

冠動脈硬化の成因と治療に関する基礎的研究

《研究の概要》

現在我が国で死因の第2位となった心疾患の中で、虚血性心疾患はその中心的な存在である。虚血性心疾患の原因は、冠状動脈硬化が基盤にあり、その進展により急性心筋梗塞を発症したり、後遺症としての虚血性心不全に陥ったりすることが最大の問題点である。またその治療法としてステント法を含む経皮的冠動脈形成術が広く臨床導入されているが、その最大の弱点は高頻度にみられる再狭窄である。いずれも血管壁構成成分の障害や増殖性変化に基づいて発症するため、これらの機序について分子生物学的・組織化学的・臨床病理学的に究明することは、動脈硬化の発症と進展過程や再狭窄の防止に重要で意義深いことであると考えられる。

血管傷害によって血管平滑筋細胞 (VSMC) や内皮細胞あるいはマクロファージなどの各細胞で活性化される細胞内シグナルによって、核内の転写因子の発現が誘導され、血管のホメオスタシスに関与する多彩な遺伝子が協調して発現変化することが知られており、この過程における転写因子を明らかにすることで、動脈硬化の発症・進展における分子構造を明らかにし得る。本研究では、BTEB2 が SMemb のみならず、動脈硬化病変の形成上重要な役割を持つ Egr-1、iNOS、tissue factor (TF)、vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1)、線溶系の抑制に重要な PAI-1 の発現調節に重要な因子であるか、また BTEB2 が血管病変の治療戦略の標的となり得るかを検討した。BTEB2 は Zn フィンガー型転写因子で、血管では発生過程で発現が減少し、血管傷害後の新生内膜中の VSMC で再発現を認めた。また BTEB2 の発現ベクターは、SMemb の他、TF、VEGF、VEGF 受容体の発現を増し、BTEB2 は VSMC の収縮型から合成型への形質変換の促進因子と考えられ、さらにはプラーク内に集積したマクロファージにも発現し、その活性化にも関与すると考えられた。さらに BTEB2 が傷害血管壁の遺伝子の活性化に関与するか否かについて、BTEB2cDNA を組み込んだ発現ベクターを培養平滑筋細胞にトランスフェクトし、各種遺伝子プロモーターの活性化を検討したところ、BTEB2 の発現ベクターは、SMemb、TF、VEGF および VEGF 受容体の発現を増加させ、また増殖因子 bFGF で発現が誘導され、その過程に MAP キナーゼの活性化や Egr-1 が関与していることが明らかにされた。また BTEB2 の発現ベクターが、他の遺伝子プロモーターの活性も増強させるかを検討し、TF、PAI-1、iNOS2 プロモーター活性を強力に増強させ、VSMC の形質変換やプラークの破綻、血栓形成に関与する転写因子として機能する可能性が示唆された。

次に DCA による切除標本を用いて、血管新生因子である線維芽増殖因子 (FGF2)、血管内皮増殖因子 (VEGF) とその受容体である frms-like tyrosine kinase-1 (Flt-1) の発現と DCA 後再狭窄との関連について、連続 30 例を対象に検討し、DCA 施行時と慢性期の CAG 所見から DCA 施行部位の late loss と FGF2、VEGF、Flt-1 の発現との関連を調べた。FGF2、VEGF はマクロファージや VSMC に認められ、それぞれ全症例の 60%、80% で陽性を呈し、Flt-1 は小血管内皮にもみられ、全症例の 84% で陽性で、VEGF と Flt-1 の両方が発現した

群で late loss が大であったため、DCA 後再狭窄に局所の血管新生因子が関与することを強く示唆した。また再狭窄病変は、血管傷害後に引き起こされる組織増殖と細胞死との複合過程から成り立ち、病変部での VSMC のアポトーシスが生じている。アポトーシスを抑制する Bcl-2 ファミリー蛋白の Bcl-XL とそれを促進する Bax および実行因子であるシステインプロテアーゼの caspase が重要であるが、再狭窄予防戦略として VSMC のアポトーシスを促進させる方法も考えられ、この機序の解明にアポトーシスに関わる制御因子のうちで重要なものを、臨床的に得られた DCA 標本 15 例を用いて免疫組織化学的に検討し、アポトーシス細胞出現率は 13 ± 10 (100 細胞核あたり) で、caspase-3 と Bax はほぼ同一の局在を示し、40~80%の細胞で陽性、Bcl-XL は 40~60%の細胞で陽性であった。Bcl-XL 陽性細胞が 20%以下では、アポトーシス細胞出現率が高く、対照とした若年の冠動脈ではアポトーシス回避機序を有する可能性が考えられた。本検討から、再狭窄病変ではアポトーシス促進因子が多く発現しており、VSMC はアポトーシス準備状態を内在することが示唆された。さらに冠動脈プラークに認められる VSMC やマクロファージ、T リンパ球の混在する複合的炎症病変が PTCA 後の再狭窄形成を促進する可能性があり、細胞学的に活発な病巣では細胞のクロストークからさまざまなサイトカインが放出され、VSMC の形質変換と活発な細胞増殖に加えて基質産生が起こる。核内受容体の一つである peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR- γ) は、糖・脂質代謝や炎症に関与することが報告されており、血管壁でマクロファージ、内皮細胞、VSMC に発現するが、DCA で採取された組織を用いて PPAR- γ の発現を免疫組織学的に検討したところ、DCA 採取組織でのマクロファージや一部の VSMC に発現する部位に多くみられ、マクロファージや T リンパ球などの炎症細胞が存在する部位に多く認められ、炎症との関連が示唆されたが、これが病変促進的に働くのか、抑制的に働くのかは今後の検討課題である。

最後にブタ冠動脈に PTCA 用バルーンで傷害を加え、傷害部を経時的に光顕と電顕で観察し、さらには抗 PKC 抗体や抗 phospho CREB 抗体を用いて免疫組織学的に、ウェスタンブロット法で PKC、CREB 活性を生化学的に検討した。バルーン傷害後、光顕観察でまず外膜の変化が先行し、内膜は 3 日目より増殖が始まり、7 日目から内腔狭小化がみられるようになり、電顕観察では 3 日目から合成型 VSMC の増殖を認め、14 日目からは収縮型へ再び形質変換しはじめることを確認した。PKC 活性や CREB 反応も増殖部 VSMC に一致してみられ、PKC は *in vivo* においても核内に遺伝子発現情報を伝達する key factor であると考えられた。また冠動脈インターベンション後の再狭窄防止に対する薬剤で明らかに有用性が認められるものは現時点ではないが、ステント植え込み術後の細胞増殖に対する抑制効果をブタを用いた *in vitro* の実験で VSMC の増殖抑制効果が報告されている抗血小板薬のシロスタゾールを用いて検討した。シロスタゾールは、ステント植え込み後 28 日の内腔面積を有意に大きく保ち、内膜面積は有意に小さく、初期の血栓形成を抑制して、これからのサイトカインの分泌抑制と VSMC に対する直接的な増殖抑制効果が示唆された。そして、冠動脈ステント後の再狭窄病変の形成について、ブタを用いてコイルステントとチューブステントに分けて 7 種類のステントを植え込み、28 日後にステント植え込み部位の左前下行枝を摘出して、光顕的に形態計測と免疫組織学的検討を加えた。ステント植え込み後の内膜増殖は、コイルステントでは偏心性、チューブステントでは同心性であった。新生内膜面積は、両ステント群で同様であったが、平均血管面積はチューブステントでより大き

く保たれていたため、血管内腔面積はチューブステントで有意に大であった。またストラット周囲を中心に抗 PCNA 抗体陽性細胞がみられ、増殖が持続していることが推測された。再狭窄の抑制には、収縮性リモデリングの関与の少ないステントを用いることが重要と考えられた。

研究者氏名及び所属機関

研究者氏名	所属機関及び地位	分担研究課題
嶽山 陽一	昭和大学藤が丘病院 教授	総括
倉林 正彦	群馬大学医学部 教授	平滑筋の増殖機構の解析
迫村 泰成	東京女子医科大学 准講師	再狭窄に対する臨床病理学的検討
上田 真喜子	大阪市立大学医学部 教授	病理組織学的検討
片桐 敬	昭和大学医学部 教授	実験的再狭窄の免疫組織学的検討

研究報告

平滑筋の増殖機構の解析

群馬大学医学部第二内科
倉林 正彦

1 はじめに

冠動脈のメカニズムとして、内皮細胞が本来もつ、抗炎症機能、抗平滑筋増殖機能、抗収縮機能、抗凝固機能の破綻が重要である。また内皮細胞のみならず、血管平滑筋細胞、外膜細胞などの血管壁細胞および血球細胞は、高血圧や血流によるずり応力をはじめとする血行動態上の変化や、高脂血症、高血糖、低酸素などの血液成分の代謝上の変化が、血管壁細胞を活性化し、動脈硬化を促進させる。従って、血管壁細胞の活性化の分子機構を明らかにすることによって血管疾患の病態生理を理解することができる。血管疾患の発症や進展過程では、各細胞型の細胞において、それぞれの細胞の機能に重要なさまざまな遺伝子の発現が一斉に ON あるいは OFF となる。したがって血管壁細胞の活性化の機構を解析する有効なアプローチは、こうした疾患の進行にともなって発現が変化する遺伝子群で特に血管の病態に重要な遺伝子群の発現を調節する機構を解析することである。とくに様々な機能をもつ遺伝子が協調的に変化することから、遺伝子転写を包括的に調節する転写因子を同定することが重要である。われわれは、本研究により以下の諸点を明らかにした。

2 Znフィンガー型転写因子 BTEB2

動脈硬化や血管傷害時に接着因子、サイトカイン、PDGFなどを含むさまざまな遺伝子の発現が変化する。これらの遺伝子の発現調節に関与する転写因子として AP1 や NFkB が重要であることはよく知られている。しかし、新生内膜に豊富に存在し、平滑筋細胞の脱分化形質への変換に重要な転写因子についての解析はほとんど報告がない。われわれは Znフィンガー型転写因子 BTEB2 につき、以下の点を明らかにした。

1. BTEB2 は血管においては、発生過程において発現が減少し、血管傷害後に形成される新生内膜中の平滑筋細胞に再発現がみられた。
2. BTEB2 の発現ベクターは SMemb の他、組織因子、VEGF、および VEGF 受容体の発現を増加させた。
3. BTEB2 は増殖因子 bFGF によって発現が誘導され、その過程に MAP キナーゼの活性化、早期反応遺伝子 Egr-1 が関与していた。
4. BTEB2 は高脂血症ウサギにおいてマクロファージの集積部位に一致してプラーク内に発現が認められ、マクロファージの活性化においても BTEB2 が関与している可能性がある。

3 ホメオボックス型転写因子 Hex

BTEB2 とは異なるファミリーに属する転写因子 Hex について、われわれはこれまでに以下のことを明らかにした。

1. Hex は BTEB2 と同様に血管傷害後に形成される新生内膜に発現し、培養平滑筋細胞においては増殖因子 bFGF によって発現が増加した。
2. ホメオボックスは一般に、AT-rich 配列に結合する因子であるが、SMemb の活性化には cAMP 反応エレメント (CRE: TGACGTCA) 配列が関与していた。ホメオボックスによる CRE 配列を介する活性化の機構は、これまでに報告はなく、この機構の解明により血管リモデリングのみならず、発生、分化の機序の観点からも新たな知見が得られると期待できる。
3. 平滑筋の分化マーカー遺伝子 (ミオシン重鎖、SM22 α 、 α -アクチン、カルポニン遺伝子) のプロモーターが Hex によって活性化されるか否かをトランスフェクション法によって解析した。その結果、Hex の過剰発現は SM22 α や α -アクチンの発現を増加させた。

4 アンキリン型転写因子 CARP

CARP は従来、心筋細胞に特異的に発現すると考えられていた。われわれは以下の点を明らかにした。

1. CARP が血管平滑筋細胞 (特に新生内膜中の平滑筋細胞) にも発現し、細胞増殖抑制作用を有する TGF β やレチノイン酸によって発現が増加する。
2. CARP のプロモーターのクローニングと解析の結果、CARP は TGF β によって Smad3, Smad4 が活性化され、それらが直接、プロモーターに結合することが明らかとなった。したがって CARP は TGF β によって活性化される細胞内情報伝達系の下流に存在し、細胞増殖の抑制に関与していると考えられる。

5 おわりに

冠動脈硬化において、内皮細胞の機能変化、血管平滑筋細胞の遊走、増殖が重要な役割

を演ずる。増殖因子がそれぞれの受容体に結合し、それに続いて活性化される細胞内情報伝達系については多くの知見が得られている。しかし、活性化された細胞内情報伝達系がいかなる転写因子を介して、血管細胞に特徴的な遺伝子群の発現を調節するのかについては不明な点が多い。特に、サイトカイン刺激により惹起されるスーパーオキシド、脂質過酸化などの活性酸素種が関与する細胞内情報伝達系によって活性化される転写因子については、血管壁においてはこれまで NF κ B、AP-1 などが知られているのみであった。今後、活性酸素による遺伝子の発現変化に上述の因子が関与するかを明らかにするとともに、これらの転写因子により発現が調節される遺伝子の詳細についても解析することにより、冠動脈硬化の分子機構を解明することが可能となるであろう。

文献

1. 倉林正彦、永井良三：血管平滑筋細胞のフェノタイプ変換のメカニズム。細胞工学、秀潤社 18(2), 1999
2. Watanabe N, Kurabayashi M, Shimomura Y, Kawai-Kowase K, Hoshino Y, Manabe I, Watanabe M, Aikawa M, Kuro-o M, Suzuki T, Yazaki Y, Nagai R.: BTEB2, a Kruppel-Like Transcription Factor, Regulates Expression of the Smemb/Non-Muscle Myosin Heavy Chain B (Smemb/NMHC-B) Gene. Circ. Res. 85:182-191, 1999
3. Oyama Y, Kurabayashi M, Akuzawa N, Nagai R.: Troglitazone, aPPAR γ ligand, inhibits osteopontin gene expression in human monocytes/macrophage THP-1 cells. J. Atheroscler Thromb, 7:77-82, 2000
4. Aihara Y, Kurabayashi M, Saito Y, Ohyama Y, Tanaka T, Takeda S, Tomaru K, Sekiguchi K, Arai M, Nakamura T, Nagai R.: Cardiac ankyrin repeat protein is a novel marker of cardiac hypertrophy; Role of M-CAT element within the promoter. Hypertension 36:48-53, 2000
5. Aihara Y, Kurabayashi M, Tanaka T, Takeda S, Tomaru K, Sekiguchi K, Ohyama Y, Nagai R.: Doxorubicin represses CARP gene transcription through the generation of oxidative stress in neonatal rat cardiac myocytes; Possible role of serine/threonine kinase-dependent pathways. J. Mol. Cell. Cardiol. 32:1410-1414, 2000
6. Tanaka T, Kurabayashi M, Kanai H, Sekiguchi K, Aihara Y, Yokoyama T, Arai M, Kanda T, Nagai R.: Induction of VEGF gene transcription by IL-1 β is mediated through stress-activated MAP kinases and Sp1 in cardiac myocytes. J. Mol. Cell. Cardiol. 32:1955-1967, 2000
7. Hoshino Y, Kurabayashi M, Kanda T, Hasegawa A, Sakamoto H, Okamoto E, Kowase K, Watanabe N, Manabe I, Suzuki T, Nakano A, Takase S, Wilcox JN, Nagai R.: Regulated expression of the BTEB2 transcription factor in vascular smooth muscle cells; Analysis of developmental and pathological expression profiles shows implications as a predictive factor for restenosis.

- Circulation 102:2528-2534, 2000
8. Nakajima T, Kurabayashi M, Ohyama Y, Kaneko Y, Furukawa T, Itoh T, Taniguchi Y, Tanaka T, Nakamura Y, Hiraoka M, and Nagai R.: Characterization of S818L Mutation in HERG C-terminus in LQT2 Modification on Activation-Deactivation Gating Properties.
FEBS Letter 481:197-203, 2000
 9. Ogata T, Kurabayashi M, Hoshino Y, Sekiguchi K, Kawai-Kowase K, Ishikawa S, Morishita Nagai R.: Inducible expression of BTEB2, a member of zinc-finger family of transcription factors, in cardiac allograft vascular disease.
Transplantation 70:1653-1656, 2000
 10. Sekiguchi K, Kurabayashi M, Oyama Y, Aihara Y, Tanaka T, Sakamoto H, Hoshino Y, Kanada T, Yokoyama T, Shimomura Y, Iijima H, Ohyama Y, Nagai R.: Homeobox protein Hex induces SMemb/Nonmuscle myosin heavy chain-B gene expression through the cAMP responsive element.
Circ, Res 88:52-58, 2001
 11. Kanai H, Tanaka T, Aihara Y, Takeda S, Kawabata M, Miyazono K, Nagai R, Kurabayashi M.: TGF0b/Smads-signaling induces transcription of the cell-type-restricted ankyrin repeat protein CARP gene through CAGA motif in vascular smooth muscle cells.
Circ. Res. 88:30-36, 2001

再狭窄に対する臨床病理学的検討

東京女子医科大学心臓血圧研究所
迫村 泰成

再狭窄病変形成の重要な要因として新生内膜肥厚が挙げられる。これは、血管形成術ともなう血管壁障害後に引き起こされる組織増殖と細胞死との複合過程から生じると考えられる。増殖過程が亢進しているほど、また細胞死過程が遅延するほど内膜肥厚が高度となり、再狭窄にいたる可能性がある。再狭窄予防を考える上でこれらの機序解明は重要である。こうした過程に関する動物モデルでの検討は多いが、実際のヒト冠動脈病変での検討は少ない。われわれは、冠動脈アテレクトミー (DCA) により採取された検体や、解剖標本を用いて病理組織学的に検討を行った。

増生した冠動脈内膜にはしばしば新生血管が認められており、局所における血管新生因子が血管形成術後の再狭窄形成に関与する可能性が報告されている。平成 10 年度は、冠動脈アテレクトミー (DCA) 切片を用い、血管新生因子である線維芽細胞増殖因子 (FGF2)、血管内皮増殖因子 (VEGF) とその受容体である frms-like tyrosine kinase-1 (Flt-1) の発現と DCA 後再狭窄との関連について検討を行った。DCA を施行し遠隔期に再度冠動脈造影を施行した連続 30 例を対象とした。切除切片は酢酸エタノール固定後酵素処理を行い、

抗 FGF2 抗体、抗 VEGF 抗体、抗 Flt-1 抗体を用いて免疫染色を行った。DCA 施行時と慢性期の冠動脈造影所見から DCA 施行部位の late loss を算出し、FGF2、VEGF、Flt-1 の発現との関連を検討した。FGF2、VEGF、Flt-1 の発現は主に平滑筋細胞に認められ、全症例の 60%、80%、84% で陽性であった。VEGF と Flt-1 の両方が同一部位に発現した群 (n=21) とその他の群 (n=9) では late loss はそれぞれ $33 \pm 29\%$ 、 $12 \pm 16\%$ であり、VEGF と Flt-1 の両方が発現した群において late loss が大であった ($p=0.02$)。FGF2 発現と late loss には関連を認めなかった。DCA においてももとの狭窄病変に VEGF と Flt-1 の両方が発現した場合 late loss が大であり、DCA 後再狭窄に局所の血管新生因子が関与している可能性が示唆された。

上記のような新生血管の多く認められる病変は、平滑筋細胞のみならずマクロファージや T リンパ球などの炎症細胞が混在している。冠動脈プラーク病変に認められる平滑筋細胞やマクロファージ、T リンパ球の混在する複合的炎症病変が、形成術後の再狭窄形成を促進する可能性がある。こうした細胞生物学的に活発な病巣では細胞のクロストークからさまざまなサイトカインが放出され、平滑筋細胞の形質変換が生じ、活発な細胞増殖と基質産生が起こる。Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR γ) は核内受容体のひとつで、糖・脂肪代謝や炎症に関与することが報告されている。血管壁でマクロファージ、内皮細胞、平滑筋細胞に発現し、*in vitro* ではマクロファージでは局所の炎症性サイトカインを抑制する方向にはたらく。そこで平成 12 年度は、DCA により採取された検体での PPAR γ 発現を免疫組織学的に検討した。PPAR γ はマクロファージおよび一部の平滑筋細胞に発現がみられた。PPAR γ 陽性細胞はマクロファージや T リンパ球などの炎症細胞が存在する部位に多く観察され、炎症との関連が示唆された。これまでの培養細胞を用いた実験報告からは PPAR γ の抗炎症因子としての役割が示されているが、PPAR γ がヒト冠動脈プラークで、病変促進的に働くのか、抑制的に働くのかは今後の更なる検討が必要である。

また、再狭窄病変における細胞死に関する検討を平成 11 年度に報告した。動脈硬化病変で平滑筋細胞のアポトーシスが生じていることがすでに明らかにされている。アポトーシスの機序に関してはいまだ不明な点が多いが、Bcl-2 ファミリー蛋白 Bcl-XL がアポトーシスの抑制作用を有すること、その homolog である Bax がアポトーシス促進に働くこと、アポトーシスの実行にシステイン・プロテアーゼ caspase が重要であることが判明している。細胞死の機序解明のために、臨床的に再狭窄病変の平滑筋細胞における細胞死にかかわる制御因子のうち重要なものを 15 例の DCA 検体を用いて免疫組織学的に検討した。再狭窄病変で平滑筋細胞アポトーシスと Bax、Bcl-XL、caspase1 (IL-1beta converting enzyme)、caspase3 (CPP=32) 発現につき検討した。光顕所見を観察し、連続切片を TUNEL 法・免疫染色の二重染色に使用した。アポトーシス細胞の形態学的同定は TUNEL 法・電顕を併用した。また陽性対照として PTCA 後の冠動脈病変の 2 剖検例、陰性対照として病変のない若年者冠動脈 1 剖検例 (14 才) を同様に検討した。TUNEL 法による結果は、再狭窄病変でのアポトーシス細胞出現率は 13 ± 10 (100 細胞核あたり) であった。Caspase3、Bax はほぼ同一の局在を示し、40~80% の細胞に陽性であり、Bcl-XL は 40~60% の細胞に陽性であった。Bcl-XL 陽性細胞が 20% 以下の症例ではアポトーシス細胞出現率が高かった。陽性対象例では、2 例とも陽性であった。一方、若年者例では軽度の生理的内膜肥厚を認めたが、

caspase3、Bax 陽性細胞は少数であり、内膜・中膜の平滑筋細胞の核に Bcl-XL 陽性像が観察された。したがって若年の冠動脈ではアポトーシス回避の機序を保持している可能性が考えられた。アポトーシス制御因子の検討から、再狭窄病変においては促進因子が多く発現しており平滑筋細胞はアポトーシス準備状態を内在していることが示唆された。

文献

1. Yasunari Sakomura, Kenta Uto, Hiromi Mizuno, Jun-ichi Yamaguchi, Masatoshi Kawana, Shigeyuki Aumi, Naoko Ishizuka, Kyomi Yanimoto, Toshinobu Horie, Toru Suzuki: Acceleration of Smooth Muscle Cell Apoptosis in Aortic Dissection. *Circulation* 98(17):I-266, 1998
2. 水野弘美、迫村泰成、石塚尚子、雨宮邦子、青見茂之、小柳 仁、西川俊郎、笠貫 宏：動脈硬化性腹部大動脈瘤における apoptosis とその制御因子に関する検討。
Circ. J. 63(Suppl. 1):290, 1999
3. 山口淳一、迫村泰成、鶴見由起夫、太田吉実、鈴木和仁、河口正雄、川名正敏、笠貫宏：血管新生因子は冠動脈形成術後の再狭窄に関与する—冠動脈アテレクトミー切片を用いた検討—
J. Circ. J. 63(Suppl):183, 1999
4. Sakomura Y, Nagashima H, Aoka Y, Kameyama K, Ogawa M, Aomi S, Koyanagi H, .: An angiotensin-converting enzyme inhibitor, perindopril, but not carvedilol prevents against beta-aminopropionitril monofumarate-induced aortic dissection in rat model.
Circulation 100(Suppl):I-319, 1999
5. Sakomura Y, Nagashima H, Aoka Y, Kameyama K, Ogawa M, Aomi S, Koyanagi H, Nishikawa T, Kasanuki H.: Difference in the susceptibility of vascular smooth muscle cells to apoptosis between abdominal and thoracic aortic aneurysm.
Cardiovascular Pathology (Submitted)
6. Kenta U, Sakomura Y., et al: Angiotensin-converting enzyme inhibitor, but not Angiotensin II receptor blocker, prevents against beta-aminopropionitril monofumarate-induced cystic degeneration in rat model.
Circulation (Submitted)

病理組織学的検討

大阪市立大学医学部
上田 真喜子

ヒト冠動脈ステント後の新生内膜増殖や再狭窄機序について、剖検症例の冠動脈を心筋から剥離し、実体顕微鏡を用いて肉眼的に観察するとともに、ステント後の新生内膜形成過程や再狭窄機序、特に新生毛細血管と平滑筋細胞の遊走・増殖に関する細胞の同定を、各種抗体を用いて検討した。ヒトのステント後再狭窄例では極めて高度の内膜増殖と新生

毛細血管形成に加えて、マクロファージの著明な集積がみられ、再狭窄部の新生内膜における細胞外マトリックスの高度な増殖がみられることを明らかにした。このことから、再狭窄の発現には VSMC の増殖のみならず、細胞外マトリックス成分の増加の両者が関与すると推察された。さらにヒト冠動脈ステント後の再狭窄機序について、新生内膜における新生毛細血管形成と VEGF およびそのレセプター (Flt-1、KDR/Flk-1) の発現を検討したところ、ステント留置後 1 カ月の新生内膜では、マクロファージに VEGF や VEGF レセプターの著明な発現がみられ、同 2 カ月では、極めて高度な新生内膜増殖や新生血管形成とマクロファージの著明な集積を認め、これを中心に VEGF やそのレセプターの発現がみられ、ヒト冠動脈ステント後の新生内膜形成に関与していることが示唆された。また同新生内膜増殖メカニズムにおける血小板血栓形成の関与と意義を明らかにするために、血小板 GP IIb/IIIa や P セレクチン、好中球ミエロパーオキシダーゼ、好中球エラスターゼなどに対する抗体を用いて、血小板血栓の存在と好中球浸潤との相互関連について、免疫組織学的に検索した。ヒトステント後の冠動脈には、GP IIb/IIIa 陽性、P セレクチン陽性の活性化血小板の凝集が高度に認められ、血小板凝集の周囲には多数の好中球浸潤がもたらされることが初めて明らかになった。そして、この血小板凝集の推移と新生内膜形成の相互関係を検討することにより、血小板の活性化と凝集がその後の新生内膜形成の引き金になっていることが強く示唆され、ヒト冠動脈ステント後の早期に GP IIb/IIIa 受容体阻害薬を授与することで、過剰な新生内膜形成を抑制し得る可能性を示唆した。

文献

1. 小松龍士、上田真喜子、小島明子、成子隆彦：ヒト冠動脈におけるステント後の新生内膜増殖と平滑筋細胞の脱分化・再分化。
動脈硬化 25(Suppl):163, 1998
2. 小松龍士、上田真喜子、成子隆彦、竹内一秀、吉川純一：ヒトステント後再狭窄に対する冠動脈形成術 (POBA) 後の病理形態像：免疫組織学的検討。
J. Cardiol. 32(Suppl):236, 1998
3. 小松龍士、上田真喜子：ヒト冠動脈ステント後の新生内膜形成機序と再狭窄機序。
日本臨床電子顕微鏡学会誌 31(Suppl):S71, 1998
4. 小松龍士、上田真喜子：ヒト冠動脈ステント後再狭窄病変における細胞増生と細胞外マトリックスの増加。
日本心血管インターベンション学会誌 13(Suppl II):47, 1999
5. 小松龍士、伊倉義弘、山本隆嗣、大神正幸、松尾俊彦、上田真喜子：ステント再狭窄に対するインターベンション施行後の病理学的変化。
日本病理学会誌 88(Suppl):288, 1999
6. 小松龍士、上田真喜子、成子隆彦、竹内一秀、吉川純一：ヒト冠動脈：ステント後再狭窄機序：細胞増生と細胞外マトリックスの関与。 J. Cardiol. 33(Suppl):236, 1999
7. Komatsu R, Ueda M, Ikura Y, Ogami M, Matsuo T, Gamada T, Becker AE: Expression of platelet glycoprotein Iib/IIIa at sites after stenting and balloon angioplasty in human coronary arteries: Immunohistochemical analysis. Circulation 100(Suppl):I-691, 1999

8. 小松龍士、上田真喜子、坂上祐司、成子隆彦、竹内一秀、吉川純一：ヒト冠動脈におけるステント後および冠動脈形成術後の血小板膜糖蛋白 Iib/IIIa の発現：免疫組織化学的解析。 Jpn Circ. J. 64(Suppl):402, 2000
9. Komatsu R, Ueda M, Ikura Y, Ogami M, Ehara S.: Role of P-selectin-dependent adhesion in neutrophil-platelet interactions in the neointima after stenting in human coronary arteries. Circulation 102:II-733, 2000
10. 小松龍士、上田真喜子、伊倉義弘、大神正幸、松尾俊彦：ヒト冠動脈インターベンション後における血小板 glycoprotein(GP) Iib/IIIa と P-selectin の発現。動脈硬化 28(Suppl):147, 2000
11. 小松龍士、松尾俊彦、上田真喜子：冠動脈疾患診断学「ヒト冠動脈硬化の病理」中外医学社、2000
12. 上田真喜子：ヒト冠動脈 PTCA・ステント後再狭窄と CABG 後新生内膜増殖のメカニズム。脈管学 40(12):951-958, 2000
13. 小松龍士、吉川純一、上田真喜子：冠動脈ステント後の新生内膜形成機序と再狭窄機序。Ischemic Heart Disease(IHD)Frontier 1 巻、No.1、93-97, 2000
14. Chen M, Kakutani M, Naruko T, Ueda M, Narumiya S, Masaki T, Sawamura T.: Activation-dependent surface expression of LOX-1 in human platelets. Biochem Biophys Res Commun 282(1):153-158, 2001
15. Komatsu R, Naruko T, Ueda M.: Neutrophil-platelet interaction in the human coronary arteries after stenting. Jpn Circ. J. 65(Suppl): 1A-301-302, 2001

実験的再狭窄の免疫組織学的検討

昭和大学医学部第三内科
片桐 敬

【目的】 血管平滑筋細胞 (VSMC) の増殖と遊走が PTCA 後の内膜肥厚の原因と考えられている。ブタ冠動脈バルーン傷害後の VSMC の経時的変化を観察し、VSMC 増殖に関するシグナル伝達機構のセカンドメッセンジャーの一つと考えられるプロテインキナーゼ C (PKC) と転写因子の cyclic AMP response element binding protein (CREB) の発現を検討した。

【方法】 ブタ冠動脈左前下行枝をバルーンカテーテルで傷害後、3 日、7 日、14 日、28 日後に傷害部を摘出し光顕、電顕的に経時的変化を観察した。さらに抗 PKC 抗体、抗 phospho CREB 抗体を用いて免疫組織法およびウエスタンブロット法で PKC、CREB 活性の変化を検討した。

【結果】 光顕観察では 3 日目より増殖が始まり、7 日目より内腔の狭小化が認められた。電顕観察では 3 日目より合成型が多数認められた。14 日目以降再び収縮型への形質変換が始まり、28 日では内皮細胞の再生も認められた。PKC 免疫陽性反応は増殖部に一致して認められ、ウエスタンブロット法でも PKC と一致する 80KDa のバンドを増殖部で強く認めた。

抗 phospho CREB 免疫反応は増殖部 VSMC の核に一致して認められた。

【結論】 バルーン傷害後の VSMC 増殖は早期より始まり、その細胞内シグナル伝達機構において PKC は核内に遺伝子発現の情報を伝達する key factor であると in vivo においても考えられた。

【目的】 冠動脈インターベンション後の再狭窄防止に関して、様々な薬剤が開発され臨床的にその効果が検討されているが、現在のところ明らかな有用性の認められるものはない。そこで、ステント植え込み術後の細胞増殖に対する抑制効果を in vitro で血管平滑筋の増殖抑制効果が報告されている抗血小板薬であるシロスタゾールを用いて検討した。

【方法】 虚勢雄性ブタの冠動脈前下行枝にバルーン傷害を加え、その 14 日後に同部位に Palmaz-Schatz ステントを植え込んだ。シロスタゾール群にはシロスタゾールを 30mg/Kg/day を経口投与した。ステント植え込み 28 日後にステント植え込み部位を採取した。冠動脈をステントを含めて薄切し、光顕、電顕観察し、各々内腔、内膜、中膜、外膜、%stenosis を形態計測した。

【結果】 新生内膜増殖が認められ、内腔側に収縮型平滑筋細胞、中膜側に合成型平滑筋細胞が主に認められた。ステントストラット周囲にマクロファージとともに好酸球の浸潤が認められた。シロスタゾール群は対照群と比較し、内腔面積は有意に大きく %stenosis は有意に小さかった。

【結論】 抗血小板薬シロスタゾールは、冠動脈ステント植え込み術後の再狭窄抑制に有効である可能性が示唆された。その機序は、初期の血栓形成を抑制することにより、血栓からの様々なサイトカインの分泌を抑制することと平滑筋に対する直接の増殖抑制効果によると推測された。

【目的】 冠動脈ステント植え込み後の再狭窄病変形成について、7 種類のステントをブタ冠動脈に植え込み、コイルステントとチューブステントに分けてその血管壁増殖様式について組織学的に検討した。

【方法】 虚勢雄ブタを用いて、左冠動脈前下行枝 (LAD) に経皮的冠動脈形成術用バルーン (直径 3.0mm、長さ 20mm、バルーン/血管比=1.2) を用いてバルーン傷害を加えた。14 日後にバルーン傷害部に対して直径 3mm の 7 種類のステント (コイルステント; GR-I、Wiktor、Cordis、チューブステント; gfx、Multilink、Palmaz-Schatz) を植え込んだ。植え込み 28 日後にステント部の LAD を摘出し、光顕的に形態計測および免疫組織学的検討を行った。免疫組織学的検討には抗 proliferating cell nuclear antigen (PCNA) 抗体、抗マクロファージ抗体および抗 α 平滑筋アクチン抗体を使用した。

【結果】 ステント植え込み後の内膜増殖は、コイルステントでは偏心性で、チューブステントでは同心性であった。両タイプのステントで新生内膜面積は変わらなかったが、平均血管面積がチューブステントで大きく保たれていたため ($P < 0.05$)、内腔面積はチューブステントで有意に大きかった ($P < 0.01$)。免疫組織学的検討では、新生内膜、特にストラット周囲に抗 PCNA 抗体陽性細胞がみられ、その多くは抗マクロファージ抗体陽性あるいは抗平滑筋アクチン抗体陽性細胞であった。

【結論】 チューブステントは、コイルステントと比べて収縮性リモデリングの関与が少

なく、内膜増殖の程度はコイルステントと同程度にもかかわらず、内腔はより広く保たれていた。再狭窄を抑制するためには、より収縮性リモデリングの関与の少ないステントを植え込むことが非常に重要と考えられた。

文献

1. 中谷雅貴・嶽山陽一・柴田正行・萬屋 穰・植田竜仁・相羽英彦・鈴木 洋・木庭新治・片桐敬：バルーン傷害およびステント植え込み後における経時的冠動脈リモデリングに関する検討ーブタ冠動脈モデルを用いてー。
J Cardiol 32(Suppl):68, 1998
2. 鈴木 洋・中谷雅貴・片桐 敬・嶽山陽一・塩田清二・中井康光：実験的冠動脈傷害（PTCA、ステント）における血管反応の免疫組織学的検討。
J Clin Electron Microscopy 3:S74, 1998
3. 中谷雅貴・嶽山陽一・柴田正行・植田竜仁・鈴木 洋・木庭新治・吉津 徹・下司映一・片桐 敬・塩田清二・中井康光：ヒストレジン樹脂包埋法を用いたステント植え込み組織標本作成とその応用ー再狭窄病変部に対する抗血小板薬の抑制効果の検討ー。
J Clin Electron Microscopy 31:S163, 1998
4. 鈴木 洋・中谷雅貴・柴田正行・相羽英彦・萬屋 穰・植田竜仁・下司映一・片桐 敬・嶽山陽一：ブタ冠動脈傷害後の新生内膜増殖に対する抗血小板薬の抑制効果。
日本内科学会雑誌 20:301, 1998
5. Masaki Nakatani, Youichi Takeyama, Masayuki Shibata, Ryouji Ueda, Shinnji Koba, Hiroshi Suzuki, Takashi Katagiri: Different proliferative responses between balloon injury and stent placement in swine.
J Mol Cell Cardiol 30(11):A315, 1998
6. 中谷雅貴・萬屋 穰・鈴木 洋・片桐 敬・嶽山陽一：Stent 植え込み後の再狭窄機序に関する検討。
日本心血管インターベンション学会誌 13(Suppl II):75, 1999
7. 中谷雅貴・嶽山陽一・片桐 敬：冠動脈インターベンション後の血管病変の形成と外膜。
血管と内皮 9(3):1999
8. 萬屋 穰・中谷雅貴・礪 良崇・柴田正行・植田竜仁・木庭新治・鈴木 洋・村上幹高・片桐 敬・嶽山陽一：ステント植え込み後の冠動脈壁増殖性変化ーコイルステント、チューブステントを用いたブタ冠動脈での検討ー。
Jpn Circ J 63(Suppl):575, 1999
9. 萬屋 穰・中谷雅貴・礪 良崇・柴田正行・植田竜仁・木庭新治・鈴木 洋・村上幹高・片桐 敬・嶽山陽一：SYNTHESIS STENT の冠動脈への影響についての実験的検討ーMULTILINK STENT との比較ー。
Jpn Circ J 64(Suppl):534, 2000
10. 鈴木 洋・片桐 敬：冠動脈インターベンション後の冠動脈リモデリング。
医学のあゆみ 別冊 冠動脈リモデリング、PP. 30-34, 2000