

研究成果報告書

2018年 2月 26日

多様な血管病変における血管外膜微小血管増殖の調節機構の解明

代表研究者 東京大学保健・健康推進本部 助教 田中 君枝

【まとめ】

動脈硬化を主な原因とする心・脳血管疾患は日本人の死因の上位を占める。動脈硬化病変を持つ血管には発達した外膜微小血管(Vasa vasorum: VV)が認められ、機械的血管傷害後の病変においても病変拡大とともに VV が増殖するが、その調節機構は完全には解明されていない。本研究では、マウス血管および異なる機械的血管傷害モデルを用いて、血管病変の成因の違いが VV 増殖反応に与える影響を検討した。

1. 研究の背景・目的

1-1

加齢は脂質異常症や高血圧症、糖尿病とともに動脈硬化の危険因子である。冠動脈に生じた動脈硬化を原因とする冠動脈疾患の発症は年齢とともに増加する。動脈硬化病変形成のメカニズムを解明し有効な予防法・治療法や評価法を開発することは、高齢化社会において今後も重要課題である。

動脈硬化病変は、Ross の仮説に従い、高血圧や高血糖状態で生じる血管内皮細胞障害による炎症から始まり、炎症が外側に波及して拡大するとされる。一方、動脈硬化病変を持つ血管の外膜では、外膜 VV の増殖を認める。外膜微小血管は正常な状態では内腔から遠い外膜側の栄養血管であるが、動脈硬化病変の拡大に伴い増殖し、病変内に外膜側から侵入して病変を脆弱化させ、病変内に炎症細胞や脂質を送り込む導管となり、病変の破綻を招くと言われている。

1-2

1-2

動物実験では、血管にワイヤーを挿入して内皮剥離と過拡張を生じさせるワイヤー傷害モデル（ヒトの冠動脈インターベンション後再狭窄病変の動物モデル）などの機械的血管傷害後に形成される血管病変で外膜 VV 増殖が生じることが報告されている。ヒトでも、光干渉断層法を用いた観察により、冠動脈へのステント植え込み術後に、ステント端部分に外膜 VV 増殖が生じることが報告されている (Nishimiya K, et al. *Circ J.* 2015;79(6):1323-31)。脂質異常下で自然発症する動脈硬化病変や、機械的血管傷害後に形成される病変、腹部大動脈瘤など、様々な血管病変で外膜 VV の増殖を認めるが、それぞれの病変での VV 増殖の程度に相違があるかは明らかでない。

1-3

代表研究者は過去に、一匹のマウスの3か所の血管（右頸動脈、右大腿動脈、左大腿動脈）に、それぞれ異なる機械的血管傷害モデル（結紮モデル、カフモデル、ワイヤー傷害モデル）を作成し、傷害の強度の違いにより、病変への骨髄由来血管前駆細胞の関与に相違が生じることを報告した（Tanaka K, et al. *Circ Res.* 2003;93:783-790）。血管傷害モデルにより、病変でのサイトカインやケモカインの発現が異なることが原因と考えられた。この研究では、上記モデルを用いて、血管病変の成因の相違が病変形成と外膜 VV 増殖反応に与える影響を検討する。

2. 研究方法と経過

2-1 マウスと機械的血管傷害モデル

マウスは、8週令の雄の野生型マウス（C57BL/6 マウス）を使用した。マウスを麻酔し、右頸動脈を分岐部で完全結紮し、血流障害による血管傷害モデルを作成した（結紮モデル）。右大腿動脈は周囲組織から剥離し、チューブ（PE-50、ポリエチレン製、内径 0.58mm、外径 0.97mm、長径 2mm）に縦に切り込みを入れて開き、血管に被せて上からシルク糸で結紮して固定した（カフモデル）。左大腿動脈は、分枝に穴をあけてワイヤー（径 0.38mm）を挿入し、1分間放置して内皮剥離および過拡張を生じさせる血管傷害モデルを作成した（ワイヤー傷害モデル）。結紮モデル、カフモデルは血管内皮細胞が保たれるが、ワイヤー傷害モデルでは血管内皮細胞は術後一時消失し、その後再生することが知られている（Tanaka K. *Circ Res.* 2003;93:783-790）。

2-2 血管サンプルの採取

上記の血管傷害モデル作成4週後に血管を採取した。血管採取前に、マウスの左心室からカニューレを挿入し、ビオチン付キトマトレクチン（血管内皮細胞のマーカー）を灌流して内皮細胞染色を行い、その後で、右頸動脈、右大腿動脈、左大腿動脈を周囲組織と一塊にして採取した。左頸動脈は、正常血管（コントロール）として採取した。採取した血管はメタノール中で固定し、パラフィン包埋後に薄切して組織サンプルを作成した。

2-3 血管外膜 VV の可視化

薄切した血管サンプルは、アビジン・ビオチン反応および Vector-Red 発色法（Vector 社）を用いて可視化し、明視野顕微鏡下で観察した。

2-4 血管病変と外膜の観察

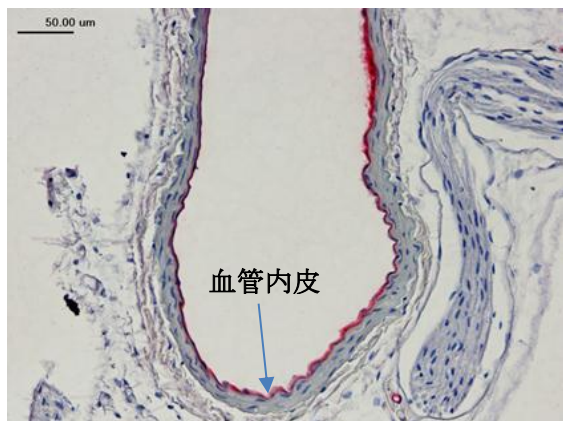
3種類の血管傷害モデル血管について、連続した切片を観察し、新生内膜（neointima, NI）、中膜（media, M）の面積を計測し、NI/M比を算出した。それぞれの血管の病変が最も大きな断面で、外膜 VV 数を計数した。外膜の範囲は、結紮モデルとワイヤー傷害モデルでは、外弾性板に接し、組織的に結合織であると同定できる範囲とした。カフモデルでは、外弾性板とカフの間の組織とした。3群間の NI/M 比、外膜 VV 数を Bonferroni の多重比較法で検定した。

3. 研究の結果

3-1 3種類の機械的血管傷害により形成される病変

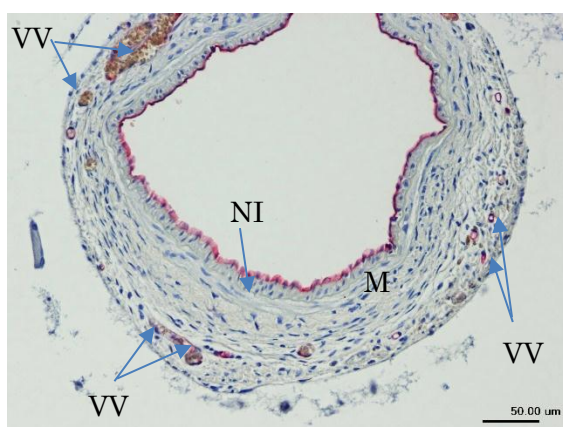
13 匹の雄の C57BL/6 マウスに手術を行い、4 週間後に両頸動脈、大腿動脈を採取して観察した。それぞれのモデルの代表例を示す。(赤=血管内皮細胞)

①正常血管 (左頸動脈、n=13)



病変、外膜 VV とともに認められなかった。

②カフモデル (右大腿動脈、n=6)

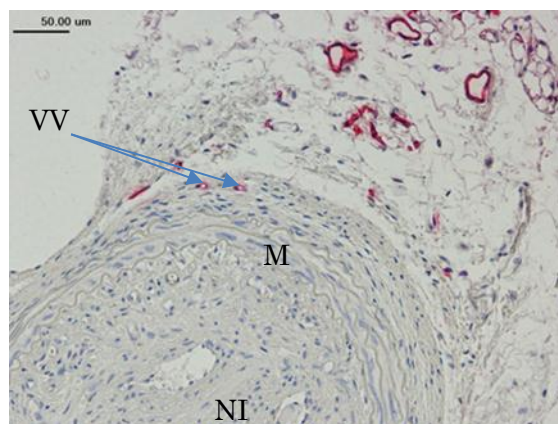


カフモデルでは、外膜全体が赤く発色してしまうもの、VV の発色が不良なものがあり、VV を評価出来たサンプルは 6 つであった。形成される病変は小さいが、外膜には VV 増殖を著明に認めるものがあった。

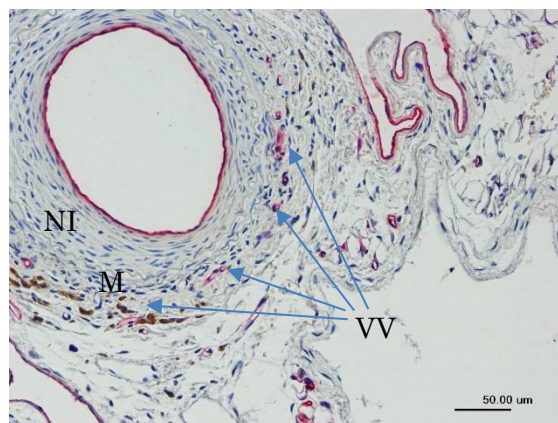
③結紮モデル (右頸動脈、n=12)

結紮モデルでは、発色不良のサンプルが 1 つあり、評価できたのは 12 つであった。病変は形成されたが、外膜 VV は少数しか

認められなかった。



④ワイヤー傷害モデル (左大腿動脈、n=12)



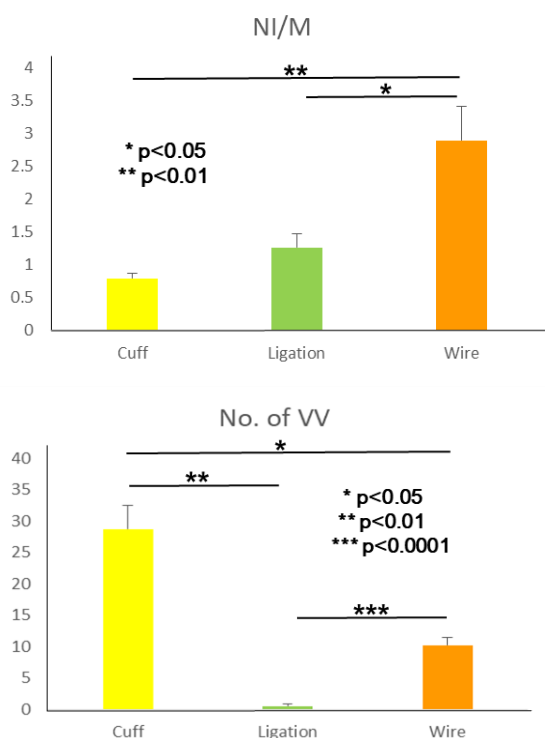
ワイヤー傷害モデルは中膜中に病変が形成されたと思われる変則的なサンプルが 1 つあり、外膜 VV を評価できたのは 12 つであった。新生内膜形成および外膜 VV の増殖を認めた。

3-2 新生内膜と外膜 VV

カフモデル(Cuff)、結紮モデル(Ligation)、ワイヤー傷害モデル(Wire)の血管の NI/M 比を算出し 3 群間で比較した。NI/M 比は、カフモデルと結紮モデルでは有意差を認めなかったが、ワイヤー傷害モデルでは、他の 2 モデルより有意に高値であった。

一方、外膜 VV 数はカフモデルで最も多

く、結紮モデルで最も少なかった。それぞれの群間に有意差を認めた。



3-3 まとめと考察

以上の観察より、マウス正常血管では新生内膜病変および外膜 VV は認められなかったが、3 種類の機械的血管傷害により新生内膜が形成され、NI/M 比はワイヤー傷害モデルで最も大きかった。外膜 VV 数は、カフモデルで最も多く認められ、結紮モデルではほとんど認められなかった。ワイヤー傷害モデルでも VV 増殖を認めたが、カフモデルの方が著明に認められた。

このように、病変の成因により、外膜 VV の増殖程度には相違が認められることが分かった。カフモデルは、血管内皮細胞は保たれたまま新生内膜が形成されるモデルで、病変が形成されるメカニズムは不明であるが外膜に炎症細胞集積を認める (Moroi M, JCI.1998;101(6):1225-1232.)。外膜の炎症

が VV 増殖と関連すると考えられる。結紮モデルは、血流障害によりせん断応力 (shear stress) が変化することで血管のリモデリングと内腔の狭小化を生じる (Kumar A. Circulation. 1997;96:4333-4342.)。動脈硬化モデルマウスでは、頸動脈の動脈硬化病変の外膜 VV は大動脈や肺動脈より少ないと報告されているが (Langheinrich AC. Atherosclerosis. 2007;191(1):73-81.)、血管部位による影響だけでなく、結紮モデルが外膜に与える影響が少ない可能性がある。ワイヤー傷害モデルでは、血管外膜の外側に接する血管周囲脂肪組織に炎症を起こすことが報告されており (Takaoka M. ATVB. 2010;30(8):1576-82.)、外膜にも炎症を生じ、VV 増殖が惹起されると考えられた。

4. 今後の課題

今後、サンプルを追加作成して検討を行う。技術的な問題により評価不能であったサンプルについては実験手法の再検討を行う。3 種類の機械的血管傷害により、病変形成および外膜 VV 増殖に相違を生じさせる調節因子を検討するため、外膜や NI、M に集積する炎症細胞を免疫染色により同定する。微小血管増殖や炎症細胞に関与するサイトカインの発現についても検討する。

野生型マウスよりも顕著な病変が形成される、動脈硬化モデルマウス (ApoE 欠損マウス) を用いても同様の検討を行う。

5. 研究結果の公表方法

今後データを追加し、国内外の循環器関連学会で報告し、英文論文にまとめて学術雑誌に投稿する。

以上