

Fig. 4. Real-time quantitative RT-PCR analysis. Expression of monocyte chemoattractant protein (MCP)-1 (A), tumor necrosis factor (TNF)- α (B), intracellular adhesion molecule (ICAM)-1 (C), CD68 (D), vascular endothelial growth factor (VEGF)-A (E), p47 (F), glutathione peroxidase (GPX)1 (G), and GPX3 (H) in the aortic wall. Data are mean \pm SD ($n = 6-10$ for each group). * $p < 0.05$ vs. Sham/CON, † $p < 0.05$ vs. AAA/CON.

MMP-2 and pro-MMP-2 bands was measured as total MMP-2 activity.

2.5. Immunoblotting analysis

For Western blotting, preparation of aortic tissue and measurements of protein concentration were performed as described in the section of gelatin zymography. Immunoblotting analysis was carried out as previously described [20]. Equal amounts of 10 μ g protein were electrophoresed on 10% SDS polyacrylamide gels (150 V, 60 min). Proteins were electroblotted onto nitrocellulose membranes (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) for 60 min at 100 V. After blocking with 5% non-fat dried milk in Tris buffered saline for 60 min, the membranes were incubated with the first antibody p65 (#3034, Cell Signaling Technology) and phospho-p65 (#3033, Cell Signaling Technology) for 60 min, followed by exposure to the second antibody for 60 min. GAPDH (sc-25778, Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, USA) immunoblot was used for protein loading control. The immunoblots were developed by enhanced chemiluminescence method. The signals were quantified by densitometry (GS-800, Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

2.6. Statistical analysis

Categorical variables were reported as frequencies with percentages, and compared between groups using chi-squared test (with Yates' continuity correction). All continuous data were

expressed as mean value \pm SD. Statistical significance of differences between multiple groups was determined using ANOVA and post hoc analysis with Bonferroni test. Statistical significance was defined as a p value of < 0.05 . All statistical analyses were performed using SPSS 15.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

3. Results

3.1. Resveratrol prevented the development of AAA

Six weeks after the operation, the diameter of the abdominal aorta was larger in AAA/CON than in Sham/CON (1.3 ± 0.1 vs. 0.8 ± 0.1 mm, $p < 0.01$). The aortic diameter was decreased in AAA/RSVT compared with AAA/CON (0.9 ± 0.1 vs. 1.3 ± 0.1 mm, $p < 0.05$, Fig. 1). Body weight, blood pressure, and heart rate were comparable among the three groups (Supplemental Table 1).

3.2. Resveratrol attenuated inflammation and oxidative stress, and preserved ECM structure

HE staining showed that infiltration of inflammatory cells in the aortic wall was more prominent in AAA/CON than in Sham/CON. However, it was attenuated in AAA/RSVT (Fig. 2A-F). EVG staining showed that the wavy structure of elastin was flattened in AAA/CON compared with Sham/CON. Administration of resveratrol preserved the wavy structure of the elastic lamellae (Fig. 2G-L). Victoria Blue staining showed that the

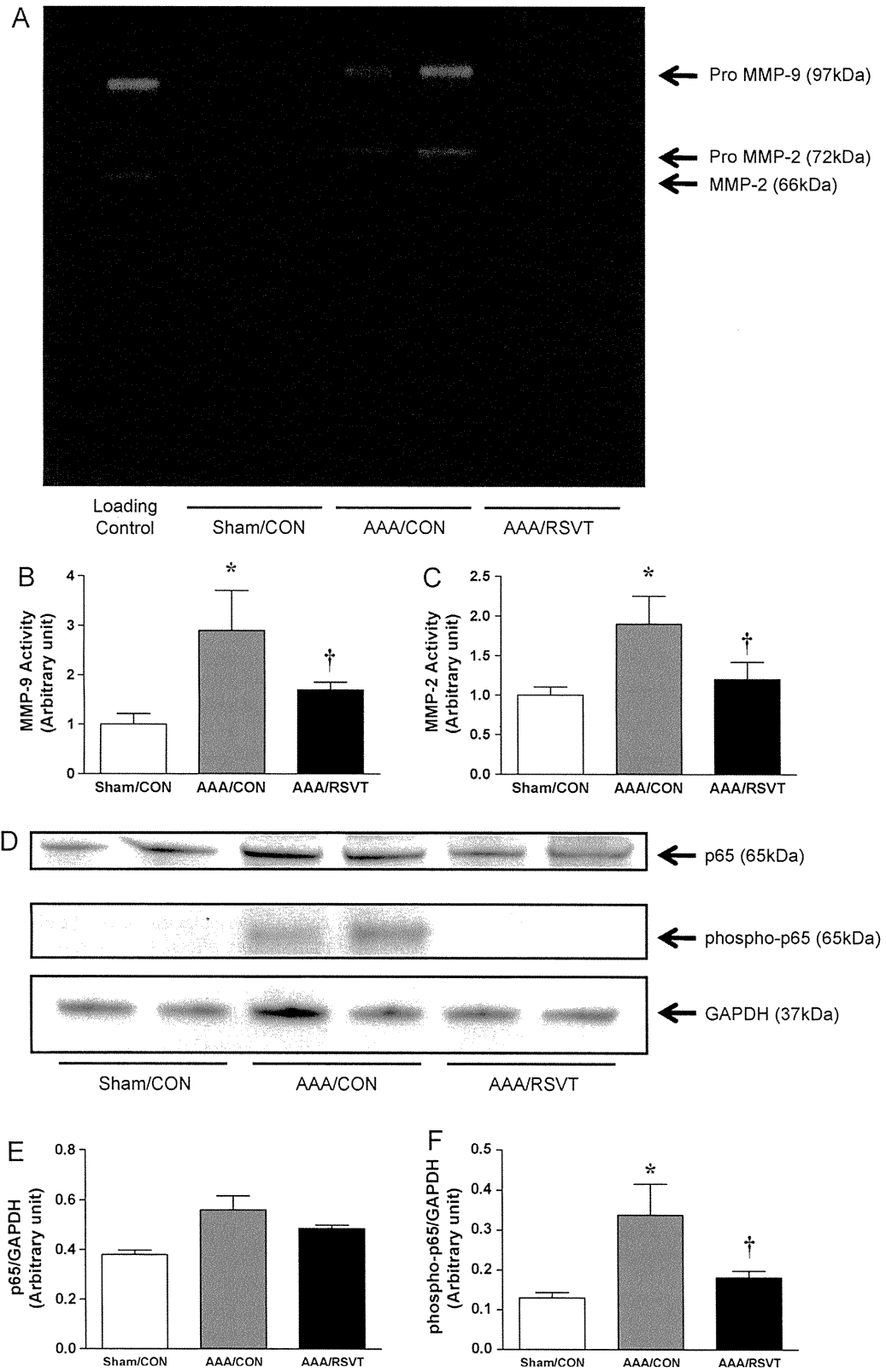


Fig. 5. Representative gelatin zymography of mouse aortic wall is shown (A). The left end lane in the gel is the loading control. Gelatin zymographic activity of matrix metalloproteinase (MMP)-9 (B) and MMP-2 (C) in the aortic wall. Representative immunoblotting of mouse aortic wall is shown (D). Protein expression of p65 (E) and phospho-p65 (F) in the aortic wall. Data are mean \pm SD ($n = 4-8$ for each group). * $p < 0.05$ vs. Sham/CON, † $p < 0.05$ vs. AAA/CON.

elastin structure stained blue of the aortic wall in AAA/CON was decreased than that in Sham/CON. Treatment with resveratrol partially restored the elastin structure in AAA (see Supplemental Fig. S1). Picrosirius Red staining showed that the collagen structure of the aortic wall in AAA/CON was thinner than that in Sham/CON. Treatment with resveratrol preserved the thick collagen structure of the aortic wall (AAA/RSVT) (see Supplemental Fig. S2). DHE fluorescence was enhanced in the aortic wall of AAA/CON compared with Sham/CON. However, it was decreased in AAA/RSVT compared with AAA/CON, suggesting attenuation of oxidative stress by resveratrol treatment (see Supplemental Fig. S3).

3.3. Resveratrol decreased macrophage infiltration, neovascularization, and oxidative stress

Fig. 3 shows immunohistochemical staining for Mac-2, CD31, 8-OHdG, and 4-HNE. Marked infiltration of Mac-2-positive macrophages was shown in the aortic wall of AAA/CON compared with Sham/CON. Resveratrol treatment decreased Mac-2-positive macrophage count (Fig. 3M). Treatment with resveratrol also reduced the number of CD31-positive vessels in periaortic tissue compared with AAA/CON (Fig. 3N). 8-OHdG-positive cell count and 4-HNE-positive cell count were increased in AAA/CON compared with Sham/CON. However, they were reduced by resveratrol treatment (Fig. 3O, P).

3.4. Resveratrol attenuated the expression of inflammatory markers and oxidative stress markers

Fig. 4 shows the data of real time-RT-PCR. mRNA expression of MCP-1, TNF- α , ICAM-1, CD68, and VEGF-A was upregulated in AAA/CON compared with Sham/CON (all $p < 0.05$). In AAA/RSVT, the expression of MCP-1, TNF- α , ICAM-1, CD68, and VEGF-A was significantly lower than that in AAA/CON (all $p < 0.05$). Compared with AAA/CON, AAA/RSVT also showed reduced mRNA expression of p47, GPX1, and GPX3 (all $p < 0.05$).

3.5. Resveratrol treatment decreased MMPs activity

Zymographic active form of MMP-9 and MMP-2 abundance was increased in AAA/CON compared with Sham/CON. Its abundance was attenuated by resveratrol treatment (Fig. 5A–C).

3.6. Treatment with resveratrol attenuated p65 phosphorylation

Protein expression of p65 was comparable between Sham/CON, AAA/CON and AAA/RSVT. Expression of phospho-p65 was significantly higher in AAA/CON than in Sham/CON. Treatment with resveratrol attenuated the expression of phospho-p65 (Fig. 5D–F).

4. Discussion

In the present study, we demonstrated that resveratrol prevented the development of CaCl₂-induced AAA in association with attenuation of neoangiogenesis, oxidative stress, chronic inflammation, and ECM degradation in the aortic wall, suggesting therapeutic potential of resveratrol for the treatment of AAA.

Increased adventitial vasculogenesis is one of the pathological features of AAA, and is thought to play an important role in the development of AAA, possibly through creating a conduit for inflammatory cell transport and establishing chronic inflammation

in the aortic wall [21]. We demonstrated that resveratrol treatment resulted in downregulation of VEGF-A, a potent angiogenic and vascular permeability factor, and decreased neoangiogenesis in the aortic wall. Our observations are consistent with former findings that resveratrol attenuated pathological angiogenesis [6]. The decreased neoangiogenesis by resveratrol treatment was associated with attenuation of macrophage infiltration and proinflammatory cytokines expression. Norata et al. reported that resveratrol treatment reduced the expression of inflammatory markers and atherosclerotic plaque formation in ApoE knockout mice [5]. Therefore, anti-angiogenic and anti-inflammatory effects of resveratrol may contribute to the prevention of AAA development.

Vascular oxidative stress is another key component in the pathogenesis of AAA. Previous studies showed that oxidative stress is augmented during the process of AAA development [22–24]. We found that oxidative stress, indicated by increases in the expression of p47 and GPXs and the number of 8-OHdG-positive cells and 4-HNE-positive cells in the aortic wall of AAA, were attenuated by resveratrol treatment. Moreover, DHE staining showed that increased ROS production in the aortic wall of AAA was dramatically decreased by resveratrol treatment. Resveratrol has antioxidant effects through several mechanisms, such as scavenging ROS [2], inhibiting production of ROS by inflammatory cells [2], inhibiting vascular NADPH oxidase activity [3], and stimulating biosynthesis of endogenous antioxidants by nuclear factor-E2-related factor-2 (Nrf2) [25]. The reduction of ROS by resveratrol may be related to its preventive effect against AAA development. Recently, it has been widely recognized that NF- κ B, especially p65 signaling, plays a pivotal role in promoting the transcription of MCP-1 and ICAM-1. NF- κ B is a known redox-sensitive transcription factor functioning as a proinflammatory signal, downstream of oxidative stress [26], and genetic deletion of NF- κ B is reported to inhibit the development of experimental model of AAA [15]. In the present study, increased expression of phospho-p65 in the aortic wall of AAA was attenuated by treatment with resveratrol. This finding is compatible with those of several recent *in vitro* studies showing that resveratrol inhibited TNF- α - or LPS-induced NF- κ B activation in vascular endothelial cells and adipocytes [27]. The anti-inflammatory effects of resveratrol shown in the present study were thought to be sequential events whereby its antioxidant action led to the inhibition of NF- κ B-induced expression of inflammatory molecules, such as ICAM-1 and MCP-1.

Inflammation and oxidative stress are closely associated with the activation of MMPs, which induces ECM degradation, resulting in the development and progression of AAA. Once expansion of the aorta occurs by degradation of ECM, wall stress rises in accordance with Laplace's law, leading to acceleration of aneurysmal enlargement. Thus, MMPs are pivotal downstream components in the pathogenesis of AAA. Macrophages are thought to be the most important source of MMPs. Previous studies have demonstrated that macrophage-derived MMP-9 is essential for AAA formation [17,28,29]. Therefore, attenuation of macrophage infiltration by resveratrol treatment may largely contribute to the decreased MMPs activity. Alternatively, resveratrol is known to reduce MMP production and activation through its direct effect [30]. Gao et al. reported that resveratrol has a protective effect against cerebral ischemia-reperfusion injury in mice through inhibition of MMP-9 [28]. The present study showed that treatment with resveratrol resulted in preservation of the wavy structure of the elastic lamellae and the collagen structure in the media of the aortic wall in association with decreased activity of MMP-9 and MMP-2. It is possible that resveratrol might both directly and indirectly reduce the activity of MMPs in the aortic wall, and thereby attenuate the development of AAA.

We recognize that the present study has some limitations. We did not check other dose or timing of resveratrol administration in this study. Pretreatment of resveratrol might be more effective for prevention of AAA development. Appropriate dose and timing of resveratrol administration should be determined in further studies.

5. Conclusion

Treatment with resveratrol in mice prevented the development of AAA, in association with a reduction of neoangiogenesis, oxidative stress, inflammatory response, MMPs activity, and ECM disruption. These findings suggest therapeutic potential of resveratrol for AAA.

Funding

This study was supported by the Medical School Faculty and an Alumni Grant from the Keio University Medical Science Fund (to T.A.) and the grant from the Ministry of Health, Labor and Welfare (Research Group of Intractable Vasculitis) Japan (to Y.O.).

Conflict of interest

There is no conflict of interest in this study.

Acknowledgements

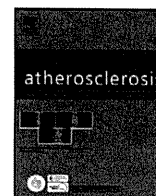
We thank Hiromi Kato (Keio University) and Mayu Matsuda (Keio University) for their excellent technical support.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.atherosclerosis.2011.03.042.

References

- [1] Frankel EN, Waterhouse AL, Kinsella JE. Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *Lancet* 1993;341:1103–4.
- [2] Martinez J, Moreno JJ. Effect of resveratrol, a natural polyphenolic compound, on reactive oxygen species and prostaglandin production. *Biochem Pharmacol* 2000;59:865–70.
- [3] Orallo F, Alvarez E, Camina M, et al. The possible implication of trans-resveratrol in the cardioprotective effects of long-term moderate wine consumption. *Mol Pharmacol* 2002;61:294–302.
- [4] Csiszar A, Labinskyy N, Podlutzky A, et al. Vasoprotective effects of resveratrol and SIRT1: attenuation of cigarette smoke-induced oxidative stress and proinflammatory phenotypic alterations. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008;294:H2721–35.
- [5] Norata GD, Marchesi P, Passamonti S, et al. Anti-inflammatory and anti-atherogenic effects of catechin, caffeic acid and trans-resveratrol in apolipoprotein E deficient mice. *Atherosclerosis* 2007;191:265–71.
- [6] Brakenhielm E, Cao R, Cao Y. Suppression of angiogenesis, tumor growth, and wound healing by resveratrol, a natural compound in red wine and grapes. *FASEB J* 2001;15:1798–800.
- [7] Clement MV, Hirpara JL, Chawdhury SH, et al. Chemopreventive agent resveratrol, a natural product derived from grapes, triggers CD95 signaling-dependent apoptosis in human tumor cells. *Blood* 1998;92:996–1002.
- [8] Pearson KJ, Baur JA, Lewis KN, et al. Resveratrol delays age-related deterioration and mimics transcriptional aspects of dietary restriction without extending life span. *Cell Metab* 2008;8:157–68.
- [9] Ungvari Z, Bagi Z, Feher A, et al. Resveratrol confers endothelial protection via activation of the antioxidant transcription factor Nrf2. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010;299:H18–24.
- [10] Weintraub NL. Understanding abdominal aortic aneurysm. *N Engl J Med* 2009;361:1114–6.
- [11] Xiong W, MacTaggart J, Knispel R, et al. Blocking TNF-alpha attenuates aneurysm formation in a murine model. *J Immunol* 2009;183:2741–6.
- [12] Ayabe N, Babaev VR, Tang Y, et al. Transiently heightened angiotensin II has distinct effects on atherosclerosis and aneurysm formation in hyperlipidemic mice. *Atherosclerosis* 2006;184:312–21.
- [13] Shiraya S, Miyake T, Aoki M, et al. Inhibition of development of experimental aortic abdominal aneurysm in rat model by atorvastatin through inhibition of macrophage migration. *Atherosclerosis* 2009;202:34–40.
- [14] Yoshimura K, Aoki H, Ikeda Y, et al. Regression of abdominal aortic aneurysm by inhibition of c-Jun N-terminal kinase. *Nat Med* 2005;11:1330–8.
- [15] Shiraya S, Miwa K, Aoki M, et al. Hypertension accelerated experimental abdominal aortic aneurysm through upregulation of nuclear factor kappaB and Ets. *Hypertension* 2006;48:628–36.
- [16] McCormick ML, Gavrilu D, Weintraub NL. Role of oxidative stress in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:461–9.
- [17] Longo GM, Xiong W, Greiner TC, et al. Matrix metalloproteinases 2 and 9 work in concert to produce aortic aneurysms. *J Clin Invest* 2002;110:625–32.
- [18] Kubota S, Kurihara T, Mochimaru H, et al. Prevention of ocular inflammation in endotoxin-induced uveitis with resveratrol by inhibiting oxidative damage and nuclear factor-kappaB activation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50:3512–9.
- [19] Fukamizu A, Sugimura K, Takimoto E, et al. Chimeric renin-angiotensin system demonstrates sustained increase in blood pressure of transgenic mice carrying both human renin and human angiotensinogen genes. *J Biol Chem* 1993;268:11617–21.
- [20] Sugano Y, Anzai T, Yoshikawa T, et al. Granulocyte colony-stimulating factor attenuates early ventricular expansion after experimental myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2005;65:446–56.
- [21] Thompson MM, Jones L, Nasim A, et al. Angiogenesis in abdominal aortic aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1996;11:464–9.
- [22] Dubick MA, Hunter GC, Casey SM, et al. Aortic ascorbic acid, trace elements, and superoxide dismutase activity in human aneurysmal and occlusive disease. *Proc Soc Exp Biol Med* 1987;184:138–43.
- [23] Zhang J, Schmidt J, Ryschich E, et al. Inducible nitric oxide synthase is present in human abdominal aortic aneurysm and promotes oxidative vascular injury. *J Vasc Surg* 2003;38:360–7.
- [24] Gavrilu D, Li WG, McCormick ML, et al. Vitamin E inhibits abdominal aortic aneurysm formation in angiotensin II-infused apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:1671–7.
- [25] Ungvari Z, Labinskyy N, Mukhopadhyay P, et al. Resveratrol attenuates mitochondrial oxidative stress in coronary arterial endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009;297:H1876–81.
- [26] Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 2000;408:239–47.
- [27] Choi SY, Hwang JH, Ko HC, et al. Nobiletin from citrus fruit peel inhibits the DNA-binding activity of NF-kappaB and ROS production in LPS-activated RAW 264.7 cells. *J Ethnopharmacol* 2007;113:149–55.
- [28] Gao D, Zhang X, Jiang X, et al. Resveratrol reduces the elevated level of MMP-9 induced by cerebral ischemia-reperfusion in mice. *Life Sci* 2006;78:2564–70.
- [29] Pyo R, Lee JK, Shipley JM, et al. Targeted gene disruption of matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B) suppresses development of experimental abdominal aortic aneurysms. *J Clin Invest* 2000;105:1641–9.
- [30] Li YT, Shen F, Liu BH, et al. Resveratrol inhibits matrix metalloproteinase-9 transcription in U937 cells. *Acta Pharmacol Sin* 2003;24:1167–71.



Invited commentary

Innocent bystander? Intraluminal thrombus in abdominal aortic aneurysm

Koichi Yoshimura^{a,c,*}, Yasuhiro Ikeda^b, Hiroki Aoki^d^a Department of Surgery and Clinical Science, Yamaguchi University Graduate School of Medicine, Ube 755-8505, Japan^b Department of Medicine and Clinical Science, Yamaguchi University Graduate School of Medicine, Ube 755-8505, Japan^c Graduate School of Health and Welfare, Yamaguchi Prefectural University, Yamaguchi 753-8502, Japan^d Cardiovascular Research Institute, Kurume University, Kurume 830-0011, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 June 2011

Accepted 15 June 2011

Available online 22 June 2011

Keywords:

Abdominal aortic aneurysm

Thrombus

Protease

Abdominal aortic aneurysm (AAA) is characterized by chronic inflammation and degradation of the extracellular matrix by proteases, such as matrix metalloproteinases (MMPs), leading to segmental dilatation of the aortic wall and eventual rupture with a high mortality [1,2]. Because most AAA patients have no symptoms until the catastrophic rupture, the main purpose of management is to predict and to prevent the aneurysm rupture, thereby improving their prognosis. Although AAA diameter and growth rate are the indices most commonly used to predict rupture, predicting the risk of rupture for an individual patient is still difficult. Controlling the growth of AAA is even more difficult and non-surgical therapy for AAA is not currently available. In this regard, an intraluminal thrombus (ILT) may be a potential predictor of the prognosis and a target for the therapeutic intervention.

The size of an ILT was previously reported to be associated with the AAA growth rate [3–5]. In addition, the risk of AAA rupture was related to the size of the ILT [6], as well as the growth rate of the ILT [7]. These clinical studies strongly suggest that ILT is a useful predictor of AAA progression and rupture, though the precise mechanism is unclear. The AAA wall covered by the ILT has been shown to be thinner and exhibit an increased number of inflammatory cells, a lower density of smooth muscle cells, and severely degraded extracellular matrix, especially elastin, compared to the thrombus-free wall [8]. The AAA wall underlying a thick ILT was also shown to have

less tensile strength compared to the wall covered with a thin ILT [9]. Thus, ILT has been correlated with the degradation and weakness of AAA walls, potentially resulting in an increased risk of AAA rupture.

Determining whether a causal relationship exists between ILT formation and degradation of the AAA wall is important, but difficult. In this issue of *Atherosclerosis*, Folkesson et al. [10] have added important information in this regard. Based on the hypothesis that a thick ILT is the source of the proteases affecting the wall beneath, the amounts and activities of various proteases were measured in thick multilayered ILTs collected from patients undergoing elective AAA surgery. MMP-9 and neutrophil elastase were abundant in the luminal layer of the ILT but had low activity, and the proteases in the abluminal layer of the ILT adjacent to the AAA walls were mostly inactive [10]. These results are consistent with a previous study by Wiernicki et al., who demonstrated that active MMP-9 and neutrophil elastase were significantly less abundant in AAA wall segments covered by a thick ILT, compared to the wall covered with a thin ILT [11]. Therefore, Folkesson and co-workers concluded that a thick ILT could not directly affect the AAA wall by providing active proteases. Then, why did previous studies show a correlation between the ILT and pathological severity of the AAA walls?

Here, we suggest a hypothetical model of the relationships among ILT formation, dilation of the aortic diameter and pathological changes in AAA (Fig. 1). As previously proposed by Swedenborg [12], elastin loss would lead to elongation and tortuosity of aortic walls, resulting in turbulent flow and ILT formation in AAA. Accordingly, the more an AAA grows in diameter, the more an ILT is likely to accumulate. In the meantime, it has been proposed that histopathology of human AAA walls can be categorized in three regions: inflammatory, active and amorphous [13]. We and others have found that the transitional area next to the neck area is more likely to contain the inflammatory region that is characterized by a large number of inflammatory cells with fairly preserved elastic lamellae, and the active region that is characterized by the high protease activities and the progressive degradation of elastic lamellae [14]. Meanwhile, most of the maximally dilated area in a large AAA is more likely to contain the amorphous region that is characterized by the depletion of smooth muscle cells and elastic lamellae, abundant fibro-collagenous extracellular matrix and low protease activities. Accordingly, the transitional area, likely to

* Corresponding author at: Yamaguchi University Graduate School of Medicine, 1-1-1 Minami-Kogushi, Ube 755-8505, Japan. Tel.: +81 836 22 2261; fax: +81 836 22 2423.

E-mail address: yoshimko@yamaguchi-u.ac.jp (K. Yoshimura).

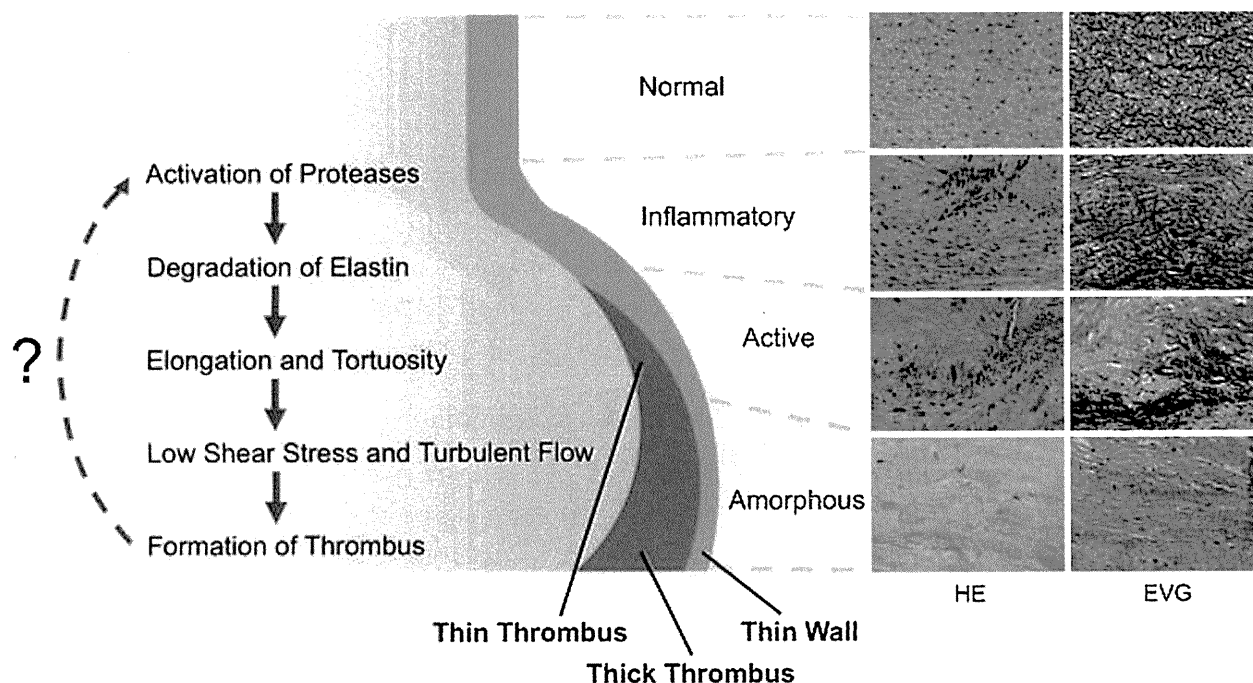


Fig. 1. The proposed relationships among intraluminal thrombus, wall shape and distinct pathological regions in an abdominal aortic aneurysm. HE, hematoxylin & eosin; EVG, elastic Van-Gieson.

Partially adapted from Yoshimura et al. [14].

be covered with a thin ILT, would correspond to the inflammatory and active regions with the increase in the cellular infiltration and the protease activities. The maximally dilated area, likely to be covered with a thick ILT, would correspond to the amorphous region with less tensile strength. In this model, an ILT would be associated with the pathological severity, but may not necessarily be an active source of proteases, as reported by Folkesson et al. in this issue of *Atherosclerosis* [10]. While this model needs to be tested in the future studies, it suggests that the ILT *per se* may not be a strong candidate for the therapeutic target. It is, however, still possible that ILT plays an active role in AAA, for example by producing inflammatory mediators.

Platelet inhibition has been reported to limit the development of AAA in a rat model [15]. A clinical study also demonstrated that aspirin use was associated with the reduced progression of a small AAA [16]. However, the larger and more recent studies have found no significant association between anti-platelet therapy and AAA expansion [17–19]. Although ILT is likely to be helpful as a predictor of AAA progression and rupture, new discoveries about the role of ILT will be required to re-evaluate it as an important therapeutic target for AAA.

Acknowledgments

This work was supported in part by a Grant-in-Aid for Scientific Research (KAKENHI 21390362) from the Japan Society for the Promotion of Science to KY.

References

- [1] Thompson RW, Geraghty PJ, Lee JK. Abdominal aortic aneurysms: basic mechanisms and clinical implications. *Curr Probl Surg* 2002;39:110–230.
- [2] Aoki H, Yoshimura K, Matsuzaki M. Turning back the clock: regression of abdominal aortic aneurysms via pharmacotherapy. *J Mol Med* 2007;85:1077–88.
- [3] Wolf YG, Thomas WS, Brennan FJ, Goff WG, Sise MJ, Bernstein EF. Computed tomography scanning findings associated with rapid expansion of abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg* 1994;20:529–35.
- [4] Parr A, McCann M, Bradshaw B, Shahzad A, Buttner P, Golledge J. Thrombus volume is associated with cardiovascular events and aneurysm growth in patients who have abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg* 2011;53:28–35.
- [5] Speelman L, Schurink GW, Bosboom EM, et al. The mechanical role of thrombus on the growth rate of an abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg* 2010;51:19–26.
- [6] Hans SS, Jareunpoon O, Balasubramaniam M, Zelenock GB. Size and location of thrombus in intact and ruptured abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg* 2005;41:584–8.
- [7] Stenbaek J, Kalin B, Swedenborg J. Growth of thrombus may be a better predictor of rupture than diameter in patients with abdominal aortic aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2000;20:466–9.
- [8] Kazi M, Thyberg J, Religa P, et al. Influence of intraluminal thrombus on structural and cellular composition of abdominal aortic aneurysm wall. *J Vasc Surg* 2003;38:1283–92.
- [9] Vorp DA, Lee PC, Wang DH, et al. Association of intraluminal thrombus in abdominal aortic aneurysm with local hypoxia and wall weakening. *J Vasc Surg* 2001;34:291–9.
- [10] Folkesson M, Silveira A, Eriksson P, Swedenborg J. Protease activity in the multi-layered intra-luminal thrombus of abdominal aortic aneurysms. *Atherosclerosis*; in press doi:10.1016/j.atherosclerosis.2011.05.002.
- [11] Wiernicki I, Stachowska E, Safranow K, et al. Enhanced matrix-degrading proteolytic activity within the thin thrombus-covered wall of human abdominal aortic aneurysms. *Atherosclerosis* 2010;212:161–5.
- [12] Swedenborg J. The role of the intraluminal thrombus in abdominal aortic aneurysms. In: Sakalihasan N, editor. *Aortic aneurysms, new insights into an old problem*. Liège, Édition de l'Université de Liège; 2008. p. 343–6.
- [13] Curci JA, Liao S, Huffman MD, Shapiro SD, Thompson RW. Expression and localization of macrophage elastase (matrix metalloproteinase-12) in abdominal aortic aneurysms. *J Clin Invest* 1998;102:1900–10.
- [14] Yoshimura K, Aoki H, Ikeda Y, Furutani A, Hamano K, Matsuzaki M. Development of pharmacological therapy for abdominal aortic aneurysms based on animal studies. In: Sakalihasan N, editor. *Aortic aneurysms, new insights into an old problem*. Liège, Édition de l'Université de Liège; 2008. p. 453–76.
- [15] Dai J, Louedec L, Philippe M, Michel JB, Houard X. Effect of blocking platelet activation with AZD6140 on development of abdominal aortic aneurysm in a rat aneurysmal model. *J Vasc Surg* 2009;49:719–27.
- [16] Lindholt JS, Sorensen HT, Michel JB, Thomsen HF, Henneberg EW. Low-dose aspirin may prevent growth and later surgical repair of medium-sized abdominal aortic aneurysms. *Vasc Endovasc Surg* 2008;42:329–34.
- [17] Thompson A, Cooper JA, Fabricius M, Humphries SE, Ashton HA, Hafez H. An analysis of drug modulation of abdominal aortic aneurysm growth through 25 years of surveillance. *J Vasc Surg* 2010;52:55–61.
- [18] Sweeting MJ, Thompson SG, Brown LC, Greenhalgh RM, Powell JT. Use of angiotensin converting enzyme inhibitors is associated with increased growth rate of abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg* 2010;52:1–4.
- [19] Ferguson CD, Clancy P, Bourke B, et al. Association of statin prescription with small abdominal aortic aneurysm progression. *Am Heart J* 2010;159:307–13.

disease: analysis of the MAIN-COMPARE (revascularization for unprotected left main coronary artery stenosis: comparison of percutaneous coronary angioplasty versus surgical revascularization) registry. *J Am Coll Cardiol* 2009;54:853–9.

[8] Abbott RD. Logistic regression in survival analysis. *Am J Epidemiol* 1985;121:465–71.

[9] Serruys PW, Morice MC, Kappetein AP, et al. Percutaneous coronary intervention versus coronary-artery bypass grafting for severe coronary artery disease. *N Engl J Med* 2009;360:961–72.

[10] D'Agostino Jr RB. Propensity score methods for bias reduction in the comparison of a treatment to a non-randomized control group. *Stat Med* 1998;17:2265–81.

0167-5273/\$ – see front matter © 2011 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.ijcard.2011.10.079

Persistent coronary arterial inflammation in a patient long after the onset of Kawasaki disease

Kenji Suda^{a,*}, Nobuhiro Tahara^b, Yoshiyuki Kudo^a, Hironaga Yoshimoto^a, Motofumi Iemura^a, Takafumi Ueno^b, Hayato Kaida^c, Masatoshi Ishibashi^c, Tsutomu Imaizumi^b

^a Department of Pediatrics and Child Health, Kurume University School of Medicine, Kurume, Japan

^b Department of Internal Medicine, Division of Cardiovascular Medicine, Cardiovascular Research Institute, Kurume University School of Medicine, Kurume, Japan

^c Department of Radiology, Kurume University School of Medicine, Kurume, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 September 2011

Revised 18 September 2011

Accepted 18 October 2011

Available online 9 November 2011

Keywords:

Kawasaki disease

Giant coronary artery aneurysm

Positron emission tomography

Fluorodeoxyglucose

Inflammation

A 40-year-old male patient, who had had Kawasaki disease (KD) at 4 months of age and was left with the left giant coronary artery aneurysm (gCAA), being 12 mm in diameter, and the occluded giant right gCAA, visited us for cardiac evaluation. He has been taking aspirin since the acute phase of KD and remained well without any cardiac event or sign of inflammatory disease. He has smoked since 18 years of age but stopped last year.

He was not obese with 21 kg/m² of body mass index and had a normal resting blood pressure of 103/72 mm Hg. Laboratory data showed normal total cholesterol of 1370 mg/L, low-density-lipoprotein-cholesterol of 1039 mg/L, and glucose tolerance with hemoglobin A1c of 4.8%, but mildly low high-density-lipoprotein-cholesterol of 281 (reference 400–960) mg/L and mildly elevated C-reactive protein of 0.22 mg/L, indicating ongoing systemic inflammation.

A multi-detector X-ray computed tomography (MDCT) revealed persistent gCAA of 12 mm in diameter at segment 6 with a low density area inside it, stenosis distal to this gCAA, a persistent gCAA of 12 mm in diameter at segment 11, and total occlusion of right coronary artery orifice with recanalization and collaterals (Fig. 1). To determine if an active inflammatory process was present in the coronary arterial wall, the patient underwent positron emission tomography (PET) using 18-fluorodeoxyglucose (FDG), with co-registration of MDCT using gCAA as guiding structure. PET indeed showed FDG accumulation starting around the left coronary orifice of the aortic wall and extending to the proximal left gCAA wall (Fig. 2).

* Corresponding author at: Department of Pediatrics and Child Health, Kurume University School of Medicine, Asahi-Machi 67, Kurume 830-0011, Japan. Tel.: +81 0942 31 7565; fax: +81 0942 38 1792.

E-mail address: suda_kenji@med.kurume-u.ac.jp (K. Suda).

An intravascular ultrasound examination showed significant intimal thickening of left gCAA wall compatible with the site of FDG accumulation and he was merely placed on statin to prevent further progression of the stenosis because cardiac catheterization did not indicate significant stenosis.

KD, a systemic vasculitis syndrome with unknown etiology, is the most frequently observed acquired heart disease in the developed countries. The most significant complication of KD is the development of gCAA, >8.0 mm in diameter, and more than half of the patients with gCAA require coronary artery intervention for progressive coronary artery stenosis adjacent to the gCAA with time [1]. As the mechanism of this ongoing coronary remodeling, persistent coronary arterial inflammation, as evidenced by increased biomarkers such as high sensitivity C-reactive protein and serum amyloid A [2], has been proposed.

On the other hand, recent robust technological innovation in MDCT and PET allows us to visualize and identify coronary artery inflammation. Rogers et al. [3] described successful evaluation of coronary arteries using FDG-PET imaging in patients with acute coronary syndrome. In FDG-PET, FDG uptake reported to correlate with macrophage accumulation and inflammation [4] and therapy with anti-inflammatory agents has demonstrated to reduce plaque FDG uptake in the arterial vasculature [5]. This report is the first direct documentation of persistent inflammation of gCAA wall after KD and FDG-PET has a potential to monitor gCAA inflammation visually.

This work is partially supported by “Academic Frontier” Project, The Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology, Japan. The authors of this manuscript have certified that they comply with the Principles of Ethical Publishing in the International Journal of Cardiology (Shewan and Coats 2010;144:1–2).

References

- [1] Suda K, Iemura M, Nishiono H, et al. Long-term prognosis of patients with Kawasaki disease complicated by giant coronary aneurysms: a single-institution experience. *Circulation* 2011;123:1836–42.
- [2] Mitani Y, Sawada H, Hayakawa H, et al. Elevated levels of high-sensitivity C-reactive protein and serum amyloid-A late after Kawasaki disease: association between inflammation and late coronary sequelae in Kawasaki disease. *Circulation* 2005;111:38–43.
- [3] Rogers JS, Nasir K, Figueroa AL, et al. Feasibility of FDG imaging of the coronary arteries: comparison between acute coronary syndrome and stable angina. *JACC Cardiovasc Imaging* 2010;3:388–97.
- [4] Tawakol A, Migrino RQ, Bashian GG, et al. In vivo 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography imaging provides a noninvasive measure of carotid plaque inflammation in patients. *J Am Coll Cardiol* 2006;48:1818–24.
- [5] Tahara N, Kai H, Ishibashi M, et al. Simvastatin attenuates plaque inflammation: evaluation by fluorodeoxyglucose positron emission tomography. *J Am Coll Cardiol* 2006;48:1825–31.

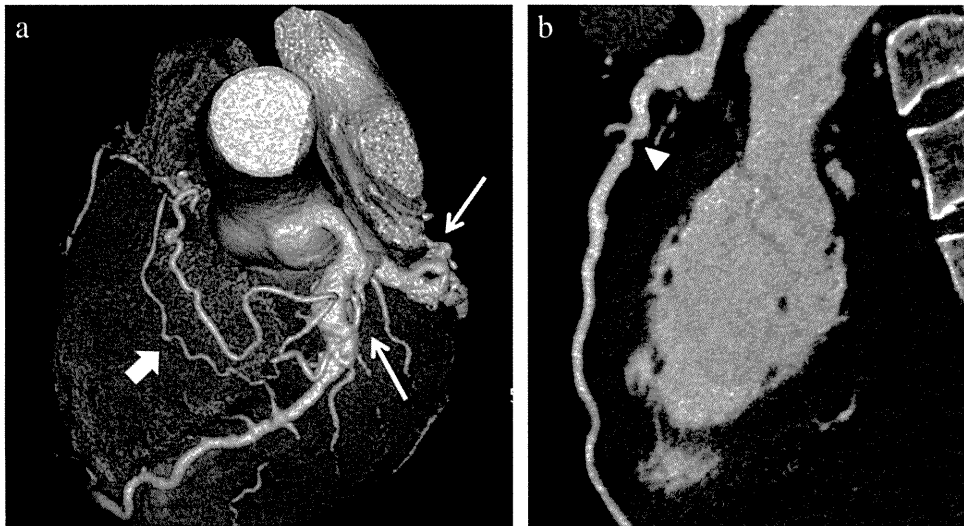


Fig. 1. a. A multi-detector X-ray computed tomography revealed persistent giant coronary artery aneurysms at segment 6 and at segment 11 (thin arrows) and collateral arteries that connect left coronary artery and recanalized right coronary artery (thick arrow). b. A longitudinal view of the left anterior descending artery revealed a giant coronary artery aneurysm and stenosis (arrow head) just distal to the aneurysm.

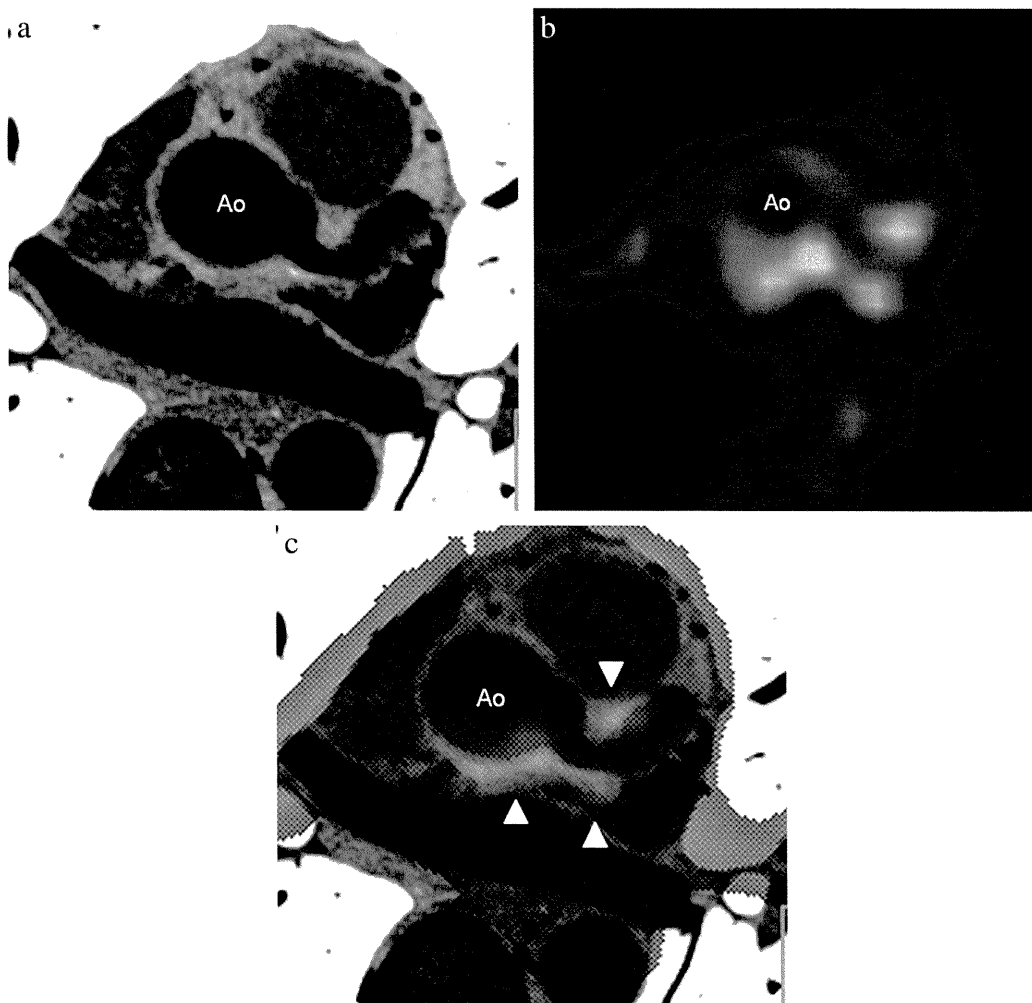


Fig. 2. The co-registration of multi-detector x-ray computed tomography of the proximal left coronary artery with giant coronary artery aneurysm (Fig. 2a) and positron emission tomography using 18-deoxyfluoroglucose at the same plane (Fig. 2b) showed significant isotope accumulation starting from the left coronary orifice of the aortic wall and extending to the proximal left coronary artery aneurysm (Fig. 2c).

特集 テネシンCと心臓・血管病変

Matricellular 蛋白とバイオマーカー*

廣江 道昭¹ 吉田 利通^{2,3} 今中 恭子

はじめに

高等動物における発生・発達と疾病の発症・進展において、細胞の形態・接着・増殖・移動・分化が極めて重要であり、特に細胞と細胞外マトリックス(ECM)との相互作用がその過程においてシグナルの主な役割を果たしていると考えられている。ECMには糖蛋白質、コラーゲン、プロテオグリカン、増殖因子など特異的な高次構造を維持しながら整合性良く配置されているのみならず、ECM分子を認識する細胞表面レセプターを介して細胞内情報伝達のためのメディエーターとしても機能する。近年、細胞-マトリックス相互作用のアダプターあるいはメディエーターとして機能する特別なECM分子として、matricellular蛋白(細胞性基質蛋白質)の存在が明らかになってきた¹⁻³⁾。

matricellular蛋白の特徴は、1)線維や基底膜のような構造物を作らず(a class of non-structural ECM)、細胞-マトリックス伝達を制御する、2)細胞表面の受容体、他のマトリックス分子、成長因子、サイトカイン、プロテアーゼなどと相互作用するだけでなく、そのbioavailabilityがある一定の環境下に限定されることを助けるmatrix

表1 Matricellular蛋白の一覧

Osteopontin
Thrombospondins(TSP-1, TSP-2)
Secreted protein acidic and rich in cysteine(SPARC)/Osteonectin
Tenascin family(tenascin-C, X, R, W)
CCN family(CCN=1~6)
Galectin
Periostin
Plasminogen activator inhibitor type 1(PAI-1)
Autotoxin

metalloproteinase(MMP)を制御し、直接細胞の運動性に影響を及ぼす、3)強い細胞接着を緩める脱接着作用(de-adhesion)によって形態形成、血管の増生、リモデリングに関与する、4)発生期の形態形成や癌浸潤、組織傷害後の修復過程で発現するという共通した性質を持っている。すなわち、matricellular蛋白とは、形態形成、組織修復や再生の際に高度に発現し、脱接着作用とともに2)の機能の発揮・調節によって組織構築の改変(repair and/or remodeling)を制御する分子群である。表1に主なmatricellular蛋白を列記したが、それらの分子機構・機能や病態との関連に関する報告がなされている。

近年、高血圧や心筋梗塞後における心臓リモデ

* Matricellular Proteins as a Biomarker for Cardiac Diseases

¹ 国立国際医療研究センター循環器内科(〒162-8655 東京都新宿区戸山1-21-1) Michiaki Hiroe: Department of Cardiovascular Medicine, National Center for Global Health and Medicine

² 三重大学大学院医学系研究科修復病理学 Toshimichi Yoshida, Kyoko Imanaka-Yoshida: Pathology and Matrix Biology, Mie University Graduate School of Medicine

³ 三重大学マトリックスバイオロジー研究センター Toshimichi Yoshida, Kyoko Imanaka-Yoshida: Mie University Research Center for Matrix Biology

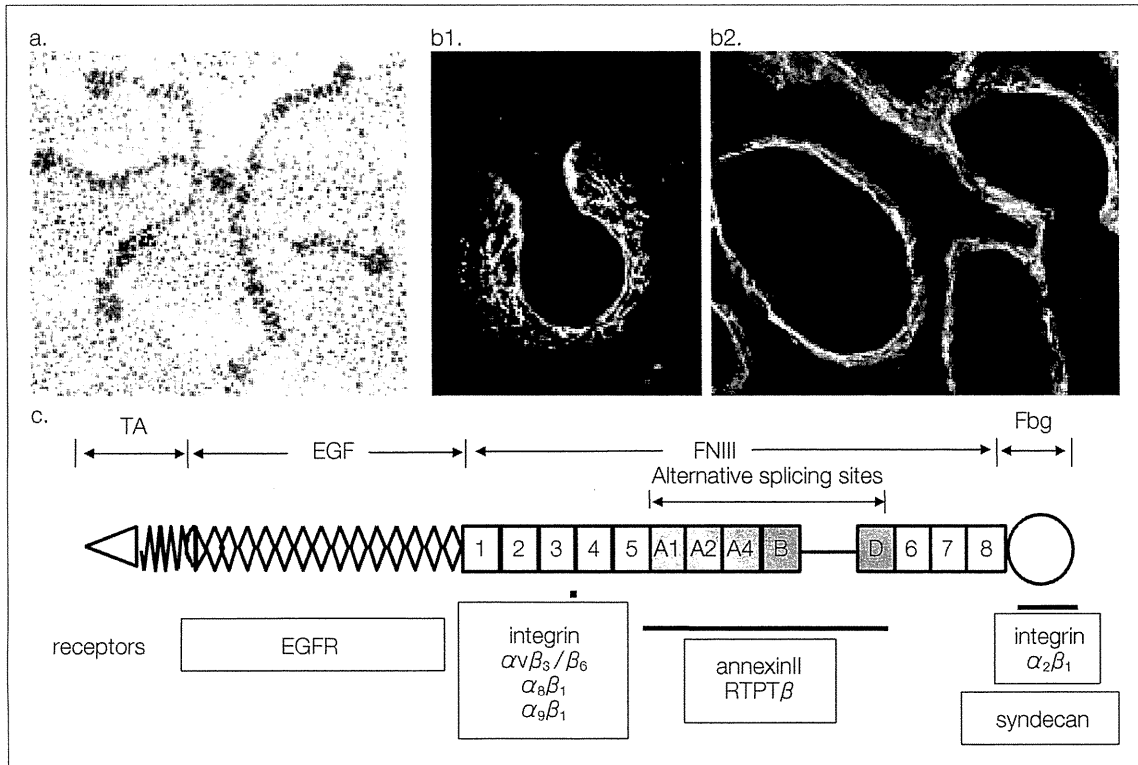


図1 Tenascin Cの分子構造・局在・制御ドメイン

- a. 構造：電子顕微鏡像で6量体を呈する。
 b. Tenascin Cの免疫組織像(白く染色されている)：1胎生期の乳腺，2乳癌組織に局在している。
 c. Tenascin Cの構造と制御ドメイン(詳細は本文参照)(文献¹⁰⁾より引用)

リングの発症機構と関連する分子としてECMや特に matricellular 蛋白の重要性が話題になっている⁴⁻⁸⁾。

本稿では、心筋梗塞、心筋炎や心不全における心臓リモデリングに関与し、特にバイオマーカーとして臨床・基礎研究に応用されている代表的な matricellular 蛋白である Tenascin C、Osteopontin、および Galectin について概説する。

Tenascin C

1. 構造と機能

Tenascin Cは、典型的な matricellular 蛋白で、1986年癌間質特異抗原として発見された。胎児期の形態形成や癌浸潤、創傷(炎症)治癒、組織再生などに伴って限定された部位に一過性に発現し、反接着因子、細胞遊走の促進因子として知られている⁹⁻¹¹⁾。

ヒト Tenascin Cの1つのサブユニットは分子量190~300 kDで、N末端から coiled-coil を作る TA ドメイン配列があり、続いて EGF 様列記が繰り返され、さらに fibrinectin type III (FNIII) 繰り返し配列がある。この FN III 繰り返し配列には選択的スプライシングを受ける領域があり、分子量の異なる多種のパリアントを作り出す。C末には fibrinogen 様部位があり、このサブユニットがN末付近のコイル状部位でより合わさって3量体になり、さらにこれらがS-S結合によって結合して6量体となり組織に存在する。複数の生物活性ドメインを持ち、integrin ($\alpha_9\beta_1$, $\alpha v\beta_3$, $\alpha v\beta_6$), EGFR, annexin II, syndecan などの多数のレセプターと結合し、組織・細胞の種類や分化度によって、細胞遊走(線維芽細胞や癌細胞など)の促進あるいは抑制など相反する機能を示す(図1)¹⁰⁾。

2. 心臓組織における tenascin の発現とその役割

心筋組織で、Tenascin C は病態時に発現し^{7,12-14)}、組織リモデリングを制御すると同時に、きわめて有用なバイオマーカーになりうるということが明らかになってきたが、本特集の佐藤明による別稿「心室リモデリングとテネイシン C」で詳細に記載されているので参照されたい。

Osteopontin (OPN)

1. 構造と機能

OPN 遺伝子はヒト染色体 4q13 上に存在し、OPN は small integrin binding Ligna N-linked glycoprotein (SIBLING) ファミリーに属し、多数の機能を保持する糖蛋白質である¹⁵⁾。OPN 分子は 314 個のアミノ酸から成り、中央より C 末端側で heparin と、N 末端寄りでは fibronectin など細胞外基質と結合する一本の蛋白(図 2)であるが、分泌型糖化糖蛋白質として糖鎖の修飾が多様なため 45~80 kD と分子量に幅がある。酸性、親水性で極めて陰性に荷電された分子で、膜アンカードメインを欠く分泌蛋白質である。OPN は、乳汁、尿管尿細管、破骨細胞、骨芽細胞、線維芽細胞、樹状細胞、活性化マクロファージ、活性化 T 細胞、平滑筋細胞、内皮細胞、ある種の腫瘍組織など広く発現が認められている¹⁶⁾。

Ca⁺⁺ 結合蛋白として骨基質中でハイドロキシアパタイトと結合しているほか、マクロファージ、破骨細胞や乳腺、腎など各所の上皮細胞でも産生され各組織における石灰化に関係している。一方、OPN は分子内に RGD (arginine-glycine-aspartate) と SVVYGLR (serine-valine-valine-tyrosine-glycineleucine-arginine) の 2 つのインテグリン結合部位を有するので $\alpha v \beta_3$ integrin との結合によって、細胞密着や増殖などの機能を発揮する。さらに、癌転移と密接な関係のある CD44 をリガンドとして様々な細胞と接着し、iNOS 誘導の抑制、リンパ球活性化、マクロファージや炎症細胞、血管や癌細胞の遊走・浸潤の惹起など多彩な機能を示す。また OPN は線維芽細胞や平滑筋細胞に対しても細胞接着、遊走活性亢進作用を有し、MMP-2, 9 の発現や活性を

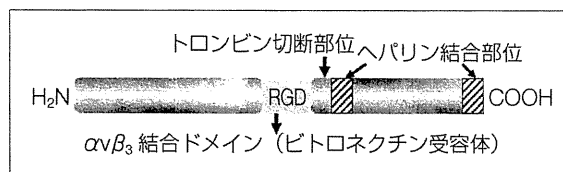


図 2 Osteopontin の分子構造
詳細は本文参照 (CareTIS, Co., Ltd の説明より引用)

抑制してコラーゲンを蓄積させることによって線維化に関与したりする作用を有している。

2. 心臓組織における OPN の発現とその役割

正常な心臓では OPN はほとんど発現していないが、種々の病的状態では著明に発現して matrix-cellular 蛋白としての役割、特に線維化と心臓リモデリングに関して重要である¹⁷⁾。

心筋梗塞における OPN の発現について、Murry らはヒト心筋組織でのマクロファージが産生細胞であることを証明した¹⁸⁾。OPN 遺伝子改変マウスを使用した心筋梗塞モデル(結紮モデル)による詳細な研究によって、OPN は梗塞巣ならびに非梗塞巣に発現し、OPN 欠損マウスでは左室腔がより拡張し、梗塞巣ならびに非梗塞巣でのコラーゲン沈着がより低下していたことから、OPN はコラーゲン産生・沈着を制御することによって梗塞後リモデリングの抑制に重要な役割を果たしていると考えられる¹⁹⁾。さらにコラーゲン産生・沈着を制御する分子機構を解明するためにラット線維芽細胞を培養し、OPN 自身では MMP-2, 9 活性には効果がなかったが、IL-1 β による増加した MMP 活性を抑制することが判明した²⁰⁾。最近、Lenga ら²¹⁾は、OPN が fibroblast から myofibroblast への分化に重要であることを報告した。つまりストレスやレニン-アンジオテンシン系が fibroblast を活性化し、TGF- β -SMAD 系を介して OPN が HMGB1 (high-mobility group box 1 protein) を発現し、さらに CNN ファミリーの CTGF を発現させ、myofibroblast へ分化するとの新しい見解である²²⁾。

心不全では、心筋症発症ハムスター²³⁾、ヒトの拡張型心筋症^{24,25)}に発現したとの報告がある。Stawowy ら²⁴⁾によると、免疫組織学的に拡張型

表2 ヒト galectin ファミリーの特徴と機能

	組織分布	機能, その他
Galectin-1	普遍的に発現	活性化 T 細胞のアポトーシス誘導 細胞増殖, mRNA スプライシング 神経軸索の再生異常(筋萎縮性側索硬化症の発症に関与か?)
Galectin-2	小腸, 胃	心筋梗塞の危険因子
Galectin-3	普遍的に発現	細胞接着, mRNA スプライシング T 細胞のアポトーシス阻害 マクロファージ遊走因子, AGE 受容体
Galectin-4	消化器系	腸管における CD4(+) T 細胞の活性化
Galectin-7	ケラチノサイト	
Galectin-8	普遍的に発現	細胞接着, 好中球機能の調節
Galectin-9	免疫細胞, 肺, 消化器系	活性化 T 細胞のアポトーシス, 好酸球遊走因子, 癌細胞のアポトーシス誘導, 細胞接着
Galectin-10	好酸球, 好塩基球	Charcot-Leyden crystal マンノースに親和性
Galectin-12	脂肪組織	脂肪細胞のアポトーシス誘導
Galectin-13	胎盤	pregnancy-related protein

心筋症の心筋細胞に発現しており, その程度は血行動態から求めた左・右室駆出率とは負の相関が観察されたことから重症度を評価できるとしている。Satoh ら²⁵⁾は, *in situ* hybridization 法で主に心筋細胞での OPNmRNA を証明し, 左・右室駆出率とは負, I 型コラーゲンとは正相関があることを観察している。

現状では, 種々の心疾患における OPN の役割は, 炎症性サイトカインや増殖因子などを介して心臓リモデリングや心筋線維化に深く関与していると考えられている。しかし, 心筋細胞での発現の分子的意義については今後の研究課題であろう。

3. バイオマーカーとしての役割

抗 OPN 抗体を使用した ELISA 法²⁶⁾によって血漿 OPN 値を測定することによって種々の心疾患での動態が明らかになってきている。まとめると,

1) 血漿 OPN 値と性別, 年齢との関連について Framingham Heart Study によると, 男性が女性より高値であり, 加齢の影響を受けること²⁷⁾。

2) 急性心筋梗塞では, 血行再建術後3日目に最大値を呈し, 経時的に低下する。最大値と左室駆出率とは負の, 左室収縮期容量とは正の相関を示していることから, OPN 値は心筋梗塞後の左室リモデリングを評価できること²⁸⁾。安定した虚血性心疾患では, 年齢と正の, 左室駆出率とは負の相関を示し, 中央値による解析では心事故(心血管死, 非致死性心筋梗塞, 血行再建術や入院)が予測できること²⁹⁾。

3) 心不全では, NYHA 機能分類の進展に従って血中値は上昇し, 左室駆出率とは負の, BNP 値とは正の相関を呈すること³⁰⁾。さらに心不全患者について ROC 解析を用いて検討すると, OPN 値は予後予測に有用なバイオマーカーであるばかりでなく, NT-proBNP との併用によってさらに予後判定に有用であること³¹⁾。拡張型心筋症で中等～重症度の左室機能障害を呈する症例では, OPN 値はレニン-アルドステロン系と IL-6 同様に上昇していることから心筋症の炎症マーカーとしての価値があること³²⁾。

4) 肥大大心や拡張期心不全では, MMP やコラーゲン関連のバイオマーカーに比較して OPN 値は病態把握には有用ではないこと³³⁾。

Galectin

1. 構造と機能

galectin は, galactose を含む糖鎖構造(β -ガラクトシド)に対する結合特異性を有する動物レクチンの一家系の総称(galactose + lectin \rightarrow galectin)であり, 現在, ヒトの galectin として galectin-1 から 10 種類報告されている³⁴⁾。galectin は細胞内蛋白質としての性質(ジスルフィド結合, 付加糖鎖, 分泌シグナルを持たず, 一般的に N-末端がアセチル化されている)を備えているが, 細胞内から分泌されて間質に存在するため細胞-ECM, または細胞-細胞間の細胞間情報伝達因子として機能していると考えられている³⁵⁾。galectin は糖鎖を認識して結合するが, 糖鎖構造に対する選択性には幅があり, また結合相手の糖鎖構

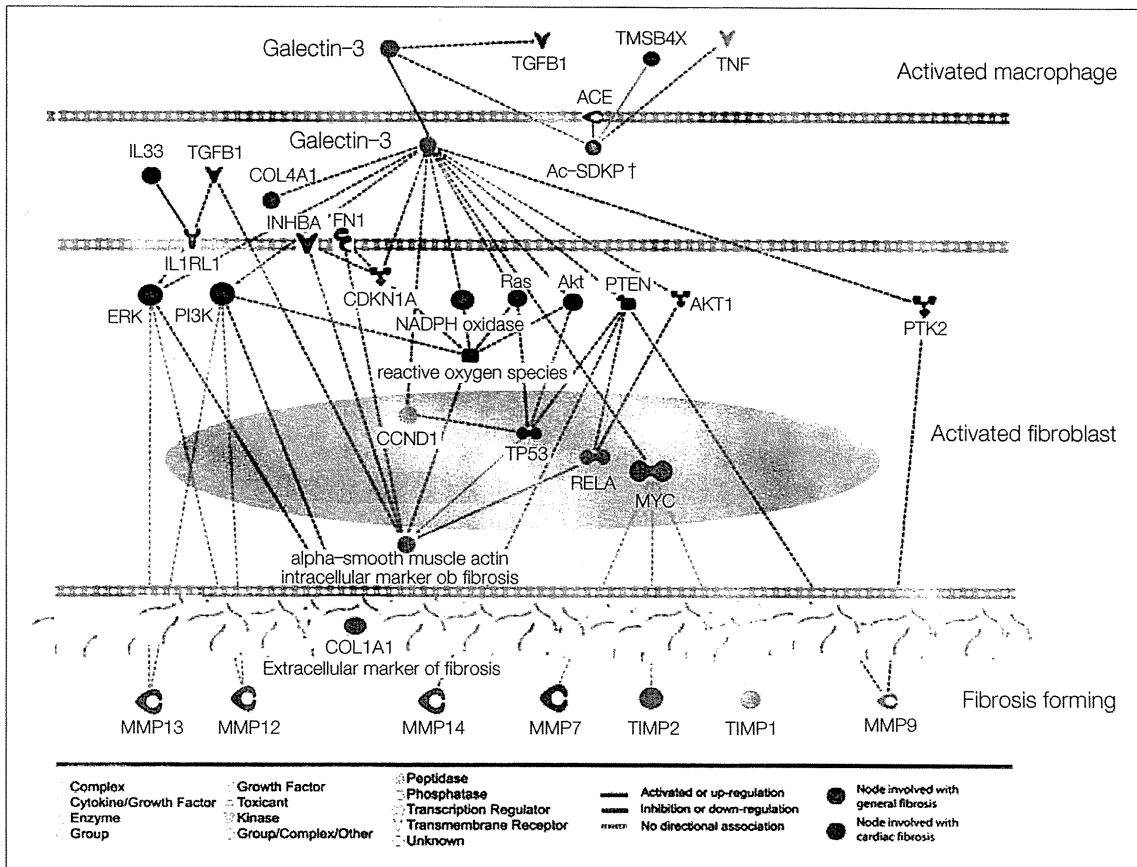


図3 Galectin-3のシグナル伝達系

図中緑色は心臓での線維化に関連している。マクロファージにて産生された galectin-3 が心臓線維芽細胞に作用して、コラーゲンの産生・蓄積など線維化が進展すると考えられている。(文献³⁸⁾より引用)

造も不均一であるため、サイトカインなどとは比較にならないほど多種類の分子を受容体として利用する可能性を持っている。

表2にヒト galectinの種類、分布と機能について示したが、本稿では心臓に関連し研究が進んでいる galectin-3 について述べる。

galectin-3は、唯一特異的なキメラ型の構造を呈し、炭水化物の認識作用とコラーゲン用ドメインを有するために多量のECM、N-acetyllactosaminやマクロファージCD11b/CD8のみならず、laminin, fibronectin, tenascin, AGE(advanced glycosylation end-products)と結合して機能を発揮している³⁶⁾。主な産生細胞はマクロファージ、好中球、好酸球や肥満細胞などで、非代償期に陥った心不全状態、線維化および炎症において非常に

重要な役割を演じている(図3)。

2. 心臓組織における OPN galectin-3 の発現とその役割^{37, 38)}

Sharmaらは、高血圧ラット(trangenic TGRmRen2-27)の心筋組織において、肥大のみで心不全に陥らない状態でも galectin-3 がマクロファージに発現しており、心臓 fibroblast やECMと結合していることを初めて報告した³⁹⁾。ecominant galectin-3を心嚢腔に投与すると、心臓 fibroblast の増殖、コラーゲン産生・沈着と心機能低下が観察され、大動脈弁狭窄症患者の心筋生検組織においても galectin-3 が発現したことを見出した。さらに、Liuらは、ラット心嚢に galectin-3 を投与し類似した状況を作成し、抗炎症・抗線維化作用を有する N-acetyl-seryl-as-

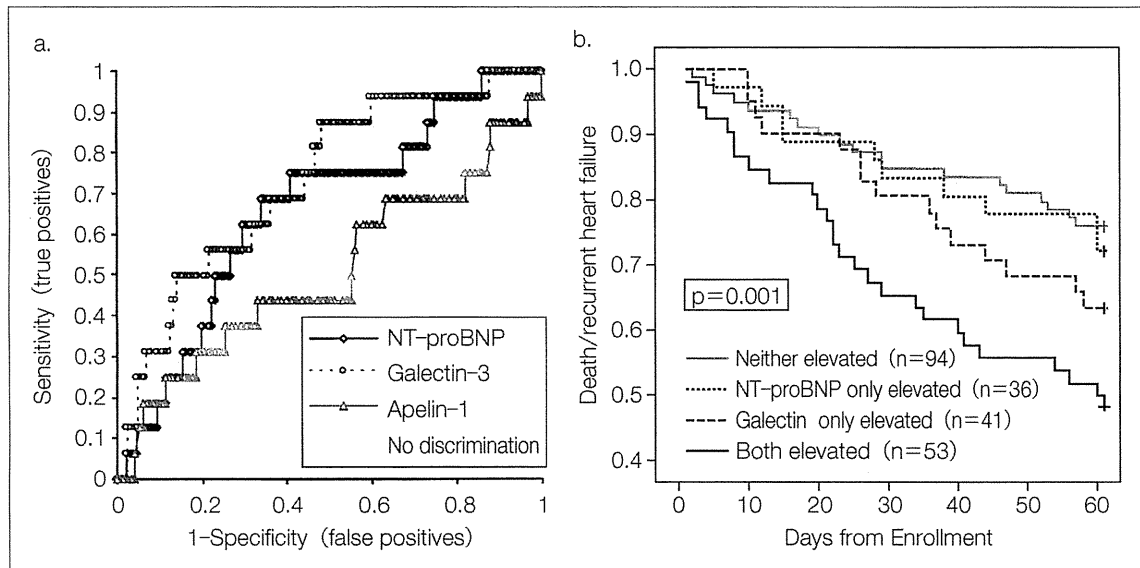


図4 急性心不全患者(209症例)におけるバイオマーカーとしての galectin-3 の臨床的意義(文献⁴¹⁾より引用)

- a. 60日後の心不全死など予後予測についてROC解析の結果, galectin-3のAUCは0.74でNT-proBNPやApelin-1に比較して有意に高く, 予後予測に役立つバイオマーカーである。
- b. 心不全死と再発する心不全による心事故発生率についてKaplan-Meier曲線で解析すると, galectin-3とNT-proBNPが共に高値を呈する症例では発生率が著明に高い。

partyl-lysyl-prolinによってTGF β -SMAD系を介して病変の出現を阻止できたと報告している⁴⁰⁾。

すなわち, galectin-3は, 心筋組織でマクロファージや肥満細胞の浸潤を増強することによって間質・血管周囲の線維化と左室機能障害に関与することが判明した。

3. バイオマーカーとしての役割

最近, 心不全の病態および予後予測を評価できる新しいバイオマーカーとしてgalectin-3の有効性について報告され始めている。まとめると,

1) 急性心不全患者(209症例)の診断と予後評価できるバイオマーカーとして, NT-proBNP, galectin-3およびapelin(心血管作動性ペプチド)について検討した結果, galectin-3はNT-proBNPと同様に診断に有用であるが, 60日間の心不全死予測に関しては, galectin-3が優れていること。さらに両者を併用すると心不全死/心不全の再発の予測には非常に優れていること(図4)⁴¹⁾。さらに急性心不全患者(PRIDE研究の患者115例)を評価すると, galectin-3は高齢者, 低腎機

能および高値NT-proBNPと相関しており, galectin-3が高いと拡張機能障害, 高い右室圧, 高度な僧房弁逆流/三尖弁逆流と連関していること, 4年生存率を観察するとgalectin-3はエコー所見とは独立した予後予測が可能である⁴²⁾。

2) 慢性心不全患者(DEAL-HF研究でNYHA III/VIの患者232例)の予後予測(平均3.4年間)に関しては, galectin-3は心不全の重症度やNT-proBNPとは独立して有用なバイオマーカーであること⁴³⁾。

3) 補助心臓装置の装着患者(55症例)では, 線維化に関連するgalectin-3は上昇しており, かつ心臓移植まで生存できなかった例は生存例よりも高値を呈していること⁴⁴⁾。

4) 慢性心不全患者(NYHA II-IIIで106症例)のgalectin-3とECMのturnoverを検討した結果, galectin-3は血清PIIINP, MMP-2とは相関していたが, 左室機能とは関連はないこと⁴⁵⁾。

5) 心不全で入院し, 退院時に採血が行われた心不全患者(COACH研究の患者592例)を検討すると, galectin-3はIL-6とCRPと相関し, 独立し

た予後予測因子であること, preserved LVEF 例ではより予測価値が増していること⁴⁶⁾.

おわりに

Osteopontin, Tenascin C および Galectin は心臓では、線維化と心臓リモデリングに参与する matricellular 蛋白であるとともに、心疾患の病態、重症度、予後予測に血中バイオマーカーとして有用であることが判明した。しかし、その他のいくつかの matricellular 蛋白が相互作用(cross-talking)しながら、線維化とリモデリングの制御に関わることが予想される。今後の基礎的・臨床的な見地からの研究の発展が期待される。

文 献

- 1) Bornstein P: Diversity of function is inherent in matricellular proteins: an appraisal of thrombospondin 1. *J Cell Biol* 130: 503-506, 1995
- 2) Bornstein P, Sage EH: Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. *Curr Opin Cell Biol* 14: 608-616, 2002
- 3) Sangaletti S, Colombo MP: Matricellular proteins at the crossroad of inflammation and cancer. *Cancer Lett* 267: 245-253, 2008
- 4) Schellings MW, Pinto YM, Heymans S: Matricellular proteins in the heart: possible role during stress and remodeling. *Cardiovasc Res* 64: 24-31, 2004
- 5) Bowers SLK, Banerjee I, Baudino TA: The extracellular matrix: At the center of it all. *J Mol Cell Cardiol* 48: 474-482, 2010
- 6) Dobaczewski M, Gonzalez-Quesada C, Frangogiannis NG: The extracellular matrix as modulators of the inflammatory and reparative response following myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 48: 504-511, 2010
- 7) Okamoto H, Imanaka-Yoshida K: Matricellular proteins-New molecular targets to prevent heart failure. *Cardiovasc Ther* 2011 Aug 4 [Epub ahead of print]
- 8) Matsui Y, Morimoto J, Uede T: Role of matricellular proteins in cardiac tissue remodeling after myocardial infarction. *World J Biol Chem* 1: 69-80, 2010
- 9) Chiquet-Ehrismann R, Mackie EJ, Pearson CA, Sakakura T: Tenascin: an extracellular matrix protein involved in tissue interactions during fetal development and oncogenesis. *Cell* 47: 131-139, 1986
- 10) Chiquet-Ehrismann R, Chiquet M: Tenascins: regulation and putative functions during pathological stress. *J Pathol* 200: 488-499, 2003
- 11) Hsia HC, Schwarzbauer JE: Meet the tenascins: multifunctional and mysterious. *J Biol Chem* 280: 26641-26644, 2005
- 12) Imanaka-Yoshida K, Hiroe M, Yoshida T: Interaction between cell and extracellular matrix in heart disease: multiple roles of tenascin-C in tissue remodeling. *Histol Histopathol* 19: 517-525, 2004
- 13) 廣江道昭, 今中(吉田)恭子, 吉田利通: テネイシン C. *日本臨牀* 65(Suppl 4): 207-213, 2007
- 14) 今中-吉田恭子, 廣江道昭, 吉田利通: テネイシン C-新しい心臓リモデリングマーカー. *医学の歩み* 232: 475-479, 2010
- 15) Scatena M, Liaw L, Giachelli CM: Osteopontin: a multifunctional molecule regulating chronic inflammation and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27: 2302-2309, 2007
- 16) Kazanecki CC, Uzwiak DJ, Denhardt DT: Control of osteopontin signaling and function by post-translational phosphorylation and protein folding. *J Cell Biochem* 102: 912-924, 2007
- 17) Singh M, Foster CR, Dala S, Singh K: Osteopontin: Role in extracellular matrix deposition and myocardial remodeling. *J Mol Cell Cardiol* 48: 538-543, 2010
- 18) Murry CE, Giachelli CM, Schwartz ST, Vracco R: Macrophages express osteopontin during repair of myocardial necrosis. *Am J Pathol* 145: 1450-1462, 1994
- 19) Trueblood NA, Xie Z, Communal C, et al: Exaggerated left ventricular dilatation and reduced collagen deposition after myocardial infarction in mice lacking osteopontin. *Circ Res* 88: 1080-1087, 2001
- 20) Xie X, Singh M, Siwik DA, et al: Osteopontin inhibits interleukin-1beta-stimulated increase in matrix metalloproteinase activity in adult rat cardiac fibroblasts: role of protein kinase C-zeta. *J Biol Chem* 278: 48546-48552, 2003
- 21) Lenga Y, Koh A, Perera AS, et al: Osteopontin expression is required for myofibroblast differentiation. *Circ Res* 102: 319-327, 2008
- 22) Zahradka P: New role for osteopontin in cardiac fibrosis. *Circ Res* 102: 270-272, 2008
- 23) Williams EB, Halpert I, Wick S, et al: Osteopontin expression is increased in the heritable cardiomyopathy of Syrian hamsters. *Circulation* 92: 705-709, 1995
- 24) Stawowy P, Blachke F, Pfautsch P, et al: Increased myocardial expression of osteopontin in patients with advanced heart failure. *Eur J Heart Fail* 4: 139-146, 2002
- 25) Satoh M, Nakamura M, Akatsu T, et al: Myocardial osteopontin expression is associated with collagen fibrillogenesis in human dilated cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail* 7: 755-762, 2005
- 26) Bautista DS, Saad Z, Chambers AF, et al: Quantification of osteopontin in human plasma with an ELISA: basal levels in pre- and postmenopausal women. *Clin Biochem* 29: 231-239, 1996
- 27) Arnlov J, Evans JC, Benjamin EJ, et al: Clinical and echocardiographic correlates of plasma osteopontin in

- the community: the Framingham Heart Study. *Heart* 92: 1514-1515, 2006
- 28) Suezawa C, Kusachi S, Murakami T, et al: Time-dependent changes in plasma osteopontin levels in patients with anterior-wall acute myocardial infarction after successful reperfusion: correlation with left ventricular volume and function. *J Lab Clin Med* 145: 33-40, 2005
 - 29) Georgiadou P, Iiodromitis E, Kolokanthis F, et al: Osteopontin as a novel prognostic marker in stable ischaemic heart disease: a 3-year follow-up study. *Eur J Clin Invest* 40: 288-293, 2010
 - 30) Soejima H, Irie A, Fukunaga T, et al: Osteopontin expression of circulating T cells and plasma osteopontin levels are increased in relation to severity of heart failure. *Circ J* 71: 1879-1884, 2007
 - 31) Rosenberg M, Zugck C, Nelles M, et al: Osteopontin, a new prognostic biomarker in patients with chronic heart failure. *Circ Heart Fail* 1: 43-49, 2008
 - 32) Ry SD, Giannessi D, Maltinti M, et al: Increased plasma levels of osteopontin are associated with activation of the rennin-aldosterone system and with myocardial and coronary microvascular damage in dilated cardiomyopathy. *Cytokine* 49: 325-330, 2010
 - 33) Zile MR, DeSantis SM, Baicu CF, et al: Plasma biomarkers that reflect determinants of matrix composition identify the presence of left ventricular hypertrophy and diastolic heart failure. *Circ Heart Fail* 4: 246-256, 2011
 - 34) Baronides SH, Castronovo V, Cooper DN, et al: Galectins: a family of animal β -galactoside-binding lectins. *Cell* 76: 597-598, 1994
 - 35) Yang RY, Rabinovich GA, Liu FT: Galectin: structure, function and therapeutic potential. *Expert Rev Mol Med* 13: e13-e39, 2008
 - 36) Krzeslak A, Lionska A: Galectin-3 as a multifunctional protein. *Cell Mol Bio Lett* 9: 305-328, 2004
 - 37) De Boer RA, Voors AA, Muntendam P, et al: Galectin-3: a novel mediator of heart failure development and progression. *Eur J Heart Fail* 11: 811-817, 2009
 - 38) De Boer RA, Yu L, van Velhuisen DJ: Galectin-3 in cardiac remodeling and heart failure. *Curr Heart Fail Rep* 7: 1-8, 2010
 - 39) Sharma UC, Pokharel S, van Brakel TJ, et al: Galectin-3 marks activated macrophages in failure-prone hypertrophied hearts and contributes to cardiac dysfunction. *Circulation* 110: 3121-3128, 2004
 - 40) Liu YH, D'Ambrosio M, Liao TD, et al: N-acetylseryl-aspartyl-lysyl-proline prevents cardiac remodeling and dysfunction induced by galectin-3, a mammalian adhesion/growth-regulatory lectin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 296: H404-H412, 2009
 - 41) Van Kimmenade RR, Januzzi JL, et al: Utility of aminoterminal pro-brain natriuretic peptide, galectin-3, and apelin for the evaluation of patients with acute heart failure. *J Am Coll Cardiol* 48: 1217-1224, 2006
 - 42) Shah RV, Chen-Tournoux AA, Picard MH, et al: Galectin-3, cardiac structure and function, and long-term mortality in patients with acutely decompensated heart failure. *Eur J Heart Fail* 12: 826-835, 2010
 - 43) Lok DJA, van der Meer P, Bruggink-Andre de la Porte PW, et al: Prognostic value of galectin-3, a novel marker of fibrosis, in patients with chronic heart failure: data from the DEAL-HF study. *Clin Res Cardiol* 99: 323-328, 2010
 - 44) Miting H, Ellinghaus P, Seewald M, et al: Plasma biomarkers of myocardial fibrosis and remodeling in terminal heart failure patients supported by mechanical circulatory support devices. *J Heart Lung Transplant* 27: 589-596, 2008
 - 45) Lin YH, Lin LY, Wu YW, et al: The relationship between serum galectin-3 and serum markers of cardiac extracellular matrix turnover in heart failure patients. *Clin Chim Acta* 409: 96-99, 2009
 - 46) De Boer RA, Lok DJA, Jaarsma T, et al: Predictive value of plasma galectin-3 levels in heart failure with reduced and preserved ejection fraction. *Ann Med* 43: 60-68, 2011

特集 テネascin Cと心臓・血管病変

大動脈瘤とテネascin C*

吉村 耕一¹ 木村 泰三² 青木 浩樹³

はじめに

大動脈瘤による破裂死は、ステントグラフト治療を含めた外科的治療の著しい進歩にもかかわらず、依然として高齢者死亡原因の上位にランクされている。近年の研究により大動脈瘤の主病態が慢性炎症ということが明らかになり¹⁾、さらなる治療成績向上に向けて薬物療法とバイオマーカー診断法の開発が期待されている。

筆者らは、最近テネascin Cが腹部大動脈瘤の疾患活動性を反映するバイオマーカーであることを見出した²⁾。本稿では、大動脈瘤の病態におけるテネascin Cの役割と臨床応用に向けての将来展望について述べる。

大動脈瘤診療の現状と課題

大動脈瘤は無症状のまま拡大進行し、放置すれば破裂死に至る。この破裂死を防止することが、大動脈瘤診療の最大の目的である。現在のところ、有効な治療法は人工血管置換術とステントグラフト治療の2つに限られ、いずれも大なり小なり侵襲的である(図1)。それゆえ国内外の診療ガイドラインでは^{3,4)}、瘤破裂リスクに乏しい小径大動脈瘤に対し、経過観察し瘤径拡大に応じて手

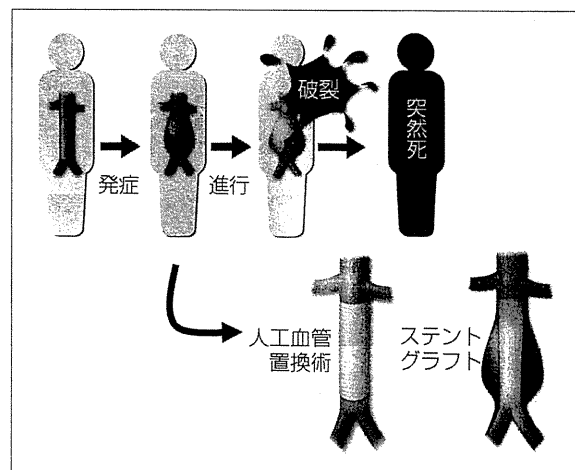


図1 大動脈瘤と現在の治療法

大動脈瘤は、無症状のまま進行して破裂死に至る疾患である。現在の治療法は、确实だが侵襲の大きい人工血管置換術と、低侵襲だが長期効果が不確実なステントグラフト治療しかない。

術を考慮するという治療戦略を推奨している⁵⁾。しかし、それは薬物療法などの内科的治療法が確立していないからに他ならない。一方、大径大動脈瘤では、人工血管置換術あるいはステントグラフト治療によって速やかに破裂リスクを回避しなければならない。しかし、高齢で喫煙者の多い大

* Aortic Aneurysm and Tenascin C

¹ 山口大学大学院医学系研究科器管病態外科学(〒755-8505 山口県宇部市南小串1-1-1) Koichi Yoshimura: Department of Surgery and Clinical Science, Yamaguchi University Graduate School of Medicine

² 筑波大学大学院人間総合科学研究科循環器内科 Taizo Kimura: Division of Cardiovascular Medicine, Graduate School of Comprehensive Human Science, University of Tsukuba

³ 久留米大学循環器病研究所 Hiroki Aoki: Cardiovascular Research Institute, Kurume University

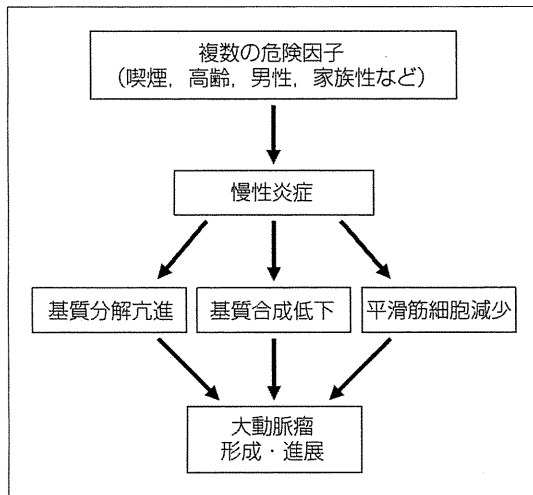


図2 大動脈瘤の病態過程

複数の因子によって大動脈壁に慢性炎症が惹起され遷延化することにより、細胞外基質代謝バランスが分解亢進に傾き、壁が脆弱化して大動脈瘤の形成・進展に至ると考えられる。

動脈瘤患者には耐術困難な患者がしばしば含まれている。そのような高リスク患者の場合、経過観察を凌駕する治療選択肢は現在のところ存在しない⁶⁾。

破裂リスクが高く外科的治療が適用される大径大動脈瘤は、欧米の報告によると、全患者数の僅か1割程度にしか過ぎない^{5,7)}。日本血管外科学会の年次報告⁸⁾によると、腹部大動脈瘤手術が約6,000件/年、胸部も含めた大動脈瘤手術の総数は10,000件/年を超えることから、本邦における大動脈瘤患者総数はこれらの約10倍と推測される。また、米国での腹部大動脈瘤手術は約55,000件/年と報告されており⁹⁾、人口あたりの手術件数にすると本邦の約3倍である。近い将来、本邦においても生活様式の欧米化と人口の高齢化により、欧米に匹敵する罹患率ならびに手術件数へと激増する可能性は十分にある。大動脈瘤を克服し健康な長寿社会を実現するためには、物理的に破裂を防止する外科的治療に加えて、病態や病因に基づく内科的な治療選択肢、特に薬物療法の実現が望まれる。さらにそのためには、疾患活動性や治療効果の評価に有用なバイオマーカー診断法の確立も不可欠である。

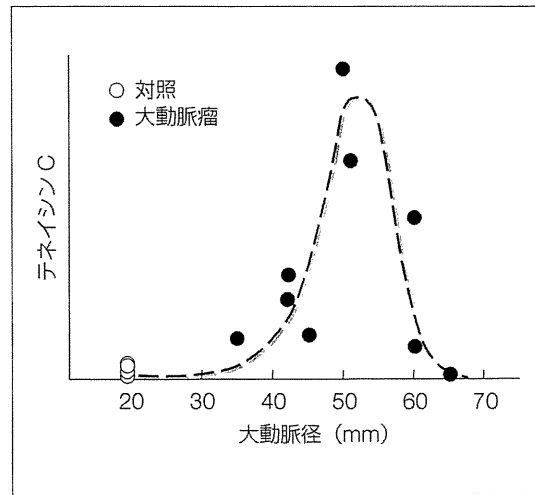


図3 大動脈瘤の瘤径とテネイシンC発現

ヒト腹部大動脈組織中のテネイシンC蛋白発現は、正常径では少なく、瘤径拡大とともに増加するが、瘤径5 cm前後でピークとなり、さらに大きな瘤径では逆に減少する。(文献⁹⁾より改変引用)

大動脈瘤の病態

大動脈の壁脆弱化を惹起し、瘤形成に至らしめる原因については未だ不明な部分が多い。喫煙は、大動脈瘤の発生、拡大、破裂のすべてに関わる危険因子であり¹⁰⁾、禁煙による瘤径拡大の軽減効果も報告されていることから、喫煙が大動脈瘤の病態に強く関与していることは疑う余地がない。喫煙以外の発生危険因子としては高齢、男性、家族歴がよく知られており、一方、糖尿病は負の危険因子である⁴⁾。ヒト大動脈瘤組織では、リンパ球およびマクロファージを主体とする炎症細胞浸潤と、細胞外基質、特に弾性線維の破壊という二つの特徴的な病理所見がみられる。大動脈瘤の一次的な原因は今なお特定されていないが、複数の病因刺激によって大動脈壁の炎症が惹起されるものと推察される。初期には炎症性メディエーターの亢進に伴い炎症細胞が浸潤し、炎症性シグナル伝達分子は活性化するが、細胞外基質の構造は保たれている。炎症が遷延化して病態が進行すると、主に炎症細胞由来の基質分解酵素が活性化し、さらに平滑筋細胞の基質合成能低下や平滑筋細胞自体の減少とあいまって細胞外基質の構築は消失する。その結果、大動脈壁は局所的に脆

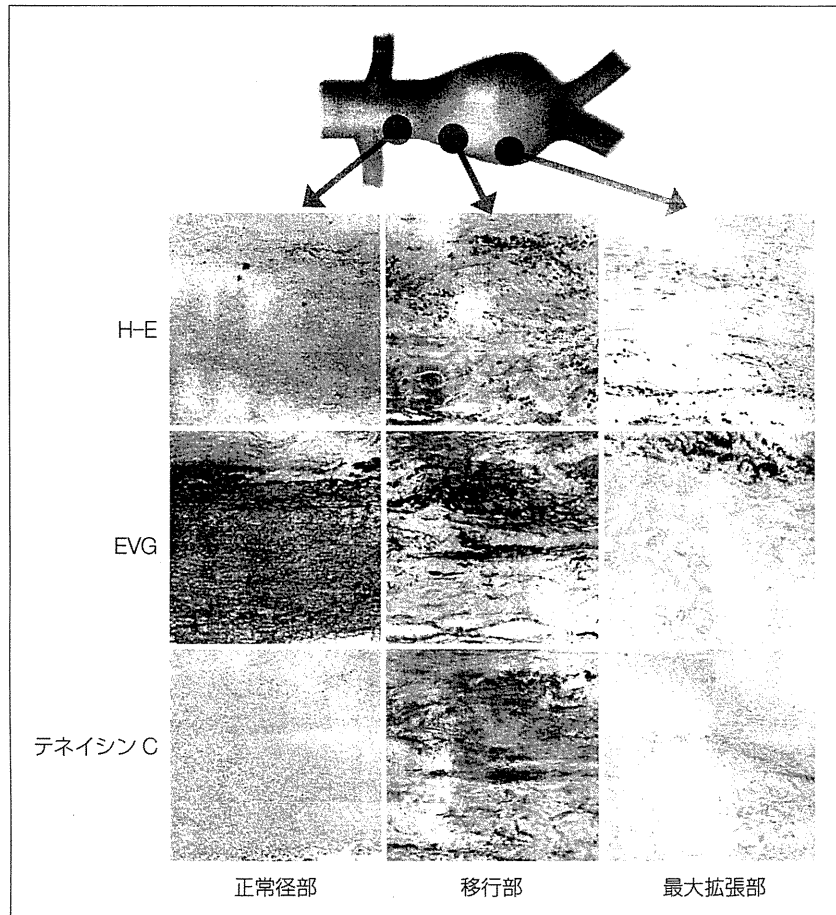


図4 大動脈瘤の病理像とテネイシンC局在

ヒト腹部大動脈瘤の最大拡張部は細胞成分に乏しく既に弾性線維が消失した末期像を呈していることが多い。顕著な炎症細胞浸潤と弾性線維破壊がみられるのはむしろ移行部である。テネイシンCは移行部の活動性病変部に強く発現していた。

H-E: Hematoxylin-Eosin, EVG: Elastica van Gieson (文献²⁾より改変引用)

弱体化して瘤は拡大進展し、放置すれば破裂に至ることになる(図2)^{1, 11, 12)}。

近年、分子生物学的アプローチによる基礎的研究が増え、薬物療法の治療標的となるような病態の鍵分子が複数報告されてきている¹³⁾。筆者らは、炎症病態ならびに細胞外基質の分解亢進と合成低下の病態を統合的に制御する分子としてストレス応答性シグナル伝達分子 c-Jun N 末端キナーゼ(JNK)を同定した¹⁴⁾。さらに JNK 阻害剤によりマウス大動脈瘤が退縮治癒することを報告している¹⁵⁾。一方、基礎的研究で有望視され、既に臨床研究が実施されたものもある。その主なものに、炎症メディエーターを標的とするアンジオテンシン変換酵素(ACE)阻害剤、アンジオテンシン II 受容体拮抗薬(ARB)、HMG CoA 還元酵素阻害剤(スタチン)、また基質分解酵素阻害作用

を有するドキシサイクリンなどがある。しかしながら、有用な治療標的の同定のみならず治療効果判定用のバイオマーカーも不可欠であるなど、克服すべき課題は多く¹⁶⁾、未だ薬物療法の実現には至っていない。

テネイシンCの役割

テネイシンCの分子的特徴の詳細は本特集別稿に譲るとして、テネイシンCが平滑筋細胞¹⁷⁾ならびに大動脈瘤組織^{18, 19)}で発現していること、炎症組織局所で発現亢進し炎症病態ならびに組織修復を制御しうることから²⁰⁾、筆者らは大動脈瘤病態におけるテネイシンCの役割に着目した。手術時に採取された腹部大動脈組織中のテネイシンC蛋白発現を検討したところ、瘤状変化のない対照大動脈組織では発現がほとんどみられ

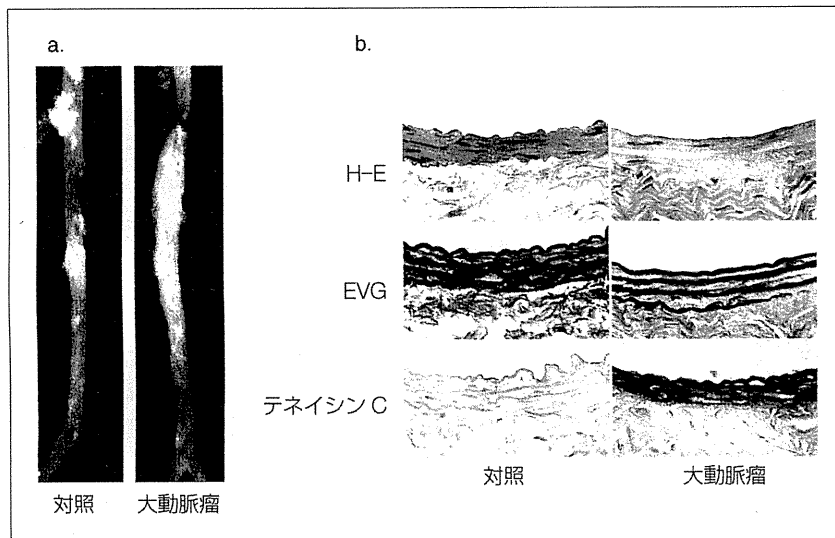


図5 マウス大動脈瘤モデルにおけるテネイシンC発現

カルシウム刺激によるマウス腹部大動脈瘤モデル(a)とその組織像を示す(b)。瘤形成時の大動脈壁で炎症細胞浸潤と弾性線維の破壊像が認められ、この病態活動期に一致してテネイシンCの発現が確認された。

H-E: Hematoxylin-Eosin, EVG: Elastica van Gieson (文献²⁾より改変引用)

ないのに対し、大動脈瘤組織においては発現が亢進していた。興味深いことに、瘤の最大拡張部から採取した組織の解析結果を瘤径別にみると、瘤径5 cm前後から採取した組織中のテネイシンC発現が最も高く、これより小さな瘤径のものや大きな瘤径のものでは比較的低い発現量であった(図3)。次いで、6 cmを超える大径瘤において正常径の頸部から最大拡張部までの縦長組織片を採取して、テネイシンC蛋白の局在を検討した。その結果、正常径部には炎症細胞がほとんどみられず組織構築も保たれており、テネイシンCの発現も検出されなかった。対照的に、瘤拡大途中の移行部では炎症細胞浸潤が顕著で弾性線維破壊を伴っており、同部に一致してテネイシンCの強い発現が認められた。弾性線維が既に消失し細胞成分がほとんどみられない最大拡張部では、テネイシンCの発現も僅かであった(図4)²⁾。テネイシンC発現細胞は主に平滑筋細胞であることが確認されたので、最大拡張部でテネイシンCの発現がほとんどみられないのは、同部に平滑筋細胞が残存していないことによると考えられる。一方、大動脈壁における炎症病態が活性化され細胞外基質分解を伴って瘤を形成・進展する過程で、その活動性病巣の平滑筋細胞におけるテネイシンC発現が亢進するものと考えられた。径5 cm前後の瘤では最大拡張部でもなお炎症病態が

活動期にあり、さらなる瘤進展の途中に違いないので、これはテネイシンCが径5 cm前後の瘤で高発現であったこと(図3)とよく合致する。

筆者らは、大動脈瘤の空間的な進展のみならず経時的な進展においても、テネイシンCが病態活動期に一致して発現亢進することを実証するために、高濃度塩化カルシウム刺激によるマウス大動脈瘤モデル¹⁵⁾を用いた(図5a)。このモデルでは刺激後6週頃まで炎症が持続し瘤径が徐々に拡大する。刺激後6週目の大動脈組織で炎症細胞浸潤と弾性線維の破壊像が認められ、この病態活動期に一致してテネイシンCの発現が大動脈壁の中膜平滑筋細胞層に強く確認された(図5b)²⁾。以上の結果から、テネイシンCは大動脈瘤の疾患活動性を反映する新しいバイオマーカーとして有望視できる。なお、疾患活動期に発現するテネイシンCが大動脈瘤病態にどのような役割を果たしているかは、筆者らによって現在解析中である。

臨床応用への展望

テネイシンCは発現した局所にとどまるためバイオイメージングで検出することが可能であるが²¹⁾、同時に循環血液中にも放出され安定して存在するため、血清テネイシンCの測定により病変局所の活動性を簡便に評価できる可能性が十分