動脈硬化症における脂質沈着とコラーゲン合成*

自見至郎** 坂田則行** 佐々木 淳*** 朔啓二郎***
松永 彰*** 日高 和子*** 竹林茂夫**

I. はじめに

粥状硬化症発症、進展に血清脂質、とくに low density lipoprotein (LDL) が関与することはすでによく知られている¹⁾。動脈壁内に侵入した LDL は化学的修飾を受け^{2,3,4)}、酸化 LDL となり、マクロファージ^{4,5)} や平滑筋細胞⁶⁾ の scavenger receptor によって細胞内に取り込まれ、脂肪蓄積の最初の原因となっている⁶⁾。

一方、プラークを形成してきた動脈硬化巣には I, III, IV, V, VI⁷⁾ 型コラーゲンが増加、蓄積している。なかでも、V, VI 型コラーゲンの硬化巣での増加が目立つ⁸⁾。これらコラーゲンは内膜で増殖した平滑筋細胞により産生され、細胞外に分泌され、さらに feed back 的にそれら内膜平滑筋細胞の機能に影響を与える⁹⁾。動脈内膜での cell-matrix loop の関係は平滑筋細胞¹⁰⁾、マクロファージ^{11,12)}、血小板¹³⁾ を介して LDL^{12,14)}、cytokines¹⁵⁾、各種 growth factors^{11,12)}、extracellular matrix¹⁶⁻¹⁸⁾ などの mediator によって複雑な相互作用を保ちながら進展していくことが考えられる。

今回われわれは、動脈平滑筋細胞の細胞機能、とくにコラーゲン合成能を中心に growth factor や LDL との相互作用について検討を行い、動脈硬化巣でのコラーゲン代謝と LDL の役割を明らかにした。

II. 材料と方法

免疫組織化学的検討

ヒト冠動脈、脳底動脈、大動脈組織を死後 3 時間以内の 10 剖検例 (年齢 44-77) から採取し、凍結切片を作成した。凍結切片は以下の一次抗体、anti-human apolipoprotein B (Apo-B), anti-human macrophage, anti-alpha smooth muscle actin, anti-PDGF, anti-human TGF β ,

anti-human proline hydroxylase alpha (hPH) でそれぞれ処理後、ALPase 標識の二次抗体と反応させたのち、発色反応を行った。各部位から採取した切片はそれぞれ慢性内膜肥厚 (DIT), 脂肪線条 (FS), プラーク巣 (PL) に分け検討した。

平滑筋細胞の培養

ブタ腹部大動脈中膜より explant 法により培養動脈平滑筋細胞を得、3-10 代のものを用いた。細胞が平滑筋細胞であることは smooth muscle actin の存在、光顕、電顕による形態観察により確かめた。

LDL の分離と¹²⁵I の標識

健常ヒト血清より KBr で比重 $d=1.020-1.062$ に合わせ、超遠心分離法にて LDL を得た。LDL は NaI¹²⁵ を用い glycine buffer (1 M, pH 10), iodine monochloride で標識したのち、PD-10 カラム (Sephadex G25) で free のものを除去した (102.3 μ Ci/mg LDL protein)。

LDL の酸化

LDL 200 μ g/ml DMEM に 5 μ M CuSO₄ を添加し 37°C, 24 時間 incubate した。LDL の酸化度は thiobarbituric acid reactive substance (TBARS), 陰性荷電は agatose gel 電気泳動で確かめた。Table I の結果より Cu²⁺ 処理 LDL を oxidized LDL (oxLDL), 未処理のものを native LDL (nLDL) とし用いた。

コラーゲンと LDL の結合

I, III, IV, V 型の各型コラーゲン (3 mg/ml, koken) に等量の I 型コラーゲンを混合し、NaHCO₃ で中和、37°C, overnight で polymerize した。コラーゲン gel (100 μ l/well) に 200 μ l の¹²⁵I-LDL を添加し、0.5-48 時間後、培養液で gel 表面を洗い well より取り出し、その radioactivity を gel 内へ浸透した LDL とした。その後、gel を氷冷 5% TCA で 4 回遠心洗浄し free の LDL を除いたものを、コラーゲンに結合した LDL とし放射活性の測定を行った。測定値は well へ添加した¹²⁵I の総 count に対する gel 内浸透性またはコラーゲン結合性 LDL の割合で表した。

* 1993 年 5 月、第 25 回日本動脈硬化学会総会において発表

** 福岡大学医学部第二病理

*** 同 第二内科

Table 1. TBARS contents and negative charge of LDL.

	TBARS (n mol)	% of migration (vs LDL)*
LDL (kept at 4°C)	1.375	100
LDL	1.125	—
LDL + 5 μ M Cu ²⁺	16.375	171
LDL with SMC	1.0	100
LDL + 5 μ M Cu ²⁺ with SMC	19.5	200

* ; agarose gel electrophoresis

DNA とコラーゲン合成能

平滑筋細胞を 24-well plate に接種，壁面へ付着させたのち，培養液を 5% PDS, DMEM に代え 48 時間培養を行い細胞を静止期にした．それぞれ表示した濃度の human PDGF (Collaborative Res, MA), porcine platelets TGF β 1 (R & D, MN), LDL の添加とともに 1 μ Ci/ml [³H]-thymidin を加え 24 時間培養した．その後，細胞を氷冷 5% TCA で 3 回洗浄後，酸非可溶性蛋白に取り込まれた radioactivity を DNA 合成能とした．

コラーゲン合成能は細胞の増殖を停止させたのち 10 μ Ci/ml [³H]-proline を添加し 24 時間培養した．平滑筋細胞が産生した全コラーゲンを 1 mg/ml pepsin を含む 0.5 M acetic acid で 20°C, 4 時間で抽出，純化，その放射活性を測定した．また，総蛋白合成能は同一条件で 10 μ Ci/ml [³H]-proline 添加，24 時間後の蛋白に取り込まれた放射活性で表わした．DNA および蛋白合成能は細胞蛋白あたりで補正した．

III. 結果および考察

ヒトの大動脈，冠動脈，脳底動脈いずれのび慢性内膜肥厚 (DIT)，脂肪線条 (FS)，プラーク巣 (PL) 全てに Apo-B は沈着していた．Apo-B は細胞内及び細胞外 matrix に認めた．DIT では I, III 型コラーゲンが内膜にび慢性に分布し，Apo-B は内膜表層部に多く沈着していた．内膜に脂肪沈着と泡沫化したマクロファージを伴っている FS では病変全体に I, III, IV, V, VI 型コラーゲンが増加し，Apo-B も同部に沈着していた．PL では，アテローム表層に I, III 型がび慢性に分布しているのに対し，V, VI 型はアテローム周囲に局限していた．Apo-B は粥腫全体に認められ，マクロファージはその周囲および辺縁部に浸潤していた．hPH 陽性細胞は FS, PL のマクロファージ集簇部近傍 (Fig. 1a) の平滑筋細胞に認められた (Fig. 1b)．一方，この泡沫化したマクロファージに PDGF, TGF β 1 を認めた (Fig. 1c, d)．この両者ともコラーゲン合成を促進させることはすでに知られており^{15,19)}，マクロファージ由来のこれら growth factors が平滑筋細胞のコラーゲン合成を刺激していることが示唆された．この事実に基づき以下 3 つの実験を行った．

1) コラーゲンへの LDL の結合

最初に，¹²⁵I で label した nLDL と oxLDL を用い各種コラーゲン gel 内への diffusion につき検討した．native および oxLDL とともに時間とともに指数関数的に gel 内へ浸透し，その値は 48 時間で添加した LDL の約 30% に達した (Fig. 2a)．その値は medium+gel 全容積からみるとほぼ均一な拡散を示している．コラーゲン gel の各 type による差は認められなかったが，oxLDL は nLDL より gel 内へいくぶん多く浸透していた．

Fig. 1 Immunohistochemical stainings of fatty streak. Macrophage (a), proline hydroxylase (b), TGF β 1 (c) and PDGF (d) were positively stained in the lesion.

Fig. 2 Diffusing (a) and binding (b) ¹²⁵I-LDL to the collagen gel prepared by mixing type I collagen with different types of collagen.

Fig. 3 Effects of PDGF on DNA synthesis, collagen synthesis and total protein synthesis in smooth muscle cells.

Fig. 4 Effects of TGFβ 1 on DNA synthesis, collagen synthesis and total protein synthesis in smooth muscle cells.

Table 2. Effects of sodium chloride on binding of LDL to several types of collagen gels.

typed I-based collagen gel (1 : 1)	LDL	LDL + 1M NaCl
I	8,460 cpm	4,033 cpm (47.7%)
III	8,695	5,415 (51.9)
IV	3,846	3,368 (87.5)
V	6,124	4,011 (65.5)

mean of triplicate data

次に、結合した native および oxLDL 放射活性を測定し、型別コラーゲンでの相違を検討した。native, oxLDL ともコラーゲン gel の type の違いによる結合能には差を認めなかった (Fig. 2b)。コラーゲン I 型と I+III 型 (data not shown) は同じようにもっとも高く、次に I+V 型で、I+IV 型はもっとも低かった。

nLDL と oxLDL とで LDL の結合性を比較するとす

べてのコラーゲン gel で oxLDL に有意に高い結合能を示した (Fig. 2b)。コラーゲン gel 種による LDL の結合性の違いが何によっているかわからないが、平滑筋細胞は基底膜コラーゲン (IV 型コラーゲン) によって細胞傷害作用をもつ oxLDL から保護されているのかも知れない。

gel type による LDL の結合の違いが陰性荷電によるものかどうかを検討した。細胞培養液にその 10 倍濃度の NaCl (1 M) を添加して、同様に nLDL との結合能について検討した。その結果、NaCl 添加によりすべてのコラーゲン gel で LDL との結合能は約 1/2 に低下した (Table 2)。このことから LDL とコラーゲンは静電的に結合していると考えられた。

粥状硬化巣に酸化 LDL の蓄積していることはすでに知られており²⁰⁾、内皮細胞など動脈壁のさまざまな細胞により LDL は酸化的变化を受けると考えられている^{2,3,4)}。今回の結果は、酸化 LDL のマクロファージや平滑筋細胞による摂取蓄積の経路だけでなく、内膜内に増加した I 型および III 型コラーゲンへと直接結合蓄積し

得る可能性を示した。

2) 平滑筋細胞に対する PDGF と TGF β 1 の相互作用

PDGF について培養平滑筋細胞の DNA 合成能, コラーゲン合成能, 総蛋白合成能におよぼす影響について検討した。上記細胞機能はいずれも PDGF の濃度依存性に有意に上昇した (Fig. 3)。コラーゲン合成と DNA 合成は 2.5 units/ml PDGF 以上で有意に増加し, 総蛋白合成能はもっとも低濃度の PDGF (0.5 units) から有意な増加を示した。

TGF β 1 (0.1-2 ng/ml) についても同様の検討を行った。コラーゲン合成能, 総蛋白合成能ともに TGF β 1 の濃度依存性に指数関数的な増加を認め, 2 ng/ml で約 200% まで上昇した (Fig. 4)。一方, DNA 合成は TGF β 1 濃度上昇に関わらずまったく変化を示さなかった。総蛋白合成能に対するコラーゲン合成能比 (相対的コラーゲンの合成能) は, PDGF に比し, TGF β 1 でより強い刺激作用があった。

次に, これら PDGF と TGF β の共同作用について検討した。平滑筋細胞の DNA 合成を増加させる濃度の PDGF (2.5 units/ml) の存在下, さまざまな濃度の TGF β 1 を同時添加した。コラーゲン合成能, 総蛋白合成能ともに TGF β 1 濃度依存性に有意な増加を示すが, コラーゲン合成能は TGF β 1 単独投与に比べ低下していた (Fig. 5)。さらに相対的コラーゲン合成能でみるとその低下率はさらに大きくなった。興味深いことに, PDGF で 140% まで増加した DNA 合成能は TGF β 1 の濃度上昇に伴い直線的に下降した。TGF β がもつこの DNA 合成抑制作用は癌抑制遺伝子の一つである RB 遺伝子に作用し c-myc の発現を低下させるという報告があり²¹⁾, このことによっているのかも知れない。また, 相対的コラーゲン合成能も TGF β 1 単独添加に比し低下しており細胞

Fig. 5 Effects of TGF β 1 on DNA synthesis, collagen synthesis and total protein synthesis in smooth muscle cells which were stimulated by PDGF.

内での情報伝達系の複雑な interaction が想定される。一般に, PDGF が持つとされる平滑筋細胞への増殖刺激作用は今回の組織検索で認められたようなマクロファージ由来の TGF β が同時に平滑筋細胞へ作用した場合, その DNA 合成は抑制されることがあり, これら二つの増殖因子のバランスのうえに病巣内での平滑筋細胞の phase が増殖期, コラーゲン産生期などの病態期に分けられ統御されている可能性がある。

Fig. 6 Effects of 0-200 μ g/ml native and oxidized LDL on DNA synthesis, total protein synthesis and collagen synthesis in smooth muscle cells.

Fig. 7 Effects of BHT on DNA synthesis and collagen synthesis in smooth muscle cells incubated with oxidized LDL which was generated by an addition of Cu²⁺.

3) 平滑筋細胞に対する LDL の作用

これまで *in vitro* で LDL や高脂血漿が平滑筋細胞のコラーゲン合成を増加させたという報告はない。そこで今回、native および oxLDL の平滑筋細胞のコラーゲン合成能への作用を検討した。静止期にした平滑筋細胞に 50–200 μg LDL/ml を添加し、24 時間の³H-thymidin 取り込みによる DNA 合成能と、細胞が分泌した全コラーゲンおよび総蛋白合成能を検討した (Fig. 6)。DNA 合成能と総蛋白合成能は nLDL に比し oxLDL で有意な減少を示した。コラーゲン合成能は nLDL の場合 200 μg /ml までまったく変化を示さなかった。しかし、oxLDL では 100 μg /ml から有意な増加を示し、150 μg /ml では nLDL に比し約 5 倍まで増加した。しかし、200 μg /ml では逆に低下していた。

oxLDL と平滑筋のコラーゲン合成の関係をさらに確かめるため抗酸化剤 BHT を用いて検討した (Fig. 7)。100 μg /ml LDL の入った培養液に銅を添加すると LDL の酸化が起こり、平滑筋細胞のコラーゲン合成能は LDL 単独のものに比し 4 倍以上増加した。これにさらに BHT を添加すると、酸化度の低下とともにコラーゲン合成は有意に低下した。以上から、平滑筋細胞のコラーゲン合成刺激作用は LDL の酸化に依存していると考えられた。しかし、この oxLDL のコラーゲン刺激作用の機序についてはまだわかっていない。Chojkier ら (1989)²²⁾ は、繊維芽細胞へ malondialdehyde を直接添加することによりコラーゲン合成の増加することを示し、過酸化脂質との関連性を示唆している。また、コラーゲン合成を劇的に増加させるビタミン C 添加の場合も、この機序によることが推測されているが^{19,22)}、逆にビタミン C の抗酸化作用との関係でなお論議を残す。一方、細胞内 second messenger であるカルシウム²³⁾ や cyclic AMP²⁴⁾ の濃度の変化が細胞のコラーゲン合成に関与するという報告もあり、今後の解明が必要であろう。

IV. ま と め

血管壁への LDL の浸入に始まる動脈硬化症の発症、進展過程での細胞と細胞外基質の相互関係を探る目的で、平滑筋細胞のコラーゲン合成を中心に酸化 LDL、マクロファージ、コラーゲン基質、増殖因子の関係を総合的に検討した。今回の研究から PDGF や TGF β の他に、酸化 LDL も直接的に平滑筋細胞のコラーゲン合成能を増加させていることがわかり、これら 3 者はともに動脈内膜内でのコラーゲン量の増加、すなわち繊維性内膜肥厚の重要な因子であることが示された。また、PDGF と TGF β の共同作用で認められたように、生体内では平滑筋細胞を中心にさまざまな因子の相互作用が存在し、こ

の観点からさらに動脈硬化進展の機序を検討する必要がある。

文 献

- 1) Schwartz, C.J., Valente, A.J., Sprague, E.A., Kelley, J.L. and Nerem, R.M.: The pathogenesis of atherosclerosis: an overview. *Clin. Cardiol.*, **14**: 1–16 (1991)
- 2) Steinbrecher, U.P., Parthasarathy, S., Leake, D.S., Witztum, J.L. and Steinberg, D.: Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**: 3883–3887 (1984)
- 3) Heinecke, J.W., Rosen, H. and Chait, A.: Iron and copper promote modification of low density lipoprotein by human arterial smooth muscle cells. *J. Clin. Invest.*, **74**: 1890–1894 (1984)
- 4) Parthasarathy, S., Printz, D.J., Boyd, D., Joy, L. and Steinberg, D.: Macrophage oxidation of low density lipoprotein generates a modified form recognised by the scavenger receptor. *Arteriosclerosis*, **7**: 505–510 (1986)
- 5) Dejager, S., Mietus-snyder, M. and Pitas, R.E.: Oxidized low density lipoproteins bind to the scavenger receptor expressed by rabbit smooth muscle cells and macrophages. *Arterioscler. and Thromb.*, **13**: 371–378 (1993)
- 6) Steinberg, D., Parthasarathy, S., Carew, T.E., Khoo, J.C. and Witztum, J.L.: Beyond cholesterol: modification of low density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N. Engl. J. Med.*, **320**: 915–924 (1989)
- 7) Katuda, S., Okada, Y., Minamoto, T., Oda, Y., Matsui, Y. and Nakanishi, I.: Collagens in human atherosclerosis, immunohistochemical analysis using collagen type-specific antibodies. *Arterioscler. and Thromb.*, **12**: 494–502 (1992)
- 8) Mayne, R.: Collagenous proteins of blood vessels. *Arteriosclerosis*, **6**: 585–593 (1986)
- 9) Sakata, N., Jimi, S., Takebayashi, S. and Marques, M. A.: Type V collagen repress the attachment, spread and growth of porcine vascular smooth muscle cells. *Exp. Mol. Pathol.*, **56**: 20–36 (1992)
- 10) Sefert, R.A., Schwartz, S.M. and Bown-pope, D.F.: Developmentally regulated production of platelet-derived growth factor-like molecules. *Nature* **311**: 669–671 (1984)
- 11) Assoian, R.K., Fleurdelys, B.E., Stevenson, H.C., Miller, P.J., Madtes, D.K., Raines, E.W., Ross, R. and Sporn, M.B.: Expression and secretion of type β transforming growth factor by activated human macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**: 6020–6024 (1987)
- 12) Shimokado, K., Raines, E.W., Madtes, D.K., Baret, T.B., Benditt, E.P. and Ross, R.: A significant part of macrophage-derived growth factor consists of at

- least two forms of PDGF. *Cell*, **43**: 277-286 (1985)
- 13) Assoian, R.K., Komoriya, A., Meyers, C.A., Miller, D.M. and Sporn, M.B.: Transforming growth factor- β in human platelets. *J. Biol. Chem.*, **258**: 7155-7160 (1983)
 - 14) Cathcart, M.K., Morel, D.W., Chisolm, G.M.III: Monocytes and neutrophils oxidized low density lipoprotein making it cytotoxic. *J. Leukoc. Biol.*, **38**: 341-350 (1985)
 - 15) Amento, E.P., Ehsani, N., Palmer, H.L.: Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis and thrombosis.*, **11**: 1223-1230 (1991)
 - 16) Hoover, G.A., McCormic, S., Kalant, N.: Interaction of native and cell-modified low density lipoprotein with collagen gel. *Arteriosclerosis.*, **8**: 525-534 (1988)
 - 17) Noma, A., Hirayama, T., Yachi, A.: Studies on binding of plasma low density lipoprotein to arterial elastin. *Connect. Tissue. Res.*, **11**: 123-133 (1983)
 - 18) Camejo, G., Lalaguna, F., Lopez, F., Starosta, R.: Characterization and properties of a lipoprotein-complexing proteoglycan from human aorta. *Atherosclerosis.*, **35**: 307-320 (1980)
 - 19) Geesin, J.C., Hendricks, L.J., Gordon, J.S., Berg, R. A.: Modulation of collagen synthesis by growth factors: the role of ascorbate-stimulated lipid peroxidation. *Arch. biochem. Biophys.*, **289**: 6-11 (1991)
 - 20) Rosenfeld, M.E., Palinski, W., Yla-Herttuala, S., Butler S., Witztum, J.L.: Distribution of oxidation specific lipid-protein adducts and apoprotein B in atherosclerotic lesions of varying severity from rabbits. *Arteriosclerosis.*, **10**: 336-349 (1990)
 - 21) Pietenpol, J.A., Stein, R.W., Moran, E., Yaciuk, P., Schlegel, R., Lyons, R.M., Pittelkow, M.R., Munger, K., Howley, P.M. and Moses, H.L.: TGF β 1 inhibition of c-myc transcription and growth in keratinocytes is abrogated by viral transforming proteins with pRB binding domains. *Cell*, **61**: 777-785 (1990)
 - 22) Chojkier, M., Houglum, K., Solis-Herruzo, J. and Brenner, D.A.: Stimulation of collagen gene expression by ascorbic acid in cultured human fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, **264**: 16857-16962 (1989)
 - 23) Flaherty, M. and Chojkier, M.: Selective inhibition of collagen synthesis by the Ca²⁺ ionophore A23187 in cultured human fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, **261**: 12060-12065 (1986)
 - 24) Baum, B.J., Moss, J., Breul, S.D. and Crystal, R.C.: Association in normal human fibroblasts of elevated levels of adenosine 3': 5'-monophosphate with a selective decrease in collagen production. *J. Biol. Chem.*, **253**: 3391-3394 (1978)

Relationship Between Lipid Deposition and Collagen Synthesis in Arterial Smooth Muscle Cells

Shiro JIMI*, Noriyuki SAKATA*, Jun SASAKI**, Keijiro SAKU**
Akira MATUNAGA**, Kazuko HIDAKA** and Shigeo TAKEBAYASHI*

The 2nd department of pathology*, the 2nd department of internal medicine**,
school of medicine, Fukuoka university