

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590577

研究課題名(和文) 急性冠症候群発症における好中球の役割に関する検討

研究課題名(英文) Role of neutrophils in onset of acute coronary syndrome

研究代表者

公文 義雄 (KUMON YOSHITAKA)

高知大学・教育研究部医療学系・准教授

研究者番号：40215033

研究成果の概要(和文)：血管壁破綻のメカニズムは不明であり、血管の粥腫(プラーク)に存在する好中球(白血球)が血管壁の破綻に関与する可能性について組織学的に検討した。外膜から栄養される毛細管血管を介してプラークに侵入した好中球は、刺激を受けて細胞質の分泌顆粒中のfPRL1を細胞表面に表出しながらプラーク内に浸潤する。このような好中球はNADPHオキシダーゼ活性が強く、局所で酸化ストレスを産生しており、これが組織の脆弱化を引き起こし血管壁の破綻に繋がると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The mechanisms of rupture of plaque in acute coronary syndrome remains unclear, we histopathologically investigated the possible role of neutrophils resided in atheromatous plaque in the plaque rupture. The fPRL1 intensity of neutrophil cytoplasm was histologically high when neutrophils were in capillary vessels of the plaque originating from tunica adventitia. As soon as the activated neutrophils were extravasated into the plaque, however, the fPRL1 intensity of neutrophil cytoplasm significantly decreased, followed by exocytosis of fPRL1 on neutrophil surface. These neutrophils were alive and active in NADPH oxidase activity, followed by generation of reactive oxygen species (ROS), possibly resulting in plaque vulnerability which may cause the rupture of the vasculature.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：酸化ストレス, 不安定プラーク, fPRL1, 糖尿病, 急性冠症候群

## 1. 研究開始当初の背景

現在血管の炎症と捉えられる動脈硬化巣の形成には、酸化LDLに代表される変性リポ蛋白と、それを貪食し酸化ストレスを産生するマクロファージが中心的な役割を果たすと

されている。しかし、これを基盤に発症するプラークの破綻、即ち、急性冠症候群(ACS)等の冠動脈疾患の発症にはこれらに加えて別の因子が必要であると考えられており、なかでも病理組織的に好中球が発症時に浸潤

していることから好中球の浸潤が関与している可能性が示唆されている。しかし、今までの報告は断片的であり、局所に浸潤している好中球の機能やプラーク破綻における重要性が解明されておらず、浸潤している好中球がプラークの破綻に直接関与している具体的な証拠は報告されていない。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は病理組織学的な酸化ストレスの増強を切り口として、浸潤した好中球に焦点を当て、(1)血管からプラーク内に浸潤している好中球が活性化状態にあることを形態学的に明らかにする、(2)ホルマリン固定標本を用いて、NADPH oxidase などにより産生された酸化ストレスをスライド上の個々の細胞で評価できるシステムを開発する、(3)プラークの破綻に好中球の果たす意義をマクロファージと比較検討して病理組織学的に明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

本研究は倫理委員会の承認の元に行われた。手術的に得られたヒトの頸動脈内膜切除組織標本 7 検体を用いて検討した。

(1)血管組織の炎症に血中や血管局所で産生される急性期蛋白である血清アミロイド A の受容体が fPRL1 であることが報告され、これに対する抗体を作成してきた。この抗体で好中球を免疫染色し、細胞質中の fPRL1 濃度を定量する方法を開発し、fPRL1 濃度の低下が好中球の細胞の活性化に繋がること (Clin Vaccine Immunol 2007;14, 678-684) を既に報告している。これを用いてプラークに存在する好中球の活性化度を評価した。

(2)理論上は凍結検体でなくてもホルマリン固定の病理組織検体を用いて、細胞の持つ酸化ストレスをスライドガラス上で再現できる。大動脈硬化病変を対象にして詳細な条件を検討し、下記の如く NADPH oxidase 活性による酸化ストレスを発色定量するシステムを開発する。この画像を NIH イメージにて取り込み、細胞ごとに定量評価するシステムを完成させる。

NADPH oxidase 活性

↓

superoxide

↓

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 産生 → セリウム → セリウム → 硫化水素  
沈殿 鉛に変換 にて発色

(3)頸動脈内膜切除標本を用いて、好中球を抗 fPRL1 染色、ナフトール ASD 染色、抗 CD66b 抗体で免疫染色し、マクロファージに特異的な抗

CD68 抗体、NADPH oxidase サブユニット (p22phox) 抗体を用いた免疫染色に加えて、今回我々が始めて開発した細胞レベルで捉えることが可能な ROS 染色を行い、連続切片標本を用いて ROS 産生部位の検討を行った。

## 4. 研究成果

(1)好中球細胞質の fPRL1 成熟に伴い出現するようになる。破綻プラークを fPRL1 で染色する (図 1) と、外膜から侵入している毛細管中の好中球細胞質 (黒矢印ヘッド) は fPRL1 に濃染し、毛細管からプラーク内に浸潤している好中球 (赤矢印ヘッド) では細胞質は fPRL1 に淡染されている。

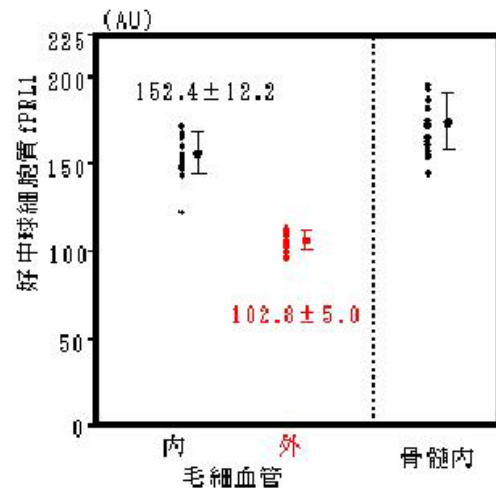
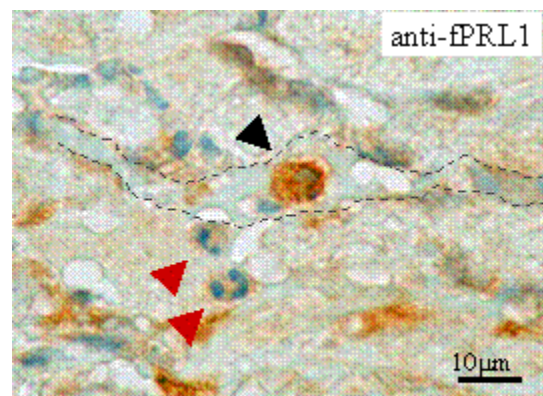


図 2 好中球細胞質の fPRL1 の変化

この変化を同一検体で ImageJ 分析を用いて 1-225 段階に定量評価する (図 2) と、好中球の細胞質 fPRL1 濃度は血管外に浸潤することで平均 152.4 から 102.8 に低下した。この変化は顆粒中に含まれる細胞質 fPRL1 が細胞外 (表面) に出して貪食作用を発揮する作用と関連するものであり、好中球機能が活性化していることを意味するのもであった。末梢血管 ~ 毛細管中に存在する好中球と骨髄中好



中球の細胞質 fPRL1 濃度はほぼ同程度であり、毛細管内では強い活性化を受けていない。

(2) 好中球のプラーク内での重要な作用に ROS 産生が考えられる。我々はホルマリン包埋標本を用いて検出法を開発した(図 3)。



図 3 ROS の検出

本検出法の優れた点は、細胞毎に ROS を検出できるものであり、in situ detection というべきものである。A に ROS 産生を、B と C はそれぞれ検出前に抗酸化作用のある  $p$ -benzoquinone と  $\beta$ -sitosterol で前処理したものであり、本検出の特異性が高いことが証明された。

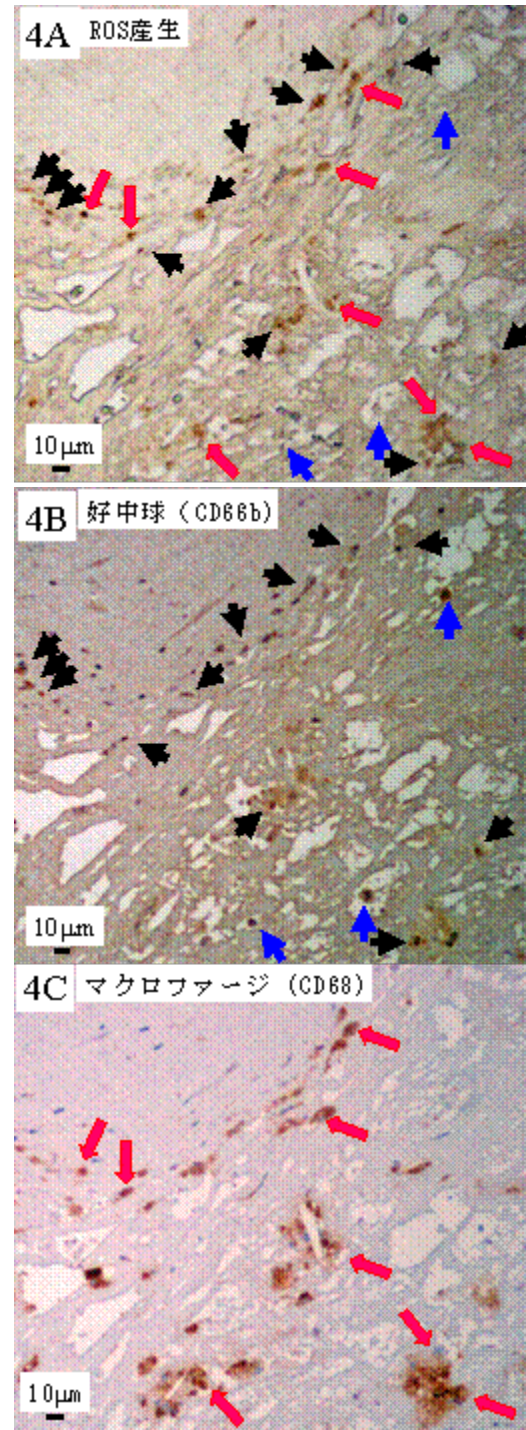


図 4 好中球とマクロファージの ROS 産生への寄与

(3) これを用いて ROS 産生に関与する細胞について検討した(図 4)。

A に ROS 産生部位、B に好中球の分布、C にマクロファージの分布を示しており、それぞれ、黒矢印は好中球に由来する ROS、青矢印は ROS 産生はしていないが存在する好中球、赤矢印はマクロファージに由来する ROS を示す。

従来、主にマクロファージが ROS 産生に関与していると理解されていたが、本研究でマクロファージのみならず好中球も同等に、部位によってはマクロファージ以上に好中球が寄与していることがわかった。更に青矢印に示す如く、好中球でも ROS 産生に関与していないものがあり、その様な好中球は毛細血管内に存在するものであった。このように好中球の機能の活性化と細胞質 fPRL1 低下は平行して変化する(Clin Vaccine Immunol 2007; 14, 678-684)ものであるが、プラーク内の ROS 産生でも同様の結論を出すことが出来た。また、ROS 産生部位は p22phox 陽性部位と一致しており、好中球の ROS 産生には NADPH oxidase が大きく関与していた。

今研究は好中球の形態的变化を科学的に評価し、それを好中球機能、中でも血管の破綻と最も関連する ROS 産生と関連して病理組織学的に捉えたものであり、このような報告は国内外ともになく、独創的な成果である。更にホルマリン固定標本で ROS 産生を in situ 検出する方法を開発したこと、好中球がマクロファージ以上にプラークの破綻に寄与することを見出すことが出来たこと、そのような活性化好中球の形態的特徴を捉えた点など大きな成果を得た。今後はこの結果を基に、プラークの破綻を切り口として、好中球が血管平滑筋細胞やマクロファージに及ぼす影響や意義について検討したい。

## 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 1 件)

① Hosokawa T, Kumon Y, Kobayashi T, Enzan H, Nishioka Y, Yuri K, Wakiguchi H and Sugiura T. Neutrophil infiltration and oxidant-production in human atherosclerotic carotid plaques. Histology and Histopathology 査読あり 2011; 26:1-11

[学会発表] (計 2 件)

① Hosokawa T, Kumon Y, Kobayashi T, Enzan H, Takahashi K, Yuri K, Wakiguchi H,

and Sugiura T. Neutrophils infiltration and generation of reactive oxygen species in a human atherosclerotic plaque. 2009 International Symposium on Atherosclerosis, 6/14-18/2009, Boston, MA.

② 細川卓利、公文義雄、小林俊博、円山英昭、高橋潔、由利和也、脇口宏、杉浦哲朗: Neutrophils infiltration and generation of reactive oxygen species in a human atherosclerotic plaque. 第 41 回日本動脈硬化学会総会・学術集会, 7/16-17/2010 下関、山口。

[その他]

ホームページ等 なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

公文 義雄 (KUMON YOSHITAKA)  
高知大学・教育研究部医療学系・准教授  
研究者番号: 40215033

### (2) 研究分担者

杉浦 哲朗 (SUGIURA TETSURO)  
高知大学・教育研究部医療学系・教授  
研究者番号: 50171145

竹内 啓晃 (TAKEUCHI HIROAKI)  
高知大学・教育研究部医療学系・講師  
研究者番号: 90346560