

一 般 演 題 抄 録

25. 線溶系因子の細胞培養系における 検討法について

萩家 康弘 上石 弘 深尾 偉晴*
松尾 理*

近畿大学医学部附属病院形成外科, *同医学部第2生理学教室

目 的

最近注目されている血管外線溶現象のなかで創傷治癒における線溶系因子の役割が解明されつつある。特に、細胞表面に存在する urokinase-type plasminogen activator (u-PA) と特異的に結合する receptor (u-PAR) が明らかにされ、この biological function について多く解析がなされている。細胞表面における線溶系因子を定量的に測定できれば、*in vitro* で培養細胞を用い、創傷治癒におけるさまざまな現象と線溶系因子との関連が検討できると思われる。今回、培養細胞を用いてその細胞表面の線溶活性、u-PA 活性を直接測定し、また細胞表面への u-PA の結合実験を行ったので、その有用性について報告する。

方 法

細胞 (4.0×10^5 cell/well) は腫瘍細胞から樹立したもので、10%牛胎児血清を含む RPMI-1640 にて37°C、5% CO₂ 存在下で培養し単層形成したものをを用いた。無血清培養の細胞に plasmin に特異的な合成基質 S-2251 及びヒト plasminogen を加え、plasminogen activation 活性を測定した (direct assay)。同様に u-PA に特異的な合成基質 S-2444 を用い plasmin の存在、非存在下に u-PA 活性の direct assay を行った。細胞より guanidine hydrochloride 法により RNA を抽出し、u-PA cDNA probe (pHUK-1) を用いて u-PA mRNA の Northern blot を行った。また、u-PA の活性

部位を block した DFP-u-PA を Iodogen 法で ¹²⁵I を標識し細胞への結合実験を行った。¹²⁵I-DFP-u-PA (0~3 nM) を 4°C、20分反応させたが、その際、大過剰 (300 nM) の u-PA 添加群と無添加群とを作製し非特異的結合をみた。得られた結合曲線から Scatchard plot で細胞への結合親和性(Kd)と結合部位数(Bmax)を解析した。

結果と考察

合成基質 S-2251 を用いた系では plasminogen 存在下で著明な基質の分解を認め、S-2444 の系では plasmin 存在下で分解を認めた。このことから細胞表面には plasminogen activation 活性が存在し、かつ細胞表面に結合した非活性型の single-chain u-PA が plasmin により活性化されることによるものと考えられた。また Northern blot により細胞には 2.5 kbp の u-PA mRNA が検出された。u-PA mRNA 発現量は plasminogen activation 活性と相関していた。u-PA の細胞への結合実験により濃度依存的な結合曲線が得られ、これより Scatchard 解析を行うと一本の直線が得られた。このことから細胞表面には u-PA に特異的で単一の結合部位が存在しており、その結合親和性 (Kd) と結合部位数 (Bmax) が求められた。

以上の結果から本研究で用いた測定法を利用することにより *in vitro* における創傷治癒に対する線溶系因子の影響を検討する実験的アプローチが可能であると考えられた。