

平成 22 年 5 月 26 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19590372  
 研究課題名（和文）マクロファージに発現するNa<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>交換体の粥状硬化進展機序における役割  
 研究課題名（英文）Role of sodium/calcium ion exchanger expressed in macrophages in atherogenesis  
 研究代表者  
 坂田 則行（SAKATA NORIYUKI）  
 福岡大学・医学部・教授  
 研究者番号：20134273

研究成果の概要（和文）：プラーク破裂の発生メカニズムを解明するために、ヒト内頸動脈におけるNa<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>交換体（NCX）とマトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）の発現および内圧負荷によるひずみ応力分布を調べた。粥状硬化巣の線維性被膜に局在する活性化マクロファージは、NCX-1膜トランスポーターを介して細胞内Ca<sup>2+</sup>の増加が起こり、MMP-2, 9を放出する。その結果、粥腫を覆う線維性被膜の菲薄化と断裂がおこると考えられる。また、線維性被膜に発生する高い応力が被膜の断裂に直接関係している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：To clarify the mechanism which is responsible for the plaque rupture, we investigated the expression of sodium/calcium ion exchanger and matrix metalloproteinase and the stress/strain distribution in the human carotid arterial wall. Activated macrophages in fibrous cap expressed sodium/calcium ion exchanger-1 and matrix metalloproteinases-2 and 9 in atherosclerotic plaques. Therefore, these cells may contribute to the thinning and disruption of fibrous cap in the plaque. In addition, the concentration of the maximal principal stress is likely to trigger the plaque rupture.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：人体病理学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：粥状硬化、マクロファージ、Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>交換体、マトリックスメタロプロテアーゼ、プラーク破裂、血行力学的因子

1. 研究開始当初の背景

(1) プラークの破裂と血栓形成は内頸動脈

閉塞や脳梗塞などの内頸動脈狭窄症の主要な合併症の直接的な引き金になっているこ

とが明らかにされている。したがって、内頸動脈狭窄症の合併症を予防、治療するために、ヒト内頸動脈におけるプラーク破裂の発生メカニズムを解明することが急務である。

(2) プラークに出現するマクロファージは、プラークの進展や破裂、退縮に関わる主要な血管壁細胞である。マクロファージは様々なサイトカインや酸化ストレスにより活性化され、マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)を放出し、プラークを覆う線維性被膜の菲薄化とその破裂に関与する。血管壁細胞に発現する分子にはMMP-1, 2, 8, 9などが知られている。

(3)  $Na^+/Ca^{2+}$ 交換体は、心筋細胞や血管平滑筋細胞に発現し、 $Na^+$ と $Ca^{2+}$ を交換輸送する膜トランスポーターである。虚血再灌流障害を引き起こす $Ca^{2+}$ 過剰負荷の流入経路になることが知られている。細胞内に流入する $Ca^{2+}$ の増加は重要なセカンドメッセンジャーとして細胞傷害やアポトーシスなどの様々な細胞の機能発現に関与している。したがって、 $Na^+/Ca^{2+}$ 交換体を介する細胞内 $Ca^{2+}$ の増加が、マクロファージ活性化に関与している可能性がある。

(4) 線維性被膜は活性化マクロファージにより菲薄化され、プラーク不安定化が起こる。この不安定プラークが破裂する直接的な原因のひとつに壁にかかる力学的ストレスがある。この力学的ストレスは大きさの異なる血圧が負荷されたときの血管形状の変化と発生応力に影響される。菲薄化した部位では高い応力が発生し、破裂の直接的な原因になることが知られている。

## 2. 研究の目的

(1)  $Na^+/Ca^{2+}$ 交換体が血管壁細胞に発現していることが知られている。そこで、ヒト動脈のプラーク内壁細胞での $Na^+/Ca^{2+}$ 交換体の発現を調べる。さらに、マクロファージに発現する $Na^+/Ca^{2+}$ 交換体の機能とその発現メカニズムを明らかにし、プラーク破裂におけるマクロファージの役割を解明する。

(2) 線維性被膜の破断を引き起こす直接原因の一つに血行力学的因子がある。これまで血管形状に基づく動脈壁の応力解析が行われてきた。本研究では、プラークの形状に加え、残留応力を考慮した壁内の応力解析を行い、破裂に寄与する力学特性を解明する。

## 3. 研究の方法

(1) プラークの破裂と $Na^+/Ca^{2+}$ 交

換体(NCX)、マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)の局在：内膜剥離術で採取された頸動脈プラーク 17例から血管長軸に垂直の連続標本を作製し、実体顕微鏡および光顕下に観察し、破裂部位の組織分布とその性状について検討した。NCXとMMPの局在については免疫組織化学的方法で調べた。

(2) NCX1とMMPの蛋白発現とmRNA発現：内膜剥離術で採取された未固定標本から粥状硬化および非硬化部分を採取した。蛋白発現はWestern blot法で検索した。mRNAの発現は、各標本から抽出した総RNAをもとにRT-PCR法で検討した。粥状硬化の有無と組織学的性状で分類し、検討した。

(3) 非軸対称な総頸動脈の内圧負荷に対する壁応力分布の解析：ヒト剖検例の総頸動脈を採取した。内圧負荷装置に装着し、一定の速度で0~160 mmHgの圧を負荷した。その時の外径変化をCCDカメラで連続的に記録した。測定後、血管中央部分の環状試料を切断して残留応力を解放した。残留応力解放状態および負荷状態での応力分布を解析した。

## 4. 研究成果

(1) プラークの破裂と $Na^+/Ca^{2+}$ 交換体(NCX)、マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)の局在：17例中プラーク破裂例は8例、非破裂例は9例であった。破裂例(M/F:7/1)では非破裂例(M/F:3/6)に比べ男性の割合が多かった。内膜の亀裂は、長軸方向では内頸動脈入口部に最も多く、その部を中心にプラーク内出血を認めた。垂直断面では、プラークを覆う線維性被膜に亀裂が生じ、亀裂断端部には線維性被膜の菲薄化、コラーゲンの破断と泡沫化マクロファージの浸潤を認めた。

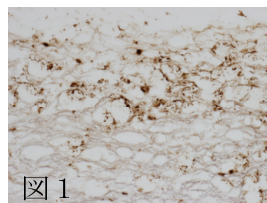


図1

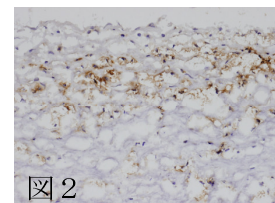


図2

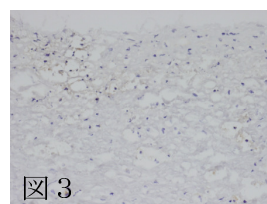


図3

図1 : CD68  
図2 : NCX-1  
図3 : NCX-2

14例の頸動脈プラークの未固定標本から凍結切片を作製し、責任病変部を免疫組織化学的に観察した。頸動脈プラークでは、粥腫の辺縁と線維性被膜に泡沫化マクロファージが多数集簇していた。CD68陽性マクロファージの多くがNCX-1陽性であったが、NCX-2は陰性であった(図1, 2, 3)。CD68または $\alpha$ SMAとNCX1の二重免疫染色を行うと、CD68陽性マクロファージの細胞質と細胞膜にNCX1が染色された。一方、 $\alpha$ SMA陽性の内膜平滑筋細胞はNCX1陰性であった。内膜でのNCX-1, MMP-1, 2, 9陽性細胞の出現率を非病変部(IT)、初期病変部(PA)、粥状硬化部(AT)の間で比較すると、いずれも病変の進行に伴い出現率が上昇した(図. 4)。内膜に浸潤するマクロファージにはMMP-2とMMP-9は強く発現したが、MMP-1とMMP-7は発現しなかった。

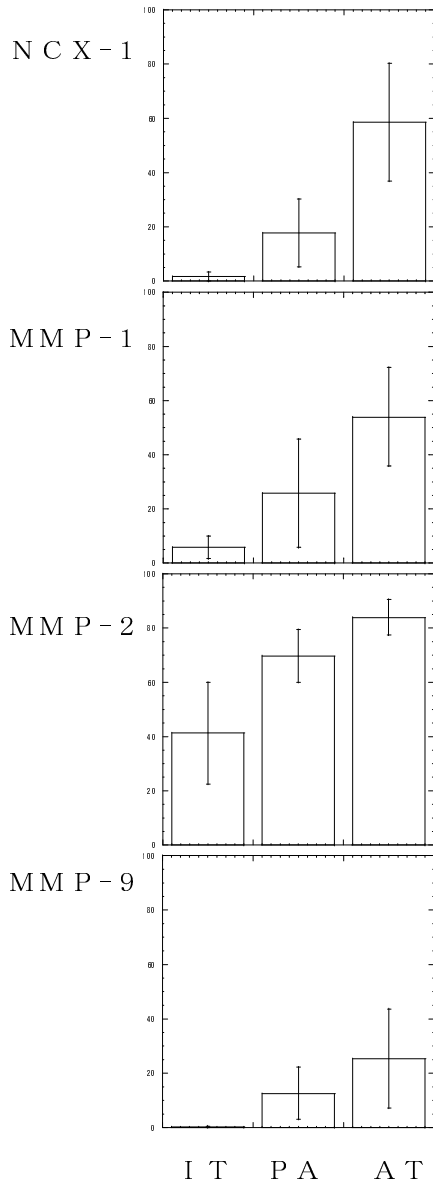


図. 4: 内膜における陽性細胞の出現率

(2) NCX-1とMMPの蛋白発現とmRNA発現: NCX-1の蛋白発現をWestern blot法で検索すると、抗NCX1抗体に反応する120kDのバンドが粥状硬化部では非硬化部に比べ増強していた。NCX-1のmRNAは粥状硬化部と非硬化部いずれにおいても検出された(図. 5)。粥状硬化部では、MMP-1, 2, 8, 9 mRNAのすべてが発現していた。一方、非硬化部では、MMP-1, 2, 9 mRNAは発現していたが、MMP-8 mRNAは検出されなかった。

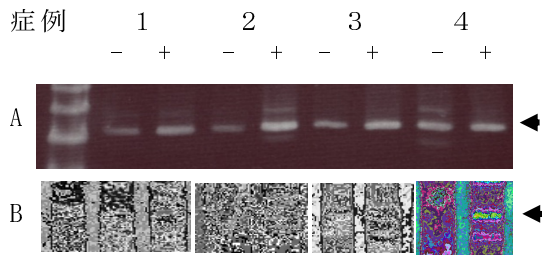


図. 5、NCX-1のmRNA発現(A, RT-PCR法)と蛋白発現(B, Western blot法): NCX-1 mRNAは動脈硬化部(+)および非硬化部(-)いずれにおいても発現したが、蛋白質発現は、硬化部で非硬化部に比べより増強している。

(3) 非軸対称な総頸動脈の内圧負荷に対する壁応力分布の解析: アテロームを有する偏心性肥厚を有する動脈に内圧を負荷した場合、肥厚部は非肥厚部に比べ変形しにくく、壁に発生するひずみ変動量が不均一化した。その結果、偏心性肥厚の肩部付近では高い応力が観察され、また管軸の中心に近いほどひずみ変動量が大きかった。また、肥厚が著しくなると応力集中見られなくなった。

(4) まとめ: (1)と(2)研究結果から、粥状硬化部に出現する活性化マクロファージは、NCX-1膜トランスポーターを介して細胞内Ca<sup>2+</sup>の増加が起こり、MMP-2, 9を放出する。そのため粥腫を覆う線維性被膜の菲薄化と断裂がおこると考えられる。このことは、Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>交換体を標的とした動脈硬化病変の予防や治療戦略の可能性を示唆する。また、(1)と(3)の結果から、線維性被膜の断裂にはこの部に発生する高い応力が直接関係している可能性を示唆される。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 14 件)

- ① Yamada H, Yuri K, Sakata N, Effect of stress/strain on retention of lipoproteins in the deep layer of intima and plaque rupture: A finite element analysis for atheromatous carotid artery, Journal of Biomechanical Science and Engineering, 査読有, in print
- ② Inokuti Y, Shimazawa M, Nakajima Y, Komuro I, Matsuda T, Baba A, Araie M, Kita S, Iwamoto T, Hara H. A Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger isoform, NCX1, is involved in retinal cell death after N-methyl-D-aspartate injection and ischemia-reperfusion. J Neurosci Res 査読有 87:906-917, 2009
- ③ Maeda S, Sakamoto K, Matsuoka I, Iwamoto T. Lysophosphatidyl-choline increases Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger expression via RhoB-geranyl-geranylation in H9c2 cells. J Pharmacol Sci 査読有 109: 565-572, 2009
- ④ Niu CF, Watanabe Y, Ono K, Iwamoto T, Yamashita K, Satoh H, Urushida T, Hayashi H, Kimura J. Characterization of SN-6, a novel Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> inhibitor in guinea pig cardiac ventricular myocytes. Eur J Pharmacol 査読有 573:161-169, 2009
- ⑤ Mima M, Kawai C, Paku K, Tomoo K, Ishida T, Sugiyama S, Matsumura H, Kitatani T, Yoshikawa HY, Maki S, Adachi H, Takano K, Murakami S, Inoue T, Mori Y, Kita S, Iwamoto T. Crystalization and preliminary X-ray crystallographic analysis of Ca<sup>2+</sup>-free primary Ca<sup>2+</sup>-sensor of Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun 査読有 64:1125-1127, 2008
- ⑥ Mera K, Fujiwara Y, Otaguri M, Sakata N, Nagai R, Immunological detection of N omega-(Carboxyl)arginine by a specific antibody, Ann N Y Acad Sci., 査読有, 1126: 155-157,2008
- ⑦ Sakata N, Tashiro T, Uesugi N, Kawara T, Furuya K, Hirata Y, Iwasaki H, Kojima M. IgG4-positive plasma cells in inflammatory abdominal aortic aneurysm: The possibility of an aortic manifestation of IgG4-related sclerosing disease, Am J Surg Pathol. 査読有, 32:553-559, 2008;
- ⑧ 伊藤健二、兼岡秀俊、坂田則行、川上豪仁、上杉憲子、森超夫、冷牟田浩司、斉藤喬雄、心血管手技後に異なる時間経過で死亡したコレステロール塞栓症の3剖検例、脈管学、査読有, 48:75-80, 2008
- ⑨ Sakata N, Nabeshima K, Iwasaki H, Tashiro T, Uesugi N, Nakashima O, Ito H, Kawanami Furuya K, Kojima M. Possible

involvement of myofibroblast in the development of inflammatory aortic aneurysm, Pathol Res Pract, 査読有, 203: 21-29, 2007

- ⑩ Maeda I, Kishita S, Yamamoto Y, Arima K, Iketa K, Meng J, Sakata N, Okamoto K, Immunochemical and immunohistochemical studies on distribution of elastin fibres in human atherosclerotic lesions using a polyclonal antibody to elastin-derived hexapeptide repeat. J Biochem, 査読有, 142:627-631, 2007
- ⑪ Mera K, Nagai R, Haraguchi N, Fujiwara Y, Araki T, Sakata N, Otaguri M, Hypo-Chlorous acid generates N epsilon-(carboxymethyl)lysine from Amadori products, Free Radical Res, 査読有,41:713-718, 2007
- ⑫ Sakata N, Hamasaki M, Iwasaki H, Shigekawa S, Arai S, Dissecting aneurysms involving both anterior cerebral artery and aorta, Pathol Int 査読有, 57:224-228, 2007
- ⑬ Li JP, Kajiya H, Okamoto F, Nakao A, Iwamoto T, Okabe K. Three Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger (NCX) variants are expressed in mouse osteoclasts and mediate calcium transport during bone resorption. Endocrinology 査読有 148:2116-2125, 2007
- ⑭ Karashima E, Nishimura J, Iwamoto T, Hirano K, Hirano M, Kita S, Harada M, Kanaide H. Involvement of Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger in cAMP-mediated relaxation in mice aorta: evaluation using transgenic mice. Br J Pharmacol 査読有 150:434-444, 2007

〔学会発表〕 (計 6 件)

- ① Yamada H, Yuri K, Sakata N, Image-based finite element analysis of the common carotid artery with intimal thickening, The Third Switzerland-Japan Work-shop on Biomechanics, September 1-4, 2009, Engelberg, Switzerland
- ② Sakata N, Hirata Y, Nabeshima K, Iwasaki H, Iwamoto T, Inoue T, Expression of Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger in human atherosclerotic lesions: The role for vascular remodeling, Asian Chapter Congress of International Union of Angiology, October 29, 2009, Tokyo
- ③ 坂田則行、線維蛋白と動脈病変—エラスチン、コラーゲンの AGE 化と慢性糖尿病合併症—、第7回日本エラスチン研究会学術集会、12/4-12/5, 2009、北九州市
- ④ 由利和夫、山田宏、坂田則行、総頸動脈の生理的負荷条件下での力学的状態と組織変性との関係に関する解析、日本機械学

会九州支部第 62 期総会、3/18、2009、九  
大伊都キャンパス

- ⑤ 由利和夫、山田宏、坂田則行、非軸対称な  
総頸動脈の内圧負荷に対する変形測定と  
残留応力解放形状に基づく応力解析、第  
21 回バイオエンジニアリング講演会、1/24、  
2009、札幌市
- ⑥ 坂田則行、上杉憲子、小島勝、岩崎宏、  
IgG4-positive plasma cells in inflammatory  
abdominal aortic aneurysm: IgG4-related  
sclerosing disease, 第 97 回日本病理学  
会、5/15-5/17, 2008、金沢市

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

坂田 則行 (SAKATA NORIYUKI)  
福岡大学・医学部・教授  
研究者番号：20134273

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者

岩本 隆宏 (IWAMOTO TAKAHIRO)  
福岡大学・医学部・教授  
研究者番号：20300973