

3. 高齢者高血圧のエビデンス

西永 正典

要約 日本高血圧学会の高血圧診療ガイドライン (JSH2004) では、高齢者高血圧に対して、前期高齢者 (65歳以上75歳未満) と後期高齢者 (75歳以上) の降圧目標をいずれも140/90mmHg未満とした。しかし、ガイドラインの中でも示されているように、私たち老年科医が日々遭遇している、80歳前半以降の高齢者高血圧に対してのエビデンスは未だに少ない。海外のEWPHE (European Working Party on High Blood Pressure in the Elderly Trial) では、80歳以上では降圧治療の効果がほとんど消失するものに対し、HY-VET (Hypertension in the Very Elderly Trial) パイロット試験では、降圧療法によって脳卒中だけが、降圧療法のベネフィットがあった。さらに、STOP-Hypertension, MRC-old, STONEと同様に、NIPPON DATA90の解析でも、降圧薬を服用して、正常血圧レベルに達していない群のリスクがもっとも高く、降圧薬を服用し正常血圧にコントロールされている群では、降圧薬を服用せず正常血圧である健康群とほとんどリスクが変わらなかった。我々のフィールドでも高齢者の降圧コントロールが十分でなく、高血圧コントロール不十分例で要介護になりやすいことを考えると、欧米に比し脳卒中が多い日本人では、降圧療法により脳卒中の発症がある程度抑制できるならば、「介護予防の観点」からも高齢者に対する降圧療法は可能な範囲で勧められるべきと考えられる。

Key words: 高血圧, 高齢者, 降圧治療効果, 生命予後, 機能予後

(日老医誌 2007; 44: 441-444)

はじめに

高齢者高血圧患者数は、近年著明に増加している。しかし、高齢者高血圧の十分な管理に対する効果について大規模な疫学研究は少なく、その至適降圧値について十分な意見の一致をみていない。さらに、高齢高血圧患者では動脈硬化が進展して、降圧による臓器血流低下が原因であると思われるさまざまな症状をきたす例も少なく、2004年日本高血圧学会によるガイドラインのとおり、診察時血圧140/90の降圧目標値にむかって、慎重に降圧することが求められている。本シンポジウムでは、高齢者高血圧に対する降圧療法の効果について、大規模研究を中心に紹介するとともに、老年医学の観点から、「介護予防」の立場からみた高齢者高血圧のエビデンスについて触れてみたい。

高齢者高血圧の予後

「高齢で、血圧が高いほど脳心血管事故が多い」ことは、米国のフラミンガムで明らかにされた。すなわち、男女ともに高齢になるほど、同じ血圧値であっても脳心血管事故の発症率が高い。さらに、70歳代の高齢者では、収縮期血圧が十分にコントロールされていなければ、男性では、約2.5倍、女性でも約2倍の脳血管障害は発症のリスクがある。

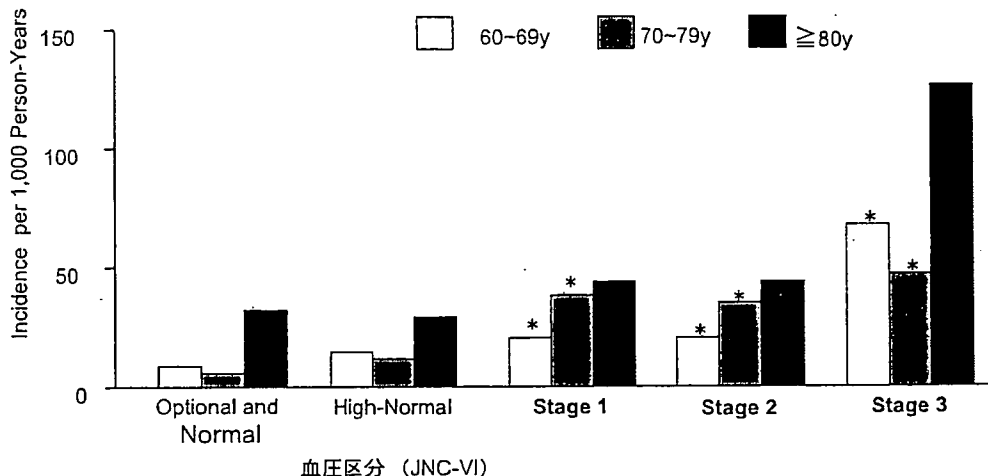
欧米に比べ脳卒中の多い、日本の久山町研究¹⁾では、80歳代における脳卒中の発症頻度が急激に増加すること明らかにされた(図1)。血圧コントロールが十分でない80歳代の高齢者では脳卒中の発症頻度は、年間10%~15%であり、高齢者の寝たきりの原因の約4割が脳卒中である事実を考えると、たとえ80歳代であっても血圧のコントロールは介護予防の観点からも重要と考えられる。

高齢者高血圧の治療効果

それでは、80歳以上の高齢者高血圧に対して、積極的な降圧療法を展開すれば、脳心血管事故の発症が防げるかというところとそれほど単純ではない。

The evidence of elderly hypertension

Masanori Nishinaga: 高知大学医学部老年病・循環器・神経内科学



| | SBP | DBP |
|-------------|-------------|---------|
| Optional | <120 かつ | <80 |
| normal | <130 かつ | <85 |
| High-normal | 130-139 または | 85-90 |
| Stage 1 | 140-159 または | 90-99 |
| Stage 2 | 160-179 または | 100-109 |
| Stage 3 | >180 または | >110 |

図1 年齢階層別・血圧階層別の心血管疾患発症率 (久山町研究) (文献1) より引用)

たとえば、60歳以上の収縮期高血圧患者だけを対象とした SHEP 研究 (1991年) は、約4,700例を治療群 (利尿薬、効果不十分の場合はβ遮断薬追加) とプラセボ群に分け、4.5年にわたって追跡した。その結果、治療群で脳卒中、心筋梗塞、全血管疾患の発症率がいずれも有意に抑制され、老年者の収縮期高血圧に対する治療の有効性が立証された。

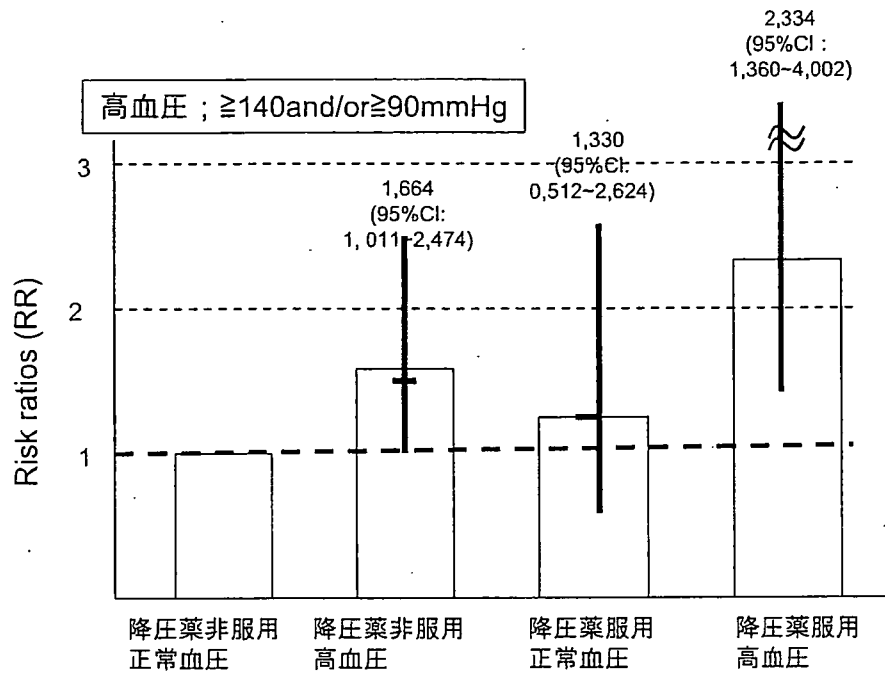
さらに、より高齢の高血圧患者 (70~84歳) を対象とした STOP-Hypertension (1991年) でも、治療群 (β遮断薬、必要に応じて利尿薬追加) で心血管イベントの発生が有意に減少することが示された。続く MRC-old、STONE でもほぼ同様の成績が得られ、高齢者高血圧に対する降圧治療のエビデンスが確立された。

一方、EWPHE (European Working Party on High Blood Pressure in the Elderly Trial, 1984年) や HY-VET などの超高齢者に対する介入試験の結果は、降圧による治療効果、すなわち、脳心血管事故の発症を、期待するほどの抑制はみられない。EWPHEでは80歳以上になると、プラセボ群と実薬群でほとんど違いがみられなくなる。一方、HYVET (Hypertension in the Very Elderly Trial) パイロット試験では、対象が85歳とい

う高齢群であるにもかかわらず、降圧療法によって脳卒中中だけが、降圧療法のベネフィットがあるという結果であった。欧米に比べて脳卒中が多い日本人において降圧療法により、脳卒中中の発症がある程度抑制できるならば、介護予防の観点からも、高齢者に対する降圧療法は積極的に勧められるべきであると考えられる。

さらに、最近の日本人のデータである NIPPON DATA90 の解析²⁾では、60歳以上の住民を対象とした降圧薬服用による血圧レベルと心血管疾患死亡のリスクとの関連を検討した報告がある (図2)。それによれば、降圧薬を服用していて、正常血圧レベルに達していない群のリスクがもっとも高く、降圧薬を服用し正常血圧にコントロールされている群では、降圧薬を服用せず正常血圧である健康群とほとんどリスクが変わらないことを示している。

疾患の発症と死亡との違いは臨床的には、大きな問題であり、死亡が減っても発症が増えることは、それだけ要介護高齢者を生み出すことにほかならない。老年医学的見地から、高齢者に対する降圧療法は、脳卒中などの死亡とともに発症を抑制することにも、力点が置かれなければ、「健康寿命」の延伸につながらないと思われる。



adjusted for age and gender, personal history of CVD, total cholesterol, smoking, diabetes, physical exercise, serum creatinine

図2 60歳以上の住民における降圧薬服用状況と血圧レベルごとの心血管疾患死亡リスク (NIPPON DATA90) (文献2)より引用)

表1 10年後のADL低下 (要介護状況発現) の危険因子
香北町1991年集団 (1488, 男:647, 女:841)

| | オッズ比 | 95%信頼区間 | p |
|-----------------|-------|--------------|----------|
| 年齢 | 1.163 | 1.120-1.207 | < 0.0001 |
| 女性 | 1.741 | 1.026-2.954 | 0.04 |
| 情報関連機能 (視聴覚) 低下 | 1.950 | 1.293-2.941 | 0.0015 |
| 脳卒中 | 4.901 | 1.024-23.453 | 0.0466 |
| 飲酒 | 0.601 | 0.375-0.962 | 0.0339 |

(文献3)より引用)

高齢者高血圧に対する今後の課題：
「高知県香北町健康長寿計画」から

高齢者の健康で自立した期間 (健康寿命) をいかにして長くするか。健康寿命の延伸を目指した取り組みは、多くの全国自治体で行われてきた。高知県香北町の取り組みは、全人口の40%近くが65歳以上の高齢者で、高齢者政策に悩んでいた自治体と、寝たきりになる前の予防的介入の必要性が重要と考えてきた大学との利害が一致し、1990年から高知医科大学との自治体・大学共同事業がはじまった。これまで、高齢者一人当たりの医療

費の伸びの抑制や、85歳以上の自立高齢者割合の改善をはじめ、多くの老年医学的成果をあげ、当初の目標は達成できた。しかし、後期高齢者が高齢者の50%以上となり、さらに90歳以上の高齢者が高齢者人口の5%を超えるようになると、自立して生活を営める高齢者の割合がしだいに鈍化しはじめた。もちろん、同様のシステムで後追いした自治体の状況と比べれば、自立高齢者割合は85%以上とっとも高い水準で推移しているのであるが、介護予防を目的とした老年医学的介入のこれからの課題が明らかになってきた。

松林らは10年後の要介護状況発現の要因について検討した (表1)³⁾。この中で、年齢、性、生活機能 (ADL) 以外で脳卒中の発症が独立した要因として残り、介入し予防できる要因として重要であった。

われわれは、この点に着目し、脳卒中予防が、健康長寿のために大きな役割をきたすと考え、血圧と日常活動度の低下、すなわち、自立喪失との関連について検討した。

高齢者の血圧は変動しやすく、短時間の血圧変動が大きいばかりでなく、白衣高血圧や仮面高血圧といった比較的長期の血圧変動も来しやすい。高齢者の場合、健

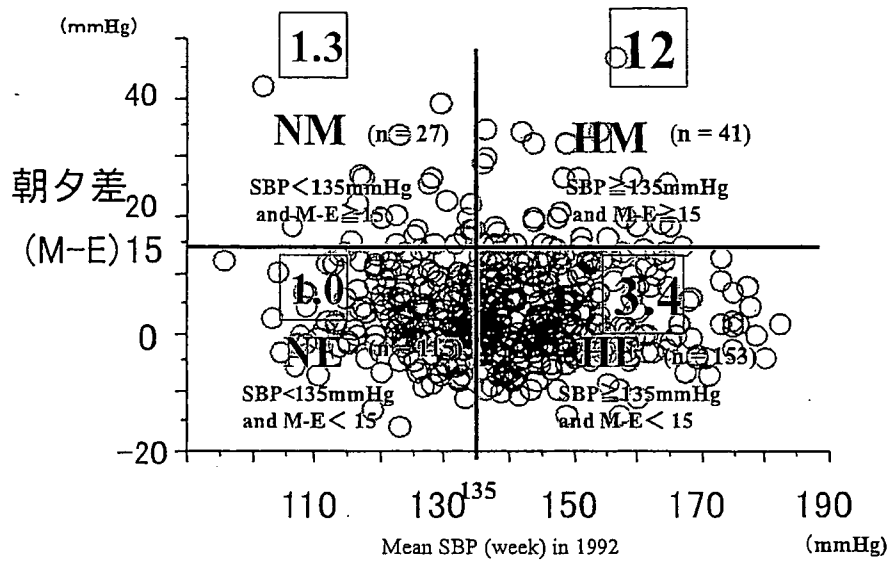


図3 家庭収縮期血圧における要介護オッズ比 (文献4) より引用)

診時の血圧値が予後を十分に反映しないことも示されており、家庭血圧値が高齢者の血圧コントロールの指標として重要な役割を果たすと考えられている。

しかし、一方では高齢者、特に後期高齢者や80歳以降の高齢者の降圧には慎重な意見もあり、家庭血圧レベルでも十分な血圧コントロールがなされていないのが現状である。

私たちの検討でも、75歳以上の地域在住高齢者の連続5日間朝・夕の家庭血圧の平均値で収縮期血圧が135 mmHg以上の高齢者は約半数に認めた。

さらに、朝の血圧が、夕方より高い高齢者高血圧群では要介護になる可能性が、十分血圧のコントロールされている群に比べて、12倍も高いこと(図3)から、降圧可能な高齢者では、十分な降圧が、要介護予防の観点から重要であると考えられる⁹⁾。

超高齢社会に突入しつつあるわが国においては、降圧療法による死亡数の減少や脳卒中発症の減少はもちろん

重要であるが、介護予防の観点からも、高齢者高血圧における降圧療法の意義を捉えなおすことも重要であると思われる。

文 献

- 1) Arima H, Tanizaki Y, Kiyohara Y, Tsuchihashi T, Kato I, Kubo M, et al: Validity of the JNC VI recommendations for the management of hypertension in a general population of Japanese elderly: the Hisayama study. Arch Intern Med 2003; 163: 361-366.
- 2) 齊藤重幸: 高齢者高血圧のエビデンス: 日本における疫学研究を中心に. Geriat Med 2005; 43: 1849-1855.
- 3) 松林公蔵: 要介護状態発現の危険因子: 香北町縦断研究から. 日老医誌 2001; 38: 614-616.
- 4) Nishinaga M, Takata J, Okumiya K, Matsubayashi K, Ozawa T, Doi Y: High morning home blood pressure is associated with a loss of functional independence in the community-dwelling elderly aged 75 years or older. Hypertens Res 2005; 28: 657-663.

第 48 回日本老年医学会学術集会記録
(ミニレビュー)

老年症候群；わずかな視・聴覚機能低下が生活機能や QOL 低下に与える影響

西永 正典 池 成基 上総 百合 高田 淳 土居 義典

老年症候群；わずかな視・聴覚機能低下が生活機能や QOL 低下に与える影響

西永 正典¹⁾ 池 成基²⁾ 上総 百合¹⁾ 高田 淳¹⁾ 土居 義典¹⁾

要約 高齢者にとって視・聴覚機能の低下は、高齢者生活機能の自立維持の重要な阻害因子であるにもかかわらず、老化現象のひとつと考えられ治療可能であっても放置されることが多い。しかし、今回の検討では、ごく軽度の視・聴覚機能の低下であっても、ADLばかりでなく、うつ尺度、QOL（主観的幸福度）に大きく影響するため、視・聴覚機能評価は高齢機能評価（チェックリスト）に不可欠と考えられる。

Key words：視力障害、聴力障害、要介護、QOL（生活の質）、ADL（日常生活活動度）

（日老医誌 2007；44：302-304）

はじめに

高齢者にとって、視覚および聴覚機能の低下は、本人や家族、そして医療・介護関係者にもさほど異常とは思われない加齢現象の一つとして捉えられており、治療可能にもかかわらず、「高齢であるから」という理由で放置されることが少なくない。さらに、平成18年度の介護保険改正により「介護予防」に重点が置かれるようになったが、要介護ハイリスクグループ（特定高齢者）の選定の一つの判断基準となる25項目のチェックリストの中に、視・聴覚機能低下に関する問いはみられず、わずかな視・聴覚機能の低下が、一見健常と思われる高齢者にどのような影響を与えるかについての検討は少ない^{1)~3)}。

そこで、本ミニレビューでは、わずかな視・聴覚機能低下と地域在住高齢者の日常活動度、QOLとの関連について検討した。

対象・方法

高知県K町在住65歳以上の高齢者に2000年時に自記式アンケートを実施し、1,874人（男813、女1,061、平均年齢76±9歳）より、視・聴覚機能に関する項目、すなわち、視覚機能：問題なし（日常生活に支障がない）、軽度支障あり（新聞の小さな文字は読めないが中等度以上は読める）、中等度支障あり（新聞を読むことができない）、重度支障あり（明暗しかわからない）、聴覚機能：

問題なし（日常生活に支障なし（補聴器使用可））、軽度支障あり（正常より大声が必要）、中等度支障あり（耳のそばで大声でゆっくり反復が必要）、重度支障あり（ほとんど、まったく聞こえない）のおのおの4段階の回答を得た（表1）。身体機能は基本的ADL（歩行、階段昇降、食事、更衣、排便排尿、入浴、整容：21点満点）、高次ADL（老研式生活能力活動指標）のうち、公共交通機関の利用の項目を除いた12点満点、うつ尺度はGeriatric Depression Scale (GDS15)、QOLはVisual Analogue Scale (VAS)を用いて評価した。

なお、本研究は、高知大学医学部倫理委員会において、住民調査に関する承認を得た。加えて、毎年、対象者アンケート調査実施時に文書による同意取得を行った。

結果

(1) 65歳以上の高齢者では、視覚支障なし1,610(85.9%)、軽度障害210(11.2%)、中等度障害43(2.3%)、重度障害11(0.6%)であった。一方、聴覚支障なし1,564

表1 視・聴覚自記式アンケート

- | |
|-------------------------------------|
| (1) 視覚機能アンケート (4段階) |
| ・支障なし：日常生活に支障なし（眼鏡使用可） |
| ・軽度支障あり：新聞の小さな文字は読めないが、中等度以上の文字は読める |
| ・中等度支障あり：新聞を読むことができない |
| ・重度支障あり：明暗しかわからない |
| (2) 聴覚機能アンケート (4段階) |
| ・支障なし：日常生活に支障なし（補聴器使用可） |
| ・軽度支障あり：正常より大声が必要 |
| ・中等度支障あり：耳のそばで大声でゆっくり反復が必要 |
| ・重度支障あり：ほとんど、まったく聞こえない |

1) M. Nishinaga, Y. Kazusa, J. Takata, Y. Doi：高知大学医学部老年病・循環器・神経内科学教室

2) S. Chi：同 フィールド医学研究会

表2 各群の比較

| | 視・聴覚ともに問題なし (n = 1,448) | 聴覚のみ軽度低下 (n = 130) | 視覚のみ軽度低下 (n = 97) | 視・聴覚ともに軽度低下 (n = 92) | p |
|----------------------|----------------------------|-----------------------|----------------------|-------------------------|----------|
| 年齢(歳) | 74±7 | 79±7 | 78±8 | 80±8 | < 0.0001 |
| 性(男/女) | 634/814 | 63/67 | 33/64 | 39/53 | n.s. |
| Basic ADL (21点満点) | 20.5±2.0 | 20.0±2.4 | 18.1±4.3 | 18.1±3.7 | < 0.0001 |
| Advanced ADL (12点満点) | 10.6±2.2 | 9.6±2.3 | 7.4±3.5 | 6.9±3.5 | < 0.0001 |
| MMS (30点満点) | 27.0±2.9 | 27.1±2.5 | 24.2±5.4 | 24.6±3.5 | < 0.0001 |
| GDS (15点満点) | 6.6±3.7 | 7.0±4.0 | 8.8±3.8 | 9.4±3.5 | < 0.0001 |

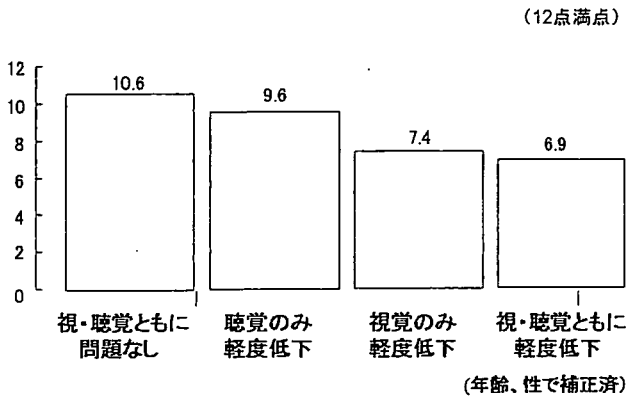


図1 高度 ADL (Advanced ADL)

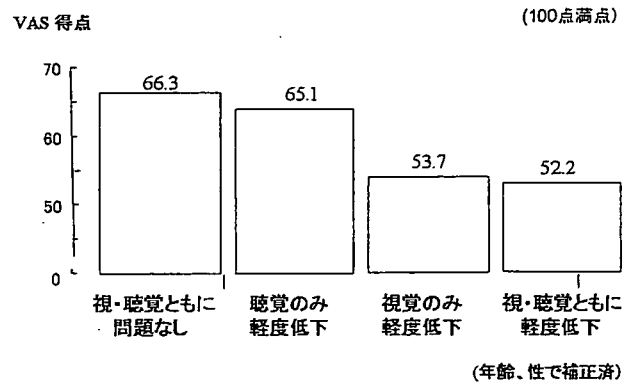


図3 生活満足度 (VAS)

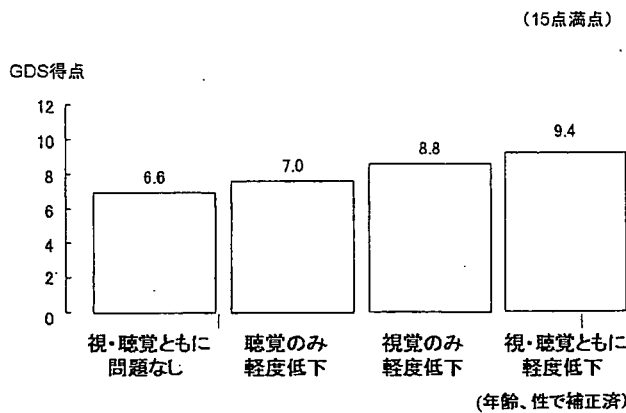


図2 GDS15 (Geriatric Depression Scale 15)

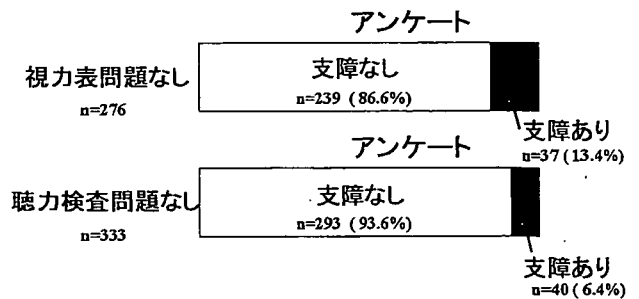


図4 健診時視・聴力検査と自記式アンケートとの関連

(83.5%), 軽度障害 235 (12.5%), 中等度障害 43 (2.3%), 重度障害 12 (0.6%) とした。

(2) 視・聴覚支障なし 1,610 人・1,564 人と軽度低下 210・235 人 (重複あり) の 4 群に分けて解析した。表 2 に示すように男女差は両群間になかったが、4 群間で視・聴覚に支障のない群では年齢が低く基本的 ADL や高度 ADL が維持され、うつ尺度は有意にうつ傾向を示し高かった。

(3) 年齢、性を補正しても高度 ADL および生活満足度 (VAS) は視・聴覚支障なしでは有意に維持され、うつ尺度 (GDS15) も有意に低かった。一方、ごく軽度の低下でも、視・聴覚障害が重なれば低下することが示された (図 1~3)。

(4) 視力表を用いた検査 (20/40 以上を異常なし) や耳元でささやく聴覚検査 (1 回で聞き取り可能を異常なし) 健診時検査とアンケート検査との関連は比較的良好で、軽度低下以上の視覚では 85% 以上、聴覚では 90% 以上が一致していた (図 4)。

考 察

高齢者の視・聴覚機能低下の原因の多くは加齢現象として見過ごされているおり、治療可能にもかかわらず、高齢であるからという理由で放置されることも少なくない⁴⁾⁵⁾。今回の検討では、極めて軽度と思われる視・聴覚機能の低下であっても、高次 ADL (AADL) をはじめうつつ尺度や QOL に与える影響は大きく、地域在住高齢者の生活機能維持に重要であることが明らかになった。平成 18 年度の介護保険改正により、介護予防に重点が置かれるようになるが、要介護ハイリスクグループ (特定高齢者) の選定に用いられる 25 項目のチェックリストの中に、視・聴覚機能に関する項目はみられない。主観的であっても、視・聴覚機能の低下は、地域在住高齢者の活動低下と関連し、かつ、以前の報告のように機能的予後との縦断的検討⁶⁾においても、情報関連機能(視・聴覚機能)の低下を知ることは高齢者の生活機能維持の観点から重要であると考えられる。

文 献

- 1) Evans JR, Fletcher AE, Wormald RPL: Causes of visual impairment in people aged 75 years and older in Britain: an add-on study to the MRC Trial of Assessment and Management of Older People in the Community. *Br J Ophthalmol* 2004; 88: 365-370.
- 2) Wormald RP, Wright LA, Courtney P, Beaumont B, Haines AP: Visual problems in the elderly population and implications for services. *BMJ* 1992; 304: 1226-1229.
- 3) Foran S, Rose K, Wang JJ, Thiagalingam S, Mitchell P: Correctable visual impairment in an older population: the Blue Mountains Eye Study. *Am J Ophthalmol* 2002; 134: 712-719.
- 4) Bess FH, Lichtenstein MJ, Logan SA, Burger MC, Nelson E: Hearing impairment as a determinant of function in the elderly. *J Am Geriatr Soc* 1989; 37: 123-128.
- 5) Smeeth L, Fletcher AE, Siu-Woon Ng E, Stirling S, Nunes M, Breeze E, et al: Reduced hearing, ownership, and use of hearing aids in elderly people in the UK—the MRC Trial of the Assessment and Management of Older People in the Community: a cross-sectional survey. *Lancet* 2002; 359: 1466-1470.
- 6) 松林公蔵: 要介護状態発現の危険因子: 香北町縦断研究から. *日老医誌* 2001; 38: 614-616.

Geriatric syndrome: Slightly reduced visual and hearing impairments reduce activities daily living (ADL) and quality of life (QOL) in the community-dwelling elderly

Masanori Nishinaga¹⁾, Sunggi Chi²⁾, Yuri Kazusa¹⁾, Jun Takata¹⁾ and Yoshinori Doi¹⁾

Abstract

Although it is well-known that moderate and severe visual and/or hearing impairments in elderly persons reduce their activities of daily living (ADL) and their quality of life (QOL), most elderly people, their caregivers and even nurses/doctors do not care about those disturbances considering them as normal aging. We studied 1,874 community-dwelling elderly (813 men, 1,061 women, mean age; 76 ± 9 yrs.) and demonstrated that apparently healthy older persons with slightly reduced function clarified by self-reported questionnaires do not only have lower scores of ADL and VAS (QOL), but also higher score of GDS 15, that is, they have a more depressive state, compared to those without visual and/or hearing impairments. Therefore, because visual and/or hearing functional impairments in the elderly, even if slight, affect their ADL impairments, QOL and mood, we should assess whether the older persons have visual/hearing disturbance(s) in functional screening and should give them some kinds of assistance to succeed in achieving an enjoyable elderly life.

Key words: *Visual disturbance, Hearing loss, Dependence, Quality of life (QOL), Activities of daily living (ADL)*
(*Nippon Ronen Igakkai Zasshi* 2007; 44: 302-304)

- 1) Department of Medicine and Geriatrics, Kochi Medical School
- 2) The Academic Association of Medical Research Expedition

高齢者急性心筋梗塞の治療

高田 淳 西永 正典 土居 義典

要約 近年、心筋梗塞急性期治療の進歩はめざましく、特に1990年代から最近に至るまで、数多くのRandomized Control Trial (RCT)が行われ、従来の保存的治療に比較して、各種再灌流療法の良好な成績が次々と示された。しかしながら、これらのRCTにおける対象の多くは50歳代後半から60歳代前半が主体であり、近年治療戦略上問題となる70~80歳代の後期高齢者が除外されていたり、対象のごく一部を占めるのみに止まっていた。これに関しては、高齢者では各種再灌流療法施行する上で、重症病変が多く、また治療上問題となる腎機能障害や出血性合併症がより高率であるという背景もあったと考えられる。一方で、RCT以外の大規模登録調査の結果からは、心筋梗塞患者は年々高齢化しており、治療現場における現状とRCTの対象症例との間に解離が認められる。これらを踏まえて、心筋梗塞急性期治療の変遷について、専門施設でのRCTおよび大規模登録調査と、地域の高齢医療圏における登録調査(高知AMI研究会)を比較検討する。

Key words : 後期高齢者, 急性心筋梗塞, 再灌流療法, 血栓溶解療法, 冠動脈形成術

(日老医誌 2006; 43: 693-696)

はじめに

高齢者の急性心筋梗塞は、典型的な胸部症状に乏しく受診までに長時間を要し、病初期に診断がつかない症例も少なくない。また冠動脈病変自体も重症多枝病変・石灰化病変が多く、経過中の心不全や機械的合併症も若年者と比べて高率になり、女性の重症例が多くなるのもその特徴である。これらに加えて、腎機能障害や末梢血管病変などの心臓外合併症も多く、従来から特に後期高齢者では院内死亡率が20%を超え、若年者にくらべて著しく予後不良とする報告も多かった。また治療戦略上も中・壮年者と異なり、病前のADLや認知障害の存在、場合によっては単に高齢であることによって積極的治療選択が制限される要因となってきた(図1)。

急性期治療における高齢者の位置づけ

心筋梗塞に関して、1980年代から各種血栓溶解剤による急性期再灌流療法の大規模トライアルが相次いで実施された。従来の保存的治療と比較して、血栓溶解療法がより有効であることを示した報告が多い一方で、対象

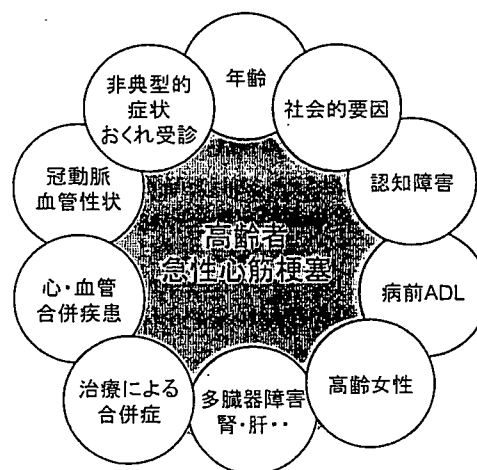


図1 高齢者急性心筋梗塞治療の問題点

の平均年齢は60歳前後とかなり若く、特に75歳以上の後期高齢者が除外されていたり、含まれていても全体の10%内外と少ない傾向にあった。また、高齢者の多くを占める女性についても全体の20%前後にとどまり、このようなstudy designの傾向は1990年代にはいっても同様であった^{1)~4)}。その後、急性期PCI(Percutaneous Coronary Intervention)の普及に伴って、血栓溶解療

表1 急性心筋梗塞：大規模トライアルと対象年齢

| トライアル | ISIS-3 | LATE | GUSTO-1 | EMERAS | NRMI 3/4 |
|-------|--------------|--------------|--------------|--------------|------------------------|
| 報告年 | 1992 | 1993 | 1993 | 1993 | 1998～2002 |
| 症例数 | 41,299 | 5,711 | 41,021 | 4,534 | 153,486 |
| 再灌流療法 | SK rt-PA | rt-PA | SK | SK | nPA |
| 年齢 | 69歳以下 74% | 平均63歳 | 平均62歳 | 64歳以下 64% | 平均68歳 |
| 高齢者 | 70歳以上 26% | 76歳以上 10% | 75歳以上 12% | 75歳以上 10% | 65歳以上 58% 75歳以上 36% |
| 女性 | 27% | 27% | 25% | 23% | 40% |

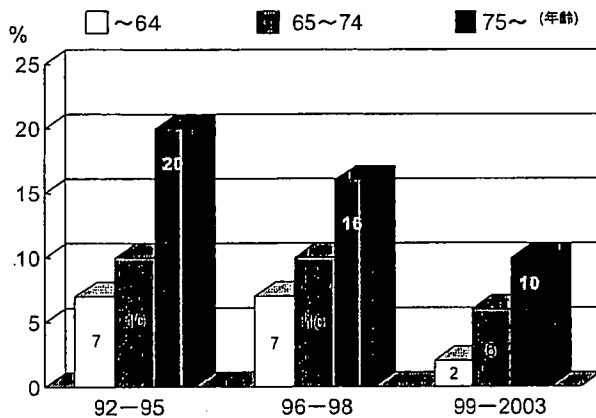
ISIS: International Study of Infarct Survival

LATE: Late Assessment of Thrombolytic Efficacy study

GUSTO: Global Utilization of Streptokinase and t-PA for Occluded Coronary Arteries trial

EMERAS: Estudio Multicentrico Estreptoquinasa Republicas de America del Sur

NRMI: National Registry of Myocardial Infarction

図2 再灌流療法施行例における院内死亡率の変遷
高知AMI研究会登録調査 (KAMI registry) より

法とPCIの比較検討が行われるようになったが、対象年齢はやはり60歳代前半であった。これらの背景には、重症多枝病変に加えて合併症も多い後期高齢者を対象に加えることによる治療成績全体の悪化や、治療法選択とは独立した多数の危険因子の存在による解析の困難さが考慮されたとも考えられる。しかしながら、結果的には実際の現場における患者構成とは若干異なった対象に関する治療成績となってしまった感がある。事実、年間20万例以上が登録される米国の大規模登録調査、National Registry of Myocardial Infarction (NRMI)⁹⁾での登録対象例を見ても、大規模トライアルに比べて、より高齢であり、高齢者および女性の頻度もより高率である(表1)。

これらの事実から分かるように、近年の血栓溶解療法ならびに各種PCIによる再灌流療法の進歩と目をみはる治療成績の向上の影で、実際は最も治療成績が悪く、

改善が期待されてきた、後期高齢者や高齢女性例での検討が置き去りにされてきたとも言える。

わが国の虚血性心疾患の現状

厚生労働省の人口動態統計によれば、人口の高齢化と心血管疾患リスクの増加に伴って、虚血性心疾患による死亡数は1970年から1995年の25年間でほぼ倍に増加した。その後過去10年間はほぼ横ばいで目だった増加はないが、前述の急性期再灌流療法がわが国でも広く普及したことを考えると、死亡数の上では顕著な効果は現れていないとも言える。これらは疫学的データであり、虚血性心疾患の診断や実際の内容が、臨床データとは必ずしも一致しないという点を考慮する必要があるが、一方で虚血性心疾患による総死亡数のうち75歳以上の占める割合が全体の60%以上を占めており、今後人口構成が確実に高齢化していくことを考えると、死亡数減少のための治療のターゲットは、中・壮年者に比べて数倍の死亡率を有する後期高齢者であると言える。

これらの社会的背景のもとに、わが国でも近年心筋梗塞急性期治療に関して、施設毎あるいは地域毎の取りくみが進みつつある。再灌流療法の普及およびmodalityの改善に加えて担当医師の技術的な進歩もあって、全体の治療成績は向上しつつある。しかしながら、患者搬送や設備、スタッフなどの点で比較的恵まれた条件の都市部の施設や、専門の多施設研究の結果と、高齢化のより進んだ地域における調査結果には若干の違いが認められる。特に院内死亡率については、専門施設からの報告では2～3%と低率であるが¹⁰⁾、地域における調査では比較的最近の検討でも7～10%を示し、特に75あるいは80歳以上の検討では20%前後といまだに高率である¹¹⁾。

これらの背景には、都市部と地方の年齢構成の違いも大きい。地方における搬送システムやアクセスの状況による搬送時間の問題なども関連する。加えて、循環器医以外の他科専門医や一般内科医との、急性期治療に関する知識の共有、あるいは広く一般への啓発活動も今後の重要な課題である。

地域における心筋梗塞治療の現状

我々は1992年から、急性心筋梗塞治療成績の向上のため、地域におけるネットワーク作りを目指して、高知AMI研究会登録調査を開始し、これまで急性期治療の変遷と、それによる急性期死亡率の改善について報告してきた。現在集計の終わっている1992年から2003年のデータを見ると、全体の年齢は68歳（男性66歳、女性73歳）、65歳以上の高齢者が60%以上、75歳以上の高齢者が約30%を占める。また調査期間を通じて徐々に高齢化しており、特に女性は2000～03年の平均年齢は74歳を越えて後期高齢者が半数を占めるようになっている。一方で開始当時50%前後であった、再灌流療法施行率が現在では80%以上となり、再灌流療法の内容も92年当時大部分が血栓溶解療法であったものが、現在はほとんどPCIとなり、特に70～80%にはステントが用いられている。これらの治療法およびmodalityの変化は特に高齢者において顕著であり、有意に死亡率の改善が認められている（図2）。同様の傾向は重症心不全や高齢女性における治療成績にも現れている。若年者と比べると出血性合併症や心破裂などに注意する必要があるが、PCIを主体とする再灌流療法を、より適切な対象に適切なタイミングで施行することにより、今後更に高齢者治療における有用性が期待できるものと考えられる。

まとめ

時代は、再灌流療法導入初期の血栓溶解療法から、PTCAを経て、各種の改良型deviceならびに再狭窄率の大幅な改善を目指したdrug eluting stent (DES) 導入の時代となり、国内の登録調査においてもその治療成績は良好である。しかしながら、比較的長期にわたって強力な抗血小板療法を必要とする点や、晩期にも起こりうるとされる血栓形成の問題などを含め、長期的な不安

が必ずしも払拭されたわけではない。今後これらの新しいmodalityについては、後期高齢者や超高齢者に対する治療戦略を考える上からも、注意深く長期的に検討していく必要があると考えられる。

最後に高知AMI研究会登録調査にご協力いただいた、基幹施設（近森会近森病院、高知医療センター、高知赤十字病院、高知県立幡多けんみん病院、高知県立安芸病院）ならびに全参加施設に深謝致します。

文 献

- 1) ISIS collaborative group: ISIS-3: a randomised comparison of streptokinase vs tissue plasminogen activator vs anistreplase and of aspirin plus heparin vs aspirin alone among 41,299 cases of suspected acute myocardial infarction. *Lancet* 1992; 28: 753-770.
- 2) Late study group: Late assessment of thrombolytic efficacy (LATE) study with alteplase 6-24 hours after onset of acute myocardial infarction. *Lancet* 1993; 342: 759-766.
- 3) The Gusto Investigators: An international randomized trial comparing four thrombolytic strategies for acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 1993; 329: 673-682.
- 4) EMERAS (Estudio Multicentrico Estreptoquinasa Republicas de America del Sur) Collaborative Group: Randomised trial of late thrombolysis in patients with suspected acute myocardial infarction. *Lancet* 1993; 342: 767-772.
- 5) Wiviott SD, Morrow DA, Frederick PD, Giugliano RP, Gibson CM, McCabe CH, et al: Performance of the Thrombolysis in myocardial infarction risk index in the National Registry of Myocardial Infarction-3 and 4. *J Am Coll Cardiol* 2004; 44: 783-789.
- 6) Kinjo K, Sato H, Sakata Y, Nakatani D, Mizuno H, Shimizu M, et al: Identification of uncomplicated patients with acute myocardial infarction undergoing percutaneous coronary intervention—Are these patients suitable for early discharge—. *Circ J* 2005; 69: 1163-1169.
- 7) Sakurai K, Watanabe J, Iwabuchi K, Koseki Y, Kon-no Y, Fukuichi M, et al: Comparison of the efficacy of reperfusion therapies for early mortality from acute myocardial infarction in Japan—Registry of Miyagi Study Group for AMI (MsAMI). *Circ J* 2003; 67: 209-214.
- 8) Kasanuki H, Honda T, Haze K, Sumiyoshi T, Horie T, Yagi M, et al: A large-scale prospective cohort study on the current status of therapeutic modalities for acute myocardial infarction in Japan: Rational and initial results of the HIJAMI Registry. *Am Heart J* 2005; 150: 411-418.

Reperfusion therapy for acute myocardial infarction in elderly patients

Jun Takata, Masanori Nishinaga and Yoshinori Doi

Abstract

Although there has been great progress in reperfusion therapy, the role of coronary reperfusion for elderly patients with acute myocardial infarction has not been fully investigated. In general, mean age of the subjects in major trials was about 60 years old and approximately only 10 to 15% of patients were over age 75. On the other hand, large-scale registries such as the US national registry of myocardial infarction (NRFMI) showed a higher prevalence of elderly (especially women) in the clinical setting. This discrepancy may be due to the fact that elderly patients with myocardial infarction have some difficulties in the treatment such as severe multi-vessel coronary lesions, non-cardiac complications and relatively high prevalence of adverse reactions to reperfusion therapy.

Here we focus on the situation of elderly patients (especially those 75 years or older) with myocardial infarction in the "real world" clinical setting, showing the clinical changes and outcome of our registry in rural Japan: the Kochi AMI (KAMI) registry.

Key words: *Old-old, Acute myocardial infarction, Reperfusion therapy, Thrombolysis, Percutaneous coronary intervention*
(Jpn J Geriat 2006; 43: 693-696)

Section of Cardiology, Department of Medicine and Geriatrics, Kochi Medical School

Endocrinology

Copy of e-mail Notification

zee3944

ENDOCRINOLOGY PROOFS: PLEASE REVIEW YOUR ARTICLE (# 3944)

=====
Endocrinology Published by The Endocrine Society

Dear Author:

Please refer to this URL address

<http://rapidproof.cadmus.com/RapidProof/retrieval/index.jsp>

Login: your e-mail address

Password: ----

The site contains 1 file. You will need to have Adobe Acrobat® Reader software to read the file. This is free software and is available at <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep.html>.

The file contains a proof of your article scheduled for publication in Endocrinology and a Publication Charge and Reprint Order Form. **THE FILE WILL EXPIRE IF NOT DOWNLOADED PROMPTLY**, so please be sure to download it immediately. If corrections are not returned promptly, publication of your article could be delayed, so **PLEASE REVIEW THE PROOF AND RETURN CORRECTIONS WITHIN 48 HOURS**.

REVIEWING YOUR PROOF

After printing the PDF file, please do the following:

- **THOROUGHLY PROOFREAD ALL TEXT AS WELL AS ANY FIGURES, TABLES, and EQUATIONS** to ensure that all elements are present and accurate and that any Greek and other special characters have translated correctly.
- Indicate changes or corrections in the margin of the page proofs. To ensure accuracy in the rendering of your corrections, please provide a typed list including all corrections and responses to queries.
- Answer all queries (which are denoted in the margin near the relevant line as AQ:A, AQ:B, AQ:C, etc. and are listed on the last page of the PDF proof; other marks in the margin such as T1, F1, and Fn1 denote citations of tables, figures, and footnotes, respectively, and do not require any action on your part). **NOTE THAT NOT ALL CHANGES ARE POINTED OUT IN THE QUERIES, SO IT IS CRUCIAL THAT YOU REVIEW YOUR PROOF CAREFULLY.**
- Note that this is a low-resolution proof and figure quality might therefore seem diminished. The file that will be used for printing is of a higher resolution. However, if you have any concerns about the quality of your figures, please note your concerns on the relevant page. If a correction to a figure is required, please submit a revised digital file that meets the requirements described at <http://cpc.cadmus.com/da/index.jsp>. Also include a good-quality hard copy of the corrected figure.

RETURNING YOUR PROOF

Please keep a copy of the corrected proof for your records, and within 48 hours return it (by special courier) to: Trisha Gage, Senior Production Editor, 46 Elfman Drive, Doylestown, PA 18901.

REPRINT ORDER FORM AND PUBLICATION CHARGES

All regular articles are subject to publication charges. Only those articles invited for publication by the Editor-in-Chief are exempt from charges. The Reprint Order Form should be signed and completed, even if your paper was invited and even if you are not ordering reprints. Send the completed form to: The Endocrine Society, c/o Bank of America, P.O. Box 631048, Baltimore, Maryland 21263-1048. Do not send page proofs to this address.

Sincerely,

Endocrinology

Copy of e-mail Notification

zee3944

Trisha Gage
Senior Production Editor
Cadmus Communications, a Cenvéo company
Publisher Services Group
46 Elfman Drive
Doylestown, PA 18901
Phone: 215-489-7120
Fax: 215-489-3196
E-mail: gagep@cadmus.com

Endocrinology 2008

This is your publication fee and reprint order form or pro forma invoice.

(Please keep a copy of this document for your records.)

Reprint order forms and purchase orders or prepayments must be received 72 hours after receipt of form either by mail or by fax at 410-820-9765. It is the policy of Cadmus Reprints to issue one invoice per order. Please print clearly. Please return this form whether reprints are ordered or not.

Author Name _____
Title of Article _____
Issue of Journal _____ Reprint # 3314024 Manuscript # EN-07-1021 Publication Date _____
Number of Pages 8 Color in Article? Yes / No (Please Circle) Symbol END

Please include the journal name and reprint number or manuscript number on your purchase order or other correspondence.

Order and Shipping Information

Reprint Costs (Please see page 2 of 2 for reprint costs/fees.)

Number of reprints ordered \$ _____
Number of color reprints ordered \$ _____
Number of covers ordered \$ _____

Subtotal \$ _____
Taxes \$ _____

(Add appropriate sales tax for Virginia, Maryland, Pennsylvania, and the District of Columbia or Canadian GST to the reprints if your order is to be shipped to these locations.)

First address included, add \$32 for each additional shipping address \$ _____

Publication Fees (Please see page 2 of 2 for fees.)

Page Charges:

\$90 per journal page \$ _____
Number of color figures _____
Color in journal: TES members add \$225 per color figure,
TES non-members add \$700 per color figure \$ _____

(Reprint Costs & Pub Fees) Total Amount Due \$ _____

Shipping Address (cannot ship to a P.O. Box) Please Print Clearly

Name _____
Institution _____
Street _____
City _____ State _____ Zip _____
Country _____
Quantity _____ Fax _____
Phone: Day _____ Evening _____
E-mail Address _____

Additional Shipping Address* (cannot ship to a P.O. Box)

Please Print Clearly

Name _____
Institution _____
Street _____
City _____ State _____ Zip _____
Country _____
Quantity _____ Fax _____
Phone: Day _____ Evening _____
E-mail Address _____

* Add \$32 for each additional shipping address

Payment and Credit Card Details

Enclosed: Personal Check _____
Institutional Purchase Order _____
Credit Card Payment Details _____

Checks must be paid in U.S. dollars and drawn on a U.S. Bank.

Credit Card: VISA Am. Exp. MasterCard

Card Number _____

Expiration Date _____

Signature: _____

Please send your order form and purchase order or prepayment made payable to:

The Endocrine Society
c/o Bank of America
P.O. Box 631048
Baltimore, MD 21263-1048

Note: Do not send express packages to this location, PO Box.

Wire transfer information: FEIN #: 541274108

Signature _____

Invoice or Credit Card Information

Invoice Address Please Print Clearly

Please complete Invoice address as it appears on credit card statement

Name _____
Institution _____
Department _____
Street _____
City _____ State _____ Zip _____
Country _____
Phone _____ Fax _____
E-mail Address _____
Purchase Order No. _____

Cadmus will process credit cards and Cadmus Journal Services will appear on the credit card statement.

If you do not mail your order form, you may fax it to 410-820-9765 with your credit card information.

Date _____

Signature is required. By signing this form, the author agrees to accept the responsibility for the payment of reprints and/or all charges described in this document.

Endocrinology

2008 REPRINT AND PUBLICATION CHARGES

Black and White Reprint Prices

| Domestic (USA only) | | | | | |
|---------------------|-------|---------|---------|---------|---------|
| # of Pages | 100 | 200 | 300 | 400 | 500 |
| 1-4 | \$279 | \$318 | \$364 | \$397 | \$437 |
| 5-8 | \$457 | \$523 | \$604 | \$680 | \$742 |
| 9-12 | \$620 | \$723 | \$841 | \$949 | \$1,049 |
| 13-16 | \$783 | \$919 | \$1,086 | \$1,215 | \$1,358 |
| 17-20 | \$953 | \$1,113 | \$1,324 | \$1,492 | \$1,655 |
| Covers | \$142 | \$171 | \$207 | \$243 | \$286 |

| International (includes Canada and Mexico) | | | | | |
|--|---------|---------|---------|---------|---------|
| # of Pages | 100 | 200 | 300 | 400 | 500 |
| 1-4 | \$314 | \$359 | \$409 | \$453 | \$508 |
| 5-8 | \$493 | \$578 | \$680 | \$773 | \$863 |
| 9-12 | \$663 | \$801 | \$949 | \$1,087 | \$1,220 |
| 13-16 | \$840 | \$1,009 | \$1,223 | \$1,394 | \$1,574 |
| 17-20 | \$1,019 | \$1,225 | \$1,495 | \$1,706 | \$1,922 |
| Covers | \$149 | \$188 | \$232 | \$275 | \$322 |

Minimum order is 100 copies. Maximum order using this form is 500 copies. For articles longer than 20 pages, please consult Cadmus Reprints at 800-407-9190. For orders larger than 500 copies, contact Heather Edwards (tel) 410-691-6214, (fax) 410-684-2788, endoreprints@cadmus.com.

Reprint Cover

Cover prices are listed above. The cover will include the publication title, article title, and author name printed in black.

Publication Fees

Page Charges

Add \$90.00 per journal page for all pages in the article. Page charges are not levied for papers specifically invited by the Editor-in-Chief.

Articles Published with Color Figures

If your article contains color and you are a TES member, add \$225 for each color figure. If your article contains color and you are not a TES member, add \$700 for each color figure. Please state the exact color figure charge on the reverse side and add to your payment or purchase order accordingly. (Author color charges do not apply to authors of invited papers, provided the photographs have been approved by the Editor-in-Chief.)

Shipping

Shipping costs are included in the reprint prices. Domestic orders are shipped via FedEx Ground service. Foreign orders are shipped via a proof of delivery air service. The shipping address printed on an institutional purchase order always supercedes.

Multiple Shipments

Orders can be shipped to more than one location. Please be aware that it will cost \$32 for each additional location.

Color Reprint Prices

| Domestic (USA only) | | | | | |
|---------------------|---------|---------|---------|---------|---------|
| # of Pages | 100 | 200 | 300 | 400 | 500 |
| 1-4 | \$373 | \$500 | \$643 | \$770 | \$901 |
| 5-8 | \$553 | \$709 | \$883 | \$1,049 | \$1,206 |
| 9-12 | \$714 | \$904 | \$1,122 | \$1,319 | \$1,516 |
| 13-16 | \$876 | \$1,105 | \$1,364 | \$1,587 | \$1,820 |
| 17-20 | \$1,043 | \$1,300 | \$1,605 | \$1,863 | \$2,119 |
| Covers | \$142 | \$171 | \$207 | \$243 | \$286 |

| International (includes Canada and Mexico) | | | | | |
|--|---------|---------|---------|---------|---------|
| # of Pages | 100 | 200 | 300 | 400 | 500 |
| 1-4 | \$452 | \$605 | \$796 | \$955 | \$1,132 |
| 5-8 | \$653 | \$878 | \$1,099 | \$1,308 | \$1,509 |
| 9-12 | \$870 | \$1,125 | \$1,405 | \$1,646 | \$1,895 |
| 13-16 | \$1,073 | \$1,377 | \$1,704 | \$1,982 | \$2,272 |
| 17-20 | \$1,287 | \$1,625 | \$2,006 | \$2,325 | \$2,642 |
| Covers | \$149 | \$188 | \$232 | \$275 | \$322 |

Delivery

Your order will be shipped within 2 weeks of the journal print date. Allow extra time for delivery.

Late Order Charges

Articles more than 90 days from publication date will carry an additional charge of \$5.67 per page for file retrieval.

Tax Due

Residents of Virginia, Maryland, Pennsylvania, and the District of Columbia are required to add the appropriate sales tax to each reprint order. For orders shipped to Canada, please add 6% Canadian GST unless exemption is claimed.

Publishing Requirements

The Endocrine Society requires prepayment or a signed institutional purchase order covering the full amount of your page charges, color charges, and reprint charges before your article will be published. You must return this form with payment of page and color charges even if you are not ordering reprints. Return this order form with check, credit card information, or signed purchase order to:

The Endocrine Society
c/o Bank of America
P.O. Box 631048
Baltimore, MD 21263-1048

Note: Do not send express packages to this location, PO Box.

Please direct all inquiries to:

Erika Clough
800-407-9190 (toll free number)
410-819-3995 (direct number)
410-820-9765 (FAX number)
cloughe@cadmus.com

Reprint Order Forms and Purchase Orders or prepayments must be received 72 hours after receipt of form.
Please return this form even if no reprints are ordered.

Adiponectin Antagonizes Stimulatory Effect of Tumor Necrosis Factor- α on Vascular Smooth Muscle Cell Calcification: Regulation of Growth Arrest-Specific Gene 6-Mediated Survival Pathway by Adenosine 5'-Monophosphate-Activated Protein Kinase

AQ: A

Bo-Kyung Son, Masahiro Akishita, Katsuya Iijima, Koichi Kozaki, Koji Maemura, Masato Eto, and Yasuyoshi Ouchi

Department of Geriatric Medicine (B.-K.S., M.A., K.I., M.E., Y.O.), the Department of Cardiovascular Medicine (K.M.), Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, Tokyo 113-8655, Japan; and the Department of Geriatric Medicine (K.K.), School of Medicine, The University of Kyorin, Tokyo 181-8611, Japan

AQ: B

Adiponectin exhibits diverse protective effects against atherogenesis and antagonizes many effects of TNF α . Here, we investigated the effect of adiponectin and TNF α on vascular calcification, a critical event in the development and progression of vascular disease. In human aortic smooth muscle cells (HASMC), TNF α augmented inorganic phosphate (Pi)-induced calcification, whereas adiponectin significantly suppressed it and abolished the stimulatory effect of TNF α in a concentration-dependent manner. Similarly, adiponectin ameliorated the accelerating effect of TNF α on Pi-induced apoptosis, the essential process of HASMC calcification. Furthermore, these effects of TNF α and adiponectin were associated with AMP-activated protein kinase (AMPK)-dependent growth arrest-specific gene 6 (Gas6) expression and Akt sig-

naling. The AMPK activator, 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside (AICAR), induced phosphorylation of AMPK and significantly inhibited Pi-induced calcification in HASMC. Conversely, pharmacological inhibition of AMPK by compound C blocked both AMPK activation and the inhibitory effect of adiponectin on calcification, providing evidence that AMPK plays a regulatory role in vascular calcification. Reporter assay revealed that adiponectin restored Gas6 promoter activity decreased by TNF α , and the effect of adiponectin was abrogated by compound C. These results demonstrate that adiponectin antagonizes the stimulatory effect of TNF α on vascular calcification by restoration of the AMPK-dependent Gas6-mediated survival pathway. (*Endocrinology* 149: 0000-0000, 2008)

VASCULAR CALCIFICATION IS often encountered in advanced atherosclerotic lesions and is a common consequence of aging (1, 2). Calcification of the coronary arteries has been shown to be positively correlated with atherosclerotic plaque burden, increased risk of myocardial infarction, and plaque instability (3-5). We recently demonstrated that apoptosis plays an important role in inorganic phosphate (Pi)-induced vascular smooth muscle cell (VSMC) calcification (6). This type of calcification is dependent on down-regulation of the growth arrest-specific gene 6 (Gas6)-mediated survival pathway.

Adiponectin is an adipocyte-derived cytokine that exhibits protective properties in the heart and blood vessels (7-10). It accumulates in injured arteries from plasma and suppresses the endothelial inflammatory response (11) and VSMC proliferation (12). Furthermore, low plasma adiponectin levels are associated with progression of coronary artery calcifica-

tion in type 1 diabetic and nondiabetic subjects, independent of other cardiovascular risk factors (13). Experimental studies have shown that adiponectin reduces TNF α production in response to various stresses, whereas TNF α attenuates adiponectin production, resulting in a reduction of plasma adiponectin levels (14-16). In addition to the inverse relationship between their expression, increasing evidence supports suppressive effects on each other's function (11, 17, 18). Given the importance of the reciprocal effects of TNF α and adiponectin, it is not clear whether both play a regulatory role in VSMC calcification.

Most of the beneficial actions of adiponectin are accounted for by the activation of AMP-activated protein kinase (AMPK) (19, 20). AMPK is a serine/threonine protein kinase that plays a key role in metabolic homeostasis in all eukaryotic cell types (21). Cardioprotective effects of adiponectin, including anti-apoptotic actions, are also likely to be dependent on AMPK (19, 22, 23). However, the role of AMPK in the effect of adiponectin on VSMC calcification has not been addressed.

In the present study, we investigated whether adiponectin and TNF α modulate Pi-induced VSMC calcification by regulating apoptosis. We found that TNF α had a stimulatory effect, whereas adiponectin had an inhibitory effect on Pi-induced apoptosis and calcification in human aortic smooth muscle cells (HASMC). Furthermore, these actions were mediated by regulation of Gas6 at the transcription level via AMPK activation.

First Published Online January 3, 2008

Abbreviations: AICAR, 5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside; AMPK, AMP-activated protein kinase; Gas6, growth arrest-specific gene 6; HASMC, human aortic smooth muscle cells; Pi, inorganic phosphate; PP2C, protein phosphatase 2C; siRNA, small interfering RNA; TUNEL, terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling; VSMC, vascular smooth muscle cells.

Endocrinology is published monthly by The Endocrine Society (<http://www.endo-society.org>), the foremost professional society serving the endocrine community.

Materials and Methods

Cell culture

HASMC were purchased from Clonetics Corp. (San Diego, CA). They were cultured in DMEM supplemented with 20% FBS, 100 U/ml penicillin, and 100 mg/ml streptomycin at 37 C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. HASMC were used up to passage 8 for the experiments.

Induction and quantification of calcification

For Pi-induced calcification, Pi (a mixed solution of Na₂HPO₄ and NaH₂PO₄ whose pH was adjusted to 7.4) was added to serum-supplemented DMEM to a final concentration of 2.6 mM (calcification medium). Ca deposition was evaluated by the o-cresolphthalein complexone method (C-Test; WAKO, Osaka, Japan) and von Kossa's staining, as previously described (6, 24).

Determination of apoptosis

To examine the effect of TNF α (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) and adiponectin (R&D Systems, Minneapolis, MN) on Pi-induced apoptosis, they were added simultaneously when the medium was switched to the calcification medium. Apoptosis was detected by DNA fragmentation with a cell-death detection ELISA^{plus} kit (Roche, Mannheim, Germany) and terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling (TUNEL) assay with ApopTag^{plus} obtained from Chemicon International, Ltd. (Hampshire, UK), according to the manufacturer's instructions.

Generation of promoter-reporter construct and luciferase activity assay

The 1925-bp Gas6 promoter (-1327/+99) corresponding to the Gas6 promoter sequence was generated by PCR from human genomic DNA with the appropriate sets of primers (6). These inserts were cloned into a pGL3 basic vector (Promega, Charbonnières, France) by standard molecular biological techniques. The construct was verified by sequencing. HASMC were transiently transfected in 12-well plates with 0.8 μ g plasmid DNA and lipofectamine 2000 (Invitrogen Corp., Paisley, UK) according to the procedure recommended by the manufacturer. Cells

were treated with TNF α , adiponectin, and compound C at 24 h after transfection, followed by incubation for an additional 44 h. Firefly luciferase activity was determined using a luciferase assay system (Promega) and normalized by total cell protein.

Preparation of small interfering RNA (siRNA) targeting Gas6 and transfection

To evaluate the role of Gas6 in the inhibitory effect of adiponectin on calcification, we knocked down Gas6 using siRNA. Two kinds of siRNA were designed to target human Gas6 and nonspecific control siRNA was synthesized using standard templates (6). siRNA (100 nM) was transfected using transfection reagent (Upstate, Charlottesville, VA) when HASMC had reached 80-90% confluence and then was transfected every 2 d with TNF α and adiponectin up to 6 d. The efficiency of Gas6 siRNA was confirmed with immunoblotting (6).

RNA extraction and Northern blot analysis

Total RNA was extracted from HASMC using an RNeasy minikit (QIAGEN, Courtaboeuf, France). For Northern blot analysis, harvested RNA (5 μ g) was fractionated on 1.4% formaldehyde-agarose gel and transferred to a nylon filter. The filter was hybridized at 68 C for 2 h with ³²P-labeled Gas6 cDNA (6) and an 18S probe in QuickHyb solution (Stratagene, La-Jolla, CA) and autoradiographed.

Immunoblotting

The effect of TNF α and adiponectin on the expression of Gas6, phospho-Akt, and Akt was examined, as described previously (24). Analysis of AMPK activation was performed using an antibody specific for the phosphorylated Thr172 of AMPK (Cell Signaling Technology Inc, Beverly, MA).

Statistical analysis

All results are presented as mean \pm SE. Statistical comparisons were made by ANOVA, followed by Bonferroni test. A value of P < 0.05 was considered statistically significant.

AQ: C

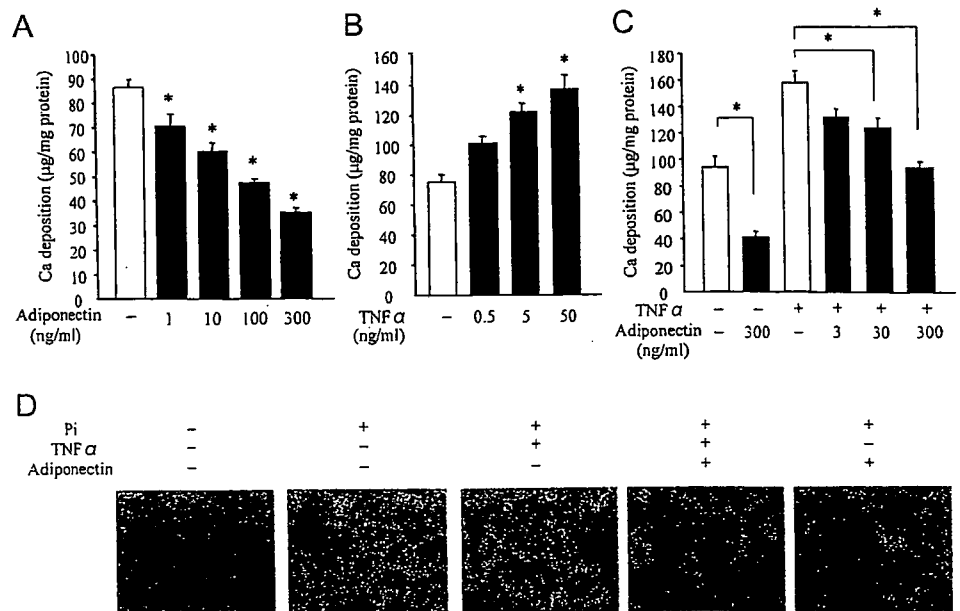


FIG. 1. Effect of adiponectin and TNF α on Pi-induced calcification. A and B, HASMC were cultured with the indicated concentrations of adiponectin (A) or TNF α (B) in calcification medium. They were added simultaneously when the medium was changed every 2 d. C, The effect of TNF α (20 ng/ml) and adiponectin with the indicated concentrations on Ca deposition was determined at 6 d. D, The effect of TNF α (20 ng/ml) and adiponectin (300 ng/ml) on Ca deposition was evaluated with von Kossa's staining at the light microscopic level. All values are presented as mean \pm SE (n = 6). *, P < 0.05 by Bonferroni test. Each experiment was performed at least in triplicate for each condition.

FIG. 2. Effect of adiponectin and TNF α on Pi-induced apoptosis. HASMC were cultured with the indicated concentrations of adiponectin for 6 d. Calcification medium was exchanged every 2 d. **A**, A quantitative index of apoptosis, determined by ELISA, is presented as the value relative to that without Pi treatment. **B**, HASMC were incubated with or without TNF α (20 ng/ml) in the absence or presence of 2.6 mM Pi for 6 d. **C** and **D**, On d 6, the effect of adiponectin (300 ng/ml) and TNF α (20 ng/ml) on apoptosis in calcification medium was determined by ELISA (**C**) and evaluated with TUNEL staining (**D**, green). Nuclei were counterstained with DAPI (blue). All values are presented as mean \pm SE (n = 3). *, P < 0.05 by Bonferroni test. Each experiment was performed in triplicate for each condition.

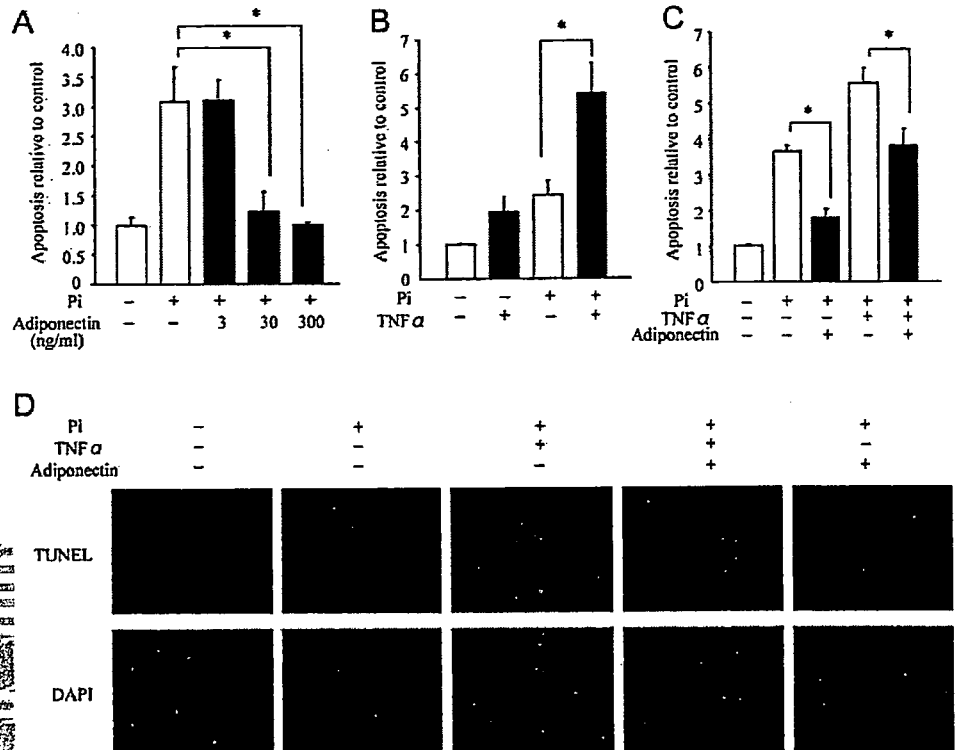


FIG. 3. Gas6 is the target of the effect of adiponectin and TNF α on Pi-induced calcification. HASMC were cultured with the indicated concentrations of adiponectin and TNF α (20 ng/ml). On d 6, cell lysates were collected and immunoblotted with antibodies that recognize Gas6, phospho-Akt (p-Akt), Akt, or β -tubulin. **A**, The untreated condition is the serum-supplemented status without Pi. **B**, Total RNA (5 μ g) was harvested for Northern blot analysis after HASMC were incubated with adiponectin (300 ng/ml) and TNF α (20 ng/ml) for 6 d. When HASMC had reached 80–90% confluence, siRNA (100 nM) was transfected and then was transfected every 2 d with adiponectin (300 ng/ml) and TNF α (20 ng/ml) up to 6 d. **C**, Ca deposition was measured and normalized by cell protein content. All values are presented as mean \pm SE (n = 3). *, P < 0.05 by Bonferroni test. Each experiment was performed in triplicate for each condition.

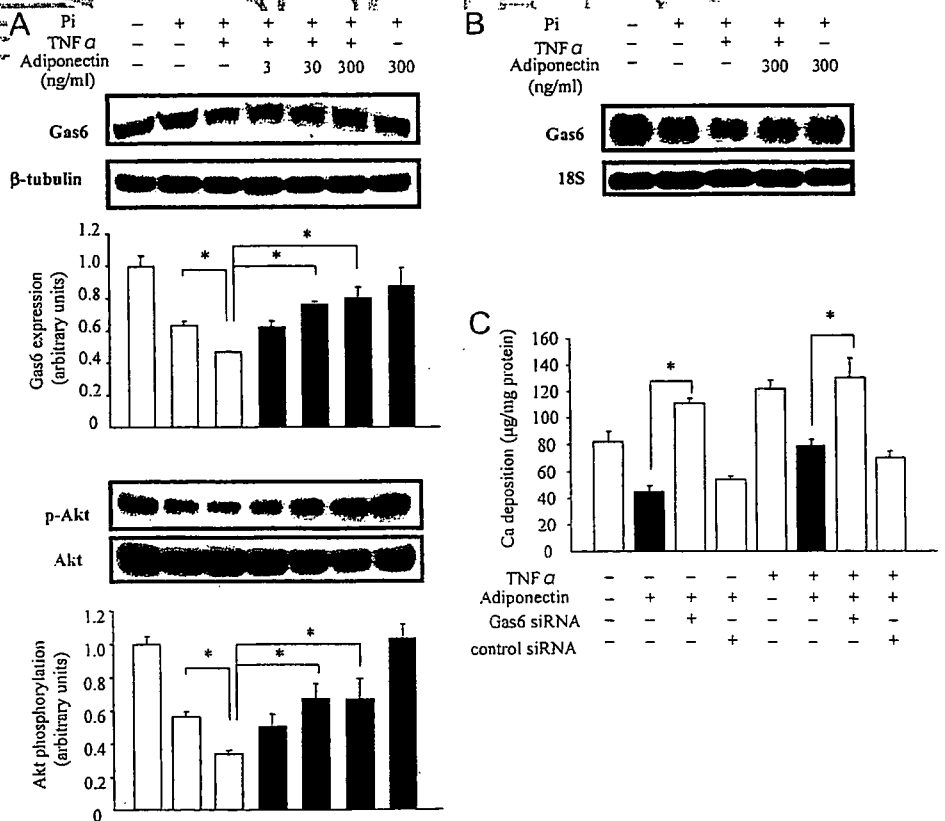
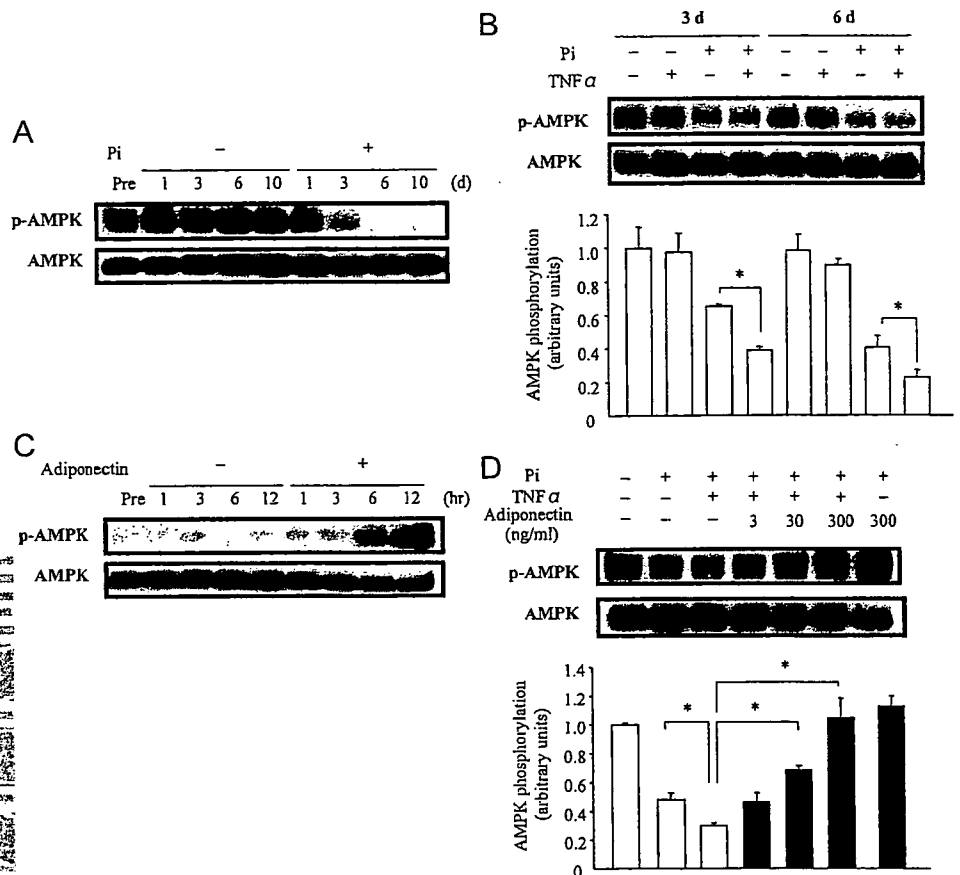


FIG. 4. Effect of adiponectin and TNF α on AMPK activity during Pi-induced calcification. HASMC were cultured in the absence or presence of Pi (2.6 mM) for up to 10 d. After the indicated incubation period, cell lysates were harvested and immunoblotted with antibodies to phospho-AMPK (p-AMPK) and AMPK. **A**, The untreated condition is the serum-supplemented status without Pi. **B**, Immunoblotting analysis showing the effect of TNF α (20 ng/ml) on p-AMPK and AMPK expression in the absence or presence of serum containing Pi (2.6 mM). **C**, Serum-starved HASMC were incubated with or without adiponectin (300 ng/ml) for 12 h. HASMC were cultured with the indicated concentrations of adiponectin and TNF α (20 ng/ml). **D**, On d 6, cell lysates were harvested and immunoblotted with antibodies to p-AMPK and AMPK. All values are presented as mean \pm SE (n = 3). *, P < 0.05 by Bonferroni test. Each experiment was performed in triplicate for each condition.



Results

Adiponectin and TNF α regulate Pi-induced calcification in HASMC

To investigate the effect of adiponectin and TNF α on Pi-induced calcification, HASMC were incubated with adiponectin and TNF α in the presence of 2.6 mM Pi. On d 6, Ca deposition was suppressed by adiponectin in a concentration-dependent manner (40 \pm 2% of control at 300 ng/ml, Fig. 1A), whereas TNF α significantly augmented Ca deposition (182 \pm 13% of control at 50 ng/ml, Fig. 1B). Furthermore, adiponectin clearly inhibited Ca deposition stimulated by TNF α in a concentration-dependent manner (Fig. 1C). This was also found by von Kossa's staining (Fig. 1D). These results suggest that adiponectin has an inhibitory effect on both Pi-induced and TNF α -stimulated calcification in HASMC.

Adiponectin antagonizes stimulatory effect of TNF α on Pi-induced apoptosis by restoration of Gas6-mediated survival pathway

Because apoptosis has been shown to be an important pathway regulating Pi-induced calcification (6, 24), we examined the effect of adiponectin and TNF α on apoptosis in HASMC. Adiponectin, at concentrations exerting inhibitory effects on calcification, significantly reduced apoptosis, as quantified by cytoplasmic histone-associated DNA fragments (Fig. 2A). On the other hand, apoptosis was enhanced by TNF α in the presence of Pi (Fig. 2B). As shown in Ca

deposition, adiponectin antagonized the stimulatory effect of TNF α on apoptosis. This inhibition was also observed by TUNEL assay (Fig. 2, C and D).

We previously demonstrated that Pi-induced apoptosis was mediated by down-regulation of the Gas6-mediated survival pathway (6, 24). Therefore, we examined the effects of adiponectin and TNF α on this pathway. Both Gas6 mRNA and protein expression were down-regulated by TNF α in the presence of Pi, whereas adiponectin clearly restored their expression (Fig. 3, A and B). Next, because the Gas6-mediated survival pathway is Akt-dependent, the effect of adiponectin and TNF α on Akt phosphorylation was examined. As shown in the Gas6 expression, the similar effect of adiponectin and TNF α was observed in Akt phosphorylation that is high at basal level in the untreated condition containing serum (Fig. 3A). We confirmed that total Akt was not changed by adiponectin and TNF α treatment (Fig. 3A). On the other hand, adiponectin and TNF α did not affect Gas6 expression and Akt phosphorylation in the condition without Pi treatment (data not shown).

Furthermore, to evaluate the role of Gas6 in the inhibitory effect of adiponectin on calcification, we examined whether the knockdown of Gas6 abrogated the effects of adiponectin using siRNA. On d 6, transfection of Gas6 siRNA markedly decreased its expression (data not shown), as reported previously (6). The inhibitory effect of adiponectin on Pi- and TNF α -induced calcification was reversed by Gas6 siRNA, supporting the critical role of Gas6 in the effect of adiponectin on calcification (Fig. 3C).

F1

F2

F3