

氏名	西 浦 巖 にし うら いわお
学位の種類	医学博士
学位記番号	医博第 522 号
学位授与の日付	昭和 54 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当
研究科・専攻	医学研究科外科系専攻
学位論文題目	脳 Ca 依存性プロテアーゼの研究

論文調査委員 (主査) 教授 沼 正作 教授 村地 孝 教授 半田 肇

### 論文内容の要旨

蛋白質磷酸化酵素を活性化する因子として cyclic AMP 及び GMP が知られていたが、最近新たに活性化因子の一つとして細胞内 Ca 依存性プロテアーゼが見出され、この種のプロテアーゼも cyclic AMP 及び GMP と同レベルで生体制御に関与していると考えられるに至った。一方、細胞内プロテアーゼは悪性腫瘍の侵襲機構に重要な役割を果しているとの示唆もあり、腫瘍細胞の転移や浸潤がカテプシン B または D あるいは中性プロテアーゼによって促進されるという報告もある。著者は脳細胞内 Ca 依存性プロテアーゼの生理的病態的意義を明らかにする目的で、種々の脳腫瘍におけるこのプロテアーゼの活性変化を調べ、本酵素を部分精製し、また、この部分精製酵素を用いて、S-100 蛋白及び外来性、内来性インヒビターの阻害効果等につき一連の実験的研究を行った。マウス脳、ラット脳、G 203 glioma 及び手術時摘出脳腫瘍組織を材料とし、そのホモジネートの遠沈上清可溶画分を酵素源として用いた。S-100 蛋白はウシ脳より部分精製した。

1) マウス正常脳可溶画分は、pH 4.5 および 8.0 にそれぞれ至適 pH をもつプロテアーゼ活性を示した。前者はカテプシン D または E に由来する活性であり、後者は Ca 依存性プロテアーゼであった。G 203 glioma でも pH 4.5 の活性のほかに pH 8.0 の Ca 依存性中性プロテアーゼ活性を認めた。後者の比活性は正常脳のそれより 2～3 倍高かった。また G 203 glioma では pH 6.0 に正常脳では認められないプロテアーゼ活性が存在した。

2) ヒト glioma 20 例の Ca 依存性プロテアーゼの比活性は、一般に正常脳のそれより 2～3 倍高く、かつ悪性化につれて上昇し、glioblastoma で高値を示す例が多かった。pH 4.5 の比活性は症例によりかなりの変動が見られた。pH 6.0 活性は大部分の症例で非常に低いか全く認められなかったが、glioblastoma のいくつかの症例で活性の存在を認めた。

3) ラット脳 Ca 依存性プロテアーゼを脳可溶性画分より DEAE-cellulose および Sephadex G-200 クロマトグラフィーによって 315 倍に精製した。本プロテアーゼは 5 mM 塩化カルシウム存在下で最も強い活性を示し、また、この Ca 存在下の活性は 10 mM システイン添加によってさらに 2～3 倍上昇

した。二価イオンのなかで Ca が最も有効であり、Sr と Mn は次に有効であったので、このプロテアーゼを Ca 依存性プロテアーゼと呼んで差しかえないと思われる。本プロテアーゼは分子量約  $8.4 \times 10^4$  で、至適 pH は 7.5~8.0 にあり、カゼイン、酸化インシュリンB鎖、ミオグロビンを水解したが、用いた数種の合成基質はこれを全く水解しなかった。また、本プロテアーゼは cyclic nucleotide 非依存性蛋白質磷酸化酵素前駆体を著しく活性化した。

4) S-100 蛋白は Ca 依存性プロテアーゼを抑制したが、このことは悪性 glioma では S-100 蛋白が減少するという既報の事実との関連性を示すものと考えられる。

5) 四種類の放線菌由来プロテアーゼインヒビターの内、Ca 依存性プロテアーゼ活性はロイペプチンによって最も強く抑制された。また、G 203 glioma の *in vitro* 培養に際して、培養液にロイペプチン  $50 \mu\text{g}/\text{ml}$  を添加したところ、細胞増殖がほぼ60%抑制された。ロイペプチンが抗原性の低い低分子量ペプチドである事実にかんがみて、ある種の腫瘍の治療にロイペプチンを用いる可能性を検討することは有意義であると思われる。

6) ラット脳 Ca 依存性プロテアーゼに特異的なインヒビターがプロテアーゼとともに脳細胞内に存在することを、脳可溶画分の Sephadex G-200 ゲル濾過実験によって証明した。ここに分離したインヒビターは、既報の各種プロテアーゼインヒビターとは異った耐熱性の高分子量の蛋白質インヒビターであった。

以上の結果は、脳内代謝調節機構及び病態にこの Ca 依存性プロテアーゼ及び特異的インヒビターが有意義な役割を果たしていることを示唆するものと考えられる。

### 論文審査の結果の要旨

蛋白質磷酸化酵素を活性化する因子として cyclic AMP および GMP が知られていたが、最近新たに活性化因子の一つとして細胞内 Ca 依存性プロテアーゼが見出され、この種のプロテアーゼも cyclic AMP および GMP と同じレベルで生体制御に関与していると考えられるにいたった。一方、細胞内プロテアーゼは悪性腫瘍の侵襲機構に重要な役割を果たしているとの示唆もあり、腫瘍細胞の転移や浸潤がカテプシン B または D あるいは中性プロテアーゼによって促進されるという報告もある。本研究は脳細胞内 Ca 依存性プロテアーゼの生理的病態的意義を明らかにする目的で、種々の脳腫瘍におけるこのプロテアーゼの活性変化を調べ、本酵素を部分精製し、また、この部分精製酵素を用いて、S-100 蛋白および外来性、内来性インヒビターの阻害効果などにつき一連の実験的研究を行った。その結果、ヒト glioma 20 例の Ca 依存性プロテアーゼの比活性は、一般に正常脳のそれより 2~3 倍高く、かつ悪性化につれて上昇し、glioblastoma で高値を示す例が多かった。S-100 蛋白は Ca 依存性プロテアーゼを抑制した。また、G 203 glioma の培養細胞増殖が外来性インヒビターロイペプチンによって強く抑制された。ラット脳 Ca 依存性プロテアーゼに特異的インヒビターが脳細胞内に存在することを証明した。

以上の結果は、脳内代謝調節機構および病態にこの Ca 依存性プロテアーゼが有意義な役割を果たしていることを示唆するものである。

以上の研究は脳細胞内 Ca 依存性プロテアーゼの生理的病態的意義を明らかにしたものである。

したがって、本論文は医学博士の学位論文として価値あるものと認める。