

— 話 題 —

新しい matrix metalloproteinase 活性測定法

第二病院脳神経外科 吉田 大蔵 高橋 弘
 付属病院脳神経外科 寺本 明

悪性脳腫瘍の治療について、どうしても考えねばならないのは腫瘍細胞の侵潤です。悪性細胞の性質として一つの腫瘍塊として成長するとともに、周囲の正常な脳組織に入り込み衛星のような病巣を増やすので、肉眼的に手術上全摘出したとしても、正常脳組織に潜り込んだ衛星のような病変からある時期がくれば再発をおこすのが常です。術後の科学療法や放射線療法は残存した腫瘍のみならず、正常脳組織に侵潤した腫瘍細胞への効果を期待して行うわけで、放射線はもとの腫瘍の範囲より広汎に照射せざるを得ません。近年提唱されている遺伝子療法といえども、局所投与するにあたり、正常の脳組織にほとんど入っていないのが現状であって、この腫瘍の細胞侵潤の存在というものが悪性脳腫瘍の治療の限界といってもよいでしょうし、脳というものが、その器官の性格上広範囲摘出出来ない以上なんらかの手段で細胞侵潤の制御なくしては悪性脳腫瘍の治療は考えられません。

腫瘍細胞の侵潤のステップとしては、1) 細胞の遊走および正常組織への接着、2) matrix metalloproteinase (MMP) を介した正常組織の融解、3) 正常組織内への遊走および衛星病変での細胞の増加という段階によることから、多数報告されています。この3つのステップのなかで、我々はMMPにターゲットをあてて、この酵素活性を抑制すれば細胞の侵潤を抑制できうることを報告してまいりました。

今回「話題」に取り上げるのは、新しいMMP活性測定法です。96-well plateにMMP-1、-2といったそれぞれのsubtypeのモノクローナル抗体を付着させておきます。血清や細胞培養液をwellに入れると液体中のMMPが捕捉されます。このMMPにmodified pro-urokinaseを与えるとactive formのurokinaseへと変換されます。このactive urokinaseは特異的に合成 peptide S-2444 (Glu-Gly-Arg-pNA-HCl) に反応し、pNA (p-nitro-aniline) を放出し、吸光度 405nm でこのアミド色素のamidolysisを測定するわけです。従来ではplasminがpro-urokinaseを感知してactive urokinaseに活性化することを利用してplasminやtissue plasminogen activatorの活性を測定していましたが、今回我々はplasminが特異的に感知するpeptide sequenceをpro-MMPに反応するようにsequenceを変換し、modified pro-urokinaseとしたわけです。

従って本法はMMPの活性をurokinaseを介して定量的に測定できる検査法です。分泌されたpro-MMPの総量はp-aminophenylmercuric acetate (APMA) を加えることで総てのPro-MMPをMMPへ転換して計量しますが、APMAを加えずに定量したものがサンプルに含まれたactive MMPであり、両者の比率からMMPの活性化率が検量できます。

今までMMPの測定は蛋白レベルではWestern blotting, ELISA法でおこない、一般的にこの20年近く酵素活性はzymography, collagenolysis assayを中心に検討されてきました。zymographyはSDS-PAGEgelにあらかじめcollagenかcaseinを溶かしておき、血清や細胞培養液を電気泳動後、gelに含まれた酵素がバックグラウンドのcollagen等を融解し、gelを染めた際白く抜けたbandで酵素活性を検定します。この方法では、molecular markerと対比させることから、それぞれのMMP subtypeの発現を一度に検討できるといった利点がありますが、電気泳動の欠点として定量的解析といった点に限界があるようです。一方collagenolysis assayですが、これはそれぞれのMMPの特異的なsubstrate即ちtype 4 collagenなどをプレートにコートしておきます。サンプル(血清、培養上清等)を上からかけて、一定時間後にサンプルに溶け出したsubstrateを測定する方法です。以前はsubstrateを放射性同位元素でラベルして液体中の同位元素をカウントしていました。この方法はすぐれて定量的ではありませんが、pro-MMP、MMPの発現の割合やどのsubtypeのMMPがどの割合で酵素活性を有していたかという点では、事実上測定不能です。

最近、様々な癌の治療で抗MMP剤を用いて補助療法にしようという流れがみうけられますが、このMMPの蛋白発現量と酵素活性が同じものかどうかは議論の多いところでもあります。先程申しましたように、酵素活性の実験法としてここ20年さしたる進歩もありませんでしたが、本法においては、簡便でしかも再現性が高く、ELISA法に慣れている方ならば、このMMP活性測定は習熟は容易でしょう。いづれにせよ、MMPに焦点をおいた悪性脳腫瘍の治療は極めて利にかなった治療法として今後の脳腫瘍治療の一つの流れになりうると考えられます。

(受付 : 2001 年 9 月 18 日)

(受理 : 2001 年 11 月 13 日)