

原 著

## 頸動脈アテローム硬化プラークにおける組織因子の発現

<sup>1</sup>東京女子医科大学医学部神経内科学<sup>2</sup>東京女子医科大学医学部第一病理学<sup>3</sup>東京女子医科大学医学部脳神経外科学<sup>4</sup>東京女子医科大学附属八千代医療センター脳神経外科

トオイ	ソノ	シバタ	ノリユキ	ウチヤマシンイチロウ	オカダ	ヨシカズ
遠井	素乃 <sup>1</sup>	・柴田	亮行 <sup>2</sup>	・内山真一郎 <sup>1</sup>	・岡田	芳和 <sup>3</sup>
カワマタ	タカカズ	カワシマ	アキツグ	カトウヨウイチロウ	サワダ	タツオ
川俣	貴一 <sup>4</sup>	・川島	明次 <sup>3</sup>	・加藤陽一郎 <sup>2</sup>	・澤田	達男 <sup>2</sup>
コバヤシ	マキオ	ウバノ	メグミ	イワタ	マコト	
小林	・横雄 <sup>2</sup>	・宇羽野	恵 <sup>1</sup>	・岩田	誠 <sup>1</sup>	

(受理 平成19年11月29日)

## Expression of Tissue Factor in Atherosclerotic Plaques of Carotid Arteries

Sono TOI<sup>1</sup>, Noriyuki SHIBATA<sup>2</sup>, Shinichiro UCHIYAMA<sup>1</sup>, Yoshikazu OKADA<sup>3</sup>,  
Takakazu KAWAMATA<sup>4</sup>, Akitsugu KAWASHIMA<sup>3</sup>, Yoichiro KATO<sup>2</sup>, Tatsuo SAWADA<sup>2</sup>,  
Makio KOBAYASHI<sup>2</sup>, Megumi UBANO<sup>1</sup> and Makoto IWATA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Neurology, Tokyo Women's Medical University, School of Medicine<sup>2</sup>Department of Pathology, Tokyo Women's Medical University, School of Medicine<sup>3</sup>Department of Neurosurgery, Tokyo Women's Medical University, School of Medicine<sup>4</sup>Department of Neurosurgery, Tokyo Women's Medical University Yachiyo Medical Center

Emerging evidence suggests that plaque destabilization based on persistent inflammation in carotid atherosclerosis (CAS) plays a critical role in cerebral infarction. Tissue factor (TF) acts as a membrane-bound receptor for activated factor VII triggering proinflammatory cell signaling. The aim of the present study was to determine the involvement of TF in destabilization of CAS plaques. This study was carried out on carotid endarterectomy specimens obtained from twenty CAS patients. The specimens were processed for making 30% sucrose-immersed, optimal cutting temperature (OCT) compound-embedded frozen sections and freshly frozen materials; the former was used for immunohistochemistry, and the latter for immunoblotting. The primary antibodies were mouse monoclonal IgG<sub>1</sub> against TF, CD68,  $\alpha$ -smooth muscle actin (SMA), and  $\beta$ -actin. Immunoreaction on sections was visualized by the avidin-biotin-immunoperoxidase complex method, and that on blots was detected by the chemiilluminescence method. TF immunoreactivity was localized to endothelial cells, CD68-immunoreactive macrophages, and SMA-immunoreactive smooth muscle cells, and it was prominent in macrophage-rich plaques (MRPs) compared with macrophage-poor plaques (MPPs). The immunoreactive density for TF normalized with  $\beta$ -actin was significantly increased in the MRP group compared with the MPP group. Our results suggest that TF participates in destabilization of CAS plaques, by its expression in the lesional cells.

**Key words:** atherosclerosis, inflammation, carotid artery, tissue factor, plaque instability

## 緒 言

脳梗塞の原因となる代表的な動脈病変は、頸動脈アテローム硬化症(carotid atherosclerosis; CAS),

脳表動脈アテローム硬化症, 穿通枝動脈硬化症などである<sup>1)</sup>. 食生活の欧米化に伴って日本でも, CASが増加している. CASが脳梗塞を生じる機序とし

て、慢性的な内腔狭窄、プラークの不安定化にもとづく血栓塞栓症および血栓あるいはプラーク内出血による急性の内腔閉塞が知られる<sup>2)</sup>。近年の基礎的研究によると、プラークの不安定化は病巣局所における炎症活動の遷延化によってもたらされることが明らかにされつつある<sup>3)</sup>。プラークの炎症反応は、アンギオテンシン II、酸化低比重リポ蛋白(OxLDL)、活性化第 VII 因子(FVIIa)などの生理活性物質が血管壁に作用することにより誘導ないし維持されと考えられている。

組織因子(TF)は従来、外因系の凝固因子として位置づけられてきた<sup>4)</sup>。一方、多くの実験的研究は、血管壁を構成する細胞表面に局在する膜結合型 TF が細胞外の FVIIa と結合することにより、炎症促進性の細胞シグナルを活性化する機構の重要性を指摘している<sup>5)</sup>。しかしながら、この現象が人体の病巣で実際に起こっているかどうかについて、十分に検証されているとはいえない。以上を踏まえて今回我々は、特異抗体を用い、ヒト CAS プラークにおける TF の局在同定と定量解析を行った。

## 材料と方法

### 1. 症例および組織調整

本研究は、本学倫理委員会で承認され、本人から同意の得られた CAS 患者 20 症例を対象とした。材料は、本学脳神経外科で頸動脈内膜剝離術(carotid endarterectomy; CEA)を受けた CAS 患者の頸動脈プラークである。各症例の CEA 材料を最大断面で 2 分割し、一方から 30% スクロース含有 pH 7.6 リン酸緩衝食塩水(PBS)溶液浸透(optimal cutting temperature; OCT)コンパウンド包埋凍結切片を、他方から新鮮凍結材料をそれぞれ作製した。前者は、検体を 30% スクロース PBS 溶液に浸漬して 1 週間後に検体が容器の底に沈み、スクロースが組織内に浸透したことを確認した上で、ドライアイスアセトン法を用いてプラスチックカセット内に OCT コンパウンド包埋して作製し、後者とともに解析時までの間、 $-80^{\circ}\text{C}$  下で凍結保存した。凍結切片は免疫組織化学染色に用い、新鮮凍結材料はイムノブロット解析に用いた。

### 2. 免疫組織化学的解析

一次抗体は、抗 TF 抗体(mouse IgG<sub>1</sub> mAb; Clone No. 4509, American Diagnostica; 1:200)、抗 CD68 抗体(mouse IgG<sub>1</sub> mAb; Clone No. KP-1; DakoCytomation; 1:10,000) および抗  $\alpha$ -平滑筋アクチン(SMA)抗体(mouse IgG<sub>1</sub> mAb; Clone No. 1A4;

DakoCytomation; 1:1,000) である。各症例の凍結切片を、100% アセトンにより  $4^{\circ}\text{C}$  下 10 分間後固定した後、親水処理、3% 過酸化水素水による内因性ペルオキシダーゼ活性阻害処理( $4^{\circ}\text{C}$  下 10 分間)、PBS (pH 7.6) による洗浄、非免疫動物血清による非特異的抗体結合反応阻害処理(室温 20 分間)、専用キットによる内因性アビジンビオチン活性阻害処理を経て、 $4^{\circ}\text{C}$  下一晩一次抗体と反応させた。免疫反応産物は、Vectastain ABC キット(Vector)を用いたアビジンビオチン免疫ペルオキシダーゼ複合体(ABC)法により検出した。発色色素にはジアミノベンジンを用い、対比染色にはヘマトキシリンを用いた。一次抗体反応を省略した切片を陰性反応対照とした。TF の免疫組織化学的局在は、隣接切片におけるヘマトキシリン・エオジン(H&E)染色像ならびに CD68 および SMA の免疫組織化学染色像との比較にもとづいて同定した。CAS プラークは、形態学的に macrophage-rich plaque (MRP) 群と macrophage-poor plaque (MPP) 群の二群に分類した。すなわち、MRP は、組織の脆弱性の指標となる血栓形成またはプラーク内出血を呈し、CD68 陽性マクロファージが広範囲に観察されるものと定義した。また、MPP は、脆弱性所見を欠き、CD68 陽性マクロファージがごく少数観察されるものと定義した。

### 3. イムノブロット解析

一次抗体は、抗 TF 抗体(mouse IgG<sub>1</sub> mAb; Clone No. 4509, American Diagnostica; 1:1,000) および抗  $\beta$ -アクチン抗体(mouse IgG<sub>1</sub> mAb; Clone No. AC-15; Sigma; 1:1,000) である。各症例の新鮮凍結材料を、10 倍量のホモジェネート緩衝液[RIPA 緩衝液にプロテアーゼ阻害薬カクテル Complete Mini (Roche) を添加したもの]と混合して氷上でホモジェネートし、 $4^{\circ}\text{C}$  下 15 分間 15,000g で遠心して得られた上清をサンプルとした。各サンプル中の蛋白濃度は、Bradford 法にもとづいて測定した。各サンプルは Laemli 緩衝液と等量混合して 5 分間沸騰させた後、各レーンあたりに蛋白量 30 $\mu\text{g}$  に調整し、10%SDS-PAGE で展開後、電気的に PVDF 膜(Millipore)に転写した。このブロット膜を室温で一晩、5% スキムミルク入り pH 7.5 Tris 緩衝食塩水(TBS)溶液で処理して非特異的抗体結合反応を阻止し、0.1% Tween-20 添加 TBS で洗浄後、室温で 1 時間一次抗体と反応させた。免疫反応産物は ECL/ECL-plus キット(GE Healthcare)を用いた化学発光法により検出した。一次抗体反応を省略した膜を陰

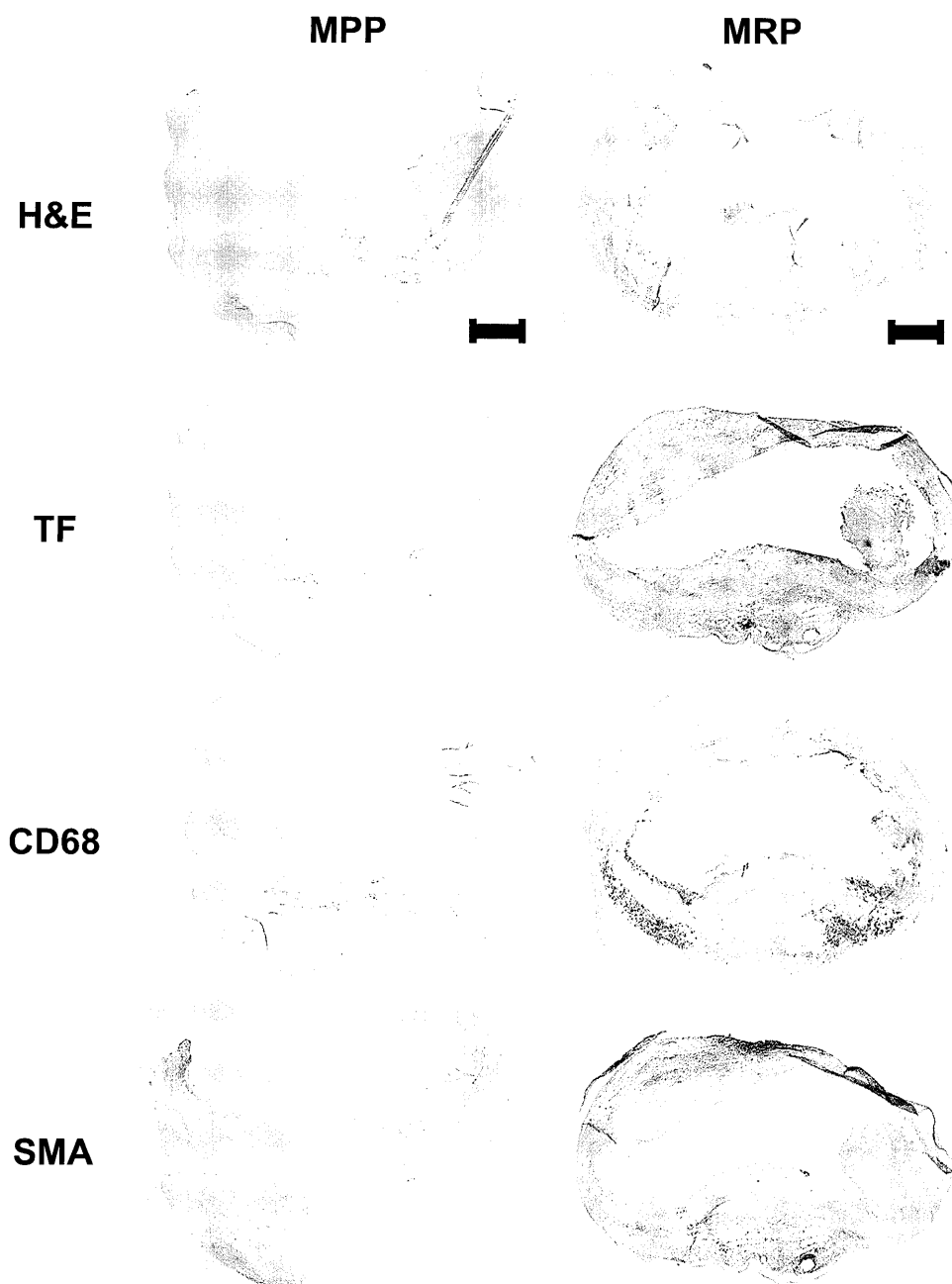


図1 頸動脈アテローム硬化プラークにおけるTF、CD68およびSMAにおける免疫組織化学的局在のルーペ像  
Bar = 1mm. MPP : macrophage-poor plaque, MRP : macrophage-rich plaque, SMA :  $\alpha$ -平滑筋アクチン, TF : 組織因子.

性反応対照とした。発光シグナルをX線フィルムに感光させ、Photoshop 画像ソフトを用いてデジタル信号化し、NIH 画像ソフトを用いて免疫活性密度を測定した。各症例のTF/ $\beta$ -アクチン免疫活性密度補正値を統計解析に用いた。

#### 4. 統計解析

MPP 群と MRP 群の各々におけるTF/ $\beta$ -アクチン免疫活性密度補正値の平均値と標準偏差を算出

し、対応のないt検定(unpaired Student's t-test)により統計学的に二群間比較した<sup>6)</sup>。

#### 結 果

##### 1. TF の局在同定

観察した20症例のうち、5例がMPP群に該当し、15例がMRP群に該当した。陰性反応対照切片は明らかな免疫活性を示さなかったことから、二次抗体反応以降の操作に問題がないことが確認された。低

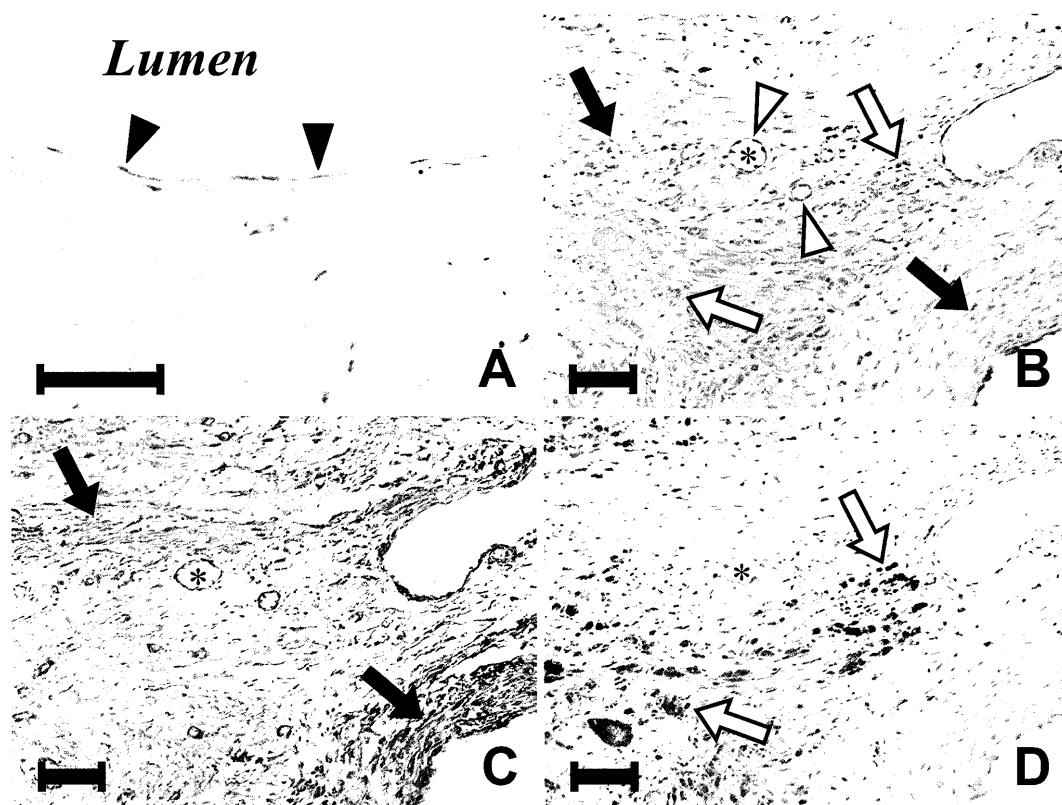


図2 マクロファージに富む頸動脈アテローム硬化プラークにおける TF (A, B), SMA (C) および CD68 (D) における免疫組織化学的局在の高倍像

黒矢尻：頸動脈内腔面血管内皮細胞，白矢尻：プラーク内新生血管内皮細胞，黒矢印：遊走血管平滑筋細胞，白矢印：浸潤マクロファージ，\*：新生血管，Bar = 10 $\mu$ m. SMA,  $\alpha$ -平滑筋アクチン，TF：組織因子.

倍でみると，TF 陽性領域は，MPP 群と比較して MRP 群でより広範囲であり，CD68 陽性領域と SMA 陽性領域が重なり合うように分布していた (図 1). 高倍でみると，TF 免疫活性は，MRP では多くの病巣構成細胞に検出されたのに対し，MPP ではごく少数の細胞に検出されるにすぎなかった. TF は，プラーク表面やプラーク内部新生血管を被覆する血管内皮細胞，CD68 陽性浸潤マクロファージならびに SMA 陽性遊走血管平滑筋細胞に局在していた (図 2). 浸潤マクロファージにおける TF 免疫活性は，大型で泡沫状のものと比較して，小型で非泡沫状のもので明瞭に検出された. なお，T リンパ球では，TF 免疫活性はごく僅かであるか，もしくはほとんど検出されなかった.

## 2. TF の定量測定

プロット上の陰性反応対照レーンは無意味な免疫活性を示さなかったことから，二次抗体反応以降の操作に問題がないことが確認された. TF および  $\beta$ -アクチンの免疫活性は，それぞれ 47kDa と 42kDa 付近の泳動度に検出された (図 3A). TF/ $\beta$ -アクチン免

疫活性密度補正值は，MPP 群と比較して MRP 群で有意に上昇していた (図 3B).

## 考 察

本研究では，免疫組織化学的解析により，TF がヒト CAS プラークの病巣構成細胞に局在すること，およびイムノプロット解析により，MPP 群と比較して MRP 群で TF の発現が亢進していることが明らかになった. これらの事実は，TF の発現とプラークの炎症活動との密接な関連を示唆している. 基礎的研究によれば，プラークにおける炎症活動の亢進と遷延化は，プラークの不安定化をもたらし，血栓形成やプラーク内出血の下地を作るという<sup>2)3)5)7)8)</sup>. また，近年の遺伝子改変動物を用いた研究によれば，動脈硬化は TF の過剰発現により促進され，TF のノックアウトにより抑制されることが明らかにされている<sup>9)10)</sup>. 従って，今回観察された MRP における TF の発現亢進は，プラークの不安定化における TF の関与を表している.

TF には，分泌型と膜結合型の 2 種類のアイソフォームが存在する<sup>4)</sup>. 分泌型は主に外因系の凝固因

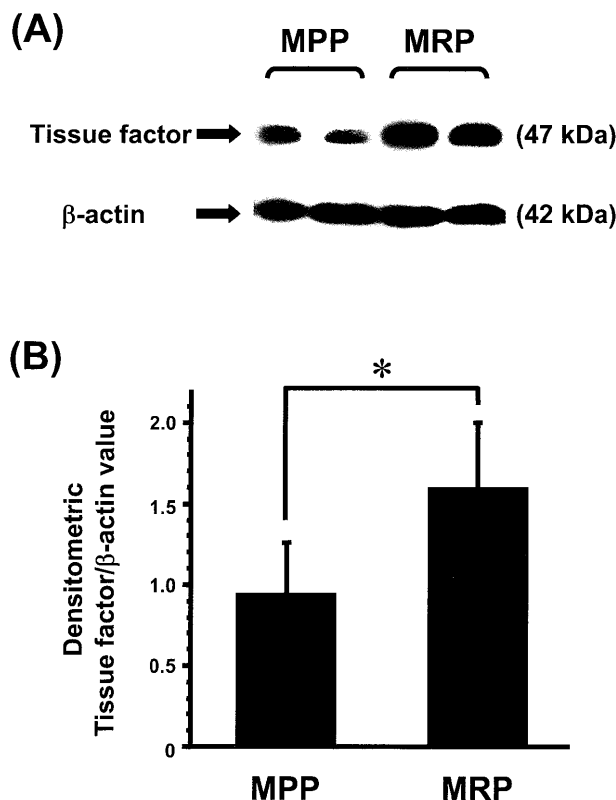


図3 TF および β-actin のイムノプロット (A) および unpaired t-test を用いた TF/β-actin 免疫活性密度補正值の二群間比較 (B)

\* $p < 0.05$ . MPP: macrophage-poor plaque group, MRP: macrophage-rich plaque group, TF: tissue factor.

子として作用するのに対し、膜結合型は FVIIa をリガンドとして炎症反応にあずかる。活動性の動脈硬化巣では、血管内皮細胞の透過性が亢進しているため、血液由来の OxLDL とともに VIIa が病巣の基質に染み込んでいる。FVIIa が病巣構成細胞の表面に存在する受容体すなわち膜結合型 TF と結合すると、その細胞質側に非受容体型チロシンキナーゼ cSrc が移動して活性化し、代表的なマップキナーゼ (MAPK) である extracellular signal-regulated kinase (ERK) と p38 および転写因子 nuclear factor-κB (NF-κB) を活性化する<sup>5)7)</sup>。ERK は、増殖因子応答 MAPK に位置づけられ、サイクリン D を誘導して病巣構成細胞の増殖をひきおこす。p38 は、ストレス応答 MAPK に属し、血管内皮増殖因子 vascular endothelial growth factor (VEGF) を誘導して血管新生を生じると同時に、炎症性サイトカインである腫瘍壊死因子-α (TNFα) を放出する<sup>8)</sup>。TNFα はオートクラインならびにパラクライン機序を介して病巣構成細胞を刺激し、NF-κB 介在性の炎症促進遺伝子産物を誘導する。ここでの炎症促進遺伝子産物とは、

TF、サイトカイン、ケモカイン、増殖因子、細胞接着因子、細胞外基質分解酵素、フリーラジカル産生酵素などである。このようにして細胞質で翻訳された TF は、細胞膜に移動後、FVIIa との接触により再び、前述の炎症シグナルを活性化する。従って、TF は病巣局所における炎症反応の遷延化に貢献すると理解される。我々の結果は、これらの基礎的事実がヒト CAS プラークで実際に起こっている状況証拠を示している。

まとめると我々は本研究において、TF がヒト CAS プラークの病巣構成細胞に局在し、炎症活動が活発なプラークでは TF の発現量が増加していることを示した。これらの結果は、TF が炎症活動の遷延化を介して、プラークの不安定化をもたらすことを示唆している。TF はこれまで、凝固因子としての側面が強調されてきた。しかしながら、病巣局所の炎症反応において TF が果たす役割の重要性を考慮すると、TF の上流ないし下流に位置するシグナル伝達物質の活性化を調節する試みは、過剰な TF の発現を抑制することによりプラーク不安定化を阻止す

る治療薬の開発に繋がると期待される。

## 謝 辞

稿を終えるに当たり、技術協力をいただいた本学第一病理学教室刈田瑞穂、竹入英幸、坂寄紀子、村松文章および岩崎秀一技師に深謝いたします。

## 文 献

- 1) **Adams HP, del Zoppo G, Alberts MJ et al:** Guidelines for the early management of adults with ischemic stroke: a guideline from the American Heart Association/American Stroke Association Stroke Council, Clinical Cardiology Council, Cardiovascular Radiology and Intervention Council, and the Atherosclerotic Peripheral Vascular Disease and Quality of Care Outcomes in Research Interdisciplinary Working Groups: the American Academy of Neurology affirms the value of this guideline as an educational tool for neurologists. *Stroke* **38**: 1655-1711, 2007
- 2) **Virmani R, Ladich ER, Burke AP et al:** Histopathology of carotid atherosclerotic disease. *Neurosurgery* **59** (Suppl): 219-229, 2006
- 3) **Stoll G, Bendszus M:** Inflammation and atherosclerosis: novel insights into plaque formation and destabilization. *Stroke* **37**: 1923-1932, 2006
- 4) **Price GC, Thompson SA, Kam PC:** Tissue factor and tissue factor pathway inhibitor. *Anaesthesia* **59**: 483-492, 2004
- 5) **Viles-Gonzalez JF, Anand SX, Valdiviezo C et al:** Update in atherothrombotic disease. *Mount Sinai J Med* **71**: 197-208, 2004
- 6) **Dawson B, Trapp RG:** Basic & Clinical Biostatistics, 4th ed, MacGraw-Hill, New York (2004)
- 7) **Versteeg HH, Hoedemaeker I, Diks SH et al:** Factor VIIa/tissue factor-induced signaling via activation of Src-like kinases, phosphatidylinositol 3-kinase, and Rac. *J Biol Chem* **275** (37): 28750-28756, 2000
- 8) **柴田亮行, 遠井素乃, 内山真一郎ほか:** 頸動脈アテローム硬化病変の分子病理. 「Mol Med 42: 臨時増刊号 生活習慣病の最前線」(岡 芳和, 内山真一郎, 倉林正彦編), pp427-433, 中山書店, 東京(2005)
- 9) **Hasenstab D, Lea H, Hart CE et al:** Tissue factor overexpression in rat arterial neointima models thrombosis and progression of advanced atherosclerosis. *Circulation* **101**: 2651-2657, 2000
- 10) **Tilley RE, Pedersen B, Pawlinski R et al:** Atherosclerosis in mice is not affected by a reduction in tissue factor expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**: 555-562, 2006