

肺胞上皮細胞および血管内皮細胞遊走能への 肺線維芽細胞共培養の影響

高橋 君子 (管理栄養学科)

The Presence of Human Pulmonary Fibroblasts Regulates Human Alveolar Epithelial and Endothelial Cell Migration

Kimiko Takahashi

Department of Nutrition and Dietetics, Kamakura Women's University

Abstract

In pulmonary tissue injury, fibroblasts proliferate and actively secrete plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), which inhibits urokinase-type plasminogen activator (uPA) activity. The effect of co-cultivation of lung fibroblasts with human endothelial cells and alveolar epithelial cells on uPA receptor (uPAR) production, as well as surface uPA activity and migration of the latter two types of cells, was examined. Although surface uPA activity of those cells was not significantly suppressed by fibroblasts, their migration and uPAR mRNA expression were stimulated by the fibroblast-conditioned medium. These results suggested that PAI-1 secreted from proliferating fibroblasts is closely involved in lung tissue repair and remodeling.

Key words: fibroblasts, tissue repair, migration, urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR), plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)

キーワード: 線維芽細胞、組織修復、細胞遊走、ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベータ受容体 (uPAR)、プラスミノゲンアクチベーターインヒビター1 (PAI-1)

はじめに

肺組織には他の組織に比べてウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベータ (uPA) が多く存在し、ガス交換を円滑にしていると考えられている^{1)、2)}。肺炎や肺線維症病変部位では、線維芽細胞が増殖し活発にプラスミノゲンアクチベーターインヒビター-1 (PAI-1) を分泌している^{3)、5)}。肺胞腔の線溶活性は正常時には抑制されており、繊維化病変では PAI-1 の増加によりコラーゲンなどの細胞外マトリックスが肥厚すると考えられている^{4)、5)}。肺線維症や喘息、慢性閉塞性肺疾患患者の痰には、

健常人に比べて炎症性サイトカインと PAI-1 が増加している⁶⁾。PAI-1 は癒痕、慢性間質性腎炎、冠動脈性心疾患、肝硬変や肥満に関連する物質でもある^{3)、7)-11)}。これらの疾患で、PAI-1 が増加することでコラーゲンの蓄積や血液流動性の低下が起これ、病態に影響を与える⁸⁾⁻¹⁰⁾。動物を用いた研究では PAI-1 による線溶抑制が、肺線維症を進行させたことが報告されている^{12)、13)}。しかし、PAI-1 が肺組織の修復や組織再構築にどう関与するかは明らかになっていない。

PAI-1 はセルピンファミリーに属する分子量45

～50kDaの糖タンパク質、セリンプロテアーゼインヒビターであり、多くの細胞から分泌されている^{1), 2), 7)-11)}。PAI-1は、遊離したあるいはuPA受容体(uPAR)に結合したuPAと結合することでその活性を阻害し、細胞表面のuPA活性による細胞外マトリックスの溶解とメタロプロテイナーゼや増殖因子の活性化を介して、特に細胞遊走や組織再構築に関連する¹⁴⁾⁻¹⁷⁾。

またPAI-1遺伝子プロモーター領域の一塩基多型(4Gと5G)の存在が見つかっている^{18), 19)}。4G型PAI-1プロモーターを持つ細胞は、5G型よりも6倍のPAI-1を産生する¹⁹⁾。

血管内皮細胞や肺胞上皮細胞の遊走能が障害肺組織の修復に深く関わるため、本研究では、肺線維芽細胞株WI-38と4G型PAI-1プロモーターを持つヒト肺線維芽細胞KiF²⁰⁾を、ヒト血管内皮細胞株(HUVEC)あるいはヒト肺胞上皮細胞株(A549)と共培養することで、線溶系を介した血管内皮細胞と肺胞上皮細胞の遊走能を検討した。

材料および方法

本研究は、東京医科大学倫理委員会の審査・承認を得て行った。

1. 細胞分離と培養

東京医科大学霞ヶ浦病院における肺がん切除患者の中で同意書を得られた患者の切除組織から肺線維芽細胞を分離した。切除肺組織の正常部位の胸膜下1-2mmの組織を取り、10%イソジン(明治、東京)とPBSで十分に洗浄後細切し、0.1%コラゲナーゼ(和光純薬、東京)溶液を加えて37℃水浴中で振とうして細胞を分離した。30分後コラゲナーゼ溶液をステンレスメッシュで濾過し、濾液に10%牛胎児血清(FBS; Tissue Culture Biologics, Tulare, CA)添加M199培地(シグマ、St Louis, MO)を加え、酵素反応を止めて洗浄した。得られた細胞中の肺胞マクロファージを除くために、10% FBS M199培地に懸濁しプラスチックディッシュ(Coster; Corning, NY)に播種して1時間37℃、5% CO₂インキュベーターで培養した。この操作後、浮遊している細胞を集

め、100 U/mL penicillin, 100μg/mL streptomycin および 2.5μg/mL fungizone (Invitrogen; Carlsbad, CA) 添加10% FBS M199培地で培養した。この培養で活発に増殖する紡錘形で非上皮系の肺線維芽細胞が得られた。この細胞をKiFと命名し、その継代数6-11の細胞を実験に供した²¹⁾。

ヒト由来肺線維芽細胞株WI-38 (IFO50075)、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞株(HUVEC; IFO50271) およびヒト肺胞上皮細胞株A549 (IFO50153)を財団法人ヒューマンサイエンス振興財団研究資源バンクより分株を受けた。培養は10%FBS添加、ダルベッコ変革イーグル培地(DMEM; シグマ)で37℃、5%CO₂湿潤インキュベーターで行った。

2. 線維芽細胞培養上清中PAI-1の定量

二種のヒト肺線維芽細胞、KiFとWI-38細胞を10⁶ cells/dishになるまで増殖させ、0.3 mg/mL牛血清アルブミン(BSA; Boehringer, Indianapolis, IN)添加無血清培地に交換した。6時間後の培養上清を回収し、定量まで-20℃で保存した。培養上清に分泌されたPAI-1量をELISAキット(Hyphen BioMed, Neuville sur Oise, France)を用いて定量した。PAI-1抗体をコートした96-wellプレートに培養上清を加え室温で反応させた。1時間後に、ペルオキシダーゼ結合マウス抗ヒトPAI-1抗体液を加え室温でさらに1時間反応を行った。反応後洗浄し、ペルオキシダーゼ基質を加えて正確に20分間発色させ、0.45 mol/L 硫酸(和光純薬)を添加することで発色反応を停止し、450 nmでの吸光度を測定した。測定値から線維芽細胞10³個あたりのPAI-1量を算出した。

3. 共培養

ヒト肺線維芽細胞KiFおよびWI-38細胞をそれぞれポアサイズ0.4 μmのCell Culture Insert (Coster)に播種しコンフルエントまで増殖させた。一方、HUVECおよびA549細胞をそれぞれ24-wellあるいは6-wellプレートに培養し、これ

らの細胞がコンフルエントに達したときに0.3 mg/mL BSA 添加無血清培地に交換し、Cell Culture Insert に培養した線維芽細胞を各 well に乗せ共培養を行った。

同時に、ヒト肺線維芽細胞の培養上清を HUVEC あるいは A549 細胞に添加して線維芽細胞の分泌物質の影響を観察・測定した。また、4 ng/mL PAI-1 (Hyphen BioMed) 添加培地での HUVEC あるいは A549 細胞の培養も行った。この PAI-1 濃度は KiF 培養上清 PAI-1 濃度から決定した。

4. 分泌および細胞表面 uPA 活性測定

KiF あるいは WI-38 細胞と共培養した HUVEC、A549 細胞の 6 時間培養上清中の uPA 活性を 0.47 μ M 合成基質 (Spectrozyme UK: American Diagnostica; Stamford, CT) を用い、ウロキナーゼ (田辺三菱製薬; 大阪) を標準として定量した。

細胞表面 uPA 活性測定は、共培養した HUVEC あるいは A549 細胞に直接 Spectrozyme UK を添加して定量した。

5. RT-PCR 法による遺伝子発現量の比較

肺線維芽細胞の培養上清を添加したあるいは共培養した HUVEC あるいは A549 細胞中の全 RNA は TRIzol (Invitrogen) およびクロロホルム、イソプロパノール、エタノール (いずれも和光純薬) を用いて TRIzol の操作方法に従って抽出した。抽出した全 RNA は純水に溶解し、その量を 260 nm での吸光度を測定して、等量となる試料を以下の RT-PCR 増幅操作に用いた。

各細胞からの抽出全 RNA 1 μ L 中の uPAR およびグリセルアルデヒド 3 リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) mRNA をそれぞれワンステップ RT-PCR キット (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) を用いて増幅した。ヒト uPAR プライマーセットは、フォワードプライマーは 577 bp から開始する 5'-CTC CAA TGG TTT CCA CAA CAA CGA CAC CTT-3'、リバーズ側配列は 930 bp からの 5'-TGG TTA CAG CCA CTT TTA GTA CAG CAG GAG-3' であり、354 bp の産物

を得た²²⁾。GAPDH プライマーは哺乳類のコンセンサス配列部位を増幅し 540-bp の断片を得た^{23), 24)}。

RT-PCR は、42°C-30分、95°C-5分を 1 サイクル、95°C-1分、55°C-1分、72°C-4分を 25 サイクル、72°C-5分を 1 サイクルの条件で増幅した。その溶液 7 μ L を 4 % アガロース (和光純薬) ゲルで電気泳動後、ゲルを臭化エチジウム (和光純薬) で染色した。電気泳動で分離した分画の密度を Scion Image (Frederick, MD) で解析し、それぞれの試料中の GAPDH mRNA を標準として uPAR mRNA 発現量を比較した。

6. 免疫沈降法

共培養を行った HUVEC、A549 細胞をそれぞれ 1 % Triton X-100, 0.1 % SDS, 1 mM PMSF (いずれも和光純薬) および 25 μ g/mL アプロチニン (田辺三菱製薬) 添加細胞分解液で破碎し、たんぱく質含有量を Lowry 法²⁵⁾で測定した。これらの細胞破碎液は、抗ヒト uPAR 抗体 (American Diagnostica) を結合させたビーズ (Dynal Biotech: Oslo, Norway) を加え、4 °C で一晩反応させた。ビーズに結合した uPAR との複合体を 0.1 M クエン酸緩衝液 (pH 3.1: 和光純薬) で遊離し、9 % ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、ニトロセルロース膜に転移させた。転移膜を抗ヒト β 1-インテグリン抗体 (EXBio: Praha, Czech Republic) と 4 °C 一晩反応させ、洗浄後 ECL Western blotting 試薬 (Amersham Biosciences: Piscataway, NJ) を用いて可視化した。

7. 細胞遊走能の測定

ポアサイズ 3.0 μ m の Cell Culture Inserts の両面をフィブロネクチン (Fibrogenex: Chicago, IL) あるいは I 型コラーゲン (Koken: 東京) でコートし、HUVEC あるいは A549 細胞をコンフルエントまで培養した。これらの細胞の上層に 0.3 mg/mL BSA 添加無血清培地を、KiF、WI-38 細胞いずれかの培養上清を下層に添加し 6 時間培養した後、下層に細胞計数試薬 WST-8 (和光純薬) を添加した 1 時間後 405 nm での吸光度を測定し、

Cell Culture Insert の下層へ遊走した HUVEC あるいは A549 細胞数を計数した。

それぞれの試料測定は triplicate で行った。統計的な比較は Student t test を用い、 p 値 < 0.05 を有意差ありとし、グラフ上の表記は、平均値 \pm SD で行った。

結果

ヒト線維芽細胞の PAI-1 分泌量

肺線維芽細胞は PAI-1 産生細胞であり^{4)-6), 21), 26)}、その遺伝子多型の存在、すなわち活発に PAI-1 を分泌する 4G 型と 5G 型があることがわかっている¹⁸⁾⁻²⁰⁾。本研究で用いた二種のヒト肺線維芽細胞株の PAI-1 分泌量を ELISA 法で測定した (図 1)。PAI-1 分泌量は 4G 型の KiF が 5G 型の WI-38 に比べて 1.6 倍であった。

ヒト血管内皮細胞と肺上皮細胞表面の uPA 活性

細胞表面の uPA 活性は、細胞外マトリックスを破壊して遊走するために重要となるので^{16), 17)}、合成基質を用いて線維芽細胞との共培養による HUVEC と A549 細胞表面の uPA 活性を測定した

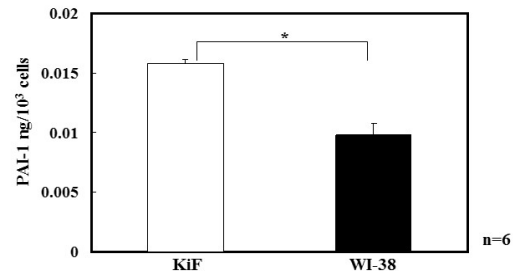


図1 ヒト線維芽細胞のPAI-1分泌量

コンフルエントになった KiF (open bar) と WI-38 (solid bar) 細胞の6時間無血清細胞上清中の PAI-1 量を ELISA 法で測定した。数値は平均値 \pm SD で示し、KiF と WI-38 細胞の分泌量を比較した。*: $p < 0.05$ 。

(図 2)。ヒト肺線維芽細胞の共存、培養上清 (CM) の添加あるいは PAI-1 の添加いずれの培養条件においても、HUVEC および A549 細胞表面の uPA 活性に影響は認められなかった。また、HUVEC および A549 培養上清中への uPA 活性は認められなかった (data not shown)。

共培養による uPAR mRNA 発現

肺線維芽細胞が分泌する大量の PAI-1 が HUVEC と A549 細胞表面の uPA 活性に影響を与えなかったため、細胞表面に uPA 活性を維持するために必要な受容体²⁷⁾⁻²⁹⁾、uPAR mRNA 発現量を RT-PCR 法で半定量をした (図 3)。

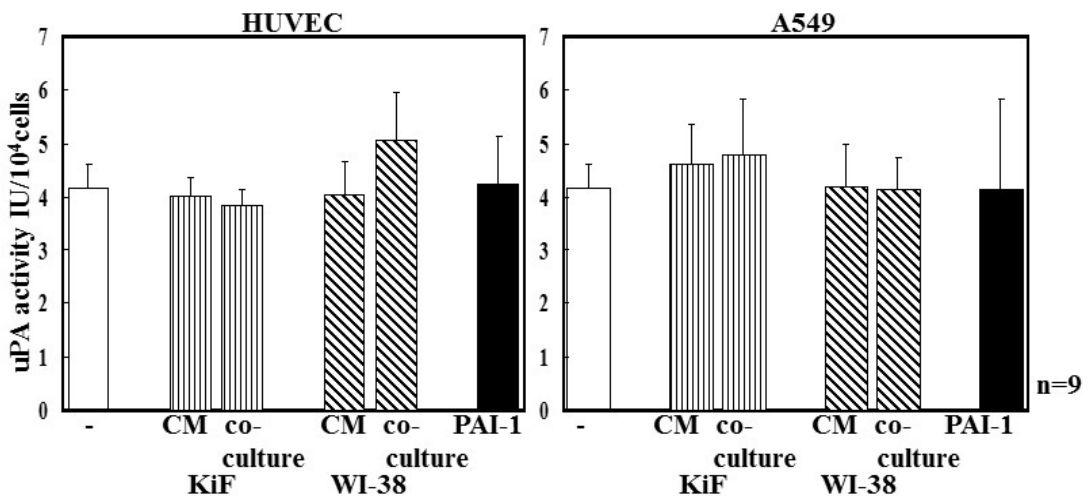


図2 細胞表面のuPA活性

HUVEC (左) と A549 細胞 (右) を KiF (striped bars)、WI-38 (dashed bars) と共培養 (co-culture)、あるいは線維芽細胞の6時間培養上清をそれぞれ添加 (CM) して培養後 Spectrozyme UK を用いて uPA 活性を測定した。また HUVEC と A549 細胞に 4 ng/mL PAI-1 (solid bar) を加えて培養後の細胞表面 uPA 活性も測定した。数値は平均値 \pm SD で示し、共培養も培養上清の添加無しでの培養群 (open bars) と比較した。*: $p < 0.05$ 。

HUVEC 細胞に PAI-1 添加や KiF 細胞の共培養、培養上清 (CM) 添加とともに uPAR mRNA 発現に影響を与えなかったが、WI-38 細胞との共培養で有意な uPAR mRNA 発現が増加した。一方 A549 細胞は、KiF 細胞共存が uPAR mRNA 発現を刺激したが、WI-38 細胞共存は uPAR mRNA 発現抑制的に働き、PAI-1 添加では変化がなかった。

図 3 で肺線維芽細胞との共培養が uPAR 発現に影響することが確認されたので、線維芽細胞が分泌する PAI-1 と関連するのかを確認するために、HUVEC と A549 細胞破碎液中の uPAR と $\beta 1$ -インテグリン複合体³⁰⁾⁻³²⁾ の存在を免疫沈降後のウェスタンブロット法で検討した (図 4)。100 kd 以上の高分子量でバンドを認めたことから $\beta 1$ -インテグリン-uPAR-uPA-PAI-1 複合体が認められた。すなわち HUVEC、A549 細胞いずれでも uPAR は $\beta 1$ -インテグリンと共存していた。

共培養の HUVEC および A549 遊走への影響

細胞表面に局在する uPA は周囲の細胞外マトリックスを分解し、組織修復時の遊走に関与している^{16)-17), 27)-29)}。障害組織では線維芽細胞が増殖し PAI-1 分泌を活発に行い始める³⁾⁻⁶⁾。そこで主

な細胞外マトリックスであるフィブロネクチンと I 型コラーゲンをコートした Cell Culture Insert 上に培養した HUVEC および A549 細胞の下層に肺線維芽細胞の培養上清を添加して培養した後、HUVEC および A549 細胞の下層への遊走をそれぞれ測定した (図 5)。HUVEC 細胞の遊走は、フィブロネクチンコート群では WI-38 培養上清が、I 型コラーゲンコート群では KiF 培養上清が遊走を刺激した。フィブロネクチン、I 型コラーゲン上の A549 細胞は、WI-38 培養上清の存在で活発に遊走したが、KiF 培養上清では遊走促進効果を認めなかった。また KiF および WI-38 培養上清の効果を比較すると、HUVEC、A549 細胞ともフィブロネクチンコート群では有意差は認められなかったが、I 型コラーゲンコート群で HUVEC 細胞では KiF 培養上清が、A549 細胞では WI-38 培養上清が有意に遊走を刺激した。フィブロネクチン、I 型コラーゲン両コート群で PAI-1 添加は、A549 細胞を有意に遊走させたが、HUVEC 細胞の遊走は抑制した。

考察

線維芽細胞は間質細胞の一つであり、細胞外マトリックスに囲まれて存在し、炎症時には線維芽

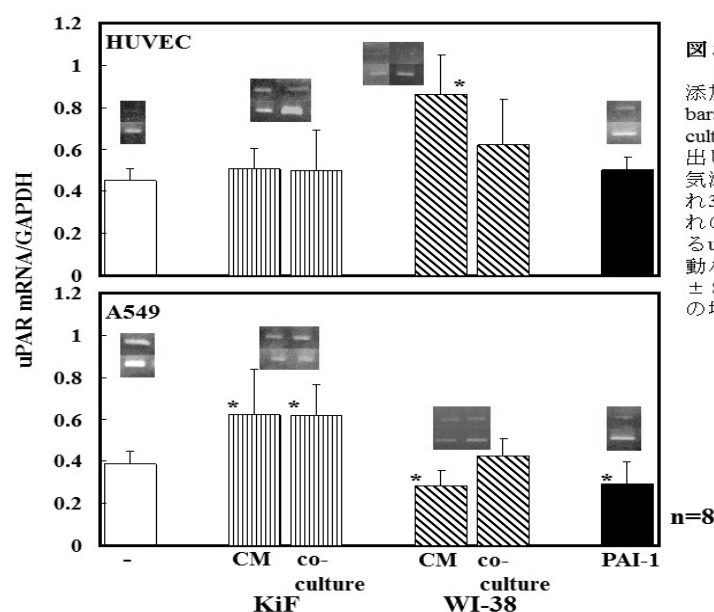


図 3 uPAR mRNA 発現

HUVEC (上) と A549 (下) を PAI-1 (solid bars) 添加、KiF (striped bars) あるいは WI-38 (dashed bars) と 6 時間共培養 (CM: 培養上清添加、co-culture: 線維芽細胞と共培養) 後、全 RNA を抽出し uPAR mRNA を RT-PCR 法で増幅した。電気泳動により uPAR と GAPDH mRNA をそれぞれ 359、540 bp に認め、画像解析によりそれぞれのバンドを数値化後、GAPDH mRNA に対する uPAR mRNA 量をグラフに示した。各電気泳動バンドをグラフ内に示した。数値は平均値 \pm SD で示し、共培養も培養上清の添加無しでの培養群 (open bars) と比較した。* $p < 0.05$

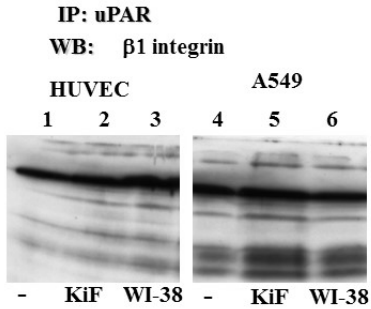


図4 免疫沈降法によるuPAR複合体の検出

HUVEC (lanes 1, 2, 3) および A549 (lanes 4, 5, 6) は、無血清培地 (lanes 1, 4)、KiF培養上清 (lanes 2, 5) あるいは WI-38培養上清 (lanes 3, 6) を添加し培養した。6時間後それぞれの細胞を破碎し、細胞破碎液に抗 uPAR 抗体を反応させ、反応複合体(uPAR-抗 uPAR 抗体)を沈降させた。この複合体と $\beta 1$ -インテグリンの共存を Western blot法で可視化した。分子量100 kD を▲で示した。

-: no addition

KiF: with KiF CM

WI-38: with WI-38 CM

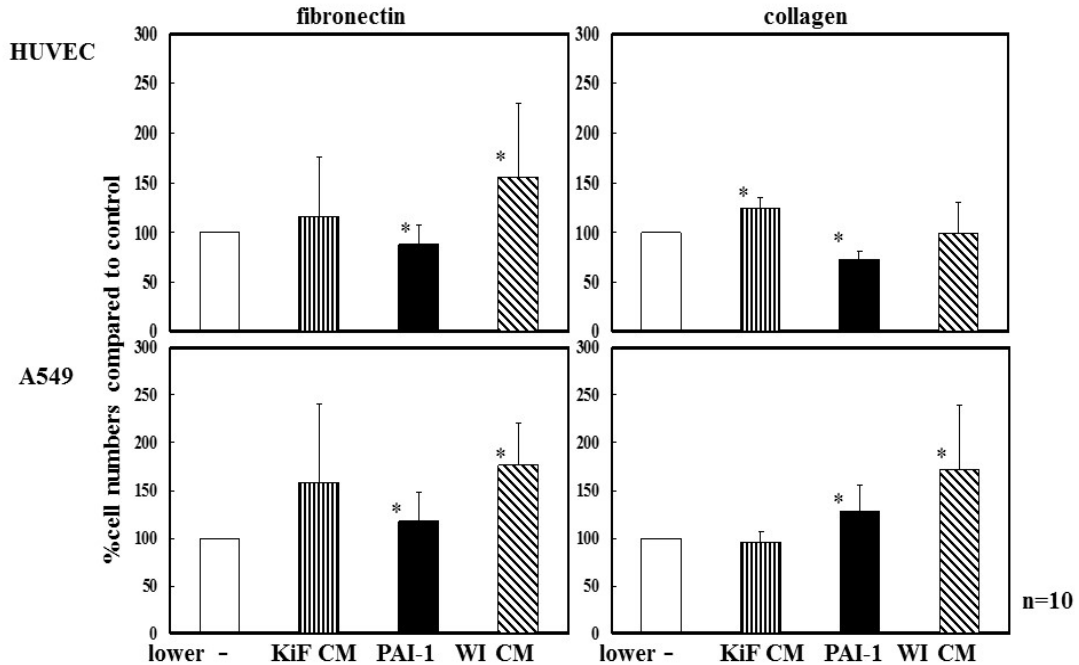


図5 血管内皮細胞と肺胞上皮細胞の遊走測定

KiF (striped bar), WI-38 (dashed bar)培養上清 あるいは PAI-1 (solid bar) をフィブロネクチン(左)あるいは型コラーゲン(右)をコートした Cell Culture Inserts にそれぞれ培養した HUVEC (上段) あるいは A549 (下段) の下層に添加した。6時間後下層に遊走した細胞数を WST-8 で計数した。測定した吸光度は下層に培養上清や PAI-1 を添加しない群 (open bar) に対する % で示し、数値は平均値 \pm SD で示した。*: $p < 0.05$ 。

細胞が増殖して、活発に PAI-1 を分泌する³⁾⁻⁵⁾。一方、血管内皮細胞や肺胞上皮細胞表面の線溶酵素が細胞外マトリックスを溶解し、これらの細胞の遊走と組織修復に関与している¹⁶⁾⁻¹⁷⁾。周囲の細胞外マトリックスの溶解や増殖因子等の活性化には、細胞表面で uPAR と結合した uPA が主に働

いている^{16)-17), 27)-29)}。

また PAI-1 遺伝子上流プロモーター領域の一塩基多型の存在が報告された¹⁸⁾⁻²⁰⁾。KiF および WI-38 細胞はそれぞれ deletion (4G) 型と insertion (5G) であることがわかっている²⁰⁾。KiF 細胞は PAI-1 を活発に培養上清へ分泌していたが、WI-

38 細胞はこれよりも少ない量の PAI-1 を分泌していた (図 1)。コラーゲンの肥厚を伴う疾患において PAI-1 は鍵となる物質であり^{33, 7)}、PAI-1 分泌量の異なる二種のヒト肺線維芽細胞あるいはその培養上清とヒト血管内皮細胞 (HUVEC) あるいは肺胞上皮細胞 (A549) との共培養による PAI-1 および線溶系を介する影響を検討した。HUVEC、A549 両細胞表面の uPA 活性は、KiF および WI-38 いずれの細胞との共培養や培養上清添加でも変化を認めなかった (図 2)。しかし HUVEC あるいは A549 培養上清中への uPA 活性は認められなかった。これらの結果はこれまでの報告と同様に、ヒト肺線維芽細胞から分泌される PAI-1 は、HUVEC と A549 細胞培養上清中の uPA 活性を阻害する可能性はあるが、細胞表面の uPA 活性には影響を与えないと考えられた³³⁾⁻³⁴⁾。

uPA 活性を細胞表面に局限させるためには、細胞表面の uPAR と結合する必要があるため²⁷⁾⁻²⁹⁾、HUVEC と A549 細胞中の uPAR mRNA 発現へのヒト肺線維芽細胞との共培養の影響を検討した。HUVEC の uPAR mRNA 発現は、5G 型の WI-38 細胞の培養上清添加で増加し、A549 細胞は 4G 型 KiF 細胞の培養上清添加および KiF 細胞との共培養で uPAR mRNA 発現が増加した (図 3)。しかし PAI-1 分子の添加による uPAR mRNA 発現は、HUVEC 細胞では有意差がみられず、A549 細胞では抑制された。uPA は細胞貫通ドメインを持たないため細胞表面でインテグリンと共存している³⁰⁾⁻³²⁾。そこで抗 uPAR 抗体による免疫沈降後に抗 β 1-インテグリン抗体を用いたウェスタンブロット法による検討を行い、HUVEC および A549 両細胞と uPAR は β 1-インテグリンと共存していることを確認した (図 4)。細胞表面の PAI-1-uPA-uPAR-インテグリン複合体は、細胞内に取り込まれてリソゾームで分解される³⁵⁾。この複合体中の PAI-1 は、線溶阻害活性発現とは無関係であり、むしろ組織修復や組織再構築に影響すると考えられている^{16), 17)}。HUVEC および A549 両細胞表面の uPA 活性は、KiF、WI-38 いずれのヒト肺線維芽細胞との共培養で刺

激を受けなかったが (図 2)、HUVEC および A549 培養上清中の uPA 活性とは異なり、細胞表面 uPA 活性が測定可能であったのはこのためであると考えられる。

HUVEC と A549 細胞に uPAR-インテグリン複合体の存在を確認できたので、これらの細胞のヒト肺線維芽細胞培養上清への遊走能を測定した (図 5)。I 型コラーゲンコート群で、PAI-1 合成が活発な KiF 培養上清添加により HUVEC 細胞の遊走は有意に刺激されたが、A549 細胞の遊走には変化がなく、WI-38 培養上清添加は、HUVEC 細胞の遊走に影響を与えず、A549 細胞の遊走を有意に増加させた。一方フィブロネクチンコート上では、HUVEC および A549 細胞の遊走はともに KiF 培養上清添加で有意差を認めず、WI-38 培養上清添加により HUVEC および A549 細胞の遊走が有意に増加した。PAI-1 分子のみの添加での HUVEC、A549 細胞の遊走は、I 型コラーゲンおよびフィブロネクチンコート群ともに HUVEC で抑制、A549 細胞では刺激された。これらの結果から、ヒト肺線維芽細胞培養上清中の PAI-1 は、直接的に HUVEC や A549 細胞の遊走能を刺激する作用を有していないと考えられる。しかし、ヒト肺微小血管内皮細胞を単離する過程で線維芽細胞を完全に除去すると、内皮細胞の増殖が低下することを経験している^{33), 34)}。また Sachs BD 等が、PAI-1 を含む複合体がシグナル伝達を調節している可能性を報告していることから³⁶⁾、PAI-1 が間接的に血管内皮細胞や肺胞上皮細胞の遊走に関与していると考えられる。

健常者の肺胞には、他組織に比べて大量の uPA が存在し、肺胞表面に分泌された uPA が侵入した異物処理を行うことで円滑な肺機能を維持していると考えられている^{1), 2)}。uPA、uPAR および PAI-1 は、プラスミノゲン、メタロプロテイナーゼや増殖因子の活性化を介して、創傷治癒時の細胞遊走に深く関与している^{16), 17)}。

正常な肺機能を維持するために複数のたんぱく質分解酵素とその阻害剤の厳格なコントロールが必須であり、Chuang-Tsai 等は PAI-1 欠損マウスにブレオマイシン処理をしても繊維化が抑制され

ることを報告している¹³⁾。筆者等のグループはヒト肺線維芽細胞が大量の PAI-1 を産生するが、uPA 産生量はヒト肺微小血管内皮細胞に比べてわずかであることを報告した^{33), 34)}。これらの報告と本研究結果から、ヒト繊維芽細胞株 KiF および WI-38 細胞が産生する PAI-1 は、その活性の有無にかかわらず組織再構築に関与すると考えられる。また、uPAR と共存するインテグリンの種類や細胞外マトリックスの組成には細胞特異性があるため³⁰⁾⁻³²⁾、HUVEC と A459 細胞の遊走能に差があったと推測できる。肺胞上皮細胞や血管内皮細胞が損傷部位に遊走してゆくことが肺組織の修復に重要であることから、周囲組織細胞に存在する線維芽細胞の PAI-1 産生を介して大きな影響を及ぼすと考えられる。

謝辞

東京医科大学霞ヶ浦病院外科・齋藤誠、古川欣也両教授の肺組織供与に深く感謝いたします。

引用文献

- 1) P. H. Quax, C. M. van den Hoogen, J. H. Verheijen, T. Padro, R. Zeheb, T. D. Gelehrter, T. J. van Barkel, J. Kuiper, and J. J. Emeis, "Endotoxin induction of plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type-1 mRNA in rat tissues in vivo," *J Biol Chem* 265: 15560-15563, 1990.
- 2) Chapmen HA Jr, Stone OL, Vavrin Z (1984) Degradation of fibrin and elastin by intact human alveolar macrophages in vitro. Characterization of a plasminogen activator and its role in matrix degradation. *J Clin Invest* 73: 806-815.
- 3) Wu Y, Zhang Q, Ann DK, Akhondzadeh A, Doung HS, Messadi DV, Le AD (2004) Increased vascular endothelial growth factor may account for elevated level of plasminogen activator inhibitor-1 via activating ERK1/2 in keloid fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol* 286: C905-C912.
- 4) Geiser T (2003) Idiopathic pulmonary fibrosis —a disorder of alveolar wound repair? *Swiss Med Wkly* 133: 405-411.
- 5) Chambers RC (2003) Role of coagulation cascade proteases in lung repair and fibrosis. *Eur Respir J* 22: 33s-35s.
- 6) Xiao W, Hsu Y-P, Ishizuka A, Kirikae T, Moss RB (2005) Sputum cathelicidin, urokinase plasminogen activation system components, and cytokines discriminate cystic fibrosis, COPD, and asthma inflammation. *Chest* 128: 2316-2326.
- 7) Dworkin LD, Gong R, Tolbert E, Centracchio J, Yano N, Zanolli AR, Esparza A, Rifai A (2004) Hepatocyte growth factor ameliorates progression of interstitial fibrosis in rats with established renal injury. *Kidney Int* 65: 409-419.
- 8) Yamamoto K, Takeshita K, Kojima T, Takamatsu J, Saito H (2005) Aging and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) regulation: implication in the pathogenesis of thrombotic disorders in the elderly. *Cardiovasc Res* 66: 276-85.
- 9) Margaglione M, Cappucci G, d'Addetta M, Colaizzo D, Giuliani N, Vecchione G, Msacolo G, Grandone E, Di Minno G (1998) PAI-1 plasma levels in a general population without clinical evidence of atherosclerosis. Relation to environmental and genetic determinants. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18: 562-567.
- 10) de Gouville A-C, Boullay V, Krysa G, Pilot J, Brusq J-M, Lorient F, Gauthier J-M, Papworth SA, Laroze A, Gellibert F, Huet S (2005) Inhibition of TGF- β signaling by an ALK5 inhibitor protects rats from dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis. *Br J Pharmacol* 145: 166-177.
- 11) Fain JN, Madan AK (2005) Insulin enhances vascular endothelial growth factor, interleukin-8, and plasminogen activator inhibitor 1 but not interleukin-6 release by human adipocytes. *Met Clin Exp* 54: 220-226.

- 12) Hattori N, Mizuno S, Yoshida Y, Chin K, Mishima M, Sisson TH, Simon RH, Nakamura T, Miyake M (2004) The plasminogen activator system reduces fibrosis in the lung by a hepatocyte growth factor-dependent mechanism. *Am J Pathol* 164: 1091-1098.
- 13) Chuang-Tsai S, Sisson TH, Hattori N, Tsai CG, Subbotina NM, Hanson KE, Simon RH (2003) Reduction in fibrotic tissue formation in mice genetically deficient in plasminogen activator inhibitor-1. *Am J Pathol* 163: 445-52.
- 14) Buckley S, Warburton D (2002) Dynamics of metalloproteinase-2 and-9, TGF- β , and uPA activities during normoxic vs. hyperoxic alveolarization. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283: L747-L754.
- 15) Molner C, Buratti T, Wiedermann CJ, Tilg H (2000) Hepatocyte growth factor plasma levels after myocardial infarction are not affected by recombinant tissue-type plasminogen-activator therapy. *Eur Cytokine Netw* 11: 87-90.
- 16) Shetty S, Idell S (2001) Urokinase induces expression of its own receptor in Beas2B lung epithelial cells. *J Biol Chem* 276: 24549-24556.
- 17) Idell S (2003) Coagulation, fibrinolysis, and fibrin deposition in acute lung injury. *Crit Care Med* 31: S213-S220.
- 18) Dawson SJ, Wiman B, Hamsten A, Green F, Humphries S, Henney AM (1993) The two allele sequences of common polymorphism in the promoter of the plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene respond differently to interleukin-1 in HepG2 cells. *J Bio Chem* 268: 10739-10745.
- 19) Kim KK, Flaherty KR, Long Q, Hattori N, Sisson TH, Colby TV, Travis WD, Martinez FJ, Murray S, Simon RH (2003) A plasminogen activator inhibitor-1 promoter polymorphism and idiopathic interstitial pneumonia. *Mol Med* Jan/Feb: 52-56.
- 20) Takahashi K, Kobayashi K, Mitsui M, Odaka T, Nakamura H, Matsuoka T (2008) Effect of Dexamethasone treatment on PAI-1 production by human lung fibroblasts. *Tiss. Cult. Res. Commun* 27: 149-159.
- 21) Mitusi M, Takahashi K, Kobayashi K, Matsuoka, T. (2007) Human lung fibroblasts cultivated with HFDM-1 reduced both the secreted PAI-1 and the surface uPA activities. *Tiss. Cult. Res. Commun.* 26: 133-142.
- 22) Roldan AL, Cubellis MV, Masucci MT, Behrendt N, Lund LR, Dano K, Appella E, Blasi F (1990) Cloning and expression of the receptor for human urokinase plasminogen activator, a central molecule in cell surface, plasmin dependent proteolysis. *EMBO J* 9: 467-474.
- 23) Fabry S, Lang J, Niermann T, Vingron M, Hensel R (1989) Nucleotide sequence of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene from the mesophilic methanogenic archaeobacteria *Methanobacterium bryantii* and *Methanobacterium formicicum*. Comparison with the respective gene structure of the closely related extreme thermophile *Methanothermus fervidus*. *Eur J Biochem* 179: 405-13.
- 24) Vincent S, Fort P (1990) Nucleotide sequence of hamster glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase mRNA. *Nucleic Acids Res* 18: 3054.
- 25) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.
- 26) Watanabe O, Takahashi K, Kishi K, Nakamura H, Hashimoto T, Narushima K, Matsuoka T. (2001) The effect of hypoxia on the expression of the urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 by human pulmonary fibroblasts. *J Tokyo Med Univ* 59: 447-454.
- 27) Plesner T, Behrendt N, Ploug M (1997) Structure, function and expression on blood and bone marrow cells of the urokinase-type plasminogen activator receptor, uPAR. *Stem Cells* 15: 398-408.

- 28) Tarui T, Andronicos N, Czekay RP, Mazar AP, Bdeir K, Parry GC, Kuo A, Loskutoff DJ, Cines DB, Takada Y (2003) Critical role of integrin $\alpha_5\beta_1$ in urokinase (uPA)/urokinase receptor (uPAR, CD87) signaling. *J Biol Chem* 278: 29863-29872.
- 29) Zhang G, Kim H, Cai X, López-Guisa JM, Alpers CE, Liu Y, Carmeliet P, Eddy AA (2003) Urokinase receptor deficiency accelerates renal fibrosis in obstructive nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 14: 1254-1271.
- 30) Peng Q, Lai D, Nguyen TTB, Chan V, Matsuda T, Hirst SJ (2005) Multiple β_1 integrins mediate enhancement of human airway smooth muscle cytokine secretion by fibronectin and type I collagen. *J Immunol* 174: 2258-2264.
- 31) Vassallo R, Kottom TJ, Standing JE, Limper AH (2001) Vitronectin and fibronectin function as glucan binding proteins augmenting macrophage receptors to *pneumocystis carinii*. *Am J Respir Cell Mol Biol* 25: 203-211.
- 32) Nguyen TTB, Ward JPT, Hirst SJ (2005) β_1 -integrins mediate enhancement of airway smooth muscle proliferation by collagen and fibronectin. *Am J Respir Crit Care Med* 171: 217-223.
- 33) Takahashi K, Uwabe Y, Sawasaki Y, Kiguchi T, Nakamura H, Kashiwabara K, Yagyu H, Matsuoka T (1998) Increased secretion of urokinase-type plasminogen activator by human lung microvascular endothelial cells. *Am J Physiol* 275: L47-L54.
- 34) Takahashi K, Kiguchi T, Sawasaki Y, Karikusa F, Nemoto N, Matsuoka T, Yamamoto M (1992) Lung capillary endothelial cells produce and secrete urokinase-type plasminogen activator. *Am J Respir Cell Mol Biol* 7: 90-94.
- 35) Degryse B, Neels JG, Czekay R-P, Aertgeerts K, Kamikubo Y, Loskutoff DJ (2004) The low density lipoprotein receptor-related protein is a motogenic receptor for plasminogen activator inhibitor-1. *J Biol Chem* 279: 22595-22604.
- 36) Sachs BD, Baillie GS, McCall JR, Passino MA, Schachtrup C, Wallace DA, Dunlop AJ, MacKenzie KF, Klussmann E, Lynch MJ, Sikorski SL, Nuriel T, Tsigelny I, Zhang J, Houslay MD, Chao MV, Akassoglou K (2007) p75 neurotrophin receptor regulates tissue fibrosis through inhibition of plasminogen activation via a PDE4/cAMP/PKA pathway. *J Cell Biol* 117: 1119-1132.

要旨

肺組織損傷部位では、線維芽細胞が増殖し活発に PAI-1 を分泌する。この PAI-1 は線溶系の uPA と結合して uPA 活性を阻害する。線維芽細胞との共培養により、肺胞上皮細胞あるいは血管内皮細胞の uPA 受容体である uPAR 産生量、これらの細胞表面における uPA 活性および遊走を検討した。肺胞上皮細胞、血管内皮細胞表面の uPA 活性は線維芽細胞の共存によって抑制されなかったが、uPAR mRNA の発現と遊走は線維芽細胞培養上清添加で刺激された。これらのことから、障害組織で増殖している線維芽細胞が分泌する PAI-1 が、肺組織細胞の修復や組織再構築に関わっていると考えられた。

(平成29年9月11日受稿)