

ヒト動脈硬化性大動脈瘤におけるマトリックスメタロプロテアーゼ その発現・局在と大動脈瘤形成における役割

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9126

ヒト動脈硬化性大動脈瘤におけるマトリックスメタロプロテアーゼ

—その発現・局在と大動脈瘤形成における役割—

金沢大学医学部外科学第一講座 (主任: 渡辺洋宇教授)

笠 島 史 成

大動脈瘤は、細胞外マトリックス成分の崩壊に伴う大動脈壁の脆弱化によって生ずると考えられる。本研究ではヒト動脈硬化性大動脈瘤の形成においてマトリックスメタロプロテアーゼ (matrix metalloproteinases, MMPs) とそのインヒビター (tissue inhibitors of metalloproteinases, TIMPs) が果たす役割を検討する目的で、手術時に採取した腹部大動脈瘤壁30例、拡張を伴わない粥状動脈硬化巣13例および剖検例の瀰漫性内膜肥厚を示す大動脈壁 8 例に対し、免疫組織化学、ザイモグラフィ、酵素産生量と酵素活性の測定を行った。大動脈瘤壁の光学顕微鏡および電子顕微鏡的観察では、中膜の弾性線維に著明な崩壊像が認められた。免疫組織化学上、MMP-1 (間質性コラゲナーゼ) は主に内膜の泡沫化したマクロファージ、内・中膜の平滑筋細胞の一部、外膜の線維芽細胞とマクロファージに存在が認められた。MMP-9 (ゼラチナーゼB) は内膜の泡沫化マクロファージと、中・外膜のマクロファージおよび好中球の一部に陽性であった。MMP-2 (ゼラチナーゼA), TIMP-2 の陽性細胞は MMP-1 に類似の分布を示した。MMP-3 (ストロムライシン-1) は陰性で、TIMP-1 は栄養血管の内皮細胞に弱陽性であった。非拡張性動脈硬化と比較して明らかな増加が認められたのは、MMP-1 と MMP-9 であり、その産生はマクロファージによるものが多かった。組織培養上清によるゼラチンザイモグラフィでは、92kDa, 83kDa, 66kDa, 60kDa の部位にゼラチン分解活性が認められ、前者は MMP-9, 後二者は MMP-2 と考えられた。潜在型 MMP-9 と思われる 92kDa のバンドは大動脈瘤において幅が広く、特に、瘤径の小さいものほど幅広い傾向があり、MMP-2 のバンドは、ほぼ一定であった。α-エラスチンザイモグラフィでは、ゼラチンザイモグラフィと同様の分子量のバンドを認めた。カゼインザイモグラフィでは、77~94kDa に MMP-9 と思われる淡いバンドを認めた。組織培養上清のゼラチン分解活性は、瘤径との間に、 $Y=7.037-0.674X$ ($r=0.366$, $P<0.05$) の有意な相関があり、瘤径 6cm 未満の大動脈瘤 ($4.47\pm 3.67\text{u/g}$) が、6cm 以上のもの ($0.97\pm 1.27\text{u/g}$) よりも有意に高い活性を有していた ($P<0.01$)。また、瘤径 6cm 未満の大動脈瘤壁は、瀰漫性内膜肥厚 ($0.46\pm 1.13\text{u/g}$) と比較しても有意に高いゼラチン分解活性を示した ($P<0.01$)。エラスチン、コラーゲン、トランスフェリンの分解活性では有意な所見は得られなかった。培養上清中の MMP-1 量は、大動脈瘤壁 ($0.124\pm 0.080\text{nmol/g}$) が粥状動脈硬化巣 ($0.063\pm 0.054\text{nmol/g}$) よりも有意に高値を示していた ($P<0.05$)。また、MMP-9 量は、大動脈瘤壁 ($0.145\pm 0.103\text{nmol/g}$) が瀰漫性内膜肥厚 ($0.022\pm 0.041\text{nmol/g}$) よりも有意に高値であった ($P<0.01$)。MMP-2 量は、大動脈瘤壁 ($0.161\pm 0.070\text{nmol/g}$) と非拡張性動脈硬化との間に有意差はなく、MMP-3 量はいずれも低値であった。TIMP-1 量は、大動脈瘤壁 ($1.036\pm 0.639\text{nmol/g}$) が粥状動脈硬化巣 ($0.409\pm 0.278\text{nmol/g}$)、瀰漫性内膜肥厚 ($0.397\pm 0.331\text{nmol/g}$) の双方に比べて有意に高値を示した (いずれも $P<0.01$)。TIMP-2 は全体に低値であった。以上のことから、大動脈瘤壁においては MMP-1 および MMP-9 が増加しており、特にマクロファージから産生される MMP-9 が、エラスチンおよび他の細胞外マトリックス成分を分解することによって大動脈瘤発生、特に初期病変の形成に重要な役割を果たしていることが示唆された。

Key words abdominal aortic aneurysm, atherosclerosis, matrix metalloproteinase, tissue inhibitor of metalloproteinases

大動脈瘤とは、大動脈壁が内圧に抗しきれず局所的に異常拡張を来した状態である。大動脈壁構造のうち形状維持を担うのは主に中膜で、中膜に存在する弾性線維、膠原線維といった細胞外マトリックスが動脈壁に弾性および抗張力を与えている^{1)~3)}。したがって、これらの線維の崩壊は大動脈壁の脆弱化を来し、大動脈径の拡大をもたらすと考えられるが、その過程において、細胞外マトリックスの主要構成蛋白質であるエラスチンやコラーゲンに作用するマトリックス分解酵素が大きく関与

していると考えられる。なかでもマトリックスメタロプロテアーゼ (matrix metalloproteinases, MMPs) と呼ばれる一群の酵素群は、生体内に存在するほとんど全ての細胞外マトリックス成分を中性域で分解するので^{4)~6)}、大動脈瘤の発生を考える上で注目すべき蛋白質分解酵素である。

MMPs 遺伝子ファミリーは、現在まで少なくとも10種類の一次構造が決定されている^{4)~6)}。これらは、それぞれ異なった基質特異性を持ち、種々の細胞で潜在型酵素として分泌され、細

平成6年12月22日受付, 平成7年2月16日受理

Abbreviations: AB-AP, avidin-biotin-alkaline phosphatase; APMA, p-aminophenyl mercuric acetate; Cm-Tf, carboxymethylated transferrin; DAB, 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride; EVG, elastica van Gieson; IGSS, immunogold silver staining; MMP, matrix metalloproteinase; NEM, N-ethylmaleimide; PLP,

胞外で活性化される。また、その酵素活性は共通のインヒビター (tissue inhibitors of metalloproteinases, TIMPs) によって厳重に調節されており、生体内での MMP 活性は、TIMPs との不均衡が生じた場合のみ作用すると考えられている。MMPs とヒト疾患との関連については、これまで多くの研究がなされており、癌の浸潤・転移や関節疾患等における MMPs の発現が報告されている^{4)~6)}。しかし、大動脈瘤と MMPs の関係を論じた研究は少なく、特に、各種の MMPs と TIMPs について、総合的かつ詳細に検討した報告は未だみられない。

本研究では、ヒト動脈硬化性大動脈瘤における各種炎症細胞、平滑筋細胞、内皮細胞および MMP-1 (間質性コラゲナーゼ)、MMP-2 (ゼラチナーゼA)、MMP-3 (ストロムライシン-1)、MMP-9 (ゼラチナーゼB)、好中球エラスターゼ、TIMP-1、TIMP-2 の局在を免疫組織化学的に解析し、合わせて MMPs の産生細胞についても検討を加えた。また組織培養上清中への MMPs、TIMPs の分泌量を定量し、さらに、培養上清の各種基質に対する分解活性を測定した。これらの結果を拡張を伴わない動脈硬化病変と比較、検討し、大動脈瘤形成に果たす MMPs の役割について考察した。

材料および方法

1. 大動脈瘤壁と対照群大動脈壁組織

当科および関連施設において腹部大動脈瘤手術の際に切除した腎動脈下大動脈瘤壁組織30例を材料とした。対照として下肢閉塞性動脈硬化症の手術にて採取した腎動脈下大動脈壁の粥状動脈硬化巣13例、および本学第一病理学教室より供与された剖検例について、動脈硬化の初期病変である瀰漫性内膜肥厚を示す腎動脈下大動脈壁組織8例を用いた。腹部大動脈瘤症例の内訳は、男性23例、女性7例で、その年齢は56~93歳、平均72.2±7.9歳であった。下肢閉塞性動脈硬化症症例は、男性12例、女性1例で、平均年齢62.8±5.8歳 (49~69歳) であり、剖検例は、男性4例、女性4例、平均年齢43.5±19.2歳 (13~65歳) であった。これらの大動脈壁組織は、一部を培養用に保存し、残りをメタカルン固定液あるいは過ヨウ素酸-リジン-パラホルムアルデヒド (periodate-lysine-paraformaldehyde, PLP) 固定液にて1~3日間固定後、パラフィン包埋した。パラフィン切片は、HE染色、およびエラスチカ・ワンギーソン (elastica van Gieson, EVG) 染色を行い、光学顕微鏡的に観察した。

II. 大動脈壁組織の電子顕微鏡的観察

新鮮大動脈瘤壁組織を細切り、2.5% グルタルアルデヒド (polysciences, Warrington, U.S.A.) で60分間前固定、2% 四酸化オスミウム (Merck, Darmstadt, Germany) で120分間後固定し、脱水、エポキシ包埋した。弾性線維の超微構造的変化を観察する目的で超薄切片に対してタンニン酸染色⁸⁾を行った。試料は日立 (東京) H-600 型電顕で直接倍率6,000~10,000倍で撮影した。

III. 大動脈壁組織の免疫組織染色

パラフィン切片をヒストクリア・エタノール系列で脱パラフィンし、0.3% 過酸化水素 (三菱瓦斯化学, 東京)、0.1% アジ化ナトリウム (和光製薬, 大阪)、98% メタノールによる内因性ペ

ルオキシダーゼブロックを行った。さらに10% 正常ウマ血清 (フナコン, 東京) あるいは正常ヤギ血清により非特異反応をブロックした後、一次抗体として各種モノクローナル抗体と4℃で18~24時間反応させた。使用したモノクローナル抗体は、抗平滑筋細胞抗体 (HHF35)、抗マクロファージ抗体 (HAM56)、内皮細胞に対する抗体 (抗第Ⅷ因子関連抗原抗体) (DAKO, Glostrup, Denmark)、各種リンパ球に対する抗体 (汎Tリンパ球, UCHL1; ヘルパーTリンパ球, OPD4; Bリンパ球, L26) (DAKO) である。一次抗体と反応後、ビオチン化ウマ抗マウス IgG 抗体 (Vector, Burlingame, U.S.A.) (HAM56 に対してはビオチン化ヤギ抗マウス IgM 抗体) と30分間反応させ、さらにストレプトアビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合体 (DAKO) と30分間反応させた後、ジアミノベンジジン (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, DAB) (Sigma, St. Louis, U.S.A.) 反応液 (0.05M Tris-HCl, 0.03% DAB, 0.006% H₂O₂, pH7.6) にて発色させた。

同様に、抗 MMP-1, 2, 3, 9 抗体 (それぞれ 41-1E5, 75-7F7, 55-2A4, 56-2A4)、抗ヒト好中球エラスターゼ抗体 (DAKO)、抗 TIMP-1, -2 抗体 (それぞれ 50-2F6, 67-4H11) による免疫組織染色を行った。抗 MMP-1, 2, 3, 9 抗体と抗 TIMP-1, 2 抗体は、本学がん研究所分子免疫部門岡田保典教授より供与されたもので、その特異性は既に報告されている^{10)~13)}。これらのモノクローナル抗体を一次抗体として用い、同様にビオチン化ウマ抗マウス IgG 抗体と反応させた後、アビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合体 (DAKO) と30分間反応させ、DAB 反応液で発色させた。

IV. 免疫二重染色

MMPs の産生細胞を同定する目的で、MMPs に対する抗体と各種の細胞に対する抗体を用いて、同一組織に2種類の抗原を同時に染色する免疫二重染色法を行った。二重染色の組み合わせは、抗 MMP-1 抗体と HHF35 または HAM56、抗 MMP-2 抗体と HHF35 または HAM56 または OPD4、抗 MMP-9 抗体と HHF35 または HAM56 とした。また、同様に MMPs と TIMPs に関して、抗 MMP-1 抗体と抗 TIMP-1 抗体、抗 MMP-2 抗体と抗 TIMP-2 抗体、抗 MMP-9 抗体と抗 TIMP-1 抗体または抗 TIMP-2 抗体の組み合わせで二重染色した。最初に MMPs をイムノゴールドシルバーステイニング (immunogold silver staining, IGSS) 法を用いて染色し、その後、もう一方の抗原をアビジン-ビオチン-アルカリホスファターゼ (avidin-biotin-alkaline phosphatase, AB-AP) 法にて染色する方法¹⁴⁾をとった。実際には、まず脱パラフィン切片を5% 正常ヤギ血清にて非特異反応ブロックし、それぞれの MMP に対する抗体と4℃で18~24時間反応させた。コロイド金標識ヤギ抗マウス IgG (アマジャム, 東京) と60分間ずつ計2回反応させた後、2% グルタルアルデヒド (glutaraldehyde) (TAAB, Berkshire, England) で後固定し、銀液 (アマジャム) による増感を行った。次いで各切片を0.1M グリシン塩酸緩衝液 pH2.2 中で攪拌しながら90分間洗浄し、AB-AP 法に移行した。それぞれの細胞または TIMP に対する抗体と60分間反応させた後、ビオチン化ウマ抗マウス IgG 抗体 (HAM56 に対してはビオチン化ヤギ抗マウス IgM 抗体) と30分間反応させ、アビジン-ビオ

チン-アルカリホスファターゼ複合体 (Vector) と30~40分間反応させた後、アルカリホスファターゼ発色試薬 (Vector Red, Vector) にて発色させた。その際、基質溶液中には1mM レバミゾール (levamisole, Vector) を加え、内因性アルカリホスファターゼ活性を阻止した。

V. 大動脈壁組織の培養

I. で得られた大動脈瘤壁組織および対照群大動脈壁組織を無菌的に1×1×1mm 大に細切し、その組織片10~15個を0.2% ラクトアルブミン水解物 (Gibco, New York, U.S.A.) 含有 RPMI 培地1640液 (Gibco) 2ml 中で37°C 24時間培養した。培養液を採取後、0.2% アジ化ナトリウムを添加し、10,000rpm, 5分間遠心して、その上清を-20°C で保存した。組織片は凍結乾燥して重量を測定した。

VI. ゼラチン, α -エラスチン, およびカゼインサブストレートゲルによる分解パターンの検索

Hibbs ら¹⁵⁾の方法に従い、ゼラチン (2mg/ml) を含むポリアクリルアミドゲル (8% アクリルアミド) を作製し、上述の培養上清を非還元状態、4°C で電気泳動した。培養上清の量は培養の際に用いた組織の乾燥重量が一定となるように調整した。ゲルを洗浄用緩衝液 (50mM Tris-HCl, 1mM ZnCl₂, 10mM CaCl₂, 2.5% トリトンX, 0.02% NaN₃, pH7.5) で洗浄した後、Tris-NaCl-Ca (TNC) 緩衝液 (50mM Tris-HCl, 0.15M NaCl, 10mM CaCl₂, 0.02% NaN₃, pH7.5) 中に37°C で17時間反応させた。ゲルはクマジーブリリアントブルー (Coomassie brilliant blue) で染色した後脱色し、ゼラチン分解パターンを検討した。同様に、 α -エラスチン (1.2mg/ml) を含むポリアクリルアミドゲル (8% アクリルアミド), およびカゼイン (1mg/ml) を含むポリアクリルアミドゲル (11% アクリルアミド) を作製して、それぞれ培養上清の泳動を行い、 α -エラスチン分解活性, カゼイン分解活性の検討を行った。この場合のゲル反応時間は24時間とした。分子量標準試薬として、ホスホリラーゼ b (94kDa) (Sigma), ヒトトランスフェリン (77kDa) (Sigma), ウシ血清アルブミン (68kDa) (Sigma), ヒト免疫グロブリン重鎖 (55kDa) (Sigma), 卵白アルブミン (43kDa) (Sigma), カルボニックアンヒドラーゼ (29kDa) (Sigma) を用いて、それぞれの消化バンドの蛋白分子量を算定した。

VII. 酵素抑制試験

ゼラチンサブストレートゲルに培養上清の同一試料を5レーン泳動し、各レーンを切り離した。そのゲルのひとつをTNC緩衝液にて、37°C 17時間反応させ、残りのゲルを、EDTA (Sigma) 20mM, セリンプロテアーゼ (serine proteinase) 阻害剤のフェニルメタンсульフォニルフルオリド (phenylmethane sulfonyl fluoride, PMSF) (Sigma) 2mM, システインプロテアーゼ (cysteine proteinase) 阻害剤のN-エチルマレイマイド (N-ethylmaleimide, NEM) (Sigma) 5mM, またはアスパラギン酸プロテアーゼ (aspartic proteinase) 阻害剤のペプスタチンA (pepstatin A) (Sigma) 0.5mM 存在下のTNC緩衝液中で同様に反応させて比較した。

VIII. ゼラチン, エラスチン, コラーゲン, およびトランスフェリン分解活性の測定

Harris ら¹⁶⁾の方法に従って、潜在型 MMPs の活性化作用を有する p-アミノフェニル酢酸第二水銀 (p-aminophenyl mercuric acetate, APMA) (Sigma) 1mM, PMSF 2mM, NEM 5mM 存在下で、¹⁴C-ゼラチンを基質として培養上清のゼラチン分解活性

を測定した。¹⁴C-ゼラチンは、精製した酸可溶性I型コラーゲンを¹⁴C-無水酢酸 (0.37~1.1GBq/mmol, アマシヤム) で標識し、熱変性 (60°C, 30分間処理) によりゼラチン化して使用した。また、同様に、不溶性エラスチンを³H-水酸化ホウ素ナトリウム (3.7~30GBq/mmol, Du Pont, Boston, U. S. A.) にて標識した³H-エラスチンを基質としてエラスチン分解活性を測定した。コラーゲンおよびトランスフェリン分解活性の測定に際しては、培養上清を1.5mM APMA と37°C で20時間反応させた後、2mM PMSF, 5mM NEM を加えてから用いた。Cawston ら¹⁷⁾の方法に従い、酸可溶性I型コラーゲンを¹⁴C-無水酢酸で標識した¹⁴C-I型コラーゲンを基質としてコラーゲン分解活性を測定した。トランスフェリン分解活性は、Okada ら¹⁸⁾の方法に従って、ヒトトランスフェリンを³H-ヨード酢酸 (3.7~11.1GBq/mmol, Du Pont) で標識した³H-カルボキシルメチル化トランスフェリン (carboxymethylated transferrin, Cm-Tf) を基質として測定した。分解活性は、培養に使用した乾燥組織重量1gあたりの単位 (u/g) で表した。1単位とは、それぞれの基質を37°C において1分間に1 μ g 分解する活性である。

IX. 組織培養上清中の MMPs および TIMPs の定量

培養上清中の MMP-1, 2, 3, 9 および TIMP-1, 2 を、富士薬品工業、岩田和士博士らの御協力により、サンドイッチイムノアッセイ法¹⁹⁾にて定量した。測定した MMPs および TIMPs の量は、培養に用いた乾燥組織重量1g 当たりの mol 数で表した。

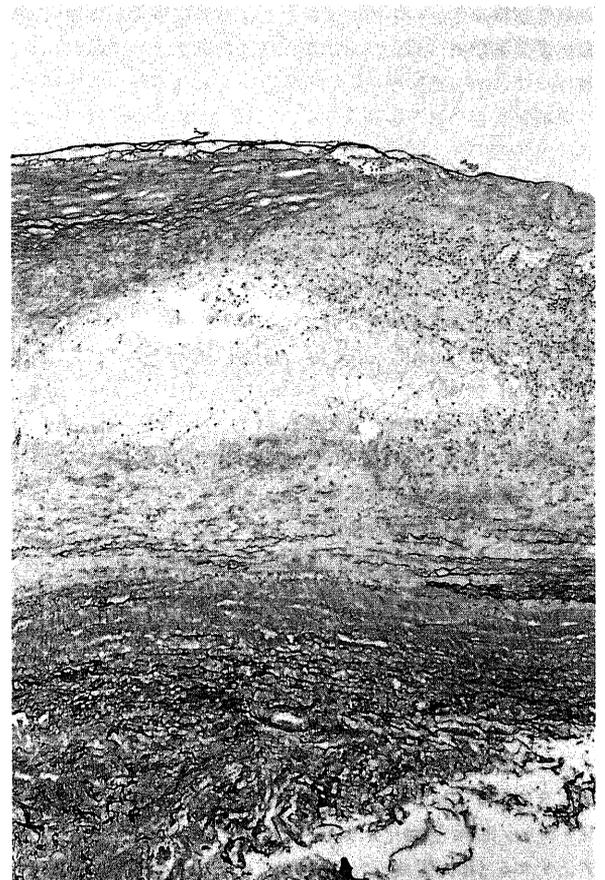


Fig. 1. Light micrograph of an abdominal aortic wall with aneurysmal dilation, showing marked degradation of medial elastic lamellae. Elastica van Gieson stain. $\times 10$.

X. 統計学的検討

測定値は平均値±標準偏差で示し、各群間における比較はMann-Whitney 検定を用いた。瘤径との関係は直線回帰分析にて一次関数を求め、分散分析で検定した。危険率 5% 未満をもって有意とした。

成 績

I. 光学顕微鏡的観察

HE 染色では、大動脈瘤壁は、いずれも高度の粥状硬化を呈しており、内膜の表面には血栓の付着が認められた。全層性に炎症細胞の浸潤があり、内膜には泡沫細胞が随所にみられ、また、外膜を中心としてリンパ球が散在性あるいは集簇して認められた。形質細胞や好中球も少数認めた。EVG 染色では、高度の粥状硬化を示す内膜の弾性線維は殆ど消失し、菲薄化した中膜の弾性線維も断裂が目立ち、消失している部分も多く認められた(図1)。

II. 電子顕微鏡的観察

大動脈瘤壁の透過電子顕微鏡による観察では、種々の崩壊過程を示す弾性線維が認められた。崩壊中の弾性線維は図2のようにタンニン酸陽性の無構造部分に電子密度の低下した亀裂様構造や微細フィラメントからなるフェルト様構造が出現しており、また無構造部分が消失し、マイクロフィブリルのみが残存している部位もみられた。

III. 大動脈瘤壁における細胞の免疫組織化学的局在

内膜には散在性に平滑筋細胞が認められた。中膜の平滑筋細胞には配列の乱れと数の減少がみられ、部分的に脱落していた。また、マクロファージは全層に多数浸潤しており、内膜にみられるものの多くは泡沫細胞の形態を呈していた。内皮細胞は大動脈の内腔面に僅かしか存在せず、主に中・外膜の栄養血管が染色されていた。Tリンパ球はマクロファージに比べると少数であったが、全層に散在性に認められ、外膜では部位により集簇して存在していた。ヘルパーTリンパ球は汎リンパ球の1/3から1/2を占めていた。Bリンパ球は主に外膜を中心として集簇しており、外膜では症例によってはTリンパ球より多数認められた。

対照として用いた拡張性変化のない粥状動脈硬化巣では、内膜に大動脈瘤と同様、マクロファージの浸潤を認めたが、中・



Fig. 2. Electron micrograph of the media of an aneurysmal aorta, showing degraded elastic fiber (arrow). Tannic acid stain. ×10,000.

外膜においては軽度であった。Tリンパ球数は、内膜では大動脈瘤よりやや多く、中・外膜では少なかった。ヘルパーTリンパ球の割合は大動脈瘤と同程度であった。Bリンパ球はごく少数外膜に認められた。瀰漫性内膜肥厚の大動脈壁では、内膜と外膜にごく軽度のマクロファージとTリンパ球の浸潤を認めるのみであった。それぞれの病変における炎症性細胞の局在については、HE 染色の所見とあわせ模式化し図3に示した。

IV. MMP-1, 2, 3, 9 および TIMP-1, 2 の免疫組織化学的局在

MMPs および TIMPs の染色性を、内膜、中膜、外膜の全細胞成分に占める陽性細胞の割合で評価した。陽性細胞が0の場合を-、陽性細胞の比率が1~25%, 26~50%, 51~75%, 76~100% の場合をそれぞれ ±, +, ++, +++ と表した(表1)。好中球エラスターゼは、内膜に付着した血栓中や外膜の栄養血管内、または手術の際の剝離面にのみ認められたため除外した。

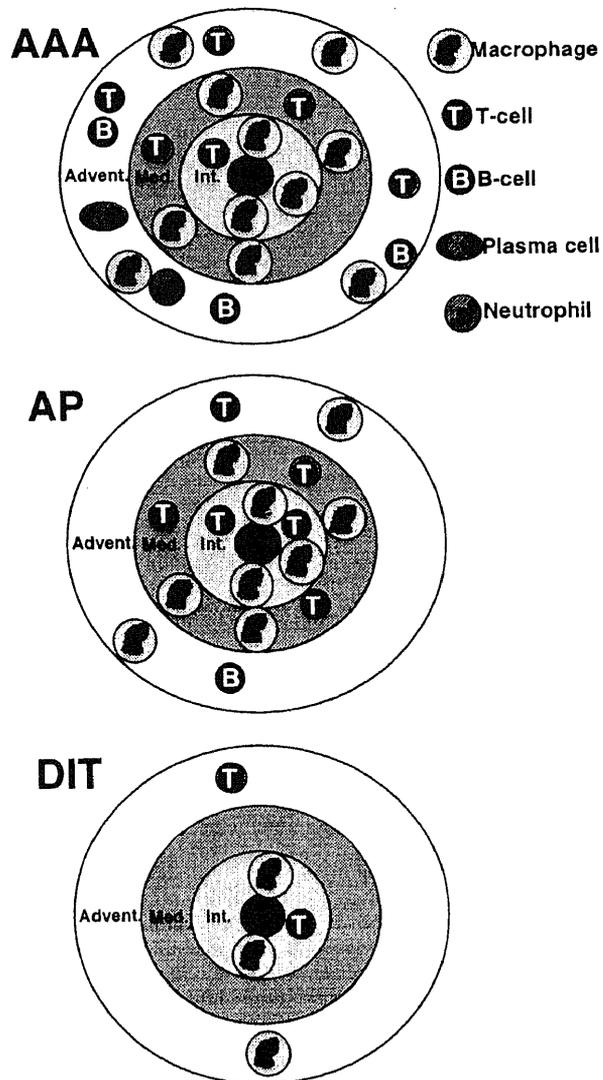


Fig. 3. Schematic diagram of distribution of inflammatory cells of the abdominal aortic wall with aneurysm (AAA), atheromatous plaque (AP), or diffuse intimal thickening (DIT), showing a greater number of macrophages and lymphocytes in the abdominal aortic aneurysm than in the other groups. Int., intima; Med., media; Advent., adventitia.

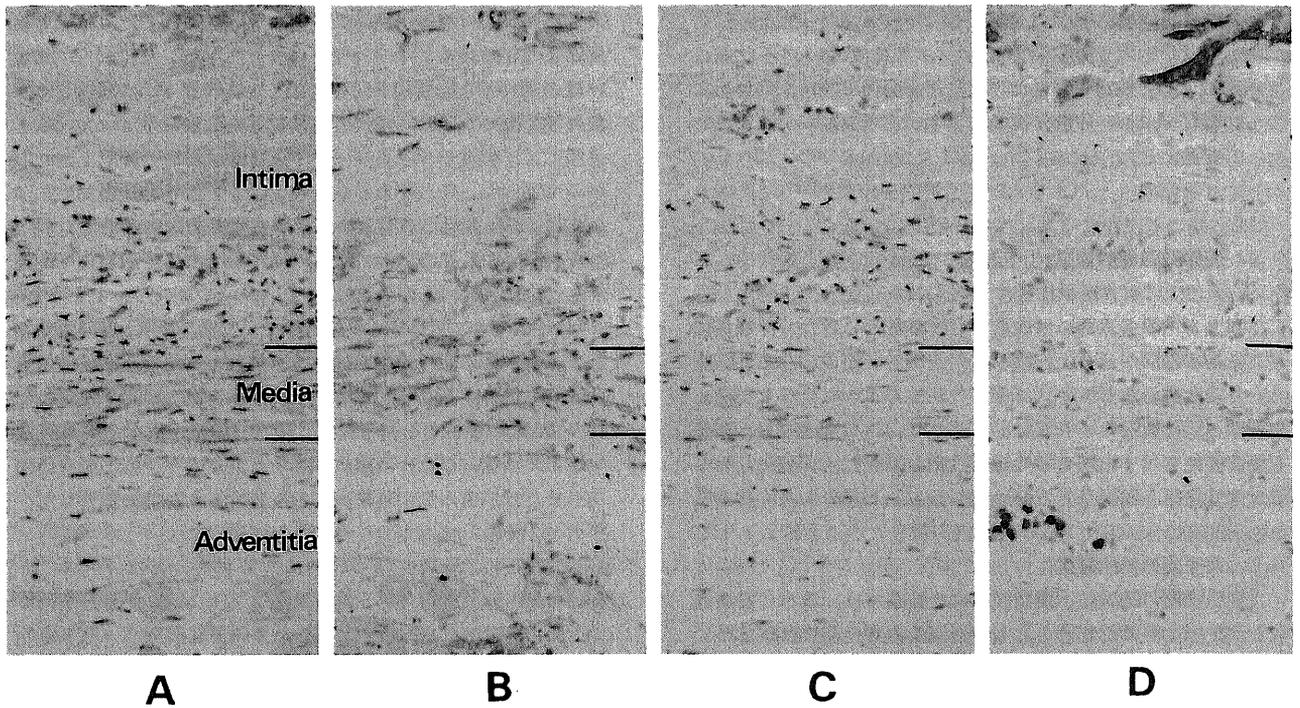


Fig. 4. Immunolocalization of MMPs in the abdominal aortic aneurysm. (A): MMP-1. (B): MMP-2. (C): MMP-3. (D): MMP-9. MMP-1 was localized in the foam cells, spindle cells, and round cells of the wall, and MMP-2 was localized in a similar pattern. MMP-9 was found mainly in the foam cells of the intima and round cells of the adventitia. MMP-3 was undetectable. A-D $\times 50$.

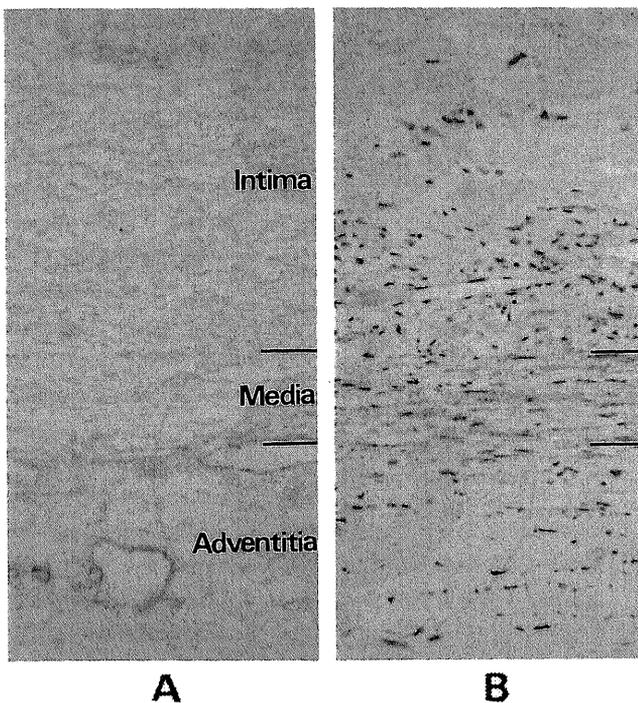


Fig. 5. Immunolocalization of TIMPs in the abdominal aortic aneurysm. (A): TIMP-1. (B): TIMP-2. TIMP-1 was weakly localized in the cells of vasa vasorum, and TIMP-2 was localized in a similar pattern to MMP-2. A, B $\times 50$.

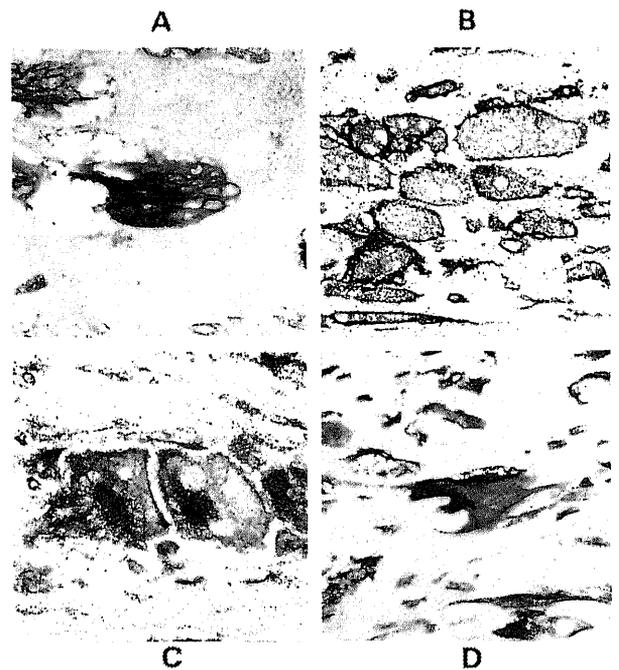


Fig. 6. Immuno-double staining of MMPs and cells in the aneurysmal wall. (A): MMP-1 (black) and macrophage (red). (B): MMP-2 (black) and macrophage (red). (C): MMP-9 (black) and macrophage (red). (D): MMP-2 (black) and smooth muscle cell (red). Sequential IGSS and avidin biotin immunoalkaline phosphatase procedures. A-D $\times 200$.

免疫組織化学上、大動脈瘤壁の MMP-1 は、内膜では比較的多数の細胞に陽性であり、泡沫細胞、紡錘形細胞、類円形細胞の胞体にその存在が認められた (図 4A)。中膜では紡錘形細胞の過半数に陽性であり、また、外膜の紡錘形細胞、類円形細胞も多数染色された。MMP-2 は MMP-1 に類似した分布を示したが、全般に陽性細胞数がより多く認められた (図 4B)。また個々の細胞では胞体よりも細胞膜に強く染色されていた。MMP-3 は全例で陰性であった (図 4C)。MMP-9 は、MMP-1 や MMP-2 と比較すると陽性細胞数は少なかったが、内膜の泡沫細胞と中・外膜の類円形細胞に存在が認められた (図 4D)。外膜の好中球の一部も MMP-9 陽性であった。TIMP-1 は栄養血管の内皮細胞に弱陽性だった (図 5A)。TIMP-2 の陽性細胞は MMP-2 とほぼ同様の分布を示し、壁全層に多数の陽性細胞が認められた (図 5B)。

対照の粥状動脈硬化巣では、MMP-1 の陽性細胞は、内膜で大動脈瘤とほぼ同様であり、中等度から比較的多数の細胞が染色されていた。一方中・外膜では、陽性細胞は少数であった。MMP-2 に関しては、全層で大動脈瘤と同じく高い陽性率を示

した。MMP-3 は陰性であった。MMP-9 は内膜と外膜に少数の陽性細胞が認められた。TIMP-1 は栄養血管内皮細胞に弱陽性であった。TIMP-2 は内・中膜では大動脈瘤と同様、多数の陽性細胞を認めたが外膜では比較的少数であった。

瀰漫性内膜肥厚の大動脈壁における免疫染色では、MMP-1 陽性細胞は内膜に少数みられ、MMP-2 は中膜において前二者と同様、多数の紡錘形細胞が染色されたが内膜と外膜では少数であった。MMP-3 は陰性であった。MMP-9 は一部の症例の外膜にごく少数染色されるのみであった。TIMP-1 は、前二者同様、栄養血管内皮細胞に弱陽性であった。TIMP-2 は、内・中膜に多数染色されたが、外膜の陽性細胞数は少なかった。

V. 免疫二重染色

大動脈瘤壁における MMPs の産生細胞を同定するため、二重染色を行った。まず MMPs を IGSS 法で黒く染色し、次いで AB-AP 法を用いてマクロファージを赤く免疫染色した。図 6A の如く、マクロファージの胞体に MMP-1 が染色され、マクロファージによる MMP-1 の産生が証明された。同様に、マクロファージに MMP-2 の存在が認められた (図 6B)。

Table 1. Tissue localization of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases

Lesion	Layer of aorta	Rate (%) ^a of positive cells					
		MMP-1	MMP-2	MMP-3	MMP-9	TIMP-1	TIMP-2
AAA	Intima	+	++	-	±	-	++
	Media	++	+++	-	±	-~±	+++
	Advent.	+~++	+~++	-	±~+	±	++
AP	Intima	+	++	-	-~±	-	++
	Media	+	+++	-	-~±	-	+++
	Advent.	±	+~++	-	-~±	±	+
DIT	Intima	±	±	-	-	-	++
	Media	+	+++	-	-	-	+++
	Advent.	±	±~+	-	-~±	±	±~+

a) -, 0; ±, 1 to 25; +, 26 to 50; ++, 51 to 75; +++, 76 to 100.

AAA, abdominal aortic aneurysm; AP, atheromatous plaque; DIT, diffuse intimal thickening; Advent., adventitia.

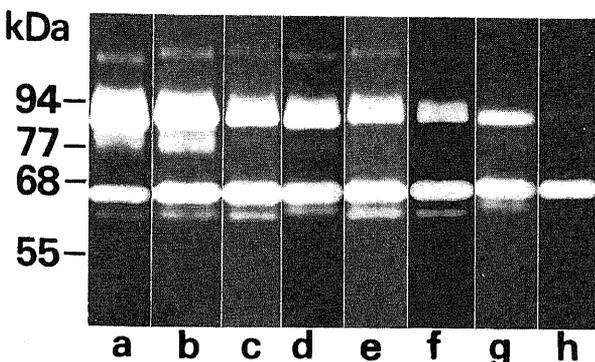


Fig. 7. Gelatinolytic activities in the culture media of the aortic tissues on a zymography. Lanes a-f, abdominal aortic aneurysms (diameter of aneurysms: a, 3.8 cm; b, 4.5 cm; c, 5.1 cm; d, 6.5 cm; e, 7.5 cm; f, 8.4 cm); lane g, atheromatous plaque; lane h, diffuse intimal thickening. Molecular weights of standards are indicated on the left.

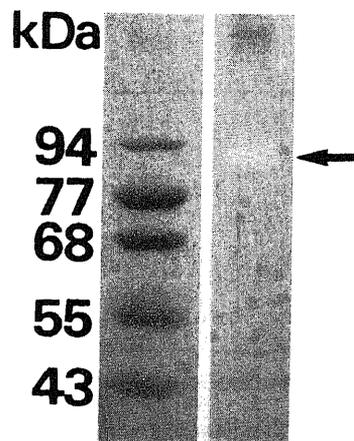


Fig. 8. α -elastin zymogram of the culture media from the aneurysmal tissue. Lysis of the substrate is found at the molecular weight of 92 kDa (arrow).

MMP-2 は単染色の所見と同じく、特に細胞膜に強く染色されていた。また、MMP-9 もマクロファージの胞体に認められ、マクロファージからの産生が確認された (図 6C)。同様に、AB-AP 法にて平滑筋細胞を免疫染色し、MMPs の存在の有無を検討した。図 6D の如く、平滑筋細胞の細胞膜に MMP-2 が染色された。MMP-1, MMP-9 も MMP-2 ほど明瞭ではなかったが、平滑筋細胞の胞体に存在が認められた。MMP-2 については、一部の OPD4 陽性ヘルパー T リンパ球の細胞膜にも存在が証明された。

さらに、MMPs を IGSS 法で染色、TIMPs を AB-AP 法にて染色し、二重染色とした。大動脈瘤壁の内・中膜では、TIMP-2 陽性である類円形細胞や紡錘形細胞の細胞膜に、MMP-2 が染色されていた。また、外膜では、TIMP-2 陽性の紡錘形細胞の細胞膜に MMP-2 が陽性という所見が多く認められた。MMPs と TIMPs のその他の組み合わせでは、同一細胞における両者の共存は明らかではなかった。

VI. ゼラチン、 α -エラスチン、およびカゼインサブストレートゲルによる分解パターン 組織培養上清を用いて、ゼラチン、 α -エラスチン、カゼイン

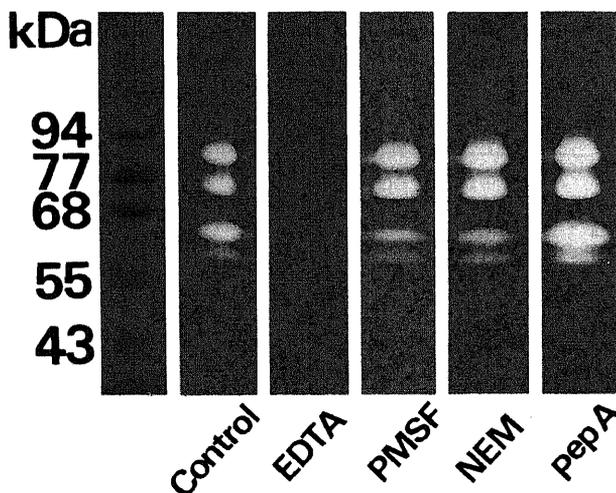


Fig. 9. Inhibition studies of the culture media from the aortic tissues. Gelatinolytic activities with 92 kDa, 83 kDa, 66 kDa and 60 kDa were inhibited by EDTA, but not by the other inhibitors, indicating that these proteinases were metalloproteinases.

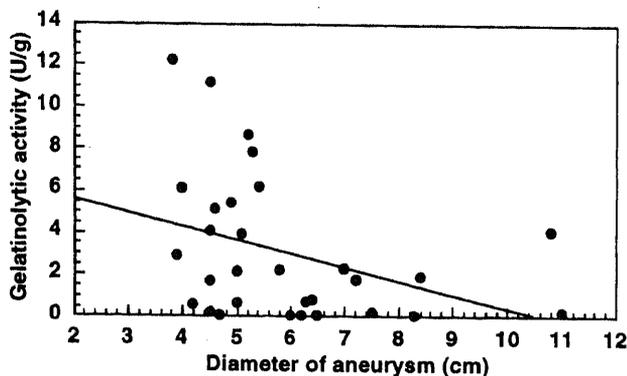


Fig. 10. Regression analysis of gelatinolytic activity and diameter of aneurysm. $Y=7.037-0.674X$, $r=0.366$, $P<0.05$.

をサブストレートとしたゼイモグラフィーを施行した。ゼラチンゼイモグラフィーでは、大動脈瘤壁の培養上清に、いずれも 92kDa, 66kDa, 60kDa のゼラチン分解活性を認めた (図 7a~f)。症例によっては 83kDa にも淡いバンドが認められた。66kDa と 60kDa にみられた活性パターンは、どの症例においてもほぼ一定であり、66kDa に一様な比較的幅広いバンドがみられ、60kDa にはその 1/3 程度の狭いバンドが出現していた。一方、92kDa のバンドは、全般に 66kDa のバンドよりもさらに幅が広く、その中でも、大動脈瘤径が小さいものほど幅が広いという傾向を認めた。83kDa の活性と瘤径との関係は明らかではなかった。

粥状動脈硬化巣の培養上清では、66kDa, 60kDa のバンドは大動脈瘤と同様であった (図 7g)。それに対し、92kDa のバンドは幅が狭く、ほとんどの例では 66kDa のバンドと同等ないし狭いバンドを有していた。83kDa の活性は一部の症例にのみ認められた。瀰漫性内膜肥厚の大動脈壁においても、66kDa と 60kDa のバンドが認められたが、大動脈瘤や粥状硬化巣と比較すると、その幅は若干狭いものであった (図 7h)。また、92kDa の活性は認めないか、ごく僅かに存在するのみであった。

α -エラスチンゼイモグラフィーの結果は、ゼラチンゼイモグラフィーとはほぼ同様であり、92kDa, 66kDa, 60kDa、症例によっては 83kDa のバンドに分解活性が認められた。ゼラチンゼイモグラムに比べると全体にバンドは淡く、92kDa 以外のバンドはやや不明瞭であった。その代表例を図 8 に示した。

カゼインゼイモグラフィーでは、77~94kDa の間にごく淡い複数のバンドを認めるのみであった。

VII. 酵素抑制試験

酵素抑制試験では、大動脈瘤壁および対照の動脈硬化巣の組織培養上清において認められた 92kDa, 83kDa, 66kDa, 60kDa のゼラチン分解活性は、PMSF, NEM およびペプスタチン A では抑制されず、EDTA のみに阻害された (図 9)。これらの酵素活性は MMP であることが証明され、分子量の大きさから 92kDa の活性は潜在型 MMP-9, 83kDa の活性はその中間型と

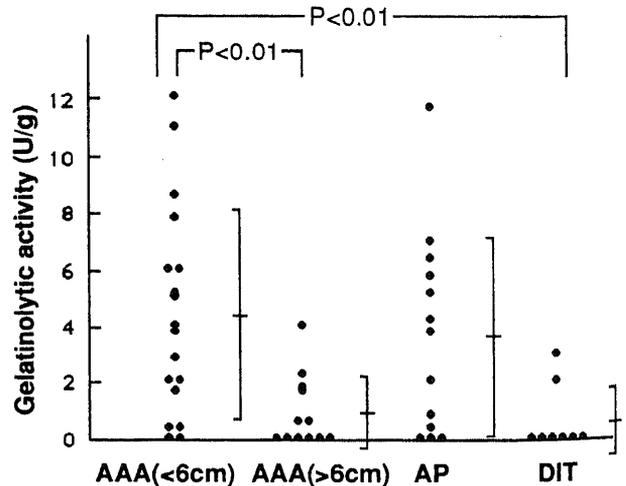
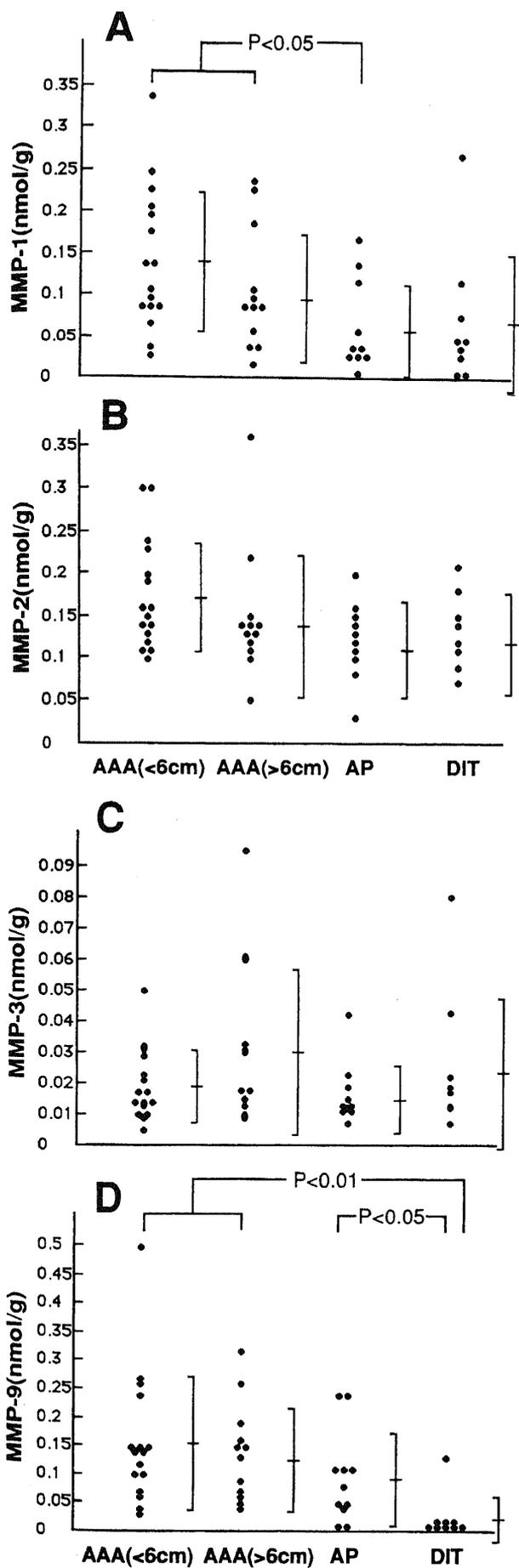


Fig. 11. Gelatinolytic activities detected with ^{14}C -gelatin as a substrate in the culture media of the aortic tissues with aneurysm (AAA), atheromatous plaque (AP), or diffuse intimal thickening (DIT). Each bar represents mean \pm SD.



考えられた。また、66kDaの活性は中間型 MMP-2, 60kDaは活性型 MMP-2 に相当すると考えられた。

VIII. ゼラチン, エラスチン, コラーゲン, およびトランスフェリン分解活性

¹⁴C-ゼラチンを基質として測定した大動脈瘤壁組織培養上清のゼラチン分解活性と、大動脈瘤壁との関係を図10に示す。ゼラチン分解活性は瘤径の小さいものほど高い傾向があり、 $Y=7.037-0.674X$ ($r=0.366, P<0.05$)の有意な相関が認められた。また、瘤径6cmを境に2群に分けると、瘤径6cm未満の大動脈瘤壁の培養上清 ($4.47\pm 3.67u/g$)は、6cm以上のもの ($0.97\pm 1.27u/g$)よりも有意に高い活性を有していた ($P<0.01$) (図11)。対照の動脈硬化と比較すると、瘤径6cm未満の大動脈瘤壁は、瀰漫性内膜肥厚 ($0.46\pm 1.13u/g$)よりも有意に高いゼラチン分解活性を示した ($P<0.01$)。粥状動脈硬化巣 ($3.70\pm 3.53u/g$)とは有意差は認められなかったが、やはり瘤径6cm未満の大動脈瘤壁の方がゼラチン分解活性がより高い傾向にあった。

³H-エラスチンを基質としたエラスチン分解活性および¹⁴C-I

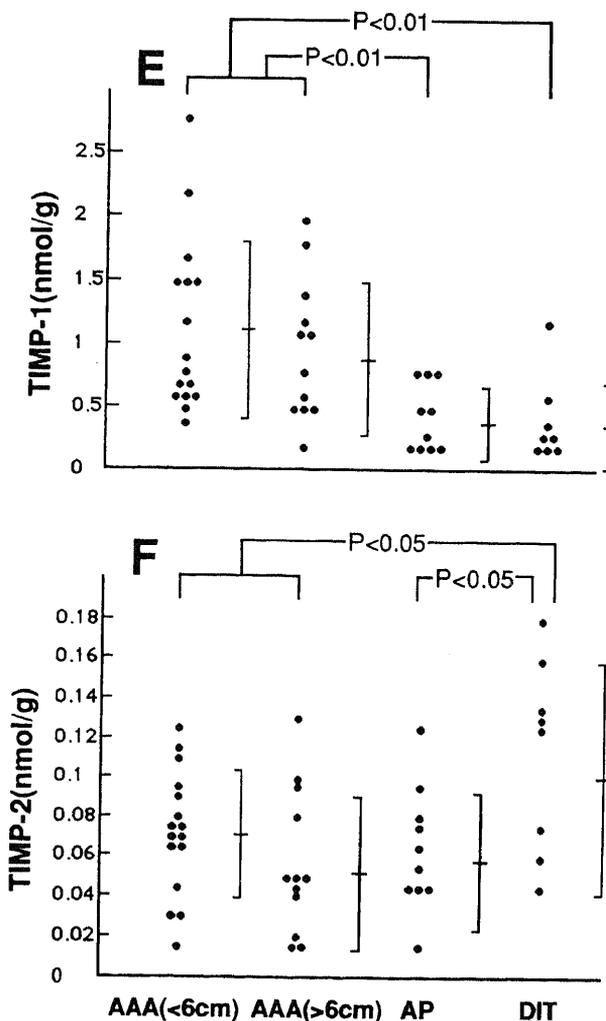


Fig.12. Amounts of MMPs and TIMPs secreted in the culture media by the aortic tissues with aneurysm (AAA), atheromatous plaque (AP), or diffuse intimal thickening (DIT). These proteins were measured by the sandwich enzyme immunoassay. Each bar represents mean±SD.

型コラーゲンを基質としたコラーゲン分解活性は、大動脈瘤径、対照の動脈硬化のいずれにおいても検出されなかった。

³H-Cm-Tf を基質として測定したトランスフェリン分解活性は、大部分が検出されなかったが、大動脈瘤壁 (0.78±1.87u/g) と粥状動脈硬化巣 (0.15±0.51u/g) の一部の症例では僅かに活性を認めた。

IX. 組織培養上清中の MMPs および TIMPs の定量

サンドイッチ免疫アッセイ法にて組織培養上清中に放出された MMPs と TIMPs の量を測定した (図12)。大動脈瘤壁の培養上清における MMP-1 量の平均値は 0.124±0.080nmol/g であった。対照の動脈硬化病変の MMP-1 量は、粥状動脈硬化巣では 0.063±0.054nmol/g、瀰漫性内膜肥厚では 0.076±0.083nmol/g で、大動脈瘤壁の MMP-1 量が粥状動脈硬化巣より有意に高値を示していた (P<0.05)。MMP-2 は、大動脈瘤壁が 0.161±0.070nmol/g で、粥状動脈硬化巣 (0.119±0.047nmol/g)、瀰漫性内膜肥厚 (0.130±0.045nmol/g) との有意差は認められなかった。MMP-3 は概して低値であり、大動脈瘤壁 (0.025±0.020nmol/g)、粥状動脈硬化巣 (0.016±0.010nmol/g)、瀰漫性内膜肥厚 (0.026±0.024nmol/g) との間有意差を認めなかった。MMP-9 に関しては、大動脈瘤壁における平均値が 0.145±0.103nmol/g で、瀰漫性内膜肥厚 (0.022±0.041nmol/g) より有意に高値であった (P<0.01)。また、粥状動脈硬化巣 (0.099±0.079nmol/g) も瀰漫性内膜肥厚より有意に高値を示していた (P<0.05)。大動脈瘤径と MMPs 量との相関はいずれも認められなかったが、MMP-1 と MMP-9 については、有意差はないものの 6cm 未満の大動脈瘤壁による培養上清が、6cm 以上のものより若干高い値を示す傾向があった。

TIMP-1 量は、大動脈瘤壁 (1.036±0.639nmol/g) が、粥状動脈硬化巣 (0.409±0.278nmol/g)、瀰漫性内膜肥厚 (0.397±0.331nmol/g) の双方に比べて、有意に高値を示した (いずれも P<0.01)。TIMP-2 は全体に低値であったが、大動脈瘤壁 (0.064±0.034nmol/g) と粥状動脈硬化巣 (0.063±0.031nmol/g) は、瀰漫性内膜肥厚 (0.112±0.048nmol/g) よりも有意に低かった (P<0.05)。また、TIMP-1、TIMP-2 ともに大動脈瘤径との有意な相関は認められなかったが、TIMP-1 では、6cm 未満の培養上清がやや高値を示していた。

考 察

動脈硬化性大動脈瘤はその頻度と破裂による死亡率の高さから臨床的にも重要視されている疾患であるが²⁰⁾、その成因は未だ明らかでない。大動脈壁の拡張性変化は、弾性線維や膠原線維などの細胞外マトリックス成分の崩壊に伴う壁の脆弱化によるものと考えられており¹¹⁻¹³⁾、大動脈瘤の形成においてマトリックス分解酵素が重要な役割を果たしていると推測される。細胞外でのマトリックス分解に主役を演じているのはセリンプロテアーゼ、メタロプロテアーゼなどの中性プロテアーゼであり、特に、生体内に存在するほとんど全ての細胞外マトリックス成分を中性域で分解する MMPs が、最近、注目を浴びている⁴⁻⁶⁾。MMP 遺伝子ファミリーは、細胞外マトリックス分解能を有する一群のメタロプロテアーゼで、活性中心に Zn²⁺ を有し酵素活性には Ca²⁺ を必要とすること、潜在型酵素として分泌され細胞外で活性化されること、それぞれの酵素の一次構造には高い相同性がみられること、共通のインヒビターである TIMP によって活性が阻害されること、などの共通した性質を

もつ。現在までに10種類の MMPs の一次構造が決定されており、癌細胞の浸潤・転移をはじめとして、種々の病的状態における MMPs の関与が知られている。

大動脈瘤壁におけるマトリックス分解活性の有無については、近年になって、様々な報告がなされるようになった。1980年、Busuttill ら²¹⁾ は、ヒト動脈硬化性大動脈瘤壁組織の抽出液がコラゲナーゼ活性を有することを報告した。彼らはこの分解活性と大動脈瘤径が正の相関を示していたこと、また活性が対照の非拡張性動脈硬化性大動脈壁に認められなかったことから、内因性のコラゲナーゼ分解活性が大動脈瘤の拡張および破裂の原因ではないかと考えた。次いで、Dobrin ら²²⁾ はイヌおよびヒトから採取した動脈を用いた実験でコラゲナーゼが動脈破裂を生じさせることを示し、コラゲナーゼによるコラーゲン分解が動脈壁の破綻に重要であると結論した。一方、Zarins ら²³⁾ は、サル大動脈壁を人為的に狭窄し、末梢に生じた拡張部動脈壁にコラーゲン分解活性の上昇を認め、ヒト大動脈瘤のコラーゲン分解活性上昇は血行動態の変化に対する反応にすぎないと主張した。また、Powell ら¹²⁴⁾ のグループは、ヒト大動脈壁のコラゲナーゼ活性が、非破裂性大動脈瘤で上昇せず、破裂性大動脈瘤でのみ上昇していたという所見を得、破裂例におけるコラゲナーゼ活性上昇は炎症細胞浸潤による刺激、または結果によるものであり、コラゲナーゼ活性が瘤形成や破裂の原因であるとする根拠はないと述べた。さらに、彼らは、大動脈瘤壁中膜のエラスチン量の著減と、それに相関したエラスターゼ活性の上昇を認め、その酵素活性は高度の大動脈瘤状硬化症に認められる白血球エラスターゼとは異なる性質をもつことを明らかにした。Rizzo ら²⁵⁾ は、マトリックス成分の解析から、大動脈瘤形成はコラーゲンではなくエラスチンの変性の結果であろうと報告し、加えて、Lehnert ら²⁶⁾ によって、腎動脈下では大動脈壁のエラスチン代謝が亢進していること、大動脈瘤壁が高いエラスチン分解活性を有することが報告され、大動脈瘤形成におけるエラスターゼ活性の役割も注目されるようになった。

また最近、大動脈瘤壁に存在すると思われるこれらの酵素活性を同定する研究が行われるようになった。Webster ら²⁷⁾ は、大動脈瘤壁には高いコラゲナーゼ活性が認められ、その活性は、金属キレート剤で抑制され、APMA で活性化されることを示し、MMPs の大動脈瘤に対する関与が示唆されるようになった。Vine ら²⁸⁾ は、抗血清を用いた免疫ブロットにて、大動脈瘤壁ホモジネート中に MMP-1、MMP-3 および MMP-9 の存在を認め、その陽性症例数は対照の動脈硬化より高頻度であったと報告した。これに対し、Herron ら²⁹⁾ は、大動脈瘤壁組織の培養上清から、"分子量92,000好中球ゼラチナーゼ" (おそらく 92kDa ゼラチナーゼ=MMP-9 のこと) を同定し、栄養血管にその免疫組織化学的局在を認めたが、間質性コラゲナーゼ (MMP-1) は証明できなかったと述べた。一方、Izarray ら³⁰⁾ は、大動脈瘤壁ホモジネートから MMP-1 の潜在型や分解産物を免疫ブロットで示すと共に、免疫蛍光法にて外膜の細胞に MMP-1 の存在を証明し、大動脈瘤壁におけるコラゲナーゼ活性の存在を裏付けるものとした。さらに、同グループのNewman ら³¹⁾ は、MMP-1 に加え、MMP-3 の存在を免疫ブロットで示し、その産生細胞として、増加したマクロファージとリンパ球を重視した。このように大動脈瘤壁における MMPs の存在が指摘されるようになってはいるが断片的な報告しかみられず、未だ十分に検討されていないのが現状であ

る。

本研究では、各種 MMPs の存在と局在、その産生細胞の同定、MMPs の産生、そして実際のマトリックス分解活性の有無、インヒビターの関与など、これまで行われていなかった様々な角度から解析を試みた。今回の免疫組織化学的検索で動脈瘤壁にその存在が証明されたのは、MMP-1, MMP-2, MMP-9 であった。MMP-3 は、細胞外マトリックス成分を直接分解する以外に、MMP-1, 8, 9 の活性化作用も有するが³⁹⁻⁴⁰、免疫組織化学的には存在が認められなかった。MMP-1, MMP-2 および MMP-9 は対照とした粥状動脈硬化巣と瀰漫性内膜肥厚にも認められたが、全体に瀰漫性内膜肥厚では陽性細胞数が比較的少数であった。大動脈瘤と粥状動脈硬化巣を比較して差異が大きかったのは、MMP-1 および MMP-9 で、大動脈瘤の外膜における増加が目立った。逆に、MMP-2 では両者間の違いはほとんど認められず、特に中膜においては瀰漫性内膜肥厚を含めた3病変で同程度の高い陽性率を示していた。MMP-1 は線維性コラーゲンである I 型と III 型コラーゲンの特異的分解酵素であり³⁹、MMP-2 と MMP-9 はゼラチンや IV 型および V 型コラーゲン分解酵素である^{39,37}。MMP-9 はこれらの基質以外に III 型コラーゲンや I 型コラーゲンの α_2 鎖も分解することができる³⁹。したがって、これら3種の MMPs で動脈壁の主な線維である膠原線維や弾性線維(後述)を分解することが可能である。免疫二重染色の結果から大動脈瘤の MMP-1 産生細胞は、主に泡沫化した内膜のマクロファージ、そして、内・中膜の平滑筋細胞の一部であることが証明され、また、外膜のマクロファージと、外膜に多数みられる HHH35 および HAM56 陰性の紡錘形細胞、すなわち、線維芽細胞も MMP-1 を産生していると考えられた。MMP-2 に関しては、内膜の泡沫化マクロファージ、内・中膜の平滑筋細胞と、外膜の線維芽細胞、マクロファージの大部分に陽性であった。また、Romanic ら³⁹ はネズミ T リンパ球と内皮細胞の共存培養において T リンパ球に MMP-2 の発現をみているが、本研究においても内膜の T リンパ球の一部に MMP-2 が認められた。MMP-9 の産生細胞は、内膜の泡沫化マクロファージと、中・外膜のマクロファージおよび好中球の一部であった。

以上をまとめると、大動脈瘤では対照と比べて MMP-1 と MMP-9 の増加が顕著であり、その産生は、総じてマクロファージによるものが多かった。マクロファージは、大動脈瘤の免疫染色で最も多数認められた細胞であり、大動脈瘤形成に重要な役割を果たすものと考えられる。次いで多く認められた炎症細胞は T リンパ球であった。単球が活性化 T リンパ球と直接接触すると MMP-1, MMP-9 の産生を誘導することが、Lacraz ら⁴⁰ によって報告されており、T リンパ球は MMP-2 を産生する他に単球/マクロファージの MMP-1, MMP-9 産生を調節しているものと推測される。

MMPs の共通のインヒビターである TIMPs のうち、TIMP-1 は免疫組織化学的に栄養血管の内皮細胞に弱陽性であったが、TIMP-2 は動脈瘤壁にひろく発現し、MMP-2 と同様の局在を示すので産生細胞は泡沫化マクロファージ、内・中膜の平滑筋細胞、外膜の線維芽細胞、マクロファージと思われた。MMP-2 と TIMP-2 の免疫二重染色では、同一細胞に両者が陽性であり、両者の密接な相互関係が示唆される所見である。

弾性線維の主要構成蛋白質であるエラスチンは大動脈壁では

乾燥重量の 50% を占め⁴¹、動脈壁の形態維持と弾性機能の発現に大切な役割を果たしている。従って、エラスチンの分解は動脈壁の脆弱化の原因となり、特に中膜弾性線維の断裂・消失は動脈瘤形成に重要な意義をもつ。本研究での α -エラスチンゼイモグラフィによる解析では 92kDa, 83kDa, 66kDa, 60kDa と、ゼラチンゼイモグラフィにみられた活性と同じ分子量にバンドが認められた。これらの活性は、前二者が MMP-9、後二者が MMP-2 による活性とみなされる。MMP-2 および MMP-9 がエラスターゼ活性を有することは、Senior ら⁴² によって報告されている。最近になって、Okada ら⁴³ はヒト動脈平滑筋細胞の培養上清がエラスチン分解活性を有しており、その活性が MMP-2 であることを示した。さらに、Katsuda ら⁴⁴ は、THP-1 細胞(ヒト単球/マクロファージ様細胞)由来の MMP-9 が、実際に大動脈組織のエラスチンを分解することをウサギ動脈中膜組織片と THP-1 細胞の共存培養において証明した。 α -エラスチンゼイモグラムで、60kDa 未満には活性が認められなかったことから、エラスチン分解活性を有するセリンプロテアーゼである好中球エラスターゼ(27~31kDa)⁴⁵ の存在は証明されず、これは免疫組織染色の所見と同様の結果であった。最近、発見されたエラスチン分解活性をもつ MMP-12(メタロエラスターゼ)⁴⁶ も、潜在型が 54kDa、活性型が 45kDa, 22kDa であり、培養上清中に分泌されているという証拠はなかった。92kDa の活性が最も明瞭であったことは、大動脈瘤壁のエラスチン分解における MMP-9 の重要性を示している。カゼインゼイモグラフィで認められたのは 77~94kDa の間のごく淡いバンドのみであり、これは MMP-9 と考えられた。MMP-3, MMP-7(マトリライシン)は共に、より低い分子量であるため、その存在は否定的であった。

¹⁴C-I 型コラーゲンを基質として測定した大動脈瘤壁組織培養上清のコラーゲン分解活性は、全てが感度以下であった。免疫組織化学的に MMP-1 が認められたにもかかわらずコラーゲン活性が低かった理由として、組織のコラーゲンに対する MMP-1 の親和性が非常に高いため、培養上清中に MMP-1 が充分回収できなかった可能性や、内因性のインヒビター(TIMPs)による影響が考えられる⁴⁶。¹⁴C-ゼラチンを基質としてゼラチン分解活性を測定した結果では、瘤径 6cm 未満の大動脈瘤壁の培養上清に、6cm 以上のものよりも有意に高いゼラチン分解活性を認めた。免疫組織染色およびゼイモグラフィで同定されたゼラチン分解活性を示すプロテアーゼは、MMP-2 と MMP-9 であり、今回測定されたゼラチン分解活性は、両者の活性の複合とみなすことができる。直線回帰分析で得られた、大動脈瘤壁の小さいものほどゼラチン分解活性が高いという傾向は、ゼラチンゼイモグラフィにおいて瘤径が小さいものほど潜在型 MMP-9 のゼラチン分解バンドの幅が広がったという結果とよく相関している。瘤径 6cm 未満の大動脈瘤壁のゼラチン分解活性が粥状動脈硬化巣より高い傾向にあり、また、瀰漫性内膜肥厚と比較すると有意に高かったことも、ゼラチンゼイモグラフィにおける潜在型 MMP-9 の活性と一致した所見である。³H-エラスチンを基質としたエラスチン分解活性の測定では、有意な活性は得られなかった。光学顕微鏡および電子顕微鏡による観察で大動脈瘤壁の弾性線維(エラスチン)が分解・消失しているにもかかわらず、エラスチン分解活性が認められなかったことは、測定法の感度による問題も考えられ、さらに検討する必要がある。³H-Cm-Tf を基質と

した分解活性は、わずかな症例で認められたが、いずれも低値であり、MMP-3 陰性の免疫組織染色やカゼインゼイモグラフィーの結果と矛盾しないものであった。

サンドイッチ免疫アッセイ法による組織培養上清の MMPs 定量では、MMP-1, MMP-2, MMP-9 ともに測定閾値以上の酵素の存在を認めたが、MMP-3 はほとんどの病変において感度以下であり、増感法による再検でわずかに測定しえた。大動脈瘤壁の MMP-1 量については、対照の粥状動脈硬化巣、瀰漫性内膜肥厚より高値であり、これは免疫組織染色の結果とも一致していた。培養上清中のコラーゲン分解活性が観察されなかったにもかかわらず、MMP-1 の増加が認められたことは、培養上清中に存在する TIMPs の影響を示唆している。なかでも TIMP-1 は、TIMP-2 に比べ MMP-1 を 8.8 倍低濃度で阻害する⁹⁾ことから重要であると考えられるが、実際、大動脈瘤培養上清中の TIMP-1 は粥状動脈硬化巣、瀰漫性内膜肥厚に対し有意に上昇していた。MMP-2 量は、それぞれの病変で差異がなく、免疫組織染色およびゼラチンゼイモグラフィーと矛盾しない結果であった。MMP-2 と関連の深い TIMP-2 は、免疫組織染色で多数認められたにも関わらず低値であり、その原因として、潜在型 MMP-2 と複合体を形成した TIMP-2 はほとんど測定することができないという測定法上の特性が考えられた。MMP-9 量は、大動脈瘤において粥状動脈硬化巣よりやや高い傾向を示し、また、瀰漫性内膜肥厚より有意に高く、免疫組織染色やゼラチンゼイモグラフィーの所見と一致していた。MMP-9 と TIMPs との関連を述べると、TIMP-2 は TIMP-1 より 1.2 倍低濃度で MMP-9 を阻害し⁹⁾、一方、TIMP-1 は潜在型 MMP-9 と複合体を形成することが知られている³⁸⁾。一般に、生体内での MMP 活性は、TIMPs との間不均衡が生じた場合に作用すると考えられ、その観点から、Brophy ら⁴⁷⁾は、TIMP の減少が大動脈瘤における酵素活性の増加に寄与していると主張している。しかしながら、本研究では、それを支持する明らかな証拠は得られなかった。

本研究の所見を総合すると、MMP-1 と MMP-9 が大動脈瘤で増加しており、その産生はマクロファージが主体をなしていた。MMP-1 については、培養上清にコラーゲナーゼ活性が認められず、TIMPs により阻害されていると考えられることから、大動脈組織で十分に作用しているかどうかは疑問である。一方、MMP-9 は、エラスチン分解活性を有し、また、免疫組織染色や培養上清中の定量にて大動脈瘤における増加が示されるとともに、ゼイモグラフィーとゼラチン分解活性の測定にて大動脈瘤径の小さいものほど強く作用していることが明らかにされた。このことは MMP-9 が大動脈瘤、特にその初期病変の形成に重要な役割を果たしていることを強く示唆している。この瘤径とゼラチナーゼ活性との負の相関は、過去に報告された瘤径とコラーゲナーゼ活性が正の相関を示すという報告²¹⁾²⁶⁾と一見相反するよう思えるが、Zarins ら²³⁾や Powell ら²⁵⁾の主張するように大動脈の拡大に対する反応としてコラーゲン分解活性が亢進しているのならば、大動脈瘤形成の原因として働いているエラスチン分解が、逆に瘤径の小さい段階で強いことも説明しうるかもしれない。本研究で認められた大動脈瘤壁の著明な弾性線維崩壊や、以前より報告されている大動脈瘤壁のエラスチン量の減少、相対的コラーゲン量の増加という事実¹²⁾²³⁾⁴⁸⁾は、これを支持する所見と思われる。

MMP-9 の大動脈瘤形成に関する役割をふまえれば、臨床的

な応用も考えることができる。大動脈瘤には急速な拡大を示すものと、長期にわたってそのままの大きさとどまるものがあり⁴⁹⁾、また、瘤径が小さいにもかかわらず破裂を生じる例も認められるが⁵⁰⁾、大動脈瘤症例の血中の MMPs 測定によって瘤径の急速な拡大や破裂の危険性を予見しうるかもしれない。また、瘤径の小さい時に MMP-9 が大動脈の弾性線維を破壊して大動脈瘤が形成されるとすれば、その時期にインヒビターを投与することによって瘤の進展が阻止できる可能性もある。これらの臨床応用も含め、大動脈瘤と MMPs の関係については今後さらに検討する必要がある。

結 論

動脈硬化性腹部大動脈瘤壁組織における MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9 と、そのインヒビターである TIMP-1, TIMP-2 について、免疫組織化学的局在の解析、その産生細胞の同定、組織培養上清中の産生量と酵素活性の測定を行い、拡張を伴わない動脈硬化と比較・検討し、次の結果を得た。

1. 大動脈瘤壁の光学顕微鏡および電子顕微鏡的観察において、内・中膜、特に中膜の弾性線維の著明な破壊像が認められた。

2. 免疫組織化学的に、MMP-1 は大動脈瘤壁内膜の泡沫化したマクロファージ、内・中膜の平滑筋細胞の一部、また、外膜の線維芽細胞とマクロファージに陽性であった。MMP-2 と TIMP-2 は、MMP-1 と類似の分布を示したが陽性細胞数がより多数であった。MMP-9 は、内膜の泡沫化マクロファージと、中・外膜のマクロファージおよび好中球の一部に染色された。MMP-3 は全例陰性で、TIMP-1 は栄養血管の内皮細胞に弱陽性を示すのみであった。非拡張性動脈硬化と比較して明らかな増加が認められたのは MMP-1 と MMP-9 であり、その産生はマクロファージによるものが多かった。

3. 組織培養上清を用いたゼラチンゼイモグラフィーでは、92kDa, 83kDa, 66kDa, 60kDa にバンドが出現し、前二者は MMP-9、後二者は MMP-2 による活性とみなされた。潜在型 MMP-9 と思われる 92kDa のバンドは、大動脈瘤において幅が広く、特に、瘤径の小さいものほど幅広い傾向があり、MMP-2 のバンドは、ほぼ一定であった。 α -エラスチンゼイモグラフィーでは、ゼラチンゼイモグラフィーと同様の分子量のバンドを認め、92kDa が最も明瞭であった。カゼインゼイモグラフィーでは、77~94kDa に MMP-9 と思われる淡いバンドを認めた。

4. 組織培養上清のゼラチン分解活性は、瘤径との間に、 $Y=7.037-0.674X$ ($r=0.366$, $P<0.05$) の有意な相関があり、瘤径 6cm 未満の大動脈瘤 (4.47 ± 3.67 u/g) が、6cm 以上のもの (0.97 ± 1.27 u/g) よりも有意に高い活性を有していた ($P<0.01$)。また、瘤径 6cm 未満の大動脈瘤壁は、瀰漫性内膜肥厚 (0.46 ± 1.13 u/g) と比較しても有意に高いゼラチン分解活性を示した ($P<0.01$)。エラスチン、コラーゲン、トランスフェリンの分解活性においては、有意な所見を得られなかった。

5. 組織培養上清中の MMP-1 量は、大動脈瘤壁 (0.124 ± 0.080 nmol/g) が、粥状動脈硬化巣 (0.063 ± 0.054 nmol/g) よりも有意に高値を示していた ($P<0.05$)。また、MMP-9 量も、大動脈瘤壁 (0.145 ± 0.103 nmol/g) が瀰漫性内膜肥厚 (0.022 ± 0.041 nmol/g) よりも有意に高値であった ($P<0.01$)。MMP-2 量は、大動脈瘤壁 (0.161 ± 0.070 nmol/g) と対照の間に有意差はな

く、MMP-3量はいずれも低値であった。TIMP-1量は、大動脈瘤壁 ($1.036 \pm 0.639 \text{ nmol/g}$) が粥状動脈硬化巣 ($0.409 \pm 0.278 \text{ nmol/g}$)、瀰漫性内膜肥厚 ($0.397 \pm 0.331 \text{ nmol/g}$) の双方に比べて、有意に高値を示した (いずれも $P < 0.01$)。TIMP-2は全体に低値であった。

以上のことから、大動脈瘤壁では、MMP-1およびMMP-9が増加しており、特にマクロファージから産生されるMMP-9が、エラスチンおよび他の細胞外マトリックス成分を分解することによって大動脈瘤の発生、特に初期病変の形成に重要な役割を果たしていることが示唆された。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導、御校閲を賜りました恩師渡辺洋宇教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究遂行に際し、御指導頂きました金沢大学第一病理学中西功夫教授に心から謝意を表します。本研究を直接御指導、御教授頂きました金沢大学第一病理学勝田省吾助教授 (現金沢医科大学第二病理学教授) に深く感謝いたします。本研究に際し、MMPs, TIMPsのモノクローナル抗体を快く供与下さいました金沢大学がん研究所分子免疫部門岡田保典教授に深謝いたします。また、組織材料を供与頂きました国立金沢病院心臓血管外科上山武史先生、石川県立中央病院心臓血管外科遠藤将光先生、富山赤十字病院心臓血管外科永井晃先生、福井県立病院心臓血管外科山本信一郎先生に深く感謝いたします。サンドイッチ免疫法による測定に御協力頂いた岩田和士博士に深謝いたします。最後に、本研究遂行にあたり、終始多大な御協力と御援助を賜った金沢大学第一病理学教室員各位、技術員各位および金沢大学第一外科学教室員各位に厚く御礼申し上げます。

なお、本論文の要旨は、第24回日本心臓血管外科学会学術総会シンポジウム (1994年、名古屋)、平成6年度日本動脈硬化学会冬季大会 (1994年、博多) において発表した。

文 献

- Menashi, S., Campa, J. S., Greenhalgh, R. M. & Powell, J. T.: Collagen in abdominal aortic aneurysm: Typing, content, and degradation. *J. Vasc. Surg.*, **6**, 578-582 (1987).
- Rizzo, R. J., McCarthy, W. J., Dixit, S. N., Lilly, M. P., Shively, V. P., Flinn, W. R. & Yao, J. S. T.: Collagen types and matrix protein content in human abdominal aortic aneurysms. *J. Vasc. Surg.*, **10**, 365-373 (1989).
- He, C. M. & Roach, M. R.: The composition and mechanical properties of abdominal aortic aneurysms. *J. Vasc. Surg.*, **20**, 6-13 (1994).
- Matrisian, L. M.: Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Trends Genet.*, **6**, 121-125 (1990).
- Woessner, J. F.: Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J.*, **5**, 2145-2154 (1991).
- 岡田保典: マトリックスメタロプロテアーゼと炎症。組織培養., **19**, 386-390 (1993).
- Shapiro, S. D., Kobayashi, D. K. & Ley, T. J.: Cloning and characterization of a unique elastolytic metalloproteinase produced by human alveolar macrophages. *J. Biol. Chem.*, **268**, 23824-23829 (1993).
- Sato, H., Takino, T., Okada, Y., Cao, J., Shinagawa, A., Yamamoto, E. & Seiki, M.: A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumor cells. *Nature*, **370**, 61-65 (1994).
- Kajikawa, K., Yamaguchi, T., Katsuda, S. & Miwa, A.: An improved electron stain for elastic fibers using tannic acid. *J. Electron Microsc.*, **24**, 287-289 (1975).
- 岡田保典, 木村顕子, 中西功夫, 岩田和士: 漫性関節リウマチ滑膜細胞由来 matrix metalloproteinase 2 の性質と滑膜細胞内局在。日病会誌, **79**, 285 (1990).
- 仲 克己: 骨吸収における matrix metalloproteinase 9 (92kDa ゼラチナーゼ/IV型コラゲナーゼ) その性質と破骨細胞での局在に関する研究。十全医会誌, **100**, 948-961 (1991).
- 木村顕子: 肺癌におけるマトリックスメタロプロテナーゼ その産生、局在と癌細胞の浸潤・転移における役割。十全医会誌, **101**, 344-355 (1992).
- Fujimoto, N., Zhang, J., Iwata, K., Shinya, T., Okada, Y. & Hayakawa, T.: A one-step sandwich enzyme immunoassay for tissue inhibitor of metalloproteinases-2 using monoclonal antibodies. *Clin. Chim. Acta*, **220**, 31-45 (1993).
- Katsuda, S., Coltrera, M. D., Ross, R. & Gown, A. M.: Human atherosclerosis. V. Immunocytochemical analysis of cell activation and proliferation in lesions of young adults. *Am. J. Pathol.*, **142**, 1787-1793 (1993).
- Hibbs, M. S., Hasty, K. A., Seyer, J. M., Kang, A. H. & Mainardi, C. L.: Biochemical and immunological characterization of the secreted forms of human neutrophil gelatinase. *J. Biol. Chem.*, **260**, 2493-2500 (1985).
- Harris, E. D. & Krane, S. M.: An endopeptidase from rheumatoid synovial tissue culture. *Biochem. Biophys. Acta*, **258**, 566-576 (1972).
- Cawston, T. E. & Barrett, A. J.: A rapid and reproducible assay for collagenase using [^{14}C] acetylated collagen. *Anal. Biochem.*, **99**, 340-345 (1979).
- Okada, Y., Nagase, H. & Harris, E. D.: A metalloproteinase from human rheumatoid synovial fibroblasts that digests connective tissue matrix components. *J. Biol. Chem.*, **261**, 14245-14255 (1986).
- Kodama, S., Yamashita, K., Kishi, J., Iwata, K. & Hayakawa, T.: A sandwich enzyme immunoassay for collagenase inhibitor using monoclonal antibodies. *Matrix*, **9**, 1-6 (1989).
- Bergqvist, D. & Bengtsson, H.: Risk factors for rupture of abdominal aortic aneurysm. *Acta Chir. Scand.*, **156**, 63-68 (1990).
- Busuttill, R. W., Abou-Zamzam, A. M. & Machleder, H. I.: Collagenase activity of the human aorta. *Arch. Surg.*, **115**, 1373-1378 (1980).
- Dobrin, P. B., Baker, W. H. & Gley, W. C.: Elastolytic and collagenolytic studies of arteries. *Arch Surg.*, **119**, 405-409 (1984).
- Zarins, C. K., Runyon-Hass, A., Zatina, M. A., Lu, C. T. & Glagov, S.: Increased collagenase activity in early aneurysmal dilatation. *J. Vasc. Surg.*, **3**, 238-248 (1986).
- Campa, J. S., Greenhalgh, R. M. & Powell, J. T.: Elastin degradation in abdominal aortic aneurysms. *Athero-*

sclerosis, 65, 13-21 (1987).

- 25) Powell, J. & Greenhalgh, R. M.: Cellular, enzymatic, and genetic factors in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysms. *J. Vasc. Surg.*, 9, 297-304 (1989).
- 26) Lehnert, B., Wadouh, F. & Dwenger, A.: Relationship between proteolytic enzymes and atherosclerosis in aortic aneurysms. *Surgery*, 172, 345-350 (1991).
- 27) Webster, M. W., McAuley, C. E., Steed, D. L., Miller, D. D. & Evans, C. H.: Collagen stability and collagenolytic activity in the normal and aneurysmal human abdominal aorta. *Am. J. Surg.*, 161, 635-638 (1991).
- 28) Vine, N. & Powell, J. T.: Metalloproteinases in degenerative aortic disease. *Clin. Sci.*, 81, 233-239 (1991).
- 29) Herron, G. S., Unemori, E., Wong, M., Rapp, J. H., Hibbs, M. H. & Stoney, R. J.: Connective tissue proteinases and inhibitors in abdominal aortic aneurysms. *Arterio. and Thromb.*, 11, 1667-1677 (1991).
- 30) Irizarry, E., Newman, K. M., Gandhi, R. H., Nackman, G. B., Halpern, V., Wishner, S., Scholes, J. H. & Tilson, M. D.: Demonstration of collagenase in abdominal aortic aneurysm disease. *J. Surg. Res.*, 54, 571-574 (1993).
- 31) Newman, K. M., Malon, A. M., Shin, R. D., Scholes, J. V., Ramey, W. G. & Tilson, M. D.: Matrix metalloproteinases in abdominal aortic aneurysm: characterization, purification, and their possible sources. *Connect. Tissue Res.*, 30, 265-276 (1994).
- 32) Murphy, G., Cockett, M. I., Stephens, P. E., Smith, B. J. & Docherty, A. J. P.: Stromelysin is an activator of procollagenase. a study with natural and recombinant enzymes. *Biochem. J.*, 248, 265-268 (1987).
- 33) Knauper, V., Wilhelm, S. M., Seperack, P. K., DeClerck, Y. A., Langley, K. E., Osthues, A. & Tschesche, H.: Direct activation of human neutrophil procollagenase by recombinant stromelysin. *Biochem. J.*, 295, 581-586 (1993).
- 34) Ogata, Y., Enghild, J. J. & Nagase, H.: Matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) activates the precursor for the human matrix metalloproteinase 9. *J. Biol. Chem.*, 267, 3581-3584 (1992).
- 35) Harris, E. D. & Krane, S. M.: Collagenase (second of three parts). *N. Engl. J. Med.*, 291, 605-609 (1974).
- 36) Wilhelm, S. M., Collier, I. E., Marmer, B. L., Eisen, A. Z., Grant, G. A. & Goldberg, G. I.: SV40-transformed human lung fibroblasts secrete a 92-kDa type IV collagenase which is identical to that secreted by normal human macrophages. *J. Biol. Chem.*, 264, 17213-17221 (1989).
- 37) Mackay, R. A., Hartzler, J. L., Pelina, M. D. & Thorgeirsson, U. P.: Studies on the ability of 65-kDa tumor cell gelatinases to degrade type IV collagen. *J. Biol. Chem.*, 265, 21929-21934 (1990).
- 38) Okada, Y., Gonoji, Y., Naka, K., Tomita, K., Nakanishi, I., Iwata, K., Yamashita, K. & Hayakawa, T.: Matrix metalloproteinase 9 (92-kDa gelatinase/type IV collagenase) from HT 1080 Human fibrosarcoma cells. *J. Biol. Chem.*, 267, 21712-21719 (1992).
- 39) Romanic, A. M. & Madri, J. A.: The induction of 72-kDa gelatinase in T cells upon adhesion to endothelial cells is VCAM-1 dependent. *J. Cell Biol.*, 125, 1165-1178 (1994).
- 40) Lacraz, S., Isler, P., Vey, E., Welgus, H. G. & Dayer, J. M.: Direct contact between T lymphocytes and monocytes is a major pathway for induction of metalloproteinase expression. *J. Biol. Chem.*, 269, 22027-22033 (1994).
- 41) Barnes, M. J.: Collagens in atherosclerosis. *Collagen Rel. Res.*, 5, 65-97 (1985).
- 42) Senior, R. M., Griffin, G. L., Fliszar, C. J., Shapiro, S. D., Goldberg, G. I. & Welgus, H. G.: Human 92-and 72-kilodalton type IV collagenases are elastases. *J. Biol. Chem.*, 266, 7870-7875 (1991).
- 43) Okada, Y., Katsuda, S., Okada, Y. & Nakanishi, I.: An elastolytic enzyme detected in the culture medium of human arterial smooth muscle cells. *Cell Biol. Int.*, 17, 863-869 (1993).
- 44) Katsuda, S., Okada, Y., Okada, Y., Imai, K. & Nakanishi, I.: Matrix metalloproteinase-9 (92-kd gelatinase/type IV collagenase equals gelatinase B) can degrade arterial elastin. *Am. J. Pathol.*, 145, 1208-1218 (1994).
- 45) Woessner, J. F.: Role of cellular proteinases and their protein inhibitors in inflammation. *Immunol. Med.*, 18, 57-89 (1992).
- 46) Samy, A. K., Finlay, F. & MacBain, G.: Elastase and collagenase activities in the wall of the abdominal aortic aneurysm. *Vasc. Surg.*, 28, 311-317 (1994).
- 47) Brophy, C. M., Marks, W. H., Reilly, J. M. & Tilson, M. D.: Decreased tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) in abdominal aortic aneurysm tissue: a preliminary report. *J. Surg. Res.*, 50, 653-657 (1991).
- 48) White, J. V., Hass, K., Phillips, S. & Comerota, A. J.: Adventitial elastolysis is a primary event in aneurysm formation. *J. Vasc. Surg.*, 17, 371-381 (1993).
- 49) 佐藤 紀: 病因・病理. 腹部大動脈瘤のすべて (稲田 潔, 広瀬 一編), 第1版, 19-26頁, ヘルス出版, 東京, 1991.
- 50) Cronenwett, J. L., Murphy, T. F., Zelenock, G. B., Whitehouse, W. M., Lindenauer, S. M., Graham, L. M., Quint, L. E., Silver, T. M. & Stanley, J. C.: Actuarial analysis of variables associated with rupture of small abdominal aortic aneurysms. *Surgery*, 98, 472-483 (1985).

Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases in Atherosclerotic Aortic Aneurysm

Fuminori Kasashima, Department of Surgery (I), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Jusen Med Soc., 104, 216—229 (1995)

Key words abdominal aortic aneurysm, atherosclerosis, matrix metalloproteinase, tissue inhibitor of metalloproteinases

Abstract

Aortic aneurysm is characterized by destruction of the extracellular matrix of the aorta. In order to evaluate the roles of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in atherosclerotic aneurysmal formation of human aorta, immunohistochemistry, zymographic analysis and enzyme assay were performed on 51 aortic tissues: 30 abdominal aortic aneurysms (AAA) and 13 undilated aortas with atheromatous plaque (AP) obtained at surgery, and 8 aortas with diffuse intimal thickening (DIT) from autopsy. Light and electron microscopic observations on aneurysmal walls showed marked degradation of medial elastic lamellae. Immunohistochemically, MMP-1 (interstitial collagenase) was localized in foamy macrophages of the intima, smooth muscle cells of the intima and media, and fibroblasts and macrophages of the adventitia in AAA. MMP-9 (gelatinase B) was found mainly in foamy macrophages of intima, and macrophages and a little neutrophils of the media and adventitia. MMP-2 (gelatinase A) and TIMP-2 were localized in a similar pattern to MMP-1. TIMP-1 was weakly localized to the endothelial cells of vasa vasorum, and MMP-3 (stromelysin-1) was undetectable. MMP-1 and MMP-9 were immunolocalized in a greater number of cells such as macrophages in AAA than in AP and DIT. Gelatin zymography using the culture media of the aortic tissues showed gelatinolytic activities with 92 kDa, 83 kDa, 66 kDa and 60 kDa, the former two considered to be MMP-9, and the latter to be MMP-2. The lysis bands at 92 kDa regarded as a precursor form of MMP-9 were more extensive in AAA, especially those with a small diameter, than in the undilated aortas. While the lysis bands considered to be MMP-2 were constant. α -elastin zymography showed the presence of elastinolytic activity with the same molecular weight as gelatin gels in the culture media from the aortic tissues. On casein zymography, a few faint lysis bands at 77-94 kDa considered to be MMP-9 were shown. With ^{14}C -gelatin as a substrate, activity could be detected in the media of AAA, and the levels were significantly higher in the samples from the aneurysm with small diameter (<6 cm) (4.47 ± 3.67 u/g) than those from the large-diameter aneurysm (over 6 cm) (0.97 ± 1.27 u/g) ($P < 0.05$). The inverse correlation of gelatinolytic activity with the diameter of the aneurysm was detected ($Y = 7.037 - 0.674X$, $r = -0.366$, $P < 0.05$). The media from the small-diameter aneurysm also showed significantly higher activity than those from DIT (0.46 ± 1.13 u/g) ($P < 0.01$). No significant activities could be detected with ^3H -elastin, ^{14}C -collagen and ^3H -carboxymethylated transferrin as a substrate. Amounts of MMP-1 secreted in the culture media measured by sandwich enzyme immunoassay were significantly higher in AAA (0.124 ± 0.080 nmol/g) than in AP (0.063 ± 0.054 nmol/g) ($P < 0.05$). The level of MMP-9 was significantly higher in AAA (0.145 ± 0.103 nmol/g) than in DIT (0.022 ± 0.041 nmol/g) ($P < 0.01$). There were no significant differences among MMP-2 levels of the samples from AAA, AP and DIT. The level of TIMP-1 of the sample from AAA was significantly higher than that from AP and PIT. The amounts of MMP-3 and TIMP-2 in all groups were very low. These results suggest that MMP-1 and MMP-9 increase in the aneurysmal aortic wall, and that MMP-9, in particular when produced mainly by macrophages, plays an important role in early aneurysmal formation of aorta, degrading elastin and other extracellular matrix components.