家兔関節軟骨細胞によるプラスミノゲン・アクチベーター およびそのインヒビター産生に対するサイトカインの影響

山田治基^{*1)}, 中川智之^{*2)}

Effects of cytokines on the production of plasminogen activator and its inhibitor by rabbit articular chondrocytes Rabbit articular chondrocytes produced urokinase-type plasminogen activator (u-PA) into culture supernatants. Human tumor necrosis factor α (TNF) increased the u-PA activity of chondrocyte culture supernatant, in contrast, human interleukin 1 α (IL-1) decreased the u-PA activity. U-PA specific inhibitor activity was detected in the culture supernatant using immunocapture method. TNF had no obvious effect on the u-PA inhibitor activity, however IL-1 increased the u-PA inhibitor activity.

The decrease of u-PA activity of chondrocyte culture supernatant appeared to reflect the increase of u-PA inhibitor in the culture supernatant. Inhibition of urokinase by the chondrocyte u-PA inhibitor was observed accompanying with higher molecular weight complex formation, in SDS-polyacrylamide gel electrophoresis followed by fibrin overlay.

TNF may have a more important role in the enzymic degradation mechanism of rabbit articular cartilage than IL-1, since u-PA is one of the potent proteinases responsible for cartilage extracellular matrix degradation.

Harumoto Yamada^{*1)}, Tomoyuki Nakagawa^{*2)}

^{*1)} Department of Orthopaedic Surgery, Keio University, School of Medicine

^{*2)} Higashisaitama National Hospital

key words: plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor, interleukin 1, tumor necrosis factor, chondrocyte

慢性関節リウマチや変形性関節症などの軟骨破壊を特徴とする疾患においては、種々の蛋白分解酵素が軟骨の基質破壊に密接に関与しているとされている¹⁾。プラスミノゲン・アクチベーター (PA)-プラスミン系は、それ自身広い範囲の細胞外基質を分解するとともに、潜在型のコラゲナーゼを活性化作用も持ち、さまざまな結合組織における酵素による基質破壊系において、より上流に位置していると考えられている²⁾。

一方、最近では各種のサイトカインが、変形性関節症や慢性関節リウマチなどの疾患におけるメディエーターとして作用していると考えられている^{3,4)}。

今回、筆者らは、サイトカインのうちインターロイキン-1(IL-1)と腫瘍壊死因子(TNF)が、軟骨基質破壊酵素の一つである PA および PA 活性を調節する PA インヒビターの産生にどのような影響を及ぼすかを、家兔軟骨細胞培養系を用いて検討した。

材料と方法

(1) 家兔軟骨細胞培養

幼若家兔関節軟骨をトリプシンとコラゲナーゼにより

酵素消化して得られた軟骨細胞を、10%ウシ胎児血清を含む DMEM 培地中でプラスチック・ディッシュ上で培養した。細胞が confluent に達したあと、培養液を酸処理したウシ胎児血清 2%含む DMEM に換えてサイトカインを添加した。サイトカインとしては human recombinant interleukin-1 α (Genzyme 社)を最高 50 unit/ml まで、human recombinant tumor necrosis factor α (Genzyme 社)を最高 5,000 unit/ml まで添加した。

(2) PA および PA インヒビター活性の測定

PA 活性については、Coleman⁵⁾の方法に従い、プラスミノゲンの活性化により生じたプラスミンの酵素活性を合成基質を使用して測定した。この方法では、PA 活性のうち、ウロキナーゼ型 PA(urokinase-type PA, u-PA)活性が選択的に測定される。

PA インヒビター活性は、抗ウロキナーゼ抗体によりイムノプレート上に固定された標準ウロキナーゼに対する阻害作用を検出する immunocapture 法により測定した⁶⁾。本法では、サンプル中に混在する非特異的インヒビターの影響を受けず、選択的に u-PA インヒビター活性を測定できる。

(3) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動と PA の活性染色

^{*1)} 慶応義塾大学医学部整形外科教室

^{*2)} 国立療養所東埼玉病院整形外科

図1 dose-dependency of cytokine-induced u-PA activity of chondrocytes

Rabbit articular chondrocytes were inoculated in DMEM containing 10% fetal calf serum at a cell density of 2×10^5 cells/cm² and harvested to confluent. After washing the cell layer with DMEM, chondrocytes were cultured in DMEM containing 2% acid-treated serum in the presence of each conc. of cytokines. After 48h from the addition of cytokines, u-PA activity was assayed using two step colorimetric assay.

サンプルを 11% SDS ポリアクリルアミドゲル中で電気泳動したあと、2.5%トリトン X-100 溶液で処理し、蛋白を renature した。その後、ポリアクリルアミドゲルをプラスミノーゲンを含むフィブリンゲル上に置き、37°C で incubation した(fibrin overlay 法)⁷⁾。

本法によりポリアクリルアミドゲル上に泳動された PA は、フィブリンゲル中のプラスミノーゲンを活性化し、生じたプラスミンがフィブリンを融解することにより活性バンドとして検出される。

結果

(1) 軟骨細胞による PA 産生とサイトカイン

添加したサイトカインの濃度と培養液中の u-PA 活性との関係を図1に示す。家兎軟骨細胞は2%酸処理血清存在下では、サイトカインの非存在下でも培養液中に u-PA を spontaneous に産生した。TNF の添加により u-PA 活性は上昇したが、IL-1 の添加によっては u-PA 活性は逆に低下した。

TNF 1,000 unit/ml 存在下での u-PA 活性を経時的に観察すると、u-PA 活性は TNF により刺激開始後24時間でほぼ plateau に達したが、IL-1 10 unit/ml 存在下では、u-PA 活性は刺激開始後72時間に到るまでまったく検出できなかった(図2)。

図3は、PA 活性を含む培養液を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけたあと、プラスミノーゲンを含むフィブリンゲル上に24時間 overlay し、活性染色を行ったものである。培養液中の PA(lane 2)は、ヒト尿

図2 time course of cytokine-induced, u-PA activity of chondrocytes

Chondrocytes were cultured in the presence of each cytokine. Medium was collected and assayed for u-PA activity at 3, 9, 24, 48, 72h after the addition of cytokines.

図3 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis followed by fibrin overlay

Culture medium from chondrocyte harvested in the presence of 1,000u/ml TNF was electrophoresed on SDS-polyacrylamide gel (lane 2). After washing with 2.5% Triton X-100 solution, the polyacrylamide gel was overlayed on fibrin gel containing plasminogen, and then incubated for 24h at 37°C.

lane 1: lysis band of human urinary urokinase

由来ウロキナーゼ(lane 1)とほぼ同じ位置に泳動され、家兎軟骨細胞はヒト u-PA と同じ約 53 K の分子量を持つと考えられた。

(2) 軟骨細胞による PA インヒビター産生とサイトカイン

軟骨細胞培養液中には、u-PA に対する特異的なインヒビターが存在した。図4は培養液の u-PA インヒビター活性と添加したサイトカインの濃度の関係を示したものである。Y軸は残存する標準ウロキナーゼ活性の百分率を示す。u-PA インヒビター活性は、IL-1 の添加

図4 dose-dependency of cytokine-induced, u-PA inhibitor activity of chondrocytes

Chondrocytes were cultured in the presence of each conc. of cytokines. After 48h from the addition of cytokines, medium was collected and assayed for u-PA inhibitor activity using immuno-capture method.

図5 time course of cytokine-induced u-PA inhibitor activity of chondrocytes

Chondrocytes were cultured in the presence of each cytokine. Medium was collected and assayed for u-PA inhibitor activity at 3, 9, 24, 48, 72h after the addition of cytokines.

により dose-dependent に増加したが, TNF の添加によつては u-PA インヒビター活性は変化しなかった。

IL-1 10 unit/ml 存在下での u-PA インヒビター活性を経時的に観察すると, u-PA インヒビター活性は刺激開始後徐々に増加し, 48時間 で最大となった。TNF 1,000 unit/ml 存在下での u-PA インヒビター活性は有意ではなかった(図5)。

軟骨細胞培養液中に 産生 された インヒビターによる u-PA の阻害様式を調べるため, 以下の実験を行った。IL-1 10 unit/ml で刺激した軟骨細胞培養を4倍まで倍数希釈したあと, 4 m Ploug unit (PU) のヒト尿由来ウロキナーゼと1時間 incubation した。この混合液を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけたあと, プラスミノゲンを含むフィブリンゲル上に置き, 残存している PA 活性を活性染色により描出した。コンントロ

図6 complex formation of urokinase with chondrocyte inhibitor

4 m PU of human urinary urokinase was incubated with culture medium of chondrocytes harvested in the presence of 10 u/ml IL-1. The mixtures were electrophoresed on SDS-polyacrylamide gel, and then overlaid on fibrin gel containing plasminogen. Lane 1: urokinase incubated with control medium, lane 2, 3, 4: urokinase incubated with 1/4, 1/2, 1/1 diluted medium.

ールの培養液を加えたウロキナーゼは, 本来の分子量である 53 K の部位に活性が認められた。ウロキナーゼに倍数希釈した軟骨細胞培養液を加えると, 53 K の活性は dose-dependent に消失し, かわりに分子量約 80 K の部位に新しい活性が同じく dose-dependent に認められた(図6)。

考 察

IL-1 は, 単球, マクロファージなどにより産生される炎症のメディエーターとして知られている。一方, TNF は当初はある種の腫瘍細胞に対する細胞障害作用を有し, 臨床的に solid tumor の壊死をきたす物質とされていたが, 近年 IL-1 とよく類似した生物学的活性, すなわち, T細胞活性化, 破骨細胞の活性化, 線維芽細胞の分裂促進, プロテインCの産生促進などの作用を持つことが報告されている³⁾。最近では, 両者のサイトカインは, 単球やマクロファージなどの血球系細胞以外に, 軟骨細胞および滑膜細胞などの関節を構成する細胞に対しても, 種々の影響を与えていることが知られており, 慢性関節リウマチや変形性関節症などの疾患において, 軟骨の変性, 破壊に深く関与しているものと推測されている^{3,4)}。

現在までにヒトの PA については, 組織型 PA (tissue-type PA, t-PA) と u-PA の2種類の PA が存在すると

されている。t-PA は、フィブリンに対する親和性が強く、専ら血管内における線溶現象に局限されて関与すると考えられているが、u-PA は、悪性腫瘍の浸潤転移、炎症、結合組織の基質破壊などに広く関与していると考えられている²⁾。

軟骨細胞による PA 産生に対するサイトカインの影響については、すでにいくつかの報告がある。Bunning ら⁹⁾は、ヒト関節軟骨細胞による細胞層および培養液中への PA 産生が、IL-1 によって亢進することを報告している。一方、Schnyder ら¹⁰⁾は、IL-1 が家兎関節軟骨細胞による培養液中への PA 産生を抑制するとしている。両者の結果の違いは軟骨細胞種差、血清添加量などの培養条件の違い、および血管内皮細胞など軟骨細胞以外の細胞種の混在によると考えられる。

最近、Campbell ら¹¹⁾は、ヒト関節軟骨細胞を用いた実験で、IL-1 が細胞層においては選択的に u-PA 活性を亢進させるが、培養液においては選択的に t-PA 活性を亢進させることを報告している。

筆者らの家兎軟骨細胞を用いた実験では、Schnyder らと同様に、IL-1 は培養液中の u-PA 活性を抑制した。さらに、今回の実験結果によって、IL-1 による u-PA 活性の抑制は、家兎軟骨細胞に対しては IL-1 が培養液中への u-PA 産生に働かず、返って u-PA インヒビター産生に働いた結果であることが明らかとなった。

家兎軟骨細胞培養液中に分泌された u-PA インヒビターは、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動後の fibrin overlay 法で示されたように、ヒト尿由来ウロキナーゼによる活性バンドを高分子量域へシフトさせた。この結果は、この家兎軟骨細胞 u-PA インヒビターは、筆者らが以前報告したヒト軟骨細胞より産生される u-PA インヒビターやヒト軟骨組織より抽出される u-PA インヒビターと同様に、u-PA と結合し、高分子量の複合体を形成することによって酵素活性を阻害する特異的なインヒビターであることを示しているものと考えられた^{12,13)}。

Gilman ら¹⁴⁾は、IL-1 が家兎軟骨細胞による金属系プロテアーゼ産生を亢進させるが、TNF は影響しないことを、Bunning ら¹⁵⁾は TNF がヒト軟骨細胞による金属系カゼイナーゼ産生を亢進させることを、Rédini ら¹⁶⁾は TNF が家兎軟骨細胞による金属系エラスターゼ産生を亢進させることを報告している。

今回、筆者らの家兎軟骨細胞を使用した実験では、IL-1 は軟骨破壊酵素の一つである PA 活性を抑制し、PA インヒビター活性を亢進させるのに対して、TNF は PA 活性を亢進させるが、PA インヒビター活性には影響しなかった。従来、IL-1 と TNF の両者は、細胞表面に別々のレセプターを持つが、生物学的作用はほぼ同じであると考えられてきた。今回の結果は、家兎軟骨における PA による基質破壊系においては、TNF のほう

が IL-1 より重要な役割を果たしている可能性があることを示唆するものと考えられた。

本稿につきましてご校閲をいただいた慶應義塾大学医学部整形外科矢部裕教授に深謝する。

文 献

- 1) Barrett, A.J.: The enzymic degradation of cartilage matrix. Dynamics of Connective Tissue Macromolecules. (ed. Burleigh, P.M.C., Poole, A.R.), North-Holland/American Elsevier, New York, 1975, p 189-226.
- 2) Dangø, K., Andreassen, P.A., Grøndahl-Hansen, J., Kristensen, P., Nielsen, L.S., Skriver, L.: Plasminogen activators, tissue degradation, and cancer. Adv. Cancer Res. 44: 139-266, 1985.
- 3) 宮坂信之: 慢性関節リウマチの関節破壊はなぜ起こるか, 炎症 9: 193-199, 1989.
- 4) Hamerman, D., Klagsbrun, M.: Osteoarthritis. Emerging evidence for cell interactions in the breakdown and remodeling of cartilage. Am. J. Med. 78: 495-499, 1985.
- 5) Coleman, P.L., Green, G.D.J.: A sensitive coupled assay for plasminogen activator using a thiol ester substrate for plasmin. Ann. N.Y. Acad. Sci. 370: 617-626, 1981.
- 6) Stephens, R.W., Leung, K.C., Pöllänen, J., Salonen, E.M., Vaheri, A.: Microplate immunocapture assay for plasminogen activators and their specific inhibitors. J. Immunol. Methods 105: 245-251, 1987.
- 7) Granelli-Piperno, A., Reich, E.: A study of protease and protease inhibitor complexes in biological fluids. J. Exp. Med. 148: 223-234, 1978.
- 8) Le, J., Vilček, J.: Biology of disease, Tumor necrosis factor and interleukin 1: Cytokines with multiple overlapping biological activities. Lab. Inv. 56: 234-248, 1987.
- 9) Bunning, R.A.D., Crawford, A., Richardson, H.J., Opdenakker, G., Damme, J.V., Russel, R.G.G.: Interleukin 1 preferentially stimulates the production of tissue-type plasminogen activator by human articular chondrocytes. Biochim. Biophys. Acta 924: 473-482, 1987.
- 10) Schnyder, J., Payne, T., Dinarello, C.A.: Human monocyte or recombinant interleukin 1's are specific for the secretion of a metalloproteinase from chondrocytes. J. Immunol. 138: 496-503, 1987.
- 11) Campbell, I.K., Piccoli, D.S., Butler, D.M., Singleton, D.K., Hamilton, J.A.: Recombinant human interleukin-1 stimulates human articular cartilage to undergo resorption and human chondrocytes to produce both tissue- and urokinase-type plasminogen activator. Biochim. Biophys. Acta 967: 183-194, 1988.
- 12) Yamada, H., Stephens, R.W., Nakagawa, T., McNicol, D.: Detection and partial characteriza-

- tion of a specific plasminogen activator inhibitor in human chondrocyte cultures. *J. Biochem.* 104: 960-967, 1988.
- 13) Yamada, H., Stephens, R.W., Nakagawa, T., McNicol, D.: Human articular cartilage contains an inhibitor of plasminogen activator. *J. Rheumatol.* 15: 1138-1143, 1988.
- 14) Gilman, S.C.: Activation of rabbit articular chondrocytes by recombinant human cytokines. *J. Rheumatol.* 14: 1002-1007, 1987.
- 15) Bunning, R.A.D., Russel, R.G.G.: The effect of tumor necrosis factor α and γ -interferon on the resorption of human articular cartilage and on the production of prostaglandin E and of caseinase activity by human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 32: 780-784, 1989.
- 16) Rdini, F., Lafuma, C., Pujol, J.-P., Robert, L., Hornebeck, W.: Effect of cytokines and growth factors on the expression of elastase activity by human synoviocytes, dermal fibroblasts and rabbit articular chondrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 155:786-793, 1988.