

冠危険因子としての 5, 10-メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素遺伝子多型に関する検討

Gene Polymorphism of 5, 10-Methylenetetrahydrofolate Reductase as a Coronary Risk Factor

森田 啓行
 田口 淳一*¹
 栗原 裕基
 北岡 正雄*²
 金田 秀昭*¹
 栗原由紀子
 前村 浩二
 新藤 隆行
 南野 徹
 大野 実*¹
 山沖 和秀
 小笠原 憲*³
 相澤 忠範*³
 鈴木 紳*⁴
 矢崎 義雄

Hiroyuki MORITA, MD
 Jun-ichi TAGUCHI, MD*¹
 Hiroki KURIHARA, MD
 Masao KITAOKA, MD*²
 Hideaki KANEDA, MD*¹
 Yukiko KURIHARA, MD
 Koji MAEMURA, MD
 Takayuki SHINDO, MD
 Tohru MINAMINO, MD
 Minoru OHNO, MD*¹
 Kazuhide YAMAOKI, MD
 Ken OGASAWARA, MD*³
 Tadanori AIZAWA, MD, FJCC*³
 Shin SUZUKI, MD, FJCC*⁴
 Yoshio YAZAKI, MD, FJCC

Abstract

Hyperhomocysteinemia has been identified as a possible risk factor for coronary artery disease. The association of the alanine/valine (A/V) polymorphism of 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR), one of the key enzymes catalyzing re-methylation of homocysteine, with coronary artery disease was examined in 362 Japanese males with a diagnosis of coronary artery disease confirmed with coronary angiography.

The A/V polymorphism was analyzed with PCR followed by Hinf I digestion. The screening of 778 male volunteer controls revealed that the frequency of V allele in Japanese was 0.33, comparable to that in the French Canadian population. The VV genotype, which correlates with increased plasma homocysteine levels due to reduced activity and increased thermolability of this enzyme, was significantly more frequent in patients with coronary artery disease (15.7%, $n=362$) than in controls (10.2%, $n=778$; $p=0.0067$). The association of the VV genotype with coronary artery disease was further increased in patients with $\geq 99\%$ stenotic lesion ($p=0.0010$). In these patients, the frequency of the VV genotype was significantly higher in patients with triple-vessel disease (26%) than in patients with single- or double-vessel disease (15% and 14%, respectively). The fasting plasma homocysteine levels in VV subjects were higher than those in AV or AA subjects.

The VV genotype of MTHFR associated with increased plasma homocysteine levels may represent an important genetic risk factor for coronary artery disease, especially with the occurrence of myocardial

東京大学医学部 第三内科, *¹第一内科: 〒113 東京都文京区本郷 7-3-1; **榊原記念病院, 東京; *³心臓血管研究所, 東京; *⁴千葉西病院, 千葉

The Third and *¹First Departments of Internal Medicine, Faculty of Medicine, University of Tokyo, Tokyo; *²Sakakibara Heart Institute, Tokyo; *³Cardiovascular Institute Hospital, Tokyo; *⁴Chiba-Nishi Hospital, Chiba

Address for reprints: MORITA H, MD, The Third Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, University of Tokyo, Hongo 7-3-1, Bunkyo-ku, Tokyo 113

Manuscript received December 25, 1996; revised March 12, 1997; accepted March 13, 1997

infarction.

Key Words

Coronary artery disease, Genetics, Risk factor, Homocysteine, 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR)

はじめに

ホモシステインはメチオニン代謝の中間産物として生成される -SH 基を含むアミノ酸である。ホモシステイン尿症は血中ホモシステイン異常高値を呈する稀な常染色体劣性遺伝疾患であるが、眼、骨格、神経症状のみならず、若年性に動脈硬化性、血栓塞栓性病変を発症することが特徴である^{1,2)}。これはホモシステインと動脈硬化、血栓形成との関連を考える上で興味深い。

最近、ホモシステインが動脈硬化性病変、血栓塞栓性病変の独立した危険因子であることが明らかとなってきた^{3,4)}。5, 10-メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素 (5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase: MTHFR) —ホモシステインの再メチル化に関与する酵素—の異常も、血中ホモシステインレベル上昇の原因となる。1991年に基礎活性低下と熱耐性低下をきたす MTHFR 変異が冠動脈疾患と相関を有することが報告された⁵⁾。1995年には Frosst ら⁶⁾は、点突然変異 C⁶⁷⁷→T によるアラニン残基からバリン残基への置換が熱不耐性 MTHFR と関係があることを示した。この変異のホモ型では、他に比べて血漿ホモシステインレベルが有意に高い。これらの知見はこの変異が冠動脈疾患の危険因子の一つの候補である可能性を示唆している。

本研究⁷⁾では、この変異の MTHFR 遺伝子型を健常日本人男性において検討した。そして冠動脈疾患患者と健常者との遺伝子型頻度を比較し、この MTHFR 遺伝子変異が重要な冠動脈疾患の危険因子であることを示した。

対象と方法

1. 対象

対象は 778 人の健常者 (平均年齢 48±10 歳) と 362 人の冠動脈疾患患者 (平均年齢 62±9 歳) で、全てが日本人男性である。被験者には本研究の目的について説明し、同意を得た上で採血を行った。冠動脈疾患患者

Selected abbreviations and acronyms

A=alanine
DNA=deoxyribonucleic acid
MTHFR=5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase
PCR=polymerase chain reaction
V=valine

は心臓カテーテル検査時に少なくとも 1 枝に 50% を超える狭窄を認めるものとした。この調査に入る時点では、202 人が心筋梗塞、20 人は増悪型不安定狭心症、そして 140 人は安定狭心症であった。冠動脈造影所見により、患者を 99% 以上の狭窄病変を有する A 群 ($n=218$, 平均年齢 61±9 歳) と有しない B 群 ($n=144$, 平均年齢 62±9 歳) とに分けた。心筋梗塞の臨床症状をきたした患者は A 群の 86%, B 群では 10% であった。おのおのを更に冠動脈狭窄枝数によって 3 群に分けた。

2. 遺伝子解析

ゲノムデオキシリボ核酸 (deoxyribonucleic acid: DNA) 抽出カラムにより静脈血から DNA 抽出を行い、ポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction: PCR) 法により 198bp の産物を増幅、その PCR 産物を C⁶⁷⁷→T の置換を認識する制限酵素 Hinf I によって処理し遺伝子型の判別を行った⁶⁾。この C⁶⁷⁷→T の置換は MTHFR のアラニン残基からバリン残基への置換をきたすので、2 つの異なるアレルを A (alanine), V (valine) と呼んだ。A アレルから得られた 198bp の PCR 産物は Hinf I によって切断されないが、V アレルから得られた同じ長さの PCR 産物は、Hinf I により 175bp と 23bp の断片に切断される。Hinf I 処理された PCR 産物を 9.6% ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、遺伝子型判別を行った (Fig. 1)。

3. 血漿ホモシステインレベル

冠動脈疾患患者のうち、198 人において冠動脈造影

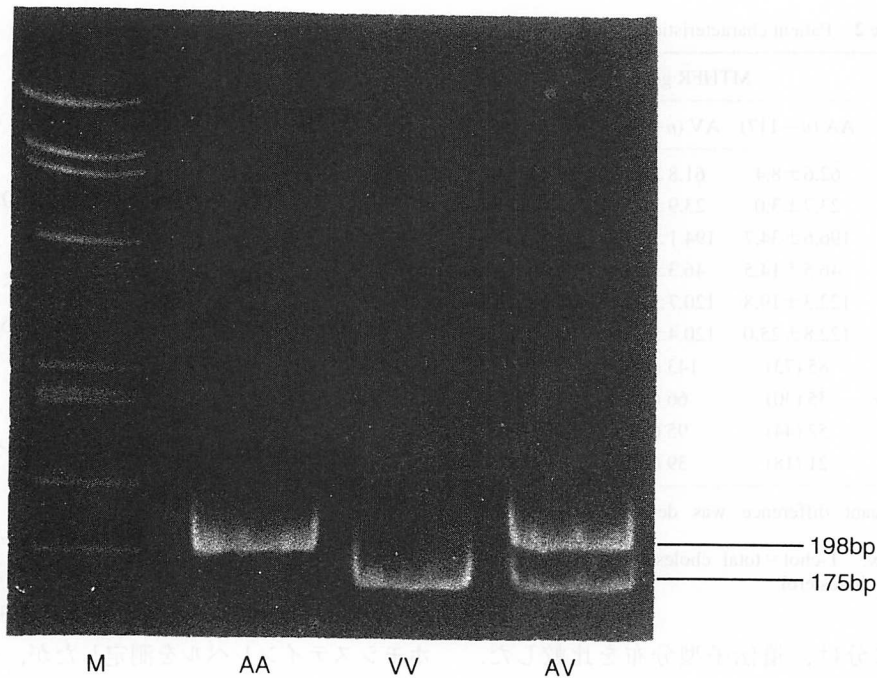


Fig. 1 Representative photograph of gel electrophoresis for three MTHFR genotypes

The 198 and 175bp fragments correspond to the A and V alleles, respectively. M indicates molecular size markers (ϕ X174/Hae III digest).

Table 1 Distribution of MTHFR genotypes in normal subjects and patients with coronary artery disease

MTHFR genotype	Normal Japanese subjects			Japanese patients with CAD (n=362)	Unselected French Canadian population ⁶⁾
	All (n=778)	Age: 26-47yr (n=405)	Age: 48-86yr (n=373)		
AA, n (%)	338 (43.4)	178 (44.0)	160 (42.9)	117 (32.3)	(37)
AV, n (%)	361 (46.4)	187 (46.2)	174 (46.6)	188 (51.9)	(51)
VV, n (%)	79 (10.2)	40 (9.9)	39 (10.5)	57 (15.7)	(12)
A/V	0.67/0.33	0.67/0.33	0.66/0.34	0.58/0.42	0.62/0.38

CAD=coronary artery disease; A/V=allele frequencies.

時に血漿ホモシステインレベルを測定した。検査当日の早朝空腹時に静脈採血、血漿ホモシステイン濃度は高速液体クロマトグラフィー (high-performance liquid chromatography: HPLC) 法を用い、総ホモシステイン量として評価した⁸⁾。

4. 統計解析

量的データは平均±標準偏差 (SD) にて表記し、その解析には Mann-Whitney 検定を、また質的データの解析には χ^2 検定を用いた。有意水準は $p < 0.05$ とした。

結 果

1. 健常日本人男性における MTHFR 遺伝子型分布
最初に日本人男性における MTHFR 遺伝子型について検討した。Frosst ら⁶⁾ が報告したように、アラニン残基からバリン残基への変異に関する 3 つの MTHFR 遺伝子型 (AA, AV, VV) が、198bp PCR 産物の Hinf I 処理により判別された。778 人の健常日本人男性を調べると、3 つの遺伝子型分布は AA 43.4%, AV 46.4%, VV 10.2%, V アレルの頻度は 0.33 であった (Table 1)。この分布は Hardy-Weinberg 律にのっとっていた。年齢による MTHFR 遺伝子型分布の偏りを調べるために、年

Table 2 Patient characteristics

	MTHFR genotypes		
	AA (n=117)	AV (n=188)	VV (n=57)
Age (yr)	62.6±8.4	61.8±9.4	59.4±8.0
BMI (kg/m ²)	23.7±3.0	23.9±2.7	23.6±1.8
T-chol (mg/dl)	196.6±34.7	194.1±29.8	199.5±32.6
HDL-chol (mg/dl)	46.5±14.5	46.3±13.9	45.4±12.6
ApoA1 (mg/dl)	122.3±19.8	120.7±24.1	125.9±21.8
ApoB (mg/dl)	122.8±25.0	120.4±21.7	125.7±23.6
Smokers, n (%)	85 (73)	143 (76)	38 (67)
Diabetes mellitus, n (%)	35 (30)	66 (35)	17 (30)
Hypertension, n (%)	52 (44)	95 (51)	28 (49)
Hyperuricemia, n (%)	21 (18)	39 (21)	10 (18)

No statistically significant difference was detected between the MTHFR genotypes.

BMI=body mass index; T-chol=total cholesterol; HDL-chol=high-density lipoprotein cholesterol.

齢によって2群に分け、遺伝子型分布を比較した。Table 1に示したように、MTHFR遺伝子型分布は2群間でほぼ同じで、ともにHardy-Weinberg律にのっとっていた。少なくとも40歳代前後で、特定のMTHFR遺伝子型に関しての明らかな淘汰はないようであった。この778人の健常者グループを対照群とした。

2. MTHFRのVV遺伝子型と冠動脈疾患との相関

冠動脈疾患患者のMTHFR遺伝子型分布を調べた。362人のうち、AA遺伝子型は32.3%、AV遺伝子型は51.9%、VV遺伝子型は15.7%、Vアレルの頻度は0.42であった(Table 1)。VV遺伝子型は健常者に比して有意に高頻度であった($p=0.0067$)。Table 2に362人の患者の3つの遺伝子型群の特徴を示したが、各群間に相違は認められなかった。VV遺伝子型と冠動脈疾患との相関について、病変の重症度の観点からも検討した。Table 3に示したとおり、A群(99%以上の狭窄病変を有する)においてはVV遺伝子型と冠動脈疾患との相関はより強くなる($p=0.0010$)一方で、B群(99%未満の狭窄病変を有する)においてはVV遺伝子型と冠動脈疾患との有意な相関は認められなかった。更にA,B各群でVV遺伝子型と冠動脈狭窄枝数の相関を調べた。A群でVV遺伝子型の頻度は一、二、三枝病変患者で、それぞれ15%、14%、26%であった。三枝病変患者におけるVV遺伝子型の頻度は、一、二枝病変に比して有意に高かった($p=0.031$)。B群ではVV遺伝子型と冠動脈狭窄枝数とに相関を認め

なかった。

3. MTHFR遺伝子型と血漿ホモシステインレベルとの相関

362人の冠動脈疾患患者のうち、198人において血漿ホモシステインレベルを測定した。VV遺伝子型の患者はAA・AV遺伝子型の患者に比べ有意に血漿ホモシステインレベルが高かった($16.4 \pm 6.2 \mu\text{mol/l}$, $n=29$ vs $14.5 \pm 3.6 \mu\text{mol/l}$, $n=169$; $p=0.021$)。

4. 虚血性心疾患と血漿ホモシステインレベル

冠動脈疾患患者198人の血漿ホモシステインレベルは平均 $14.8 \pm 4.1 \mu\text{mol/l}$ 、その分布は $6.8\text{--}38.8 \mu\text{mol/l}$ であった。198人中50人(25.3%)が基準値($\sim 16.9 \mu\text{mol/l}$)を逸脱していた。対照群では34人につき血漿ホモシステインレベルを測定したが、その分布は $8.5\text{--}16.9 \mu\text{mol/l}$ と正常範囲にあり、平均は $12.6 \pm 2.1 \mu\text{mol/l}$ で、患者群に比して有意に($p=0.002$)低値であった。

考 案

Frosstら⁶⁾によって報告されたMTHFRの変異が、日本人でもよくみられること、更にこの変異が有意に冠動脈疾患と相関していることが明らかとなった。特にこの変異の頻度は狭窄病変の重症度(99%以上の狭窄の存在)および冠動脈狭窄枝数と相関があり、この変異と冠動脈病変の重症度や心筋梗塞発症との密接な関連が示唆される。

日本人(モンゴロイド)におけるこの変異アレル(Vアレルと呼んだ)頻度は0.33であり、Frosstら⁶⁾によって報告されたフランス系カナダ人(コーカシアン)における頻度(0.38)とほぼ等しく、またその頻度分布もHardy-Weinberg律にのっとっている。この変異が人種を超えて広くみられること、人類の長い歴史を超えて自然淘汰を逃れ、バランスのとれた多型を保っていることを物語っている。

本研究ではこの変異のホモ遺伝子型(VV遺伝子型)と冠動脈疾患との相関を示した。この遺伝子型と冠動脈疾患の重症度とは更に強い相関を示す。

“Conventional coronary risk factor”は各遺伝子型群間で差異を認めず、VV遺伝子型と冠動脈疾患との相関は他の危険因子と独立しているようである。加えて

Table 3 Distribution of MTHFR genotypes in patients with or without $\geq 99\%$ stenosis and different numbers of stenotic coronary arteries

MTHFR genotype	Control (n=778)	Group A (n=218)				Group B (n=144)			
		All	1-VD	2-VD	3-VD	All	1-VD	2-VD	3-VD
AA, n (%)	338 (43)	62 (28)	25 (29)	17 (29)	20 (28)	55 (38)	26 (36)	17 (47)	12 (34)
AV, n (%)	361 (46)	116 (53)	49 (56)	34 (58)	33 (46)	72 (50)	40 (55)	13 (36)	19 (54)
VV, n (%)	79 (10)	40 (18)	13 (15)	8 (14)	19 (26)	17 (12)	7 (10)	6 (17)	4 (11)

Groups A and B include patients with and without $\geq 99\%$ stenosis, respectively.
1-VD=single-vessel disease; 2-VD=double-vessel disease; 3-VD=triple-vessel disease.

VV 遺伝子型においては血漿ホモシステインレベルは AA あるいは AV 遺伝子型に比して有意に高値を呈する。その差異は小さいが、従来の研究でもメチオニン経口負荷後の血漿ホモシステインレベルが、この変異の影響を強く受けることは示されている⁶⁾。この結果は MTHFR の VV 遺伝子型が、血漿ホモシステインレベル高値と関連して、冠動脈疾患の独立した遺伝的な危険因子たりうる可能性を強く示唆している。確かに VV 遺伝子型であっても、血漿ホモシステインが正常範囲内にあるものも多いし、発症に至らないものも多い。VV 遺伝子型では他の環境要因(ビタミン、葉酸摂取など)の影響を受けやすくなるという可能性は考えられ、事実その報告もみられる⁹⁾。

Wilcken らの報告¹⁰⁾ではオーストラリア在住の白人を対象に MTHFR の A/V 多型と冠動脈疾患との相関について同様の検討を行ったところ有意な相関はなかったと結論付けられている。我々の検討では日本人男性のみを対象にしており、人種の差が結果を異なったものにしていても考えられる。また、そもそも女性では閉経を機に血漿ホモシステイン濃度が上昇することが知られており、男女の多型比率は同様であったとの記述はあるものの、閉経前後の女性をも対象に含めて議論しており、これが少なからず影響を与えているという可能性はある。加えて、栄養状態などの環境要因の相違やそれに対する susceptibility の相違が遺伝子多型と疾病発症との関係に影響を及ぼしていると考えられ、これらに関しては今後の更なる検討が必要であろう。

疫学的研究に加えて、実験データによっても、血漿ホモシステインレベル高値が動脈硬化性、血栓性病変の原因となることが示されている。Harker ら¹¹⁾はヒヒへのホモシステイン注入により、急性期には血管内皮

のまだらな落屑、慢性期には平滑筋細胞増殖に伴う内膜新生が起り、これは抗血小板薬により拮抗されることを報告している。ホモシステインが動脈硬化をきたすメカニズムはいまだ解明されていないが、*in vitro* 研究により、幾つかの可能性が示されている。ホモシステインは培養内皮細胞に対して直接毒性を有するが、この作用はカタラーゼにより抑制される¹²⁻¹⁴⁾。最近、Tsai ら^{15,16)}はホモシステインが内皮細胞増殖を抑える一方で、cyclin D1 および A の発現を促進し、血管平滑筋細胞増殖を刺激することを報告した。また、ホモシステインは Factor V 活性を増強¹⁷⁾、thrombomodulin 表面発現を抑制¹⁸⁾、プロテイン C 活性を抑制¹⁹⁾、組織型プラスミノゲン活性化因子結合を抑制²⁰⁾、内皮での抗凝固 heparan 硫酸発現を抑制する²¹⁾。一方、ホモシステインは血小板で thromboxane A2 (TXA2) 生成を増強する²²⁾。このようにホモシステインは、血管細胞増殖制御と血管壁での凝固活性促進により、動脈硬化性、血栓性の病変に関与すると考えられる。

最近、幾つかの研究により、血中葉酸、ビタミン B6, B12 レベルが血漿ホモシステインレベルと負相関を有するということが^{23,24)}、これらの摂取増加は冠動脈疾患患者の血漿ホモシステインレベルを減少させること²⁵⁻²⁷⁾が示されている。血漿ホモシステインレベルをビタミン投与によって下げることが冠動脈疾患の危険をどの程度軽減するかについては、いまだ確立された結論が得られていない。この治療の有効性が遺伝子型に依拠するものであるとするならば、臨床の場で治療の選択を行う際に、この遺伝子型同定は大いに貢献するものと考えられる。今回我々が報告した MTHFR 遺伝子型と虚血性心疾患との関連が、今後の臨床介入研究の一助となることが期待される。

要 約

疫学的検討により、高ホモシステイン血症が冠動脈疾患の危険因子であることが明らかとなってきた。そこで我々は、ホモシステインの再メチル化に関わる酵素の一つである5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素 (MTHFR) のアラニン/バリリン (A/V) 多型と冠動脈疾患との相関について、日本人男性を対象に検討した。

対象患者 362 人全ての診断は冠動脈造影検査によって確認し、その A/V 多型はゲノム DNA を PCR 法にて増幅後、制限酵素 Hinf I 処理することにより判別解析した。

778 人の男性対照群の検討により、日本人における V アレル頻度が 0.33 であることが明らかとなったが、これは以前にフランス系カナダ人で報告のあった V アレル頻度にほぼ等しい。VV 遺伝子型は、この酵素の活性低下と熱耐性低下により、血漿ホモシステインレベル上昇を招来するが、この VV 遺伝子型は、対照群 (10.2%, $n=778$) に比べ、冠動脈疾患患者群 (15.7%, $n=362$) において有意に高頻度であった ($p=0.0067$)。VV 遺伝子型と冠動脈疾患とのこの相関は、99% 以上の狭窄病変を有する患者群においてより強かった ($p=0.0010$)。更にこの患者群における VV 遺伝子型頻度は、三枝病変患者 (26%) では一枝ないしは二枝病変患者 (それぞれ 15% および 14%) に比べて有意に高かった。また空腹時血漿ホモシステインレベルは、VV 遺伝子型患者では、AA および AV 遺伝子型患者に比べて高値をとることも確認された。

血漿ホモシステインレベル高値と関連のある MTHFR の VV 遺伝子型は、冠動脈疾患、特に心筋梗塞など、重症冠疾患発症に関わる重要な遺伝的危険因子であると考えられる。

J Cardiol 1997; 29: 309-315

文 献

- Boers GH, Smals AG, Trijbels FJ, Fowler B, Bakkeren JA, Schoonderwaldt HC, Kleijer WJ, Kloppenborg PW: Heterozygosity for homocystinuria in premature peripheral and cerebral occlusive arterial disease. *N Engl J Med* 1985; **313**: 709-715
- Mudd SH, Skovby F, Levy HL, Pettigrew KD, Wilcken B, Pyeritz RE, Andria G, Boers GH, Bromberg IL, Cerone R, Fowler B, Grobe H, Schmidt H, Schweitzer L: The natural history of homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency. *Am J Hum Genet* 1985; **37**: 1-31
- McCully KS: Homocysteine and vascular disease. *Nat Med* 1996; **2**: 386-389
- Mayer EL, Jacobsen DW, Robinson K: Homocysteine and coronary atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 1996; **27**: 517-527
- Kang SS, Wong PW, Susmano A, Sora J, Norusis M, Ruggie N: Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase: An inherited risk factor for coronary artery disease. *Am J Hum Genet* 1991; **48**: 536-545
- Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJ, den Heijer M, Kluijtmans LA, van den Heuvel LP, Rozen R: A candidate genetic risk factor for vascular disease: A common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995; **10**: 111-113
- Morita H, Taguchi J, Kurihara H, Kitaoka M, Kaneda H, Kurihara Y, Maemura K, Shindo T, Minamino T, Ohno M, Yamaoki K, Ogasawara K, Aizawa T, Suzuki S, Yazaki Y: Genetic polymorphism of 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) as a risk factor for coronary artery disease. *Circulation* 1997; **95**: 2032-2036
- Araki A, Sako Y: Determination of free and total homocysteine in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr* 1987; **422**: 43-52
- Jacques PF, Bostom AG, Williams RR, Ellison RC, Eckfeldt JH, Rosenberg IH, Selhub J, Rozen R: Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. *Circulation* 1996; **93**: 7-9
- Wilcken DEL, Wang XL, Sim AS, McCredie RM: Distribution in healthy and coronary populations of the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C⁶⁷⁷T mutation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; **16**: 878-882
- Harker LA, Ross R, Slichter SJ, Scott CR: Homocysteine-induced arteriosclerosis: The role of endothelial cell injury and platelet response in its genesis. *J Clin Invest* 1976; **58**: 731-741
- Wall RT, Harlan JM, Harker LA, Striker GE: Homocysteine-induced endothelial cell injury in vitro: A model for the study of vascular injury. *Thromb Res* 1980; **18**: 113-121
- Starkebaum G, Harlan JM: Endothelial cell injury due to copper-catalyzed hydrogen peroxide generation from homocysteine. *J Clin Invest* 1986; **77**: 1370-1376
- Dudman NP, Hicks C, Lynch JF, Wilcken DE, Wang J: Homocysteine thiolactone disposal by human arterial endothelial cells and serum in vitro: *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1991; **11**: 663-670
- Tsai J-C, Perrella MA, Yoshizumi M, Hsieh CM, Haber E, Schlegel R, Lee ME: Promotion of vascular smooth muscle cell

- growth by homocysteine : A link to atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91** : 6369–6373
- 16) Tsai J-C, Wang H, Perrella MA, Yoshizumi M, Sibinga ES, Tan LC, Haber E, Chang TH-T, Schlegel R, Lee ME : Induction of cyclin A gene expression by homocysteine in vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1996; **97** : 146–153
- 17) Rodgers GM, Kane WH : Activation of endogenous factor V by a homocysteine-induced vascular endothelial cell activator. *J Clin Invest* 1986; **77** : 1909–1916
- 18) Lentz SR, Sadler JE : Inhibition of thrombomodulin surface expression and protein C activation by the thrombogenic agent homocysteine. *J Clin Invest* 1991; **88** : 1906–1914
- 19) Rodgers GM, Conn MT : Homocysteine, an atherogenic stimulus, reduces protein C activation by arterial and venous endothelial cells. *Blood* 1990; **75** : 895–901
- 20) Hajjar KA : Homocysteine-induced modulation of tissue plasminogen activator binding to its endothelial cell membrane receptor. *J Clin Invest* 1993; **91** : 2873–2879
- 21) Nishinaga M, Ozawa T, Shimada K : Homocysteine, a thrombogenic agent, suppresses anticoagulant heparan sulfate expression in cultured porcine aortic endothelial cells. *J Clin Invest* 1993; **92** : 1381–1386
- 22) Di Minno G, Davi G, Margaglione M, Cirillo F, Grandone E, Ciabattini G, Catalano I, Strisciuglio P, Andria G, Patrono C, Mancini M : Abnormally high thromboxane biosynthesis in homozygous homocystinuria : Evidence for platelet involvement and probucol-sensitive mechanism. *J Clin Invest* 1993; **92** : 1400–1406
- 23) Wu LL, Wu J, Hunt SC, James BC, Vincent GM, Williams RR, Hopkins PN : Plasma homocyst(e)ine as a risk factor for early familial coronary artery disease. *Clin Chem* 1994; **40** : 552–561
- 24) Pancharuniti N, Lewis CA, Sauberlich HE, Perkins LL, Go RC, Alvarez JO, Macaluso M, Acton RT, Copeland RB, Cousins AL, Gore TB, Cornwell PE, Roseman JM : Plasma homocyst(e)ine, folate, and vitamin B12 concentrations and risk for early-onset coronary artery disease. *Am J Clin Nutr* 1994; **59** : 940–948
- 25) Dudman NP, Wilcken DE, Wang J, Lynch JF, Macey D, Lundberg P : Disordered methionine/homocysteine metabolism in premature vascular disease : Its occurrence, cofactor therapy, and enzymology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1993; **13** : 1253–1260
- 26) Landgren F, Israelsson B, Lindgren A, Hultberg B, Andersson A, Brattstrom L : Plasma homocysteine in acute myocardial infarction : Homocysteine-lowering effect of folic acid. *J Intern Med* 1995; **237** : 381–388
- 27) Naurath HJ, Joosten E, Riezler R, Stabler SP, Allen RH, Lindenbaum J : Effects of vitamin B12, folate, and vitamin B6 supplements in elderly people with normal serum vitamin concentrations. *Lancet* 1995; **346** : 85–89