原 著

順天堂医学 40 (2)
P. 189~199 (1994)

ヒト平滑筋ミオシン重鎖の多様性

—血管発生および動脈硬化病変における発現—

Diversity of human smooth muscle myosin heavy chains

—Significance as markers for vascular development and atherosclerosis—

相 川 眞 範*

MASANORI AIKAWA, M. D.

虚血性心疾患の主たる原因となる動脈硬化病変の形成には、平滑筋細胞の形質変換や増殖が重要な役割を果たしていると言われている。永井らは先にウサギ平滑筋には少なくとも3種のミオシン重鎖 (SM1・SM2・SMemb) が存在し、その発現様式は平滑筋分化あるいは平滑筋増殖に伴い変化することを示した。SM1はすべての発生段階の血管平滑筋に一貫して発現しており、またSM2は生後の分化した平滑筋にのみ発現し、実験的動脈硬化病変では消失した。一方、非筋型ミオシンのSMembは胎児期平滑筋や増殖平滑筋に強く発現していた。よって、平滑筋ミオシン重鎖は動脈硬化病変における平滑筋の形質の病理学的マーカーとなりうる事が示唆された。

そこで本研究においては、臨床的に重要なヒトの動脈硬化病変における平滑筋形質変換の様式を明らかにすることを目的として3種類のヒト平滑筋ミオシン重鎖のcDNAクローンを単離し、それらの組織発現を検討した。SM1 mRNAはすべての発生段階の大動脈で同程度に発現していた。SM2 mRNAの発現は胎児期には弱く、発生にともない増強し、成人ではSM1と同程度に発現していた。SMemb mRNAは胎児・新生児期に強く発現したのち成長に伴い減弱したが、高齢者では再び強く発現する傾向がみられた。各アイソフォームに特異的な抗体を用いた組織学的検討で、SM1は胎児から成人まですべての大動脈と冠動脈の中膜に発現していたが、SM2は胎児期には殆ど陰性であり、生後の中膜において陽性であった。SMembはウサギの検討と異なり、胎児平滑筋に特異的な発現様式は示さなかった。若年症例冠動脈のびまん性内膜厚部位は平滑筋細胞を主体に構成されており、3種類すべてのミオシン重鎖が発現していたが、加齢に伴って内膜肥厚が進行すると、分化した平滑筋にのみ発現するSM2の発現は低下する傾向があり、平滑筋細胞の形質変換が認められた。動脈硬化病変においてはSM2のみならずSM1の発現も低下しており、高度に形質変換した平滑筋の存在が示唆された。このように動脈硬化の発生および進展機序には、平滑筋形質変換が重要な役割を果たしていると考えられた。ヒト平滑筋ミオシン重鎖は平滑筋細胞形質のマーカーとして有用であり、動脈硬化病変の形成や進展の分子機構の解明に寄与することが期待される。

キーワード：ミオシン重鎖，平滑筋，動脈硬化，血管発生

Key words : myosin heavy chains, smooth muscle, atherosclerosis, vascular development

* 順天堂大学医学部内科学教室循環器内科学講座

Division of Cardiology, Department of Internal
Medicine, Juntendo University School of Medi-
cine, Tokyo, Japan

〔Nov. 18, 1993原稿受領〕〔Dec. 16, 1993掲載決定〕

緒 言

これまでの永井らの検討により、ウサギ平滑筋ミオシン重鎖には少なくとも3種類のアイソフォー

ム (SM 1・SM 2・SMemb) が存在し、それらの発現は血管発生に伴い変換することが明らかになった^{1)~5)}。SM 1は胎児期から成体のすべての発生段階の血管平滑筋に発現するが、SM 2は生後の分化した平滑筋のみに発現する。一方、SMembは胎児期の未分化な平滑筋に強く発現したのち、生後次第に減少し成体では消失する。この事実から、平滑筋ミオシン重鎖アイソフォームは平滑筋分化の優れた分子マーカーであると考えられた。すなわち、SM 1は平滑筋のマーカー、SM 2は良好に分化した平滑筋のマーカー、また SMemb は未分化な平滑筋のマーカーとしての有用性が示唆されたわけである。また、バルーニングによる血管内皮剥離や高コレステロール食負荷後に形成される新生内膜では SM 2の発現が減少し、胎児型ミオシンである SMemb が再発現すること、すなわち、動物の実験的動脈硬化病変の形成には、平滑筋細胞の脱分化をともなった増殖が重要な役割を果たしていることが明らかとなった⁵⁾。このことにより、平滑筋ミオシン重鎖アイソフォームは動脈硬化病変において形質変換した平滑筋の同定や、動脈硬化の病態解析のための病理学的マーカーとしても有用であると考えられた。しかしここで用いたウサギなどの小動物は主に中膜のみから構成されており、内膜肥厚が生理的に存在するヒトの動脈(特に冠動脈に特徴的であるが)とは構造が異なっている。よって、これら一連の研究で得られた結果が臨床的に重要なヒトの動脈硬化形成の機序を説明しうるか、という問題があった。そこで本研究では、ヒト血管平滑筋におけるミオシン重鎖の発現を検討した。はじめに、ヒト平滑筋組織より3種類ミオシン重鎖アイソフォームをコードする cDNA クローンを単離し、それらを用いて各発生段階のヒト大動脈におけるアイソフォームの発現を mRNA レベルで検討した。さらに cDNA から推定された特異的アミノ酸配列の合成ペプチドを用いて各アイソフォームのモノクローナル抗体を作成し、ヒト大動脈および冠動脈の発生過程や動脈硬化病変における発現を組織学的に検討した。

材料と方法

1. cDNA クローニングと DNA 塩基配列解析

SMHC94 (ヒト SM 1) と SMHC93 (ヒト SM 2) をヒト臍帯 cDNA ライブラリー (λ gt10, Dr. Chandra Kumar, Schering-Plough, より供与) より、HSME 6 (ヒト SMemb) はヒト胎児大動脈 cDNA ライブラリー (λ gt11, Clontech, Laboratories, Palo Alto, Calif) より単離した。ヒト臍帯 cDNA ライブラリーは SMHC40 (ヒト SM 1) で、ヒト胎児大動脈 cDNA ライブラリーは FSMHC 34 (ヒト SMemb)⁵⁾ の *Sma* I-*Sma* I 断片 (491-1571nt.) でスクリーニングした。cDNA プロローブは Random-Primed DNA Labeling Kit (Boehringer Mannheim, Germany) を用い、 $[\alpha$ -³²P] dCTP で標識した。ライブラリー (2.5×10^5) の一部を Plaque/Colony Hybridization Transfer Membrane (New England Nuclear, Boston, Mass) にトランスファーし、50% formamide, 5 x SSPE (0.75 M NaCl, 50 mM NaH₂PO₄, 5 mM EDTA), 0.1 % SDS, 5x Denhard's solution and denatured salmon sperm DNA (100 μ g/ml) の溶液中で、cDNA プロローブとハイブリダイゼーションをおこなった (42°C, 18時間)。pBlue-script II sk (-) にサブクローニングされた陽性クローンに対し、Taq dye primer cycle sequencing kit (Applied Biosystems Inc, Foster City, Calif) を用い DNA thermal cycler 480 (The Perkin-Elmer Corporation, CT, and the Cetus Corporation, CA) で反応させた。DNA 塩基配列の解析は Model 373A DNA Sequencing Systems (Applied Biosystems, CA) で行った。

2. ヒト血管およびヒト培養線維芽細胞の採取

胎児大動脈を含むすべての血管標本は順天堂大学で遺族の同意を得て行われた病理解剖症例より採取された。標本の年齢構成は以下の3群よりなる。胎児群5例: 在胎17~27週齢, 若年成人群5例: 18~33歳, 高齢者群10例: 52~76歳。RNA 調製の目的には、死後4時間以内の組織を液体窒素で直ちに凍結した。免疫組織染色用には95% エタ

ノールと1%酢酸の混合液中で固定した。ヒト線維芽細胞(大日本製薬)はDulbecco's modified Eagle's medium/10% fetal bovine serumを用い、37°C、5% CO₂環境下で培養された。

3. RNAの調製およびリボスクレアーズ・プロテクション・アッセイ

Total RNAは剖検時に採取したヒト上行大動脈からAGPC法により調製した⁶⁾。SM1とSM2を同時に認識するcRNAプローブはSMHC93(SM2)cDNAの*Pst*I-*Xba*I断片(nt. 782-932, 151bp)を用いた。この断片は112bpのSM1・SM2共通配列と、39bpのSM2特異的配列を有する。SMembを認識するcRNAプローブにはHSME6の*Eco*RI-*Pst*I断片(156bp)を用いた。また、ヒトglyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)cDNAをPolymerase Chain Reaction法を用いて作成した⁷⁾。それぞれのcDNA断片をpBluescript II SK(-)にサブクローニングしたのち、Riboprobe Gemini System II (Promega Corp, Madison, Wis)を用いてアンチセンスRNAプローブを合成した。RNAサンプルとのハイブリダイゼーション、リボスクレアーズによる消化、ポリアクリルアミドゲルでの泳動はRibonuclease Protection Assay RPA II Kit (Ambion Inc, Austin, Tex)を用いて行なった。SM2 mRNAのフルプロテクションは153nt、SM1のパーシャルプロテクションは81ntと33ntのバンドとしてゲル上に認められ、SMembとGAPDH mRNAはそれぞれ157ntと68ntのバンドとして認められる。

4. 平滑筋ミオシン重鎖アイソフォームのモノクローナル抗体の作成

各アイソフォームのカルボキシル末端の特異的アミノ酸配列をもとにペプチドを合成した。3種類の合成ペプチドは以下の通りである。SM1 (Arg-Asp-Ala-Asp-Phe-Asn-Gly-Thr-Lys-Ala-Ser-Glu)・SM2 (Gly-Pro-Pro-Pro-Gln-Glu-Thr-Ser-Gln)・SMemb (Thr-Ser-Asp-Val-Asn-Glu-Thr-Gln-Pro-Pro-Gln-Ser-Glu)。それらを用い、先にわれわれが記載した方法⁸⁾で抗体を作成した。

5. ヒト大動脈および冠動脈の免疫組織染色

エタノール固定後パラフィン包埋した組織を3μmの厚さに薄切した。脱パラフィン後、DAKO LSAB Kit (Dako Corp, Calif)を用い、先に記載した方法⁸⁾¹⁴⁾で酵素抗体法により染色した。用いた一次抗体は抗ヒト平滑筋ミオシン重鎖(SM1・SM2・SMemb抗ヒト平滑筋αアクチン(1A4, DAKO A/S, Denmark)⁹⁾・抗ヒトマクロファージ(HAM56, Enzo Diagnostic, New York, NY)¹⁰⁾の各モノクローナル抗体であり、すべて室温で30分間インキュベートした。

結 果

1. cDNAクローニングとDNA塩基配列解析

ヒトSM1, SM2, SMembをコードするcDNA(SMHC94, SMHC93, HSME6)は「材料と方法」で述べた方法で単離した。SMHC94, SMHC93, HSME6はそれぞれ1.2・0.9・1.0bpのインサートを有していた。図-1AにSM1(SMHC94)およびSM2(SMHC93)の塩基配列とアミノ酸配列を示す。両cDNAはSM2が持つカルボキシル末端の39bpの特異配列(途中に停止コドンがあり、9コのアミノ酸をコードする)を除き、共通の配列を有していた。ウサギSM1・SM2との相同性は核酸レベルでそれぞれ92%・93%、アミノ酸レベルで96%・97%であった。ウサギおよびラットの検討で、SM2の9アミノ酸はSM1/2遺伝子の39ntのエクソンでのスプライシングの違い(alternative splicing)によって出現することが明らかになっている。よって、ヒトSM1・SM2の発現も同一の遺伝子からスプライシングにより調節をうけていると考えられた。図-1BにヒトSMemb(HSME6)の塩基配列とアミノ酸配列を示す。ウサギSMembとは核酸レベルとアミノ酸レベルでそれぞれ92%・98%と高い相同性を示した。

2. ヒト平滑筋ミオシン重鎖アイソフォーム mRNAの発現

われわれが単離したcDNAクローンを用いて、

B

図-1 ヒト平滑筋ミオシン重鎖アイソフォーム (SM 1, SM 2, SMemb) をコードする cDNA クローン (SMHC94, SMHC93, HSME 6) の DNA 塩基配列 (A) およびアミノ酸配列 (B)

各アイソフォームに特異的な cDNA プローブを作成し、各発生段階のヒト大動脈より抽出した RNA に対しリボヌクレアーゼ-プロテクションアッセイを行なった。図-2 A において在胎31週の胎児から46歳男性までのヒト大動脈における SM 1 および SM 2 mRNA の発現を示した。SM 1 はすべての発生段階の大動脈で同程度に発現していた。ウサギでは生後にはのみ発現した SM 2 はヒトにおいては胎児期や新生児期にも認められたが、SM 1 に比べ発現は弱く、成長に伴って SM 1 とほぼ同程度にまで増加した。SMemb は胎児期・新生児期に強く発現したのち、成長に伴い減少したが、ウサギの場合と異なり消失することではなく、さらに加齢に伴って再び増加する傾向が見られた。なお、GAPDH の発現量に明らかな変化は認められず、SMemb の発現の変化はサンプル RNA の泳

動量の多寡によるものではないと考えられる。また、SM 1 と SM 2 は血管平滑筋組織のみに発現し培養線維芽細胞には全く発現しなかったのに対し、SMemb は非筋細胞である培養線維芽細胞にも強く発現した。われわれのこれまでの検討¹⁾ と合わせ、SM 1 と SM は平滑筋特異的ミオシンであり、SMemb は非筋型ミオシンであると考えられた。

3. ヒト大動脈および冠動脈における平滑筋ミオシン重鎖アイソフォームの組織発現

上行大動脈および左冠動脈前下行枝を対象に抗ヒト平滑筋ミオシン重鎖 (SM 1・SM 2・SMemb)・抗ヒト平滑筋 α アクチン (1A4)・抗ヒトマクロファージ (HAM56) の各モノクローナル抗体を用い、免疫組織染色を施した。

1) 血管の発達に伴う発現

図-3の胎児大動脈において、SM1とSMemb

図-2 リボスクレアーゼ・プロテクション・アッセイを用いた培養線維芽細胞および各発生段階のヒト大動脈における平滑筋ミオシン重鎖 mRNA の発現

各レーンには $5 \mu\text{g}$ ずつの total RNA を泳動した。(A) 平滑筋特異的ミオシン重鎖 (SM 1・SM 2) の発現 SM 2 mRNA の発現は 153 nt のフルプロテクションのバンド, SM 1 の発現は 81 nt のパーシャルプロテクションのバンドとして認められる。(B) 非筋型ミオシン重鎖 (SMemb) と GAPDH mRNA の発現はそれぞれ 157 nt と 68 nt のフルプロテクションのバンドとして認められる。RNA サンプルに対する SMemb と GAPDH のハイブリダイゼーションは同時に行われた。Fibroblast; 培養線維芽細胞, Aorta; 大動脈, Fetus; 胎児大動脈, Neonate; 新生児大動脈

図-3 ヒト大動脈の発生・加齢に伴う平滑筋特異的ミオシン重鎖 (SM 1 SM 2) と非筋型ミオシン重鎖 (SMemb) の発現の変化 (連続切片を用いた免疫組織学的検討)

i; 内膜, m; 中膜, Scale Bar = $200 \mu\text{m}$. 胎児 (17週) 大動脈は中膜のみで形成され, SM 2 の発現は認められなかった。18歳, 52歳, 65歳の動脈中膜には 3 種類すべてのミオシン重鎖が発現していたが, 内膜での SM 2 の発現は低下していた

は陽性であったが, SM 2 はほぼ陰性であった。一方, すべての成人症例の中膜で, 3 種類すべての平滑筋ミオシン重鎖が陽性であった。しかし, 若年成人群 5 例中 3 例および高齢者群 10 例中 7 例の内膜で SM 2 の発現は低下していた。SMemb の発現も高齢者群 10 例中 2 例で低下していた。

冠動脈においても大動脈同様, 血管発生に伴い平滑筋ミオシン重鎖の発現の変換が認められた (図-4)。胎児冠動脈で陰性であった SM 2 が生後は陽性であった。SM 1 と SMemb は大動脈同様すべての年齢で陽性であった。SMemb の染色性は加齢に伴い低下するように思われたが, 生後でも SMemb の発現が認められたことは, ウサギでの検討 (SMemb の発現は胎児期のみに認められた) との相違点であった。

ヒト冠動脈の特徴として, 内膜形成は生直後より起こり, 若年成人において中膜より厚い内膜が存在することも少なくない。本研究において若年者の内膜は SM 1 陽性の平滑筋細胞を主体に構成され, 抗マクロファージ抗体 (HAM 56) に陽性の細胞は殆ど認められなかった。図-4 の 18歳の症例に示す通り, 若年者冠動脈の動脈硬化性変化を有さない内膜肥厚 (所謂 生理的内膜肥厚) では 3 種類すべての平滑筋ミオシン重鎖が発現していた。図-4 の 33歳の症例では, 同一切片上の軽度内膜肥厚と中等度の内膜肥厚の免疫組織染色を示した。軽度内膜肥厚部位では 3 種類すべての平滑筋ミオシン重鎖が発現しているのに対し, 中等度の内膜肥厚部位では SM 2 の発現が明らかに低下している。すなわち, 動脈硬化性変化の認められない内幕においても, ミオシンの発現パターンからみた平滑筋細胞の形質変換が起きていることを示唆するものである。

2) 動脈硬化病変における発現

高齢者群 10 例中 5 例の大動脈において粥状硬

図-4 ヒト冠動脈(左前下行枝)の発生・加齢に伴う平滑筋特異的ミオシン重鎖(SM1 SM2)と非筋型ミオシン重鎖(SMem)の発現の変化(連続切片を用いた免疫組織学的検討)

i; 内膜, m; 中膜, Scale Bar = 200 μ m. 胎児(21週)冠動脈には大動脈(図-3)同様に明らかな内膜形成は認められず, 中膜は抗SM2抗体に殆ど陰性であった(最上段中央). 生後の冠動脈中膜にはSM2を含む3種類すべてのミオシン重鎖が発現していた. また, 18歳および33歳の軽度のびまん性内膜肥厚部位ではすべてのミオシン重鎖が同程度に発現していた. しかし同じ33歳症例の同一切片上の中程度に肥厚した内膜では, 分化した平滑筋に発現するミオシン重鎖であるSM2が明らかに低下していた(最下段中央)

化病変が認められた. この領域の平滑筋は α アクチン, SM1に陽性でもSM2には陰性の形質を有していた. マクロファージの集簇の著明な領域では特にSM2の発現が低下していた. また, SMembの発現は高齢者群10例中2例の粥状硬化病変で低下していた. 典型例を図-5に示した(74歳男性).

図-6は65歳男性の左冠動脈前下行枝の免疫組織染色像である. 偏在性の内膜肥厚部位には細胞外基質の蓄積, 硝子化, マクロファージの集積, 平滑筋細胞の脱落などの動脈硬化性変化が認められた. それを取り巻く内膜平滑筋は抗 α アクチン抗体には陽性でも, 分化した平滑筋に特異的なSM2のみならず, 胎児平滑筋にも発現するSM1にすら陰性の形質を有するものも認められた.

図-5 大動脈粥状硬化病変における平滑筋ミオシン重鎖の発現

74歳男性大動脈の粥腫辺縁部(shoulder region)の連続切片に対し抗平滑筋 α アクチン, 抗平滑筋特異的ミオシン重鎖(SM1, SM2), 抗非筋ミオシン(SMem), 抗マクロファージの各抗体を用い, 免疫組織染色を行った. i; 内膜, m; 中膜, HE; ヘマトキシリン・エオジン染色, M ϕ ; マクロファージ, Scale Bar = 200 μ m. マクロファージの集簇する内膜には抗 α アクチン, 抗SM1抗体に陽性でSM2に殆ど陰性の平滑筋が認められた. 内膜平滑筋ではSMembの発現も低下していた

SMembの発現は全体に低下していたが, 粥状硬化病変よりむしろ比較的健常な内膜で保たれていた. 同様の所見は高齢者群10例中7例で認められたが, 若年成人群では認められなかった. ここでは示さないが, さらに高度の動脈硬化性変化を有する症例の内膜平滑筋では, ミオシン重鎖同様 α アクチンの発現も著明に低下した.

また, 冠動脈硬化の進展に伴い, 内膜だけでなく中膜にも平滑筋の形質変換が生ずる. 図-6で示したように偏心性動脈硬化病変に隣接した中膜において, α アクチンの発現は保たれているが, ミオシン重鎖の発現は明らかに低下していた. このような変化は高齢者群のほぼ全例に認められた.

考 察

狭心症や心筋梗塞などの虚血性心疾患の主たる

図-6 冠動脈硬化病変における平滑筋ミオシン重鎖の発現

65歳男性左冠動脈前下行枝の連続切片に対し抗平滑筋 α アクチン、抗平滑筋特異的ミオシン重鎖 (SM1, SM2), 抗非筋ミオシン (SMemb), 抗マクロファージの各抗体を用い、免疫組織染色を行った. i; 内膜, m; 中膜, HE; ヘマトキシリン・エオジン染色, Mφ; マクロファージ, Scale Bar = 200 μ m. (A) 線維化および硝子化を伴った内膜にはマクロファージの集簇 (矢印) も認められた. (B) 偏心性動脈硬化病変を囲んで存在する細胞は α アクチン陽性の平滑筋であった. この領域では分化した平滑筋に発現するミオシン重鎖のSM2は殆ど陰性であり, 平滑筋特異的ミオシン重鎖のSM1の発現も低下していた. 抗SM2抗体のみならず抗SM1抗体にすら陰性の細胞群は動脈硬化病変における高度に形質変換した平滑筋細胞の存在を示唆するものである. SMembの発現は動脈硬化性変化の著明でない肥厚内膜を中心に認められた. 動脈硬化病変に隣接する中膜でも平滑筋特異的ミオシン重鎖の発現の低下が認められた

原因となる動脈硬化病変の形成には平滑筋細胞の増殖が重要な役割を果たしていると言われている¹¹⁾¹²⁾. また平滑筋細胞は増殖に伴いその形質を変換することが知られている¹³⁾. われわれは動物の実験的動脈硬化病変の形成には平滑筋ミオシン重鎖の発現からみた平滑筋細胞の脱分化を伴った増殖が関与していると報告した⁵⁾. しかし, ヒトの動脈硬化は長い年月の間に多くの因子の影響を受けて形成され, 動物モデルと異なった機序が想定される. またウサギなどの小動物の動脈は主に中膜のみから構成されており, 内膜肥厚が生理的に存在するヒトの動脈 (特に冠動脈に特徴的であるが) とは構造が異なっており, 動物モデルがヒトの動脈硬化の形成機序を必ずしも説明しえないと考えられる. そこで本研究では, ヒト平滑筋ミオシン重鎖の発現を通して, ヒトの血管発生や動脈硬化の進展過程での平滑筋形質変換の様式や動脈硬化病変形成における役割を検討することを試みた. そのために, われわれは3種類のヒト平滑

筋ミオシン重鎖アイソフォーム cDNA のクローニングを行い, 単離したクローンをを用い血管発生に伴う発現パターンを mRNA レベルで検討した. さらに各アイソフォームに特異的なモノクローナル抗体を作成し, 胎児から高齢者まで様々な年齢の大動脈, および冠動脈を対象に免疫組織染色を施した.

1. ヒト血管平滑筋には少なくとも3種類のミオシン重鎖アイソフォームがある

本研究では最初に, ヒト平滑筋より3種類のミオシン重鎖の cDNA (SMHC94・SMHC93・HSME6) の単離を行った. DNA 塩基配列の解析から, それらはウサギ SM1・SM2・SMemb と極めて高い相同性を有し, それぞれヒト SM1・SM2・SMemb をコードする cDNA であると考えられた. この時点で, ヒト血管平滑筋にも少なくとも3種類のミオシン重鎖アイソフォームがあることが明らかとなった. また, ヒト SM1 と SM2 は同一の遺伝子から alternative splicing によって発現

し, SMemb は異なる遺伝子から発現すること, すなわちヒト平滑筋ミオシン重鎖の発現は遺伝子の転写レベルとスプライシングのレベルで二重に調節を受けていることも明らかとなった. これまでの検討¹¹⁾と本研究を合わせ SM 1 と SM 2 は平滑筋のみに特異的に発現することから, 平滑筋を同定するマーカーとして有用であると考えられた. 特に SM 2 は良好な分化状態にある平滑筋のみに発現することから, 平滑筋分化の極めて鋭敏なマーカーとして有用である. 一方, SMemb は胎児期の平滑筋や実験的動脈硬化病変を構成する平滑筋, 培養平滑筋細胞などの未分化な平滑筋や, 培養線維芽細胞などの活性化状態にある間葉系細胞に強く発現する. 従って, 今回単離・同定された 3 種類のヒト平滑筋ミオシン重鎖は, それらの発現を同時に検討することにより平滑筋の分化状態や活性度を詳細に評価でき, ヒト動脈硬化の形成や進展の機序を明らかにすることができると考えられた.

2. ヒト平滑筋ミオシン重鎖の発現は血管発生に伴って変換する

ヒト大動脈を用いた mRNA レベルでの検討で, SM 1 は胎児期の平滑筋から強い発現が認められたが, SM 2 の発現は胎児・新生児期には, SM 1 に比べ弱かったが生後増加し, 成人では SM 1 と同等の発現を認めた. 組織レベルでは胎児期には, 大動脈・冠動脈ともに SM 2 の発現は殆ど認められなかったが, 生後は中膜平滑筋に明らかな発現が認められた. 胎児期における SM 2 の発現の mRNA レベルと組織レベルでの不一致の原因については, 検体の週齢の違い (RNA は 31 週, 組織は 17~27 週) などが挙げられよう. SMemb mRNA は胎児・新生児期に強く発現したのち, 生後はあきらかに減少した. また, SMemb mRNA の発現は高齢者では再び増加する傾向が見られた. しかし, この mRNA レベルでの検討は各年齢層が少数ずつでしか行なわれていないため, 高齢者での SMemb の発現増加の意義や動脈硬化進展との関連については, より多数の検体を用いた検討が必要であろう. 組織レベルでの SMemb の発現

はウサギでの検討と異なり, 生後の大動脈の中膜でも消失しなかった. しかし, 冠動脈の中膜では, 加齢に伴いやや減少する傾向がみられた. また, 心筋内の冠動脈分枝や vasa vasorum では発現が認められなかった¹⁴⁾. このように, ヒト平滑筋ミオシン重鎖の発現は血管の発生や加齢, 血管の種類やサイズなどにより多様である.

3. ミオシン重鎖の発現からみた平滑筋の形質は動脈硬化の初期病変から粥状硬化への進展に伴い変換する

ウサギやラットなどの小動物と異なりヒトの動脈には生理的に内膜が存在する. 特に冠動脈においては, 生直後より明らかな内膜形成が認められ, 若年成人で既に中膜より厚い内膜が存在することも珍しくない. 本研究においても若年成人群の全例に内膜肥厚を認めた. 若年者の内膜は α アクチン, SM 1 陽性の平滑筋細胞で構成され, マクロファージの集簇は極くわずかであり, 所謂, 生理的内膜肥厚とよばれるべきものであった. これらの内膜には SM 1・SM 2・SMemb の 3 種類すべてのミオシンがほぼ同程度に認められた. しかし, 図-4 の 33 歳の症例のように, 肥厚が進展すると分化型ミオシンである SM 2 の発現が明らかに低下した. この部位にもマクロファージの集簇や脂質の沈着は極くわずかであった. これは, 生理的内膜においても肥厚が進展すると, 平滑筋の形質変換がおきていることを示唆する所見である. すなわち, 動脈硬化初期病変の形成には, 従来より重要とされてきた脂質やマクロファージの関与¹¹⁾に先立ち, 平滑筋の形質変換が重要な役割を果たしている可能性があると考えられる. しかし, 図-5 の大動脈にみられるように, マクロファージが多量に存在する部位では, SM 2 は殆ど認められず, 上述の知見はマクロファージが平滑筋の形質変換に促進的に作用することを否定するものではない. 図-6 の冠動脈のように動脈硬化が進展すると, 内膜平滑筋細胞には, 抗 α アクチン抗体には陽性でも, 分化型ミオシンである SM 2 のみならず, 胎児平滑筋にも発現する SM 1 にすら陰性の細胞も多数認められた. これは, 動脈硬化病変における

高度に形質変換した平滑筋の存在を示唆するものである。また、動脈硬化病変に隣接する中膜においても平滑筋形質変換は認められた。このように動脈硬化は加齢にともない、内膜だけでなく中膜も含む血管全体の平滑筋形質変換をきたす病態であるといえる。

ところで、動脈硬化病変には新生血管形成がしばしば認められるが、このような血管は SM 1 のみに陽性な特異な形質を有しており¹⁴⁾、その周囲に(あたかもこれらの血管に運ばれてきたかのよう)にマクロファージやリンパ球の集積が認められることが多い。この事実は、動脈硬化病変の進展を考えるうえで興味深い。

さて、本研究においては動脈硬化の形成や進展過程での SMemb の発現様式は明らかにならなかった。ウサギでの検討と異なりヒトの血管においては SM 2 の発現の低下に SMemb の増加が必ずしも伴わなかったからである。その理由として、ヒトの動脈硬化は動物の実験モデルと異なり、長年月を経て徐々に形成され、内膜平滑筋増殖は以外に活発でないことが挙げられよう¹⁵⁾。そこで、経皮的冠動脈形成術 (PTCA) に続発する再狭窄病変や心移植後の冠動脈硬化など比較的急激に起こる平滑筋増殖病変 (accelerated arteriosclerosis) での SMemb の発現に興味を持たれる。Simons らは PTCA 再狭窄病変には通常の動脈硬化病変に比べ SMemb (最近彼らは非筋ミオシンの B 型と称しているが) の発現が多いと報告している¹⁶⁾。しかし、ヒトの血管病変を平滑筋特異的ミオシン (SM 1・SM 2) と SMemb の発現とを合わせて検討すると、平滑筋の形質は極めて多様であり、SMemb の発現だけでは評価は困難であることがわかる。また、SMemb は若年者の中膜などの健全な中膜に認められたり、動脈硬化性の変化の少ない内膜にむしろ強く発現するなど、SMemb の発現が必ずしも再狭窄に特異的な現象ではないことから、このような検討の解釈には注意を要する。

平滑筋の形質変換は動脈硬化の進展において重要な現象である。ヒト平滑筋ミオシン重鎖は平滑筋形質変換を評価する優れたマーカーであり、動

脈硬化の病態を理解する上で有用であると考えられる。今後は平滑筋ミオシンを用いて、動脈硬化初期病変の形成や粥状硬化への進展過程における平滑筋形質のより詳細な検討や、増殖因子やサイトカイン産生などの生理活性との関連などの検討が重要である。一方、このような平滑筋ミオシンの遺伝子発現調節機構の解明は動脈硬化の病態のみならず、平滑筋分化の分子機構の理解にも寄与すると思われる¹⁷⁾。

結 論

- 1) 3 種類のヒト平滑筋ミオシン重鎖アイソフォームの発現は血管発生に伴って変換することから、平滑筋分化の優れた分子マーカーであると考えられる。
- 2) ヒト平滑筋ミオシン重鎖の発現からみた平滑筋の形質は、動脈硬化初期病変の形成から粥状硬化への進展に伴い変換する。

本研究をご指導頂きました東京大学医学部第三内科永井良三先生、および絶えず有益なご助言を賜りました本学循環器内科山口 洋先生に深謝致します。また、病理標本の採取にご協力頂いた須田耕一先生・白井俊一先生・広瀬幸子先生・和田 了先生をはじめとする本学病理学教室の諸先生方に、心より感謝申し上げます。

文 献

- 1) Nagai R, Larson DT, Periasamy M: Characterization of a mammalian smooth muscle myosin heavy chain cDNA clone and its expression in various smooth muscle types. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 85: 1047~1051, 1988
- 2) Nagai R, Kuro-o M, Babij P *et al.*: Identification of two types of smooth muscle myosin heavy chain isoforms by cDNA cloning and immunoblot analysis. *J. Biol. Chem.*, 264: 9734~9737, 1989
- 3) Babij P, Periasamy M: Myosin heavy chain isoform diversity in smooth muscle is produced

- by differential RNA processing. *J. Mol. Biol.* 210 : 673~679, 1989
- 4) Kuro-o M, Nagai R, Tsuchimochi H *et al.*: Developmentally regulated expression of vascular smooth muscle myosin heavy chain isoforms. *J. Biol. Chem.* 264 : 18272~18275, 1989
 - 5) Kuro-o M, Nagai R, Nakahara K *et al.*: cDNA cloning of a myosin heavy chain isoform in embryonic smooth muscle and its expression during vascular development and in arteriosclerosis. *J. Biol. Chem.* 266 : 3768~3773, 1991
 - 6) Chomezynski P, Saccini N: Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162 : 156~159, 1987
 - 7) Tso JY, Sun XH, Kao TH *et al.*: Isolation and characterization of rat and human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase cDNAs: genomic complexity and molecular evolution of the gene: *Nucleic Acids Research* 13 : 2485~2502, 1985
 - 8) Kim HS, Aikawa M, Kimura K *et al.*: Ductus Arteriosus: Advanced Differentiation of Smooth Muscle Cells Demonstrated by Myosin Heavy Chain Isoform Expression in Rabbits. *Circulation*, 88 [part 1]: 1804~1810, 1993
 - 9) Skalli O, Ropraz P, Trzeciak KV *et al.*: A monoclonal antibody against alpha-smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation. *J Cell Biol*, 103 : 2787~2796, 1986
 - 10) Gown AM, Tsukada T, Ross R: Human atherosclerosis. II. Immunocytochemical analysis of the cellular composition of human atherosclerotic lesions. *Am J Pathol*, 125 : 191~207, 1986
 - 11) Ross R: The pathogenesis of atherosclerosis: An update. *N. Engl. J. Med*, 314 : 488~500, 1986
 - 12) Schwartz SM, Campbell GR, Campbell JH: Replication of smooth muscle cells in vascular disease. *Circ. Res.* 58 : 427~444, 1986
 - 13) Campbell GR, Campbell JH: Smooth muscle phenotypic change in arterial wall homeostasis: Implications for the pathogenesis of atherosclerosis. *Exp Mol Pathol*, 42 : 139~162, 1985
 - 14) Aikawa M, Nalla Sivam P, Kuro-o M, *et al.*: Human smooth muscle myosin heavy chain isoforms as molecular markers for vascular development and atherosclerosis. *Circ Res.* 73 : 1000~1012, 19
 - 15) Gordon D, Reidy MA, Benditt EP *et al.*: Cell proliferation in human coronary arteries. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.*, 87 : 4600~4604, 1990
 - 16) Simons M, Leclerc G, Safian RD *et al.*: Relation between activated smooth-muscle cells in coronary-artery lesions and restenosis after atherectomy. *New Engl J Med*, 328 : 608~613, 1993
 - 17) Babij P, Kelly C, Periasamy M: Characterization of a mammalian smooth muscle myosin heavy chain gene: Complete nucleotide and protein coding sequence and analysis of the 5' end of the gene. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.*, 88: 10676~10680, 1991

Original Paper

Summary**Diversity of human smooth muscle myosin heavy chains**

—Significance as markers for vascular development and atherosclerosis—

Rabbit smooth muscle contains at least three types of myosin heavy chain (MHC) isoforms; SM1, SM2 and SMemb. SM1 and SM2 are specific to smooth muscle, but SMemb is a nonmuscle-type MHC abundantly expressed in the embryonic aorta. These three MHC isoforms are differentially expressed in the rabbit during normal vascular development and in experimental arterio- and atherosclerosis. This study investigated whether expression of human smooth muscle MHC isoforms is regulated in developing arteries and in atherosclerotic lesions. To accomplish this cDNA clones encoding human SM1, SM2 and SMemb were isolated. The expression of SM2 mRNA in the fetal aorta was significantly lower compared to SM1 mRNA, but ratio of SM2- to SM1-mRNA in the aorta decreased after birth, but appeared to increase in the aged. In immunohistological studies using three antibodies against human MHC isoforms, SM1 was constitutively positive from the fetal stage to adulthood in the apparently normal media of the aorta and coronary arteries, whereas SM2 was negative in fetal arteries at an early gestational stage. In the human aorta or coronary arteries, unlike the rabbit, SMemb was detected even in the adult. Diffuse intimal thickening in the major coronary arteries was composed of smooth muscle cells, reacting equally to three antibodies for MHC isoforms, but reactivities with anti-SM2 antibody were reduced with aging. With progression of atherosclerosis, intimal smooth muscle diminished the expression of not only SM2 but also SM1, whereas α -smooth muscle actin was preserved. These results suggest that smooth muscle MHC isoforms are important molecular markers for studying human vascular smooth muscle cell differentiation as well as the cellular mechanisms of atherosclerosis.

Key words : myosin heavy chains, smooth muscle, atherosclerosis, vascular development

MASANORI AIKAWA, M. D.

*Division of Cardiology, Department of Internal Medicine,
Juntendo University School of Medicine, Tokyo, Japan*