

下肢静脈瘤におけるマトリックスメタロプロテイン
アーゼ-2,マトリックスメタロプロテインアーゼ-9,ウ
ロキナーゼ型プラスミノーゲンアクチベーターおよ
びその受容体の発現の検討

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/2297/9436

下肢静脈瘤におけるマトリックスメタロプロテインアーゼ-2, マトリックスメタロプロテインアーゼ-9, ウロキナーゼ型 プラスミノゲンアクチベーターおよび その受容体の発現の検討

金沢大学医学部医学科第一外科学講座(主任:渡辺洋宇教授)

小 杉 郁 子

下肢静脈瘤は主として伏在静脈の弁不全による内圧上昇によって静脈壁が局所的に拡張をきたした疾患である。下肢静脈瘤においてマトリックスメタロプロテインアーゼ(matrix metalloproteinases, MMP)とその活性化を行う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, uPA)が果たす役割を検討する目的で、手術時に採取した静脈瘤73例(延べ切除静脈片は大伏在静脈鼠径部82個, 静脈瘤85個, 大伏在静脈足関節部28個)と正常大伏在静脈13例(大動脈-冠動脈バイパス手術時に採取した静脈の一部13個)に対し、免疫組織化学的染色, サンドイッチイムノアッセイ法を用いた酵素産生量の測定を行った。静脈瘤壁の光学顕微鏡的観察において、平滑筋細胞の増生による中膜の肥厚あるいは減少による菲薄化と、弾性線維の軽度の増生や断裂, 走行の乱れが見られた。免疫組織化学的単染色の結果, MMP-2は正常血管, 静脈瘤ともに内膜の血管内皮細胞, 中膜の平滑筋細胞, 外膜の全層に染色性が認められた。MMP-9は静脈瘤の中膜の平滑筋細胞に染色性が認められた。uPAとuPAレセプター(uPA receptor, uPAR)は静脈瘤の中膜の平滑筋細胞にそれぞれ染色性が認められたが, MMP-9染色陽性細胞と一致しない場合が多かった。MMP-9, uPA, uPARの標本数に対する染色陽性標本の割合を比較したが, MMP-9は静脈瘤足関節部(71.4%)は正常静脈(15.4%)に比較して有意に割合が高かった($p < 0.01$)。uPAは静脈瘤足関節部(7.14%)で標本数に対する染色陽性標本の割合が鼠径部(62.2%)と瘤部(36.5%)に比較して有意に低かったが($p < 0.01$), 正常静脈(15.4%)との比較では有意差は得られなかった。uPARでの標本数に対する染色陽性標本の割合は静脈瘤鼠径部(14.6%), 瘤部(11.8%), 足関節部(3.57%), 正常静脈(7.69%)で各群間に有意差は認められなかった。培養上清で行ったuPAの定量では大伏在静脈鼠径部 381.4 ± 301.5 ng/g蛋白, 瘤部 266.5 ± 217.7 ng/g蛋白, 足関節部 207.2 ± 138.1 ng/g蛋白, 正常大伏在静脈壁 135.9 ± 93.4 ng/g蛋白で, 大伏在静脈鼠径部と正常大伏在静脈間に $p < 0.05$ で有意差が認められた。uPAの血漿中濃度は静脈瘤群は 1.13 ± 1.10 ng/ml, 健常人で 1.50 ± 0.66 ng/mlで有意差は認められなかった。以上の結果から下肢静脈瘤では, MMP-9, uPAが中膜の平滑筋細胞から産生され, 静脈瘤の形成進展に関与しているものと考えられた。すなわち静脈内圧上昇に反応して中膜の平滑筋細胞増殖やマトリックス増生が生じるがその時にMMP-9, uPAが産生され, 壁の再構築が一部では弾性線維の破壊と壁の菲薄化をもたらすものと考えられた。MMP-9とuPAの産生細胞が必ずしも一致しないのは傍分泌の制御機構が考えられ, 静脈瘤では弁不全により大伏在静脈鼠径部の血液は静脈瘤の部分に逆流することから, 大伏在静脈鼠径部のuPAが静脈瘤の部位のMMP-9に作用してそれを活性化し, 異常なマトリックス再構築としての弾性線維破壊をきたすと考えられた。

Key words varicose veins, matrix metalloproteinases, urokinase-type plasminogen activator

下肢静脈瘤は肥満や妊娠時の腹圧上昇, 長時間の立ち仕事などによる静脈内圧の上昇や妊娠時のホルモン高値などにもない, 伏在静脈などの弁不全が発生し, 慢性的な内圧上昇に抗しきれず表在静脈が局所的に拡張をきたした疾患である^{1)~3)}。一般に血管壁の形状を決定するのは主に中膜で, 中膜に存在する弾性線維や膠原線維などの細胞外マトリックスが壁の形状を維

持する役割をはたし, これらの線維の破壊や断裂が壁構造の破壊, 形状変化をもたらしているとされている。これら細胞外マトリックスを分解する酵素系の中でも, マトリックスメタロプロテインアーゼ(matrix metalloproteinases, MMP)は, 生体内のほとんどすべての細胞外マトリックスを中性域で分解することが知られ^{4)~6)}, 悪性疾患⁷⁾や慢性関節リウマチ⁸⁾, 糸球体腎

平成11年5月11日受付, 平成11年7月21日受理

Abbreviations: DAB, 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride; EVG, elastica van Gieson; LSAB, labelled streptavidin biotin; MMP, matrix metalloproteinase; PA, plasminogen activator; PAI, plasminogen activator inhibitor; TIMP, tissue inhibitors of metalloproteinase; uPA, urokinase-type plasminogen activator; uPAR, urokinase-type plasminogen activator receptor

炎¹⁰といった膠原病などさまざまな疾患での発現が報告されている。MMPの活性化システムの重要なものとして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, uPA) による一連の反応がある^{5)11)~13)}。uPAは血管の疎通性の維持や血栓の溶解過程に重要な役割を果たす酵素である¹³⁾が、MMPと同様に悪性疾患で発現することが報告され¹⁴⁾、細胞表面で特異的なレセプターであるウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーターレセプター (urokinase-type plasminogen activator receptor, uPAR) に結合し、プラスミノゲンを活性化してプラスミンを生じさせ、プラスミンがMMP-9 (ゼラチナーゼB, 92 kDa IV型コラゲナーゼ) の前駆体酵素を活性化することが明らかとなっている¹⁵⁾。さらにMMP-2 (ゼラチナーゼA, 72 kDa IV型コラゲナーゼ) の特異的活性化因子として膜型マトリックスメタロプロテインアーゼ (membrane-type matrix metalloproteinase, MT-MMP) が最近報告されている^{7)6)16)~18)}。主に悪性疾患で注目されているMMPやuPAであるが、血管疾患では大動脈瘤においてMMP-9の関与が以前から注目され^{19)~23)}、中膜に存在するマクロファージにMMP-9が発現して弾性繊維や基底膜のIV型コラゲンを切断し大動脈壁の中膜を破壊する結果、大動脈壁の脆弱化を来し大動脈径が拡張し、瘤が形成されることが明らかになった²⁴⁾²⁵⁾。また、実験的にマウスの大動脈と総頸静脈に障害を加え拡張させると、MMP-2およびMMP-9が内弾性板と外弾性板周囲に発現することが明らかにされた²⁶⁾。しかし静脈疾患においてはuPAが下肢静脈瘤症例の大伏在静脈鼠径部の組織培養液中において増加していることが報告されているのみで²⁷⁾、下肢静脈瘤とMMP、uPAの関係について総合的に検討した論文は見受けられない。

本研究では下肢静脈瘤におけるMMP-2, MMP-9, uPA, uPARの局在を免疫組織学的に解析し、組織培養上清および血漿中へのuPAの分泌量を測定し検討した。

対象および方法

I. 静脈瘤壁と対照群静脈壁組織、および血漿の採取

当科および関連施設において下肢静脈瘤ストリッピング術 (伏在静脈剥去術) の際に切除した大伏在静脈の鼠径部と足関節部および静脈瘤を材料とした。下肢静脈瘤症例は男性23例、女性50例の計73例で、年齢は25歳から82歳、平均は53.2歳であった。下肢静脈瘤の形態学的分類は伏在静脈瘤 (saphenous type) か分枝静脈瘤 (segmental type) で、臨床的重症度分類²⁸⁾ではクラス2から4の症例を対象とした。患肢は片側あるいは両側であり、切除静脈片の延べ数は大伏在静脈鼠径部82個、静脈瘤85個、大伏在静脈足関節部28個であった。対照として、当科における大動脈-冠動脈バイパス術の際にグラフトとして採取した大伏在静脈の鼠径部の静脈片13個を用いた。対照群は男性8例、女性5例の計13例で、年齢は59歳から74歳、平均は68.3歳であった。採取した静脈片は挫滅部分を選り捨て約1cm採取し、うち下肢静脈瘤症例35例と正常大伏在静脈13例は一部を培養用に使い、残りの部分、および培養に用いなかった症例の静脈片はホルマリン固定液に1から3日間固定した後パラフィン包埋した。パラフィン切片はHE染色、エラスチカ・ワンギーソン (elastica van Gieson, EVG) 染色および免疫染色を行い、光学顕微鏡的に観察した。また、下肢静脈瘤症例20例より早朝空腹時に肘静脈より採血を行い、3000 rpmで10分

間遠心分離し得られた血漿を-80℃で保存した。対照群は健康なボランティア15例とし、同様に採血し、血漿を保存した。

II. 静脈壁組織の免疫組織化学染色

免疫染色は、ラベルドストレプトアビジン-ビオチン (labelled streptavidin biotin, LSAB) 法にて行った。パラフィン切片をキシレン-アルコール系列で脱パラフィンし、水道水で2分間洗浄後、3%過酸化水素加カルシウム、マグネシウム不含PBS (pH 7.4) (日本製薬, 東京) に15分間浸し、内因性ペルオキシダーゼブロックを行った後、流水にて10分間洗浄した。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。一次抗体はマウス精製モノクローナル抗ヒトMMP-2抗体 (富士薬品工業, 富山), マウス精製モノクローナル抗ヒトMMP-9抗体 (富士薬品工業) をPBSにてそれぞれ100倍に希釈して室温で1時間反応させた。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・ヤギ抗体および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) の混合液を、20分間室温にて反応させた。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、20分間室温にて反応させ、さらに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 (3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride, DAB) (和光純薬, 大阪) [30mgを150mlのPBSに溶解し、30μlの34%過酸化水素水を加えて調整] にて、MMP-2は約3分間、MMP-9は約9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。

なおuPA, uPAR免疫染色は内因性ペルオキシダーゼブロックを行う前に、以下のとおりに抗原の賦活を行った。uPAは0.02%トリプシン溶液 (トリプシン (Sigma, St. Louis USA) 2mgと塩化カルシウム (和光純薬) 2mgを10ml PBSに溶解) に10分間浸し、流水で10分間洗浄後500 Wマイクロウェーブ処理を3回行い抗原の賦活を行った。uPARは500 Wマイクロウェーブ処理を3回行った後、0.02%トリプシン溶液に10分間浸したのち流水で10分間洗浄した。それぞれの賦活ののち3%過酸化水素加PBSに15分間浸し、内因性ペルオキシダーゼブロックを行った後、流水にて10分間洗浄した。ウシ血清アルブミンにて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、それぞれマウスモノクローナル抗uPA抗体、マウスモノクローナル抗uPAR抗体 (American diagnostica inc., Greenwich, USA) を、PBSにて100倍、50倍に希釈し、4℃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・ヤギ抗体およびビオチン標識抗ウサギイムノグロブリン・ヤギ抗体の混合液を、20分間室温にて反応させた。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を、20分間室温にて反応させ、さらにPBSにて5分間3回洗浄した。LSAB反応終了後、DAB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. 静脈瘤壁組織の培養

Iで得られた大伏在静脈鼠径部、大伏在静脈足関節部、静脈瘤壁組織および対照群大伏在静脈組織をそれぞれ無菌的に1×1×1mmに細切し、その組織片15個を1%ペニシリンG, スト

レプトマイシン, アンホテリシンB, 0.2% L-グルタミン含有 RPMI 1640 培地 (Gibco, New York, USA) 2 ml 中で 37°C 24 時間培養した。培養液は採取後に 0.2% アジ化ナトリウムを添加し, 10000 rpm で 5 分間遠心分離を行い, 上清を採取しミニチューブ内に -80°C で保存した。組織片も取り出しミニチューブ内に -80°C で冷凍保存した。

IV. 静脈瘤壁蛋白質量の測定

Lijnen ら²⁰⁾の方法にしたがい, 150 mM 塩化ナトリウム (和光純薬), 1% ポリオキシエチレン (10) オクチルフェニルエーテル (Triton X-100) (和光純薬), 0.1% SDS (和光純薬), 0.5% デオキシコール酸ナトリウム (和光純薬), 0.2% アジ化ナトリウム (和光純薬) 含有 10 mM 硫酸ナトリウム (和光純薬) を混和し, 蛋白抽出用緩衝液 (pH 7.2) を作成した。緩衝液 1 ml を培養に用いた組織の入ったミニチューブ内に注入し, 十分に混和したのち 10000 rpm で 5 分間遠心分離を行い上清を採取し, モデル 550 マイクロプレートリーダー (日本バイオ・ラボラトリーズ, 東京) を用い 595 nm の波長で吸光度を計測し蛋白質量を算出した。

V. 組織培養液および血漿中の uPA 活性の測定

培養上清中の uPA はサンドイッチイムノアッセイ法にて定量した。キットは TintElize® uPA (Biopool AB, Umeå, Sweden) を用いた。予め抗ヒト uPA モノクローナル抗体が吸着したマイクロプレートの各ウェルに, PBS-EDTA-Tween 20 液を 100 μ l ずつ注入し, 1 分間震盪し賦活を行ったのち, 培養上清を 50 μ l ずつ注入し蓋をして 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ヤギ抗ヒト uPA 抗体を各ウェルに 50 μ l ずつ追加し 1 時間震盪したのち, 各ウェルを PBS-EDTA-Tween 20 液を 350 μ l ずつ 4 回注入して洗浄した後, オルトフェニレンジアミン (*ortho*-phenylenediamine) と 0.15% 過酸化水素水 2 ml を加えたものを各ウェルに 200 μ l ずつ注入し, 30 分間暗所で震盪し発色させた。3M の硫酸 (和光純薬) を各ウェルに 50 μ l ずつ注入して 10 分間暗所に置き反応を停止させた後, モデル 550 マイクロプレートリーダーを用い, 492 nm の波長で吸光度を計測し, 標準曲線をもとに培養上清中の uPA 濃度を算出した。測定した uPA の量は培養に用いた組織蛋白質 1 g あたりの重量 (ng/g 蛋白) で表した。また血漿中の uPA の量は同様に定量して ng/ml で表した。

VI. 統計学的検討

測定値は平均値 \pm 標準偏差で示し, 各群間における平均値の比較は Mann-Whitney 検定を用い, 危険率 5% 未満をもって有意とした。また多群間における平均値の比較は Kruskal-Wallis 検定を用い, 危険率 5% 未満をもって有意とした。各群における染色率の検定は χ^2 検定を用い, 危険率 5% 未満をもって有意とした。

成 績

I. 光学顕微鏡的観察

HE 染色では, 正常大伏在静脈鼠径部に比較して患肢の大伏在静脈鼠径部, 大伏在静脈足関節部, 静脈瘤壁において平滑筋細胞の増生による中膜の肥厚, あるいは減少による菲薄化がみられたが, 平滑筋細胞の配列の乱れは認められず, 一様に長軸方向に対し垂直にほぼ輪状の配列が見られた (図 1A, B, C, D)。

標本を十分に観察し内弾性板と外弾性板とを同定し, その間の最大厚の中膜の厚さを計測したところ, 中膜壁厚は鼠径部では $488 \pm 188 \mu$ m ($\bar{x} \pm$ SD, $n = 82$), 瘤部では $396 \pm 152 \mu$ m

($n = 85$), 足関節部では $360 \pm 121 \mu$ m ($n = 28$), 正常大伏在静脈では $315 \pm 66.8 \mu$ m ($n = 13$) であり, 鼠径部と正常大伏在静脈, 鼠径部と足関節部, 鼠径部と瘤部の間で有意差 (それぞれ $p < 0.01$) が認められ, また瘤部と足関節部の間にも有意差 ($p < 0.05$) が認められた (図 2A)。

しかし壁厚にはばらつきが見られ, 同一標本内でも壁の肥厚部分と菲薄部分が混在していた。その中膜の最大厚と最小厚の差を測定したところ, 鼠径部では $57.4 \pm 70.5 \mu$ m, 瘤部では $57.3 \pm 55.2 \mu$ m, 足関節部では $31.8 \pm 53.2 \mu$ m, 正常大伏在静脈では $38.1 \pm 39.5 \mu$ m で瘤部と足関節部の間に有意差 ($p < 0.01$) が認められたが, 鼠径部と瘤部間, 鼠径部と正常大伏在静脈間には有意差はみられず, 壁の厚さが同一標本内ではばらつきがある傾向が見受けられたものの, そのばらつきは著明ではなかった (図 2B)。

なおマクロファージや好中球などの炎症細胞の浸潤は, 中膜や外膜に認められたがごくわずかであり, 内膜にはほとんど認められなかった。静脈瘤壁の内膜は薄く弾性線維をほとんど含まず, 外膜は弾性線維を含むが走行は規則性が見られず, 内弾性板と外弾性板とともに明らかではないことも多かった。EVG 染色では正常大伏在静脈鼠径部, 静脈瘤症例大伏在静脈鼠径部, 足関節部に比較して静脈瘤壁の中膜では弾性線維の軽度の断裂が見られ, その走行の方向は正常大伏在静脈鼠径部, 静脈瘤症例大伏在静脈鼠径部, 足関節部は長軸方向に対し一様に輪状で同心円を描くように走行しているが, 静脈瘤壁では走行に乱れが生じ同心円を描いてはなかった (図 1E, F, G, H)。静脈壁は動脈とは異なり弾性線維が豊富とはいえないことから断裂の程度は軽度にとどまったが, 走行方向の乱れは瘤の拡張時に生じた組織学的変化の現れと考えられた。

II. 静脈瘤壁における MMP-2, MMP-9, uPA, uPAR の免疫組織化学的局在

MMP-2, MMP-9, uPA, uPAR の免疫染色性を内膜, 中膜, 外膜各々の全細胞数に占める陽性細胞の割合で評価した。観察はそれぞれ 400 倍の視野で行い, 1 標本につき最も陽性細胞の多く見られる 1 視野中の細胞数と陽性細胞数を数え, 全標本数で平均をとり算出した (表 1)。各標本での中膜における MMP-9 の全細胞数に占める陽性細胞数の割合を採取部位別に標本数全体と比較すると, 大伏在静脈鼠径部では $25.9 \pm 5.6\%$ ($\bar{x} \pm$ SD, $n = 82$), 大伏在静脈足関節部では $25.1 \pm 5.4\%$ ($n = 28$), 静脈瘤壁では $24.5 \pm 4.6\%$ ($n = 85$) で, 正常大伏在静脈の $8.9 \pm 4.1\%$ ($n = 13$) との間にはそれぞれ有意差 ($p < 0.05$) が認められた。uPA, uPAR の全細胞数に占める陽性細胞数の割合は各群の間で有意差は認められなかった。

MMP-2 は正常大伏在静脈壁および, 静脈瘤症例の大伏在静脈鼠径部, 足関節部, 静脈瘤壁ともに内膜の血管内皮細胞, 中膜の平滑筋細胞, 外膜の線維芽細胞の全層に 100% の染色性がすべての標本に認められ (図 3A), 標本数全体に対する染色陽性標本 (標本中 1 個でも染色陽性細胞が存在した標本) の割合に正常大伏在静脈と静脈瘤間では有意差は認められなかった。MMP-9 は静脈瘤症例の大伏在静脈鼠径部, 足関節部, 静脈瘤壁の中膜の平滑筋細胞と中膜に染色性が認められた (図 3B)。

MMP-9 の標本数全体に対する染色陽性標本の割合は静脈瘤症例では鼠径部 35.4%, 瘤部 42.4%, 足関節部 71.4% (図 4A) であり鼠径部と瘤部の間には有意差は認められなかったが, 足関節部は鼠径部, 瘤部と比較して有意に染色陽性標本の割合が

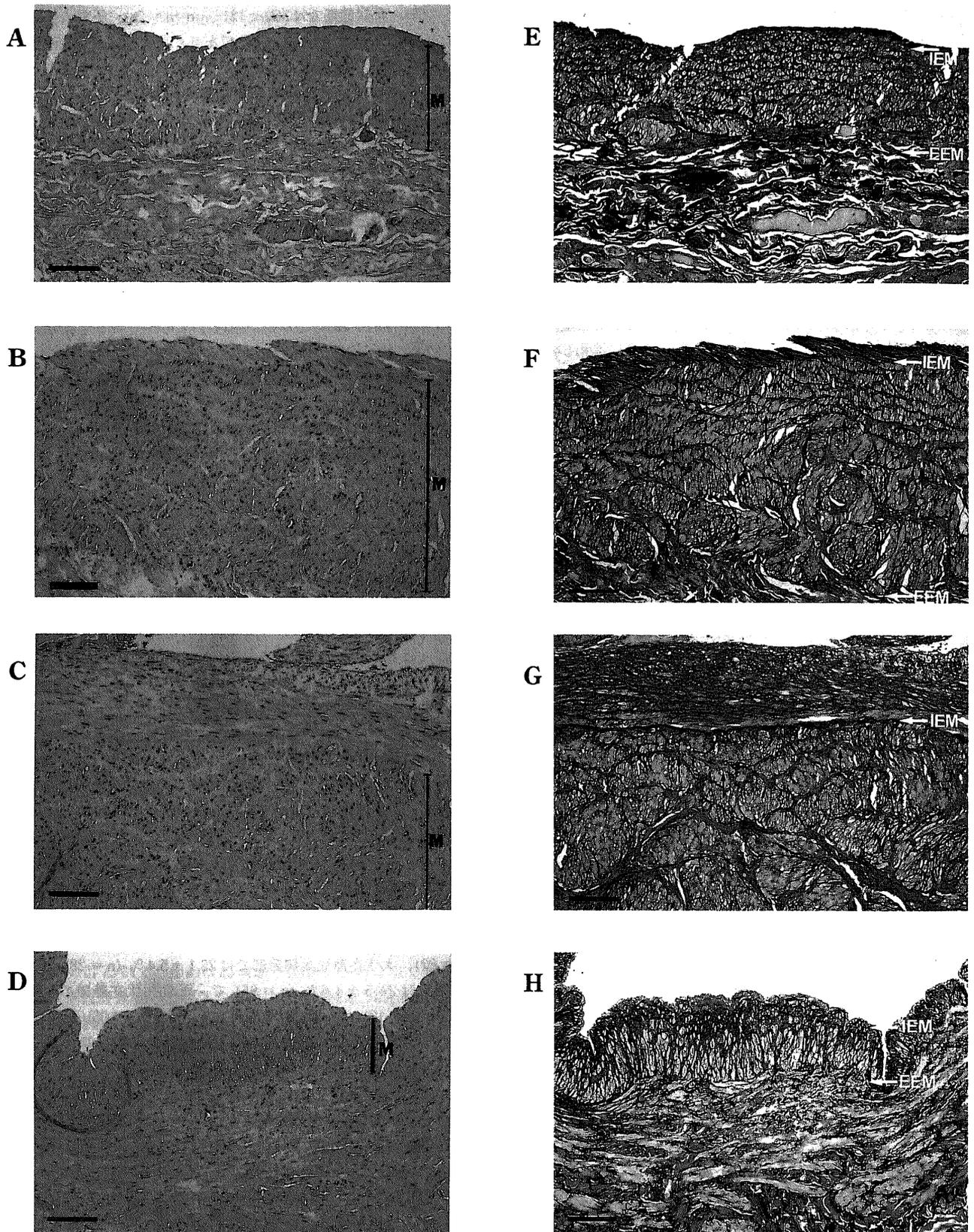


Fig. 1. Light micrographic findings of a varicose venous wall with dilation. All vessels are cut in longitudinal sections. (A) Greater saphenous vein with varicose veins at the groin. HE stain. (B) Varicose vein. HE stain. (C) Greater saphenous vein with varicose veins at the ankle. HE stain. (D) Greater saphenous vein in control. HE stain. (E) Greater saphenous vein with varicose veins at the groin. Elastica van Gieson stain. (F) Varicose vein. Elastica van Gieson stain. (G) Greater saphenous vein with varicose veins at the ankle. Elastica van Gieson stain. (H) Greater saphenous vein in control. Elastica van Gieson stain. M, tunica media. ←IEM, internal elastic membrane; ←EEM, external elastic membrane. Arrows indicate the fragmentation of elastic fiber. Scale bar indicates 200 μ m.

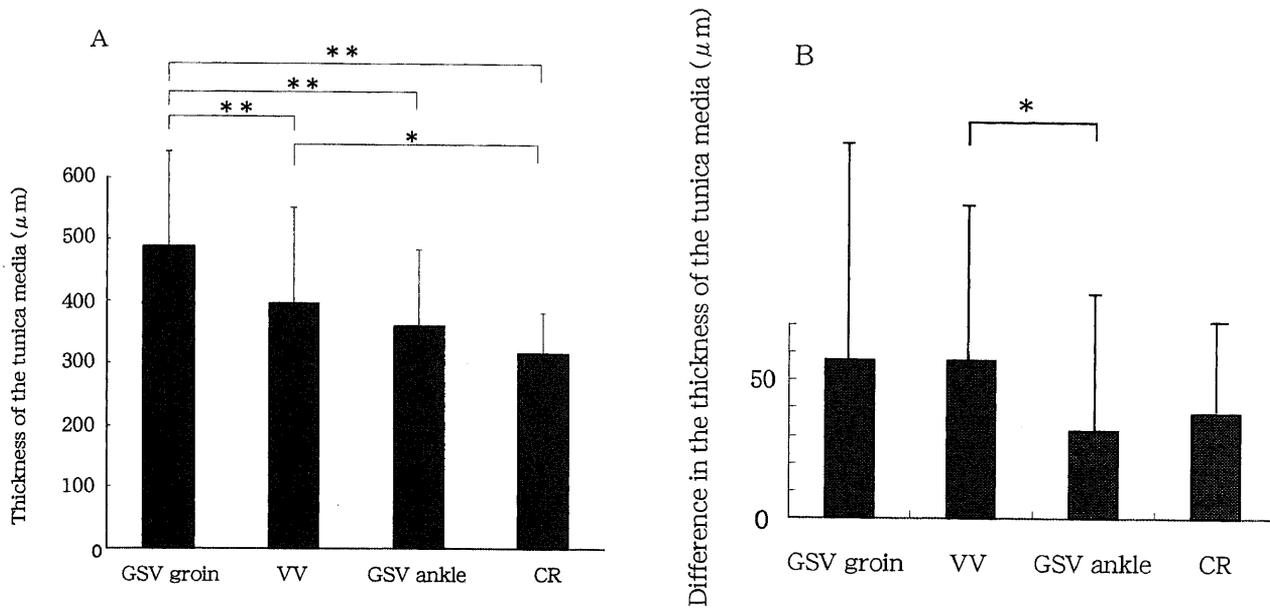


Fig. 2. (A) Thickness of the tunica media. GSV groin, greater saphenous vein at the groin; GSV ankle, greater saphenous vein at the ankle; VV, varicose vein; CR, control. Each bar represents $\bar{x} \pm SD$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. (B) Difference in the thickness of the tunica media in the same sample. GSV groin, greater saphenous vein at the groin; GSV ankle, greater saphenous vein at the ankle; VV, varicose vein; CR, control. Each bar represents $\bar{x} \pm SD$. * $p < 0.01$.

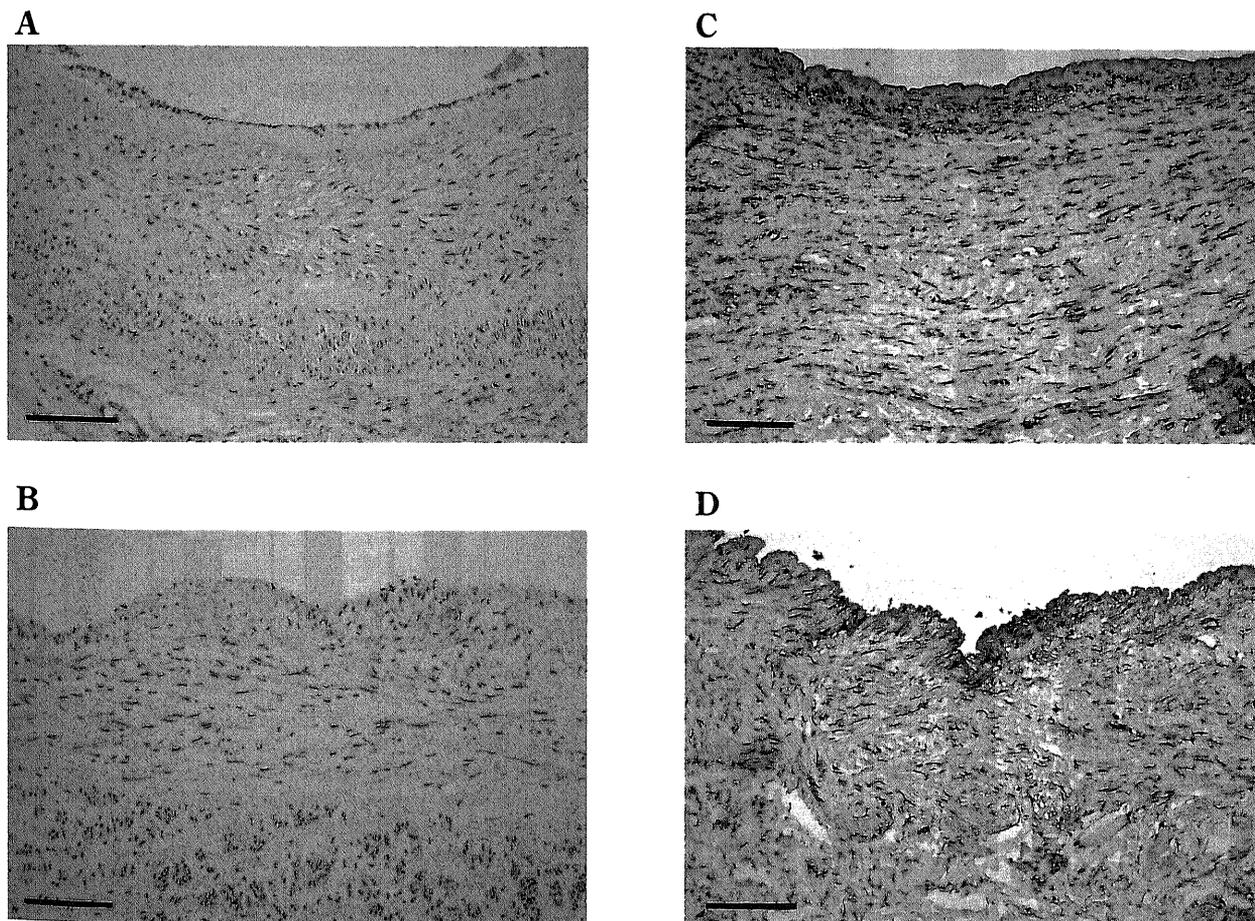


Fig. 3. Immunohistochemical staining of varicose venous wall for MMP-2 (A), MMP-9 (B), uPA (C), uPAR (D). MMP-2 was localized in the cells in all layers of the wall, whereas MMP-9 was localized on the surface of smooth muscle cells in the tunica media. uPA and uPAR were localized on the surface of smooth muscle cells in the tunica media. Original magnification, $\times 33$. Scale bar indicates $200 \mu m$.

高かった ($p < 0.01$). 正常大伏在静脈も中膜に染色性が認められたがその染色陽性標本の割合は15.4%であり、静脈瘤患者の大伏在静脈足関節部との間に有意差が認められた ($p < 0.01$). MMP-9染色陽性群とMMP-9染色陰性群の間には中膜の厚さには相関関係は認められず、MMP-9が陽性である症例が特に中膜の肥厚あるいは菲薄のどちらかに強く偏っているとはいえなかった (図5A). また、中膜の最大径と最小径の差についても、陽性群と陰性群の間に有意差は見られず、MMP-9陽性症例がより中膜の厚さにばらつきが生じているとはいえなかった (図5B).

uPAはMMP-9と同様に中膜の平滑筋細胞に染色性が認められた (図3C). 全細胞数に占める陽性細胞数の割合の比較で有意差が得られなかったため、標本数全体に対する陽性標本数の

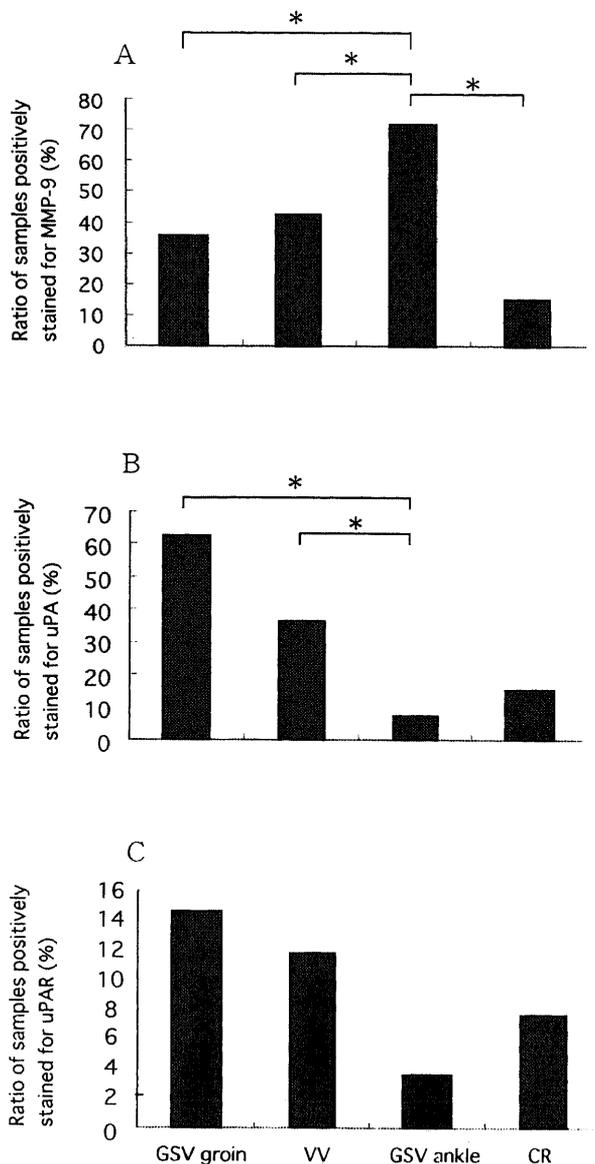


Fig. 4. Ratio of the positively stained samples over all samples. (A) MMP-9. (B) uPA. (C) uPAR. GSV groin, greater saphenous vein at the groin; GSV ankle, greater saphenous vein at the ankle; VV, varicose vein; CR, control. * $p < 0.01$.

割合での比較を試みたが、uPAの染色陽性標本数の割合は静脈瘤症例で鼠径部62.2%、瘤部36.5%、足関節部7.14%、正常大伏在静脈壁は15.4%で、足関節部の染色陽性標本数の割合は鼠径部と瘤部の割合と比較して有意に低く ($p < 0.01$), 足関節部と正常大伏在静脈との間には有意差は認められなかった (図4B).

uPARも同様に中膜の平滑筋細胞に染色性が認められた (図3D). uPAと同様に、全細胞数に占める陽性細胞数の割合の比

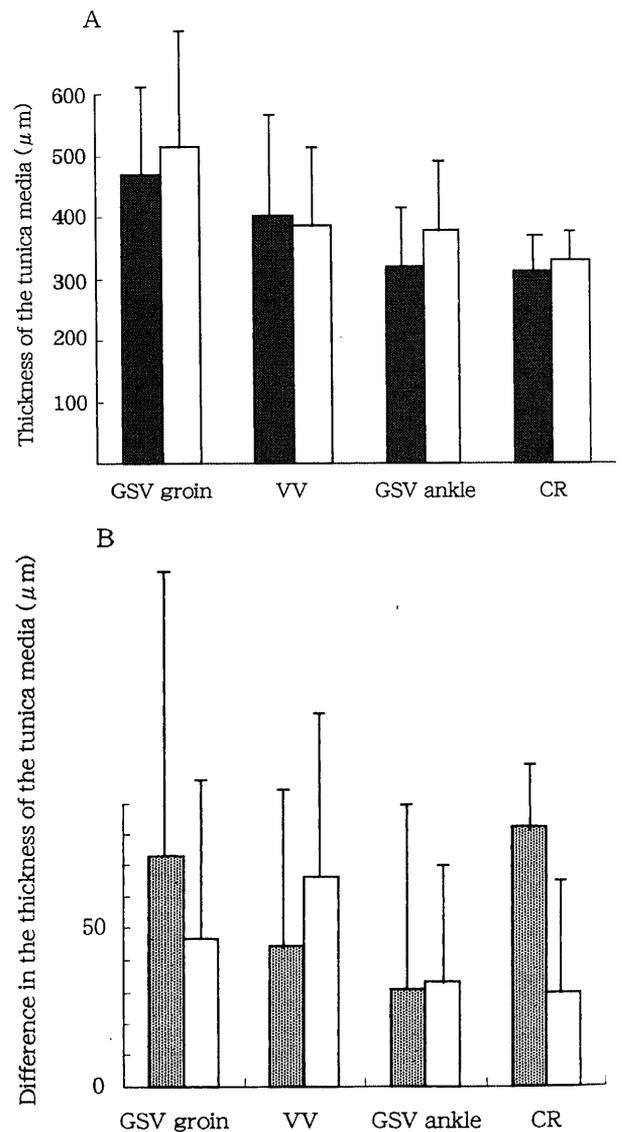


Fig. 5. (A) Thickness of the tunica media. GSV groin, greater saphenous vein at the groin; GSV ankle, greater saphenous vein at the ankle; VV, varicose vein; CR, control. Gray bar, group of samples positively stained for MMP-9 ($n=87$); White bar, group of samples negatively stained for MMP-9 ($n=121$). Each bar represents $\bar{x} \pm SD$. (B) Difference in the thickness of the tunica media in the same immunostained sample. GSV groin, greater saphenous vein at the groin; GSV ankle, greater saphenous vein at the ankle; VV, varicose vein; CR, control. Gray bar, group of samples positively stained for MMP-9 ($n=87$); White bar, group of samples negatively stained for MMP-9 ($n=121$). Each bar represents $\bar{x} \pm SD$.

較で有意差が得られなかったため、標本数全体に対する陽性標本数の割合での比較を試みたが、uPARの染色陽性標本数の割合は静脈瘤症例で鼠径部14.6%、瘤部11.8%、足関節部3.57%、正常大伏在静脈壁は7.69%でそれぞれ有意差は認められなかつ

た(図4C)。

MMP-9は中膜の平滑筋細胞より産生されていることが明らかとなったが、MMP-9陽性標本においてuPAとuPARが共に陽性である標本は、静脈瘤症例大伏在静脈鼠径部で6例、瘤部で

Table 1. Tissue localization of MMP, uPA and uPAR

Lesion	Layer of vein	Ratio (x±SD, %) of immunopositive cells			
		MMP-2	MMP-9	uPA	uPAR
GSV groin	Intima	100	0	0	0
	Media	100	25.9±5.61 *	3.09±0.35	0.35±0.15
	Adventia	100	0	0	0
VV	Intima	100	0	0	0
	Media	100	25.2±5.42 *	2.00±0.42	0.38±0.15
	Adventia	100	0	0	0
GSV ankle	Intima	100	0	0	0
	Media	100	24.5±4.62 *	1.17±0.78	0.16±0.16
	Adventia	100	0	0	0
CR	Intima	100	0	0	0
	Media	100	8.90±4.10	2.66±1.57	0.31±0.20
	Adventia	100	0	0	0

MMP, matrix metalloproteinases; uPA, urokinase-type plasminogen activator; uPAR, urokinase-type plasminogen activator receptor; GSV groin, greater saphenous vein with varicose veins at the groin; VV, varicose vein; GSV ankle, greater saphenous vein with varicose veins at the ankle; CR, control. *p<0.05, vs. control.

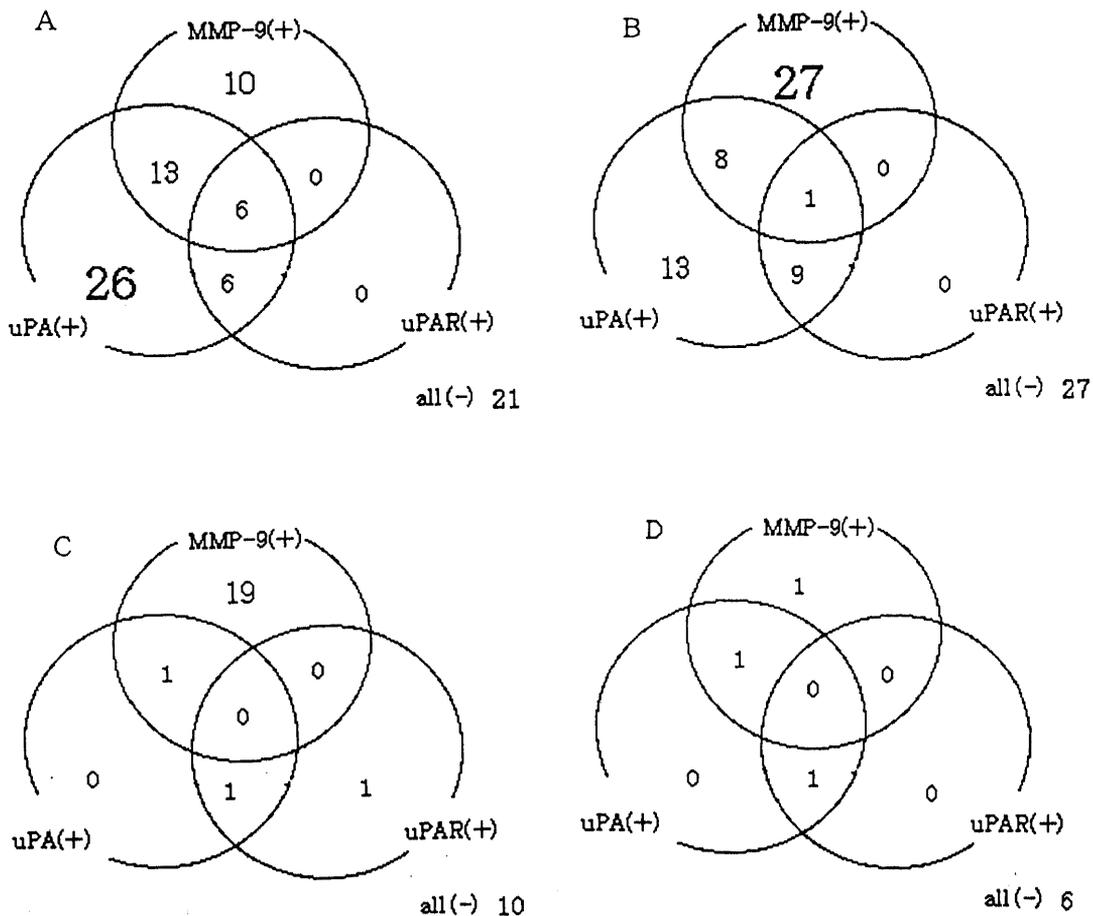


Fig. 6. Number of the positively stained samples for MMP-9, uPA, uPAR. (A) GSV groin. (B) VV. (C) GSV ankle. (D) Control.

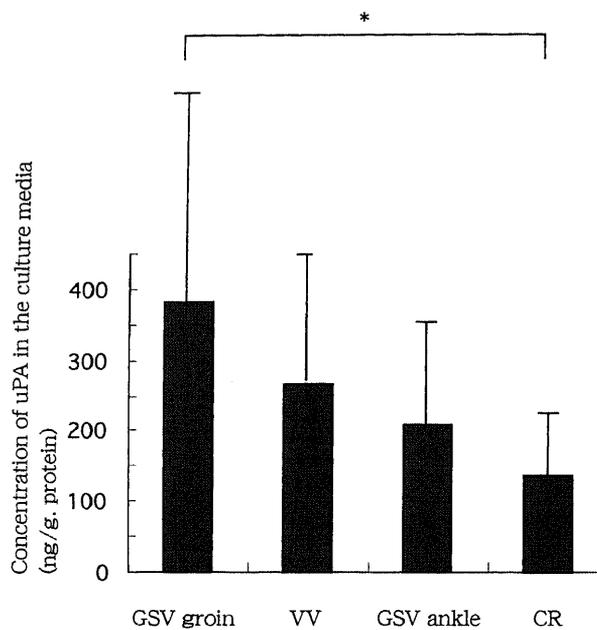


Fig. 7. Concentration of uPA in the culture media of the venous tissue with varicose veins. GSV groin, greater saphenous vein at the groin; GSV ankle, greater saphenous vein at the ankle; VV, varicose vein; CR, control. Each bar represents $\bar{x} \pm SD$. * $p < 0.05$.

1例, 足関節部で0例, 正常静脈で0例であり, すべての酵素を産生している症例が鼠径部で比較的多かったものの, 有意差はみられず, 各酵素を産生している静脈の部位や細胞集団は異なる可能性が示唆された(図6A, B, C, D).

また, uPAとuPARは同一標本で陽性に染色された標本は静脈瘤症例大伏在静脈鼠径部で12例, 瘤部で10例, 足関節部で1例, 正常静脈で1例みられたが, uPAが陰性でuPARが陽性に染色された標本はわずかに1例のみであった。

Ⅲ. 組織培養上清中および血漿中のuPAの定量

静脈瘤症例の培養上清におけるuPA量の平均±標準偏差は, 鼠径部で 381.4 ± 301.5 ng/g蛋白 ($\bar{x} \pm SD$, $n = 35$), 瘤部で 266.5 ± 217.7 ng/g蛋白 ($n = 35$), 足関節部で 207.2 ± 138.1 ng/g蛋白 ($n = 35$)であり, 正常大伏在静脈壁の培養上清中では 135.9 ± 93.4 ng/g蛋白 ($n = 13$)で, 静脈瘤症例の大伏在静脈鼠径部と正常大伏在静脈壁の間には有意差 ($p < 0.05$) が認められたが, 鼠径部, 瘤部, 足関節部の間には有意差は認められなかった(図7).

uPAの血漿内濃度は静脈瘤群で 1.13 ± 1.10 ng/ml ($n = 20$), 健康人で 1.50 ± 0.66 ng/ml ($n = 15$)で有意差は認められなかった(図8).

考 察

下肢静脈瘤は肥満や妊娠時の腹圧上昇, 長時間の立ち仕事などによる静脈内圧の上昇や妊娠時のホルモン高値などにもない, 伏在静脈の弁不全が発生し, 周囲に支持組織の少ない表在静脈において高い内圧による過度の張力が加わり, 不可逆的, 局所的に静脈壁が拡張をきたした疾患と考えられている¹⁾³⁾. さらに下肢静脈瘤の罹患には詳細は明らかにされていない

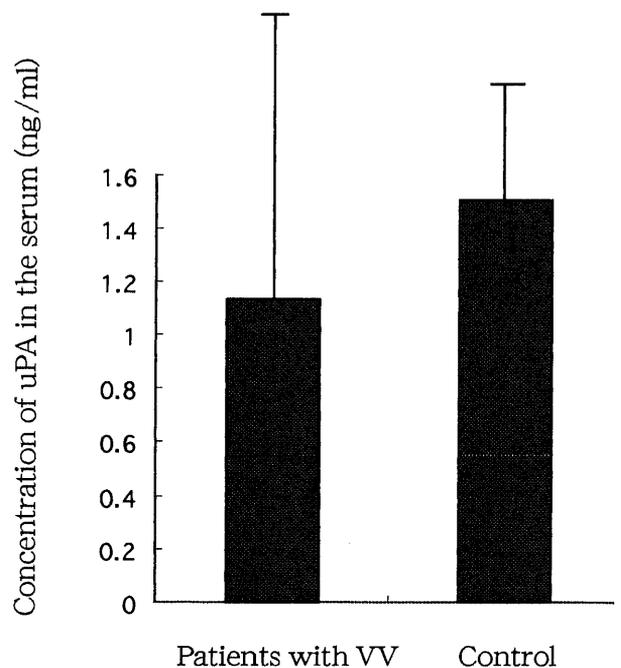


Fig. 8. Concentration of uPA in the serum of patients with varicose veins and healthy controls. Each bar represents $\bar{x} \pm SD$.

ものの家族性が認められ, Cornu-Thenardら²⁹⁾は両親が下肢静脈瘤に罹患している場合, その子供は90%の確率で下肢静脈瘤に罹患し, 父親が罹患している場合は25%, 母親が罹患している場合は62%, 両親共に罹患していない場合は20%と述べており, 家族的因子も無視できない。

本疾患は致命的ではないものの, 一度罹患すると慢性的に経過し, 場合によっては停留性皮膚炎, 皮膚潰瘍をきたし, 患者の受ける身体的, 精神的苦痛は大きい. 静脈瘤に陥った静脈は蛇行し長さが増大し, 拡張は不規則で結節または紡錘形に拡張したり動脈瘤様の膨出を伴う. また, 血管壁の厚さも不規則で最も強く拡張している部位では壁の厚さは薄くなり, 一方これに接した部位では中膜の代償性肥大や壁の線維化によって肥厚しているところも見られる. 弁膜の変形や内腔の血栓化が認められることもあるが, 顕微鏡的にはこの変化は極めて軽微で静脈壁の様々な肥厚が見られるのみとされる. また, Maurelら³⁰⁾は正常静脈と下肢静脈瘤の拡張部と非拡張部の膠原線維の量を測定し, 正常静脈より下肢静脈瘤静脈は膠原線維の増加が見られたが, 拡張部と非拡張部間での膠原線維の量に有意差はみられなかったと述べている. 本研究では, 光学顕微鏡にて観察した結果, 弾性線維の量は, 正常大伏在静脈鼠径部に比較して下肢静脈瘤症例の大伏在静脈鼠径部に有意に増加や減少しているような所見は得られなかったが, その走行には乱れが生じていた. 計測された中膜の厚さを比較したところ, 正常大伏在静脈鼠径部に比較して下肢静脈瘤症例の大伏在静脈鼠径部が有意に肥厚していた. また, 同一標本内でも中膜の厚さに変化が見られ, 有意差は見られなかったが, 静脈瘤部分では中膜の肥厚部分と菲薄部分が混在している傾向が見られた. これらの中膜の厚さの変化は, 壁を拡張させようとする静脈内圧に対する壁の

再構築が成立した部分と成立し得なかった部分とを示すものと考えられ、静脈瘤鼠径部や瘤部において同一標本内で中膜の厚さに差がある部分が見られることは、静脈内圧の上昇に対し再構築がなされて耐圧性を保つことができた部位と、再構築が不完全で逆に内圧に抗しきれず非薄化した部位が混在していると考えられた。足関節部では周囲の脂肪組織などが少なく皮下組織の線維成分が多いことや、筋肉ポンプによる減圧が効率良く行われていることにより瘤化せず、壁の形態を保ち得たと考えられた。また、足関節部の伏在静脈でのuPAの産生が少ないためにマトリックスの変性による瘤化がおこらなかったと考えられた。

他の血管疾患として代表的なものに大動脈瘤が挙げられるが、大動脈瘤の拡張性変化は、弾性線維や膠原線維などの細胞外マトリックス成分の崩壊に伴う壁の脆弱化によるものと考えられ³⁰⁻³³、細胞外マトリックスの分解に関与するMMPファミリーと呼ばれる⁴¹⁻⁶¹一群の酵素のうちMMP-1, MMP-3, MMP-9が大動脈壁に高頻度であることが明らかにされ³⁴⁻³⁸、笠島²⁴と塚²⁵は大動脈瘤において中膜の弾性線維の破壊が著明で、マクロファージから産生されるMMP-9がエラスチン分解活性を有し、免疫組織染色や培養上清中の定量で大動脈瘤での増加が示されることを明らかにし、大動脈瘤の初期病変の形成に重要な役割を果たしていることを報告した。これらMMPは不活性化前駆体酵素として分泌されるが、MMP-9の活性化因子であるuPAとそのレセプターであるuPARはMMPの研究においては、特に重要性のある酵素である。

Lijnenら²⁶はマウスの野生種とuPA遺伝子異常種、プラスミノゲン遺伝子異常種を用い、大腿動脈と総頸静脈に1.4Vの電流を2秒間通電し、血管障害モデルを作成し、活性化MMP-2とMMP-9を免疫染色とゼラチンゼイモグラフィで定量した実験で、障害された静脈壁の内弾性板と外弾性板上に正常な静脈壁に比べ約2倍の活性化MMP-2とMMP-9が発現し、さらにMMP-2はuPA遺伝子異常種、プラスミノゲン遺伝子異常種でも活性化が見られたが、MMP-9はプラスミノゲン遺伝子異常種では活性化が見られなかったことを明らかにした。これらの報告から、拡張や直接的障害時に血管壁内でuPAとMMPsの活性化の一連の反応がおこり、特にMMP-2とMMP-9の活性化がみられることは明らかである。このように大動脈瘤に関しては様々な報告がなされているが、静脈瘤の分野で報告されたものは少なく、Shiremanら²⁷が下肢静脈瘤症例の大伏在静脈鼠径部と足関節部、静脈瘤部と正常大伏在静脈の同部位の組織を48時間培養した上清中の組織型プラスミノゲンアクチベーター (tissue-type plasminogen activator, tPA), uPA, 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の定量を行い、uPAが正常大伏在静脈鼠径部に比べ下肢静脈瘤症例の大伏在静脈鼠径部で有意に増加していることを明らかにし、uPAが膠原線維や弾性線維の破壊をもたらす下肢静脈瘤の形成に病理学的に関与しているのではないかと述べている。しかし、静脈瘤において各種のMMPに関しての研究報告は見られていない。

本研究ではMMP-2, MMP-9の存在と局在を明らかにし、その産生細胞の同定を行い、活性化因子であるuPA, uPARの産生量に関し総合的に検討した。今回、免疫組織学的検索で下肢静脈瘤壁に存在が認められたのはMMP-2, MMP-9, uPA, uPAR全てであった。ただしMMP-2は正常静脈壁、静脈

瘤壁ともに内膜の血管内皮細胞、中膜の平滑筋細胞、外膜全層に強陽性であり、Okadaら³⁹がヒト動脈平滑筋細胞の培養上清がエラスチン分解活性を有しその活性がMMP-2であることを示し、笠島²⁴がヒト大動脈瘤壁の免疫組織学的検討から、MMP-2の産生細胞は泡沫性マクロファージ、内膜と中膜の平滑筋細胞、外膜の線維芽細胞であると示したことと一致するものの、正常静脈の血管内皮細胞、中膜の平滑筋細胞からも産生が認められたことから、その組織特異性および疾患特異性に関してさらなる検討が必要であると考えられる。

MMP-9は中膜の平滑筋細胞に染色陽性で、塚²⁵がマクロファージと平滑筋細胞がMMP-9産生細胞であると報告したことと一致した。本研究では強く炎症所見が見られる下肢静脈瘤は検索対象から除外してあるため、組織学的検索上、マクロファージなどの炎症細胞は中膜や外膜の外側の結合組織内にわずかに見られるのみで、マクロファージがMMP-9を産生していることは確認できなかった。uPAとuPARも中膜の平滑筋細胞から産生されていることが明らかであったが、その産生細胞はMMP-9産生細胞とは異なっているものが含まれていると考えられた。中膜は静脈壁で最も弾性線維や平滑筋細胞が多く存在し、血管の三層構造の中で血管の形態を決定するものであるが、静脈瘤壁の中膜で正常静脈より有意にMMP-9の発現細胞数が多いことや、各部位でのuPAの発現細胞数に有意差は見られなかったものの患肢の大伏在静脈鼠径部の培養上清中のuPA量が正常より有意に高いことは、静脈瘤の形成進展にMMP-9, uPAが関与していることを示すものと考えられる。静脈瘤症例でMMP-9陽性標本群とMMP-9陰性標本群との中膜の厚さを比較したところ、各部位の平均値との間に差が認められず、MMP-9陽性標本において中膜壁の肥厚化あるいは非薄化が見られるとは断言し得なかったのは、MMP-9陽性標本群とMMP-9陰性標本群それぞれの群で計測された中膜の厚さにかんがいのばらつきがあり、それを平均化して比較しているために有意差が得られなかったと考えられた。MMP-9発現によって壁の再構築を強く障害し壁の非薄化を生じさせ、ばらつきを生じさせると証明するには至らなかったものの、壁の厚さを決定している中膜の平滑筋細胞からMMP-9が産生されることによって、壁の再構築に影響を及ぼしていることを示唆する。すなわち静脈内圧上昇に反応して中膜の平滑筋細胞増殖やマトリックス増生が生じるが、その時にMMP-9が産生され壁の再構築が行われ、逆に一部では弾性線維の破壊と壁の非薄化をもたらすものと考えられる。また、MMP-9とuPAの陽性細胞が必ずしも一致せず、同一標本で陽性細胞がみられる症例が少なかった理由として、一つは瘤化の過程上の時相的差異があり、uPAは静脈圧上昇により壁の再構築を開始した、もしくは準備した状態の静脈壁に認められ、産生後速やかに細胞外に分泌されるために免疫組織化学的に陽性になりにくいことで、MMP-9は現在壁の再構築を行っている状態の静脈壁に認められるためと考えられる。もう一つは傍分泌の制御機構が考えられ、特に静脈瘤では弁不全により大伏在静脈鼠径部の血液は静脈瘤の部分に逆流することから、大伏在静脈鼠径部から産生、分泌されたuPAが静脈瘤の部位のMMP-9に作用してそれを活性化し、異常なマトリックス再構築としての弾性線維破壊をきたしていると考えられる。

また、血管内皮細胞は凝固、線溶系の活性化ならびに制御に関する諸因子を産生することが明らかになり、プラスミノゲ

ンアクチベーター (plasminogen activator, PA) を産生放出して線溶系の活性化を行うとされている¹⁹⁾。Shiremanら²⁰⁾が対象とした下肢静脈瘤はストリッピング手術の適応となるもので血栓化の見られていない症例と考えられ、彼らの研究で下肢静脈瘤において増加していたuPAは血栓形成を防止するために産生されたuPAの可能性も残されている。しかし本研究では下肢静脈瘤群と健康人の血漿中濃度は有意差が認められなかったことから、uPAの産生理由は血管内皮細胞から産生された血栓形成防止のためとは断言し得ず、免疫組織化学的検討では全細胞数に占める陽性細胞数の割合と、標本数全体に対する陽性標本数は正常静脈との間に有意差は得られなかったものの、下肢静脈瘤症例の培養上清でuPAが正常静脈の培養上清よりも高値であり、静脈瘤症例の中膜平滑筋細胞からuPAが産生されていることが確認されたことから、むしろ静脈内圧亢進に対する中膜平滑筋細胞の反応と組織再構築に関与していると考えられた。

Brophyら⁴⁰⁾はMMP阻害因子(tissue inhibitors of metalloproteinases, TIMP)の減少が大動脈瘤における酵素活性の増加に関与していると述べ、Allaireら⁴¹⁾はTIMP-1がMMP-9を阻害し大動脈瘤の形成や破裂を予防すると述べ、笠島²¹⁾と塚²²⁾は腹部大動脈瘤においてTIMP-2がMMP-9を阻害することで動脈内膜のマトリックスの改築に関与していると述べている。またPA阻害因子であるPAIは血管内皮細胞、平滑筋細胞およびマクロファージから産生され、PAI-1はuPAと1対1の複合体を形成し特異的にuPAを抑制することが明らかにされ⁴²⁾、Allaireら⁴³⁾はさらにPAI-1発現細胞移植ラット、PAI-1非発現細胞移植ラットと非細胞移植ラットの3種類にモルモットの動脈を移植し、実験的に大動脈瘤を作成したところPAI-1発現細胞移植ラットでは瘤の増大や破裂は見られず、PAI-1非発現細胞移植ラットと非細胞移植ラットではそれぞれ40%、100%の割合で瘤が増大し破裂が見られ、ザイモグラフィで分析した結果、PAI-1発現によってカゼイナーゼ(caseinase)と活性化MMP-9を抑制し瘤の増大と破裂を抑制すると述べている。これらの研究報告から動脈瘤の予防としてTIMPやPAIを血管内投与し血管壁の形態変化の抑制を行い得る可能性があると考えられ、同様に下肢静脈瘤に対してもTIMPやPAIを投与することで、最終的にMMPの発現を抑制し静脈瘤の進展を遅延、抑制し得る可能性があると考えられる。

結 論

下肢静脈瘤におけるMMP-2 (72 kDa ゼラチナーゼ)、MMP-9 (92 kDa ゼラチナーゼ)、uPA、uPARの免疫組織化学的局在を検討し、uPAの静脈壁からの分泌量を測定することで以下の結果を得た。

1. 静脈瘤壁において平滑筋細胞の増生による中膜の肥厚、あるいは減少による菲薄化がみられた。中膜の厚さは患肢の大伏在静脈鼠径部が正常大伏在静脈鼠径部、静脈瘤部、足関節部に比べて有意に高く、また静脈瘤部が正常大伏在静脈鼠径部の間より有意に高かった。測定した中膜の最大厚と最小厚の差は、瘤部が足関節部より有意に高かったが、鼠径部と瘤部間、鼠径部と正常大伏在静脈の間には有意差はみられなかった。静脈瘤では大伏在静脈鼠径部や足関節部に比較して中膜に弾性線維の軽度の増生や断裂が見られ、その走行に乱れが生じ長軸方向に対して輪状かつ同一円状に配列していなかった。

2. 免疫組織化学的単染色の結果、MMP-2は正常血管、静

脈瘤ともに内膜の血管内皮細胞、中膜の平滑筋細胞、外膜の線維芽細胞の全層に全標本で100%の染色性が認められた。

3. MMP-9は静脈瘤の中膜の平滑筋細胞に染色性が認められ、標本数に対する染色陽性標本の割合は静脈瘤鼠径部、瘤部、正常静脈と比較して有意に足関節部が高かった。中膜の全細胞数に対するMMP-9の陽性細胞の割合を採取部位別に比較すると、静脈瘤壁の大伏在静脈鼠径部、瘤部、足関節部とも正常大伏在静脈に比べてそれぞれ有意に高かった。

4. uPAは静脈瘤の中膜の平滑筋細胞に染色性が認められ、標本数に対する染色陽性標本数の割合は、静脈瘤足関節部は鼠径部と瘤部と比較して有意に低かったが、正常静脈との間に有意差は認められなかった。

5. uPARは静脈瘤の中膜の平滑筋細胞に染色性が認められ、標本数に対する染色陽性標本の割合は静脈瘤鼠径部、瘤部、足関節部、正常静脈の各群間に有意差は認められなかった。

6. 同一標本上でMMP-9、uPA、uPARすべてが陽性に染色された標本が少なく、MMP-9はuPA、uPARと異なる平滑筋細胞から産生されている場合があると考えられた。uPAとuPARは同一標本で陽性に染色された標本が多くみられ、同一の平滑筋細胞から産生されているものと考えられた。

7. 培養組織上清のuPA定量では正常大伏在静脈と比較し、静脈瘤鼠径部で有意にuPAが増加していることが明らかとなった。瘤部、足関節部と正常大伏在静脈の間には有意差は認められなかった。

8. 血清中uPA定量では健康人と静脈瘤患者との間に有意差を認めなかった。

以上の結果から下肢静脈瘤において、静脈内圧上昇に反応して中膜の平滑筋細胞増殖やマトリックス増生を生じ、静脈の中膜の厚さが増加する際にMMP-9、uPAは平滑筋細胞から産生され、傍分泌の機構に基づき壁の再構築および瘤形成に関与していることが示唆された。

謝 辞

本稿を終えるに当たり、御指導と御校閲を賜りました恩師渡辺洋宇教授に深く謝意を表します。また、終始御指導頂きました金沢大学第一外科学講座浦山 博講師、笠島史成助手に心から謝意を表します。組織材料を供与頂きました石川県立中央病院心臓血管外科(当時、現在国立金沢病院心臓血管外科)遠藤将光先生、市立砺波総合病院外科片田正一先生、南ヶ丘病院外科森 明弘先生、厚生連高岡病院心臓血管外科松永康弘先生、城端厚生病院外科平野勝康先生に深く感謝いたします。最後に本研究遂行に当たり、終始多大な御協力と御援助を賜った田中洋子技師、金沢大学第一外科学教室員各位に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Callam MJ. Epidemiology of varicose veins. *Br Surg* 81: 167-173, 1994
- 2) Dindelli M, Parazzini F, Basellini A, Rabaiotti E, Corsi G, Ferrari A. Risk factors for varicose disease before and during pregnancy. *Angiology* 44: 361-367, 1993
- 3) 長谷川正光. 静脈循環の特殊性. その力学的, 生理学的側面. *脈管学* 23: 5-9, 1983
- 4) Matrisian LM. Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Trends Genet* 6: 121-125, 1990
- 5) Woessner JF. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J* 5: 2145-2154, 1991

- 6) 岡田保典. マトリックスメタロプロテアーゼと炎症. 組織培養 19: 386-390, 1993
- 7) 常塚宣男. 膜型マトリックスメタロプロテアーゼ-1 (MT-MMP-1) cDNA導入による癌細胞の転移, 浸潤の促進. 十全医会誌 105: 272-286, 1996
- 8) 徳楽正人. 肺癌における膜型マトリックスメタロプロテアーゼ (MT-MMP) の発現とゼラチナーゼA (MMP-2) 活性化の意義. 十全医会誌 106: 320-326, 1997
- 9) 岡田保典, 木村顕子, 中西功夫, 岩田和士. 慢性関節リウマチ滑膜細胞由来 matrix metalloproteinase 2の性質と滑膜細胞内局在. 日病会誌 79: 285, 1990
- 10) 久田幸正. ラット抗Thy1.1腎炎におけるマトリックスメタロプロテイナーゼ-2の発現. 十全医会誌 104: 36-45, 1995
- 11) Matrisian LM. The matrix-degrading metalloproteinases. *Bioessays* 14: 455-463, 1992
- 12) Eeckhout Y, Vaes G. Further studies on the activation of procollagenase, the latent precursor of bone collagenase: effects of lysosomal cathepsin B, plasmin and kallikrein, and spontaneous activation. *Biochem J* 166: 21-31, 1977
- 13) 居石克夫. 血管内皮細胞をめぐる最近の話題. *Blood & Vessel* 18: 107-115, 1987
- 14) 勝尾信一. ヒト線維肉腫細胞 (HT-1080) の肺転移に及ぼすウロキナーゼタイププラスミノゲンアクチベーターおよびプラスミノゲンアクチベーターインヒビター-1の影響. 十全医会誌 103: 628-638, 1994
- 15) Fazioli F, Blasi F. Urokinase-type plasminogen activator and its receptor: new targets for anti-metastatic therapy? *Trends Pharmacol Sci* 15: 25-29, 1994
- 16) Sato H, Takino T, Okada Y, Cao J, Shinagawa A, Yamamoto E, Seiki M. A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature* 370: 61-65, 1994
- 17) Takino T, Sato H, Shinagawa A, Seiki M. Identification of the second membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP-2) gene from a human placenta cDNA library. *J Biol Chem* 270: 23013-23020, 1995
- 18) 神原方枝. 神経芽細胞腫における膜型マトリックスメタロプロテアーゼ-1 (MT-MMP-1) の発現とゼラチナーゼA活性化の検討. 十全医会誌 106: 577-586, 1997
- 19) 重松 宏, 折口信人, 武藤徹一郎. 炎症性大動脈瘤におけるマトリックスメタロプロテアーゼの発現について. 難治性血管炎調査研究班, 1995年度研究報告書. 206-209頁, 1996
- 20) 折口信人, 重松 宏, 武藤徹一郎. 炎症性大動脈瘤におけるマトリックスメタロプロテアーゼの発現について. 日血管外会誌 5: 371, 1996
- 21) 渡辺徹雄, 澤井高志, 大熊恒郎, 佐藤 成, 橋爪英二, 村上博, 佐々木茂, 高田秀司, 鎌田啓介, 力丸裕人, 後藤 均, 里見 進. 腹部大動脈瘤の発生・進展における Matrix metalloproteinases (MMPs) の役割. *脈管学* 36: 751, 1996
- 22) 善甫宣哉, 原田昌和, 斉藤 聰, 土生川光成, 山下晃正, 吉村耕一, 久我貴之, 藤岡顕太郎, 江里健輔. MMPとTIMPよりみた動脈硬化性動脈瘤の発生機序と病態. *脈管学* 36: 752, 1996
- 23) 浦山 博, 原田 猛, 笠島史成, 渡辺洋宇, 勝田省吾. ヒト粥状硬化性大動脈瘤における線溶系因子およびマトリックス分解酵素. *脈管学* 36: 751, 1996
- 24) 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. 十全医会誌 104: 216-229, 1995
- 25) 塚 正彦. ヒト大動脈粥状硬化におけるマトリックスメタロプロテアーゼの免疫組織化学的および生化学的研究. 十全医会誌 105: 81-93, 1996
- 26) Lijnen HR, Hoef BV, Lupu F, Moons L, Carmeliet P, Collen D. Function of plasminogen / plasmin and matrix metalloproteinase systems after Vascular Injury in mice with targeted inactivation of fibrinolytic system genes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18: 1035-1045, 1998
- 27) Shireman PK, McCarthy WJ, Pearce WH, Shively VP, Cipollone M, Kwaan HC, Yao JST. Plasminogen activator levels are influenced by location and varicosity in greater saphenous vein. *J Vasc Surg* 24: 719-724, 1996
- 28) Porter JM, Moneta GL. Reporting standards in venous disease: An update. *J Vasc Surg* 21: 635-645, 1995
- 29) Cornu-Thenard A, Boivin P, Baud JM, De vincenzi I, Carpentier PH. Importance of familial factor in varicose disease: clinical study of 134 families. *J Dermatol Surg Oncol* 20: 318-326, 1994
- 30) Maurel E, Azema C, Deloly J, Bouissou H. Collagen of the normal and the varicose human saphenous vein: a biochemical study. *Clin Chim Acta* 193: 27-38, 1990
- 31) Menashi S, Campa JS, Greenhalgh RM, Powell JT. Collagen in abdominal aortic aneurysm: Typing, content, and degradation. *J Vasc Surg* 6: 578-582, 1987
- 32) 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
- 33) He CM, Roach MR. The composition and mechanical properties of abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg* 20: 6-13, 1994
- 34) 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
- 35) Vine N, Powell JT. Metalloproteinases in degenerative aortic disease. *Clin Sci* 81: 233-239, 1991
- 36) Herron GS, Unemori E, Wong M, Rapp JH, Hibbs MH, Stoney RJ. Connective tissue proteinases and inhibitors in abdominal aortic aneurysms. *Arterio and Thromb* 11: 1667-1677, 1991
- 37) Irizarry E, Newman KM, Gandhi RH, Nackman GB, Halpern V, Wishner S, Scholes JV, Tilson MD. Demonstration of interstitial collagenase in abdominal aortic aneurysm disease. *J Surg Res* 54: 571-574, 1993
- 38) Newman KM, Malon AM, Shin RD, Scholes JV, Ramey WG, Tilson MD. Matrix metalloproteinases in abdominal aortic aneurysm: characterization, purification, and their possible sources. *Connect Tissue Res* 30: 265-276, 1994
- 39) Okada Y, Katsuda S, Okada Y, Nakanishi I. An elastinolytic enzyme detected in culture medium of human arterial

smooth muscle cells. *Cell Biol Int* 17: 863-869, 1993

40) 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

41) Allaire E, Forough R, Wang T, Clowes MM, Clowes AW. Tissue metalloproteinase inhibitor-1 (TIMP-1) overexpression prevents arterial rupture and dilation in a xeno-graft model.

FASEB J 10: 1134, 1996

42) 山田純一. 各種病態における血中プラスミノゲンアクチベーターインヒビターの動態. *お茶の水医学雑誌* 39: 47-61, 1991

43) Allaire E, Hasenstab D, Kenagy RD, Starcher B, Clowes MM, Clowes AW. Prevention of aneurysm development and rupture by local overexpression of plasminogen activator inhibitor-1. *Circulation* 98: 249-255, 1998

Matrix Metalloproteinase-2, Matrix Metalloproteinase-9 and Urokinase-type Plasminogen Activator in Varicose Veins Ikuko Kosugi, Department of Surgery (I), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 - J. *Juzen Med Soc.*, **108**, 455 - 466 (1999)

Key words varicose veins, matrix metalloproteinases, urokinase-type plasminogen activator

Abstract

The main characteristic of a varicose vein is local dilatation due to high venous pressure caused by valvular incompetence of the saphenous vein. To evaluate the roles of matrix metalloproteinases (MMP) and urokinase-type plasminogen activator (uPA) in varicose veins, immunohistochemical staining and enzyme-linked immunosorbent assays were performed on samples from 73 patients with leg varicose veins as follows: 82 greater saphenous veins at the groin (GSV groin), 28 greater saphenous veins at the ankle (GSV ankle), 85 varicose veins (VV) and 13 venous tissues of normal greater saphenous veins at the groin (Control, CR) obtained during coronary artery bypasses. Light microscopic observations of the venous walls showed thickened or thinned tunica media, an increased or decreased number of smooth muscle cells, and degradation of elastic lamellae. Immunohistochemically, the endothelial cells of the tunica intima, smooth muscle cells of the tunica media and fibroblasts of the tunica adventitia were positive for MMP-2 in the GSV groin, GSV ankle, VV and CR. MMP-9 was localized in the smooth muscle cells of the tunica media. uPA and uPAR were found to be positive in a different set of smooth muscle cells of the tunica media to the MMP-9 positive cells. The number of MMP-9 positively stained samples in the GSV groin (35.4%), VV (42.4%), and GSV ankle (71.4%) groups was significantly higher than that in the CR (15.4%) group ($p < 0.01$). The number of uPA positively stained samples in the GSV ankle (7.14%) group was significantly lower than in the GSV groin (62.2%) and VV (36.5%) groups, but was not significantly different from that in the CR (15.4%) group. There was no significant difference in the number of uPA receptor (uPAR) positively stained samples between the GSV groin (14.6%), VV (11.8%), GSV ankle (3.57%) and CR (7.69%) groups. An enzyme-linked immunosorbent assay showed that the amount of uPA in the culture of the GSV groin (381.4 ± 301.5 ng/g protein) group was significantly higher than that in the CR (135.9 ± 93.4 ng/g protein) group ($p < 0.05$). There was no significant difference among the uPA levels at the GSV groin, GSV ankle (207.2 ± 138.1 ng/g protein), or VV (266.5 ± 217.7 ng/g protein). There was no significant difference among uPA levels in the serum of varicose patients (1.13 ± 1.10 ng/ml) and healthy controls (1.50 ± 0.66 ng/ml). The results of this study suggest that MMP-9 is expressed by smooth muscle cells, that uPA and uPAR are expressed by smooth muscle cells in the varicose venous wall, and that these agents play an important role in the formation of varicose veins. Concerning the remodeling process of the venous wall reacting to the increased pressure in vessels, MMP-9 may be produced in the varicose venous wall, and may degrade elastic lamellae and other extracellular components of the venous wall. Production of MMP-9 and uPA in different smooth muscle cells suggests that a paracrine control system is involved. uPA may be produced by the tissues of the greater saphenous vein in the groin area, and flow downward due to valvular incompetence, activating MMP-9 in the varicose vein tissues. Thus, MMPs and uPA may contribute to the formation of varicose veins.