

(1) 血管内皮傷害後の内膜肥厚における 血小板および白血球の関与

Role of Platelets and Neutrophils in Intimal Thickening Following Endothelial Injury

梅村 和夫*

キー・ワード：血管内皮傷害、内膜肥厚、血小板、好中球

〔要旨〕 血管内皮傷害は動脈硬化の増悪因子として重要である。実験的に内皮を傷害すると内膜肥厚が形成されることがわかっている。そこで内膜肥厚について血小板や好中球がどのような役割をしているか検討した。抗血小板薬の投与や P-selectin を阻害することで内膜肥厚を抑制できた。このことから内皮が傷害されると血小板が活性化され粘着・凝集し、その血小板膜上の P-selectin を介して好中球が集積し細胞増殖因子、サイトカインやフリーラジカルが放出され血管平滑筋の増殖・遊走を刺激することが考えられた。

はじめに

動脈硬化は種々の疾患、冠動脈疾患(狭心症や心筋梗塞)、脳梗塞症や閉塞性動脈硬化症等をひき起こし、生命だけでなく日常生活、QOL に大きな影響を及ぼしている。その動脈硬化は、高脂血症が大きな要因の一つと考えられるが、乱流によるシェアストレスや感染、血栓等による内皮傷害がさらにその状態を修飾すると考えられている。そこで、われわれは、血管内皮を選択的に傷害できる方法を開発した¹⁻⁴⁾。その傷害法を使用し、血管内皮傷害後に起こる内膜肥厚について血小板や白血球がどのような役割をしているか検討した。

血管内皮傷害法

われわれは光増感反応を応用した。つまり、ローズベンガルという色素に緑色光を照射するとローズベンガルが励起状態となる。このエネルギーを酸素に渡し、酸素は一重項酸素となる(図1)。この一重項酸素は細胞の膜を脂質過酸化し細胞傷害をひき起こ

す。この原理を大腿動脈に適応した。静脈内へローズベンガルを投与し、内皮傷害を起こしたい部位に緑色光を照射すると局所的に血管内に一重項酸素が発生し、その一重項酸素が血管内皮を選択的に傷害する。この傷害は内弾性板や中膜平滑筋には影響をほとんど与えない。

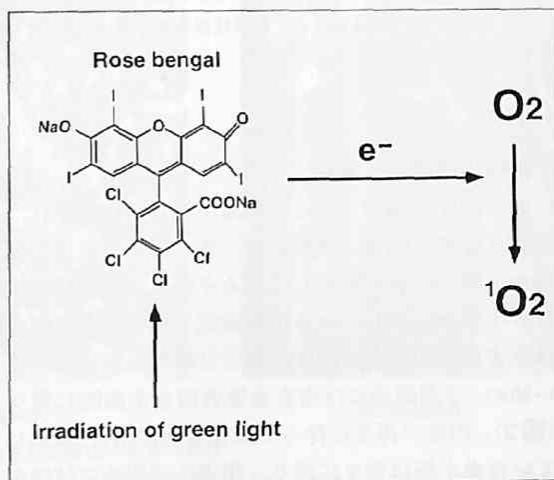


図1 光増感反応の原理

* 浜松医科大学薬理学教室
1997年12月18日受理

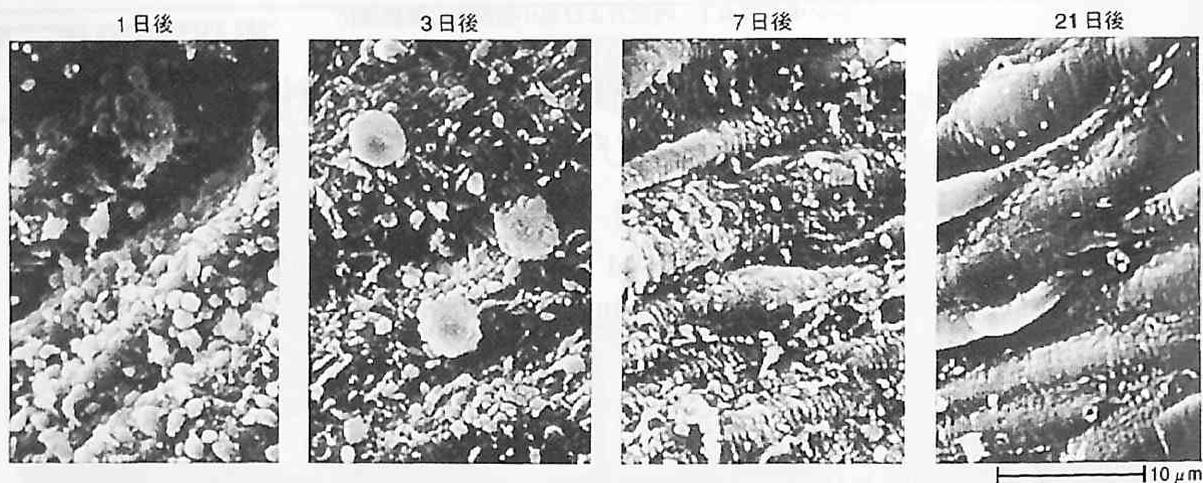


図2 走査型電子顕微鏡による傷害血管表面の観察

傷害後1日には多数の血小板が粘着・凝集している。傷害後3日には粘着・凝集している血小板上に白血球が粘着している。傷害後21日には内皮が再生し、傷害部位を覆い血小板の粘着・凝集がみられなくなる。

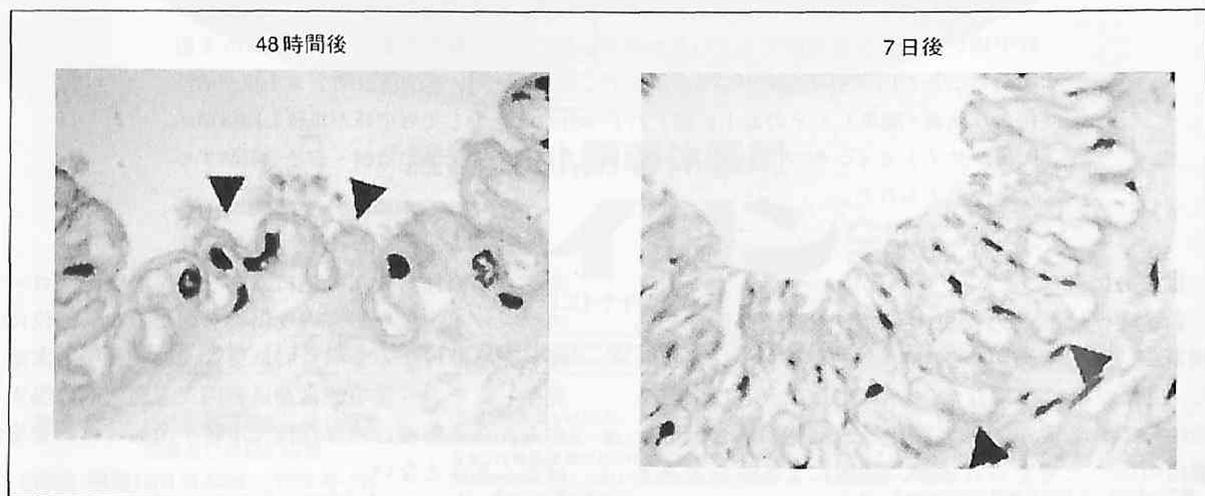


図3 *In vivo* における平滑筋細胞の増殖・遊走

BrdUを取り込んだ細胞が染まる。矢頭は内弾性板を示している。傷害後48時間ではBrdUは内弾性板直下の細胞に取り込まれている。つまり、内皮傷害により内弾性板直下の平滑筋細胞が増殖をしている。傷害後7日ではBrdUを取り込んだ細胞は内膜層へと遊走している。

血管内膜肥厚モデル

血管内皮を傷害することで血小板が活性化され、傷害血管壁に粘着・凝集する。さらに傷害後3日には血小板が粘着・凝集しているその上に白血球、特に好中球が粘着している像が確認できる。血管内皮は傷害後1週間から徐々に傷害された血管表面を覆い始め、3週間後には傷害血管表面を全面的に覆う(図2)。内皮の再生に伴って血管表面に粘着・凝集していた血小板は徐々に減り、傷害3週間後には内皮に覆われることにより血小板はみられなくなる。傷

害後2日にプロモデオキシウリジン(BrdU)を投与し血管平滑筋細胞の増殖の状態を観察すると、内弾性板直下の平滑筋細胞がBrdUを取り込んでいる(図3)。つまり、内皮が傷害されることにより何かが内弾性板直下の平滑筋細胞を刺激し、平滑筋細胞が増殖を始めたことを意味している。さらにBrdUを投与した動物を1週間後に殺し血管を取り出し観察してみると、BrdUを取り込んだ細胞は内膜層に存在することが確認される(図3)。これから、内皮が傷害されることで内弾性板直下の平滑筋細胞がなんらかの

刺激を受け増殖を開始する。その細胞はさらに内膜層へ遊走することを意味している。さらに、平滑筋細胞を特異的に染める α アクチンの抗体で染めると内膜層の細胞成分はほとんどが平滑筋細胞であることが確認できる。そこで、この平滑筋細胞の増殖・遊走に関与する因子としては、内皮傷害後にみられる血小板の粘着・凝集および白血球の集積から考えると、血小板および白血球が重要な因子であることが予想される。

血小板の関与

血小板はADP、コラーゲン、トロンボキサン A_2 やトロンビン等により活性化され、最終的には血小板膜の糖蛋白である IIb/IIIa 複合体(GP IIb/IIIa)が血漿フィブリノゲンと結合することで血小板は凝集するといわれている(図4)。そこで、今回は経口可能な GP IIb/IIIa 拮抗薬である SC54684A を使用し、血小板の内膜肥厚への関与を検討したり。実験プロトコルは SC54684A (30 mg/kg)あるいはアスピリン(100 mg/kg)を内皮傷害前2時間に経口投与した。生理食塩水を投与した群をコントロールとした。血管内皮を傷害後30分に組織型プラスミノゲンアクチベーター(t-PA)を30分かけ静脈内へ投与した。その後 SC54684A は1日2回、アスピリンは1日1回、3週間投与し、血管を取り出し組織学的に内膜肥厚を観察した。

傷害後24時間の血管内腔側を走査型電子顕微鏡

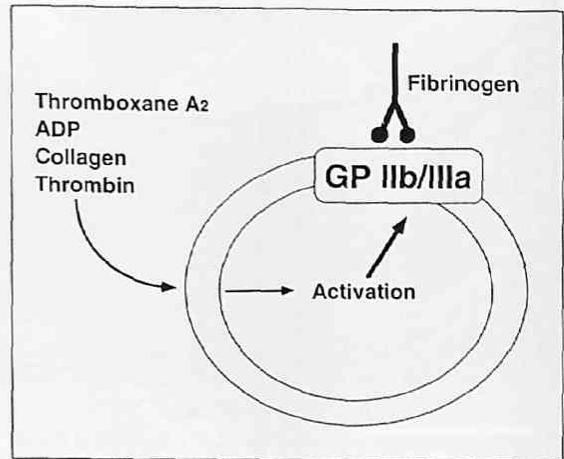
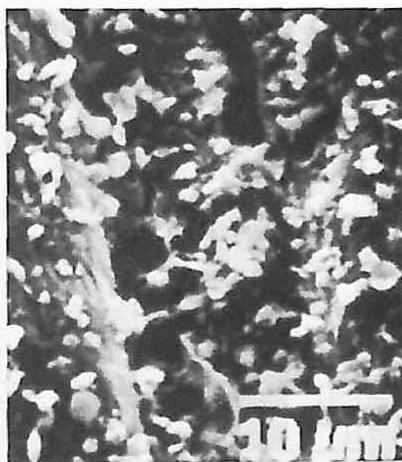


図4 血小板凝集

で観察すると、コントロール群では血管表面には多くの血小板が粘着・凝集していた。一方、SC54684A投与群では血小板の粘着・凝集はほとんどみられなかった。しかし、アスピリン投与群ではコントロール群と同様に血小板の粘着・凝集は多数みられた(図5)。

傷害後3週における内膜肥厚はコントロールでは図6のようにみられた。SC54684A は内膜面積および内膜/中膜面積比ともに有意に縮小した。しかし、アスピリンは縮小傾向はあるものの有意な変化ではなかった(図7)。

血小板からは細胞増殖因子である血小板由来増殖



Control



Aspirin



SC54684A

図5 走査型電子顕微鏡による血栓溶解後の血管内腔像

コントロール群では傷害血管内腔に多数の血小板が粘着・凝集している。GP IIb/IIIa 拮抗薬である SC54684A は血小板の凝集・粘着を抑制している。しかし、アスピリンは抑制しない。

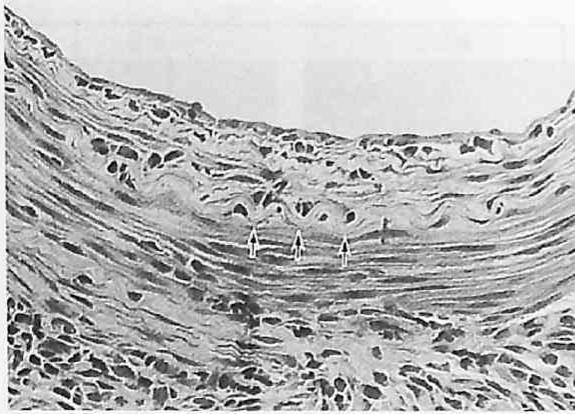


図6 血管内膜肥厚像

矢印は内弾性板を示している。それより上層は内膜層で下層は中膜層である。

因子(PDGF)が放出され、活性化した血小板膜表面ではプロトロンビンがトロンビンに変換される。トロンビンは細胞増殖因子として働き、さらに血管内皮細胞を刺激して各種増殖因子の遊離や細胞接着因子の発現を促す。このことから、活性化した血小板は内膜肥厚のトリガーとなりうる。

われわれの結果から、GP IIb/IIIa 拮抗薬である SC54684A は傷害血管上での血小板の粘着・凝集を強力に抑えることによって内膜肥厚を抑制したと思われる。しかし、抗血小板薬であるアスピリンは十分には血小板の活性化を抑制することができず、傷害血管上に多数の血小板の粘着・凝集が起り、内膜肥厚を抑制できなかったと思われる。それは、アスピリンは血小板凝集の一つの経路のみを抑止する

が、GP IIb/IIIa 拮抗薬は凝集の最終段階を抑制することでどの凝集惹起物質による凝集も抑制することによるものと思われる。しかし、SC54684A の内膜肥厚における抑制率としては 30% 程度とあまり強力ではなかった。

白血球の関与

内皮傷害後 3 日には傷害血管上に多数粘着・凝集した血小板に白血球、特に好中球の集積がみられた(図 8)。そこで、まず循環中の好中球の数を減少させる目的で抗好中球抗体を投与して好中球の数を 3 分の 1 以下にした。この状態で内皮を傷害し 3 週間後に内膜肥厚を観察すると、好中球を減少させた群ではコントロール群と比べ内膜肥厚は抑制された(図 9)。抑制率として約 70% 程度であった。

さらに、傷害血管壁への好中球の集積は傷害血管上に凝集・粘着した血小板を介したものと考えられる。これは、活性化した血小板膜上に発現する P-selectin と好中球膜表面の糖鎖が結合することで血管壁に接着すると予測される。そこで、P-selectin の阻害薬である phytic acid を投与し、P-selectin の関与を検討した。

内皮傷害後から phytic acid を腹腔内に投与した。傷害後の内膜肥厚の抑制は好中球の数を減少させた群とほぼ同程度であった(図 10)。

このことから、傷害血管上に粘着・凝集した血小板と活性化された血小板膜上の P-selectin に粘着した好中球がラジカル、サイトカインや各種増殖因子を放出し、内膜肥厚のトリガーとなっている可能

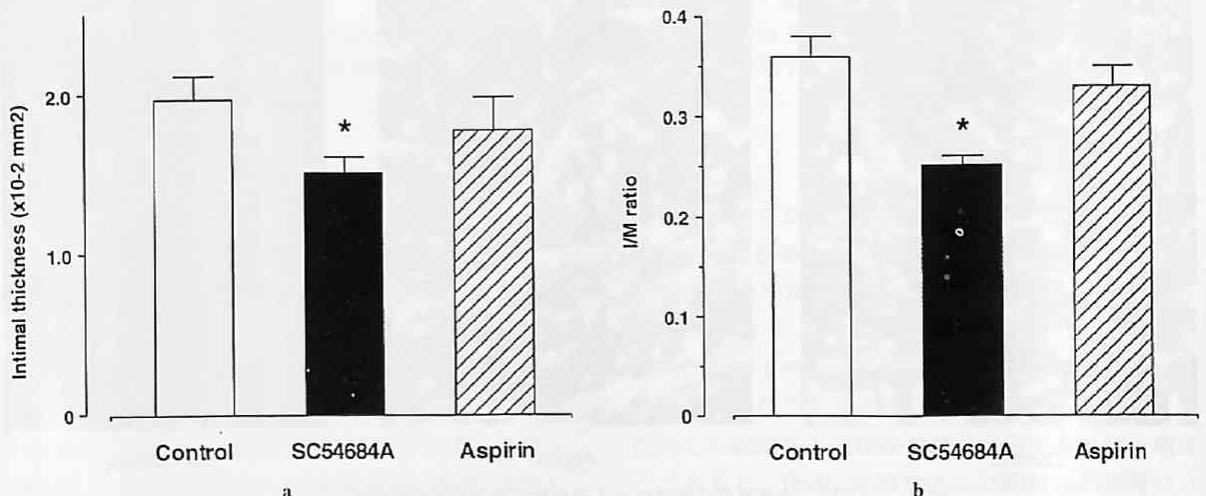


図7 内膜肥厚に対する効果 a: 内膜面積, b: 内膜/中膜面積比

*: p<0.05 vs. コントロール

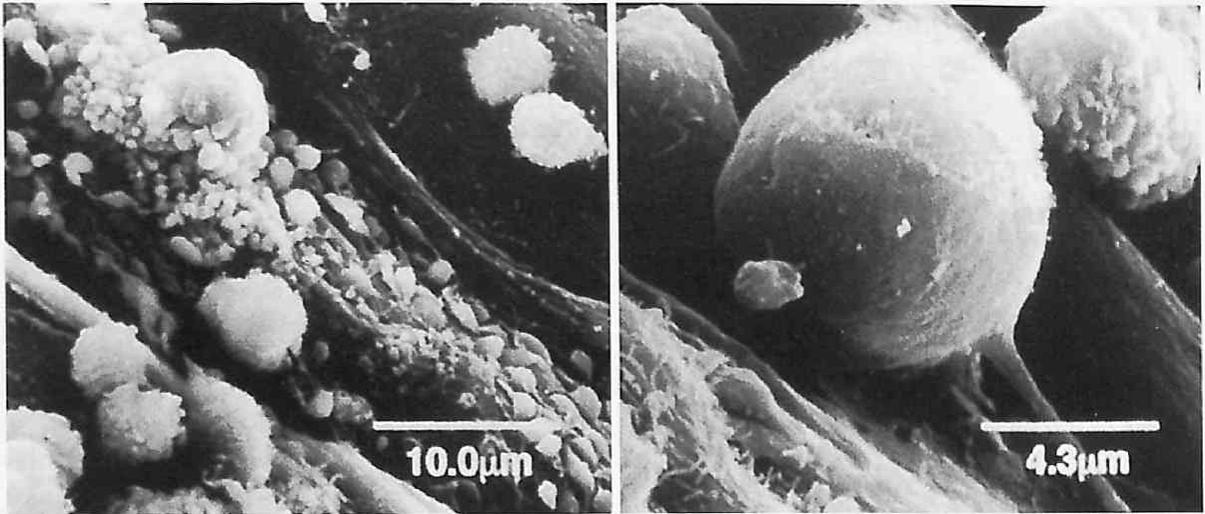


図8 走査型電子顕微鏡による傷害後3日の血管内腔像
 粘着・凝集した血小板上に多数の白血球が集積している。

図9 好中球減少による内膜肥厚への影響(n=12)
 好中球減少は有意に内膜面積、内膜/中膜面積比を減少させた。
 * : p<0.05 vs. コントロール

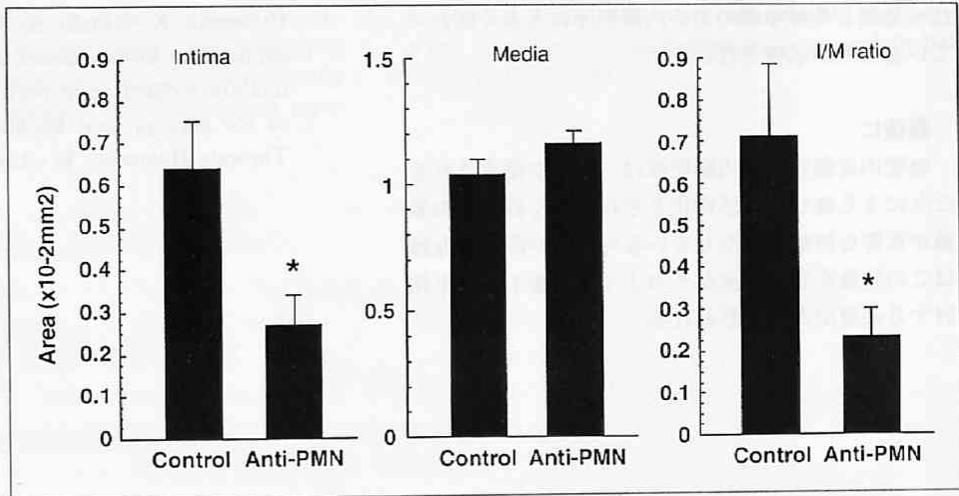
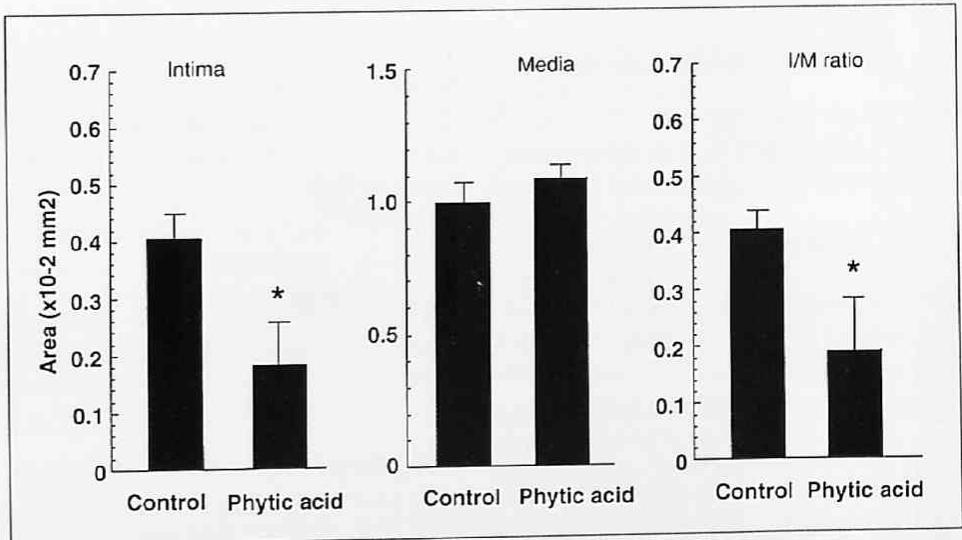


図10 P-selectin 阻害薬(phytic acid)による内膜肥厚への効果(n=10)
 阻害薬は内膜肥厚を抑制した。
 * : p<0.05 vs. コントロール



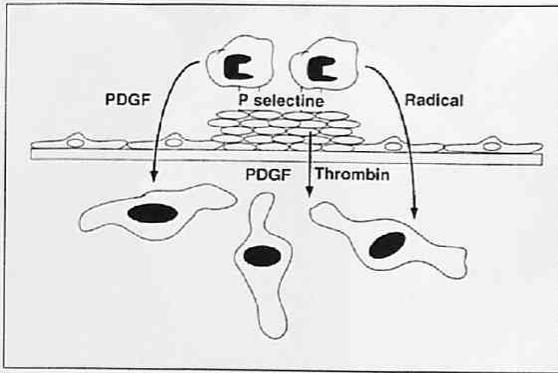


図 11 内膜肥厚のカニズム

内皮傷害により血小板が粘着・凝集をし、その膜上に好中球が集積する。活性化された血小板、好中球からは細胞増殖因子、サイトカインやフリーラジカルが放出され、中膜平滑筋細胞が増殖・遊走し内膜肥厚を形成する。

性が大きい(図 11)。さらに、活性化された血小板に比べ集積した好中球の方が内膜肥厚に大きく関わっていることが示唆された。

最後に

血管内皮傷害後の内膜肥厚は、内皮が傷害されることによる血小板の活性化とそれに続く好中球の集積が重要な役割を果たしている可能性が高い。今後はこの現象を高脂血症がどのように修飾するかを検討する必要があると思われる。

文 献

- 1) Hirata, Y., Umemura, K., Kondo, K., Uematsu, T. and Nakashima, M.: Experimental intimal thickening studies using the photochemically induced thrombosis model in the guinea-pig femoral artery. *Atherosclerosis*, **107**: 117~124, 1994.
- 2) Kikuchi, S., Umemura, K., Kondo, K. and Nakashima, M.: Tranilast, an anti-allergic drug, suppresses intimal hyperplasia after photochemically-induced endothelial injury in the spontaneously hypertensive rat. *Eur. J. Pharmacol.*, **295**: 221~227, 1996.
- 3) Umemura, K., Watanabe, S., Kondo, K., Hashimoto, H. and Nakashima, M.: Inhibitory effect of prostaglandin E₁ on intimal thickening following photochemically induced endothelial injury in the rat femoral artery. *Atherosclerosis*, **130**: 11~16, 1997.
- 4) Umemura, K., Kondo, K., Ikeda, Y. and Nakashima, M.: Enhancement by ticlopidine of the inhibitory effect on in vitro platelet aggregation of the glycoprotein IIb/IIIa inhibitor tirofiban. *Thromb, Haemost.*, **78**: 1381~1384, 1997.

Role of Platelets and Neutrophils in Intimal Thickening Following Endothelial Injury

Umemura, K.

Department of Pharmacology, Hamamatsu University School of Medicine, Shizuoka, Japan

Key Words: Intimal thickening, Platelets, Neutrophils

We investigated the roles of platelets and neutrophils in intimal thickening following endothelial injury of the femoral artery. The photochemical reaction between systemically administered Rose Bengal and transluminal green light produced endothelial injury followed by platelet adhesion and aggregation at the site of photochemical reaction. Further, 3 days after the injury, numerous neutrophils adhered to the damaged vessel wall. Three weeks after the injury, there was intimal thickening at the irradiated site. To reduce the numbers of neutrophils, anti-neutrophil antibody (ANA) administered intraperitoneally before the endothelial injury. In other animals, myo-

inositol hexaphosphate (phytic acid), which inhibits P-selectin, was also administered intravenously after the injury. In a separate experiment, a glycoprotein (GP) IIb/IIIa inhibitor, which strongly inhibits platelet aggregation, was administered orally before the injury and an additional administration was given for 3 weeks after the injury. Neutropenia by ANA administration and phytic acid inhibited intimal thickening and the GP IIb/IIIa inhibitor slightly inhibited intimal thickening. Thus, neutrophils and platelets may play a key role in intimal thickening following endothelial injury in this model.