

advanced glycation end productによる血管グラフト硬化  
発症機構の解明  
—動脈硬化発症機構解明および治療法開発を目指して

課題番号：11470236

平成11年度～平成13年度科学研究費補助金(基盤研究(B)(2))研究成果報告書

平成14年3月

研究代表者 笹嶋唯博  
(旭川医科大学医学部)

# advanced glycation end productによる血管グラフト硬化発症 機構の解明

一動脈硬化発症機構解明および治療法開発を目指して

課題番号：11470236

## 研究組織

|       |  |
|-------|--|
| 研究代表者 | 笹嶋唯博（旭川医科大学医学部教授）  |
| 研究分担者 | 山崎弘資（旭川医科大学医学部講師）<br>羽賀将衛（旭川医科大学医学部助手）<br>地野之浩（大正製薬開発研究所研究員） |
| 研究協力者 | 小沢恵介（旭川医科大学医学部研究生）   |

## 研究経費

|        |        |    |
|--------|--------|----|
| 平成11年度 | 13,000 | 千円 |
| 平成12年度 | 1,000  | 千円 |
| 平成13年度 | 1,100  | 千円 |
| 計      | 15,100 | 千円 |

## 研究発表

### (1) 論文

Sasajima, T., Bhattacharya, V., Wu, M. H. D., Shi, Q., Hayashida, N., Sauvage, L. R.: Morphology and histology of the human and canine internal thoracic arteries. *Ann Thorc Surg.* 68; 143-148, 1999.

### (2) 口頭発表

1) 山崎弘資、羽賀将衛、清水紀之、平澤雅敏、古屋敦宏、笹嶋唯博、Sauvage Lester, Wu Moses: 内胸動脈におけるAdvanced glycation end product沈着. 第53回日本胸部外科学会総会. 2000

2) Yamazaki, Kosuke, Hirasawa, M., Koya, A., Ozawa, K., Inaba, M., Goh, K., Sasajima, T.: Advanced glycation end product deposition in internal thoracic arteries. The Asian Chapter Congress of the International Union of Angiology. 2001. 11. (Jeju, Korea)

3) Sasajima, Tadahiro: Biological fates of vascular grafts. The Asian Chapter Congress of the International Union of Angiology. 2001. 11. (Jeju, Korea)

## 緒言

糖尿病患者では動脈中膜の石灰化 (Monckeberg型石灰化) が高率に発生するが、この機序として血管中膜構成タンパクへのpentosidineなどのadvanced glycation end product (AGE)の沈着が注目されている。AGEは生体内タンパクのアミノ基と糖との間のメイラード反応により生成される糖化タンパクで、老化、動脈硬化発生機序にかかわる重要な因子として注目されている。AGEの候補物質としてpentosidine, carboxymethyllysine (CML), pyrrolidine, crossline, imidazolone, carboxyethyllysineなどが考えられている。

動脈再建に使用される代用血管のうち、ヒト自家静脈グラフトは移植後5年以降に高率にグラフト硬化を発生する。静脈グラフトにおける硬化の前段階では必ず弾性板の消失、内膜肥厚、中膜平滑筋細胞の消失が起こり、内胸動脈においても中膜弾性線維層が加齢と共に変性、減少し、弾性板周辺筋層が線維化に向かう。しかし内胸動脈にみられるこれら変性の進展は自家静脈に比べて極めて緩徐であり、弾性動脈としての防御機構、とりわけ内弾性板と数層の中膜弾性板がglycationからの防御作用を発揮していると考えられる。

本研究の目的は正常ヒト血管を用い、中膜へのAGE沈着、中膜弾性線維層の構造変化、特にそのglycationによる変性により中膜平滑筋細胞がアポトーシスへと向う一連の変性過程を解析し、動脈硬化発生機序におけるAGEの関与とその対策を明かにすることである。

## 材料と方法

### 1. 材料

1) Northwest Tissue Center (Seattle, WA)より事故、頭部銃創、肺炎で死亡した動脈硬化病変のない16人の内胸動脈血管標本を提供された。年齢は15~79歳 ( $41.8 \pm 20.6$ 歳) (40歳未満8例、40歳以上8例)、男性13例、女性3例。

2) 旭川医科大学付属病院での剖検で得られた0歳および4歳児の内胸動脈標本。

### 2. 方法

1)  $3 \mu\text{m}$ パラフィン切片を作成、蛍光顕微鏡システムOlympus System Microscope BX60を用い、370nmの波長で励起し、AGEの発する440nmの青色自家蛍光を観察した (図1)。内胸動脈AGE沈着を蛍光強度から (-)、(+)、(2+)、(3+)、(4+)の5段階に分類した (図2)。

2)  $3 \mu\text{m}$ パラフィン切片を作成、蛍光顕微鏡システムOlympus System Microscope BX60を用い、370nmの波長で励起し、AGEの発する440nmの青色

自家蛍光画像をPolaroid Digital Camera PDMCie/OLにて取り込み、内蔵された画像解析ソフトを用いAGE蛍光強度を半定量し、Unit/areaで表示した。

3) 3 $\mu$ mパラフィン切片を、熊本大学堀内正公教授より供与された、3種類の抗AGE抗体：6D12（抗CML抗体）、CMS-10（抗CML抗体）、H-12（抗Pyrraline抗体）を1次抗体として用い、SAB法で免疫組織染色を行った（図3）。

## 結果

### 1. 内胸動脈へのAGE沈着（自家蛍光定性）

0歳児および4歳児の内胸動脈では自家蛍光は発しておらず、AGE沈着は認めなかった。成人内胸動脈では全て自家蛍光を認め、蛍光強度は年齢と共に増加しており、年齢と共にAGE沈着が増加していると考えられた（図4）。

### 2. 内胸動脈へのAGE沈着（自家蛍光半定量）

画像解析による蛍光強度の半定量においても、自家蛍光強度は年齢の増加と共に増加する傾向を認めた（図5）。

### 3. 抗AGE抗体を用いた検討（表1）

0歳児および4歳児の内胸動脈では6D12, CMS-10, H-12いずれでも染色されなかった。成人内胸動脈では6D12, CMS-10, H-12のいずれでも染色陽性であったが、年齢との相関は認めなかった。

## 考察

AGEは生体内タンパクのアミノ基と糖との間のメイラード反応により生成される糖化タンパクで、近年、老化、動脈硬化との関連で注目されてきている。水晶体では加齢とともにAGEが沈着することが報告されている。血管ではコラーゲン、エラスチンなどの中膜構成タンパクに沈着することが報告されているが、本研究においても、成人内胸動脈では中膜弾性線維層へのAGEの沈着を認め、加齢が進むと内膜においてもAGE沈着を認めた。自家蛍光を用いたAGE検出法では、加齢とともに内胸動脈へのAGE沈着が増加していることが明らかとなった。現在、AGEの候補物質としてpentosidine, CML, pyrraline, crossline, imidazolone, carboxyethyllysineなどが考えられているが、今回用いた6D12, CMS-10, H-12の抗体が検出する、CML, pyrralineに関しては加齢との相関を認めなかった。今後、pentosidine, imidazolone, carboxyethyllysineに対する抗体を用いた検討が必要であると考えられた。成人では自家蛍光、抗AGE抗体いずれの方法でも、内胸動脈へのAGE沈着が検出されたが、0歳児および4歳児の内胸動脈ではいずれの方法でもAGE沈着は認めなかった。加齢とともにAGE沈着は増加するが、少なくとも幼児期まで

はAGE沈着は起きていないと考えられる。

弾性動脈である内胸動脈では、内弾性板と数層の中膜弾性線維層により中膜平滑筋細胞がglycationから保護されていると考えられている。加齢とともにAGE沈着は増加し、中膜弾性線維層も減少し、中膜弾性線維層防御機構の減弱を認めるものの、内胸動脈に関する限り、高齢でも十分に動脈硬化防御機構は機能していることが示唆された。

## 文献

1. Sasajima, T., et al.: Morphology and histology of the human and canine internal thoracic arteries. *Ann Thorc Surg.* 68; 143-148, 1999.
2. Yatuyanagi, E., Sasajima, T., et al.: Role of medial smooth muscle cell function in antithrombogenicity of vein grafts. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 15; 350-356, 1998.

AGE autofluorescence



modified Verhoeff's and van Gieson's stain

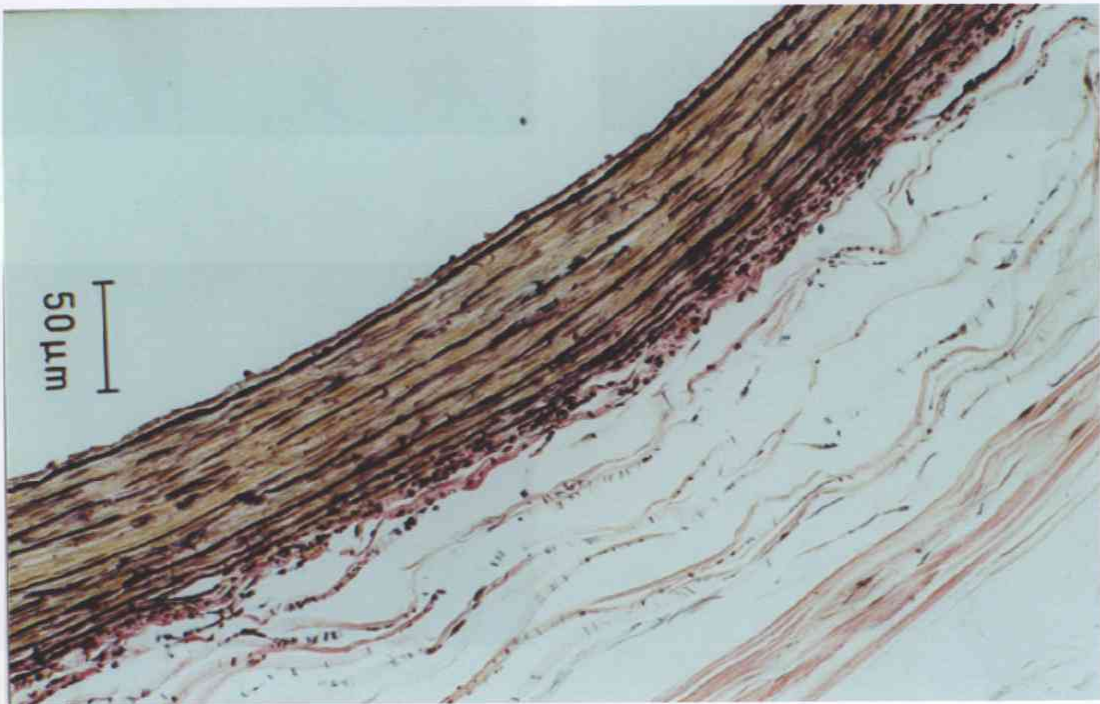
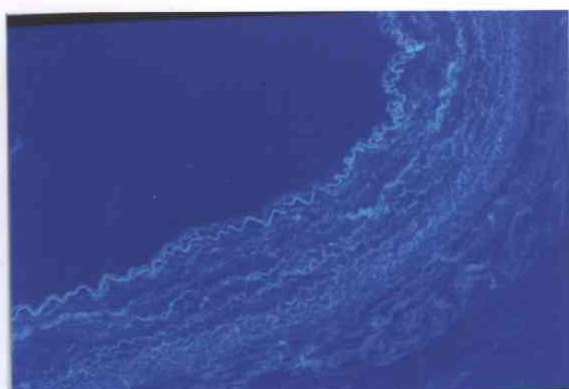


图 1



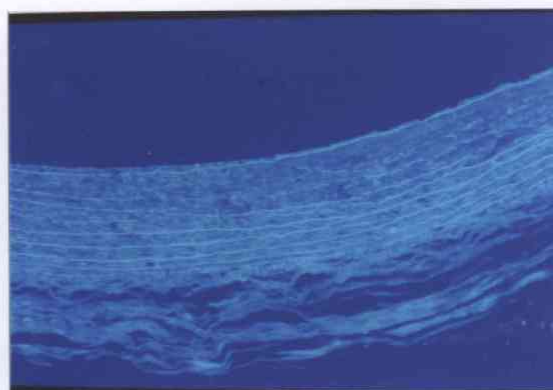
(-)



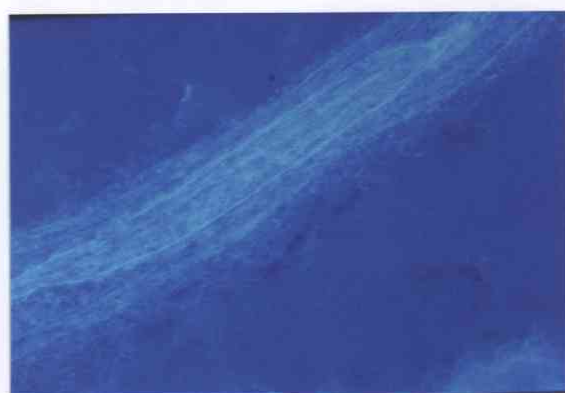
(3+)



(+)



(4+)



(2+)

图 2



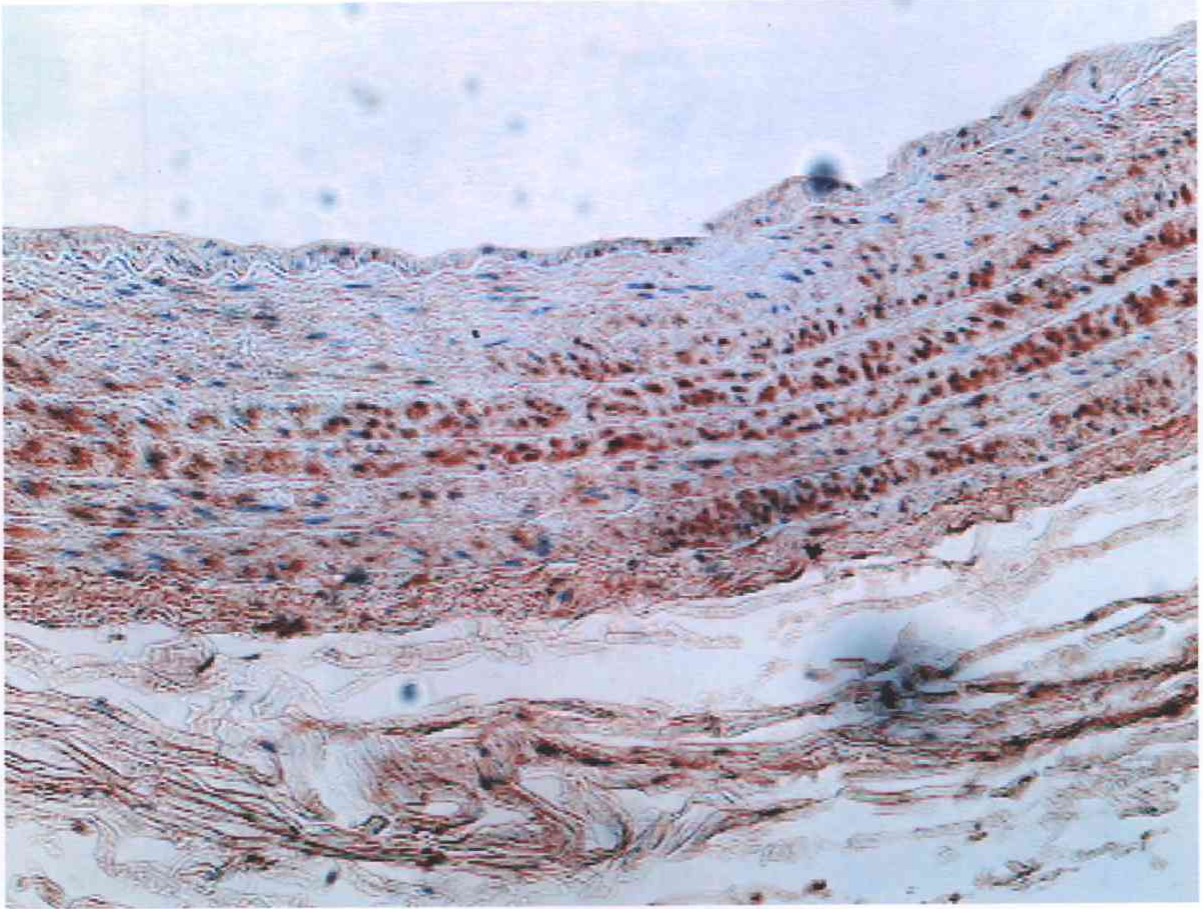


图 3

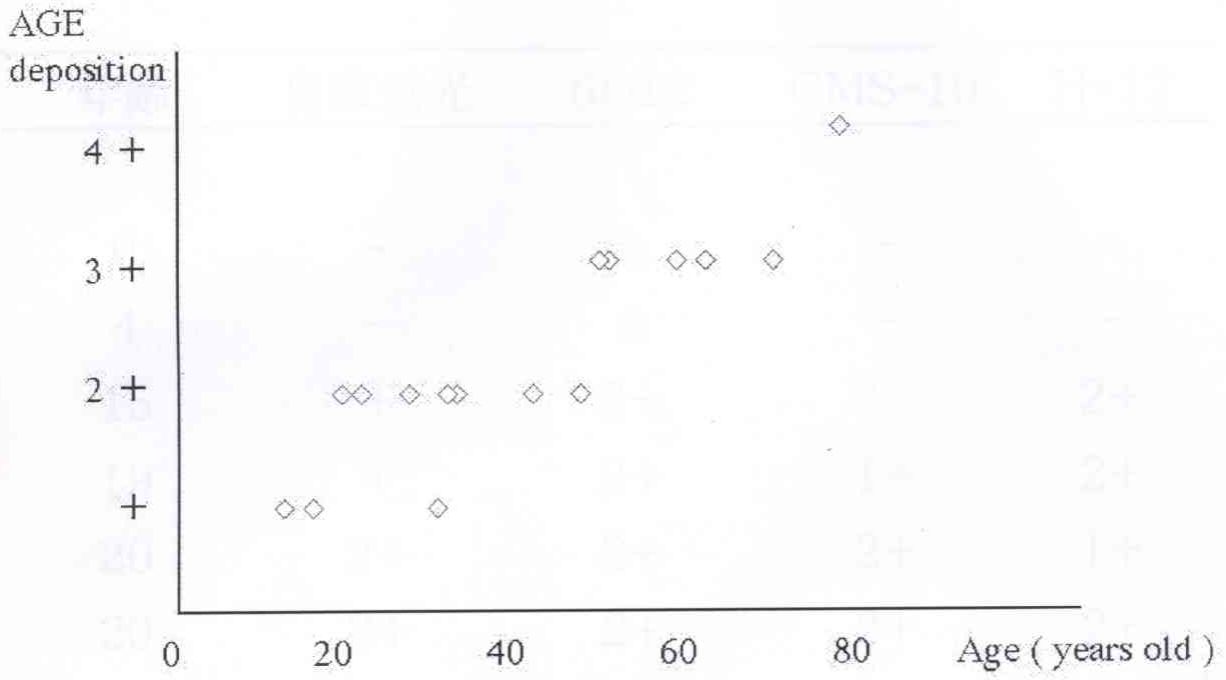


図 4

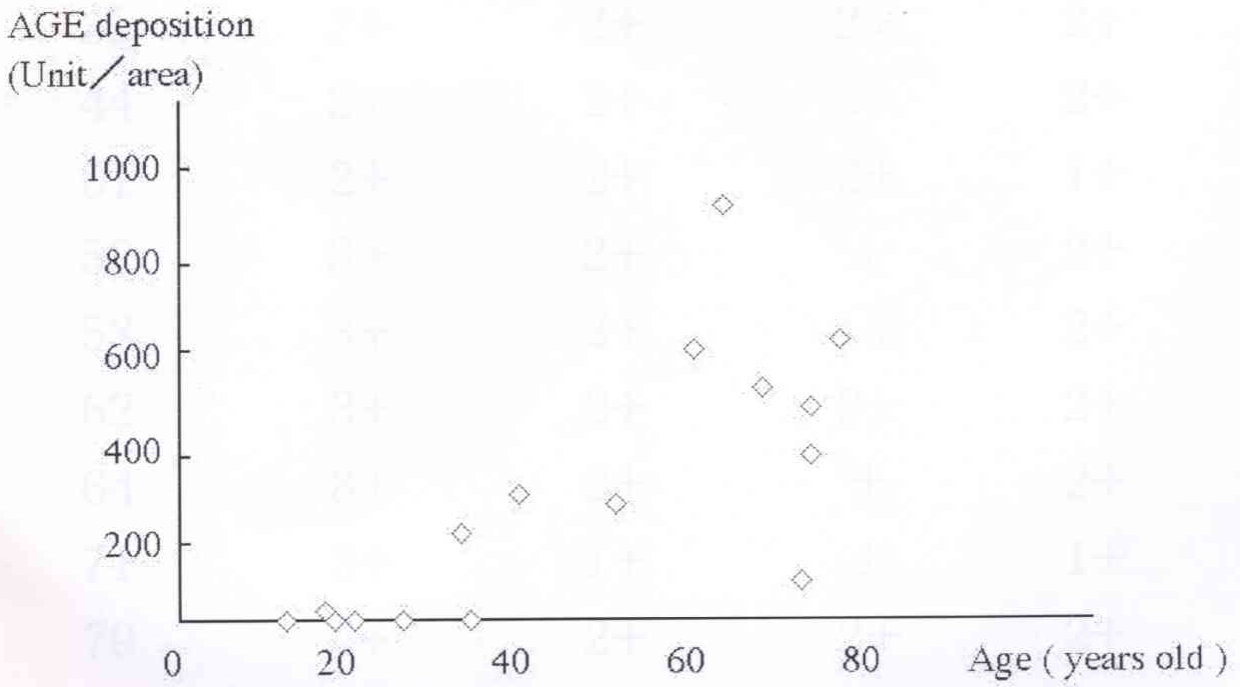


図 5

表 1

| 年齢 | 自家蛍光 | 6D12 | CMS-10 | H-12 |
|----|------|------|--------|------|
| 0  | -    | ±    | -      | -    |
| 4  | -    | ±    | -      | -    |
| 15 | +    | 2+   | 2+     | 2+   |
| 19 | +    | 2+   | 1+     | 2+   |
| 20 | 2+   | 2+   | 2+     | 1+   |
| 20 | 2+   | 2+   | 2+     | 2+   |
| 22 | 2+   | 2+   | 2+     | 2+   |
| 27 | +    | 1+   | 1+     | 2+   |
| 34 | 2+   | 1+   | 1+     | 1+   |
| 35 | 2+   | 2+   | 2+     | 2+   |
| 44 | 2+   | 2+   | 2+     | 2+   |
| 51 | 2+   | 2+   | 2+     | 1+   |
| 52 | 3+   | 2+   | ±      | 2+   |
| 53 | 3+   | 2+   | 1+     | 2+   |
| 62 | 3+   | 2+   | 2+     | 2+   |
| 64 | 3+   | 2+   | ±      | 2+   |
| 71 | 3+   | 1+   | ±      | 1+   |
| 79 | 4+   | 2+   | 2+     | 2+   |