

Title	Inhibitory Effect of a Synthetic Protease Inhibitor (Gabexate Mesilate) on the Respiratory Burst Oxidase in Human Neutrophils
Author(s)	大橋, 一朗
Citation	大阪大学, 1996, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/40457">https://hdl.handle.net/11094/40457</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">〈a href="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">〈/a〉</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	おお 大 はし 橋 いち 一 ろう 朗
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 2 6 5 1 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 8 年 7 月 8 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	Inhibitory Effect of a Synthetic Protease Inhibitor (Gabexate Mesilate) on the Respiratory Burst Oxidase in Human Neutrophils (合成プロテアーゼインヒビター (メシル酸ガベキセート) の好中球 NADPH oxidase に対する抑制効果)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 門 田 守 人 (副査) 教 授 松 田 暉 教 授 木 下 タ ロ ウ

## 論 文 内 容 の 要 旨

### [目 的]

好中球 NADPH oxidase は細胞質因子と膜因子で構成され、好中球が刺激されると細胞質因子は膜へ移行して活性型 NADPH oxidase 複合体を形成し、NADPH 存在下に  $O_2^-$  を産生する。このようにして産生された  $O_2^-$  が臓器障害の病態に関与しており、その産生の制御は治療的意義を有していると考えられる。教室では一部の protease inhibitor に好中球からのフリーラジカル産生抑制作用があることを明らかにしてきた。本研究は、protease inhibitor の 1 つであるメシル産ガベキセート (GM) を用いて、NADPH oxidase 抑制機序を明らかにしようとしたものである。

### [方法ならびに成績]

- 1) 健常ヒト末梢血より分離した好中球を phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) にて刺激し、 $O_2^-$  産生量をチトクローム C 法により測定した。この系に GM を添加し、 $O_2^-$  産生への効果を検討した。GM は濃度依存性に  $O_2^-$  産生を減少させ、 $IC_{50}$ =約 3 mM であった。
- 2) この効果が GM による産生抑制あるいは除去作用亢進によるかを検討するため、ピロガロールの  $O_2^-$  による自動酸化に及ぼす GM の影響を吸光度計にて測定した。ピロガロールは水溶液中で酸素に電子を与えて  $O_2^-$  にかえるのみならず、ピロガロール自体が自動酸化によりピロガロールアニオンやその中間産物を形成する。存在する物質に  $O_2^-$  除去作用がある場合、 $O_2^-$  によるピロガロールアニオンあるいは中間産物の生成が低下し、吸光度は低下する。GM は濃度依存性に  $O_2^-$  を除去したが、その作用は軽微で、 $O_2^-$  産生抑制作用は除去作用亢進によるものではないことが判明した。
- 3) 好中球を diisopropylfluorophosphate (DFP) 処理後、 $N_2$ -cavitation にて細胞破壊し、低・中・高速遠心後、膜分画、細胞質分画を得た。GM 存在下に膜分画、細胞質分画を含む反応液中にアラキドン酸を添加し incubation 後、NADPH を加え、 $O_2^-$  産生量をチトクローム C 法により測定した。GM は濃度依存性に cell-free assay でも  $O_2^-$  産生を抑制し、 $IC_{50}$ =約 250  $\mu$ M であった。
- 4) DFP 処理好中球に GM 存在下、非存在下に incubation 後、PMA を用いて刺激し、上記方法にて細胞破壊・分画

し、得た膜分画を電気泳動した。

- 5) GM 存在下に細胞質分画、膜分画を含む反応液を室温で incubation 後、アラキドン酸にて刺激し、細胞質因子を膜分画へ移行させた後、再度高速遠心して得た膜分画を電気泳動した。
- 6) 4), 5)の電気泳動後、NADPH oxidase の細胞質因子である47-kDa 蛋白に対する抗体を用いて、Western-blotting を施行した。GM は PMA 刺激好中球あるいは cell-free assay での NADPH oxidase の細胞質因子 (47-kDa, 65-kDa 蛋白) の膜分画移行を抑制した。

[総括]

- 1) GM は濃度依存性に PMA 刺激好中球の  $O_2^-$  産生を抑制した。また、cell-free assay でも  $O_2^-$  産生を抑制した。
- 2) GM は濃度依存性に  $O_2^-$  を除去したが、その作用は軽微であった。
- 3) GM は PMA 刺激好中球あるいは cell-free assay での NADPH oxidase の細胞質因子 (47-kDa, 65-kDa 蛋白) の膜分画移行を抑制した。

以上より、GM は47-kDa, 65-kDa 蛋白の膜分画移行を抑制することで好中球からの  $O_2^-$  産生を抑制する機序が明らかにされた。GM は好中球からの  $O_2^-$  産生を抑制することで  $\alpha_1$ -プロテアーゼインヒビターや  $\alpha_2$ -マクログロブリンなどの酸化され失活しやすい内因性のプロテアーゼインヒビターをフリーラジカルから保護し、好中球の産生する  $O_2^-$  による組織傷害を予防する可能性が示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

生体内で産生される活性酸素が種々病態の原因となっていることが明らかとなっている。本研究はプロテアーゼインヒビターの1つである gabexate mesilate によるヒト好中球の  $O_2^-$  産生抑制効果、並びにその抑制機序を解析したものである。Gabexate mesilate は好中球からの  $O_2^-$  産生を cellular と同時に subcellular レベルで抑制した。この作用はスカンベンジャー作用の増強ではなく gabexate mesilate の NADPH oxidase 抑制を介して  $O_2^-$  産生を抑制していることが明らかとなった。そのメカニズムとして gabexate mesilate が NADPH oxidase の細胞質因子である47-kDa, 65-kDa 蛋白質の形質細胞膜への移行を抑制する可能性が示された。

以上、本研究は gabexate mesilate が好中球から産生される  $O_2^-$  で進行する MOF などの病態の治療に臨床上有用であることを示したもので、学位に値すると思われる。