

経皮的冠動脈形成術後再狭窄病変での
heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor
の血管平滑筋細胞内発現亢進：冠動脈アテレクトミー切除標本
を用いた *in situ* ハイブリダイゼーション法による検討

奈良県立医科大学第1内科学教室

齊藤 精久

ENHANCED EXPRESSION OF HEPARIN-BINDING EPIDERMAL
GROWTH FACTOR-LIKE GROWTH FACTOR OF SMOOTH MUSCLE CELLS
IN THE RESTENOSIS AFTER PERCUTANEOUS TRANSLUMINAL
CORONARY ANGIOPLASTY : *IN SITU* HYBRIDIZATION STUDY OF
RESECTED SPECIMENS OBTAINED BY DIRECTIONAL
CORONARY ATHERECTOMY

KIYOHISA SAITO

First Department of Internal Medicine, Nara Medical University

Received November 12, 1997

Abstract : Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor (HB-EGF) is one of the growth factors for vascular smooth muscle cells (SMC) and is implicated in the pathogenesis of human atherosclerosis. But there is no report for the role of HB-EGF in the restenosis of human coronary arteries after percutaneous transluminal coronary angioplasty (PTCA).

To elucidate the role of HB-EGF in restenosis after PTCA using *in situ* hybridization in specimens obtained by directional coronary atherectomy (DCA), the expression of HB-EGF mRNA in both restenosis and *de novo* stenotic lesions were investigated.

Histological findings and the expression of HB-EGF mRNA in 17 patients with coronary stenotic lesions were examined : 7 with restenosis lesions after PTCA (the restenosis group) and 10 with primary lesions (the *de novo* group). The intimal lesions were classified into atherosclerotic plaques and intimal proliferation, and the area of each component were measured.

There were no significant differences between the two groups with regard to age, gender, number of diseased vessels, target lesion of DCA, coronary risk factor, or prevalence of each intimal lesion. Percent area of intimal proliferation in the restenosis group was significantly greater than that in the *de novo* group ($66 \pm 22\%$ vs. $21 \pm 27\%$, $p < 0.05$). As for *in situ* hybridization, expression of HB-EGF mRNA was detected in the cytoplasm of SMC in lesions showing intimal proliferation. Prevalence of HB-EGF mRNA expression in the restenosis group was significantly greater than that in the *de novo* group (71% vs.

10%, $p < 0.05$). In the restenosis group all patients, in whom HB-EGF mRNA expression was detected, underwent DCA less than 6 months after angioplasty.

These data suggest that HB-EGF might play an important role in the progression of restenosis after PTCA through intimal proliferation and changes of SMC phenotype.

Index Terms

angioplasty (percutaneous transluminal coronary), atherectomy (directional coronary), gene expression, growth factors, restenosis

はじめに

経皮的冠動脈形成術(PTCA)は、虚血性心疾患の治療法として確立されてからすでに20年が経過しており、新たな手技の開発や器具の改良によって初期成功率が著しく改善している。しかし、このPTCAは、25~50%という高い再狭窄率¹⁻⁴⁾に問題を残している。したがって、PTCAの治療成績を向上させるには、再狭窄の原因解明とその防止策の確立が急務といえよう。一方、経皮的冠動脈アテレクトミー(DCA)は、1988年にSimpsonら⁵⁾によって考案された冠動脈狭窄性病変を直接切除する術式である⁵⁻⁷⁾。DCAは、治療法としての有用性だけでなく、切除された組織材料を病理診断や生化学的および細胞生物学的研究に供与できるという利点を有している^{8,9)}。

近年になって発見された成長因子のひとつである heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor (HB-EGF)¹⁰⁾は、ヒト冠動脈では血管平滑筋細胞(SMC)、マクロファージ(Mφ)、および血管内皮細胞に発現し¹¹⁾、*in vitro*ではSMCに対してplatelet-derived growth factor(PDGF)と同等の強い増殖促進作用を示すことが報告されている^{10,12)}。しかし、HB-EGFがPTCA後再狭窄部でのSMC増殖に関与しているか否かについてはいまだ明らかにされていない。そこで今回著者は、DCAで得られた検体を用いて冠動脈狭窄性病変部でのHB-EGFの発現を*in situ* hybridization法で検出し、HB-EGFとPTCA後再狭窄との関連について検討したので報告する。

対象と方法

1. 対象

対象は、1995年6月から1997年5月までに当科でDCAに成功した23症例のうち、acute coronary syndromeの6例を除いたPTCA後再狭窄群(Restenosis group)7例(男性7例、平均年齢 57 ± 11 歳)、および新規

病変群(De novo group)10例(男性9例、女性1例、平均年齢 57 ± 10 歳)である。

DCAは、Simpson Coronary Atherocath™(DVI社製、USA)を用いて実施した。

インフォームド・コンセントは、DCA手技および本研究の主旨について説明し、対象の全例から得た。

2. 方法

(1) 患者背景

患者背景は、年齢、性別、罹患枝数、DCAの対象血管、冠動脈疾患危険因子、PTCAからDCA施行までの期間、およびDCA施行までの狭心症罹病期間について検討した。

(2) 組織標本作製

DCAで採取された組織標本は、直ちに滅菌操作下で処理した。標本を4%パラホルムアルデヒド/生理食塩水含有リン酸緩衝液(PFA/PBS、和光純薬社製)に4℃で一晩、浸漬固定した後、0.02% diethylpyrocarbonate(和光純薬社製)を含む30%蔗糖(和光純薬社製)に浸漬した後、OCTコンパウンド(Tissue Tek™, Miles社製、USA)に包埋し、検索時まで-80℃で保存した。

Cryostat™(Miles社製、USA)で6μmの厚さの切片を作製し、シラン処理スライドガラス上に載せて乾燥固定した。

(3) 光学顕微鏡的観察

乾燥固定した組織標本をヘマトキシリン-エオジン(H-E)染色し、光学顕微鏡で観察した。切除標本の病理像はWallerら⁹⁾の分類に準じ、細胞成分に乏しい線維性結合織、石灰化、cholesterol cleft、およびnecrotic coreから構成される粥状硬化性プラーク病変(atherosclerotic plaque)と、線維成分が乏しく浮腫状の疎性結合織に星状あるいは紡錘状のSMCが認められる内膜増殖病変(intimal proliferation)の2型に組織学的に分類した(Fig. 1)。切除標本に占める粥状硬化性プラーク病変あるいは内膜増殖病変の面積は、Color image processor (SPICCA-II、日本アビオニクス社)を用いて定量的に測

定した。

(4) SMC および M ϕ の同定

抗ヒト α アクチン抗体(HHF 35, Dako Japan 社製) および抗ヒト M ϕ 抗体(HAM 56, Dako Japan 社製)を用いた免疫組織化学染色(LSAB 2 Kit/HRP, Dako Japan 社製)を施行し, 切除標本での SMC および M ϕ を同定した。

(5) *In situ* hybridization 法

1) HB-EGF cDNA 挿入プラスミドの作製

480 bp(nucleotide 550-1029)¹³⁾の HB-EGF cDNA を reverse transcription polymerase chain reaction 法で増幅した。この cDNA は, 制限酵素の Sac I (Takara Japan 社製) および Bql I (Takara Japan 社製)による

切断長からヒト HB-EGF cDNA と確認された。SP 6 と T 7 RNA ポリメラーゼのプロモーターを有する pCR II™プラスミドベクター(Invitrogen 社製, USA) に TA Cloning kit™(Invitrogen 社製, USA)を用いて HB-EGF cDNA を挿入し, さらにそのプラスミドを大腸菌にトランスフォームした。この cDNA 挿入プラスミド DNA をアンピシリン存在下で増幅し, プラスミド自動分離装置(Kurabo PI-100 Σ)で精製した。cDNA プラスミド DNA を制限酵素の Sac I で切断し, DNA 断片の長さから cDNA の挿入方向を確認した。

2) フルオレセイン(FI)標識 HB-EGF cRNA プロープの作製

FI 標識 HB-EGF アンチセンス RNA プロープは, FI Labelling Kit(RNA colour kit™, Amersham Japan 社製)を用い, 制限酵素の Bam H I (Takara Japan 社製)で直鎖にした HB-EGF cDNA 挿入プラスミドベクターを鋳型とし, T 7 RNA ポリメラーゼ(Amersham Japan 社製)を用いた転写反応で作製した。

得られた FI 標識 RNA は, 16%ホルマリン含有 1.2%アガロースゲル電気泳動後, その RNA サイズおよび FI 標識 RNA 濃度をノザンプロット法で確認した。

FI 標識 HB-EGF センス RNA プロープは, 直鎖制限酵素に EcoR V (Takara Japan 社製), RNA ポリメラーゼに SP6(Amersham Japan 社製)を用いた転写反応でアンチセンス RNA プロープと同様に作製した。

3) *In situ* hybridization 染色

In situ hybridization 染色は, FI 標識 HB-EGF RNA プロープを用いた RNA colour kit protocol にしたがった。

まず, FI 標識 cRNA-mRNA ハイブリッドにアルカリフォスファターゼ(ALP)標識抗 FI 抗体を反応させた。ついで, この FI 標識 cRNA-mRNA ハイブリッドを ALP の発色基質である NBT(nitro blue tetrazolium salt)と BCIP(5-bromo-4-chloro-3-indol phosphate, toluidinium salt)溶液で一晩発色反応させて検出した。検鏡後, TE(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)緩衝液で反応を停止させてから, 4% PFA/PBS で固定し, メチルグリーン核染色後に封入して観察した。

(6) 推計学的処理

群間比較は, Mann-Whitney の U 検定および Fisher の直接確率計算法で推計学的処理をした。なお, 本文中の数値は平均±標準偏差で示し, 有意水準は危険率が 5%未満とした。

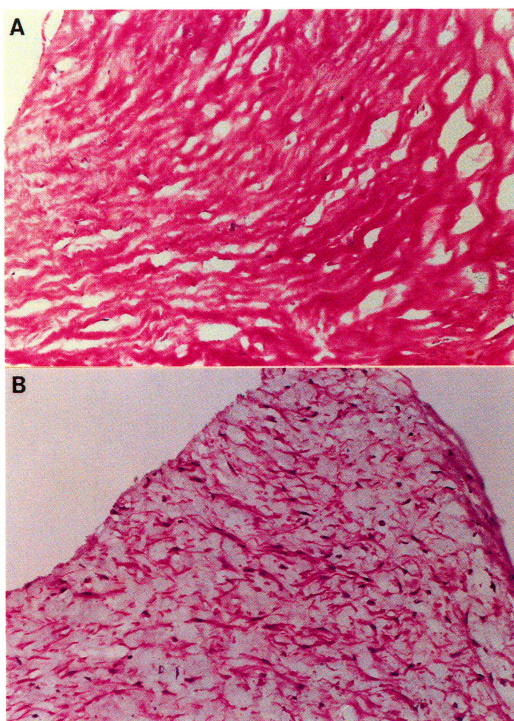


Fig. 1. Classification of intimal tissue obtained by directional coronary atherectomy (Hematoxylin-eosin stain, $\times 100$).

A : Atherosclerotic plaque with fibrous connective tissue and cholesterol cleft.

B : Intimal proliferation with stellate-to-spindle-shaped smooth muscle cells in a loose myxoid stroma.

成 績

1. 患者背景

年齢、性別、罹患枝数、DCAの対象血管、および冠動脈疾患危険因子は、再狭窄群と新規病変群の両群間に差がなかった。また、再狭窄群でのPTCAからDCAまでの期間は4~10(平均6±1)ヵ月、新規病変群でのDCA施行までの狭心症罹病期間は、5~11(平均7±2)ヵ月であった(Table 1)。

なお、DCA前の冠動脈狭窄度は全例で90%以上であ

り、DCA後の残存狭窄度は全例で25%以下であった。

2. 組織学的特徴

再狭窄群では、粥状硬化性プラーク病変である線維性結合織が7例中6例(86%)、石灰化が7例中1例(12%)、cholesterol cleftが7例中4例(57%)、necrotic coreが7例中1例(12%)に認められた。また、内膜増殖病変は7例中6例(86%)で認められた。新規病変群では、線維性結合織が10例中10例(100%)、石灰化が10例中3例(30%)、cholesterol cleftが10例中9例(90%)、necrotic coreが10例中2例(20%)に認められた。

Table 1. Characteristics of 17 patients

Patient No.	Age (yrs)	Gender (M/F)	No. of diseased vessels	Target lesion	Coronary risk factor					Interval period (mos)
					HT	DM	SM	HL	Obesity	
Restenosis group										
1	62	M	3	RCA	-	-	+	-	-	4
2	53	M	1	LCX	-	-	+	-	-	10
3	63	M	2	RCA	+	-	+	+	-	6
4	47	M	1	LAD	-	-	+	-	-	5
5	47	M	2	LAD	-	-	+	-	-	6
6	73	M	1	LAD	-	-	-	-	-	6
7	48	M	1	LAD	+	+	+	+	-	6
Total	57±11	7/0			2/7	1/7	6/7	2/7	0/7	6±1
De novo group										
8	42	M	1	LAD	+	-	+	-	-	7
9	60	M	2	LAD	+	-	+	-	+	7
10	74	F	3	LAD	-	-	-	+	-	10
11	50	M	3	RCA	-	-	+	-	-	8
12	48	M	3	RCA	-	+	+	-	-	7
13	55	M	1	LAD	-	-	+	-	-	5
14	67	M	1	LAD	+	-	+	+	+	11
15	56	M	2	LAD	+	-	+	+	-	7
16	75	M	3	LAD	+	-	+	+	-	7
17	63	M	1	RCA	-	-	-	-	+	6
Total	57±10	9/1			5/10	1/10	8/10	4/10	3/10	7±2
Statistical significance	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	/

LAD; left anterior descending artery, LCX; left circumflex artery, RCA; right coronary artery, HT; hypertension, DM; diabetes mellitus, SM; Smoking, HL; hyperlipidemia.

ns; not significant.

Interval period of patient number 1 to 7 mean the period from prior angioplasty to directional coronary atherectomy.

Interval period of patient number 8 to 17 mean the period of anginal history.

また、内膜増殖病変は10例中7例(70%)で認められた。つまり、各病変の出現頻度は、再狭窄群と新規病変群の両群間に差がなかった。しかし、DCA組織中に占める内膜増殖病変の面積比は、再狭窄群が66±22%、新規病変群が21±27%であり、新規病変群に比して再狭窄群で有意に高率であった(p<0.05)(Table 2)。

3. HB-EGF mRNAの局在

DCA切除標本での内膜増殖病変には、抗ヒトαアクチン抗体(HHF 35)で染色される楕円形あるいは紡錘状に増殖したSMCが認められたが、Mφは認められなかった(Fig. 2)。また、HB-EGF mRNAの発現は、内膜増殖病変でのSMCの細胞質にFl標識HB-EGFアン

チセンスRNAプローブを用いた *in situ* hybridization法で確認された(Fig. 3)。

切除標本でのHB-EGF mRNAの発現率は、再狭窄群が7例中5例(71%)、新規病変群が10例中1例(10%)であり、新規病変群に比して再狭窄群で有意に高率であった(p<0.05)(Table 2)。

なお、PTCAからDCAまでの期間の検討では、HB-EGF mRNAの発現が認められた症例は、全例でPTCA後6ヵ月以内にDCAが実施されていた。また新規病変群についてもHB-EGF mRNAの発現例は、狭心症の罹病期間が5ヵ月の短期であった(Table 1)。

Table 2. Histological findings of patients undergoing directional coronary atherectomy

Patient No.	Atherosclerotic plaque				Percent area of intimal proliferation (%)	Expression of HB-EGF mRNA
	Fibrous connective tissue	Calcification	Cholesterol cleft	Necrotic core		
Restenosis group						
1	+	-	+	-	91	+
2	+	-	+	-	0	-
3	+	+	+	-	38	+
4	-	-	-	+	89	+
5	+	-	-	-	68	+
6	+	-	-	-	42	-
7	+	-	+	-	65	+
Total	6/7	1/7	4/7	1/7	66±22	5/7
De novo group						
8	+	-	+	-	0	-
9	+	-	+	-	28	-
10	+	-	-	-	38	-
11	+	-	+	-	11	-
12	+	+	+	+	16	-
13	+	-	+	+	84	+
14	+	-	+	-	34	-
15	+	+	+	-	0	-
16	+	+	+	-	0	-
17	+	-	+	-	12	-
Total	10/10	3/10	9/10	2/10	21±27	1/10
Statistical significance	ns	ns	ns	ns	p<0.05	p<0.05

HB-EGF ; heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor.

ns ; not significant.

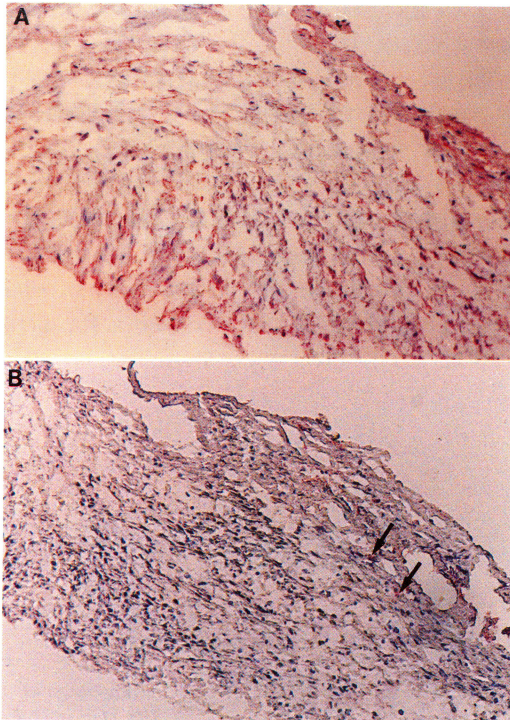


Fig. 2. Immunohistochemical stain in coronary restenosis lesion (48-year-old man, Patient No. 7).

- A : Localization of SMCs detected by HHF 35 ($\times 100$).
Round or spindle-shaped cells were identified as SMCs.
- B : Localization of macrophages detected by HAM 56 ($\times 100$).
Macrophages were observed in fibrous connective tissue (small arrows).
No macrophages were observed in intimal proliferation.

考 察

1. PTCA 後の内膜増殖病変について

PTCA は、1977 年に Gruentzig¹⁴⁾が報告して以来、薬物療法および大動脈冠動脈バイパス術とともに、虚血性心疾患治療法の主軸を成している。しかし、本術式は、再狭窄率が高いという欠点を有している。PTCA 後再狭窄の成因は、冠動脈解離、elastic recoil、血栓形成、冠動脈 remodeling¹⁵⁾、SMC を中心とした新生内膜増殖などの機序が推定されている。その中で、冠動脈解離、elastic recoil、および血栓形成は、急性冠閉塞の原因であり、PTCA 後の早期再狭窄に

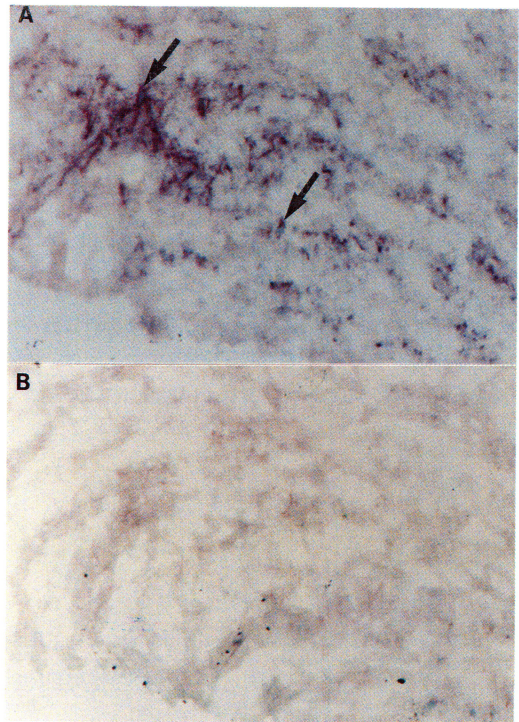


Fig. 3. HB-EGF mRNA expression in coronary restenosis lesion (48-year-old man, Patient No. 7).

- A : HB-EGF mRNA was found in the cytoplasm of SMCs using antisense cRNA probe (large arrows, *In situ* hybridization, $\times 200$).
- B : Negative control using sense cRNA probe in the cosecutive section (*In situ* hybridization, $\times 200$).

関与しているとされる。一方、PTCA 3～6 ヶ月後の再狭窄の原因としては、冠動脈 remodeling と、SMC を中心とした新生内膜増殖が注目されている¹⁶⁻²⁰⁾。今回の検討でも、線維性結合織、石灰化、cholesterol cleft、および necrotic core の出現頻度は、再狭窄群と新規病変群の両群間に差がなかったが、DCA 組織中に占める内膜増殖病変の面積比は、新規病変群に比して再狭窄群で有意に高率であり、内膜増殖病変が PTCA 後再狭窄に重要な役割を果たすと考えられる。

2. SMC の増殖因子について

正常血管では、SMC は高度に分化した収縮型として中膜に存在する。一方、動脈硬化巣や PTCA 後再狭窄部

での SMC は、蛋白合成や細胞外基質の分泌が活発の合成型を呈する²¹⁾。この SMC の収縮型から合成型への形質変換が、SMC の増殖や動脈硬化発症のメカニズムに重要な役割を果たしていると考えられている。SMC の形質変換と増殖に関与する物質には、PDGF などの種々の成長因子やサイトカイン、アンジオテンシン II などの血管作動因子、およびフィブロネクチンなどの細胞外基質が挙げられる²¹⁾。

1991 年に東山ら¹⁰⁾によって発見された HB-EGF は、epidermal growth factor (EGF) ファミリーのひとつであり¹⁰⁾、N 末端にヘパリン親和性の親水性領域、C 末端に EGF 類似領域を有する^{10,22,23)}。HB-EGF は、他の EGF と同様に、EGF レセプターと結合し、チロシンキナーゼを介して線維芽細胞、角質細胞、肝細胞および SMC の増殖を促進する²⁴⁻²⁶⁾。さらに、HB-EGF は、ヒト冠動脈の SMC、Mφ、および血管内皮細胞に分布しており¹¹⁾、PDGF と同等の SMC に対する強い増殖促進作用をもつことも報告されている^{10,12)}。Nakata ら¹¹⁾の剖検例を用いたヒト冠動脈の免疫組織学的検討では、動脈硬化性病変部で、HB-EGF 陽性 SMC は、偏心性内膜肥厚部に高率に認められたが、細胞外基質の増加と細胞成分の減少を伴う高度の動脈硬化性病変ではむしろ減少していたという。しかし、彼らの報告¹¹⁾では、SMC で染色された HB-EGF がどの細胞で産生されたものかについては不明である。今回の著者の成績は、SMC の細胞質内に HB-EGF の mRNA を検出したものであり、SMC 自身が HB-EGF を産生し、その産生された HB-EGF が SMC の自己増殖因子として作用していることを推測させる。

相川ら²⁷⁾は、剖検心および PTCA 後の DCA 標本を用い、内膜増殖病変での平滑筋ミオシン重鎖アイソフォームの発現から SMC の形質変換について検討している。PTCA 後の比較的早期の症例では幼若な SMC に特有なアイソフォームは合成型 SMC に発現するが、PTCA 後 6 ヶ月を境として幼若な SMC に特有なアイソフォームは減少したと報告している。今回の検討では、PTCA 後再狭窄部の内膜増殖病変での SMC に HB-EGF mRNA が高率に発現しており、しかも HB-EGF mRNA の発現を示した再狭窄症例は全例が PTCA 後 6 ヶ月以内の症例であった。したがって、相川らの報告と考え合わせると、HB-EGF は、PTCA 後の SMC の自己増殖因子であるのみならず形質変換にも強く関与しているものと考えたい。

また、再狭窄群で HB-EGF mRNA の発現を示さなかった症例は、PTCA から DCA 施行までの期間が長く、Zempo & Clowes²⁸⁾のバルーン傷害モデルを用いた動物

実験の成績が示すように疎性結合織の一部が線維性結合織に置換した可能性もある。さらに、新規病変群で HB-EGF mRNA の発現を示した症例は内膜増殖病変の占める面積比が高率の狭心症発症 5 ヶ月以内の症例であり、HB-EGF は PTCA 後再狭窄部のみならず冠動脈硬化病変の内膜増殖病変にも関与しているものと考えられる。

結 論

PTCA 後再狭窄部には、内膜増殖病変の占める面積比が高率であり、内膜増殖病変が、PTCA 後再狭窄部に重要な役割を果たすと考えられる。さらに、HB-EGF mRNA が PTCA 後再狭窄部の内膜増殖病変の SMC に高率に発現していたことから、HB-EGF は、SMC の自己増殖因子であり、PTCA 後再狭窄に重要な役割を果たすことが示唆される。

本論文の要旨は、第 44 回日本心臓病学会学術集会 (1996 年、東京)において発表した。

稿を終えるにあたり、ご指導、ご校閲を賜りました土肥和紘教授に深甚なる謝意を捧げるとともに、ご校閲、ご助言を賜りました第 2 病理学教室日浅義雄教授ならびに公衆衛生学教室米増國雄教授に深謝いたします。さらに直接のご指導、ご教示を賜りました椎木英夫講師ならびに公衆衛生学教室土肥祥子助教授に感謝いたします。また終始ご協力頂きました第 1 内科学教室循環器グループの諸先生方に感謝いたします。

文 献

- 1) Hirshfeld, Jr. J. W., Schwartz, J. S., Jugo, R., Macdonald, R. G., Goldberg, S., Savage, M. P., Bass, T. A., Vetrovec, G., Cowley, M., Taussig, A. S., Whitworth, H. B., Margolis, J. R., Hill, J. A., Pepine, C. J. and The M-Heart Investigators: Restenosis after coronary angioplasty: A multivariate statistical model to relate lesion and procedure variables to restenosis. *J. Am. Coll. Cardiol.* 18: 647, 1991.
- 2) Serruys, P. W., Luijten, H. E., Beatt, K. J., Geuskens, R., De Feyter, P. J., Van Den Brand, M., Reiber, J. H. C., Ten Katen, H. J., Van Es, G. A. and Hugenholtz, P. G.: Incidence of restenosis after successful coronary angioplasty: A time-related phenomenon: A quantitative angiographic study in 342 consecutive patients at 1, 2,

- 3, and 4 months. *Circulation* 77 : 361, 1988.
- 3) **Nobuyoshi, M., Kimura, T., Nosaka, H., Mioka, S., Ueno, K., Yokoi, H., Hamasaki, N., Horiuchi, H. and Ohishi, H.** : Restenosis after successful percutaneous transluminal coronary angioplasty : Serial angiographic follow-up of 229 patients. *J. Am. Coll. Cardiol.* 12 : 616, 1988.
 - 4) **Roubin, G. S., King III, S. B. and Douglas, Jr. J. S.** : Restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty : The Emory University Hospital experience. *Am. J. Cardiol.* 60 : 39 B, 1987.
 - 5) **Simpson, J. B., Selmon, M. R., Robertson, G. C., Cipriano, P. R., Hayden, W. G., Johnson, D. E. and Fogarty, T. J.** : Transluminal atherectomy for occlusive peripheral vascular disease. *Am. J. Cardiol.* 61 : 96 G, 1988.
 - 6) **Simpson, J. B.** : *in* Acute Coronary Care in the Thrombolytic Era (Califf, R. M., Mark, D. B. and Wagner, G. S. eds.). 1st ed., Year Book Medical Publishers, Chicago, p 392, 1988.
 - 7) **Hinohara, T., Selmon, M. R., Robertson, G. C., Braden, L. and Simpson, J. S.** : Directional atherectomy : New approaches for treatment of obstructive coronary and peripheral vascular disease. *Circulation* 81 (suppl IV) : 79, 1990.
 - 8) **Schnitt, S. J., Safian, R. D., Kuntz, R. E., Schmidt, D. A. and Baim, D. S.** : Histologic findings in specimens obtained by percutaneous directional coronary atherectomy. *Hum. Pathol.* 23 : 415, 1992.
 - 9) **Waller, B. F., Johnson, D. E., Schnitt, S. J., Pinkerton, C. A., Simpson, J. B. and Baim, D. S.** : Histological analysis of directional coronary atherectomy samples : A review of findings and their clinical relevance. *Am. J. Cardiol.* 72 : 80 E, 1993.
 - 10) **Higashiyama, S., Abraham, J. A., Miller, J., Fiddes, J. C. and Klagsbrun, M.** : A heparin-binding growth factor secreted by macrophage-like cells that is related to EGF. *Science* 251 : 936, 1991.
 - 11) **Nakata, A., Miyagawa, J., Yamashita, S., Nishida, M., Tamura, R., Yamamori, K., Nakamura, T., Nozaki, S., Kameda-Takemura, K., Kawata, S., Taniguchi, N., Higashiyama, S. and Matsuzawa Y.** : Localization of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in human coronary arteries : Possible roles of HB-EGF in the formation of coronary atherosclerosis. *Circulation* 94 : 2778, 1996.
 - 12) **Higashiyama, S., Abraham, J. A. and Klagsbrun, M.** : Heparin-binding EGF-like growth factor stimulation of smooth muscle cell migration : Dependence on interactions with cell surface heparan sulfate. *J. Cell. Biol.* 122 : 933, 1993.
 - 13) **Fen, Z., Dhady, M. S., Yoshizumi, M., Hilkert, R. J., Quertermous, T., Eddy, R. L., Shows, T. B., and Lee M-E.** : Structural organization and chromosomal assignment of gene encoding the human heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor/Diphtheria toxin receptor. *Biochem.* 32 : 7932, 1993.
 - 14) **Gruentzig, A.** : Transluminal dilatation of coronary-artery stenosis. *Lancet* 1 : 263, 1978.
 - 15) **Post, M. J., Borst, C. and Kuntz, R. E.** : The relative importance of arterial remodeling compared with intimal hyperplasia in lumen renarrowing after balloon angioplasty : A study in the normal rabbit and the hypercholesterolemic yucatan micropig. *Circulation* 89 : 2816, 1994.
 - 16) **Austin, G. E., Ratliff, N. B., Hollman, J., Tabei, S. and Phillips, D. F.** : Intimal proliferation of smooth muscle cells as an explanation for recurrent coronary artery stenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *J. Am. Coll. Cardiol.* 6 : 369, 1985.
 - 17) **Fischell, T. A., Grant, G. and Johnson, D. E.** : Determinants of smooth muscle injury during balloon angioplasty. *Circulation* 82 : 2170, 1990.
 - 18) **Gershlick, A. H. and de Bono, D. P.** : Restenosis after angioplasty. *Br. Heart. J.* 64 : 351, 1990.
 - 19) **Garratt, K. N., Edwards, W. D., Kaufmann, U. P., Vliestra, R. E. and Holmes, Jr. D. R.** : Differential histopathology of primary atherosclerotic and restenotic lesions in coronary arteries and saphenous vein bypass grafts : Analysis of tissue obtained from 73 patients by directional atherectomy. *J. Am. Coll. Cardiol.* 17 : 442,

- 1991.
- 20) 癸生川恵一, 堀江俊伸, 住吉徹哉, 孫崎信久, 河口正雄, 谷野俊輔, 細田瑾一, 近藤真弘: アテローム切除術による冠動脈病変の組織学的検討. *J. Cardiol.* **24**: 167, 1994.
- 21) 真鍋一郎・永井良三: 血管平滑筋細胞の形質変換の機構. *実験医学* **13**: 180, 1995.
- 22) Higashiyama, S., Lau, K., Besner, G. E., Abraham, J. A. and Klagsbrun, M.: Structure of heparin-binding EGF-like growth factor: Multiple forms, primary structure, and glycosylation of the mature protein. *J. Biol. Chem.* **267**: 6205, 1992.
- 23) Thompson, S. A., Higashiyama, S., Wood, K., Pollitt, N. S., Damm, D., McEnroe, G., Garrick, B., Ashton, N., Lau, K., Hancock, N., Klagsbrun, M. and Abraham, J. A.: Characterization of sequences within heparin-binding EGF-like growth factor that mediate interaction with heparin. *J. Biol. Chem.* **269**: 2541, 1994.
- 24) Ito, N., Kawata, S., Tamura, S., Kiso, S., Tsushima, H., Damm, D., Abraham, J. A., Higashiyama, S., Taniguchi, N. and Matsuzawa, Y.: Heparin-binding EGF-like growth factor is a potent mitogen for rat hepatocytes. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* **198**: 25, 1994.
- 25) Hashimoto, K., Higashiyama, S., Asada, H., Hashimura, E., Kobayashi, T., Sudo, K., Nakagawa, T., Damm, D., Yoshikawa, K. and Taniguchi, N.: Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor is an autocrine growth factor for human keratocytes. *J. Biol. Chem.* **269**: 20060, 1994.
- 26) Dluz, S. M., Higashiyama, S., Damm, D., Abraham, J. A. and Klagsbrun, M.: Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor expression in cultured fetal human vascular smooth muscle cells: Induction of mRNA levels and secretion of active mitogen. *J. Biol. Chem.* **268**: 18330, 1993.
- 27) 相川真範, 黒尾 誠, 永井良三: 平滑筋ミオシンアイソフォームを用いて血管病変の成因をさぐる. *実験医学* **13**: 186, 1995.
- 28) Zempo, N. and Clowes, A. W.: *in* Long-term results in vascular surgery (Yao, J. S. T. and Pearce W. H., eds.), 1st. ed., Appleton and Lange, Norwalk, p 19, 1992.