

一 般 演 題 抄 錄

## 5. 骨吸収因子による骨肉腫株化細胞 NY における urokinase-type plasminogen activator receptor 発現に関する検討

野中 藤吾 嶋田 亘 宮城 一郎

菊地 啓 田中 清介

近畿大学医学部整形外科学教室

松尾 理

近畿大学医学部第2生理学教室

### 目 的

近年、線溶系分野において従来の血管内線溶あるいは血液線溶という概念とは別に血管外線溶あるいは細胞性線溶という概念が提唱されている。これは urokinase-type plasminogen activator receptor (u-PAR) を中心とした細胞周囲における蛋白分解活性のカスケードである。一方、骨吸収に関して u-PA などの plasminogen activator が骨吸収を促進させるという報告があるが、骨吸収と細胞周囲の蛋白分解活性との関連についての報告は未だない。そこで本報告では骨肉腫株化細胞 NY を用いて骨吸収刺激因子および骨吸収抑制因子で細胞を刺激し u-PAR を中心とした細胞周囲蛋白分解活性についての解析を行った。

### 方 法

NY 細胞 ( $2 \times 10^5$  個) を  $10^{-7}$  M PTH,  $10^{-7}$  M PGE<sub>2</sub>, 1.0 ng/ml TNF- $\alpha$  および 1.0 ng/ml TGF- $\beta$  で24時間刺激し、細胞に酸処理を行い u-PAR に結合している内因性の u-PA を細胞表面分画として採取し enzymography で u-PA 活性を測定した。次に、DFP 処理した u-PA を <sup>125</sup>I で標識し、各薬剤で刺激した細胞に 4°C 90分 binding assay を行い scatchard 解析にて細胞と u-PA の親和性を表わす Kd

値および u-PA の binding site 数を表わす B<sub>max</sub> を算出した。更に、u-PAR probe を用いて Northern blot 法で u-PAR の mRNA レベルでの解析を行った。

### 結果および考察

細胞表面分画中の u-PA 活性は enzymography で分子量 55 kDa の位置に認められ、PGE<sub>2</sub> 刺激でコントロールの1.6倍に増加し、TGF- $\beta$  刺激で約30%減少が認められた。Binding assay を行った結果、scatchard 直線が一本であることから u-PA が単一の receptor に結合していることが示された。コントロールの Kd 値は 5.51 nM, B<sub>max</sub> は  $0.92 \times 10^5$  binding sites/cell であった。Kd 値は各刺激群でコントロールと比べ有意な変化は認められなかったが、B<sub>max</sub> は PTH 刺激で1.5倍、PGE<sub>2</sub> 刺激で1.8倍の増加が認められた。Northern blot 法を用いた u-PAR の mRNA レベルでの解析での結果、u-PAR の mRNA が 1.4 kb の位置に認められ、そのバンドがコントロールに比べ、PTH 刺激で1.4倍、PGE<sub>2</sub> 刺激で2.4倍の増加が認められた。これらの結果は、binding assay での B<sub>max</sub> の値と正の相関が認められた。以上のことから u-PAR を中心とした細胞周囲での蛋白分解活性が骨吸収に関与している可能性が示唆された。