

血管平滑筋細胞の表現型の多様性と動脈硬化進展のメカニズム

羽尾 裕之¹ 植田 初江² 新長真由美¹ 廣田 誠一¹

要 旨：動脈硬化や血管形成術後の再狭窄病変では、内膜における血管平滑筋細胞の単クローン性増殖が知られている。また現在では、中膜には多様な表現型の血管平滑筋細胞が混在し、その一部が内膜形成に重要な役割を果たしているという仮説が広く受け入れられている。血管平滑筋細胞の表現型の多様性の観点から、動脈硬化の進展や再狭窄病変の形成における表現型の異なる平滑筋細胞の病態への関与についてわれわれの検討結果を交えて述べる。

(J Jpn Coll Angiol, 2007, 47: 307-312)

Key words: smooth muscle cell, heterogeneity, atherosclerosis, restenosis

はじめに

血管平滑筋細胞の遊走と増殖は動脈硬化の進展や血管形成術後の再狭窄に重要な役割を果たしている。炎症細胞や傷害を受けた内皮細胞から放出されるサイトカイン、蛋白分解酵素や細胞外基質は平滑筋細胞 smooth muscle cell (SMC) の遊走および増殖を刺激し、新生内膜が形成される。ヒト動脈硬化病変のプラークは単クローン性のSMCからなることが知られている¹⁾。また中膜には多様な表現型のSMCが存在するという仮説が提唱され、さまざまな種で異なる表現型の培養SMC株が報告された。最近では、新生内膜の細胞供給源として、外膜の線維芽細胞²⁾、血管内皮細胞³⁾、骨髄由来幹細胞⁴⁾などが報告されている。本稿ではわれわれの検討結果^{5,6)}を含めて、SMCの細胞生物学的な特徴に焦点をあて、SMCの表現型の多様性と動脈硬化や血管形成術後再狭窄の進展機序について述べる。

表現型の異なる培養血管平滑筋細胞株の樹立

Table 1に示すように、さまざまな種の異なる部位の血管から多様な表現型のSMCが分離培養された。ラットを用いた検討が最も多く、大動脈からは中膜より分離された紡錘型平滑筋細胞 (spindle-shaped SMC: S-

SMC)と、バルーンカテーテルによる血管傷害15日後の新生内膜から分離された類上皮型平滑筋細胞 (epithelioid SMC: E-SMC) の2種類の異なる細胞株が報告された。これらの細胞株は主に培養時の形態から分類され、S-SMC株は短紡錘型から紡錘型を呈し、コンフルエントに達すると重なり合って増殖する“hill-and-valley”パターンを呈し、E-SMC株は培養時に類円形を呈し、単層に増殖してコンフルエント時には敷石状を呈した^{5,7)} (Fig. 1)。さらにS-SMCは胎生期から4~5日齢および6週~3カ月齢ラット大動脈から分離され、18カ月齢以上のラットや自然発症高血圧ラット (spontaneously hypertensive rat: SHR) の大動脈の中膜からはE-SMCが分離培養された^{8,9)}。これらの結果からSMCの表現型には加齢や血圧の変化が影響することが示唆された。ラット大動脈の中膜および新生内膜より分離したクローン株は、S-SMCおよびE-SMC両者の表現型を示すクローン株が混在していた⁵⁾。これらのSMCの表現型が培養下のみならず、生体内でも保持されるかを検討するため、ラット大動脈由来の2つの異なる培養細胞株であるS-SMCとE-SMCを内皮傷害後のラット頸動脈に植え込んだところ、移植された細胞は生体内で頸動脈に生着後も培養時の分化度を維持していた¹⁰⁾。

さらに大型動物を用いた検討では、Fridらはウシ肺

¹兵庫医科大学病院病理部

²国立循環器病センター臨床検査部病理

Table 1 Evidences of smooth muscle cell heterogeneity

Species	Vessel	Age	Location	Method	Morphology
Rat	Aorta	Newborn	Normal media	Digestion	Spindle and cobblestone
	Aorta	Adult	Normal media	Digestion, explant	Spindle
	Aorta	Adult	IT 15 days	Digestion	Epithelioid
	Aorta	Old	Normal media	Digestion	Epithelioid
	Carotid artery	Adult	Normal media	Digestion	Spindle
	Carotid artery	Adult	IT 15 days	Digestion	Epithelioid
SHR	Aorta	Adult	Normal media	Cloning	Spindle and epithelioid
Chick	Abdominal Aorta	Embryo	Normal media	Digestion	Spindle
	Aortic arch	Embryo	Normal media	Digestion	Epithelioid
Mouse*	Aorta	Newborn	Normal media	Cloning	Spindle and epithelioid
	Aorta	Adult	Normal media	Cloning	Spindle
Dog	Carotid artery	Adult	Normal media	Digestion	Bipolar and spherical
	Carotid artery	Adult	IT 14 days	Digestion	Spherical
Cow	Pulmonary artery	Adult	Normal media	Explant	Rhomboid
	Pulmonary artery	Adult	Normal media	Explant	Spindle
Pig	Coronary artery	Adult	Normal media	Explant	Spindle and rhomboid
	Coronary artery	Adult	IT 15 days	Explant	Rhomboid
Human	Aorta	25–60y	Atheroma	Digestion	Elongated, polygonal asymmetric, stellate
	Coronary artery	Adult	Normal and atheroma	Explant	Spindle and epithelioid
	Internal thoracic artery	Adult	Normal artery	Cloning	Spindle and epithelioid

SHR: spontaneously hypertensive rats, IT: intimal thickening

*H-2K^b-tsA58 transgenic mice

動脈および大動脈の中膜を組織形態学的に異なる血管壁の構成成分に分類し、S-SMC、E-SMCに加えて多角形を呈するrhomboid SMC (R-SMC) の3つの細胞株を分離培養し¹¹⁾、Holifieldらはイヌ動脈の外膜に近い部位の中膜からE-SMCと類似したspherical SMCの培養に成功した¹²⁾。われわれはブタ冠動脈の中膜から、S-SMCとR-SMCの2つの異なる表現型のSMC株を分離し、さらにステント植え込み15日後の新生内膜からはR-SMCが高率に分離された⁶⁾ (Fig. 2)。ヒト動脈由来培養SMCでも多彩な表現型のSMC株が報告されている。高分化な長紡錘型を示すelongated SMCsはびまん性内膜肥厚から、stellate SMCsは動脈硬化の強い内膜病変から分離された¹³⁾。またBjorkerudら¹⁴⁾もヒト動脈の内膜から培養時の形態と細胞接着能の違いから2つの異なる表現型の細胞株の分離培養に成功した。

表現型の異なる血管平滑筋細胞の生物学的特徴

血管傷害後の新生内膜より分離されたE-SMCやR-SMCなどの細胞株は中膜由来のS-SMCと比較すると、高い増殖遊走能や低い分化度などの共通の生物学的特徴を呈する (Table 2)。E-SMCとR-SMCはS-SMCと比較して増殖能が高く、コンフルエントに達すると増殖の接触阻止が見られた^{5-7, 10, 15)}。ラット由来のE-SMCはブタ由来のR-SMCやヒト血管由来のE-SMCと異なり、無血清培地でも自律性増殖能が認められた点が特徴的である^{5, 6, 16-20)}。E-SMCやR-SMCはS-SMCと比較して高い遊走能とplasminogen activator (PA) 活性、tPA、uPAおよびmetalloproteinase-2の産生を認めた^{21, 22)}。これらの結果を裏付けるように、動物モデルにおける新生内膜やヒトの動脈硬化病変において、PAの強発現が認められた²³⁾。

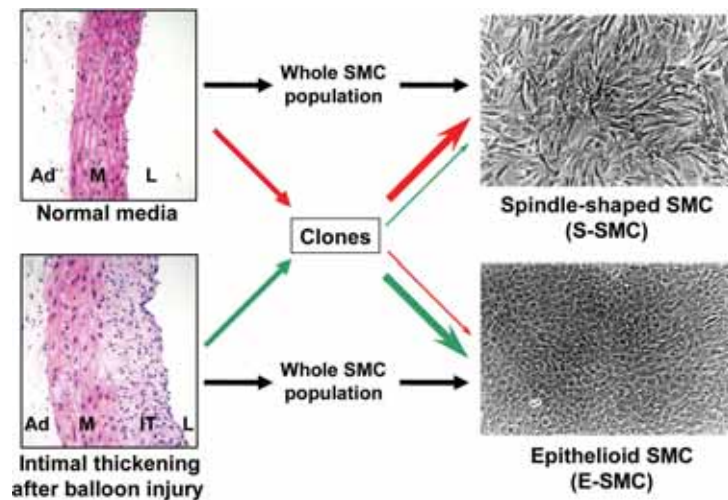


Figure 1 Heterogeneity of rat aortic smooth muscle cells.

Phase-contrast microphotographs show spindle-shaped (S-SMC) and epithelioid (E-SMC) phenotype isolated from rat aortic normal media and IT at 15 days post-balloon injury. Normal media and intimal thickening predominantly yields S-SMC and E-SMC clones, respectively.

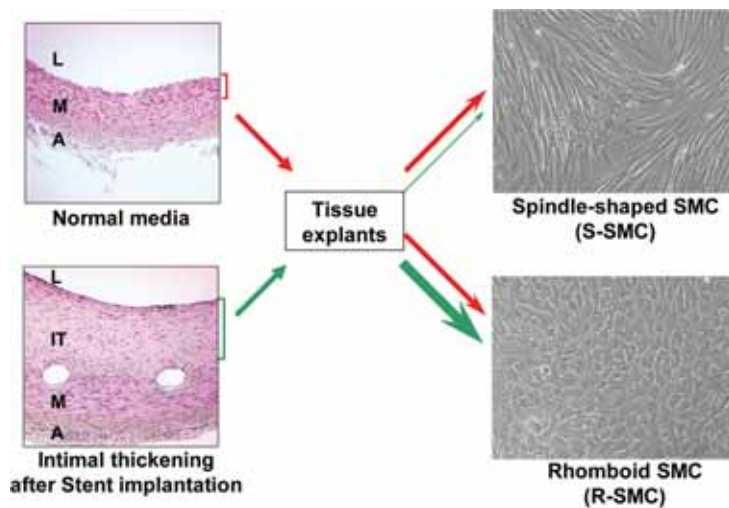


Figure 2 Heterogeneity of pig coronary artery smooth muscle cells.

Phase-contrast microphotographs show spindle-shaped (S-SMC) and rhomboid (R-SMC) phenotypes isolated from pig coronary artery normal media and IT at 15 days post-stent implantation. Luminal portion of normal media equally yields S-SMC and R-SMC population. Intimal thickening after stent implantation yields R-SMC population predominantly.

Table 2 Biological characteristics of smooth muscle cell subpopulations

Species	Rat		Cow			Pig		Human	
	Spindle	Epithelioid	Spindle	Rhomboid	Epithelioid	Spindle	Rhomboid	Spindle	Epithelioid
Autonomous growth	–	+	–	+	+	–	–	–	–
Migratory activity	Low	High	ND	ND	ND	Low	High	Low	High
Differentiation features									
α-SM actin	++	+	++	+/-	+	+++	+	+++	++
Desmin	+/-	–	ND	ND	ND	+	+/-	ND	ND
Smooth muscle myosin heavy chain	+	+/-	++	–	–	+	+/-	+++	++
Smoothelin	ND	ND	ND	ND	ND	+	+/-	ND	ND
SM22α	++	ND	++	+/-	+	ND	ND	ND	ND

ND: not determined

細胞骨格蛋白による分化度マーカーの発現は収縮型と合成型SMCの分類に有用である (Table 2)。広く用いられているSMCの分化度マーカーである α -smooth muscle (SM) actinは、E-SMCやR-SMCよりS-SMCでその発現が増強していた。desminやsmooth muscle myosin heavy chain (SMMHC)はE-SMCやR-SMCと比較して高分化なS-SMCに強く発現していたが、培養とともにその発現は減弱もしくは消失した^{5, 6, 8, 10, 19}。その他の高分化なSMCのマーカー蛋白としては、smoothelin, SM22 α , calponin, h-caldesmon, metavinculinなどが知られている^{6, 10, 11}。ヒト動脈由来のSMCも含め、大型動物から分離されたSMCは高分化であることが多かった。アポトーシスは内膜肥厚モデルや動脈硬化病変、血管形成術後の再狭窄病変で見られ、プラークの安定化と密接に関係している。培養SMCではラットE-SMCにおける活性酸素やレチノール酸などによるアポトーシスへの易誘導性が報告されている²⁴。

ラット由来のS-SMC, E-SMCに対するマーカー分子の検索

プロテオミクス解析によりラット大動脈由来のE-SMCに対するマーカー蛋白として、細胞性レチノール酸結合蛋白 (cellular retinol binding protein-1, CRBP-1) が同定された。CRBP-1は中膜のごく一部のSMCにのみ分布していたのに対し、血管傷害後の新生内膜ではSMCに広範囲に分布していた²⁵。CRBP-1はラット大動脈由来のE-SMCに対するマーカー蛋白として*in vitro*および*in vivo*で有用であった。胎児由来のSMCの自律性増殖にはembryonic growth-associated proteinが関与しており²⁶、ウシ肺動脈由来R-SMCではextracellular signal-regulated kinase (ERK-2) の活性化が知られている²⁷。異なった表現型のSMC株における遺伝子の発現の差が網羅的に検索され、ブタ内胸動脈由来SMCでは細胞接着因子に関連する遺伝子が、ブタ冠状動脈由来SMCでは脂質代謝、炎症、細胞増殖に関連する遺伝子の発現がそれぞれ増強していた²⁸。

異なった表現型のSMC株の細胞供給源

発生時の血管形成の過程で血管平滑筋細胞は中胚葉、神経堤、心外膜などの異なる細胞供給源が知られており、多様な表現型のSMC株は異なった細胞供給源から由来していることが想定された。ニワトリ胚を用

いた検討ではS-SMCとE-SMCはそれぞれ中胚葉と神経堤から由来していた²⁹。ラットE-SMCは血管周囲細胞として内皮細胞による毛細血管様構造の周囲に接着し³⁰、ブタR-SMCはコラーゲングルで高い3次元遊走能を示したことから⁶、E-SMCやR-SMCは生体内で血管形成や血管新生に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。より低分化なE-SMCやR-SMCは血管局所に存在している多彩な分化能を有する幹細胞として血管傷害後の修復機転や血管新生に関与している可能性が考えられた。また骨髄由来幹細胞のSMCへの分化がさまざまな血管傷害モデルで証明されており、骨髄由来幹細胞と局所の血管壁由来のE-SMCやR-SMCの関連は興味深く、今後の検討が期待される。

血管平滑筋細胞の表現型の変換

SMCの表現型の変換を起こす因子として、SMCの増殖抑制、分化促進を引き起こすヘパリン、transforming growth factor (TGF)- β 、レチノール酸、SMCの増殖刺激、脱分化を引き起こすPDGF-BB, fibroblast growth factor (FGF)-2, insulin growth factor、血管収縮因子であるendothelin (ET)-1, angiotensin II, histamine, norepinephrine、血管拡張因子であるnitric oxide (NO) などが知られている。

ヘパリンはラットSMCにおいては最も強い増殖抑制作用を、ウシ肺動脈由来の細胞株ではR-SMCに対してのみ選択的に増殖抑制作用を示した¹¹。TGF- β 、レチノール酸はラットSMCでは増殖を抑制し分化を促進した。レチノール酸による α -SM actinの発現の増強はE-SMCのみに認められ、CRBP-1陽性のラットE-SMCはS-SMCよりレチノール酸に対する感受性が高いことが予想される。レチノール酸やRAR- α 作動薬によって大動脈や頸動脈の内膜肥厚の抑制効果が認められたことから³¹、CRBP-1はこれらの動物モデルにおいては新生内膜の形成に重要な役割を果たしていると考えられた。ET-1, angiotensin II, histamine, norepinephrine¹⁵など血管収縮物質に対する感受性はS-SMCがE-SMCよりも高く、この結果はS-SMCの収縮型SMCとしての細胞学的特徴と合致する。

ブタS-SMCはFGF-2とPDGF-BBの培地への添加、ブタ冠状動脈由来の内皮細胞との共培養によってR-SMCへ表現型の転換が見られた。この変化は増殖刺激と分化度マーカーの低下を伴い、またS-SMCからR-SMCへ

の培養時の形態変化は可逆性であった⁶⁾。内皮細胞との共培養時のSMCの増殖刺激作用は内皮細胞によるplasminogen activator inhibitor-1の産生やTGF- β の発現抑制効果が考えられる。

結 語

さまざまな種の異なる部位の血管壁で多様な表現型の培養SMC株が同定された。その中でも血管傷害後の新生内膜由来のE-SMCやR-SMCは新生内膜形成において重要な表現型であることが明らかになった。

細胞株の表現型の可塑性については、細胞由来の種類によっても異なり、ラットS-SMCとE-SMCはお互いに表現型が転換しないと考えられた。さらにレチノール酸など培養時にE-SMCの生物学的特徴に影響を与える分子は新生内膜の形成を抑制した。ブタ冠動脈由来のSMCではラットと異なりS-SMCからR-SMCへの表現型の転換が認められ、これらの変化は可逆性であった。

今後の研究課題として表現型の異なるヒト由来SMC株における、培養時および生体内での有用なマーカーの同定が期待される。これらの研究成果の血管発生分野への応用によって、異なる表現型のSMCの細胞供給源や生体内の血管網における分布が解明されるであろう。さらに動脈硬化や血管形成術後再狭窄に対する新たな治療戦略への応用が望まれる。

文 献

- 1) Benditt EP, Benditt JM: Evidence for a monoclonal origin of human atherosclerotic plaques. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1973, **70**: 1753–1756.
- 2) Zaleski A, Shi Y, Johnson AG: Diverse origin of intimal cells: smooth muscle cells, myofibroblasts, fibroblasts, and beyond? *Circ Res*, 2002, **91**: 652–655.
- 3) Gittenberger-de Groot AC, DeRuiter MC, Bergwerff M et al: Smooth muscle cell origin and its relation to heterogeneity in development and disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999, **19**: 1589–1594.
- 4) Hillebrands JL, Klatter FA, Rozing J: Origin of vascular smooth muscle cells and the role of circulating stem cells in transplant arteriosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, **23**: 380–387.
- 5) Bochaton-Piallat ML, Ropraz P, Gabbiani F et al: Phenotypic heterogeneity of rat arterial smooth muscle cell clones: implications for the development of experimental intimal thickening. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1996, **16**: 815–820.
- 6) Hao H, Ropraz P, Verin V et al: Heterogeneity of smooth muscle cell populations cultured from pig coronary artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, **22**: 1093–1099.
- 7) Walker LN, Bowen-Pope DF, Ross R et al: Production of platelet-derived growth factor-like molecules by cultured arterial smooth muscle cells accompanies proliferation after arterial injury. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, **83**: 7311–7315.
- 8) Bochaton-Piallat ML, Gabbiani F, Ropraz P et al: Age influences the replicative activity and the differentiation features of cultured rat aortic smooth muscle cell populations and clones. *Arterioscler Thromb*, 1993, **13**: 1449–1455.
- 9) Hall KL, Harding JW, Hosick HL: Isolation and characterization of clonal vascular smooth muscle cell lines from spontaneously hypertensive and normotensive rat aortas. *In Vitro Cell Dev Biol*, 1991, **27A**: 791–798.
- 10) Bochaton-Piallat ML, Clowes AW, Clowes MM et al: Cultured arterial smooth muscle cells maintain distinct phenotypes when implanted into carotid artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, **21**: 949–954.
- 11) Frid MG, Aldashev AA, Dempsey EC et al: Smooth muscle cells isolated from discrete compartments of the mature vascular media exhibit unique phenotypes and distinct growth capabilities. *Circ Res*, 1997, **81**: 940–952.
- 12) Holifield B, Helgason T, Jemelka S et al: Differentiated vascular myocytes: are they involved in neointimal formation? *J Clin Invest*, 1996, **97**: 814–825.
- 13) Orekhov AN, Karpova II, Tertov VV et al: Cellular composition of atherosclerotic and uninvolved human aortic subendothelial intima: Light-microscopic study of dissociated aortic cells. *Am J Pathol*, 1984, **115**: 17–24.
- 14) Bjorkerud S: Cultivated human arterial smooth muscle displays heterogeneous pattern of growth and phenotypic variation. *Lab Invest*, 1985, **53**: 303–310.
- 15) Li S, Fan YS, Chow LH et al: Innate diversity of adult human arterial smooth muscle cells: cloning of distinct subtypes from the internal thoracic artery. *Circ Res*, 2001, **89**: 517–525.
- 16) Seifert RA, Schwartz SM, Bowen-Pope DF: Developmentally regulated production of platelet-derived growth factor-like molecules. *Nature*, 1984, **311**: 669–671.
- 17) McCaffrey TA, Nicholson AC, Szabo PE et al: Aging and arteriosclerosis. The increased proliferation of arterial smooth muscle cells isolated from old rats is associated with increased platelet-derived growth factor-like activity. *J Exp Med*, 1988, **167**: 163–174.
- 18) Majesky MW, Giachelli CM, Reidy MA et al: Rat carotid

- neointimal smooth muscle cells reexpress a developmentally regulated mRNA phenotype during repair of arterial injury. *Circ Res*, 1992, **71**: 759–768.
- 19) Lemire JM, Covin CW, White S et al: Characterization of cloned aortic smooth muscle cells from young rats. *Am J Pathol*, 1994, **144**: 1068–1081.
 - 20) Martinez-Gonzalez J, Berrozpe M, Varela O et al: Heterogeneity of smooth muscle cells in advanced human atherosclerotic plaques: intimal smooth muscle cells expressing a fibroblast surface protein are highly activated by platelet-released products. *Eur J Clin Invest*, 2001, **31**: 939–949.
 - 21) Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G, Pepper MS: Plasminogen activator expression in rat arterial smooth muscle cells depends on their phenotype and is modulated by cytokines. *Circ Res*, 1998, **82**: 1086–1093.
 - 22) Lau HK: Regulation of proteolytic enzymes and inhibitors in two smooth muscle cell phenotypes. *Cardiovasc Res*, 1999, **43**: 1049–1059.
 - 23) Lupu F, Heim DA, Bachmann F et al: Plasminogen activator expression in human atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995, **15**: 1444–1455.
 - 24) Li WG, Miller FJ Jr, Brown MR et al: Enhanced H₂O₂-induced cytotoxicity in “epithelioid” smooth muscle cells: implication for neointimal regression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, **20**: 1473–1479.
 - 25) Neuville P, Geinoz A, Benzonana G et al: Cellular retinol-binding protein-1 is expressed by distinct subsets of arterial smooth muscle cells *in vitro* and *in vivo*. *Am J Pathol*, 1997, **150**: 509–521.
 - 26) Weiser-Evans MC, Schwartz PE, Grieshaber NA et al: Novel embryonic genes are preferentially expressed by autonomously replicating rat embryonic and neointimal smooth muscle cells. *Circ Res*, 2000, **87**: 608–615.
 - 27) Frid MG, Aldashev AA, Nemenoff RA et al: Subendothelial cells from normal bovine arteries exhibit autonomous growth and constitutively activated intracellular signaling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999, **19**: 2884–2893.
 - 28) Qin M, Zeng Z, Zheng J et al: Suppression subtractive hybridization identifies distinctive expression markers for coronary and internal mammary arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, **23**: 425–433.
 - 29) Topouzis S, Majesky MW: Smooth muscle lineage diversity in the chick embryo. Two types of aortic smooth muscle cell differ in growth and receptor-mediated transcriptional responses to transforming growth factor- β . *Dev Biol*, 1996, **178**: 430–445.
 - 30) Nicosia RF, Villaschi S: Rat aortic smooth muscle cells become pericytes during angiogenesis *in vitro*. *Lab Invest*, 1995, **73**: 658–666.
 - 31) Miano JM, Kelly LA, Artacho CA et al: all-Trans-retinoic acid reduces neointimal formation and promotes favorable geometric remodeling of the rat carotid artery after balloon withdrawal injury. *Circulation*, 1998, **98**: 1219–1227.

Arterial Smooth Muscle Cell Heterogeneity and Atherosclerosis Development

Hirofumi Hao,¹ Hatsue Ishibashi-Ueda,² Mayumi Shincho,¹ and Seiichi Hirota¹

¹Department of Surgical Pathology, Hyogo College of Medicine, Hyogo, Japan

²Department of Pathology, National Cardiovascular Center, Osaka, Japan

Key words: smooth muscle cell, heterogeneity, atherosclerosis, restenosis

SMCs in human atheromatous plaques showed the monoclonal features and this fact suggests that a predisposed medial SMC subpopulation could play an important role in the development of IT. The presence of distinct SMC subpopulation in the arterial wall revealed that SMCs show heterogeneous features. We have demonstrated that heterogeneous features of pig coronary artery SMCs *in vitro*, spindle-shaped SMCs and rhomboid SMCs. Rhomboid SMCs may be significantly linked with IT formation, at least it is in our animal model for restenosis after coronary intervention. In this review, we discuss the *in vitro* studies that demonstrate the presence of distinct SMC subpopulations in the arteries of various species, such as rat, cow, dog, pig and human. Their phenotypic features and regulation, markers for distinct SMC subpopulations and origin of heterogeneous SMC populations are described.

(*J Jpn Coll Angiol*, 2007, **47**: 307–312)

Online publication July 23, 2007

脈管学 Vol. 47, 2007