

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

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/2297/9185

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

金沢大学医学部医学科病理学第一講座 (主任: 中西功夫教授)

塚 正 彦

動脈硬化の発生・進展に伴う内膜マトリックスの改築や進行した病変における動脈壁の破壊に細胞外マトリックスの分解が必須である。本研究では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 (matrix metalloproteinases, MMPs) とそのインヒビター (tissue inhibitors of metalloproteinases, TIMPs) の役割を調べる目的で、50剖検例の大動脈病変 (新生児正常組織3例, 瀰漫性内膜肥厚群38例, 脂肪斑29例, 粥腫を伴わない線維性硬化巣21例, 粥腫性硬化巣26例, 複合病変19例, 粥腫性硬化巣の肩の部分22例, 線維性被膜22例, 線維性被膜内側6例, 線維性被膜外側6例, 粥腫50例) を対象として, MMP-1 (間質性コラゲナーゼ), MMP-2 (72kDa ゼラチナーゼ, ゼラチナーゼA), MMP-3 (ストロムライシン-1), MMP-9 (92kDa ゼラチナーゼ, ゼラチナーゼB), TIMP-1 と TIMP-2 について免疫組織化学的および生化学的に検討した。光学顕微鏡的観察では, 病変の進行と共に内膜に多量の細胞外マトリックスが沈着していた。粥腫内および粥腫辺縁において弾性線維が断裂し, 粥腫内では膠原線維の染色性が低下していた。免疫組織化学的に MMP-1 は瀰漫性内膜肥厚と進行病変, なかでも粥腫性硬化巣の粥腫内に高い発現率を示した。MMP-2 はすべての病変に陽性を示した。MMP-3 は新生児症例で陰性で他の病変では弱陽性であった。MMP-9 は新生児や初期病変で陰性ないし弱陽性であったが, 進行病変では陽性, 特に粥腫性硬化巣の線維性被膜と粥腫との境界部分や複合病変では強陽性を示した。TIMP-1 と TIMP-2 は新生児症例では陰性であった。初期病変で TIMP-1 と TIMP-2 は平滑筋細胞に陽性であったが, 進行病変で TIMP-1 の平滑筋細胞における陽性率は低下し, TIMP-2 は逆に上昇した。免疫組織化学的二重染色で, MMP-1, 2, 3, 9 および TIMP-1, 2 いずれもマクロファージおよび泡沫化した平滑筋細胞によって産生されていることが確認された。組織培養上清によるゼラチンゼイモグラフィでは, 92kDa, 68kDa および 64kDa に消化活性がみられ, それぞれ MMP-9, 潜在型 MMP-2 および活性型 MMP-2 と考えられた。エラスチンゼイモグラフィでも同じ分子量に消化活性がみられ, 特に進行病変では 92kDa に強い消化活性が認められた。組織培養上清中の MMPs と TIMPs の定量では, TIMPs とのバランス (MMPs/TIMPs のモル比) のうえで, MMPs の優位が新生児症例 (モル比1.2) でみられた他, MMPs の分子種別では TIMP-1 に対する MMP-9 のモル比が, 粥状硬化性病変のうち最も進行した病変である複合病変 (モル比0.17) で増加していた ($p < 0.05$)。基質消化試験では, 粥腫性硬化巣の中では線維性被膜と粥腫との境界部分からとった組織培養上清に, 他の部位ならびに他の大動脈粥状硬化性病変に較べ有意に高いエラスチン分解活性 ($3.2 \pm 1.8 \text{U/g}$ 重量) が認められた ($p < 0.05$)。コラーゲン分解活性について同様の検討を行ったところ, 複合病変において高いコラーゲン分解活性 ($1.9 \pm 1.1 \text{U/g}$ 重量) が認められた ($p < 0.1$)。ゼラチン分解活性についての検討では病変別で最も低いのは粥腫性硬化巣 ($1.3 \pm 0.20 \text{U/g}$ 重量) であり, 最も高い線維性硬化巣 ($4.4 \pm 0.84 \text{U/g}$ 重量) との間に有意差がみられた。これらの結果から, 平滑筋細胞およびマクロファージの産生する MMP-1, 2, 3, 9 が動脈硬化の進展に伴う内膜マトリックスの改築に重要な役割を果たす事が示唆された。また, 進行病変では MMPs, 特に MMP-1 と MMP-9 の過剰発現, TIMPs との不均衡によってコラーゲンおよびエラスチン活性が亢進し, 粥腫の拡大と組織破壊が進むものと考えられた。

Key words atherosclerosis, extracellular matrix, matrix metalloproteinase, tissue inhibitor of metalloproteinases

虚血性心疾患や脳梗塞等の動脈硬化を基盤にした疾患がわが国の成人病のなかで重要な位置を占めるようになってきており, 動脈硬化性疾患への対策はますます重要度を増している。動脈硬化 (atherosclerosis) は基本的には動脈内膜の限局性肥厚性病変であり, 病理学的には内膜における平滑筋細胞, マク

ロファージの増殖, 平滑筋細胞による細胞外マトリックスの産生および細胞内外の脂質沈着を特徴とする。この動脈硬化は内皮・内膜傷害に対する防衛的, 修復的な局所の細胞組織反応として発生し, 炎症としての側面を持つ増殖性病変と考えられている¹⁾。長い年月にわたり内膜の傷害とそれを修復に導く一連の

平成7年12月13日受付, 平成8年1月10日受理

Abbreviations: AB-AP, avidine-biotin-alkaline phosphatase; APMA, p-aminophenyl mercuric acetate; DAB, 3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride; EVG, elastica van Gieson; IGSS, immunogoldsilver staining; MMP, matrix metalloproteinase; NEM, N-ethylmaleimide; PMSF, phenylmethanesulfonyl fluoride; TIMP, tissue inhibitor of metalloproteinases; TNC, Tris-NaCl-Ca

反応が繰り返されるが、この修復反応の中で内膜の構造を改築しながら動脈硬化が進行していく。さらに、進行した病変では細胞外マトリックスの分解による組織破壊も目立ってくる。したがって、病変の種々の過程に蛋白分解酵素の関与が必要と考えられる。なかでも特に、マトリックスメタロプロテアーゼ (matrix metalloproteinases, MMPs) と呼ばれる一群の酵素は生体内に存在するほとんどすべての細胞外マトリックス成分を中性域で分解し得ることから、本病変の発生・進展を考える上で重要な蛋白分解酵素であると推測される。MMP 遺伝子ファミリーは、一次構造の知られた酵素から構成され、最近発見された MT-MMP を含めこれまでに13種類報告されている³⁾⁻⁷⁾。生体内では、それらの酵素活性は共通のインヒビター (tissue inhibitors of metalloproteinases, TIMPs) によって厳重にコントロールされるといわれている⁸⁾。MMPs とヒト疾患との関係については癌の浸潤・転移¹⁰⁾⁻¹¹⁾ や関節疾患¹²⁾、大動脈瘤¹³⁾ など多くの疾患における MMPs の発現が報告されている。最近、Galis ら¹⁴⁾ によって動脈硬化性病変と MMPs との関係が報告されたが、各種の MMPs と TIMPs について、総合的かつ詳細に検討した報告は未だみられない。

本研究では、動脈硬化を有するヒト大動脈壁における MMP-1 (間質性コラゲナーゼ)、MMP-2 (72kDa ゼラチナーゼ、ゼラチナーゼ A)、MMP-3 (ストロムライシン-1)、MMP-9 (92kDa ゼラチナーゼ、ゼラチナーゼ B) および TIMP-1、-2 の免疫組織化学的局在を検討するとともに、各分子種について動脈壁組織からの分泌量を定量し、培養上清のゼラチン、コラーゲンおよびエラスチンに対する分解活性を測定した。これらの結果から、MMPs が動脈硬化の進展に果たす役割について考察した。

材料および方法

I. 大動脈組織

金沢大学医学部で病理解剖し採取された50剖検例の大動脈における延べ242病変を対象とした。病変は新生児 (3例) を加えた瀰漫性内膜肥厚 (38例)、脂肪斑 (29例)、粥腫を伴わない線維性硬化巣 (21例)、粥腫性硬化巣 (26例) および複合病変 (19例) の計6病変群に大きく分類した。粥腫性硬化巣についてはさらに肩の部分 (shoulder region) (22例)、線維性被膜 (fibrous cap) (22例)、線維性被膜内側 (6例)、線維性被膜外側 (6例)、粥腫 (atheroma: 50例) に細分類した (図1)。症例の内訳は、男性28症例、女性22症例で、その年齢は0~91歳、平均59.8±23.0歳で新生児を除いた各群の間に年齢の偏りはなかった (分散分析)。これらの大動脈壁組織は、一部を培養用に保存し残りをメタカルン固定あるいは過ヨウ素酸-リジン-パラホルムアルデ

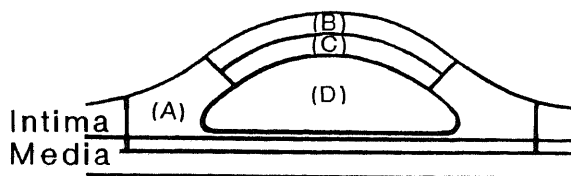


Fig. 1. Scheme showing portions of the atheromatous plaque of aorta for the tissue culture preparation. (A), shoulder region; (B), inner wall of fibrous cap; (C), outer wall of fibrous cap; (D), atheroma.

ヒド (periodate-lysine-paraformaldehyde, PLP) 固定液にて1日固定後、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。

II. 大動脈組織の免疫組織染色

パラフィン切片をヒストクリア・エタノール系列で脱パラフィンし、0.3%過酸化水素 (三菱瓦斯化学、東京)、0.1%アジ化ナトリウム (和光製薬、大阪) による内因性ペルオキシダーゼのブロックと正常ウマ血清 (DAKO, Glostrup, Denmark) による非特異的反応の阻止後、一次抗体として各種モノクローナル抗体を室温で60分間反応させた。使用したモノクローナル抗体は抗平滑筋抗体 (HHF35)、抗マクロファージ抗体 (HAM56)、抗 MMPs 抗体および抗 TIMPs 抗体である。一次抗体と反応後、ビオチン化ウマ抗マウス IgG 抗体 (Vector, Burlingame, USA) と30分間反応させ、さらにストレプトアビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合体 (DAKO) と30分間反応させた後、ジアミノベンジジン (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, DAB) 反応液 (0.05M Tris-HCl, 0.03% DAB, 0.006% H₂O₂, pH7.6) にて発色させた。抗 MMP-1, 2, 3, 9 抗体 (41-1E5, 75-7F7, 55-2A4, 56-2A4) と抗 TIMP-1, 2 (147-6D11, 67-411) 抗体は本学がん研究所分子免疫部岡田保典教授より供与されたもので、その特異性は既に報告されている¹²⁾⁻¹⁹⁾。

III. 免疫二重染色

MMPs および TIMPs の産生細胞の同定、あるいは MMPs と TIMPs の同時発現の検索のために、MMPs と TIMPs および平滑筋細胞、マクロファージに対する抗体を用いて、同一組織に2種類の抗原を同時に染色する免疫二重染色を行った。最初に MMPs をイムノゴールドシルバーステインング (immunogold silver staining, IGSS) 法を用いて染色し、その後、もう一方の抗原をアビジン-ビオチン-アルカリホスファターゼ (avidin-biotin-alkaline phosphatase, AB-AP) 法にて染色する方法²⁰⁾をとった。実際にはまず脱パラフィン切片を5%正常血清にて非特異的反応を阻止し、それぞれの MMP あるいは TIMP に対する抗体と90分間反応させた。コロイド金標識ヤギ抗マウス IgG (アマシャム、東京) と60分間ずつ計2回反応させた後、2%グルタルアルデヒドで後固定し、銀液 (アマシャム) による増感を行った。次いで各切片を0.1M グリシン塩酸緩衝液 pH2.2 中で攪拌しながら90分間洗浄し、AB-AP 法に移行した。それぞれの細胞または MMP に対する抗体と60分間反応させた後、ビオチン化ウマ抗マウス IgG 抗体と30分間反応させ、アビジン-ビオチン-アルカリホスファターゼ複合体 (Vector) と30~40分間反応させた後、アルカリホスファターゼ発色試薬 (Vector Red, Vector) にて発色させた。その際、基質溶液中には 1mM レバミゾールを加え、内因性アルカリホスファターゼ活性を阻止した。なお一次抗体として使用したモノクローナル抗体は、抗平滑筋抗体 (HHF35)、抗マクロファージ抗体 (HAM56)、抗 MMPs 抗体および抗 TIMPs 抗体である。

IV. 免疫二重染色性の判定

染色性は AB-AP 法陽性細胞にしめる IGSS 法陽性細胞の割合を定量化して、陽性スコアとして表した。AB-AP 法陽性細胞中 IGSS 法陽性細胞の認められない場合を0、AB-AP 法陽性細胞に対する IGSS 法陽性細胞の比率が0~10%、10~30%、30~50%、および50%以上の場合をそれぞれ陽性スコア1、2、3、4と評価した²¹⁾。得られたスコアは、小数点第一位

まで平均値を算出し、組織中で同定された平滑筋細胞とマクロファージにおいて MMPs と TIMPs が産生される程度や MMPs と TIMPs 同時発現の程度の評価に用いた。

V. 大動脈組織の培養

病理解剖症例(前述)より得られた大動脈壁組織を無菌的に実体鏡(オリンパス, 東京)下で 1x1x1mm 大に細切し, その組織片 20-25個を 0.2% ラクトアルブミン水解物含有 RPMI 培地 1640液 (Gibco, New York, U. S. A.) 2ml 中で 37°C 24時間培養した。培養液を採取後, 0.02% アジ化ナトリウムを添加し, 10,000rpm, 5分間遠心して, その上清を -20°C で保存した。組織片は凍結乾燥して重量を測定した。

VI. ゼラチンおよび α -エラスチンサブストレートゲルによる分析パターンの検出

Hibbs らの方法²³⁾に従い, ゼラチン (2mg/ml) を含むポリアクリルアミド (8% アクリルアミド) を作製し, 前述の組織培養で得られた培養上清を非還元状態, 4°C で電気泳動した。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, 10mM CaCl₂, 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 (50mM Tris-HCl, 0.15 M NaCl, 10mM CaCl₂, 0.02% NaN₃, pH7.5) 中に 37°C で 20時間反応させた。ゲルはクマシーブリリアントブルー (coomassie brilliant blue) で染色した後脱色し, ゼラチン分解パターンを検討した。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) を作製して培養上清の泳動を行い分解活性の検討を行った。この場合のゲル反応時間は 24時間とした。分子量標準試薬として, ホスホリラーゼ b (94kDa) (Sigma, St. Louis, U. S. A.), ヒトトランスフェリン (77kDa) (Sigma), ウツ血清アルブミン (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決定した。

VII. 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 レーン泳動させ, 各レーンを分離した。そのゲルの一つを TNC 緩衝液にて 37°C 20時間反応させ, 残りのゲルを, EDTA (Sigma) 20mM, セリンプロテアーゼ阻害剤フェニルメタンсульフォニルフルオリド (phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF) (Sigma) 2mM, システインプロテアーゼ (cystein proteinase) 阻害剤の N-エチルマレイミド (N-ethylmaleimide, NEM) (Sigma) 5mM, あるい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 (pepstatin 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。

VIII. イムノブロット解析 (Western blot)

ザイモグラフィで示された基質消化バンドの同定を目的として, Towbin らの方法²³⁾に従いイムノブロット解析を行った。抗体は免疫組織化学で用いた抗 MMPs 抗体あるいは抗 TIMPs 抗体と同じものを使用した。具体的にはザイモグラフィ作製と同様の条件で培養上清を電気泳動し, 8% アクリルアミド上に分離された蛋白を Horizeblot AE 6670 (アトー, 東京) を用い, 250mA, 2時間, ニトロセルロース膜を 10mM Tris-HCl 緩衝液 pH7.6, 0.9% NaCl, 0.05% ポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノラウレート (polyoxyethene (20) sorbitan monolaurate) (和光純薬工業, 東京) で洗い, さらに 1% 仔ウシ

血清アルブミンで湿潤箱内, 室温 30分間, 非特異的反応を阻止した。ニトロセルロース膜に対して抗 MMPs 抗体あるいは抗 TIMPs 抗体を一次抗体として用い免疫染色した。一次抗体と反応後ビオチン化ウマ抗マウス IgG 抗体 (Vector) と 30分間反応させ, さらにストレプトアビジン-ビオチン-ペルオキシンダーゼ複合体 (DAKO) と 30分間反応させた後, DAB (Sigma) 反応液 (0.05M Tris-HCl, 0.03% DAB, 0.006% H₂O₂) にて発色させた。

K. ゼラチン, エラスチン, およびコラーゲン分解活性の測定

Harris らの方法^{24,25)}に従って, 潜在型 MMPs の活性化作用を有する p-アミノフェニル酢酸第二水銀 (p-aminophenyl mercuric acetate, APMA) (Sigma) 1mM, PMSF 2mM, NEM 5mM 存在下で, ¹⁴C-ゼラチンを基質として培養上清のゼラチン分解活性を測定した。¹⁴C-ゼラチンは, 精製した酸可溶性 I 型コラーゲンを ¹⁴C-無水酢酸 (0.37~1.1GBq/mmol, アマジャム) にて標識し, 熱変性 (60°C, 30分間処理) によりゼラチン化して使用した。また同様に不溶性エラスチンを ³H-水酸化ホウ素ナトリウム (3.7~30GBq/mmol, Du Pont, Boston, U. S. A.) にて標識した ³H-エラスチンを基質として培養上清をエラスチン分解活性を測定した。Cawston らの方法²⁶⁾に従い, 酸可溶性 I 型コラーゲンを ¹⁴C-無水酢酸で標識した ¹⁴C-I 型コラーゲンを基質としてコラーゲン分解活性を測定した。コラーゲン分解活性に際しては, 培養上清を 1.5mM の APMA と 37°C で 20時間反応させた後, 2mM PMSF, 5mM NEM を加えてから用いた。分解活性は, 培養に使用した乾燥組織重量 1g 当たりの単位 (U/g 重量) で表した。1単位とは, それぞれ基質を 37°C において 1分間に 1 μ g 分解する活性である。

X. 組織培養上清中の MMPs および TIMPs の定量

培養上清中の MMP-1, -2, -3, 9 および TIMP-1, -2 を, 富士薬品工業, 岩田和士博士の協力でサンドイッチイムノアッセイ法にて定量した。測定された MMPs および TIMPs の量は培養に用いた乾燥組織重量 1g 当たりの mol 数で表し^{15,27)}, 単独の MMP 分子種の mol 数あるいは MMP 同士の mol 数の和と, 単独の TIMP 分子種の mol 数あるいは TIMP 同士の mol 数の和との比を求めることでその比同士を比較した。

XI. 統計学的検討

測定値は平均値と標準偏差あるいは標準誤差で示し, 多群間の比較は Kruskal-Wallis 法あるいは分散分析後の, Scheffe の多重比較法で検定した。二群間比較は Mann-Whitney 検定を用いた。

成 績

I. 動脈硬化病変の光学顕微鏡的観察

HE 染色と EVG 染色による観察では, 新生児症例で内膜の肥厚は殆ど認められなかった。17歳男性の症例で軽度の瀰漫性内膜肥厚がみられ, 以後加齢に従って増強し, 内膜に細胞成分と共に多量の細胞外マトリックスが沈着した。しかし, 50歳~75歳と75歳以上の症例とでは瀰漫性内膜肥厚の程度に殆ど差はなかった。脂肪斑では内膜に泡沫細胞の集簇がみられた。線維性硬化巣は局所的な内膜肥厚で紡錘形細胞や類円形細胞が細胞成分であり, 泡沫細胞は認められなかった。細胞間には多量の細胞間マトリックスが沈着していた。粥腫性硬化巣は表層の細胞外マトリックスに富む線維性被膜 (fibrous cap) とその下部の

粥腫 (atheroma) からなっていた。線維性被膜と粥腫との境界部分で泡沫細胞が多数みられた。粥腫の中心は脂質に富む無細胞性壊死組織からなり、好酸性を示す膠原線維は認められなかった (図 2-a)。また、EVG 染色上弾性線維は、分断され細小

化したものが少量ある以外はほとんど見られなかった (図 2-b)。肩の部分では細胞成分は密であった (図 2-a)。複合病変では内膜の潰瘍があり、血管新生・出血がみられ、石灰沈着も認められた。

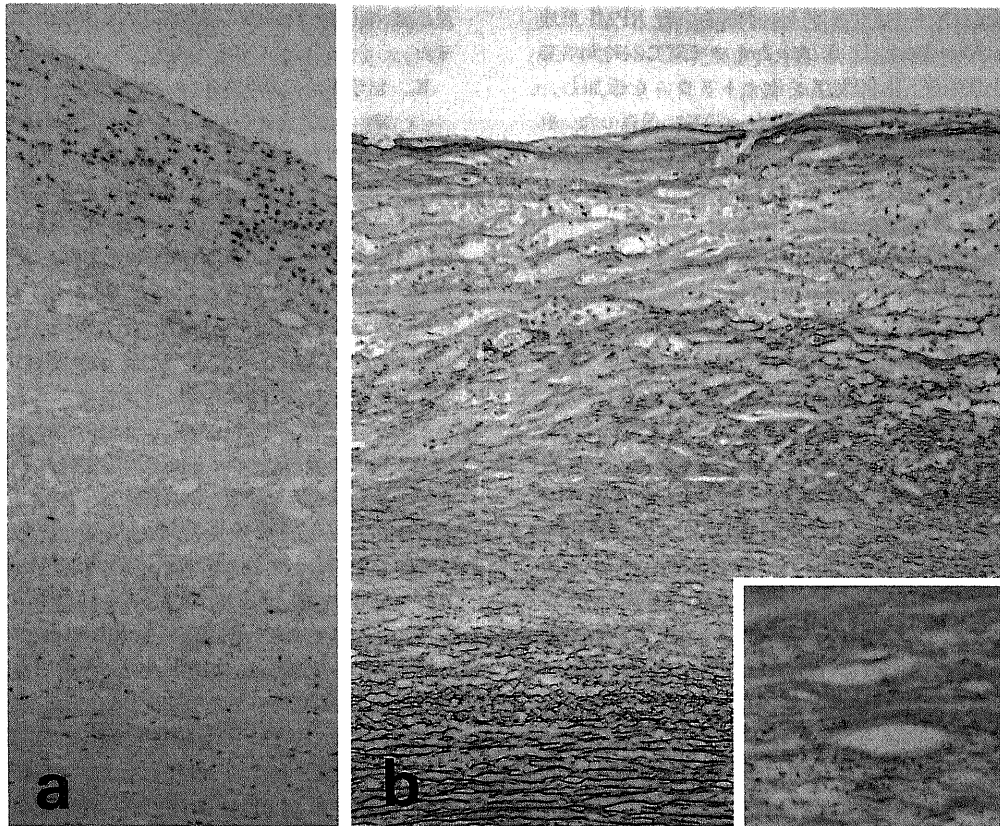


Fig. 2. Light micrographs of an atheromatous plaque. (a) Thickened intima constituting fibrous cap of dense connective tissue and the underlying a lipid-filled atheromatous center (HE stain, $\times 100$). (b) Foam cells and the disrupting elastic fibers in the intima (EVG stain, $\times 100$). Inset shows fragmentation of elastic fibers (EVG stain, $\times 500$).

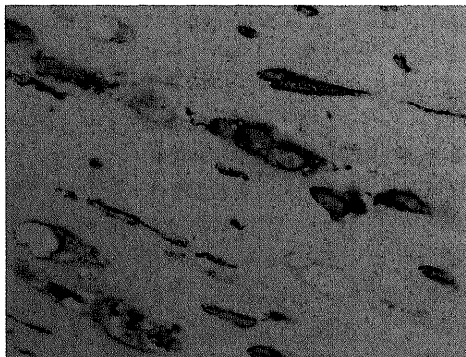


Fig. 3. Immunodouble staining of MMP-2 (black) and HHF35 (red) in the atheromatous plaque in the aorta representing MMP-2 expression in smooth muscle cells by sequential IGSS and avidin biotin immunoalkaline phosphatase procedures ($\times 500$).

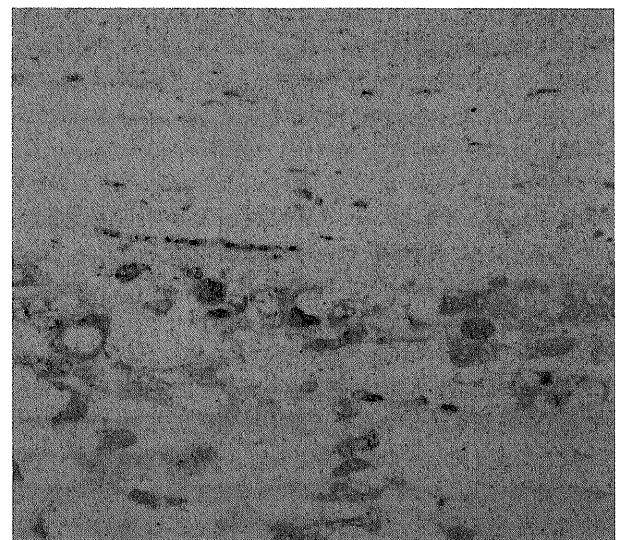


Fig. 4. Immunodouble staining of MMP-9 (black) and HAM56 (red) in the atheromatous plaque showing MMP-9 expression in macrophages by sequential IGSS and avidin biotin immunoalkaline phosphatase procedures ($\times 240$).

II. 動脈硬化病変における細胞の免疫組織化学

動脈硬化病変の主要構成細胞である平滑筋細胞とマクロファージの局在をそれぞれの特異的抗体を用いて解析した。瀰漫性内膜肥厚や粥腫を伴わない線維性硬化巣では平滑筋細胞が圧倒的に多数を占めていた。脂肪斑にみられる泡沫細胞は主にマクロファージ由来であったが、平滑筋細胞も少量含まれていた。粥腫性硬化巣の肩の部分には、新生血管の内皮細胞を除けばマクロファージが主体であったが平滑筋細胞も少数含まれていた。線維性被膜では内側に平滑筋細胞、外側すなわち粥腫との境界部ではマクロファージが多数認められた。進行病変(粥腫性硬化巣および複合病変)にみられる泡沫細胞のなかには平滑筋細胞由来のものも多数みられた。

III. MMP-1, 2, 3, 9 および TIMP-1, 2 の免疫組織化学的局在

免疫組織化学上、動脈硬化病変における MMP-1 は初期病変および進行病変の内膜の泡沫細胞および内膜と中膜の紡錘形細胞の胞体に陽性であった。進行病変の内膜の MMP-2 は分布の面で MMP-1 と同様であったが、各陽性細胞は主に細胞膜が染まり、中膜よりも内膜で個々の細胞が強く染まった。MMP-3 は初期病変では紡錘形細胞、進行病変では泡沫細胞、というようにすべての病変について内膜に弱陽性の細胞が少数認められた。MMP-9 は瀰漫性内膜肥厚、脂肪斑あるいは進行病変の内膜細胞成分に陽性で特に中膜との境界部で陽性の細胞がみられた。TIMP-1 は初期病変特に新生児では染色されなかったが進行病変の内膜の紡錘形細胞と外膜・中膜の栄養血管内皮細胞に弱陽性を示した。TIMP-2 は MMP-2 とほぼ同様で内膜と中膜に分布していた。TIMP-1 同様 TIMP-2 も新生児症例で染色されなかった。進行病変においても TIMP-2 の染色性は初期病変症例と変化はなかった。表 1 は各種動脈硬化病変における MMPs と TIMPs の局在をまとめたものである。

IV. 免疫二重染色

動脈硬化病変における MMPs の産生細胞の同定、あるいは MMPs と TIMPs の同時発現の証明のために二重染色を行った。まず MMPs を IGSS 法で黒く染色し、次に AB-AP 法で平滑筋細胞あるいはマクロファージを赤く染めた。図 3 はマクロファージによる MMP-2 の産生を示しており、赤く染まったマクロファージの胞体に MMP-2 が黒く染色されている。また、まず TIMPs を IGSS 法で黒く染色し、次に AB-AP 法で MMPs を赤く染めた。AB-AP 法で赤染された細胞数を母数としたとき、二重染色された細胞数の、母数に対する割合をスコア化すると、MMP-1 はマクロファージおよび平滑筋細胞共に発現されていた(全症例の陽性スコアの平均が、いずれも 2.5)。MMP-2 は瀰漫性内膜肥厚と脂肪斑では平滑筋細胞に比してマクロファージで高い発現率(陽性スコア 2.1; 3.1)を示していたが進行病変では発現率に差はなかった(陽性スコア 2.0; 1.9)。粥腫性硬化巣の線維性被膜内側と肩の部分に平滑筋細胞と比較して有意に高いマクロファージによる MMP-2 の発現が認められた(陽性スコア 1.0; 2.7)。MMP-3 は MMP-2 の傾向とは逆に、全体的に平滑筋細胞がマクロファージよりも高い発現率(全症例の陽性スコアの平均が 0.94; 0.48)を示した。病変別では平滑筋細胞による MMP-3 の発現率に変化はなかったが、線維性硬化巣と粥腫性硬化巣ではマクロファージの MMP-3 の発現がより強くみられた(陽性スコア 1.0; 1.5)。MMP-9 はマクロファージおよび平滑筋細胞共に瀰漫性内膜肥厚(陽性スコア 2.0; 0.3)に比して粥腫性硬化巣と複合病変で発現率が上がった(陽性スコア 2.5; 1.8)。粥腫性硬化巣の中では線維性被膜で平滑筋細胞の MMP-9 発現率が有意に高かった(陽性スコア 2.6)。病変別には複合病変で MMP-9 を産生する平滑筋細胞の陽性率(陽性スコア 3.0)が線維性硬化巣(陽性スコア 1.0)の 3 倍、粥腫性硬化巣(陽性スコア 2.0)の 1.5 倍となった。マクロ

Table 1. Immunolocalization of MMPs and TIMPs in normal intima and various intimal lesions

Lesion	Immunolocalization of					
	MMP-1	MMP-2	MMP-3	MMP-9	TIMP-1	TIMP-2
Normal intima (newborn)	-	+	-	-	-	-
Diffuse intimal thickening	+	++	±	±	±	++
Fatty streak	+	++	±	±	±	++
Fibrous plaque (free of atheroma)	+~++	++	±	+	+	++
Atheromatous plaque						
Shoulder region	++	++	±	+	±~+	+
Fibrous cap (inner)	+	+++	±	+	±	++
Fibrous cap (outer)	+	++	±	++	±~+	++
Atheroma	++~+++	+	±	++	±	++
Complicated lesion	++	++	±	++	±~+	+~++

-, negative; ±, variably and faintly positive; +, constantly but weakly positive; ++, constantly positive; +++, constantly and strongly positive.

ファージの MMP-9 発現率は瀰漫性内膜肥厚 (陽性スコア 0.3) を基準にすると脂肪斑で3倍以上 (陽性スコア1.0), 線維性硬化巣で10倍以上 (陽性スコア4.0) と上昇したが, 線維性硬化巣と比較して泡沫化マクロファージの絶対数が増加する粥腫性硬化巣と複合病変では相対的に MMP-9 産生細胞の割合は減少した (陽性スコア2.0; 1.5). コラーゲン分解活性が高い線維性被膜 (後述) における MMP-9 産生細胞の陽性率は平滑筋細胞で2.6, マクロファージで2.0であり肩の部分 (陽性スコア1.0; 1.0) や粥腫 (陽性スコア2.0; 1.5) といった他の部分より高かった (図4).

TIMP-1 は瀰漫性内膜肥厚で平滑筋細胞によく発現されていた (陽性スコア2.0) が, 進行病変では平滑筋細胞とマクロファージとも低発現率を示した (陽性スコア0.7; 1.0). また進行病変では MMP-9 との同時発現の割合も減少した (陽性スコア0.4). TIMP-2 の場合, 瀰漫性内膜肥厚での平滑筋細胞による

発現 (陽性スコア 2.0) と比較して進行病変の平滑筋細胞で発現率が上昇した (陽性スコア 3.0). MMP-9 と TIMP-2 との同時発現が線維性硬化巣と粥腫性硬化巣内の肩の部分で高頻度 (陽性スコア1.0; 1.0) にみられた.

V. ゼラチンおよび α -エラスチンサブストレートゲルによる分析パターン

組織培養上清を用いてゼラチンおよび α -エラスチンをサブストレートとしたゼイモグラフィを施行した. ゼラチンゼイモグラフィ (図5) では新生児群のすべてに 68kDa のゼラチン分解活性を認め, 3症例のうち2症例に 92kDa のバンドがみられた. 瀰漫性内膜肥厚群より進行病変群に至るまで 68kDa, 64kDa のバンドの幅に変化はなかった. 複合病変群に 92kDa の幅広いバンドが出る傾向にあった. 粥腫性硬化巣を細分した組織の培養上清のうち肩の部分と線維性被膜に 68kDa の強いゼラチン分解活性がみられた. エラスチンゼイモグラフィで瀰漫性内膜肥厚群, 脂肪斑群, 粥腫性硬化巣群および複合病変群の各群のなかのいくつかは 92kDa の位置に比較的幅の広いバンドを, また別のものは 68kDa の位置にわずかに見える程度の狭いバンドを示した (図6). 粥腫の1症例で 28kDa のエラスチン分解活性を示すものがあった. 新生児および線維性硬化巣群の検体にエラスチン分解活性を示すバンドはみられなかった. 線維性被膜の 68kDa と 92kDa, 粥腫の 68kDa と 92kDa にエラスチン分解活性が認められた.

VI. 酵素抑制試験

大動脈の組織培養上清において認められた 92kDa, 68kDa, 64kDa のゼラチン分解活性は, PMSF, NEM およびペプスタチンAでは抑制されず, EDTA でのみ阻害され, これらの酵素活性は MMPs によるものである事が証明された. 92kDa, 68kDa のエラスチン分解活性についても同様の結果であった.

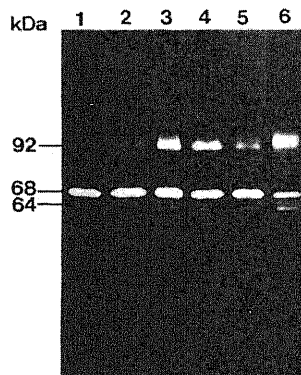


Fig. 5. Gelatin-zymogram of the culture media. Lysis bands of gelatin substrate gel in the each lane (lane 1, newborn; 2, diffuse intimal thickening; 3, fatty streak; 4, fibrous plaque; 5, atheromatous plaque; 6, complicated lesion) at the molecular weights of 92 kDa, 68 kDa, and 64 kDa.

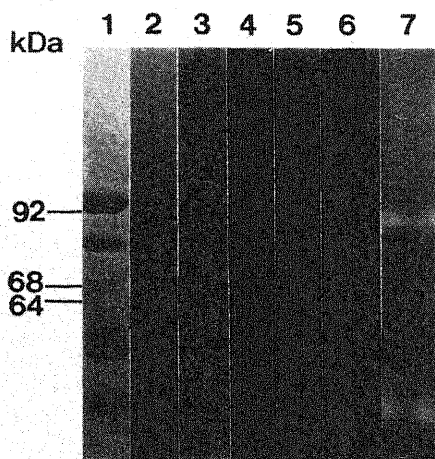


Fig. 6. Elastin-zymogram of the culture media. In elastin substrate gel (lane 1, marker; 2, newborn; 3, diffuse intimal thickening; 4, fatty streak; 5, fibrous plaque; 6, atheromatous plaque; 7, atheroma), lysis bands at the molecular weights of 92 kDa are found in the atheromatous plaque and atheroma. Elastolytic activities with 64 kDa and 28 kDa are also visible in the atheroma.

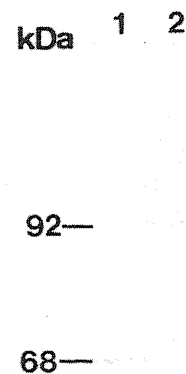


Fig. 7. Immunoblot analysis of the culture media using antibodies against MMP-2 (lane 1, fibrous plaque) and MMP-9 (lane 2, atheromatous plaque). The 68 kDa enzyme in the culture medium of fibrous plaque is reacted with the antibody against MMP-2. And the 92 kDa enzyme in the culture medium of atheromatous plaque is reacted with the antibody against MMP-9.

VII. イムノブロット解析 (Western blot)

培養上清中のゼラチンサブストレートおよびエラスチンサブストレートで消化活性を示す 92kDa, 68kDa, 64kDa の分子種の同定のためイムノブロット解析を行った (図 7). 免疫組織化学に使用したのと同じ MMP-2 の N 末端ドメインを認識する抗ヒト MMP-2 抗体で 68kDa 蛋白が認識され, 抗 MMP-9 抗体で 92kDa 蛋白が認識された. 従って 68kDa 蛋白は MMP-2 で 92kDa 蛋白は MMP-9 と結論づけられた. 64kDa 蛋白は分子量から活性型 MMP-2 であると推測された.

VIII. ゼラチン, エラスチンおよびコラーゲン分解活性の測定

放射性同位元素で標識した各種基質に対する培養上清の消化活性を測定した. ^{14}C -ゼラチンを基質として培養上清のゼラチン分解活性を測定し, 病変毎に評価したところ, 新生児群を加

えた病変別 6 群間の多群間比較で平均値が最も低い粥腫性硬化巣群 ($1.3 \pm 0.020 \text{ U/g}$ 重量) と平均値が最も高い線維性硬化巣群 ($4.4 \pm 0.84 \text{ U/g}$ 重量) との間に有意な差 (分散分析, $p=0.0049$) がみられた. 瀰漫性内膜肥厚群 ($2.3 \pm 0.41 \text{ U/g}$ 重量) を対照とした 2 群間比較では線維性硬化巣群 ($4.4 \pm 0.84 \text{ U/g}$ 重量) のゼラチン分解活性が比較的高く (分散分析, $p=0.066$) 他の病変には差がみられなかった. 病変を瀰漫性内膜肥厚に限り, 性差がないか検討した結果, ゼラチン分解活性について差はみられなかった. 年齢別に 0 歳以上 25 歳未満, 25 歳以上 50 歳未満, 50 歳以上 75 歳未満および 75 歳以上で瀰漫性内膜肥厚を群に分けて検討した結果, 加齢に従いゼラチン分解活性が低下する傾向にあった. しかし統計学的に有意差はなかった (分散分析, $p=0.772$). 同様にコラーゲン分解活性とエラスチン分解活性も

Table 2. Collagenolytic activity of various intimal lesions of aorta

Intimal Lesion	Number of cases	Collagenolytic activity ($\bar{x} \pm \text{SE}$, U/g weight)
Newborn	3	0.089 ± 0.089
Diffuse intimal thickening	39	0.279 ± 0.136
Fatty Streak	32	0.737 ± 0.598
Fibrous plaque	24	0.169 ± 0.095
Atheromatous plaque	26	0.052 ± 0.030
Complicated lesion	20	$1.920 \pm 1.094^*$

* $P < 0.1$ as compared with value of the other lesions by Kruskal-Wallis test.

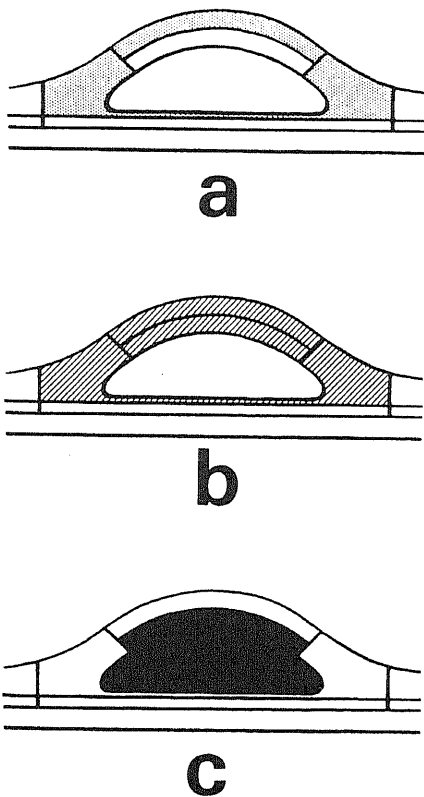


Fig. 8. Scheme showing characteristic distribution of matrix-degrading enzymes in the portions of atheromatous plaque, with predominance gelatinolytic activity (a), collagenolytic activity (b) and elastinolytic activity (c).

Table 3. Elastinolytic activity of varying sites of atheromatous plaque

Atheromatous plaque	Number of cases	Elastinolytic activity ($\bar{x} \pm \text{SE}$, U/g weight)
Whole	30	0.880 ± 0.561
Shoulder region	19	0.094 ± 0.067
Inner fibrous cap	5	0.947 ± 0.947
Outer fibrous cap	5	$3.156 \pm 1.807^*$
Atheroma	47	1.583 ± 0.609

* $P < 0.05$ as compared with value of each region in the atheromatous plaque by Kruskal-Wallis test.

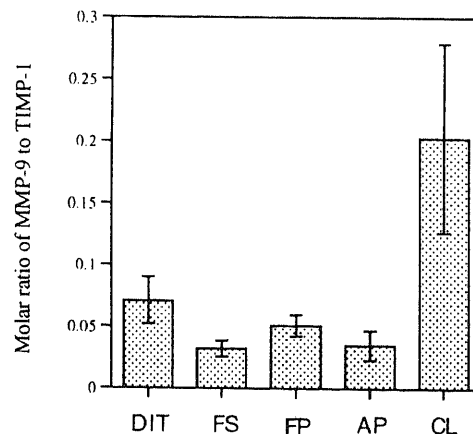


Fig. 9. Ratio of MMP-9 to TIMP-1 in supernatant cultured aortic tissue media with various atherosclerotic lesions, being measured by the sandwich immunoassay. DIT, diffuse intimal thickening; FS, fatty streak; FP, fibrous plaque; AP, atheromatous plaque; CL, complicated lesion.

年齢別に測定したが、各年齢層間に有意な差はなかった(分散分析, $p=0.990$)。コラーゲン分解活性とエラスチン分解活性は瀰漫性内膜肥厚群を対照群として各病変を2群間比較したところ新生児群、脂肪斑群および線維性硬化巣群に有意差はなかった。瀰漫性内膜肥厚および粥腫性硬化巣に対して、複合病変に高いコラーゲン分解活性($p=0.078$)が認められた(表2)。粥腫性硬化巣を細分した組織培養上清の分析では、線維性被膜内側と肩の部分に高いゼラチン分解活性がみられた。コラーゲン分解活性は粥腫を除いた部分に高い活性がみられた。また粥腫と線維性被膜外側に高いエラスチン分解活性が認められた(表3)。粥腫性硬化巣を細分したなかで、ゼラチン、コラーゲンあるいはエラスチンの基質消化試験で高値を示した部分(ゼラチン3.0U/g重量以上、コラーゲン1.5U/g重量以上、エラスチン1.4U/g重量以上)を図で示すとそれぞれ(図8-a~c)となる。ゼラチン、エラスチンおよびコラーゲンを基質とした分解活性は酵素抑制試験でバンドが消失したときと同じEDTA濃度でいずれも抑制された。

K. 組織培養上清中の MMPs および TIMPs の定量

サンドイッチ免疫ノアッセイ法にて組織培養上清中に放出された MMPs と TIMPs の量を測定した。組織培養上清中の MMPs と TIMPs の分子数のバランスを知る意味で単位乾燥組織重量当たりの MMPs モル数の和(MMP-1+MMP-2+MMP-3+MMP-9)と TIMPs モル数の和(TIMP-1+TIMP-2)との比を算出したところ、新生児群のすべての症例で TIMPs に対する MMPs の相対的優位がみられた(比の平均:1.2)。新生児症例の MMPs/TIMPs の比率は病変別の6群の MMPs/TIMPs の比率の中で有意な差を呈した。新生児群を除いた5群について検討すると、瀰漫性内膜肥厚(0.45)と比較して粥腫性硬化巣(0.18)と脂肪斑(0.22)が TIMPs に対する MMPs の割合が低かった(分散分析、いずれも $p=0.027$)。粥腫性硬化巣を細分した標本からの検体ではすべての部位で MMPs モル数の和(MMP-1+MMP-2+MMP-3+MMP-9)と TIMPs モル数の和(TIMP-1+TIMP-2)との比に差はみられなかった。

各 TIMPs に対する MMP 分子種のうちで、MMP-9 の TIMP-1 に対する割合は新生児群で0.568、病変別に、瀰漫性内膜肥厚で0.071、脂肪斑で0.032、線維性硬化巣で0.051、粥腫性硬化巣で0.035そして複合病変で0.173であった(図9)。複合病変は他の病変に較べて TIMP-1 に対する MMP-9 が有意な高値を示した(分散分析, $p<0.0001$)。粥腫性硬化巣を細分化して同様に各 TIMPs に対する MMP 分子種を定量すると、MMP-9 の TIMP-1 に対する割合は部位別に、肩の部分で0.051、線維性被膜内側で0.107、線維性被膜外側で0.128、線維性被膜全層で0.317、粥腫で0.032であった。線維性被膜は粥腫に較べて TIMP-1 に対する MMP-9 の比が有意な高値を示した(分散分析, $p<0.0001$)。MMP-9 以外の MMP 分子種が各病変あるいは粥腫性硬化巣の各部位で有意な高値を示すことはなかった。

考 察

わが国の死因の過半数を占める脳血管障害や心疾患の多くは動脈硬化の末期症状として発病しており、動脈硬化の病態生理や成因の解明が急がれている。動脈硬化の成因に関しては古くから血栓原説²⁰⁾、血漿潤滑説²¹⁾など多くの仮説が提唱されてきたが、現在最も有力な説と考えられているのは Ross¹²⁾²⁰⁾によって提唱された反応傷害説である。これは血管壁の傷害に対する

過剰な修復反応が動脈硬化を生ずるというものである。この修復反応において細胞外マトリックスの産生と分解が起こり、内膜の構造を改築しながら動脈硬化が進行していく。産生される細胞外マトリックスについては生体内および試験管内の観点からの論文がある^{31)~34)}。一方、細胞外マトリックスの分解については、マトリックス分解酵素が重要な役割を担っている。細胞外マトリックスの分解に主役的役割を演じているのはセリンプロテアーゼ、メタロプロテアーゼなどの中性プロテアーゼであり、特にその中で生体内に存在する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 MMPs が注目されている。MMPs の活性は、それらに共通のインヒビターである TIMPs によって厳重に調節されている³⁵⁾。TIMPs にはアミノ酸配列において41%の相同性を示す TIMP-1³⁶⁾、TIMP-2³⁶⁾ および TIMP-3³⁷⁾ が区別され、TIMP-1 と TIMP-2 は MMP 活性を1:1のモル比で阻害する。したがって生体内では MMPs の産生量が局所における TIMPs 量を上回った場合のみ酵素活性が出現すると考えられている。また最近 TIMP-1 と TIMP-2 はそれぞれ潜在型の MMP-9 と MMP-2 との間に複合体を形成し³⁸⁾³⁹⁾ これらの TIMPs は MMP-9 や MMP-2 の活性化のみならず潜在型酵素の活性化機序をも制御していることが明らかとなっている⁴⁰⁾⁴¹⁾。このように MMPs と TIMPs を解析することは動脈硬化の成り立ちと進展を考える上で極めて重要と思われる。Galis ら¹⁴⁾は、粥腫性硬化巣から採取した組織抽出液について、正常と比較した細胞外マトリックス分解能について述べている。それによると粥腫性硬化巣からの組織抽出液には活性型ゼラチナーゼが含まれており、肩の部分、粥腫および新生毛細血管といった部分では TIMP-1 が阻害因子となり MMPs の粥腫性硬化巣における過剰発現をコントロールしているということである。

本研究では、各種 MMPs および TIMPs の局在、その産生細胞の同定、組織培養上清を用いたザイモグラフィ(電気泳動で MMP-TIMP 複合体がはげれた状態)による基質消化活性と、実際のゼラチン、コラーゲン、エラスチン分解活性の検討および基質消化活性が MMPs によるものであることの同定を各種動脈硬化病変で試みる事によって、初期病変から進行病変に至るまでの過程で MMPs がどのような役割を果たしているのかを検討した。

一般に加齢は動脈硬化の危険因子の一つとされ、同年代で比較すると女性よりも男性に強い動脈硬化がみられると言われていた。そこで形態学的に同様に見える瀰漫性内膜肥厚についてマトリックス分解の面から性別・年齢層別に詳細に検討した。今回行った解析方法のうちで最も生体内に近い条件といえる基質消化試験では、少なくともゼラチン分解活性については性差が認められなかった。同様に年齢層別ゼラチン分解活性の結果は、新生児期に成人例の平均以上のゼラチン分解活性を示した後、加齢に従いゼラチン分解活性が低下する傾向にあった。しかし、年齢層ごとの有意差は統計学上、認められなかった。分子数測定の結果から、新生児期にみられた高いゼラチン分解活性は MMPs と TIMPs の分子数のバランスのうえで MMPs が TIMPs より1.2倍と優位である事が原因と推測される。Sasaguri ら⁴²⁾はヒト新生児大動脈由来培養平滑筋細胞について基質分解活性と MMP-1、MMP-3 の発現を報告している。本実験では、新生児大動脈組織の免疫組織化学で MMP-2 は少数の内膜平滑筋細胞と中膜平滑筋細胞に陽性だったが、MMP-1、

MMP-3は陰性であった。血管平滑筋細胞のMMPs発現についてのSasaguriらの結果と本実験の結果の差は培養細胞と組織中の細胞との違いによると考えられる。

本研究で注目されるのは³H-エラスチンを基質として解析したエラスチン分解活性が粥腫性硬化巣内の粥腫と線維性被膜で高値を示し、特に線維性被膜と粥腫との境界部に相当する部分で有意に高かったことである。EVG染色所見でも粥腫内の弾性線維の崩壊像と消失が認められた。α-エラスチンゼイモグラフィによる解析では92kDa, 68kDaおよび28kDaの分子量にバンドが認められた。このうち92kDaはMMP-9, 68kDaはMMP-2による活性とみなされる。92kDaの活性が最も明瞭であったことは進行病変、特に粥腫内のエラスチン分解におけるMMP-9の重要性を示している。MMP-9で動脈組織のエラスチンが分解されることはKatsudaら⁴³⁾の生体外の実験で明らかにされており、また、笠島¹⁹⁾は大動脈瘤形成にMMP-9が重要な役割を果たす成績を得ている。本研究では免疫組織化学的に線維性被膜と粥腫との境界部で、MMP-9を発現する平滑筋細胞とマクロファージの絶対数が増加していた。したがって粥状硬化では泡沫化した平滑筋細胞およびマクロファージが産生するMMP-9が病変の進展、特に粥腫の形成と増大に重要な役割を果たしているものと推測される。Okadaら⁴⁴⁾はヒト培養動脈平滑筋細胞の産生するMMP-2にエラスチン分解活性を証明しており、本研究でもMMP-2が免疫組織学的にすべての病変に局在している事が示された。したがって、MMP-2はMMP-9と共に弾性線維の分解に関与しているものと考えられる。また粥腫の培養上清に28kDaのエラスチン分解活性を示す1症例があったが、分子量からみてMMP-7の可能性があり、今後更に検討する必要がある。

複合病変ではMMP-9の産生量が多いのに拘わらず、エラスチン分解活性はそれほど高くなかった。これは粥腫性硬化巣の段階で既に弾性線維が分解され、また、崩壊の進んだ血管壁に対してMMP-9の活性を抑制し壁の破綻を防止する機序が働いている可能性を示唆している。

動脈壁にはI型、III型コラーゲンを主とする線維性コラーゲンが多量に存在し、抗張力作用を担うことによって動脈壁の構造と機能の保持に寄与している。動脈硬化は内膜の構造を改築しながら進行し、また、粥腫形成や複合病変ではコラーゲン線維の崩壊が目立ってくる。したがって、動脈硬化の成り立ち、進展にコラーゲン線維の分解は重要な役割を果たしている。ヒト動脈硬化性大動脈組織からの抽出物がコラーゲン分解活性を有することは既に報告されており⁴⁵⁾、本研究でも各病変の培養上清にコラーゲン分解活性が検出され、特に複合病変で高い分解活性が認められた。また粥腫性硬化巣の線維性被膜で有意差はないものの比較的高いコラーゲン分解活性がみられた。このコラーゲン分解活性は基質消化試験でEDTAを加えることによって失活がみられたことからMMPsによるものと思われた。MMPsの中でコラーゲン線維の分解に主役を演じるのがMMP-1である⁹⁾。本研究の免疫組織学的解析で各種病変にMMP-1の局在が認められ、免疫二重染色でその産生細胞は平滑筋細胞とマクロファージであることが証明された。免疫組織学的に粥腫性硬化巣と複合病変ではMMP-1の発現・局在に有意な差はみられなかったが、それぞれの培養上清におけるコラーゲン分解活性では複合病変に有意に高い分解活性が認められた。このことは進行性病変におけるコラーゲン分解に

MMP-1以外のMMPs関与していること示唆している。MMP-1が定量的に多く存在する程、MMP-3による活性化を受ける⁴⁶⁾ので、複合病変ではMMP-3がコラーゲン分解活性を亢進させたのかもしれない。しかし、本実験の結果ではMMP-3およびMMP-1の定量試験において病変別あるいは粥腫性硬化巣内の部位別で有意に高値を示す部分が多かったことから、複合病変でみられた高いコラーゲン分解活性は潜在型MMP-1のMMP-3による直接的活性化のためだけとは考えにくい。一方、各MMP分子種の定量で、MMP-9が病変別では複合病変に最も高値を示し、粥腫性硬化巣の中では粥腫に対する線維性被膜に有意な高値がみられた。MMP-9はゼラチンやIV型およびV型コラーゲンといった従来考えられていた基質以外にもIII型コラーゲン、I型コラーゲンのα2鎖および酸不溶性I型コラーゲンを分解すると考えられている¹⁸⁾。今回の免疫組織化学と定量試験の結果と合わせ、複合病変と粥腫性硬化巣の線維性被膜で検出された高いコラーゲン分解活性はMMP-1による分解に加え、過剰に発現されたMMP-9による分解が加わっている可能性がある。

一般的に、MMP産生量が一定のとき、TIMPsの発現レベルが病態を決定するといわれている。しかし、木村¹⁹⁾は肺癌組織の培養液中のMMP-9とTIMP-1量を組織重量あたりの分子数で見た場合TIMP-1量が優位であってもMMP-9以外のMMPs産生が加わるとMMP-9とTIMP-1量との間に不均衡を生じ、MMP-9のモル比の相対的増加につながり、癌細胞の浸潤・転移能を生ずる可能性を指摘している。今回の動脈硬化病変の解析では、TIMP-1のMMP-9に対するモル比が複合病変で5倍、また粥腫性硬化巣の線維性被膜で6倍となっており、他の病変や領域が20倍以上となっている事から考えると複合病変や線維性被膜ではモル濃度的にTIMP-1とMMP-9との比がTIMP-1圧倒的優位の状態から1:1により近づいている。MMP-9以外のMMP-1, MMP-2およびMMP-3を加えたモル数がTIMP-1とTIMP-2を加えたモル数を上回ることにはなかったが、今回測定しなかったMMP-7⁴⁷⁾⁴⁸⁾など、別のMMP分子種が増加することでTIMPsに対しMMPsが優位となりMMP-9活性が生じたと考えることが可能である。

TIMP-2の場合、免疫二重染色上、進行病変で平滑筋細胞およびマクロファージ共に発現率が上がった。MMP-9とTIMP-2との同時発現が病変別の線維性硬化巣と、粥腫性硬化巣内の肩の部分で高頻度に見られた。しかし、MMP-9とTIMP-1との同時発現は進行病変で低下していた。この結果から線維性硬化巣と、粥腫性硬化巣内の肩の部分の構成細胞がMMP-9と同時に発現を示すのはTIMP-1よりもむしろTIMP-2で、TIMP-2は産生細胞の付近で活性化を受けたMMP-9の活性を阻害することで線維性硬化巣および粥腫性硬化巣内の肩の部分のMMP-9によるエラスチン分解活性とゼラチンやI, III, IVおよびV型コラーゲン分解活性を抑制する方向に働いていることが示唆された。

以上のように、病変をほぼ正常と思われる部分、初期病変および進行病変の三つに分けて考えると、形態上進行した病変に必ずしも高い蛋白分解活性があるわけではなかった。また同一病変内にも粥腫性硬化巣に代表されるように蛋白分解活性の高低に独特の分布があることから、粥腫形成さらには複合病変形成に至るまでのマトリックスメタロプロテアーゼの働きは、時間的・空間的に限局されたものであることが分かった。本実験

で粥腫性硬化巣を細分したなかで、ゼラチン、コラーゲンあるいはエラスチンの基質消化試験で高値を示した部分は図8で示されるようになっており、これから粥腫形成の際にコラーゲンとエラスチンの分解の点で最もアクティブな部分は線維性被膜の特に血管腔外側にあたる粥腫との境界部であるといえる。肩の部分は少数の中膜由来平滑筋細胞の他、血球由来のT-リンパ球やマクロファージなどの細胞成分が密である。塚田⁴⁶⁾は細胞間相互作用でマクロファージが産生する腫瘍壊死因子(tumor necrosis factor α , TNF α)が血管内皮細胞の遊走を促して新生血管を形成するなど多彩な様相を示し血流が豊富である理由から興味深い部位であるとの見方をしている。今後、組織切片上のザイモグラフィで各種サイトカインを添加した場合の解析や、今回検索しなかった他のMMPs例えばMMP-7などを研究対象に加えたより詳細な検討が必要であろう。

結 論

動脈硬化を有する大動脈壁におけるMMP-1(間質性コラーゲナーゼ)、MMP-2(72kDaゼラチナーゼ、ゼラチナーゼA)、MMP-3(ストロムライシン-1)、MMP-9(92kDaゼラチナーゼ、ゼラチナーゼB)およびTIMP-1、-2の免疫組織化学的局在を検討するとともに、各分子種について動脈壁組織からの分泌量を定量し、培養上清のゼラチン、コラーゲンあるいはエラスチンに対する分解活性を測定することで以下の結果を得た。

1. 病変の進行と共に内膜に多量の細胞外マトリックスが沈着したが、粥腫内では膠原線維の染色性低下、弾性線維の崩壊が目立った。

2. 免疫組織化学単染色の結果、MMP-1とMMP-2は初期病変・進行病変いずれにも陽性であった。MMP-3は初期病変の紡錘形細胞と進行病変の泡沫細胞に弱陽性であった。MMP-9は新生児や初期病変で陰性ないし弱陽性であったが、進行病変では陽性、特に粥腫性硬化巣の線維性被膜と粥腫との境界部分や複合病変では強陽性を示した。TIMP-1、-2は新生児症例で陰性で、TIMP-1は初期病変内膜の紡錘形細胞に陽性を示し、TIMP-2はMMP-2に似た分布を示した。免疫二重染色の結果、進行病変ではマクロファージと平滑筋細胞によるMMP-1とMMP-9の発現が増加していた。MMP-2とMMP-3の各病変におけるマクロファージと平滑筋細胞による発現率と分布に差はなかった。TIMP-1のマクロファージと平滑筋細胞による発現率は進行病変で低下し、TIMP-2の場合は上昇した。

3. 組織培養上清の定量で、新生児症例でのみTIMPsに対してMMPsが優位(MMPs:TIMPs=1.2:1)であった。

4. 成人症例では、定量された各種MMPsの中でMMP-9が、複合病変と粥腫性硬化巣内の線維性被膜で有意に($p<0.05$)増加していた。

5. 粥腫性硬化巣内の線維性被膜で有意に高いエラスチン分解活性がみられ、コラーゲン分解活性も高い傾向を示した。

6. 複合病変で有意に高い($p<0.1$)コラーゲン分解活性がみられた。

7. 粥腫を形成しない線維性硬化巣は粥腫性硬化巣に比較して高い($p<0.05$)ゼラチン分解活性を示した。

以上の結果から、MMPsとTIMPsが動脈の生理的および動脈硬化に伴う内膜マトリックスの改築に深く関与し、特に動脈硬化症の進展に平滑筋細胞とマクロファージの産生する

MMP-1とMMP-9が重要な役割を果た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中西功夫教授に深く謝意を表わします。また、終始直接御指導頂きました金沢医科大学第二病理学教室勝田省吾教授に深く感謝いたします。MMPs、TIMPsのモノクローナル抗体と御助言を下された金沢大学がん研究所分子免疫部岡田保典教授、サンドイッチイムノアッセイ法による測定に御協力頂いた富士薬品工業岩田和士博士に深謝し、併せて金沢大学第一病理学教室員ならびに技術員各位に厚く感謝いたします。

尚、本論文の要旨は第84回日本病理学会総会(1995年、名古屋)において発表した。

文 献

- 1) Ross, R.: The pathogenesis of atherosclerosis - An update. *N. Engl. J. Med.*, 314, 488-500 (1986).
- 2) Ross, R.: The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*, 362, 801-809 (1993).
- 3) Woessner, J. F. Jr.: Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J.*, 5, 2145-2154 (1991).
- 4) Shapiro, S. D., Kobayashi, D. K. & Ley, T. J.: Cloning and characterization of a unique elastolytic metalloproteinase produced by human alveolar macrophages. *J. Biol. Chem.*, 268, 23824-23829 (1993).
- 5) Birkedal, H. H., Moor, W. G., Boddén, M. K., Windsor, L. J., Birkedal, H. B., DeCarlo, A. & Engler J. A.: Matrix metalloproteinases: a review. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, 4, 197-250 (1993).
- 6) Freije, J. M., Diez-Itza, I., Balbin, M., Sanchez, L. M., Blasco, R., Tolivia, J. & Lopez-Otin, C.: Molecular cloning and expression of collagenase-3, a novel human matrix metalloproteinase produced by breast carcinomas. *J. Biol. Chem.*, 269, 16766-73 (1994).
- 7) Sato, H., Takino, T., Okada, Y., Cao, J., Shinagawa, A., Yamamoto, E. & Seiki, M.: A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumor cells. *Nature*, 370, 61-65 (1994).
- 8) Stetler-Stevenson, W. G., Kruttsch, H. C. & Liotta, L. A.: Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-2). A new member of the metalloproteinase inhibitor family. *J. Biol. Chem.*, 264, 17374-17378 (1989).
- 9) Matristan, L. M.: Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Trends Genet.*, 6, 121-125 (1990).
- 10) Sato, H., Kida, Y., Mai, M., Endo, Y., Sasaki, T., Tanaka, J. & Seiki, M.: Expression of genes encoding type IV collagen-degrading metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in various human tumor cells. *Oncogene*, 7, 77-83 (1992).
- 11) Canete-Soler, R., Litzky, L., Lubensky, I. & Muschel, R. J.: Localization of the 92kd gelatinase mRNA in squamous cell and adenocarcinomas of the lung using in situ hybridization. *Am. J. Pathol.*, 144, 518-527 (1994).

- 12) Okada, Y., Shinmei, M., Tanaka, O., Naka, K., Kimura, A., Nakanishi, I., Bayliss, M. T., Iwata, K. & Nagase, H.: Localization of matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) in osteoarthritic cartilage and synovium. *Lab. Invest.*, **66**, 680-690 (1992).
- 13) 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. *十全医会誌*, **104**, 1-14 (1995).
- 14) Galis Z. S., Sukhova G. K., Lark M. W. & Libby P.: Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaque. *J. Clin. Invest.*, **94**, 2493-2503 (1994).
- 15) Fujimoto, N., Zhang, J., Iwata, K., Shinya, T., Okada, Y. & Hayakawa, T.: A one-step sandwich enzyme immunoassay for tissue inhibitor of metalloproteinase-2 using monoclonal antibodies. *Clin. Chim. Acta*, **220**, 31-45 (1993).
- 16) Obata, K., Iwata, K., Okada, Y., Kohrin, Y., Ohuchi, E., Yoshida, S., Shinmei, M. & Hayakawa, T.: A one-step sandwich enzyme immunoassay for human matrix metalloproteinase 3 (stromelysin-1) using monoclonal antibodies. *Clin. Chim. Acta*, **211**, 59-72 (1992).
- 17) Okada, Y., Gonoji, Y., Naka, K., Tomita, K., Nakanishi, I., Iwata, K., Yamashita, K. & Hayakawa, T.: Matrix metalloproteinase 9 (92kDa gelatinase/type IV collagenase) from HT 1080 human fibrosarcoma cells. *J. Biol. Chem.*, **267**, 21712-21719 (1992).
- 18) Okada, Y., Naka, K., Kawamura, K., Matsumoto, T., Nakanishi, I., Fujimoto, N., Sato, H. & Seiki, M.: Localization of matrix metalloproteinase 9 (92kD gelatinase/type IV collagenase=gelatinase B) in osteoclasts: implications for bone resorption. *Lab. Invest.*, **72**, 311-322 (1995).
- 19) 木村顕子: 肺癌におけるマトリックスメタロプロテアーゼ その産生, 局在と癌細胞の浸潤・転移における役割. *十全医会誌*, **101**, 344-355 (1992).
- 20) Katsuda, S., Coltrera, M. D., Ross, R. & Gown, A. M.: Human atherosclerosis. IV. Immunocytochemical analysis of cell activation and proliferation in lesion of young adult. *Am. J. Pathol.*, **142**, 1787-1793 (1993).
- 21) Mankin, H. J., Dorfman, H., Lippiello, L. & Zarins, A.: Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips. *J. Bone Jnt. Surg. Am.*, **52A**, 424 (1971).
- 22) Hibbs, M. S., Hasty, K. A., Seyer, J. M., Kang, A. H. & Mainardi, C. L.: Biochemical and immunological characterization of the secreted forms of human neutrophil gelatinase. *J. Biol. Chem.*, **260**, 2493-2500 (1985).
- 23) Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 4350-4354 (1979).
- 24) Harris, E. D. & Krane, S. M.: An endopeptidase from rheumatoid synovial tissue culture. *Biochem. Biophys. Acta*, **258**, 566-576 (1972).
- 25) Banda, M. J., Werb, Z. & Mackerrow, J. H.: Elastin degradation. *In* S. P. Colowick & N. O. Kaplan (eds.), *Methods in Enzymology*, vol. **144**, p288-305, Academic Press, Orlando, 1987.
- 26) Cawston, T. E. & Barrett, A. J.: A rapid and reproducible assay for collagenase using [1-¹⁴C] acetylated collagen. *Anal. Biochem.*, **99**, 340-345 (1979).
- 27) Kodama, S., Yamashita, K., Kishi, J., Iwata, K. & Hayakawa, T.: A sandwich enzyme immunoassay for collagenase inhibitor using monoclonal antibodies. *Matrix*, **9**, 1-6 (1989).
- 28) Duguid, J. B.: Thrombosis as factor in the pathogenesis of coronary atherosclerosis. *J. Pathl. Bact.*, **58**, 207-212 (1946).
- 29) Adams, C. W. M.: Atheroma lipids. *J. Atherosclerosis Res.*, **7**, 117-119 (1967).
- 30) Ross, R. & Glomset, J.: The pathogenesis of atherosclerosis. *N. Engl. J. Med.* **295**, 369-377, 420-425 (1976).
- 31) Katsuda, S., Okada, Y., Minamoto, T., Oda, Y., Matsui, Y. & Nakanishi, I.: Collagens in human atherosclerosis -Immunohistochemical analysis using collagen type-specific antibodies. *Arterioscler. Thromb.*, **12**, 494-502 (1992).
- 32) Opsahl, W. P., DeLuca, D. J. & Ehrhart, L. A.: Accelerated rates of collagen synthesis in atherosclerotic arteries quantified in vivo. *Arteriosclerosis*, **7**, 470-476 (1987).
- 33) Okada, Y., Katsuda, S., Matsui, Y., Minamoto, T. & Nakanishi, I.: Altered synthesis of collagen types in cultured arterial smooth muscle cells during phenotypic modulation by dimethyl sulfoxide. *Acta Pathol. Jpn.*, **39**, 15-22 (1989).
- 34) Amento, E. P., Ehsani, N., Palmer, H. & Libby, P.: Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis and thrombosis*, **11**, 1123-1222 (1991).
- 35) Woessner, J. F. Jr.: Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connecting tissue remodeling. *FASEB J.*, **5**, 2145-2154 (1991).
- 36) Docherty, A. J. P., Lyons, A., Smith, B. J., Wright, E. M., Stephen, P. E., Harris, T. J. R., Murphy, G. & Reynolds, J. J.: Sequence of human tissue inhibitor of metalloproteinase and its identity to erythroid-potentiating activity. *Nature*, **318**, 66-69 (1985).
- 37) Parloff, N., Staskus, P. W., Kishnani, N. S. & Hawkes S. P.: A new inhibitor of metalloproteinases from chicken: ChIMP-3. *J. Biol. Chem.*, **267**, 17321-17326 (1992).
- 38) Wilhelm, S. M., Collier, I. E., Marmer, B. L., Eisen, A. Z., Grant, G. A. & Goldberg, G. I.: SV40 transformed human lung fibroblast secrete a 92-kDa type , collagenase which is identical to that secreted by normal human macrophages. *J. Biol. Chem.*, **264**, 17213-17221 (1989).
- 39) Goldberg, G. I., Marmer, B. L., Grand, G. A., Eisen, A. Z., Wilhelm, S. & He., C.: Human 72-kilodalton type, collagenase forms a complex with a tissue inhibitor of metalloproteinases designated TIMP-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **86**, 8207-8211 (1989).

- 40) Okada, Y., Gonoji, Y., Naka, K., Tomita, K., Nakanishi, I., Iwata, K., Yamashita, K. & Hayakawa, T.: Matrix metalloproteinase 9 (92-kDa gelatinase/Type IV collagenase) from HT 1080 human fibrosarcoma cells. *J. Biol. Chem.*, **267**, 21712-21719 (1992).
- 41) Howard, E. W., Bullen, E. C. & Banda, M. J.: Regulation of the autoactivation of human 72-kDa progelatinase by tissue inhibitor of metalloproteinase-2. *J. Biol. Chem.*, **266**, 13064-13069 (1991).
- 42) Sasaguri, Y., Murahashi, N., Sugama, K., Kato, S., Hiraoka, K., Satoh, T., Isomoto, H. & Morimatsu, M.: Development-related changes in matrix metalloproteinase expression in human aortic smooth muscle cells. *Lab. Invest.*, **71**, 261-269 (1994).
- 43) Katsuda, S., Okada, Y., Okada, Y., Imai, K. & Nakanishi, I.: Matrix metalloproteinase-9 (92-kd gelatinase/type IV collagenase equals gelatinase B) can degrade arterial elastin. *Am. J. Pathol.*, **145**, 1208-1218 (1994).
- 44) Okada, Y., Katsuda, S., Okada, Y. & Nakanishi, I.: An elastinolytic enzyme detected in the culture medium of human arterial smooth muscle cells. *Cell Biol. Int.*, **17**, 863-869 (1993).
- 45) Busuttill, R. W., Abou-Zamzam, A. M. & Machleder, H. I.: Collagenase activity of the human aorta. *Arch. Surg.*, **115**, 1373-1378 (1980).
- 46) Ivesen, G. & Nagase, H.: Mechanisms of activation of tissue procollagenase by matrix metalloproteinase 3 (stromelysin). *Biochemistry*, **29**, 10261-10270 (1990).
- 47) Woessner, J. F. Jr. & Taplin, C. J.: Purification and properties of a small latent matrix metalloproteinase of the rat uterus. *J. Biol. Chem.*, **263**, 16918-16925 (1988).
- 48) Quantin, B., Murphy, G. & Breathnach, R.: Pump-1 cDNA codes for a protein with characteristics similar to those of classical collagenase family member. *Biochemistry*, **28**, 5327-5334 (1989).
- 49) 塚田豊弘: マクロファージと動脈硬化 —動脈硬化巣における局在. *現代医療*, **23**, 2695-2699 (1991).

Immunohistochemical and Biochemical Studies on Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Human Atherosclerotic Lesions Masahiko Tsuka, Department of Pathology (I), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. *Juzen Med Soc.*, **105**, 81—93 (1996)

Key words atherosclerosis, extracellular matrix, matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases

Abstract

Matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors (tissue inhibitors of metalloproteinases) play an important role in the development of atherosclerosis by degrading the extracellular matrix of aorta. In order to know their roles in tissue levels, MMP-1 (tissue collagenase), MMP-2 (72kDa gelatinase/gelatinase A), MMP-3 (stromelysin-1), MMP-9 (92kDa gelatinase/gelatinase B), TIMP-1, and TIMP-2 were examined immunohistochemically and biochemically in various lesions of aortic tissues obtained from 50 autopsy cases: newborn: newborn (3 lesions), diffuse intimal thickening (DIT, 38 lesions), fatty streak (FS, 29 lesions), fibrous plaque (FP, 21 lesions), atheromatous plaque (AP, 26 lesions) and complicated lesion (CL, 19 lesions), and five parts of atheromatous plaques (shoulder region, 22 lesions; fibrous cap, 22 lesions; inner fibrous cap, 6 lesions; other fibrous cap, 6 lesions; atheroma, 50 lesions). By light microscopy, large amounts of extracellular matrix components were found deposited in the intima with the progression of the atheromatous lesions, and elastic fibers were fragmented in the atheroma as well as in the outer fibrous cap by elastica van Gieson's staining. Stainability of collagenous fibers in the atheroma was decreased with hematoxylin-eosin staining. Immunohistochemically, MMP-1-positive cells were observed at a higher proportion in DIT and advanced lesions, especially in the center of the atheroma. MMP-2 was immunolocalized in every lesion. MMP-3 was negative in newborn, but faintly positive in all lesions. Although MMP-9 was either negative or faintly positive in intimal cells of newborn and early atherosclerosis, it was positive in advanced lesion, especially strongly positive in CL and in the boundary between the atheroma and fibrous cap of AP. On the other hand, TIMPs were not immunolocalized in newborn. TIMP-1 and TIMP-2 were positive in smooth muscle cells of early atherosclerosis. The rate of TIMP-2-positive smooth muscle cells was higher in advanced lesions; conversely that of TIMP-1 was lower in advanced lesions. Double staining of MMPs and TIMPs revealed that MMP-1, -2, -3, -9 and TIMP-1, -2 were immunolocalized in both macrophages and smooth muscle cells. Gelatin zymography of the culture media of those aortic tissues showed gelatinolytic activities with 92kDa, 68kDa, and 64kDa, which were considered to be MMP-9, latent form of MMP-2, active form of MMP-2, respectively. α -elastin zymography showed the presence of elastinolytic with the same molecular weight as gelatin gels in the advanced lesions, consistent with 92kDa MMP. On quantitative analysis, ratio of MMPs to TIMPs was increased in newborn. And the ratio of MMP-9 to TIMP-1 was significantly increased in CL (0.17, $p < 0.05$). On enzyme assay, fibrous cap elastinolytic (3.2 ± 1.8 U/g weight) was significantly higher than other atheromatous

lesions ($P < 0.1$). Gelatinolytic activity of FP was significantly higher (4.4 ± 0.84 U/g weight) than AP (1.3 ± 0.20 U/g weight, $p < 0.05$). These results of the present study suggested that MMP-1, 2, 3, 9 produced by smooth muscle cells and macrophages play crucial roles in remodeling of the intimal extracellular matrix during the development of atherosclerotic lesions, and overexpression of MMPs, particularly MMP-1 and MMP-9 in the advanced lesions contribute significantly to tissue destruction.