

大動脈瘤形成機序に関する実験的ならびに臨床的研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9446

大動脈瘤形成機序に関する実験的ならびに臨床的研究

金沢大学医学部医学科外科学第一講座 (主任: 渡辺洋宇教授)

原 田 猛

大動脈瘤は細胞外マトリクス成分の破壊に伴う動脈壁の脆弱化によって生ずる。ウロキナーゼなどの線溶系因子は血栓溶解に直接作用するほか、マトリクス分解酵素活性化カスケードの初期因子としての機能を担い細胞の遊走、組織構築、創傷治癒などにも深く関与することが明らかにされている。本研究では動脈硬化性大動脈瘤形成において局所線溶活性の果たす役割を検討する目的で、実験的にラットに腹部大動脈瘤作成を行い、また、手術時に採取された腹部大動脈瘤壁、閉塞性動脈硬化症の大動脈壁を用いて免疫組織染色、ザイモグラフィ、酵素産生量の測定、エラスターゼ活性の測定を行った。ラットの実験においてプラスミン、ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター (urokinase-type plasminogen activator, u-PA)、組織型プラスミノゲンアクチベーター (tissue-type plasminogen activator, t-PA) の単独投与で動脈壁の破壊は起こらず、拡張性変化もきたさなかった (14日後平均大動脈径1.35mm)。これらにチオグリコレート処置を加えるとプラスミン追加群 (14日後平均大動脈径3.34mm)、または u-PA 追加群 (14日後平均大動脈径2.52mm) では瘤化が起り、t-PA 追加群では動脈壁に変化は認めなかった。瘤化した動脈組織は中膜弾性線維の断裂及び菲薄化が認められた。ゼラチンザイモグラフィの結果、瘤化した組織には92kDa, 72kDa, 66kDa, 60kDaの部位にゼラチン分解活性を認め、全てのバンドにおいて対照ラットと比較し増幅を認めた。92kDaはマトリクスメタロプロテイナーゼ (matrix metalloproteinase, MMP)-9, 72kDa, 66kDa, 60kDaはMMP-2による分解活性と考えられた。ヒト腹部大動脈瘤組織と閉塞性動脈硬化性大動脈組織の培養上清中のエラスターゼ活性を測定した結果、大動脈瘤全体と閉塞性動脈硬化性病変とではエラスターゼ活性に有意差を認めなかったが、瘤径を6cmで2群に分けると瘤径6cm未満群において内、中、外膜の全ての層が閉塞性動脈硬化性病変に対して有意にエラスターゼ活性が高く認められた。瘤径6cm未満群は瘤径6cm以上の群に対しても有意にエラスターゼ活性が高く認められた。中膜培養上清中のu-PA, t-PA, プラスミノゲンアクチベーターインヒビター (plasminogen activator inhibitor, PAI)-1の量の検討では、u-PA量は瘤径6cm未満の大動脈瘤中膜組織群 (平均220.5ng/g) で閉塞性動脈硬化性病変群 (平均187.7ng/g) に比べて有意に高値を示した ($P < 0.05$)。また、u-PA量は瘤径での比較でも瘤径6cm未満群が瘤径6cm以上群 (平均160.3ng/g) に比べて有意に高値を示した ($P < 0.05$)。t-PA量は大動脈瘤で平均300.8ng/g、閉塞性動脈硬化性病変では252.0ng/gで有意差はなく、PAI-1量は大動脈瘤は4252.3ng/gで、閉塞性動脈硬化性病変の2614.5ng/gより有意に高値を示した ($P < 0.01$)。大動脈瘤壁のt-PA, PAI-1量は瘤径との相関は認めなかった。免疫組織染色上、内膜では粥状硬化の周辺部に存在する泡沫細胞、紡錘形細胞、類円形細胞の胞体にu-PA, ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター受容体 (receptor for urokinase-type plasminogen activator, u-PAR), t-PAが多数の細胞に強く染色されていた。それに比べてPAI-1の陽性細胞は少数であった。中膜の紡錘形細胞にもu-PA, u-PAR, t-PAが多く陽性であった。PAI-1も中膜の紡錘形細胞に弱く陽性であった。以上の研究結果から、実験的にラットにおいてu-PAで瘤作成が可能であること、臨床的に瘤径が小さなヒト腹部大動脈瘤の中膜にu-PAの増加が認められ、かつエラスターゼ活性が上昇していることが明らかにされ、u-PAが大動脈瘤形成の一因であることが示唆された。

Key words abdominal aortic aneurysm, atherosclerosis, plasminogen activator, matrix metalloproteinase

大動脈瘤は、大動脈中膜のエラスチンが断裂破壊され中膜が菲薄化し血圧にて進展され、異常拡張した状態である。大動脈壁構造の形状維持を担うのは主に中膜で、中膜エラスチンやコラーゲンが動脈壁に弾性および抗張力をもたらしている¹⁾²⁾³⁾。これらの線維の崩壊は大動脈壁の脆弱化をきたし大動脈の拡張をもたらすと考えられるが、その過程において細胞外マトリクスの主要構成蛋白質であるエラスチンやコラーゲンに作用する

マトリクス分解酵素が関与していると考えられている。なかでもマトリクスメタロプロテイナーゼ (matrix metalloproteinase, MMP) と呼ばれる一群の酵素群は生体内のほとんど全ての細胞外マトリクス成分を中性域で分解する。特に大動脈瘤発生ではマクロファージから産生されるゼラチナーゼB (MMP-9) がエラスチンその他の細胞外マトリクス成分を分解することにより瘤形成に関与した役割を果たしている⁴⁾。

平成11年8月11日受付, 平成11年10月1日受理

Abbreviations: EVG, elastica van Gieson; MMP, matrix metalloproteinase; NEM, N-ethylmaleimide; OPD, ortho-phenylenediamine; PAI, plasminogen activator inhibitor; PET, PBS-EDTA-Tween20; PMSF, phenylmethanesulfonyl

MMP群はそれぞれ異なった基質特異性を持ち、種々の細胞で潜在型酵素として分泌され細胞外で活性化される。潜在型MMPの活性化にはプラスミンが最初の引金として作用していると考えられている⁵⁾⁶⁾。プラスミンは間質コラゲナーゼ(MMP-1)、ストロムライシン(MMP-3)およびMMP-9を活性化することができるが、プラスミンのMMP-1やMMP-9に対する直接的な活性化能は弱く、最終的な活性化にはMMP-3が主に作用しプラスミン(またはトリプシン)→MMP-3→MMP(MMP-1, MMP-9)という潜在型酵素の活性化カスケードが最近では考えられている。

細胞外マトリクス分解酵素の1つであるウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター(urokinase-type plasminogen activator, u-PA)はプラスミノゲンを限定分解し、酵素的に活性なプラスミンへと変換する。u-PAは活性部位にセリン残基をもつことよりセリンプロティナーゼとして分類される。u-PAにより活性化されたプラスミンはフィブリン、IV型およびV型コラーゲンなどを基質とするほか、プラスミノゲン、PA、MMPなどの潜在型酵素を活性化する。u-PAの他、PAには組織型プラスミノゲンアクチベーター(tissue-type plasminogen activator, t-PA)が存在し、それぞれは構造的にも機能的にも異なる。

u-PAを含めた線溶活性は血栓溶解に直接作用するほか、マトリクス分解酵素活性化カスケードの初期因子として機能するため細胞の遊走⁷⁾⁸⁾、組織構築、創傷治癒⁹⁾、排卵や着床現象などにも深く関与することが明らかにされた¹⁰⁾。また、腫瘍細胞の悪性化に伴う線溶活性の亢進は古くから注目され、浸潤性増殖における組織破壊と密接な関連があることが示唆されてきた。現在ではPAを多くの癌細胞が分泌していることが証明されている¹¹⁾。しかし大動脈瘤と線溶系因子の関係を論じた研究は少なく¹²⁾¹³⁾¹⁴⁾、仮説の域を出ない。本研究では特に弾性線維の破壊に関わる細胞外マトリクス分解酵素としてu-PAに焦点を当て、組織破壊における線溶系因子の役割について検討した。

材料および方法

I. 大動脈瘤形成の実験的検討

1. 実験動物

生後10週齢、体重300～320gのウイスター系雄ラットを実験に用いた。

2. 実験方法

Anidjarら¹⁵⁾¹⁶⁾の方法に従い、6%ペントバルビタールナトリウム(投与量0.1ml/100mg体重)を腹腔内投与し麻酔した後、手術台に仰臥位で固定し腹部正中切開にて開腹した。手術用顕微鏡使用下に腹部大動脈を下大静脈より剥離し、分枝である腰動脈および下腸間膜動脈を腹部大動脈左腎静脈横走部より尾側へ総腸骨動脈分岐部まで結紮した。次に左鼠径部を縦切開し、ポリエチレンカテーテルを左大腿動脈より腎動脈下腹部大動脈に留置した(図1)。腹部大動脈を左腎静脈下で微小血管鉗子をかけ、さらにここより1cm尾側に絹糸を二重に通して遮断した。カテーテルを通じu-PA(600 IU/ml)(Sigma, St. Louis, USA)、t-PA(50,000 IU/ml)(Sigma)、プラスミン(1 IU/ml)(Sigma)、

マクロファージ活性化物質であるチオグリコレート(1mg/ml)(Sigma)又は生理食塩水を100mmHg圧にて1時間浸透させた。灌流終了後大動脈遮断を解除、カテーテルを抜去し、左大腿動脈を結紮し創を縫合閉鎖した。普通飼料自由水にて飼育し、1, 2, 3, 5, 7, 9, 11, 14日後に後述の如く標本を摘出した。6%ペントバルビタールナトリウムを腹腔内投与し麻酔を行い、前回手術創より切開開腹した。大動脈を遊離し腎動脈下腹部大動脈での最大横径を自然拍動下にて測定した。横径測定後、6%ペントバルビタールナトリウムを急速に静注し深麻酔にて屠殺、腎動脈下腹部大動脈より総腸骨動脈分岐部まで摘出した。摘出した大動脈片は縦切開し二分割した。一方を組織標本に、他方をザイモグラフィに供した。

3. 実験群の設定

ラットは生理食塩水群、u-PA群、t-PA群、プラスミン群、チオグリコレート群、u-PA加チオグリコレート群、t-PA加チオグリコレート群、プラスミン加チオグリコレート群の8群に分けた。まず大動脈瘤の形成の有無を調べるために各々5匹を手術後14日目に犠牲死させた。次いで瘤形成をみた群において径時の変化をみるために1, 3, 5, 7, 9, 11日目に各々2匹を犠牲死させた。また、コントロールとして生理食塩水群で1, 3, 7日に、チオグリコレート群で1, 3, 5, 7, 9, 11日に各々2匹を犠牲死させ径時の変化をみた。

4. 組織標本の作成

上述した方法で得られたラット腹部大動脈標本を直ちに10%中性緩衝ホルマリン液に投入し6～24時間固定後、パラフィン包埋した。パラフィン切片はH E染色およびエラスチカ・ワンギーソン(elastica van Gieson, EVG)染色を行い、光学顕微鏡的に観察した。

5. ラット腹部大動脈組織内ゼラチン、 α -エラスチン分解パターンの検討

ラットの初回開腹3, 5, 7, 11, 14日後及び無処置のラット腹部大動脈切片をPolytron(Kinematica, Switzerland)を用いて0.1Mリン酸緩衝液中に懸濁し、採取後、10,000rpm、5分間遠心してその上清を-80℃で保存した。Hibbsら¹⁷⁾の方法に従い、ゼラチン(2mg/ml)を含むポリアクリルアミドゲル(8%アクリルアミド)を作成し、上述した培養上清を非還元状態、4℃で電気泳動した。培養上清の量は培養の際に用いた組織の乾燥重量が一定となるように調整した。ゲルを洗浄用緩衝液(50mM Tris-HCl, 1mM ZnCl₂, 2.5%トリトンX, 0.02%NaN₃, pH7.5)で洗浄した後、Tris-NaCl-Ca(TNC)緩衝液(50mMol Tris-HCl, 0.15M NaCl, 10mM CaCl₂, 2.5%トリトンX, 0.02%NaN₃, pH7.5)中に37℃で17時間反応させた。ゲルはクマシーブリリアントブルーで染色した後脱色しゼラチン分解パターンを検討した。分子量標準マーカーとして、ホスホリラーゼb(94kDa)(Sigma)、ヒトトランスフェリン(77kDa)(Sigma)、ウシ血清アルブミン(68kDa)(Sigma)、ヒト免疫グロブリン重鎖(55kDa)(Sigma)、卵白アルブミン(43kDa)(Sigma)、カルボニックアンヒドラーゼ(29kDa)(Sigma)を用いてそれぞれの消化バンドの蛋白分子量を算定した。同様に α -エラスチン(1.2mg/ml)を含むポリアクリルアミドゲル(8%アクリルアミド)を作成して、培養上清の電気泳動を行い α -エラスチン分解活性の検討

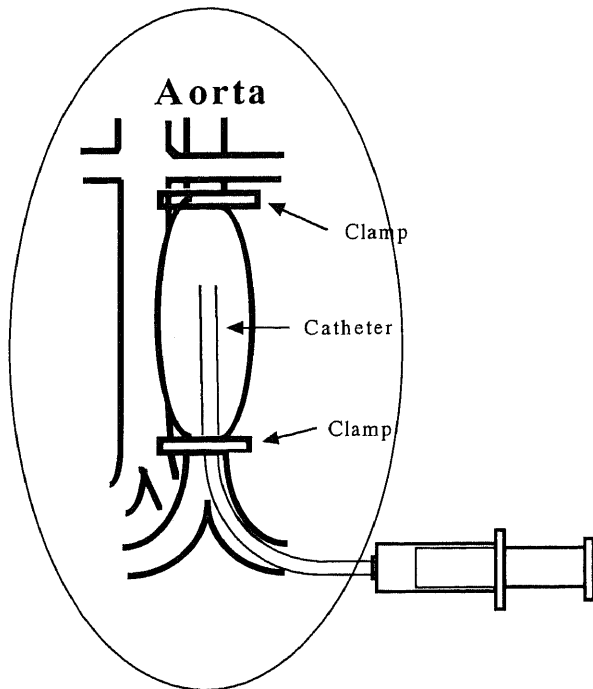


Fig. 1. Schematic representation of rat aortic perfusion model with isolation of the catheter tip within the infrarenal aorta.

を行った。

6. 酵素抑制試験

ゼラチンサブストレートゲルに培養上清の同一試料を5レーン泳動し、各レーンを切り離した。そのゲルのひとつをTNC緩衝液にて、37℃、17時間反応させ残りのゲルをEDTA20 mM、セリンプロテアーゼ阻害剤のフェニルメタンсульフォニルフルオリド (phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF) 2mM、システインプロテアーゼ阻害剤のN-エチルマレイמיד (N-ethylmaleimide, NEM) (Sigma) 5mM、またはアスパラギン酸プロテアーゼ阻害剤のペプスタチンA (Sigma) 0.5mM 存在下のTNC緩衝液中で同様に反応させて比較した。

II. 大動脈瘤形成の臨床的検討

1. 大動脈瘤壁と対照群大動脈壁組織

当科および関連施設において腹部大動脈瘤手術の際に切除した腎動脈下大動脈瘤壁組織24例を材料とした。対照として下肢閉塞性動脈硬化症に対し腹部大動脈-末梢動脈バイパス術を要した症例において吻合口作成時に切除された腎動脈下大動脈壁の粥状動脈硬化巣16例を用いた。腹部大動脈瘤症例の内訳は、男性17例、女性7例で、その年齢は60~88歳で平均年齢は74.2±8.1歳であった。下肢閉塞性動脈硬化症症例は、男性13例、女性3例で、年齢は49~73歳、平均年齢は63.1±7.6歳であった。これらの大動脈組織は一部は培養用に保存し、残りを過ヨウ素酸-リジン-バラホルムアルデヒド固定液にて1日間固定後、パラフィン包埋した。パラフィン切片はHE染色およびEVG染色を行い、光学顕微鏡的に観察した。

2. 組織培養上清中のエラスターゼ活性

大動脈瘤壁組織および対照群大動脈壁組織を無菌的に内臓に付着した壁を血栓を除去した後で内臓、中臓、外臓にそれぞれ

分離し、1×1×1mm大に細切した。その組織片10個を0.2%ラクトアルブミン水解物 (Gibco, New York, USA) 含有RPMI培地1640液 (Gibco) 2ml 中で37℃24時間培養した。培養液を採取後、10,000rpm、5分間遠心し、その上清を-80℃で保存した。組織片は凍結乾燥して重量を測定した。Biethら¹⁸⁾の方法に準じ、培養上清中のエラスターゼ活性を測定した。培養上清0.1mlに0.05% TNC緩衝液2.4ml加え、基質として125mM サクシニル-L-アラニル-L-アラニル-L-アラニン-p-ニトロアニリンのN-メチルピロリドン溶液20μlを加え、ガラス棒で攪拌後、25℃で410nmの吸光度増加を2~3分間測定した。分解活性は培養に使用した乾燥組織重量1g当たり、及び単位時間当たりの生成したp-ニトロアニリンのモル数で示した。吸光度のp-ニトロアニリンへの換算には、NA分子吸光度係数8800を用いた。

3. ゼラチン、α-エラスチンサブストレートゲルによる分解パターンの検索

上述したHibbsら¹⁷⁾の方法にて、凍結保存上清をゼラチン、α-エラスチンサブストレートゲルによる分解パターンの検討を行った。

4. 酵素抑制試験

上述した方法にて、酵素抑制試験を行った。

5. 中膜組織培養上清中のu-PA、t-PA、PA阻害因子(plasminogen activator inhibitor, PAI)-1の定量

大動脈瘤壁中膜組織および対照群大動脈壁中膜組織の培養上清中のu-PA、t-PA、PAI-1濃度をELISA法にて測定した。u-PA測定にはTint Elise uPA (Biopool, Umea, Sweden) を用いた。予め、抗ヒトu-PAモノクローナル抗体のコーティングされたマイクロプレートの各ウェルにPBS-EDTA-Tween20 (PET) 緩衝液100μlを分注し、1分間震盪した後、培養上清50μlを加え、室温にて2時間震盪しながら反応させた。次にペルオキシダーゼ標識抗ヒトuPA-IgGを50μl加え室温にて1時間反応させた後、PET緩衝液にて4回洗浄した。o-フェニレンジアミン二塩酸塩 (ortho-phenylenediamine, OPD) にて暗所で30分間発色した後、3M硫酸で反応を停止し、イムノリーダー-ER-8000 (三光純薬、東京) にて490 nmにおける吸光度を測定し、標準曲線をもとにサンプル中のu-PA濃度を測定した。

t-PA測定には、Imulyse tPA (Biopool) を用いた。ヤギ抗ヒトt-PAを、0.1Mの炭酸水素ナトリウムで0.01 mg/mlの濃度に希釈し、マイクロプレートの各ウェルに200μl分注し、25℃にて16~18時間反応させた後、PET緩衝液で4回洗浄した。マイクロプレートの奇数のウェルにはPET緩衝液で12.5μl/mlに希釈した正常ヤギイムノグロブリンを、偶数のウェルにはPET緩衝液で12.5μl/mlに希釈したヤギ抗ヒトtPA抗体をそれぞれ150μl分注し、さらに全ウェルに検体を10μl加え室温でマイクロミキサーを用い3時間反応させた。次にペルオキシダーゼ標識抗ヒトt-PA IgG50μlを各ウェルに分注し、2時間反応させた後、PET緩衝液で4回洗浄した。OPDにて暗所で30分間発色した後、4.5 M硫酸を50μlを加え反応を停止し、イムノリーダーにて490 nmにおける吸光度を測定し、標準曲線をもとにサンプル中のt-PA濃度を測定した。

PAI-1測定には、PAI-1 ELISA kit (Monozyme, Hørsbol, Denmark) を用いた。マイクロプレートに抗体をコーティングした後、培養上清0.1mlを加え、4℃で一晩おきPBS緩衝液で洗浄後ビオチン化抗体液を分注し室温で1時間反応させ、PBS

緩衝液で洗浄後、わさびペルオキシダーゼ標識アビジン液を添加、室温で1時間反応させ洗浄、基質を100 μ l分注し3分後に反応停止液として4.5Mの硫酸を50 μ l分注し、25°Cでの490nmの吸光度増加をイムノリーダーER-8000にて2~3分間測定した。

測定したu-PA, t-PA, PAI-1の量は培養に用いた組織の乾燥重量1g当たりのng数で表わした。

6. 大動脈壁組織の免疫組織染色

対象組織はホルマリン固定パラフィン包埋し、4 μ mで5枚の連続薄切標本を作成し、シランコーティングスライド(武藤化学,東京)に付着させた。1枚はHE染色を施し、残る4枚についてそれぞれu-PA, ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクテター受容体 (receptor for urokinase-type plasminogen activator, u-PA), t-PA, PAI-1に対する免疫組織化学染色を行った。免疫組織化学染色は標識化ストレプトアビジン-ビオチン法にて行った。まず薄切標本をキシレン(和光純薬,大阪)にて10分間、3回の脱パラフィンを行った後に100%エタノール(和光純薬)3層、90%エタノール、70%エタノールの順に各層20回の震盪を行った後、水道水で1分間流水水洗し親水させた。PBS (pH7.2) (日本製薬,東京)に浸し、0.1%トリプシン溶液 [トリプシン (Sigma) 10mg, 塩化カルシウム (和光純薬) 10mg, 0.05M Tris-HCl 緩衝液 (pH7.6) 10ml] に30分間浸し、抗原の賦活を行った。3%過酸化水素加PBSにて15分間内因性ペルオキシダーゼのブロッキングを行い、流水にて10分間洗浄した後ウシ血清アルブミン (ダコ・ジャパン, 京都) にて10分間非特異的反応のブロッキングを行った。一次抗体はそれぞれ抗u-PA抗体, 抗u-PA抗体, 抗t-PA抗体, 抗PAI-1抗体 (American diagnostica inc., Greenwich, USA) をPBSにて, $\times 200$, $\times 50$, $\times 40$, $\times 20$ に希釈し, 4°Cで一晩反応させた。PBSにて5分間、3回洗浄した後、ビオチン標識抗マウスイムノグロブリンヤギ抗体 (ダコ・ジャパン), ビオチン標識抗ウサギイムノグロブリンヤギ抗体 (ダコ・ジャパン) を30分間室温にて反応させ, PBSにて5分間、3回洗浄しペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (ダコ・ジャパン) を30分間室温にて反応させ, PBSにて5分間3回洗浄した。LSAB反応終了後、四塩酸3, 3ジアミノベンチジン (和光純薬) にて約5分間発色し, 水道水にて10分間流水水洗し, マイヤーヘマトキシリンにて対比染色を行った後, エタノール, キシレンにて脱水, 透徹を行い封入した。

III. 統計学的処理

ラット腹部大動脈径の測定値は平均値 \pm 標準誤差で示し, エラスターゼ活性, u-PA, t-PA, PAI-1量の測定値は平均値 \pm 標準偏差で示した。有意差検定には, 2群の比較にはMann-Whitney検定を, 3群以上の検定にはKruskal-Wallis検定を用いた。危険率, $P < 0.05$ をもって有意とした。

成 績

I. 大動脈瘤形成の実験的検討

1. ラット腹部大動脈径の経時的变化(図2)

初回開腹時のラット腹部大動脈径の平均値は1.18 \pm 0.12mm (n = 88)であった。生理食塩水灌流ラットでは灌流前1.18 \pm 0.12mmから灌流終了時(1時間後)に1.78 \pm 0.42mm (n = 11)と大動脈径が拡張したが1日後では平均1.50mm (n = 2)となりその後は拡張性変化を認めなかった。

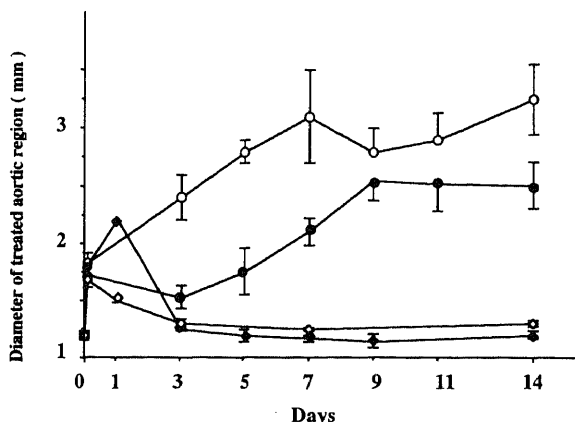


Fig. 2. Diameter of rat aortas before and after treatments: ◇, physiologic saline; ●, thioglycolate plus urokinase-type plasminogen activator; ◆, thioglycolate plus tissue-type plasminogen activator; ○, thioglycolate plus plasmin. Data are $\bar{x} \pm$ SEM.

チオグリコレート灌流ラット, プラスミン灌流ラット, u-PA灌流ラット, t-PA灌流ラット, チオグリコレート加t-PA灌流ラットでは生理食塩水灌流ラットと同様の経過(14日後平均大動脈径1.35 \pm 0.35mm)であり, 拡張性変化を認めなかった。

チオグリコレート加プラスミン灌流ラットでは灌流終了時の大動脈径は生理食塩水灌流ラットなど他と同様の拡張を示し, 続く7日後(平均大動脈径3.18 \pm 0.33mm)まではほぼ一定の速度で大動脈は拡張した。7日後以降は穏やかな拡張性変化を認めた(14日後平均大動脈径3.34 \pm 0.26mm)。

チオグリコレート加u-PA灌流ラットでは灌流終了時に拡張した大動脈径は, 他の拡張性変化を認めなかった群と同様に術3日後まで緩やかに縮小したが5日後には再拡張に転じ(平均大動脈径1.75 \pm 0.18mm), 9日後(平均大動脈径2.54 \pm 0.20mm)まで一定の速度で拡張を続けた。9日以降はさらなる拡張は認めなかった(14日後平均大動脈径2.52 \pm 0.24mm)。

2. ラット腹部大動脈壁の組織学的検討

HE染色およびEVG染色を行い, ラット腹部大動脈壁を光学顕微鏡で観察した(図3)。生理食塩水灌流ラットでは, HE染色では大動脈壁はいずれも軽度の粥状硬化症を呈しており, 内膜の表面にはわずかに血栓の付着も認められた。チオグリコレート加プラスミン灌流ラットでは3日目に全層性に炎症細胞の浸潤があり, 弾性線維の断裂が認められた。7日目では弾性線維は菲薄化し, 11日目ではほとんど消失し痕跡のみと化した部位も認められた。チオグリコレート・u-PA灌流ラットではチオグリコレート加プラスミン灌流ラットと同様の所見が認められたが, そのエラスチン断裂は軽度であった。チオグリコレート灌流ラット, プラスミン灌流ラット, u-PA灌流ラット, t-PA灌流ラット, チオグリコレート加t-PA灌流ラットでは生理食塩水灌流ラットと同様の内膜肥厚と炎症細胞浸潤像は認められたが, 中膜弾性線維の断裂は認めなかった。

3. ラット腹部大動脈組織内ゼラチン, α -エラスチン分解パターン

組織懸濁液を用いて, ゼラチンザイモグラフィを施行した

(図4). 正常ラット大動脈組織では92kDa, 72kDa, 66kDa, 60kDaのゼラチン分解活性を認めた. 66kDaのバンドは最も幅広く明瞭であり, 72kDaのバンドはその1/4程度の狭いバンドであり, 60kDa, 92kDaのバンドは極く淡いバンドであった.

大動脈瘤形成を認めたチオグリコレート加プラスミン灌流ラット, チオグリコレート加u-PA灌流ラット, および対照としてチオグリコレート灌流ラットの腹部大動脈壁の組織懸濁液を採取日毎にザイモグラフィーを施行した. チオグリコレート加プラスミン灌流ラットでは3~7日をピークに全てのバンド

が増強した. 11日以後は減弱したが正常ラットよりは濃いレベルであった. チオグリコレート加u-PA灌流ラットでは92kDaのバンドは3日より増強し5~9日にピークを認め14日では減弱したが正常ラットよりはわずかに濃いレベルであった. 66kDaバンドは経過中, 正常ラットよりわずかに濃かった. 60kDaのバンドは92kDaのバンドとほぼ同一の変化であった. チオグリコレート灌流ラットでは3~5日をピークにバンドの増強は認められたがプラスミン加u-PA灌流ラットに比べて弱かった.

α -エラスチンザイモグラフィーでは全ての例でほとんど活

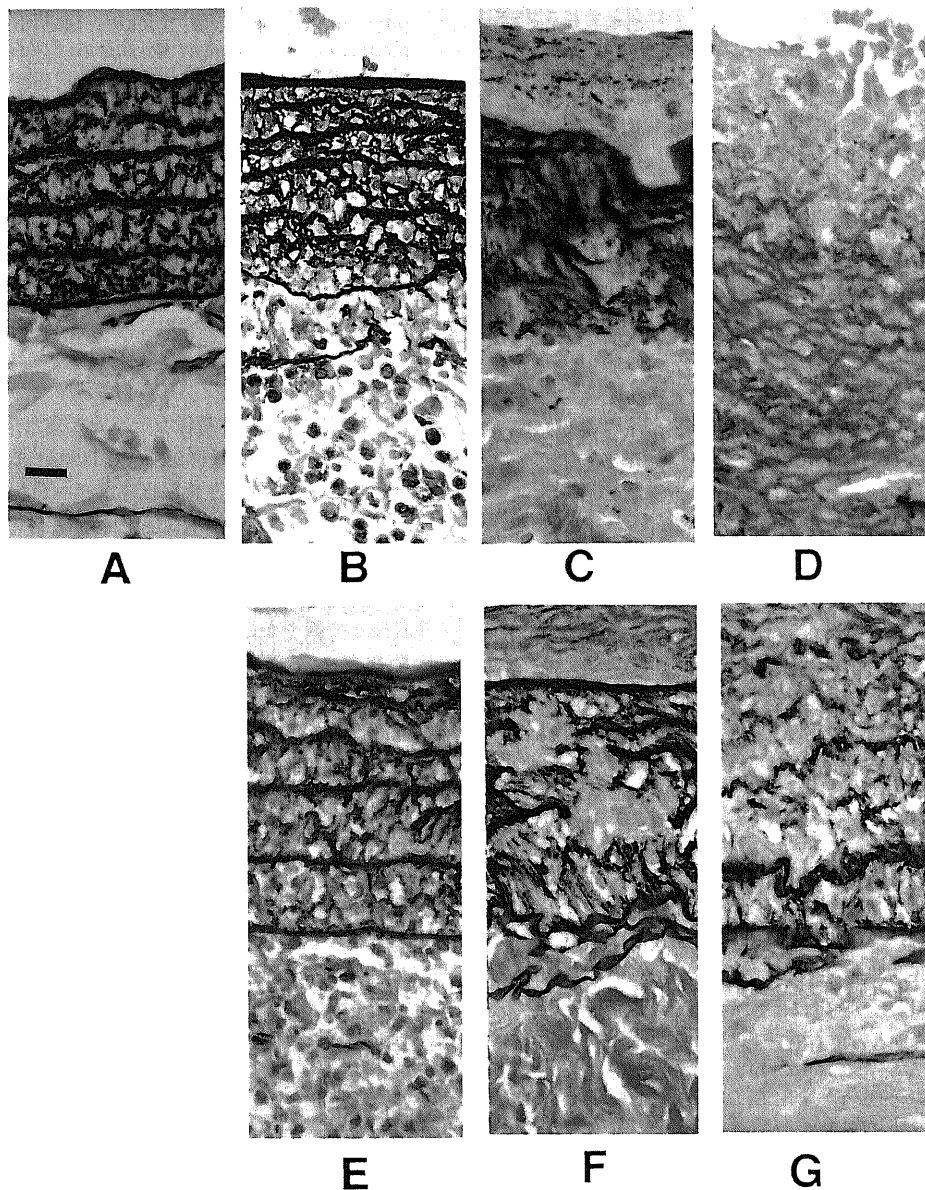


Fig. 3. Histological results of representative specimens of rat aortas stained by elastica van Gieson's method. Control (A) is a section from rat aorta before perfusion. B represents a specimen of rat aorta 3 days after perfusion with thioglycolate plus plasmin. Numerous cells infiltrate, and elastic lamellae are fragmented. After 7 days, elastic lamellae have become thin (C), and after 14 days, collagenous tissues have replaced the lamellae (D). (E), (F) and (G) represent specimens from rat aortas perfused with thioglycolate plus urokinase-type plasminogen activator: 3 days, 7 days, and 14 days after perfusion, respectively. Each section shows the same changes as that with thioglycolate plus plasmin treatment. Bar=20 μ m

性は認められなかった。

4. 酵素抑制試験

組織懸濁液において認められた92kDa, 72kDa, 66kDa, 60kDaのゼラチン分解活性は、酵素抑制試験ではPMSF, NEM, ペプスタチンAでは抑制されず、EDTAでのみ阻害された。この結果から、これらの酵素活性はMMPであることが証明され、後述するヒト腹部大動脈組織内ゼラチンサブストレートゲルによる酵素抑制試験の結果と同一であった。従って分子量の大きさから、92kDaの活性は潜在型MMP-9と考えられた。72kDaの活性は潜在型MMP-2, 66kDaは中間型MMP-2, 60kDaは活性型MMP-2と推測された。

II. 大動脈瘤形成の臨床的検討

1. ヒト腹部大動脈組織の光学顕微鏡的観察

HE染色では、大動脈壁は大動脈瘤、閉塞性動脈硬化性共に高度の粥状硬化症を呈しており内膜の表面には血栓の付着が認められた。大動脈瘤壁では全層性に炎症細胞の浸潤があり、内膜には泡沫細胞が随所にみられた外膜を中心としてリンパ球が散在性にあるいは集簇して認められた。形質細胞や好中球も少数認められた。大動脈瘤壁でのEVG染色では、高度の粥状硬化を示す内膜の弾性線維は殆ど消失し、菲薄化した中膜の弾性線維も断裂が目立ち消失している部分も多く認められた。

2. ヒト腹部大動脈組織培養上清中のエラスターゼ活性の検討

サクシニル-L-アラニル-L-アラニル-L-アラニン-p-ニトロアニリンを基質として測定したヒト腹部大動脈組織の

培養上清中のエラスターゼ活性は、内膜では大動脈瘤径6cm未満の群で 539.2 ± 96.0 nmol/時間/g, 6cm以上の大動脈瘤群で 363.4 ± 141.2 nmol/時間/g, また、閉塞性動脈硬化性組織の内膜で 448.6 ± 139.1 nmol/時間/gであった(図5A)。中膜では瘤径6cm未満の群で 561.1 ± 145.9 nmol/時間/g, 瘤径6cm以上の群で 347.3 ± 164.9 nmol/時間/g, 閉塞性動脈硬化性組織で 374.9 ± 94.8 nmol/時間/gであった(図5B)。外膜では瘤径6cm未満の群で 429.1 ± 106.1 nmol/時間/g, 瘤径6cm以上の群で 286.1 ± 135.0 nmol/時間/g, 動脈硬化性組織で 301.4 ± 96.4 nmol/時間/gであった(図5C)。瘤径を6cmで二分すると内、中、外膜の全ての層で6cm未満の群に有意にエラスターゼ活性が高く認められた。また、大動脈瘤全体と閉塞性動脈硬化性病変とではエラスターゼ活性には有意差を認めなかったが、瘤径6cm未満群と閉塞性動脈硬化性病変とでは全ての層で有意にエラスターゼ活性が高く認められた。

3. ヒト腹部大動脈組織内ゼラチン, α -エラスチン分解パターンの検討

組織培養上清を用いて、ゼラチン, α -エラスチンをサブストレートとしたザイモグラフィを施行した(図6)。ゼラチンザイモグラフィでは大動脈瘤壁の培養上清中にいずれも92kDa, 66kDa, 60kDaのゼラチン分解活性を認めた。66kDa, 60kDaにみられた活性パターンはどの症例においてもほぼ一定であり、66kDaに一樣な比較的幅広いバンドがみられ、60kDaにはその1/3程度の狭いバンドが出現していた。92kDaのバンドは閉塞性動脈硬化巣の培養上清ではほぼ一定であったが、

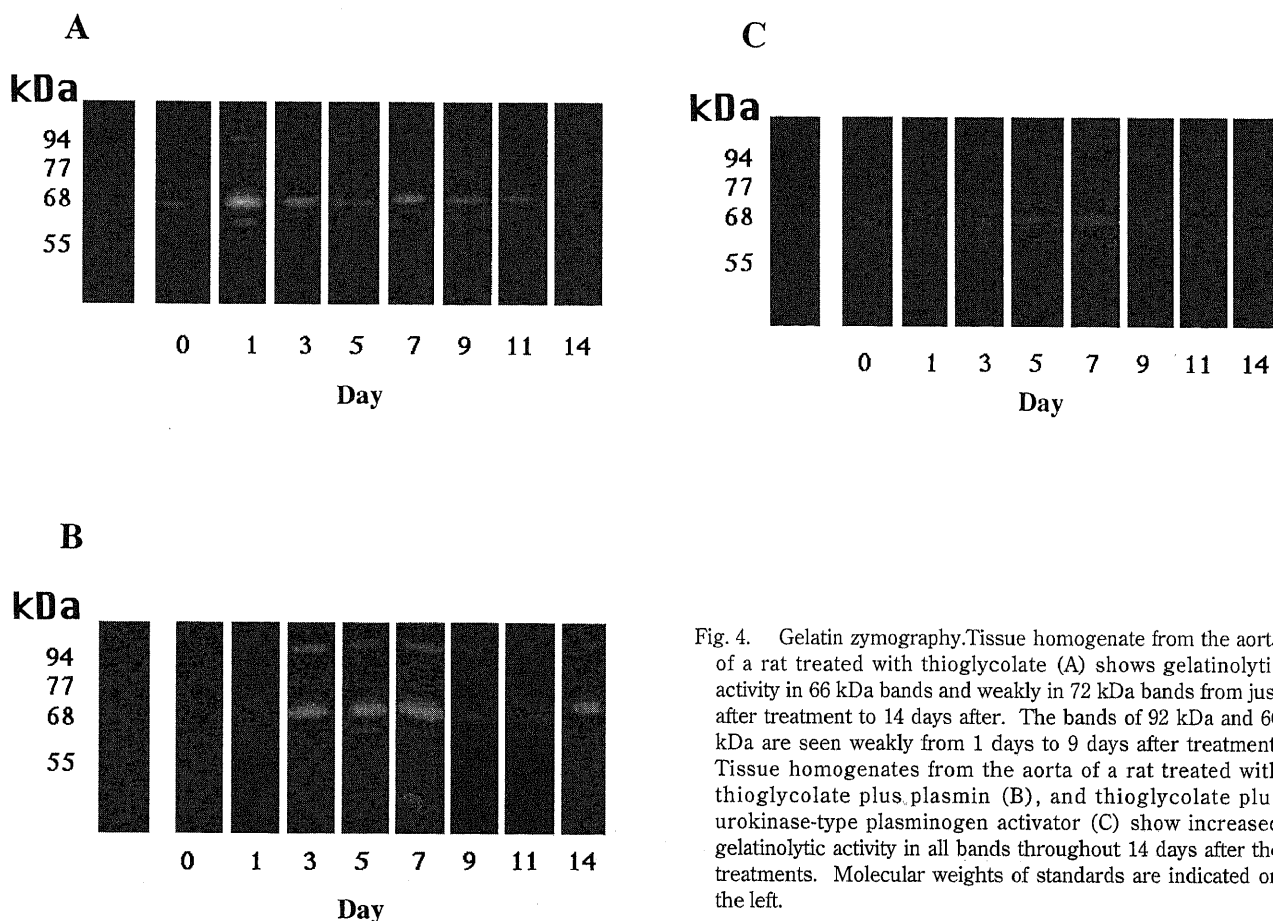


Fig. 4. Gelatin zymography. Tissue homogenate from the aorta of a rat treated with thioglycolate (A) shows gelatinolytic activity in 66 kDa bands and weakly in 72 kDa bands from just after treatment to 14 days after. The bands of 92 kDa and 60 kDa are seen weakly from 1 days to 9 days after treatment. Tissue homogenates from the aorta of a rat treated with thioglycolate plus plasmin (B), and thioglycolate plus urokinase-type plasminogen activator (C) show increased gelatinolytic activity in all bands throughout 14 days after the treatments. Molecular weights of standards are indicated on the left.

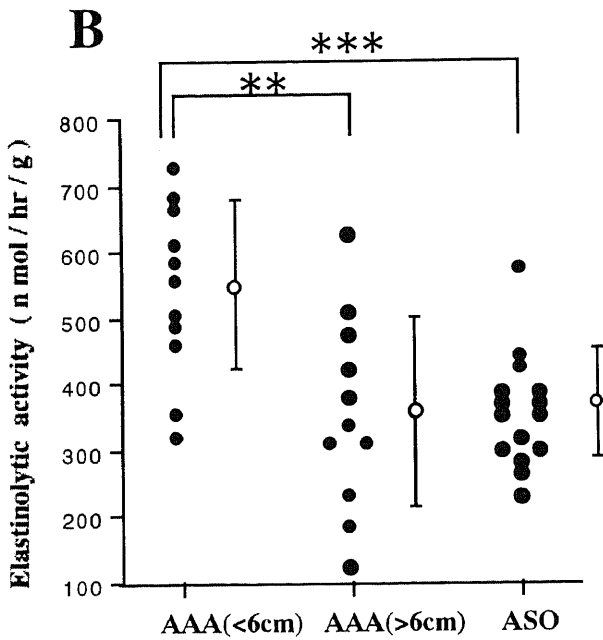
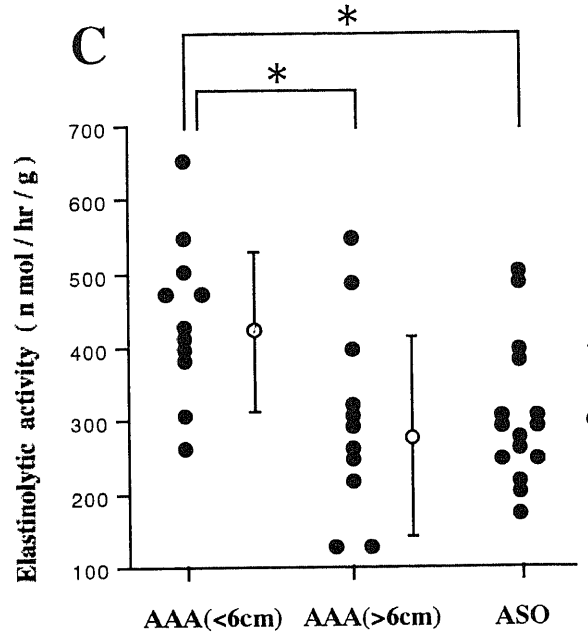
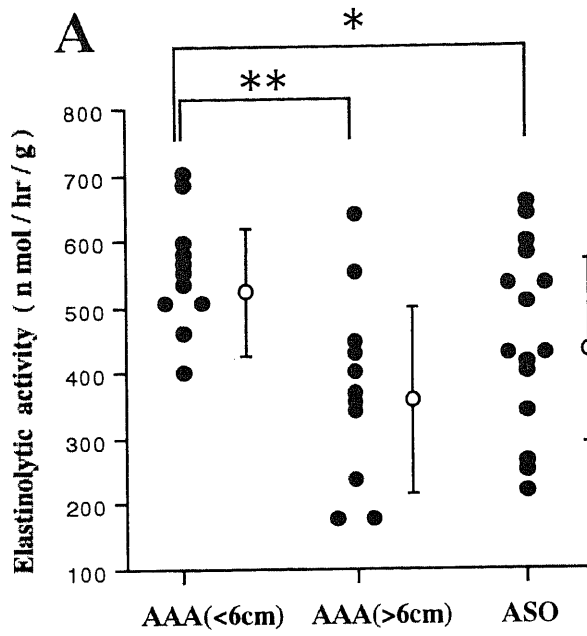


Fig. 5. Elastinolytic activity in the culture media of aortic tissues of aneurysms and atherosclerotic occlusive disease, measured by the substrate of succinyl-L-alanyl-L-alanyl-L-alanine-p-nitroanilide. (A) Intimal tissues. (B) Medial tissues. (C) Adventitial tissues. Each bar represents $\bar{x} \pm SD$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$. AAA, abdominal aortic aneurysm; ASO, arteriosclerosis obliterans.

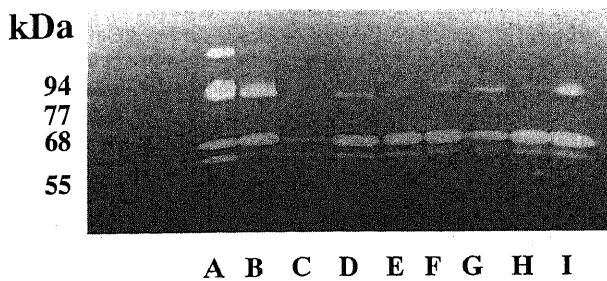


Fig. 6. Gelatinolytic activities in the culture media of the aortic tissues on zymography. Lanes A-D, abdominal aortic aneurysm (diameter of aneurysm: A, 4.5 cm; B, 5.2 cm; C, 6.0 cm; D, 7.5 cm). Lane E, normal aorta obtained from autopsy. Lane F-I, atherosclerotic occlusive disease. Molecular weights of standards are indicated on the left. Gelatinolytic activity in 92 kDa band is increased in lanes A and B.

大動脈瘤組織では瘤径の小さなものに幅が広い傾向が認められ、瘤径が大きくなると症例によっては92kDaのバンドが欠損する例もあった。

α -エラスチンザイモグラフィーでは明らかなバンドは認められず、分解活性は証明できなかった。

4. 酵素抑制試験

酵素抑制試験では大動脈瘤壁および対照の閉塞性動脈硬化巣の組織培養上清において認められた92kDa, 84kDa, 66kDa, 60kDaのゼラチン分解活性は、PMSF, NEM, ペプスタチンAでは抑制されずEDTAでのみ阻害された。これらの酵素活性はMMPであることが証明され、分子量の大きさから92kDaの活性は潜在型MMP-9, 84kDaの活性はその活性型と考えられた。66kDaの活性は中間型MMP-2, 60kDaは活性型MMP-2と考え

られた。

5. ヒト腹部大動脈中膜組織培養上清中のu-PA, t-PA, PAI-1の定量

大動脈瘤中膜組織の培養上清におけるu-PA量の平均値は190.1 ± 59.8ng/gであった。対照の閉塞性動脈硬化病変中膜組織のu-PA量の平均値は187.7 ± 48.6ng/gであった。大動脈瘤と閉塞性動脈硬化病変の間では有意差は認められなかったが、瘤径6cm未満の大動脈瘤中膜組織群 (平均220.5 ± 42.3ng/g) では閉塞性動脈硬化病変に比べて有意に高値を示した。瘤径での比較でも瘤径6cm以上群 (平均160.3 ± 65.7ng/g) に比べて瘤径6cm未満群が有意に高値を示した (いずれもP < 0.05) (図7A)。

大動脈瘤壁の培養上清におけるt-PA量の平均値は300.8 ± 156.2ng/gであった。対照の閉塞性動脈硬化病変のt-PA量の平

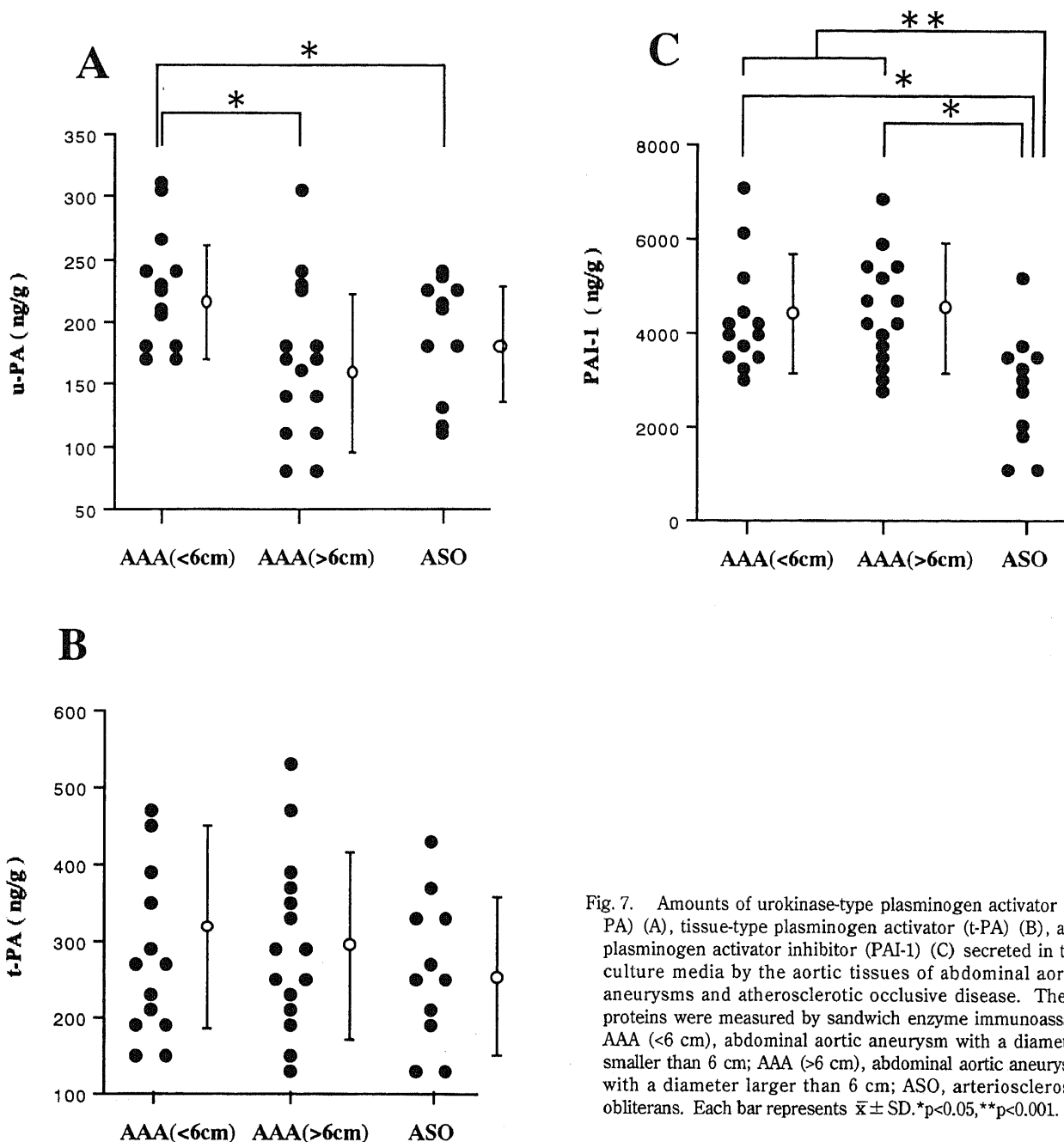


Fig. 7. Amounts of urokinase-type plasminogen activator (u-PA) (A), tissue-type plasminogen activator (t-PA) (B), and plasminogen activator inhibitor (PAI-1) (C) secreted in the culture media by the aortic tissues of abdominal aortic aneurysms and atherosclerotic occlusive disease. These proteins were measured by sandwich enzyme immunoassay. AAA (<6 cm), abdominal aortic aneurysm with a diameter smaller than 6 cm; AAA (>6 cm), abdominal aortic aneurysm with a diameter larger than 6 cm; ASO, arteriosclerosis obliterans. Each bar represents $\bar{x} \pm SD$. *p<0.05, **p<0.001.

均値は $252.0 \pm 108.4 \text{ ng/g}$ で有意差は認められなかった (図7B).

大動脈瘤壁のPAI-1量の平均値は $4252.3 \pm 1318.9 \text{ ng/g}$ で、閉塞性動脈硬化病変のPAI-1量の平均値は $2614.5 \pm 1324.0 \text{ ng/g}$ より有意に高値を示した ($P < 0.01$). 大動脈瘤壁のPAI-1量は瘤径との相関は認められず全体に高値を示した (図7C).

6. ヒト腹部大動脈組織のu-PA, t-PA, PAI-1の免疫組織化

学的局在 (図8, 図9)

大動脈瘤壁の内膜では粥状硬化の周辺部に存在する泡沫細胞, 紡錘形細胞, 類円形細胞の胞体にu-PA, u-PAR, t-PAが多数の細胞に強く染色されていた. PAI-1はそれに比し陽性細胞は少数であった. 菲薄化した中膜の紡錘形細胞にもu-PA, u-PAR, t-PAが多く陽性であった. PAI-1も中膜の紡錘形細胞に

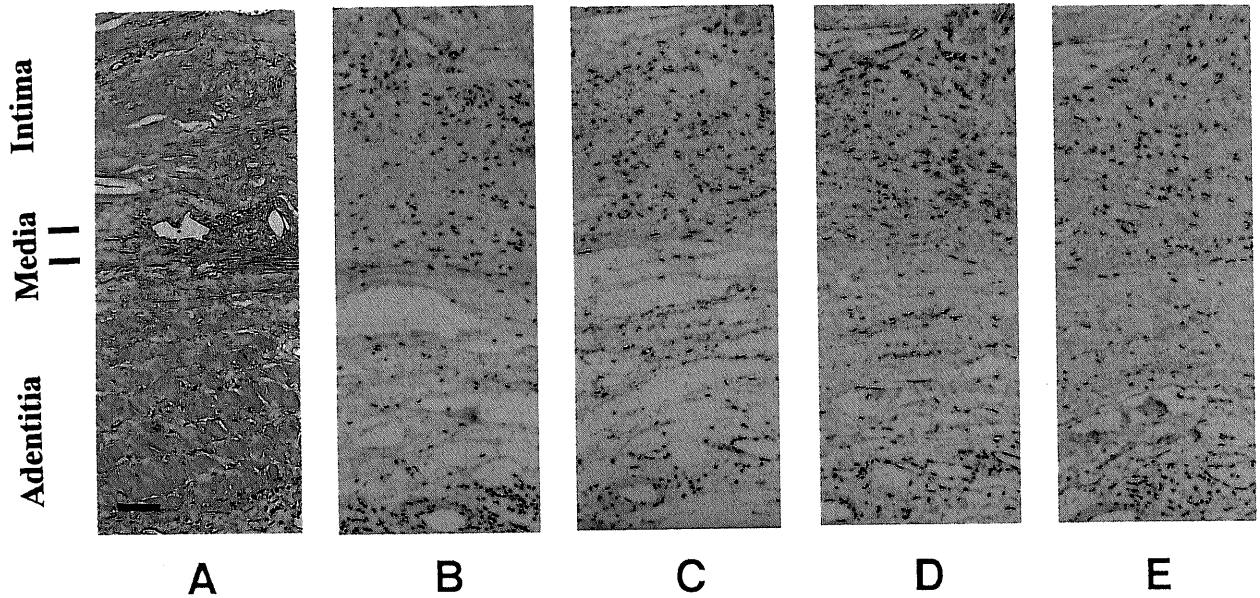


Fig. 8. Light micrograph of an abdominal aorta with aneurysmal dilatation, (A) Hematoxylin eosin stain, (B) Immunostain for urokinase-type plasminogen activator (u-PA), (C) Immunostain for uPA-receptor (uPAR), (D) Immunostain for tissue-type plasminogen activator (t-PA), (E) Immunostain for plasminogen activator inhibitor (PAI-1). Thickness of medial wall is decreased. u-PA, t-PA and PAI-1 are localized in the foam cells, spindle cells, and round cells in the wall. Bar=50 μm

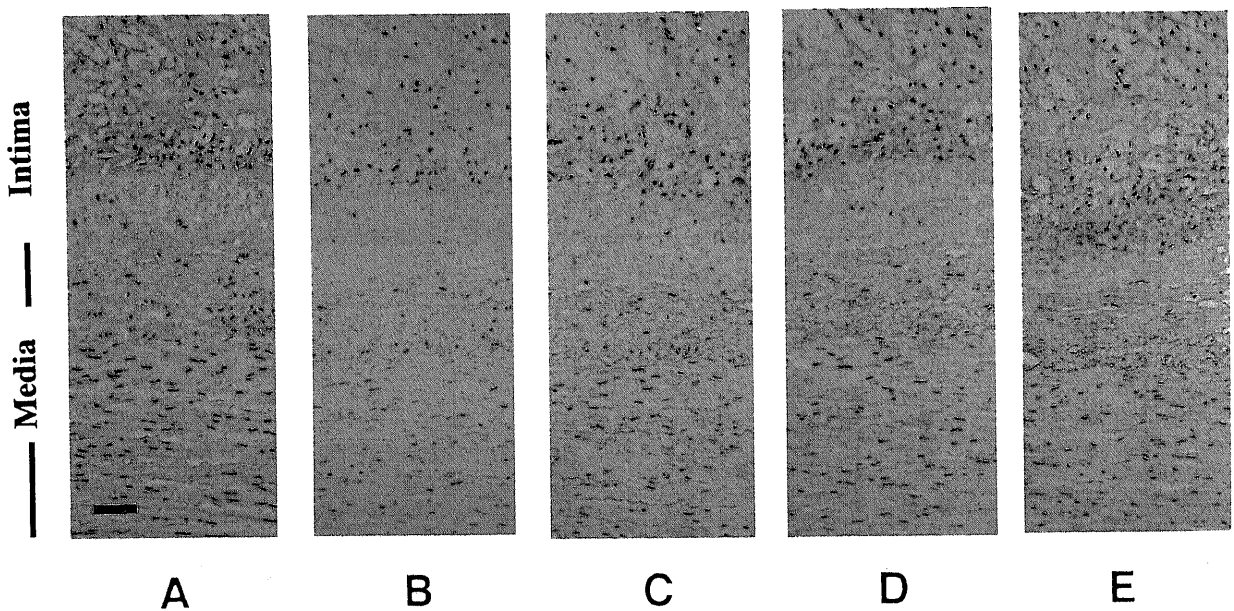


Fig. 9. Light micrograph of an abdominal aorta with atherosclerotic occlusive disease, (A) Hematoxylin eosin stain, (B) Immunostain for urokinase-type plasminogen activator (u-PA), (C) Immunostain for uPA-receptor (uPAR), (D) Immunostain for tissue-type plasminogen activator (t-PA), (E) Immunostain for plasminogen activator inhibitor (PAI-1). Thickness of medial wall is relatively preserved. u-PA, t-PA and PAI-1 are localized in the foam cells, spindle cells, and round cells in the wall. Bar=50 μm

弱く陽性であった。外膜では栄養血管内皮細胞およびその周囲の類円形細胞の胞体にu-PAが強く認められ、u-PARは栄養血管内皮細胞、周囲の類円形細胞に染色された。t-PAは内皮細胞及びその周囲の類円形細胞に弱く陽性、PAI-1は内皮細胞のみに陽性であった。

閉塞性動脈硬化病変では内膜においてu-PA、u-PAR、t-PA、PAI-1はそれぞれ大動脈瘤とほぼ同様であり粥状硬化の周辺部の細胞の胞体にその存在が認められたが軽度であった。中膜の紡錘形細胞の少数にu-PAが認められ、u-PARは紡錘形細胞のほとんどの胞体に弱陽性であった。t-PAはu-PAとほぼ同程度の陽性所見でありPAI-1陽性細胞はごく少数であった。外膜の栄養血管内皮細胞ではu-PA、u-PAR、t-PA、PAI-1はいずれも陽性を示した。

考 察

大動脈瘤形成に関与する重要なマトリクス分解酵素としてMMPが知られており、なかでもMMP-2、およびMMP-9は弾性線維を破壊する際に重要な酵素として大動脈瘤形成との相関性が検討されている。Websterら¹⁹⁾は大動脈瘤とMMPの関与を示唆し、Vineら²⁰⁾は大動脈瘤壁ホモジネート中にMMP-1、MMP-3、MMP-9の存在を認め閉塞性動脈硬化に比べ大動脈瘤に陽性症例数が多かったと報告した。

MMPは潜在型酵素として細胞外に分泌され、細胞外マトリクスに結合しているMMPはu-PAによりプラスミン依存、非依存に活性化される²¹⁾。またu-PAにはプラスミンを介さずに直接マトリクスを分解する作用も認められている²²⁾。培養細胞を用いた報告によれば、u-PAは細胞-基質間の接着領域に認められ、細胞表面にあるu-PARに結合していることが明らかにされている²³⁾。u-PARに結合したu-PAは、液相に存在するu-PAと比べてプラスミノゲンの活性化効率の上昇が認められること²⁴⁾からu-PARは細胞周囲に局限した効率の良いPA活性を実現していると考えられている。細胞性線溶は細胞表面の受容体結合潜在型u-PAが活性型u-PAに変換されること²⁵⁾より始まり、続いて膜結合型プラスミノゲンが活性化されていく。これらのプロテナーゼ活性はPAI-1²⁶⁾²⁷⁾やMMP阻害因子(tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMP)などのインヒビターにより巧妙に調節されており、組織破壊に重要な役割を演じている。またu-PA活性が細胞外マトリクスの破壊において重要である²⁸⁾と指摘されている。

粥状動脈硬化巣での研究においてはNoda-Heinyら²⁹⁾がu-PARの増加を粥状硬化巣のマクロファージ、泡沫細胞表面で認められることを報告し、このu-PARの増加は細胞外マトリクス分解、内膜肥厚、細胞移動に寄与していると推測している。大動脈瘤ではClaudeら¹³⁾が、ヒト動脈瘤壁中にプラスミノゲンが増加していることを指摘しプラスミンと瘤化の関係を論じている。Reillyら¹²⁾も大動脈の閉塞性病変と拡張性病変でPAの発現が異なっていることを報告した。実験的にはAnidjarら¹⁵⁾¹⁶⁾が、ラット大動脈瘤形成の実験でプラスミンを追加投与した群において著しい瘤形成が観察されプラスミンと動脈瘤の関係を示唆しているが、この理由として彼らはプラスミンはマクロファージなどの炎症細胞中のエラスターゼ活性を増強促進させるのではないかと推測するに留まっている。このラット腹部大動脈瘤モデルは動脈瘤研究に積極的に応用されており、ことにMMP関連の研究が多い。Halpernら³⁰⁾、Ricciら³¹⁾は炎症細胞

およびMMPと大動脈瘤の関連を示し、Holmesら³²⁾はマクロファージからのMMP-9分泌を抑制することによりラット大動脈瘤形成もまた抑制されることを示した。このように大動脈瘤に対するMMPの関与は定説化しつつある。しかし大動脈瘤形成に関連するMMPへの積極的な研究に比べu-PA-プラスミン系について検討した報告は少ない。

本研究では同様の実験系においてプロテアーゼカスケードの起点であるu-PAを用いて瘤作成が可能であるかを検討した。その結果、チオグリコレート加プラスミン浸透ラットではAnidjarら¹⁵⁾の報告同様の変化を示し大動脈瘤が形成された。チオグリコレート加u-PA浸透ラットでもまたプラスミンに比し軽度ではあるが瘤化した。これはu-PAによるプラスミン依存、及び非依存なマトリクス結合MMPの活性化作用と、u-PAの直接のマトリクス分解活性によると推測される。u-PA単独浸透ラットでは瘤化はなく組織破壊も認められないことから直接のマトリクス分解活性は極く弱く、MMPの活性化作用が主であると考えられる。またu-PAは抑制因子であるPAI-1と結合する性質があり、過剰なu-PA浸透による局所のPAI-1の消費枯渇の結果で両者の量的バランスが崩れ線溶活性亢進が起こったとも考えられる。しかし、t-PAもまたPAI-1と結合し結合体は除去されるにもかかわらず、チオグリコレート加t-PA浸透ラットでは動脈拡張は来さなかつたことからこの影響も少ないものと考えられた。

これらのラット腹部大動脈壁を組織学的に検討した結果、未処置正常ラットでは内膜の肥厚は認められないが、全ての灌流ラットではカテーテル留置に伴う内皮傷害が刺激となり内膜肥厚が生じていた。

Ross³³⁾の傷害反応仮説によると血管内皮細胞が傷害を受けると、そこに単球やTリンパ球が接着し、内膜に侵入した単球はマクロファージに分化する。更にマクロファージなどから増殖因子、サイトカインが分泌され平滑筋細胞が中膜より内膜へ侵入増殖し動脈硬化となるとされている。細胞が遊走するためには障壁として細胞間結合、基底膜や間質マトリクスがあるがこれらはMMPによって破壊される。この際、遊走する平滑筋細胞はu-PAを産生分泌してマトリクス分解酵素活性化カスケードを開始するとされている。単球・マクロファージも増殖因子の他MMP、u-PAなどを分泌するが¹⁴⁾、これらの細胞はチオグリコレート処置により活性化し、またMMP-9産生量は亢進する³⁴⁾³⁵⁾。従って本研究の実験系での浸透部動脈壁に集積した炎症細胞、平滑筋細胞は組織中に残存したチオグリコレートにより活性化し組織中のMMP-9濃度も増加していたと考えられる。Anidjarら¹⁵⁾の実験ではチオグリコレート浸透ラットで軽度の拡張性変化を示しプラスミン添加がこれを著しく増幅させている。自験例では結果は異なり、チオグリコレート浸透ラットでは内膜肥厚、炎症細胞浸潤は認められたが中膜の破壊は観察されず拡張性変化も認められなかつた。本実験では原法と異なり動脈への浸透時間を一時間と短縮させていたために結果が異なつたとも考えられた。過度の炎症を惹起させれば中膜の破壊まで至ることは、臨床例での細菌性動脈瘤やベーチェット病をみれば容易に理解でき、この点で原法の結果はむしろ炎症性動脈瘤に近いのではないかと思われる。いずれにせよチオグリコレート刺激によるマクロファージ活性化を介した局所のMMP-9の濃度増加だけではエラスチン断裂をきたすには不十分であると考えられる。この理由としてMMPは潜在型酵素として分泌

されるため活性化が必要でありこの活性化が不十分であった、またBrophyら³⁶⁾が述べているようにTIMPによるMMPの阻害機能も同時に亢進していた、などが考えられた。

特殊な病態を除くと動脈瘤病変では内膜肥厚と中膜の菲薄化が同時に存在し、「動脈硬化性動脈瘤」との名称を与えられている。しかし動脈瘤の病因が動脈硬化であるかどうかは未だ不明である。前述したように動脈硬化性病変の発生進展では細胞が間質を破壊しながら移動を行うと考えられているが、移動と共にエラスチン修復もまた行なうためこの過程においては一般に中膜弾性線維の不可逆性変化までは至らない。弾性線維の破壊は細胞遊走時に修復を凌駕する過度のエラスチン分解活性が生じた場合にエラスチンの断裂をきたすとすれば動脈硬化性病変と拡張性病変が同時に進行する病態となると考えられる。実際にヒト大動脈瘤ではコラーゲン、エラスチンの合成が亢進し³⁷⁾、MMPに代表されるプロテナーゼの亢進も多く観察される⁴⁾ため合成能を上回る分解活性の存在が予測されている。

一方でヒト腹部大動脈瘤の炎症反応は単球・マクロファージの出現が特徴的であり⁴⁾³⁸⁾³⁹⁾、この炎症反応が病因である⁴⁰⁾とする説もある。マクロファージのマトリクス分解はプラスミン依存性であり⁴¹⁾、この点からも動脈瘤と線溶系の関与が疑われる。自験例ではPAやプラスミン単独灌流ラットにおいて灌流部動脈壁に変化はなく、局所線溶活性の亢進状態のみでは組織破壊は観察されなかった。すなわち、MMPもしくはセリンプロテナーゼの単独の局所増加のみでは動脈瘤化は起り難く、プラスミン・u-PAの局所濃度増加による潜在型MMPの活性化が存在して初めて効率の良い細胞外マトリクスの分解が起こりうると考えられた。

ラット腹部大動脈組織内ゼラチン分解活性の検討では、瘤化したものでは活性型MMP-9のバンドが経過とともに増減しラット大動脈径実測値の変化とほぼ一致した。つまり活性型MMP-9値が上昇するに従い動脈径の拡張速度は大きくなり、活性型MMP-9値が下降するに従い動脈径の拡張速度は小さくなると推測された。ただ拡張性変化を認めなかったチオグリコレート単独灌流ラットでも弱いながら同様の変化を認めた。MMP-2値はコントロールに比し全経過で上昇していた。

組織学的にも弾性線維の破壊像はMMP-9の増加とともにみられ、活性化MMP-9によるラット大動脈瘤形成を裏付ける所見であると考えられた。

これらの結果を総合すると、動脈壁中のMMP (特にMMP-9) 及びプラスミン・u-PAの局所濃度を実験的に増加させれば弾性線維の破壊、動脈拡張をもたらすことが示された。

ヒト動脈瘤とエラスターゼ、コラーゲナーゼ活性の比較検討は以前より行なわれ瘤径と分解活性が正の相関を示す⁴²⁾との報告が多い。しかしこの分解活性の測定は動脈壁全層の結果であり、内、中、外膜の全ての層での検討はみられない。今回の結果ではヒト腹部大動脈組織培養上清中のエラスターゼ活性、ゼラチンゼイモグラフィーの検討において、全ての層で腹部大動脈瘤全体と閉塞性動脈硬化症では差が認められなかったが、動脈瘤を二分すると瘤径6cm未満と閉塞性動脈硬化症では有意に動脈瘤においてエラスターゼ活性が高値であった。瘤径6cm未満の群と6cm以上の群でも有意の差が認められ、瘤径が小さなものほどエラスターゼ活性が内、中、外膜の全ての層で上昇し、特に中膜にその傾向が大であった。各層の比較では外膜に比べ内膜、中膜でエラスターゼ活性が高くなる傾向が認められた。瘤

径6cm未満の群とASO群でもまた有意の差があったが6cm以上の群ではASO群とはエラスターゼ活性に差はなかった。

瘤径が小さなものほどエラスターゼ活性が上昇している理由としては以下のことが考えられた。動脈瘤は血圧にて進展されるのであるが、Laplaceの法則(張力=血圧×半径)によって動脈径が大きいほど壁にかかる張力は高い。動脈瘤初期病変では動脈径も小さく壁にかかる張力は比較的小さいと考えられる。従って動脈瘤初期病変ではより大きなエラスターゼ活性が大動脈拡大のために必要となる。一方で、動脈瘤が大きくなると中膜は菲薄化し平滑筋細胞は減少消失する。そのため瘤径が大きくなれば細胞成分の減少を反映しエラスターゼ活性もそれに伴い減少すると考えられる。中膜の破壊が腹部大動脈瘤の病理学的変化であるが、本実験における瘤径6cm未満の動脈瘤初期病変でのエラスターゼ活性が中膜に特に高値であった点も上記と矛盾しない。

ゼラチンゼイモグラフィーの解析では培養上清中にいずれも92kDa, 66kDa, 60kDaのゼラチン分解活性を認め、これらの活性は前者が活性型MMP-9、後2者がMMP-2による活性と考えられる。 α -エラスチンゼイモグラフィーではエラスチン分解活性は認められなかったが、MMP-9、及びMMP-2がエラスターゼ活性を有することは、Seniorら⁴³⁾によって報告されている。従って、125mMサクシニル-L-アラニル-L-アラニル-L-アラニン-p-ニトロアニリンを基質として測定したヒト腹部大動脈組織培養上清中のエラスターゼ活性はMMP-9、及びMMP-2も含まれていると考えられた。ゼイモグラフィーで92kDaの活性が最も明瞭であったことは、ヒト腹部大動脈組織内のエラスターゼ活性のなかでMMP-9の重要性を示していると考えられる。

瘤壁中の線溶系活性の測定では、血液中に当然含まれると考えられる線溶系活性を排除するため培養にてその産生量を測定した。その結果ヒト腹部大動脈中膜組織培養上清中のu-PA、t-PA、PAI-1の検討では、u-PA量は瘤径6cm未満では、瘤径6cm以上や閉塞性動脈硬化症に比べて有意に高く、MMPと共にエラスターゼ活性に関与していると考えられた。ラットの実験で明らかになった点は、増加した潜在型MMPに、プラスミンまたはu-PAによる活性化が加わって組織学的変化を来しうるだけの細胞外マトリクスの分解活性が付随されることである。従ってヒト腹部大動脈瘤組織でも線溶活性の亢進が存在することが推測、期待される。しかしながら本実験では阻害因子であるPAI-1量も、ヒト腹部大動脈組織において有意に閉塞性動脈硬化病変より増加しており、この数値のみからは線溶亢進が存在し動脈壁弾性線維の破壊へ関与しているとは断定できない。悪性腫瘍での研究でも同様の現象が報告され、この矛盾はu-PARの存在にて説明されている。血管外線溶活性決定にはu-PARの関与が大きく、細胞膜上のu-PARに結合するu-PAの総量によって線溶活性が決定され、同時にマトリクス分解も決定される²⁸⁾。従って組織中のu-PA量の増加は飽和していない限りu-PAR結合u-PA量の増加とつながり、局所の線溶活性が亢進していると考えられる。また粥状動脈硬化巣内では細胞表面のu-PARが増加している³³⁾ことから、大動脈瘤壁中では更に細胞表面のu-PARが増加している可能性も考えられる。PAI-1は組織中に分散した不必要なPA活性の制御を担っているとすれば、PAI-1の増加は瘤組織中の線溶活性亢進の抑制のための二次的な性質を反映し、むしろ傍細胞性の線溶活性の亢進状態を

示しているのかもしれない。

ヒト腹部大動脈組織のu-PA (及びu-PAR), t-PA, PAI-1の免疫組織化学的局在の検討では, 腹部大動脈瘤においてu-PA, u-PARは内膜の泡沫細胞, 紡錘形細胞, 類円形細胞 (平滑筋細胞やマクロファージ) に多く陽性であり, また中膜の紡錘形細胞 (平滑筋細胞) や外膜の栄養血管の内皮細胞や類円形細胞 (マクロファージ) に多く陽性であった。

閉塞性動脈硬化病変ではu-PARは中膜平滑筋細胞全てに陽性であり, 大動脈瘤とは陽性細胞数では大きな違いはなかった。u-PARはマトリクスの状態に関わりなく平滑筋細胞においてその発現量は不明であるが, 常に存在していると考えられる。u-PAは瘤病変で中膜平滑筋細胞で多く陽性である例を認め, 閉塞性動脈硬化病変ではu-PA陽性中膜平滑筋細胞は概して少数であった。培養上清から得られた結果を加え, 動脈瘤中膜ではu-PAR結合u-PA量が増えている可能性があり, その増加はすなわち傍細胞性線溶, 局所線溶活性の亢進状態を惹起していると考えられた。また動脈瘤では外膜の類円形細胞にu-PA, u-PAR, PAI-1は強く陽性であった。大動脈瘤では外膜を問わず炎症細胞はその絶対数が増加しており, エラスターゼ活性増加との関係や瘤形成への何らかの関わりも推察されるが, 本研究では外膜の線溶系の瘤形成への役割については不明であった。

以上, ヒト腹部大動脈瘤初期病変ではMMP-9を含めエラスターゼ活性上昇を認め, ならびにu-PA量増加による局所線溶活性の亢進の存在が推測され, 瘤形成の要因と考えられた。動物実験と臨床材料による成績を総合すると, 大動脈瘤の形成に弾性線維などを分解する蛋白分解酵素, 特にMMP-9とu-PAが関与していることが明らかとなった。

大動脈瘤には急速な拡大を示し破裂の危険性の高いものと, 長期間瘤径に変化のないものがある⁴⁴⁾。マトリクス分解酵素活性化カスケードの初期因子として機能するu-PAなどの分解産物の測定にても, 病変の進行が予測可能になるかもしれない。臨床応用を含めて本研究の今後の更なる発展が期待される。

結 論

動脈硬化性大動脈瘤形成において局所線溶活性の果たす役割を検討する目的で, 実験的にラット腹部大動脈瘤を形成し, また手術時に採取された腹部大動脈瘤壁, 閉塞性動脈硬化症の大動脈壁を用いて免疫組織染色, ザイモグラフィ, 酵素産生量の測定, エラスターゼ活性の測定を行い以下の様な結果を得た。

1. ラット腹部大動脈瘤形成モデルにて, チオグリコレート・プラスミン及びチオグリコレート・u-PAを灌流した群に全例瘤化が認められた。その他の灌流ラットでは変化を認めなかった。

2. ラット腹部大動脈壁の組織学的検討では, チオグリコレート加プラスミン灌流ラットでは初期変化として全層性に炎症細胞の浸潤を認め, 次いで弾性線維の断裂も認められた。徐々に弾性線維は非薄化し, 最終的には殆ど消失して痕跡のみと化した部位も認められた。チオグリコレート加u-PA灌流ラットでは同様の変化が認められたがそのエラスチン断裂は軽度であった。その他の灌流ラットでは内膜肥厚と炎症細胞浸潤像のみ認められた。

3. ラット腹部大動脈組織内ゼラチン分解活性の検討において潜在型MMP-9, 潜在型, 中間型, 活性型MMP-2の活性が認

められた。チオグリコレート・プラスミン灌流ラットでは経過と共にMMP-9, MMP-2の活性が増強し減弱した。同様の変化はチオグリコレート・u-PA灌流ラットでも認められたが, MMP-2に比べMMP-9の変化がより顕著であった。チオグリコレートのみの灌流ラットではMMP-9の増強は認められたが, プラスミン及びu-PAを添加した灌流ラットに比べてその変化は弱かった。動脈瘤化がみられた群ではMMP-9の変化はラット大動脈径の拡張速度と呼応していた。

4. ヒト大動脈瘤壁の光学顕微鏡の観察において中膜の弾性線維の著明な破壊像が認められた。

5. ヒト腹部大動脈組織の培養上清中のエラスターゼ活性は, 瘤径を6cmで二群すると, 内, 中, 外膜の各層で6cm未満の群に有意にエラスターゼ活性が高く認められた。また, 大動脈瘤全体と閉塞性動脈硬化性病変とではエラスターゼ活性には有意差を認めなかったが, 瘤径6cm未満群と閉塞性動脈硬化性病変とでは全ての層で有意にエラスターゼ活性が高く認められた。

6. ヒト大動脈瘤中膜組織の培養上清におけるu-PA量は, 大動脈瘤と閉塞性動脈硬化病変間では有意差は認められなかったが, 瘤径6cm未満の大動脈瘤群では閉塞性動脈硬化病変に比べて有意に高値を示した。大動脈瘤群内での比較では瘤径6cm未満群が有意に高値を示した。t-PA量は各間に有意差は認められなかった。ヒト大動脈瘤壁のPAI-1量は閉塞性動脈硬化病変より有意に高値を示した。ヒト大動脈瘤のPAI-1量は瘤径との相関は認められなかった。

7. ヒト腹部大動脈組織の内膜では粥状硬化の周辺部に存在する泡沫細胞, 紡錘形細胞, 類円形細胞の胞体にu-PA, u-PAR, t-PAが多数の細胞に強く染色されていた。PAI-1はそれに比し陽性細胞は少数であった。中膜の紡錘形細胞にもu-PA, u-PAR, t-PAが多く陽性であり動脈瘤組織でわずかに陽性所見が強かった。PAI-1も中膜の紡錘形細胞に弱く陽性であった。

実験的にラットにおいてu-PAで瘤作製が可能であったこと, 及び, 臨床的に動脈瘤初期病変と考えられる瘤径が6cm未満の大動脈瘤中膜組織中にu-PA量の増加が認められ, かつエラスターゼ活性が上昇していたことからu-PAが大動脈瘤形成の一因であると考えられた。

謝 辞

稿を終えるに臨み御指導と御校閲を賜りました恩師渡辺洋宇教授に深甚なる謝意を表します。また本研究の遂行に際し御指導頂きました浦山博講師に心から謝意を表します。最後に終始多大な御協力と御援助を賜った金沢大学医学部外科学第一講座, 金沢大学医学部病理学第一講座各位, 技術員各位に厚く御礼申し上げます。

なお, 本論文の要旨は第99回日本外科学会総会 (1999年, 福岡) において発表した。

文 献

- 1) Menashi S, Campa JS, Greenhalgh RM, Powell JT. Collagen in abdominal aortic aneurysm: Typing, content, and degradation. *J Vasc Surg* 6: 578-582, 1987
- 2) Rizzo RJ, McCarthy WJ, Dixit SN, Lilly MP, Shively VP, Flinn WR, Yao JST. Collagen types and matrix protein content in human abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg* 10: 365-373, 1989
- 3) He CM, Roach MR. The composition and mechanical properties of abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg* 20: 6-13, 1994

- 4) 笠島史成. ヒト動脈硬化性大動脈瘤におけるマトリックスメタロプロテアーゼ:その発現・局在と大動脈瘤形成における役割. 十全医学会雑誌 104: 216-229, 1995
- 5) Ogata Y, Enghild JJ, Nagase H. Matrix metalloproteinase 3 (Stromelysin) activates the precursor for the human matrix metalloproteinase 9. *J Biol Chem* 267: 3581-3584, 1992
- 6) Miyazaki K, Umenishi F, Funahashi K, Koshikawa N, Yasumitsu H, Umeda M. Activation of TIMP-2/progelatinase a complex by stromelysin. *Biochem Biophys Res Commun* 185: 852-859, 1992
- 7) Pepper MS, Vassalli J-D, Montesano R, Orci L. Urokinase-type plasminogen activator is induced in migrating capillary endothelial cells. *J Cell Biol* 105: 2535-2541, 1987
- 8) Pollanen J, Hedman K, Nielsen LS, Dan ϕ K, Vaheri A. Ultrastructural localization of plasma membrane-associated urokinase-type plasminogen activator at focal contacts. *J Cell Biol* 106: 87-95, 1988
- 9) Schafer BM, Maier K, Eickhoff U, Todd RF, Kramer MD. Plasminogen activation in healing human wounds. *Am J Pathol* 144: 1269-1280, 1994
- 10) 遠藤良夫, 佐々木琢磨. 癌転移の分子機構. 進行胃癌に対する治療戦略 (宮崎逸夫, 米村 豊編), 第一版, 16-23頁, ソフトサイエンス社, 東京, 1995
- 11) Nagayama M, Sato A, Hayakawa H, Urano T, Takada Y, Takada A. Plasminogen activators and their inhibitors in non-small cell lung cancer. *Cancer* 73: 1398-1405, 1994
- 12) Reilly JM, Sicard GA, Lucore CL. Abnormal expression of plasminogen activators in aortic aneurysmal and occlusive disease. *J Vasc Surg* 19: 865-872, 1994
- 13) Claude JJ, Newmann KM, Li H, Gregory AK, Tilson MD. Possible key role for plasmin in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysms. *Surgery* 116: 472-478, 1994
- 14) Newman KM, Claude JJ, Li H, Scholes JV, Ogata Y, Nagase H, Tilson MD. Cellular localization of matrix metalloproteinases in the abdominal aortic aneurysm wall. *J Vasc Surg* 20: 814-820, 1994
- 15) Anidjar S, Salzman JL, Gentric D, Lagneau P, Camilleri JP, Michel JB. Elastase induced experimental aneurysms in rats. *Circulation* 82: 973-981, 1990
- 16) Anidjar S, Dobrin PB, Eichorts M, Graham GP, Chejfec G. Correlation of inflammatory infiltrate with the enlargement of experimental aortic aneurysms. *J Vasc Surg* 16: 139-147, 1992
- 17) Hibbs MS, Hasty KA, Seyer JM, Kang AH, Mainardi CL. Biochemical and immunological characterization of the secreted forms of human neutrophil gelatinase. *J Biol Chem* 260: 2493-2500, 1985
- 18) Bieth J, Speiss B, Wermuth CG. The synthesis and analytical use of a highly sensitive and convenient substrate of elastase. *Biochem Med* 11: 350-357, 1974
- 19) Webster MW, McAuley CE, Steed DL, Miller DD, Evans CH. Collagen stability and collagenolytic activity in the normal and aneurysmal human abdominal aorta. *Am J Surg* 161: 635-638, 1991
- 20) Vine N, Powell JT. Metalloproteinases in degenerative aortic disease. *Clin Sci* 81: 233-239, 1991
- 21) Blasi F. Urokinase and urokinase receptor: A paracrine/autocrine system regulating cell migration and invasiveness. *Bioessays* 15: 105-111, 1993
- 22) Quigley JP, Gold LI, Schwimmer R, Sullivan LM. Limited cleavage of cellular fibronectin by plasminogen activator purified from transformed cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 2776-2780, 1987
- 23) Pollanen J, Vaheri A, Tapiovaara H, Riley E, Bertram K, Woodrow G, Stephens RW. Prourokinase activation on the surface of human rhabdomyosarcoma cells: Localization and inactivation of newly formed urokinase-type plasminogen activator by recombinant class 2 plasminogen activator inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 2230-2234, 1990
- 24) Plow EF, Felez J, Miles LA. Cellular regulation of fibrinolysis. *Thromb Haemost* 66: 32-36, 1991
- 25) Behrendt N, Ploug M, Patthy L, Houen G, Blasi F, Dan ϕ K. The ligand-binding domain of the cell surface receptor for urokinase-type plasminogen activator. *J Biol Chem* 266: 7842-7847, 1991
- 26) Cajot JF, Bamat J, Bergomelli GE, Kruithof EK, Medcalf RL, Testuz J, Sordat B. Plasminogen-activator inhibitor type 1 is a potent natural inhibitor of extracellular matrix degradation by fibrosarcoma and colon carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 6939-6943, 1990
- 27) Cubellis MV, Wun T-C, Blasi F. Receptor-mediated internalization and degradation of urokinase is caused by its specific inhibitor PAI-1. *EMBO J* 9: 1079-1085, 1990
- 28) Cohen RL, Xi XP, Crowley CW, Lucas BK, Levinson AD, Shuman MA. Effects of urokinase receptor occupancy on plasmin generation and proteolysis of basement membrane by human tumor cells. *Blood* 78: 479-487, 1991
- 29) Noda-Heiny H, Daugherty A, Sobel BE. Augmented urokinase receptor expression in atheroma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1: 37-43, 1995
- 30) Halpern VJ, Nackman GB, Gandhi RH, Irizarry E, Scholes JV, Ramey WG, Tilson MD. The elastase infusion model of experimental aortic aneurysms: Synchrony of induction of endogenous proteinases with matrix destruction and inflammatory cell response. *J Vasc Surg* 20: 51-60, 1994
- 31) Ricci MA, Strindberg G, Slaiby JM, Guibord R, Bergersen LJ, Nichols P, Hendley ED, Pilcher DB. Anti-CD 18 monoclonal antibody slows experimental aortic aneurysm expansion. *J Vasc Surg* 23: 301-307, 1996
- 32) Holmes DR, Petrinc D, Wester W, Thompson RW, Reilly JM. Indomethacin prevents elastase-induced abdominal aortic aneurysm in the rat. *J Surg Res* 63: 305-309, 1996
- 33) Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis - an update. *N Engl J Med* 31: 488-499, 1986
- 34) Zena W, Gordon S. Secretion of specific collagenase by stimulated macrophages. *J Exp Med* 142: 346-360, 1975
- 35) Zena W, Gordon S. Elastase secretion by stimulated macrophages. *J Exp Med* 142: 361-377, 1975
- 36) Brophy CM, Marks WH, Reilly JM, Tilson MD. Decreased

tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) in abdominal aortic aneurysm tissue: A preliminary report. *J Surg Res* 50: 653-657, 1991

37) Mesh CL, Baxter BT, Pearce WH, Chisholm RL, McGee GS, Yao JS. Collagen and elastin gene expression in aortic aneurysms. *Surgery* 122: 256-261, 1992

38) Brophy CM, Reilly JM, Smith W, Tillson MD. The role of inflammation in nonspecific aneurysm disease. *Ann Vasc Surg* 5: 229-233, 1991

39) Koch AE, Haines KG, Rizzo RJ, Radosevich JA, Pope RM, Robinson PG, Pearce WH. Human abdominal aortic aneurysms: immunophenotypic analysis suggesting an immune-mediated response. *Am J Pathol* 137: 1199-1213, 1990

40) Anidjar S, Kieffer E. Pathogenesis of acquired aneurysm of

the abdominal aorta. *Ann Vasc Surg* 6: 298-305, 1991

41) Dayer JM, Beard J, Chess L, Krane SM. Participation of monocyte-macrophages and lymphocytes in the production of a factor that stimulates collagenase and prostaglandin release by rheumatoid synovium. *J Clin Invest* 64: 1386-1392, 1979

42) Powell J, Greenhalgh RM. Cellular enzymatic and genetic factors in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg* 9: 297-304, 1989

43) Senior RM, Griffin GL, Fliszar CJ, Shapiro SD, Goldberg GI, Welgus HG. Human 92-and-72kilodalton type IV collagenases are elastases. *J Biol Chem* 266: 7870-7875, 1991

44) 佐藤 紀. 病因・病理. 腹部大動脈瘤のすべて (稲田 潔, 広瀬 一編), 第一版, 19-26頁, ヘルス出版, 東京, 1991

Studies of Aortic Aneurysm Formation Using Experimental Aortic Aneurysms and Atherosclerotic Human Aortas
Harada Takeshi, Department of Surgery(I), Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 - *J. Juzen Med Soc.*, **108**, 554 - 567 (1999)

Key words abdominal aortic aneurysm, atherosclerosis, plasminogen activator, matrix metalloproteinase

Abstract

Destruction of the extracellular matrix of the aortic wall decreases the wall tensile strength and eventually results in aneurysm formation. The fibrinolytic system degrades the extracellular matrix both directly and indirectly by activation of latent matrix metalloproteinases (MMP). The role of local fibrinolytic activity in aneurysm formation in aortas is examined here. In the experimental study abdominal aortic aneurysms were produced in rats, and the aortic walls were investigated both histochemically and zymographically. In the clinical study, resected specimens from surgery for abdominal aortic aneurysms or aorto-iliac occlusive disease were investigated for elastinolytic activity, amounts of u-PA, t-PA, and PAI-1, zymographically, and immunohistochemically. The experimental study revealed that thioglycolate plus plasmin or thioglycolate plus urokinase-type plasminogen activator (uPA) enlarged the infused abdominal aortae (by 3.34 mm and 2.52 mm at 14 days after preparation, respectively), but plasmin alone, or thioglycolate plus tissue-type plasminogen activator (tPA) did not cause aneurysm formation in the infused aortae (only 1.35 mm at 14 days after preparation). The aneurysmal wall showed destruction of the medial elastins and decrease of medial thickness in microscopic examination. Gelatin zymography using homogenated aortic tissues from the aneurysms showed gelatinolytic activities in the 92 kDa band, 72 kDa band, 66 kDa band, and 60 kDa band. The first band was matrix metalloproteinase (MMP) -9, and the other three were MMP-2. In the clinical study, measurements of elastase activity in the aortic tissue culture media indicated levels that were significantly higher in the samples from aneurysms with small diameters (<6 cm) than in those from aneurysms with large diameters (>6 cm), or in those from occlusive aortas. Amounts of uPA in the culture media of the aortic medial wall from aneurysms with small diameters (<6 cm) were significantly higher than those from aneurysms with large diameters (>6 cm) or those from occlusive aortas (220.5ng/g vs 160.3ng/g and 187.7ng/g). No differences were noted between small and large aneurysms in the values for tPA and PAI-1. Under immunocytochemical analysis, uPA, uPA receptors and tPA were found to be present in foam cells, fusiform cells, and round cells at atheromatous intima of the aorta. A test for PAI-1 was weakly positive in a few cells of the intima. Fusiform cells in the media of the aorta were stained for uPA, uPA receptors and tPA. The fusiform cells in the media were weakly stained for PAI-1. These results suggest that uPA plays an important role in aneurysm formation, via activation of MMPs and elastin degradation.