

氏名(本籍)	とみ ざわ ひろ こ (群馬県) 富 沢 浩 子		
学位の種類	博 士 (医 学)		
学位記番号	博 甲 第 1130 号		
学位授与年月日	平 成 5 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	学 位 規 則 第 5 条 第 1 項 該 当		
審査研究科	医 学 研 究 科		
学位論文題目	糖 尿 病 性 血 管 障 害 に お け る 非 酵 素 的 糖 化 蛋 白 の 意 義 に 関 す る 研 究		
主 査	筑波大学教授	医学博士	小 山 哲 夫
副 査	筑波大学教授	医学博士	杉 田 良 樹
副 査	筑波大学教授	医学博士	本 村 幸 子
副 査	筑波大学教授	医学博士	渡 邊 照 男
副 査	筑波大学助教授	理学博士	牧 野 誠 夫

## 論 文 の 要 旨

### 〈目的〉

糖尿疾患者にみられる血管障害の成因の一つとして蛋白の非酵素的糖化が注目されている。非酵素的糖化は、蛋白質と糖が結合してアマドリ転位生成物を生成する初期段階と、さらに脱水転位反応が繰り返され advanced glycation end product (AGEP) に変化する後期段階からなる。血管壁構成蛋白において AGEP によるマトリックス蛋白分子内・分子間のクロスリンクや、細胞-マトリックス間あるいはマトリックス成分どうしの関係が変化し、その結果生じる蛋白の構造的・機能的変化が糖尿病における血管障害の発症機序の一つとして推測されている。この可能性を検討するために、ストレプトゾトシン (STZ) 糖尿病ラットを用いて(1)大型～中型動脈におけるエラスチンの糖化とカルシウム沈着の関係、(2)腎糸球体基底膜の糖化と蛋白尿との関連を検討した。さらに、糖化の後期段階の反応を抑制するとされているアミノグアニジンが糖尿病性血管障害を抑制しうるか否かについて検討した。

### 〈対象と方法〉

1. STZ 糖尿病ラットにおける糖化エラスチンの生成とカルシウム沈着に関する検討：ウィスター系雄ラットに STZ50mg/kg を静注し、糖尿病を惹起した。同週齢の無処置ラットを対照とした。アミノグアニジン (AG) は STZ 処置翌日から毎日25mg/kg を腹腔内に投与した。STZ 静注後、3、5、10週目に大動脈エラスチンを抽出し、初期糖化反応の指標であるケトアミンの蔞酸加水分解産物である 5-Hydroxymethylfurfural (5-HMF) と後期糖化反応の指標として、その蛍光特性を利

用し、蛍光 (Ex370nm, Em440nm) を測定した。大動脈を脱脂後に濃硝酸中で灰化して、カルシウム含量を測定した。

2. STZ 糖尿病ラットにおける糸球体基底膜の糖化と尿蛋白に関する検討：糖尿病ラットの作成とアミノグアニジン投与は研究 1 に準じた。無処置対照群 (C 群), アミノグアニジン投与対照群 (C+AG 群), 糖尿病群 (DM 群), アミノグアニジン投与糖尿病群 (DM+AG 群) の 4 群について、糸球体基底膜を単離し、糸球体基底膜の 5-HMF を測定した。尿蛋白を SDS-PAGE で分析した。  
<結果>

1. STZ 糖尿病ラットにおける糖化エラスチンの生成と Ca 沈着に関する検討：1) 5-HMF 値は糖尿病群では対照群と比較して 3 週で 1.1 倍に、5 週で 1.6 倍 ( $P < 0.01$ ) に増加し、10 週では 1.2 倍とやや減少した。

2) 蛍光は糖尿病群では対照群と比較し、3, 5, 10 週において、それぞれ 1.6 倍, 2.4 倍, 1.9 倍と有意に増加した。

3) カルシウム含量は 3 週において両群で差を認めなかったが、10 週には糖尿病群で対照群の 1.4 倍 ( $P < 0.01$ ) に増加した。この増加は糖化の後期段階の反応を抑制するとされているアミノグアニジン投与により抑制された。

2. STZ 糖尿病ラットにおける糸球体基底膜の糖化と尿蛋白に関する検討：

1) 10 週齢における糸球体基底膜の 5-HMF 値は C 群と (C+AG) 群間, DM 群と (DM+AG) 群間では有意差が認められなかったが、DM 群では C 群の 2.4 倍と有意に高値であった。

2) 尿蛋白の分析では、10 週における DM 群の 62kD, 69kD (アルブミン), 77kD の高分子蛋白は C 群に比して各々 3.6, 3.8, 4.1 倍であり、有意に高値であった。DM 群 69kD の尿蛋白は 3, 5, 10 週目において、それぞれ C 群の 3.6, 3.8, 4.1 倍と有意に高値であった。

3) (DM+AG) 群と DM 群との比較においては 3, 5 週では 62kD, 69kD, 77kD のいずれの分画についても有意差を認めなかったが、10 週目では (DM+AG) 群の各蛋白分画は、各々 DM 群の 54%, 40%, 49% と有意に低値であった。

<考察および結論>

STZ 糖尿病ラットではエラスチン糖化の後期反応は糖尿病発症後 10 週という早い時期から進行し、AGEP が生成されることが示された。エラスチンの糖化に伴いカルシウム沈着が増加し、エラスチンの変化が動脈壁弾性を低下させ、macroangiopathy を進展させる可能性が示唆された。

また STZ 糖尿病ラットでは高分子蛋白の尿中排泄が増加することが示された。この変化はアミノグアニジン投与により抑制されたことから、糖化により生じた AGEP が糸球体基底膜蛋白を修飾し、糸球体基底膜のサイズバリアとしての機能を障害することが、糖尿病における蛋白尿の発現に関与する可能性が示された。

糖尿病発症後、比較的早期からエラスチンや糸球体基底膜蛋白などの非酵素的糖化反応が進行し、AGEP による蛋白の構造的・機能的変化が生ずることが示され、macro および microangiopathy の発症には糖化の初期段階の産物ではなく、後期段階の産物である AGEP が関与することが示唆され

た。アミノグアニジンは糖化の後期反応を抑制し、糖尿病合併症の発症及び進展を防止する可能性が示された。

## 審 査 の 要 旨

糖尿病の重要な合併症である網膜症・腎症や全身の動脈硬化症はいずれも血管障害により発症することは知られているが、その発症機序の詳細には未だ不明な点が多い。本研究は血管障害の発症機序の一つと考えられている蛋白の非酵素的糖化の関与について STZ 糖尿病ラットを用いて検討し、糖尿病の比較的早期から動脈のエラスチンの糖化やカルシウム沈着が生ずる事を示した最初の論文である。動脈壁のエラスチンの糖化やカルシウムの沈着、ならびに糸球体基底膜の障害は後期糖化の産物である advanced glycation end product による蛋白の構造的・機能的変化にもとづくこと、また糖化の後期段階の反応を抑制するとされているアミノグアニジンがこれらの現象を抑制することを明らかにしたことは評価され、今後の臨床応用に向けての研究の発展が期待される。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。