

|           |                                                                                                                                                                          |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名       | にし はら ひで き<br>西 原 秀 紀                                                                                                                                                    |
| 学位(専攻分野)  | 博 士 (医 学)                                                                                                                                                                |
| 学 位 記 番 号 | 医 博 第 2518 号                                                                                                                                                             |
| 学位授与の日付   | 平 成 14 年 5 月 23 日                                                                                                                                                        |
| 学位授与の要件   | 学 位 規 則 第 4 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    | Matrix vesicles and media vesicles as nonclassical pathways for the secretion of m-calpain from MC3T3-E1 cells<br>(MC3T3-E1細胞より出される m-カルパインの非定型分泌経路としての基質小胞及び培地小胞に関する研究) |
| 論文調査委員    | (主 査)<br>教 授 開 祐 司 教 授 野 田 亮 教 授 中 村 孝 志                                                                                                                                 |

### 論 文 内 容 の 要 旨

カルパインはカルシウム依存性の中性システインプロテアーゼの総称であり、 $\mu$ -カルパインは細胞外に認められることは殆どないが、m-カルパインは細胞外領域、特に骨軟骨領域では肥大軟骨細胞周囲の軟骨基質内や骨折治癒時の細胞外線維組織や仮骨組織にも豊富に存在することが判明した。m-カルパインは、このような細胞外領域では充分活性を持ち得る。しかし、細胞外カルパインの活性は殆ど同定されておらず、又その m-カルパインの由来が細胞破壊によるものなのか能動的分泌なのかは不明である。

この研究では、3種の骨芽様細胞(MC3T3-E1, U2OS, SaOS2)及びHela細胞を用いて培地中及び細胞質中のm-カルパイン量を計測した。各細胞は15,000/cm<sup>2</sup>で培養開始し、コンフルエント前と後で計測した。回収前24時間分の培地及び細胞層を採取した。培地は細胞成分を遠沈させその上清を緩衝液Aと合せてDEAEセファロースカラムにかけて溶離し、その後濃縮して試料とした。細胞層はトリプシナイズして細胞数を数え遠沈後、細胞塊を音波処理し遠沈しその上清を細胞質の試料とした。これらの試料をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に流しウエスタンブロッティングした後、m-カルパイン抗体及びDABを用いて発色させた。細胞質及び培地中のm-カルパインは全て80kDaのバンドとして示され、この濃度をデンスitomーターにて定量化し有意差 $p < 0.05$ で検定した。今回、サブコンフルエント状態では、m-カルパイン量の比(培地中/細胞質中)はMC3T3-E1で有意に高かった。又、細胞破壊の指標となるLDHの量は4者間で大きな相違はなかった。一方コンフルエント状態では、MC3T3-E1のm-カルパイン量の比(培地中/細胞質中)はHelaより有意に高いものの、U2OS, SaOS2より有意に低かった。しかし、後2者の培地中のLDH量は非常に高く、m-カルパイン量の比をLDH量の比(培地中/細胞質中)で割った比は、MC3T3-E1で有意に高値を示した。これにより、MC3T3-E1は他の細胞に比し能動的にm-カルパインを細胞外に放出していることが示された。

さて、能動分泌されるタンパクには、細胞質から小胞体に入るためにシグナルペプチドが必要であるが、m-カルパインにはそれが存在しないものと考えられている。しかし、近年、線維芽細胞成長因子等は、シグナルペプチドが存在せずとも細胞外に選択的に分泌されていることがわかってきた。しかし、その経路は未だ明確ではない。今回、MC3T3-E1の培地中のm-カルパインは、プレフェルディンA等の試薬では阻害されず、非定型的な経路による放出と考えられた。一方、最近、細胞質タンパクの非定型的分泌経路のひとつとして、細胞膜から発芽する形態の小胞の存在が提示されている。興味深いことに、MC3T3-E1も基質小胞や培地小胞を産生することが報告されている。基質小胞は細胞膜の発芽により形成され、石灰化開始時の核として作用するものと考えられ、その中に、ある特定の細胞質タンパクを包含している。培地小胞は細胞培地中に存在する小胞で、極めて基質小胞に類似したものであることがわかっている。この研究では、m-カルパインがMC3T3-E1の産生する基質小胞や培地小胞内に存在することが示され、MC3T3-E1からのm-カルパインの能動的放出の一部はこれらの小胞によるものと考えられた。又、ザイモグラフィにて培地中のm-カルパインは充分な活性を持っていることが証明された。既に、カルパインは骨細胞外基質のプロテオグリカンを分解し得ることが知られており、初

期の石灰化に m-カルパインが寄与していることが想定された。

## 論文審査の結果の要旨

細胞内にのみ存在すると考えられていた m-カルパインが細胞外領域、特に骨軟骨領域では肥大軟骨細胞周囲の軟骨基質内や骨折治癒時の細胞外線維組織や仮骨組織にも豊富に存在することが判明している。本研究では、3種の骨芽様細胞 (MC3T3-E1, U2OS, SaOS2) 及び HeLa 細胞を用いて培地中及び細胞質中の m-カルパイン量をコンフルエント前と後で計測した。両者とも m-カルパイン量の比 (培地中/細胞質中) を LDH 量の比 (培地中/細胞質中) で割った比は、MC3T3-E1 で有意に高値を示した。これにより、MC3T3-E1 は他の細胞に比し能動的に m-カルパインを細胞外に放出していることが示された。しかし、今回、MC3T3-E1 の培地中の m-カルパインは、ブレフェルディン A 等の試薬では制御されず、非定型的な経路による放出と考えられた。一方、最近、細胞質タンパクの非定型的分泌経路のひとつとして、細胞膜から発芽する形態の小胞の存在が提示され、又、MC3T3-E1 も石灰化開始時の核と考えられる基質小胞や培地小胞を産生することが報告されている。本研究でも、MC3T3-E1 からの m-カルパインの能動的放出の一部はこれらの小胞によるものと考えられた。又、ザイモグラフィにて培地中の m-カルパインの活性も証明された。

以上の、研究は、骨石灰化に於けるプロテオグリカンを経路とするカルパインの関与の究明に貢献し、骨疾患治療法の開発に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。なお、本学位授与申請者は、平成14年4月8日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。