血管損傷修復とマスト細胞キマーゼ

奥西秀樹・塩田直孝・高井真司・宮崎瑞夫*

Role of mast cell chymase in excessive wound-healing response to vascular injury

This study has analyzed the pathogenetic mechanism of the intimal thickening after balloon injury, which is currently a serious problem on the balloon angioplasty for coronary arteriosclerosis, from the aspect of wound-healing inflammation. The locally generated angiotensin II (AII), which is known for its aggravating effect on vascular hypertrophy, has been implicated to participate in the pathogenic mechanism. One month after the balloon injury, dog arteries showed myointimal hyperplasia as well as the increases in AII and AII-generating enzymes, angiotensin-converting enzyme and mast cell chymase, with the latter enzyme increasing more markedly. In the adventitia of lesioned vessels, the density of mast cells and fibroblasts was increased with apparent fibrosis and angiogenesis. These pathohistological findings suggest that the adventitial fibrosis reflects an excessive wound-healing response to the injury, and that the mast cell-fibroblast cross-talk may couple the adventitial fibrosis with the intimal hyperplasia. In this hyperplastic lesion, mast cell chymase seems to play a pivotal role by generating AII, and also by chymase's proinflammatory actions which are not yet fully defined. Thus, it is reasonable to regard the intimal thickening as a manifestation of exaggerated wound-healing response to an injury.

Hideki Okunishi・Naotaka Shiota・

Shinji Takai・Mizuo Miyazaki*

key words : mast cell, chymase, wound healing, neointima, fibrosis

この小論では、現在、臨床的に大きな問題となっている経皮経管の冠動脈形成術(PTCA)後の再狭窄の発症機序を炎症学の視点から解析してみた。再狭窄は血管内膜の増殖・肥厚によるが、今回の実験成績は、この内膜病変を“物理的傷害に対する炎症性過剰修復反応¹⁾”と見なすのが妥当

であることを示唆している。

動脈硬化に伴う冠動脈狭窄は本邦でも増加の一途を辿っており、心筋梗塞に至る重要な危険因子である。現在、冠動脈狭窄の治療法としてバルーンカテーテルによる内腔拡張術、即ち PTCA がその簡便さのゆえに広く実施されている。しかし、PTCA で一次的拡張に成功しても、半年以内に高頻度で再狭窄を生じ、しかも、これを確実に防ぐ手段はまだない²⁾。

ラットのバルーン傷害血管に生じる反応性内膜肥厚がアンジオテンシン変換酵素(ACE)阻害薬で予防できる³⁾ことから、ヒト PTCA 後内膜肥厚に対しても ACE 阻害薬の臨床試験が実施されたが、否定的な成績に終わった²⁾。

一方、ACE の産生するアンジオテンシン II (AII) が細胞増殖、肥大、遊走作用や細胞外基質(ECM)産生亢進作用を有することが知られており⁴⁾、ヒト血管でも AII は同様の作用を発揮するものと推察される。

筆者らは、従来、血管組織における局所的な AII 産生機構を解析してきた⁵⁻⁷⁾結果、ラット血管の AII 産生が ACE のみに依存するのとは異なり、ヒト血管ではキマーゼ(chymase)による AII 産生が ACE よりも優位であることを見出した⁷⁾。この血管 AII 産生機構における種差が ACE 阻害薬の内膜肥厚予防効果の種差をもたらすのであろうと仮定し、ヒト血管と同質の AII 産生機構をもつイヌ血管^{5,6)}においてバルーン傷害モデルを作成し、病変発症機序の解明を試みた。その結果、キマーゼの病変形成への関与が示唆されたばかりでなく、これまでまったく着目されていなかった傷害部位の血管外膜炎症が内膜の炎症性肥厚と関連することを見出した。

方 法

ビーグル成犬の右側総頸動脈を小切開し、3F バルーンカテーテルを挿入して内腔面に傷害を加え

* Department of Pharmacology, Osaka Medical College
大阪医科大学薬理学教室

図1 バルーン傷害による内膜肥厚
同一の個体から採取した傷害側(パネルA)と非傷害・対照側(パネルB)の弾性線維染色標本を示す。傷害側には典型的な新生内膜(N)を認めるが、対照側には認められない。Lは血管内腔、Mは中膜、Aは外膜をおおのの指示している。上方の矢は内弾性板、下方の矢は外弾性板である。(文献⁸⁾より改変)

図2 傷害側動脈外膜のトルイジンブルー染色
メタクロマジーを示すマスト細胞(矢頭)が多数出現し、線維芽細胞数の増加、コラーゲン線維の増生、および多数の血管新生(矢印)が認められる。

た⁸⁾。切開孔は極細ポリプロピレン糸で、狭窄しないように注意を払って縫合閉鎖した。左側総頸動脈は周囲組織から剝離するだけに留め、対照とした。術後1カ月で両側頸動脈を摘出し、以下の解析を行った。

ホルマリン固定後、①ヘマトキシリン・エオジン染色標本を病理組織学的に解析し、②弾性線維

染色標本の画像解析により、内膜肥厚を定量化し、③トルイジンブルー染色でメタクロマジーを示すマスト細胞を計数した。

AII産生系の動態を示す指標として、ACEおよびキマーゼの酵素活性⁹⁾ならびに mRNA レベル(おのおのの cDNA に特異的なプライマーを合成し、逆転写(RT)PCR法で増幅⁹⁾)、および血管組織AII濃度(固相抽出物を逆相 HPLC で分画したあと、ラジオイムノアッセイで定量)を測定した。

結果

傷害側動脈は内腔狭窄を呈し、これは平滑筋細胞の内膜への遊走と、内膜での増殖、ECM 増生を伴う新生内膜(Neointima)によるものであった(図1)。新生内膜は内弾性板の断裂部に一致してもっとも顕著であった。内膜肥厚部に相当する血管外膜では、マスト細胞および線維芽細胞が増加し、コラーゲンと思われる ECM 増生や血管新生が多数認められた(図2)。

傷害側動脈では、対照側に比して、ACE 活性が4.6倍に、ACE mRNA は4.8倍にそれぞれ上昇し、キマーゼ活性は22倍に、キマーゼ mRNA は3.4倍に上昇していた(図3)。血管組織AII濃度は対照側の約2倍に増加していた(図4)。

考察

バルーンカテーテルによる物理的傷害が血管壁に加わると、それに反応してキマーゼと ACE はいずれも遺伝子発現が増加し、酵素活性が上昇した。これらの酵素により局所的なAII産生が増加し、AIIの増殖因子様作用⁴⁾の結果として平滑筋の内膜への遊走、内膜での増殖・ECM 増生が引き起こされたものと考えられる(図5)。

ACE よりもキマーゼの活性増加が顕著であることから、キマーゼによるAII産生が病変形成の主役であると推察されるが、この推察の妥当性は別に得られた実験成績——AII受容体拮抗薬は内膜肥厚を抑制したが、ACE 阻害薬の効果は軽微であった(奥西ら、第16回日本高血圧学会、1993)——により支持される。

二つの阻害薬の効果がいちじるしく異なるのは、AII拮抗薬がAII産生経路に拘らずAIIの作用を受容体レベルで遮断する⁹⁾のに対し、ACE 阻害

図3 傷害によるアンジオテンシンII産生酵素の活性および遺伝子発現の変化

上段パネルはRT-PCR法によるACEとキマーゼのmRNAレベルを示す。レーン1はマーカー、レーン2と3は対照側、レーン4と5は傷害側を示す。傷害側ではACE、キマーゼともに遺伝子発現レベルが上昇している。

下段パネルはACEおよびキマーゼの活性(6例の平均値±標準誤差)を示す。いずれの酵素活性も傷害側で増加している。

薬はキマーゼを阻害せずAIIの産生を遮断できない⁵⁻⁷⁾からである、と解釈できる。

傷害部の外膜においてマスト細胞や線維芽細胞が増加したのは、たんに血管を周囲結合組織から剥離したからではない。なぜなら、同様に周囲組織を剥離した対照側血管では内膜肥厚も外膜炎も生じないからである。

キマーゼはマスト細胞由来のプロテアーゼであり^{10,11)}、傷害部位においてキマーゼ活性が増加している生化学的所見は、同部位の外膜においてマスト細胞が増加している病理組織学的所見と符合する。マスト細胞が線維芽細胞とともにケロイドや線維化などの慢性肉芽性炎症に何らかの寄与をしていることは早くから指摘されてきたが^{12,13)}、分子レベルでの詳細な解析はまだ不十分である。

図4 血管組織中のアンジオテンシンII濃度

左パネルはAII濃度(組織乾燥重量あたりのAII量)の実測値を示す。右パネルは各個体ごとの対照側の数値を基準として標準化したもの。すべての個体で傷害側のAII濃度が上昇している。3本の短い横線は平均値±標準誤差をあらわす。

同様に、慢性炎症におけるキマーゼの役割も実証されていない。損傷修復部位におけるキマーゼ活性の上昇を示す今回の実験成績と、AII拮抗薬の内膜肥厚予防効果(既述)とを考え併せると、血管キマーゼの炎症性過剰修復反応における役割が、間接的にはあるが、示されたといつてよい。直接の証明には特異的なキマーゼ阻害薬の開発を待たねばならない。

今回の結果は、キマーゼがAII産生を介して損傷修復性炎症反応に関与していることを示したが、キマーゼの炎症における役割はこれに留まらないと、筆者らは考えている。なぜなら、キマーゼはフィブロンネクチン¹⁴⁾やコラーゲン¹⁰⁾などのECM、IL-1 β ¹⁵⁾やIL-4(M. K. Church 私信)などのサイトカイン、IgGおよび血液凝固因子などを限定分解し¹⁰⁾、これらの蛋白分子を修飾することが知られており、この機能を通じて組織修復性炎症反応に深く関わっていると考えられるからである。これらの諸相を特異的なキマーゼ阻害薬の開発

図 5 バルーン傷害による内膜損傷や内弾性板断裂が新生内膜肥厚および外膜の線維性炎症を起こす機序(仮説)

血管内膜に傷害が加わると、損傷細胞から bFGF などの成長因子が放出される。bFGF は平滑筋細胞 (SMC) を内膜へ遊走させたり、外膜の線維芽細胞を活性化し、それによってマスト細胞が活性化される。マスト細胞はキマーゼを放出し、アンジオテンシン I を II に変換する。アンジオテンシン II はオートクリン・パラクリンのマスト細胞自身や線維芽細胞に作用して外膜の増殖性炎症を促進し、平滑筋細胞やマクロファージ (Mφ) に直接、あるいは間接 (PDGF 等を介して) に作用して内膜肥厚を促進する。IEL: 内弾性板, EEL: 外弾性板

により解明していきたい。

今回のデータでは、キマーゼ活性の増加率と遺伝子発現の増加率との間に乖離がみられたが、これはキマーゼがマスト細胞から持続して緩徐に放出されたあと、マスト細胞表面や ECM プロテオグリカンに結合して安定な形で(言わば固定化酵素として)存在する¹¹⁾からであろう。つまり、キマーゼ遺伝子発現やマスト細胞脱顆粒がわずかに亢進しただけでも、細胞外スペースでは大きなキマーゼ活性増加を招来すると考えられる。

内膜に対する傷害がいかにして外膜のマスト細胞および線維芽細胞を活性化するかは未解決の問題であるが、図5に示すように、おそらく傷害された内皮細胞や一部の平滑筋細胞から放出されたbFGFなどが外膜の線維芽細胞を活性化し¹⁶⁾、線維芽細胞はSCF(c-kit ligandともよばれる)を分泌してマスト細胞前駆細胞の分化・増殖をもたらす¹⁷⁾ものと推察している。さらに、c-kit受容体が活性化されたマスト細胞はキマーゼの遺伝子発現および細胞外放出を促進してAII産生を高めるほ

図 6 血管外膜におけるマスト細胞と線維芽細胞のクロストーク

損傷細胞から放出された bFGF は線維芽細胞を活性化し SCF(c-kit ligand)を分泌させる。SCF はマスト細胞の分化・増殖を誘発するとともに多様な炎症促進物質を放出させ、これら物質はさらに線維芽細胞の増殖と活性化を誘発して細胞外マトリックス(ECM)増生や血管新生を促進する。これが今回の病理組織像に反映されていると考えられる。

AT-R: アンジオテンシン II 受容体, bFGF-R: bFGF 受容体

か、ヘパリン、ヒスタミン、IL-4、TNF- α 、トリプターゼなど多種多様な炎症修飾物質を放出して線維芽細胞の増殖や ECM 増生^{17,18)}、血管新生¹⁹⁾を引き起こすと考えられる。

外膜におけるマスト細胞と線維芽細胞とのクロストーク(図6)は、外膜の線維化(炎症性組織修復)を起こすだけでなく、新生内膜形成の駆動力ともなっているに違いない¹⁶⁾。この考えを指示する事実として、マスト細胞や線維芽細胞の機能を抑制するトラニラストがケロイド形成を抑制したり²⁰⁾、ヒトPTCA後再狭窄を予防すること(上田ら、第40回日本心臓病学会、1992)があげられる。

これらの事実を総合すると、キマーゼはたんに物理的傷害に対する亜急性修復反応に関わるだけでなく、さらに広範囲の免疫性・非免疫性の慢性肥厚性血管炎(多くは原因不明の難病である)にも深く関わっている可能性が強い。

結 論

この研究は傷害血管の内膜肥厚に血管キマーズが重要な役割を果たしていること、内膜肥厚はたんに内膜だけの炎症反応ではなく外膜の過剰修復炎症と呼応していること、を明らかにした。

AIIの定量法は金勝慶博士(大阪市大)に、マスト細胞の染色・同定は山本隆一博士(大阪医大)および有菌直樹博士(京都府立医大)に、分子生物学的技術は深水昭吉、村上和雄両博士(筑波大)および中川俊正博士(大阪医大)にそれぞれ負うところが大きかったことを記して深謝します。

文 献

- 1) Forrester, J. S., Fishbein, M., Helfant, R., Fagin, J. : A paradigm for restenosis based on cell biology : clues for the development of new preventive therapies. *J. Am. Coll. Cardiol.* 17 : 758-769, 1991.
- 2) Heyndrickx, G. R., the MERCATOR study group : Angiotensin-converting enzyme inhibitor in a human model of restenosis. *Angiotensin and the heart.* (ed. Grobecker, H., Heusch, G., Strauer, B. E.), Steinkopff Verlag, Darmstadt, 1993, p 169-182.
- 3) Powell, J. S., Clozel, J.-P., Muller, R. K. M., Kuhn, H., Hefti, F., Hosang, M., Baumgartner, H. R. : Inhibitors of angiotensin-converting enzyme prevent myointimal proliferation after vascular injury. *Science* 245 : 186-188, 1989.
- 4) Schelling, P., Fischer, H., Ganten, D. : Angiotensin and cell growth : a link to cardiovascular hypertrophy? *J. Hypertens.* 9 : 3-15, 1991.
- 5) Okunishi, H., Miyazaki, M., Toda, N. : Evidence for a putatively new angiotensin II-generating enzyme in the vascular wall. *J. Hypertens.* 2 : 277-284, 1984.
- 6) Okunishi, H., Miyazaki, M., Okamura, T., Toda, N. : Different distribution of two types of angiotensin II-generating enzymes in the aortic wall. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 149 : 1186-1192, 1987.
- 7) Okunishi, H., Oka, Y., Shiota, N., Kawamoto, T., Song, K., Miyazaki, M. : Marked species-difference in the vascular angiotensin II-forming pathways : humans versus rodents. *Japan. J. Pharmacol.* 62 : 207-210, 1993.
- 8) Shiota, N., Okunishi, H., Fukamizu, A., Sakonjo, H., Kikumori, M., Nishimura, T., Nakagawa, T., Murakami, K., Miyazaki, M. : Activation of two angiotensin-generating systems in the balloon-injured artery. *FEBS Lett.* 323 : 239-242, 1993.
- 9) Okunishi, H., Song, K., Oka, Y., Kobayashi, T., Kawamoto, T., Ishihara, H., Mori, N., Miyazaki, M. : *In vitro* pharmacology of a novel non-peptide angiotensin II-receptor antagonist, E4177. *Japan. J. Pharmacol.* 62 : 239-244, 1993.
- 10) 木戸 博, 勝沼信彦 : セリンプロテアーゼとアレルギー炎症の成立機序. 肥満細胞—生理と病理. (黒沢元博編), メディカルレビュー社, 1990, p 167-179.
- 11) Sayama, S., Iozzo, R. V., Lazarus, G. S., Schechter, N. M. : Human skin chymotrypsin-like proteinase chymase. *J. Biol. Chem.* 262 : 6808-6815, 1987.
- 12) Enerback, L., Norrby, K. : The mast cells. Cell kinetics of the inflammatory reaction. *Curr. Topics Pathol.* 79. (ed. Iversen, O. H.), Springer, New York, 1989, p 169-204.
- 13) Galli, S. J. : New concepts about the mast cell. *New Engl. J. Med.* 328 : 257-265, 1993.
- 14) Vartio, T., Seppa, H., Vaheri, A. : Susceptibility of soluble and matrix fibronectins to degradation by tissue proteinases, mast cell chymase and cathepsin G. *J. Biol. Chem.* 256 : 471-477, 1981.
- 15) Mizutani, H., Schechter N., Lazarus, G., Black, R. A., Kupper, T. S. : Rapid and specific conversion of precursor interleukin 1 β to an active IL-1 species by human mast cell chymase. *J. Exp. Med.* 174 : 821-825, 1991.
- 16) Edelman, E. R., Nugent, M. A., Smith, L. T., Karnovsky, M. J. : Basic fibroblast growth factor enhances the coupling of intimal hyperplasia and proliferation of vasa vasorum in injured rat arteries. *J. Clin. Invest.* 89 : 465-473, 1992.
- 17) Galli, S. J., Tsai, M., Wershil, B. K. : The c-kit receptor, stem cell factor, and mast cells. *Am. J. Pathol.* 142 : 965-974, 1993.
- 18) Metcalfe, D. D., Costa, J. J., Burd, P. R. : Mast cells and basophils. *Inflammation : basic principles and clinical correlates.* 2nd ed. (ed. Gallin, J. I., Goldstein, I. M., Snyderman, R.), Raven Press, New York, 1992, p 709-725.
- 19) Klagsbrun, M. : Mediators of angiogenesis : the biological significance of basic fibroblast growth factor(bFGF)-heparin and heparan sulfate interactions. *Cancer Biol.* 3 : 81-87, 1992.
- 20) Suzawa, H., Kikuchi, S., Arai, N., Koda, A. : The mechanism involved in the inhibitory action of tranilast on collagen biosynthesis of keloid fibroblasts. *Japan. J. Pharmacol.* 60 : 91-96, 1992.