◆原 著◆

培養ヒト子宮内膜線維芽様細胞の plasminogen activator とその inhibitor 産生に及ぼす性 steroid hormone の影響

浅川 真也子*

Influence of Sex Steroid Hormones on Production of Plasminogen Activator and Its Inhibitor in Human Endometrial Fibroblastoid Cells in Vitro

Mayako ASAKAWA*

Key words: tissue type plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor, endometrial fibroblastoid cell, cell culture, sex hormone

The endometrium is a site of high fibrinolytic activity associated with menstruation, nidation of ovum and wound healing. To investigate the fibrinolytic system in the endometrium and the influence of sex steroids on it, tissue type plasminogen activator (t-PA) antigen, plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) antigen and PA activity in the conditioned medium of the endometrial fibroblastoid cells (EF) cultured in the presence of these hormones were assayed. The growth rates on the fibrin gel substrate were also assayed.

t-PA synthesis and PA activity were enhanced by estrogen. PAI-1 synthesis was increased and PA activity was suppressed by progesterone (P), estradiol (E_2) + P, testosterone, dexamethasone and indomethacine. The cells were well proliferated on the fibrin substrate and no aggregation were observed in the case of high level PAI-1. E_2 brought about cell aggregation and cessation of growth due to the substrate degradation accelerated by t-PA.

It was suggested that the fibrinolytic system in the endometrium was controlled by sex steroids through the balance of PA and PAI synthesis.

はじめに

子宮内膜の plasminogen activator (PA) 活

性は、子宮腔内分泌物、月経血、子宮内膜組織
やその培養上清を用いた組織レベルの研究にお
いて、性周期や妊娠、そして各種子宮内膜疾患

* 東邦大学医学部第一産科婦人科学教室〔〒143 東京都大田区大森西 6-11-1〕: The First Department of Obstetrics and Gynecology, Toho University School of Medicine, 6-11-1 Omori-nishi Ota-ku Tokyo, Japan 受付: 1990. 10. 16, 受理: 1990. 11. 17.

で変動することが多数報告されている¹⁾⁻⁶⁾。しかし細胞レベルでの研究はほとんどみられない。

子宮内膜は上皮と間質より構成されているが、性ステロイドホルモンに対して最も多様な変化がみられるのは子宮内膜間質であり、月経時の内膜剥奪、内膜出血、それに妊卵の着床、侵入などは、子宮内膜上皮での出来事というよりむしろ内膜間質の変化としてとらえられる。PA 活性は、組織が産生する PA と PA inhibitor (PAI) の量的バランスによって変化が生じ、子宮内膜組織においては、上皮よりも間質の関与が重要であると考えた。本研究では、子宮内膜組織の大部分を占める間質の線維芽様細胞 (endometrial fibroblastoid cell: EF) を各種ステロイドホルモンなど試薬添加条件下で培養し、培養液中に放出される組織型 PA (t-PA) とその抑制物質である PAI-1 の抗原量を定量し、さらに PA 活性も測定した。また細胞を fibrin 上で培養する生体モデルを作成し、担体の線溶に伴って変化する細胞の増殖率と形態を観察し、子宮内膜間質の線溶系に対する役割について比較検討した。

材料および方法

1) 子宮内膜間質由来線維芽様細胞の培養

正常月経周期婦人の子宮内膜を鈍的に採取し、それを 0.25% trypsin 溶液中で約 1 mm³ の組織片に細切した後、機械的刺激を加えながら 20 min, 37°C にて加温した。その細胞混濁液を 800 rpm, 5 min 遠沈した。上清を排除し pellet に培養液として 10% FBS (GIBCO) 加 BME (Flow Lab Co.) pH 7.2 を適量加えて細胞浮遊液を作成し、25 cm² culture flask (Corning) にて、37°C 閉鎖系静置単層培養し、初代培養とした。

初代培養時には colony を形成する上皮様細胞の混入を認めたが、その細胞は線維芽様細胞に比べ担体接着度は弱く、trypsin 処理にて容易に除去することができた。

2) fibrin plate の作成

2 ml の 20 mM Hepes-3 mM CaCl₂-saline (pH 7.2) (Hepes-Ca-Saline) を入れた 24

well plate (Nunc) の各 well に、bovine fibrinogen から Donnelly ら⁷⁾ の方法にしたがって 1% 蛋白濃度に調整した fibrin monomer を 200 μ l 静かに注入した。37°C, 3 hr 静置後、上清を静かに吸引排除し、前もって調整した活性化 XIII 因子 (正常血漿相当濃度フィブrogamin, Hoechst) を fibrin layer に重層し、37°C, 3 hr 加温して架橋 fibrin plate を作成した。fibrin layer を作成した plate を Hepes-Ca-Saline 中に浸し、24 hr 洗浄した。以上の操作はすべて無菌的に行った。

3) 使用薬剤

添加試薬の最終濃度は tranexamate 3 mM (Trans), histamine 1 μ M (Hist), indomethacine 10 μ M (Ind), dexamethasone 0.1 μ M (Dex), estrone 0.1 μ M (E₁), estradiol 0.1 μ M (E₂), estriol 0.1 μ M (E₃), progesterone 0.1 μ M (Prog), E₂+Prog 0.05 μ M+0.1 μ M, testosterone 0.1 μ M (Test) である。

4) plastic substrate 上培養

subculture で confluent に達した EF を trypsin 処理にて分散し、培養液で細胞浮遊液を作成し、生細胞数算定後、20% FBS 加 BME 溶液で 4 $\times$ 10⁴ cells/ml に調整した。その細胞浮遊液を終濃度の 2 倍濃度に調整した各試薬溶液 1 ml を入れた 24 well plate の各 well に、それぞれ 1 ml 注入し 37°C, 5% CO₂ in air にて開放系静置培養した。

5) fibrin substrate 上培養

前もって作成した各 well の fibrin plate 上に終濃度の 2 倍に調整した試薬 1 ml と 20% FBS, 0.05 cu/ml bovine plasminogen (Plg) 加 BME を培養液とし 4 $\times$ 10⁴ cells/ml となるように調整した均一細胞浮遊液 1 ml を移植し、37°C, 5% CO₂ in air にて開放系静置培養した。なお Plg 無添加培養は、リジンセファロースカラム処理によって FBS 中の Plg を除去した Plg free FBS を添加した。

6) 細胞数算定法

plastic 上培養細胞に対しては、well 内の培養液を排除後、0.25% trypsin 200 μ l 添加して均一細胞浮遊液を作成し、それを血球計算板 (Neubauer 改良型) にて算定した。また fi-

brin plate 上培養細胞に対しては、0.25% trypsin 2 ml にて細胞浮遊液を作成した。この浮遊液に適量の 0.1% crystal violet/0.1 M クエン酸溶液を添加し、均一細胞核浮遊液を作成後、その核数を血球計算板にて算定した。経時的細胞数算定の結果より細胞増殖曲線を作成した。なお fibrin 上培養では増殖細胞の形態変化を経時的に写真撮影した。

7) t-PA 抗原, PAI-1 抗原, PA 活性測定用細胞培養

細胞を 25×10^4 cells/ml となるように 10% FBS 加 BME で調整し、96 well microtiter plate (Nunc) の各 well に 200 μ l 移植して、37°C, 5% CO₂ in air にて開放系静置培養した。培養 48 hr 後の充分に confluent な細胞層を 0.5% bovine serum albumin (BSA: SIGMA) 加 BME 250 μ l を 3 回添加と排液を繰り返して洗浄した。3 回目の洗浄終了後、同培養液 100 μ l および最終濃度の 2 倍に調整した各試薬添加 BME 100 μ l を加え、37°C, 5% CO₂ in air にて 72 hr 開放系静置培養した。

8) t-PA 抗原, PAI-1 抗原, PA 活性測定

72 hr 培養後の conditioned medium の t-PA 抗原と PAI-1 抗原を EIA (Tint Elize t-PA, Tint Elize PAI-1, Biopool) にて測定した。培養液中の PA 活性は、fibrin clot lysis 法によって測定した。

結 果

1) plastic 上培養での各試薬添加の影響

plastic substrate 上で細胞増殖の経時的变化を試薬無添加群を対照とし、一定濃度の添加各試薬別に検討した。Fig. 1 は各条件下で培養した細胞の増殖曲線である。24 hr 培養で対数的増殖期に入り、96 hr でプラトーとなった。その増殖度はいずれの試薬条件でも対照とほぼ同じで、添加試薬の細胞増殖に及ぼす影響は plastic 上ではないことを確認した。

2) 各試薬添加培養での fibrin 担体の線溶と増殖細胞の経時的变化 (Fig. 2)

Plg 非存在下あるいは Plg (終濃度 0.025 cu/ml) 存在下で Trans または Ind 添加培養では、96 hr 以上経過しても fibrin の溶解は全く観察されず、96 hr 培養後の細胞数はそれぞれ 9.8×10^4 , 10.2×10^4 , 10.1×10^4 であった (Fig. 3)。試薬無添加 Plg 添加の対照では、細胞が増殖した 48 hr 以降より fibrin の溶解が始まり、96 hr の細胞数は 6×10^4 であった (Fig. 4)。Hist 添加培養では、線溶は生じるものの対照に比べ軽度で、培養 96 hr においては 8.5×10^4 と緩徐な増殖を示した。Dex, E₂ + Prog, Prog, Test 添加培養では、Trans と同様に線溶を認めず、96 hr 培養の細胞数はそれぞれ 10.1×10^4 , 9.8×10^4 , 9.2×10^4 , 9.9×10^4 と対数的な増殖を示した (Fig. 5)。E₂ を添加した場合は、48 hr で線溶による強い fibrin の

Fig. 1 Growth curve of EF cultured on the plastic dish with various reagents.

Fig. 2 Effect of various reagents on the growth of EF cultured on the fibrin substrate.

Fig. 3 EF proliferated on the fibrin substrate in Plg free control at 120 hr ($\times 200$). Good growth was observed also in the case of tranexamate and indomethacine.

Fig. 4 EF on the fibrin substrate in the presence of Plg with no reagents. Cells were aggregated at 72 hr ($\times 200$).

溶解を認め細胞はほとんど集塊となり、培養 72 hr の細胞数は 2.5×10^4 で増殖停止となった (Fig. 6).

3) t-PA および PAI-1 抗原と PA 活性との関係 (Table 1)

1. t-PA 抗原量

各種試薬添加培養の培養液中に放出された t-PA 抗原量は、対照の 25.8 ± 3.77 ng/ml (平均 $\pm$ SD, $n=5$) と比較して、 E_2 : 37.0 ± 3.56 ng/ml, E_3 : 34.1 ± 1.59 ng/ml と有意に高値であった ($P < 0.01$). その他の試薬は、Ind: 25.2 ± 10.8 , Hist: 28.0 ± 8.14 , Dex: 29.4 ± 8.11 , E_1 : 32.3 ± 8.13 , Prog: 28.3 ± 3.11 ,

Fig. 5 EF grown on the fibrin substrate in the presence of Plg with dexamethasone at 120 hr ($\times 200$). Good growth was observed also in the case of progesterone, estradiol+progesterone and testosterone.

Fig. 6 EF cultured on the fibrin substrate in the presence of Plg with estradiol for 72 hr ($\times 200$). The cells were almost aggregated.

Table 1 Quantities of t-PA antigen, PAI-1 antigen, and PA activity in the conditioned medium of EF with various reagents at 72hr. PA activities were determined by clot lysis time calibrated with Rec. t-PA (Mitsubishi Kasei).

	control	indome thacine	histamine	dexame thasone	estrone	estradiol	estriol	estradiol + proges terone	proges terone	testos terone
t-PA antigen Mean ng/ml (S.D.)	25.8 (3.77)	25.8 (10.8)	28.0 (8.14)	29.4 (8.11)	32.3 (8.13)	37.0* (3.56)	34.1* (1.59)	21.1 (3.01)	28.3 (3.11)	23.3 (2.30)
PAI-1 antigen Mean ng/ml (S.D.)	28.0 (2.64)	39.5* (2.45)	26.0 (2.71)	67.0* (6.19)	22.0** (2.73)	28.5 (5.18)	30.0 (2.74)	40.0* (3.08)	37.0* (2.92)	71.0* (1.40)
PA activity Mean ng/ml (S.D.)	10.1 (1.34)	4.32* (0.26)	16.0* (1.62)	4.75* (0.31)	26.6* (1.66)	37.3* (2.77)	28.3* (2.77)	2.15* (0.16)	6.40* (0.57)	2.85* (0.07)

Mean ($\pm$ SD, n=5)

* $p < 0.01$

** $p < 0.02$

Test: 23.3 ± 2.30 , $E_2 + \text{Prog}$: 21.1 ± 3.01 ng/ml と対照に比べ有意差はなかった。

2. PAI-1 抗原量

対照の 28.0 ± 2.64 ng/ml (平均 $\pm$ SD, n=5) と比較すると, Ind: 39.5 ± 2.45 , Dex: 67.0 ± 6.19 , Prog: 37.0 ± 2.92 , Test: 71.0 ± 1.40 , $E_2 + \text{Prog}$: 40.0 ± 3.08 ng/ml と有意に高く ($P < 0.01$), E_1 においては 22.0 ± 2.73 ng/ml ($P < 0.02$) と低かった。Hist: 26.0 ± 2.71 , E_2 : 28.5 ± 5.18 , E_3 : 30.0 ± 2.74 ng/ml は、対照と比べ有意差はなかった。

3. PA 活性

対照群の PA 活性 (10.1 ± 1.34 ng/ml t-PA 相当の lysis time, n=5) に比べ有意に亢進していたのは, E_1 : 26.6 ± 1.66 , E_2 : 37.3 ± 2.77 , E_3 : 28.3 ± 2.77 ng/ml の estrogen 群と Hist: 16.0 ± 1.62 ng/ml であった ($P < 0.01$)。逆に有意に PA 活性の低下を示したのは, Ind: 4.32 ± 0.26 , Dex: 4.75 ± 0.31 , Prog: 6.40 ± 0.57 , $E_2 + \text{Prog}$: 2.15 ± 0.16 , Test: 2.85 ± 0.07 ng/ml であった ($P < 0.01$)。

結論および考察

1914年 Whitehouse⁸⁾ が子宮由来血液中の線溶酵素の存在を報告して以来、子宮内膜組織の PA 活性に関する多数の研究報告がなされてきた^{1)~6)}。しかしそれらほとんどの研究が、採取して得られた組織あるいはその抽出液を材料としているため、内膜構成組織全体の PA 活性を調べたものである。Todd⁹⁾ が PA 活性部位の観察方法を報告したが、PA 活性の局在に関する研究報告であり、PA 産生細胞との関係は明らかではない。そこで著者は、子宮内膜における PA 産生に内膜間質細胞が深く関与していると考え、細胞培養法を用いて子宮内膜間質より EF を単離培養し、EF の線溶機構への関与の仕方を検討した。その結果、EF は t-PA および PAI-1 を産生し、添加した外来薬物によりその産生量が変化することが明らかになった。

EF に Prog 単独、または Prog と E₂ の同時添加条件下では、PAI-1 の増加によって PA 活性が低下した。同条件の fibrin 上培養では線溶は認められず、細胞の経時的な増加が得られた。E₂ 添加条件下では、t-PA の増加が見られ、PA 活性の亢進に伴った線溶のため培養細胞は凝集し増殖停止となった。この結果を月経周期のホルモン動態と照らしあわせて考えると、本実験に使用した E₂ は 0.1 µg/ml で生理的な血中濃度に比べやや高いが、この条件を排卵直前と仮定すれば、その時期に高い PA 活性が得られることになる。E₂+Prog (50 ng/ml, 100 ng/ml) を排卵直後と仮定すれば、その時期の PA 活性は強く抑制され、Prog の消退により発来する月経期は再び E₂ 優位となり PA 活性が亢進することになる。子宮内膜組織片の PA 活性は、月経前期および月経期に高くなるという報告があるが¹¹²⁾、月経周期で著明な変化を来すのは内膜間質であり、内膜組織 PA 活性は、EF が産生する t-PA および PAI-1 によって左右されることが考えられる。すなわち、内膜間質の PA 活性は、排卵を境として逆転し、月経開始で再度亢進することが明らかとなった。

受精卵の着床初期には絨毛細胞の PA 活性が亢進し、その後は低下することが望ましい¹⁰⁾。本研究で添加した高濃度の E₂+Prog は妊娠のホルモン環境も仮定でき、EF は多量の PAI-1 を産生することより、絨毛細胞の t-PA を中和することが考えられる。このように妊娠を継続するためには、個々の細胞単位内における PA と PAI 比率ではなく、着床部位における子宮内膜と絨毛細胞を含む組織としての PA と PAI 産生のバランスが重要であると思われる。また Test 添加による PAI-1 の増加に伴った PA 活性の低下は、絨毛細胞侵入初期より多量に存在する PAI-1 によって着床が阻害される可能性が示唆される。

組織修復における PA の関与を浦山らは¹¹⁾、良い組織再構築は、fibrin 凝固と線溶のバランスの上に乗っていると報告している。fibrin の溶解に伴い fibrin 担体上で増殖した線維芽細胞の増殖抑制が円滑に進まないと、線維性の膠着ひいては癒着を来すであろう。癒着防止における t-PA 関与についての報告も見られる¹¹²⁾。本研究では、子宮内膜間質の線維芽細胞が t-PA を産生することがわかり、線維芽細胞が自ら PA を産生することは、接着増殖を fibrin に依存している反面、依存担体を溶解することによってその増殖に抑制をかけるといった自己増殖制御機構の存在を示唆するものである。子宮内膜間質で多量の t-PA が産生される利点としては、内膜損傷という面から考えると、創傷治癒機構における線維芽細胞増殖制御を介し、子宮腔内癒着防止にも大きく関与していると考えられる。

glucocorticoid の作用についてはほかの報告¹³⁾と同様に PAI-1 増加を示したが、Ind は t-PA 産生の脱抑制型¹⁴⁾ではなく、PAI-1 増加を誘導し、Hist は他臓器由来線維芽細胞¹¹⁾ほど t-PA 産生増加を来さなかった。以上の結果から、子宮内膜の大部分を占める間質の線維芽細胞に関する刺激応答性の特異性が明らかになったが、子宮内膜の形態的、機能的に合目的な反応の一つとして t-PA および PAI-1 産生を捕えることができると考えられた。すなわち EF は性ステロイドホルモンなど外来刺激

応答性の t-PA および PAI-1 産生により PA 活性を変化させることが明らかとなり、性周期、着床および癒着防止に適合していることが考えられた。なお試験的実験では、EF のウロキナーゼ型 PA は t-PA に比し僅少であった。いずれにしても生理的応答を担う細胞として EF は無視できない存在であるといえる。

結 語

EF は t-PA および PAI-1 を産生し、両者のバランスによって生じる PA 活性は、estrogen を添加した場合促進され、Prog 添加によって抑制された。EF における PA 活性は性周期および外来刺激によって変動し、受精卵の着床、子宮腔内癒着防止との関与が示唆された。

稿を終わるに臨み、本研究に際し御指導、御校閲下さった第 1 産科婦人科学教室百瀬和夫教授、生化学教室浦山功助教授に深く感謝致します。直接ご指導戴いた第 1 産科婦人科学教室上山護講師に深謝し、併せて、ご協力戴いた、産科婦人科学教室、生化学教室の諸先生に御礼申し上げます。

文 献

- 1) 斎藤春雄：子宮内膜、脱落膜、胎盤および腹膜における線維素溶解酵素のアクチベーターに関する研究，弘前医学，**17**：355～369，1966。
- 2) Rybo, G.: Plasminogen activator in the endometrium, Acta Obstet. Gynecol. Scand., **45**：429～450, 1966.
- 3) Casslén, B. and Åstedt, B.: Fibrinolytic activity of human uterine fluid, Acta Obstet. Gynecol. Scand., **60**：55～58, 1981.
- 4) Casslén, B. and Åstedt, B.: Occurrence of both urokinase and tissue plasminogen activator in the human endometrium, Contraception, **28**：553～564, 1983.
- 5) Albrechtsen, O.K.: The fibrinolytic activity of menstrual blood, Acta Endocrinol., **23**：219～226, 1956.
- 6) Casslén, B., Andersson, A., Nillsson, I.M. and Åstedt, A.: Hormonal regulation of the release of plasminogen activators and of a specific activator inhibitor from endometrial tissue in culture, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **182**：419～424, 1986.
- 7) Donnelly, T.H., Laskowski, M. Jr., Notley, N. and Scheraga, H.A.: Equilibria in the fibrinogen-fibrin conversion, II. steps reversibility of the polymerization, Arch. Biochem. Biophys., **56**：369～387, 1955.
- 8) Whitehouse, B.W.: The physiology and pathology of uterine haemorrhage, Lancet, **1**：951～957, 1914.
- 9) Todd, A.S.: The histological localization of fibrinolysin activator, J. Path. Bact., **78**：281～283, 1959.
- 10) Ikeuchi, M.: The study of local fibrinolysis in abortion, Acta Obstet. Gynaec. Jpn., **37**：1215～1223, 1985.
- 11) 浦山 功, 上山 護, 浅田敏雄：組織修復とプロテアーゼ，最新医学，**43**：742～746, 1988.
- 12) Doody, K.J., Dunn, R.C. and Buttram, V.C.Jr.: Recombinant tissue plasminogen activator reduces adhesion formation in a rabbit uterine horn model, Fertil. Steril., **51**：509～512, 1989.
- 13) Anderson, P.A., Pyke, C., Riccio, A., Kristenson, P., Nielsen, L. S., Lund, L.S., Blasi, F. and Dano, K.: Plasminogen activator inhibitor type 1 biosynthesis and mRNA level are increased by dexamethason in human fibrosarcoma cell, Mol. Cell. Biol., **7**：3021～3025, 1987.
- 14) Drapier, J.C. and Petit, J.F.: Involvement of prostaglandins in LPS-mediated regulation of plasminogen activator synthesis by inflammatory macrophages, Int. J. Immunopharmac., **6**：345～350, 1984.