

動調節能曲線を左方へ復帰させる⁶⁾。ARBのカンデサルタンにも同様に、脳血流自動調節能曲線を左にシフトさせる効果があり⁷⁾、これらの薬剤は脳血流を維持したまま降圧作用を示すため、脳卒中を予防する上で理にかなった降圧薬と言える。ただし、脳梗塞急性期はこの調節能が破綻しており、降圧により脳虚血が増悪することから、脳卒中治療ガイドライン⁸⁾では収縮期血圧 220mmHg 以上または平均血圧 130mmHg 以上が持続する場合を除いて、急性期の降圧療法を推奨していない。

しかし、脳卒中急性期の高血圧に対してカンデサルタンによる降圧の安全性を検討した ACCESS (The Acute Candesartan Cilexetil Therapy in Stroke Survivors) 試験⁹⁾の結果は、ここに述べた考え方に再考をせまるものであった。この試験では、脳梗塞発症 72 時間以内にカンデサルタンで降圧を開始した群 (内頸動脈に 70%以上の狭窄を有する例を除く) と、7 日目以降に同薬剤で血圧をコントロールした群で、脳卒中の再発、意識状態の低下、脳浮腫、心血管イベント、心不全の発症をプライマリエンドポイントとして追跡した。

12 カ月後の全血管系イベントはカンデサルタン群 9.8%、コントロール群 18.7% と有意にカンデサルタン群で低かった。この差が脳血流自動調節能の是正によるものでないことは、追跡期間中両群の血圧に差がなかったことから明らかであるが、いずれにせよ、初期の 7 日間の血圧管理の差が予後に大きな差をもたらしたことになり、脳梗塞急性期の降圧療法に関して、さらに検討の余地があることを意味している。

4. 脳卒中発症・再発予防における RA 系薬剤の有用性

PROGRESS (Perindopril protection against recurrent stroke study) は、脳梗塞慢性期における ACE 阻害薬であるペリンドプリルの効果を検証するために実施された国際共同研究で、日本を含む世界 7 地域の 10 カ国が参加して行われた。登録に際して血圧値に関する規定はなく、くも膜下出血を除く脳卒中 6,105 例を対象として試験が実施された。

脳卒中の再発については、ペリンドプリル群で

血圧が 147/86mmHg から 138/82mmHg へと低下し、プラセボ群に比して 28% (95%信頼区間 15~39%) と有意に抑制効果が見られた。さらに臓器保護作用を示すものとして、脳卒中再発例における痴呆 (現・認知症) 発症例が有意に少ないことが発表された¹⁰⁾。脳卒中の二次予防効果は、血圧が高くない例に対しても認められたことも ACE 阻害薬の臓器保護効果を示唆する。

同じく ACE 阻害薬であるラミプリルの脳卒中予防効果が、Heart Outcomes Prevention Evaluation (HOPE) の付随研究である MICRO-HOPE 試験¹¹⁾においても示されている。β遮断薬のアテノロールを対照として、ARB のロサルタンの心血管イベントに対する効果を検討した The Losartan Intervention For Endpoint reduction (LIFE) 研究¹²⁾で、両薬剤の血圧に対する効果はほぼ同程度であったにもかかわらず、ロサルタンはアテノロールより脳卒中発症率を 25% と有意に低下させた。この結果は、ARB が降圧以外の機序で神経に保護的に作用することを示すものである。

一方、SCOPE (The Study on Cognition and Prognosis in the Elderly) はカンデサルタンについて検討した試験¹³⁾で、非致死性の脳梗塞は 27.8% と有意にリスクが低下した。特筆すべきは第 19 回国際高血圧学会 / 第 12 回欧州高血圧学会で発表されたサブ解析の結果で、MMSE (Mini Mental State Examination) が 24~28 と認知機能が低下した、いわゆる痴呆 (現・認知症) 予備軍ではコントロール群に比べてカンデサルタン群で、その後のスコアの低下が有意に抑制された。(p = 0.04)。かねてより高血圧が痴呆 (現・認知症) の危険因子とされており、SCOPE 試験はそれを裏付けたことになると同時に、今後の痴呆 (現・認知症) 発症予防に効果が期待される。

また、最近報告された MOSES (Morbidity and mortality after Stroke -Eprosartan compared with nitrendipine for Secondary prevention) 研究¹⁴⁾では、慢性期の高血圧合併脳卒中患者を対象に ARB のエプロサルタン (本邦未発売) と Ca 拮抗薬のニトレンジピンを PROBE 方式で比較しており、両者の間に有意な血圧差が無いにも関わらず、Ca 拮抗薬群に比し ARB 群で有意な脳卒中再発抑制効果が証明されており、ARB の降圧を超え

■特集・高血圧ガイドライン JSH2004 時代の ARB

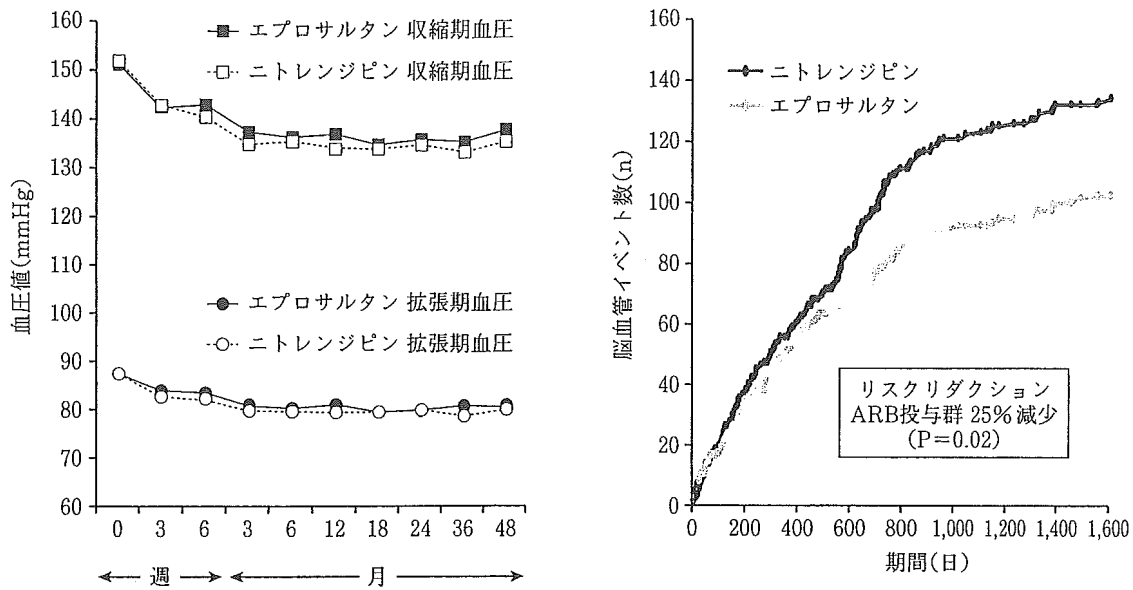


図2 MOSES 研究結果の概要

ARB のエプロサルタンと Ca 拮抗薬のニトレンジピンの間には有意な血圧差がないにも関わらず, ARB 群で有意な脳卒中再発抑制効果が示された。

MOSES : MORbidity and mortality after Stroke Eprosartan compared with nitrendipine for Secondary prevention

ARB : Angiotensin receptor blocker

(Joachim Schrader XXIV Congress of the European Society of Cardiology ; August 2004 より)

表1 ARB の脳卒中再発予防効果

ARB は降圧を超えた脳保護効果を強く示唆している。

Trial	Type of Prevention	Key Finding
ACCESS (カンデサルタン)	脳卒中の二次予防 (降圧療法を必要とする脳梗塞急性期患者)	ARB の急性期投与群で1年後の心血管イベントは47.5%減少
MOSES (エプロサルタン)	脳卒中の二次予防 (慢性期)	ARB はCa拮抗薬と比較して降圧度は同等にも関わらず脳血管リスクを25%減少

ACCESS : The Acute Candesartan Cilexetil Therapy in Stroke Survivors

MOSES : Morbidity and mortality after Stroke -Eprosartan compared with nitrendipine for Secondary prevention

ARB : Angiotensin receptor blocker

(筆者ら作成)

た脳保護効果を強く示唆する結果となっている。(図2, 表1)。

5. ARB の神経保護作用

ARB が痴呆(現・認知症) 予防効果を示すメカニズムは未だ不明であるが, 最近いくつかの示唆

に富むデータが報告されたので簡単に紹介する。ここでキーワードとなるのは, AT2 受容体である。というのは, アンジオテンシン II の受容体には, 互いに生理作用の拮抗する AT1/AT2 受容体の2つの主なサブタイプが存在し, AT2 受容体は血管拡張のほか, 抗炎症作用, 抗動脈硬化作用な

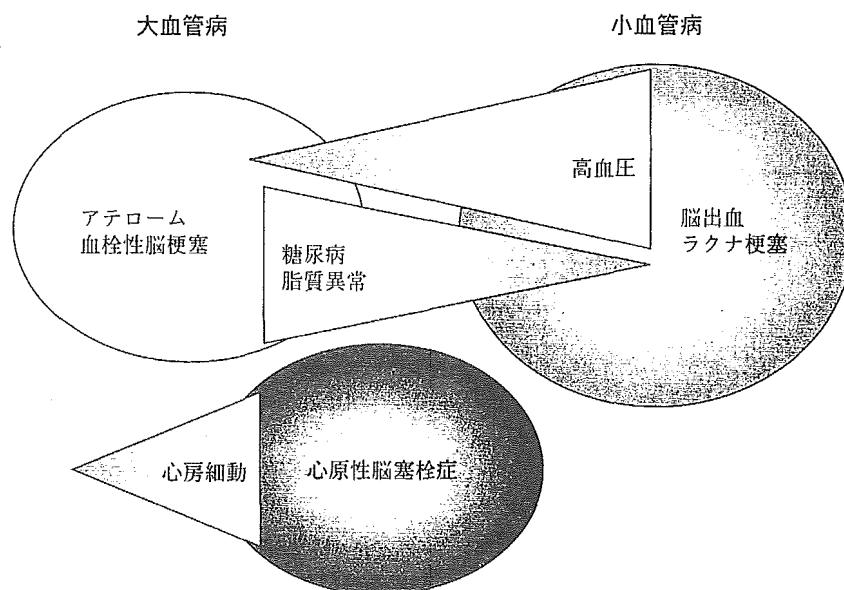


図3 脳卒中の病型と危険因子

脳梗塞の発症予防を考える上では、高血圧以外のリスク管理も重要となる。

(藤島正敏：血管医学3：233-236, 2002より)

どに関与し、臓器に対して保護的に作用していると考えられるからである。詳細は他稿に譲るが、AT1受容体阻害により増加したアンジオテンシンⅡが、ブロックされないAT2受容体を刺激して、上記の作用を増強していると考えられるようになってきている。

高次脳機能におけるAT2受容体の役割は、AT2受容体欠損マウスにおいて探索行為の減少や、不安様行動などが見られることから示唆されていたが、ヒトの精神遅滞においてもAT2受容体の欠損あるいは突然変異が見いだされ、脳の発達過程に関与しているものと考えられる¹⁵⁾。実際、AT2受容体は脳の形成時期に高発現し、出生後に減少する。ただし、軸索切断などの傷害時にも発現が増加することが知られており、器官形成後もAT2受容体刺激が神経の軸索再生を促進することが、実験的に明らかにされている¹⁶⁾。以上のことから、AT2受容体を介したシグナル伝達は神経系に保護的に作用するものと考えられる。

前述のように、AT1受容体の阻害がAT2受容体を間接的に刺激することになれば、ARBが神経細胞に保護的に作用し、ひいては高次脳機能を保つことにつながるものと期待される。従って「降圧を超えた作用」の少なくとも一部は、局所の

AT2受容体刺激によりもたらされている可能性が考えられる。

これに関しては、薬剤の局所へのアクセスが要求されることになるが、Culmanらは経静脈的、あるいは経口的に投与したARBが血液脳関門を通過して、脳内のAT1受容体の作用を減弱させることを確認している⁹⁾。彼らは、テルミサルタンはロサルタンやイルベサルタンに比して脂溶性が高く、中枢移行性に優れているが、最も脳内AT1受容体阻害作用の強いのはカンデサルタンであるとしている。

一方、ARBの脳虚血に対する影響を動物実験モデルで調べたDaiらは、ARB投与によりラットの脳虚血による神経機能障害が有意に軽減されることを明らかにし、本来AT1受容体刺激により誘導される転写因子のc-Fosやc-Junの発現を、ARBが抑制したことと関連していると考察した¹⁷⁾。しかし、彼らも神経機能が保たれたことに関してAT2受容体刺激が関与している可能性について言及し、検討すべき課題としていた。

ごく最近Iwaiらは、AT2受容体欠損マウスの中大脳動脈閉塞モデルでは野生型に比べて梗塞巣が有意に増大することを報告し、AT2受容体刺激も虚血による障害に対して保護的に作用している

——■特集・高血圧ガイドライン JSH2004 時代の ARB

ことを明らかにした。併せて彼らは ARB の虚血に対する効果を検討し、バルサルタンの投与は、野生型に対しては梗塞巣の縮小効果を示すが、AT2 受容体欠損マウスではその効果は乏しく、ARB の効果が AT2 受容体刺激を介したものであることを示した¹⁹⁾。

これまで見てきたのは RA 系に作用する薬剤の直接的な神経保護作用であるが、なかでも ARB は他の作用により間接的に脳梗塞の発症を抑えることも期待される。この場合は脳梗塞の病態が問題となるので、まず病型分類を概説する。

脳梗塞は、small vessel disease, large vessel disease に相当するラクナ梗塞とアテローム血栓性脳梗塞、ならびに血管病変と直接関係のない心原性脳塞栓症に細分類され、ラクナ梗塞とアテローム血栓性脳梗塞はそれぞれ脳梗塞の約 30～40%、30%を占める。図 3 は、脳梗塞の各病型ごとのリスクを示したもので、例えば糖尿病は脳梗塞発症率をおよそ 3 倍にすることが知られており、脳梗塞の発症予防を考える上ではこれら高血圧以外のリスク管理も重要となる。これまで、チアゾリジン系やスタチン系薬剤による個々のリスク管理の重要性が証明されている。

他稿で解説されているように、最近の大規模臨床試験の知見では、ACE 阻害薬ならびに ARB が糖尿病 (CAPPP [The Captopril Prevention Project]¹⁹⁾, HOPE, LIFE, VALUE [Valsartan Antihypertensive Long-term Use Evaluation]²⁰⁾, 心房細動 (LIFE, SCOPE) の発症を抑制することが明らかにされており、これらの作用は長期的には合併症としての脳梗塞を予防することになると考えられる。さらに、心筋梗塞などの心疾患も心原性脳梗塞の発症リスクとなるため、RA 系薬剤の心保護作用は間接的に脳を保護することにもなる。

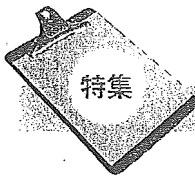
6. おわりに

アンジオテンシンの多彩な作用が明らかになるにつれ、RA 系薬剤を単なる降圧剤としてくることが難しくなりつつある。その「降圧を超えた」作用をさらに発展させることによって、脳梗塞の予防のみならず、痴呆症 (現・認知症) を含む中枢神経疾患の治療に広く寄与できるものと思われる。

文 献

- 1) Staessen JA, Wang JG, Thijs L : Cardiovascular protection and blood pressure reduction : a meta-analysis. *Lancet* 358 : 1305-1315, 2001.
- 2) Mendelsohn FA, Quirion R, Saavedra JM, et al : Autoradiographic localization of angiotensin II receptors in rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 81 : 1575-1579, 1984.
- 3) Culman J, Blume A, Gohlke P, et al : The renin-angiotensin system in the brain : possible therapeutic implications for AT (1)-receptor blockers. *J Hum Hypertens* 16 (Suppl 3) : S64-70, 2002.
- 4) Schrader H, Stovner LJ, Helde G, et al : Prophylactic treatment of migraine with angiotensin converting enzyme inhibitor (lisinopril) : randomised, placebo controlled, crossover study. *BMJ* 322 : 19-22, 2001.
- 5) Tronvik E, Stovner LJ, Helde G, et al : Prophylactic treatment of migraine with an angiotensin II receptor blocker : a randomized controlled trial. *JAMA* 289 : 65-69, 2003.
- 6) Takada J, Ibayashi S, Nagao T, et al : Bradykinin mediates the acute effect of an angiotensin-converting enzyme inhibitor on cerebral autoregulation in rats. *Stroke* 32 : 1216-1219, 2001.
- 7) Nishimura Y, Ito T, Saavedra JM : Angiotensin II AT (1) blockade normalizes cerebrovascular autoregulation and reduces cerebral ischemia in spontaneously hypertensive rats. *Stroke* 31 : 2478-2486, 2000.
- 8) 脳卒中合同ガイドライン委員会 : 脳卒中治療ガイドライン 2004. 東京. 2004.
- 9) Schrader J, Luders S, Kulschewski A, et al : Acute Candesartan Cilexetil Therapy in Stroke Survivors Study Group. : The ACCESS Study : evaluation of Acute Candesartan Cilexetil Therapy in Stroke Survivors. *Stroke* 34 : 1699-1703, 2003.
- 10) Tzourio C, Anderson C, Chapman N, et al : PROGRESS Collaborative Group. : Effects of blood pressure lowering with perindopril and indapamide therapy on dementia and cognitive decline in patients with cerebrovascular disease. *Arch Intern Med* 163 : 1069-1075, 2003.
- 11) Bosch J, Yusuf S, Pogue J, et al : HOPE Investigators. : Heart outcomes prevention evaluation.

- Use of ramipril in preventing stroke : double blind randomised trial. *BMJ* 324 : 699-702, 2002.
- 12) Dahlof B, Devereux RB, Kjeldsen SE, et al : LIFE Study Group. : Cardiovascular morbidity and mortality in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE) : a randomised trial against atenolol. *Lancet* 359 : 995-1003, 2002.
- 13) Lithell H, Hansson L, Skoog I, et al : SCOPE Study Group. : The Study on Cognition and Prognosis in the Elderly (SCOPE) : principal results of a randomized double-blind intervention trial. *J Hypertens* 21 : 875-886, 2003.
- 14) <http://www.moses-study.com/>
- 15) Vervoort VS, Beachem MA, Edwards PS, et al : AGTR2 mutations in X-linked mental retardation. *Science* 296 : 2401-2403, 2002.
- 16) Lucius R, Gallinat S, Rosenstiel P, et al : The angiotensin II type 2 (AT2) receptor promotes axonal regeneration in the optic nerve of adult rats. *J Exp Med* 188 : 661-670, 1998.
- 17) Dai WJ, Funk A, Herdegen T, et al : Blockade of central angiotensin AT (1) receptors improves neurological outcome and reduces expression of AP-1 transcription factors after focal brain ischemia in rats. *Stroke* 30 : 2391-2398, 1999.
- 18) Iwai M, Liu HW, Chen R, et al : Possible inhibition of focal cerebral ischemia by angiotensin II type 2 receptor stimulation. *Circulation* 110 : 843-848, 2004.
- 19) Hansson L, Lindholm LH, Niskanen L, et al : Effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition compared with conventional therapy on cardiovascular morbidity and mortality in hypertension : the Captopril Prevention Project (CAPPP) randomised trial. *Lancet* 353 : 611-616, 1999.
- 20) Julius S, Kjeldsen SE, Weber M, et al : VALUE trial group. : Outcomes in hypertensive patients at high cardiovascular risk treated with regimens based on valsartan or amlodipine : the VALUE randomised trial. *Lancet* 363 : 2022-2031, 2004.



誌上討論：新しいエビデンスから新しい治療 脳血管障害合併例における 降圧薬選択と降圧目標②

高橋哲也 Takahashi Tetsuya 梶川病院脳神経内科

松本昌泰 Matsumoto Masayasu 広島大学大学院医歯薬総合研究科脳神経内科学

脳卒中の発症が降圧療法により抑制できることは、すでに各種の大規模臨床試験により確認されている。主に、壮年者軽・中等症高血圧を対象とした臨床試験（VA, VA-NHLBI, USPHS, Oslo, ANBPS, MRC研究など）では、メタアナリシスにより、収縮期血圧を10 mmHg, 拡張期血圧を5～6 mmHg 下降させると脳血管障害の発症を約40%抑制できることが判明している。また、脳血管障害を発症しやすい老年者高血圧患者を対象とした大規模臨床試験の結果に関しても、メタアナリシスにより、収縮期血圧を12～14 mmHg, 拡張期血圧を5～6 mmHg 下降させると、脳血管障害の発症を34%減少させることが報告されている¹⁾。脳梗塞を含む脳血管障害の一次予防に関しては、上記の臨床試験により降圧療法の有効性が確立されているとあってよい。しかし、脳血管障害の既往のある例については、降圧が循環不全を助長し、さらなる虚血を誘発する危険性が議論されており、事実、Irieら²⁾は病型によっては、血圧と再発率の関係がJカーブを示すことを指摘している（Level 2）。一方で、脳血管障害二次予防における降圧療法の是非に関して、批判に耐えうるエビデンスが最近まで得られていなかった。

脳血管障害合併例における降圧薬選択

脳卒中発症後1年以内の再発率は8%³⁾、5年以内では17%⁴⁾と報告されており、脳卒中の最大の危険因子である高血圧をいかにコントロールするかは、慢性期の脳卒中患者の治療上きわめて重要なことである。脳卒中既往例の血圧コントロールの効果について9つの臨床試験をまとめたINDANA (individual data analysis of antihypertensive intervention trials) Project Collaboratorsによる6,752例でのメタアナリシスにより、降圧療法群では非降圧療法群に比べ相対危険度28%の有意な再発抑制効果が示唆された⁵⁾（Level 1）。しかし、この解析では脳卒中に関して統一した病型分類がされていない点が問題であった。

その意味で、PROGRESS (perindopril protection against recurrent stroke study) 試験⁶⁾の結果は、きわめてインパクトのあるものであった。すなわち、エントリー時の147/86 mmHgから、ペリンドプリルや降圧利尿薬であるインダパミドの追加投与により血圧を138/82 mmHg程度に持続的に降下させることにより、平均年齢64歳の患者において4～5年間で28%ものさらなる再発抑制効果が得られることを実証し、慢性期の脳卒中患者における降圧の重要性を示した（Level 1）。脳卒中のなかでも

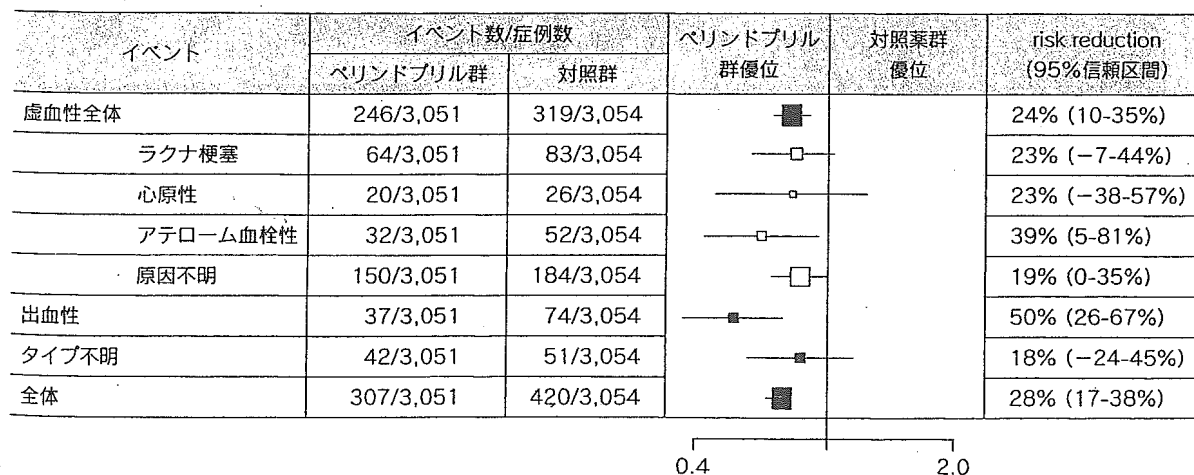
特に脳出血の抑制効果は約5割と強く、東洋人において有益と考えられる結果であった。脳梗塞についても3病型（ラクナ梗塞、アテローム血栓性脳梗塞、心原性脳梗塞）において、それぞれ23%、39%、23%の再発抑制効果が示されている(●)。このなかで効果が有意であったのは、降圧による再発が懸念されていたアテローム血栓性脳梗塞に関してであった。また、サブスタディの結果⁹⁾では、脳卒中再発例の介護の必要性についても有意な抑制効果が実証されたが、この結果も今後の高齢化社会への対応を考えるうえで意義深いものである。このPROGRESS試験の結果を含む最近のメタアナリシス⁹⁾でも、降圧療法により相対危険度が24%低下しており、INDANAとほぼ同等の結果が得られている。降圧薬間（Ca拮抗薬を除く）の比較では、ACE阻害薬と利尿薬の併用の場合に最も効果が大きく45%もの低下がみられた。

アンジオテンシンII受容体拮抗薬（ARB）の脳卒中再発予防効果に関しては、テルミサルタンを実薬とするランダム化比較試験（RCT）、すなわち、ongoing telmisartan alone and in combination with ramipril global end point trial（ONTARGET）¹⁰⁾ならびにprevention regimen for effec-

tively avoiding second strokes（PROFESS）¹¹⁾が進行中である。特に後者は、脳卒中既往のある15,500例の登録を目標に、プラセボを対照として行われており、新たな情報が得られるものと期待される。また、1,405例の脳卒中または一過性脳虚血発作既往例を対象に、ニトレンジピンとARBのエプロサルタン（わが国では未承認）を比較したMOSES（morbidity and mortality after stroke-eprosartan vs nitrendipine for secondary prevention）試験¹²⁾においては、両群の降圧効果に差がみられなかったにもかかわらず、エプロサルタン群で脳卒中再発抑制効果が優れている（相対危険度が25%低下する）ことが、2004年8月に発表された（論文未発表）。blood pressure lowering treatment trialists' collaboration（BPLTTC）によるメタアナリシス¹³⁾で、β遮断薬や降圧利尿薬に比べ一次予防効果が有意に優れる（相対危険度を13%低下させる）ことが実証されているCa拮抗薬については、これまでのところ二次予防効果に関するエビデンスは得られていない。

さらなる比較試験を通じて、より脳卒中再発抑制の優れた降圧薬が明らかにされるものと思われるが、エビデンスを重視する立場からは、脳血管障害合併

● 病型ごとのペリンドプリルによる脳卒中再発抑制効果



(Chapman N, et al. Stroke 2004; 35: 116-121⁷⁾より)

例における降圧療法としてACE阻害薬または利尿薬、あるいは両者の併用が勧められる。これに加えて日本高血圧学会2004年版(JSH 2004)ではCa拮抗薬とARBを取り上げている(Level 5)。いずれのクラスの降圧薬を選択する場合でも次項に述べる理由により、降圧効果発現が緩徐な薬が選択されるべきである。

脳血管障害合併例における降圧目標

PROGRESS試験の結果を踏まえて、降圧目標は病型にかかわらず140/90 mmHg未満とするのが妥当であろう。ただし、降圧は緩徐に行うことが肝要

で、JSH 2004では、治療開始2~3か月で150/95 mmHg未満まで降圧したうえで、最終目標へは数か月かけて降圧するように推奨している。さらに、治療中に、めまい、ふらつき、だるさ、頭重感、しびれ、神経症候の増悪などを訴えた場合には、降圧による脳循環不全症状の可能性があり、降圧薬の減量や変更が必要であるとして注意を促している。また、内頸動脈狭窄率が両側70%を超える場合は、収縮期圧を150 mmHg未満に降圧すると脳卒中再発リスクが増大するとの報告¹⁴⁾があり(②)、今後病態に応じた目標血圧設定のためのエビデンスの集積が求められる。



② 頸動脈狭窄症例における血圧と脳卒中リスクの関係

狭窄群	収縮期血圧 mmHg			
	<130	130~149	150~169	≥170
両側 <70%	1(0.69-1.44)	1(0.84-1.19)	1(0.83-1.20)	1(0.78-1.29)
片側 ≥70%	1.90(1.24-2.89)	1.18(0.92-1.51)	1.27(0.99-1.64)	1.64(1.15-2.23)
p	0.025	0.3	0.13	0.03
両側 ≥70%	5.97(2.43-14.68)	2.54(1.47-4.39)	0.97(0.4-2.35)	1.13(0.50-2.54)
p	<0.001	0.001	0.95	0.77

(両側の頸動脈狭窄率が70%以下の場合を1としたときの各群のハザード比)

(Carotid Endarterectomy Trialists' Collaboration. Stroke 2003; 34: 2583-2590¹⁴⁾より)

文献

- 1) 松本昌泰: 脳保護を視点とした高血圧性臓器障害の予防・治療. 日本臨牀 2004; 62 (Supple): 142-152.
- 2) Irie K, Yamaguchi T, Minematsu K, et al: The J-curve phenomenon in stroke recurrence. Stroke 1993; 24: 1844-1849.
- 3) Lees KR, Bath PM, Naylor AR: ABC of arterial and venous disease. Secondary prevention of transient ischaemic attack and stroke. BMJ 2000; 320: 991-994.
- 4) Hankey GJ, Warlow CP: Treatment and secondary prevention of stroke: evidence, costs, and effects on individuals and populations. Lancet 1999; 354: 1457-1463.
- 5) The INDANA Project Collaborators: Effect of antihypertensive treatment in patients having already suffered from stroke. Gathering the evidence. Stroke 1997; 28: 2557-2562.
- 6) PROGRESS Collaborative Group: Randomised trial of a perindopril-based blood-pressure-lowering regimen among 6,105 individuals with previous stroke or transient ischaemic attack. Lancet 2001; 35: 1033-1041.
- 7) Chapman N, Huxley R, Anderson C, et al: Effects of a perindopril-based blood pressure-lowering regimen on the risk of recurrent stroke according to stroke subtype and medical history. Stroke 2004; 35: 116-121.
- 8) PROGRESS Collaborative Group: Effects of a perindopril-based blood pressure lowering regimen on disability and dependency in 6105 patients with cerebrovascular disease: a

- randomized controlled trial. Stroke 2003; 34: 2333-2338.
- 9) Rashid P, Leonardi-Bee J, Bath P. Blood pressure reduction and secondary prevention of stroke and other vascular events: a systematic review. Stroke 2003; 34: 2741-2748.
 - 10) Unger T. The ongoing telmisartan alone and in combination with ramipril global endpoint trial program. Am J Cardiol 2003; 91:28-34.
 - 11) <http://www.profess-study.com/com/homepage.jsp>
 - 12) <http://www.moses-study.com/>
 - 13) Blood Pressure Lowering Treatment Trialists' Collaboration: Effects of ACE inhibitors, calcium antagonists, and other blood-pressure-lowering drugs: results of prospectively designed overviews of randomised trials. Lancet 2000; 356: 1955-1964.
 - 14) Carotid Endarterectomy Trialists' Collaboration: Relationship between blood pressure and stroke risk in patients with symptomatic carotid occlusive disease. Stroke 2003; 34: 2583-2590.

特集
循環器疾患と
RA系

臨床

RA系阻害薬の脳保護作用

翠清会梶川病院神経内科部長

高橋 哲也

Takahashi, Tetsuya

広島大学大学院医歯薬学総合研究科
病態探究医科学講座脳神経内科学教授

松本 昌泰

Matsumoto, Masayasu

Protective effect of renin-angiotensin system blockade on brain function

KEY WORDS

脳血流自動調節能/
(RA系薬剤の)脳卒中予防効果/
AT2受容体刺激作用/(RA系薬剤の)神経保護作用

主な略語

RA :
renin-angiotensin
(レニン-アンジオテンシン)

ACE :
angiotensin converting enzyme
(アンジオテンシン変換酵素)

ARB :
angiotensin receptor blocker
(アンジオテンシン受容体拮抗薬)

MMSE :
mini mental state examination



高血圧は脳梗塞の最大の危険因子であり、血圧コントロールの本来の目的は脳卒中を含む心血管イベントの抑制である。これまでの大規模臨床試験からは収縮期血圧を10mmHg、拡張期血圧を5～6mmHg低下させると脳卒中の発症率が30%低下することが示されている¹⁾。しかし、近年の試験ではレニン-アンジオテンシン (renin-angiotensin : RA) 系の薬剤においては、降圧効果が従来の薬剤と同程度であっても脳梗塞の予防効果の点で優れているものがあり、これらの薬剤については降圧以外の効果により脳梗塞を予防し

ていることが考えられる。「降圧を超えた作用」といわれる所以である。さらに、認知機能障害を抑制する効果が証明された薬剤もあり、他の臓器の場合と同様、RA系の薬剤は、脳に対しても臓器保護作用があると考えられるようになった。血圧調節に関与する循環系としてのRA系とは独立して、脳、心臓、副腎、血管、腎臓に存在し、長期的な調節因子として作用する局所RA系が、これにかかわっているものと想定されるが、その脳保護作用についてははまだ不明な点が多い。本稿では、これまでに得られている知見のいくつかを紹介する。

CARDIAC PRACTICE
VOL.16 NO.1

CARDIAC PRACTICE 65 (65)

特集 ■ 循環器疾患と RA系

- RA系のコンポーネントは脳実質ならびに脳の血管にも存在する。
- RA系の薬剤は高血圧患者の脳血流自動調節能を是正する作用を示す。
- ARBの中には脳梗塞急性期から使用可能と思われるものがある。

中枢神経系におけるRA系

脳弓下器官、終板器官、最後野、室傍核や視索上核は脳内のアンジオテンシン結合部位であり、これら血液脳関門を欠く諸核の神経細胞は血液中のアンジオテンシンを感知して、体液・塩分量と血圧の調節に関与している²⁾。一方、脳血液関門により血液循環と隔てられた青斑核、孤束核などにもアンジオテンシン受容体が存在し、これらの部位では脳局所に存在するレニン、アンジオテンシン変換酵素(angiotensin converting enzyme : ACE)の作用によりアンジオテンシノーゲンからアンジオテンシンIIが酵素的に産生される。アンジオテンシノーゲンはグリア細胞で産生され、主に細胞外に存在することからアンジオテンシンIIへの変換は細胞外で行われていると考えられる。レニンならびにACEは神経細胞の神経終末に存在するが、レニンの発現量は低く、アンジオテンシノーゲンから直接アンジオテンシンIIが生成される経路も考えられている。ACE活性はむしろ脈絡叢や被殻、淡蒼球で高く、他の機能に関与している可能性がある³⁾。

RA系と脳血流自動調節能

RA系のコンポーネントは脳の血管にも存在している。RA系と脳血管の関係を示すものとして興味深いのは、リシノプリルやカンデサルタンが片頭痛予防に有用であるとする報告である⁴⁾。機序は明らかにされていないものの、アンジオテンシンが脳血管系の調節に関与していることを示唆するものである。血圧の変動にかかわらず脳における血流が一定となるように、抵抗血管である脳細動脈の血管径が調節される(脳血流自動調節能)ことが脳血管の特徴の1つである。高血圧のある場合は内皮依存性血管拡張反応が减弱しているため、灌流圧の低下に際して十分に拡張できず、下限の血圧が通常より高くなり、したがって脳血流自動調節能曲線は右へシフトする(図1)。ACE阻害薬(ACE inhibitor : ACEI)のカプトプリルは血管内皮に存在するACEを阻害して、ACEにより産生されるアンジオテンシンを減少させ、逆にACEにより分解されるブラジキニンを増加させることにより、自動調節能曲線を左方へ復帰させる⁵⁾。アンジオテンシン受容体拮抗薬(angiotensin receptor blocker : ARB)のカンデサルタンにも同様に脳血流自動調節能曲線を左にシフトさせる効果があり⁷⁾、これらの薬剤は脳血流を維持したまま降圧

作用を示すため、脳卒中を予防する上で理にかなった降圧薬といえる。ただし、脳梗塞急性期ではこの調節能が破綻しており、降圧により脳虚血が増悪することから、脳卒中治療ガイドライン⁸⁾では収縮期血圧220mmHg以上または平均血圧130mmHg以上が持続する場合を除いて急性期の降圧療法を推奨していない。しかし、脳卒中急性期の高血圧に対してカンデサルタンによる降圧の安全性を検討したACCESS(The Acute Candesartan Cilxetil Therapy in Stroke Survivors)試験⁹⁾の結果は、ここに述べた考え方に再考を迫るものであった。この試験では、脳梗塞発症24時間以内に10~15%血圧を低下させることを目標として、カンデサルタン内服を開始した群(カンデサルタン群：内頸動脈に70%以上の狭窄を有する例を除く)と7日目以降に同薬剤で血圧をコントロールした群(コントロール群)で、脳卒中の再発、意識状態の低下、脳浮腫、心血管イベント、および心不全の発症をプライマリーエンドポイントとして追跡した。12ヵ月後の全血管系イベントはカンデサルタン群9.8%、コントロール群18.7%と有意にカンデサルタン群で低かった。この差が降圧作用によるものでないことは、追跡期間中、両群の血圧に差がなかったことから明らかであるが、いずれにせよ、初期の7日間のARB内服の有無が予後に大きな差をもたらしたことになる。脳卒中急性期の降圧療法に関

- RA系の薬剤の中には認知機能低下の抑制作用を有するものがある。
- ARBはAT2受容体刺激を通して、臓器保護的に作用している可能性がある。

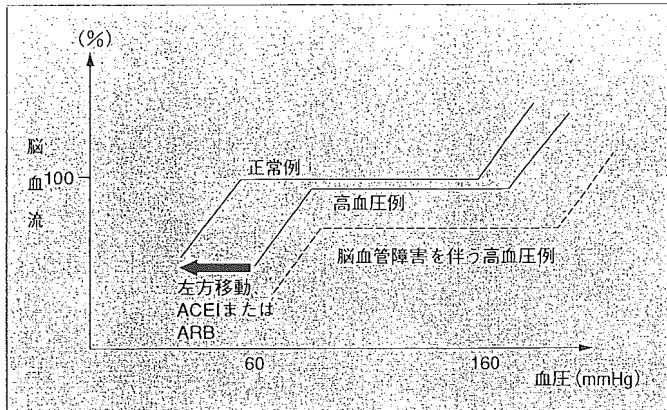


図1 脳血流の自動調節能

してさらに検討の余地があることを意味している。

脳卒中予防における RA系薬剤の有用性

PROGRESS (Perindopril Protection Against Recurrent Stroke Study) 試験¹⁰⁾は脳卒中慢性期におけるACEIであるペリンドプリルの効果を検証するために実施された国際共同研究で、日本を含む世界7地域の10カ国が参加して行われた。登録に際して血圧値に関する規定はなく、くも膜下出血を除く脳卒中6,105例を対象として試験が実施された。脳卒中の再発については、ペリンドプリル群で血圧が147/86mmHgから138/82mmHgへと低下し、プラセボ群に比して28% (95%信頼区間: 15~39%)の低下と有意な抑制効果がみられた。さらに臓器保護作用を示すも

のとして、脳卒中再発例における痴呆発症例が有意に少ないことが報告された。脳卒中中の二次予防効果は血圧が高くない例に対して認められたこともACEIの臓器保護効果を示唆する。同じくACEIであるラミプリルの脳卒中予防効果がHOPE (Heart Outcomes Prevention Evaluation) 試験の付随研究であるMICRO-HOPE試験¹¹⁾において示されている。また、β遮断薬のアテノロールを対照として、ARBのロサルタンの心血管イベントに対する効果を検討したLIFE (The Losartan Intervention For Endpoint reduction) 研究¹²⁾で、両薬剤の血圧に対する効果はほぼ同程度であったにもかかわらず、ロサルタンはアテノロールより脳梗塞発症率を25%低下させ、その差は有意なものであった。この結果はARBが降圧以外の機序で神経に保護的に作用することを示すものである。一方、カンデサルタンに

ついて検討したSCOPE (The Study on Cognition and Prognosis in the Elderly) 試験¹³⁾では、非致死性の脳梗塞のリスクが27.8%低下した。特筆すべきは第19回国際高血圧学会/第12回欧州高血圧学会で発表されたサブ解析の結果で、MMSE (Mini Mental State Examination) が24~28と認知機能が軽度低下したいわゆる痴呆予備軍では、コントロール群に比べてカンデサルタン群でその後のスコアの低下が抑制された(p=0.04) (図2)。かねてより高血圧は痴呆の危険因子とされており、SCOPE試験はそれを裏付けると同時に、今後の痴呆発症予防を模索する上で1つの手がかりとなるものである。

ARBの神経保護作用

ARBが痴呆予防効果を示すメカニズムはいまだ不明であるが、最近いくつかの示唆に富むデータが報告されたので簡単に紹介する。ここでキーワードとなるのはアンジオテンシンIIタイプ2 (angiotensin II type 2: AT2) 受容体である。というのはアンジオテンシンIIの受容体には、互いに生理作用の拮抗するAT1/AT2受容体の2つの主要サブタイプが存在し、AT2受容体は血管拡張作用の他、抗炎症作用、抗動脈硬化作用などに関与し、臓器に対して保護的に作用していると考えられるからである。詳細は他稿に譲るが、

特集 ■ 循環器疾患とRA系

- AT2受容体は軸索再生促進に関与し、その変異による精神遅滞の報告もみられる。
- ARB投与によりラットの脳虚血による神経機能障害が軽減する。
- AT2受容体欠損マウスではARBの梗塞巣縮小効果が減弱する。

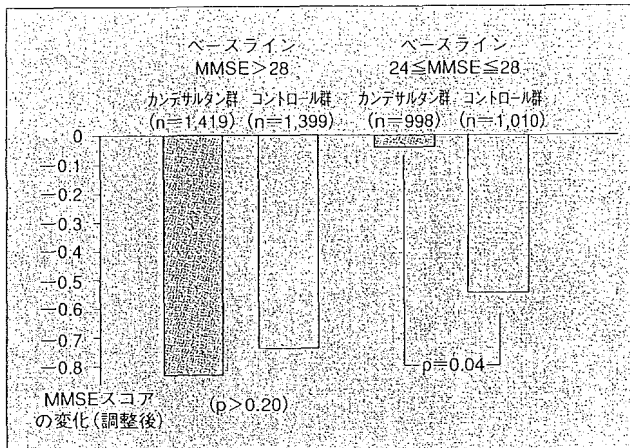


図2 カンデサルタンの認知機能に対する効果
(第19回国際高血圧学会/第12回欧州高血圧学会)

AT1受容体阻害により増加したアンジオテンシンが、ブロックされないAT2受容体を刺激して、上記の作用を増強していると考えられるようになってきている。AT1受容体を阻害した場合に、AT2受容体の下流のシグナルであるcGMP (cyclic guanosine monophosphate) の産生が腎臓にて増加するのはその1例である¹⁴⁾。高次脳機能におけるAT2受容体の役割は、AT2受容体欠損マウスにおいて探索行為の減少や、不安様行動などがみられることから示唆されていたが、ヒトの精神遅滞においてもAT2受容体の欠損あるいは突然変異が見い出され、脳の発達過程に関与しているものと考えられる¹⁵⁾。実際、AT2受容体は脳の形成時期に高発現し、出生後に減少する。ただし、軸索切断などの傷害時にも発現が増加することが

知られており、器官形成後もAT2受容体刺激が神経の軸索再生を促進することが実験的に明らかにされている¹⁶⁾。以上のことから、AT2受容体を介したシグナル伝達は神経系に保護的に作用するものと考えられる。前述のようにAT1受容体の阻害がAT2受容体を間接的に刺激するのであれば、ARBが神経細胞に保護的に作用し、ひいては高次脳機能を保つことにつながるものと期待される。つまり「降圧を超えた作用」の少なくとも一部は、局所のAT2受容体刺激によりもたらされている可能性が考えられる。これに関しては薬剤の局所へのアクセスが要求されるが、Culmanらは経静脈的、あるいは経口的に投与したARBが血液脳関門を通過して脳内のAT1受容体の作用を減弱させることを確認している³⁾。彼らは、

テルミサルタンはロサルタンやイルベサルタンに比して脂溶性が高く、中枢移行性に優れているが、最も脳内AT1受容体阻害作用の強いのはカンデサルタンであるとしている。

一方、ARBの脳虚血に対する影響を動物実験モデルで調べたDaiらは、ARB投与によりラットの脳虚血による神経機能障害が有意に軽減されることを明らかにし、本来AT1受容体刺激により誘導される転写因子のc-Fosやc-Junの発現をARBが抑制したことと関連していると考察した¹⁷⁾。しかし彼らも、神経機能が保たれたことに関してAT2受容体刺激が関与している可能性について言及し、検討すべき課題としていた。ごく最近、IwaiらはAT2受容体欠損マウスの中大脳動脈閉塞モデルでは野生型マウスに比べて梗塞巣が増大することを報告し、AT2受容体刺激も虚血による障害に対して保護的に作用していることを明らかにした。併せて彼らはARBの虚血に対する効果を検討し、バルサルタンの投与は野生型マウスに対しては梗塞巣の縮小効果を示すものの、AT2受容体欠損マウスではその効果は乏しいことから、ARBの効果がAT2受容体刺激を介したものであることを示した¹⁸⁾。

これまでみてきたのはRA系に作用する薬剤の直接的な神経保護作用であるが、なかでもARBは他の作用により間接的に脳梗塞の発症を抑えることも期待される。この作用は脳梗塞の病態

- RA系薬剤は、糖尿病、心房細動の発症を抑制することが明らかにされている。
- RA系薬剤は心保護作用も有しており、合併症としての脳梗塞を予防することが期待される。

と関連することから、ここで病型分類を概説する。脳梗塞はsmall vessel disease, large vessel diseaseに相当するラクナ梗塞とアテローム血栓性脳梗塞、ならびに血管病変と直接関係のない心原性脳塞栓症に細分類され、ラクナ梗塞とアテローム血栓性脳梗塞はそれぞれ脳梗塞の約30~40%, 30%を占める。図3は脳梗塞の各病型ごとのリスクファクターを示したもので、たとえば糖尿病は脳梗塞発症率をおよそ3倍にすることが知られており、脳梗塞の発症予防を考える上ではこれら高血圧以外のリスク管理も重要となる。これまでチアゾリジン系やスタチン系薬剤による個々のリスク管理の重要性が証明されている。他稿で解説されているように、最近の大規模臨床試験の知見では、ACEIならびにARBが糖尿病

HOPE, LIFE, VALUE (Valsartan Anti-hypertensive Long-term Use Evaluation)²⁰⁾], 心房細動(LIFE, SCOPE)の発症を抑制することが明らかにされており、これらの作用は長期的には合併症としての脳梗塞を予防することになると考えられる。さらに心筋梗塞などの心疾患も心原性脳塞栓症の発症リスクとなるため、RA系薬剤の心保護作用は間接的に脳を保護することにもなる。また、前記リスクを重複する病態である代謝症候群にも、アンジオテンシンが関与していることを示す知見²¹⁾も増えつつあることから、特にアテローム血栓性脳梗塞に対しては直接的な効果も見込まれる。



アンジオテンシンの多彩な作用が明らかになるにつれ、RA系薬剤を単なる降圧薬としてくることが難しくなりつつある。その「降圧を超えた作用」をさらに発展させることによって、脳梗塞の予防のみならず、広く中枢神経疾患の治療に寄与できるものと思われる。

●文 献

- 1) Staessen JA, Wang JG, Thijs L : Cardiovascular protection and blood pressure reduction ; a meta-analysis. Lancet 358 : 1305-1315, 2001.
- 2) Mendelsohn FA, Quirion R, Saavedra JM, et al : Autoradiographic localization of angiotensin II receptors in rat brain. Proc Natl Acad Sci USA 81 : 1575-1579, 1984
- 3) Culman J, Blume A, Gohlke P, et al : The renin-angiotensin system in the brain ; possible therapeutic implications for AT (1) -receptor blockers. J Hum Hypertens 16 (Suppl 3) : S64-S70, 2002
- 4) Schrader H, Stovner LJ, Helde G, et al : Prophylactic treatment of migraine with angiotensin converting enzyme inhibitor (lisinopril) ; randomised, placebo controlled, crossover study. BMJ 322 : 19-22, 2001
- 5) Tronvik E, Stovner LJ, Helde G, et al : Prophylactic treatment of migraine with an angiotensin II recep-

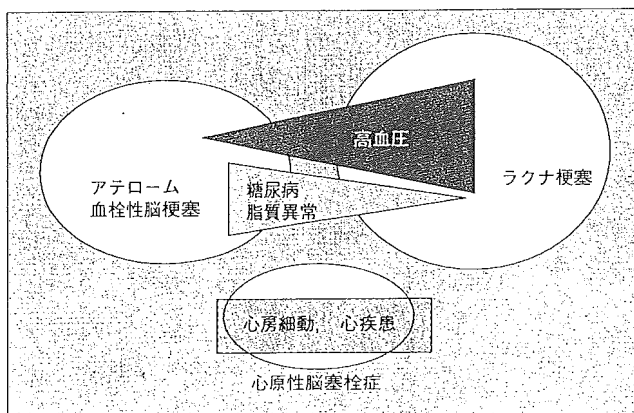


図3 脳梗塞のリスクファクター
(藤島正敏 : Prog Med 21 : 1225, 2001より引用)

- tor blocker ; a randomized controlled trial. *JAMA* 289 : 65-69, 2003
- 6) Takada J, Ibayashi S, Nagao T, et al : Bradykinin mediates the acute effect of an angiotensin-converting enzyme inhibitor on cerebral autoregulation in rats. *Stroke* 32 : 1216-1219, 2001
- 7) Nishimura Y, Ito T, Saavedra JM : Angiotensin II AT(1) blockade normalizes cerebrovascular autoregulation and reduces cerebral ischemia in spontaneously hypertensive rats. *Stroke* 31 : 2478-2486, 2000
- 8) 脳卒中合同ガイドライン委員会 : 脳卒中治療ガイドライン2004. 東京, 2004
- 9) Schrader J, Luders S, Kulschewski A, et al : The ACCESS Study ; evaluation of Acute Candesartan Cilxetil Therapy in Stroke Survivors. *Acute Candesartan Cilxetil Therapy in Stroke Survivors Study Group. Stroke* 34 : 1699-1703, 2003
- 10) Tzourio C, Anderson C, Chapman N, et al : Effects of blood pressure lowering with perindopril and indapamide therapy on dementia and cognitive decline in patients with cerebrovascular disease. *PROGRESS Collaborative Group. Arch Intern Med* 163 : 1069-1075, 2003
- 11) Bosch J, Yusuf S, Pogue J, et al : Use of ramipril in preventing stroke ; double blind randomised trial. *HOPE Investigators. Heart outcomes prevention evaluation. BMJ* 324 : 699-702, 2002
- 12) Dahlof B, Devereux RB, Kjeldsen SE, et al : Cardiovascular morbidity and mortality in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE) ; a randomised trial against atenolol. *LIFE Study Group. Lancet* 359 : 995-1003, 2002
- 13) Lithell H, Hansson L, Skoog I, et al : The Study on Cognition and Prognosis in the Elderly (SCOPE) ; principal results of a randomized double-blind intervention trial. *SCOPE Study Group. J Hypertens* 21 : 875-886, 2003
- 14) Siragy HM, El-Kersh MA, De Gasparo M, et al : Differences in AT2-receptor stimulation between AT1-receptor blockers valsartan and losartan quantified by renal interstitial fluid cGMP. *J Hypertens* 20 : 1157-1163, 2002
- 15) Vervoort VS, Beachem MA, Edwards PS, et al : AGTR2 mutations in X-linked mental retardation. *Science* 296 : 2401-2403, 2002
- 16) Lucius R, Gallinat S, Rosenstiel P, et al : The angiotensin II type 2 (AT2) receptor promotes axonal regeneration in the optic nerve of adult rats. *J Exp Med* 188 : 661-670, 1998
- 17) Dai WJ, Funk A, Herdegen T, et al : Blockade of central angiotensin AT (1) receptors improves neurological outcome and reduces expression of AP-1 transcription factors after focal brain ischemia in rats. *Stroke* 30 : 2391-2398, 1999
- 18) Iwai M, Liu HW, Chen R, et al : Possible inhibition of focal cerebral ischemia by angiotensin II type 2 receptor stimulation. *Circulation* 110 : 843-848, 2004
- 19) Hansson L, Lindholm LH, Niskanen L, et al : Effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition compared with conventional therapy on cardiovascular morbidity and mortality in hypertension ; the Captopril Prevention Project (CAPPP) randomised trial. *Lancet* 353 : 611-616, 1999
- 20) Julius S, Kjeldsen SE, Weber M, et al : Outcomes in hypertensive patients at high cardiovascular risk treated with regimens based on valsartan or amlodipine ; the VALUE randomised trial. *VALUE trial group. Lancet* 363 : 2022-2031, 2004
- 21) Prasad A, Quyyumi AA : Renin-angiotensin system and angiotensin receptor blockers in the metabolic syndrome. *Circulation* 110 : 1507-1512, 2004

Upregulation of SR-PSOX/CXCL16 and Recruitment of CD8⁺ T Cells in Cardiac Valves During Inflammatory Valvular Heart Disease

Ryoko Yamauchi, Makoto Tanaka, Noriaki Kume, Manabu Minami, Takahiro Kawamoto, Kiyonori Togi, Takeshi Shimaoka, Shu Takahashi, Junko Yamaguchi, Takeshi Nishina, Masanori Kitaichi, Masashi Komeda, Toshiaki Manabe, Shin Yonehara, Toru Kita

Objective—SR-PSOX/CXCL16 is a transmembrane chemokine and is implicated in activated CD8⁺ T cell trafficking. In the present study, we examined the expression pattern of SR-PSOX/CXCL16 in the heart and investigated a potential role of SR-PSOX/CXCL16 in inflammatory valvular heart disease.

Methods and Results—Initial expression of SR-PSOX/CXCL16 in murine embryos was detected in endothelial cells lining endocardial cushions in the forming heart at E11.5. From mid-gestation to adult, expression of this gene in the heart was exclusively observed in valvular endothelial cells. Examination of SR-PSOX/CXCL16 expression in human cardiac valves demonstrated that SR-PSOX/CXCL16 was strongly expressed in valvular and neocapillary endothelial cells in patients with infective endocarditis. SR-PSOX/CXCL16 expression in neocapillary endothelial cells was also observed in patients with rheumatic and atherosclerotic valvular disease. Moreover, CD8⁺ T cells were distributed closely to endothelial cells expressing SR-PSOX/CXCL16. In vitro adhesion assays showed that SR-PSOX/CXCL16 induced adhesion of activated CD8⁺ T cells to vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) through very late antigen-4 (VLA-4) activation. Furthermore, SR-PSOX/CXCL16 stimulated interferon- γ (IFN- γ) production by CD8⁺ T cells.

Conclusions—SR-PSOX/CXCL16 may be involved in CD8⁺ T cell recruitment through VLA-4 activation and stimulation of IFN- γ production by CD8⁺ T cells during inflammatory valvular heart disease. (*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:282-287.)

Key Words: SR-PSOX/CXCL16 ■ cardiac valve ■ endothelial cell ■ infective endocarditis ■ CD8⁺ T cell

Chemokines are a group of small, structurally related proteins with four conserved cysteines forming two essential disulphide bonds. Based on NH₂-terminal cysteine motifs, chemokines are classified into four major subfamilies: CC, CXC, C, and CX3C.^{1,2} Although increasing evidence has demonstrated multiple functions of chemokines, including lymphocyte differentiation³ and angiogenesis,^{4,5} the main function of chemokines is lymphocyte traffic control.^{6,7} Chemokine gradients mediate chemotaxis by providing directional cues for lymphocyte motility.^{7,8} Chemokines also play a key role in lymphocyte/endothelial-cell recognition. Chemokines presented on endothelial cells trigger rapid activation of integrins, resulting in arrest and firm adhesion of lymphocytes.^{7,9,10}

Based on functional characteristics, chemokines are classified into homeostatic and inflammatory chemokines. Homeostatic chemokines are produced constitutively and are

involved in the proper development and homeostasis of the immune system.^{7,11} Inflammatory chemokines are upregulated under inflammatory conditions and recruit effector cells, including monocytes, granulocytes, and effector T cells, through integrin activation.^{7,11}

SR-PSOX/CXCL16 is a CXC chemokine and exists in a transmembrane form.¹²⁻¹⁴ SR-PSOX/CXCL16 is expressed in dendritic cells in lymphoid organs and attracted activated T cells in vitro, suggesting that it may be involved in T cell-antigen presenting cell interactions in initiation of immune responses.^{12,14} Moreover, upregulation of SR-PSOX/CXCL16 by inflammatory stimuli indicated that SR-PSOX/CXCL16 may be involved in efficient recruitment of effector T cells into inflammatory lesions.¹² Although the expression of SR-PSOX/CXCL16 has been described in adult lymphoid tissues,¹² its distribution pattern outside the immune system is unknown. Therefore, in this study, we first examined the

Received July 16, 2003; revision accepted December 1, 2003.

From the Department of Cardiovascular Medicine (R.Y., N.K., T.K.), Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kyoto, Japan; the Department of Social Service (M.T.), Kyoto University Hospital, Kyoto, Japan; the Department of Geriatric Medicine (M.T., M.M., T.K., K.T.), Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kyoto, Japan; the Institute for Viral Research (T.S., S.Y.), Kyoto University, Kyoto, Japan; Biomedical Research Laboratories (S.T., J.Y.), Sankyo Co., Ltd, Tokyo, Japan; the Department of Cardiovascular Surgery (T.N., M.K.), Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kyoto, Japan; and the Department of Anatomic Pathology (M.K., T.M.), Kyoto University Hospital, Kyoto, Japan.

Correspondence to Dr Makoto Tanaka, Department of Social Service, Kyoto University Hospital, 54 Shogoin-Kawahara-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan. E-mail makoto@kuhp.kyoto-u.ac.jp

© 2004 American Heart Association, Inc.

Arterioscler Thromb Vasc Biol. is available at <http://www.atvbaha.org>

DOI: 10.1161/01.ATV.0000114565.42679.c6

spatial and temporal expression pattern of SR-PSOX/CXCL16 during murine development. Interestingly, we found that SR-PSOX/CXCL16 was specifically expressed in endothelial cells of the cardiac valves. Histological examination of human cardiac valves and *in vitro* studies demonstrated that the chemokine might play an important role in CD8⁺ T cell recruitment and interferon- γ (IFN- γ) production during inflammatory valvular heart disease.

Methods

Mouse Tissue Samples, In Situ Hybridization, and Immunohistochemistry

Noon on the day of mating was referred to as E0.5 (day 0.5 postcoitus). Paraffin sections (5 μ m) of embryonic and adult tissues from C57BL/6 mice were fixed with 4% paraformaldehyde, treated with 0.1 mol/L HCl, acetylated in 0.25% acetic anhydride in 0.1 mol/L triethanolamine, and hybridized with ³⁵S-CTP-labeled riboprobe at 55°C overnight in 50% formamide, 0.3 mol/L sodium chloride, 20 mmol/L Tris-HCl, 5 mmol/L EDTA, 10 mmol/L sodium pyrophosphate, 1X Denhardt, 10% dextran sulfate, and 0.5 mg/mL yeast RNA. After hybridization, they were treated with RNase-A, washed and dehydrated through graded ethanol, and emulsion autoradiography was performed. The SR-PSOX/CXCL16 riboprobe comprised a full-length cDNA. Hybridization with a sense probe did not give any signals.

For immunohistochemistry, paraffin sections were deparaffinized in xylene and rehydrated in graded alcohol and incubated with anti-mouse CXCL16 antibody (R&D Systems, Minneapolis, MN) or anti-mouse platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) antibody (Pharmingen, San Diego, CA) overnight at 4°C. After washing, sections were incubated with biotinylated goat anti-mouse IgG and horseradish peroxidase-conjugated streptavidin (Vector Laboratories, Burlingame, CA), and staining was detected with 3,3'-diaminobenzidine (DAB).

Human Tissue Samples and Immunohistochemistry

Paraffin sections (5 μ m) were prepared from human valve specimens from 14 patients who underwent valve replacement. The diagnosis of rheumatic valve disease was based on a history of rheumatic fever and characteristic echocardiographic features. All tissue samples were fixed in 10% neutral formalin and embedded in paraffin wax. Sections were deparaffinized in xylene, rehydrated in graded alcohol, and autoclaved for 10 minutes at 121°C in 10 nM EDTA (pH 8.0). The tissue sections were then incubated with anti-SR-PSOX/CXCL16, anti-CD8, anti-CD4, anti-CD68, anti-CD29, or anti-VCAM-1 antibody overnight at 4°C. Anti-human SR-PSOX/CXCL16 monoclonal antibody was generated by immunizing mice with recombinant human SR-PSOX/CXCL16 protein. The antibody gave a single band on Western blotting (R.Y. and M.T., unpublished data) and inhibited chemotactic activity of human SR-PSOX/CXCL16 on human CXCR6-expressing cells.¹⁵ Monoclonal anti-human CD8⁺ and CD4⁺ antibodies were purchased from Medical & Biological Laboratories (Nagoya, Japan), and monoclonal anti-human CD29, CD34, and VCAM-1 antibodies were from Novocastrol Laboratories (Newcastle, UK). After washing, sections were incubated with biotinylated goat anti-mouse IgG and horseradish peroxidase-conjugated streptavidin, and staining was detected with DAB.

Preparation of Cell Suspension From Spleen

Lymphocytes from spleen were prepared as previously described.^{16,17} CD8⁺ T cells were prepared from spleen of C57BL/6 mice by positive selection using MACS immunobeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). For *in vitro* activation, CD8⁺ T cells were incubated with anti-CD28 (10 μ g/mL; Pharmingen, San Diego, CA) in RPMI1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum, 24 mmol/L NaHCO₃, 50 μ mol/L 2-mercaptoethanol, and

IL-2 (4 ng/mL) in 96-well plates coated with anti-CD3 (1 μ g/mL; Becton Dickinson, San Jose, CA) for 5 days. The activated T cells were then rested in the aforementioned medium supplemented with 2 ng/mL of IL-2 for 4 days. Recombinant human IL-2 was kindly provided by Takeda Pharmaceutical Company (Osaka, Japan).

Cell Adhesion Assay

Adhesion assay was performed as described.^{18–20} Briefly, polystyrene 96-well microtiter plates were coated with soluble VCAM-1 (2.5 μ g/mL) and blocked by heat-denatured BSA. Activated CD8⁺ T cells suspended at a concentration of 1.5×10^6 /mL in 0.1% BSA-RPMI were incubated for the indicated times in a CO₂ incubator at 37°C in the presence or absence of soluble SR-PSOX/CXCL16 (R&D Systems, Minneapolis, MN). After incubation, nonadherent cells were removed by centrifugation (topside down) at 48g for 5 minutes. Attached cells were fixed with 5% glutaraldehyde, stained with 0.1% crystal violet in 200 nM MES (pH 6.0), and solubilized with 10% acetic acid. The absorbance of each well at 595 nm was measured using a multiscan enzyme-linked immunosorbent assay reader (TECAN, Männedorf, Switzerland). Anti-mouse α -integrin antibody was purchased from Pharmingen.

Cell Stimulation and Measurement of IFN- γ Production

CHO cell lines stably expressing mouse SR-PSOX/CXCL16 were established by transfection with a plasmid (pME18S) expressing full-length mouse SR-PSOX/CXCL16 cDNA. After selection with 800 μ g/mL of G418 for 2 weeks, drug-resistant clones were isolated, and clones expressing SR-PSOX/CXCL16 were identified by Western blotting. Activated CD8⁺ T cells at a concentration of 1×10^5 /mL were co-cultured with control CHO cells or CHO cells stably expressing SR-PSOX/CXCL16 in 0.1% BSA-RPMI for 24 hours in 96-well plates. After incubation, 100 μ L of supernatants were collected and assessed for IFN- γ production using an ELISA kit (Bio Source International, Camarillo, CA) according to the manufacturer's protocol. The detectable range of the ELISA kit was 1 to 500 pg/mL and the optical density of individual wells was determined at 450 nm using a microplate reader. Anti-mouse SR-PSOX/CXCL16 monoclonal antibody was generated by immunizing mice with recombinant mouse SR-PSOX/CXCL16 protein. This antibody gave a single band on Western blotting (R.Y. and M.T., unpublished data) and blocked chemotaxis of mouse CXCR6 expressing cells to mouse SR-PSOX/CXCL16 (T.S. and S.Y., unpublished data).

Statistical Analysis

Data were analyzed by one-factor ANOVA followed by Fisher PLSD as a post hoc test. $P < 0.01$ was considered to be statistically significant.

Results

SR-PSOX/CXCL16 Is Expressed in Cushion and Valve Endothelium During Development

Initial expression of SR-PSOX/CXCL16 was detected in the heart at E11.5. SR-PSOX/CXCL16 mRNA was exclusively expressed in endothelial cells covering endocardial cushions (Figure 1A through 1D). Mesenchymal cells transformed from these cushion endothelial cells lost SR-PSOX/CXCL16 expression (Figure 1A through 1D). From mid-gestation to adult, SR-PSOX/CXCL16 expression was confined to endothelial cells of the cardiac valves at mRNA (Figure 1E through 1H) and protein (Figure 1I) levels. Expression of SR-PSOX/CXCL16 protein in valvular endothelium was confirmed by positive PECAM-1 staining (Figure 1J).

Outside the heart, SR-PSOX/CXCL16 mRNA expression was first observed in the meninges, covering the spinal cord,

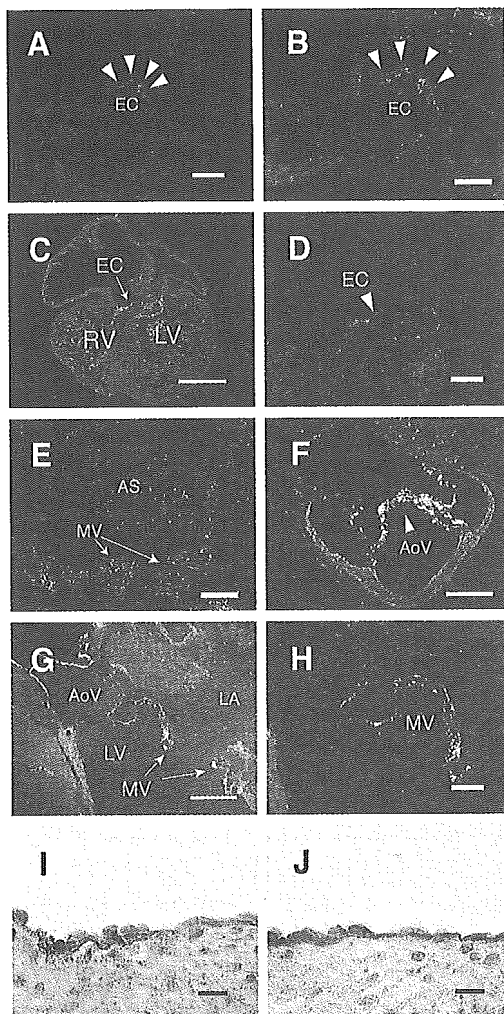


Figure 1. Expression of SR-PSOX/CXCL16 in the heart is confined to valvular endothelium. In situ hybridization and immunohistochemistry of murine samples. In situ hybridization was performed on paraffin sections of mouse embryonic and adult tissues using ^{35}S -labeled mouse SR-PSOX/CXCL16 riboprobe. A–D, Sagittal sections of day 11.5 postcoitus (A, B) and day 13.5 postcoitus (C, D) embryos. SR-PSOX/CXCL16 was expressed in endothelial cells covering the endocardial cushion (EC). RV indicates right ventricle; LV, left ventricle. E, Sagittal section of a day 13.5 postcoitus embryo, showing SR-PSOX/CXCL16 expression in the forming mitral valve (MV). AS indicates atrial septum. F, Sagittal section of a neonate, showing hybridization signals in the aortic valve (AoV). G and H, Sagittal section of an adult heart. SR-PSOX/CXCL16 was expressed in valvular endothelium. LA indicates left atrium. I and J, Immunohistochemical staining of mitral valve. SR-PSOX/CXCL16 was expressed in valvular endothelium (I), as confirmed by positive PECAM-1 staining in a serial section (J). Scale bars = 200 μm (C, F, G), 100 μm (A, D, H), 50 μm (B, E), and 10 μm (I, J).

dorsal root, and cerebral sulcus at E13.5. At E15.5, SR-PSOX/CXCL16 was still detected in pia mater and arachnoid. Expression of SR-PSOX/CXCL16 mRNA in lymphoid organs including the thymus and spleen was first observed at this stage. SR-PSOX/CXCL16 was also expressed in Rathke's pouch. However, no expression of SR-PSOX/CXCL16 was detected in the adult brain. These data are shown in Figure I (available online at <http://atvb.ahajournals.org>).

Upregulation of SR-PSOX/CXCL16 in Inflammatory Valvular Disease

The specific expression of SR-PSOX/CXCL16 in valvular endothelium suggested that this chemokine may play a role in the pathogenesis of valvular heart disease. We thus examined expression of SR-PSOX/CXCL16 protein in human cardiac valves from patients who underwent valve replacement (Table). In noninflammatory valvular disease (prolapse of mitral valve), SR-PSOX/CXCL16 protein was undetectable (Figure 2A). In contrast, dramatic upregulation of SR-PSOX/CXCL16 protein was observed in valvular endothelium in patients with infective endocarditis (Figure 2C, 2F, and 2H). SR-PSOX/CXCL16 protein expression in valvular endothelial cells was confirmed by positive CD34 staining (Figure 2D) and control IgG was substituted for the primary antibody in negative control experiments (Figure 2E). Macrophages (open arrowheads in Figure 2F), as revealed by positive CD68 staining (Figure 2G), also expressed SR-PSOX/CXCL16 protein. Interestingly, endothelial cells of neocapillaries within cardiac valves were also positive for SR-PSOX/CXCL16 (Figure 2J and 2M). In patients with rheumatic and atherosclerotic valvular disease, SR-PSOX/CXCL16 protein expression was observed in neocapillary endothelial cells within cardiac valves (Figure 3C and 3E), whereas no expression was detected in valvular endothelium (Figure 3A).

Because it was previously reported that SR-PSOX/CXCL16 attracted activated CD8^+ T lymphocytes *in vitro*, we next examined whether CD8^+ T cells existed in these lesions. As expected, we detected abundant CD8^+ T cells underneath valvular endothelial cells in patients with infective endocarditis (Figure 2I). CD8^+ T cells were also detected around neocapillaries within cardiac valves in patients with endocarditis (Figure 2K) as well as rheumatic and atherosclerotic valvular disease (Figure 3D and 3F). No CD8^+ T cells were observed in cardiac valves from patients with noninflammatory valvular disease (Figure 2B). Although SR-PSOX/CXCL16 was also shown to attract activated CD4^+ T cells *in vitro*,¹² we did not observe any CD4^+ T cells in cardiac valves in patients with inflammatory valvular heart disease (Figure 2L).

SR-PSOX/CXCL16-Mediated Adhesion of Activated CD8^+ T Lymphocytes to VCAM-1

The close association of SR-PSOX/CXCL16 expression with CD8^+ T cells suggested that SR-PSOX/CXCL16 may be involved in CD8^+ T cell recruitment. To find out if SR-PSOX/CXCL16 mediates adhesion of CD8^+ T lymphocytes, we performed adhesion assays. We examined adhesion of activated CD8^+ T cells to purified adhesion molecules to determine the regulation of integrin avidity by SR-PSOX/CXCL16. Interestingly, SR-PSOX/CXCL16 was able to induce firm adhesion of activated CD8^+ T cells to VCAM-1 by more than 2-fold, but not to intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) (Figure 4A), whereas SR-PSOX/CXCL16 had no effects on naive CD8^+ T cells (Figure 4A). Moreover, functional blocking of the $\alpha 4$ -subunit of integrins abolished the effect of SR-PSOX/CXCL16 (Figure 4B), indicating that the adhesion mediated by SR-PSOX/CXCL16 was VLA-4-dependent.

Expression of CXCL 16 in Valvular and Neocapillary Endothelium

Case	Valve	Sex/Age	Diagnosis	CXCL16 (Valvular Surface Endothelium)	CXCL16 (Capillary Endothelium)	CD8 ⁺ T cell	CRP	WBC ($\times 10^3$)
1	Mitral	M/61	IE	+	+	+	11.3	14.5
2	Aortic	M/48	IE	+	+	+	2.9	7.3
3	Aortic	M/74	IE	+	+	+	1.3	7.2
4	Mitral	M/27	IE	+	+	+	4.1	10.5
5	Mitral	M/16	IE	+	+	+	10.5	13.3
6	Aortic	M/50	IE	+	+	+	8.8	7.8
7	Mitral	F/73	MR (MVP)	-	-	-	0	4.2
8	Mitral	M/46	MR (MVP)	-	-	-	0.1	6.9
9	Mitral	F/73	MSR (rheumatic)	-	+	+	0.4	4.7
10	Mitral	F/64	AR+MSR (rheumatic)	-	+	+	0.1	4.6
11	Aortic	M/84	AR+MSR (rheumatic)	-	+	+	0.1	6.4
12	Aortic	F/74	AS (atherosclerotic)	-	+	+	0	3.9
13	Aortic	M/72	AS (atherosclerotic)	-	+	+	0.2	4.9
14	Aortic	M/59	AS (atherosclerotic)	-	+	+	0	6.8

IE indicates infective endocarditis; MR, mitral regurgitation; AS, aortic stenosis; AR, aortic regurgitation; MSR, mitral stenosis and regurgitation; MVP, mitral valve prolapse; WBC, white blood cells.

We thus examined expression of VCAM-1 and VLA-4 in cardiac valves in patients with infective endocarditis. Interestingly, neocapillary endothelial cells expressing SR-PSOX/CXCL16 were positive for VCAM-1 (Figure 2N), and CD8⁺ T cells within neocapillary lumens (Figure 2O) expressed VLA-4 (Figure 2P).

Stimulation of IFN- γ Production in Activated CD8⁺ T Lymphocytes by SR-PSOX/CXCL16

To assess the involvement of SR-PSOX/CXCL16 in inflammatory processes, we examined whether SR-PSOX/CXCL16 could activate IFN- γ production by CD8⁺ T cells. As shown in Figure 4C, co-culture with CHO cells stably expressing SR-PSOX/CXCL16 significantly enhanced IFN- γ production by activated CD8⁺ T cells. IFN- γ production by naive CD8⁺ T cells was undetectable either in the presence or in the absence of SR-PSOX/CXCL16 (data not shown). The enhancement of IFN- γ production by SR-PSOX/CXCL16 in activated CD8⁺ T cells was completely blocked by anti-SR-PSOX/CXCL16 antibody (Figure 4C). Either control CHO cells or CHO cells with stable expression of SR-PSOX/CXCL16 did not produce IFN- γ (data not shown).

Discussion

SR-PSOX/CXCL16 was detected in the cushion endothelium at a time coincident with endothelial-mesenchymal transformation. The endothelium covering the endocardial cushion is considered to be a specific population of endothelial cells that has acquired competence to receive transformation signals from the myocardium.²¹ To our knowledge, SR-PSOX/CXCL16 is the first molecular marker specific for the cushion endothelium, demonstrating at a molecular level that endothelial cells covering the cushion are distinct from other endocardial cells. Furthermore, SR-PSOX/CXCL16 was later expressed in endothelial cells of the cardiac valves, indicating

that valve endothelium is derived from endothelial cells covering endocardial cushions at earlier stages.

In human cardiac valves, SR-PSOX/CXCL16 expression was undetectable in the absence of valvular inflammation. The difference in the expression pattern between human and mice may be caused by species difference. Interestingly, SR-PSOX/CXCL16 expression was upregulated during inflammation and CD8⁺ T cells were closely associated with SR-PSOX/CXCL16-positive endothelial cells. Adhesion assays demonstrated that SR-PSOX/CXCL16 mediated adhesion of activated CD8⁺ T lymphocytes to VCAM-1, suggesting that SR-PSOX/CXCL16 may, at least in part, play a role in CD8⁺ T cell recruitment in inflammatory valvular disease. However, it is possible that other inflammatory chemokines may be also involved in this process. Lymphocyte firm adhesion generally requires activation of integrins by chemokines.^{7,22} The effect of SR-PSOX/CXCL16 was abolished by inhibition of the $\alpha 4$ -integrin, indicating that SR-PSOX/CXCL16 mediates adhesion of activated CD8⁺ T cells to VCAM-1 through activation of VLA-4. These results were further supported by immunostaining for VCAM-1 and VLA-4.

Does SR-PSOX/CXCL16 stimulate cytokine production in activated CD8⁺ T cells in addition to integrin activation? Interestingly, SR-PSOX/CXCL16 enhanced IFN- γ production by activated CD8⁺ T cells. IFN- γ is an important immune-activating cytokine that mediates macrophage activation and induces inflammatory responses.²³⁻²⁵ In vitro studies have shown that IFN- γ inhibited growth of endothelial cells and smooth muscle cells, and in vivo studies demonstrated that the proliferative response of smooth muscle cells after arterial injury was inhibited by IFN- γ .²⁶⁻²⁸ Therefore, it was suggested that IFN- γ may be associated with reduction of the fibrous cap, thereby destabilizing atherosclerotic plaques.²⁴ Similarly, IFN- γ production by CD8⁺ T cells in inflammatory valvular disease may promote

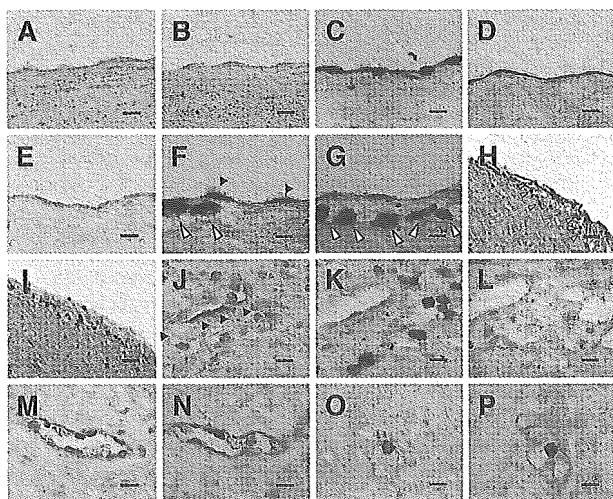


Figure 2. Upregulation of SR-PSOX/CXCL16 expression and presence of CD8⁺ T cells in cardiac valves in patients with infective endocarditis. Immunohistochemical staining of human cardiac valves. Paraffin sections were stained with anti-SR-PSOX/CXCL16 monoclonal antibody (A, C, F, H, J, M) or anti-CD8 monoclonal antibody (B, I, K, O). A and B, Serial sections of mitral valve from a patient with mitral valve prolapse, showing no expression of SR-PSOX/CXCL16 and absence of CD8⁺ T cells. C–E, Serial sections of mitral valve from a patient with infective endocarditis. SR-PSOX/CXCL16 expression was observed in valvular endothelial cells (C), as confirmed by positive CD34 staining (D). E, Control IgG did not produce any significant immunostaining. F and G, Serial sections of mitral valve from a patient with infective endocarditis. SR-PSOX/CXCL16 was expressed in valvular endothelial cells (arrowheads in F) and macrophages (open arrowheads in F), as revealed by positive CD68 staining in a serial section (G). H and I, Serial sections of aortic valve from a patient with infective endocarditis. SR-PSOX/CXCL16 expression was observed in valvular endothelial cells (H) and macrophages (open arrowheads in H). CD8⁺ T cells are located underneath valvular endothelial cells (I). J–L, Serial sections of mitral valve from a patient with infective endocarditis. Note SR-PSOX/CXCL16 expression in neocapillary endothelial cells (arrows in J) and CD8⁺ T cells infiltrate around neocapillary endothelial cells (K). There was no CD4⁺ T cells around neocapillary endothelial cells (L). M and N, Serial sections of mitral valve from a patient with infective endocarditis. Neocapillary endothelial cells expressing SR-PSOX/CXCL16 (M) were also positive for VCAM-1 (N). O and P, CD8⁺ T cell located within the neocapillary lumen (O) expressed VLA-4 (P). Scales bars = 10 μ m (A–G, J–P) and 25 μ m (H, I).

remodeling and destruction of inflamed valves. Moreover, IFN- γ increased expression of VCAM-1 on endothelial cells.²⁹ The upregulation of VCAM-1 by IFN- γ may further enhance CD8⁺ T cell trafficking mediated by SR-PSOX/CXCL16.

Expression of SR-PSOX/CXCL16 in valvular endothelium was only observed in patients with infective endocarditis. What is the pathological significance for the different expression pattern between patients with infective endocarditis and rheumatic/atherosclerotic valvular disease? First, expression of SR-PSOX/CXCL16 in valvular endothelium as well as in neocapillary endothelium may further enhance recruitment of CD8⁺ T cells into inflamed tissues. Second, expression of SR-PSOX/CXCL16 on valvular surface may mediate bacterial adhesion to valvular tissues. Recently, it was reported that SR-PSOX/CXCL16 mediated adhesion and phagocytosis of bacteria by

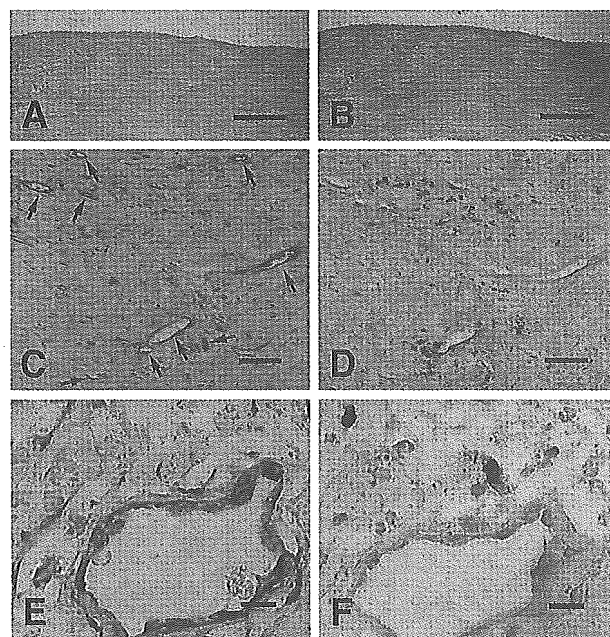


Figure 3. Expression of SR-PSOX/CXCL16 in neocapillary endothelial cells in patients with rheumatic and atherosclerotic valvular disease. Immunohistochemical staining of human cardiac valves. Paraffin sections were stained with anti-SR-PSOX/CXCL16 monoclonal antibody (A, C, E), or anti-CD8 monoclonal antibody (B, D, F). A–D, Serial sections of aortic valve from a patient with rheumatic valvular disease. Panels A and B show no expression of SR-PSOX/CXCL16 in valvular endothelium and absence of CD8⁺ T cells. However, SR-PSOX/CXCL16 expression was clearly detected in neocapillary endothelial cells (arrows in C) and close association of CD8⁺ T cells could be observed (D). E and F, Serial sections of aortic valve from a patient with atherosclerotic valvular disease. Neocapillary endothelial cells (arrows in E) were positive for SR-PSOX/CXCL16. CD8⁺ T cells were located around neocapillaries (F). Scales bars = 100 μ m (A, B), 50 μ m (C, D), and 10 μ m (E, F).

antigen presenting cells.¹⁵ SR-PSOX/CXCL16 may be involved in the attachment of bacteria to valvular endothelial cells, which is the first step in the development of infective endocarditis.

Does inflammation still persist in the chronic phase of rheumatic valve disease? It was recently reported that plasma high-sensitivity C-reactive protein (hsCRP) level was significantly higher in patients with chronic rheumatic valve disease than in patients with prosthetic valves or in healthy subjects.³⁰ Moreover, patients with multiple valve disease had significantly higher plasma hsCRP levels than those with single valve involvement.³⁰ These results suggested the persistence of inflammation in rheumatic valves at chronic stages. Expression of SR-PSOX/CXCL16 in neocapillary endothelial cells and invasion of CD8⁺ T cells in rheumatic valves may support their findings.

In summary, cardiac expression of SR-PSOX/CXCL16 was restricted to valvular endothelium and the expression in valvular endothelium was dramatically upregulated during infective endocarditis. Moreover, SR-PSOX/CXCL16 expression was detected in neocapillaries within cardiac valves in chronic inflammatory valvular disease. The result of the present study suggested that SR-PSOX/CXCL16 might be involved in the recruitment of activated CD8⁺ T lymphocytes and enhancement of IFN- γ production during inflammatory valvular heart disease.