

PTCA（冠動脈形成術）後の再狭窄に対する分子生物学的アプローチ

(研究の概要)

近年動脈硬化による冠動脈疾患が多く、動脈硬化の対策と冠動脈狭窄に対する対策とが取られている。後者には冠動脈形成術 (PTCA) を主体とするインターベンション治療が普及し、初期治療成功率は 95% を越えた。しかし 6 ヶ月以内の再狭窄発生率も PTCA で 30-40% と高率であることが判明した。このため臨床的には新しい用具の開発が進められたが、DCA やロタブレータで 20-30%、Stent 移植でも 20-30% の再狭窄があり、放射線照射や新薬物も効果が不明確なため、他の基本的な対策が必要である。

再狭窄の主な病態は動脈壁、特に内膜の増殖・肥厚にある。この研究はこの血管壁増殖反応について基礎的研究を進め、冠循環血中の活性化物質と再狭窄、冠動脈の病理学的検討、血管壁細胞内の Ca 動態と増殖、Sdil 遺伝子の血管壁導入による血管壁反応性変化、ヒトカルボニン遺伝子の遺伝子組み替えマウスでの血管壁反応の性変化、などより各分子生物学レベルより、この機序の解明を目的として行われ、以下の成果を得た。

1. 臨床例で冠循環血中の白血球と血小板の表面接着分子、これら細胞と内皮細胞由来の可溶性接着分子の活性化を、PTCA 前とその後の経過で観察し、48 時間後に最大活性が得られた。このうち CD11b (Mac-1) は 6 ヶ月後の再狭窄の程度と相関した ($r=0.62$, $p<0.02$)。可溶性の sICAM-1、sP-selectin、sL-selectin の活性化も冠循環血中で見られ、血球と血管壁細胞とが接着することにより細胞間相互作用が働くと推定された。

さらに DCA で採取した動脈組織および血中濃度測定から、局所冠動脈壁での L-PGDA を介する PGD2 産生減少が推定され、PGD2 合成低下による血小板活性化の助長も示唆された。これらの結果より罹患動脈病変局所での血球接着とこれに続く変化が再狭窄の機序に重要であると考えられた (諸岡)。

2. DCA で採取した 26 冠動脈病変の病理組織を免疫染色を含め観察すると、不安定狭心症 8 例では平滑筋細胞の増殖が多く、粥腫が半数に、血栓は 3/8 例に見られた。亜急性心筋梗塞 2 例ではコレステリン結晶を含む粥腫であった。陳旧性心筋梗塞と安定狭心症では、細胞に乏しい繊維性病変が多く、石灰化が 6/9 例に見られた。不安定狭心症の局所病変所見と再狭窄病変が共通するかはなお検討を要した。

剖検例で先天性冠動脈異常 55 例で、冠動脈起始異常 20 例中 3 例、単冠動脈 4 例中 1 例、左回旋枝欠除 8 例中 2 例、右冠動脈低形成 9 例中 1 例に心筋梗塞併発があり、55 例中 7 例 (12.7%) に心筋梗塞を合併した。しかし両者の因果関係は乏しく、心筋梗塞は動脈硬化病変に起因したと考えられた。また単冠動脈症 4 例を詳細に検討したが、Shirani 1A 型で予後良好例であった (大川)。

3. ラットで頸動脈内膜を剥離すると 2 週間後より内膜肥厚が見られ、この増殖、肥厚した平滑筋に IP3 感受性 Ca チャネルが強く発現した。電子顕微鏡でも増殖した平滑筋の筋小胞体に IP3 感受性 Ca チャネルが多量に確認された。30 歳女性の腸骨動脈内膜肥厚部の平滑筋でも同様の所見を得た。

牛大動脈平滑筋と内皮細胞を培養して薬物で刺激すると、細胞内 Ca 濃度は内皮細胞が産生する NO で調節を受け、急な変化は緩衝された。内皮細胞では IP3R1 しかないことが明らかにされ、特異抗体でこれを抑制すると細胞内外の Ca 移動が抑制された。また eNOS をノックアウトした血管内皮細胞では NO の autocrine 作用がなく、平滑筋の増殖抑制作用が極端に少ないことが明らかとなった。これらの結果より、IP3 受容体発現に NO が積極的に関与する機構が血管細胞にはあることを示し、長期的な Ca チャネルの発現調節作用もあると考えられる。増殖過程で細胞内 Ca の反応は相違し、また NO は増殖抑制を細胞内 Ca 動態を介している可能性がある。臨床的に冠攣縮の発症にも Ca チャネルの発現変化の関与が考えらる（豊岡）。

4. 血管平滑筋の G1 期より S 期へ移行を抑制する Sdilp21 遺伝子を、家兎頸静脈に導入後、頸動脈に自家移植すると、移植血管の平滑筋は増殖型への脱分化が抑制された。これより静脈内膜の肥厚が抑制され、新しい治療のアプローチとして有望と考えられた（澤）。

5. ヒトカルポニン遺伝子のトランスジェニックマウスでは、バルーンで頸動脈内膜剥離後の内膜肥厚が抑制され、これは平滑筋の遊走を抑制する結果と考えられた。またカルポニン遺伝子欠失マウスでは、平滑筋が骨芽細胞に分化誘導され、血管壁石灰化との関連が示唆された。同マウスで大動脈平滑筋の発生張力は低下し、短縮速度は増加していた。これより、この遺伝子は血管トーン維持に重要な役割をしていることを明らかにした（高橋）。

研究者氏名及び所属機関

研究者氏名	所属機関及び地位	分担研究課題
諸岡成徳	獨協医科大学越谷病院 循環器内科 教授	臨床例で PTCA に伴う冠循環内活性化物質の検討
大川真一郎	東京女子医科大 学第二病院内科 教授	生検及び剖検例の冠動脈病理組織像の検討
豊岡照彦	東京大学医学部第二内科 教授	血管平滑筋細胞の増殖と Ca チャネル機能発現
澤 芳樹	大阪大学医学部第 1 外科 助手	バイパス血管の内膜肥厚と Sdilp21 遺伝子導入による血管壁反応性の変化
高橋克仁	大阪府立成人病センター 研究所第 5 部 主任研究員	ヒトカルポニン遺伝子組み替えによる血管壁増殖反応の検討

研究報告

A 臨床例で、PTCA に伴う冠循環内活性化物質の検討（獨協医科大学 諸岡成徳、井上晃男、酒井良彦）

I. 研究目的：臨床例で PTCA を施行した冠動脈病変部では、凝固・線溶系の変化、血小板・白血球・内皮細胞などより、接着分子、増殖因子の流出があり、動脈壁での血球・血管壁細胞との間で細胞分子レベルの変化が起こり、これが慢性期の内膜増殖と関連する可能性がある。本研究はこの面より再狭窄の機序を明かにする。

II. 研究計画及び材料と方法：狭心症患者で有意な狭窄があり、PTCA を施行し、事前に本人より同意の得られた 42 人を対象とした。他に stent 移植例、DCA 施行例、正常人も対象とした。PTCA 前およびその後 144 時間まで、冠静脈より採血し、血小板・白血球表面の接着分子を flow cytometry 法で測定した。6 ヶ月後に冠動脈造影を行い、再狭窄 (late loss index) を検討した。さらに血小板・白血球・内皮細胞より遊離する可溶性接着分子をモノクローナル抗体を用いて測定した。

7 人の正常人血液で、in vitro で血小板活性と薬剤の効果を検討した。薬剤は cilostazol を使用した。

DCA で得られた冠動脈硬化巣組織よりリポカリン型プロスタグランジン合成酵素 L-PGDS の mRNA を RT-PCR 法で観察し、L-PGDS の冠循環血中濃度を ELLISA 法で測定した。接着分子は、Mac-1、SialylLewis X (SLX)、P-selectin、L-selectin、CD63、CD11b、CD62P、PAC-1 を flow cytometry 法で、可溶性の sICAM-1、sP-selectin、sL-selectin をモノクローナル抗体法で測定した。

III. 研究成果：1. PTCA 後の経過中に好中球表面上の Mac-1、SLX の発現が増加し、L-selectin の減少が見られた。血小板表面の P-selectin、CD63 も増加した。cutting balloon の使用ではより発現は軽度であり、stent 移植を行うと発現はより高度であった。Mac-1 (CD11b) は PTCA 後 48 時間で最大となり、この値は、QCA の測定値と重回帰分析を行うと、6 ヶ月後の再狭窄を示す late loss index と $P=0.002$ で有意の関連を示し、単相関では $r=0.62$ ($p<0.02$) の相関を示した。これらは動脈壁の損傷、再狭窄の発生と接着分子の発

現との関連を示唆した。stent 移植では反応が強いが、stent 自身による支えが再狭窄を物理的に減少させていると推察された。

2. 可溶性接着分子は冠静脈血で、sICAM-1、sP-selectin、sL-selectin が PTCA 後 48 時間で増加した。特に sICAM-1 は好中球細胞表面の Mac-1 と共に late loss index と強い相関を示した。これらは動脈病変局所で、血小板、好中球、内皮細胞の活性化が起こり、接着分子を介して接着による細胞間相互作用を誘発し、慢性期の再狭窄発生に関与する可能性を示唆した。

3. ADP で正常人血小板を活性化すると、細胞表面の接着分子 P-selectin、PAC-1 の増加が起こり、GPIIb/IIIa が活性化されるが、cilostazol を前投与すると抑制され、血小板と白血球との相互作用も抑制されると推定された。

4. プロスタグランジン D₂ 合成を触媒するリポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素 L-PGDS の mRNA が DCA で得られた冠動脈硬化巣で強く発現することを RT-PCR 法で観察した。可溶性 L-PGDS の血中濃度を ELISA 法で測定すると、慢性期非再狭窄例では PTCA 直後に下降したが、24 時間、48 時間に増加した。しかし再狭窄例では、前値と同程度であった。48 時間後の L-PGDS 変化率は Mac-1 の発現増加率と負の相関を示した。これは PGD₂ 合成の減少は血小板活性化を助長し、一方好中球の活性化を軽減して再狭窄を抑制する可能性が示唆された。

IV. 考察: 同一症例で 2 ヶ所に PTCA を施行した場合、1 ヶ所では強い再狭窄を起こすが、他の所では再狭窄がないことをしばしば臨床例では経験する。すなわち全身的な要因の他に、罹患動脈局所の病変要因も再狭窄では重要である。この研究では PTCA に伴う冠循環血中の活性化物質の動態を直接測定し、また標的動脈硬化巣の組織反応を検討することで、局所要因に重点を置いて検討した。罹患部では流血中の白血球、血小板と血管壁の内皮細胞、平滑筋、線維芽細胞などの接着、相互作用より血管壁増殖反応は促進、修飾されると考えられる。この研究では接着分子の活性化について、PTCA 施行部を灌流した血液中の白血球表面に Mac-1、また血小板表面に P-selectin が発現していた。さらに接着分子の一部は血中に遊離するため、可溶性の sICAM-1、sP-selectin、と内皮細胞由来の sLselectin を灌流血清で測定すると、共に増加しており細胞相互の接着が起こっていると推定された。また Mac-1 は PTCA 後 48 時間で最高値となったが、この値と 6 ヶ月後の再狭窄 late loss index とは $r=0.62$ の相関が得られた。これより再狭窄発生は PTCA 後早い時期での局所反応が重要と考えられた。これにはさらに増殖因子やサイトカインも当然関与するが、この研究ではこれらとの関連は検討していない。しかし DCA で得た標的動脈硬化巣の組織ではプロスタグランジン合成の異常があり、動脈硬化巣では PGD₂ の合酵素 L-PGDS の mRNA が発現しているが、PTCA によって L-PGDS の産生に変化が見られ、PGD₂ 減少による血小板活性化が動脈局所で助長されている可能性が示唆された。この点は血管壁の炎症要因や内圧ストレス要因と共に、今後再狭窄との関連について検討課題として残された。

B 生検及び剖検例の冠動脈病理組織の検討 (大川真一郎)

I. 研究目的: ヒト冠動脈の病理形態変化より検討を行う。これを Directional Coronary Atherectomy (DCA) 施行例における冠動脈の病理組織所見、及び老年者連続剖検 6000 例より先天性冠動脈異常で心筋虚血所見のある例の 2 つより検討する。さらに単冠動脈症 4 例

について詳細に検討を加える。これより冠動脈異常と心筋虚血や心臓性急死との関連を明らかにする。

Ⅱ. 研究計画及び材料と方法：1. 心血管内エコー（IVUS）下に DCA を施行した 24 例（26 病変）の冠動脈硬化組織を男性 16 人、女性 8 人、年齢 59+2 歳より得た。この組織像と虚血性心疾患の状態、IVUS 所見を比較検討した。2. 連続剖検 6000 例中先天性冠動脈異常 55 例あり、心筋壊死部を灌流する冠状動脈の硬化狭窄性病変を比較した。

Ⅲ. 研究成果：1. 臨床病型より不安定狭心症 8 例、亜急性心筋梗塞 2 例、陳旧性心筋梗塞 9 例、安定狭心症 7 例あり、このうち IVUS で 21 例が内膜病変を観察できた。soft plaque は 1 例、fibrous plaque は 20 例であった。石灰化は上記の順に 5/7、1/2、2/8、5/5 に認められた。免疫組織染色を含む組織所見では不安定狭心症例で平滑筋細胞の増加が多く見られ、粥腫を半数に認めたが、血栓は半数以下の症例（3/8）に見られた。亜急性心筋梗塞例では 2 例ともコレステリン結晶を含む粥腫で、陳旧性心筋梗塞例と安定狭心症例では、細胞に乏しい線維性動脈硬化病変が多数をしめた。陳旧性心筋梗塞では石灰化が多かった（6/9）。

2. 先天性冠動脈異常 55 例中 7 例（12.7%）で心筋梗塞を合併していた。1) 冠動脈起始異常 20 例 {左冠動脈の右冠洞起始 2 例、無冠洞起始 2 例、左回旋枝の右冠洞起始 6 例、右冠動脈の左冠洞起始 10 例} 中 3 例、2) 単冠動脈 4 例中 1 例、3) 左回旋枝欠除 8 例中 2 例、4) 右冠動脈低形成 9 例中 1 例で、いずれも梗塞は冠動脈異常（奇形）そのものとの因果関係に乏しく、壊死心筋を灌流する冠動脈の硬化性狭窄病変によるものであった。また左回旋枝低形成 9 例中 2 例が突然死であったが、それらの死因はそれぞれ大動脈破裂と肺炎によるものであった。

3. 単冠動脈症の報告は約 100 例であるが、今回の 85 歳例は最高齢である。本研究の 4 例は Shirani らの分類によると、比較的予後良好と見なされる Type IA に属していた。

Ⅳ. 考察：不安定型狭心症は病巣で平滑筋細胞の増加があり、粥腫も半数に見られた。これが再狭窄と関連した特有の病変であるか、さらに検討を要する。このため内膜内皮細胞、平滑筋細胞、マクロファージと細胞外マトリックスの役割（特にコラーゲンの型、酸性ムコ多糖類について）などについて、免疫組織学的検討が必要である。先天性冠動脈異常では、12.7%に心筋梗塞を合併したが、奇形自身との因果関係は乏しいと考えられた。

C 血管平滑筋細胞の増殖と Ca チャネル機能発現（豊岡照彦）

Ⅰ. 研究目的：種々の血管作動性物質の刺激にたいして細胞内 Ca は均一に反応しない。これは細胞の増殖過程で差があり、増殖停止期には均一に反応し、増殖期には著しく低下する。しかし増殖期でも強制的に停止期に移行させれば、反応性は向上する。こうした細胞反応の不均一性が生体の血管でも起こるか明らかにすることを目的とする。このため 1. 細胞内 Ca イオン濃度を制御する Ca チャネルの中で IP₃ 感受性 Ca チャネルについて特異抗体を用い、内膜剥離によりラット頸動脈血管平滑筋の増殖期と停止期の変化を明らかにする。2. 牛大動脈の内皮細胞と血管平滑筋を培養し、nitric oxide (NO) は平滑筋細胞の増殖抑制が知られているので、細胞内外の Ca イオン動態について NO の作用を明らかにする。

Ⅱ. 研究計画及び材料と方法：1. 細胞内 Ca 濃度を制御する IP₃ 感受性 Ca チャネルの特異抗体を作成する。ラットで頸動脈内膜剥離により中膜の増殖期と増殖停止期平滑筋細胞

を作成する。内膜肥厚時 IP3 感受性 Ca チャネルの組織分布を光学顕微鏡、免疫組織染色と電子顕微鏡で観察する。平滑筋の同定は α 平滑筋ミオシン抗体、増殖期は PCNA 抗体で確認する。内膜剥離後 1-8 週で、Evans Blue 静注し内膜損傷を確認する。2. 牛大動脈より血管内皮細胞と平滑筋を分離、培養する。これを ATP、bradykinin、ionomycin、thapsigargin で刺激して、Ca 濃度変化を二次元画像法で解析する。細胞内 Ca 動態を時間積分で定量する。更に NO₂ と NO を bioassay する。3. eNOS 遺伝子について、プロモータと exon1 部分の mRNA を RT-PCR で増幅し、これより anti-sense DNA と senseDNA を作成し、これを培養した内皮細胞に導入し、eNOS ノックアウト内皮細胞を作成する。3 種類の作成された細胞株を使用して NO 合成の状態と細胞内 Ca 動態、平滑筋反応の変化を検討する。

Ⅲ. 研究成果：1. ラット頸動脈内膜剥離後 1 週間では内膜肥厚は殆ど起こらなかったが、2 週目から明瞭になり、4、8 週目では著明な肥厚が認められた。IP3 感受性 Ca チャネル蛋白は増殖、肥厚している平滑筋に特に強く発現した。中膜の IP3 感受性 Ca チャネルは一過性に軽度低下した。電子顕微鏡でも、内膜下に増殖した平滑筋の筋小胞体は発達し、IP3 感受性 Ca チャネルが多量に確認された。30 才代女性の腸骨動脈内膜肥厚部の平滑筋に IP3 感受性 Ca チャネルが同様に強く発現しているのが観察された。

2. 牛大動脈の内皮細胞と平滑筋を ATP などで刺激すると、刺激薬物で差はあるが細胞外に生理的量の Ca があれば、NO の産生量は増加し細胞内 Ca も増加、細胞外 Ca 量を減量すると NO 産生は著明に減少した。内皮細胞では Ca の最大レベルは不変で、半減期と時間積分が減少した。内皮細胞と平滑筋の混合培養では、刺激により内皮細胞では Ca 濃度は増加し平滑筋では逆に低下した。この低下の程度は内皮細胞の NO 産生量と良く相関した。内皮細胞では IP3R1

しか存在しないことが immunoblotting 法で明かとなった。この特異抗体でこの受容体を抑制すると ATP 刺激に対する細胞内外の Ca 移動が抑制され、また各種の刺激に対する反応の変化より、内因性の NO は細胞内 Ca 遊離を抑制し、細胞外からの流入を促進することで、内皮細胞内の Ca 濃度の急速な変化を緩衝することが示された。

3. eNOS をノックアウトした内皮細胞では、ATP 刺激に対して細胞内の Ca 濃度が増加して、NO による autocrine 作用がないことが示された。平滑筋との共存培養で eNOS ノックアウト内皮細胞を使用すると、平滑筋細胞の増殖抑制が極端に少ないことが明かとなった。またこの条件では平滑筋の IP3 受容体発現が著明に増加していた。

Ⅳ. 考察：従来 agonist 刺激による NO の産生に IP3 受容体が重要な機能を有し、容量依存性 Ca 流入を抑制すると考えられているが、逆に IP3 受容体発現に NO が積極的に関与する機構が血管細胞系には有ることを示している。この事実は NO には短期的な Ca 動態調節のほかに、長期的な Ca チャネルの発現調節作用もあることを示している。臨床で冠攣縮性狭心症では攣縮部は一様でなく、局所の NO 産生の問題とされてきたが、実際は Ca チャネルの発現も異り、血管平滑筋の反応が変化したことも関与すると考えられる。内皮細胞剥離後に 1 型 IP3 受容体の中膜増殖に際して一過性に急増するが、これらの結果はこの事実を支持すると考える。

D. バイパス血管の内膜肥厚と Sdilp21 遺伝子導入による血管壁反応性の変化（澤芳樹）

I. 研究目的：PTCA の対象の一つに冠動脈バイパス術後のグラフト狭窄病変がある。こ

これは中膜の平滑筋細胞の著明な増殖に基づくが、平滑筋の G1 期から S 期への細胞周期の進行を抑制的に制御している蛋白である Senescent Cell Derived Inhibitor (Sd1;p21) 遺伝子を HVJ-リポソーム法で導入しこの反応を換えることにより、細胞増殖を抑制出来るかを検討した。

Ⅱ. 研究計画及び材料と方法：うさぎ頸静脈を採取する。HVJ-リポソーム法は遺伝子を脂質の膜で包み、DNA-脂質複合体を形成した後、不活性化したセンダイウイルス (HVJ) を加え細胞内に導入する。グラフト採取後頸動脈に自家移植するまでに、Sd1 DNA または control plasmidDNA を Hemagglutinating virus of Japan-liposome (HVJ-liposome) 法を用いて、ex vivo で 20 分間グラフトを処置して遺伝子導入を行う。この処置した静脈を頸動脈にバイパス移植し、術後 2 週間後にグラフトを摘出し、病理組織、免疫染色を行って観察する。Ⅲ. 研究成果：遺伝子導入をしなかったコントロール群では、移植静脈はグラフト壁全周に肥厚したのに対し、Sd1 遺伝子を導入した群では、壁肥厚は軽減した。また細胞増殖を PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) 染色で同定すると、コントロールに比べ Sd1 遺伝子導入群では増殖期細胞が減少していた。また免疫染色でミオシン重鎖アイソフォームの発現様式により平滑筋の形質を同定すると、コントロール群では分化型を示す SM2 の発現をみないのに対し、導入群では一部認めるようになった。これらの結果より Sd1 遺伝子が、静脈壁平滑筋細胞の細胞周期に作用し、平滑筋細胞の分化型から増殖型への脱分化と増殖を抑制し、結果的に静脈壁の肥厚が抑制されたと考えられた。

Ⅳ. 考察：血管への遺伝子導入は、長期的な効果や生体に対するベクターの安全性など今後検討すべき点はあるが、再狭窄に対する新しい治療のアプローチとして今後有望であると考えられた。

E ヒトカルポニン遺伝子組み替えによる血管壁増殖反応の検討 (高橋克仁)

Ⅰ. 研究目的：カルポニンは平滑筋アクチン結合蛋白である。PTCA 部位の血管平滑筋にカルポニン遺伝子を導入し、カルポニン産生を増加させて、再狭窄の抑制を発生工学技術を用いて試みることを研究目的とする。カルポニン遺伝子は血管平滑筋の収縮抑制因子として発見され、この遺伝子が血管平滑筋に過剰発現すると、血管内膜肥厚が抑制されることが観察されている。カルポニン発現の低下を認めるヒト冠動脈病変部は再狭窄に対する high risk 群を構成することも明らかにされている。カルポニン遺伝子はカルポニンを正常血管壁で多量に発現をする遺伝子であり、バルーン損傷後のカルポニン発現低下を遺伝子組換えにより、この遺伝子を導入しカルポニン産生を補う新しい試みである。さらにこの遺伝子の血管壁細胞の分化に対する作用、血管壁張力の維持機構との関連についても検討を加える。

Ⅱ. 研究計画及び材料と方法：1. ヒトカルポニンの全長 cDNA を CMV enhancer とベータ actin promoter に連結し、349 個の SHRSP/1zm 受精卵に microinjection した。2 細胞期胚芽まで発育しえた 228 個の卵を偽妊娠処置した Wister 系のメスラットの卵管内に導入した。産仔総数 64 匹の内、3 家系のヒトカルポニン遺伝子を有するトランスジェニックラットを得た。このラットの右総頸動脈を 2F Fogarty カテーテルで内膜剥離した。2 週後に Evans blue で剥離部を確認し、病理組織学的に内膜/中膜面積比を算出した。2. マウスカルポニン遺伝子のアクチン結合領域を含む exon5-7 をターゲティングし、ホモ型欠失マウスを

得た。カルポニン³はミオシン ATPase を制御するので、このマウスで動脈張力発生に対する作用を検討した。3. ホモ型欠失マウスでヒト組換え体 BMP-2 (rhBM0-2) を添加して、大腿筋未分化間葉系細胞の骨細胞への分化を検討した。

Ⅲ. 研究成果：1. 導入カルポニン遺伝子は血管平滑筋、心筋で発現が多く見られた。トランスジェニックマウスではバルーン障害後内膜肥厚が抑制された。内膜／中膜比はトランスジェニックマウス 2 系統で 0.173 ± 0.043 (n=7)、 0.35 ± 0.110 (n=6) で、対照は 0.777 ± 0.124 (n=6) と有意な差 ($p < 0.03$) があつた。トランスジェニックマウスでは、内膜剥離 3 日後の中膜平滑筋細胞核は BrdU 取り込み率が対照の 17% に抑制されていた。

2. 骨芽細胞への分化のマーカーである ALP は rhBMP-2 によって用量依存性に誘導され、その活性はホモ型欠失マウスの線維芽細胞で有意に高値であつた。線維芽細胞は欠失マウスで $92.4 \pm 1.7\%$ が骨芽細胞に分化したのに対して、野生型マウスでは $32.8 \pm 4.4\%$ に過ぎなかつた (n=5、 $p < 0.001$)。

3. ホモ欠失マウスでは、4 週齢の大動脈で高 K 刺激により収縮させると、収縮張力は低下していた。一方等尺性収縮時の短縮速度は増加しており、カルポニンがミオシン架橋の回転速度を抑制して血管トーンスを維持する latch 収縮の形成に関与すると推定された。輸精管平滑筋で欠失マウスでは野生型に比べて、3 倍短縮速度が増加していた。

Ⅳ. 考察：カルポニン遺伝子のトランスジェニックマウスでは、カルポニンの過剰発現で、血管平滑筋の基質-細胞間の接着が増強されること、増殖と遊走を抑制し、内膜肥厚を抑制したと考えられた。また動脈壁の石灰化はプラークの破壊と血栓形成の原因として重要な危険因子であるが、今回の結果は動脈硬化の病態解明に役立つものと思われる。さらにカルポニンが *in vivo* において、クロスブリッジの回転速度を低下させて、血管の張力を維持する latch 収縮の発生に重要な役割を果たしていることを始めて明らかにした。

V. 研究成果の発表：

1. Inoue T, Fujito T, Hoshi K, Sakai Y, Yamaguchi H, Takayanagi K, Morooka S, Takabatake Y. A mechanism of ischemic preconditioning during percutaneous transmural coronary angioplasty. *Cardiology* 87: 216-223, 1996
2. Inoue T, Sakai Y, Morooka S, Hayashi T, Takayanagi K, Takabatake Y: Expression of polymorphonuclear leukocyte adhesion molecules and its clinical significance in patients treated with percutaneous transluminal coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol.* 28: 1127-1133, 1996
3. Inoue T, Hoshi K, Fujito T, Sakai Y, Morooka S, Sohma R: Early detection of platelet activation after coronary angioplasty. *Coron Artery Dis* 7:529-534, 1996
4. Shin WS, Kawaguchi H, Sasaki T, Wang Y, Yang WD, Inukai M, Toyooka T: The role of nitric oxide in the cardiovascular system. *Ann N Y Sci* 786:233-244, 1996
5. Toyooka T, Kawaguchi H, Wang YP: Calcium-activated neural proteases and myocardial protein catabolism. Recent insights into heart failure syndrome. 1996 Springer Verlag. Heidelberg, Berlin, 1996

6. Toyooka T, Naylor WG: Third generation calcium entry blockers. *Blood Pressure* 5: 206-208, 1966
7. Uehara Y, Miyazaki M, Kanase H, Sugano K, Toyooka T: Body mass index is a determinant of blood pressure in young adults with essential hypertensive parents. *J Human Hypertens* 10: 601-606, 1966
8. Wang WP, Shin WS, Kawaguchi H, Inukai M, Kato M, Sakamoto A, Uehara Y, Miyamoto M, Shimamoto N, Korenaga R, Ando J, Toyooka T: Contribution of sustained Ca elevation for nitric oxide production in endothelial cells and subsequent of Ca transient in vascular smooth muscle cells in coculture. *J Biol Chem* 271: 5647-5655, 1996
9. Takahashi K, Tazunoki T, Okada T, Ohgami K, Miwa T, Miki A, Shibata N: The 5-flanking region of the human smooth muscle cell calponin gene contains a cis-acting domain for interaction with a methylated DNA-binding transcription repressor. *J Biochem* 120: 415-425, 1996
10. Masuda H, Tanaka K, Takagi M, Ohgami K, Sakamaki T, Shibata N, Takahashi K: Molecular cloning and characterization of human non-smooth muscle calponin. *J Biochem* 120: 415-424, 1996
11. Inoue T, Hoshi K, Mizoguchi K, Shimizu M, Sakai Y, Morooka S: Cutting balloon angioplasty for a restenosis lesion at the distal anastomosis of a saphenous vein graft. *J Intervent Cardiol* 10: 121-124, 1997
12. Kamisirado H, Inoue T, Fujito T, Kase M, Shimizu M, Sakai Y, Takayanagi K, Morooka S, Natsui S: Effect of enalapril maleate on cerebral blood flow in patients with chronic heart failure. *Angiology* 48: 707-713, 1997
13. Inoue T, Fujito T, Asahi S, Hoshi K, Saaki Y, Morooka S: Impaired left ventricular diastolic filling occurs in diabetic patients without atherosclerotic coronary artery disease. *Am J Med Sci* 313: 125-130, 1997
14. 大川真一郎: 高齢者の先天性心疾患 臨床発達心臓病学 改訂2版 高尾篤良ほか編 p131-143、中外医学社 1997
15. Ohkawa S et al: Acidic glycosaminoglycans in urine, serum and myocardium of aged patients with myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 9: 541-550, 1997
16. Kawaguchi H, Shin WS, Wang Y, Inukai M, Kato M, Toyooka T: In vivo gene transfection of human eNOS in cardiomyocyte causes apoptosis-like cell death. Identification by Sendai virus-coated liposomes. *Circulation* 95: 2441-2447, 1997
17. Sakamoto A, Ono K, Abe M, Jasmin G, Eki T, Masaki T, Toyooka T, Hanaoka F: Both hypertrophic and dilated cardiomyopathy are caused by mutation of the same gene, delta-sarcoglycan in hamster: A model of dystrophin-associated glycoprotein complex. *Proc Natl Sci Acad USA* 94: 13873-8, 1997
18. Iwasawa K, Nakajima T, Hazama A, Goto W, Shin WS, Toyooka T, Omata M: Effects of extracellular PH on receptor-mediated Ca influx in A7r5 rat smooth cells:

- Involvement of two types of channel. *J Physiol* 503: 237-351, 1997
19. 山川智之、白鴻志、益田順一、澤芳樹、門場啓司、白倉良太、緒方絢、松田輝：血管内ステント留置後の新生内膜形成におけるプロテオグリカン及び TGF-ベータの動態の検討。動脈硬化 24: 565-567、1997
 20. Fukui Y, Masuda H, Takagi M, Takahashi K, Kiyokane K: The presence of H2-calponin in keratinocyte. *J Dermatol Sci* 14: 29-36, 1997
 21. Hashimoto C, Matuda H, Ayaki M, Suzuki Y, Uenaka A, Seya T, Miyoshi J, Takahashi K, Iuni Y: Molecular cloning and sequence analysis of the cDNA for the mouse counterpart to adult hamster liver purified growth inhibitory factor. *Biochim Biophys Acta* 1355: 205-208, 1997
 22. Yamamura H, Matuda H, Ikeda W, Tokuyama T, Takagi M, Shibata N, Tatsuta M, Takahashi K: Structure and expression of the human SM22 α gene assignment of the gene to chromosome 11, and repression of the promoter activity by cytosineDNA methylation. *J Biochem* 122: 157-167, 1997
 23. 山村倫子、淡田修久、高橋克仁：遺伝子工学の医療への応用—血管病変に対するアンチセンス法、遺伝子治療を中心に。現代医療 29: 1559-1567、1997
 24. 高橋克仁：カルボニン遺伝子と血管平滑筋の病態生理 *Ther Res* 18: 991-1001, 1997
 25. Inoue T, Sakai Y, Fujito T, Hoshi K, Hayashi T, Takayanagi K, Morooka S: Expression of neutrophil adhesion molecules after coronary angioplasty, Roles of selectin family and carbohydrate ligands. *Thromb Haemost* 79: 54-58, 1998
 26. Inoue T, Fujito T, Hoshi K, Sakai Y, Morooka S, Sohma R: Detection of platelets activated acetylcholine-induced coronary vasospasm. *Thromb Haemost* 79: 1004-1007, 1998
 27. Inoue T, Saniabadi AR, Matsunaga R, Hoshi K, Yaguchi I, Morooka S: Impaired endothelium-dependent acetylcholine-induced coronary artery relaxation in patients with high serum remnant lipoprotein particles. *Atherosclerosis* 139: 363-367, 1998
 28. Matsunaga R, Miura J, Fujito T, Uchida Y, Inoue T, Kamisirado H, Morooka S, Omori Y: Ischemic change on electrocardiogram induced by hypoglycemia in a diabetic patient. *Jpn Cir J* 62: 142-145, 1998
 29. Inoue T, Hoshi K, Matsunaga R, Yaguchi I, Morooka S, Shimizu M: Spiral coronary artery dissection complicating diagnostic coronary angiography: Repair with multiple stent implantations. *J Intervent Cardiol* 11: 61-65, 1998
 30. Inoue T, Sakai Y, Hoshi K, Yaguchi I, Fujito T, Morooka S: Lower expression of neutrophil adhesion molecule indicates less vessel wall injury and might explain lower restenosis rate after cutting balloon angioplasty. *Circulation* 97: 2511-2518, 1998
 31. Nagoshi H, Uehara Y, Kawai F, Maeda S, Ogura T, Goto A, Toyooka T, Esumi H, Shimizu T, Omata M: Prostaglandin D2 inhibits inducible nitric oxide synthase expression in rat vascular smooth muscle. *Cir Res* 82: 204-209, 1998

32. Bai H, Sawa Y, Zhang W, Yamakawa T, Morishita R, Kaneda Y, Matsuda H: Gene transfer to vein graft wall by HVJ-liposome method; time course and localization of gene expression. *Ann Thor Surg* 66: 814-9, 1998
33. Bai H et al: Inhibition of intimal hyperplasia after vein grafting by in vivo transfer of human senescent cell-derived inhibitor-1 gene. *Gene Ther* 5:761-9, 1998
34. Parker CA, Takahashi K, Tang JX, Tao T, Morgan K: Cytoskeletal targeting of calponin in differentiated, contractile smooth muscle cells of the ferret. *J Physiol* 508: 187-198, 1998
35. Ueki N, Ohkawa T, Yamamura H, Takahashi K, Tsutsui T, Kawai Y, Yokoyama Y, Amuro Y, Hada T, Higashino K: Induction of calponin-h1 by transforming growth factor-b1 in cultured human Ito cells L190. *Bioch Biophys Acta* 1403: 28-36, 1998
36. Yamamura H, Yoshikawa H, Tatsuta M, Akedo H, Takahashi K: Expression of the smooth muscle calponin gene in human osteosarcoma and its possible association with prognosis. *Inter J Can* 79:245-250, 1998
37. Yamamura H, Ikeda W, Shibata N, Awata N, Takahashi K: Structure and expression of calponin in arterial smooth muscle cells. In *Ischemic Heart* ed by Motizuki S et al, Kluwer Academic Publisher, P87-95, 1998
38. Yoshikawa H, Taniguchi S, Yamamura H, Mori M, Sugimoto M, Miyado K, Nakamura K, Nakado K, Katsuki M, Shibata N, Takahashi K: Mice lacking smooth muscle calponin display increased bone formation that is associated with enhancement of bone morphogenetic protein responses. *Genes to Cells* 3: 685-695, 1998
39. Kim BK, Ozaki H, Hori M, Takahashi K, Karaki H: Increased contractility of rat uterine smooth muscle at the end of pregnancy. *Comp Biochem Physiol* 121: 165-173, 1998
40. Inoue T, Sohma R, Morooka S: Cilostazol inhibits the expression of activation-dependent membrane surface glycoprotein on the surface of platelets stimulated in vitro. *Thromb Res* 93: 137-143, 1999
41. Inoue T, Sakai Y, Takayanagi K, Morooka S, Uehara Y, Oda H, Seiki K, Nakajima H, Urade Y: Prostaglandin D2 generation kinetics after coronary angioplasty affects the activation of platelets and neutrophils and relates to the occurrence of acute thrombotic complication or late restenosis, in press
42. Kuboki K, Ohkawa S, Chida K et al: Torsades de pointes in a case of hypertrophic cardiomyopathy with special reference to the pathologic findings of the heart including the conduction system. *Jpn Heart J* 40: 233-238, 1999
43. Fujikawa H, Tani E, Yamaura I, Ozeki I, Miyaji K, Sato M, Takahashi K, Imajo-Ohmi S: Activation of protein kinases in canine basilar artery in vasospasm. *J Cerebral Blood Flow Metabolism* 19: 44-52, 1999