

no effect in hypotonic media. Similar results were obtained with the co-transfection of -1.1AQP2 and AQP-2 gene. The hypotonic responsive element therefore resides in -1.1 kb of the 5'-flanking region of the AQP-2 gene.

In the cells transfected with -0.36AQP2 and AQP-2 gene, the elevation of DBcAMP-induced Luc activity was found in both the isotonic and hypotonic media. In addition, the dominant-negative TonEBP cancelled the

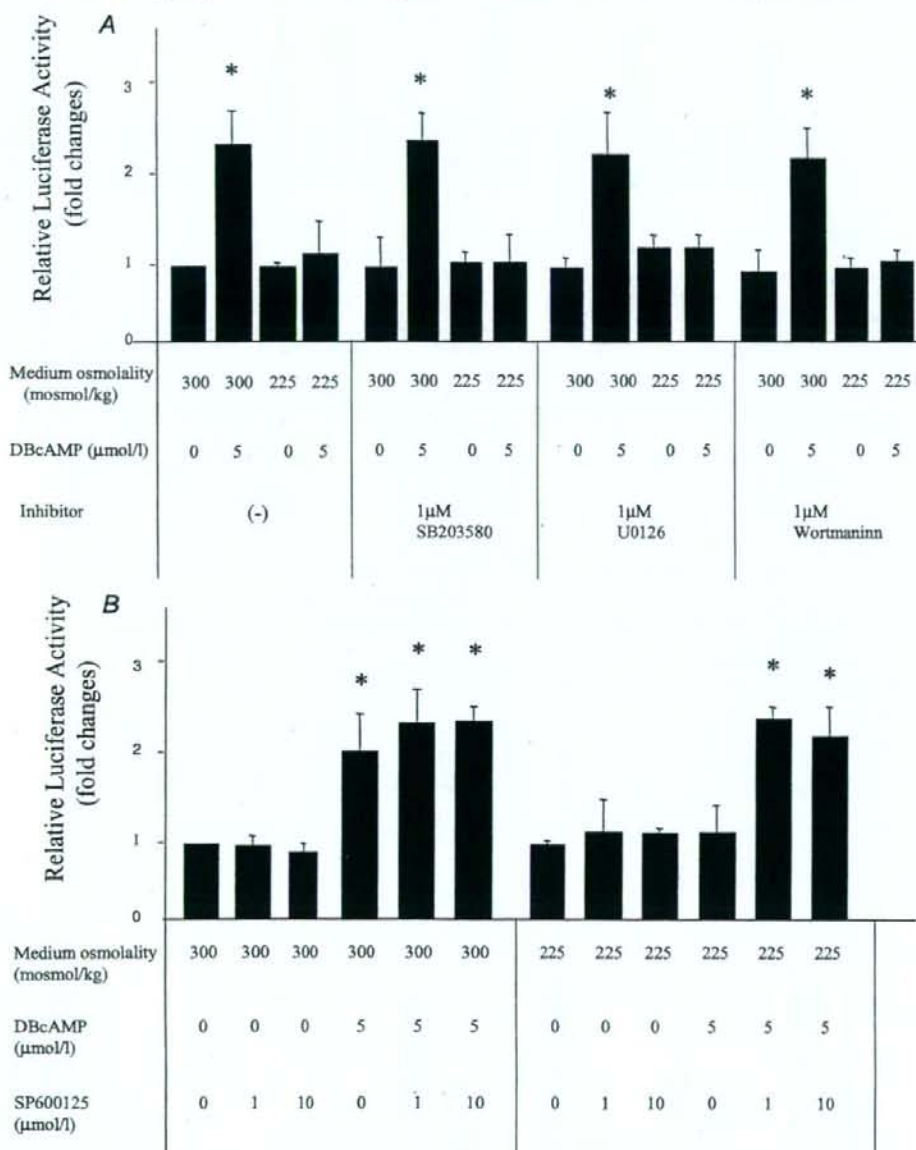


Figure 5. Pharmacological sensitivity of the AQP-2 promoter activity in the cells transfected with -1.1AQP2 and murine AQP-2 gene in the hypotonic medium

A, after pretreatment with 1 $\mu\text{mol l}^{-1}$ SB203580 (p38 inhibitor), U0126 (MEK inhibitor) or wortmannin (PI3K inhibitor) for 1 h, the cells were further incubated with hypotonic medium containing the respective substance for an additional 48 h. Dibutyryl cAMP (5 $\mu\text{mol l}^{-1}$) was added to the medium at 24 h. **B**, after pretreatment with 1 or 10 $\mu\text{mol l}^{-1}$ SP600125 (JNK inhibitor) for 1 h, the cells were further incubated with hypotonic medium containing the respective substance for an additional 48 h. * $P < 0.05$ versus the isotonic conditions without DBcAMP. Values are means \pm S.E.M., $n = 6$.

hypotonic inhibition of DBcAMP-induced Luc activity. Taken together, these findings indicate that the inhibitory effect of hypotonic conditions is most probably mediated via TonE itself, a tonicity responsive enhancer.

Originally, the TonE consensus sequence, (C/T)GGAAnn(C/T)n(C/T), was identified by Kwon and colleagues (Takenaka *et al.* 1994), as the *cis*-acting element responsible for hypertonic regulation. TonE mediates the transcriptional regulation of several genes, including those for sodium–myo-inositol cotransporter, sodium–chloride–betaine cotransporter and aldose reductase in response to hypertonicity, in addition to the AQP-2 gene (Ferraris *et al.* 1996; Rim *et al.* 1998; Miyakawa *et al.* 1998). Also, TonEBP is a transcriptional factor that stimulates TonE, and was originally identified and cloned using the yeast one-hybrid assay (Miyakawa *et al.* 1999). It is reported that TonEBP production is activated by a hypertonic challenge, and rapidly reduced by a hypotonic challenge (Woo *et al.* 2000). In other words, TonEBP is bidirectionally regulated by a change in tonicity. However, there is no report concerning whether the TonE element directly mediates a hypotonic transcriptional regulation of aquaporins, and a more detailed study will be needed to determine TonEBP activity in these circumstances.

In this study, TonE mediated the hypotonicity-induced suppression of DBcAMP-induced Luc activity. In hypotonic conditions, basal Luc activity was not changed. It is possible that TonE might interact directly with the cAMP response element (CRE) in hypotonic conditions to inhibit the cAMP-induced activation of AQP-2 promoter. The activity of AQP-2 promoter is

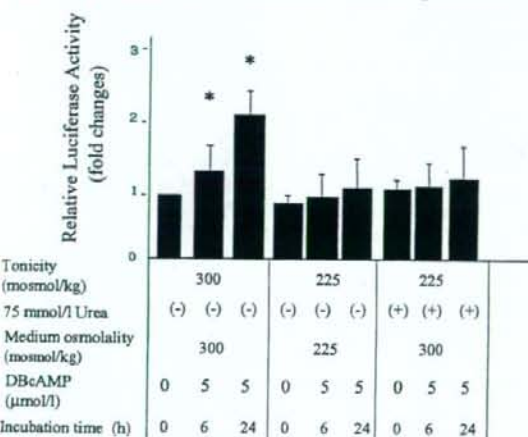


Figure 6. The effect of isosmolality (not isotonicity) on the AQP-2 promoter activity in the cells co-transfected with -1.1AQP2 and murine AQP-2 gene

Isosmotic, urea-supplemented medium was made by adding excess urea into the hypotonic medium of 225 mosmol kg⁻¹. Dibutyl cAMP (5 μmol l⁻¹) was added into the medium at 24 or 42 h. **P* < 0.05 versus the isotonic conditions without DBcAMP. Values are means ± S.E.M., *n* = 8.

basically regulated by cAMP, mediated via CRE, and by hypotonicity, via TonE. The region located between -6.1 and -4.3 kb of the AQP-2 gene is not essential for hypotonicity-induced transcription of the AQP-2 promoter, because there was no difference in inhibition of DBcAMP-induced Luc activity between -6.1AQP2 and -1.1AQP2. In contrast, hypertonic conditions stimulated basal Luc activity and further mediated the synergistic effect with cAMP-induced AQP-2 transcription. There are at least two hypertonicity-responsive regions, as described in our previous report (Kasono *et al.* 2005). They are the region located between -6.1 and -4.3 kb and TonE, and both regions are concomitantly involved in the regulation of hypertonicity-induced transcription of the AQP-2 promoter. However, Hasler *et al.* (2006) reported that in mouse collecting duct principal cells, TonEBP acts directly on AQP-2 gene transcriptional activity and that hypertonic challenge increases the AQP-2 promoter activity mediated via TonEBP. There are therefore different mechanisms for tonicity-responsive transcription of the AQP-2 gene between the hypo- and hypertonic states.

What is the intracellular signalling pathway mediating the action of hypotonicity on promoter activity? The signal of hypotonicity might be initiated by a change in cellular volume. Though the sensor of cellular volume is still not known, JNK kinase could be involved in the hypotonic signal. The JNK kinase may reduce TonEBP activity or may reduce the interaction of TonE with CRE by regulating AQP-2 promoter activity in hypotonic conditions. Recently, Li *et al.* (2007) showed that calcineurin directly regulates AQP-2 gene transcription and further interacts with TonEBP to enhance AQP-2 expression. It is known that p38 MAP kinase and MEK facilitate the hypertonic regulation of AQP-1 promoter via TonE (Umenishi & Schrier, 2003). These findings may imply that there are different intracellular signals regulating AQP-2 promoter gene between hypo- and hypertonicity, and that JNK kinase participates in regulating hypotonic inhibition of AQP-2 transcription.

It is known that AQP-2 biosynthesis is usually shut off shortly after IMCD cells are primarily cultured in the *in vitro* system (Furuno *et al.* 1996). Since cultured mIMCD₃ cells in our experiments did not express water channels, we used cells co-transfected with AQP-2 cDNA to evaluate the response to hypotonicity. Without co-transfection with AQP-2 gene, we could not find hypotonicity-induced suppression of DBcAMP-induced Luc activity (data not shown). The co-transfection with AQP-2 gene could increase water permeability and mediate changes in cell volume in response to the hypotonic solutions, thus providing hypotonicity-induced suppression. However, the study might be replicated using cells that express AQP-2 natively, such as mpkCCDcl4 cells (Robert-Nicoud *et al.* 2001). In future studies, we will use these cells to further our investigation of the tonicity-regulated transcription of AQP-2 gene.

Hypotonicity-induced suppression of DBcAMP-induced Luc activity was also seen in the isosmotic, urea-supplemented medium, which was effectively hypotonic (Fig. 6). Urea equilibrates between the intracellular and extracellular space across the cell membrane. These findings may suggest that the osmotic gradient between the outside and inside of cells affects the Luc activity of the AQP-2 promoter. Both NaCl and urea contribute to osmotic gradients within renal medullary tissue in animals and humans. We previously reported that the NaCl component but not the urea component contributes to hypertonic challenge for stimulating Luc activity (Kasano *et al.* 2005). Taken together, only NaCl-induced tonicity could be involved in the regulation of DBcAMP-induced AQP-2 gene transcription.

Clinical and experimental studies have demonstrated a renal 'escape' phenomenon from antidiuresis in chronic AVP excess, as is seen in the syndrome of SIADH; Gross *et al.* 1983; Ishikawa & Schrier, 2003). The mechanisms whereby water diuresis is produced have been investigated extensively (Ecelbarger *et al.* 1997; Murase *et al.* 1999; Saito *et al.* 2001). Arginine vasopressin-independent downregulation of AVP V₂ receptor function and AQP-2 expression might participate in the initiation of escape from AVP-induced antidiuresis (Murase *et al.* 1999). We suggested that hypotonicity might diminish the postreceptor signalling of AVP in a collecting duct in SIADH rats (Saito *et al.* 2001). The present *in vitro* study revealed the direct involvement of hypotonicity in reducing AQP-2 promoter activity. Hypotonicity is produced by increased extracellular fluid in the experimental rats with SIADH. Reduction in transcriptional regulation of AQP-2 in hypotonic conditions may support the *in vivo* finding of the AVP escape phenomenon in chronic AVP-induced antidiuresis.

In conclusion, the present study has demonstrated that hypotonicity reduced DBcAMP-induced AQP-2 promoter activity in mIMCD₃ cells co-transfected with -1.1AQP2 and AQP-2. Similar results were obtained with -6.1AQP2. It is suggested that TonE has a tight interaction with CRE for hypotonicity-induced reduction of AQP-2 promoter activity. The JNK kinase pathway could be involved in transduction of the hypotonic signal.

References

- Arima H, Yamamoto N, Sobue K, Umenishi F, Tada T, Katsuya H & Asai K (2003). Hyperosmolar mannitol stimulates expression of aquaporins 4 and 9 through a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent pathway in rat astrocytes. *J Biol Chem* **278**, 44525–44534.
- Christensen BM, Marples D, Jensen UB, Frokiaer J, Sheikh-Hamad D, Knepper M & Nielsen S (1998). Acute effects of vasopressin V₂-receptor antagonist on kidney: AQP-2 expression and subcellular distribution. *Am J Physiol Renal Physiol* **275**, F285–F297.
- Ecelbarger CA, Nielsen S, Olson BR, Murase T, Baker EA & Knepper MA (1997). Role of renal aquaporins in escape from vasopressin-induced antidiuresis in rats. *J Clin Invest* **99**, 1852–1863.
- Ferraris JD, Williams CK, Jung KY, Bedford JJ, Burg MB & Garcia-Perez A (1996). ORE, a eukaryotic minimal essential osmotic response element. The aldose reductase gene in hyperosmotic stress. *J Biol Chem* **271**, 18318–18321.
- Furuno M, Uchida S, Marumo F & Sasaki S (1996). Repressive regulation of the aquaporin-2 gene. *Am J Physiol Renal Physiol* **271**, F854–F860.
- Fushimi K, Uchida S, Hara Y, Hirata Y, Marumo F & Sasaki S (1993). Cloning and expression of apical membrane water channel of rat kidney collecting tubule. *Nature* **361**, 549–552.
- Gross PA, Kim JK & Anderson RJ (1983). Mechanism of escape from desmopressin in the rat. *Circ Res* **53**, 794–804.
- Hasler U, Jeon US, Kim JA, Mordasini D, Kwon HM, Feraille E & Martin PY (2006). Tonicity-responsive enhancer binding protein is an essential regulator of aquaporin-2 expression in renal collecting duct principal cells. *J Am Soc Nephrol* **17**, 1521–1531.
- Ishikawa S & Schrier RW (2003). Pathophysiological roles of arginine vasopressin and aquaporin-2 in impaired water excretion. *Clin Endocrinol (Oxf)* **58**, 1–17.
- Kasano K, Saito T, Saito T, Tamemoto H, Yanagidate C, Uchida S, Kawakami M, Sasaki S & Ishikawa S (2005). Hypertonicity regulates the aquaporin-2 promoter independently of arginine vasopressin. *Nephrol Dial Transplant* **20**, 509–515.
- Li SZ, McDill BW, Kovach PA, Ding L, Go WY, Ho SN & Chen F (2007). Calcineurin-NFATc signaling pathway regulates AQP2 expression in response to calcium signals and osmotic stress. *Am J Physiol Cell Physiol* **292**, C1606–C1616.
- Matsumura Y, Uchida S, Furuno M, Marumo F & Sasaki S (1997). Transcriptional regulation of aquaporin-2 water channel gene by cAMP. *J Am Soc Nephrol* **8**, 861–867.
- Miyakawa H, Woo SK, Chen CP, Dahl SC, Handler JS & Kwon HM (1998). *Cis-* and *trans-*acting factors regulating transcription of the BGT1 gene in response to hypertonicity. *Am J Physiol Renal Physiol* **274**, F753–F761.
- Miyakawa H, Woo SK, Dahl SC, Handler JS & Kwon HM (1999). Tonicity-responsive enhancer binding protein, a Rel-like protein that stimulates transcription in response to hypertonicity. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 2538–2542.
- Murase T, Ecelbarger CA, Baker EA, Tian Y, Knepper MA & Verbalis JG (1999). Kidney aquaporin-2 expression during escape from antidiuresis is not related to plasma or tissue osmolality. *J Am Soc Nephrol* **10**, 2067–2075.
- Nielsen S, DiGiovanni SR, Christensen EI, Knepper MA & Harris HW (1993). Cellular and subcellular immunolocalization of vasopressin-regulated water channel in rat kidney. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 11663–11667.
- Robert-Nicoud M, Flahaut M, Elalouf JM, Nicod M, Salinas M, Bens M, Doucet A, Wincker P, Artiguenave F, Horisberger JD, Vandewalle A, Rossier BC & Firsov D (2001). Transcriptome of a mouse kidney cortical collecting duct cell line: effects of aldosterone and vasopressin. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 2712–2716.

- Rim JS, Atta MG, Dahl SC, Berry GT, Handler JS & Kwon HM (1998). Transcription of the sodium/myo-inositol cotransporter gene is regulated by multiple tonicity-responsive enhancers spread over 50 kilobase pairs in the 5'-flanking region. *J Biol Chem* **273**, 20615-20621.
- Saito T, Higashiyama M, Nagasaka S, Sasaki S, Saito T & Ishikawa S (2001). Role of aquaporin-2 gene expression in hyponatremic rats with chronic vasopressin-induced antidiuresis. *Kidney Int* **60**, 1266-1276.
- Saito T, Ishikawa S, Sasaki S, Fujita N, Fushimi K, Okada K, Takeuchi K, Sakamoto A, Oogawara S, Kaneko T, Marumo F & Saito T (1997). Alteration in water channel AQP-2 by removal of AVP stimulation in collecting duct cells of dehydrated rats. *Am J Physiol Renal Physiol* **272**, F183-F191.
- Sasaki S, Fushimi K, Saito H, Saito F, Uchida S, Ishibashi K, Kuwahara M, Ikeuchi T, Inui K, Nakajima K & Marumo F (1994). Cloning, characterization and chromosomal mapping of human aquaporin of collecting duct. *J Clin Invest* **93**, 1250-1256.
- Storm R, Klusmann E, Geelhaar A, Rosenthal W & Maric K (2003). Osmolality and solute composition are strong regulators of AQP-2 expression in renal epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* **284**, F189-F198.
- Takenaka M, Preston AS, Kwon HM & Handler JS (1994). The tonicity-sensitive element that mediates increased transcription of the betaine transporter gene in response to hypertonic stress. *J Biol Chem* **269**, 29379-29381.
- Umenishi F & Schrier RW (2002). Identification and characterization of a novel hypertonicity-responsive element in the human aquaporin-1 gene. *Biochem Biophys Res Commun* **292**, 771-775.
- Umenishi F & Schrier RW (2003). Hypertonicity-induced aquaporin-1 (AQP1) expression is mediated by the activation of MAPK pathways and hypertonicity-response element in the AQP1 gene. *J Biol Chem* **278**, 15765-15770.
- Wojtaszek PA, Heasley LE, Siriwardana G & Berl T (1998). Dominant-negative c-Jun NH₂-terminal kinase 2 sensitizes renal inner medullary collecting duct cells to hypertonicity-induced lethality independent of organic osmolyte transport. *J Biol Chem* **273**, 800-804.
- Woo SK, Dahl SC, Handler JS & Kwon HM (2000). Bidirectional regulation of tonicity-responsive enhancer binding protein in response to changes in tonicity. *Am J Physiol Renal Physiol* **278**, F1006-F1012.
- Woo SK, Lee SD, Na KY, Park WK & Kwon HM (2002). TonEBP/NEAT5 stimulates transcription of HSP70 in response to hypertonicity. *Mol Cell Biol* **22**, 5753-5760.

Acknowledgements

All authors declare no conflict of interest. We thank Professor H. M. Kwon, Johns Hopkins University, for providing pDNTonEBP. The present study was presented in part at the Annual Meeting of the American Society of Nephrology, 16-19 November 2006, in San Diego, CA, USA. The study was supported by grants from the Ministry of Education, Science and Culture of Japan (nos 13137208, 16790527 and 17590841) and the Ministry of Health, Welfare and Labor of Japan. We thank Ms Chieko Yanagidate and Taeko Otani for their technical assistance.

動脈硬化の発症機序

川上正舒

自治医科大学さいたま医療センター

Pathogenesis of Atherosclerosis

Masanobu Kawakami

Saitama Medical Center, Jichi Medical University

Summary Atherosclerosis, previously considered to be a cholesterol storage disease, is currently understood as an inflammatory disease. The earliest change is subendothelial deposits of lipid and lipoprotein. The next event is the recruitment of inflammatory cells from the circulation. This process is mediated by adhesion molecules of which expression is enhanced both on leukocytes and endothelial cells by atherogenic risks. The leukocytes then transmigrate into subendothelial space, the intima. The monocytes exposed to modified LDL or cytokines there become converted to activated macrophages, take up modified lipoproteins and become foam cells. During these processes, activated endothelial cells and leukocytes secrete a variety of chemokines and cytokines which further activate the cells in auto- or paracrine fashion and lead to the recruitment of smooth muscle cells from the media of the artery. If the conditions continue, the advanced lesion is developed, consisting of smooth muscle cells, macrophages, T-lymphocytes, lipid, necrotic cell debris and connective tissue covered by a fibrous cap formed by smooth muscle cells, elastic fibers and proteoglycans. Clinical events such as myocardial or cerebral infarction are mostly derived from the formation of an occlusive thrombus at the site of plaque rupture or erosion of the plaque surface.

Key words: inflammatory reaction, adhesion molecule, macrophage, vascular smooth muscle, cytokine

1. はじめに

「動脈硬化」には Atherosclerosis すなわちアテローム性動脈硬化（粥状動脈硬化）と細動脈硬化，中膜硬化などの病変があるが，本稿ではアテローム性動脈硬化の発症機序について概説する。

“Atherosclerosis”は，病理学者 Felix Marchand が 1904 年に提唱した術語で，“粥”を意味する “athero” と “硬化，固く”を意味する “sclerosis” というギリシャ語から作られたと言われている¹⁾。粥状の形態を構成する主要成分はコレステロールおよびコレステロールエステルであることから，長年にわたり動脈硬化はコレステロール蓄積病であるという概念で捉えられていた。多くの疫学研究が高コレステロール血症と冠動脈疾患の相関を示しており，コレステロールを低下させることにより冠動脈疾患や脳梗塞の発症や死亡が減少することも示されている²⁾。しかし，現在では動脈硬化の発症や進展の機序はコレステロールを含む様々な危険因子と血管壁の細胞が複雑に絡まって

起こされる血管壁の炎症反応であると考えられている。

2. 傷害反応説

動脈硬化の発症機序が炎症反応であるという説は古く，19 世紀半ばに，かの Karl von Rokitansky が，動脈硬化は血管内膜に小血塊が沈着し，そこに線維芽細胞が潜入して器質化が起こり二次的に脂質が蓄積したものであると記載している。また，「病理学の父」と呼ばれる Rudolf Virchow も脂質の血管内への浸透にともなう血管内膜の傷害と炎症反応が動脈硬化プラーク発症の主要機序であると記載したと言われる。

現代医学においてこの概念の基になるのは，Russell Ross の傷害反応説（response to injury theory）であろう³⁻⁴⁾。この説は，動脈硬化は血管内皮細胞が何らかの傷害を受けるとそこに血小板が凝集して活性化され，PDGF（platelet-derived growth factor）を放出し，その PDGF の作用により中膜の平滑筋が内膜に遊走して増殖することが，動脈硬化発症の第一段階であるというものである。その後，マクロファージ

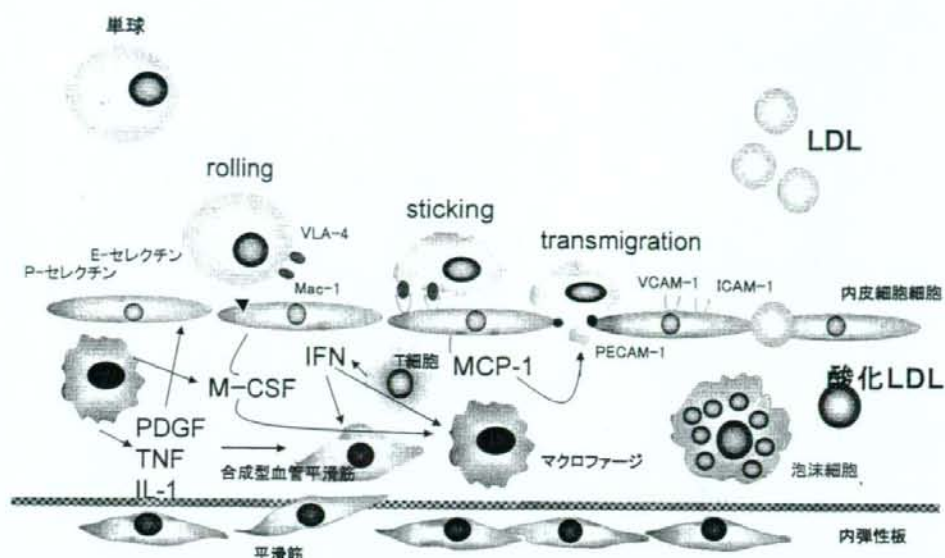


図1 動脈硬化の発症機序

や血管内皮細胞も PDGF を分泌することや、内皮細胞の機能障害による白血球との関係の重要性なども明らかになり、動脈硬化の成因は白血球細胞と血管壁細胞との複雑な相互作用による血管壁の炎症反応であるという概念が確立してきた (図1)⁴⁻⁶⁾。

3. 動脈硬化

3.1 初期病変

3.1.1 内皮細胞の透過性亢進とリポ蛋白

血管内皮は一層の内皮細胞からなり、血流と血管の組織を隔てる重要な役割を担っている。内皮細胞は非常に多くの機能を持ち、NO やプロスタサイクリンなど血管の正常な機能を維持する上で重要な物質を産生し、その一方で必要に応じて von Willebrand 因子や組織因子などの凝固促進因子も分泌する。エンドセリン-1 や MCP-1, IL-1, IL-8, TNF α , PDGF, M-CSF など多くのサイトカインを産生分泌することも知られている⁷⁾。上述のように動脈硬化の最も早期の変化は、血管内皮細胞の障害であるが、まず、リポ蛋白などの血漿成分に対する透過性が亢進し、内皮細胞下組織の基質に LDL (Low Density Lipoprotein: 低比重リポ蛋白) の蓄積が認められるようになる。もともと、LDL や IDL (Intermediate Density Lipoprotein: 中間比重リポ蛋白)、カイロミクロンレムナントは正常な内皮の細胞間結合部を通過して受動的に血管壁に浸透するので、内皮下への脂質蓄積には必ず

しも内皮細胞障害が必要なわけではない。いずれにせよ、血管に蓄積するリポ蛋白の量は血中 LDL 濃度に依存することから脂質異常症ではこの変化が起こりやすい。血管壁に浸透した LDL はそのアポ B が細胞外基質のプロテオグリカンに結合して組織内に沈着する。細胞外基質に結合した LDL は脂質成分の酸化や分解、アポ蛋白の分解などの修飾を受け、いわゆる変性 LDL (modified LDL), 酸化 LDL (oxidized LDL) になる (後述)。

LDL 以外のリポ蛋白でもアポ B を持つ Lp(a) やレムナントも血管壁に蓄積し動脈硬化を促進する。Lp(a) はアポ B に加えてプラスミノーゲンと相同性の高いクリングル構造のペプチドを持つことからプラスミンを低下させ線溶系に対して抑制的に働き、また、TGF- β (transforming growth factor β) を低下させて平滑筋の増殖を促進するなど LDL よりも強い動脈硬化惹起性を持つとされている⁸⁾。

内皮細胞障害としては、透過性亢進のほか、接着分子発現の増加、凝固因子の増加、抗凝固因子の減少、酸化 LDL 受容体の 1 つである LOX の発現の増加、NF- κ B や AP-1 (activator protein 1) の活性化などが挙げられる。

3.1.2 白血球の動員

内皮下での脂質の蓄積に次いで見られるのは単球とリンパ球の内皮細胞への接着とそれに続く内皮下への移入である⁹⁻¹¹⁾。この現象は炎症反応の初期反応とし

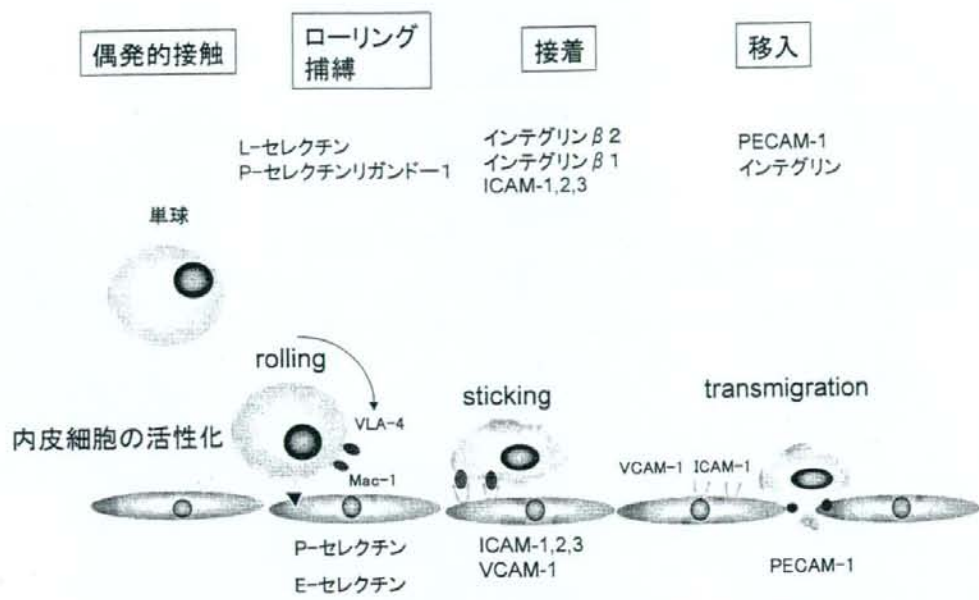


図2 単球の内皮細胞への接着と内皮下への移入における接着分子の役割

て共通したものであるが、興味深いことに、動脈硬化病変では好中球の集積は認められない。この炎症反応を惹起する因子の1つは内皮下に蓄積している変性LDLで、内皮細胞を裏側から刺激して細胞接着分子やM-CSF (macrophage colony stimulating factor), MCP-1 (monocyte chemotactic protein 1)などのサイトカインの発現や分泌を促進する¹¹⁾。MCP-1は単球の内皮下への移入に重要で、M-CSFは単球・マクロファージの増殖と分化を促進し、スカベンジャー受容体の発現を増加させる。変性LDLは内皮細胞によるNO産生を抑制することも知られている。

白血球は内皮細胞に接触するとまず内皮細胞表面上を転がる“ローリング”という現象を示す。これには、内皮細胞のEセレクトリン、Pセレクトリンと白血球のLセレクトリンとそれぞれの対応リガンドの結合が重要である^{12,13)}。それに続くより強い接着には単球およびT細胞のインテグリン (VLA 4, LFA-1, Mac-1) および免疫グロブリンスーパーファミリーのICAM (intercellular adhesion molecule) 1, 2, 3と内皮細胞のVCAM-1 (vascular-cell adhesion molecule 1), ICMA 1, 2, 3の結合が関与する^{12,13)} (図2)。内皮細胞に接着した白血球が血管壁内に移入する過程においても接着分子の関与が必要で、特にPECAM-1 (platelet-endothelial-cell adhesion molecule 1)が重要な役割を演じている。

3.2 脂肪線状 (Fatty-streak)

動脈硬化が肉眼的に認められる最初の病変は、血管内腔表面が黄白色ないし黄色に不整に隆起した脂肪線状と呼ばれるものである。ここでは、細胞内に多量のコレステロールエステルを蓄積した泡沫細胞 (foam cell) が見られる。初期病変でみられる泡沫細胞の多くは血中の単球由来のマクロファージであるが、PDGF, FGF 2 (fibroblast growth factor 2) TGF- β の働きにより、次第に中膜から平滑筋細胞が内膜に遊走してきてこれも泡沫化する。比較的進行した脂肪線状ではマクロファージ由来の泡沫細胞と平滑筋細胞由来の泡沫細胞の両方が混在しているとされている。

マクロファージや平滑筋は無修飾のLDLをほとんど取り込むことができない。泡沫化は、酸化LDLなどの変性リポ蛋白がスカベンジャー受容体を介して取り込まれ、細胞内にコレステロールエステルが蓄積することによるものである。マクロファージに取り込まれるLDLはかなり高度の修飾 (酸化あるいは他の変性)を受けたもので (highly oxidized or highly modified), その修飾には内皮細胞やマクロファージが産生する活性酸素が主役を演じており、また、ミエロペルオキシダーゼ、スフィンゴミエリナーゼ、フォスホリパーゼなどの酵素が関与することも明らかにされている¹⁴⁻¹⁶⁾。

変性LDLを取り込むスカベンジャー受容体として

はSR-AとCD36が主なものであるとされている。PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ) はマクロファージの分化を促進し酸化LDLの取り込みを増加させるが、酸化LDLの脂肪酸酸化物がPPAR γ を活性化しCD36の発現を増加させることが観察されており、PPAR γ を活性化させる内因性のリガンドの1つは酸化LDLであると考えられている¹⁷⁾。しかし、PPAR γ のアゴニストは糖尿病患者における心血管病の発症を抑制することが報告されている。著者らは非糖尿病の患者でもPPAR γ のアゴニストであるピオグリタゾンが動脈硬化の進展を抑制することを観察している¹⁸⁾。この矛盾は、臨床的にはPPAR γ がHDLによるコレステロールの引き抜きを促進してSR-Aの発現を抑制するので、これがCD36増加の効果を凌駕するということによると推測されている。M-CSFがスカベンジャー受容体の発現を増加させることは上述したがPDGFもこれを増加させるとされ、TNF α やインターフェロン γ は逆に抑制すると考えられている。

マクロファージはアポEを分泌することが知られており、このアポEがHDLによるコレステロールの引き抜きを促進していると考えられている。事実、アポEノックアウトマウスの骨髄を移植されたマウスでは対照群に比し動脈硬化を起こし易いことが観察されている。

動脈硬化巣では単球/マクロファージ、平滑筋細胞の他にTリンパ球が存在することも知られている。このT細胞は活性化されており、接着分子の発現は増加しており、また、インターフェロン γ を分泌するので、これらを介して血管壁の炎症反応を促進する役割の一端を担っていると考えられている。

3.3 線維性プラーク

さらに病変が進行すると病変部を覆うように被膜 (fibrous cap) が形成される。平滑筋が増殖しコラーゲンなどの細胞外基質成分を分泌することによる。また、泡沫化したマクロファージや平滑筋は、壊死あるいはアポトーシスに陥り細胞外にコレステロールおよびコレステロールエステルを放出するので、細胞外基質とコレステロールの蓄積が増加する。このようにして形成される被膜下の病変内部は脂質コアと呼ばれ、マクロファージ、T細胞、平滑筋およびそれらの泡沫化細胞、コレステロールやコレステロールエステル、崩壊堆積物 (debris) が混在し、その一部は壊死巣を形成する。マクロファージの分泌するPDGF、

HB-EGF、IL-1、TNF α 、TGF- β などは平滑筋の遊走や増殖および細胞外基質の分泌を促進する¹⁹⁾。アンジオテンシンIIも平滑筋の増殖と細胞外基質の分泌を促進する作用を持つ。

病変辺縁部位では白血球の内皮細胞への接着と血管壁内への移入という初期反応が起こり、さらにそれに続く上述の反応が繰り返し継続するので、病巣が拡大していく。

3.4 進行病変

動脈硬化の初期には病変は血管の外膜の方向に進展するが、ある程度進行すると血管の内腔側にも進展して血管腔を狭小化する。高度に進行した病変では骨形成と同様の機序により石灰化が起こり、中心部は壊死に陥っている。しかし、心筋梗塞の多くはプラークそのものによる血管腔の閉塞によるものではなく、プラークの表面に形成される血栓による血流の遮断が原因であることが明らかになってきた。プラークの表面に糜爛が生じたりあるいはプラークの線維性被膜が破れたりするとそこに血栓が形成される^{19,20)}。このように血栓を形成しやすいプラークは脂質コアの容積が病巣の30~40%以上を占め、被膜は薄くてマクロファージやTリンパ球に富み平滑筋やコラーゲンに乏しいという特徴をもち、脆弱性プラーク (vulnerable plaque) あるいは不安定プラークと呼ばれている。このようなプラークではマクロファージは活性化されておりコラーゲンの分解酵素であるMMPを分泌する。Tリンパ球の分泌するインターフェロン γ は平滑筋によるコラーゲンの産生・分泌を抑制し、一方では、マクロファージによるMMPを含む種々の蛋白分解酵素の産生・分泌を促進する。多くの場合、被膜の破綻はプラークの辺縁部で起こるが、この部位にはマクロファージやTリンパ球などの炎症性細胞が多く存在することも観察されている。また、逆に、被膜が厚くコラーゲンや線維芽細胞、平滑筋細胞に富みマクロファージやTリンパ球に乏しいプラークは破綻しにくく、安定プラークと呼ばれる。これまで述べてきたように、動脈硬化の進展にはマクロファージおよび平滑筋の動員と増殖が重要であるとされているが、一方で、これらの細胞が壊死あるいはアポトーシスに陥る反応も進んでいる。すなわち、動脈硬化巣の進展およびプラークの安定化、不安定化は細胞の増殖と壊死・アポトーシスのバランスによって決まる²¹⁾。

3.5 急性冠動脈症候群 (ACS: Acute Coronary Syndrome)

病理学的な検討によると、上述のように、致死的な心筋梗塞の原因は冠動脈における血栓で、血栓形成部位の70~80%は被膜の物理的な破裂が認められ、その他の場合も被膜の糜爛、プラーク内の出血あるいは石灰化部の糜爛が観察される^{19,20)}。被膜が破裂すると露出したコラーゲンに血小板が接触して活性化され、また、脂質コアにはマクロファージが産生する組織因子が存在するので、これらが相俟って凝固カスードは瞬時に活性化する。酸化LDLは内皮細胞およびマクロファージによる組織因子の産生を促進するが、最近では内皮細胞のCD40に炎症細胞のCD40L (CD40リガンド)が結合することも重要であるとされている。フィブリノーゲンがフィブリンに変換され、血小板から von Willebrand 因子が放出され、血小板とフィブリンからなる白色血栓が形成される。また、動脈硬化の危険因子とされる糖尿病、肥満、高血圧などでは血中のPAI-1 (plasminogen activator inhibitor 1)の血中濃度が増加しているが、PAI-1は組織プラスミノゲン活性化因子を阻害し線溶系を不活性化するので、形成された血栓の溶解も阻害される。また、破裂したプラークから組織因子に富む壊死組織が血流中に流出すると遠隔の抹消血管にも血栓を作る。

4. サイトカインの役割

これまで述べてきたように、動脈硬化の発症と進展にはMCP-1, M-CSF, TNF α , IL-1をはじめとする多くのサイトカインが関与するが²¹⁾、最近、これらに加えてオステオポンチンの役割も注目されている²²⁾。オステオポンチンは主としてマクロファージやTリンパ球などの炎症性細胞が産生するサイトカインで名称の示唆するように骨の再吸収と破骨細胞の分化の調節因子であるが、その他にも様々な作用をもち、マクロファージの泡沫化や平滑筋の遊走などにも関与して動脈硬化を促進する役割を持つことが推測されている。

5. 危険因子の発症機序への関わり

5.1 脂質異常症

LDLをはじめとするリポ蛋白が内皮の細胞間結合部を通過して血管壁に浸透し、アポBが細胞外基質に沈着して酸化などの変性を受けることについては既に述べた。酸化LDLはそれ自体がマクロファージあるいは平滑筋に対して走化性を示してこれらの細胞を

それぞれ流血中あるいは血管の中膜から内膜に集める役割を演じている。さらに、内皮細胞によるMCP-1やM-CSFの産生や接着分子の発現を促進し、マクロファージや平滑筋による諸々のサイトカインの分泌を刺激するなど、動脈硬化の発症・進展に關与する多くの影響を示す。

一方、HDLは動脈硬化の進展を抑制する働きを示す。その最も重要な機序は抹消組織からコレステロールを引き抜くことであるが、これに加えて、HDLにはリポ蛋白の酸化を抑制する作用がある。HDLはパラオキシネースというエステラーゼを運んでおり、これが酸化LDL中の酸化されたリン脂質を分解除去する。

5.2 高血圧

血管内皮は常時血流にさらされており、そのずり応力の影響を受ける。血流が一定方向の層流である部位では内皮細胞は楕円形をして血流に沿って整然と配列しているが、動脈の分岐部や屈曲部位では血流は乱流となり、その部位の内皮細胞は多角形を呈し、その配列も一定方向を示さない。このような分岐部や屈曲部位の内皮は透過性が高く、LDLなどの比較的大分子の血漿成分も血管壁に浸透しやすい。従って、動脈硬化病変は動脈全体に一樣に進展するものではなく、このような部位に斑状に形成される。高血圧はこのような血流の影響をより増幅する。また、高血圧患者では血中の活性酸素が増加するので、内皮細胞のNOが減少し、それにより接着分子の増加や抹消血管の抵抗性の増加が起ると考えられている。

高血圧ではしばしばアンジオテンシンIIが増加しているが、アンジオテンシンIIは上述のように平滑筋の増殖やコラーゲンの分泌を促進する他、フォスフォリパーゼCを活性化して細胞内Caを増加して平滑筋を収縮させる。

5.3 CRP

炎症のマーカーであるCRPが動脈硬化の危険因子でもあることが多くの疫学研究や臨床研究から明らかになっている。これまでの臨床検査では感度以下の濃度で正常とされていた範囲でも高感度の測定法で詳細な定量を行うとその範囲の中でも高い濃度を示す人ほど心血管イベントを起こし易いことが明らかにされている。また、スタチンにより高コレステロール血症を治療するとコレステロールとともにCRP濃度も低下し、コレステロールの低下が同程度でもCRPの低下の大きいほどイベントの発症が抑えられるということ

も報告されている。

これまで述べてきたように、動脈硬化の形成は炎症反応であるので、CRP は単に動脈硬化の進展状況を示す指標であるとも推測できるが、CRP 自体が動脈硬化の原因として寄与するものである可能性もある。現に、最近、CPR 自体が血管壁細胞に様々な作用を示し動脈硬化の原因因子としての役割を持つことが報告されている。著者らも、CRP が血管内皮細胞の増殖を抑制し、さらにアポトーシスを誘導することや、マクロファージによる TNF α 、IL-1、MMP-9 の産生・分泌を促進することを観察している²³⁾。

5.4 メタボリック症候群、糖尿病

メタボリック症候群や糖尿病が動脈硬化を促進する機序は非常に多岐にわたるので²⁴⁾本稿では省略するが、その1つとして蛋白が非酵素的糖化反応により生成される AGE (advanced glycation endproducts) の役割が挙げられている。血管内皮細胞は AGE に対する受容体 (RAGE) を持っており AGE を結合すると細胞内の酸化ストレスが増加してさまざまな障害を起こすとされている²⁵⁾。

6. おわりに

コレステロールの蓄積病と考えられていた動脈硬化の発症機序が炎症反応という観点から解明されてきた。これらの細胞の変化やサイトカインの働きを標的とした治療法の開発も検討されるようになってきている。

文 献

- 1) Gotto AM: Evolving concepts of dyslipidemia, atherosclerosis, and cardiovascular disease. The Bishop Lecture. *J Am Coll Cardiol* **46**: 1219-1224, 2005
- 2) Ross R: The pathogenesis of atherosclerosis: An update. *N Engl J Med* **314**: 488, 1986
- 3) Ross R: The pathogenesis of atherosclerosis: A perspective for the 1990s. *Nature* **362**: 801-809, 1993
- 4) Ross R: Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N Engl J Med* **340**: 115-126, 1999
- 5) Libby P: Inflammation in atherosclerosis. *Nature* **420**: 868-874, 2002
- 6) Lusis AJ: Atherosclerosis. *Nature* **407**: 233-241, 2000
- 7) 上羽洋人, 川上正舒: サイトカイン・成長因子と動脈硬化。医学のあゆみ **193**: 308-312, 2000
- 8) Grainger DJ, Kemp PR, Liu AC, et al: Activation of transforming growth factor- β is inhibited in transgenic apolipoprotein (a) mice. *Nature* **370**: 460-462, 1994
- 9) Rao RM, Yang L, Garcia-Cardena G, et al: Endothelial-

dependent mechanisms of leukocyte recruitment to the vascular wall. *Cir Res* **101**: 234-247, 2007

- 10) Braunersreuther V, Mach F: Leukocyte recruitment in atherosclerosis: Potential targets for therapeutic approaches? *Cell Mol Life Sci* **63**: 2079-2088, 2006
- 11) Badimon L, Martinez-Gonzalez J, Llorente-Cortes V, et al: Cell biology and lipoproteins in atherosclerosis. *Curr Mol Med* **6**: 439-456, 2006
- 12) Blankenberg S, Barbaux S, Tiret L: Adhesion molecules and atherosclerosis. *Atherosclerosis* **170**: 191-203, 2003
- 13) Galkina E, Ley K: Vascular adhesion molecules in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**: 2292-2301, 2007
- 14) Podrez EA, Poliakov E, Shen Z, et al: Identification of a novel family of oxidized phospholipids that serve as ligands for the macrophage scavenger receptor CD36. *J Biol Chem* **277**: 38503-38516, 2002
- 15) Marathe S, Kuriakose G, Williams KJ, et al: Sphingomyelinase, an enzyme implicated in atherogenesis, is present in atherosclerotic lesions and binds to specific components of the subendothelial extracellular matrix. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19**: 2648-2658, 1999
- 16) Leitinger N, Watson AD, Hama SY, et al: Role of group II secretory phospholipase A2 in atherosclerosis: 2. Potential involvement of biologically active oxidized phospholipids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19**: 1291-1298, 1999
- 17) Chawla A, Barak Y, Nagy L, et al: PPAR- γ dependent and independent effects on macrophage-gene expression in lipid metabolism and inflammation. *Nat Med* **7**: 48-52, 2001
- 18) Katayama T, Ueba H, Tsuboi K, et al: Reduction of neointima-hyperplasia after coronary stenting by pioglitazone in nondiabetic patients with metabolic syndrome. *Am Heart J* **153**: 762, e1-7, 2007
- 19) Libby P, Theroux P: Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation* **111**: 3481-3488, 2005
- 20) Shah P: Molecular mechanisms of plaque instability. *Curr Opin Lipidol* **18**: 492-499, 2007
- 21) Geng YJ, Libby P: Progression of atheroma. A struggle between death and procreation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **22**: 1370-1380, 2002
- 22) Scatena M, Liaw L, Giachelli CM: Osteopontin. A multifunctional molecule regulating chronic inflammation and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**: 2302-2309, 2007
- 23) Nabata A, Kuroki M, Ueba H, et al: C-reactive protein induces endothelial cell apoptosis and matrix metalloproteinase-9 production in human mononuclear cell: Implications for the destabilization of atherosclerotic plaque. *Atherosclerosis* 2007 May 23: Epub. ahead of print
- 24) 川上正舒: メタボリックシンドロームと炎症。日本医師会雑誌 **136**・特別号(1): S93-S96, 2007
- 25) Schleicher E, Friess U: Oxidative stress, AGE, and atherosclerosis. *Kidney Int (Suppl)* **106**: S17-26, 2007

糖尿病関連諸検査—測定法, 臨床的意義, 評価法—
血液検査

可溶性 VCAM-1, 可溶性 ICAM-1

Soluble VCAM-1 and soluble ICAM-1

阿部泰宣 川上正舒

Key words : 糖尿病, 肥満, 血管合併症, 可溶性 VCAM-1, 可溶性 ICAM-1

はじめに

大血管および細小血管合併症は糖尿病患者の死因や生活機能障害の主因となっている。これらの合併症は無症状のうちに進行し、腎症や心筋梗塞を発症して初めて診断されることもまれではない。また、血管病変の形成は前糖尿病状態の段階で既に始まっているともいわれている。このため、血管合併症を早期に発見するための簡便で信頼できるバイオマーカーの発見が望まれている。本稿で述べる可溶性 intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) や可溶性 vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) もそのようなバイオマーカーの候補の一つとして研究されてきたものである。

本稿では、その生成、生物学的役割、測定法、糖尿病および血管合併症との関連やバイオマーカーとしての限界について論じる。

1. 可溶性 ICAM-1 および可溶性 VCAM-1 の生成について

ICAM-1 および VCAM-1 はともに細胞表面に発現する I 型の膜タンパクである。ICAM-1 は 5 個の免疫グロブリン様ドメインを細胞外に有し、膜貫通ドメインと短い細胞質ドメインを

アンカーにして細胞膜に繋ぎ留められている。VCAM-1 は 6 個または 7 個の免疫グロブリン様ドメインを細胞外に有し、ICAM-1 と同様に膜貫通ドメインと短い細胞質ドメインをアンカーにして細胞に繋ぎ留められている。ICAM-1、VCAM-1 とともに膜タンパクとして合成されるが、血液や関節液などに可溶性タンパクとしても存在することが知られている¹⁾。可溶性 ICAM-1 および可溶性 VCAM-1 (以後 ICAM-1 と VCAM-1 をまとめて CAMs と表記する) は細胞内ドメインと膜貫通ドメインを欠損しており、膜貫通ドメインと細胞膜に一番近い免疫グロブリン様ドメインとの間が加水分解され、細胞表面より放出されるものと考えられている。in vitro では白血球エラスターゼやメタロプロテアーゼが膜型 CAMs を加水分解し可溶性 CAMs を生成するとの報告があるが、生体内におけるタンパク分解酵素の種類、制御機構、詳細な水解部位については明らかになっていない。可溶性 ICAM-1 については alternative splicing によって生成されるとの報告もある。しかし、その後このような機序による可溶性 ICAM-1 についての報告は少なく、可溶性 ICAM-1 のうちの程度が alternative splicing によるものなのかについてははっきりしない。

Yasunori Abe, Masanobu Kawakami: Department of Integrated Medicine, Saitama Medical Center, Jichi Medical University 自治医科大学附属さいたま医療センター 総合医学 1

膜型 ICAM-1 は血管内皮細胞のほか、単球、マクロファージ、活性化リンパ球、線維芽細胞、肝細胞、上皮細胞など様々な細胞の表面に発現しており、血管内皮細胞ではエンドトキシン、TNF α 、インターロイキン(IL)1、インターフェロン γ などの刺激によって発現が増加することが知られている。一方、膜型 VCAM-1 は未刺激の血管内皮細胞にはほとんど発現しておらず、エンドトキシン、TNF α 、インターロイキン1、インターロイキン4などの刺激によって発現が増加する。膜型 VCAM-1 はその他分化中の骨格筋細胞、骨髄のストローマ細胞、一部の樹状細胞などでも発現していることが確認されている。

これまでに報告された正常者や各種疾患における血中の可溶性 CAMs のレベルから判断して、一般的には血中の可溶性 CAMs の濃度は組織における膜型 CAMs の発現のレベルを反映しているものと考えられる。しかしながら、現時点では生成、代謝およびクリアランスの機序の詳細がわかっていないことから、組織における膜型 CAMs の発現のレベルと血中の可溶性 CAMs の濃度との間に乖離が認められる状態が存在する可能性も考慮に入れる必要がある。

2. 可溶性 ICAM-1 および可溶性 VCAM-1 の生物学的役割について

膜型 ICAM-1 は顆粒球、単球、リンパ球に存在する LFA1 (CD11a/CD18) や、顆粒球や単球に存在する Mac1 (CD11b/CD18) に結合することにより、細胞と細胞との接着を介在し(血管内皮細胞と白血球、白血球と白血球など)、またこれらの白血球の活性化にも関与する。一方、膜型 VCAM-1 はリンパ球や単球などに発現している $\alpha 4$ インテグリン ($\alpha 4\beta 1$: CD49d/CD29, $\alpha 4\beta 7$) と結合することによって、血管内皮細胞とリンパ球や単球との接着を介在する。 $\alpha 4$ インテグリンは成熟した好中球には発現していないことから、ICAM-1 と異なり VCAM-1 は好中球の接着を介在することはできない。また、VCAM-1 は ICAM-1 と異なり、生理的なずり応力の存在下でも単核白血球を内皮細胞上にと

らえることができる。更に、VCAM-1 を完全欠損させたマウスは胎盤や心臓の形成不全のため胎内で死亡することから、VCAM-1 は、胎生期において、尿膜や心筋など様々な細胞に発現し、発生や分化に重要な働きをしているものと考えられている。

可溶性 CAMs が膜型 CAMs の単なる代謝産物にすぎないのか、それとも何らかの生理学的役割があるのかについては議論の分かれるところである。LFA1 や Mac1 との結合部位はそれぞれ ICAM-1 の免疫グロブリン様ドメイン1と3に存在するので、可溶性 ICAM-1 も LFA1 や Mac1 に結合し、膜型 ICAM-1 の結合を競合的に抑制することにより白血球の接着を抑制したり、それ自体がリガンドとして働き、白血球の活性化を引き起こすことが原理的には可能のように思える。事実、そのような報告もあるが、モノマーの可溶性 ICAM-1 の LFA1 に対する親和性は低く、ICAM-1/LFA1 依存性の細胞接着を抑制するには、血中に存在する可溶性 ICAM-1 濃度の1,000倍以上の濃度が必要とされ、少なくとも正常の状態では血中に存在する可溶性 ICAM-1 の生理的役割は小さいものと思われる。

膜型 VCAM-1 の $\alpha 4$ インテグリンとの結合部位は免疫グロブリン様ドメイン1と4に存在するので、可溶性 VCAM-1 にも $\alpha 4$ インテグリンとの結合部位は存在する。膜型 VCAM-1 の膜貫通ドメインと細胞内ドメインをヒト免疫グロブリンのFc部分に置き換えた遺伝子組換え型の可溶性 VCAM-1 (VCAM1Fc) は $\alpha 4$ インテグリンに結合し、Tリンパ球の遊走を惹起したり、単球の血管内皮細胞への接着を部分的に抑制することが *in vitro* で確認されている²⁾。しかしながら、VCAM1Fc はダイマーを形成するため、ICAM-1 同様、この実験結果をそのままネイティブの可溶性 VCAM-1 に当てはめることはできない。正常者でも血清中には数 ng/mL レベルの可溶性 VCAM-1 が存在するが、通常、 $\alpha 4$ インテグリンを発現するリンパ球や単球の表面に VCAM-1 は検出されない。したがって、少なくとも正常の状態では血中に存在するネイティブの可溶性 VCAM-1 は $\alpha 4$ インテグリンに

結合しないか、結合するとしても親和性は低いものと思われる。ただし、 $\alpha 4$ インテグリンの活性化が起きたり、また何らかの理由で可溶性 CAMs のダイマー化、マルチマー化が起きることによって、生理的な濃度でも可溶性 CAMs がそれぞれの受容体に結合する可能性はある。関節リウマチ患者の関節液中の Tリンパ球の一部に VCAM-1 が検出されるとの報告があるが、これは関節液中の可溶性 VCAM-1 が結合したものと考えられている。

3. 測定法

可溶性 ICAM-1 および可溶性 VCAM-1 ともに 2 種類の抗体を利用したサンドウィッチ ELISA によって測定するのが一般的である。ELISA キットは R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) より入手可能である。ICAM-1 はリンパ球や単球にも発現しており、保存中にこれらの膜表面から放出される可能性もあることから、血清や血漿は採血後直ちに分離する。分離した血清や血漿は測定をするまで -20°C 以下で保存する。正常者では血清 ICAM-1 値は $225 \pm 16.6 \text{ ng/mL}$ 、血清 VCAM-1 値は $522 \pm 43.6 \text{ ng/mL}$ 程度である²³⁾。血清の方が血漿より値が若干高めに出る。

4. 臨床的意義

a. 可溶性 CAMs と 2 型糖尿病

複数の横断研究において、血液中の可溶性 ICAM-1 および可溶性 VCAM-1 濃度は 2 型糖尿病群で対照群と比較して有意に高値を示すと報告されている。更に、複数のコホート研究においても、ベースラインの血中可溶性 ICAM-1 および可溶性 VCAM-1 高値は血中可溶性 E-セレクトリン高値とともに 2 型糖尿病の独立した予知因子(危険因子)であるとの報告がなされている⁴⁻⁶⁾。

炎症のバイオマーカーと考えられてきた可溶性 CAMs が 2 型糖尿病の予知因子であるとの報告をどのように解釈すれば良いだろうか？ これまでにも複数のコホート研究において、CRP やインターロイキン 6 (IL6) などの炎症マーカー

が 2 型糖尿病の予知因子であるとの報告がなされている^{7,8)}。肥満者の脂肪組織からは TNF α や IL6 などの炎症性サイトカインが分泌される一方、抗炎症作用を有するアディポネクチンの分泌は低下していることが知られている。TNF α は ICAM-1, VCAM-1 および E-セレクトリンの発現を誘導し、IL6 は ICAM-1 や CRP の発現を誘導する。更に、CRP 自身も培養血管内皮細胞において ICAM-1, VCAM-1 および E-セレクトリンの発現を誘導するとの報告がある。したがって、可溶性 ICAM-1 の血中レベルの増加は肥満者における炎症を反映したものと考えられる。

それではこれらの可溶性 CAMs は肥満者の体のどこで作られているのであろうか？ マウスの食餌性肥満モデルでは脂肪組織に特異的に ICAM-1 mRNA の発現が増加し、肥満度や腹部脂肪の増加と血清中の可溶性 ICAM-1 濃度には正の相関が認められる。そして、ICAM-1 を発現している細胞は脂肪組織で増加している特殊なマクロファージであることがわかっている⁹⁾。

b. 可溶性 CAMs と 1 型糖尿病

1 型糖尿病は自己免疫機序による膵島炎とそれに伴う膵島 β 細胞の破壊によって引き起こされる疾患である。自己免疫性膵島炎にはリンパ球をはじめとする単核白血球の膵島への浸潤を伴うことから、接着分子の関与が推定されている。事実、マウスの 1 型糖尿病モデルでは、膵島炎における ICAM-1 の関与が示唆される所見が報告されている^{10,11)}。ヒトにおいても、膵島炎の診断的バイオマーカーとして血中の可溶性 CAMs が使えるかどうか、また接着分子が自己免疫性膵島炎の治療のターゲットになりうるかどうかという観点から、1 型糖尿病における接着分子の研究が行われてきた。しかしながら、横断研究において、微小アルブミン尿やそれ以上の腎臓合併症を伴う 1 型糖尿病症例では、正常者と比して血中の可溶性 ICAM-1 と可溶性 VCAM-1 濃度の有意な上昇を認めるものの¹²⁾、臨床的に明らかな合併症を伴わない 1 型糖尿病では、有意な差は認められなかったと報告されている。同様に、別の大規模な横断研究におい

でも、1型糖尿病患者では血中可溶性 VCAM-1 および可溶性 E-セレクトリン濃度とタンパク尿、網膜症、動脈硬化性心血管疾患との間に有意な相関が認められ、特に血中可溶性 VCAM-1 とタンパク尿との間に最も強い相関が認められたと報告されている¹³⁾。

一方、コホート研究において、まだ1型糖尿病を発症していない自己抗体陽性と陰性の sibling 間で血中可溶性 ICAM-1 および可溶性 L-セレクトリン濃度を比較してみると、自己抗体陽性群と陰性群の間には有意差を認めなかったものの、抗膵島細胞抗体 (ICA) 高値や抗 IA2 抗体陽性などのハイリスク群では自己抗体陰性群と比し可溶性 ICAM-1 および可溶性 L-セレクトリンの血中濃度が有意に高く、追跡中に1型糖尿病を発症した群では発症しなかった群に比しベースラインの可溶性 ICAM-1 濃度が有意に高かったとの報告がある¹⁴⁾。しかしながら、両群間でのオーバーラップが多すぎるため、可溶性 ICAM-1 濃度から1型糖尿病の発症を予測するのは困難であった。

以上より、ヒトにおいても1型糖尿病の発症に接着分子の関与が疑われるものの、血中可溶性 CAMs 濃度は膵島炎の診断マーカーとしての価値は低く、また1型糖尿病患者における血中可溶性 CAMs 濃度の上昇は主に血管合併症に由来するものと考えられる。

c. 可溶性 CAMs と糖尿病大血管合併症

粥状硬化病変では内膜にコレステロールエステルを取り込んだマクロファージやリンパ球の集積が認められるが、これらの単核白血球から分泌されるサイトカイン、成長因子、プロテアーゼなどがプラークの形成や破裂に重要な役割を担っていることから、粥状硬化病変の形成、進展における接着分子の役割について多くの研究が行われてきた。

ヒトの粥状硬化巣では血管内皮細胞に ICAM-1 や VCAM-1 の発現が認められるが、動物の高脂血症モデルでは、脂肪線条における単核球の接着、浸潤に先立って、その部分を覆う内皮細胞に VCAM-1 などの接着分子が発現することがわかっている。著者らも、家族性高コレステ

ロール患者の低比重リポタンパクの最も陰性にチャージしたサブ分画が、ヒト培養血管内皮細胞に VCAM-1 をはじめとする接着分子や CXC ケモカインの発現を誘導し、単核白血球の接着を引き起こすことを報告している¹⁵⁾。更に、ICAM-1 や VCAM-1 を欠損させたマウスの粥状硬化モデルでは (VCAM-1 の場合、完全欠損マウスは胎内で死亡するため、部分欠損マウスを使用) 粥状硬化巣の面積が欠損のないマウスに比して有意に小さいことから、これらの接着分子が粥状硬化病変の形成に重要な役割を担っているのは間違いないと思われる^{16,17)}。

それでは、血中の可溶性 CAMs は粥状硬化の早期診断のマーカーになりうるのか？ 著者らの初期の研究では、血中の可溶性 ICAM-1 濃度は高コレステロール血症および高中性脂肪+低 HDL 血症で高値を示したのに対し、可溶性 VCAM-1 濃度は高中性脂肪+低 HDL 血症では高値を示したものの高コレステロール血症では正常者と比し有意な差を認めなかった^{2,3)}。その後の複数の大規模なコホート研究において、ベースラインの血中可溶性 ICAM-1 濃度の高値は将来の冠動脈疾患や閉塞性動脈硬化症の独立した予知因子であることが明らかになってきたが、一部の報告を除くと、血中可溶性 VCAM-1 濃度とこれらの疾患との間に相関は認められていない^{18,19)}。in vitro や動物の粥状硬化モデルにおいては膜型の VCAM-1 が粥状硬化の形成により重要な働きを担っている可能性が示唆されているので、この結果は意外に思える¹⁶⁾。これをどう解釈すれば良いのであろうか？ 一つには、血中可溶性 VCAM-1 濃度が血管内皮細胞における膜型 VCAM-1 の発現レベルを反映していない可能性が考えられる。前述のように、可溶性 VCAM-1 が膜型 VCAM-1 から生成される機序やその代謝経路についてはほとんどわかっていない。また、正常者でも血中の可溶性 CAMs の濃度は数百 ng/mL 程度もあり、粥状硬化巣の内皮細胞から可溶性 VCAM-1 が生成されたとしても、血中濃度に与える影響は微々たるものであろうと想像される。逆に粥状硬化における血中可溶性 ICAM-1 濃度の上昇は、病

変部分の血管内皮細胞からの可溶性ICAM-1の生成の増加だけでは説明しにくく、白血球など他の細胞からの生成の増加も寄与しているのではないかと想像される。

おわりに

これまでに述べてきたように、糖尿病患者では血中可溶性CAMs濃度が正常者と比し高値を示すことがあるが、その理由は様々で、肥満に伴う脂肪組織の炎症、細小血管合併症、大血管合併症あるいはそれらの複合が原因になっていると考えられる。血中可溶性ICAM-1値や可溶

性VCAM-1値が2型糖尿病の、また、血中可溶性ICAM-1値が粥状硬化性心血管疾患の独立した予知因子であることがわかってきたが、腫瘍マーカーなどと比べるとオッズ比は低く、その臨床的価値は限られている。したがって、簡便でかつ特異性、感受性の高い新しいバイオマーカーの発見が望まれる(それは同時に治療の新しいターゲットになる可能性もある)。そのためには、DNA microarrayや血漿タンパクのプロテオミクスなど最先端技術を利用した、網羅的で効率の良いアプローチが必要と思われる。

文献

- 1) Gearing AJ, Newman W: Circulating adhesion molecules in disease. *Immunol Today* 14: 506-512, 1993.
- 2) Abe Y, et al: Soluble cell adhesion molecules in hypertriglyceridemia and potential significance on monocyte adhesion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18: 723-731, 1998.
- 3) Hackman A, et al: Levels of soluble cell adhesion molecules in patients with dyslipidemia. *Circulation* 93: 1334-1338, 1996.
- 4) Meigs JB, et al: Biomarkers of endothelial dysfunction and risk of type 2 diabetes mellitus. *JAMA* 291: 1978-1986, 2004.
- 5) Thorand B, et al: Elevated markers of endothelial dysfunction predict type 2 diabetes mellitus in middle-aged men and women from the general population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26: 398-405, 2006.
- 6) Hoogeveen RC, et al: Circulating oxidised low-density lipoprotein and intercellular adhesion molecule-1 and risk of type 2 diabetes mellitus: the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Diabetologia* 50: 36-42, 2007.
- 7) Pradhan AD, et al: C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA* 286: 327-334, 2001.
- 8) Duncan BB, et al: Low-grade systemic inflammation and the development of type 2 diabetes: the atherosclerosis risk in communities study. *Diabetes* 52: 1799-1805, 2003.
- 9) Brake DK, et al: ICAM-1 expression in adipose tissue: effects of diet-induced obesity in mice. *Am J Physiol Cell Physiol* 291: C1232-1239, 2006.
- 10) Balasa B, et al: A mechanism for IL-10-mediated diabetes in the nonobese diabetic (NOD) mouse: ICAM-1 deficiency blocks accelerated diabetes. *J Immunol* 165: 7330-7337, 2000.
- 11) Camacho SA, et al: A key role for ICAM-1 in generating effector cells mediating inflammatory responses. *Nat Immunol* 2: 523-529, 2001.
- 12) Clausen P, et al: Plasma concentrations of VCAM-1 and ICAM-1 are elevated in patients with type 1 diabetes mellitus with microalbuminuria and overt nephropathy. *Diabet Med* 17: 644-649, 2000.
- 13) Soedamah-Muthu SS, et al: Soluble vascular cell adhesion molecule-1 and soluble E-selectin are associated with micro- and macrovascular complications in Type 1 diabetic patients. *J Diabetes Complications* 20: 188-195, 2006.
- 14) Toivonen A, et al: Soluble adhesion molecules in preclinical type 1 diabetes. The Childhood Diabetes in Finland Study Group. *Pediatr Res* 49: 24-29, 2001.
- 15) Abe Y, et al: L5, the most electronegative subfraction of plasma LDL, induces endothelial vascular cell adhesion molecule 1 and CXC chemokines, which mediate mononuclear leukocyte adhesion. *Atherosclerosis* 192: 56-66, 2007.

- 16) Cybulsky MI, et al: A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *J Clin Invest* 107: 1255-1262, 2001.
- 17) Kitagawa K, et al: Involvement of ICAM-1 in the progression of atherosclerosis in APOE-knockout mice. *Atherosclerosis* 160: 305-310, 2002.
- 18) Hwang SJ, et al: Circulating adhesion molecules VCAM-1, ICAM-1, and E-selectin in carotid atherosclerosis and incident coronary heart disease cases: the Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) study. *Circulation* 96: 4219-4225, 1997.
- 19) Ridker PM, et al: Plasma concentration of soluble intercellular adhesion molecule 1 and risks of future myocardial infarction in apparently healthy men. *Lancet* 351: 88-92, 1998.

巻 頭 言

メタボリックシンドロームと高コレステロール血症 — ガイドラインとマニュアルによる医療のなかで —

自治医科大学附属さいたま医療センター センター長 川上 正舒

最近、多くの疾患の診断と治療にガイドラインが作成されており、それに基づく医療のマニュアル化は良質な医療を迅速かつ平等に提供する上で非常に有用である。しかし、マニュアルで医療行為を行うには、その背景にある病態とガイドラインの意義についても十分な理解が必要である。

メタボリックシンドロームについても、この点でときに問題があるように思われる。わが国では本症候群の早期発見を目的とした特定検診が行われるようになったほどに重要視され、一般人を含めた多くの人がこれを認知するように広報活動が行われている。一方で、医師のなかにも、「その診断基準に高コレステロール血症が入らないのはなぜか」という疑問をもつ者もあり、この症候群が意味するところは必ずしも十分に理解されているとはいえないようである。欧米では高名な専門家の間でもこの症候群の存在自体について議論があり、2005年にはアメリカ糖尿病学会(ADA)と欧州糖尿病学会(EASD)が共同で、これを一つの症候群とするのは時期尚早であるとの声明を出した¹⁾。これに対して「メタボリックシンドロームが存在するのだからか²⁾」という主張論と「メタボリックシンドロームという裸の王様³⁾」という慎重論のいささか興奮気味のタイトルでの議論があり、この論争にはまだ終止符は打たれていない^{4,5)}。かくいう私はこの点について語る資格があるわけではないが、一つの問題は「症候群」という言葉にある。“根本となる一つの原因から生じる一連の症状を指す言葉”(Wikipedia)と原因を重視して解釈するか、“原因が多岐にわたるものもある”(広辞苑)と原因論にこだわらずに解釈するのかということである。この点についても、インスリン抵抗性を重視した病因論と、それぞれ独立した危険因子の集積と考えるべきであるとの見解に分かれるところであるが、いずれにしても一つひとつの危険因子は軽度であっても重なるほど重大であるという概念は両者の認めるところである。

診断については、慎重論者が論じるように、診断基準による二分化(dichotomize)は危険であり、基準はあくまでも便宜上の約束事であるということを理解することも重要である。本症候群を高LDL血症とは独立した症候群とする背景を理解せず「診断基準に高LDL血症は入らないのですか?」という疑問をもつ人は、この症候群の存在を主張する立場のアメリカ心臓病学会(AHA)とNIH(NHLBI)の共同声明が、本症候群の脂質異常の治療における“第一目標はLDLコレステロールの低下である”としていることに、面食らう可能性さえあるように思うのである。ゆめゆめ、本症候群も、1人で来てハンバーガー30個を注文した客に「こちらでお召し上がりですか? それともお持ち帰りですか?」と聞くような、マニュアル化した医師や医療行政者に弄ばれることのないようにしたいものである。

(かわかみ まさのぶ)

■文 献

- 1) Kahn R, Buse J, Ferrannini E et al: The metabolic syndrome: time for a critical appraisal: joint statement from the American Diabetes Association and European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care* 28 (9): 2289-2304, 2005
- 2) Grundy SM: Does the metabolic syndrome exist? *Diabetes Care* 29 (7): 1689-1692, 2006
- 3) Kahn R: The Metabolic Syndrome (Emperor) Wears No Clothes. *Diabetes Care* 29 (7): 1693-1696, 2006
- 4) Ferrannini E: Metabolic syndrome: a solution in search of a problem. *J Clin Endocrinol Metab* 92 (2): 396-398, 2007
- 5) Grundy SM: Metabolic syndrome: a multiplex cardiovascular risk factor. *J Clin Endocrinol Metab* 92 (2): 399-404, 2007

動脈硬化の基礎

— 炎症と動脈硬化

川上正舒(自治医科大学附属さいたま医療センター)

本日の話題は「炎症と動脈硬化」となっておりますが、実際には動脈硬化の発症機序としての炎症反応について解説させていただきます。

動脈硬化の発症機序が炎症反応であるということは、100年以上も前にRokitanskyやVirchowらが記載していたといわれておりますが、現代医学においてこれをより明確にしたのはRussel Rossの“Response to Injury”説、すなわち“障害反応説”であると思えます。この説はその後、さまざまな修正が加えられましたが、動脈硬化の成因は血球細胞と血管壁細胞との複雑な相互作用による血管壁の炎症反応であるという、今日確立されている概念の基礎となっております。

動脈硬化の病変はまず血管内皮細胞の障害からはじまります。内皮細胞は非常に多くの機能を持ち、NOやプロスタサイクリンなど血管の正常な機能を維持する上で重要な物質を産生し、また、エンドセリン-1やMCP-1、IL-1、TNF α 、PDGF、M-CSFなど多くのサイトカインを産生分泌することも知られています。この内皮細胞の機能が障害されるとリポ蛋白などの血漿成分に対する透過性が亢進し、内皮の裏側の血管壁の組織にLDLが蓄積するようになります。当然のことながら血中LDL濃度が高ければ血管に蓄積する量も多くなると考えられます。血管壁に浸透したLDLは組織内に沈着して酸化や分解などの修飾を受け、酸化LDLなどのいわゆる変性LDLになります。

内皮細胞障害としては、透過性亢進のほかに、接着分子の増加や酸化LDL受容体の増加など多くの変化が知られており、これらの変化も動脈硬化の促進に働くと考えられます。

内皮下の脂質の蓄積に次いで見られるのは血流中の単球とリンパ球が内皮細胞に接着し、次いで血管壁に侵入するという現象で、これはまさに炎症の初期反応そのものですが、興味深いことに、動脈硬化病変では好中球の集積はみられません。この動脈硬化病変での炎症反応を引き起こす誘因の1つは、先ほど述べました血管壁に蓄積する酸化LDLで、これが内皮細胞を裏側から刺激して接着分子やM-CSF (macrophage colony stimulating factor)あるいは、MCP-1(monocyte chemotactic protein 1)などのサイトカインの発現や分泌を促進します。MCP-1は血流中の単球が血管内皮に呼び寄せられて血管壁に侵入するのに重要で、また、M-CSFは血管壁に入った単球が増殖しマクロファージへ分化するのを促進し、スカベンジャー受容体の発現を増加させます。

血流中の単球やリンパ球は内皮細胞に接触すると接着分子を介して内皮細胞に結合し、その後内皮の細胞と細胞の間を通過して血管壁に侵入します。接着分子にはセレクチンやICAM-1、VCAM-1など多くのものがあり、白血球が血管に接着し侵入していくそれぞれの過程にはそれぞれ異なる接着分子が関与するとされていますが、ここでは時間の都合で省略させていただきます。

動脈硬化として肉眼的に最初に認められるのは、血管内腔表面が白色ないし黄色に隆起した病変で脂肪線状と呼ばれています。その部位では、細胞内に多量のコレステロールエステルを蓄積した泡沫細胞がみられます。初期病変でみられる泡沫細胞の多くは血中から血管壁に入った単球由来のマクロファージですが、このマクロファージや内皮細胞がPDGFやTGF β を分泌しますので、その働きにより、

血管の中膜から平滑筋細胞が内膜に遊走してきてこれも酸化LDLを取り込んで泡沫化します。したがって、比較的進行した脂肪線状ではマクロファージ由来の泡沫細胞と平滑筋細胞由来の泡沫細胞の両方が混在しているとされています。

動脈硬化巣では単球/マクロファージや平滑筋細胞のほかにTリンパ球が存在することも知られています。このT細胞は活性化されており、インターフェロン γ を分泌するので、これらを介して血管壁の炎症反応を促進する役割の一端を担っていると考えられています。

さらに病変が進行すると平滑筋が増殖しコラーゲンを分泌し、これが病変部を覆うように被膜(fibrous cap)を形成します。また、泡沫化したマクロファージや平滑筋は、壊死あるいはアポトーシスに陥り細胞外にコレステロールおよびコレステロールエステルを放出しますので、細胞外基質とコレステロールの蓄積が増加します。このようにして形成される被膜下の病巣内部は脂質コアと呼ばれ、マクロファージ、T細胞、平滑筋およびそれらの泡沫化細胞、コレステロールやコレステロールエステル、壊死細胞のdebrisが混在し、その一部は壊死巣を形成し、いわゆる粥状動脈硬化のプラークが完成します。

病変辺縁部位ではこのような過程が繰り返されて病巣が拡大していきます。

動脈硬化が進行すると血管腔が狭くなりますが、しかし、心筋梗塞の多くはプラークそのものが血管腔を閉塞することによるものではなく、プラークの表面に形成される血栓による血流の遮断が原因であるということが明らかになりました。これについてはこのセミナーでもすでにプラークの破裂というところでお聞きになったと思います。このプラークの破裂の機序にも病巣部位での炎症細胞が重要な役割を演じていることが知られています。すなわち、マクロファージやTリンパ球などの炎症性細胞が多く存在し、逆に線維芽細胞や平滑筋細胞やコラーゲン線維の少ない部位が破裂しやすいことが知られてい

ます。

最後にいわゆる危険因子と炎症のかかわりについて触れておきたいと思います。

炎症のマーカーであるCRPが動脈硬化の危険因子でもあることが多くの研究から明らかになっています。高感度の測定法で詳細な定量を行うと、これまでの臨床検査では感度以下の濃度で正常とされていた範囲の中でも定量することができます。このような範囲の中でも高い濃度を示す人ほど心血管イベントを起こし易いことが明らかになってきました。また、スタチンにより高コレステロール血症を治療した場合、コレステロールの低下が同程度でもCRPの低下の大きいほどイベントの発症が抑えられるということも報告されています。

これまで述べてきましたように、動脈硬化の形成は炎症反応ですので、CRPは単に動脈硬化の進展状況を示す指標であるとも推測できますが、最近、CRP自体が血管壁細胞にさまざまな作用を示し動脈硬化の原因因子としての役割を持つことも報告されています。われわれも、CRPが血管内皮細胞の増殖を抑制し、さらにアポトーシスを誘導することや、マクロファージによるTNF α 、IL-1、MMP-9の産生・分泌を促進することを観察しています。

また、メタボリックシンドロームで問題とされる内臓脂肪は多くの種類の炎症性サイトカインを分泌しますので、メタボリックシンドロームでは糖代謝異常、高血圧、脂質異常症を累積するということに加えて、脂肪細胞から分泌される炎症性サイトカインが直接動脈硬化を促進することに影響しているということも推測されております。

このように、コレステロールの蓄積病と考えられていた動脈硬化の発症機序が炎症反応という観点から解明されてきており、これらの細胞の変化やサイトカインの働きを標的とした治療法の開発も期待されます。

(ラジオNIKKEI心臓財団虚血性心疾患セミナーより)

Ang II-stimulated migration of vascular smooth muscle cells is dependent on LR11 in mice

Meizi Yu,¹ Hideaki Bujo,¹ Kenji Ohwaki,² Hiroyuki Unoki,³
Hiroyuki Yamazaki,⁴ Tatsuro Kanaki,² Manabu Shibasaki,^{2,4} Kazuhiko Azuma,⁵
Kenichi Harigaya,⁵ Wolfgang J. Schneider,⁶ and Yasushi Saito²

¹Department of Genome Research and Clinical Application, ²Department of Clinical Cell Biology, ³Division of Applied Translational Research, and ⁴Department of Molecular and Tumor Pathology, Chiba University Graduate School of Medicine, Chiba, Japan. ⁵Kowa Research Institute, Kowa Company Ltd., Higashimurayama, Japan. ⁶Department of Medical Biochemistry, Max F. Perutz Laboratories, Medical University of Vienna, Vienna, Austria.

Medial-to-intimal migration of SMCs is critical to atherosclerotic plaque formation and remodeling of injured arteries. Considerable amounts of the shed soluble form of the LDL receptor relative LR11 (sLR11) produced by intimal SMCs enhance SMC migration *in vitro* via upregulation of urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) expression. Here, we show that circulating sLR11 is a novel marker of carotid intima-media thickness (IMT) and that targeted disruption of the *LR11* gene greatly reduces intimal thickening of arteries through attenuation of Ang II-induced migration of SMCs. Serum concentrations of sLR11 were positively correlated with IMT in dyslipidemic subjects, and multivariable regression analysis suggested sLR11 levels as an index of IMT, independent of classical atherosclerosis risk factors. In *Lr11*^{-/-} mice, femoral artery intimal thickness after cuff placement was decreased, and Ang II-stimulated migration and attachment of SMCs from these mice were largely abolished. In isolated murine SMCs, sLR11 caused membrane ruffle formation via activation of focal adhesion kinase/ERK/Rac1 accompanied by complex formation between uPAR and integrin $\alpha\beta3$, a process accelerated by Ang II. Overproduction of sLR11 decreased the sensitivity of Ang II-induced activation pathways to inhibition by an Ang II type 1 receptor blocker in mice. Thus, we demonstrate a requirement for sLR11 in Ang II-induced SMC migration and propose what we believe is a novel role for sLR11 as a biomarker of carotid IMT.

Introduction

Migration of vascular SMCs from the media to the intima is a key step in the development of atherosclerosis (1, 2). Following migration, SMCs proliferate in the intima and secrete matrices and proteases to form atheromatous plaques under the influence of stimulatory cytokines. The system encompassing urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its receptor (uPAR) is thought to be important for the migration of SMCs. For migration, cell-associated proteolysis of ECM and/or receptor-mediated signaling leading to activation of ERK and Rac1 (3, 4) play crucial roles. However, in regard to migration of SMCs relevant to the development of atherosclerosis and remodeling of injured arteries, the mechanisms for and significance of uPA/uPAR activation have not been fully elucidated yet.

Functional studies using genetically altered animals or cells have revealed that certain receptors belonging to the family of LDL receptor relatives (LRs) are important regulators of cell migration via modulating cytokine signaling and/or protease activation (5–7). Interestingly, LR-mediated regulation of migration appears to be caused at least in part by modulation of the uPA/uPAR system (6,

7). LR11 (also called *sorLA*), an unusually complex and highly conserved LR discovered and molecularly characterized by us and others (8–10), mediates uPAR's plasma membrane localization, as both the membrane-spanning form and the shed soluble form of the receptor (sLR11) bind to and colocalize with uPAR on the cell surface (11). LR11 is highly expressed in intimal SMCs at the intima-media border in the plaque area of experimental models of atherogenesis (11, 12). Furthermore, overexpression of LR11 in SMCs enhances their migration via elevated levels of uPAR (13).

In the process of atherosclerosis, the BB isoform of PDGF (PDGF-BB) is an important cytokine for migration of SMCs (1, 2). PDGF-BB performs its task through the stimulation of cell motility via accelerated cytoskeleton rearrangement and degradation of ECM components of intimal SMCs (1). Also, PDGF-BB enhances migration of intimal SMCs via activation of the LR11/uPAR-mediated intracellular pathway (14). Ang II is another potent chemoattractant for SMCs (1, 15, 16). Recent studies with Ang II type 1 receptor (AT₁R) blockers (ARBs) (17) or knockdown experiments (18) have shown that intracellular signals involving activation of Rac1 are important for the Ang II-mediated hypertrophy of SMCs and neo-intimal formation in injured arteries.

Here, we have studied the (patho)physiological significance of the LR11-mediated migration system of intimal SMCs in the development of intimal thickening *in vivo*. We found that circulating sLR11 levels reflect the degree of carotid intima-media thickness (IMT), an established atherosclerosis marker (19), independently of other risk factors of IMT in subjects with dyslipidemia. Subsequent studies using LR11-targeted mice revealed that sLR11 increases membrane

Nonstandard abbreviations used: ARB, AT₁R blocker; AT₁R, Ang II type 1 receptor; FAK, focal adhesion kinase; GST, glutathione-S-transferase; HDL-C, HDL cholesterol; I/M ratio, ratio of IMT; IMT, intima-media thickness; LDL-C, LDL cholesterol; LR, LDL receptor relative; LRP1, LDL-related protein 1; NMHCII-B, nonmuscle myosin heavy chain II-B protein; OR, odds ratio; PDGF-BB, PDGF isoform with 2 B chains; RAP, receptor-associated protein; sLR11, shed soluble form of LR11; uPA, urokinase-type plasminogen activator; uPAR, uPAR receptor.

Conflict of interest: The authors have declared that no conflict of interest exists.

Citation for this article: *J. Clin. Invest.* 118:2733–2746 (2008). doi:10.1172/JCI32381.