

貞松 俊弘 (長崎県) 昭和36年3月20日生

授与年月日 平成3年3月20日

主論文 ニワトリ骨端軟骨基質小胞プロテアーゼ  
に対する単クローン抗体の作製とその局  
在

#### 論文内容の要旨

##### 緒言

基質小胞は、骨端軟骨の初期石灰化に密接に関与する小胞と考えられている。この基質小胞の石灰化機構は、以下のごとく説明されている。まず、小胞内のCa濃度が基質小胞内リン脂質のCa親和性やCa-ポンプによって、上昇する。また、小胞膜に存在する alkaline phosphatase が局所のリン酸イオン濃度を上昇させる。この結果、小胞内でハイドロキシアパタイトの微結晶ができ、その後この結晶の成長によって小胞膜が破壊され基質中で結晶が成長、増殖していく。この成長は組織液中のCa、Pi濃度がアパタイトに対して過飽和であることから、自発的に進行していくというものである。しかし基質中には、陽イオン親和性をもち、しかも保護コロイド作用によって結晶の成長を抑制するプロテオグリカンが存在しており、このままでは結晶成長は進行しがたいはずである。そこで基質小胞中にプロテオグリカンを分解する酵素(基質小胞プロテアーゼ)が存在すると仮定すると、小胞膜が破れた際に本酵素が放出され、プロテオグリカンの保護コロイド作用を消失させ、結晶化が進行するという仮設が成り立つ。

本報では、この基質小胞プロテアーゼに対する単クローン抗体を作製し、その局在を免疫組織学的に調べた結果を報告する。

##### 材料および方法

①基質小胞プロテアーゼの精製：6～8週令のニワトリ骨端軟骨をコラゲナーゼ消化した後、段階的な遠心分離によって最終沈澱(基質小胞画分)を得た。これを、ゲル濾過およびデオキシコール酸処理して、基質小胞プロテアーゼを精製した。

②基質小胞プロテアーゼのプロテオグリカンに対する作用：同週令のニワトリ骨端軟骨より塩化セシウム密度勾配平衡超遠心法によってプロテオグリカン-A<sub>1</sub>画分(PG-A<sub>1</sub>)を抽出した。PG-A<sub>1</sub>をTris/HCl bufferに溶解したものに、精製基質小胞プロテアーゼおよび、コントロール溶液を反応させた後、比粘度を測定した。なお、本酵素の分子量は、SDS-PAGEにて推定した。

③単クローン抗体の作製：Babl/cマウスに免疫を行

ない、脾臓細胞とNS-1 myeloma cellをポリエチレングリコールにて細胞融合させ、HAT培地によってハイブリドーマを選択した。スクリーニングはWestern Blot法によって行なった。硫酸沈澱にて精製した抗体を用いてプロテアーゼの局在を免疫組織学的に検討した。

④免疫組織：組織標本はニワトリ骨端軟骨を用い、免疫光顕はABC法、免疫電顕はprotein A-Gold法によって行なった。コントロールとして、PBSおよび正常マウス血清を用い、また吸収試験も行なった。

##### 結果

精製した基質小胞プロテアーゼの分子量は、約33KDであった。プロテアーゼによるプロテオグリカン溶液の比粘度は、コントロールの56.7%に低下していた。Western Blotにて分子量約33KDの単一バンドに抗体陽性反応が観察された。抗体のアイソタイプはIgG<sub>1</sub>であった。

免疫光顕像では、肥大軟骨細胞層から石灰化層にかけて、骨髄組織内のmesenchymal cellが染色されており、血球系の細胞は染色されなかった。また、静止層から肥大軟骨層において、軟骨細胞および基質中にも明かな陽性像は得られなかった。コントロールでは、なにも染色されなかった。

免疫電顕像では、肥大軟骨細胞層から石灰化層にかけて、基質小胞内に1～4個の金コロイド粒子が観察された。これらの金粒子は、ほとんどの基質小胞において、その辺縁、すなわち膜に沿って存在していた。また、石灰化部位では、軟骨基質内の針状結晶に沿って金粒子の沈着が認められた。一方コントロールでは、何も染色されなかった。

##### 考察

基質小胞から抽出したプロテアーゼは、本研究により基質小胞特有の酵素であることが確認できた。しかも石灰化軟骨基質中では、針状結晶に沿って本酵素が観察されたことより、基質小胞プロテアーゼは石灰化に密に関与していることが推察された。このことは、本酵素がプロテオグリカンを分解して、その粘度を低下させたことからも裏づけられる。すなわち、本実験で得られた結果は先に示した仮設を支持するものであった。そして、免疫光顕で骨髄内のmesenchymal cellが染色されたことは、本酵素が骨髄内の未分化細胞の段階で既に合成されていることを伺わせるものと思われる。

以上のごとく基質小胞プロテアーゼは、基質小胞による石灰化の最終段階において、アパタイトの結晶成長に関与する重要な酵素であると考えられるが、今後、プロテアーゼの起源、ひいては基質小胞の起源などを知るために、今回作製した単クローン抗体を用いた研

究が必要と思われる。

#### 論文審査の結果の要旨

貞松俊弘は、昭和60年3月、久留米大学医学部を卒業後、第79回医師国家試験に合格、昭和60年6月より、国立長崎中央病院医員（研修医）となり、昭和61年4月、長崎大学大学院医学研究科に入学した。大学院においては、整形外科を修め、整形外科主任、岩崎勝郎教授の指導をうけ、論文を完成し、「ニワトリ骨端軟骨基質小胞プロテアーゼに対する単クローン抗体の作製とその局在」（日本整形外科学会雑誌、第65巻4号、P230～239）を主論文とし、他5編の参考論文を附して、医学研究科委員会に提出した。

主論文は、硬組織の初期石灰化機構を解明するためのものである。ニワトリ骨端軟骨より基質小胞を分離した後、ゲル濾過にてプロテアーゼを精製した。単クローン抗体は、Köhlerらの方法に従って作製した。その結果、得られた抗体のアイソタイプは、IgG<sub>1</sub>、L鎖はKappa typeであった。ゲル濾過および作製した抗体を結合させたアフィニティクロマトグラフィーにて得られた精製基質小胞プロテアーゼの分子量は、SDS-PAGEにて、約33KDであった。Western Blot法にて、約33KDの部位に一致して抗体陽性反応が観察された。基質小胞プロテアーゼが、プロテオグリカン分解するか否かの確認のために、プロテアーゼによるプロテオグリカン溶液の粘度低下作用をみたところ、コントロールの56.7%にまで粘度が低下した。

次に、プロテアーゼの局在を知る目的で、免疫光顕（ABC法）、免疫電顕（Protein A-Gold法）を行った。免疫光顕では、骨髄組織内のmesenchymal cellが染色されており、本酵素が骨髄内の未熟な細胞ですでに合成されていることが示唆された。免疫電顕では、基質小胞内に金粒子がみられ、また石灰化部位では、アパタイトの針状結晶に沿って金粒子の沈着が認められた。これらのことから、基質小胞プロテアーゼは、確かに基質小胞に存在しており、また、石灰化部位では、針状結晶に沿って本酵素が存在していたこと、および、プロテオグリカン分解作用を有することより、基質小胞プロテアーゼは、基質小胞性石灰化の最終段階において、アパタイトの結晶成長に関与する重要な酵素であると考えられた。

以上のごとく、本研究は硬組織の初期石灰化における基質小胞プロテアーゼの役割りと、その局在を明らかにした所に意義がある。

研究科委員会は、下記の通り審査委員を選定したので、委員は、主査を中心とし、慎重審査の上、平成3年3月20日の定例委員会に付議し、審議の結果、本論文は学位に値するものとして承認された。

審査担当者 主査 教授 岩崎勝郎

副査 教授 中根一穂  
副査 教授 松田源治