

Figure 4. Evaluation of cell density and matrix deposition in neointima. **A**, Ratios of intimal cell number to total intimal area evaluated on hematoxylin and eosin-stained femoral arterial sections from wild-type ($n=7$) and Smad3-null ($n=6$) mice obtained 3 weeks after the injury. **B**, Ratios of Masson's trichrome-positive intimal area to total intimal area in femoral arterial sections from wild-type ($n=7$) and Smad3-null ($n=6$) mice 3 weeks after the injury. **C** and **D**, Photomicrographs showing the representative Masson's trichrome-stained sections of wild-type (**C**) and Smad3-null (**D**) femoral arteries. Arrows indicate the positions of the internal elastic lamina. L indicates vascular lumen. Original magnification $\times 200$; bar = $50 \mu\text{m}$. * $P < 0.01$ compared with the wild type.

TGF- β . It is to be noted that lack of Smad3 did not eliminate TGF- β -induced growth suppression in SMCs (Figure 6A). The residual growth inhibitory activity is likely to depend on another mediator downstream of TGF- β receptors, possibly Smad2.

Ashcroft et al³⁷ reported that Smad3 is required for TGF- β -induced migration of monocytes, leukocytes, and keratinocytes. Unexpectedly, Smad3-null SMCs were able to migrate toward TGF- β (Figure 6B). The finding suggests that, in contrast to the growth inhibitory function, Smad3-dependent signal is not essential for chemotaxis by TGF- β in murine vascular SMCs. It is therefore likely that the ability of medial SMCs to migrate into intima is preserved in Smad3-null arteries. The signaling pathway responsible for TGF- β -induced SMC motility remains to be elucidated.

TGF- β is known as a potent inducer of ECM deposition. It has been demonstrated that overexpression and intravenous administration of TGF- β caused arterial intimal thickening largely consisted of increased ECM.^{10,44} TGF- β exerts fibrogenic activity through enhancement of ECM synthesis as well as inhibition of ECM degradation by downregulating MMP expression and upregulating MMP inhibitors.⁶⁻⁸ Previous studies, mainly performed on dermal fibroblasts, showed that TGF- β -mediated regulation of many ECM-related genes, such as type I, III, V, and VI collagens, TIMP-1 and MMP-1 was Smad3-dependent.⁴⁵⁻⁴⁷ In this study, we reported that Smad3-null neointima was rich in SMCs with relatively less matrix-deposition compared with wild-type intima, as evaluated by intimal cell density and Masson's trichrome staining (Figure 4), confirming a crucial role of Smad3-dependent signals in vascular ECM regulation. Moreover, TGF- β was unable to enhance mRNA expression of COL1A2 and TIMP-1 or suppress MT1-MMP expression in Smad3-null SMCs (Figure 7), establishing Smad3-dependency of these genes in vascular SMCs. Regulation of MMP-2 or gelatinase also seems to depend on Smad3-pathway in SMCs, because

TGF- β attenuated MMP-2 activity in the culture media of wild-type but not in Smad3-null SMCs. Because degradation of matrix scaffold by MMPs enables cell movement and general tissue reorganization,^{38,39} inability of TGF- β to suppress MMPs in Smad3-null SMCs may facilitate cell migration from media to intima in vivo.⁴⁸ Our in vitro finding that Smad3-null SMCs show a higher migration than wild-type at 10 ng/mL TGF- β (Figure 6B) may support this idea. MMP activity uninhibited by TGF- β as well as decreased matrix deposition might also have contributed to enhancement of intimal thickening in Smad3-null mice.

There have been reports on injury models suggesting that TGF- β promotes intimal thickening.^{3,9-13,49} The present result that Smad3 deficiency accelerates intimal response to injury appears inconsistent with these results. However, we do not think that our findings contradict other reports on TGF- β transgene or antagonism. Our model differs from any other previous models in the point it specifically lacks Smad3 signal but not other TGF- β signal components, eg, Smad2 and MAP kinases. Smad3 not only transduces signal downstream of TGF- β , but also plays a major role in signaling of activins,^{22,23} other members of the TGF- β superfamily. Activin A is expressed in atherosclerotic lesion⁵⁰ and promotes the contractile or nonproliferative phenotype of SMCs,⁵¹ playing a role in stabilization of atherosclerotic plaque. Adenovirus-mediated overexpression of activin A suppresses neointimal formation.⁵¹ Although we have not examined the involvement of activin A in the present study, it is assumable that the defect in activin A signal in addition to TGF- β accounts for the drastic neointimal hyperplasia in Smad3-null mice. It is of interest to determine whether specific activation of Smad3 in arterial SMCs in vivo attenuates neointimal hyperplasia. As another possibility, proinflammatory status caused by systemic Smad3 deficiency²⁷ might have influenced neointimal response. Although our BMT results (Figure 2D through 2F) show that the degree of intimal hyper-

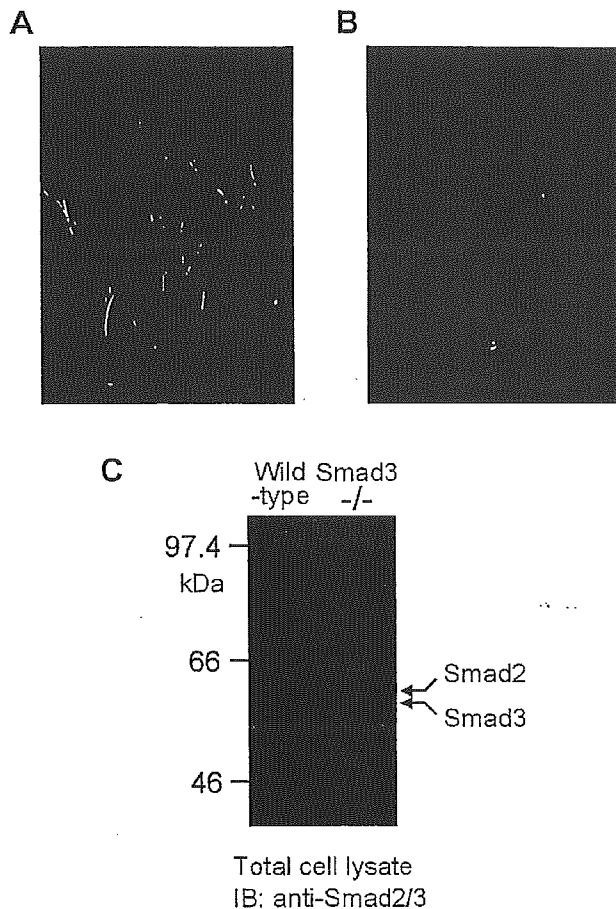


Figure 5. Characterization of cultured mice aortic SMCs. SMCs enzymatically isolated from the aorta of wild-type mice were immunocytochemically stained using anti-SMA (A, green) and anti-SMM (B, red) antibodies, counterstained with DAPI (blue, for nuclei), and subjected to fluorescent microscopy. Original magnification $\times 200$. C, Total cell lysates of wild-type and Smad3-null SMCs were analyzed by SDS-PAGE and subjected to immunoblotting with an anti-Smad2/3 antibody. Migration positions of Smad2 and Smad3 are indicated.

plasia mainly depends on the origin of blood vessels and not of bone marrow cells, further investigation is needed to elucidate the entire role of inflammation in Smad3-null vascular response.

Finally, overactivation of TGF- β -Smad3 pathway is implicated in various fibrotic diseases involving organs such as skin, lung, liver, and kidney. Molecular agents that block Smad3-dependent TGF- β signal are anticipated as an ideal therapeutic option for these disorders.⁴⁶ However, our present results lead us to surmise that systemic suppression of Smad3 signaling can cause undesirable effects in the arteries by facilitating proliferative intimal lesions. Therefore, selective drug-delivery to the affected organs as well as careful monitoring of possible vascular lesions should be considered on clinical application of Smad3 inhibitors for fibrotic diseases.

In conclusion, mice lacking Smad3 developed marked neointimal hyperplasia on injury accompanying modulation of growth and matrix regulation in vascular SMCs. This study

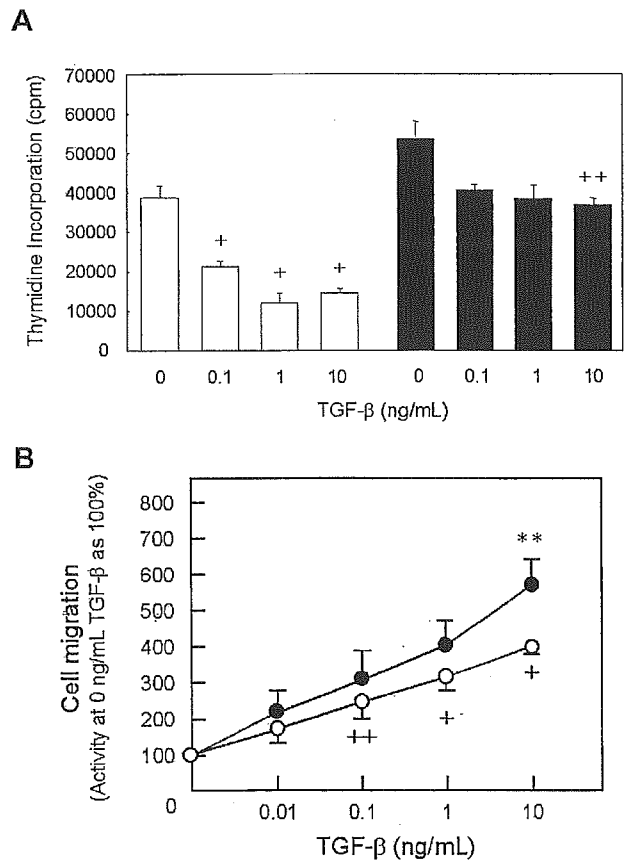


Figure 6. TGF- β -induced growth inhibition and migration of wild-type and Smad3-null SMCs. A, Wild-type (open columns) and Smad3-null (closed columns) SMCs were assayed for TGF- β -induced growth inhibition using ^3H -thymidine incorporation. Data are expressed as the means of three separate experiments, each performed in quadruplicate. $+P < 0.01$, $++P < 0.05$, compared with the value of 0 ng/mL TGF- β . B, Migration of wild-type (open circles) and Smad3-null (closed circles) SMCs toward various doses of TGF- β was measured by use of modified Boyden chamber method. Data represent the percentage of cell numbers relative to those in the absence of TGF- β and are expressed as the means of 5 separate experiments, each performed in triplicate. $+P < 0.01$, $++P < 0.05$, compared with the value of 0 ng/mL TGF- β . $**P < 0.05$, compared with the value of wild-type at 10 ng/mL TGF- β .

documents direct evidence and novel information on the functional significance: a vasculoprotective role of Smad3-dependent TGF- β signaling in response to injury.

Acknowledgments

This study is supported by Grants-in-Aids for Scientific Research from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, and the Ministry of Health, Labor and Welfare, Japan Heart Foundation, grants from Mitsui Sumitomo Welfare Foundation and NOVARTIS Foundation for Gerontological Research to Koutaro Yokote. We thank Drs A. Roberts and C. Deng (National Institutes of Health, USA) for providing us with heterozygous mice for Smad3 disruption, Drs K. Harigaya and M. Higashi for valuable advice on histological examination, Drs K. Sonezaki and T. Tokuyama for fruitful discussion, and A. Takada for technical assistance.

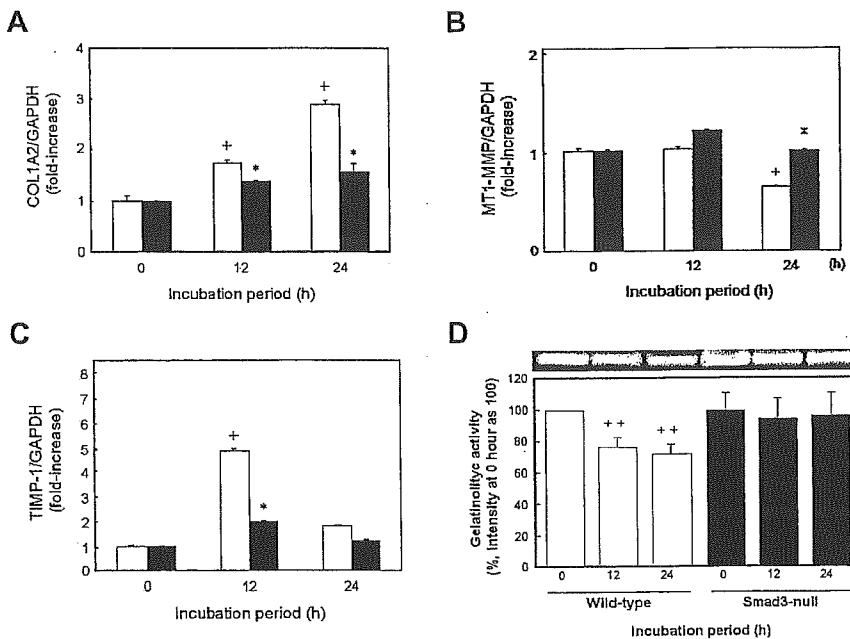


Figure 7. Effect of TGF- β on expression of type I collagen, MMPs, and TIMP-1 in wild-type and Smad3-null SMCs. Transcript levels of COL1A2 (A), MT1-MMP (B), and TIMP-1 (C) in wild-type and Smad3-null SMCs treated with TGF- β . Wild-type (open columns) and Smad3-null (closed columns) SMC were incubated with 10 ng/mL TGF- β for the indicated periods, the total RNA was isolated and used for cDNA synthesis. Quantitative real-time PCR was performed using the SYBR Green PCR Master Mix and analyzed on an ABI PRISM 7000 Sequence Detector System. Data were calculated relative to the value for the cells without TGF- β and are expressed as the means of 3 separate experiments, each performed in triplicate. ⁺ $P < 0.01$, compared with the value of 0 hour; ^{*} $P < 0.01$, compared with the wild type at the same time point. D, MMP-2 gelatinolytic activity in the culture media of wild-type and Smad3-null SMCs treated with TGF- β . Culture media of SMCs incubated with 10 ng/mL TGF- β for the indicated periods was analyzed by gelatin zymogram. Proteolytic

degradation of gelatin by MMP was visualized as a translucent band on the dark background. Graph shows the gelatinolytic activity, evaluated by densitometrical scanning of the bands, relative to those of wild-type SMCs at 0 hour. Data were expressed as the means of 4 separate experiments. ⁺⁺ $P < 0.05$, compared with the value of 0 hour.

References

- Roberts AB, Sporn MB. The transforming growth factor-betas. In: Sporn MB, Roberts AB, eds. *Peptide Growth Factors and Their Receptors*. Heidelberg, Germany: Springer-Verlag; 1990;95:419–472.
- Blobe GC, Schiemann WP, Lodish HF. Role of transforming growth factor β in human disease. *N Engl J Med*. 2000;342:1350–1358.
- Nikol S, Isner JM, Pickering JG, Kearney M, Leclerc G, Weir L. Expression of transforming growth factor-beta 1 is increased in human vascular restenosis lesions. *J Clin Invest*. 1992;90:1582–1592.
- Laiho M, Rönstrand L, Heino J, Decaprio JA, Ludlow JW, Livingston DM, Massagué J. Control of junB and extracellular matrix protein expression by transforming growth factor-beta 1 is independent of simian virus 40 T antigen-sensitive growth-sensitive growth-inhibitory events. *Mol Cell Biol*. 1991;11:972–978.
- Ignatz RA, Massagué J. Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J Biol Chem*. 1986;261:4337–4345.
- Westerhausen DR Jr, Hopkins WE, Billadello JJ. Multiple transforming growth factor- β -inducible elements regulate expression of the plasminogen activator inhibitor type-1 gene in Hep G2 cells. *J Biol Chem*. 1991;266:1092–1100.
- Eickelberg O, Köhler E, Reichenberger F, Bertschin S, Woodtli T, Erne P, Perruchoud AP, Roth M. Extracellular matrix deposition by primary human lung fibroblasts in response to TGF- β 1 and TGF- β 3. *Am J Physiol*. 1999;276:L814–L824.
- Uriá JA, Jiménez MG, Balbín M, Freije JM, López-Otín C. Differential effects of transforming growth factor- β on the expression of collagenase-1 and collagenase-3 in human fibroblasts. *J Biol Chem*. 1998;273:9769–9777.
- Nabel EG, Shum L, Pompili VJ, Yang Z-Y, San H, Shu HB, Liptay S, Gold L, Gordon D, Derynck R, Nabel GJ. Direct transfer of transforming growth factor β 1 gene into arteries stimulates fibrocellular hyperplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90:10759–10763.
- Schulick AH, Taylor AJ, Zuo W, Qiu C-B, Dong G, Woodward RN, Agah R, Roberts AB, Virmani R, Dichek DA. Overexpression of transforming growth factor β 1 in arterial endothelium causes hyperplasia, apoptosis, and cartilaginous metaplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95:6983–6988.
- Wolf YG, Rasmussen LM, Rouslahti E. Antibodies against transforming growth factor-b1 suppresses intimal hyperplasia in a rat model. *J Clin Invest*. 1994;93:1172–1178.
- Kingston PA, Sinha S, David A, Castro MG, Lowenstein PR, Heagerty AM. Adenovirus-mediated gene transfer of a secreted transforming growth factor- β type II receptor inhibits luminal loss and constrictive remodeling after coronary angioplasty and enhances adventitial collagen deposition. *Circulation*. 2001;104:2595–2601.
- Yamamoto K, Morishita R, Tomita N, Shimozato T, Nakagami H, Kikuchi A, Aoki M, Higaki J, Kaneda Y, Ogihara T. Ribozyme oligonucleotides against transforming growth factor- β inhibited neointimal formation after vascular injury in rat model: potential application of ribozyme strategy to treat cardiovascular disease. *Circulation*. 2000;102: 1308–1314.
- Morisaki N, Kawano M, Koyama N, Koshikawa T, Umehiya K, Saito Y, Yoshida S. Effects of transforming growth factor-beta 1 on growth of aortic smooth muscle cells. Influences of interaction with growth factors, cell state, cell phenotype, and cell cycle. *Atherosclerosis*. 1991;88: 227–234.
- Goodman LV, Majack RA. Vascular smooth muscle cells express distinct transforming growth factor- β receptor phenotypes as a function of cell density in culture. *J Biol Chem*. 1989;264:5241–5244.
- Lutgens E, Gijbels M, Smook M, Heeringa P, Gotwals P, Koteliansky VE, Daemen MJ. Transforming growth factor- β mediates balance between inflammation and fibrosis during plaque progression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22:975–982.
- Mallat Z, Gojova A, Marchiol-Fournigault C, Esposito B, Kamaté C, Merval R, Fradelizi D, Tedgui A. Inhibition of transforming growth factor- β signaling accelerates atherosclerosis and induces an unstable plaque phenotype in mice. *Circ Res*. 2001;89:930–934.
- Robertson AK, Rudling M, Zhou X, Gorelik L, Flavell RA, Hansson GK. Disruption of TGF-beta signaling in T cells accelerates atherosclerosis. *J Clin Invest*. 2003;112:1342–1350.
- McCaffrey TA, Du B, Consigli S, Szabo P, Bray PJ, Hartner L, Weksler BB, Sanborn TA, Bergman G, Bush HL Jr. Genomic instability in the type II TGF- β 1 receptor gene in atherosclerotic and restenotic vascular cells. *J Clin Invest*. 1997;100:2182–2188.
- McCaffrey TA, Du B, Fu C, Bray PJ, Sanborn TA, Deutsch E, Tarazona N, Shknovtch A, Newman G, Patterson C, Bush HL Jr. The expression of TGF- β receptors in human atherosclerosis: evidence for acquired resistance to apoptosis due to receptor imbalance. *J Mol Cell Cardiol*. 1999;31:1627–1642.
- Grainger DJ, Kemp PR, Metcalfe JC, Liu AC, Lawn RM, Williams NR, Grace AA, Schofield PM, Chauhan A. The serum concentration of active

- transforming growth factor- β is severely depressed in advanced atherosclerosis. *Nat Med*. 1995;1:74–79.
22. Heldin C-H, Miyazono K, ten Dijke P. TGF- β signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature*. 1997;390:465–471.
 23. Massagué J, Chen Y-G. Controlling TGF- β signaling. *Genes Dev* 2000; 14:627–644.
 24. Sirard C, de la Pompa JL, Elia A, Itie A, Mirtsos C, Cheung A, Hahn S, Wakeham A, Schwartz L, Kern SE, Rossant J, Mak TW. The tumor suppressor gene *Smad4/Dpc4* is required for gastrulation and later for anterior development of the mouse embryo. *Genes Dev*. 1998;12:107–119.
 25. Yang X, Li C, Xu X, Deng C. The tumor suppressor SMAD4/DPC4 is essential for epiblast proliferation and mesoderm induction in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:3667–3672.
 26. Waldrip WR, Bikoff EK, Hoodless PA, Wrana JL, Robertson EJ. Smad2 signaling in extraembryonic tissues determines anterior-posterior polarity of the early mouse embryo. *Cell*. 1998;92:797–808.
 27. Yang X, Letterio JJ, Lechleider RJ, Chen L, Hayman R, Gu H, Roberts AB, Deng C. Targeted disruption of SMAD3 results in impaired mucosal immunity and diminished T cell responsiveness to TGF- β . *EMBO J*. 1999;18:1280–1291.
 28. Kikuchi S, Umemura K, Kondo K, Saniabadi AR, Nakashima M. Photochemically induced endothelial injury in the mouse as a screening model for inhibitors of vascular intimal thickening. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998;18:1069–1078.
 29. Yamashita K, Sakamoto A, Ohkubo Y, Arima M, Hatano M, Kuroda Y, Tokuhisa T. C-fos overexpression in splenic B cells augments development of marginal zone B cells. *Mol Immunol*. 2005;42:617–625.
 30. Ohmi K, Masuda T, Yamaguchi H, Sakurai T, Kudo Y, Katsuki M, Nonomura Y. A novel aortic smooth muscle cell line obtained from p53 knock out mice expresses several differentiation characteristics. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;238:154–158.
 31. Hasegawa K, Arakawa E, Oda S, Yanai N, Obinata M, Matsuda Y. Novel smooth muscle cell lines from transgenic mice harboring temperature-sensitive SV40 large T-antigen gene: temperature-dependent expression of smooth muscle myosin heavy chain-1 and calponin genes. *J Mol Cell Cardiol*. 1997;29:2177–2186.
 32. Yokote K, Mori S, Hansen K, McGlade J, Pawson T, Heldin CH, Claesson-Welsh L. Direct interaction between Shc and the platelet-derived growth factor β -receptor. *J Biol Chem*. 1994;269:15337–15343.
 33. Datto MB, Frederick JP, Pan L, Borton AJ, Zhuang Y, Wang XF. Targeted disruption of Smad3 reveals an essential role in transforming growth factor β -mediated signal transduction. *Mol Cell Biol*. 1999;19:2495–2504.
 34. Yokote K, Mori S, Siegbahn A, Ronnstrand L, Wernstedt C, Heldin CH, Claesson-Welsh L. Structural determinants in the platelet-derived growth factor α -receptor implicated in modulation of chemotaxis. *J Biol Chem*. 1996;271:5101–5111.
 35. Fischer-Dzoga K, Dimitrievich GS, Griem ML. Radiosensitivity of vascular tissue, II: differential radiosensitivity of aortic cells in vitro. *Radiat Res*. 1984;99:536–546.
 36. Waksman R, Robinson KA, Crocker IR, Gravanis MB, Cipolla GD, King SB 3rd. Endovascular low-dose irradiation inhibits neointima formation after coronary artery balloon injury in swine: a possible role for radiation therapy in restenosis prevention. *Circulation*. 1995;91:1533–1539.
 37. Ashcroft GS, Yang X, Glick AB, Weinstein M, Letterio JL, Mizel DE, Anzano M, Greenwell-Wild T, Wahl SM, Deng C, Roberts AB. Mice lacking Smad3 show accelerated wound healing and an impaired local inflammatory response. *Nat Cell Biol*. 1999;1:260–266.
 38. Lijnen HR, Soloway P, Collen D. Tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1 impairs arterial neointima formation after vascular injury in mice. *Circ Res*. 1999;85:1186–1191.
 39. Galis ZS, Johnson C, Godin D, Magid R, Shipley JM, Senior RM, Ivan E. Targeted disruption of the matrix metalloproteinase-9 gene impairs smooth muscle cell migration and geometrical arterial remodeling. *Circ Res*. 2002;91:852–859.
 40. Sato H, Takino T, Kinoshita T, Imai K, Okada Y, Stetler-Stevenson WG, Seiki M. Cell surface binding and activation of gelatinase A induced by expression of membrane-type-1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP). *FEBS Lett*. 1996;385:238–240.
 41. Grainger DJ, Kemp PR, Liu AC, Lawn RM, Metcalfe JC. Activation of transforming growth factor-beta is inhibited in transgenic apolipoprotein(a) mice. *Nature*. 1994;370:460–462.
 42. Grainger DJ, Witchell CM, Metcalfe JC. Tamoxifen elevates transforming growth factor-beta and suppresses diet-induced formation of lipid lesions in mouse aorta. *Nat Med*. 1995;1:1067–1073.
 43. McDonald CC, Alexander FE, Whyte BW, Forrest AP, Stewart HJ. Cardiac and vascular morbidity in women receiving adjuvant tamoxifen for breast cancer in a randomised trial. The Scottish Cancer Trials Breast Group. *BMJ*. 1995;311:977–980.
 44. Kanzaki T, Tamura K, Takahashi K, Saito Y, Akikusa B, Oohashi H, Kasayuki N, Ueda M, Morisaki N. In vivo effect of TGF- β 1: enhanced intimal thickening by administration of TGF- β 1 in rabbit arteries injured with a balloon catheter. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995;15:1951–1957.
 45. Yuan W, Varga J. Transforming growth factor- β repression of matrix metalloproteinase-1 in dermal fibroblasts involves Smad3. *J Biol Chem*. 2001;276:38502–38510.
 46. Xu G, Chakraborty C, Lala PK. Reconstitution of Smad3 restores TGF- β response of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 upregulation in human choriocarcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;300:383–390.
 47. Flanders KC. Smad3 as a mediator of the fibrotic response. *Int J Exp Pathol*. 2004;85:47–64.
 48. Galis ZS, Khatri JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res*. 2002;90:251–262.
 49. Chung IM, Ueno H, Pak YK, Kim JW, Choi DH, Shin GJ, Yang WI, Jang Y. Catheter-based adenovirus-mediated local intravascular gene delivery of a soluble TGF- β type II receptor using an infiltrator in porcine coronary arteries: efficacy and complications. *Exp Mol Me*. 2002;34:299–307.
 50. Inoue S, Orimo A, Hosoi T, Ikegami A, Kozaki K, Ouchi Y, Nomura S, Muramatsu M, Orimo H. Demonstration of activin-A in arteriosclerotic lesions. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994;205:441–448.
 51. Engelse MA, Neele JM, van Achtenberg TA, van Aken BE, van Schaik RH, Pannekoek H, de Vries CJ. Human activin-A is expressed in the atherosclerotic lesion and promotes the contractile phenotype of smooth muscle cells. *Circ Res*. 1999;85:931–939.

増殖因子とその受容体—PDGF, TGF- β —

小林一貴・横手幸太郎・齋藤 康
(千葉大学医学部附属病院糖尿病・代謝・内分泌内科)

1. 増殖因子とは

ヒトの身体は、数十兆の細胞が適切に配置して組織を構築し、協調しあいながら特化して生理機能を発揮している。そのためには、多種多様に分化した細胞の数のバランスが適切に制御される必要があり、このプロセスに重要な役割を果たしている物質群の一つが細胞増殖因子(以下、増殖因子)である。増殖因子とは、文字通り細胞の増殖を促進するペプチドであり、単なる栄養物でないものを指す。

代表的な増殖因子として知られる血小板由来増殖因子(platelet-derived growth factor, 以下PDGF)は、A鎖(PDGF-A), B鎖(PDGF-B)と呼ばれる2種類のポリペプチドからなる二量体分

子として、1979年に初めて精製された¹⁾。その後20年を経て、最近、PDGF-C, PDGF-Dという新しい分子が発見された²⁾。現在、PDGFには、AA, AB, BB, CC, DDという5種類の二量体アイソフォームが確認されている。これらは、主として間葉系細胞の表面に発現する2種類のPDGF受容体(α 受容体と β 受容体)と特異的に結合する(図1)。PDGF受容体はその細胞内にチロシンキナーゼ活性を有し、PDGFとの結合による二量体化を経て、その活性が上昇する。そして種々の細胞内シグナル分子をチロシンリン酸化により活性化させ、主にRas-MAPキナーゼ経路やPI3キナーゼ経路を通じて遺伝子発現や細胞骨格の変化をもたらし、細胞の増殖や遊走を刺激すると考えられている。

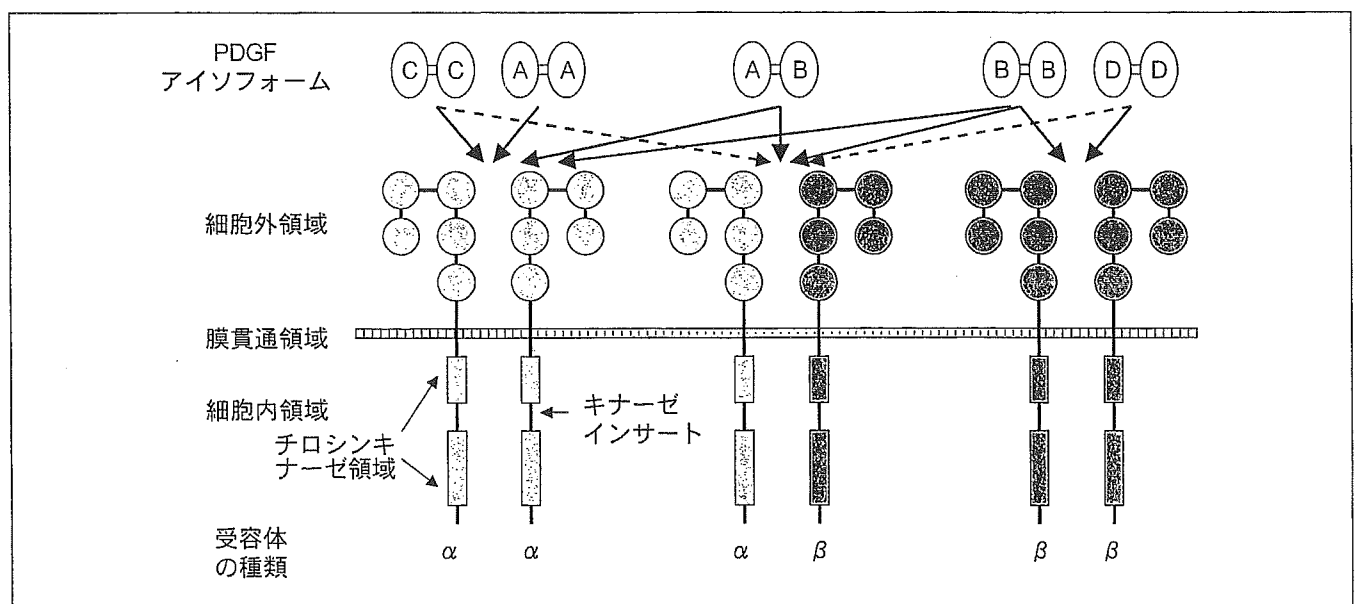


図1 5種類のPDGFアイソフォームとPDGF α , β 受容体の構造

PDGF α , β 受容体は5つの免疫グロブリンドメインからなる細胞外領域と、細胞内領域にはインサートにより分断されたキナーゼドメインを有し、ホモないしヘテロ二量体を形成する。実線は、それぞれのPDGFアイソフォームと結合し、活性化される受容体二量体の組み合わせを示す。PDGF-CCおよびDDは破線で示すヘテロ二量体をも活性化しようと報告されているが、その生物学的意義は不明である。(文献2)より改変引用)

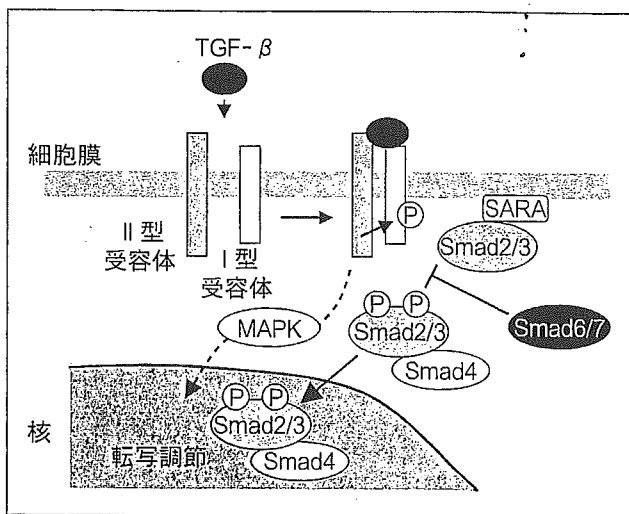


図2 TGF-βによる細胞内シグナル伝達

TGF-βが受容体に結合すると、I型受容体とII型受容体の会合が起こり、II型受容体がI型受容体の細胞膜貫通部直下をリン酸化する。これにより活性化されたI型受容体は特異的SmadであるSmad2およびSmad3をリン酸化し、これらは共有型SmadであるSmad4と複合体を結合する。Smad複合体は細胞質から核へと移行し、核内で他の転写因子と共同して標的遺伝子の発現を誘導する。一方、Smad6、Smad7はこれらのシグナルを抑制することから、抑制型Smadと呼ばれる。また、TGF-βはSmad分子とは別にある種のMAPキナーゼ(MAPK)の活性化をもたらすことも報告されている。

TGF-β(transforming growth factor-β)は、そもそもその名の通り、ある培養条件下で細胞をトランスフォームすなわち形質変換/癌化させる因子として1983年に血小板などから精製された。しかし、その後の研究から、この形質変換はTGF-βによって発現が変化する他の増殖因子などを介した間接作用であること、TGF-βの本質的な作用は逆に強力な細胞増殖抑制と細胞外マトリクス産生であることが明らかとなった³⁾。TGF-βには、I型およびII型と名付けられた2種類の受容体があり、いずれも細胞内にセリン・スレオニンキナーゼ活性を有する。図2に示すように、TGF-βとの結合により活性化された受容体は、Smadと呼ばれる細胞内シグナル分子をセリン・スレオニンリン酸化する。自身が転写因子であるSmad分子は核内へと移行し、各種遺伝子の発現を調節し、増殖抑制作用、マトリクス産生作用などをもちとされている⁴⁾。TGF-βには、骨形成にかかわるBMP(bone morphogenic protein)や細胞の分化に重要なアクチビンな

ど類似した構造をもつ仲間があり、これらは合わせてTGF-βスーパーファミリーと呼ばれている。

II. PDGF, TGF-βと動脈硬化

1976年、Russel Rossらは血管平滑筋細胞の増殖にPDGFが重要であることを明らかにした。PDGFが精製される3年前のことである。彼らは、何らかの原因により血管内皮細胞が傷害を受けて剥離した箇所血小栓が付着し、ここから放出されたPDGFに反応して血管壁中膜の平滑筋細胞が内膜へと遊走、増殖を重ねて肥厚内膜を形成することが動脈硬化の本質であると提唱した⁵⁾。動脈硬化の古典的な学説となった「傷害反応仮説」である。この考え方は、経皮冠動脈形成術(percutaneous transluminal intervention: PCI)後にみられる再狭窄病変形成機序の説明として現在も受け継がれている。一方、高脂血症に起因する粥状動脈硬化では、内皮細胞が剥離せずとも内膜肥厚をもたらされること、流血中の単球由来する泡沫化マクロファージが主体であること、さらに不安定プラークとその破綻(unstable plaque and its rupture)の概念などが確立され⁶⁾、PDGFの占める重要性は相対的に小さくなった感がある。ところが最近、高コレステロール血症患者の流血中単球でPDGF-A, Bの発現が増加していることや⁷⁾、PDGFβ受容体に対する抗体がApoEノックアウトマウスの動脈硬化病変形成を軽減すること、LRP1(LDL receptor-related protein 1)ノックアウトマウスの動脈硬化にPDGFシグナルが重要であることなどが報告され^{8,9)}、新たな注目を集めている。

TGF-βと動脈硬化とのかかわりについても、これまで数多くの研究がなされてきた。表1に示すように、TGF-βが動脈硬化を促進するか抑制的に働くかは過去の報告が相半ばしている。近年、T細胞特異的にTGF-βシグナルを抑制したマウスモデルなどの成績から、粥状動脈硬化病変の形成に対してはTGF-βがこれを抑制するとの考え方が主流となっている²²⁾。一方、内皮傷害に伴う再狭窄モデルでは、主としてTGF-βの病変促進性が示唆されている。興味深いことに、

表1 動脈硬化における TGF- β の役割を論じた主な研究報告

抑制する	促進する
<ul style="list-style-type: none"> 重症冠疾患では血中 TGF-β が低値である^{10,11)} タモキシフェンは TGF-β の活性化を通じて冠動脈病変を抑制する^{12,13)} 中和抗体や可溶性 II 型受容体による TGF-β の抑制は不安定プラーク様動脈病変を生じる^{14,15)} TGF-β は平滑筋細胞の増殖を抑制する^{16~18)} 	<ul style="list-style-type: none"> TGF-β の過剰発現は新生内膜形成を増強する^{19,20)} TGF-β を抑制する新生内膜の形成が抑制される^{21,22)}

TGF- β の主要シグナル分子である Smad3 のノックアウトマウスでは、内皮傷害に対する新生内膜の形成が著しく増強する (Kobayashi ら未発表データ)。すなわち、動脈硬化巣における TGF- β の作用は、TGF- β とその受容体、シグナル分子の発現にも関連して、複雑に制御されている可能性がある。

III. 糖尿病にみられる動脈硬化と増殖因子の役割

糖尿病患者に心血管障害の発症率や PCI 後の再狭窄の発症頻度が高く、心イベントを生じた後の生命予後も悪いことが知られている。しかし、その原因についてはいまだ十分には解明されていない。

PDGF や TGF- β は糖尿病に合併する動脈硬化の形成にどのように関与するのだろうか。培養細胞を用いた検討から、ヒトの血管内皮細胞やマクロファージ、そしてラットやウサギの平滑筋細胞において、高血糖が PDGF β 受容体の発現を増強させることが示されている^{23,24)}。また、2型糖尿病モデルラットの中膜 (平滑筋細胞) では、やはり β 受容体の発現が増加している²⁵⁾。さらに、糖尿病血管障害に関連するさまざまな液性因子、例えばアンギオテンシン II²⁶⁾、エンドセリン²⁷⁾、炎症性サイトカイン²⁸⁾ の数々、終末糖化産物 (advanced glycation end-products: AGE)²⁹⁾ などが、PDGF の産生を刺激することも知られている。このほか、高血糖下でプロテインキナーゼ C や低分子量 G 蛋白 Rho の活性化を通じて血管壁での発現が増えるオステオポンチンという蛋白質は、PDGF による平滑筋細胞の増殖をさらに増強させる働きをもつ³⁰⁾。このように糖尿病状態は、直接的あるいは間接的に血管壁での PDGF

シグナル増強を招き、動脈硬化病変の形成に寄与すると考えられる。

PDGF 受容体キナーゼの阻害剤であり慢性骨髄性白血病の治療薬として臨床応用もされているイマチニブ (imatinib, 商品名グリベック) が、糖尿病にした ApoE ノックアウトマウスの大動脈粥状硬化病変を有意に抑制することが最近報告された³²⁾。イマチニブの投与は、単球遊走因子である MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) やマトリクス産生因子 CTGF (connective tissue growth factor) の発現も血管壁において低下させることから、糖尿病血管壁では PDGF が多彩な作用を通じて動脈硬化病変の形成に携わることが示唆される。

一方、TGF- β も糖尿病・高血糖によりその発現を増すことが幾つかの臓器ならびに細胞レベルの検討から明らかとなっている。特に腎糸球体では、高血糖に伴うプロテインキナーゼ C の活性化を通じて TGF- β 発現が上昇し、マトリクスの沈着を促す結果、腎症の硬化性変化を進展させると考えられている。動脈壁においては、糖尿病が TGF β 受容体の発現上昇をもたらすことが確認されており、その結果、フィブロネクチンなどのマトリクス産生が増加する。これら一連の変化は、糖尿病患者でしばしば認められる“びまん性に硬化した動脈壁”の形成を考えるうえで興味深い。ただし、これまで報告されている 1 型、2 型糖尿病患者の血中 TGF- β 濃度については必ずしも一定の傾向がみられず、また TGF- β には内皮機能を保護し、プラークを安定化させる働きもあることなどから、糖尿病の動脈硬化における TGF- β の役割は病変の進展度に応じて異なる可能性がある。

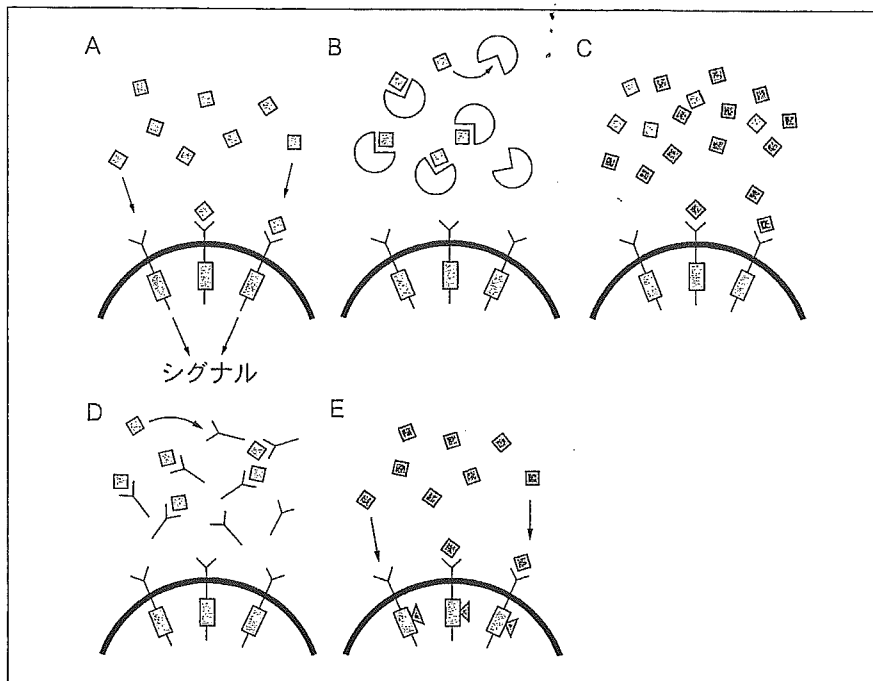


図3 増殖因子に対するさまざまな拮抗剤

A: 増殖因子が正常に働く場合に比べ、B: 増殖因子に対する中和剤、C: 増殖因子受容体への結合に競合する薬剤、D: シグナルを伝達しない可溶性の増殖因子受容体が存在すると、増殖因子は受容体と結合できない。E: 受容体の細胞内ドメインに作用してシグナル伝達を阻害する拮抗剤も可能である。(文献32)より改変引用)

IV. 増殖因子を標的とした治療の可能性

現在、増殖因子やその受容体の発現を抑制する薬剤、シグナル伝達を抑制する方法などが盛んに研究されている。図3に示すような作用機序の拮抗剤は、各種増殖因子に対して応用が可能であり、糖尿病に伴う動脈硬化の新しい治療薬となる可能性をはらんでいる。図3のAは、増殖因子が受容体に結合する結果、増殖シグナルが伝達される通常の状態を示している。これに対してBでは、増殖因子に何らかの物質が結合した結果、増殖因子が受容体と結合できなくなる。Cでは受容体に結合する物質が増殖因子の受容体への結合と競合し、増殖因子が受容体に結合できない。Dでは細胞内にシグナルを伝えない受容体が大量に存在するため、増殖因子はこちらの方に結合してしまい、細胞膜表面の受容体には結合できなくなる。さらにEでは増殖因子と受容体の結合は正常に起きるが、下流へのシグナル伝達が阻害されている。特に、C、D、Eについては増殖因子拮抗剤の有力な候補がすでに現われており、前述のPDGF受容体キナーゼ阻害剤イマチニブの作用機序はEに該当する。

増殖因子は病変部だけでなく全身の正常細胞に作用しうするため、糖尿病患者の動脈硬化治療を目的にこれら阻害剤を臨床応用するためには、全

身投与に伴う副作用の懸念を乗り越える必要がある。すでにPCI後の再狭窄予防のために世界的に使用されている薬剤溶出ステント(drug-eluting stent)などは薬物を局所に限定して投与できることから有望なデバイスとなろう。

文献

- 1) Heldin C-H et al: Signal transduction via platelet-derived growth factor receptors. *Biochim Biophys Acta* 1378: F 79-F 113, 1998
- 2) Fredriksson L et al: Novel PDGF family members: PDGF-C and PDGF-D. *Cytokine Growth Factor Rev* 15: 197-204, 2004
- 3) Roberts AB et al: The transforming growth factor- β s. In *Handbook of Experimental Pharmacology*. Vol 95, Peptide Growth Factors and Their Receptors, part I (Sporn MB & Roberts AB eds), Springer-Verlag, Berlin, pp 419-472, 1990
- 4) Miyazono K et al: TGF- β signaling by Smad proteins. *Adv Immunol* 75: 115-157, 2000
- 5) Ross R et al: The pathogenesis of atherosclerosis. *N Engl J Med* 295: 369-377, 420-425, 1976
- 6) Libby P et al: Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 105: 1135-1143, 2002
- 7) Billet MA et al: Increased expression of genes for platelet-derived growth factor in circulating mononuclear cells of hypercholesterolemic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16: 399-406, 1996
- 8) Sano H et al: Functional blockade of platelet-derived growth factor receptor-beta but not of

- receptor- α prevents vascular smooth muscle cell accumulation in fibrous cap lesions in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 103 : 2955-2960, 2001
- 9) Boucher P et al : LRP : role in vascular wall integrity and protection from atherosclerosis. *Science* 300 : 329-332, 2003
 - 10) Grainger DJ et al : The serum concentration of active transforming growth factor- β is severely depressed in advanced atherosclerosis. *Nat Med* 1 : 74-79, 1995
 - 11) Stefoni S et al : Low TGF- β serum levels are a risk factor for atherosclerosis disease in ESRD patients. *Kidney Int* 61 : 324-335, 2002
 - 12) McDonald CC et al : Cardiac and vascular morbidity in women receiving adjuvant tamoxifen for breast cancer in a randomised trial : The Scottish Cancer Trials Breast Group. *BMJ* 311 : 977-980, 1995
 - 13) Grainger DJ et al : Tamoxifen elevates transforming growth factor- β and suppresses diet-induced formation of lipid lesions in mouse aorta. *Nat Med* 1 : 1067-1073, 1995
 - 14) Mallat Z et al : Inhibition of transforming growth factor- β signaling accelerates atherosclerosis and induces an unstable plaque phenotype in mice. *Circ Res* 89 : 930-934, 2001
 - 15) Lutgens E, Gijbels M, Smook M et al : Transforming growth factor- β mediates balance between inflammation and fibrosis during plaque progression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22 : 975-982, 2002
 - 16) McCaffrey TA et al : Genomic instability in the type II TGF- β 1 receptor gene in atherosclerotic and restenotic vascular cells. *J Clin Invest* 100 : 2182-2188, 1997
 - 17) McCaffrey TA et al : The expression of TGF- β receptors in human atherosclerosis : evidence for acquired resistance to apoptosis due to receptor imbalance. *J Mol Cell Cardiol* 31 : 1627-1642, 1999
 - 18) Kanzaki T et al : In vivo effect of TGF- β 1. Enhanced intimal thickening by administration of TGF- β 1 in rabbit arteries injured with a balloon catheter. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15 : 1951-1957, 1995
 - 19) Nabel EG et al : Direct transfer of transforming growth factor β 1 gene into arteries stimulates fibrocellular hyperplasia. *Proc Natl Acad Sci USA* 90 : 10759-10763, 1993
 - 20) Schulick AH et al : Overexpression of transforming growth factor β 1 in arterial endothelium causes hyperplasia, apoptosis, and cartilaginous metaplasia. *Proc Natl Acad Sci USA* 95 : 6983-6988, 1998
 - 21) Yamamoto K et al : Ribozyme oligonucleotides against transforming growth factor- β inhibited neointimal formation after vascular injury in rat model : potential application of ribozyme strategy to treat cardiovascular disease. *Circulation* 102 : 1308-1314, 2000
 - 22) Robertson AK et al : Disruption of TGF- β signaling in T cells accelerates atherosclerosis. *J Clin Invest* 112 : 1342-1350, 2003
 - 23) Okuda Y et al : Increased production of PDGF by angiotensin and high glucose in human vascular endothelium. *Life Sci* 59 : 1455-1461, 1996
 - 24) Inaba T et al : Enhanced expression of platelet-derived growth factor- β receptor by high glucose. Involvement of platelet-derived growth factor in diabetic angiopathy. *Diabetes* 45 : 507-512, 1996
 - 25) Tamura K et al : Increased atherogenesis in Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats before the onset of diabetes mellitus : association with overexpression of PDGF β -receptors in aortic smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 149 : 351-358, 2000
 - 26) Deguchi J et al : Angiotensin II stimulates platelet-derived growth factor-B chain expression in newborn rat vascular smooth muscle cells and neointimal cells through Ras, extracellular signal-regulated protein kinase, and c-jun N-terminal protein kinase mechanism. *Circ Res* 85 : 565-574, 1999
 - 27) Jaffer FE et al : Endothelin stimulates PDGF secretion in cultured human mesangial cells. *Kidney Int* 38 : 1193-1198, 1990
 - 28) Silver BJ et al : Platelet-derived growth factor synthesis in mesangial cells : induction by multiple peptide mitogens. *Proc Natl Acad Sci USA* 86 : 1056-1060, 1989
 - 29) Doi T et al : Receptor-specific increase in extracellular matrix production in mouse mesangial cells by advanced glycosylation end products is mediated via platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 89 : 2873-2877, 1992
 - 30) Takemoto M et al : Enhanced expression of osteopontin in human diabetic artery and analysis of its functional role in accelerated atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20 : 624-628, 2000
 - 31) Lassila M et al : Imatinib attenuates diabetes-associated atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24 : 935-942, 2004
 - 32) 宮澤恵二ほか : 新細胞増殖因子のバイオロジー. 羊土社, 東京, p143, 2001

Werner症候群

Werner症候群とは

1904年にドイツの医師Otto Wernerにより「強皮症を伴う白内障症例」として初めて報告された常染色体劣性の遺伝性疾患である。思春期以降、さまざまな老化徴候が出現することから、代表的な早老症候群の一つに数えられている。本症は、第8染色体短腕上に存在するRecQ型DNA/RNAヘリカーゼ (WRNヘリカーゼ) のホモ接合体変異により生じる。

頻度

わが国におけるWerner症候群の発症頻度は100万人に1~3名の割合とされ、近親婚の多い地域に高い傾向がある。これまで全世界で少なくとも1,200症例が報告されているが、うち800例以上が日本人であり、とくにわが国に頻度の高い疾患と考えられる。一方、神奈川県的一般成人を対象とした調査では、1,000名中6名がWRN遺伝子変異をヘテロ接合体で保有していた。この数値から単純に計算すると、WRN変異をヘテロ接合体で保有する人の数は全国で70万人にのぼると考えられ、毎年20名強の赤ん坊がWRN変異をホモ接合体に保有して (つまり発症のリスクを抱えて) 生まれてくることになる。

症候と病態生理

Werner症候群患者は幼児期、思春期までは健康人と区別することが難しい。思春期以降、白髪や皮膚の萎縮、角化などの症候が出現するが【図1】、実際の診断は30歳前後で白内障の出現を契機になされることが多い。Epsteinらによって記載されたWerner症候群の代表的な症候を【表1】に示す。このほか、高コレステロール血症の合併や腹部内臓脂肪の蓄積を高頻度に認める。40歳以上の症例では、しばしば足部や肘部に難治性皮膚潰瘍を生じ、ADL低下の大きな要因となる。平均寿命は47歳前後とされてきたが、近年、各種合併症治療の進歩により延長傾向にある。本症の原因であるWRNヘリカーゼの欠損はゲノムの不安定性 (genomic instability) を招き、その結果として細胞老化や突然変異の発生が促進されると考えられている。しかし、インスリン抵抗性を初めとする各種代謝異常をもたらす機序については十分に解明されていない。

Werner症候群：ウェルナー症候群

Side Memo

早老症候群

老年者一般に認められる徴候が若いうちに現れるという特徴に基づき分類された雑多な疾患群である。近年、その原因遺伝子の多くが明らかになった。Werner症候群以外では、Hutchinson-Gilford (ハッチンソン-ギルフォード) 症候群、Cockayne (コケイン) 症候群、ataxia teleangiectasia (毛細血管拡張性運動失調)、Down (ダウン) 症候群などが早老症候群に分類される。

診断・鑑別診断

古くは前述の臨床的特徴と常染色体劣性遺伝形式とをもって診断された。現在ではその原因遺伝子が明らかにされているため、蛋白または、ゲノムDNAレベルでWRNヘリカーゼ変異を特定することが診断の確定に必要である。四肢末梢を主体とする皮膚の硬化と萎縮は強皮性との鑑別を要するが、全般的な臨床症状の相違が診断の決め手となる。

図1 Werner症候群の症候

- ① 46歳, 女性。薄く白い毛髪, 薄い皮膚, 口唇の皺など, 老年者にみられる特徴がこの年代より現れている。
- ② 52歳, 男性。薄い毛髪, 曲がった腰, 細い四肢など一見して実年齢より老けて見える。

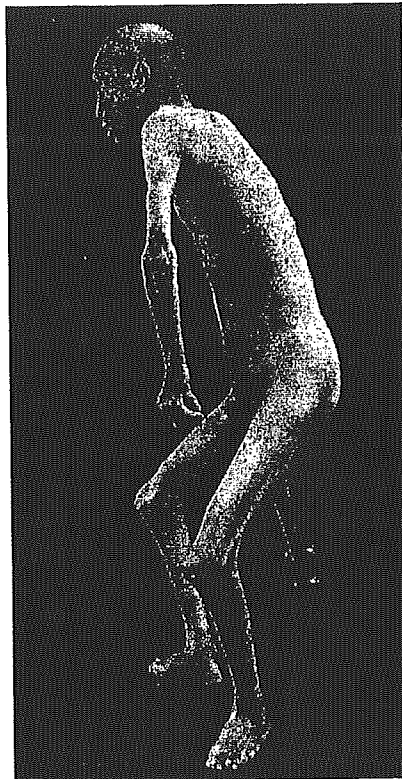
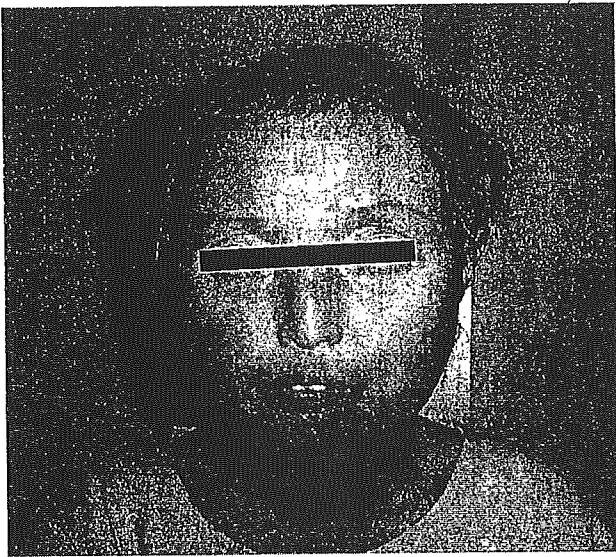


表1 Werner症候群の臨床的特徴

- ①低身長
- ②皮膚萎縮・角化・潰瘍
- ③四肢の筋・脂肪組織の萎縮
- ④毛髪の変化(白髪・禿頭)
- ⑤音声の変化(高調性嗄声)
- ⑥白内障
- ⑦骨粗鬆症
- ⑧耐糖能異常
- ⑨性腺機能低下
- ⑩軟部組織石灰化
- ⑪悪性腫瘍合併
- ⑫高インスリン血症

Basic Point

Biochemistry

● 老化 (aging) とは

成熟期以後, 加齢とともに各臓器の機能あるいはそれらを統合する機能が低下し, 個体の恒常性を維持することが不可能となり, ついに不可逆的に死に至る過程をさす。この過程で起きるすべての現象を老化現象とよぶ。生理的な老化 (physiological aging) が著しく加速され, 病的状態を引き起こす場合を病的老化 (pathological aging) とよぶことがあり, 骨粗鬆症, Alzheimer病, 早老症候群などが含まれる。

治療

本症患者の2大死因は間葉系の悪性腫瘍と動脈硬化性心血管障害である。WRN遺伝子異変に対する根本的治療法が存在しない現状では、悪性腫瘍の早期発見と動脈硬化性リスクの軽減が患者の予後向上に重要な意味をもつ。本症に合併する糖尿病は強いインスリン抵抗性を示し、しばしばコントロールに苦慮するが、通常はチアゾリジン誘導体の内服が有効である。皮膚潰瘍は通常療法に反応しづらく、状況によっては皮膚移植も考慮すべきである。

Level up View

● Werner症候群とアディポサイトカイン

Werner症候群患者はインスリン抵抗性、耐糖能障害、高脂血症など、肥満者によくみられる代謝異常を呈するが、そのBMI (body mass index: 体重(kg)/身長(m²), 25以上が肥満) は22以下と見かけ上は太っていないことが多い。ところがその一方で、腹腔内臓脂肪の蓄積を伴いやすい。近年、アディポサイトカインと総称され脂肪細胞から分泌される生理活性物質の変動が、生活習慣病の成り立ちに重要と考えられている。Werner症候群では、インスリン抵抗性を惹起するTNF (tumor necrosis factor)- α や抗凝固作用をもつPAI (プラスミノゲンアクチベーターインヒビター)-Iといったアディポサイトカインの血中濃度が健常者に比べて有意に高いことがわかった。このように、Werner症候群にみられる各種代謝異常の成り立ちには、特異な脂肪分布とその機能変化が関与している可能性がある。

Self Check

Werner症候群について正しいのはどれか。

1. 常染色体優性遺伝形式をとる。
2. DNA/RNAヘリカーゼ遺伝子の変異を原因とする。
3. 毛髪の変化や白内障を示すことが多い。
4. 思春期以降、種々の老化徴候を示す。
5. 1型糖尿病を合併することが多い。

- a. (1)(2)(3) b. (1)(2)(5) c. (1)(4)(5) d. (2)(3)(4) e. (3)(4)(5)

〈横手幸太郎〉



その他の代謝疾患

[3]

インスリンと血管平滑筋細胞

横手幸太郎, 齋藤 康

千葉大学医学部附属病院糖尿病・代謝・内分泌内科

本稿では、①高インスリン血症が単独で動脈硬化のリスクとなるか、②血管平滑筋細胞のインスリン作用とインスリン抵抗性、③プロインスリンCペプチドと平滑筋細胞、という3項目を柱として、インスリンと平滑筋細胞について論じる。

これまでに行われてきた複数の臨床研究の成績から、高インスリン血症と動脈硬化性疾患との関連が示唆されている。しかし、臨床的に観察される高インスリン血症の多くはその基盤にインスリン抵抗性を有し、代償性機転によって生じると考えられる。このため、高インスリン血症が単独で動脈硬化の発症と進展に寄与するかは不明確である。筆者らは、50~65歳の15年間にわたり著しい高インスリン血症を呈したインスリノーマの男性例を経験したが、脂質や血圧値には異常を認めず、症候性の動脈硬化性疾患はなく、また頸動脈超音波検査によるIMTは左右とも0.7mm、プラークも観察されなかった。インスリノーマを対象とした過去の報告¹⁾ならびにラット膵移植モデル²⁾の検討結果を考慮すると、高インスリン血症はインスリン抵抗性あるいは他のリスクファクターとの共存下でのみ動脈硬化促進的に働くことが示唆された。

動脈硬化の進みややすい病態として注目されているメタボリックシンドローム (metabolic syndrome) の成り立ちや2型糖尿病の発症に

はインスリン抵抗性が重要と考えられている。そこで、血管平滑筋細胞内のインスリンシグナルにおいても“抵抗性”を生じうるのか、またそれが動脈硬化の形成に関与するのか、臨床ならびに基礎的考察を行った。昨今、経皮的冠動脈インターベンション (PCI) 後の再狭窄に対し、薬剤溶出ステントの高い有効性が示されている。ラパマイシン (シロリムス: 免疫抑制剤) 溶出ステントはその先駆けであり、わが国でも用いられているが、インスリン使用糖尿病患者ではその効果が不十分であることが報告されている³⁾。これに対して、パクリタキセル (タキソール) という抗癌剤を用いた溶出ステントはインスリン使用糖尿病患者においても有意な抑制効果を示し話題となった⁴⁾。ラパマイシンは p 70 S6 キナーゼの阻害剤でありインスリンシグナルの一部分のみを抑制するが増殖に重要な MAP キナーゼ経路には影響を与えない⁵⁾。これに対してパクリタキセルは、細胞分裂という“最終アウトプット”を阻害する働きを持つことが、外因性インスリンを使用する糖尿病患者の再狭窄予防効果の差異に現れている可能性がある。

一般にインスリン抵抗性は、肝や骨格筋細胞における PI3 キナーゼ経路の減弱と関連することが知られている。筆者らの成績では、血管平滑筋細胞における PI3 キナーゼ経路は MAP キナーゼ経路に対して抑制的に働く。つ

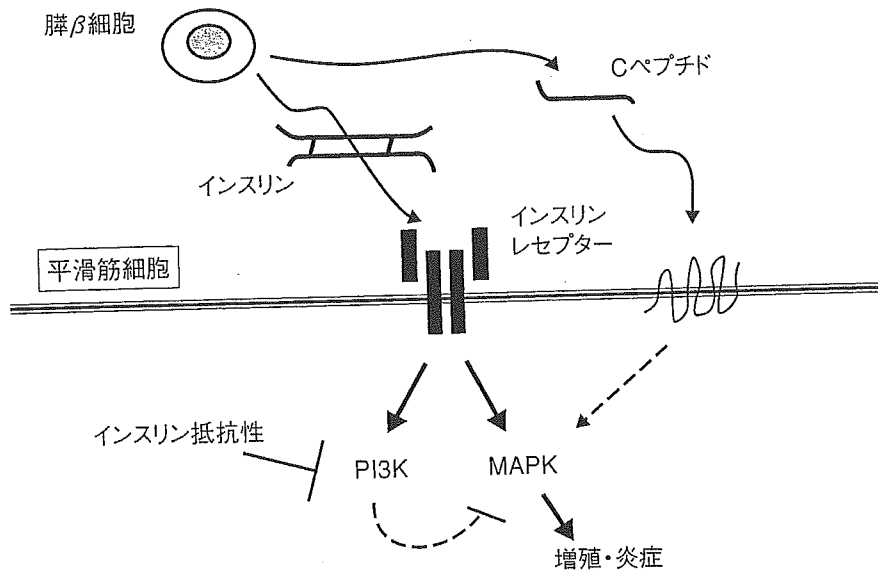


図1 血管平滑筋細胞におけるインスリン抵抗性とシグナル伝達

まり，平滑筋細胞における“インスリン抵抗性=PI3キナーゼ活性の低下”は，アポトーシスの抑制や細胞増殖，炎症の増強などをもたらす，それ自体が動脈硬化に対して促進的に働いている可能性がある。

また，これまでインスリン分泌過程の副産物と考えられてきたプロインスリン由来Cペプチドに，近年，種々の生理作用が報告されている⁶⁾が，平滑筋細胞においてはMAPキナーゼ経路を活性化し，炎症惹起性遺伝子の発現を促した。インスリン抵抗性状態や慢性腎不全などの動脈硬化が進みやすい病態において高Cペプチド血症が見られることは示唆的といえよう。

このように，血管平滑筋細胞におけるインスリン抵抗性状態がMAPキナーゼシグナルの増強をもたらして動脈硬化病変の形成に寄与し，Cペプチドがその作用を修飾するという仮説は，2型糖尿病患者の血管合併症進展の一側面を説明するものであり，これらを標的とした新しい治療法創出の可能性を示している（図1）。

文献

1) Leonetti F, Iozzo P, Giaccari A, et al :

Absence of clinically overt atherosclerotic vascular disease and adverse changes in cardiovascular risk factors in 70 patients with insulinoma. *J Endocrinol Invest* 16 : 875-880, 1993

- 2) Abe H, Bandai A, Makuuchi M, et al : Hyperinsulinaemia accelerates accumulation of cholesterol ester in aorta of rats with transplanted pancreas. *Diabetologia* 39 : 1276-1283, 1996
- 3) Moussa I, Leon MB, Baim DS, et al : Impact of sirolimus-eluting stents on outcome in diabetic patients : a SIRIUS (SIRolImUS-coated Bx Velocity balloon-expandable stent in the treatment of patients with de novo coronary artery lesions) substudy. *Circulation* 109 : 2273-2278, 2004
- 4) Stone GW, Ellis SG, Cox DA, et al : A polymer-based, paclitaxel-eluting stent in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med* 350 : 221-231, 2004
- 5) 宮澤恵二，横手幸太郎，宮園浩平：新細胞増殖因子のバイオロジー．羊土社，東京，2001
- 6) Wahren J : C-peptide : new findings and therapeutic implications in diabetes. *Clin Physiol Funct Imaging* 24 : 180-189, 2004

--Letter to the Editor--

Acupuncture for Dysphagia in Poststroke Patients

: A Videofluoroscopic Study

Takashi Seki MD PhD¹, Hideo Hayashi BSc², Shizuru Yamada MD², Koh Iwasaki MD, PhD¹, Kenji Toba MD, PhD³, Hiroyuki Arai MD, PhD¹, Hidetada Sasaki MD, PhD⁴

¹Department of Geriatric and Complementary Medicine
Center for Asian Traditional Medicine Research, Tohoku University
Graduate School of Medicine

² Health Service Facilities for the Elderly, Mahoroba-no-Sato

³Department of Geriatric Medicine, Kyorin University School of Medicine

⁴Department of Geriatric and Respiratory Medicine, Tohoku University
Graduate School of Medicine

Corresponding Author:

Dr. Takashi Seki, MD, PhD

Associate Professor,

Department of Geriatric and Complementary Medicine, Center for Asian
Traditional Medicine Research, Tohoku University Graduate School of
Medicine, 1-1 Seiryomachi, Aoba-ku, Sendai, Miyagi 980-8574, JAPAN

Tel: +81-22-717-7182 Fax :+81-22-717-7186

E-mail : t-seki@geriat.med.tohoku.ac.jp

Acupuncture for Dysphagia in Poststroke Patients

Word count for text: 746

Total number of References: 4

Total number of Figures: 1

Severe dysphagia predisposes to medical complications such as aspiration pneumonia in poststroke patients.¹ Existing modalities for treating dysphagia are generally ineffective.² We recently reported that acupuncture on two acupoints (Zusanli ST36 and Taixi K3) restored the swallowing reflex³ and gait disorders⁴ in poststroke patients. In this study, we performed a videofluoroscopic study (VFSS) to determine if acupuncture also improves dysphagia and aspiration.

According to Magnetic Resonance Imaging findings, 32 poststroke patients (84 ± 9 (mean \pm SD) years, Female/Male 20/12) with episodes of choking while taking food or drinking liquid were selected randomly at an elderly care facility and participated in this study under written informed consent. Participants were randomly assigned into two groups. We practiced acupuncture on the intervention group (18 patients; 77 ± 9 (mean \pm SD) years, F/M 10/8) three times a week for four weeks with usual care. Four disposable stainless steel fine needles (diameter 0.16 mm, length 40 mm; SEIRIN, Shizuoka, Japan) were inserted in two acupoints (ST36 and K3) bilaterally and kept at a 10 mm depth for 15 minutes without any extra stimulation such as electrical or manual. Fourteen other patients were assigned to the control group (79 ± 5 (mean \pm SD) years, F/M 10/4) and

received usual care without acupuncture. VFSS was performed at the base line and four weeks later in both groups. The interval of VFSS was 5 minutes with a random order of three different kinds of food. The patients were asked to swallow 5 mL of water, 5 mL of fluid food (liquidized food) and one piece of solid food (approximately 5ml of a cookie). The water and food were blended with barium (Enemastar Enema Powder, FUSHIMI Pharmaceutical, Marugame, Japan). In each swallowing, VFSS was performed in a lateral projection with the patient in a sedentary position using a fluoroscopy unit (Prestige II, GEMedical Systems, Tokyo, Japan) connected to a DVD-HDD recorder (RD-XS30, TOSHIBA, Tokyo, Japan). Images were obtained at 30 frames per second and reviewed frame by frame with image processing software (Premier 6.0, Adobe Systems, Tokyo, Japan) by a radiologist who did not know if the patient had been treated with acupuncture. Pharyngeal retention was defined as pharyngeal residue of material in the valleculae and in the piriform sinuses after swallowing. Tracheobronchial post-deglutitive aspiration was defined as penetration of material below the level of the vocal folds. VFSS frames from the instruction of swallowing to the time that the material passed the entrance of the esophagus were observed. Body temperature was measured at 2:00 p.m. every day. The

total number of days of fever above 37.8 degrees was counted for four weeks.

The swallowing times at baseline from the instruction of swallowing to the time of passing the entrance of the esophagus were 1.7 ± 1.0 , 8.7 ± 13.2 and 10.4 ± 7.0 (mean \pm SD) sec with water, fluid food and solid food, respectively in the intervention group and 1.9 ± 0.6 , 4.5 ± 3.7 , 9.7 ± 7.6 sec in the control group. After four weeks the average times were 1.1 ± 0.3 ($P < .05$), 5.0 ± 4.8 ($P < .05$), 11.8 ± 9.3 sec, respectively, in the intervention group and 2.1 ± 0.9 , 5.4 ± 5.4 , 10.1 ± 6.9 sec, respectively, in the control group. In the intervention group the swallowing time of water and fluid food were shortened significantly after four weeks.

Figure 1 shows the percentage of pharyngeal retention and aspiration in the two groups. In the intervention group, there were significant decreases of retention, but in the control group there was no significant change. In the intervention group, aspiration at the baseline was observed in 40%, 8% and 25% of the patients with water, liquid and solid foods, respectively, but no aspiration was observed after four weeks. Aspiration did not change in the control group after four weeks. High fever over 37.8 degrees was observed in 28 of 394 days of the control group but only in four days of 356 days of the intervention

group. Fever-up days of the intervention group was significantly lower than that of the control group ($P < .01$). The combination of these acupoints was selected according to the traditional theory of Chinese medicine, and is novel and safe, easy to use. These data show the significant effect of the acupuncture treatment on pharyngeal retention and aspiration. The present study suggests that this acupuncture therapy is a new way to prevent aspiration and aspiration pneumonia in poststroke patients.

REFERENCES

1. Eisenhuber E, Schima W, Schober E et al. Videofluoroscopic assessment of patients with dysphagia: pharyngeal retention is a predictive factor for aspiration. *Am J Roentgenol* 2002; 178 : 393-398.
2. Freed ML, Freed L, Chatburn RL et al. Electrical stimulation for swallowing disorders caused by stroke. *Respir Care* 2001; 46 : 466-474.
3. Seki T, Kurusu M, Tanji H et al. Acupuncture and swallowing reflex in post-stroke patients. *J Am Geriatr Soc* 2003;51: 726-727.
4. Seki T, Kurusu M, Arai H et al. Acupuncture for gait disorders in the elderly. *J Am Geriatr Soc* 2004; 52: 643-644.