

〈特集：ゲノム解析で見つかったProtein Markerの意義
—PTX3は新たな炎症マーカーとして認知されるか—〉

冠動脈プラーク、血栓とPTX3

畠山 金太、浅田 祐士郎

Coronary plaque, thrombosis and PTX3

Kinta Hatakeyama and Yujiro Asada

Summary Chronic vascular inflammation plays an important role in atherogenesis and plaque instability. PTX3, a member of the pentraxin family, is composed of short and long pentraxin, and is a prototypically long pentraxin synthesized by diverse cell types in atherosclerotic lesions in response to inflammatory stimuli. PTX3 is a multifunctional pattern-recognition molecule modulating innate immunity and inflammation, and may be involved in plaque instability and acute coronary syndrome.

Key words: Coronary atherosclerotic plaque, Inflammation, Thrombosis, PTX3, CRP

I. はじめに

動脈硬化の発生・進展や心筋梗塞などの心血管イベント発症の鍵を握っているのは血管壁における炎症反応である。Pentraxin 3 (PTX3) と C-reactive protein (CRP) はペントラキシンファミリーに属する急性期タンパク質で生体内の炎症を反映するマーカーとして、心筋梗塞をはじめ数多くの疾患においてその臨床的有用性が報告されている。CRPはIL-6などの刺激により肝臓で産生されるのに対して、PTX3は炎症局所の内皮細胞、線維芽細胞、平滑筋細胞などで産生されるため末梢組織の炎症状態をより鋭敏に反映するマーカーとして期待されている。また、PTX3とCRPは単なるマーカーとしての意義だけ

ではなく、補体やマクロファージの活性化など多彩な作用を通じて病態に関与することが報告されている¹⁾。

急性冠症候群（急性心筋梗塞、不安定狭心症、心臓性突然死）は、冠動脈の硬化巣（プラーク）の破綻（破裂あるいはびらん）により血管内腔に血栓が形成され、内腔が閉塞ないし亜閉塞をきたして発症する。プラーク破綻の原因や破綻後に血管内腔で血栓が成長するメカニズムについては完全には解明されていないが、炎症反応が重要な役割を果たすと考えられる。

本稿では、ヒトの剖検例、アテレクトミーや血栓吸引法で得られた標本における病理学的検討を中心に、冠動脈プラークの進展、血栓形成とPTX3に関する知見を紹介する。

宮崎大学医学部 病理学講座 構造機能病態学分野
〒889-1692 宮崎県宮崎市清武町木原5200

Department of Pathology, Faculty of Medicine, University of Miyazaki,
5200 Kihara, Kiyotake, Miyazaki 889-1692, Japan

1. 冠動脈プラークの形態的特徴

一般的にプラークと呼ばれる病変は、斑状の盛り上がりを示し、中心に壊死組織（脂質コアあるいは粥腫粥と呼ばれる）を含み、表面はコラーゲンを主成分とする線維性被膜で覆われた内膜の病変である。プラーク構成成分としては、平滑筋細胞、マクロファージやリンパ球などの炎症細胞、プロテオグリカン、コラーゲンなどの細胞外基質を認める。後述するようにプラークの組織像は多様であり、脂質成分や線維成分の多寡により不安定プラーク（AHA分類ではTypeⅣ病変）や線維性プラーク（TypeⅢ病変）などと呼ばれる。

2. 炎症反応とプラークの進展、不安定化

粥腫粥（脂質コア）を多量に含むプラーク

（lipid-rich plaque）（図1）は破綻しやすく不安定プラークとも呼ばれており、プラーク内にはマクロファージとTリンパ球の浸潤を認める（図2）。これらの炎症細胞の浸潤は特に肩の部分（shoulder region）、線維性被膜直下や脂質コアの底部（plaque base）に多く認め、プラーク進展や不安定化との関連が示唆されており、特に、マクロファージはプラーク破綻に深く関与するとされている。マクロファージを中心とした炎症細胞は血管内腔側から直接あるいはプラーク内の新生血管を介して浸潤してくる。新生血管はプラーク内の低酸素状態や炎症性刺激に対して主にvaso vasorumより誘導されたもので活動性プラークの指標としても注目されている。また、新生血管は後述するプラーク内出血の原因となることが報告されている。

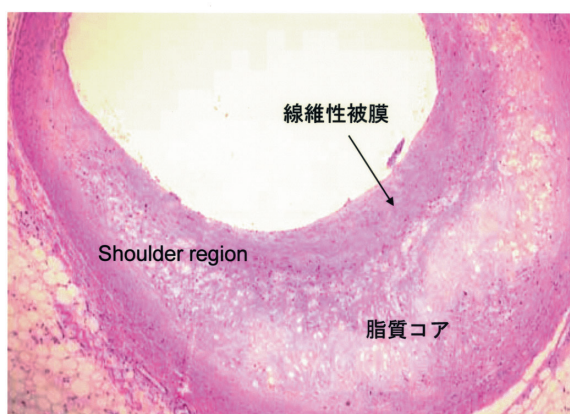


図1 冠動脈プラーク（Lipid-rich plaque）。プラーク内に大きな脂質コアを認める。

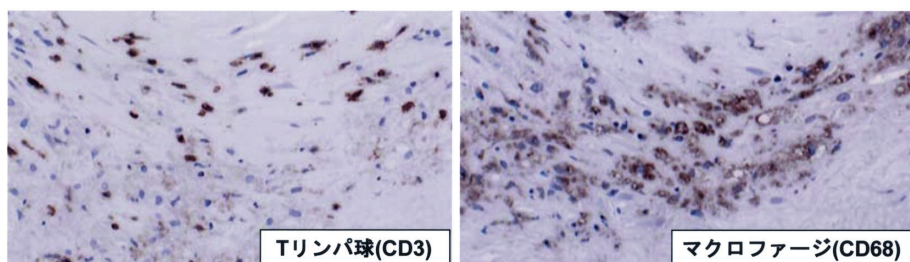


図2 冠動脈プラークにおける炎症細胞の浸潤。
線維性被膜や肩の部分（shoulder region）には多数のTリンパ球とマクロファージの浸潤を認める（免疫染色）。

3. 冠動脈プラークにおけるPTX3、CRPの発現

冠動脈プラークにおけるPTX3とCRPの発現は、初期病変に比し進行病変で亢進している。進行病変においては主に細胞外マトリックスに陽性であり、マクロファージや平滑筋細胞にも発現している^{2,3)}。しかし、PTX3とCRPの分布様式には明確な差を認めCRPは主に脂質コアを中心として分布するのに対してPTX3は内皮細胞直下の間質（図3）や出血部に陽性である（図4）。プラーク出血は急性冠症候群患者の冠動脈プラークには高頻度（30–40%以上）に認められ、多発性に生じており、プラーク内圧の上昇、赤血球の溶血による酸化ストレスの増強や膜脂質の沈着によりプラーク不安定化を助長するとともにプラーク破綻にも関与すると考えら

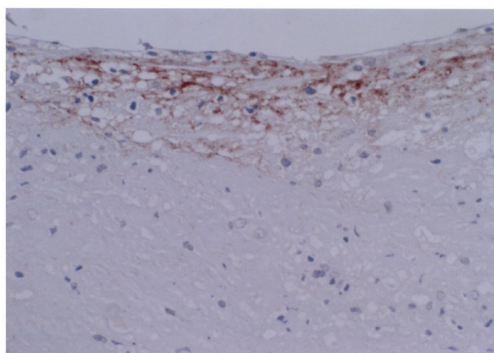


図3 冠動脈プラークにおけるPTX3免疫染色。内皮細胞直下の間質にPTX3陽性像を認める。

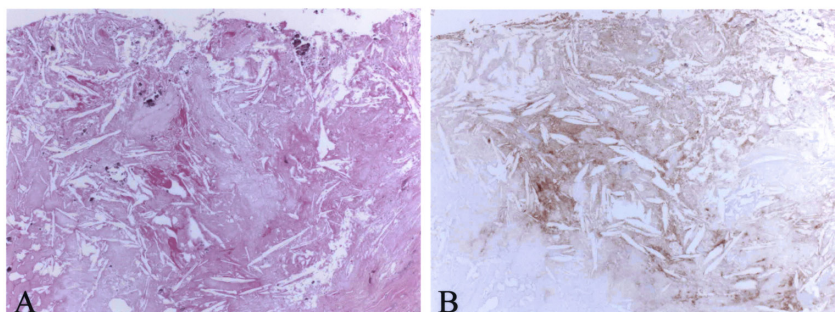


図4 冠動脈プラークにおけるPTX3。
(A) プラーク出血を伴うType VI lesion (AHA分類)。
(B) プラーク出血部にPTX3陽性像を認める (免疫染色)。

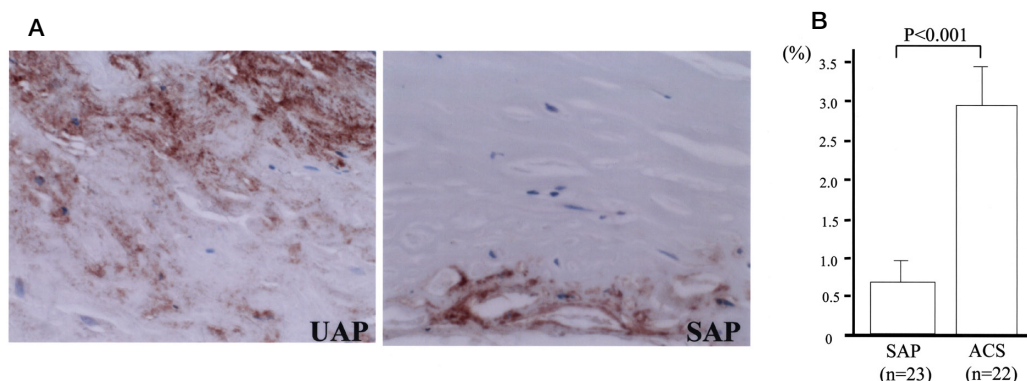


図5 狭心症患者の冠動脈プラークにおけるPTX3（アテレクトミー標本）
(A) 不安定狭心症患者（UAP）と安定狭心症（SAP）患者の冠動脈責任病変におけるPTX3陽性像（免疫染色）。
(B) 安定狭心症（SAP）に比し急性冠症候群（ACS）患者の冠動脈プラークでは有意にPTX3の陽性面積率が高値であった。

れている。このようなプラーク出血部にPTX3が特異的に陽性像を示すことは、PTX3のマーカーとしての意義を考える上で重要である。すなわち、CRPは酸化LDLの沈着などにより惹起された血管壁の炎症状態を反映するのに対して、PTX3は炎症に加えてプラーク出血を合併したより危険性の高いプラークのマーカーと考えられる。

4. PTX3とプラーク不安定化

狭心症患者の冠動脈責任病変から採取したアテレクトミー標本を用いた検討では、PTX3とCRPの陽性率は安定狭心症に比し不安定狭心症において有意に高値を示したことよりプラーク不安定化への関与が示唆される³⁾ (図5)。CRPは血管壁の構成細胞に対し多彩な作用を示す。内皮細胞ではVCAM-1、ICAM-1などの接着因子発現を増加させ、マクロファージでは組織因子、PAI-1 (プラスミノゲンアクチベーターインヒビター-1)、CD40/CD40L、MMPs (matrix metalloproteinases) 発現を促進し、平滑筋細胞ではROS産生や新生内膜の形成を促進することが報告されており、CRPはこれらの作用を介して動脈硬化の進展とプラーク不安定化を促進すると考えられる。PTX3については補体の活性化やオプソニン効果など炎症・免疫反応の活性化に重要であると考えられるが、動脈硬化に対する作用は不明な点が多い。一方、アテレクトミー後の再狭窄との関連性についてはCRP陽性率の高い群では再狭窄率が高値であったのに対して³⁾、PTX3では逆に陽性率の高い群において再狭窄率は低かった。PTX3はbFGFのアンタゴニストとして血管平滑筋細胞の遊走を抑制し⁴⁾、さらに血管新生に対しても抑制作用を示す^{5,6)}。さらに、最近ではPTX3欠損マウスを用いた実験でプラーク内でのマクロファージ集積が亢進したとの報告がなされた⁷⁾。これらの結果から冠動脈プラーク内に発現するPTX3は動脈硬化に対して抑制的に作用する可能性が示唆される。

5. マクロファージのフェノタイプと動脈硬化

近年、マクロファージには活性化様式の違いからM1 (classic activation) とM2 (alternative activation) というsubpopulationが存在し、動脈硬化に対してそれぞれ促進的あるいは抑制的に

働いていることが報告されている⁸⁾。M1マクロファージからはIL-6、IL-12、IL-18、TNF、IFN-gammaなどのproatherogenicなサイトカインが産生され、一方、M2マクロファージからはIL-10などのatheroprotectiveなサイトカインが産生される。我々の検討では、不安定狭心症の冠動脈責任病変では主にマクロファージにIL-18とIFN-gammaの過剰発現がみられ⁹⁾、また、IL-10も同様に過剰発現していた¹⁰⁾。特に、IL-10は不安定狭心症の独立した予測因子となることが明らかとなった¹⁰⁾。最近、プラーク出血に対してCD163陽性マクロファージ (M2マクロファージ) からIL-10が産生されることが報告された¹¹⁾。このように動脈硬化の進展に対して拮抗的に作用するファクターのバランスによりその進行は制御される可能性がある。

6. M2マクロファージとPTX3

興味深いことに単球におけるPTX3発現はIL-10で促進されIFN-gammaで抑制される。前述したように冠動脈プラークにおいてはプラーク出血部 (AHA分類ではType VI lesion) の間質とマクロファージでPTX3の強い発現を認めるが、同部にはCD68陽性/CD163陽性M2マクロファージが局在している。一方、出血を伴わない不安定プラーク (AHA分類ではType IV lesion) の脂質コアにはCRP陽性像を認めるが、同部にはCD68陽性/CD163陰性M1マクロファージが局在する。このように冠動脈プラークにおけるPTX3とCRPの局在については、プラークの進行度あるいはその種類により発現パターンが変化しさらにマクロファージのフェノタイプ変換が関連している。このフェノタイプ変換はIL-10を介すると考えられるがその意義は不明である。M2マクロファージは組織の修復ないし治癒過程において重要な役割を果たすことより、プラーク出血に対する組織修復を促進するシグナル経路とも考えられる。PTX3とCRPを臨床的なマーカーとして使用する時、その差異を理解しておくことは病態を理解する上でも重要と思われる。

7. 冠動脈プラークの破綻と炎症

心筋梗塞の70-80%はプラーク破裂により発症すると考えられている¹²⁾。プラーク破裂とはプラークの線維性被膜が断裂しプラーク内の脂

質コアが流血と接する病変である。プラーク破裂の原因としては、プラーク側の要因（脂質コアの大きさと成分、線維性被膜の厚さ、被膜の平滑筋細胞数、被膜の炎症細胞浸潤の程度、プラーク内出血）と外的因子（心拍動、動脈壁への張力、スパズム）の関与が重要視されているが不明な点が多い¹³⁾。プラーク内で炎症反応が持続するとマクロファージからMMPsの産生が増加して線維性被膜が菲薄化し、プラークが破裂しやすくなると考えられている。CRPはプラーク内における炎症反応の持続、平滑筋細胞のアポトーシス誘導、内皮機能障害や過凝固性の促進（組織因子の産生増加）などを介してプラーク破裂による急性冠症候群の発症に関与すると考えられる。PTX3はプラーク出血部に陽性像を認めるため急性冠症候群の発症に深く関連す

ると推定されるがその詳細は不明である。一方、冠動脈血栓による突然死の約20-30%はプラーク破裂ではなく、プラーク表層のびらんによると報告されている¹²⁾。プラークびらんでは内皮細胞の剥離、内皮下組織の細胞外マトリックス成分の変化、血液の凝固性亢進や血流の異常（血行力学的因子、シェアストレス）がより重要な因子と考えられる。

8. 吸引血栓における好中球とPTX3

近年、心筋梗塞に対する治療法として冠動脈血栓を直接吸引する血栓吸引療法が行われている。この治療法の目的は、プラーク破綻部に生じた血栓とプラーク内容物を吸引し、冠動脈の再灌流をはかるとともに末梢塞栓症を軽減して心筋微小循環を保護することである。吸引血栓

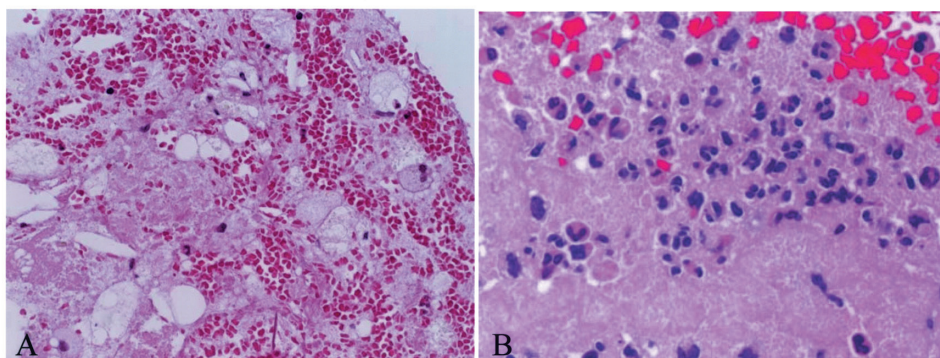


図6 心筋梗塞患者の冠動脈から吸引された血栓。
(A) コレステロール結晶、泡沫細胞などのプラーク成分を認める。(B) 多数の好中球を認める。

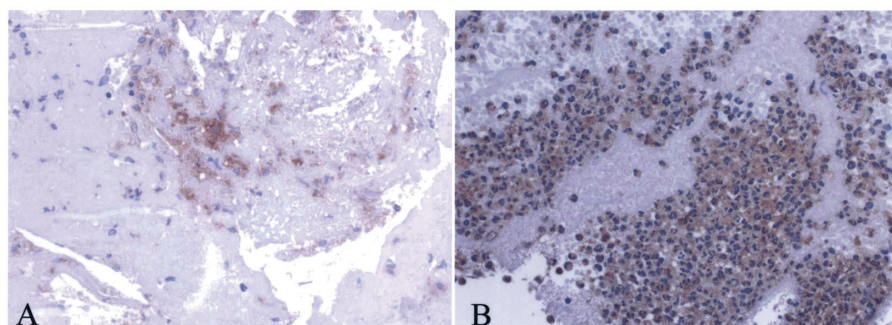


図7 吸引血栓におけるPTX3
(A) プラーク成分では間質とマクロファージにPTX3陽性像を認める（免疫染色）。
(B) 多数の好中球にPTX3陽性像を認める（免疫染色）。

中には、血小板とフィブリン以外に血管壁成分としてプラーク組織（コレステロール結晶、泡沫細胞など）、コラーゲンに富んだ内膜組織や平滑筋細胞などを認め、また血球成分として好中球、好酸球、単球、リンパ球などを認める（図6）。筆者らは血栓中の好中球数に着目して臨床的なパラメーター（糖尿病などのリスクファクター、TIMI grade、入院時CRP、造影上の血栓の大きさ、max CPK、慢性期心機能など）を用いて比較検討すると、1)血栓中の好中球数と発症からの経過時間、2)好中球数とmax CPK、3)好中球数と血栓の大きさ、に有意な相関を認めた。また、CD45陽性の単核球（リンパ球）数も発症後の経過時間とともに増加した。活性化血小板にはP-セレクチンが発現しており、白血球（好中球とリンパ球）の動員も促進されて血栓の成長に関与すると考えられる。血栓内に存在する白血球の意義については、活性化血小板上のP-セレクチンとの結合を介する作用により血栓成長を促進するとともにケミカルメディエーターの放出による微小血管の攣縮作用も考えられる。このような血栓中にはPTX3蛋白質の局在を認める。特に、強い発現を認める細胞は好中球であり、吸引血栓中の多数の好中球に陽性像を認める（図7B）。また、プラーク成分の細胞外マトリックスとマクロファージには強い

PTX3陽性像を認める（図7A）。このように心筋梗塞を引き起こした冠動脈責任病変において強いPTX3の陽性像を認めることは重要な所見と思われる。その意義については不明な点が多いが基本的には冠動脈血栓による心筋梗塞に対する生体の修復反応として出現していると考えられる。

9. 血栓形成とPTX3

現在までの動脈血栓の形成に関する実験的知見を要約すると以下の1)から5)のようになる。1)内皮細胞が剥離して動脈内膜内のコラーゲンと血液中の von Willebrand 因子（vWF）が結合し、さらに血小板 Glycoprotein (GP) I bとvWFが結合する、2)血小板がコラーゲンレセプターを介して粘着し、血小板からADP、セロトニン、トロンボキサンA2などの生理活性物質が放出され周囲の血小板を活性化する、3)活性化血小板GP II b-III aとvWF・フィブリンノーゲンが結合し血小板が凝集する、4)血小板膜上での凝固反応が進行してフィブリンが形成される、5)最終的に安定化した壁在血栓が形成される。これらの過程に対するCRPの作用としてGP II b-III aに結合することにより血小板凝集を抑制することが報告されている一方、mCRP（modified/monomeric CRP）は活性化血小板上のP-セレクチンを介する白血

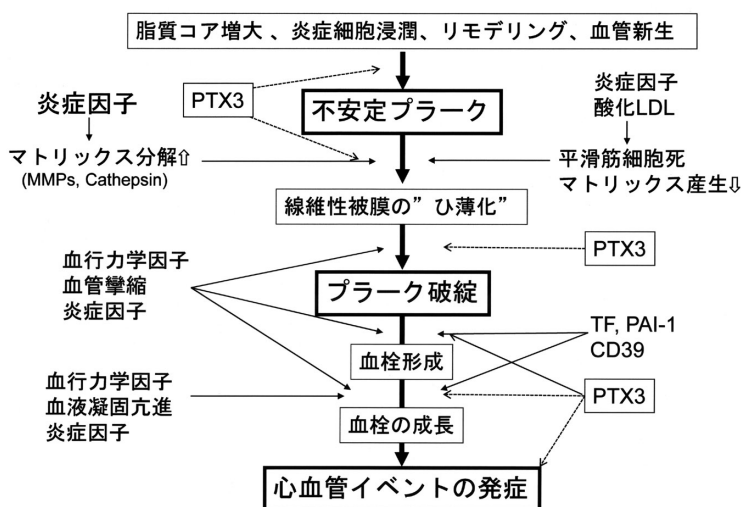


図8 急性冠症候群の発症におけるPTX3の関与

球-血小板の結合を促進する^{14,15)}。PTX3はP-セレクチンを介する内皮細胞-白血球の結合を阻害し、白血球の遊走を抑制する¹⁶⁾。フローチャンバーを用いた筆者らの検討ではPTX3は血小板凝集を抑制し、この抑制作用はPTX3のN末側が関与していたが詳細な機序は不明である。

心血管イベント発症には、プラーク破綻部における血栓形成・成長や末梢塞栓あるいは血管攣縮が関与していると考えられる。心筋梗塞の発症には到らないサイレントなプラーク破綻は稀ではないことから、イベント発症には破綻部における血栓の成長が重要であると考えられる。血栓の成長は、前述したような血小板の活性化以外にも多くの因子が関与しており、プラーク内あるいは血液中の組織因子¹⁷⁾、組織因子経路インヒビター (TFPI)、プロスタサイクリン (PGI₂)、プラズミノゲンアクチベーター (PA)、PAI-1、Ecto-NTPDase/CD39¹⁸⁾、一酸化窒素 (NO) などの凝固線溶因子の微妙なバランスや血流などにより制御されている。特に、心筋梗塞は冠動脈プラークを基盤に発症することからプラークの過凝固性は非常に重要な因子と考えられる。プラーク内では、血小板活性化能の強いI型、III型コラーゲンが増加し、また外因系凝固反応の引き金である組織因子が大量に発現し、さらに、PA活性の低下とそのインヒビター (PAI-1) の増加も報告されている。PTX3は、単球・マクロファージや内皮細胞に対して組織因子の発現を促進することから、プラーク内の過凝固性に関与すると考えられる¹⁾。

II. 終わりに

近年、心筋梗塞の病態解明が急速に進みプラーク破綻の分子機構や血小板・凝固系の活性化機構も解明されてきているが、その過程における炎症の重要性が注目されている。また心筋梗塞は全身病としての側面も有しており、全身性の炎症、易血栓性の血液あるいは致死的な不整脈に陥りやすいvulnerable myocardiumを有する場合も発症に関与することが報告されてきている。PTX3は炎症反応の調節、血小板の活性化抑制、組織因子の発現調節や心筋細胞の保護¹⁹⁾など多彩な機能を通じて心筋梗塞の発症あるいは病態の修飾に関与していると考えられる (図8)。

今後、PTX3の有する多彩な作用に対する更なる理解を深め、プラーク進展の抑制、血栓の制御、そして心血管イベント発症の抑制へ繋げてゆくことが期待される。

引用文献

- 1) Bottazzi B, Garlanda C, Cotena A, Moalli F, Jaillon S, Deban L, Mantovani A: The long pentraxin PTX3 as a prototypic humoral pattern recognition receptor: interplay with cellular innate immunity. *Immunol Rev*, 227(1): 9-18, 2009.
- 2) Savchenko A, Imamura M, Ohashi R, Jiang S, Kawasaki T, Hasegawa G, Emura I, Iwanari H, Sagara M, Tanaka T, Hamakubo T, Kodama T, Naito M: Expression of pentraxin 3 (PTX3) in human atherosclerotic lesions, *J Pathol*, 215: 48-55, 2008.
- 3) Ishikawa T, Hatakeyama K, Imamura T, et al.: Involvement of c-reactive protein obtained by directional coronary atherectomy in plaque instability and developing restenosis in patients with stable or unstable angina pectoris. *Am J Cardiol*, 91: 287-292, 2003.
- 4) Camozzi M, Zaccagna S, Rusnati M, Coltrini D, Ramirez-Correa G, Bottazzi B, Mantovani A, Giacca M, Presta M: Pentraxin 3 inhibits fibroblast growth factor 2-dependent activation of smooth muscle cells in vitro and neointima formation in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25: 1837-42, 2005.
- 5) Rusnati M, Camozzi M, Moroni E, Bottazzi B, Peri G, Indraccolo S, Amadori A, Mantovani A, Presta M: Selective recognition of fibroblast growth factor-2 by the long pentraxin PTX3 inhibits angiogenesis. *Blood*, 104: 92-9, 2004.
- 6) Inforzato A, Baldock C, Jowitt TA, Holmes DF, Lindstedt R, Marcellini M, Rivieccio V, Briggs DC, Kadler KE, Verdoliva A, Bottazzi B, Mantovani A, Salvatori G, Day AJ: The angiogenic inhibitor long pentraxin PTX3 forms an asymmetric octamer with two binding sites for FGF2. *J Biol Chem*, 285: 17681-92, 2010.
- 7) Norata GD, Marchesi P, Pulakazhi Venu VK, Pasqualini F, Anselmo A, Moalli F, Pizzitola I, Garlanda C, Mantovani A, Catapano AL: Deficiency of the long pentraxin PTX3 promotes vascular inflammation and atherosclerosis. *Circulation*, 120: 699-708, 2009.
- 8) Shimada K: Immune system and atherosclerotic disease. Heterogeneity of leukocyte subsets participating in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circ J*, 73: 994-1001, 2009.
- 9) Nishihira K, Imamura T, Hatakeyama K, et al.: Expression of interleukin-18 in coronary plaque

- obtained by atherectomy from patients with stable and unstable angina. *Thromb Res*, 121: 275-279, 2007.
- 10) Nishihira K, Imamura T, Yamashita A, Hatakeyama K, Shibata Y, Nagatomo Y, Date H, Eto T, Asada Y: Increased Expression of Interleukin-10 in Unstable Plaque Obtained by Directional Coronary Atherectomy. *Eur Heart J*, 27: 1685-1689, 2006.
- 11) Boyle JJ, Harrington HA, Piper E, Elderfield K, Stark J, Landis RC, Haskard DO: Coronary intraplaque hemorrhage evokes a novel atheroprotective macrophage phenotype. *Am J Pathol*, 174: 1097-108, 2009.
- 12) Sato Y, Hatakeyama K, Yamashita A, Marutsuka K, Sumiyoshi A, Asada Y: Proportion of fibrin and platelets differs in thrombi on ruptured and eroded coronary atherosclerotic plaques in humans. *Heart*, 91: 526-30, 2005.
- 13) Fuster V, Fayad ZA, Moreno PR, Poon M, Corti R, Badimon JJ: Atherothrombosis and high-risk plaque: Part II: approaches by noninvasive computed tomographic/magnetic resonance imaging. *J Am Coll Cardiol*, 46: 1209-18, 2005.
- 14) Brennan MP, Moriarty RD, Grennan S, Chubb AJ, Cox D: C-reactive protein binds to alphaIIb beta3. *J Thromb Haemost*, 6: 1239-41, 2008.
- 15) Molins B, Peña E, Vilahur G, Mendieta C, Slevin M, Badimon L: C-reactive protein isoforms differ in their effects on thrombus growth. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 28: 2239-46, 2008.
- 16) Deban L, Russo RC, Sironi M, Moalli F, Scanziani M, Zambelli V, Cuccovillo I, Bastone A, Gobbi M, Valentino S, Doni A, Garlanda C, Danese S, Salvatori G, Sassano M, Evangelista V, Rossi B, Zenaro E, Constantin G, Laudanna C, Bottazzi B, Mantovani A: Regulation of leukocyte recruitment by the long pentraxin PTX3. *Nat Immunol*, 11: 328-34, 2010.
- 17) Hatakeyama K, Asada Y, Marutsuka K, et al.: Localization and activity of tissue factor in human aortic atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis*, 133: 213-219, 1997.
- 18) Hatakeyama K, Hao H, Imamura T, et al.: Relation of CD39 to plaque instability and thrombus formation in directional atherectomy specimens from patients with stable and unstable angina pectoris. *Am J Cardiol*, 95: 632-635, 2005.
- 19) Salio M, Chimenti S, De Angelis N, Molla F, Maina V, Nebuloni M, Pasqualini F, Latini R, Garlanda C, Mantovani A: Cardioprotective function of the long pentraxin PTX3 in acute myocardial infarction. *Circulation*, 117: 1055-64, 2008.