The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	担癌・炎症状態におけるマウスシステインプロテアーゼインヒビター／低分子キニノーゲンおよびラットT-キニノーゲンに関する研究
Author(s)	伊藤, 徳夫
Citation	大阪大学, 1992, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3063603
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【 3 】

氏　　名	伊　藤　徳　夫（いとう　のりお）
博士の専攻分野の名称	博　士　（薬　学）
学位記番号	第　10386　号
学位授与年月日	平成4年9月2日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	**担癌・炎症状態におけるマウスシステインプロテアーゼインヒビター／低分子キニノーゲンおよびラットT－キニノーゲンに関する研究**
論文審査委員	（主査）教授　眞弓　忠範 （副査）教授　近藤　雅臣　教授　馬場　明道　教授　三村　務

論文内容の要旨

プロテアーゼは，生体反応の様々な過程に関わっている。癌に関連したプロテアーゼは，その存在そのものが宿主にとって不都合な場合がほとんどであり，炎症反応においては，過剰なプロテアーゼが組織破壊をひきおこし，治癒を遅らせると理解されている。癌や炎症に関わるプロテアーゼの活性調節という視点から見ると，内因性のインヒビターは非常に重要な調節因子としてとらえることができる。従来はセリンプロテアーゼやメタロプロテアーゼが注目されていたため，これらプロテアーゼに対するインヒビターを中心に研究が行われてきた。しかし，近年癌や炎症に対するシステインプロテアーゼの関わりが解明されつつあり，システインプロテアーゼインヒビターも癌や炎症関連のプロテアーゼの制御に深く関わっている可能性が考えられた。

そこで「癌に関連したシステインプロテアーゼ活性の上昇に対する，宿主の生体防御反応としてのインヒビターレベルの増加」という仮説にもとづいて，正常マウス血漿，sarcoma 180担癌マウス血漿および腹水を用いて，システインプロテアーゼであるパパインを阻害する活性を検索・比較したところ，血漿・癌性腹水中にパパイン阻害活性を認めた。この阻害活性は担癌マウス血漿・腹水では正常マウス血漿に対して高値を示した。そこで，この阻害活性の本体の分子を癌性腹水から精製した。精製したインヒビターは，67,000の分子量を示し，パパイン，カテプシンB,Lといったシステインプロテアーゼの活性を阻害したが，他のクラスのプロテアーゼに対しては阻害を示さなかった。ところで，キニン前駆体であるキニノーゲンが，内因性のシステインプロテアーゼインヒビターの一つであることが知られている。そこで，このシステインプロテアーゼインヒビターが，キニノーゲンである可能性について検討した。トリプシンやマウスカリクレインでこのインヒビターを処理するとブラジキニンが遊離された。アミノ末端の40残基，キニン部分を含みカルボキシ末端までの54残基の部分アミノ酸配列を解析すると，マウスシステインプロテアーゼインヒビターは，1次構造上でもキニノーゲンの特徴を示し，他の動物種由来の既知の低分子キニノーゲンやラットのT－キニノーゲンとよく類似していた。分子量，構造，などから判断して，この分子はマウス低分子キニノーゲンであると結論した。以後，この分子をマウスシステインプロテアーゼインヒビター／低分子キニノーゲン（mCPI／LMWK）と称する。mCPI／LMWKの血漿濃度は，癌細胞を移植後腫瘍の増殖にともなって増加が認めら

れ，起炎刺激を与えることによっても上昇した。類似の現象（炎症急性期反応）はラットのシステインプロテアーゼインヒビターであるT-キニノーゲンにおいて明らかにされており，プロテアーゼインヒビターとしての活性，構造上の類似性と合わせて炎症急性期タンパク質としての性格からもT－キニノーゲンとの類似性が認められた。

mCPI／LMWKの担癌あるいは炎症時における生体内濃度の上昇機序については残念ながら不明であるが，起炎刺激による生体内濃度の上昇機序はラットのT-キニノーゲンに関しては以下のように明らかにすることができた。血中キニノーゲンの産生臓器が肝臓であるため，肝臓での産生速度の上昇がその原因であると考えられるが，この現象が起きるためには肝細胞が炎症が起きていることを感知するための機構・系の存在が必要である。そこで，この系に免疫系が介在する可能性について検討した。起炎刺激を行ったラットから得た免疫担当細胞の同系正常ラットへの移入実験，活性化免疫担当細胞と培養肝細胞との同時培養の系により，活性化マクロファージや活性化T細胞からT－キニノーゲン産生を促進する液性因子が産生されることを明らかとした。この因子がサイトカインであると想定し種々検討の結果，インターロイキン(IL)-6とインターフェロン（IFN）αにT-キニノーゲン産生促進活性が存在することを認めた。活性化マクロファージや活性化T細胞が産生する促進活性が上記サイトカインで説明できるか否かを調べた結果，T細胞からはIL-6が分泌され，一方，マクロファージからはIL-6，IFN α両者が分泌され，肝細胞のT-キニノーゲン産生を刺激することを明らかとした。

さて，担癌状態あるいは炎症状態においてシステインプロテアーゼインヒビターであるキニノーゲン類の生体内濃度が増加することに，どのような意義があるのであろうか。プロテアーゼインヒビターの産生を生体防御反応としてとらえる立場から，細胞の増殖に対するキニノーゲンの影響について検討すると，mCPI／LMWKはその生体内濃度においてsarcoma 180細胞，SV40-30T3細胞等の増殖を濃度依存的に抑制し，マウス胎児細胞の増殖を促進した。癌細胞移植によるmCPI／LMWKレベルの上昇の意義について考えるとき，非常に興味ある結果が得られた。同様な活性がT-キニノーゲンのみならず，代表的なシステインプロテアーゼインヒビターである卵白シスタチンにも認められたため，キニノーゲンの細胞増殖調節活性は，システインプロテアーゼインヒビターとしての性質にもとづくと考えられた。さらに，mCPI／LMWKの細胞増殖抑制機序が，細胞周期のG1期からS期への移行抑制であることを明らかとした。細胞周期のＧ１期からＳ期への移行に必要なシステインプロテアーゼが存在し，この分子がmCPI／LMWKの標的分子となっている可能性が考えられた。

以上，担癌・炎症状態におけるシステインプロテアーゼインヒビターならびにキニノーゲンに関する研究の結果，キニノーゲンは癌・免疫・細胞増殖との密接な関わりを持ち，生体防御機構の一部を構成している分子であると考えられた。

論文審査の結果の要旨

プロテアーゼは炎症反応，マクロファージなどによる異物処理，癌の増殖，浸潤，転移など，生体反応の様々な過程に関わっている。従って，癌や炎症に関わるプロテアーゼの活性調節という視点からみると，内因性のプロテアーゼインヒビターは非常に重要な調節因子としてとらえることが出来る。一方，キニノーゲンはキニンの前駆体蛋白としてキニン類を遊離するだけでなく，システインプロテアーゼインヒビターの機能と構造を併せ有している。本論文は，癌細胞の増殖・転移や炎症の進行に対してプロテアーゼは促進的に機能しており，これに対抗・調節するための生体防御反応として，プロテアーゼインヒビターが産生され，機能していることを明らかにしようとしたものである。

その結果，マウス血漿および癌性腹水中には，システインプロテアーゼインヒビターが存在し，この分子はマウスの低分子キニノーゲンであることを初めて証明すると共に，癌や炎症の進行にともなって，本低分子キニノーゲンの血漿中濃度が増加することを認めた。さらに，ラットＴ－キニノーゲンの血漿中濃度も起炎刺激によって上昇するが，この現象は，免疫担当細胞由来のIL-6,IFN α を情報伝達液性因子・エフェクター分子とした肝細胞におけるT-キニノーゲン合成速度の上昇であることを明らかにした。また，低分子キニノーゲンおよびラットT-キニノーゲンはsa-

rcoma180, SV40-3T3細胞などの増殖抑制活性を有しており，抑制機序は細胞周期のG1期からS期への移行を抑制することにもとづいている事などを明かにした。

以上の成果は，マウス低分子キニノーゲンの証明と共に，プロテアーゼインヒビターであるキニノーゲンが，癌・免疫・細胞増殖と密接な関わりを持ち，生体防御機構の一部を担っていることを明かにしたものであり，博士（薬学）の学位を授与するにふさわしいと考える。