

動脈硬化病変としての粥腫の形成と その不安定化の機序

浅野 伍朗

はじめに

動脈硬化症は心筋梗塞，狭心症，脳梗塞，脳出血など多くの疾患の原因となり，高血圧，高脂血症，糖尿病などの合併がみられる。動脈の病理学的変化の発生は血管の持つ機能的，形態学的特徴と関連している¹⁾。動脈の病理学的変化の発生はその収縮能や透過性とも関連して各血管の支配臓器に依存した特徴的病態を示し，多彩な病態を惹起する。多くの要因の関与により病変の進展がみられるが，その経過において血管内皮細胞は機能の失調を伴い血管作動物質は血管の形態変化に關与する。血液由来のマクロファージ，リンパ球と血小板は種々のcytokinesを産生し，内皮細胞の再生や，平滑筋細胞などの血管壁の細胞の増殖再生と間質成分の構成にも変化を引き起こす。動脈の構成細胞の比が各臓器で異なり特異な変動を来し，細胞外マトリックスと脂質の親和性にも相異がみられ，血管リモデリングへの移行が注目される。ここに血管構成細胞の動態と粥腫の形成機序とその不安定化の機序について言及するが，この形態学的特徴と機能変化や組織変化の評価には各種顕微鏡（電子顕微鏡，超音波顕微鏡，レーザー共焦点顕微鏡，偏光顕微鏡）と分子生物学手法を用いて解析が進められた。その観察結果について以下の観点から得られた結果を考察し報告する。実験的動脈硬化モデルにおける(1)内皮細胞の傷害と再生(2)平滑筋細胞の再生・増殖・分化と形質変換(3)ヒト冠動脈のリモデリング過程における粥腫の形成とその不安定化(4)糖尿病における血管病変とその特異性(5)粥腫の進展評価と進展阻止への光感受性物質の利用について述べる。

(1)実験的動脈硬化モデルにおける 内皮細胞の傷害と再生

動脈硬化の病態を形成する原因としての危険因子として高脂血症，高血圧，喫煙などが注目されてきた。そして，血管壁を構成している細胞の相互の関連性の上から，病変が進展していくことが検討され，血管構成細胞の機能や病的な変化に対する反応性や再生機能の解明が必要とされている。実験的には，コレステロールの負荷や内皮細胞の擦過，虚血状態やエンドトキシンを投与した動物モデルを用いての検討がなされてきた²⁻⁴⁾。1%コレステロール負荷ウサギ大動脈では走査電顕像により2週間後には血管内腔表層に不規則な凹凸がみられ，内皮細胞の腫大と血球成分の付着が認められた。コレステロール負荷後には壁細胞に脂質顆粒の増加がみられ，内皮細胞と平滑筋細胞の泡沫化を認めた。そして種々の分子の標識物質（トレーサー）が細胞間隙やpinocytotic vesicle内に認められ，細胞膜を通しての透過亢進の所見が確認された。また酵素組織化学的には $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPaseや Ca^{++} ATPaseの活性が明らかに血管内皮細胞と平滑筋細胞の細胞膜とミトコンドリアで観察された⁴⁻⁶⁾。またコレステロール負荷モルモットにおける大動脈組織では大動脈内腔側にコンドロイチン硫酸，デルマタン硫酸，ヘパラン硫酸の局在がみられ，コレステロール負荷群で著しい増加がみられ，特に内皮細胞の表層およびその間にプロテオグリカンの増加と不規則な分布が認められた。ビタミンE投与群ではこれらのプロテオグリカンは内皮細胞表層に局限し，増加の抑制が観察された⁷⁾。コレステロール負荷による，この過程の変動が脂質蓄積と脂質過酸化による動脈硬化促進を裏付けている。動脈の構成細胞の増殖動態については，血管内皮細胞剥離ラットモ

デルにおける観察において電子密度の高い基底膜の上方に内皮細胞の存在が認められたが、剥離後には内皮細胞は欠除し、基底膜にも消失が認められた。擦過 28 日後にもsubendothelial matrix構造は減少しており、同時に内皮細胞に密接する基底膜面では少量のコラーゲン線維の再生が観察された。内皮細胞の再生と関係する基底膜成分である細胞外基質の役割は注目される⁸⁾。内皮剥離後のラミニンとIV型コラーゲンの免疫組織化学的染色法による観察では、ラミニンとIV型コラーゲンは、14日後、28日後で、内皮細胞膜下に局在がみられた。また28日後にはfactor-VIIIと同じく細胞外基質であるフィブロネクチンの局在も認められた^{8,9)}。次に増殖因子である、bFGFとVEGFの局在は擦過 3 日後には基底膜部や平滑筋細胞にbFGFが認められ、さらに7日後、14 日後には中膜にもbFGFの局在が認められた。一方、VEGFは3日後、7日後、14日後において中膜で観察された。RT-PCR法によりbFGFの発現を検討すると3日後、7日後、14日後で201bp、VEGFも220bpの領域にその発現を認めた。擦過 7 日後の内皮細胞と平滑筋細胞の増殖能をオートラジオグラフィ法でみると³Hチミジンの取り込みから内皮細胞と中膜細胞は共に増殖能を示していた⁹⁾。以上の内皮細胞と基底膜の再生の過程についての観察結果からは内皮細胞の機能の変化としての透過亢進、酵素欠損、糖質の変化がみられ、機械的擦過による剥離での透過性の変動や間質のプロテオグリカンを含む細胞外基質の産生変動が確認され、細胞増殖との関連が示唆された。

(2) 平滑筋細胞の再生、増殖、分化と形質変換

中膜を構成する平滑筋細胞の増殖、分化、再生、形質変換と関連した増殖因子や細胞外基質成分などの役割についてみると、平滑筋細胞は細胞外基質や増殖因子の変化と共に形質の変換がみられる。すなわち増殖能を有する合成型の細胞形態を示す細胞とアクチンフィラメントを有する収縮型の細胞形態を示す細胞が観察される。細胞外基質の動きについてもラミニンとフィブロネクチンが細胞増殖と関係することを検討し合成型へのラミニンの関与と収縮型へのフィブロネクチンの関与を確認した¹⁰⁾。ラミニンとフィブロネクチンを負荷した培養平滑筋細胞でのアクチンのm-RNAをcompetitive-RT-PCR法により確認してみるとラミニンを添加した培地で高い値を示した。さらに間質成分の働

きとマップキナーゼ(MAPK)を介した遺伝子発現との関連からアクチンやビメンチンの発現を指標にMAPK系の2つの阻害剤、すなわちextracellular signal-regulated kinase(ERK)の阻害剤であるPD098059と、P38MAPK活性阻害剤であるSB203580の2つを用いてフィブロネクチンとラミニンを別々に加えた培養条件においてMAPK系の役割を免疫プロット法により検討した。フィブロネクチンを加えた平滑筋細胞の培地へPD098059を添加するとビメンチンなどのプロテイン量は減少した。そしてラミニンを加えた平滑筋細胞の培地へSB203580を添加した群ではアクチン量の減少が観察された。このようにそれぞれの阻害剤に対応した結果を示し、細胞外基質が平滑筋細胞の形質変換にMAPKを介して関与していることが確認された。平滑筋細胞の分化に関連して、small-proteoglycanであり、ケラタン硫酸の側鎖成分であるルミカンについてもラミニンとフィブロネクチンを加えた培地で平滑筋細胞を培養して検討するとルミカンはwestern-blot法で68kDaと62kDaで発現が確認され、ルミカンとラミニンの関連性が明らかにされた¹¹⁾。フィブロネクチンとラミニンを加えた培地で培養した平滑筋細胞をフィブロネクチン阻害剤(PD098059)添加群とラミニン阻害剤(SB203580)添加群で対比して電顕的に観察すると、myofilamentは細胞膜内に局在し、時間依存的に減少傾向を示した。フィブロネクチンを加えた培地やラミニンを加えた培地では平滑筋細胞の胞体内に、ER(endoplasmic reticulum)の増加が観察された¹⁰⁾。内皮細胞の再生と平滑筋細胞の分化や増殖に関与する細胞外基質成分は細胞を取り巻く環境変化として注目され、相互に密接な関連を示し、組織の構成状態やその修復過程で深く影響している。これらの変化は粥腫内のマクロファージの増加や脂質の蓄積や変性にも影響し、病変の進展と大きく関連していると考えられる。

(3) ヒト冠動脈リモデリング過程における粥腫の形成とその不安定化

血管のリモデリングは経年的な血管構造の再編成に基づくものであり、血管壁構成細胞と間質成分などの細胞を取り巻く微小環境とが相互に影響して形成される。動脈硬化様病変には線維の増生を主要な変化とする安定プラークと脂肪成分の蓄積変化を主要な変化とする粥腫の形成がみられる。しかし狭窄がまだ高度で

ない段階で血栓をとまう不安定プラークが存在することがある^{12, 13}。粥腫の形成過程において血管の機能障害と共に構造的にも不安定性を併せ持つ複雑な病変がみられる。この形態学的特徴と機能変化を有する特異な形態変化の観察のために分子生物学的手法に加え種々のプローブを用いた形態計測的解析法を用いて観察を行った。これまで心筋梗塞や不安定狭心症の原因として冠状動脈における脂質の豊富にみられる粥腫の性状の特異性についての説明が求められてきた。ここに心筋梗塞症例での冠動脈にみられる特徴的な疎水状態を観察した^{14, 15}。冠動脈には支配臓器による特徴と疾患特異性を示す背景因子の関与がみられ、内腔を有する(低い狭窄率)段階でのプラーク破壊(不安定プラーク)への移行もみられる¹³。この点で、冠動脈では安定プラークと不安定プラークの形成をリモデリングの過程の中でどのように位置付けるかが大変重要である。これと関連して動脈硬化症と合併疾患との複合病変としての不安定プラークの発生についての可能性を検討することは必要である。このようにヒト冠動脈の線維性(安定)プラークと脂質の豊富な不安定プラークについては偏光顕微鏡による観察において脂質の蓄積状態や性状には種々の差異があり、プラーク形成における構造の変化とも関連している。そして前述のように内腔肥厚に伴う内腔の拡張と中膜が伸長する(内腔肥厚を有しても内腔を保つ)というリモデリング過程の存在をより特徴的に示す点で、冠動脈には脳動脈と異なる臓器特異性がみられた^{16, 17}。しかしリモデリング過程での心筋梗塞例の冠動脈では、心筋梗塞患者の血栓形成例の冠動脈では内腔狭窄率が低い症例の冠動脈において、内腔肥厚に伴う内腔拡張傾向が変化し、内腔を保つ恒常性から逸脱し中膜の恒常性維持の変化がみられ、内腔肥厚によるものとは別の内腔が減少傾向を示す症例がみられた¹⁶。こうした状態を示す冠動脈の不安定プラークにおける脂肪の分布については3次元的な脂質蓄積状態を考慮する必要がある。確かに内腔側で脂質の蓄積が変化する過程で血流の縦軸方向に亀裂や傷害が生じる可能性が観察された。また超音波顕微鏡(SAM)を用いて観察した結果では、内腔側から内皮細胞の存在した状態でその直下の弾性線維の構造変化を無処置的に観察でき内腔の弾性構造が改築する様子が観察され、心筋梗塞症例において黒く網状にみられる弾性構造が減少し走行も乱れ、弾性構造が不均一

になり、大きい濃淡差が確認された。そして同様に中膜の弾性構造においても心筋梗塞症例では規則的な平滑筋細胞の配列が乱れ、不規則になり、間質成分が細線維化し、伸長がみられ弾性構造の密度も減少していた¹⁸。冠動脈の不安定プラークの組織ではこうした内腔と中膜の変化が一つの特徴として観察された。不安定化の機序については、マクロファージの集積、線維被膜の菲薄化、血管内皮細胞の機能不全、易血栓性が特徴とされている。病巣の大きさは泡沫化細胞の数量とは平行せず、平滑筋細胞やマクロファージの作用が病変を進展させるのか、内皮障害や脂質蓄積に対する生体防衛反応がこれに関与するのかが課題である。こうした不安定プラークの存在する冠動脈ではその弾力性や伸展性にも変化がみられる。血管壁全体の機械的な伸展性について観察すると弾力は低下し超音波顕微鏡による観察結果とも類似した結果を得ている¹⁵。このような構造的機械的な脆弱性がみられ、血管の収縮性や伸展性において不安定性が生じている可能性が示唆される。粥腫内に蓄積した脂質はその構造状態により加熱されると偏光輝度は一旦消失する。この試験法を用いることで、心筋梗塞症例において特徴的な偏光輝度の消失がみられた。心筋梗塞患者の冠動脈では脂質の量的差異に加え蓄積状態やその性質が異なっている¹⁵。偏光輝度を示す蓄積脂質はその外形的状態に加え脂質の組成や物理的凝集状態にも違いがみられており、蓄積状態で同質の変性脂質の存在が確認された。この脂質蓄積状態ではコレステロール結晶の析出と異なり、脂質が蓄積している周囲の組織で疎水性環境が存在している状態であることが明らかとされた。これは脂質の蓄積以前から組織に疎水性を高める成分の増加があることを示唆している。疎水性強度が高まると加熱により蛍光の消失が早まる特徴があり、組織の疎水性変化をさらに定量的に評価することで心筋梗塞症例では著しく疎水性変化が亢進していることが明らかとされた¹⁵。不安定プラークでは疎水性プローブであるNile redなどの蛍光試薬とアポトーシスのマーカーであるAnnexin Vを用いて観察すると2つのマーカーが共に脂質が蓄積している周囲に陽性所見を示し細胞膜傷害や膜の融合による疎水性亢進の状態を裏付けている。このように不安定プラークでは、安定プラークが親水性で線維形成が安定しているのとは異なり、疎水性状態の亢進が著しいことが確認された^{14, 15, 19}。

(4) 糖尿病における血管病変とその特異性

糖尿病患者の死因では動脈硬化症を含む血管障害が原因となる臓器障害が多いことが知られ、近年Advanced glycation end products (AGEs) の存在が注目されている。蛍光性AGEは特有の440nmの蛍光波長を示し、またマクロファージ抗体が陽性の細胞内にもAGEの局在が観察されている²⁰⁾。また糖尿病症例の冠動脈の粥腫内ではアクチンの減少とテネシンの増加といった平滑筋細胞の減少と種々の蛋白発現が観察されると共にマクロファージの増加傾向が観察された。また内皮下内腔側上層部の平滑筋細胞にはアポトーシスの存在が観察され、糖尿病症例で高頻度に認められた^{21, 22)}。特に、糖尿病症例での脂質の特徴的拡散は病巣を拡大し、内皮細胞障害と血管壁の弾性構造を改変し、機械的な脆弱性の増大に寄与していることが示唆される。一方AGEのレセプター(RAGE)の存在は内皮細胞では抗血栓作用、血管トーン、血管透過性に影響することが知られている。ラット糖尿病モデルの大動脈におけるRAGEの発現をみると、AGEは平滑筋細胞の陽性細胞と平行するがRAGEは平行せず、内皮細胞の再生や平滑筋細胞の増殖能との間で乖離がみられた²³⁻²⁵⁾。RAGEの発現は糖尿病により血管壁の組織構成を不整合な構成に変えている可能性が高いことが示唆された。

(5) 粥腫の進展評価と進展阻止への光感受性物質の利用

動脈硬化病巣における細胞の増殖分化や病変の進展、さらに不安定化への徴候を検索することは診断と治療に欠かせない重要なことである。動脈硬化病巣についてヘマトポルフィリン染色法を用いて観察するとプラークの脂質蓄積部は赤く染色された²⁶⁾。光治療で研究が進められてきた光感受性物質のヘマトポルフィリン(HP)の利用による蛍光スペクトル解析では病変の進展状態の解析が可能である²⁷⁾。動脈硬化の進行に伴い特有の蛍光スペクトルを示し赤色方向に変異し、蛍光強度も増加する。このHPの蓄積傾向は元来親水性の試薬であるために脂質には入らず、脂質周囲においてみられる。そしてHPが両親媒性の性格を有するために、疎水性の高い脂質の蓄積部位に集積傾向を示す。こうしたHPの蓄積の傾向をみるとプラークの被膜やコレステロール結晶にはHP

蛍光は乏しく、粥腫の境界部の間質や細胞の変性に伴いHPは蓄積する。そしてその部位の光感受性の増加や病態情報を蛍光強度とスペクトルの変化として確認することが出来た。この変化はプラークの脆弱性をも反映している。この結果は粥腫の光治療の意図に添い、光治療の機序解明のためにも有用と思われる。プラークの被膜と脂質蓄積部では、主にHPの蓄積は線維被膜と脂質の境界部に観察され、被膜の菲薄化と脂質蓄積の状態の観察に有用であった。

以上、動脈硬化の成り立ちと安定と不安定プラークの性状について述べてきたが、微視的アプローチと巨視的アプローチの個々の長所をより有効に相補的に活用することにより、今後の病態解析に役立ち、脈管学のさらなる発展に寄与することと確信する。

文 献

- 1) Asano G, Wang R, Kameyama K et al: Risk factors and pathogenesis of atherosclerotic lesion. *J Nippon Med Sch*, 1999, **66**: 372-381.
- 2) Fukui M, Qiao Y, Asano G et al: Ultrastructural localization of calcium dependent adenosine triphosphatase (ATPase) in the myocardium of endotoxin-administered rats. *Med Electron Microsc*, 1993, **26**: 151-155.
- 3) Shiharajima S, Aida T, Nakagawa A et al: Early membrane damage during ischemia in rat heart. *Exp Mol Pathol*, 1986, **44**: 1-6.
- 4) Asano G, Ohkubo K, Hoshino M et al: Early changes in the arterial endothelium under various pathological conditions. *Acta Path Jap*, 1979, **29**: 21-34.
- 5) Asano G, Fukumoto H, Nishigaki R et al: Biological roles of vascular endothelial cell in various process. *J Nippon Med Sch*, 1998, **65**: 265-275.
- 6) Asano G, Ashraf M, Schwartz A: Localization of Na-K-ATPase in guinea-pig myocardium. *J Mol Cell Cardiol*, 1980, **12**: 257-266.
- 7) Qiao Y, Kameyama K, Asano G et al: Effect of vitamin E on vascular integrity in cholesterol-fed guinea pigs. *Arterioscler Thromb*, 1993, **13**: 1885-1892.
- 8) Yokoyama M, Ishiwata T, Asano G: Process of basement membrane reformation after intimal denudation. *J Atheroscler Thromb*, 1994, **1**: 60-70.
- 9) Onda M, Asano G, Ishiwata T: Role of bFGF and VEGF in repairing process of vascular injury. *J Jpn Coll Angiol*, 1994, **34**: 233-241.
- 10) Qin H, Ishiwata T, Asano G et al: Effects of extracellular matrix on phenotype modulation and MAPK transduction of rat aortic smooth muscle cell in vitro. *Exp Mol Pathol*, 2000, **69**: 79-90.
- 11) Qin H, Ishiwata T, Asano G: Effects of extracellular matrix on lumican expression in rat aortic smooth muscle cells

- in vitro. *J Pathol*, 2001, **195**: 604-608.
- 12 Davies MJ, Thomas AC: Plaque fissuring-the cause of acute myocardial infarction, sudden ischaemic death, and crescendo angina. *Br Heart J*, 1985, **53**: 363-373.
- 13 Falk E, Shah PK, Fuster V: Coronary plaque disruption. *Circulation*, 1995, **92**: 657-171.
- 14 Kimura T: Changes in water content in vessel wall after intimal injury with special reference to relationship between proton nuclear magnetic resonance relaxation times and morphological changes. *J Jpn Coll Angiol*, 1989, **39**: 213-219.
- 15 Kameyama K, Machida M, Asano G et al: Study of the developing mechanism of hydrophobicity in unstable plaques of coronary artery. *J Jpn Coll Angiol*, 1997, **37**: 279-286.
- 16 Kameyama K, Asano G et al: Comparison of atherosclerotic change in middle cerebral artery and coronary artery with special reference to morphometrical study. *J Jpn Atheroscler Soci*, 1986, **14**: 1143-1149.
- 17 Kameyama K, Yamada N, Asano G et al: Morphometrical studies on coronary arteries of myocardial infarction with special reference to the relationship between distensibility of arterial walls and intima thickening. *J Jpn Atheroscler Soci*, 1992, **16**: 683-688.
- 18 Kameyama K, Asano G: Evaluation of elastic structural change in coronary atherosclerosis using scanning acoustic microscopy. *Atherosclerosis*, 1992, **94**: 191-200.
- 19 Sakurai T, Kameyama K, Asano G et al: Characterization of lipid in atherosclerotic coronary arteries in myocardial infarction. *J Jpn Coll Angiol*, 1993, **33**: 1117-1125.
- 20 Onda M, Kameyama K, Asano G: Specificity of autofluorescence substance in the atherosclerotic lesion of diabetes mellitus. *J Jpn Coll Angiol*, 1997, **37**: 279-286.
- 21 Fukumoto H, Kameyama K, Asano G et al: Immunohistochemical evaluation of vascular smooth muscle cells and tenascin in atherosclerotic plaques of coronary arteries with special reference to relationship between diabetes mellitus and myocardial infarction. *J Jpn Coll Angiol*, 1996, **36**: 899-906.
- 22 Fukumoto H, Naito Z, Asano G et al: Immunohistochemical and morphometric evaluations of coronary atherosclerotic plaques. *J Atheroscler Thromb*, 1998, **5**: 29-35.
- 23 Sun M, Yokoyama R, Asano G et al: Deposition of advanced glycation end products (AGE) and expression of the receptor AGE in cardiovascular tissue of the diabetic rat. *Int J Exp Path*, 1998, **79**: 207-222.
- 24 Naito Z, Asano G, Shimizu-Suganuma M et al: Ultrastructural changes and immunohistochemical localization of nitric oxide synthase, advanced glycation end products and NF- κ B in aorta of streptozotocin treated Mongolian gerbils. *J Nippon Med Sch*, 1999, **66**: 166-175.
- 25 Wang R, Yokoyama M, Asano G et al: Roles of advanced glycation end products (AGEs) and receptor for AGE on vascular smooth muscle cell growth. *J Nippon Med Sch*, 2001, **68**: 472-481.
- 26 Machida M, Kameyama K, Asano G: Histochemical and fluorescence spectroscopical analysis of arteriosclerotic lesion in human aorta using photosensitizing agent hematoporphyrin. *J Jpn Coll Angiol*, 1997, **37**: 799-807.
- 27 Machida M, Kameyama K, Asano G et al: Fluorescence spectroscopic and histochemical analysis using hematoporphyrin as a microenvironmental probe for atherosclerotic change in the human aorta. *Lab Invest*, 1999, **79**: 733-745.

Mechanism of Plaque Formation and Instability in Atherosclerosis

Goro Asano

President, Nippon Medical School, Tokyo, Japan

Atherosclerosis is a major cause of death and disability. Risk factors for atherosclerosis include pharmacotherapy, lifestyle, hyperlipidemia, hypertension, and diabetes mellitus. In cholesterol-fed guinea pigs, intimal atheromatous lesions were observed and vitamin E seemed to preserve the morphological and functional integrity of the vascular wall and contribute to the inhibition of atherogenesis. Intra- and extracellular lipid deposition may contribute to changes in drainage and hydrophobic change in the intima of human coronary arteries. Hydrophobicity between water and lipid micelles was disturbed in the plaque. It is suggested that this unstable hydrophobic interaction may promote the formation of irregular lipid micelles and induce instability of the plaque. In atheroma of the coronary artery in diabetes mellitus, the additional binding of advanced glycation end products (AGEs) was considered to promote the accumulation of autofluorescence with specific characteristics in atheromatous lesions and contribute to the progression of atherosclerosis. Hematoporphyrin (HP) as a microenvironmental fluorescent probe to investigate the development of atherosclerotic plaques was localized in the region of cell proliferation around cholesterol micelles and damaged cells. HP is useful for detecting clinically important changes in atherosclerotic lesions, to lipid-rich unstable plaques, which are closely associated with cardiovascular events.

(*J. Jpn. Coll. Angiol.*, 2003, **43**: 69-73)