急性冠症候群における酸化LDLと Fas-Fas Ligand伝達系アポトーシスの関与

今西　敏雄　　財田　滋穂　　羽野　卓三　　西尾　一郎

要　旨：急性冠症候群のプラーク破裂の要因として，プラークの線維性被膜の構成成分である血管平滑筋細胞のアポトーシスに着目し，検討した。実験的研究により，酸化LDLは，血管平滑筋細胞のプロテアソーム活性を低下させることにより，細胞表面のFas蛋白の発現を増強させ，Fas誘導アポトーシスの感受性を高めることを明らかにした。また，臨床的研究により，可溶型および膜型Fas ligand（FasL）はともに，急性冠症候群において増強していることを明らかにした。
（J Jpn Coll Angiol, 2005, **45**: 919–927）

Key words: Fas, apoptosis, vascular smooth muscle cell, oxidized LDL

はじめに

線維性被膜（fibrous cap）の脆弱化あるいは不安定化は，細胞外マトリックスの分解，血管平滑筋細胞の細胞外マトリックスの産生障害，血管壁障害後の血管平滑筋細胞の増殖能の障害，血管平滑筋細胞の細胞死（アポトーシス）等が原因であると想定されている。われわれはFas-Fas ligand（FasL）のシグナル伝達系を介するアポトーシスに着目し，研究を進めてきた。

Fas誘導アポトーシスは，粥状動脈硬化，移植グラフトおよび血管炎といったさまざまな血管病変の形成に関連していると報告されている[1~4]。しかしながら，多くの場合FasL（あるいはagonisticな作用を有するFas抗体）は単独では血管平滑筋細胞にアポトーシスを誘発できず，蛋白合成阻害剤であるサイクロヘキサマイドあるいは転写合成阻害剤であるアクチノマイシンD存在下でのみ細胞障害性を有する[2,5]。したがって，われわれはFasL刺激に対するアポトーシスの感受性を高める，何らかのsensitizing factorが存在するのではないかと仮説した。その因子の一つとして粥状動脈硬化の形成において重要な役割を果たす酸化low density lipoprotein（LDL）に着目した。今回，実験的研究ではFas誘導アポトーシスの感受性における酸化LDLの関与について検討した。また，Fas誘導アポトーシスの臨床的意義を明らかにするために，急性冠症候群患者におけるFasLの動態についてもみた。

和歌山県立医科大学循環器内科

方　　法

(1)実験的研究

1．細胞培養

ヒト胎児血管平滑筋細胞（human vascular smooth mustle cells: hVSMC）は城野先生（大阪市立大学）の厚意により提供していただき，培養液〔Dulbecco's modified eagle's medium（DMEM）+ 10% fetal bovine serum（FBS）〕下で10cmプレートを用いて培養した。ヒト臍帯静脈血管内皮細胞（HUVECs）はClonetics社（San Diego, CA, USA）より購入した。培養液は2% FBS, 10 ng/ml human epithelial growth factor, 1.0 μg/ml hydrocortisone, 12 μg/ml bovine brain extractを含むendothelial cell growth medium（EGM）を用いた。hVSMCは7～10継代，HUVECsは3～5継代のものを用いた。無血清の培地で24時間培養したhVSMCおよびHUVECsに，agonisticな作用を有するFas抗体（CH11；モノクローナル抗Fas抗体，MBL，Nagoya, Japan），酸化LDL，z-VAD.fmk（Idun Pharmaceutical, San Diego，CA，USA），プロテアソーム活性阻害剤であるMG132を組み合わせて24時間作用させた。

2004年11月18日受付　　2005年5月2日受理

2．cell death ELISA法

細胞質に遊離するヒストン結合DNA断片をenzyme-linked immunosorbent assay（ELISA）法を用いて検出し，アポトーシスの程度を定量的に評価した。最初にヒストンに対する抗体をマイクロプレートに吸着させた。次にバッファーで洗浄後，200μlのインキュベーション用緩衝液で30分間コーティングし，引き続き洗浄後におのおののサンプル（1×10^4 cell分の細胞質分画）を100μl加え，室温にて90分間反応させた。洗浄後に基質溶液を加え，15分間ブレードシェイカーで反応させ，吸光光度計（405nmの吸光度で測定）を用いてアポトーシスの程度を定量評価した。

3．フローサイトメトリー法

種々の濃度の酸化LDLにより処置した培養血管平滑筋細胞を0.5% FBS入りのDMEM培養液にて6時間培養し，1×10^5の細胞をトリプシン溶液にて分離させた。その後fluorescein isothiocyanate（FITC）ラベリングしたFasに対するモノクローナル抗体（Alexis Biochemicals, San Diego, USA）を作用させ， FACS caliber system（Becton Dickinson, Moutain View, CA, USA）により解析した。細胞表面のFasの発現量はフローサイトメトリー法によるFITCの蛍光強度を定量化し，コントロール細胞との蛍光強度の比率を算出した。

4．LDLの分離および酸化処理

LDLは正常ヒトの血漿から超遠心法を用いて回収した。血漿を得た後，EDTA（100μmol/ml）とゲンタマイシン（2滴）を加えた。蛋白濃度はLowry変法を用いて測定した。LDL（native LDL（nLDL）；比重1.019～1.063g/ml）は臭化ナトリウムを用いて超遠心法（65,000回転×4時間20分×3回）で分離・回収した。透析カラム（Bio-Rad, Hercules, CA, USA）を用いてnLDLからEDTAを取り除いた後，硫酸銅を5μmol/lの濃度で添加し，37°C，16時間インキュベーションすることにより酸化処理を行った。16時間後にEDTAを再度加えることにより酸化処理を停止させた。その後phosphate buffered saline（PBS）を用いて24時間透析を行うことにより酸化LDLを得た。LDL酸化の程度はアガロース電気泳動によりnLDLに比し 2～3 倍の速さで泳動されることにより確認した。

5．プロテアソーム活性

酸化LDLが，培養血管平滑筋細胞において，ユビキチン－プロテアソーム系にどのように影響するかをみた。プロテアソーム活性は20Sプロテアソーム活性を測定した（20S Proteasome Assay Kit; Boston Biochem, Cambridge, MA, USA）。種々の濃度の酸化LDL（20，50，100μg/ml）を培養血管平滑筋細胞に添加し，細胞抽出液を経時的に調整し，合成蛍光基質（sLLVY-MCA）を用い，蛍光マルチプレートリーダー（Fluoroscan Ascent：Labsystems, Franklin, MA, USA）でプロテアソーム活性を半定量的に測定した。

6．western blotting

ヒト単核球を免疫複合体で16時間刺激し，刺激前後の単核球および培養上清より蛋白を抽出した。蛋白の濃度は，Pierce BCA Reagents（Pierce, Rockland, IL, USA）を用いて測定した。その後，sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis（SDS-PAGE）により電気泳動を施行し，polyvinylidene fluoride（PVDF）膜に転写した。FasLの同定は，マウスモノクローナル抗体no.33（anti-human FasL IgG_1, Transduction Laboratories, Lexington, KY, USA）を用い，enhanced chemiluminescence（ECL）substrate（Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA）により検出した。

（2）臨床的研究

2003年3月より2004年1月に当院に入院した，不安定狭心症および急性心筋梗塞症例，いわゆる急性冠症候群（ACS群；15名），安定狭心症群（SAP群；15名）を対象とした。急性心筋梗塞の定義は，① 持続する胸痛，② ECG上のST上昇，③ 正常上限の2倍以上のCPK上昇，の3条件を満たすものとした。不安定狭心症の定義は，新しく発症した狭心症あるいは次第に発作の頻度・程度が増強する狭心症，とした。年齢・性をマッチングさせた冠動脈疾患のない10症例を対照（control群）とした。末梢血の採血は，ACS群は救急搬送時に，SAP群およびcontrol群は入院時に施行し，EDTA2Na入採血管にて7ml採血した。一方，ヒト単核球はHistopaque 1077（Sigma, St. Louis, MO, USA）を用いた密度勾配遠心法により抽出した。ヒト単核球における膜型FasLはCD14（単核球を認識）抗体およびFasLに対する抗体を用いたフローサイトメトリー法により測定した。

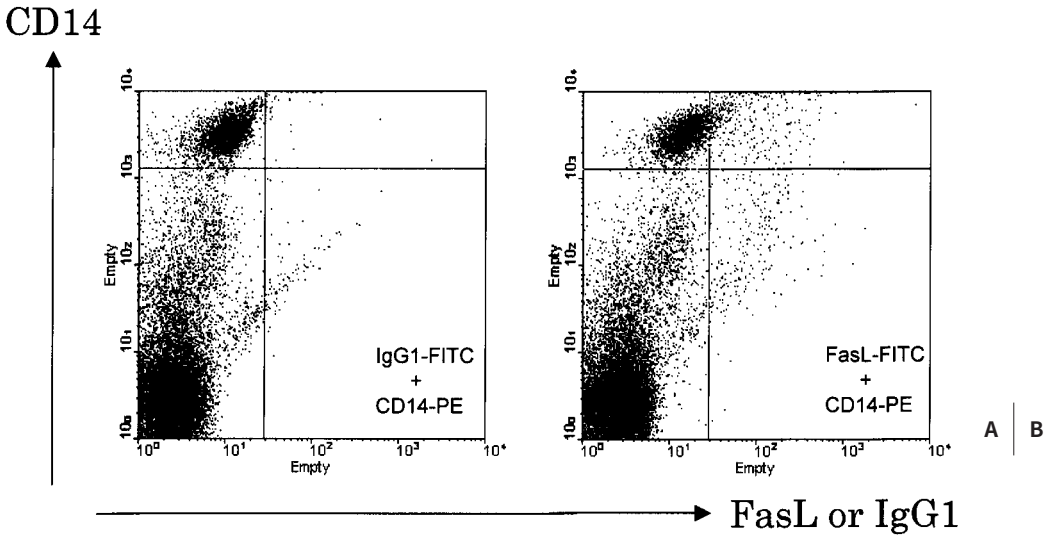

Figure 1　Measurement of membrane FasL on monocyte by using flowcytometry. Double staining of FITC-conjugated IgG1 and PE-conjugated CD14 (A). Double staining of FITC-conjugated FasL and PE-conjugated CD14 (B).

各群における単核球の膜型FasLはCD14陽性細胞に対するFasL陽性細胞の割合で算出した(**Fig. 1**)。一方，可溶型FasLおよび膜型FasLの病態的意義を明らかにするために，その発現調節機序についてみた。すなわち，ヒト単核球を免疫複合体で刺激し，刺激前後の可溶型FasLおよび膜型FasLの発現を解析した。未処理の単核球より得た培養上清，免疫複合体で活性化した単核球の培養上清，単核球，活性化単核球および陽性コントロールとしてJurkat cellに対してFasL抗体を用いたwestern blotting法を施行した。次に，活性化単球および活性化単球の培養上清によるhVSMCへのアポトーシス誘導効果をみた。活性化単球によるhVSMCに対するアポトーシス誘導効果は，hVSMCを^{51}Crでラベリングした後，活性化単球とhVSMCを24時間，共培養し，培養上清に遊離する^{51}Cr量を評価した。このアッセイによるキャリブレーションは，15% FBS下で培養したhVSMCおよび24 時間以内に100%アポトーシスを誘導するスタロスポリン(Sigma)により処置したhVSMCを用いて，施行した。活性化単球の培養上清によるhVSMCへのアポトーシス誘導効果は，単球を免疫複合体で刺激し，24時間後に得た培養上清をhVSMCに添加し，Hoechst 33342(4μg/ml)を用いた核染色により評価した。

結　果

(1)実験的研究

1. 培養血管平滑筋細胞におけるFas蛋白の発現

Fas受容体は白血球をはじめとして多くの細胞に発現していることが報告されている。今回われわれが用いた第 7 および第10継代のhVSMCに対して，Fasに対するポリクローナル抗体を用いたwestern解析を行い，Fas蛋白の発現をみた。第 7 継代および第10継代ともに同程度にFas蛋白が発現していた(**Fig. 2**)。

2. Fas誘導アポトーシスに対するプロテアソーム活性阻害剤(MG132)の効果

Fasはユビキチン・プロテアソーム系により蛋白分解を受けることが報告されている。したがって，われわれは培養血管平滑筋細胞におけるFas誘導アポトーシスの感受性とユビキチン・プロテアソーム系との関連をみた。プロテアソーム活性阻害剤(MG132)を用いてFas誘導アポトーシスへの影響をみたところ，agonisitic Fas抗体(CH11)単独と比較して，プロテアソーム活性阻害剤を同時に作用させた場合，プロテアソーム活性阻害剤の濃度依存性に有意にアポトーシスが誘導された(**Fig. 3**)。

3．酸化LDLがプロテアソーム活性に及ぼす効果

プロテアソーム活性は，分光蛍光光度計（spectrofluorophotometer）を用いて測定した。培養血管平滑筋細胞において，酸化LDLは濃度依存性にプロテアソーム活性を低下させた（**Fig. 4**）。

4．酸化LDLによるFas誘導アポトーシスの感受性に及ぼす効果

酸化LDL，CH11，z-VAD.fmk添加による培養血管平滑筋細胞へのアポトーシス誘導効果について，アポトーシス検出法であるTUNEL染色法により評価した。酸化LDLを単独に作用させた場合と比較し，CH11を同時に投与することによりTUNEL陽性細胞は増加した。この効果はカスパーゼ阻害剤であるz-VAD.fmkにより抑制された。さらに，cell death ELISA法を用いて，DNA fragmentationの程度をみることによりアポトーシスの定量評価を施行したところ，同様の結果を得た。すなわち，CH11あるいは酸化LDLを単独投与した場合，アポトーシスはコントロールと比較し変化しなかった。一方，両者を同時に作用させると有意にアポトーシスが誘導された。この効果はz-VAD.fmkにより抑制された（**Fig. 5**）。

（2）臨床的研究

1．ヒト単核球によるFasLの発現調節機序および培養血管平滑筋細胞のアポトーシス誘導効果

未処理の単核球より得た培養上清，免疫複合体で活性化した単核球の培養上清，単核球，活性化単核球および陽性コントロールとしてJurkat cellに対してFasL抗体を用いたwestern blotting法を施行した。活性化単核球の培養上清には可溶性FasLに相当する約30 kDaのバンドが検出されたのに対し，未処理の単核球の培養上清には存在しなかった。また膜型FasLに相当する約36 kDa

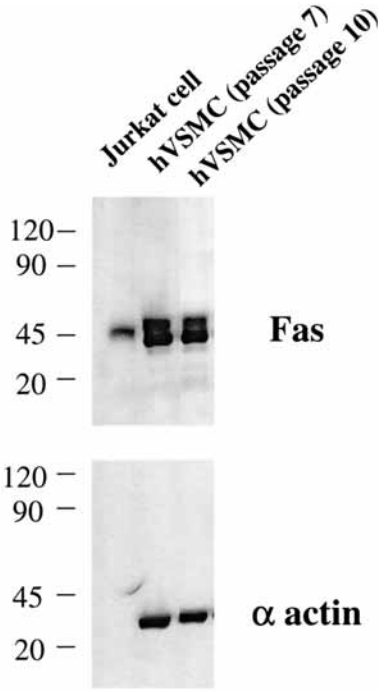

Figure 2　Fas protein expressions in cultured hVSMC.

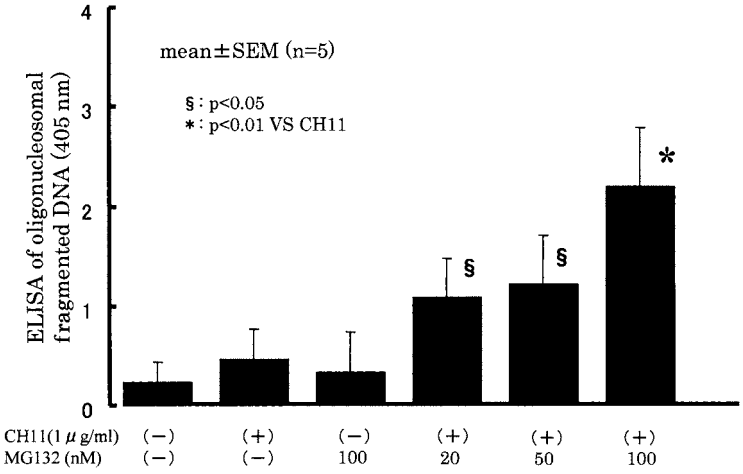

Figure 3　Effects of a proteasome inhibitor (MG132) on Fas-induced apoptosis.

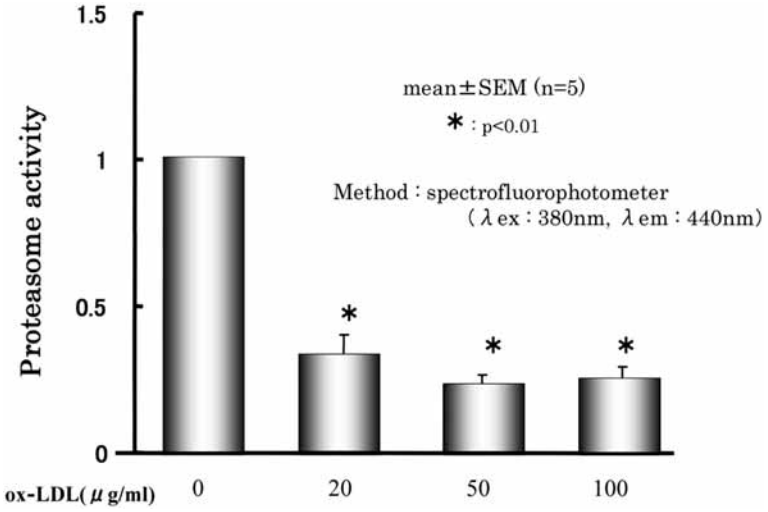

Figure 4　Effects of oxidized LDL on proteasome inhibitor.

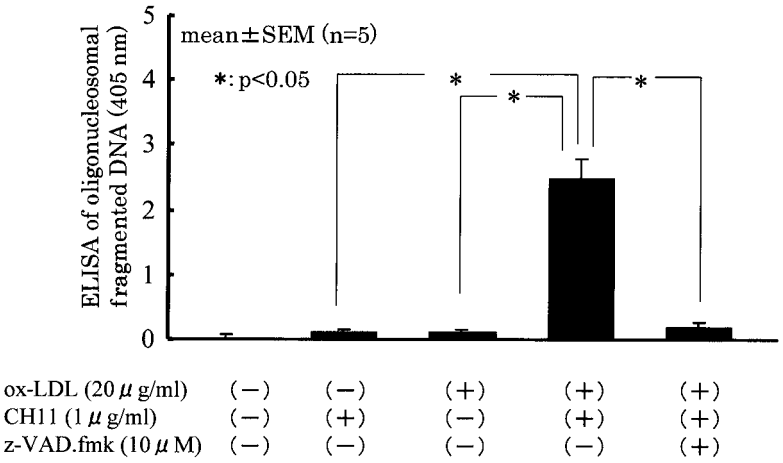

Figure 5　Effects of oxidized LDL on Fas-induced apoptosis in hVSMCs.

のバンドは未処理の単核球には検出されなかったのに対し，活性化単核球には検出された(**Fig. 6**)。以上の結果より，単核球は活性化されることにより，可溶型FasLを分泌するとともに膜型FasLを発現することを明らかにした。次に，活性化単核球および活性化単球の培養上清による培養血管平滑筋細胞のアポトーシス誘導効果をみた。活性化した単球とヒト培養血管平滑筋細胞を共培養したところ，活性化単球は培養血管平滑筋細胞に細胞死を誘導した。この効果はFas受容体レベルで拮抗作用を有するFas IgG1抗体により有意に抑制された。また，活性化した単球の培養上清は，同様に，ヒト培養血管平滑筋細胞にアポトーシスを誘導した。この効果はFas受容体レベルで抑制的に作用するFasFc融合蛋白やFas IgG1抗体あるいはカスパーゼ阻害剤であるz-VAD.fmkにより有意に抑制された(**Fig. 7**)。以上の結果より，マクロファージに発現しているFasLおよびマクロファージより産生される可溶型FasLは，少なくとも培養系において，血管平滑筋細胞にFas誘導アポトーシスを惹起することを明らかにした。

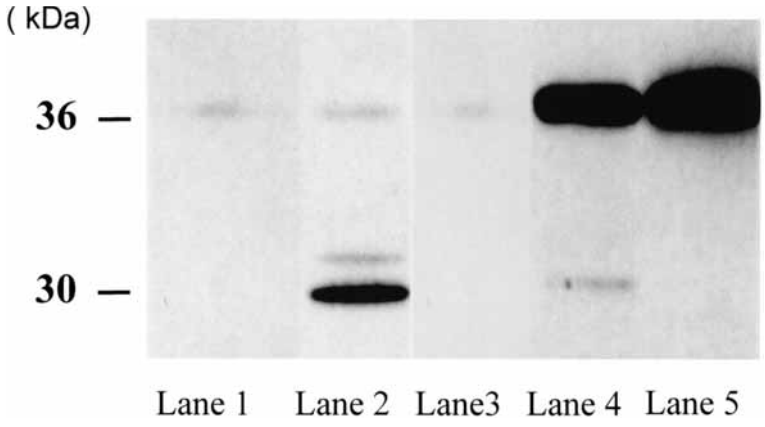

Figure 6 Western blot demonstrating soluble FasL release by activated monocytes. No release of soluble FasL could be detected in the supernatant from control, unactivated monocyte (lane 1) following the monoclonal antibody against FasL. In contrast, a 30 kDa protein is apparent in the culture medium of monocytes within 30 min of activation of immune complex (lane 2). Whole cell lysates of activated monocytes contain the 37 kDa FasL isoform (lane 4), whereas those of unactivated monocytes do not (lane 3). Lane 5 demonstrates positive control (Jurkat cell lysates).

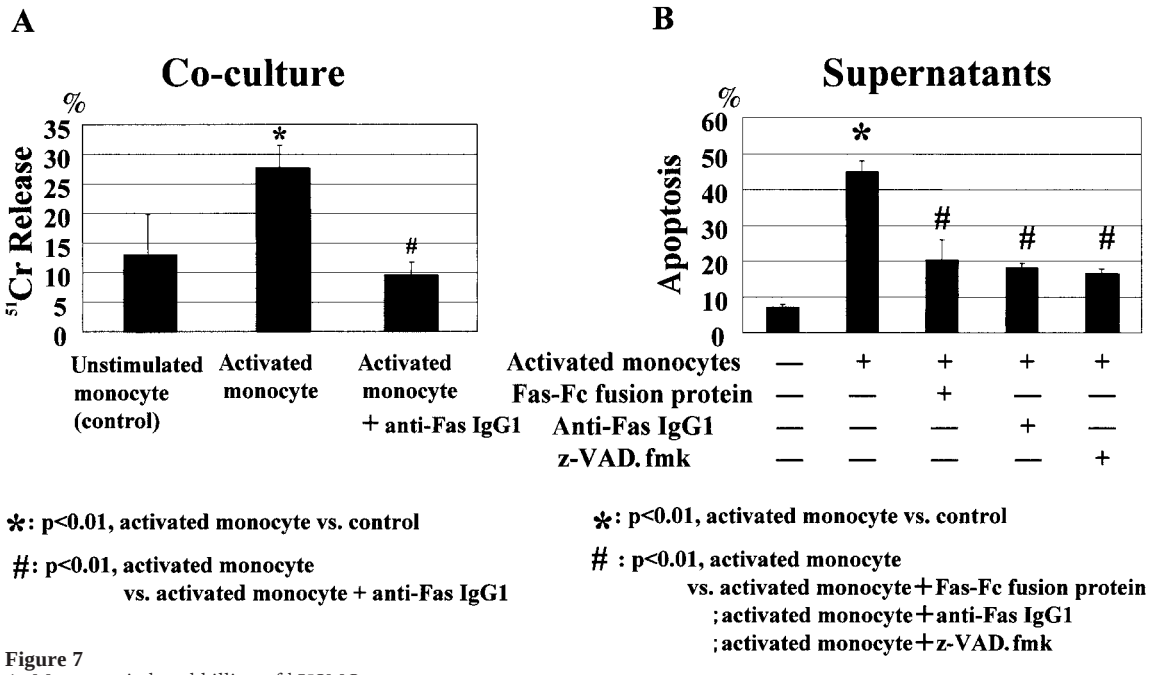

Figure 7
A: Monocyte induced killing of hVSMCs.
Monocytes were co-cultured with hVSMCs prelabeled with radiolabeled chromium. Immunne complex-activated monocytes increased in release of radiolabeled chromium. This increase of ^{51}Cr could be blocked by anti-Fas IgG1 ($p<0.01$). Unstimulated monocytes induced a modest increase in the release of ^{51}Cr. Error bars =±SEM and all experiments were repeated six times.
B: Supernatants from activated monocytes induce apoptosis in cultured VSMCs.
Supernatants from immune complex-activated monocytes stimulate apoptosis when added for 24 hours to VSMCs. The Fas-Fc fusion protein (Immunex, Seattle, WA, USA), anti-Fas IgG1 (Immunotech, Marseille, France), or Z-VAD-fmk, pre-incubated with the monocyte supernatant, produced a significant decrease of apoptosis ($p<0.01$). Cell death was measured by Hoechst 33342 staining. Error bars =±SEM and all experiments were repeated six times.

Table 1　Clinical background

	Control (n=15)	SAP (n=15)	ACS (n=15)
Age	68±8	68±12	71±12
Men/women	7/8	8/7	9/6
Hypertension	1	9	10
Smoking	3	6	8
Diabetes mellitus	0	3	3
Hyperlipidemia	0	6	5

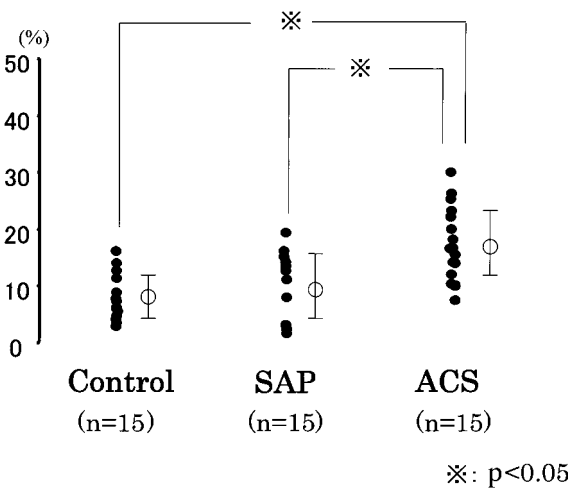

Figure 8　Soluble FasL is up-regulated in patients with acute coronary syndrome.

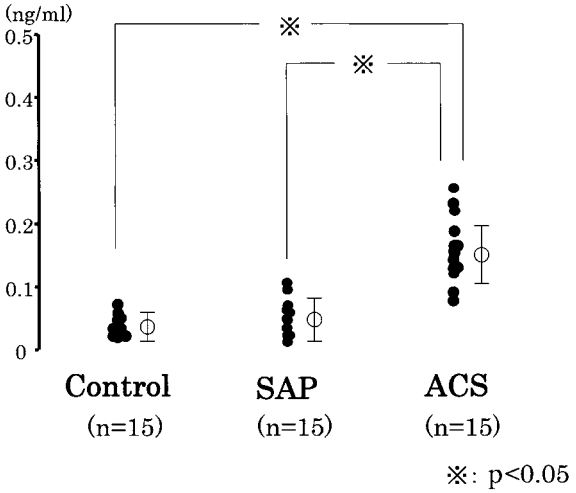

Figure 9　Membrane FasL is up-regulated in patients with acute coronary syndrome.

2.　急性冠症候群における可溶型FasLおよび膜型FasLの動態

control群，安定狭心症群，および急性冠症候群の 3 群の患者背景を**Table 1** に示す。control群に比し，安定狭心症群および急性冠症候群は冠動脈危険因子，すなわち高血圧症，喫煙，糖尿病，および高脂血症の罹患率が高い傾向にあった。可溶型FasLは，control群および安定狭心症群に比し，急性冠症候群で有意に高値であった(**Fig. 8**)。また，末梢血中の単球における膜型FasLは，同様に，control群および安定狭心症群に比し，急性冠症候群で有意に高値であった(**Fig. 9**)。興味深いことに，可溶型FasLと膜型FasLとの間には相関がみられなかった。これは両者が異なった調節因子により制御されていることを示唆している。以上の結果より，Fas-FasLシグナル伝達系を介するアポトーシスは，複数の機序を介し，急性冠症候群の病態と関連していると考えられた。

考　察

粥状動脈硬化プラークの形成や血管形成術後の再狭窄病変内の細胞にアポトーシスが生じることが報告されている[6]。病変の主要構成成分である血管平滑筋細胞ばかりでなく，浸潤マクロファージやT細胞にもアポトーシスが生じる[7]。また，粥状動脈硬化プラーク摘出標本で血管内皮細胞のアポトーシスが高頻度に検出されることも最近報告された[8]。Bennettらは，冠動脈硬化プラーク由来の培養血管平滑筋細胞は正常冠動脈由来の培養血管平滑筋細胞と比較してアポトーシス

を起こしやすいことを明らかにした[9]。

興味深いことに，破裂プラークの粥状動脈硬化病変は高頻度のアポトーシスを有すると報告されている[9]。これらの知見より粥状動脈硬化病変における血管平滑筋細胞のアポトーシスを原因として，周辺細胞の密度が疎となり，プラークの不安定化と破裂が生じ，急性冠症候群の一因となる説が提唱されている[9]。しかしながら，FasLおよびagonisticな作用を有するFas抗体は，それぞれ単独では血管平滑筋細胞にアポトーシスを誘導できず，蛋白合成阻害剤であるサイクロヘキサマイドや転写合成阻害剤であるアクチノマイシンD存在下でのみ細胞障害性を有する，という点が解決すべき問題として残されていた。

今回の研究において，酸化LDLは培養血管平滑筋細胞のプロテアソーム活性を濃度依存性に低下させることが明らかになった。一方，プロテアソーム活性阻害剤はFas誘導アポトーシスの感受性を高めた。これらの結果より，酸化LDLはプロテアソーム活性を低下させることにより，Fas誘導アポトーシスの感受性を高めるものと推察された。また，われわれは，急性心筋梗塞あるいは不安定狭心症患者の血中において，可溶型FasLおよび膜型FasLの両者が増加していることも明らかにした。この結果は，Fas伝達系を介するアポトーシスが急性冠症候群の病態と関連している可能性を示唆するものと思われる。興味深いことに，可溶型FasLと膜型FasLとの間には相関がみられず，両者を調節する因子が異なることによると推察された。可溶型FasLは，メタロプロテアーゼが膜型FasLの一部を切断することにより末梢血中を循環する，と報告されている[10]。一方，膜型FasLは炎症細胞の活性化に伴いアップレギュレートされることを今回われわれは明らかにした。以上より，可溶型FasLと膜型FasLの発現様式に関連がみられなかったことの詳細な機序は不明であるが，急性冠症候群の不安定プラーク内におけるメタロプロテアーゼおよび炎症細胞の活性化の時間的および空間的差異が原因の一つであると推察された。また，今回の研究において，アポトーシスが冠動脈プラークの破裂にどの程度寄与しているかについては不明のままである。また，FasLおよびマクロファージより産生される可溶性FasLは，少なくとも培養系において血管平滑筋細胞にFas誘導アポトーシスを引き起こすことを今回の研究でわれわれは明らかにした。炎症性サイトカインは，血管平滑筋細胞におけるFasの発現を増強させ，FasLに対する感受性を亢進させる。粥状動脈硬化巣においてさまざまな炎症細胞の浸潤を認める。その炎症性細胞の大部分は活性化されたものであり，FasLと同時に炎症性サイトカインを豊富に発現している。したがって，培養系において認められたFas誘導アポトーシスは粥状動脈硬化巣においても働いている可能性が高いものと推察される。また，今回はFas誘導アポトーシス以外のアポトーシス調節機構について検討しなかった。今後，粥状動脈硬化病変におけるアポトーシスの関与を遺伝子レベルで解明することが，動脈硬化に対する新しい診断および治療法の開発に貢献するものと考えられる。

結論と総括

Fas-FasLシグナル伝達系の発現およびアポトーシスの誘導効果におけるユビキチン・プロテアソーム系の関与について，培養血管平滑筋細胞および培養血管内皮細胞を用いて検討した。またFas-FasLシグナル伝達系を介するアポトーシスの臨床的意義についても検討した。結果は以下のようにまとめられる。

(1)実験的研究

1．培養血管平滑筋細胞および培養血管内皮細胞において，ユビキチン・プロテアソーム系はFas誘導アポトーシスの感受性に関与していた。すなわち，プロテアソーム活性低下による細胞表面Fasの発現増強がFas誘導アポトーシスの感受性獲得に関与していた。

2．粥状動脈硬化の発生および進展に主要な役割を担う酸化LDLは，培養血管平滑筋細胞あるいは培養血管内皮細胞において，プロテアソーム活性を低下させることにより，Fas誘導アポトーシスの感受性を増強させた。

(2)臨床的研究

1．可溶型FasLおよび末梢血中の単球における膜型FasLは，control群および安定狭心症群に比し，急性冠症候群において有意に高値であった。

2．可溶型FasLと膜型FasLとの間には相関がみられなかった。これは両者を調節する因子が異なることによると推察された。

以上より，Fas-FasLシグナル伝達系を介する血管構

成細胞のアポトーシスの誘導は，少なくとも培養系において，ユビキチン・プロテアソーム系により調節されていることが明らかになった。またFas-FasLシグナル伝達系は急性冠症候群の病態に関連している可能性が示唆された。

文　献

1) Cai W, Devaux B, Schaper W et al: The role of Fas/APO 1 and apoptosis in the development of human atherosclerotic lesions. Atherosclerosis, 1997, **131**: 177–186.
2) Geng YJ, Henderson LE, Levesque EB et al: Fas is expressed in human atherosclerotic intima and promotes apoptosis of cytokine-primed human vascular smooth muscle cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997, **17**: 2200–2208.
3) Dong C, Wilson JE, Winters GL et al: Human transplant coronary artery disease: pathological evidence for Fas-mediated apoptotic cytotoxicity in allograft arteriopathy. Lab Invest, 1996, **74**: 921–931.
4) Bjorkerud S, Bjorkerud B: Apoptosis is abundant in human atherosclerotic lesions, especially in inflammatory cells (macrophages and T cells), and may contribute to the accumulation of gruel and plaque instability. Am J Pathol, 1996, **149**: 367–380.
5) Imanishi T, Hano T, Nishio I et al: Transition of apoptotic resistant vascular smooth muscle cells to troptotic sensitive state is correlated with downregulation of c-FLIP. J Vasc Res, 2000, **37**: 523–531.
6) Fukuo K, Nakahashi T, Nomura S et al: Possible participation of Fas-mediated apoptosis in the mechanism of atherosclerosis. Gerontology, 1997, **43 (Suppl 1)**: 35–42.
7) Walsh K, Smith RC, Kim HS: Vascular cell apoptosis in remodeling, restenosis, and plaque rupture. Circ Res, 2000, **87**: 184–188.
8) Kockx MM, De Meyer GR, Muhring J et al: Apoptosis and related proteins in different stages of human atherosclerotic plaques. Circulation, 1998, **97**: 2307–2315.
9) Bennett MR, Evan GI, Schwartz SM: Apoptosis of human vascular smooth muscle cells derived from normal vessels and coronary atherosclerotic plaques. J Clin Invest, 1995, **95**: 2266–2274.
10) Tanaka M, Suda T, Haze K et al: Fas ligand in human serum. Nat Med, 1996, **2**: 317–322.

Effects of Oxidized LDL on Fas-mediated Apoptosis in Human Vascular Smooth Muscle Cells

Toshio Imanishi, Shigeho Takarada, Takuzo Hano, and Ichiro Nishio

Department of Cardiovascular Medicine, Wakayama Medical University, Wakayama, Japan

Key words: Fas, apoptosis, vascular smooth muscle cell, oxidized LDL

The characteristic atherosclerotic lesion consists of a necrotic core contained within a fibrous capsule comprising vascular smooth muscle cells (VSMCs). Ultimate failure of this capsule, the “fibrous cap”, plays an active part in causing plaque rupture. It has been well known that Fas-mediated apoptosis is a feature of atherosclerosis. Even though Fas-mediated signaling transduction is well-documented, the mechanisms for determining the Fas sensitivity of human VSMCs require further research. Our *in vitro* study revealed that cross-linking of the Fas receptor with the anti-Fas antibody in the presence of oxidized LDL (ox-LDL) induced DNA fragmentation in human VSMCs, which were blocked by the caspase inhibitor z-VAD.fmk, followed by the up-regulation of cell surface Fas. One of the mechanisms for ox-LDL up-regulating cell surface Fas works by inhibiting the degradation of Fas through the ubiquitin-proteasome pathway. Furthermore, clinical studies revealed that both membrane FasL and soluble FasL derived from acute coronary syndrome that were significantly up-regulated compared with those of either stable angina or normal control.

(J Jpn Coll Angiol, 2005, **45**: 919–927)