

## 腹部大動脈瘤における Matrix metalloproteinases (MMP-2 と MMP-9) の発現と中膜弾性線維崩壊との関連

### マッピングを用いた検討

渡辺 徹雄<sup>1</sup>      澤井 高志<sup>2</sup>      佐藤 成<sup>1</sup>      里見 進<sup>1</sup>

**要 旨**：腹部大動脈瘤（AAA）の進展における Matrix metalloproteinases (MMPs) の役割を明らかにするため、AAA17症例の腹部大動脈の非拡張部から移行部、瘤にかけての連続標本における MMP-2, MMP-9陽性細胞の発現と壁を構成する弾性線維断裂との関連をマッピングを用いて検討した。対照には5例の閉塞性動脈硬化症（ASO）を用いた。

AAAの中膜弾性線維の破壊は、非拡張部、移行部、瘤部にかけて連続的に捉えられた。内膜側のアテローム形成や壁の破壊は、ASOと類似していたのに対し、外膜側では膠原線維層の肥厚や炎症細胞浸潤がみられ、外膜側の変化がAAAの特異的な変化であった。

蛋白分解酵素を発現している細胞と病変との関連については、MMP-2は瘤の内膜側のマクロファージ（M<sub>1</sub>），MMP-9は外膜側に浸潤するM<sub>2</sub>で発現を多数認め、その分布は弾性線維の断裂部位に一致した。瘤部内膜側のMMP-2陽性細胞数はASOとほぼ同じ傾向を示したのに対し、外膜側のMMP-9陽性細胞の数はASOや非拡張部に比べ有意に多かった。

以上より腹部大動脈瘤の進展には外膜側から進行する中膜破壊が特徴的で、これにはM<sub>2</sub>から分泌される蛋白分解酵素であるMMP-9が大きく関与している可能性が示唆された。（日血外会誌 9 : 539-544, 2000）

索引用語：腹部大動脈瘤，マトリックス・メタロプロテナーゼ（MMP），MMP-2，MMP-9

### 序 言

腹部大動脈中膜弾性線維の主成分のelastinは、出生後はほとんど生合成されず、崩壊がおこると、大動脈の形態は不可逆的に変化し、腹部大動脈瘤（AAA）を形成する<sup>1)</sup>。このelastin崩壊には、Matrix metallo-

proteinases (MMPs) が関与するとの報告が多数なされてきた<sup>2-6)</sup>。

われわれもこれまで、動脈瘤より中枢側の腹部大動脈非拡張部から瘤に至る連続標本を用いたMMPsの免疫染色、in situ hybridizationによる検討から、瘤内膜側でMMP-2、外膜側でMMP-9が多くの発現を認め、特に外膜側に浸潤するmacrophage (AAA-infiltrating macrophages ; AIM cells<sup>2)</sup>)でのMMP-9の発現は、外膜側の線維化や動脈瘤の拡大速度との相関を認め、MMP-9がAAA進展に強く関与することを報告した<sup>7)</sup>。

今回はAAAの発生・進展の機序を明らかにするた

1 東北大学医学部第2外科 (Tel : 022-717-7214)

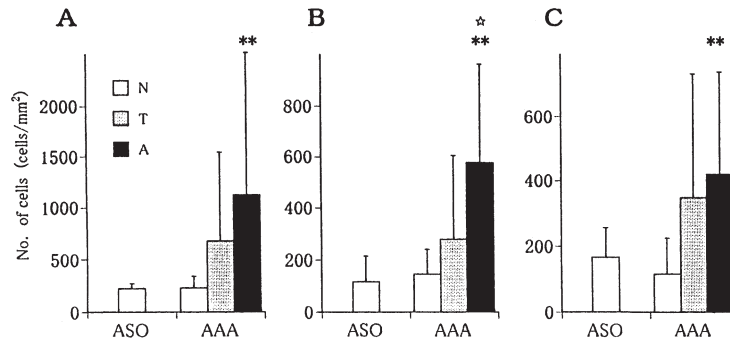
〒980-8575 仙台市青葉区星陵町 2-1

2 岩手医科大学第1病棟 (Tel : 019-651-5111)

〒020-8505 盛岡市内丸 19-1

受付：2000年 2月 2日

受理：2000年 7月 21日



**Fig.1** Number of lymphocytes (A), T Lymphocytes (B), and macrophages (C) in the adventitial side of the aorta

cells / mm<sup>2</sup>, error bars represent standard deviation of the mean, \*\*: p<0.01 vs. non-dilated portion, \*: p<0.05 vs. ASO.

N ; non-dilated portion, T ; transitional portion, A ; aneurysmal portion.

め、非拡張部から瘤部までの連続標本を用い、中膜弾性線維とMMPs発現の関係や閉塞性動脈硬化症(ASO)との相違を検討したので報告する。

## 対象と方法

### 1. 対象

紡錘形の非特異性腹部大動脈瘤手術例のうち、腹部大動脈中枢側の瘤化のない非拡張部から動脈瘤にかけての前壁を連続的に採取できた17例(男14名、女3名、平均69.4歳、瘤最大径平均57.6mm)の大動脈壁を対象とした。また閉塞性動脈硬化症(ASO)手術例5例(64.8 ± 6.0歳)の腹部大動脈壁をASO群として対照とした。

### 2. MMPsの免疫染色

MMPsの免疫染色には、抗MMP-2抗体(マウスモノクローナル抗体: CA4001<sup>8)</sup>, Finland・Dia Bor社 M. Hoyhtya博士, Oulu大学 K. Tryggvason博士より供与), 抗MMP-9抗体(マウスモノクローナル抗体: 2G9<sup>9)</sup>, 鐘紡(株)より供与)を用いた。

採取した標本は4% paraformaldehyde / PBS液で2時間固定し、包埋後、薄切し連続切片を作製、すでにわれわれが報告した方法<sup>10)</sup>で免疫染色を施行した。trypsin処理後、1次抗体と4℃で1昼夜、2次抗体と室温で45分間、avidin-biotin-peroxidase complexと室温で30分間反応させ、diaminobenzidineで発色を行った。また連続切片を用い、抗CD68抗体(macrophage; M), 抗Leukocyte Common Antigen抗体(リンパ球), 抗

CD3抗体(Tリンパ球), 抗 $\alpha$ -Smooth Muscle Cell actin抗体(血管平滑筋細胞; SMC)の免疫染色も同様に行った。

### 3. 検討の方法・陽性細胞数の計測

AAA標本を観察すると、すでに報告したように、中膜弾性線維の層状構造の保たれた非拡張部から、次第に菲薄化し、弾性線維層をわずかにしか認めない瘤の部までが連続的に観察された。これを非拡張部・移行部・瘤部の3部に分け、非拡張部を内部controlとした。また菲薄化した中膜弾性線維層より内腔側を“内膜側”, 外側を“外膜側”とした。MMPs陽性細胞数は、非拡張部・移行部・瘤部各々の内膜側・外膜側で、0.125mm四方の陽性細胞数を各々20カ所で計測し、1mm<sup>2</sup>あたりの陽性細胞数として表した。また中膜弾性線維層、外膜側線維組織層の厚さを3部各々5カ所計測し、平均を求めた。ASO群でも同様に計測した。

### 4. 中膜弾性線維とMMPs陽性細胞分布の検討

AAAの非拡張部から瘤部にかけてのElastic-Goldner染色標本を写真撮影し、これを組み合わせ弾性線維の走行をトレースした。MMP-2, MMP-9陽性細胞についても写真撮影し、強い陽性細胞の位置を弾性線維のトレース上にプロットした。

### 5. 統計学的検定

結果は平均 ± 標準偏差で示し、多群間の比較は一元配置分散分析後、Tukey法で多重比較を行い、危険率5%未満をもって統計学的に有意とした。

## 結 果

### 1. 連続標本でみたAAAの組織像

AAAの連続標本を観察すると、中膜弾性線維層の厚さが $0.65 \pm 0.34\text{mm}$ で、構造の保たれた非拡張部から、有意に菲薄化し弾性線維をほとんど認めない瘤部( $0.11 \pm 0.12\text{mm}$ )まで連続的に観察された。内膜側はASO群、AAAいずれも肥厚し、コレステリン沈着を伴う粥状硬化像を認める例が多かった。一方、外膜側線維組織層の厚さは非拡張部で $0.44 \pm 0.40\text{mm}$ と、ASO群( $0.40 \pm 0.17\text{mm}$ )同様であったのに対し、瘤部では $0.61 \pm 0.35\text{mm}$ と肥厚を認めた。この瘤部の外膜側では、層状構造を失い細かく断裂した弾性線維が認められ、新生血管や炎症性細胞浸潤を認めた。この外膜側に浸潤するリンパ球、Tリンパ球、M<sub>1</sub>の細胞数をみると、ASO群は非拡張部とほぼ同様だったのに対し、瘤部ではいずれも非拡張部に比べ有意に多かった( $p < 0.05$ )(Fig. 1)。

### 2. MMP-2, MMP-9の発現

ASO群では、内膜肥厚部のshoulderやplaqueのcoreを形成するM<sub>1</sub>やSMCでMMP-2, MMP-9の陽性を認め、また一部外膜側のM<sub>1</sub>や好中球でも陽性を認めた。

AAAの内膜側では、ASO同様粥状硬化巣の泡沫化したSMCやplaque core, shoulderのM<sub>1</sub>でMMP-2の強い陽性を認めた(Fig. 2)。MMP-9もplaqueのcoreやshoulderのM<sub>1</sub>で陽性を認めた。

一方AAAの外膜側では、MMP-9が、外膜側に多数浸潤するM<sub>1</sub>(AIM-cell)で細胞内に顆粒状に多く観察され(Fig. 2)、またMMP-2も同様のM<sub>1</sub>で陽性を認めた。

### 3. AAAでのMMPs発現細胞の分布と中膜弾性線維の関係

中膜弾性線維の走行とMMP-2・MMP-9陽性細胞の分布のトレースをみると、MMP-2は内膜側に多く、外膜側ではMMP-9が多かった。MMP-2は弾性線維層の断裂した部に内膜側から潜り込むような形で巣状に分布する部位が多かった。MMP-9は菲薄した弾性線維層の外膜側に帯状に分布していた(Fig. 3)。

### 4. AAAにおけるMMPs陽性細胞数

内膜側でのMMP-2陽性細胞数をみると、瘤部( $856.7 \pm 363.1$ 個/ $\text{mm}^2$ )、移行部( $611.0 \pm 345.2$ 個/

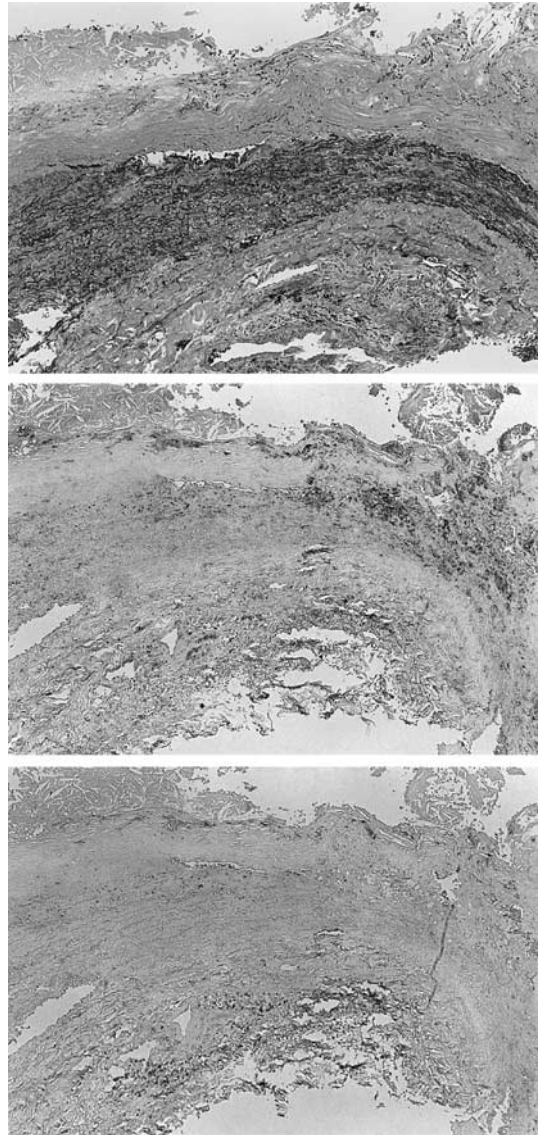


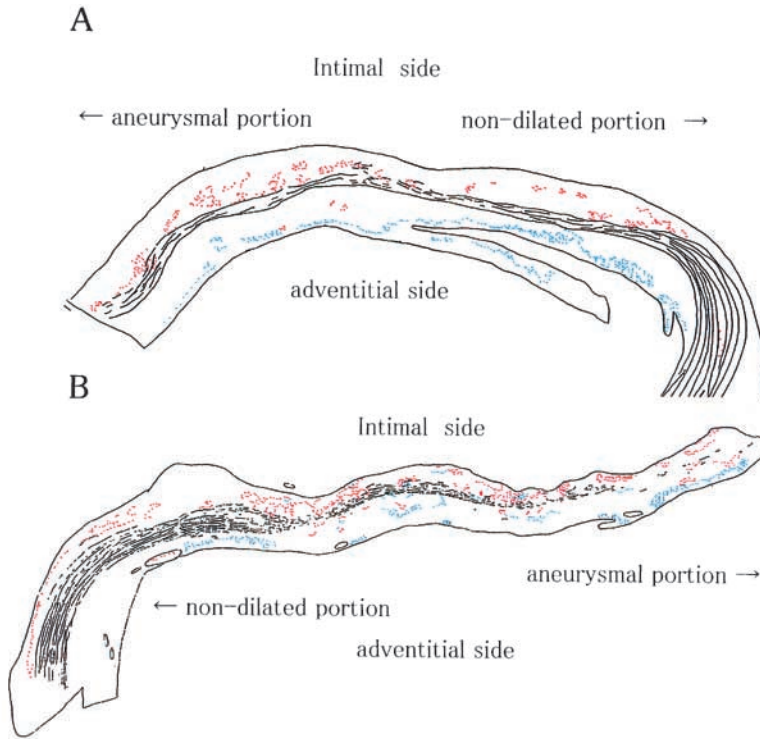
Fig. 2 Immunohistochemical demonstration of MMP-2 and MMP-9 in the transitional portion of AAA (59 y.o., male, maximum diameter 58mm).

Specimens are oriented with the lumen at top.

Upper : Elastica-Goldner staining, Middle : MMP-2, Lower : MMP-9,  $\times 10$ .

$\text{mm}^2$ )は、非拡張部( $317.7 \pm 270.5$ cells/ $\text{mm}^2$ )に比べて有意に多かったが、瘤部とASO群( $476.8 \pm 129.4$ 個/ $\text{mm}^2$ )とは有意な差を認めなかった(Fig. 4A)。

一方外膜側でのMMP-9陽性細胞数(Fig. 4B)は、ASO群( $155.2 \pm 138.8$ 個/ $\text{mm}^2$ )と非拡張部( $187.3 \pm 211.4$ 個/ $\text{mm}^2$ )は、同様の値であった。瘤

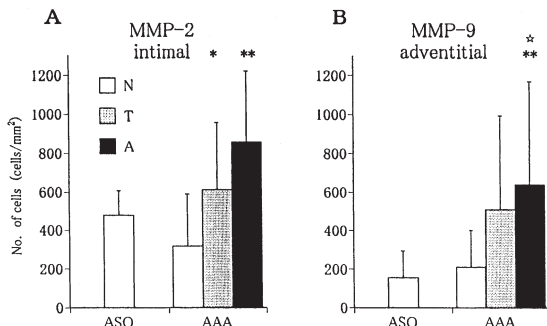


**Fig. 3** Mapping of MMP-2 and MMP-9 positive cells associated with aortic elastic fibers in AAA  
 Red dots represent MMP-2 positive cells, and blue dots represent MMP-9 positive cells.  
**A** : 64 y. o., male, maximum diameter 54mm, **B** : 73 y. o., male, maximum diameter 51mm.

部外膜側のMMP-9 ( $638.1 \pm 531.0$  個 /  $\text{mm}^2$ ) は、ASO群や非拡張部に比べて有意に多かった ( $p < 0.05$ )。内膜側のMMP-9陽性細胞数、外膜側のMMP-2陽性細胞

数は、いずれも瘤部と非拡張部に有意な差は認めず、ASO群も非拡張部とほぼ同様の値であった。

考 察



**Fig. 4** Number of MMP-2 positive cells in the intimal side (**A**) and MMP-9 positive cells in the adventitial side (**B**) of the aorta  
 cells /  $\text{mm}^2$ , error bars represent standard deviation of the mean, \* :  $p < 0.05$  vs. non-dilated portion, \*\* :  $p < 0.01$  vs. non-dilated portion, :  $p < 0.05$  vs. ASO.  
 N ; non-dilated portion, T ; transitional portion, A ; aneurysmal portion.

今回の検討ではAAAの非拡張部から瘤にかけての連続標本を用い、弾性線維の崩壊とMMPsの発現の検討を行った。その結果、弾性線維層が菲薄化するにつれ、外膜側では膠原線維の肥厚や炎症性細胞浸潤が認められたのに対し、内膜側はASOとほぼ同様で、外膜側での線維化と炎症細胞浸潤がAAAに特徴的な像であった。

MMPsの発現では、内膜側でMMP-2、外膜側でMMP-9の多くの発現を認めた。内膜側のMMP-2の発現は、瘤部とASOとに差を認めなかったのに対し、外膜側のMMP-9陽性細胞数はASO群や非拡張部に比べ有意に多かった。この外膜側でのMMP-9の発現が、AAAに特徴的な所見であり、AAA進展に大きく関与することが示唆された。

この外膜側でのMMP-9の発現は主にAIM-cells<sup>2)</sup>で

の発現であった。このAAA外膜側でのAIM-cellsの多数の浸潤やMMP-9の発現が、瘤進展の原因であるか、結果であるかは議論のあるところである<sup>11)</sup>。従来、内膜の動脈硬化病巣の進展に伴い中膜が虚血に陥り、このため中膜が崩壊し、産生されたelastin-degradation productsが白血球の遊走を促し、2次的反応として外膜側の細胞浸潤やproteaseの分泌がおこるといわれてきた<sup>12)</sup>。このような“動脈硬化性動脈瘤”として内膜病変を重視する考えに基づけば、今回の外膜側でのMMP-9の発現は“結果”を捉えているに過ぎないこととなる。

一方近年、動脈瘤外膜への炎症性細胞の出現とこれらでのMMPsの発現を動脈瘤形成に重要視する報告<sup>2-6)</sup>や、adventitial elastolysisがAAA形成の第1段階の変化であるとする報告<sup>13)</sup>がなされ、これらは外膜側での変化を1次的なものとして捉えるものである。

われわれもすでに、外膜側のMMP-9陽性細胞数と外膜側線維組織層の厚さには正の相関が存在し、またMMP-9陽性細胞数と動脈瘤拡大速度にも相関があることを報告した<sup>7)</sup>。さらに瘤径の小さな動脈瘤でも多くのMMPs発現を認めること、移行部でもMMPs発現がみられることなどから考えれば、外膜側へのMの浸潤とMMPsの分泌は、動脈瘤発生の早期からの所見と考えられ、単に“結果”と考えるよりは、瘤進展に関与すると考える方が妥当と考えられる。

これらの結果から動脈瘤の中膜破壊は外膜側からも破壊が進行していると考えられ、これにはAIM cellsでのMMP-9発現が大きな役割を果たしていると考えられた。

## 文 献

- 1) McMahan, M. P., Faris, B., Wolfe, B. L. et al. : Ageing effects on the elastin composition in the extracellular matrix of cultured rat aortic smooth muscle cells. *In Vitro Cell Dev. Biol.*, **21** : 674-680, 1985.
- 2) Tilson, M. D. and Newman, K. M. : Proteolytic mechanisms in the pathogenesis of aortic aneurysms. In : *Aneurysms. New Findings and Treatments.* J. S. T. Yao and W. H. Pearce, eds., Nortwalk, 1994, Appleton & Lange, pp. 3-10.
- 3) McMillan, W. D., Patterson, B. K., Keen, R. R. et al. : In situ localization and quantification of seventy-two-kilodalton type IV collagenase in aneurysmal, occlusive and normal aorta. *J. Vasc. Surg.*, **22** : 295-305, 1995.
- 4) Thompson, R. W., Holmes, D. R., Mertens, R. A. et al. : Production and localization of 92-kilodalton gelatinase in abdominal aortic aneurysms : An elastolytic metalloproteinase expressed by aneurysm-infiltrating macrophages. *J. Clin. Invest.*, **96** : 318-326, 1995.
- 5) Sakalihan, N., Delvenne, P., Nusgens, B. V. et al. : Activated forms of MMP2 and MMP9 in abdominal aortic aneurysms. *J. Vasc. Surg.*, **24** : 127-133, 1996.
- 6) McMillan, W. D., Patterson, B. K., Keen, R. R. et al. : In situ localization and quantification of mRNA for 92-kD type IV collagenase and its inhibitor in aneurysmal, occlusive and normal aorta. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **15** : 1139-1144, 1995.
- 7) 渡辺徹雄, 澤井高志, 佐藤 成他 : 腹部大動脈瘤進展におけるMatrix metalloproteinasesの役割. 脈管学 (印刷中)
- 8) Margulies, I. M. K., Höyhty, M., Evans, C. et al. : Urinary type IV collagenase : Elevated levels are associated with bladder transitional cell carcinoma. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **1** : 467-474, 1992.
- 9) 関 雅之, 宇月美和, 大本弘志他 : 慢性関節リウマチ患者におけるMatrix metalloproteinase 9(MMP-9)の発現と動態. *リウマチ*, **35** : 792-801, 1995.
- 10) 澤井高志, 宇月美和, 高橋裕一他 : パラフィン切片を用いたサイトカインの免疫染色学的方法. *病理と臨床*, **10** : 1067-1070, 1992.
- 11) Shah, P. K. : Inflammation, metalloproteinases, and increased proteolysis ; An emerging pathophysiological paradigm in aortic aneurysm. *Circulation*, **96** : 2115-2117, 1997.
- 12) Holmes, D. R., Liao, S., Parks, W. C. et al. : Medial neovascularization in abdominal aortic aneurysms : A histopathologic marker of aneurysmal degeneration with pathophysiologic implications. *J. Vasc. Surg.*, **21** : 761-772, 1995.
- 13) White, J. V., Haas, K., Phillips, S. et al. : Adventitial elastolysis is a primary event in aneurysm formation. *J. Vasc. Surg.*, **17** : 371-381, 1993.

## **A Mapping Analysis of the Distribution of MMP-2 and MMP-9 in the Wall of Abdominal Aortic Aneurysms and Correlation with the Disruption of Elastic Fibers**

Tetsuo Watanabe<sup>1</sup>, Takashi Sawai<sup>2</sup>, Akira Sato<sup>1</sup> and Susumu Satomi<sup>1</sup>

1 Second Department of Surgery, Tohoku University School of Medicine

2 First Department of Pathology, School of Medicine, Iwate Medical University

**Key words** : Abdominal aortic aneurysm (AAA) , Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) ,  
Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2)

In order to examine the correlation between the expression of matrix metalloproteinases (MMPs) of the aortic wall with its disruption of lamellar elastic structure, abdominal aortas surgically removed from 17 patients because of aneurysm were serially sliced from the non-dilated to aneurysmal portions, with all the slices submitted to immunohistochemical analysis of MMP-2 and MMP-9. Surgical specimens from 5 patients with atherosclerotic occlusive disease (ASO) served as controls.

Mapping of the result of immunohistochemistry disclosed that both MMP-2 and MMP-9 were strongly in terms of intensively expressed in the same regions where the lamellar elastic fibers were severely disrupted. Cells positive for MMP-2 were found to gather on the intimal side of the aneurysmal wall, while those positive for MMP-9 were shown to be present in the adventitia. In terms of the number of MMP-2 expressing cells, however, there was no significant difference among the non-dilated, transitional and aneurysmal parts of the aorta.

In ASO, the expression of MMP-2 did not seem to have any bearing on the elastic fiber disruption. On the other hand, the number of MMP-9 positive cells in the adventitia of the aneurysmal sac was shown to be significantly higher than in the non-dilated portion of aorta or in ASO.

Thus it appears that MMP-9 expressed by macrophages play an important role in progression of abdominal aortic aneurysms. (*Jpn. J. Vasc. Surg.*, **9** : 539-544, 2000)