

Title	膀胱腫瘍組織中に存在するプラスミノゲンアクチベータ
Author(s)	光林, 茂
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/35879">https://hdl.handle.net/11094/35879</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> をご参照ください。

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名・(本籍)	みつ 光	ばやし 林	しげる 茂
学位の種類	医	学	博 士
学位記番号	第	7953	号
学位授与の日付	昭和63年1月6日		
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当		
学位論文題目	膀胱腫瘍組織中に存在するプラスミノーゲンアクチベータ		
論文審査委員	(主査)		
	教授	園田	孝夫
	(副査)		
	教授	森	武貞 教授 北村 旦

## 論 文 内 容 の 要 旨

### [目 的]

最近血液線溶系の酵素であるプラスミノーゲンアクチベータ(以下PAと略)はウロキナーゼ(以下UKと略)タイプと組織性プラスミノーゲンアクチベータ(以下t-PAと略)に分類されるようになってきた。UKとt-PAは生化学的ならびに免疫学的に異なっているのみならず、生物活性も著明に異なっている。即ちアミノ酸の一次構造を比較すると、Kringleと称される二重反転渦巻構造がUKでは1個しかないが、t-PAでは2個あり、またt-PAにはFinger-domeinと言われる特有の構造がある。これらの構造の違いがt-PAの生物活性の発現に寄与しているものと思われる。

ある種の悪性腫瘍細胞は種々のPAを産生することが知られており、細胞の悪性転化の際にPAの産生が増加すると言われている。しかしPAのタイプと悪性転化の関係は未だ不明の点が多く、本研究はUKおよびt-PAの抗体を用いて、膀胱腫瘍組織中のPAのタイプを同定することを目的とした。

### [方 法]

近畿大学医学部附属病院泌尿器科で膀胱腫瘍の診断下に膀胱全摘術を施行した4例と経尿道的punch biopsyを施行した1例(組織診断は全例移行上皮癌)より肉眼的に明らかな腫瘍組織を採取し、一塊として以下の実験を供した。

#### 1. 組織抽出液の精製

wet weightの10倍量の0.15M KClを加えた後homogenateを作製し、30%硫酸沈殿分画、1N酢酸によるpH5.2におけるeuglobulin fraction、0.01%Tween80を含んだ0.1M Tris-HCl buffer pH7.5を平衡bufferとし、溶出bufferとして平衡bufferに2M KSCNおよび0.4M methyl  $\alpha$ -D-mannop-

yranosideを加えた溶液を用いた concanavalin A-Sepharose affinity chromatography の3段階の操作にて精製した。

## 2. PA活性の測定

fibrinolytic activityはフィブリンプレート法および同法とSDS-PAGEを組み合わせた electrophoretic enzymographyを用いて測定した。後者はゲル上のフィブリン溶解面積をデンストメーターを使用して測定し、UKスタンダードの検量線より換算するもので、測定限界は $10^{-5}$  IU/mlである。amidolytic activityは合成基質S-2288, S-2444を使用し、405nmにおける2-wavelength microplate photometerで吸光度を測定した。

## 3. UKおよびt-PAの精製

高分子UKは市販のUKより benzamidine-Sepharose, IgG-Sepharoseで精製した。t-PAはメラノーマ細胞Bowes株の培養液より concanavalin A-Sepharose, IgG-Sepharoseを用いて精製した。

## 4. 免疫学的検討

マウスで作製した抗t-PA IgG(蛋白濃度2.32mg/ml)および家兎で作製した抗UK IgG(蛋白濃度0.75mg/ml)を使用した。両抗体の稀釈系列と精製したPAを37°Cで30分間反応させ、enzymographyにて分析し、デンストメーターで定量した。

### [成績]

### 1. 膀胱腫瘍組織中のPAの精製

組織抽出液のPA活性は0.0046 IU/mlであり、concanavalin A-Sepharoseの吸着成分には10.8 IU/mlのPA活性を認め、purification factorは80,000であった。

### 2. 同PAの生物学的特徴

本酵素の分子量はenzymographyの解析より55,000であり、plasminogen free fibrinogenを用いたenzymographyではゲルにフィブリン溶解が見られなかったことにより、本酵素はPAであることを確認した。またDFPによりPA活性は消失し、セリンプロテアーゼに属するものと考えられた。

S-2288を用いた各種のPAインヒビターとの反応では、 $IC_{50}$ はBPTI :  $8.2 \times 10^{-4}$  M, benzamidine :  $1.35 \times 10^{-3}$  M, EDTA :  $5.9 \times 10^{-2}$  M, TPCK :  $3.2 \times 10^{-2}$  Mであった。

amidolytic activityの分析結果はS-2444よりS-2288を強く分解した。本実験条件下でUKあるいはt-PAを測定するとUKはS-2288よりもS-2444を強く分解し、t-PAはその逆の反応を示した。したがって合成基質に対する挙動はt-PAタイプの反応であった。

### 3. 同PAの免疫学的特徴

免疫学的検討では抗UK IgGと反応したことよりUKタイプと考えられた。

### [総括]

以上の結果より膀胱腫瘍組織中に存在するPAは分子量55,000の高分子UKと非常に類似したセリン酵素と考えられ、免疫学的にはUKタイプと考えられるものの、合成基質に対する挙動はt-PAタイプの反応を示した。この不一致は膀胱腫瘍が常に尿中に含まれるUKと接触するという特徴の1つの反映かも知れない。また本PAがBPTIおよびbenzamidineによって強く抑制された事実をも考慮する

と、本酵素は既知のPAとは違ったPAである可能性も否定できない。今後個々の患者については膀胱腫瘍の悪性度および浸潤度とPAのタイプ、PA活性の強度の検討が必要と考えられ、非常に小さいサンプルでも測定可能な方法の開発を検討している。

### 論文の審査結果の要旨

手術時に得られた正常膀胱粘膜および膀胱腫瘍組織より、組織抽出液を作製し、30%硫酸分画, euglobulin fraction, Concanavalin A-Sephrose affinity chromatographyにより、extract中のplasminogen activator (PA)を精製した。さらに膀胱腫瘍組織由来培養細胞を樹立し、培地中に分泌されるPAについて検討を加え、膀胱腫瘍は尿中のurokinase (UK)と若干性質を異にするUKを分泌している可能性を明らかにした。今後の尿路粘膜癌の性質を研究する上で価値ある論文である。