

ヒト動脈硬化症の発生，進展に関する最近の話題： 「貯留反応説」と新生血管の多面性

居石，克夫
九州大学医学研究院病理病態学分野

<https://doi.org/10.15017/13539>

出版情報：福岡醫學雜誌. 100 (1), pp.1-12, 2009-01-25. 福岡医学会
バージョン：
権利関係：

総 説

ヒト動脈硬化症の発生，進展に関する最近の話題

—「貯留反応説」と新生血管の多面性—

九州大学医学研究院病理病態学分野

居 石 克 夫

はじめに

動脈硬化の発生，進展に関する概念は，Russell Ross の「傷害反応説 (response-to-injury hypothesis)」提唱後¹⁾，普く「炎症説」²⁾に集約され今日に至っている。これは，1970年代迄の「古典的炎症説」，「脂質沈着説」，「血栓原説」，「平滑筋細胞増生説」などの諸仮説を統括するとともに，近年の分子生物学的研究により集積された細胞・組織レベルでの時・空間的相互反応を基盤とした生体反応の仕組みに関する知識をもとに，動脈硬化症の成り立ちに関する新たな研究展開をもたらしている (図1)。その結果，現在までに動脈硬化の病因論のみならず病態に加えて新規の診断法，治療法の開発とともに予防法の開発に向けた多くの進歩がもたらされた。特に，動脈硬化関連疾患 (動脈硬化症) の発症における「粥腫—血栓症 (athero-thrombosis)」の視点³⁾は，動脈硬化症の発生における血栓の病態学的意義を再認識させ，日本発のスタチン製剤は脂質代謝改善のみならず炎症反応改善効果をもたらすことが明らかにされ，また各種血管インターベンションの開発や脳梗塞発症に関連する PKC η の遺伝子多型⁴⁾などのゲノム疫学研究など，具体的な研究成果が実っている。このように，「炎症説」が動脈硬化研究の進歩に果たした役割は極めて大きい。

一方，動脈硬化の病態学的意義は，動脈硬化病変の発生，進展のみならずその還流臓器の虚血の発生と転帰に関する二つの視点から議論されねばならない。血管新生は，組織・臓器の発生，再生のみならず癌や炎症性病変における組織リモデリングならびに修復過程において極めて重要な役割を果たしている。図2に示すように，右冠動脈硬化内膜には外膜に由来する新生血管が区域性に増生している (図2左)。一方，右冠動脈主幹部の閉塞性病変に続発した後下壁心臓の心外膜と心筋層の側副血管の発達が顕著である (図2右)。

然し乍ら，ヒト動脈硬化早期病変の発生機序ならびに動脈硬化症としての臓器虚血の転帰に影響を与える臓器血管新生，特に機能的血管新生機序については多くの議論を残している。本稿では，ヒト動脈硬化早期病変の成り立ちに関する「貯留反応説」，また進展病変における血管新生の多面性について，教室で明らかにした成績を中心に概説する。

1. ヒト動脈硬化早期病変の病理学的特徴

病理総論的に「炎症」とは，組織・臓器の障害に対する一連の生体反応と定義される。実際に，臨床疫学的研究からヒト動脈硬化症の発症に関する危険因子として脂質代謝異常，高血圧，糖尿病，喫煙など多くの因子が関与していることが明らかにされ，近年，メタボリック症候群が注目されている。然し乍ら，ヒト早期病変の成り立ちに関する病理学的研究は少なく，早期動脈硬化病変における傷害組織の病理学的特徴ならびにその後の白血球浸潤を代表とする炎症性変化の引き金は必ずしも明らかにされていない。即ち，粥状動脈硬化の病理学的特徴である動脈内膜内の脂質沈着とマクロファージ浸潤は，“どちらが先

動脈硬化と炎症

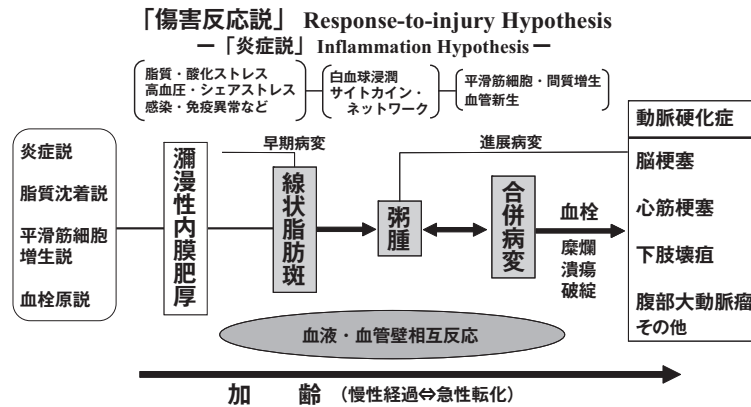


図1 ヒト粥状動脈硬化の自然史

動脈硬化と血管新生 (死後血管造影)

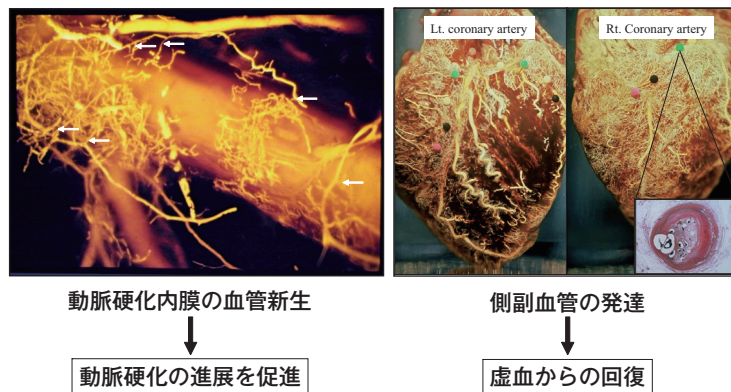


図2 動脈硬化と血管新生

剖検症例の死後冠動脈アンジオによる造影所見を提示している。
 左図) 右主幹部冠動脈の内腔周囲に網目状の新生血管が区域状に増生している。これら新生血管は外膜の小動脈としばしば連続している(矢印)。病理組織学的検索にて、これら内腔周囲に見られる新生血管の殆どは、硬化内膜内に増生していた。
 右図) 心外膜ならびに心筋層の側副血行路が右冠動脈還流領域で発達している。挿入組織所見に示すように、右冠動脈主幹部は、再疎通像を伴う器質化血栓により完全に閉塞されている。

か? ”, “始めにどこに発生するのか? ”, また “それらの由来と内膜への侵入経路は? ” など多くの疑問を残している。その理由の一つとして, 「炎症説」の出発点となった「傷害反応説」は, 家兎やげっ歯類を中心にした動脈硬化動物モデルから得られた所見を軸にして展開されてきたことにある。これら小動物モデルの病変はヒト動脈硬化病変と種々の点で異なりが有ることから, ヒト病変における臨床病理学的検証が今後も必要である。

本章では, 動脈硬化の成り立ちについて, ヒト早期動脈硬化病変の病理学的特徴を脂質沈着とマクロファージ浸潤の時間的, 空間的推移を中心に概説し, Tabas らが提唱した動脈硬化発生に関する「貯留反応説 (response-to-retention hypothesis)」⁵⁾⁶⁾の病態学的意義について「炎症説」と対比しつつ述べる。

1) 脂質沈着はマクロファージ浸潤に先行して肥厚内膜深部に発生する

ヒト粥状動脈硬化の早期病変は, 内膜肥厚と脂質沈着ならびにマクロファージの浸潤に特徴づけられる。そこで, これら内膜の病理学的早期変化を明らかにする為に, ヒト若年者の冠動脈の「び慢性内膜肥厚

(diffuse intimal thickening : DIT)」と早期動脈硬化病変 (AHA 分類⁷⁾の病変型-I と II に相当) を対象に病理学的に検索した結果⁸⁾を紹介する。

(1) 脂質沈着の部位とその時間・空間的推移に関する病理学的特徴

図3に DIT と早期動脈硬化病変の病理学的特徴, 即ち両者の形態学的移行像を示す。DIT の主な病理学的特徴は, ①規則的な平滑筋細胞と弾性線維を含む間質の増生による内膜肥厚であること, ②脂質沈着を認めないこと, ③マクロファージ浸潤は殆ど無いかあっても内膜表層に少数認められるのみであること, である (図3 a-c)。この内膜肥厚は, 小児期に, 既に, 誰にでも認められる形態変化であることから, その発生機序は不明であるものの, 一般には, 生理的な適応現象と理解されている。一方, 早期動脈硬化病変は, ①脂質の肥厚内膜深部ないし全層に認められる細胞外 (図3 e, h) と細胞内沈着 (図3 h, i), ②マクロファージの内膜内浸潤・集積 (図3 f, i), そして③これらの病理学的変化に伴う内膜の間質ならびに細胞分布の変化に特徴づけられる (図3 d, g)。因に, 細胞内脂質沈着の病理学的特徴は, 泡沫化細胞 (主にマクロファージ) の出現であり, その典型的な病型が線状脂肪斑 (AHA 分類の病型-II と III に相当) であり, その前段階の病変と考えられているのが細胞外脂質沈着のみ (AHA 病型-I に相当) の病変である。

さて, 細胞内・外脂質沈着の推移をマクロファージの浸潤のそれと対比しつつ検討すると, 図3に示すように, 先ず①細胞外脂質沈着が DIT 深部に明らかとなり (図3 e), 次いで②マクロファージ浸潤が肥厚内膜表層から深部へと進展する (図3 i) とともに③泡沫マクロファージの集簇 (図3 h, i) が肥厚内膜深部から中間部に顕著となるのが一般的である。

このことは, DIT 深部から脂質沈着が始まり, その後にマクロファージ浸潤を誘導し, 肉眼的に識別されるヒト早期動脈硬化病変として一般に受け入れられている線状脂肪斑⁹⁾が形成されることを示している。さらに, この結論は, Stary 等の AHA 分類における DIT から病型-I, -II へと進展するとした仮説⁷⁾を支持するとともに, DIT は粥状動脈硬化の発生基盤となりやすい, 即ち, 動脈硬化を発生し易い領域 (atherosclerosis-prone region) の一つであるとする考え¹⁰⁾をも裏付けることとなる。

(2) 沈着脂質とその部の内膜基質の特性: 「貯留反応説」は「炎症説」に基づくヒト早期動脈硬化の発生機序を説明する

このような DIT 深部に沈着した脂質の分布は免疫組織化学的に apoB の分布とほぼ一致しており, またその多くは酸化フォスファテдилコリンから構成されている⁸⁾ことなどから, この時期の沈着脂質の由

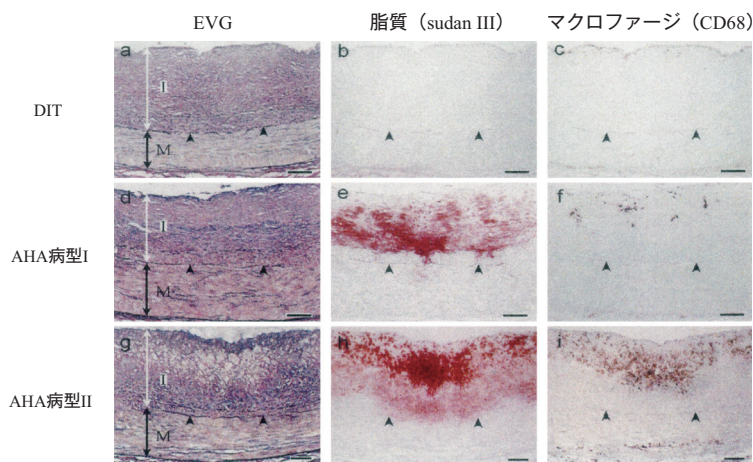


図3 ヒト冠動脈の DIT と早期動脈硬化病変における脂質沈着とマクロファージ浸潤

AHA : American Heart Association の動脈硬化病型分類 (文献-7), EVG : elastica van Gieson 染色, DIT:び慢性内膜肥厚 (diffuse intimal thickening), I : 肥厚内膜, M : 中膜, 矢印頭 : 内弾性板 (右図) 心外膜ならびに心筋層の側副血行路が右冠動脈還流領域で発達している。挿入組織所見に示すように, 右冠動脈主幹部は, 再疎通像を伴う器質化血栓により完全に閉塞されている。

来の主体は血漿脂質であり、その由来と浸潤経路は従来からの「脂質しみ込み・沈着説」で説明される。

然し乍ら、内膜にしみ込んだ脂質は上述のように肥厚内膜の細胞外に不均一に沈着し、特に中膜近くの内膜深部に強く沈着している。その後、マクロファージの浸潤、さらにはその泡沫化とともに細胞内脂質として肥厚内膜の中部ないし深部の沈着巣として光顕的のみならず肉眼的に識別されるようになる。

これらの所見を説明しうる概念が、Tabas 等が提唱した動脈硬化発生に関わる「貯留反応説 (response-to-retention hypothesis)」である⁵⁾⁶⁾。この仮説の特徴は、動脈硬化発生の初期の組織学的変化として細胞外脂質沈着の意義を明らかにしたことのみならず、この細胞外脂質沈着における内膜の部位選択性に、内膜のプロテオグリカンの変化が関与していることを指摘したことである。即ち、脂質沈着を伴い易い内膜は、バーシカン (versican) やバイグリカン (biglycan) が豊富で、デコリン (decorin) が少ない¹¹⁾とされており、また、血漿リポ蛋白-間質プロテオグリカン複合体は酸化的、非酸化的修飾を受けやすいことから¹²⁾¹³⁾、早期の細胞外沈着脂質が血管壁における炎症発生の引き金となり得ると報告されている。実際に、DIT 深部に脂質の沈着ないし貯留が始まるとともにその周囲の平滑筋細胞が MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1, 単球走化性蛋白-1) を発現していることが免疫組織化学的に証明されている⁸⁾。

従って、早期の内膜内脂質沈着に着目した「貯留反応説」は、「炎症説」に基づく動脈硬化発生の初期の機序を説明しうる概念と言える。然し乍ら、DIT 深部のプロテオグリカンの組成変化に TGF- β が関与するとの報告¹⁴⁾もあるが、その詳細な機序は未だ不明であり今後の検討課題の一つである。

2) 早期病変では、マクロファージは内膜表層から浸潤する

進展病変における単球・マクロファージの浸潤経路については古来より多くの議論がなされてきたが、後述するように、現在では内膜表層のみならず硬化内膜内の新生血管からの浸潤も重要な経路と考えられている。従って、早期病変における浸潤経路についても同様の二つの経路があり得るが、早期病変では内膜内新生血管は殆ど認められない¹⁵⁾¹⁶⁾。実際に、図 3 c, f, i に示すように、単球・マクロファージの浸潤は、DIT では内膜表層にごく僅かに認められるのみであり、その後脂質沈着が進むにつれて肥厚内膜深部へと浸潤部位が広がり、その密度が増加する。一方、中膜の内膜側と肥厚内膜深部にはこれら細胞浸潤が全く見られない。従って、早期病変では、単球・マクロファージの浸潤経路は内膜表層からと推定せざるをえない。

早期動脈硬化病変での単球・マクロファージの浸潤誘導機序については不明な点が多い。しかし、上述のように早期の脂質沈着部ないしその周囲の平滑筋細胞に MCP-1 発現を認めること、また沈着脂質の多くは酸化脂質であること⁸⁾から、酸化ストレスにより DIT 深部の平滑筋細胞が発現した MCP-1 が単球・マクロファージの内膜内への浸潤に関与している可能性が示唆される。

2. 動脈硬化の進展病変と「炎症・修復説」

動脈硬化の進展病変、特に粥腫ないしその合併病変の形成、またそれ等の転帰を決定する要因として炎症が重要であることは普く認識されている¹⁾²⁾。とりわけ粥腫 (プラーク) の不安定化に炎症が関与していることは、Davies ら¹⁷⁾の心筋虚血発生における冠動脈の責任病変に関する報告以降、以下の病理形態学的三要因、即ち、①エステル化コレステロールに富む偏在性粥腫であること、②粥腫を被覆する線維性被膜が菲薄であること、③被膜に高度なマクロファージなどの炎症細胞浸潤を認めるが、平滑筋細胞は少ないこと、が病態学的に重要であると認識され、動脈硬化症 (臓器梗塞などの動脈硬化関連疾患) の発症に炎症が関与していることは明らかである。実際に、これら病理学的コンセンサスが冠動脈病変の画像化技術の進歩とともに、破綻し易い粥腫 (不安定プラーク) の診断、治療法の決定や予防など医療の現場に応用されている。

更に、我々は、以下に述べるヒト冠動脈硬化内膜内新生血管の病理学的研究^{15)16)18)~21)}から、血管新生は動脈硬化病巣の炎症を促進するのみならず、粥腫不安定化を招来する病理学的要因の一つと考えている²²⁾ (図 2)。その理由として、プラーク内に認められる血管新生過程は、病理総論的に内膜の傷害に対す

る修復反応を意味しており、また新生血管の周囲に密な炎症細胞の集簇を伴っている病変は、動脈硬化が進行性、かつ活動性であることを示唆しているからである。従って、我々は、動脈硬化の進展、特に動脈硬化症の発生病態に関する概念として「炎症・修復説」を提唱している。

1) ヒト冠動脈硬化内膜に認められる新生血管

動脈硬化内膜に血管新生が認められることは古くから知られていたが、その形成機序や病態学的意義は不明であった。その後、過剰な血管新生は、癌のみならず慢性炎症の進展に関与していることが明らかにされてきた²³⁾が、動脈硬化内膜の新生血管については、未だ多くの議論を残している。我々のヒト冠動脈硬化内膜内新生血管の病理学的研究に基づいて、本稿では、特にその病態学的意義について述べる。

(1) 冠動脈硬化内膜内新生血管の病理学的特徴

図2左に死後冠動脈血管造影の所見を示す。網目状の増生血管が冠動脈内腔周囲に区域状に認められ、これら血管は諸処で外膜の小血管と連続している(矢印)。冠動脈壁内に認められるこれらの新生血管の殆どは動脈硬化内膜内に存在し¹⁵⁾¹⁶⁾、表1に示す病理学的特徴が認められる。主な特徴としては、①その血管壁は菲薄で、しばしば拡張した微小血管より成り、複雑に屈曲、蛇行した網目構造を呈していること、②透過性亢進によると考えられる血管周囲のフィブリン析出に加えて出血を伴っていることや血栓形成を認めることが稀でないこと、③これら新生血管はDITには認められないこと¹⁵⁾¹⁶⁾、④新生血管頻度は、硬化病変の進展と時間的、空間的に密に関連していること¹⁷⁾、⑤内膜内新生血管の殆どが外膜血管に由来していること¹⁵⁾、⑥新生血管密度はマクロファージや平滑筋細胞が発現するVEGF-A¹⁶⁾ならびにVEGF-C陽性細胞の出現頻度¹⁹⁾と有意の正相関を示すこと、⑦血管新生抑制因子の一つであるPEDF (pigment epithelium-derived factor, 色素上皮由来因子)の内膜の細胞外沈着は血管密度と負の相関を示すこと²¹⁾、などが挙げられる。これらの所見は、新生血管が動脈硬化の進展に関与し、その形成機序にVEGF-A、-C、またPEDFが関与している可能性を示唆している。

(2) ヒト硬化内膜内血管新生の病態学的意義

硬化内膜内新生血管が動脈硬化の進展に関与する主な機序としては、①内膜の栄養供給のみならず白血球細胞の浸潤経路として内膜の炎症反応の場となるとともに、②しばしば随伴する新生血管周囲のフィブリン沈着や出血による同部の凝固亢進は局所のトロンビン産生亢進、フィブリン分解産物の沈着や血小板由来増殖因子の内膜内沈着を促進して内膜での炎症を亢進させることが考えられる。さらに、③新生血管

表1 動脈硬化内膜の血管新生：病理学的特徴

1. 硬化内膜内の増生血管密度は、内腔狭窄度と局所の炎症性変化に相関する。
2. これら血管の多くは、外膜血管に由来する。
(Kumamoto M et al. Hum Pathol 26 : 450-456, 1995)
3. DIT部では血管新生を認めない。
4. 硬化内膜の新生血管は動脈硬化発生とともに出現し、その進展とともにその分布密度は増加する。とくに粥腫移行期(AHA III期)以降で増加する。
5. VEGF-A 蛋白陽性細胞の出現頻度は、動脈硬化進展と相関する。
(Chen Y-X et al. Arterioscler Thromb Vasc Biol 19 : 131-139, 1999)
6. 家兎総頸動脈中膜へのVEGF-A 遺伝子導入は、内膜肥厚と同部の血管腫様血管増生を惹起する。
(Yonemitsu Y et al. Lab Invest 75 : 313-323, 1996)
7. VEGF-C 蛋白陽性細胞の出現頻度は、動脈硬化進展と相関する。
(Nakano T et al. Hum Pathol 36 : 330-340, 2005)
8. 超早期ヒト動脈硬化内膜では、白血球細胞は内膜から浸潤する。
(Nakashima Y et al. Arterioscler Thromb Vasc Biol 27 : 1159-1165, 2007)

【硬化内膜のマクロファージ、リンパ球浸潤を伴う新生血管は、活動性炎症・修復過程の一病理形態学的指標となりうる。その発生にはVEGFs/受容体連関が関与している。】

の透過性亢進や血栓形成などによる循環不全は、粥腫の浮腫を増悪させ、また壊死コアの拡大を生じて粥腫の機械的脆弱性を促進する可能性がある。従って、我々は一般に提唱されている不安定性プラークの特徴としての病理学的三要因¹⁷⁾とともにプラーク内新生血管は粥腫の不安定性を助長してプラーク破綻の危険性を増す要因の一つとなりうると考えている(図4)。

近年、上述のプラーク内新生血管が粥腫破綻に関与しているとの我々の考えを支持する報告が相次いでいる²⁴⁾²⁵⁾(表2)。さらに、Fusterらは、スタチン治療によりプラーク内の血管新生、出血、脂質沈着やマクロファージの浸潤を抑制してプラークの安定化が促進される可能性をも示唆している²⁶⁾。

2) 動脈硬化動物モデルより得られた研究成果

実際に血管新生因子の機能を修飾すると動脈硬化の進展にどのような影響を与えるのかについて、動脈硬化動物モデルを用いて得られた最近の研究報告を紹介する(表3)。①動脈硬化動物モデルの粥腫形成期に血管新生抑制因子である TNP470, endostatin や angiostatin の投与によりプラーク進展が抑制され²⁷⁾²⁸⁾、②逆に血管新生因子(VEGF-A, -C)の投与によりプラーク形成が促進されること²⁹⁾³⁰⁾が報告されている。さらに、③可溶性 VEGF 受容体? 1 (Flt-1) 遺伝子を導入することにより動脈硬化の発生、進展が抑制されること、その理由として、可溶性 Flt-1 が VEGF の血管新生のみならず炎症惹起効果を抑制する可能性が示唆されている³¹⁾。これらの報告は、我々の「動脈硬化内膜内の血管新生は動脈硬化の進展に関与している」との仮説を支持するものであり、さらに多機能サイトカインとしての VEGF が、血管新生のみならず炎症促進にも関与していることを示唆する所見として注目される。

3. 動脈硬化症における血管新生の多面性

一方、動脈硬化を基盤として発生する臓器虚血の転帰は、側副血行路の発達により修飾される。実際に、動脈硬化により慢性虚血に陥った心臓や下肢では種々の程度の側副血行路の形成が証明される。この適応反応を応用して虚血臓器・組織を救済する目的で開発された治療法が血管新生療法である³²⁾。従って、動脈硬化症における血管新生は、動脈硬化病変での進展要因(図1左)であるとともに虚血臓器では側副血行の担い手(図1右)としての相反する二面性を同一個体で有することとなる。このことは、新規の血管新生促進もしくは抑制療法を開発、実施する際の研究戦略を決定する上で極めて重要である。

4. 虚血臓器・組織における側副血行と血管新生

最近の血管生物学の進歩とともに生理的ならびに病的血管新生機序、特に血管新生因子の同定とそれらの生物学的特性について多くの知識が集積されてきた。近年、血管新生過程には開始、成熟(維持)、退縮過程と諸段階があり、それぞれの主要分子の同定ならびに関連因子間の相互反応が注目されている³³⁾³⁴⁾。

粥状動脈硬化内膜内新生血管の病態学的意義

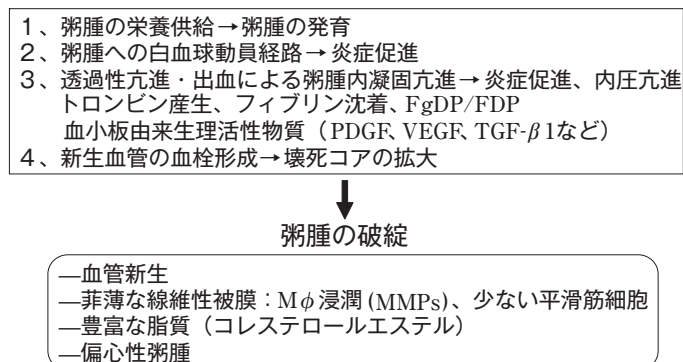


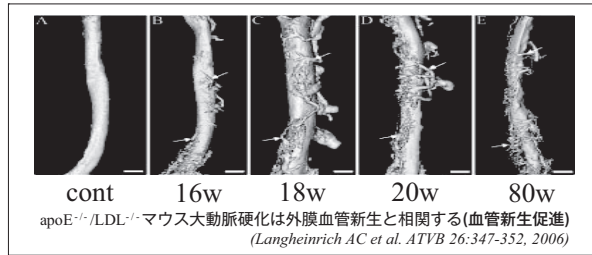
図4 ヒト粥状動脈硬化内膜内の新生血管の病態学的意義

表2 不安定プラーク(破綻し易い粥腫)の病理学的特徴

冠動脈不安定プラークの特徴	
1)	被膜のマクロファージ浸潤
2)	粥腫壊死核の大きさ
3)	内膜内新生血管の密度
4)	プラーク内出血とコレステリン結晶の量 (Virmani R et al, ATVB 2005)
大動脈不安定プラークの特徴	
1)	薄い線維被膜 (< 60μm)
2)	内弾性板の破綻
3)	線維被膜の炎症
4)	内膜内新生血管の密度
5)	沈着脂質の量 (粥腫壊死核の大きさ) (Moreno PR et al, Circulation 2004)

表3 VEGF-A, -C / 受容体連関の機能亢進は動脈硬化の進展を促進する

- 1) endostatin, TNP470, angiostatin 投与が粥腫形成を抑制 (血管新生抑制)
(Moulton KS et al. Circulation 99 : 1726-732, 1999)
(Moulton KS et al. Proc Natl Acad Sci 100 : 4736-4741, 2003)
- 2) VEGF-A, -C 投与がプラーク形成を促進 (血管新生・形成促進)
(Celletti FL et al. Nature Med 7 : 425-429, 2001)
(Nakano T et al., submitted)
- 3) *sFlt-1* 遺伝子導入は動脈硬化/実験的再狭窄を抑制 (炎症抑制)
(Zhao Q et al. Circulation 105 : 1110-1115, 2002)
(Ohtani K et al. Circulation 110 : 2444-2452, 2004)



我々は、種々の下肢虚血動物モデルを開発して、これら諸段階に關与する因子の動態を解析し、血流回復に關与する機能的側副血行路の形成機序を検討している^{20)35)~38)}。以下に、マウス急性虚血下肢モデルを用いて得られた成果、特に虚血組織における血管新生關連因子の時間的・空間的相互反応を中心に概説する。

1) 急性虚血組織における内因性血管新生因子の経時的発現

(1) マウス下肢虚血モデルの確立

下肢の重症虚血状態を再現性よく誘導できる安定したモデルとして、我々は、マウスの大腿動静脈と主要分子血管を結紮、抜去する方法で以下に述べる2種類の動物モデルを確立している。即ち、① C57BL/6 マウスに対しこの虚血誘導を行うと、手術直後にほぼ血流が遮断されるものの、その後1週間から10日の間に徐々に血流が回復し、結果的に下肢の脱落を起こさない。一方、② balbCヌードマウスにおいては再現性よく早期に下肢脱落が生じる。我々は、前者をマウス下肢救済モデル (limb salvage model)、後者をマウス下肢脱落モデル (limb auto-amputation model) としてこの分野の組織学的検索、各種遺伝子や蛋白発現とともに血流測定や薬理学的研究に利用している³⁵⁾。これらのモデルを用いることで、特に前者では虚血大腿骨格筋の種々の蛋白や遺伝子発現レベルの経時変化や血管新生遺伝子治療の血流回復効果を検討することが出来、また後者では救肢効果を判定すること等が可能である。

(2) 急性虚血組織における内因性血管新生因子の発現

図5に示すように、マウス下肢救済モデルにおける虚血直後の下肢組織では VEGF-A, FGF-2, HGF や PDGF-A 等が、また虚血後期には VEGF-C や PDGF-B 等の因子の発現が亢進しており、さら

虚血下肢局所における経時的血流回復と内因性血管新生關連因子発現パターン

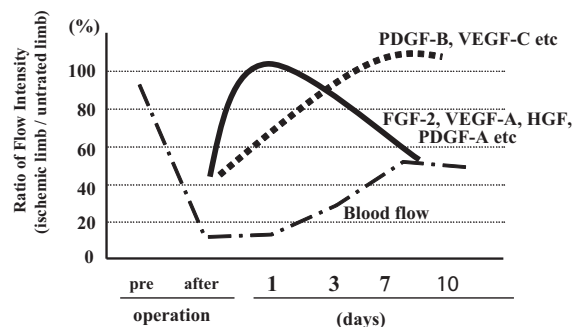


図5 虚血下肢マウスモデル (limb salvage model) の局所における経時的血流回復と内因性血管新生關連因子 mRNA の発現パターン
急性虚血後の下肢骨格筋に発現誘導される種々の内因性血管因子 mRNA を real-time PCR 法で測定し、それ等の経時的な相対的発現状況を示す。虚血後早期に FGF-2, HGF, VEGF-A や PDGF-A 等の、またその後に PDGF-B, VEGF-C 等の血管新生因子の発現増強が認められる。

にこれら因子の中和活性抗体を用いた研究等から、これら血管新生因子の何れもが虚血下肢の血流回復に不可欠であることが明らかとなった。VEGF-Aは、HIF-1活性化による低酸素誘導因子として良く知られているが、その他の因子は *in vitro* の検索結果からは必ずしも低酸素刺激が直接の誘導刺激とは考えられていない。従って、VEGF以外の因子については、これら諸因子間の協調的相互反応が間接的な発現誘導システムを構築して機能的側副血路形成に密に関与していることが示唆される。

2) 内因性血管新生因子と機能的血管新生

これら内因性血管新生因子の空間的相互作用と血流回復に関与する血管新生機構を解明する為に、短期発現型ウイルスベクターであるセンダイウイルスベクター³⁹⁾を用いて VEGF-A ならびに FGF-2 遺伝子導入を行った *in vivo*, *in vitro* の研究から³⁵⁾、① FGF-2 遺伝子導入により血流回復が明らかに促進される (図6 a) が、② VEGF-A 遺伝子導入ではこの効果が得られないこと、然し乍ら、③ FGF-2 遺伝子導入による血流回復には VEGF-A 機能の存在が不可欠であること、等が明らかとなった。さらに、VEGF-A に比して FGF-2 遺伝子導入により、④ 虚血後期の周皮細胞を伴った新生血管密度が明らかに増加していた (図6 b)。以上の所見より、FGF-2 遺伝子導入は、虚血早期の血管新生のみならず後期の新生血管の成熟を促進して、血流回復に関与する機能的血管新生を誘導していると考えられる。

3) 内因性血管新生因子の空間的相互反応

血管機能の調節には、血管壁構成細胞、即ち、内皮細胞と周皮・平滑筋細胞の空間的相互反応が重要である。FGF-2 遺伝子導入は、① 虚血誘導早期のみならず後期に発現が亢進する前述の内因性血管新生因子の全ての発現を促進する (図7) こと、② 虚血早期の FGF-2 遺伝子導入による平滑筋細胞や周皮細胞の VEGF-A や HGF の発現亢進には p42/44 mitogen activated protein kinase が、さらにこれら因子の発現持続には FGF-2 刺激による PDGF-AA/p70S6 kinase オートクライン系が関与している (図8)³⁶⁾³⁷⁾ ことが明らかとなった。一方、③ 虚血後期の VEGF-C と PDGF-B 遺伝子発現亢進機序には、平滑筋・周皮細胞と血管内皮細胞相互の空間的機能連関が関与している。即ち、平滑筋・周皮細胞が産生する VEGF-C が内皮細胞の VEGF 受容体 2, 3 を活性化して PDGF-B 産生を亢進させ、この PDGF-B が平滑筋・周皮細胞の PDGF 受容体[?]を活性化して VEGF-C の産生を促進させる正のパラクライン促進機構が存在することが明らかとなった (図9)⁴⁰⁾。

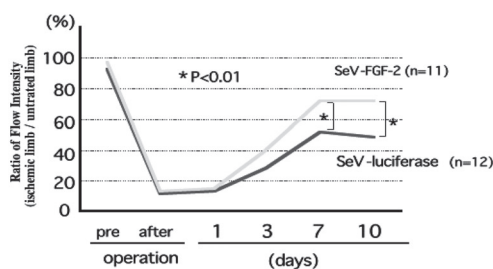


図6a

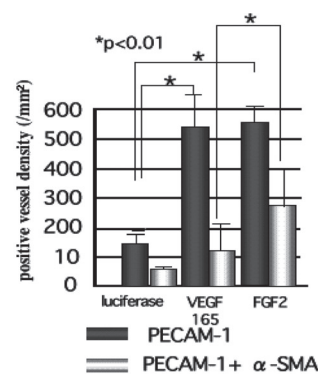


図6b

- 図6 SeV-FGF-2 遺伝子導入のマウス下肢救済モデル (limb salvage model) における血流回復効果
- レーザー ドップラー法により測定した血流の経日的回復経過を示す。SeV-FGF-2 遺伝子導入により明らかな血流回復が得られる ($p < 0.05$)。
 - SeV-VEGF₁₆₅ と SeV-FGF-2 遺伝子導入の何れも虚血組織の血管密度を増加させるが、 α -SMC 陽性細胞 (周皮・平滑筋細胞) が随伴する血管は FGF-2 遺伝子導入群で有意に促進されている。

以上の研究成果から、組織ならびに臓器虚血により誘導される内因性血管新生因子のなかで、FGF-2はこれら因子の時間的・空間的発現調節に極めて重要な因子であることが明らかとなった(図10)。また、FGF-2遺伝子導入は、虚血下肢動物モデルの救済効果が極めて高く、かつ安全であることから、現在、九大消化器・総合外科学分野(旧外科学第2)を中心に、九州大学病院でヒト下肢末梢動脈閉塞性疾患の治療に向けた安全性試験(第I~IIa相)が進められている。

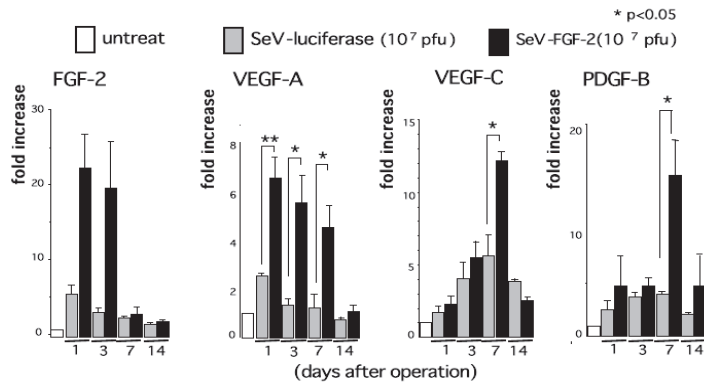


図7 SeV-FGF-2遺伝子導入はマウス下肢救済モデル(limb salvage model)における内因性血管新生因子発現を統合的に促進する急性虚血直後にSeV-FGF-2遺伝子を導入し、種々の内因性血管因子mRNAをreal-time PCR法で測定し、その経日的な相対的発現状況を示す。SeV-FGF-2遺伝子導入は、早期のFGF-2やVEGF-Aのみならず後期のVEGF-CやPDGF-B発現を顕著に促進する。

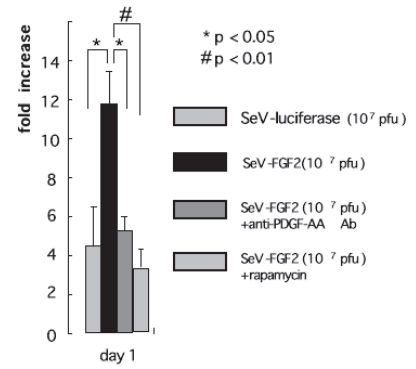


図8 SeV-FGF-2遺伝子導入により促進される内因性VEGF-A mRNA発現にはPDGF-A発現ならびにRas活性化が関与している。マウス下肢救済モデル(limb salvage model)におけるSeV-FGF-2遺伝子導入により促進されたVEGF-A mRNA発現は、抗PDGF-A活性中和抗体のみならずp70S6 kinase阻害剤であるrapamycinにより抑制される。

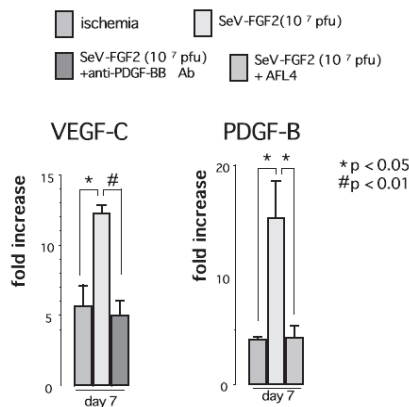


図9 SeV-FGF-2遺伝子導入は内因性VEGF-C/PDGF-B発現連携を促進する。マウス下肢救済モデル(limb salvage model)におけるSeV-FGF-2遺伝子導入により促進されたVEGF-C mRNA発現は抗PDGF-BB活性中和抗体により抑制されるとともに、同様に、PDGF-B mRNAの発現亢進は抗VEGF-C受容体活性中和抗体により抑制される。

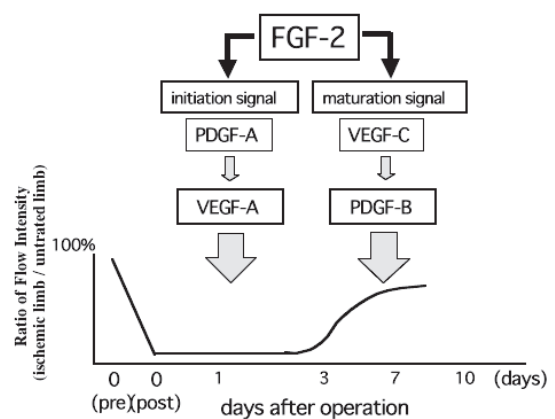


図10 FGF-2は虚血組織の血管新生ならびに血流回復の全過程を調節している。

おわりに

ヒト動脈硬化の発生、進展機構について、特に早期病変における傷害—炎症の発生機序、また進展病変ならびに虚血臓器に見られる血管新生の多面性について概説した²⁰⁾。ヒト動脈硬化は、現在、汎用されている動脈硬化動物モデルとは病理学的に多くの点で異なりがある。ヒト動脈硬化症の病態解析、適切な診断・治療ならびに予防法の確立の為には、改めて、ヒト動脈硬化の基礎的・臨床的研究が大切であることを強調したい。

参 考 文 献

- 1) Ross R : Atherosclerosis - an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340 : 115-126, 1999.
- 2) Libby P : Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420 : 868-874, 2002.
- 3) Falk E, Shah PK and Fuster V : Coronary plaque disruption. *Circulation* 92 : 657-671, 1995.
- 4) Kubo M, Hata J, Ninomiya, Matsuda K, Yonemoto K, Nakano T, Matsushita T, Yamazaki K, Ohnishi Y, Saito S, Kitazono T, Ibayashi S, Sueishi K, Iida M, Nakamura Y and Kiyohara Y : A nonsynonymous SNP in *ORKCH* (protein kinase Ch) increases the risk of cerebral infarction. *Nature Genet* 39 : 212-217, 2007.
- 5) Williams KJ and Tabas I : The response-to-retention hypothesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15 : 551-561, 1995.
- 6) Lusis AJ : Atherosclerosis. *Nature* 407 : 233-241, 2000.
- 7) Stary HC, Blankenhorn DH, Chandler AB, Glagov S, Insull W Jr, Richardson M, Resenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ and Wagner WD : A definition of the intima of human arteries and of its atherosclerosis-prone regions. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, Am Heart Association. *Circulation* 85 : 391-405, 1992.
- 8) Nakashima Y, Fujii H, Sumiyoshi S, Wight TN and Sueishi K : Early human atherosclerosis : Accumulation of lipid and proteoglycans in intimal thickening followed by macrophages infiltration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27 : 1159-1165, 2007.
- 9) Tanaka K, Masuda J, Imamura, Sueishi K, Nakashima T, Sukurai I, Shozawa T, Hosoda Y, Yoshida Y, Nishiyama Y, Yutani C and Hatano S : A nation-wide study of atherosclerosis in infants, children and young adults in Japan. *Atherosclerosis* 72 : 143-156, 1988.
- 10) Nakashima Y, Chen YX, Kinukawa N and Sueishi K : Distributions of diffuse intimal thickening in human arteries : preferential expression in atherosclerosis-prone arteries from an early age. *Virchows Arch* 441 : 279-288, 2002.
- 11) Merrilees MJ, Beaumont B and Scott LJ : Comparison of deposits of versican, biglycan and decorin in saphenous vein and internal thoracic, radial and coronary arteries : correlation to patency. *Coron Artery Dis* 12 : 7-16, 2001.
- 12) Hunt-Camejo E, Camejo G, Rosengren B, Lopez F, Ahlstrom C, Fager G and Bondjers G : Effect of arterial proteoglycans and glycosaminoglycans on low density lipoprotein oxidation and its uptake by human macrophages and arterial smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb* 12 : 569-583, 1992.
- 13) Tabas I : Nonoxidative modifications of lipoproteins in atherogenesis. *Ann Rev Nutr* 19 : 123-139, 1999.
- 14) Little PJ, Tannock L, Olin KL, Chait A and Wight TN : Proteoglycans synthesized by arterial smooth muscle cells in the presence of transforming growth factor- β exhibit increased binding to LDLs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22 : 55-60, 2002.
- 15) Kumamoto M, Nakashima Y and Sueishi K : Intimal neovascularization in human coronary atherosclerosis : Its origin and pathophysiological significance. *Hum Pathol* 26 : 450-456, 1995.
- 16) Chen YX, Nakashima Y, Tanaka K, Shiraishi S, Nakagawa K and Sueishi K : Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor (VEGF)/vascular permeability (VPF) in the atherosclerotic intimas of human coronary arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19 : 131-139, 1999.
- 17) Davies MJ and Thomas AC : Plaque fissuring—the cause of acute myocardial infarction, sudden ischemic death, and crescendo angina. *Br Heart J* 53 : 363-373, 1985.
- 18) Sueishi K, Yonemitsu Y, Nakagawa K, Kaneda Y, Kumamoto M and Nakashima Y : Atherosclerosis and angiogenesis. Its pathophysiological significance in humans as well as in an animal model induced by the gene transfer of vascular endothelial growth factor. *Ann NY Acad Sci* 811 : 311-324, 1997.

- 19) Nakano T, Nakashima Y, Yonemitsu Y, Sumiyoshi S, Chen YX, Akishima Y, Ishii T, Iida M and Sueishi K : Angiogenesis/lymphangiogenesis and expression of lymphangiogenic factors in atherosclerotic intima of human coronary arteries. *Hum Pathol* 36 : 330-340, 2005.
- 20]** Sueishi K, Onimaru M and Nakashima Y : Atherosclerosis and angiogenesis : Double face of neovascularization in atherosclerotic intima and collateral vessels in ischemic organs. *Recent Advances in Thrombosis and Hemostasis*, Tanaka K and Davie EW (eds), Springer-Japan, Tokyo, 374-386, 2008.
- 21) Baba H, Yonemitsu Y, Nakano T, Onimaru M, Miyazaki M, Ikeda Y, Sumiyoshi S, Ueda Y, Hasegawa M, Yoshino I, Maehara Y and Sueishi K : Cytoplasmic expression and extracellular deposition an antiangiogenic factor, pigment epithelium-derived factor, in human atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25 : 1938-1944, 2005.
- 22) 居石克夫 : 血管リモデリングの病理—血管内皮細胞の機能からみた病態解析と臨床研究への応用— 日本病理学会会誌 92 : 55-73, 2003.
- 23) Folkman J and Klagsbrun M : Angiogenic factors. *Science* 235 : 442-447, 1987.
- 24) Moreno PR, Purushothaman KR, Fuster V, Echeverri D, Trusczyńska H, Sharma SK, Badimon JJ and O'Connor WN : Plaque neovascularization is increased in ruptured atherosclerotic lesions of human aorta : Implications for plaque vulnerability. *Circulation* 110 : 2032-2038, 2004.
- 25) Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Finn AV, Gold HK, Tulenko TN, Wrenn SP and Narula J : Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture : Angiogenesis as a source of intraplaque hemorrhage. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25 : 2054-2061, 2005.
- 26) Pucci A, Sheiban I, Formato L, Celeste A, Brscic E, Moretti C, De Bernardi A, Alberti A, Bergamasco L, Trevisan G and Fuster V : In vivo coronary plaque histology in patients with stable and acute coronary syndromes. relationships with hyperlipidemic status and statin treatment. *Atherosclerosis* 194 : 189-195, 2007.
- 27) Moulton KS, Heller E, Konerding MA, Flynn E, Palinski W and Folkman J : Angiogenesis inhibitors endostatin or TNP-470 reduce intimal neovascularization and plaque growth in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 99 : 1726-1732, 1999.
- 28) Moulton KS, Vakili K, Zurakowski D, Soliman M, Butterfield C, Sylvan E, Lo KM, Gillies S, Javaherian K and Folkman J : Inhibition of plaque neovascularization reduces macrophages accumulation and progression of advanced atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 100 : 4736-4741, 2003.
- 29) Celletti FL, Waugh JM, Amabile PG, Brendolan A, Hilfiker PR and Dake MD : Vascular endothelial growth factor enhances atherosclerotic plaque progression. *Nat Med* 7 : 425-429, 2001.
- 30) 中野敏昭, 鬼丸満穂, 米満吉和, 岡野慎士, 居石克夫 : 血管新生因子 VEGFs による動脈硬化進展に関する病態学的研究. 日本病理学会会誌 96 : 220, 2007.
- 31) Zhao Q, Egashira K, Inoue, Usui M, Kitamoto S, Ni W, Ishibashi M, Hiasa K, Ichiki T, Shibuya M and Takeshita A : Vascular endothelial growth factor is necessary in the development of arteriosclerosis by recruiting/activating monocytes in a rat model of long-term inhibition of nitric oxide synthesis. *Circulation* 105 : 1110-1115, 2002.
- 32) Carmeliet P : Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature (Review)* 438 : 932-936, 2005.
- 33) Carmeliet P : Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 9 : 653-660, 2003.
- 34) Fukuhara S, Sako K, Minami T, Noda K, Kim HZ, Kodama T, Shibuya M, Takakura N, Koh GY and Mochizuki N : Differential function of Tie2 at cell-cell contacts and cell-substratum contacts regulated by angiopoietin-1. *Nat Cell Biol* 10 : 513-526, 2008.
- 35]** Masaki I, Yonemitsu Y, Yamashita A, Sata S, Tani M, Komori K, Nakagawa K, Hou X, Nagai Y, Hasegawa M, Sugimachi K and Sueishi K : Angiogenic gene therapy for experimental critical limb ischemia ; acceleration of limb loss by overexpression of vascular endothelial growth factor 165 but not fibroblast growth factor-2. *Circ Res* 90 : 966-973, 2002.
- 36]** Onimaru M, Yonemitsu Y, Tani M, Nakagawa K, Masaki I, Okano S, Ishibashi H, Shirasuna K, Hasegawa M and Sueishi K : Fibroblast growth factor-2 gene transfer can stimulate hepatocyte growth factor expression irrespective of hypoxia-mediated down regulation in ischemic limb. *Circ Res* 91 : 923-930, 2002.
- 37) Tsutsumi N, Yonemitsu Y, Shikada Y, Onimaru M, Tani M, Okano S, Kaneko K, Hasegawa M, Hashizume M, Maehara Y and Sueishi K : Mechanism of angiogenic actions of rapamycin : an essential role of PDGFRA signaling in mesenchymal cells during in vivo angiogenesis. *Circ Res* 94 : 1186-1194, 2004.
- 38]** Tani M, Yonemitsu Y, Fujii T, Shikada Y, Kohno R, Onimaru M, Okano S, Inoue M, Hasegawa M, Onohara T, Maehara Y and Sueishi K : Diabetic microangiopathy in ischemic limb as a disease of disturbance of the

platelet-derived growth factor-BB/protein kinase C axis but not of impaired expression of angiogenic factors. Circ Res : 98 : 55-62, 2006.

- 39] Yonemitsu Y, Kitson C, Ferrari S, Farley R, Griesenbach U, Dian J, Steel R, Phillippe S, Zhu J, Jeffery PK, Kato A, Hasan MK, Masaki I, Nagai Y, Fukumura M, Hasegawa M, Geddes DM and Alton EW : Efficient gene transfer to the airway epithelium using recombinant Sendai virus. Nat Biotechnol 18 : 970-973, 2000.
- 40) 鬼丸満穂, 米満吉和, 谷井 貢, 中野敏昭, 向野利一郎, 藤井孝明, 居石克夫 : マウス虚血下肢への FGF-2 遺伝子導入における VEGF-C/FLT-4 連関ならびに PDGF-BB/PDGF-b 連関のパラクライン的相互作用. 日本病理学会誌 95 : 228, 2006.

(参考文献のうち、数字がゴシック体で表示されているものについては、著者により重要なものと指定された分です.)

プロフィール

居石 克夫 (すえいし かつお)

九州大学教授 (大学院医学研究院基礎医学部門病態制御学講座病理病態学分野)

◆**略歴** : 1945 年生まれ, 1970 年九州大学医学部医学科卒業, 1970-72 年九州大学医学部附属病院小児科研修医, 1972-76 年九州大学大学院医学系研究科 (病理学講座第 1), 1976-80 年九州大学医学部病理学第 1 助手, 1978-80 年 University of California, San Francisco, Cardiovascular Research Institute 研究員, 1980-83 年九州大学医学部病理学第 1 講師, 1983-85 年九州大学医学部附属病院病理部助教授, 1985 年より現職.

◆**趣味** : スポーツ (球技), 家庭菜園, ドライブ