

血管平滑筋の増殖制御と Imatinib Mesilate による増殖抑制作用

— 冠動脈再狭窄予防への応用の可能性 —

真木山 八 城

新潟大学大学院医歯学総合研究科循環器分野

(主任：相澤義房教授)

Imatinib Mesilate Blocks the Proliferation of Vascular Smooth Muscle Cells

Yashiro MAKIYAMA

Division of Cardiology,

Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences

(Director: Prof. Yoshifusa AIZAWA)

要 旨

【背景】心筋梗塞などの虚血性心疾患に対する治療は、バルーンやステントを用いて冠動脈狭窄部をカテーテル的に拡張するインターベンション治療の普及によって大きく進歩した。とはいえ少なからぬ患者では術中に起こる狭窄部血管内皮障害が原因で術後に血管内膜肥厚が起こり、結果として冠動脈再狭窄が出現し、予後改善の妨げとなっている。慢性骨髄性白血病の新薬として開発された Imatinib Mesilate は、*abl* や *bcr/abl* のチロシンキナーゼ (TK) シグナルを阻害することで慢性骨髄性白血病や Ph 陽性急性リンパ性白血病に有効であり、また *kit* の TK を阻害することで消化管間質腫瘍 (GIST) に有効であるが、本剤が阻害する 3 つめの分子である血小板由来増殖因子 (PDGF) の受容体 (PDGFR) は血管平滑筋細胞に強く発現していることから、冠動脈再狭窄の予防薬として有効であると推測した。これを検討することを目的として培養血管平滑筋細胞を用いた細胞不連続性の増殖におよぼす効果を調べ、さらにラットの頸動脈バルーン障害モデルを用いた Imatinib Mesilate の *in vivo* 投与実験を行った。

【方法と結果】血管平滑筋の平面培養では、増殖中の細胞は *homophilic* な接着因子である *coxsackievirus and adenovirus receptor* (CAR) を強く発現し、細胞が平面の全体を覆うとともに CAR の発現量が減少し増殖が終止した。スクラッチにより細胞平面に傷を付けると、傷の周囲の細胞に CAR が強発現しつつ増殖を開始した。このことから、細胞の連続性が増殖シグナルに介入すること、また CAR 陽性細胞同士の *homophilic* な接着が細胞の増殖を負に制御している可能性が推測された。ラットの頸動脈をバルーン付きカテーテルで障害すると、血管平滑筋の中膜から内膜への遊走に引き続いて CAR の強発現とともに強い増殖が誘導されるが、Imatinib Mesilate の経口投与によって内膜肥厚が用量依存性に抑制された。このことから、体内においては障害血管内腔側に接着した血小板から放出される PDGF による遊走・増殖シグナ

Reprint requests to: Yashiro MAKIYAMA
First Department of Internal Medicine
Niigata University School of Medicine
1-754 Asahimachi-dori,
Niigata 951-8510 Japan

別刷請求先：〒951-8510 新潟市旭町通り1-754
新潟大学医学部内科学第一教室 真木山八城

ルを Imatinib Mesilate がブロックすることがわかった。

【結語】 Imatinib Mesilate の投与によりインターベンション治療後の冠動脈再狭窄を予防できる可能性が示された。

キーワード：虚血性心疾患，冠動脈インターベンション，術後冠動脈再狭窄，内膜肥厚，メシル酸イマチニブ，CAR

緒 言

血管増殖の正と負の制御を理解することは、臨床医学において重要な課題の一つである。今まで我々は閉塞性動脈硬化症や虚血性心疾患の治療を目的とした血管再生の基礎研究を行い実際の患者治療に応用してきたが、これは主に血管増殖の正の制御に関連するものであった^{1)–4)}。一方、悪性腫瘍の治療においては血管増殖を抑制することが治療に結びつき、また本研究のように血管内膜肥厚を抑制し冠動脈再狭窄を予防するなど、血管増殖の負の制御を治療に結びつけることもまた重要な研究テーマである。

血管を構成する主な細胞である血管内皮 (EC) と血管平滑筋 (SMC) はいずれも恒常的に coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) を発現しており、アデノウイルス・ベクターを用いた遺伝子の発現が障害血管に強くみられることと関連する⁵⁾。CAR の細胞外ドメインは免疫グロブリン遺伝子家系に属する接着因子のひとつで、VCAM-1 や ICAM-1 との相同性を有する^{6)–8)}。CAR それ自体が CAR のリガンドであり (homophilic cell adhesion molecule)⁹⁾、血管平滑筋の増殖を制御している可能性が推測されている¹⁰⁾。

血管平滑筋の増殖因子には PDGF, bFGF などいくつか存在するが、血管内皮障害においては障害部位に接着する血小板から分泌される PDGF が重要である。平滑筋に発現している PDGF の受容体 (PDGFR) の細胞内ドメインにはチロシンキナーゼ (TK) 活性があり、SMC においては中膜から内膜への遊走と新生内膜における SMC の増殖を誘導することで血管修復にかかわる。慢性白血病の治療薬として abl 蛋白の TK 活性を阻害

するように設計されたシグナル伝達阻害剤のイマチニブは、abl に類似した TK をもつ kit および PDGFR のシグナル伝達をも阻害する。そこでわれわれは血管内皮障害によって引き起こされる新生内膜肥厚をイマチニブの投与によって抑制できる可能性を推測し、実験を行った。

方 法

細胞培養

ラット大動脈血管平滑筋細胞 (Cell Applications, San Diego, CA) を洗浄ののち、平滑筋増殖培地 (SMC P-STIM, Becton Dickinson, CA: MCDB131 medium supplemented with 5% FBS, 5 μ g/l of human insulin, 10 μ g/l of rhEGF, 2 μ g/l of rhbFGF, 100 U/ml of penicillin G, and 100mg/ml of streptomycin) に浮遊させ、0.7ml (1×10^4 細胞) を type-I コラーゲンで処理した培養スライド (Biocoat, Becton Dickinson, 0.69 cm²/chamber, 8 chamber/slide) に播種し、37°C 5% CO₂ の条件で培養した。培養終了後、スライドを PBS で洗浄したのち、氷冷 Zamboni 液で 30 分間固定し、各種抗体と蛍光色素を用いて染色した。

バルーン障害モデル

動物は雄の 12 ないし 14 週齢の SD ラット (430–500g, Charles River Japan, Yokohama) を用いた。処置は無菌的な環境で、Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH publication No. 86-23) に従って行った。50 mg/kg のペントバルビタール・ナトリウムの腹腔内投与によって麻酔したのち、左頸動脈を露出し総頸動脈から 2F フォガティ・カテーテルを刺入し、バルーンを 3 往復させることで外頸動脈の内膜を障害し、

傷を閉じた。

胃管を留置し、メシル酸イマチニブの原末（ノバルティス社より供与、体重 kg あたり 0, 6, 12.5, 25 および 50mg）を蒸留水に溶いたものを、障害作成当日より 14 日間一日一回投与した。障害作成の 14 日後に致死量の麻酔によって屠殺し、切除した頸動脈から周囲組織を取り除き洗浄した後、OCT compound (Sakura Finetechnical, Tokyo) に埋没させ、速やかに液体窒素にて冷凍し -80℃ で保存した。厚さ 10mm の連続切片を APS 処理したスライド (Matsunami Glass, Osaka) に付着させ、氷冷 Zamboni 液で 30 分間固定し、各種抗体と蛍光色素を用いて染色した。

染色と画像処理

CAR および第Ⅷ因子関連抗原 (FVIIIIRAg) の染色はウサギ抗 CAR 抗体 (新潟大学脳研究所の桑野良三先生より供与) またはウサギ抗 FVIIIIRAg 抗体 (Zymed, San Francisco, CA) と、ビオチン化ヤギ抗ウサギ Ig (Nichirei, Tokyo) および FITC 標識ストレプトアビジン (Vector, Burlingame, CA) を用いた。増殖細胞核抗原 (PCNA) およびアルファ平滑筋アクチン (αSMA) の染色はマウス抗 PCNA モノクローナル抗体 (Zymed) またはマウス抗 αSMA モノクローナル抗体 (Sigma) と TRITC 標識ヤギ抗マウス抗体 (Vector) を用いた。核染色には DAPI を用いた。

H E 染色標本は BX60 顕微鏡 (Olympus, Tokyo) と DP50 ヴィデオシステム (Olympus) を用いて画像のデジタル化を行い、Mac SCOPE ソフトウェア (Mitani, Fukui) を用いて数値化した。内膜および中膜の総面積の比 (I/M ratio) を内膜肥厚の指標とし、内弾性板より内側の総面積 (血管内腔を含む) に占める内膜総面積の割合 (% stenosis) を内腔狭窄の指標とした。健常で無処置のラット頸動脈についても同様の測定を行った。

蛍光染色した標本は confocal laser scan unit (Olympus FV500) を装着した顕微鏡 (Olympus IX71) と Fluoview ソフトウェア (Olympus) を用いて画像化した。レーザーは multi-argon laser

(488 nm) および Green He-Ne laser (543 nm) を用い、バリアフィルターセットは BA505/525 および BA5601F を用い、色表現は緑 (FITC)、赤 (ローダミン) および青 (DAPI) で描画した。

統計

測定値は平均値と標準偏差で表現した。多群間の比較は one-way ANOVA を用いて行い Bonferroni 試験で有意差の検定を行った。

結 果

培養平滑筋の増殖

CAR および PCNA の発現を図 1 に示す。血管平滑筋細胞は培養液中に含まれる bFGF に反応して増殖するが、細胞の連続性が回復するとともに CAR の発現が弱まり増殖を停止した。スクラッチにより一部を障害すると、連続性を失った細胞に CAR の発現上昇にともない PCNA が発現し増殖を再開した。

バルーン障害モデル

バルーン障害 7 および 14 日後の組織を図 2, 3 に示す。無治療で 7 日後に CAR の発現の増加とともに強い増殖を示していた血管平滑筋は、14 日後には厚い新生内膜を形成し、血管内皮の回復によって増殖を停止した。新生内膜の形成はイマチニブの経口投与によって用量依存性に抑制された (図 4)。

考 案

バルーン障害モデルの観察から、血管平滑筋細胞は血管内皮障害を引き金とした細胞連続性の破綻、および障害血管内腔側に凝集した血小板から放出された PDGF によって内弾性板を貫通して内膜へ移動するとともに、収縮型から合成型への形質転換をおこし CAR の発現が増強して増殖を開始した。細胞増殖を負に制御する機構の一つにリン酸チロシン脱リン酸化酵素 (PTPase) を介するシステムがある。白血球に普遍的に発現して

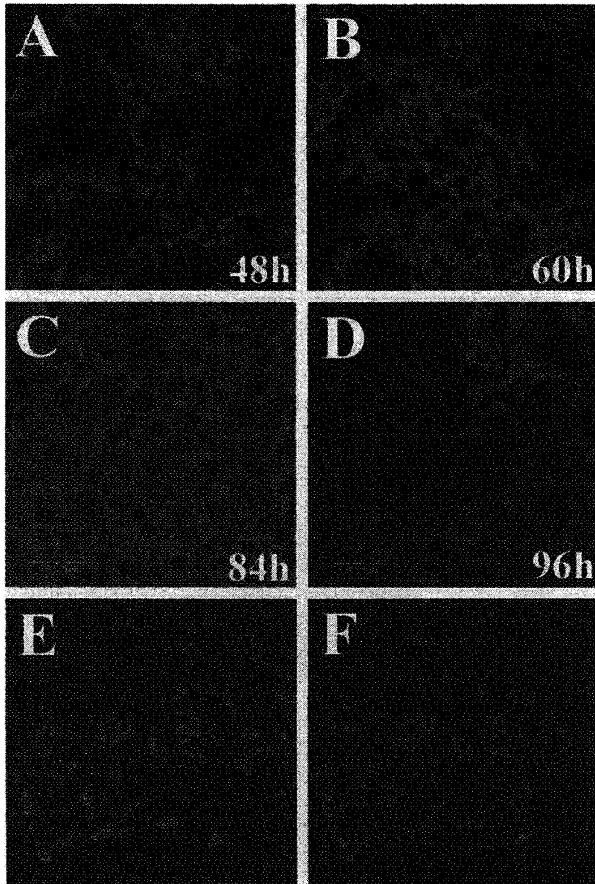


図1 培養血管平滑筋細胞における CAR の発現
 ラットの大動脈平滑筋細胞をシャーレ上で培養し、CAR の発現を観察した (パネル A-D)。細胞の連続性が回復すると CAR (緑色) の発現が弱まった。コンフレントになり増殖の停止した培養細胞の一部を針によってスクラッチすると (パネル E, F の下部)、細胞連続性の破綻した細胞周囲に CAR の発現が再上昇するとともに核内に PCNA (パネル E: 赤色) が発現し、連続性を回復するための細胞増殖が再開したことが分かる。同じ標本の核染色 (青色) をパネル F に示す。コンフォーカル顕微鏡, 倍率: $\times 800$ 。

いる CD45 を初めとする受容体型 PTPase は、一般に細胞外ドメインがリガンドと結合することで細胞内ドメインの PTPase が活性化し TK からのシグナルを遮断するが、一方の SHP1 を初めとする細胞質型 PTPase は他の受容体と会合すること

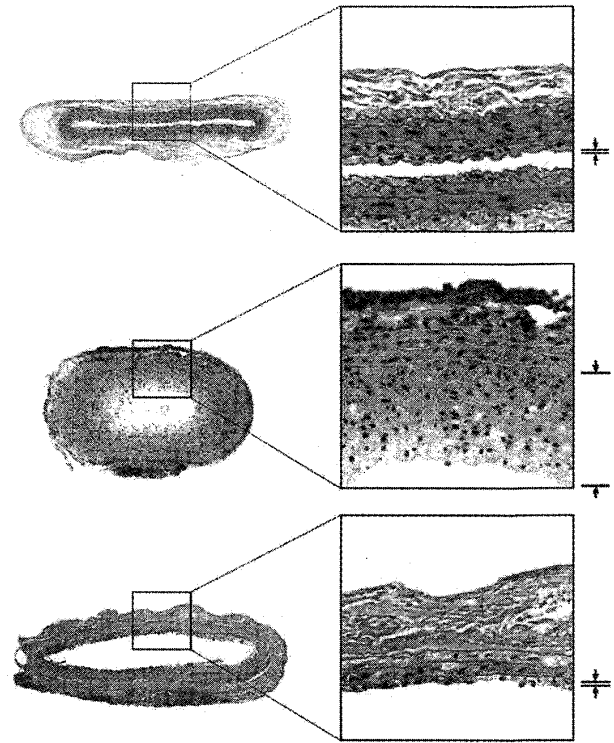


図2 バルーン障害後の新生内膜肥厚に対するイマチニブの効果

ラット頸動脈のバルーン障害 14 日後の組織を H E 染色した。図の右端に内膜の範囲を示す。無処置の頸動脈 (上段) を比較のため提示する。バルーン障害のあと無治療のラット (中段) では著しい新生内膜肥厚により動脈内腔の狭窄が生じるのに対し、体重 (kg) あたり 50mg のイマチニブを 14 日間連日経口投与したもの (下段) では新生内膜の形成が阻害されている。顕微鏡写真は倍率: $\times 20$ で撮影した。

で活性化する。CAR の細胞内ドメインは PTPase 活性を有しないが、膀胱癌細胞が CAR を介して接着すると増殖が抑制され p21 の上昇と Rb 蛋白の脱リン酸化がおこることから¹¹⁾、CAR が直接あるいは間接的に PTPase を活性化することが推測される。いっぽう気管支上皮においては、CAR を介した接着は tight junction protein の ZO-1 を誘導し気管支上皮のバリアー形成に寄与するが¹²⁾、これもおそらく増殖の制御と関連した一連の反応を形成しているものと推測されている。以下に

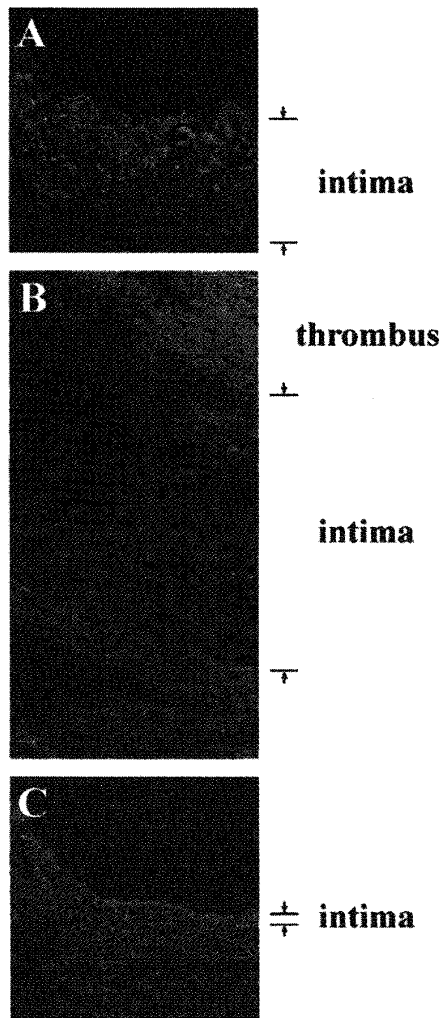


図3 バルーン障害後の新生内膜の蛍光顕微鏡像

パネルA：ラット頸動脈のバルーン障害7日後：内膜に遊走した平滑筋はさかんに増殖し、内腔側の平滑筋にCARが強く発現している(倍率：×400, 赤：aSMA, 緑：CAR)。B, Cは14日後の組織(倍率：×100, 赤：aSMA, 緑：ⅧRAg)。無治療(B)で見られる新生内膜肥厚が、イマチニブ50mg/kgの連日経口投与(C)では強く抑制されていた。

PDZモチーフに関連して現在までに報告されていることを引用しつつ、今回の研究の結果の解釈を試みる。

細胞の接着や tight junction (TJ) の形成には PDZモチーフを有する蛋白が深く関わっている¹³⁾。

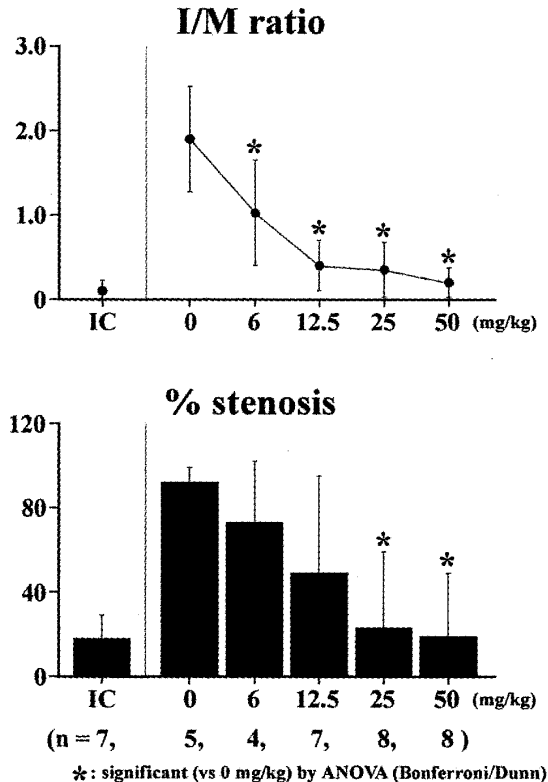


図4 イマチニブの投与による内膜中膜比(I/M ratio)および内腔狭窄率(% stenosis)の改善効果

ラット頸動脈のバルーン障害14日後の組織をHE染色し、ビデオシステムによってデジタル化したのちMac SCOPEソフトウェアによって数値化した。内膜中膜比は、内膜の面積と中膜の面積の比率を、また内腔狭窄率は内弾性板より内側の組織(内膜)の面積を内弾性板より内側の内腔を含む総面積で割ったものである。イマチニブの14日間連日経口投与により、用量依存性に新生内膜肥厚および内腔狭窄の抑制が観察された。ICはintact carotid。

細胞膜を4回貫通する構造の claudin と occludin はそのC末端でPDZモチーフを有する蛋白と会合する性質をもつ¹⁴⁾。ZO-1, ZO-2, ZO-3などのPDZモチーフを有するTJ蛋白は細胞の接着を感知して接着面での claudin と occludin の間に架橋を形成し、これを核にしてアクチンが伸展し細胞膜は流動性を失い形状が保持される。CARは細胞外ドメインにIg様ドメインを2つもちICAM

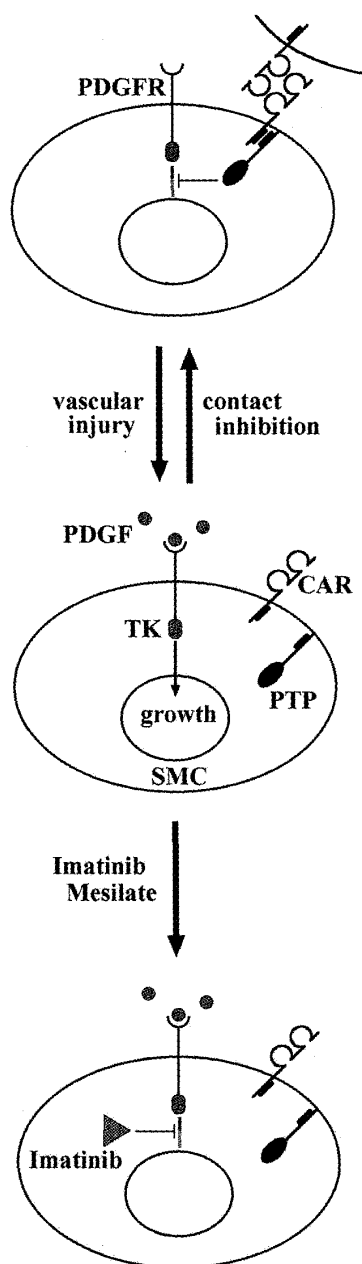


図5 予測されるイマチニブによる血管平滑筋の増殖抑制機序

細胞同士の連続性を有する平常時には、homophilic な接着因子の一つである CAR が細胞膜直下でリン酸チロシン脱リン酸化酵素 (PTP) を介して増殖の抑制を行う (上段). 血管障害によって細胞の連続性が失われると CAR と PTP の会合による増殖抑制が解除され, 障害血管に付着した血小板より放出される血小板由来増殖因子 (PDGF) がその受容体 (PDGFR) のチロシンキナーゼ (TK) を介して平滑筋を増殖させる (中段). イマチニブは PDGFR の TK を選択的に阻害し, 増殖を抑制する.

や VCAM と同様に細胞接着に拘わるが, 一方では CAR の細胞内ドメインは PDZ モチーフを有し TJ 形成部位を反応の場とすることが容易に推測される. 実際, 気道上皮において CAR は basolateral に局在し上皮細胞同士の TJ に拘わっているが, これには CAR の細胞内ドメインが重要な役割を果たしていることが示され¹⁵⁾, この反応は細胞の増殖をも制御している¹⁶⁾. CAR は他の PDZ モチーフを持つ蛋白である LNX や MUPP-1 と複合体を形成することが示されており¹⁷⁾¹⁸⁾, TJ 領域において複雑な制御に拘わっていることが推測されている. このような PDZ モチーフを介する反応は TJ 形成に限らず, 細胞接着一般にかかわっている.

動脈障害に引き続いて血管壁に発現する PTPase は 18 種類 (8 つの受容体型と 10 個の細胞質型でこのうち PTPL1 以外は PDZ モチーフを持たない) が観察されており, このうち 5 つの PTPase がバルーン障害後に新生内膜に強く発現していた¹⁹⁾. 5 つの PTPase のうち SHP1 と CD45 は白血球に, また PTPb は内皮細胞に由来するもので, 血管平滑筋に由来するものは PTP1B と PTPL1 の 2 つであり, 両者とも細胞質型であった. PTP1B は障害直後の中膜平滑筋で発現の増強が観察されたのに対し, PTPL1 は平滑筋が内膜に遊走し増殖を開始してから発現が増強したことから, 細胞接着に関連して増殖の制御を行う PTPase は PTPL1 であることが予測される. この PTPL1 は一次構造が他の細胞骨格関連蛋白と類似性が高く²⁰⁾, また PDZ モチーフを介して Fas の C 末端と相互作用を起こすことが報告されている²¹⁾.

以上の文献的考察を今回の研究結果に当てはめて, 血管内皮障害に続発する組織修復の過程とイマチニブの作用点を推測したものを図 5 に示す. 血管平滑筋細胞は常態において各種受容体の細胞内ドメイン TK からのシグナルは PTPase によって抑制されているが, 血管障害によって細胞の連続性が破綻すると接着因子とリガンドの解離によって PTPase の不活性化がおこる. 障害血管に凝集した血小板から放出される PDGF や周囲組織

から放出される bFGF によって受容体の TK からシグナルが誘導され増殖が開始すると同時に CAR, PTPL1 などの産生が高まり, これら PDZ モチーフを有する分子は細胞膜近傍へ集積する. 増殖によって細胞の連続性が回復した平滑筋では CAR の homophilic なリガンドとの接着が回復し, 接着局所の細胞膜の細胞質側で claudin や occludin を足場とした主に PDZ モチーフを介した多数の分子の会合が促進され, PTPL1 の活性化により TK からシグナルが遮断され, 増殖が停止するとともに CAR, PTPase などの産生が低下する. なお本研究においてイマチニブが強い新生内膜抑制作用を示したことから, 少なくとも血管内皮障害に続発する平滑筋の増殖においては, 障害内皮に凝集した血小板から表出される PDGF に対する反応が主たる作用機序であることが推測される. また PDGFR からのシグナルは, 本来は中膜に存在する SMC が内弾性板を貫通して内膜へ遊走する最初の反応からかかわっていることから, PDGFR からのシグナルを遮断することは最も理にかなっている. 一方の bFGF はヘパリン結合性を有する増殖因子で, 常態においては内弾性板などの細胞外マトリックスに蓄えられており, 虚血によって組織が酸性に傾いた時にマトリックスから遊離し細胞の増殖を速やかに誘導することから, 今回のバルーン障害モデルのように虚血を伴わない系においては大きな作用を示さなかったとはいえ, 実際の臨床で問題となる急性心筋梗塞などの虚血と血管障害が同時に起こる病態においては PDGF と並んで大きな役割をはたすものと考えられる. 一方 PDGF と bFGF の作用の違いを比較すると, PDGF は血管平滑筋が中膜から内弾性板を超えて内膜へ移動し引き続いて内膜内で増殖するのを刺激するため, PDGF のシグナルを遮断することで内膜肥厚にかかわる平滑筋の動員をその最初の反応から抑制できるのに対し, bFGF はオートクライン・パラクライン的に作用するサイトカインで主に血管平滑筋増殖の後半で作用するのみならず血管内皮の再生をも促すことから, bFGF からのシグナルを遮断するような薬剤を用いることは得策ではないと推測される.

経皮的冠動脈インターベンションは虚血性心疾患に対する治療法として我が国でも広く用いられている. これまで術後再狭窄のため長期成績に関して十分に満足できる結果が得られてはなかったが, 近年, 強力な新生内膜増殖抑制作用を持つシロリムスを加えたポリマーをステント表面にコーティングした薬剤溶出性ステント (DES; drug eluting stent) が開発されたことにより, 再狭窄率の劇的な改善が期待されている²²⁾²³⁾. しかし一方でシロリムスによる新生内膜増殖抑制のため, 生体にとって異物であるステントが内皮に覆われることなく血管腔に露出したままになる可能性が指摘されている. 遠隔期において抗血小板剤の休薬を契機にステント内血栓症を発症したとの報告もあり²⁴⁾, DES 留置後には長期に渡る抗血小板療法が推奨されているが²⁵⁾, それに伴う出血性合併症の危険も決して無視出来ない. さらにポリマーに対するアレルギー反応²⁶⁾ など DES に特有の合併症も懸念されており, DES の長期予後に関しては未だ不明な点が多い.

本研究においてイマチニブの経口投与でバルーン障害モデルにおける新生内膜増殖を抑制することが示され, 今後の臨床応用が大いに期待される. 例えば, 様々な理由で DES を使用できない症例において従来の金属ステント留置する際, 再狭窄予防目的にイマチニブを投与したり, また一般にステント治療が不適とされる径 2.5mm 以下の小血管²⁷⁾ や高度屈曲性病変, さらに大動脈以下の閉塞性動脈硬化症に対する血管内治療²⁸⁾ に際してバルーン形成術とイマチニブ投与を併用するなど, 応用範囲は極めて広いと思われる.

臨床的に慢性骨髄性白血病患者に対して用いられるイマチニブの投与量は一日あたり 400 ~ 800mg である. これは体重 kg あたりおよそ 10mg に相当し, 本研究の結果から新生内膜増殖抑制効果が得られる用量と考えられる. また本剤の作用機序から, 冠インターベンション後数週間程度の投与で再狭窄予防効果が期待できるため, 重篤な副作用を招来する可能性も小さいと思われる.

謝 辞

研究を指導して頂いた第一内科学教室の相澤義房教授、鳥羽健講師、加藤公則助手、および共同で実験をおこなった小澤拓也先生に心より深謝いたします。

文 献

- 1) 西川 尚：下肢虚血モデルマウスを用いた骨髄細胞移植 (BMT) による血管新生の検討：新潟医学会雑誌 118: 402 - 410, 2004.
- 2) Saigawa T, Kato K, Ozawa T, Toba K, Makiyama Y, Minagawa S, Hashimoto S, Furukawa T, Nakamura Y, Hanawa H, Kodama M, Yoshimura N, Fujiwara H, Namura O, Sogawa M, Hayashi J and Aizawa Y: Clinical application of bone marrow implantation in patients with arteriosclerosis obliterans, and the association between efficacy and the number of implanted bone marrow cells. *Circ J* 68: 1189 - 1193, 2004.
- 3) 小澤拓也：赤芽球造血による血管新生作用—血管再生療法の治療成績向上を目指した基礎的研究—：新潟医学会雑誌 119: 350 - 358, 2005.
- 4) Ozawa T, Toba K, Kato K, Minagawa S, Saigawa T, Hanawa H, Makiyama Y, Moriyama M, Honma K, Isoda M, Hasegawa G, Naito M, Takahashi M and Aizawa Y: Erythroid cells play essential roles in angiogenesis by bone marrow cell implantation. *J Mol Cell Cardiol*, in press.
- 5) Reikter MD, Simari RD, Work CW, Nabel GJ, Nabel EG and Gordon D: Gene transfer into normal and atherosclerotic human blood vessels. *Circ Res* 82: 1243 - 1252, 1998.
- 6) Bergelson JM, Krithivas A, Celi L, Droguett G, Horwitz MS, Wickham T, Crowell RL and Finberg RW: The murine CAR homolog is a receptor for coxsackie B viruses and adenoviruses. *J Virol* 72: 415 - 419, 1998.
- 7) Tomko RP, Xu R and Philipson L: HCAR and MCAR: The human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 3352 - 3356, 1997.
- 8) Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett G, Kurt-Jones EA, Krithivas A, Hong JS, Horwitz MS, Crowell RL and Finberg RW: Isolation of a common receptor for coxsackie B virus and adenovirus 2 and 5. *Science* 275: 1320 - 1323, 1997.
- 9) Honda T, Saitoh H, Masuko M, Katagiri-Abe T, Tominaga K, Kozakai I, Kobayashi K, Kumanishi T, Watanabe YG, Odani S and Kuwano R: The coxsackievirus-adenovirus receptor protein as a cell adhesion molecule in the developing mouse brain. *Molecular Brain Research* 77: 19 - 28, 2000.
- 10) Nasuno A, Toba K, Ozawa T, Hanawa H, Osman Y, Hotta Y, Yoshida K, Saigawa T, Kato K, Kuwano R, Watanabe K and Aizawa Y: Expression of coxsackievirus and adenovirus receptor in neointima of the rat carotid artery. *Cardiovasc Pathol* 13: 79 - 84, 2004.
- 11) Okegawa T, Pong R-C, Li Y, Bergelson JM, Sagalowsky AI and Hsieh J-T: The mechanism of the growth-inhibitory effect of coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) on human bladder cancer: a functional analysis of CAR protein structure. *Cancer Res* 61: 6592 - 6600, 2001.
- 12) Cohen CJ, Shieh JTC, Pickles RJ, Okegawa T, Hsieh J-T and Bergelson JM: The coxsackievirus and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 15191 - 15196, 2001.
- 13) Sierralta J and Mendoza C: PDZ-containing proteins: alternative splicing as a source of function diversity. (Review) *Brain Res Brain Res Rev* 47: 105 - 115, 2004.
- 14) Gonzalez-Mariscal L, Betanzos A and Avila-Flores A: MAGUK proteins: structure and role in the tight junction. *Semin Cell Dev Biol* 11: 315 - 324, 2000.
- 15) Cohen CJ, Gaetz J, Ohman T and Bergelson JM: Multiple regions within the coxsackievirus and adenovirus receptor cytoplasmic domain are required for basolateral sorting. *J Biol Chem* 276: 25392 - 25398, 2001.
- 16) Excoffon KJ, Hruska-Hageman A, Klotz M, Traver GL and Zabner J: A role for the PDZ-binding domain of the coxsackievirus B and adenovirus receptor (CAR) in cell adhesion and

- growth. *J Cell Sci* 117: 4401 - 4409, 2004.
- 17) Sollerbrant K, Raschperger E, Mirza M, Engstrom U, Philipson L, Ljungdahl PO and Pettersson RF: The coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) forms a complex with the PDZ domain - containing protein ligand - of numb protein - X (LNX). *J Biol Chem* 278: 7439 - 7444, 2003.
- 18) Coyne CB, Voelker T, Pichla SL and Bergelson JM: The coxsackievirus and adenovirus receptor interacts with the multi - PDZ domain protein - 1 (MUPP - 1) within the tight junction. *J Biol Chem* 279: 48079 - 48084, 2004.
- 19) Wright MB, Seifert RA and Bowen - Pope DF: Protein - tyrosine phosphatases in the vessel wall: differential expression after acute arterial injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 1189 - 1198, 2000.
- 20) Saras J, Claesson - Welsh L, Heldin CH and Gonez LJ: Cloning and characterization of PTPL1, a protein tyrosine phosphatase with similarities to cytoskeletal - associated proteins. *J Biol Chem* 269: 24082 - 24089, 1994.
- 21) Saras J, Engstrom U, Gonez LJ and Heldin CH: Characterization of the interactions between PDZ domains of the protein - tyrosine phosphatase PTPL1 and the carboxyl - terminal tail of Fas. *J Biol Chem* 272: 20979 - 20981, 1997.
- 22) Marx SO and Marks AR: Bench to bedside: the development of rapamycin and its application to stent restenosis. *Circulation* 104: 852 - 855, 2001.
- 23) Moses JW, Leon MB, Popma JJ, Fitzgerald PJ, Holmes DR, O' Shaughnessy C, Caputo RP, Kereiakes DJ, Williams DO, Teirstein PS, Jaeger JL, Kuntz RE for the SIRIUS Investigators: Sirolimus - eluting stents versus standard stents in patients with stenosis in a native coronary artery. *New Engl J Med* 349: 1315 - 1323, 2003.
- 24) McFadden EP, Stabile E, Regar E, Cheneau E, Ong ATL, Kinnaird T, Suddath WO, Weissman NJ, Torguson R, Kent KM, Pichard AD, Satler LF, Waksman R and Serruys PW: Late thrombosis in drug - eluting coronary stents after discontinuation of antiplatelet therapy. *Lancet* 364: 1519 - 1521, 2004.
- 25) Kereiakes DJ, Choo JK, John J, Young JJ and Broderick TM: Thrombosis and drug - eluting stents: a critical appraisal. *Rev Cardiovasc Med* 5: 9 - 15, 2004.
- 26) Virmani R, Guagliumi G, Farb A, Musumeci G, Grieco N, Motta T, Mihalcsik L, Tespili M, Valsecchi Orazio and Kolodgie FD: Localized hypersensitivity and late coronary thrombosis secondary to a sirolimus - eluting stent - Should we be cautious? *Circulation* 109: 701 - 705, 2004.
- 27) Schunkert H, Harrell L and Palacios IF: Implications of small reference vessel diameter in patients undergoing percutaneous coronary revascularization. *J Am Coll Cardiol* 34: 40 - 48, 1999.
- 28) Costanza MJ, Queral LA, Lilly MP and Finn WR: Hemodynamic outcome of endovascular therapy for TransAtlantic InterSociety Consensus type B femoropopliteal arterial occlusive lesions. *J Vasc Surg* 39: 343 - 350, 2004.

(平成18年1月16日受付)