

厚生省
新薬開発研究費

低分子酵素阻害物質による
難病治療薬の開発研究

江 橋 班

昭和63年度研究報告書

平成元年 3 月

研究報告書の作成にあたって

病気の治療は必ずしも病因の究明を必要としない。猛威をふるった結核の克服は、結核病理の解明とは全く無縁のところで行われた。勿論この場合は外因的疾患であり、論理的にも充分予想し得た筈である。では遺伝子疾患のような内因性疾患においては、事態はどのように展開してゆくのであろうか。

分子遺伝学的アプローチがデュシェンヌ型筋ジストロフィー病因の解明に突破口を開くであろうことは、万人の予測したことであった。この期待は、ボストンの Kunkel 教授らによって見事に現実化され、我が国を初めとする世界各国の研究者がこれに続き、目を見張るような成果が次々と生まれつつある。

しかし、研究の進展とともに、その自然発生率（変異率）が異常に高いことから予想されるように、筋ジストロフィー成立の遺伝子的要因は、まことに奥深い複雑さを持つことが明らかになりつつある。このことは、分子遺伝学的な成果を治療と直結させるためには、従来にも増した叡智と努力を必要とすることを意味する。

この様な情勢を考えると、本研究班の意図する対症的治療法の意義は、現時点において寧ろ高まってきたというべきであろう。つまり、分子遺伝学的アプローチから得られる情報を臨床症状と対比することにより、病態の立体的把握が可能となり、より具体的な指針を設定することが可能となったからである。

本研究班は、従来から手がけてきた薬物の臨床的応用に結論を下すべく努力を重ねてきたが、本年度は新しい薬物の開発にも意を注ぎ、見るべき成果を取めた。この両方のアプローチを車の両輪として、今後とも筋ジストロフィー症治療法の開発とその確立に向け、一步一步前進してゆきたい。

平成元年3月

主任研究者 江橋節郎

目 次

I. 分担研究報告	
1) 筋ジスマウスの前肢, 後肢筋におけるプロテアーゼ変化の相違点..... 3	微生物化学研究所 青柳 高明 和田 孝雄 小島 路子 永井真知子 原田 滋子
2) mdx マウス骨格筋中で活性化するアルカリ・プロテアーゼの精製と性質 9	和歌山県立医科大学第二生理学教室 辻 繁勝 楠本 茂夫 東京工業大学理学部生命理学科 沢田 均
3) 実験的筋炎モデル動物の作製に関する研究15	—自己免疫筋抗原の筋組織内分布と精製の試み— 国立精神・神経センター神経研究所 里吉栄二郎 古川 昭栄 新井左衛子 加茂 功
4) 1. ベスタチンの筋細胞膜安定化作用に関する実験的研究19	
2. ベスタチン二重盲検試験進捗状況22	東邦大学医学部大橋病院第四内科 岸 雅彦 木下 眞男 栗原 照幸 日高 隆信 池田 憲 高宮 清之
5) 蛋白分解酵素の役割とその阻害剤に関する研究23	(勸)大阪基礎医学研究奨励会 藤井 節郎 日坂 哲彦 山田晴雄
6) CANP 阻害剤の合成27	東京理科大学理学部 向山 光昭 植木 正彬 大正製薬株式会社総合研究所 大関 正弘 花田 和紀 横尾 千尋 岡崎 忠靖 村田 充男 徳島大学酵素科学研究センター 勝沼 信彦
7) 筋ジスハムスターにおける CANP インヒビターの分解33	東京都老人研究所 川島 誠一 林 昌美 中村 愛
8) CANP 遺伝子のクローニングに関する研究35	—CANP インヒビターの阻害機構と阻害部位— 東京都臨床医学総合研究所 鈴木 紘一 川崎 博史 榎森 康文 西道 隆臣 反町 洋之
9) MEL 細胞骨格タンパク質に対する CANP インヒビターの影響39	国立精神・神経センター神経研究所 杉田 秀夫 石浦 章一 塚原 俊文

10) Recombinant Cystatin 類の治療薬としての開発に関する基礎研究	43
徳島大学酵素科学センター酵素化学部門 勝沼 信彦 唐渡 孝枝 二川 健	
三井東圧化学株式会社ライフサイエンス研究所 池 祥雅	
11) E-64-c および EST の薬物動態	47
—蛍光 HPLC によるモニター法の開発—	
九州大学薬学部 大倉 洋甫 巢 文峰 甲斐 雅亮	
12) 哺乳類横紋筋 C-タンパク質アイソフォーム： 二次元電気泳動法とイムノプロット法による解析	53
千葉大学理学部生物学科 丸山 工作 大日方 昂 小島 崇	
新保 和彦	
13) CANP 阻害剤の一般薬理学的研究	59
—神経活動および筋電図の周波数分析に基づく呼吸筋機能評価法に関する基礎的研究—	
東京慈恵会医科大学第二薬理学教室 福原 武彦 高野 一夫 木村 直史	
加藤 総夫	
14) 骨格筋ミオシン軽鎖のラジオイムノアッセイによる測定法の開発	65
東京大学医学部第三内科 矢崎 義雄 永井 良三 磯部 光章	
加藤 祐之	
国立精神・神経センター神経研究所 杉田 秀夫	
15) Duchenne 型進行性筋ジストロフィー症における筋障害の進行過程	67
—CT スキャンによる定量的評価—	
国立療養所東埼玉病院内科 石原 傳幸 青柳 昭雄 儀武 三郎	
川村 潤 横田 名慈	
国立療養所東埼玉病院リハビリテーション科 里宇 明元 園田 茂 原 行弘	
16) 正常幼児の運動機能について	73
東京女子医科大学小児科 福山 幸夫 大沢真木子 斎藤加代子	
新井 ゆみ 炭田 沢子 岡田 典子	
鈴木 暁子 宍倉 啓子 平山 義人	
17) 筋ジストロフィー症患者の理学的評価法の再検討	79
東京大学医学部脳研病理 中野 今治	
国立精神・神経センター神経研究所 杉田 秀夫	
国立療養所東埼玉病院 石原 傳幸 熊井 初穂	
国立療養所下志津病院 藤井 則子 土佐 千秋 石原 真弓	
松村喜一郎	
新潟大学脳研究所神経内科 桑原 武夫	
国立療養所新潟病院 近藤 隆春 水野 京子 山崎 元義	
国立療養所医王病院 崎田 朝保 本家 一也 武田 洋子	
国立療養所南九州病院 幸福 圭子 福永 秀敏	

18) Duchenne 型進行性筋ジストロフィー症の臨床的検討： ……………	85
EST 投与群 5 年目の経過と EST 二重盲検試験の発	
新潟大学脳研究所神経内科 宮武 正 桑原 武夫 湯浅 龍彦	
国立療養所新潟病院 山崎 元義 近藤 隆春	
19) ベスタチン投与剤における筋疾患マーカーの変動について ……………	89
国立療養所宇多野病院 西谷 裕 板垣 泰子 太田 光昭	
20) ベスタチンの血清 LAP に及ぼす影響 ……………	93
国立療養所兵庫中央病院 高橋 桂一 梅枝 孝之 益田 喜信	
森鼻 文朗 小林 浩子	
21) ベスタチンの長期投与について ……………	97
国立療養所箱根病院 村上 慶郎 岡崎 隆 林 英人	
梁 正淵	
22) ベスタチン服薬および非服薬 DMD 患者における T 波の検討 ……………	103
国立療養所西別府病院 三吉野産治 江田伊勢松	
II. 低分子酵素阻害物質による難病治療薬の開発研究班分担研究者一覧 ……………	109

分担研究報告

筋ジスマウスの前肢、後肢筋におけるプロテアーゼ変化の相違点

青柳高明*

研究協力者 和田孝雄* 小島露子*
永井真知子* 原田滋子*

はじめに

筋ジストロフィー症の発症ならびに進展の機序に、プロテアーゼの異常による筋蛋白崩壊が重要な役割を演じていることが可成り明らかになり、各種プロテアーゼ阻害物質を治療に用いる試みが、多くの研究者によって報告されている。筆者らは筋ジスマウスの前肢筋および後肢筋のアミノペプチダーゼが有意に増加すること¹⁻³⁾、さらに患者血清中のアミノペプチダーゼとエンドペプチダーゼが発病機序に異なる役割を果していることを示唆した⁴⁾。

今回の研究では筋ジスマウスの前肢筋および後肢筋中のプロテアーゼ活性の動態を経時的に追究した。また、エンドペプチダーゼに属する各酵素に対しては基質特異性の高い合成基質を用い、さらに標的酵素の特異性を高めるため、低分子酵素阻害物質の添加効果についても述べる。

実験動物

筋ジスマウス (C 57 BL/6 J^{dy/dy}) および対照マウス (C 57 BL/6 J^{dy/+ and +/+}) は実験動物中央研究所より購入した。実験動物は生後1週から11週まで、各週ごとに1匹宛屠殺したのち、直ちに前肢筋、後肢筋、心、脾、肝、腎を摘出し、-70°Cで保存した。臓器は10倍量のphosphate buffered saline (PBS) の中で、組織ホモジナイザー (Ultatrrax) を用いて1分間ホモジナイズした。酵素活性の測定には、組織ホモ

ジェネートの3,000 xg, 20分間の遠心上清を用いた。

基質

酵素活性測定用の基質ならびに略語は下記に示す。

Glu · NA, L-glutamic acid β -naphthylamide hydrochloride ; Arg · NA, L-arginine β -naphthylamide hydrochloride ; Pro · NA, L-proline β -naphthylamide hydrochloride ; Gly - Arg · NA, glycyl - L - arginine β - naphthylamide ; Lys-Ala · NA, L-lysyl-L-alanine β -naphthylamide ; Lys-Ala · NA, L-lysyl-L-alanine β -naphthylamide ; Arg-Arg · NA, L-arginyl-L-arginine β -naphthylamide ; Gly-Pro · NA, glycyl-L-proline β -naphthylamide ; Z-Arg-Arg · NA, N-cbz-L-arginyl-L-arginine β -naphthylamide ; Z-Gly-Pro · NA, N-cbz-glycyl-L-proline β -naphthylamide ; Boc-Val-Leu-Lys · MCA, t-butylloxycarbonyl-L-valyl-L-leucyl-L-lysine 4-methyl-7-coumarylamide ; Pro-Phe-Arg · MCA, L-prolyl-L-phenylalanyl-L-arginine 4-methyl-7-coumarylamide ; Boc-Gln-Ala-Arg · MCA, t-butylloxycarbonyl-L-glutamyl-L-alanyl-L-arginine 4-methyl-7-coumarylamide ; Suc-Leu-Leu-Val-Tyr · MCA, succinyl-L-leucyl-L-leucyl-L-valyl-L-tyrosin 4-methyl-7-coumarylamide ; Suc-Ala-Pro-Ala · MCA, succinyl-L-alanyl-L-prolyl-L-alanine 4-methyl-7-coumarylamide ; Boc-Val-Pro-Arg · MCA, t-

*微生物化学研究所

butyloxycarbonyl-L-valyl-L-prolyl-L-arginine 4-methyl-7-coumarylamide.

緩衝液

酵素活性測定用の緩衝液は 0.02 M PBS (pH 7.2) を用いた。ただし、Post-Pro-Enz の測定には 0.2 M Tris-HCl buffer (pH 7.8) を用いた。

酵素活性の測定

ホモジネートの遠心上清画分は、それぞれの基質溶液および緩衝液を含む反応試験管(1.5×10 cm)に分注し、37°C で 1 時間の反応を行った。Post-Pro-Enz については、前述の緩衝液を用いて測定した。すべての酵素活性の測定には 3 本の試験管を用い、その平均値を記載した。各酵素活性の測定法および基質は表 1 に示す。

蛋白の測定

標準蛋白としてウシ血清アルブミンを用い、Lowry 法¹⁷⁾ で測定した。

酵素阻害物質

ベスタチン[(2S,3R)-3-amino-2-hydroxy-4-phenylbutanoyl-(S)-leucine]はAP-B, Leu-AP, tri- and tetra-aminopeptidase などを阻害する。

統計

多変量解析の一手法である主成分分析法¹⁸⁾を用いて解析した。

結果および考察

前肢筋および後肢筋の酵素活性を筋ジスマウスと対照マウスで比較した結果、筋ジスマウスにおいてはアミノペプチダーゼが有意に増加することを認めた。筋ジストロフィー症において、アミノペプチダーゼの役割が重要であることを指摘^{1),19),20)}した。さらに患者血清において、アミノペプチダーゼ活性の動態は罹病期間と逆相関であったが、エンドペプチダーゼ活性は順相関であった。疾病機序にエキソペプチダーゼとエンドペプチダーゼが異なる役割を果していることを示唆した⁴⁾。

今回は筋ジスマウスの前肢筋および後肢筋内のプロテアーゼの動態をアミノペプチダーゼ(7種類)とエンドペプチダーゼ(8種類)について経時的に検討した。特に、エンドペプチダーゼに属する各酵素に対しては特異的な合成基質を用い、さらに標的酵素の特異性を高めるため、低分子酵素阻害物質の添加効果を調べ、それぞれの反応系を確立した。

図 1 にカリクレイン活性測定におけるベスタチン添加の効果を示す。左図はカリクレイン蛋白量の変化を経時的に調べた。右図はカリクレイン(40.76 μg)を用い、同時に各種濃度のベスタチン添加時の分解曲線の変化を示す。ベスタチンは 200 μg 以上に加えても基質分解の低下はみられず、直線的分解を示した。カリクレ

表 1 List of the proteases measured and their substrates

Enzyme	Abbreviation	Substrate	Reference for assay method
Aspartate aminopeptidase (EC3.4.11.7)	AP-A	Glu-NA	1
Arginine aminopeptidase (EC3.4.11.6)	AP-B	Arg-NA	1
Proline iminopeptidase (EC3.4.11.5)	Pro-IP	Pro-NA	5
Dipeptidyl aminopeptidase I (EC3.4.14.1)	DAP-I	Gly-Arg-NA	6
Dipeptidyl aminopeptidase II (EC3.4.14.2)	DAP-II	Lys-Ala-NA	7
Dipeptidyl aminopeptidase III (EC3.4.14.4)	DAP-III	Arg-Arg-NA	8
Dipeptidyl aminopeptidase IV (EC3.4.11.5)	DAP-IV	Gly-Pro-NA	9
Cathepsin B (EC3.4.22.1)	Cathepsin B	Z-Arg-Arg-NA	10
Prolyl endopeptidase (EC3.4.21.26)	Post-Pro-Enz	Z-Gly-Pro-NA	5
Plasmin (EC3.4.21.7)	Plasmin	Boc-Val-Leu-Lys-MCA	11
Tissue kallikrein (EC3.4.21.35)	Kallikrein	Pro-Phe-Arg-MCA	12
Trypsin (EC3.4.21.4)	Trypsin	Boc-Gln-Ala-Arg-MCA	13
Chymotrypsin (EC3.4.21.1)	Chy-try	Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA	14
Leukocyte elastase (EC3.4.21.37)	Elastase	Suc-Ala-Pro-Ala-MCA	15
α-Thrombin (EC3.4.21.5)	Thrombin	Boc-Val-Pro-Arg-MCA	16

Z: carbobenzyoxy, Boc: t-butyloxycarbonyl, Suc: succinyl

筋ジスマウスの前肢、後肢筋におけるプロテアーゼ変化の相違点

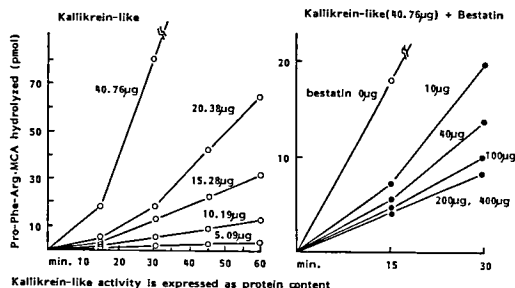


図1 Effect of bestatin on Kallikrein-like activity

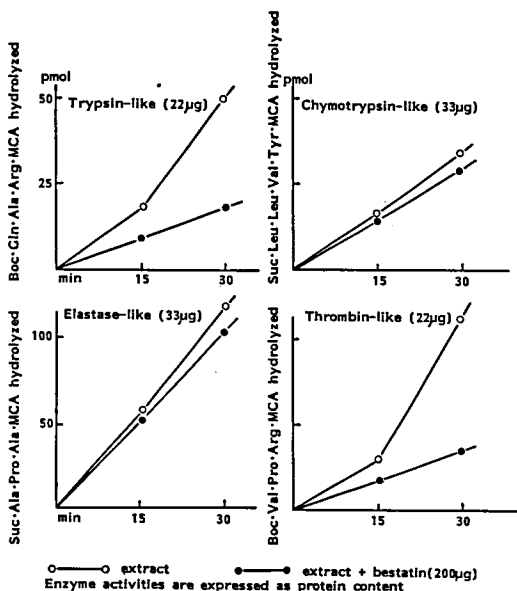


図2 Effect of bestatin on various protease activities

表2 Protease changes in forelimb and hindlimb muscles of control and dystrophic mice

Enzyme	Specific activity (nmol/min/mg protein):SD n=11			
	Forelimb		Hindlimb	
	Control	Dystrophy	Control	Dystrophy
AP-A	0.538±0.095	0.917±0.323**	0.521±0.243	0.992±0.228**
AP-B	7.066±1.028	7.555±1.283	7.718±2.642	7.830±2.042
Pro-IP	1.001±0.375	1.111±0.659	1.405±0.741	1.272±0.546
DAP-I	0.077±0.075	0.694±0.413***	0.164±0.183	0.705±0.807*
DAP-II	4.384±1.259	8.305±1.712***	4.322±1.143	6.385±3.801
DAP-III	1.555±0.727	2.285±0.810*	1.812±0.877	1.377±0.394
DAP-IV	0.627±0.306	0.934±0.341*	0.769±0.473	0.836±0.341
Cathepsin B	3.099±2.066	15.776±6.236***	2.540±1.812	13.226±12.087**
Post-Pro-Enz	2.631±0.714	3.934±0.541***	2.954±1.593	3.018±0.969
Plasmin	0.036±0.010	0.102±0.034***	0.030±0.016	0.071±0.023***
Kallikrein	0.028±0.013	0.060±0.055	0.021±0.009	0.031±0.015
Trypsin	0.058±0.039	0.094±0.047	0.035±0.033	0.063±0.046
Chymotrypsin	0.030±0.015	0.041±0.009*	0.026±0.012	0.033±0.015
Elastase	0.032±0.008	0.069±0.025***	0.058±0.013	0.073±0.027
Thrombin	0.083±0.048	0.170±0.081**	0.044±0.044	0.107±0.070*

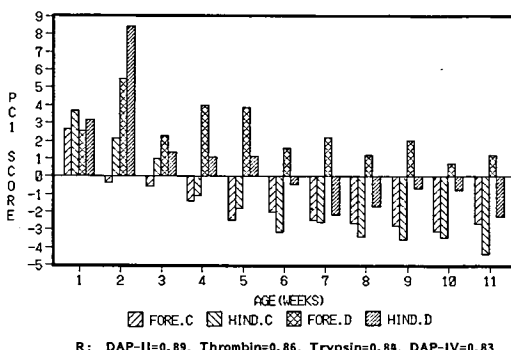
*: P<0.05, **: P<0.01, ***: P<0.001

インの基質である Pro-Phe-Arg-MCA はカリクレイン以外のベスタチンで抑制を受ける酵素により分解を受ける。それ故、カリクレイン活性の測定には 200 µg のベスタチンを加えて行なった。

図2にはトリプシン、キモトリプシン、エラスターゼ、トロンビンの分解曲線ならびにベスタチン (200 µg) 添加時の分解曲線を示す。何れの酵素もベスタチン添加による影響を受けるが、特にトリプシン、トロンビンにおいて顕著である。エンドペプチダーゼに対する合成基質は特定酵素以外の影響を受け易い。それ故、特定酵素を阻害しない阻害物質を加えることが必要である。

上述した結果に基づき、前肢筋および後肢筋におけるプロテアーゼ活性を筋ジスマウスと対照マウスとの間で比較した結果を表2に示す。前肢筋についてみると、AP-A, DAP-I, II, IIIとIV, カテプシン B, Post-Pro-Enz, プラスミン, キモトリプシン, エラスターゼ, トロンビンなどが筋ジスマウスで有意に上昇している。また後肢筋については、AP-A, DAP-I, カテプシン B, プラスミン, トロンビンなどが筋ジスマウスで有意に上昇していることが認められた。

これらの各酵素活性の変化を一括して論じるために多変量解析の一手法である主成分分析法を用いて解析を行った。第1主成分についての



R: DAP-II=0.89, Thrombin=0.86, Trypsin=0.84, DAP-IV=0.83

図3 Age related changes in muscular enzymes in dystrophic mice

因子得点の週齢による変化を図3に示す。対照マウスにおけるスコアは前肢筋および後肢筋をとわず、週齢にともなって低下する。一方、筋ジスマウスでは第2週に1度上昇したのち低下する。特に後肢筋において顕著であった。しかし、前肢筋では一旦上昇してからの低下度が少なく、常に後肢筋より高いスコアを示すことが認められた。前肢筋の主な酵素の活性は後肢筋より高いといえる。第1主成分と各種酵素との相関係数はDAP-II ($\gamma=0.89$)、トロンピン ($\gamma=0.86$)、トリプシン ($\gamma=0.84$)、DAP-IV ($\gamma=0.83$) などが高い相関を示した。

この現象は、筋肉の萎縮がもっぱら後肢に起こることから一見パラドキシカルである。発病機序とこの現象との関係を考えてみるに、プロテアーゼがこの疾病の主な原因とはいわないが、少くとも増悪因子に関与していることが示唆される。対照マウスの週齢にともなう変化を正常と考え、筋ジスマウスではこれらの酵素活性は生まれた時から上昇している。さらに、もう1つの因子が加わると、プロテアーゼが筋蛋白に作用し、萎縮を起すのではないかと思われる。しかし、一度萎縮が起ると、その筋肉細胞の萎縮のために細胞内の酵素活性そのものも低下してしまうと考える。

ま と め

筋ジスマウスの前肢筋および後肢筋における15種類のプロテアーゼの動態を経時的に調べた。エンドペプチダーゼに属する各酵素活性については基質特異性の高い合成基質を用いた。さらに、上記の各酵素を阻害しないベスタチンなどを添加することにより、標的酵素の特異性を高めた。筋ジスマウスでは前肢筋、後肢筋とも対照に比べ、各種のプロテアーゼ活性が有意に増加することを認めた。主成分分析による解析では、DAP-II、トロンピン、トリプシン、DAP-IVと関係の強い成分が前肢筋と後肢筋との間で分離することを認めた。これらのプロテアーゼと筋萎縮との関連性を究明し、難病解決の緒

口としたい。

文 献

- 1) Aoyagi, T., Wada, T., Kojima, F., Nagai, M. and Umezawa, I.: *J. Clin. Invest.*, 67: 51-59, 1981.
- 2) Aoyagi, T., Tobe, H., Kojima, F., Hamada, M., Takeuchi, T. and Umezawa, H.: *J. Antibiot.*, 31: 636-638, 1978.
- 3) Umezawa, H., Aoyagi, T., Suda, H., Hamada, M. and Takeuchi, T.: *J. Antibiot.*, 29: 97-99, 1976.
- 4) Aoyagi, T., Wada, T., Kojima, F., Nagai, M., Miyoshino, S. and Umezawa, H.: *Clin. Chim. Acta.*, 129: 165-173, 1983.
- 5) Aoyagi, T., Wada, T., Kojima, F., Nagai, M., Okubo, M., Masaki, Y. and Umezawa, H.: *J. Appl. Biochem.*, 7: 273-281, 1985.
- 6) McDonald, J.K. and Schwabe, C.: In *proteinases in mammalian cells and tissues* (ed. by Barrett, A.J.) Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, p.p. 314-322, 1977.
- 7) McDonald, J.K., Leibach, F.H., Grindeland, R.E. and Ellis, S.: *J. Biol. Chem.*, 243: 4143-4150, 1968.
- 8) Ellis, S. and Nuenke, J.M.: *J. Biol. Chem.*, 242: 4623-4620, 1967.
- 9) Aoyagi, T., Wada, T., Kojima, F., Nagai, M., Osanai, M., Imahori, K. and Umezawa, H.: *Biotech. Appl. Biochem.*, 8: 23-31, 1986.
- 10) Barrett, A.J. and Kirschke, H.: In *methods in enzymology* (ed. by Lorand, L.) Academic press, New York, p.p. 535-561, 1981.
- 11) Kato, H., Adachi, N., Ohno, Y., Iwanaga, S., Takada, K. and Sakakibara, S.: *J. Biochem.*, 88: 183-190, 1980.

- 12) Nagase, H. and Barrett, A. : *Biochem. J.*, 193 : 187-192, 1981.
- 13) Kawabata, S., Miura, T., Morita, T., Kato, H., Fujikawa, K., Iwanaga, S., Takada, K., Kimura, T. and Sakakibara, S. : *Eur. J. Biochem.*, 172 : 17-25, 1988.
- 14) Sawada, H., Yokosawa, H., Hoshi, M. and Ishii, S. : *Experientia*, 39 : 377-378, 1983.
- 15) Mumford, R.A., Strauss, A.W., Powers, J.C., Pierzchala, P.A., Nishino, N. and Zimmerman M. : *J. Biol. Chem.*, 255 : 2227-2230, 1980.
- 16) Lottenberg, R., Christensen, U., Jackson, C.M. and Coleman, P.L. : In *methods in enzymology* (ed. by Lorand, L.) Academic Press, New York, Vol. 80. p.p. 341-361, 1981.
- 17) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. : *J. Biol. Chem.*, 193 : 265-275, 1951.
- 18) Kendall, M. : In *multivariate analysis*, Charles Griffin and Co., London, p.p. 13-29, 1975.
- 19) Wada, T., Kojima, F., Nagai, M., Aoyagi, T. and Umezawa, H. : *J. Pharm. Dyn.*, 4 : 184-190, 1981.
- 20) Aoyagi, T., Wada, T., Yamamoto, K., Kojima, F., Nagai, M. and Umezawa, H. : *J. Pharm. Dyn.*, 7 : 312-321, 1984.

mdx マウス骨格筋中で活性変化する アルカリ・プロテアーゼの精製と性質

辻 繁 勝*

研究協力者 楠 本 茂 夫* 沢 田 均**

はじめに

進行性筋ジストロフィー症の骨格筋では症状の進行に伴って種々のプロテアーゼ活性が上昇することが知られている。しかし、それぞれのプロテアーゼがどのような形で疾病に関係しているかについては不明な点が多い。これらプロテアーゼ活性の中には症状の進行をプロモートするものもあり、あるいは発病に直接関与する活性増加もあり、疾病の発現に係わる機序は、かならずしも一様ではないと考えられる。我々はヒト DMD の疾患モデル動物である mdx マウスを用いて活性上昇を示す幾つかのプロテアーゼについて酵素蛋白の精製および性質の検索を行ない、それら酵素の筋ジストロフィー症発病に関与する機序を探ると同時に、種々の酵素阻害物質を投与した際の治療効果のマーカーとして有用であるかどうかの検討を行っている。

実験方法

使用動物

C57 BL/10-mdx マウスおよびその正常対照の C57 BL/10 系マウスを実験に使用した。

酵素の精製

今回は2つのプロテアーゼ活性について酵素蛋白の精製を行なった。いずれもアルカリ側に至適 pH 域のある酵素で、1つは発症前の10日齢頃に活性のピークが現れるもので、ミクロソーム画分中に活性が認められ¹⁾、他は症状の進行に伴い4ヶ月齢頃に活性のピークに達するも

ので、粗ミトコンドリア画分中に存在する。前者は20日齢の mdx マウス後肢筋を 0.32 M 蔗糖液 (pH 7.4) 中でホモジナイズし、14,000 g、30 分間の遠心上清を分離し、更に 100,000 g、90 分遠心分離して得られた沈澱をミクロソーム画分とした。ミクロソーム画分は更に 0.1% Brji 35 を含む 1 MKCl 液 (pH 8.0) で抽出し、DEAE・セファロース、ヘパリン・セファロース、アプロチニン・セファロースの順序でカラムクロマトグラフィーを行ない酵素精製を行なった。後者は4ヶ月齢の mdx マウス後肢筋を同様にホモジナイズし、14,000 g、30 分遠心分離後の沈澱を粗ミトコンドリア画分とした。粗ミトコンドリア画分は更に 1.5 M NaCl 液 (pH 10.0) で抽出し、フェニール・セファロース、LBTI セファロースの順にカラムクロマトグラフィーを行ない酵素の精製を行なった。

酵素活性測定

プロテアーゼ活性の測定はミクロソーム酵素の場合は 10 μ M、Boc-Val-Pro-Arg-MCA を基質とし、pH 8.5、37°C、1 時間反応後に遊離した AMC を蛍光測定して求めた。一方粗ミトコンドリア画分の酵素活性は FITC-カゼインを基質とする方法と、5 μ M の Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA を基質とする方法の両方を用いたが、いずれも pH 10.0、37°C、60 分間反応後、遊離物質を蛍光測定した。

結果及び考察

酵素の性質

まずミクロソーム画分由来の精製標品では表

* 和歌山県立医科大学第二生理学教室

** 東京工業大学理学部生命理学科

表1 Summary of purification of microsomal protease

Step	Protein (mg)	Activity (nmol/min)	Specific Act. (nmol/min/mg)	Yield (%)
100,000 g ppt	8.8	39	4.5	—
Crude extract	5.4	38	7.0	100
DEAE-Sepharose	3.2	18	5.6	49
Heparin-Sepharose	0.084	12	150	32
Aprotinin-Sepharose	0.034	6.6	190	17

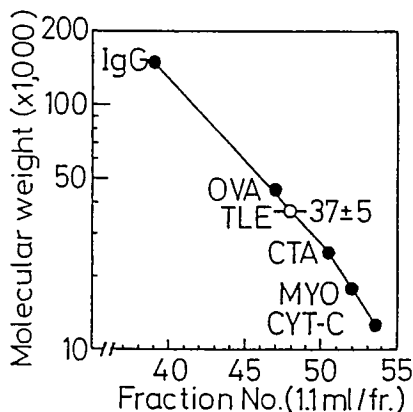


図1 Gel filtration of microsomal protease on Sephacryl S-300

1の如く、トリプシン・インヒビターであるアプロチニンを用いたアフィニティ・クロマトグラフィーの抽出液中で、ミクロソーム画分の約40倍の比活性が得られ、17%のyieldを示していた。この精製標品について性質を検査したところ、分子量はSephacryl S-300ゲル濾過法で分画すると 37 ± 5 Kであり(図1)、(3H)で酵素蛋白をラベルしてSDS-PAGE電気泳動を行なった結果でも約35 Kに位置することが認められたことから約35,000と推定された。基質特異性については種々の合成基質を用いて検討した結果、 P_2 サイトにはプロリン残基、 P_1 サイトにはアルギニン残基を要求するトリプシン型のプロテアーゼであることが判った(表2)。又至適pH域はアルカリ側のpH9近傍にあり(図2)、等電点はゲル内等電点電気泳動法によりpH=5.2であることが認められた。阻害剤に対する感受性テストではDFP, DMSFで強く阻

表2 Substrate specificities of microsomal protease

Substrate (10 μ M)	% Activity
Boc-Val-Pro-Arg-MCA	100
Tos-Gly-Pro-Arg-MCA	135
Tos-Gly-Pro-Lys-MCA	32

Boc-Phe-Ser-Arg-MCA	3
Boc-Leu-Thr-Arg-MCA	1
Boc-Leu-Ser-Thr-Arg-MCA	3

Glut-Gly-Arg-MCA	< 1
Boc-Leu-Gly-Arg-MCA	3
Boc-Ile-Glu-Gly-Arg-MCA	< 1

Z-Phe-Arg-MCA	< 1
Pro-Phe-Arg-MCA	1

Boc-Val-Leu-Lys-MCA	< 1
Z-Arg-Arg-MCA	< 1

Boc-Glu-Lys-Lys-MCA	< 1

Bz-Arg-MCA	< 1

Arg-MCA	< 1

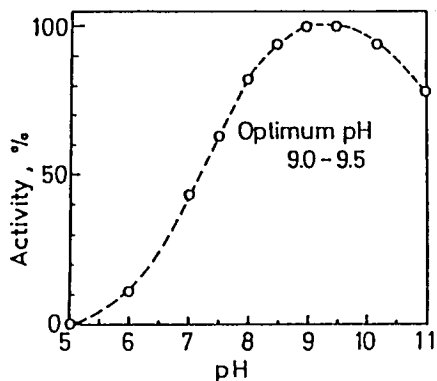


図2 Optimum pH range of microsomal protease

害されることからセリン・プロテアーゼであることが認められ、ヌアンチロンピンIII, アプロチニン, アンチパイン, ヒルジン, メシル酸ガベキサート, ロイペアチンなどでも100%近い活性阻害を受けることが判明した²⁾。

次に粗ミトコンドリア画分由来の精製標品の比活性を調べると表3に示す如く、LBTI-セファローズクロマトグラフィー抽出液中で粗ミトコンドリア画分の約1,700倍になっていた。又

表3 Summary of purification of protease from mitochondrial fraction

Step	Total Volume (ml)	Total Protein (mg)	Total Activity (nmol AMC/min)	Specific Activity (nmol AMC/min/mg)	Yield (%)
Crude extract	100	208	4.02	0.019	100
Phenyl-Sepharose	96	23	7.43	0.32	185
LBTI-Sepharose	17.6	0.118	3.91	33.14	97

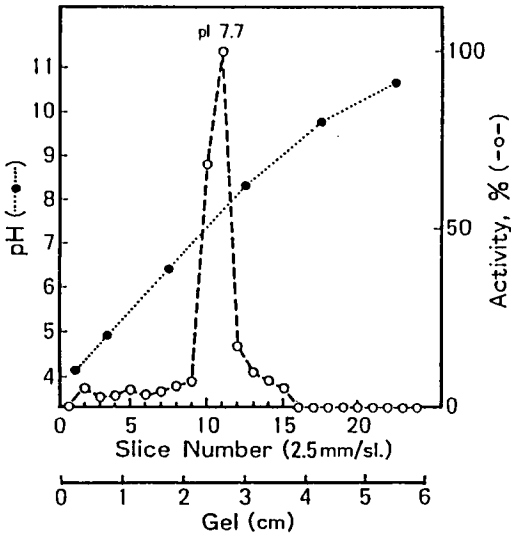


図3 Isoelectric focusing of protease from mitochondrial fraction

yieldは97%であった。

フェニールセファローズ抽出液での yield が 100%を大幅に越えているのは、酵素蛋白と結合した状態でインヒビターが内在し、精製の過程で分離したことを示している。

次に精製酵素の性質を検討したところ、分子量は Sephacryl S-300 ゲル濾過法でキモトリプシン A(25.2 K)とほぼ同じ位置に来ることが判り、SDS-PAGE で電気泳動し、銀染色した結果でも 25 K の所に単一のバンドが得られたことから約 25,000 の単鎖ポリペプチドであると推定した。又等電点はゲル内等電点電気泳動法によって $pI=7.7$ であることが認められた(図3)。更に基質特異性の検討結果から P_2 サイトにバリン残基、 P_1 サイトにチロシン残基を要求

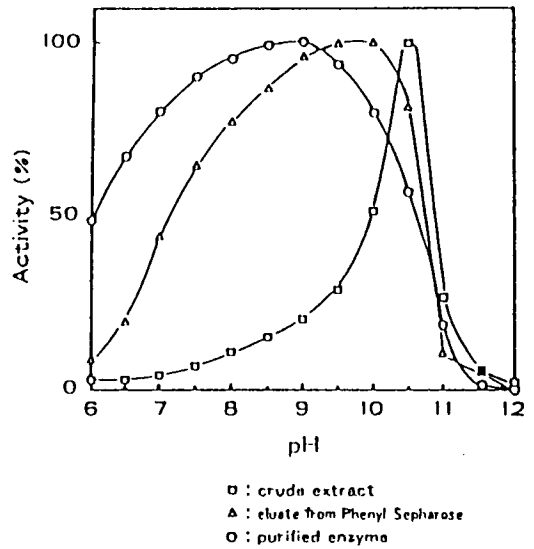


図4 Changes of optimal pH range on purification procedure

するキモトリプシン型のプロテアーゼであることが示唆された。至適 pH 域の測定では図4の如く、精製酵素では pH 8.0~9.5 と、粗抽出液での至適 pH より中性に近づいた値を示したことから、生体内では酵素蛋白と結合して存在する内在インヒビターが至適 pH をアルカリ側に引張り、活性を抑制しているが、インヒビターが離れると、生理的条件下でも高い酵素活性が現われて来る可能性を示しているものと考えられる。

阻害剤に対する感受性テストでは DFP, PMSF で強く活性が阻害されることからセリン・プロテアーゼに属することが明らかであるが、ヌキモスタチン, STI, LBTI, TPCK などでも強く阻害されることが認められた。

一方、精製過程で酵素と分離されることからその存在が認められた内在インヒビターについても検討を行なった結果この物質は図5に示される如く LBTI-セファローズクロマトグラフィーの際の非吸着部分に抽出されるもので、分子量 1.2 K と 60 K 以上の二つのフラクションにピークが存在することが認められた。そのうち圧倒的に量の多い 1.2 K のものが主要なイ

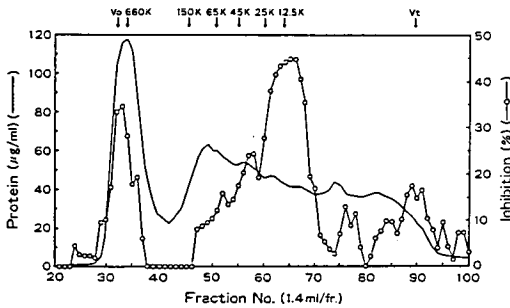


図5 Inhibitory effect of unabsorbed fraction to LBTI-Sepharose on protease activity from mitochondrial fraction

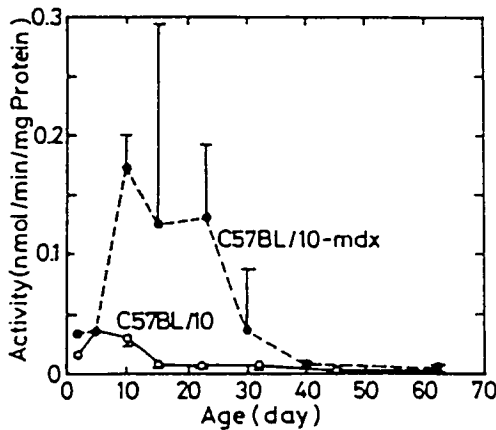


図6 Age related changes of microsomal protease activities from normal (open circle) and mdx (closed circle) mice

ンヒビターで正常状態の体内では酵素蛋白と結合し、酵素活性を抑制しているものと推測される。

酵素の機能

mdx マウス後肢筋からミクロソーム画分を採出し、その中の酵素活性を日齢順に測定すると図6の如く10日齢頃から急激に活性が上昇し、25日齢頃から活性が低下し始め、40日齢頃に正常マウスとほぼ同じレベルに戻ることが認められた。一方正常マウスでは10日齢迄はやや高い活性値を示しているが、15日齢以降になると極めて低い活性値を示す様になる。以上の結果からこの酵素はmdx マウス骨格筋において

20日齢以降に認められる急激な組織学的変化の際に主役の1つを演じている可能性が推測される。又正常マウスでは幼仔期にのみやや高い活性が認められることから、恐らくこの酵素は筋の成長期に特異的に働くものと推測されmdx マウスにおけるこの時期での急激な活性上昇が発病に一義的に関係している可能性は充分に考えられる。

一方、粗ミトコンドリア画分中の酵素活性は疾病進行に伴って活性上昇し、4ヶ月齢では正常対照の約3倍の活性が認められた。又、精製酵素標品を杉田らの方法³⁾で調整した筋構造蛋白標品と混合してインキュベートし、経時的に反応液を採出して、SDS-PAGEで泳動させ、無添加の対照と比較する実験を行なうと、ミオシン、アクチンなどの収縮系蛋白がすみやかに分解消失する状態が認められた。従ってこの酵素は骨格筋中に存在し、収縮系蛋白を分解する機能を有していることが認められた。

まとめ

筋ジストロフィー症マウス(mdx)骨格筋において症状進行に伴って著しく活性上昇を示す2つのアルカリ・プロテアーゼの精製を行ない、その性質を検討した。1つはミクロソーム画分中に存在し、分子量約34,000、等電点6.3の糖蛋白からなるトリプシン様セリンプロテアーゼであった。又活性の至適pH域は9.0~9.5であった。mdx マウスにおいて、この酵素は10~30日齢の間に急激な活性上昇を示すことから、発病の早期の過程に強く関与している可能性が推測される。一方、他の一つの酵素は粗ミトコンドリア画分から抽出され、分子量約25,000、等電点7.7の単鎖ポリペプチドからなるキモトリプシン様セリンプロテアーゼであった。又活性の至適pH域は8.5~9.5であった。mdx マウスにおいてこの酵素は症状の進行に伴ってゆっくりと活性上昇する、即ち通常は内在インヒビターと結合した形で存在するため、生理的状态では低い活性を示すが、疾病進行の過程で、イ

ンヒビターが遊離する状態になると酵素活性が上昇するものと推測される。又、この酵素は、*in vitro* で主要な収縮系蛋白を分解する機能を有することが認められた。以上の結果から2つのプロテアーゼ活性は、ともに疾病に深く関与していることが考えられ、新薬の治療効果を検定する際のマーカーとして有用なものと考えられる。

文 献

- 1) 辻 繁勝：幾つかの筋ジストロフィー症モデルマウスにおける Alkaline Protease 活性の変化。厚生省特定疾患「難病の疾患モデル調査研究」班昭和59年度研究報告書、p.p.123-127, 1985.
- 2) Sawada, H., Tsuji, S., et al: FEBS Lett., 199 (2): 193-197, 1986.
- 3) Sugita, H., Katagiri, T. et al: Basic Research in Myology (ed by Kakulas, B.A.) Excerpta Medica Amsterdam: p.p.291-297, 1974.

実験的筋炎モデル動物の作製に関する研究 —自己免疫筋抗原の筋組織内分布と精製の試み—

里 吉 栄二郎*

研究協力者 古川昭栄* 新井左衛子* 加茂 功*

多発性筋炎(polymyositis: PM), 皮膚筋炎(dermatomyositis: DM)は筋肉に特異的に細胞障害性免疫反応が認められる¹⁾²⁾。これら疾患の発症機構は未だ不明であるが、自己免疫疾患の角度から研究されている。本研究はこれら疾患の病態をよく反映する実験的モデル動物を作製し、低分子酵素阻害物質の発病抑止効果、治療薬としての効果を検討するのが目的である。

PM, DMでは筋肉が特異的にリンパ球による細胞浸潤を受けることから、筋肉にのみ特異的に存在するなんらかの成分が自己免疫反応の標的になっていると推定される。これまでにPMやDMに見いだされている自己抗体としては、抗ミオグロビン抗体³⁾、抗ミオシン抗体⁴⁾、抗核抗体⁵⁾があるが、疾患特異性が低いとされており、PM, DMの発症の引金となる抗原物質は他に存在すると考えられる。

重症筋無力症(myasthenia gravis: MG)は神経・筋シナプス後膜に特異的に存在するアセチルコリン受容体(AChR)に対する抗体が産生され、その抗体によってAChRが障害される疾患と考えられている⁶⁾。しかし、MG患者血清中には未だ未同定の筋肉抗原に対する抗体が高頻度に存在している。PMやDMでみられる筋特異的リンパ球の浸潤を考慮するとき、著者らはこれらの抗原物質の中に、細胞性免疫反応の標的となる物質が存在するのではないかと、また、その抗原物質は筋膜または、筋特異的細胞外マトリックスに存在するのではないかと考えた。

著者らはこれまでにこの種の抗原物質が筋肉や心筋に存在することを明らかにし、さらに、この抗原に対するモノクローナル抗体を作製し、抗体や抗原分子の特性を生化学的に明らかにした。本年度は1)モノクローナル抗体を用いて筋抗原の筋組織内分布の同定、2)アフィニティクロマトグラフィーによる筋抗原の精製を試みた。

方 法

ラット筋肉からの抗原物質の抽出法、抗原活性の測定法はすでに報告した方法⁷⁾によった。モノクローナル抗体の調製法は昨年度報告した筋抗原の筋組織内分布

ラット腓腹筋を液体窒素で冷却したイソペンタンで急速冷却し、クライオスタットで10 μ m切片とした。この筋組織切片を-20°C冷却アセトンで5分間固定し、0.5%スキムミルクに30分間浸してブロッキングした。その後、筋抗原に対するモノクローナル抗体1E7,7D9を2.5-20 μ g/mlの濃度となるように、10%ラット血清、10%ブタ血清、40%ウマ血清を含む0.01M Tris-HCl buffer(pH 7.6)で調製し、切片上に滴下して4°Cで2日間反応させた。コントロールにはマウス血清またはマウスIgGを用いた。次に抗体を除去、洗浄後、示適濃度のビオチン化抗マウスIgG抗体、ストレプトアビジン標識 horseradish peroxidase を順次室温で90分間反応させた後、3-amino-9-ethylcarbazole, H₂O₂で発色させた。

筋抗原のアフィニティクロマトグラフィー

1)抗体カラムの調製: 1 ml 体積の proteinA

*国立精神・神経センター神経研究所

結合樹脂(Bio-Rad, MAPS) 2本にそれぞれ、抗筋抗原モノクローナル抗体7D9, コントロールモノクローナル抗体5E4を含むマウス腹水1mlを流してIgGを結合させた。1M NaClを含む0.05M phosphate buffer(pH 6.5)でよく洗浄後、樹脂を取り出し、10mM 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide 中で30分間反応させた。この処理により protein A と IgG が共有結合で架橋される。樹脂をよく洗浄後、再びカラムに充填した。

2)アフィニティクロマトグラフィー：カラムを順次、1M NaClを含む0.1M borate buffer (pH 8.6), 0.1M acetate buffer (pH 5.0)で洗浄し、0.1M Tris-HCl buffer (pH 7.6)で中和した。ゲルろ過で部分精製したラット筋抗原画分を、抗体カラムに約5時間かけて通した。洗浄に使ったと同じbufferで非特異的結合物質を除き、0.17M glycine-HCl buffer (pH 2.3)でカラムから溶出した。溶出液は直ちにNaOHで中和した。溶出液の抗原活性はモノクローナル抗体で、蛋白組成は5-20%濃度勾配ゲルによるSDS電気泳動で調べた。

結 果

2種のモノクローナル抗体は同一分子を認識する

モノクローナル抗体1E7, 7D9が認識する分子は同一らしいこと、しかも認識エピトープが全く異なることはすでに昨年報告した。さらにこのことを確認するため2種のモノクローナル抗体の一方をプラスチックの表面に物理吸着させ、抗原を反応させた後、ビオチン化したもう一方の抗体が結合するかどうかを調べた。図1右に示すように、7D9を固相に用いた時、ビオチン化1E7のみが十分に結合した。7D9は結合しなかった。また1E7を固相に用いた場合は1E7, 7D9のいずれもほとんど結合しなかった(図1左)。固相化された7D9抗体に結合した抗原分子に、さらに1E7抗体が結合したことから、この2種の抗体は同一抗原分子を

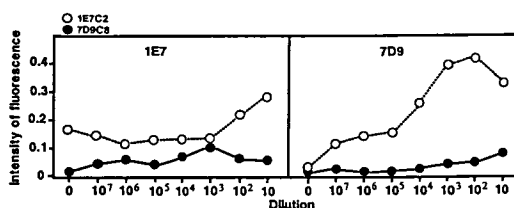


図1 2種のモノクローナル抗体の筋抗原との結合様式

右：モノクローナル抗体7D9を固相化し筋抗原と反応させた後、ビオチン化した1E7(○)または同7D9(●)と反応させそれらの結合性を調べた。streptavidin 標識ペーカグラクトシダーゼを結合させ、結合した酵素活性によって、結合ビオチン化抗体を定量した。

左：モノクローナル抗体1E7を固相化した。

以下同じ。

認識していることが確かめられた。抗体の役割を逆にすると結合が起こらない理由は不明であるが、固相1E7と結合した抗原分子上の7D9 エピトープが固相面側に向いてしまい、7D9抗体が入り込めない状態になっているのかもしれない。

筋抗原の筋組織内分布

モノクローナル抗体1E7, 7D9は基本的には同一の組織染色パターンを示した。コントロール抗体や血清では特異的染色はみられなかった。

図2は筋線維の走行方向に対し直角よりやや斜めに切断した切片をモノクローナル抗体7D9で染色した時の典型的なパターンを示す。筋膜か細胞外マトリックスかは明確ではないが、筋線維を取り囲む構造体と、筋線維内の横紋構造に特異的な染色がみられた。位相観察下で横紋構造がみえない筋線維は内部構造の染色がみられなかった。一方、線維走行方向に平行に切った切片でも、筋線維の外側と内部の横紋構造が染色された。モノクローナル抗体1E7でもほぼ同様な結果であったが、筋線維周囲の染色性が弱い傾向があった(図3)。この染色性の微

