シンポジウム 3 粥腫 (プラーク) の破裂

細胞外マトリックスの分解とプラークの破裂¹勝 田 省 吾² 塚 正 彦²

はじめに

動脈硬化では、内膜の傷害とそれを修復に導く一連の反応が繰り返され、内膜に種々の細胞外マトリックスが沈着し、内膜の構造を改築しながら内膜線維症が進行していく¹⁾。しかし、本病変の特徴である脂質の関与によって、完成された病変 (プラーク) は、表層の線維性被膜と深層の脂質コア (lipid core) に二分される。線維性被膜には多量の細胞外マトリックスが沈着し、プラークの強度が保たれるが、脂質コアでは脂質沈着に加えて細胞外マトリックスの分解が亢進し組織は脆弱化する。このプラークの脆弱化はプラークの易破綻性を生み、プラーク破裂の原因となる²⁾。

本稿では、筆者らの得たデータと最近の知見をもとに、プラーク破裂を細胞外マトリックス分解の面から考えてみたい。

I. 細胞外マトリックスとプラークの安定化

プラークの骨格を形成する細胞外マトリックスは、コラーゲン、エラスチン、糖蛋白、ヒアルロン酸-プロテオグリカンであり、それぞれ特有の役割を果たし動脈壁の構造と機能の保持に寄与している。特に、コラーゲンとエラスチンは線維を作るので、プラークを安定化させて破裂を抑制する重要な細胞外マトリックスである。コラーゲンの種類はI型からXIX型まで区別されているが、ヒトのプラークには、I型、III型、IV型、V型およびVI型の5種類が沈着する³⁾。電顕的に周期性横紋を有するコラーゲン線維は、I型、III型およびV型コラーゲン分子からなり、I

型コラーゲンは剛直性、III型コラーゲンは柔軟性を有し、V型コラーゲンが多いと細い線維になりプラークに抗張力と柔軟性を与えている。VI型コラーゲン (マイクロフィブリルコラーゲン) は電顕的に細いフィラメント状構造として観察され、細胞表面のコンドロイチン硫酸プロテオグリカンのコア蛋白質やI型コラーゲン、ヒアルロン酸と結合しプラーク全体の立体構築の保持に重要な役割を果たしている。特に、本コラーゲンはヒト好中球エラスターゼによって分解されるが⁴⁾、平滑筋細胞やマクロファージの放出する種々のマトリックス分解酵素に抵抗を示すので、酵素的分解からプラークを守るという点で重要である。また、VI型コラーゲンは von Willebrand 因子と結合するので⁵⁾、プラークが破裂した場合、血栓形成性に働く。

エラスチンは弾性線維の主要構成蛋白質で、プラークに弾力性、柔軟性を与え、プラークの安定性に貢献するが、一方では脂質やカルシウム沈着の場となる。脂質の沈着した弾性線維は弾力性が低下し、また、エラスチン分解酵素の作用を受けやすくなる。

II. 細胞外マトリックスの分解とプラーク破裂

プラーク破裂のリスクを規定するのは、プラーク自体の性状 (プラークの易破綻性) とプラークに働く外的要因 (破裂のトリガー) の両者であり、易破綻性のプラークに種々のトリガーが働くとプラークが破裂する。易破綻性を生むプラークの脆弱化は、脂質コアの大きさ、被膜の厚さ、被膜の炎症細胞浸潤の3つの主要因子によって規定されている²⁾。脂質コアが大きくなるほどプラークは脆くなり、破裂傾向が強くなる。被膜の厚さは、特に肩領域 (shoulder region, プラークと病変の少ない部位との境界部) が薄く、この部位で破裂することが多い。さらに、肩領域はマクロファージが浸潤しやすい部位であり、冠状動脈のびらんや破裂を生じた部位には活性化マクロファージが密集している⁶⁾。マクロファージは MMPs (後述) などの蛋白質分解酵素を分泌することにより、プラーク破裂を促進する。Fig. 1 は破裂したプラークにおけるI型コラーゲン (コラーゲン線維) とエラスチン (弾性線維) の沈着を示すが、脂質コ

¹ 1996年11月、平成8年度日本動脈硬化学会冬季大会 (金沢) において発表。

² 金沢医科大学第二病理

Degradation of Extracellular Matrix and Plaque Rupture
Shogo Katsuda, Masahiko Tsuka: Department of Pathology, Kanazawa Medical University, Ishikawa, Japan.
Key words: Plaque rupture, Extracellular matrix, MMP, TIMP

原稿受取日: 1997年11月4日

Fig. 1 破裂したプラークにおける、I型コラーゲン (A), エラスチン (B) の分解.

アではI型コラーゲン、エラスチンともほとんど消失していることがわかる。このように、脂質コアの増大・線維性被膜の菲薄化には細胞外マトリックスの分解が必須であり、プラークの易破綻性に細胞外マトリックス分解酵素が重要な役割を果たしている。

III. 細胞外マトリックス分解酵素

細胞外マトリックスの分解に関わる蛋白質分解酵素は、活性中心にある触媒残基の種類によって、セリンプロテアーゼ、アスパラギン酸プロテアーゼ、システインプロテアーゼ、マトリックスメタロプロテアーゼ (matrix metalloproteinase, MMP) の4つに大別される。アスパラギン酸プロテアーゼとシステインプロテアーゼは酸性の至適 pH を有するので、特殊な場合を除き、細胞内で作用すると考えられている。一方、セリンプロテアーゼと MMPs は中性プロテアーゼで、生体内における細胞外マトリックスの分解は一般に中性で行われるので、細胞外マトリックスの分解にはセリンプロテアーゼと MMPs が中心的役割を果たすものと考えられている⁷⁾。セリンプロテアーゼとして、好中球エラスターゼ、カテプシン G、キマーゼ、トリプターゼ、プラスミン、プラスミノゲンアクチベーター、カリクレイン、などが存在する。これらのプロテアーゼは、好中球、

肥満細胞などの炎症細胞や血清に由来するので、主に急性炎症性病変における細胞外マトリックスの分解に主役を演じるものと思われる。しかし、動脈硬化の発生・進展に伴う細胞外マトリックスの代謝にも関与し、特に MMPs の活性化に重要な役割を果たしている (後述)。

MMP は、① 活性中心に Zn^{2+} を有し、酵素活性に Ca^{2+} を必要とする、② 潜在型酵素として分泌され、細胞外で活性化を受ける、③ アミノ酸配列に高い相同性を有する、④ 共通のインヒビターである tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) によって活性が阻害される、などの特徴を有し、現在までに 14 種類の分子種が区別されている^{7,8)}。Table 1 にそれぞれの MMP とその基質が示されているが、MMPs によって、ほとんどすべての細胞外マトリックスを分解することができる。TIMPs は MMPs に特異的な内因性阻害剤であり、現在 3 種類の分子種 (TIMP-1, 2, 3) が区別されている。TIMP-1, 2 はいずれも MMP 活性を 1:1 のモル比で阻害する。さらに、TIMP-1 は潜在型 MMP-9 と、TIMP-2 は潜在型 MMP-2 とそれぞれ複合体を形成し、潜在型 MMPs の活性化も抑制する。このように TIMPs は MMPs 活性を厳重に調節しており、生体内では MMPs-TIMPs 不均衡 (MMPs 活性優位) の条件下でのみ MMPs 活性が発揮される。

IV. プラークにおける MMPs の発現と細胞外マトリックス分解

筆者らはこれまでに、動脈硬化巣に局在する MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9 および潜在型 MMP-2 を活性化する MT-MMP-1⁹⁾ の 6 種類の MMPs と、TIMP-1, TIMP-2 について解析してきた。MMP-1, -2, -3, -7, -9 でプラークを構成するほとんどの細胞外マトリックス成分を分解することができるので (Table 1 参照)、まず筆者らのデータを紹介し、次いで、これらの MMPs とプラーク破裂との関わりを述べることにする。

免疫組織学的には、正常動脈の中膜平滑筋細胞に MMP-2 が発現しているが、MMP-1, MMP-3, MMP-9 は陰性である。病変の進行とともに、プラークに MMP-1, MMP-9 陽性のマクロファージおよび平滑筋細胞が増加してくる (Fig. 2A, B)。また、MMP-2 とともにその活性化酵素である MT-MMP-1 も、平滑筋細胞、マクロファージに証明される。一方、プラークの脂質コアおよびコアの辺縁部でインヒビター、特に TIMP-1 の染色性が低下している (Fig. 2C, D)。プラークでは、MMP-1, MMP-9 は平滑筋細胞とマクロファージに同程度に発現しているが、MMP-2 は線維性被膜外側 (内腔側) と肩領域で平滑筋細胞に比べてマクロファージに強く発現している。MMP-3 の発現もマクロファージに優位の傾向を示している。MMP-7 もプラーク

Table 1 MMP 遺伝子ファミリー (文献⁷⁾より改変).

名 称	MMP 番号	分子量 潜在型/活性型	基 質
<u>コラゲナーゼ群</u>			
組織コラゲナーゼ	MMP-1	52kD/41kD	I, II, III, X 型コラーゲン
好中球コラゲナーゼ	MMP-8	58kD/57kD	I, II, III 型コラーゲン
コラゲナーゼ-3	MMP-13	65kD/55kD	I 型コラーゲン
<u>ゼラチナーゼ/IV 型コラゲナーゼ群</u>			
ゼラチナーゼ A	MMP-2	72kD/67kD	ゼラチン, IV, V, VII, XI 型コラーゲン, ラミニン, フィブロンネクチン, エラスチン, デコリン
ゼラチナーゼ B	MMP-9	92kD/67kD	ゼラチン, III, IV, V 型コラーゲン, $\alpha 2(I)$ 鎖, エラスチン
<u>ストロムライシン群</u>			
ストロムライシン-1	MMP-3	57kD/45kD, 28kD	プロテオグリカン, III, IV, VII, IX 型コラーゲン, ラミニン, フィブロンネクチン, ゼラチン
ストロムライシン-2	MMP-10	57kD/48kD, 28kD	III, IV, V 型コラーゲン, ゼラチン, フィブロンネクチン
<u>細胞膜貫通型 MMP</u>			
MT-MMP-1	MMP-14	68kD/60kD	(潜在型 MMP-2 の活性化)
MT-MMP-2	MMP-15	72kD	?
MT-MMP-3	MMP-16	64kD	(潜在型 MMP-2 の活性化)
MT-MMP-4	MMP-17	70kD	?
<u>その他</u>			
マトリライシン	MMP-7	28kD/19kD	プロテオグリカン, ゼラチン, フィブロンネクチン, エラスチン, IV 型コラーゲン, ラミニン
ストロムライシン-3	MMP-11	58kD/28kD	フィブロンネクチン, ゼラチン, プロテオグリカン, ラミニン
メタロエラスターゼ	MMP-12	54kD/45kD, 22kD	エラスチン

Fig. 2 プラーク内の MMP-1 (A), MMP-9 (B), TIMP-1 (C), TIMP-2 (D) の発現.

に発現しており, 特に, 線維性被膜と脂質コアの境界部を中心に局在しているのが注目される (Fig. 3).

各種動脈硬化病変を含む組織片の培養上清についてゼラチン (MMP-1 によって切断され, 体温で変性したコラーゲン) 分解活性をザイモグラフィで分析すると, MMP-2 と

MMP-9 の蛋白バンドに分解活性がみられ, 病変の進行と共に活性が亢進する (Fig. 4). 特に, 大きな脂質コアを有したり, 破綻したプラークでは強い分解活性を示す. エラスチンザイモグラムで分子量 92,000 (MMP-9), 68,000 (MMP-2), 28,000 (MMP-7) の蛋白バンドにエラスチン分解活性が

Fig. 3 MMP-7の蛋白質および mRNA の発現。

みられる。筆者らは MMP-9 が動脈の弾性線維を実際に分解することを証明し¹⁰⁾、Imai ら¹¹⁾ は MMP-7 に強いエラスチン分解活性があることを明らかにした。最近、Halpert ら¹²⁾ はエラスチン分解酵素であるメタロエラストラーゼ (MMP-12) をプラークに証明しており、プラークの弾力性保持に中心的役割を果たす弾性線維は、MMP-2、MMP-7、MMP-9 および MMP-12 によって分解されるものと推定される。

プラークを細分した組織培養上清について、ゼラチン、コラーゲンおよびエラスチン消化試験を行うと、線維性被膜外側と肩の部分に高いゼラチン分解活性がみられる。コラーゲン分解活性は脂質コアを除いた部分に高く、エラスチン分解活性は脂質コアと線維性被膜内側 (脂質コア側) に高い。プラーク内において、それぞれの分解活性の強さに違いがみられることは興味ある所見である。

以上、プラークには MMP-1、-2、-3、-7、-9 が存在することを報告したが、これらの MMPs は潜在型酵素 (pro MMP) として細胞外に分泌されるので、作用を発揮するには細胞外で活性化されることが必要である。生体内での潜在型 MMP の活性化については、セリンプロテアーゼを中心とした蛋白質分解酵素による活性化が主体をなすと考えられている⁷⁾。たとえば、プラスミンは pro MMP-1、pro MMP-3、カテプシン G は pro MMP-3、pro MMP-9、好中球エラストラーゼは pro MMP-3、pro MMP-7 を活性化する。血漿中のフィブリノーゲンがプラークにしみ込んだ場合、内皮細胞、平滑筋細胞、マクロファージから産生されるプラスミノゲンアクチベーターによってプラスミンが生成されることは容易に想像される。また、カテプシン G は単球/マクロファージから産生・放出されるので¹³⁾、これらのセリンプロテアーゼによって pro MMP-1、-3、-9 の活性化が可能である。最近、プラーク、特に肩領域に肥満細胞が存在し、肥満細胞から分泌されるトリプターゼやキマーゼによって pro MMP-3、pro MMP-1 が活性化されることがわかっ

Complicated lesion
Atheromatous plaque
Fibrous plaque
Fatty streak
Diffuse intimal thickening
Normal aorta

Fig. 4 各種動脈硬化病変におけるゼラチン分解活性。

Fig. 5 潜在型 MMP (pro MMP) の活性化。

た¹⁴⁾。さらに、MMP 相互による活性化機構も注目されている⁷⁾。Fig. 5 で示すように、活性化された MMP-3 が pro MMP-1、-7、-9 を活性化し、活性化された MMP-7 は pro MMP-1、-9 を活性化することが明らかになっている。Pro MMP-2 の活性化に関しては不明であったが、最近、MT-MMP が細胞膜表面で pro MMP-2 を活性化することが実証された⁹⁾。

事実, Galis ら¹⁵⁾ は, *in situ* サイモグラフィで人のプラークで実際に MMP が活性化されており, ゼラチンやカゼインを分解することを証明しているの, プラーク内でセリンプロテアーゼや MMP 相互による活性化によって MMPs が作用すると考えることができよう。

終わりに

プラーク脆弱化の観点から, MMPs のプラーク破裂に果たす役割を述べた。今後, プラーク破裂防止に向けての細胞外マトリックスをターゲットとした遺伝子治療法も開発されるであろう。そのためには, プラーク内での個々の MMP の遺伝子発現調節機序, 活性化機構, TIMPs による活性阻害など詳細な解析が必要である。

文 献

- 1) Katsuda S and Nakanishi I: The pathogenesis of atherosclerosis. In: Wound Healing in Cardiovascular Disease. ed by Weber KT, pp 179-194, Futura Publishing, New York, 1995
- 2) Falk E, Shah PK, and Fuster V: Coronary plaque disruption. *Circulation*, 92: 657-671, 1995
- 3) Katsuda S, Okada Y, Minamoto T, Oda Y, Matsui Y, and Nakanishi I: Collagens in human atherosclerosis. Immunohistochemical analysis using collagen type-specific antibodies. *Arterioscler Thromb*, 12: 494-502, 1992
- 4) Kielty CM, Lees M, Shuttleworth A, and Woolley D: Catabolism of intact type VI collagen microfibrils: Susceptibility to degradation by serine proteinases. *Biochem Biophys Res Commun*, 191: 1230-1236, 1993
- 5) Wu XX, Gordon RE, Glanville RW, Kuo HJ, Uson RR, and Rand JH: Morphological relationships of von Willebrand factor, type VI collagen, and fibrillin in human vascular subendothelium. *Am J Pathol*, 149: 283-291, 1996
- 6) Libby P: Molecular bases of the acute coronary syndrome. *Circulation*, 91: 2844-2850, 1995
- 7) 岡田保典: サイトカインによる細胞外マトリックス分解酵素の産生とその調節. *BIO Clinica*, 11: 407-412, 1996
- 8) Puente XS, Pendas AM, Llano E, Velasco G, and Lopez-Otin C: Molecular cloning of a novel membrane-type matrix metalloproteinase from a human breast carcinoma. *Cancer Res*, 56: 944-949, 1996
- 9) Sato H, Takino T, Okada Y, Cao Y, Shinagawa A, Yamamoto E, and Seiki M: A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature*, 370: 61-65, 1994
- 10) Katsuda S, Okada Y, Okada Y, Imai K, and 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
- 11) Imai K, Yokohama Y, Nakanishi I, Ohuchi E, Fujii Y, Nakai N, and Okada Y: Matrix metalloproteinase 7 (matrilysin) from human rectal carcinoma cells. *J Biol Chem*, 270: 6691-6697, 1995
- 12) Halpert I, Sires UI, Roby JD, Potter-Perigo S, Wight TN, Shapiro SD, Welgus HG, Wickline SA, and Parks WC: Matrilysin is expressed by lipid-laden macrophages at sites of potential rupture in atherosclerotic lesions and localizes to areas of versican deposition, a proteoglycan substrate for the enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 9748-9753, 1996
- 13) Campbell EJ, Silverman EK, and Campbell MA: Elastase and cathepsin G of human monocytes: quantification of cellular content, release in response to stimuli, and heterogeneity in elastase-mediated proteolytic activity. *J Immunol*, 143: 2961-1968, 1989
- 14) Kovanen PT, Kaartinen M, and Paavonen T: Infiltrates of activated mast cells at the site of coronary atheromatous erosion or rupture in myocardial infarction. *Circulation*, 92: 1084-1088, 1995
- 15) Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, and Libby P: Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest*, 94: 2493-2503, 1994