

冠動脈不安定粥腫破綻の四次元的な観察

李予昕¹⁾, 大西彰²⁾, 須藤晃正³⁾, 福島聖二³⁾, 林清飛¹⁾, 鈴木俊一²⁾, 淵本大一郎²⁾,
千本正一郎²⁾, 岩元正樹⁴⁾, 橋本径子⁴⁾, 春田裕典³⁾, 高山忠輝³⁾, 國本聡³⁾,
廣高史³⁾, 松本太郎⁵⁾, 三俣昌子³⁾, 杉谷雅彦⁶⁾, 斎藤颯¹⁾, 平山篤志³⁾

Four-Dimensional Observation of Unstable Plaque Rupture
in Coronary Artery

Yuxin LI¹⁾, Akira ONISHI²⁾, Mitsumasa SUDO³⁾, Seiji FUKUSHIMA³⁾, Qingfei LIN¹⁾,
Shunichi SUZUKI²⁾, Daiichiro FUCHIMOTO²⁾, Shoichiro SEMBON²⁾, Masaki IWAMOTO⁴⁾,
Michiko HASHIMOTO⁴⁾, Hironori HARUTA³⁾, Tadateru TAKAYAMA³⁾, Satoshi KUNIMOTO³⁾,
Takafumi HIRO³⁾, Taro MATSUMOTO⁵⁾, Masako MITSUMATA³⁾, Masahiko SUGITANI⁶⁾,
Satoshi SAITO¹⁾, Atsushi HIRAYAMA³⁾

要旨

冠動脈粥腫進展と破綻の原因はまだ明らかになっていない。本研究の目的はLDLコレステロール受容体ノックアウト (LDLR^{-/-}) ブタを用いて、ACSの患者と似ている冠動脈不安定プラークを持つ大動物モデルを確立し、長期間にわたり経時的に冠動脈を観察することにより、粥腫形成の初期段階の内膜肥厚から最終的に破綻に至るまでの自然進展の経過を把握することである。LDLR^{-/-}ブタに高コレステロール高脂肪食を負荷する事で、短期間に急性冠症候群の発症の原因となる不安定プラークを形成することに成功した。今後、さらに長期的に観察することより不安定プラークの破綻のメカニズムを解明し、プラークの易破綻性の正確な評価を期待している。

1. はじめに

冠動脈粥腫の破綻が急性冠症候群の発症の原因となることが明らかになっているが、破綻しやすい粥腫(不安定プラーク)の形成過程、また破綻の契機となる原因は未だ明らかになっていない。その大きな理由の一つは冠動脈粥腫形成、破綻の時間的経過を正確に捉えていないことである。一方、進歩した血管内イメージング法は不安定プラークを特徴づけ、急性冠症候群(acute coronary syndrome, ACS)の危険度を評価することができるが、実際の臨床の現場においては、破綻直前の不安定プラークを捉えることは極めて難しい。従って、冠動脈粥腫が破綻した後から破綻経過を遡及して、その機序を解明することは困難である。

本研究の目的はLDLコレステロール受容体ノックアウト (LDLR^{-/-}) ブタを用いて、ACSの患者と似ている冠動脈不安定プラークを持つ大動物モデルを確立することである。また、長期間にわたり経時的に冠動脈を観察することにより、粥腫形成の初期段階の内膜肥厚から最終的に破綻に至るまでの自然進展の経過を把握する。また、血管内イメージング法で得られた粥腫の三次元立体構造に時間軸も含め、四次元的に再現することより、粥腫不安定化の分子、組織、力学的多面的な要因を解明し、粥腫の破綻を未然に防ぐ治療法の開発の指針をもたらすことである。

1) 日本大学医学部内科学系先端心血管画像解析学分野
2) 独立行政法人農業生物資源研究所医用モデルブタ研究開発ユニット
3) 日本大学医学部内科学系循環器内科学
4) プライムテック株式会社
5) 日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野
6) 日本大学医学部病態病理学系病理学分野
李予昕: li.yuxin@nihon-u.ac.jp

2. 対象及び方法

ブタは生理学的, 解剖学的, および遺伝学的にヒトに比較的近い動物であるため, 近年疾患モデルとして遺伝子組換えブタの開発が急速に進んできている。本研究では平成23年に世界で初めて作成したLDLコレステロール受容体ノックアウトホモ接合体 (LDLR^{-/-}) ブタを用いた。LDLR^{-/-}ブタは急速に動脈硬化が進行し, まだ未成熟の6ヶ月齢で, 冠動脈は内皮の肥厚等の初期の動脈硬化の所見がえられた。粥腫の進展をさらに加速し, 特に不安定プラークの形成を促進するため, 3ヶ月齢からLDLR^{-/-}ブタに1.5%コレステロールと15%脂肪食を4ヶ月間与えた。

同一個体において長期間にわたり, 経時的に冠動脈造影を施行し, 血管内超音波 (IVUS), 血管内視鏡, OCTなどの血管内イメージングを行ってデータを収集した。収集された血管内イメージング画像で冠動脈プラークの組織性状を同定する。またIVUSとOCTの画像信号を三次元再構造ソフトウェアで, 三次元立体構造を解析する。実験終了時には各臓器と血管を取り出し, タンパク, mRNAを抽出し, 炎症関連因子を中心として分子生物学的解析を行った。また, 動脈プラークを持つ各血管組織を固定後, 血管内イメージング法で観察した冠動脈プラークと同一病変を免疫染色などにより, マクロファージ, 内皮, 平滑筋, アポトーシス, 炎症因子などさまざま

なプラーク不安定化に関連する因子を病理学的に検討した。

3. 結果

LDLR^{-/-}ブタの血中LDLは野生型ブタ (WT) の14倍以上, 総コレステロールも約8倍に増加し, またHDLは70%も減少した (図1)。

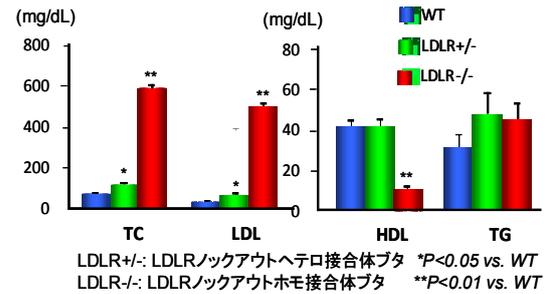


図1 血中コレステロール濃度

LDLR^{-/-}ブタに1.5%コレステロールと15%脂肪負荷食を継続して4ヶ月後, 冠動脈病変部に著明な血管径拡大 (positive remodeling) と大量のプラークを認めた (図2A, 左冠動脈回旋枝)。また, IVUS画像をiMap機能により組織性状を解析すると, プラーク内に大量の壊死コアを認めた (図2B, ピンクは壊死コア)。病変部位をHE染色すると, プラークの中には炎症細胞が侵入し, 破綻しやすい薄い線

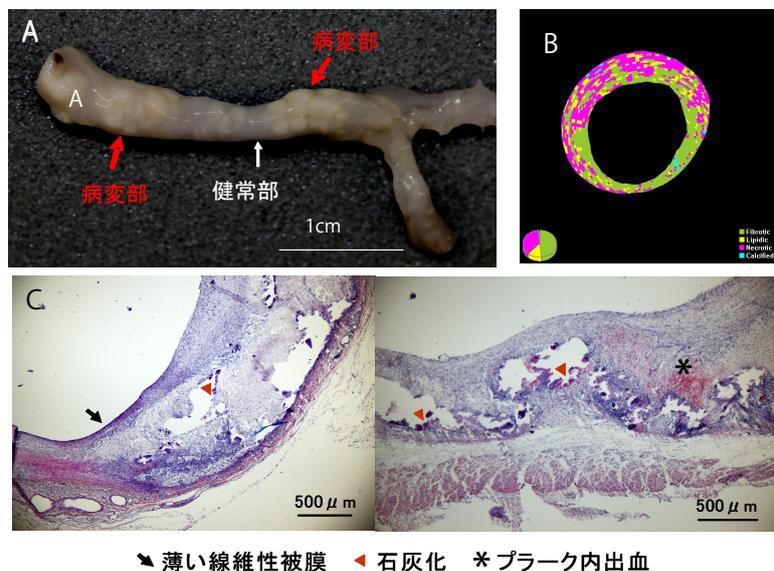


図2 冠動脈病変

維性被膜, 多量の脂質コア, 大量の石灰化, プラーク内出血などの不安定プラークの特徴を認めた (図2C)。

IVUS画像信号を三次元再構造ソフトウェアで解析すると, Lumen Volume は $8.71 \pm 1.43 \text{ mm}^3/\text{mm}$, Vessel Volume は $15.80 \pm 1.82 \text{ mm}^3/\text{mm}$, Plaque Volume は $7.10 \pm 0.45 \text{ mm}^3/\text{mm}$, Volumetric Plaque % は 42.47 ± 3.30 であった。

4. 考察

以上, LDLR^{-/-}ブタの血中コレステロール濃度は極めて高く, ヒト高コレステロール血症と類似し, また急速に動脈硬化が進行し, 若いうちに冠動脈にプラークが形成された。また LDLR^{-/-}ブタに高コレステロール高脂肪食を負荷する事で, 短期間に急性冠症候群の発症の原因となる不安定プラークが発展できた。この高コレステロール高脂肪食負荷 LDLR^{-/-}ブタは, 不安定プラークの形成と破綻のメカニズムを研究するための理想な大動物モデルになると考えられた。不安定プラークを持つ LDLR^{-/-}ブタを用いて, 経時的に観察することにより粥腫破綻のメカニズムの完全な解明や, 粥腫の易破綻性の正確な評価法が定まり, 粥腫の破綻を防ぐ新しい治療法の開発など全く新しい治療方法の開発に大いに役立つと思われた。

また肉用ブタより作出した LDLR^{-/-}ブタは, 体重が生後急速に増長し, 6ヶ月で100Kg, 1年で200Kg以上になり, 体型が大きすぎるため, 長期間の飼育,

観察と普及は不可能である。現在 LDLR^{-/-}ブタをミニブタ系統と交配, 選抜し, 体重30kg以内の LDLR^{-/-}ミニブタの開発を課題としている。

5. 結語

LDLR^{-/-}ブタに高コレステロール高脂肪食を負荷する事で, 短期間にヒトと類似した不安定プラークが発展できた。長期的に四次元的観察することより不安定プラークの形成と破綻のメカニズムを解明し, プラークの易破綻性の正確な評価を期待する。

文献

- Onishi A, Iwamoto M, Akita T, et al. Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. *Science* 2000; **289**: 1188-90.
- Ueda Y, Asakura M, Hirayama A, et al. Intracoronary morphology of culprit lesions after reperfusion in acute myocardial infarction: serial angioscopic observations. *J Am Coll Cardiol* 1996; **27**: 606-10.
- Hirayama A, Asakura M, Yamaguchi O, et al. Coronary angiography in ischemic heart disease *J Cardiol*. 2000; **35** Suppl 1: 57-60.
- Daisy Sahni, G.D. Kaur, Harjeet & Indar Jit. Anatomy & distribution of coronary arteries in pig in comparison with man *Indian J Med Res* 2008; **127**: 564-570
- Rapacz J, Hasler-Rapacz J, Taylor KM, et al. Lipoprotein mutations in pigs are associated with elevated plasma cholesterol and atherosclerosis. *Science* 1986; **234**: 1573-7
- Prescott MF, Hasler-Rapacz J, von Linden-Reed J, et al. Familial hypercholesterolemia associated with coronary atherosclerosis in swine bearing different alleles for apolipoprotein B. *Ann N Y Acad Sci* 1995; **748**: 283-93.