

一 般 演 題 抄 録

29. ノックアウトマウス血漿中におけるスタフィロキナーゼの線溶系活性化機構の解析

岡田清孝 上嶋 繁 深尾偉晴 松尾 理
近畿大学医学部第2生理学教室

Staphylokinase (SAK) は plasmin (Plm) と複合体を形成し, plasminogen activator (PA) 活性を発現する. この PA 活性は循環血液中で α_2 -antiplasmin (α_2 -AP) により阻害されるが, fibrin 上では阻害されず血栓特異性の線溶系活性化を示す. このことから, SAK は優れた血栓溶解剤として期待され, 臨床治験が進んでいる. また, この作用は動物種により異なるとされている. しかし, SAK のマウス系での解析については, 未だ不十分であることから, 線溶系因子ノックアウトマウスを用いて検討した.

血漿は健常人, wild-type マウス (WT) および α_2 -AP または plasminogen (Plg) のノックアウトマウス (α_2 -AP^{-/-}, Plg^{-/-}) より得た. ヒトおよびマウスの Plg はそれぞれの血漿より精製した. また, Plm は Plg の urokinase-Sepharose 処理により得た. PA 活性は合成基質 (S-2251) 法で検討した. 血栓溶解能は RI 標識した plasma clot の溶解性で検討した. SAK と Plm との結合性は生体分子間相互作用解析装置 IAsys を用いてリアルタイムに解析した.

SAK による PA 活性は, ヒトおよびマウスの血漿中では発現しなかった. また, ヒト Plm-SAK 複合体による PA 活性発現は, ヒト Plg を加えた plg^{-/-} マウスおよび WT マウスの血漿中では見られなかった. しかし, α_2 -AP^{-/-} マウスの血漿中では PA 活性を発現した. さらに, ヒト Plm-SAK 複合体はヒトおよびマウスの血漿より作成した plasma clot を溶解したが, マウス血漿の方が約10倍弱かった. 一方, 精製系では, IAsys においてヒト Plm は固相化 SAK に対し濃度依存の結合性を示した. しかし, マウス Plm は結合性を示さなかった. また, SAK の PA 活性は, マウス Plm との反応では発現しなかった. これに対し, ヒト Plm-SAK 複合体はマウス Plg を活性化した. しかし, このマウス Plg の活性化はヒト Plg より約80倍弱かった.

以上より, マウスの系において SAK はマウス Plm と反応しないが, ヒト Plm-SAK 複合体はマウス Plg を活性化させ, マウス α_2 -AP により阻害されることが示唆された.

30. 神経幹細胞のコラーゲンゲル培養下における bFGF の影響

伊藤龍生 佐藤隆夫 林 義之 伊東良太 玉井良尚* 橋本重夫
近畿大学医学部第2病理学教室 *同第3内科学教室

目的 神経幹細胞は二次元培養では塩基性線維芽細胞成長因子 (bFGF) 存在下で, その分化が抑制され細胞塊を作りながら細胞増殖を行い, bFGF 非存在下では増殖性を失い神経細胞やグリア細胞に分化すると報告されている. しかし, 三次元培養における神経幹細胞の形態学的変化は報告されていない. 今回, 我々はラット神経幹細胞の三次元培養法を試み形態学的に観察した.

方法 胎生15日齢ラット終脳より分離し培養した神経幹細胞を 1×10^7 cells/ml に調整しコラーゲンゲル内にて培養した. bFGF 10 ng/ml 添加群と非添加群に分けて37°C, 5% CO₂ にて4日間培養した. その後4%-paraformaldehyde にて固定し光顕的に観察をした.

結果 bFGF 添加群では2時間後から神経幹細胞

の突起伸長を認めたが, 非添加群では24時間後からであった. また培養4日後ではbFGF 添加群が非添加群に比較し, より多くの突起伸長を認めた. 非添加群に比較しbFGF 添加群ではMAP2 陽性細胞が増加していた. また添加群ではMAP2 陽性細胞による rosette の形成が認められたが, 非添加群では rosette の形成は認められなかった.

考察 二次元培養ではbFGF は神経幹細胞の細胞増殖に働くことが報告されているが三次元培養ではMAP2 陽性細胞数の増加及び rosette 形成が見られ, 神経幹細胞に対して神経細胞への分化誘導が見られた. このことは細胞の立体構造がbFGF の作用に影響することを示した. In vivo での細胞増殖因子の作用を検討する上でコラーゲンゲル培養は有用であると考えられた.