ヒト卵巣組織由来の培養株化細胞の産生する Plasminogen activator

深尾 偉晴* 岡田 清孝* 菊池 啓* 松尾 睦美*
上嶋 繁* 板東 博志* 酒井 鉄博* 松尾 理*

Studies on plasminogen activator produced by the
cultured cell line from the tissue of human ovary

Hideharu FUKAO*, Kiyotaka OKADA*, Hiraku KIKUCHI*,
Chikami MATSUO*, Shigeru UESHIMA*, Hiroshi BANDO*,
Tetsuhiro SAKAI* and Osamu MATSUO*

Key words: cultured cells, plasminogen activator,
UK, t-PA, fibrin affinity

A novel cell line named B-1085 with morphological and physiological stability was established from the tissue cultured cells of the human ovary, which produced high level of plasminogen activator (PA) into the cultured medium.

B-1085 was subcultured under the following conditions: MEM medium containing 10% FCS, 2 mM glutamine and 300 ppm penicillin with 5×10^5 cells / 10 ml of medium / 25 cm²-flask, incubated at 37°C, 5% CO₂ for 7–10 days. This cell line could be cultured on microbeads with a good adhesion and growth secreting high concentration of PA into the medium.

PA produced by B-1085 was investigated on its enzymatic identification. This PA was successfully purified using high performance liquid chromatography with zinc chelate-5PW column resulting in a single band (55 K) on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Enzymography revealed that 55 K protein band had a fibrinolytic activity and no other active band was detected. Immunological study showed that the PA cross-reacted with anti-UK antibody but not with anti-t-PA one. These results suggest that the PA was similar to UK in the the point of molecular weight and im-

* 近畿大学医学部第二生理学〔〒589 大阪府南河内郡狭山町西山〕, Department of Physiology, Kinki University School of Medicine, Osaka, Japan.

munological property. On the other hand, this PA demonstrated high affinity to fibrin, indicating t-PA type characteristic.

はじめに

生体内の各組織では種々の plasminogen activator (以下 PA) が産生されている¹⁾. 今回, ヒト組織内 PA を検索した結果, 卵巣組織細胞の初代培養から得られた培養株化細胞 B-1085 がその培養液中に高濃度の PA を産生することを見出した. 以下, 本培養株化細胞 (以下 B-1085) の細胞学的特性, PA 産生に関する培養条件, 並びに PA の酵素学的性質について報告する.

I. 材料および方法

外科手術により得られたヒト卵巣組織を trypsin 0.05%, collagenase 200 U/ml を用いた常法に従って酵素消化による細胞分散を行い, 初代培養²⁾ を実施した. その後, 継代培養を繰り返し, 単一の細胞群を得, 以後培養株化細胞 B-1085 として確立し実験に供した. 培地は, 合成 penicillin 300 ppm, glutamine 2 mM, および牛胎児血清 (GIBCO 社) 10% を含む Eagle MEM 培地 (ニッスイ) を用い 5×10^5 cells/10 ml/25 cm²-flask (CORNING 社) の播種量で, 37°C, 5% CO₂ 分圧下, 7-10日間培養し,

Fig. 2 S-2444 (●—●) or S-2288 (▲—▲) amidolytic activity of PA obtained from the cultured medium of B-1085.

Fig. 1 S-2251 amidolytic activity of the cultured medium of B-1085 in the presence (●—●) or absence (▲—▲) of plasminogen.

継代を行った. Beads 培養³⁾ には, Cytodex-1 (Pharmacia 社) を用い, 1×10^7 cells/200 mg beads (D.W.)/80 ml の規模で実施した. 細胞内外の PA 活性値は, fibrin plate 法⁴⁾, または合成基質分解法⁵⁾ により求め, urokinase (以下 UK) 換算した. 本 PA を enzymography⁶⁾ により, 分子量と酵素活性を明らかにした. また, ConA-Sepharose および fibrin-Sepharose⁷⁾⁸⁾ を用いておのおの, ConA および fibrin に対する親和性を検討し, 既知の UK⁹⁾ および組織性 PA¹⁰⁾ (以下 t-PA) と比較した. 本 PA は Zn chelate-5PW を装着した高速液体クロマトグラフィー¹¹⁾ を用いて精製した.

II. 結果

B-1085 は一定の条件下で既に 5 年以上継代培養され, 培地中に PA を産生しており (図 1), その高生産性は安定している [10 ml/75 cm²-flask の無血清培養で 20-30 IU/ml, melanoma(Bowes) の 2 倍以上].

B-1085 は microbeads によく接着し、かつ良好な増殖を示し、beads 培養が可能であり、培養上清には PA 産生が認められた。Enzymography により分析すると、本 PA は分子量約 55000 に単一の酵素活性を有しており、UK の分子量と類似していた。しかし、UK の場合に見られる低分子(分子量約 33000)の活性 band は認められなかった。合成基質に対しては S-2288 より S-2444 をより多く分解した(図 2)。免疫学的検討では、抗 UK 抗体により活性は抑制された。また fibrin に対する高い親和性が認められた。

III. 考 察

B-1085 は長期にわたり形態学的にも生理学的にも安定しており、永代培養可能な樹立細胞であると思われた。本細胞が分泌する PA は fibrin 親和性を有する点、t-PA 型であるが、分子量、合成基質に対する特異性及び免疫学的性質の点からは UK 型であると思われた。

文 献

- 1) Astrup, T.: Tissue activators of plasminogen. *Fed. Proc.*, **25**; 42~51, 1966.
- 2) Vahouny, G.V., Wei, R., Starkweather, R. and Davis, C.: Preparation of beating heart cells from adult rats. *Science*, **167**; 1616, 1970.
- 3) Levine, D.W., Wong, J.S., Wang, D.I.C., et al.: Microcarrier cell culture, new methods for research-scale application. *Somatic Cell Res.*, **3**; 149~155, 1977.
- 4) Matsuo, O., Mihara, H. and Rokushima, Y.: Assessment of the thrombolytic effect of low urokinase concentrations. *Acta. Haematol. Jap.*, **39**(3); 298~305, 1976.
- 5) Matsuo, O., Nishida, Y., Akazawa, K. and Mihara, H.: Effect of urokinase on fibrinolysis and fibrinogenolysis. *Jap. J. Physiol.*, **32**(6); 879~883, 1982.
- 6) Matsuo, O., Sakai, T., Bando, H., Okada, K., Nakajima, S., Takagi, O. and Izaki, S.: Plasminogen activator in bronchoalveolar fluid. *Hemostasis*, **16**; 43~50, 1986.
- 7) Blombäck, B. and Blombäck, M.: Purification of human and bovin fibrinogen. *Arkiv. Kemi.*, **10**; 415~443, 1956.
- 8) Heene, D.L. and Matthias, F.R.: Adsorption of fibrinogen derivatives on insolubilized fibrinogen and fibrinmonomer. *Thromb. Res.*, **2**; 137~154, 1973.
- 9) Holmberg, L., Bladh, B. and Åstedt, B.: Purification of urokinase by affinity chromatography. *Biochim. Biophys. Acta.*, **445**; 215~222, 1976.
- 10) Matsuo, O., Rijken, D.C. and Collen, D.: On the thrombolytic properties of human tissue plasminogen activator and urokinase. In: *Urokinase: Basic and Clinical Aspects*. Mannucci, P.M. and D'Angelo, A. (Ed.) London-Academic Press., pp. 55~61, 1982.
- 11) Matsuo, O., Tanbara, Y., Okada, K., Fukao, H., Bando, H. and Sakai, T.: High-performance chromatographic method for the purification of tissue-type plasminogen activator. *J. Chromatogr.*, **369**; 391~397, 1986.