

分担研究報告書

食後血糖上昇の抑制による心筋梗塞二次予防に関する大規模薬剤介入臨床研究

分担研究者 中谷 敏 国立循環器病センター 医長

研究要旨

現在わが国における心臓死は全国民死亡原因の第2位を占めている。なかでも慢性心不全患者は増加し続けており、その原因として心筋梗塞後心ポンプ機能低下が重要である。慢性心不全による繰り返す入院、多種類の治療薬の使用は医療費増加につながり、厚生行政上の重要課題となっている。また臨床的見地からも、梗塞後慢性心不全患者のQOLは低く、健康寿命の延長のためにも梗塞後心不全の発症を抑制することは極めて重要な案件である。

今後わが国が迎える超高齢化社会の到来を考慮すると、心筋梗塞の二次予防というアプローチが特に重要となる。心筋梗塞のリスクファクターである生活習慣病のうち、発症およびその予後に最も影響を与える糖尿病は、食後高血糖のみを有する糖尿病予備軍とともに非常な勢いで増加している。血糖値の上昇は酸化ストレスを引き起こすことが知られており、食後の高血糖のみがすでに大血管障害のリスクとなり、心筋梗塞の発症リスクを高めることが報告されている(Donahue RP, et al. Diabetes 36: 689-692,1987)。そこで心筋梗塞後患者の食後の血糖上昇を抑えることが、心筋梗塞二次予防につながると考え、我々は本研究を立案した。本研究は急性心筋梗塞で入院した症例に対して α グルコシダーゼ阻害薬を投与し、その心血管イベントの抑制効果の有無を全国100施設と共同した多施設大規模臨床試験にて検討する。

かかる大規模多施設臨床研究の成否にはサンプルサイズおよび質の高いデータの確保が重要な要素となる。我々は厚生科研 効果的医療技術の確立推進臨床研究事業 虚血・再灌流における心筋保護に関する大規模無作為薬剤効果比較試験(課題番号H14—心筋—006、JWIND試験)にて、心筋梗塞における急性期の薬剤介入という困難な性格であるにもかかわらず、全国68施設との共同で700例を超えんとする症例の登録を得て解析しつつある実績を有する。心筋梗塞の多施設臨床研究チームとしてネットワークがすでに確立されている

我々の研究グループは、そのインフラストラクチャーを活用することにより、本研究の遂行能力を十分有するものと考えられる。

A. 研究目的

血糖の上昇は酸化ストレスを引き起こすことが知られており、食後高血糖のみがすでに大血管障害のリスクとなり、心筋梗塞の発症リスクを高めることがわかっている(Donahue RP, et al. Diabetes 36: 689-692,1987)。そこで心筋梗塞後の症例に対して、 α グルコシダーゼ阻害薬により食後の血糖上昇を抑えることが、心筋梗塞二次予防につながると考え我々は本研究を立案した。当該患者数が相当数にのぼる治療法は、当然のことながら検討段階から安全な薬剤の使用が必須である。われわれが考慮している α グルコシダーゼ阻害薬は、血中には原則取り込まれず、消化管にとどまり糖分の吸収を抑える薬剤であるため、幅広い患者層への適用が可能であると考えられる。

B. 研究方法

食後血糖上昇の抑制による心筋梗塞二次予防に関する大規模薬剤介入臨床研究

[対象]

急性心筋梗塞と診断され、再灌流療法をうけた20才以上の症例

[除外基準]

α グルコシダーゼ阻害薬がすでに投与されている症例
低血糖発作の既往のある症例
その他、重篤な肝障害、腎障害や同意の得られない症例、不適当と考えられる症例

[方法]

エンリー時に α グルコシダーゼ阻害薬が投与されていない症例を無作為割付により2群にわけて、 α グルコシダーゼ阻害薬投与(ボグリボース、1回0.2mg 1日3回毎食直前)群と偽薬投与群に割り付

ける。以後3年間フォローアップし心血管イベント、心不全への進展、心筋リモデリングおよび糖尿病の発症につき2群間で比較検討する。またエントリー時の顕性糖尿病の有無で層別解析をする。フォローアップ期間は6ヶ月ごとにデータ登録を行い、心血管イベントおよび糖尿病の状況(空腹時血糖、HbA1C)、内服状況を調査していく。

[目標症例数]

4000症例(コントロール群2000症例、 α グルコシダーゼ阻害薬群2000症例)

[参加予定施設]

全国100施設

国立循環器病センター、駿河台日本大学病院、りんくう総合医療センター市立泉佐野病院、宇和島市立宇和島病院、新別府病院など厚生科研 課題番号H14—心筋—006(JWIND試験)参加68施設に加え、計100施設での共同研究を計画している。

[中央予定施設]

国立循環器病センター

[評価項目]

プライマリーエンドポイント

心血管イベント(死亡、心疾患による入院、再梗塞、心不全、再インターベンション、CABG)

セカンダリーエンドポイント

死亡率

インターベンション後再狭窄

心筋リモデリング(心エコー、核医学検査、BNP)

慢性心不全への移行の抑制(心不全による入院、NYHA)

脳血管障害の発症

糖尿病の発症

[割り付け方法]

インターネットを利用した中央割付法

[サブスタディ]

データマイニング

フォローアップの際に、他の内服薬もすべて検討し、治療法最適化をデータマイニング法にて検討する。

SNPを用いた薬剤効果の検討

現在医療費の高騰から、テーラーメイド医療の重要性が強く訴えられている。

α グルコシダーゼ阻害薬の効果がみられた群とない群において各種動脈硬化関連遺伝子、心筋梗塞関連遺伝子、糖尿病関連遺伝子のSNPを用いて検討を行う。

[動物実験による検討]

糖尿病マウスを利用した、長期間高血糖状態がマウス心筋代謝に与える影響の検討

耐糖能異常の梗塞後心筋に与える影響を検討するため、KKAYなどの糖尿病マウスに心筋梗塞を作成し、高血糖状態に長期間さらされることによりいかなる遺伝子発現変化をきたすかをaffimetrix社製のmicro chipを利用して解析する。また α グルコシダーゼ阻害薬等の薬剤による遺伝子発現変化を検討し、また高血糖及びその是正による心筋代謝への影響を検討する。

マウス心筋梗塞モデル、およびイヌ心筋梗塞モデルにおける食後高血糖抑制による心不全予防効果の検討

糖尿病のない野生型マウス、およびイヌに心筋梗塞を作成し、 α グルコシダーゼ阻害薬(boglibose)を経口で投与し、心エコーなどを用いて心機能を検討する。

平成16年度は、参加予定施設とキックオフミーティングを行いプロトコルの確定をすると共にインターネット登録用のホームページを立ち上げた。中央施設である国立循環器病センターの倫理審査委員会を通過し予定通りエントリーが開始された。また、イヌ心不全モデルにおいて糖代謝に関連する遺伝子の変化しており、ヒト心不全症例での検討でも同様のことが見付かった。

(倫理面への配慮)

以下の点を明記し、倫理委員会の承認手続きを経て研究を開始した。拡散か施設でも同様の手続きを開始している。

(1) 研究及び医療行為の対象となる個人の人権の擁護

本研究は遺伝子情報を扱わず臨床情報のみの解析であるが、臨床データの収集は「連結匿名化」を行った上で中央解析施設(国立循環器病センター)に集積し、解析時には個人特定に繋がるデータとは切り離れた状態での解析を行う。

(2) 医学研究及び医療行為の対象となる個人への利益と不利益

本研究で使用される薬剤は臨床の現場で日常使われている薬剤であり、開発途中のいわゆる治験薬とは根本的に異なる。本研究ではコントロール目標を立て厳密にコントロールするので、より細やかな治療を受けられる可能性がある。また検査項目に関して一般の診療に必要な物に限っており新たな採血等の必要がなく対象となる個人への負担は少ない。個人情報保護に努めれば個人への不利益は少ないものと考えられる。

(3) 医学的貢献度

我が国における心不全による死亡は全死因の第二位を占めており、その抑止は社会的急務となっている。特に心筋梗塞後の心機能低下に起因する慢性心不全については、5年生存率が50%以下と低いことから、その改善が急がれている。心筋梗塞後の心機能低下は再梗塞によりその危険性が增大する。心筋梗塞再発予防における大規模薬剤介入を念頭に置いた本研究は、医学的貢献度も非常に高いと考える。

(4) 医学研究及び医療行為の対象となる個人に理解を求め同意を得る方法

患者さん用説明文書を用いて、研究遂行者の担当者が説明し、別紙の同意文書により同意を得る。

(5) 動物を用いた実験について

動物実験は施設の倫理規定に基づき審査に通過した実験のみを行い、マウス等動物の生命を最大限尊重し、効率的に実験を進める。

C. 研究結果

現在わが国において、心臓死は全国民死亡原因の第2位を占めている。なかでも慢性心不全患者は増加し続けており、その原因としては心筋梗塞後の心機能低下が重要である。くり返す入院、多種類の治療薬の使用は医療費増加につながり、厚生行政上の重要課題である。また臨床的見地からも、梗塞後心不全患者のQOLは低く、健康寿命の延長のためにも梗塞後の心不全発症を抑制することは極めて重要な案件である。

くり返す心筋梗塞後の心機能低下に対して、二次予防および心筋リモデリング抑制というアプローチがあげられる。加齢そのものが発症のリスクファクターであるため、今後わが国が迎える超高齢化社会の到来にあたり、心筋梗塞二次予防の重要性が増している。一方で心筋梗塞のリスクファクターである生活習慣病のうち、その発症・予後に最も影響

を与えるとされる糖尿病およびその予備軍は、生活習慣の変化、高齢化をうけて非常な勢いで増加している。したがって今後わが国の心筋梗塞二次予防において、耐糖能異常への新たな対処の必要性が高まっている。

血糖の上昇は酸化ストレスを引き起こすことが知られており、食後高血糖のみがすでに大血管障害のリスクとなり、心筋梗塞の発症リスクを高めることがわかっている(Donahue RP, et al. Diabetes 36: 689-692, 1987)。そこで心筋梗塞後の症例に対して、 α グルコシダーゼ阻害薬により食後の血糖上昇を抑えることが、心筋梗塞二次予防につながると考え我々は本研究を立案した。当該患者数が相当数にのぼる治療法は、当然のことながら検討段階から安全な薬剤の使用が必須である。われわれが考慮している α グルコシダーゼ阻害薬は、血中には原則取り込まれず、消化管にとどまり糖分の吸収を抑える薬剤であるため、幅広い患者層への適用が可能であると考えられる。

当該研究期間3年の研究計画

1年目 研究体制の整備、症例エントリーの開始、動物実験による検討

当該年度は、参加予定施設を含めたキックオフミーティングを開催しプロトコルの確定を行った。また、インターネットを用いた登録のためホームページを立ち上げ、予定通りエントリーを開始した。また、実験動物を使った評価系において耐糖能異常と心不全の関連について検討した。

2年目 症例のエントリー、エントリーされた症例の観察、動物実験による検討

3年目 エントリーされた症例の観察、データ解析

D. 考察

心機能と生体の糖利用は密接な関係にあることが基礎医学の成果として明らかになりつつある。本研究は大規模臨床研究にて、抗高血糖薬の投与により心筋梗塞二次予防が可能であるかを臨床的に検討するものであり、以下の結果が期待される。

1. 心筋梗塞の二次予防により慢性心不全患者の増加を抑制できれば、厚生行政面においては大幅な医療費抑制効果が期待され、また医療面においては患者のQOLの著明な改善、健康寿命の延長が期待できる。
2. 包括医療制度の導入により急性心筋梗塞を含めた心血管イベントの発症数の減少は、そのまま医療費の抑制につながる。

E.結論

糖利用の正常化は、新しい心血管疾患の治療法になりうると考えられた。

F.健康危険情報

特記なし

G.研究発表

1. 論文発表

特記なし

2. 学会発表

特記なし

H.知的財産権の出願・登録情報(予定を含む)

1. 特許取得

特記なし

2. 実用新案登録

特記なし

3. その他

特記なし

分担研究報告書

食後血糖上昇の抑制による心筋梗塞二次予防に関する大規模薬剤介入臨床研究

分担研究者 山岸 正和 国立循環器病センター 医長

研究要旨

現在わが国における心臓死は全国民死亡原因の第2位を占めている。なかでも慢性心不全患者は増加し続けており、その原因として心筋梗塞後心ポンプ機能低下が重要である。慢性心不全による繰り返す入院、多種類の治療薬の使用は医療費増加につながり、厚生行政上の重要課題となっている。また臨床的見地からも、梗塞後慢性心不全患者のQOLは低く、健康寿命の延長のためにも梗塞後心不全の発症を抑制することは極めて重要な案件である。

今後わが国が迎える超高齢化社会の到来を考慮すると、心筋梗塞の二次予防というアプローチが特に重要となる。心筋梗塞のリスクファクターである生活習慣病のうち、発症およびその予後に最も影響を与える糖尿病は、食後高血糖のみを有する糖尿病予備軍とともに非常な勢いで増加している。血糖値の上昇は酸化ストレスを引き起こすことが知られており、食後の高血糖のみがすでに大血管障害のリスクとなり、心筋梗塞の発症リスクを高めることが報告されている(Donahue RP, et al. Diabetes 36: 689-692,1987)。そこで心筋梗塞後患者の食後の血糖上昇を抑えることが、心筋梗塞二次予防につながると考え、我々は本研究を立案した。本研究は急性心筋梗塞で入院した症例に対して α グルコシダーゼ阻害薬を投与し、その心血管イベントの抑制効果の有無を全国100施設と共同した多施設大規模臨床試験にて検討する。

かかる大規模多施設臨床研究の成否にはサンプルサイズおよび質の高いデータの確保が重要な要素となる。我々は厚生科研 効果的医療技術の確立推進臨床研究事業 虚血・再灌流における心筋保護に関する大規模無作為薬剤効果比較試験(課題番号H14—心筋—006、JWIND試験)にて、心筋梗塞における急性期の薬剤介入という困難な性格であるにもかかわらず、全国68施設との共同で700例を超えんとする症例の登録を得て解析しつつある実績を有する。心筋梗塞の多施設臨床研究チームとしてネットワークがすでに確立されている

我々の研究グループは、そのインフラストラクチャーを活用することにより、本研究の遂行能力を十分有するものと考えられる。

A. 研究目的

血糖の上昇は酸化ストレスを引き起こすことが知られており、食後高血糖のみがすでに大血管障害のリスクとなり、心筋梗塞の発症リスクを高めることがわかっている(Donahue RP, et al. Diabetes 36: 689-692,1987)。そこで心筋梗塞後の症例に対して、 α グルコシダーゼ阻害薬により食後の血糖上昇を抑えることが、心筋梗塞二次予防につながると考え我々は本研究を立案した。当該患者数が相当数にのぼる治療法は、当然のことながら検討段階から安全な薬剤の使用が必須である。われわれが考慮している α グルコシダーゼ阻害薬は、血中には原則取り込まれず、消化管にとどまり糖分の吸収を抑える薬剤であるため、幅広い患者層への適用が可能であると考えられる。

B. 研究方法

食後血糖上昇の抑制による心筋梗塞二次予防に関する大規模薬剤介入臨床研究

[対象]

急性心筋梗塞と診断され、再灌流療法をうけた20才以上の症例

[除外基準]

α グルコシダーゼ阻害薬がすでに投与されている症例
低血糖発作の既往のある症例
その他、重篤な肝障害、腎障害や同意の得られない症例、不適当と考えられる症例

[方法]

エンリー時に α グルコシダーゼ阻害薬が投与されていない症例を無作為割付により2群にわけて、 α グルコシダーゼ阻害薬投与(ボグリボース、1回0.2mg 1日3回毎食直前)群と偽薬投与群に割り付

ける。以後3年間フォローアップし心血管イベント、心不全への進展、心筋リモデリングおよび糖尿病の発症につき2群間で比較検討する。またエントリー時の顕性糖尿病の有無で層別解析をする。フォローアップ期間は6ヶ月ごとにデータ登録を行い、心血管イベントおよび糖尿病の状況(空腹時血糖、HbA1C)、内服状況を調査していく。

[目標症例数]

4000症例(コントロール群2000症例、 α グルコシダーゼ阻害薬群2000症例)

[参加予定施設]

全国100施設

国立循環器病センター、駿河台日本大学病院、りんくう総合医療センター市立泉佐野病院、宇和島市立宇和島病院、新別府病院など厚生科研 課題番号H14—心筋—006(JWIND試験)参加68施設に加え、計100施設での共同研究を計画している。

[中央予定施設]

国立循環器病センター

[評価項目]

プライマリーエンドポイント

心血管イベント(死亡、心疾患による入院、再梗塞、心不全、再インターベンション、CABG)

セカンダリーエンドポイント

死亡率

インターベンション後再狭窄

心筋リモデリング(心エコー、核医学検査、BNP)

慢性心不全への移行の抑制(心不全による入院、

NYHA)

脳血管障害の発症

糖尿病の発症

[割り付け方法]

インターネットを利用した中央割付法

[サブスタディ]

データマイニング

フォローアップの際に、他の内服薬もすべて検討し、治療法最適化をデータマイニング法にて検討する。

SNPを用いた薬剤効果の検討

現在医療費の高騰から、テーラーメイド医療の重要性が強く訴えられている。

α グルコシダーゼ阻害薬の効果がみられた群とない群において各種動脈硬化関連遺伝子、心筋梗塞関連遺伝子、糖尿病関連遺伝子のSNPを用いて検討を行う。

[動物実験による検討]

糖尿病マウスを利用した、長期間高血糖状態がマウス心筋代謝に与える影響の検討

耐糖能異常の梗塞後心筋に与える影響を検討するため、KKAYなどの糖尿病マウスに心筋梗塞を作成し、高血糖状態に長期間さらされることによりいかなる遺伝子発現変化をきたすかをaffimetrix社製のmicro chipを利用して解析する。また α グルコシダーゼ阻害薬等の薬剤による遺伝子発現変化を検討し、また高血糖及びその是正による心筋代謝への影響を検討する。

マウス心筋梗塞モデル、およびイヌ心筋梗塞モデルにおける食後高血糖抑制による心不全予防効果の検討

糖尿病のない野生型マウス、およびイヌに心筋梗塞を作成し、 α グルコシダーゼ阻害薬(boglibose)を経口で投与し、心エコーなどを用いて心機能を検討する。

平成16年度は、参加予定施設とキックオフミーティングを行いプロトコルの確定をすと共にインターネット登録用のホームページを立ち上げた。中央施設である国立循環器病センターの倫理審査委員会を通過し予定通りエントリーが開始された。また、イヌ心不全モデルにおいて糖代謝に関連する遺伝子に変化しており、ヒト心不全症例での検討でも同様のことが見付かった。

(倫理面への配慮)

以下の点を明記し、倫理委員会の承認手続きを経て研究を開始した。拡散か施設でも同様の手続きを開始している。

(1) 研究及び医療行為の対象となる個人の人権の擁護

本研究は遺伝子情報を扱わず臨床情報のみの解析であるが、臨床データの収集は「連結匿名化」を行った上で中央解析施設(国立循環器病センター)に集積し、解析時には個人特定に繋がるデータとは切り離した状態での解析を行う。

(2) 医学研究及び医療行為の対象となる個人への利益と不利益

本研究で使用される薬剤は臨床の現場で日常使われている薬剤であり、開発途中のいわゆる治験薬とは根本的に異なる。本研究ではコントロール目標を立て厳密にコントロールするので、より細やかな治療を受けられる可能性がある。また検査項目に関して一般の診療に必要な物に限っており新たな採血等の必要がなく対象となる個人への負担は少ない。個人情報保護に努めれば個人への不利益は少ないものと考えられる。

(3) 医学的貢献度

我が国における心不全による死亡は全死因の第二位を占めており、その抑止は社会的急務となっている。特に心筋梗塞後の心機能低下に起因する慢性心不全については、5年生存率が50%以下と低いことから、その改善が急がれている。心筋梗塞後の心機能低下は再梗塞によりその危険性が增大する。心筋梗塞再発予防における大規模薬剤介入を念頭に置いた本研究は、医学的貢献度も非常に高いと考える。

(4) 医学研究及び医療行為の対象となる個人に理解を求め同意を得る方法

患者さん用説明文書を用いて、研究遂行者の担当者が説明し、別紙の同意文書により同意を得る。

(5) 動物を用いた実験について

動物実験は施設の倫理規定に基づき審査に通過した実験のみを行い、マウス等動物の生命を最大限尊重し、効率的に実験を進める。

C. 研究結果

現在わが国において、心臓死は全国民死亡原因の第2位を占めている。なかでも慢性心不全患者は増加し続けており、その原因としては心筋梗塞後の心機能低下が重要である。くり返す入院、多種類の治療薬の使用は医療費増加につながり、厚生行政上の重要課題である。また臨床的見地からも、梗塞後心不全患者のQOLは低く、健康寿命の延長のためにも梗塞後の心不全発症を抑制することは極めて重要な案件である。

くり返す心筋梗塞後の心機能低下に対して、二次予防および心筋リモデリング抑制というアプローチがあげられる。加齢そのものが発症のリスクファクターであるため、今後わが国が迎える超高齢化社会の到来にあたり、心筋梗塞二次予防の重要性が増している。一方で心筋梗塞のリスクファクターである生活習慣病のうち、その発症・予後に最も影響

を与えるとされる糖尿病およびその予備軍は、生活習慣の変化、高齢化をうけて非常な勢いで増加している。したがって今後わが国の心筋梗塞二次予防において、耐糖能異常への新たな対処の必要性が高まっている。

血糖の上昇は酸化ストレスを引き起こすことが知られており、食後高血糖のみがすでに大血管障害のリスクとなり、心筋梗塞の発症リスクを高めることがわかっている(Donahue RP, et al. Diabetes 36: 689-692,1987)。そこで心筋梗塞後の症例に対して、 α グルコシダーゼ阻害薬により食後の血糖上昇を抑えることが、心筋梗塞二次予防につながると考え我々は本研究を立案した。当該患者数が相当数にのぼる治療法は、当然のことながら検討段階から安全な薬剤の使用が必須である。われわれが考慮している α グルコシダーゼ阻害薬は、血中には原則取り込まれず、消化管にとどまり糖分の吸収を抑える薬剤であるため、幅広い患者層への適用が可能であると考えられる。

当該研究期間3年の研究計画

1年目 研究体制の整備、症例エントリーの開始、動物実験による検討

当該年度は、参加予定施設を含めたキックオフミーティングを開催しプロトコルの確定を行った。また、インターネットを用いた登録のためホームページを立ち上げ、予定通りエントリーを開始した。また、実験動物を使った評価系において耐糖能異常と心不全の関連について検討した。

2年目 症例のエントリー、エントリーされた症例の観察、動物実験による検討

3年目 エントリーされた症例の観察、データ解析

D. 考察

心機能と生体の糖利用は密接な関係にあることが基礎医学の成果として明らかになりつつある。本研究は大規模臨床研究にて、抗高血糖薬の投与により心筋梗塞二次予防が可能であるかを臨床的に検討するものであり、以下の結果が期待される。

1. 心筋梗塞の二次予防により慢性心不全患者の増加を抑制できれば、厚生行政面においては大幅な医療費抑制効果が期待され、また医療面においては患者のQOLの著明な改善、健康寿命の延長が期待できる。
2. 包括医療制度の導入により急性心筋梗塞を含めた心血管イベントの発症数の減少は、そのまま医療費の抑制につながる。

E.結論

糖利用の正常化は、新しい心血管疾患の治療法になりうると考えられた。

F.健康危険情報

特記なし

G.研究発表

1. 論文発表

特記なし

2. 学会発表

特記なし

H.知的財産権の出願・登録情報(予定を含む)

1. 特許取得

特記なし

2. 実用新案登録

特記なし

3. その他

特記なし

分担研究報告書

食後血糖上昇の抑制による心筋梗塞二次予防に関する大規模薬剤介入臨床研究

分担研究者 金 智隆 国立循環器病センター 医師

研究要旨

現在わが国における心臓死は全国民死亡原因の第2位を占めている。なかでも慢性心不全患者は増加し続けており、その原因として心筋梗塞後心ポンプ機能低下が重要である。慢性心不全による繰り返す入院、多種類の治療薬の使用は医療費増加につながり、厚生行政上の重要課題となっている。また臨床的見地からも、梗塞後慢性心不全患者のQOLは低く、健康寿命の延長のためにも梗塞後心不全の発症を抑制することは極めて重要な案件である。

今後わが国が迎える超高齢化社会の到来を考慮すると、心筋梗塞の二次予防というアプローチが特に重要となる。心筋梗塞のリスクファクターである生活習慣病のうち、発症およびその予後に最も影響を与える糖尿病は、食後高血糖のみを有する糖尿病予備軍とともに非常な勢いで増加している。血糖値の上昇は酸化ストレスを引き起こすことが知られており、食後の高血糖のみがすでに大血管障害のリスクとなり、心筋梗塞の発症リスクを高めることが報告されている(Donahue RP, et al. Diabetes 36: 689-692,1987)。そこで心筋梗塞後患者の食後の血糖上昇を抑えることが、心筋梗塞二次予防につながると考え、我々は本研究を立案した。本研究は急性心筋梗塞で入院した症例に対して α グルコシダーゼ阻害薬を投与し、その心血管イベントの抑制効果の有無を全国100施設と共同した多施設大規模臨床試験にて検討する。

かかる大規模多施設臨床研究の成否にはサンプルサイズおよび質の高いデータの確保が重要な要素となる。我々は厚生科研 効果的医療技術の確立推進臨床研究事業 虚血・再灌流における心筋保護に関する大規模無作為薬剤効果比較試験(課題番号H14—心筋—006、JWIND試験)にて、心筋梗塞における急性期の薬剤介入という困難な性格であるにもかかわらず、全国68施設との共同で700例を超えんとする症例の登録を得て解析しつつある実績を有する。心筋梗塞の多施設臨床研究チームとしてネットワークがすでに確立されている

我々の研究グループは、そのインフラストラクチャーを活用することにより、本研究の遂行能力を十分有するものと考えられる。

A. 研究目的

血糖の上昇は酸化ストレスを引き起こすことが知られており、食後高血糖のみがすでに大血管障害のリスクとなり、心筋梗塞の発症リスクを高めることがわかっている(Donahue RP, et al. Diabetes 36: 689-692,1987)。そこで心筋梗塞後の症例に対して、 α グルコシダーゼ阻害薬により食後の血糖上昇を抑えることが、心筋梗塞二次予防につながると考え我々は本研究を立案した。当該患者数が相当数にのぼる治療法は、当然のことながら検討段階から安全な薬剤の使用が必須である。われわれが考慮している α グルコシダーゼ阻害薬は、血中には原則取り込まれず、消化管にとどまり糖分の吸収を抑える薬剤であるため、幅広い患者層への適用が可能であると考えられる。

B. 研究方法

食後血糖上昇の抑制による心筋梗塞二次予防に関する大規模薬剤介入臨床研究

[対象]

急性心筋梗塞と診断され、再灌流療法をうけた20才以上の症例

[除外基準]

α グルコシダーゼ阻害薬がすでに投与されている症例

低血糖発作の既往のある症例

その他、重篤な肝障害、腎障害や同意の得られない症例、不適當と考えられる症例

[方法]

エントリー時に α グルコシダーゼ阻害薬が投与されていない症例を無作為割付により2群にわけて、 α グルコシダーゼ阻害薬投与(ボグリボース、1回0.2mg 1日3回毎食直前)群と偽薬投与群に割り付

ける。以後3年間フォローアップし心血管イベント、心不全への進展、心筋リモデリングおよび糖尿病の発症につき2群間で比較検討する。またエントリ一時の顕性糖尿病の有無で層別解析をする。フォローアップ期間は6ヶ月ごとにデータ登録を行い、心血管イベントおよび糖尿病の状況(空腹時血糖、HbA1C)、内服状況を調査していく。

[目標症例数]

4000症例(コントロール群2000症例、 α グルコシダーゼ阻害薬群2000症例)

[参加予定施設]

全国100施設

国立循環器病センター、駿河台日本大学病院、りんくう総合医療センター市立泉佐野病院、宇和島市立宇和島病院、新別府病院など厚生科研 課題番号H14—心筋—006(JWIND試験)参加68施設に加え、計100施設での共同研究を計画している。

[中央予定施設]

国立循環器病センター

[評価項目]

プライマリーエンドポイント

心血管イベント(死亡、心疾患による入院、再梗塞、心不全、再インターベンション、CABG)

セカンダリーエンドポイント

死亡率
インターベンション後再狭窄
心筋リモデリング(心エコー、核医学検査、BNP)
慢性心不全への移行の抑制(心不全による入院、NYHA)

脳血管障害の発症

糖尿病の発症

[割り付け方法]

インターネットを利用した中央割付法

[サブスタディ]

データマイニング

フォローアップの際に、他の内服薬もすべて検討し、治療法最適化をデータマイニング法にて検討する。

SNPを用いた薬剤効果の検討

現在医療費の高騰から、テーラーメイド医療の重要性が強く訴えられている。

α グルコシダーゼ阻害薬の効果がみられた群とない群において各種動脈硬化関連遺伝子、心筋梗塞関連遺伝子、糖尿病関連遺伝子のSNPを用いて検討を行う。

[動物実験による検討]

糖尿病マウスを利用した、長期間高血糖状態がマウス心筋代謝に与える影響の検討

耐糖能異常の梗塞後心筋に与える影響を検討するため、KKAyなどの糖尿病マウスに心筋梗塞を作成し、高血糖状態に長期間さらされることによりいかなる遺伝子発現変化をきたすかをaffimetrix社製のmicro chipを利用して解析する。また α グルコシダーゼ阻害薬等の薬剤による遺伝子発現変化を検討し、また高血糖及びその是正による心筋代謝への影響を検討する。

マウス心筋梗塞モデル、およびイヌ心筋梗塞モデルにおける食後高血糖抑制による心不全予防効果の検討

糖尿病のない野生型マウス、およびイヌに心筋梗塞を作成し、 α グルコシダーゼ阻害薬(boglibose)を経口で投与し、心エコーなどを用いて心機能を検討する。

平成16年度は、参加予定施設とキックオフミーティングを行いプロトコルの確定をすると共にインターネット登録用のホームページを立ち上げた。中央施設である国立循環器病センターの倫理審査委員会を通過し予定通りエントリが開始された。また、イヌ心不全モデルにおいて糖代謝に関連する遺伝子に変化しており、ヒト心不全症例での検討でも同様のことが見付かった。

(倫理面への配慮)

以下の点を明記し、倫理委員会の承認手続きを経て研究を開始した。拡散か施設でも同様の手続きを開始している。

(1)学研究及び医療行為の対象となる個人の人権の擁護

本研究は遺伝子情報を扱わず臨床情報のみの解析であるが、臨床データの収集は「連結匿名化」を行った上で中央解析施設(国立循環器病センター)に集積し、解析時には個人特定に繋がるデータとは切り離した状態での解析を行う。

(2)学研究及び医療行為の対象となる個人への利益と不利益

本研究で使用される薬剤は臨床の現場で日常使われている薬剤であり、開発途中のいわゆる治験薬とは根本的に異なる。本研究ではコントロール目標を立て厳密にコントロールするので、より細やかな治療を受けられる可能性がある。また検査項目に関して一般の診療に必要な物に限っており新たな採血等の必要がなく対象となる個人への負担は少ない。個人情報保護に努めれば個人への不利益は少ないものと考えられる。

(3) 医学的貢献度

我が国における心不全による死亡は全死因の第二位を占めており、その抑止は社会的急務となっている。特に心筋梗塞後の心機能低下に起因する慢性心不全については、5年生存率が50%以下と低いことから、その改善が急がれている。心筋梗塞後の心機能低下は再梗塞によりその危険性が増大する。心筋梗塞再発予防における大規模薬剤介入を念頭に置いた本研究は、医学的貢献度も非常に高いと考える。

(4) 医学研究及び医療行為の対象となる個人に理解を求め同意を得る方法

患者さん用説明文書を用いて、研究遂行者の担当者が説明し、別紙の同意文書により同意を得る。

(5) 動物を用いた実験について

動物実験は施設の倫理規定に基づき審査に通過した実験のみを行い、マウス等動物の生命を最大限尊重し、効率的に実験を進める。

C. 研究結果

現在わが国において、心臓死は全国民死亡原因の第2位を占めている。なかでも慢性心不全患者は増加し続けており、その原因としては心筋梗塞後の心機能低下が重要である。くり返す入院、多種類の治療薬の使用は医療費増加につながり、厚生行政上の重要課題である。また臨床的見地からも、梗塞後心不全患者のQOLは低く、健康寿命の延長のためにも梗塞後の心不全発症を抑制することは極めて重要な案件である。

くり返す心筋梗塞後の心機能低下に対して、二次予防および心筋リモデリング抑制というアプローチがあげられる。加齢そのものが発症のリスクファクターであるため、今後わが国が迎える超高齢化社会の到来にあたり、心筋梗塞二次予防の重要性が増している。一方で心筋梗塞のリスクファクターである生活習慣病のうち、その発症・予後に最も影響

を与えるとされる糖尿病およびその予備軍は、生活習慣の変化、高齢化をうけて非常に勢いで増加している。したがって今後わが国の心筋梗塞二次予防において、耐糖能異常への新たな対処の必要性が高まっている。

血糖の上昇は酸化ストレスを引き起こすことが知られており、食後高血糖のみがすでに大血管障害のリスクとなり、心筋梗塞の発症リスクを高めることがわかっている(Donahue RP, et al. Diabetes 36: 689-692, 1987)。そこで心筋梗塞後の症例に対して、 α グルコシダーゼ阻害薬により食後の血糖上昇を抑えることが、心筋梗塞二次予防につながると考え我々は本研究を立案した。当該患者数が相当数にのぼる治療法は、当然のことながら検討段階から安全な薬剤の使用が必須である。われわれが考慮している α グルコシダーゼ阻害薬は、血中には原則取り込まれず、消化管にとどまり糖分の吸収を抑える薬剤であるため、幅広い患者層への適用が可能であると考えられる。

当該研究期間3年の研究計画

1年目 研究体制の整備、症例エントリーの開始、動物実験による検討

当該年度は、参加予定施設を含めたキックオフミーティングを開催しプロトコルの確定を行った。また、インターネットを用いた登録のためホームページを立ち上げ、予定通りエントリーを開始した。また、実験動物を使った評価系において耐糖能異常と心不全の関連について検討した。

2年目 症例のエントリー、エントリーされた症例の観察、動物実験による検討

3年目 エントリーされた症例の観察、データ解析

D. 考察

心機能と生体の糖利用は密接な関係にあることが基礎医学の成果として明らかになりつつある。本研究は大規模臨床研究にて、抗高血糖薬の投与により心筋梗塞二次予防が可能であるかを臨床的に検討するものであり、以下の結果が期待される。

1. 心筋梗塞の二次予防により慢性心不全患者の増加を抑制できれば、厚生行政面においては大幅な医療費抑制効果が期待され、また医療面においては患者のQOLの著明な改善、健康寿命の延長が期待できる。
2. 包括医療制度の導入により急性心筋梗塞を含めた心血管イベントの発症数の減少は、そのまま医療費の抑制につながる。

E.結論

糖利用の正常化は、新しい心血管疾患の治療法になりうると考えられた。

F.健康危険情報

特記なし

G.研究発表

1. 論文発表

特記なし

2. 学会発表

特記なし

H.知的財産権の出願・登録情報(予定を含む)

1. 特許取得

特記なし

2. 実用新案登録

特記なし

3. その他

特記なし

分担研究報告書

食後血糖上昇の抑制による心筋梗塞二次予防に関する大規模薬剤介入臨床研究

分担研究者 吉政 康直 国立循環器病センター 部長

研究要旨

現在わが国における心臓死は全国民死亡原因の第2位を占めている。なかでも慢性心不全患者は増加し続けており、その原因として心筋梗塞後心ポンプ機能低下が重要である。慢性心不全による繰り返す入院、多種類の治療薬の使用は医療費増加につながり、厚生行政上の重要課題となっている。また臨床的見地からも、梗塞後慢性心不全患者のQOLは低く、健康寿命の延長のためにも梗塞後心不全の発症を抑制することは極めて重要な案件である。

今後わが国が迎える超高齢化社会の到来を考慮すると、心筋梗塞の二次予防というアプローチが特に重要となる。心筋梗塞のリスクファクターである生活習慣病のうち、発症およびその予後に最も影響を与える糖尿病は、食後高血糖のみを有する糖尿病予備軍とともに非常な勢いで増加している。血糖値の上昇は酸化ストレスを引き起こすことが知られており、食後の高血糖のみがすでに大血管障害のリスクとなり、心筋梗塞の発症リスクを高めることが報告されている(Donahue RP, et al. Diabetes 36: 689-692,1987)。そこで心筋梗塞後患者の食後の血糖上昇を抑えることが、心筋梗塞二次予防につながると考え、我々は本研究を立案した。本研究は急性心筋梗塞で入院した症例に対して α グルコシダーゼ阻害薬を投与し、その心血管イベントの抑制効果の有無を全国100施設と共同した多施設大規模臨床試験にて検討する。

かかる大規模多施設臨床研究の成否にはサンプルサイズおよび質の高いデータの確保が重要な要素となる。我々は厚生科研 効果的医療技術の確立推進臨床研究事業 虚血・再灌流における心筋保護に関する大規模無作為薬剤効果比較試験(課題番号H14—心筋—006、JWIND試験)にて、心筋梗塞における急性期の薬剤介入という困難な性格であるにもかかわらず、全国68施設との共同で700例を超えんとする症例の登録を得て解析しつつある実績を有する。心筋梗塞の多施設臨床研究チームとしてネットワークがすでに確立されている

我々の研究グループは、そのインフラストラクチャーを活用することにより、本研究の遂行能力を十分有するものと考えられる。

A. 研究目的

血糖の上昇は酸化ストレスを引き起こすことが知られており、食後高血糖のみがすでに大血管障害のリスクとなり、心筋梗塞の発症リスクを高めることがわかっている(Donahue RP, et al. Diabetes 36: 689-692,1987)。そこで心筋梗塞後の症例に対して、 α グルコシダーゼ阻害薬により食後の血糖上昇を抑えることが、心筋梗塞二次予防につながると考え我々は本研究を立案した。当該患者数が相当数にのぼる治療法は、当然のことながら検討段階から安全な薬剤の使用が必須である。われわれが考慮している α グルコシダーゼ阻害薬は、血中には原則取り込まれず、消化管にとどまり糖分の吸収を抑える薬剤であるため、幅広い患者層への適用が可能であると考えられる。

B. 研究方法

食後血糖上昇の抑制による心筋梗塞二次予防に関する大規模薬剤介入臨床研究

[対象]

急性心筋梗塞と診断され、再灌流療法をうけた20才以上の症例

[除外基準]

α グルコシダーゼ阻害薬がすでに投与されている症例
低血糖発作の既往のある症例
その他、重篤な肝障害、腎障害や同意の得られない症例、不適當と考えられる症例

[方法]

エンリー時に α グルコシダーゼ阻害薬が投与されていない症例を無作為割付により2群にわけて、 α グルコシダーゼ阻害薬投与(ボグリボース、1回0.2mg 1日3回毎食直前)群と偽薬投与群に割り付

ける。以後3年間フォローアップし心血管イベント、心不全への進展、心筋リモデリングおよび糖尿病の発症につき2群間で比較検討する。またエントリー時の顕性糖尿病の有無で層別解析をする。フォローアップ期間は6ヶ月ごとにデータ登録を行い、心血管イベントおよび糖尿病の状況(空腹時血糖、HbA1C)、内服状況を調査していく。

[目標症例数]

4000症例(コントロール群2000症例、 α グルコシダーゼ阻害薬群2000症例)

[参加予定施設]

全国100施設

国立循環器病センター、駿河台日本大学病院、りんくう総合医療センター市立泉佐野病院、宇和島市立宇和島病院、新別府病院など厚生科研 課題番号H14—心筋—006(JWIND試験)参加68施設に加え、計100施設での共同研究を計画している。

[中央予定施設]

国立循環器病センター

[評価項目]

プライマリーエンドポイント

心血管イベント(死亡、心疾患による入院、再梗塞、心不全、再インターベンション、CABG)

セカンダリーエンドポイント

死亡率
インターベンション後再狭窄
心筋リモデリング(心エコー、核医学検査、BNP)
慢性心不全への移行の抑制(心不全による入院、NYHA)

脳血管障害の発症

糖尿病の発症

[割り付け方法]

インターネットを利用した中央割付法

[サブスタディ]

データマイニング

フォローアップの際に、他の内服薬もすべて検討し、治療法最適化をデータマイニング法にて検討する。

SNPを用いた薬剤効果の検討

現在医療費の高騰から、テーラーメイド医療の重要性が強く訴えられている。

α グルコシダーゼ阻害薬の効果がみられた群とない群において各種動脈硬化関連遺伝子、心筋梗塞関連遺伝子、糖尿病関連遺伝子のSNPを用いて検討を行う。

[動物実験による検討]

糖尿病マウスを利用した、長期間高血糖状態がマウス心筋代謝に与える影響の検討

耐糖能異常の梗塞後心筋に与える影響を検討するため、KKAYなどの糖尿病マウスに心筋梗塞を作成し、高血糖状態に長期間さらされることによりいかなる遺伝子発現変化をきたすかをaffimetrix社製のmicro chipを利用して解析する。また α グルコシダーゼ阻害薬等の薬剤による遺伝子発現変化を検討し、また高血糖及びその是正による心筋代謝への影響を検討する。

マウス心筋梗塞モデル、およびイヌ心筋梗塞モデルにおける食後高血糖抑制による心不全予防効果の検討

糖尿病のない野生型マウス、およびイヌに心筋梗塞を作成し、 α グルコシダーゼ阻害薬(boglibose)を経口で投与し、心エコーなどを用いて心機能を検討する。

平成16年度は、参加予定施設とキックオフミーティングを行いプロトコルの確定をすると共にインターネット登録用のホームページを立ち上げた。中央施設である国立循環器病センターの倫理審査委員会を通過し予定通りエントリーが開始された。また、イヌ心不全モデルにおいて糖代謝に関連する遺伝子に変化しており、ヒト心不全症例での検討でも同様のことが見付かった。

(倫理面への配慮)

以下の点を明記し、倫理委員会の承認手続きを経て研究を開始した。拡散か施設でも同様の手続きを開始している。

(1) 研究及び医療行為の対象となる個人の人権の擁護

本研究は遺伝子情報を扱わず臨床情報のみの解析であるが、臨床データの収集は「連結匿名化」を行った上で中央解析施設(国立循環器病センター)に集積し、解析時には個人特定に繋がるデータとは切り離れた状態での解析を行う。

(2) 医学研究及び医療行為の対象となる個人への利益と不利益

本研究で使用される薬剤は臨床の現場で日常使われている薬剤であり、開発途中のいわゆる治験薬とは根本的に異なる。本研究ではコントロール目標を立て厳密にコントロールするので、より細やかな治療を受けられる可能性がある。また検査項目に関して一般の診療に必要な物に限っており新たな採血等の必要がなく対象となる個人への負担は少ない。個人情報保護に努めれば個人への不利益は少ないものと考えられる。

(3) 医学的貢献度

我が国における心不全による死亡は全死因の第二位を占めており、その抑止は社会的急務となっている。特に心筋梗塞後の心機能低下に起因する慢性心不全については、5年生存率が50%以下と低いことから、その改善が急がれている。心筋梗塞後の心機能低下は再梗塞によりその危険性が増大する。心筋梗塞再発予防における大規模薬剤介入を念頭に置いた本研究は、医学的貢献度も非常に高いと考える。

(4) 医学研究及び医療行為の対象となる個人に理解を求め同意を得る方法

患者さん用説明文書を用いて、研究遂行者の担当者が説明し、別紙の同意文書により同意を得る。

(5) 動物を用いた実験について

動物実験は施設の倫理規定に基づき審査に通過した実験のみを行い、マウス等動物の生命を最大限尊重し、効率的に実験を進める。

C. 研究結果

現在わが国において、心臓死は全国民死亡原因の第2位を占めている。なかでも慢性心不全患者は増加し続けており、その原因としては心筋梗塞後の心機能低下が重要である。くり返す入院、多種類の治療薬の使用は医療費増加につながり、厚生行政上の重要課題である。また臨床的見地からも、梗塞後心不全患者のQOLは低く、健康寿命の延長のためにも梗塞後の心不全発症を抑制することは極めて重要な案件である。

くり返す心筋梗塞後の心機能低下に対して、二次予防および心筋リモデリング抑制というアプローチがあげられる。加齢そのものが発症のリスクファクターであるため、今後わが国が迎える超高齢化社会の到来にあたり、心筋梗塞二次予防の重要性が増している。一方で心筋梗塞のリスクファクターである生活習慣病のうち、その発症・予後に最も影響

を与えるとされる糖尿病およびその予備軍は、生活習慣の変化、高齢化をうけて非常に勢いで増加している。したがって今後わが国の心筋梗塞二次予防において、耐糖能異常への新たな対処の必要性が高まっている。

血糖の上昇は酸化ストレスを引き起こすことが知られており、食後高血糖のみがすでに大血管障害のリスクとなり、心筋梗塞の発症リスクを高めることがわかっている(Donahue RP, et al. Diabetes 36: 689-692,1987)。そこで心筋梗塞後の症例に対して、 α グルコシダーゼ阻害薬により食後の血糖上昇を抑えることが、心筋梗塞二次予防につながると考え我々は本研究を立案した。当該患者数が相当数にのぼる治療法は、当然のことながら検討段階から安全な薬剤の使用が必須である。われわれが考慮している α グルコシダーゼ阻害薬は、血中には原則取り込まれず、消化管にとどまり糖分の吸収を抑える薬剤であるため、幅広い患者層への適用が可能であると考えられる。

当該研究期間3年の研究計画

1年目 研究体制の整備、症例エントリーの開始、動物実験による検討

当該年度は、参加予定施設を含めたキックオフミーティングを開催しプロトコルの確定を行った。また、インターネットを用いた登録のためホームページを立ち上げ、予定通りエントリーを開始した。また、実験動物を使った評価系において耐糖能異常と心不全の関連について検討した。

2年目 症例のエントリー、エントリーされた症例の観察、動物実験による検討

3年目 エントリーされた症例の観察、データ解析

D. 考察

心機能と生体の糖利用は密接な関係にあることが基礎医学の成果として明らかになりつつある。本研究は大規模臨床研究にて、抗高血糖薬の投与により心筋梗塞二次予防が可能であるかを臨床的に検討するものであり、以下の結果が期待される。

1. 心筋梗塞の二次予防により慢性心不全患者の増加を抑制できれば、厚生行政面においては大幅な医療費抑制効果が期待され、また医療面においては患者のQOLの著明な改善、健康寿命の延長が期待できる。
2. 包括医療制度の導入により急性心筋梗塞を含めた心血管イベントの発症数の減少は、そのまま医療費の抑制につながる。

E.結論

糖利用の正常化は、新しい心血管疾患の治療法になりうると考えられた。

F.健康危険情報

特記なし

G.研究発表

1. 論文発表

特記なし

2. 学会発表

特記なし

H.知的財産権の出願・登録情報(予定を含む)

1. 特許取得

特記なし

2. 実用新案登録

特記なし

3. その他

特記なし

研究成果の刊行に関する一覧表

主任研究者氏名 : 北風 政史

所属機関名 : 国立循環器病センター 職名 : 部長

課題名 : 食後血糖上昇の抑制による心筋梗塞二次予防に関する大規模薬剤介入臨床研究

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	頁	出版年
Li Y, Minamino T, et al.	Ablation of MEK kinase 1 suppresses intimal hyperplasia by impairing smooth muscle cell migration and urokinase plasminogen activator expression in a mouse blood-flow cessation model.	Circulation	111(13)	1672-8	2005
Liao Y, Asakura M, et al.	Benidipine, a long-acting calcium channel blocker, inhibits cardiac remodeling in pressure-overloaded mice.	Cardiovasc Res	65(4)	879-88	2005
Liao Y, Asakura M, et al.	Amlodipine ameliorates myocardial hypertrophy by inhibiting EGFR phosphorylation.	Biochem Biophys Res Commun	327(4)	1083-7	2005
Kim J, Washio T, et al.	A Novel Data Mining Approach to the Identification of Effective Drugs or Combinations for Targeted Endpoints—Application to Chronic Heart Failure as a New Form of Evidence-based Medicine.	Cardiovasc Drugs Ther	18(6)	483-9	2004
Fujita M, Minamino T, et al.	Selective blockade of serotonin 5-HT _{2A} receptor increases coronary blood flow via augmented cardiac nitric oxide release through 5-HT _{1B} receptor in hypoperfused canine hearts.	J Mol Cell Cardiol	37(6)	1219-23	2004

Shintani Y, Node K, et al.	Opening of Ca ²⁺ -activated K ⁺ channels is involved in ischemic preconditioning in canine hearts.	J Mol Cell Cardiol	37(6)	1213-8	2004
-------------------------------	--	-----------------------	-------	--------	------

Ablation of MEK Kinase 1 Suppresses Intimal Hyperplasia by Impairing Smooth Muscle Cell Migration and Urokinase Plasminogen Activator Expression in a Mouse Blood-Flow Cessation Model

Yan Li, MD, PhD*; Tetsuo Minamino, MD, PhD*; Osamu Tsukamoto, MD*; Toshiaki Yujiri, MD, PhD; Yasunori Shintani, MD; Ken-ichiro Okada, MD; Yoko Nagamachi, BS; Masashi Fujita, MD; Akio Hirata, MD; Shoji Sanada, MD, PhD; Hiroshi Asanuma, MD, PhD; Seiji Takashima, MD, PhD; Masatsugu Hori, MD, PhD; Gary L. Johnson, PhD; Masafumi Kitakaze, MD, PhD

Background—Migration, proliferation, and matrix-degrading protease expression of smooth muscle cells (SMCs) are major features of intimal hyperplasia after vascular injury. Although MEK kinase 1 (MEKK1) has been shown to regulate cell migration and urokinase plasminogen activator (uPA) expression, the precise role of MEKK1 in this process remains unknown.

Methods and Results—We triggered a vascular remodeling model by complete ligation of the right common carotid artery in wild-type (WT) and MEKK1-null (MEKK1^{-/-}) mice. The intimal areas 28 days after ligation were significantly decreased in the ligated MEKK1^{-/-} arteries compared with WT arteries (28±8 versus 65±17 μm², *P*<0.05). There were no differences in the ratios of proliferating cell nuclear antigen (PCNA)-positive cells to total cells within the arterial wall between WT and MEKK1^{-/-} arteries. Proliferation capacity also did not differ between WT and MEKK1^{-/-} cultured aortic smooth muscle cells (AoSMCs). In contrast, the number of intimal PCNA-positive cells 7 days after ligation was significantly smaller in MEKK1^{-/-} arteries. Three different migration assays revealed that migration and invasion of MEKK1^{-/-} AoSMCs were markedly impaired. Addition of full-length MEKK1 restored the migration capacity of MEKK1^{-/-} AoSMCs. The number of MEKK1^{-/-} AoSMCs showing lamellipodia formation by epithelial growth factor was significantly smaller compared with those of WT SMCs. Furthermore, uPA expression after ligation was markedly decreased in MEKK1^{-/-} arteries.

Conclusions—MEKK1 is implicated in vascular remodeling after blood-flow cessation by regulating the migration and uPA expression of SMCs. MEKK1 is a potential target for drug development to prevent vascular remodeling. (*Circulation*. 2005;111:1672-1678.)

Key Words: remodeling ■ muscle, smooth ■ vasculature ■ restenosis

Blood vessels respond to damaging stimuli by activating a remodeling mechanism that leads to intimal hyperplasia.^{1,2} Accumulating evidence has shown that the underlying causes of intimal hyperplasia are the invasion and proliferation of vascular smooth muscle cells (SMCs), both of which processes are triggered and controlled by numerous growth factors and mitogens.² Cell invasion involves migration by cytoskeletal reorganization³ and activation of a cascade of proteases that degrade various extracellular matrix (ECM) components.² Urokinase-type plasminogen activator (uPA) is

responsible for degradation of the ECM.⁴ Recent studies in uPA-deficient mice have demonstrated that the number of neointimal SMCs after injury is markedly reduced compared with those in wild-type (WT) mice, suggesting that uPA plays a critical role in cell invasion during vascular remodeling.⁵

MEK kinase 1 (MEKK1) is a 196-kDa, mitogen-activated protein kinase kinase kinase (MAP3K) that acts as an upstream regulator of several MAPK pathways.⁶⁻⁸ MEKK1 has been implicated in diverse and cell type-specific biological responses, including cardiac hypertrophy,⁶ cell survival,⁷

Received August 26, 2004; revision received November 16, 2004; accepted November 18, 2004.

From the Department of Internal Medicine and Therapeutics (Y.L., T.M., O.T., Y.S., K.-i.O., Y.N., M.F., A.H., S.S., H.A., S.T., M.H.), Osaka University Graduate School of Medicine, Suita, Osaka, Japan; the Department of Cardiovascular Medicine (M.K.), National Cardiovascular Center, Suita, Osaka, Japan; the Department of Cardiology (Y.L.), Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, People's Republic of China; the Department of Bio-Signal Analysis (T.Y.), Yamaguchi University Graduate School of Medicine, Ube, Yamaguchi, Japan; and the Department of Pharmacology (G.L.J.), University of North Carolina School of Medicine, Chapel Hill, NC.

*Drs Li, Minamino, and Tsukamoto contributed equally to this work.

Correspondence to Tetsuo Minamino, MD, PhD, Division of Cardiology, Department of Internal Medicine and Therapeutics, Osaka University Graduate School of Medicine, 2-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan. E-mail minamino@medone.med.osaka-u.ac.jp

© 2005 American Heart Association, Inc.

Circulation is available at <http://www.circulationaha.org>

DOI: 10.1161/01.CIR.0000160350.20810.0F

and apoptosis.⁸ Recent studies on MEKK1-null (MEKK1^{-/-}) mice have uncovered a unique function for this protein kinase in cell migration.^{9,10} MEKK1^{-/-} mice were found to exhibit impairment of embryonic eyelid closure, a process involving epithelial cell migration.⁹ MEKK1 is also involved in growth factor-induced embryonic stem cell migration and contributes to fibroblast and epithelial cell migration *in vitro*.¹⁰ Furthermore, endogenous and overexpressed MEKK1 was reported to colocalize with the α -actinin cytoskeleton along actin stress fibers in focal adhesions.¹¹ Conversely, cytoskeletal reorganization can also lead to MEKK1 activation.¹² This close relationship between MEKK1 and the cytoskeleton implies that MEKK1 may be essential for regulating morphological changes such as the formation of lamellipodia, which proceeds to cell migration.^{3,13,14} Furthermore, MEKK1 is necessary for uPA upregulation in response to fibroblast growth factor-2 (FGF-2).¹⁵ These findings indicate that MEKK1 might play an important role in SMC migration and uPA production, both of which will affect SMC invasion during vascular remodeling. Herein, using a blood-flow cessation model in mice with targeted ablation of the *MEKK1* gene, we tested our hypothesis that MEKK1 plays a pivotal pathophysiological role in arterial remodeling by regulating SMC migration and uPA expression.

Methods

Animals and Blood-Flow Cessation Model

All animal studies were conducted in accordance with guidelines of the National Institutes of Health (Bethesda, Md) and institutional Animal Care and Use Committees. MEKK1^{-/-} mice were generated as described previously.⁹ The blood-flow cessation model was performed as reported previously.¹⁶ Carotid arteries were harvested immediately for biochemical analysis or after fixation for morphological and immunohistological analysis 1, 3, 7, and 28 days after surgery.

Morphometric and Histological Examinations

Standard hematoxylin-eosin staining, elastic van Gieson's staining, immunostaining for uPA (1:100, American Diagnostica), and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) staining (1:50, Santa Cruz) were performed on serial sections (5 μ m) within 0.5 mm proximal to the site of ligation of right common carotid arteries, as reported previously.^{17,18} The luminal, internal elastic lamina (IEL), and external elastic lamina areas were measured with Scion Image software (Scion Corp). Morphological parameters were calculated as described previously.¹⁹ In brief, the intimal area was calculated as the IEL area minus luminal area, and the medial area was the external elastic lamina area minus IEL area. The ratio of intima to media area (I/M) was calculated as intimal area/medial area, and the stenotic ratio was calculated as the intimal area/IEL area \times 100.

Primary Culture of AoSMCs and Transfection

Primary culture of aortic SMCs (AoSMCs) was performed and characterized as described previously.²⁰ Cells were identified by positive immunostaining for α -smooth muscle actin (American Research Products). AoSMCs were transiently transfected with lipofectamine and either a full-length form of MEKK1 vector (MEKK1FL) or an empty vector (pcDNA3.1).²¹ After 48 hours, SMCs were studied in migration assays or for uPA expression.

AoSMC Proliferation Assay

AoSMCs (5×10^3) were cultured for 24 hours in 96-well plates with or without epithelial growth factor (EGF, 20 ng/mL), FGF-2 (20 ng/mL, R&D Systems, Inc), or platelet-derived growth factor-BB

(PDGF-BB, 25 ng/mL, Sigma). Then, [³H]thymidine incorporation and cell number were measured, as previously reported.²²

Quantification of Scrape Wound-Induced Migration Assay

Dense monolayers of overconfluent AoSMCs grown on Laboratory-Tek chamber slides were scraped with a sterile scraper as described previously.²³ After the wound was created, cells were incubated for 24 hours with or without FGF-2 (20 ng/mL) and visualized with rhodamine-phalloidin (R-451, Molecular Probes). The number of and distance that AoSMCs migrated from the wound line were calculated as the mean of 6 different fields.

Aortic Explant Migration Assay

Preparation of aortic explants was performed as described previously.²⁴ Explants were counted as positive when >1 cell was observed and identified by positive staining for α -smooth muscle actin.

Transwell Matrigel-Coated Chamber Invasion Assay

Cell invasion was analyzed with a BioCoat Matrigel invasion chamber (BD Biosciences Corp), as described previously.²⁵ Inserts without a Matrigel coating were used as controls. FGF-2 (20 ng/mL) was added to the lower chambers as a chemoattractant. The number of invading cells was manually counted per high-power field for each condition (10 fields for each filter). The percentage of invasion was calculated as (invading cells in Matrigel inserts/migrated cells of control inserts) \times 100.

Immunofluorescence Confocal Microscopy

Immunofluorescence staining with rhodamine-phalloidin and a monoclonal antibody for uPA (1:50) was performed as described previously.²⁶ Staining was examined with a Nikon Eclipse TE2000-U confocal scanning electron microscope.

Protein Extraction and Western Blotting Analysis

Protein extraction and immunoblotting were performed as described previously.^{15,21,22} Protein phosphorylation levels were normalized to the matching densitometric values of nonphosphorylated proteins.

Statistical Analysis

All data were expressed as mean \pm SEM. Significant differences were analyzed by an unpaired Student *t* test, Fisher exact test, or ANOVA followed by the Bonferroni post hoc test. A value of $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

MEKK1 Ablation Inhibits Intimal Hyperplasia

There was no intimal thickening in unligated arteries of either WT or MEKK1^{-/-} mice. Significant neointimal growth was observed 28 days after ligation in WT mice, whereas it was much less in MEKK1^{-/-} mice (Figure 1A). Morphometric analysis of ligated arteries on day 28 revealed that the average intimal area was significantly smaller in MEKK1^{-/-} mice than in WT mice, whereas no difference in medial area was observed between WT and MEKK1^{-/-} mice (Figure 1B). Consequently, I-M ratios and stenotic ratios were significantly decreased in MEKK1^{-/-} mice compared with those in WT mice (Figure 1B).

MEKK1 Ablation Prevented Increases in the Numbers of Intimal PCNA-Positive Cells

In both WT and MEKK1^{-/-} mice, the ratios of PCNA-positive cells to total cells within the arterial wall, intima, and media were significantly increased 3 days after ligation