

氏名	ね もり りょう いち 根 守 良 一
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学位記番号	論農博第 2624 号
学位授与の日付	平成 18 年 11 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	Film <i>in situ</i> zymography の開発と応用 ——マトリックスメタロプロテアーゼの活性局在検出法——
論文調査委員	(主 査) 教授 大 東 肇 教授 北 畠 直 文 教授 安 達 修 二

論 文 内 容 の 要 旨

マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) 類をはじめとする種々のプロテアーゼは生体組織内局所において生理的あるいは病的に機能を発現している。例えば、組織の発生や再構築、血管新生、創傷治癒時に、また、炎症、自己免疫疾患、光刺激による皮膚の老化、腫瘍、歯周病などにおける発現が知られている。これらの生理的・病的な現象を理解するためには各組織におけるプロテアーゼの働きを理解することが必須であり、そのためにはプロテアーゼ活性の発現状態を知ることが重要である。ほとんどのプロテアーゼは前駆体 (pro) 型タンパク質として合成され、細胞外に分泌された後、一部のペプチドが切り取られることによって活性型プロテアーゼとなる。一方、組織中には各プロテアーゼを阻害するタンパク質が分布し、活性型プロテアーゼと結合することによりその機能を阻害する。そのため、プロテアーゼ分子の mRNA やタンパク質を検出したとしても、その量の大小は必ずしも活性の大小に反映されない。組織局所における活性を直接調べる方法として *in situ* zymography 法が開発されているが、現状は汎用性・再現性に富んだ手法にまでは至っていない。このような背景下、著者は、ポリエチレンテレフタレート (PET) フィルムを支持体とする均一な品質の *in situ* zymography 用基質薄膜 (FIZ) の開発を試み、その応用性について検討した。その主な成果は次のようにまとめられる。

(1) MMP 類および他のプロテアーゼを対象とする汎用性 FIZ 膜の開発とその応用

MMP 類をはじめとする多彩なプロテアーゼ類の活性を検出できるよう、ゼラチンを基質に選び、その種類や架橋度、さらには膜厚などを変えた多彩な試作品を作製し、主として癌組織を対象にそれらの性能を評価した。特に、架橋度は分解性に大きく影響することを明らかにし、各種プロテアーゼ溶液および癌組織でのプロテアーゼ活性を広く測定できるよう、最適化を試みた。なお、薄膜の製造には写真フィルム製造用の塗布機を用い、膜厚 $7\mu\text{m}$ の一定な膜 (FIZ-GN 膜) を作製した。

並行して、MMP 阻害剤 (キレート剤) である 1,10-フェナンスロリンを含むゼラチン膜 (FIZ-GI 膜) をも作製し、FIZ-GN 膜と併用することによって、求める活性が MMP によるものか他のプロテアーゼによるものかを判別できるシステムを開発した。

大学医学部・病院機関の協力を得て、作製した FIZ-GN および FIZ-GI を用いて種々検討した結果、多彩な癌や病変組織に MMP 活性が発現している様子を画像としてとらえることに成功した。

最近、FIZ-GN による癌組織の MMP 活性が臨床的な悪性度と相関することが、協力医学関係機関において明らかにされつつあり、著者は、実例を示しつつ、本 FIZ-GN の癌領域における臨床応用の可能性や期待度について言及している。

(2) MMP-7 に選択的な FIZ 膜の開発とその応用

MMP ファミリーのなかで、MMP-7 は大腸癌や子宮内膜癌をはじめとするいくつかの癌腫で悪性度との強い相関が報告されている。そこで著者は、MMP-7 に選択的な *in situ* zymography の開発を試みた。基質として、MMP-7 によって効率的に分解され、かつ大量入手が可能なカルボキシメチルトランスフェリン (Cm-Tf) を選択した。Cm-Tf は MMP-7 以外にも MMP-3 の基質にもなることが知られており、選択性に懸念があった。しかしながら、MMP-3 の分子量が MMP-7 よ

り大きいことに注目し、基質の強い架橋により MMP-7 選択性を高めることに成功した。また、セリンプロテアーゼ類による分解を避けるために各種阻害剤の併用を検討し、アプロチニンとエラスチナーールの混合液による膜の前処理で主なセリンプロテアーゼによる妨害が抑制できることも明らかにした。以上の実験的試みから、例えば、子宮内膜癌の凍結検体を用いた試験により MMP-7 活性を容易に検出するなど、MMP-7 に選択性の高い FIZ 膜の作製に成功している。

最後に、著者は、未だ開発・発展途上にある関連分野において、本研究開発によって得られた *in situ* zymography 用フィルム類開発の意義（応用性・利便性・発展性など）についての的確なる考察をしている。

論文審査の結果の要旨

マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) などのプロテアーゼは医学、薬学、獣医学などの研究対象として重視されており、癌をはじめとする各種の疾患における作用が解明されつつある。また、最近、いくつかの食品成分にも MMP の活性阻害や産生阻害作用が見いだされており、食品機能の解明や新規機能性食品の開発分野においても注目が集まっている。MMP の研究が盛んになるなか、研究手法として、汎用性に富み、また精度の高い *in situ* zymography の開発が強く望まれている。これまで、主として均一な基質薄膜を作製する困難さのため本法の利用は限られていた。このような背景下、本論文では、均一な基質薄膜の作製とその応用に対して種々精緻な検討を加えた。評価できる点は以下の通りである。

1. ゼラチンを基質とする薄膜 (FIZ-GN)、および MMP 阻害剤である 1,10-フェナンスロリンを含むゼラチン薄膜 (FIZ-GI) の作製を行い、両者が多彩な MMP 類や、トリプシン、プラスミン、カテプシンなどの広範なプロテアーゼ活性の局在検出に使えることを確認した。また、FIZ-GN と FIZ-GI を用いて各種の癌や自己免疫疾患組織などにおける MMP 活性の局所的な発現を検出し、さらに経口投与した薬物による *in vivo* MMP 活性の強度変化の測定にはじめて成功した。

2. 癌の悪性度との相関が示されている MMP-7 活性の選択的な検出を目的に、カルボキシメチルトランスフェリン (Cm-Tf) での架橋を試みた。その結果、期待どおり MMP-7 を選択的に検出できることを確認し、また、架橋 Cm-Tf 薄膜とセリンプロテアーゼ阻害剤を併用し、ヒト癌組織における MMP-7 活性の局在をはじめて明らかにするなど、臨床応用への将来性を示した点は高く評価される。

以上のように、本論文は新規な *in situ* zymography 用薄膜の開発とその応用に向けた種々の検討結果を、実用例をも示しつつ、論じており、プロテアーゼ研究に関連する農学、医学、薬学、獣医学分野に貢献するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成18年10月19日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。