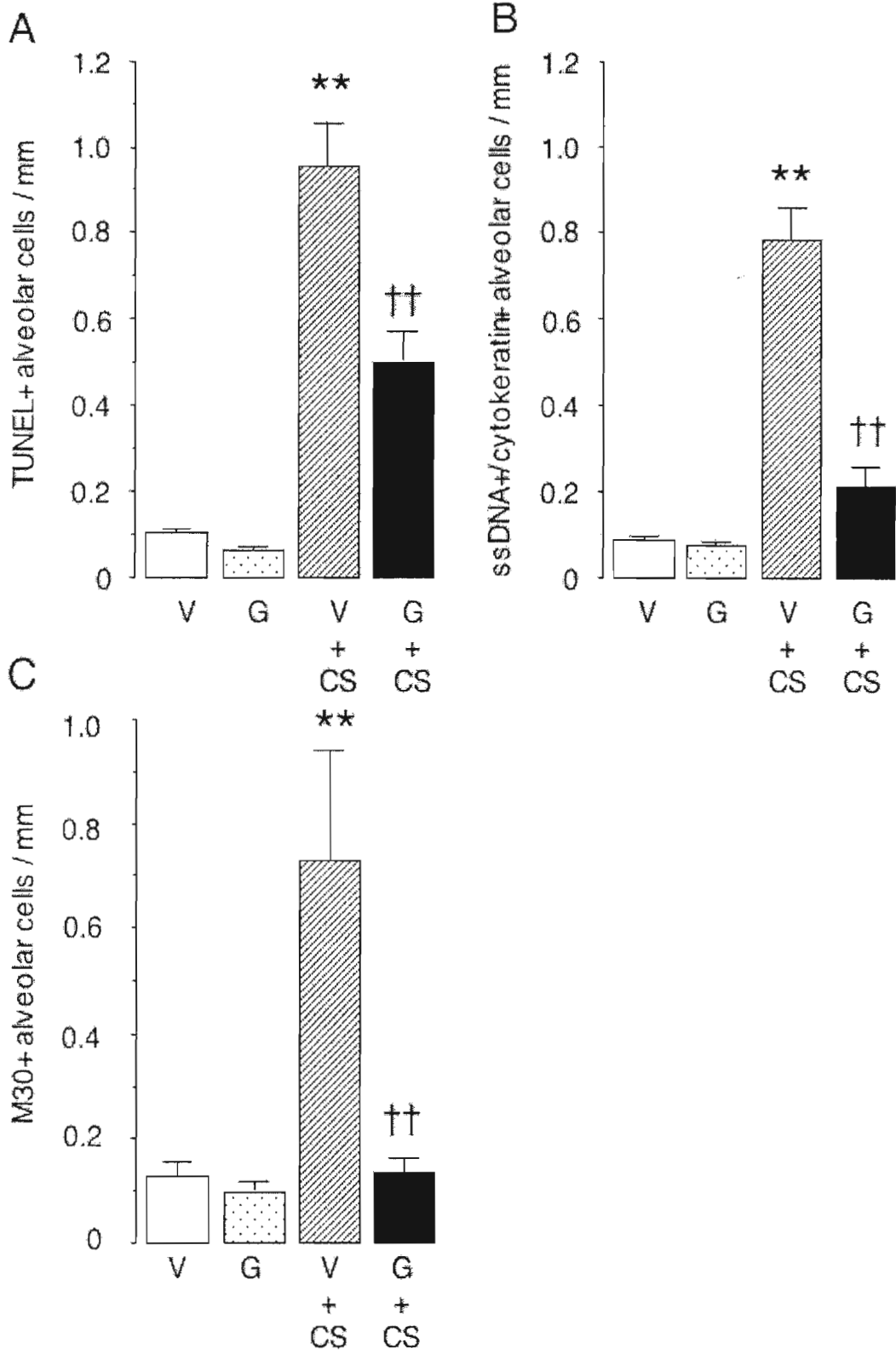


図5 喫煙曝露肺気腫における肺胞細胞死に対するGGAの抑制効果。A：TUNEL陽性肺胞細胞数；B：ssDNA陽性肺胞上皮細胞数；C：M30陽性肺胞上皮細胞数。V：溶媒を経口投与した群（G1：n=9）；G：GGAを経口投与した群（G2：n=8）；V+CS：溶媒を経口投与して喫煙曝露した群（G3：n=5）；G+CS群（G4：n=7）。** P<0.01 vs. G1、†† P<0.01 vs. G3。

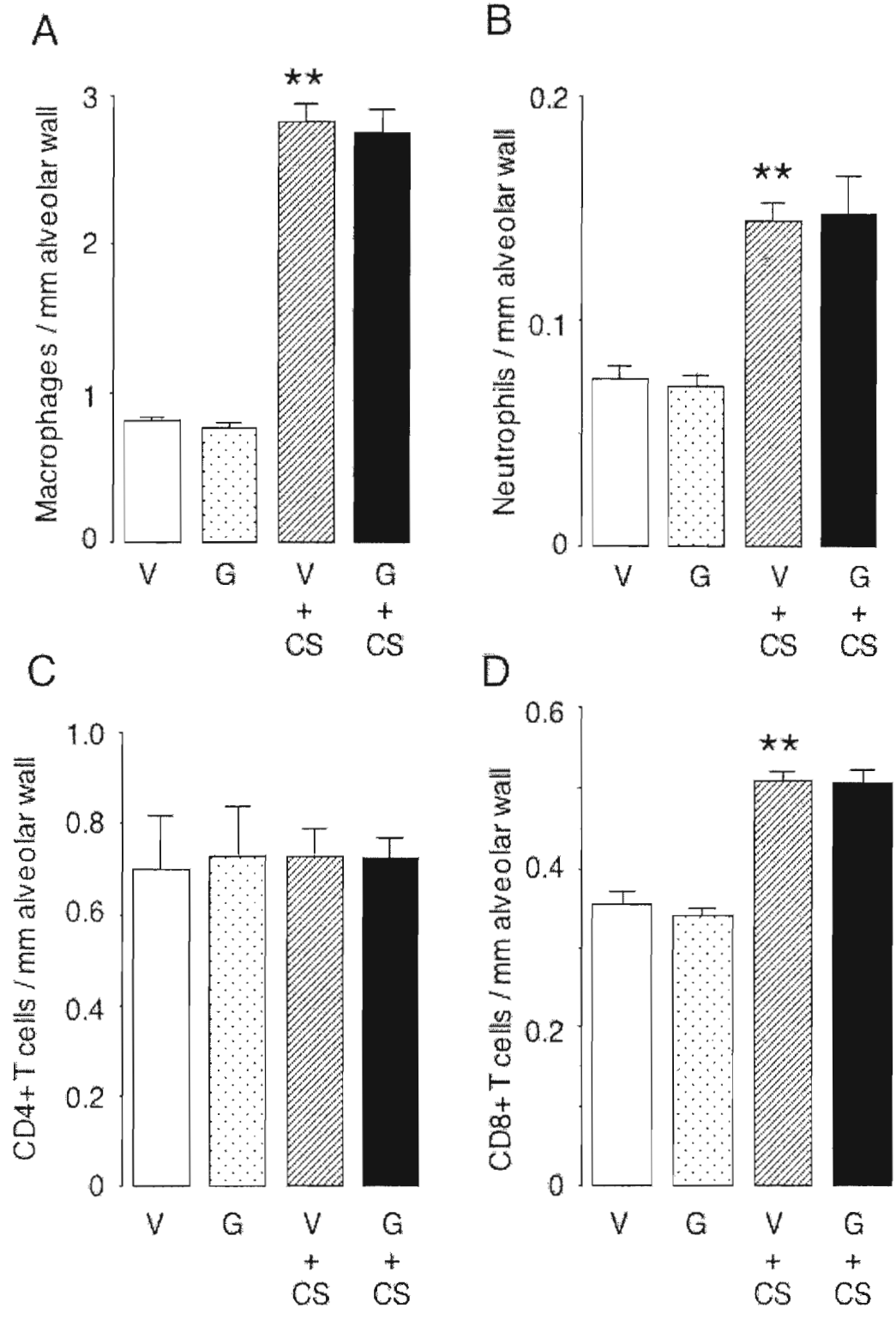


図6 喫煙曝露肺気腫における肺胞の炎症細胞浸潤に対するGGAの影響。A：肺胞マクロファージ；B：好中球；C：CD4陽性Tリンパ球；D：CD8陽性Tリンパ球。V：溶媒を経口投与した群（G1：n=9）；G：GGAを経口投与した群（G2：n=8）；V+CS：溶媒を経口投与して喫煙曝露した群（G3：n=5）；G+CS群（G4：n=7）。**P<0.01 vs. G1。

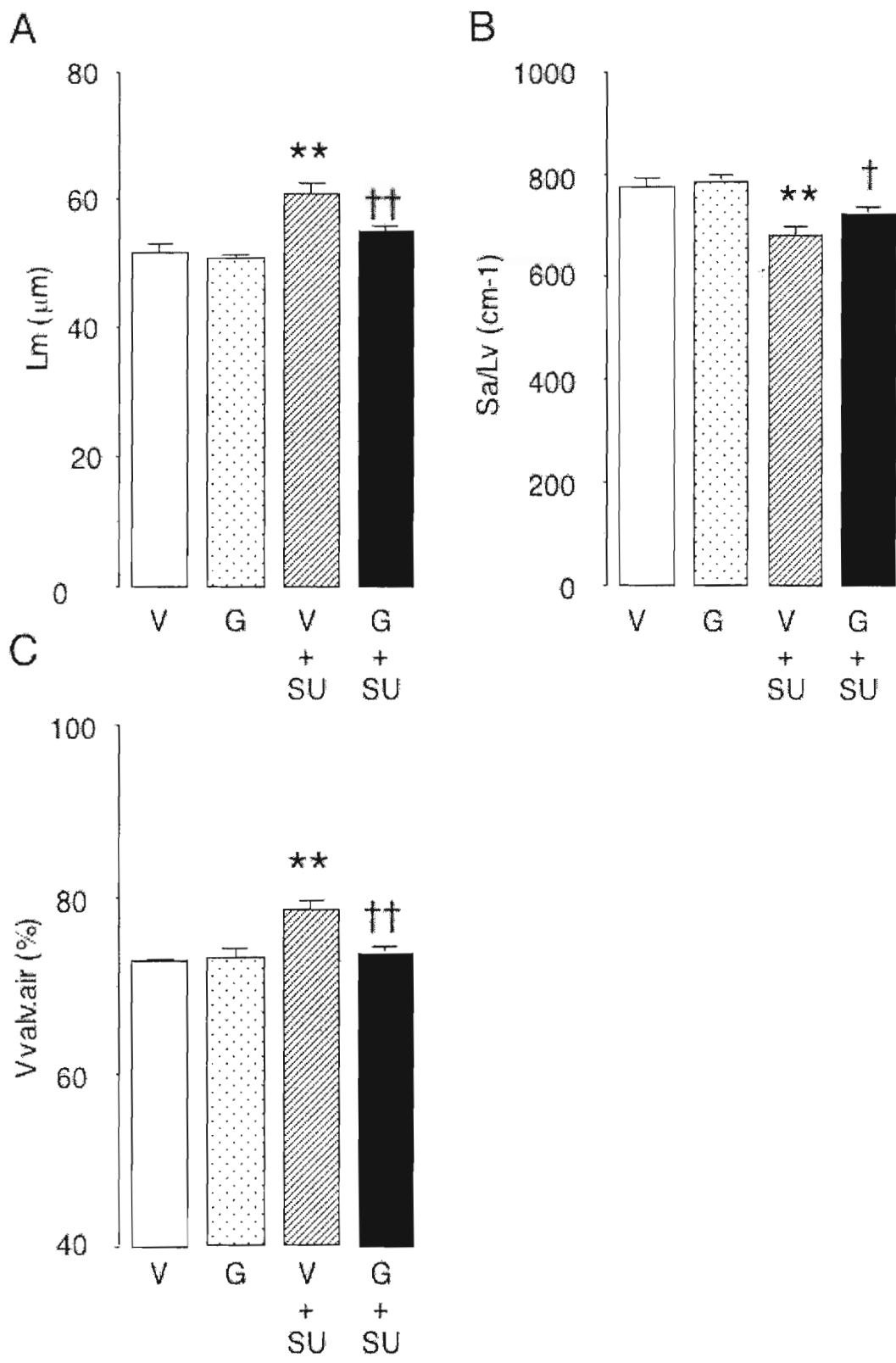


図7 VEG受容体阻害肺気腫に対するGGAの抑制効果。V: 溶媒を経口投与および皮下注射した群 (G1: n = 7); G: GGAを経口投与して溶媒を皮下注射した群 (G2: n = 7); V + SU: 溶媒を経口投与してSU5416を皮下注射した群 (G3: n = 7); G + SU: GGAを経口投与してSU5416を皮下注射した群 (G4: n = 7)。
** P < 0.01 vs. G1、† P < 0.05、†† P < 0.01 vs. G3。Lm: Mean linear intercepts (肺胞壁間平均直線距離)、Sa/Lv: Surface area/Lung volume (肺容積あたりの肺胞表面積)、V_{valv.air}: Volume fraction of alveolar air (肺胞腔内容積比率)。

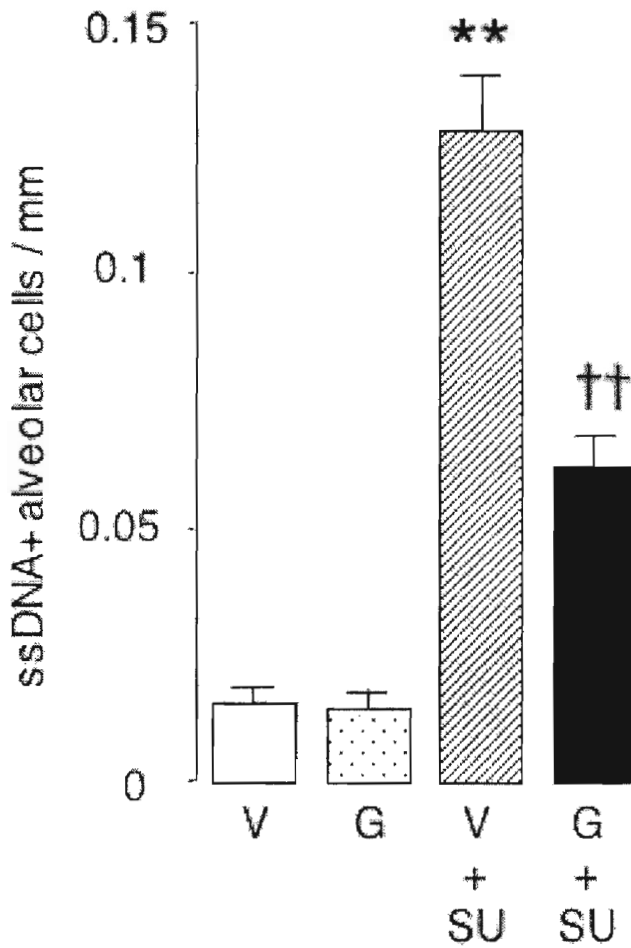


図8 VEG 受容体阻害肺気腫における肺胞細胞死に対する GGA の抑制効果。

V : 溶媒を経口投与および皮下注射した群 (G1 : n = 7) ; G : GGA を経口投与して溶媒を皮下注射した群 (G2 : n = 7) ; V + SU : 溶媒を経口投与して SU5416 を皮下注射した群 (G3 : n = 7) ; G + SU : GGA を経口投与して SU5416 を皮下注射した群 (G4 : n = 7)。 ** P < 0.01 vs. G1、† P < 0.05、†† P < 0.01 vs. G3。