血管内皮細胞の TIMP

神 宮 政 男*

Vascular endothelial cells and TIMP

Vascular endothelial cells (EC) have been shown to produce various biologically active substances and play an important role in both physiology and pathology of the blood vessels. EC have been shown to produce metalloproteinases (MMP) and tissue inhibitor of MMP TIMP. Vascular tissue may be composed of type IV collagen which is a main component of vascular basement membrane and type I or II collagen, a main stromal matrix component. These different matrix components are digested by different MMP. Imbalance of MMP and TIMP produced by EC may cause vascular events: for example, increased MMP and decreased TIMP are a predisposing factor leading to vascular damage, inflammatory cell infiltration and metastasis of malignant cells, while decreased MMP and increased TIMP may lead to fibrosis, atherosclerosis or wound healing.

It has been shown that cytokines modulate production of TIMP by EC. Our data imply that IL-1 or tumor necrosis factor inhibit TIMP production by EC, while IL-6 promote it. Therefore, regulation of matrix component, MMP and TIMP may be important for tissue repair, wound healing, atherosclerosis and inflammation.

Masao Shingu*

key words : endothelial cells, TIMP, metalloproteinases, matrix components

血管内皮細胞(EC)は血管内膜の血管腔側に位置し、血管内腔を一面に被う lining cell (連接細胞)であり、血流に接しているため、血漿蛋白の血管外滲出、各種炎症細胞の浸出、止血・血栓などにおいて、重要な役割を演じる細胞である。その培養技術がほぼ確立され、一般的となった結果、ECは各種の生理学的物質やメディエーターを産生・遊離し、生理学的、病態的に重要な役割を演じることが知られてきた。

一方、ECは種々のプロテアーゼ(プロテナーゼ)を産生し、matrix metalloproteinase (MMP)もそのなかの一つであるが、MMPを不活性化する tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)をも産生し、MMPを調節している。

ここではECの産生するMMPおよびTIMPの役割につき文献的考察および仮説を述べ、ECによるTIMP産生に対するサイトカインの影響につき、筆者らの成績を示し、文献的考察を加える。

MMP

(1) プロテアーゼおよび MMP

プロテアーゼは細胞内外に存在し、殺菌、組織再生・修復、血管新生など生体防御に関与するのみでなく、腫瘍細胞浸潤、組織破壊など幅広い役割を有し、プロテアーゼの存在するところにはほぼ同時にプロテアーゼを活性化する酵素・分子や、逆に不活化する因子(各種インヒビター)のような調節機構も存在することが知られている¹⁾(表1)。

プロテアーゼのうち、エンドペプチダーゼ(endopeptidase)のグループとして、主に結合組織または結合組織に存在する細胞から産生・分泌されるMMPは中性にて、各種結合組織成分または細胞間質基質蛋白(タイプI, II, III, IV, V collagen, gelatin, proteoglycan (PG), laminin および fibronectin (FN) を分解することが知られている。MMPは金属キレート剤(EDTA など)で不活化される。

(2) MMPの種類

細胞外基質(matrix)は、collagen, PG, および糖蛋白 (FN, laminin) および elastin などからなる。collagenaseをはじめ、その gene family と

* Department of Clinical Immunology, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University
九州大学生体防御医学研究所

表 1 組織破壊に関与すると考えられる宿主由来プロテアーゼとその特異的内在性インヒビター

プロテアーゼ	代表的な内因性インヒビター
セリンプロテアーゼ	
エラスターゼ	セルビン(α_1 -proteinase inhibitor)
カテプシンG	セルビン(α_1 -antichymotrypsin)
メダラシン	セルビン(α_1 -proteinase inhibitor)
トリプターゼ	セルビン(α_1 -antichymotrypsin)
キマーゼ	セルビン(α_1 -antichymotrypsin)
凝固系(トロンビン)	セルビン(antithrombin)
線溶系(プラスミン)	セルビン(α_1 -plasmininhibitor)
キニン・カリクレイン	セルビン(CI inhibitor)
補体系プロテアーゼ	セルビン(CI inhibitor)
システインプロテアーゼ	
カテプシンB	シスタチン(cystatin A, C)
カテプシンH	シスタチン, キニノーゲン (cystatin A, B, C)
カテプシンL	シスタチン, キニノーゲン, c-Ha-ras 蛋白質(cystatin A, B, C)
カテプシンN	シスタチン
ジペプチジルペプチダーゼ	シスタチン(cystatin SN, SA)
カルバイン	カルバスタチン
アスパルティック(カルボキシル)プロテアーゼ	
カテプシンD	α_2 -macroglobulin
カテプシンE	
メタロプロテアーゼ	
コラゲナーゼ	TIMP, α_2 -macroglobulin
ゼラチナーゼ	TIMP
プロテオグリカナーゼ	TIMP (ストロメライシン)
その他	
プロテアゾーム	

山本健二：炎症とプロテアーゼ。歯周治療の科学。
(青野正男・編)，医歯薬出版，1991，p 99-104 より
引用，セルビン＝セリンプロテアーゼインヒビター

していくつかの MMP は，これらの基質蛋白を分解し，基質の分解・再生・修復に関与するとされる亜鉛依存性の endopeptidase の一種である。一般的な MMP は collagenase (MMP-1)，72-kD gelatinase(kD＝キロダルトン，分子量72,000) (タイプⅣ collagenase, MMP-2)，92-kD gelatinase および stromelysin (proteoglycanase, transin, MMP-3)などであり，すべての基質構成成分はこれらの MMP により分解され，いくつかの MMP は基質特異性を持つとされるが，多くの場合 MMP 間においては，分解しうる基質がオーバーラップしている。

collagenase は基質の主要成分である collagen

表 2 MMP または TIMP が関与する病態・生理 (MMP/TIMP のバランスが重要)

- ① MMP 過剰または TIMP 不足により惹起されると考えられる病態・生理
血管新生
腫瘍細胞浸潤・転移
炎症細胞の血管外浸出
炎症における組織破壊
(骨吸収，軟骨破壊，歯周組織破壊，血管傷害など)
- ② MMP の欠乏または TIMP 過剰により惹起されると考えられる病態
fibrosis (肺，肝など)
強皮症
動脈硬化

を分解するが，のちに述べる血管基底膜ではタイプⅣ collagen が基質を構成する主な成分であり，これは stroma のタイプⅠ，Ⅱ collagen ないしは軟骨のタイプⅡ collagen とは化学的に異なっており，タイプⅠ，Ⅱ，Ⅲ collagen を分解する collagenase²⁾はタイプⅣ collagen を分解できないとされる。

gelatinase は gelatin を分解するが，PG に対しては分解せず，nativeなタイプⅣ，Ⅴ collagen や elastin を分解するとする説もある。

stromelysin は，PG, laminin, FN, gelatin およびタイプⅣ collagen を分解し，慢性関節リウマチ(RA)患者滑膜線維芽細胞より分離された MMP²⁾と，のちにウサギ骨から単離された PG およびウサギ滑膜線維芽細胞から単離された stromelysin とはいずれも同一のものであることがわかった。また，軟骨組織の構造維持に重要な役割をなすことが示唆されているタイプⅨ collagen は，stromelysin により分解されるという⁴⁾。

(3) EC による MMP の産生とその役割

MMP は組織・臓器の基質成分を分解することから，collagen, PG, gelatin などの基質成分を多く含む臓器・組織では，その破壊・再生・修復などが MMP により惹起されることが示唆されており，したがって，MMPの活性化の程度，active MMP/latent MMP の比率，MMP と MMP インヒビター (TIMP) とのバランス (MMP/TIMP 比)，pH などの異常により，臓器・組織傷害が起こりうる。MMP が関与すると思われる病態を

表2に示す。骨・関節疾患の一つであるRAや変形性関節症(OA)ではMMPが軟骨・骨破壊に関与することが直接的または間接的な成績により示されている⁵⁾。膠原病などにおける腎傷害にMMPが関与している⁶⁾。

種々タイプの血管炎は原発性またはリウマチ・膠原病などに二次的にみられ、血管の狭窄・閉塞などをきたし、臓器栄養障害により臓器傷害が起こる。血管炎における血管傷害の機序は複雑であるが、仮説として、免疫複合体により補体が活性化され、その結果、C5aのような補体フラグメントが産生され、これが好中球の血管外浸出を惹起し、この好中球からはプロテアーゼや活性酸素が遊離される。この両者は直接に組織・基質を破壊する二大メディエーターであるが、血管傷害の機序を好中球と培養ヒトECを*in vitro*モデルとして用い、ECの基底膜や基質の破壊またはEC細胞死(lysis)から検討すると、プロテアーゼおよび活性酸素(主に過酸化水素)いずれも関与しているようである^{7,8)}。プロテアーゼのなかでは中性セリンプロテアーゼ(エラスターゼなど)が関与しているとされるが、MMPの関与についてはほとんど報告されていない。

EC自身、間質 collagenase、タイプIV collagenaseなどのMMPを産生するのみでなく、TIMPをも産生すること、および好中球からはcollagenase⁹⁾、gelatinaseなどのMMPが産生されることなどから、多分にMMPが血管炎における血管傷害に関与する可能性がある。基底膜はタイプIV、V collagen, laminin, heparin sulphate PGや、その他の糖蛋白からなり、基底膜をとりまくstromaはタイプI、III collagen, FN, elastin, PGその他の糖蛋白からなる。このような異なったタイプのcollagenの分解には異なったcollagenaseが必要であり、基底膜のタイプIV、V collagenを分解するcollagenaseは、間質 collagen タイプI、IIIを分解するcollagenaseとは異なるという。

しかしながら、すべての種類の細胞外基質はいずれかのMMPにより分解される。ECはタイプIV collagenaseのみでなく、間質 collagenaseを産生し、タイプIV collagenや間質 collagen, 基底膜 collagen いずれをも分解するものと考えられる。ECが産生する plasminogen activator (PA)

表3 血管内皮細胞が産生するMMPおよびTIMPのバランス異常により惹起されると思われる病態

-
① MMP/TIMP 比が高すぎるとき
腫瘍細胞の浸潤・転移(*)
血管新生
血管傷害(血管炎) (*)
炎症細胞の血管外浸出(*)
② MMP/TIMP 比が低すぎるとき
動脈硬化
肺線維症
-

*: 炎症細胞や腫瘍細胞自身のMMPおよびTIMPも関与

は plasminogen を plasmin とし、この plasmin は FN や laminin などの基質蛋白の分解に関与するほか、latent(不活性型)collagenaseを活性化することにより、間接的にも基質破壊に関与している。

以上より、ECが産生するMMPは表3のような種々の病態に関与するものと考えられるが、腫瘍細胞の浸潤・転移や血管新生に係わっていることは比較的最近の成績により示されており、血管炎における血管傷害や炎症細胞浸出などでは多分に仮説が含まれる。この場合、ECのMMPのみでなく、ECが産生するTIMPとのバランス(MMP/TIMP比)が重要であり、さらに、腫瘍細胞や炎症細胞自身のMMP活性およびTIMPも、腫瘍細胞浸潤・転移や炎症細胞浸出に関与することが考えられる。

TIMP

(1) TIMPの種類

MMPはinactive zymogenとして合成・分泌されるが、その制御因子として、活性化因子(activator)と抑制・阻害因子(inhibitor)がある。inhibitorとして、3種類考えられており、まず、軟骨・大血管から抽出された低分子陽イオン蛋白(分子量11,000)があげられ、つぎに、血漿中 collagenase inhibitorの主なものとして、 α_2 -macroglobulin¹⁰⁾があり、この分子量725,000の糖蛋白は組織ではマクロファージにより産生され、4種類すべてのendopeptidase(表1)を阻害する。もう一つは分子量30,000(27,500~34,000)前後の糖蛋白であるTIMPである。

ヒト TIMP の cDNA がクローニングされ、リコンビナント TIMP の生産が可能となっている。TIMP は MMP の主要な制御因子であり、MMP と 1:1 の高親和性結合体をつくり、古典的 collagenase, タイプ IV, V collagenase, gelatinase および stromelysin などほとんどすべての MMP を阻害するが、細菌 collagenase やセリンプロテアーゼに対しては阻害しないとされる。TIMP は熱や酸に耐性であるがトリプシンやエラスターゼにより分解され、還元アルキル化により不活性化される。

TIMP 様 inhibitor はウシ、ブタ、ウサギ、ヒトの組織・体液・抽出液・細胞培養上清などに検出され、軟骨、骨、関節滑膜、腱¹¹⁾、皮膚¹²⁾、歯髄¹³⁾などのような結合組織を多く含む組織や、培養滑膜細胞や軟骨細胞などの培養上清について、TIMP の物理・化学的性状が検討されている。TIMP を産生する単離細胞としては、滑膜細胞、軟骨細胞、骨芽細胞、血管平滑筋細胞、線維芽細胞および EC などが知られている。

最近、TIMP family として、TIMP-2 が抽出・精製され、一次構造が決定された。これは分子量 21,000 の蛋白であり、アミノ酸構造においては 192 のアミノ酸残基を持ち、TIMP-1 とは 71% の homology を示し、選択的に 72-kD のタイプ IV collagenase の latent proenzyme と複合体をつくり、また、その活性型とは 1:1 のモル比で結合したとき、100% の酵素活性阻害を示す。したがって、TIMP-2 は latent および active いずれのタイプ IV collagenase にも結合し、その他の MMP をも阻害することが考えられる。TIMP-2 に対し、従来の TIMP は TIMP-1 とされ、これは活性型間質 collagenase, 活性型 stromelysin および 92-kD タイプ IV collagenase と 1:1 のモル比で結合し、その活性を阻害する。TIMP-1 は 184 のアミノ酸残基を有し、6 個の S-S 結合をもつとされる。

(2) EC による TIMP 産生とその役割

EC は MMP とともに TIMP をも産生・遊離するが、その意義または役割としては表 3 のようなことが考えられる。ウサギ毛細血管由来 EC は procollagenase, prostromelysin などの MMP を産生し、同様に分子量 30,000 の TIMP を産生、これは MMP に結合しており、この TIMP を除

くことにより、EC の MMP ははじめてその活性を発現することから、EC は TIMP を産生することにより、自身の MMP を調節しているという¹⁵⁾。

血管炎における血管傷害には好中球や単球・マクロファージの産生するプロテアーゼや活性酵素が関与することはすでに述べたが、好中球の産生する MMP や EC 自身の MMP も基底膜や血管壁を破壊することにより、血管傷害に関与することが考えられる。この場合、EC が産生する TIMP は血管傷害を防衛するのであろう。また、血管平滑筋細胞や EC および線維芽細胞などが MMP および TIMP を産生することが示唆されていることから、血管壁の再生・修復に MMP/TIMP が関与することが考えられる。その一つとして動脈硬化が考えられるが、仮説として、MMP/TIMP 比が低すぎるとき、動脈硬化が起こるものと思われる(表 3)。

腫瘍細胞の浸潤においては、毛細血管基底膜および基質をなんらかの機序により、腫瘍細胞が浸潤し、他臓器・組織の血管壁に粘着し、基底膜を透過して、ターゲット組織で増殖する一連の過程があり、特に基底膜および stroma を浸潤する際に、MMP が重要な役割をなす。基底膜はタイプ IV, V collagen, laminin, などからなり、stroma は間質 collagen (タイプ I, III), FN, elastin および PG などからなる。MMP, 特に collagenase は、これらの基質蛋白を破壊し、EC¹⁶⁾ や腫瘍細胞¹⁷⁾からも産生され、腫瘍細胞の浸潤を助けるうえで重要である。TIMP は、腫瘍細胞の浸潤・転移を抑制し、腫瘍細胞自身も TIMP を産生している¹⁸⁾。また、転移性の強い腫瘍細胞にはタイプ IV collagen 分解活性が認められ¹⁷⁾、したがって、血管壁の EC¹⁵⁾ のみでなく、腫瘍細胞そのものの MMP/TIMP 比が転移・浸潤の重要な調節因子である(図 1)。

一方、EC は腫瘍細胞の collagen 分解活性を抑制し、その機序は MMP 産生を EC が抑えるのではなく、EC が産生する分子量 70,000 および約 30,000 の二つの collagenase インヒビターであるとされ、後者は TIMP に類似したものである。血管平滑筋細胞や線維芽細胞にはこのような因子は少ない¹⁶⁾。

毛細血管の新生は、臓器発達、創傷治癒、腫瘍

図1 血管内皮細胞が産生する MMP および TIMP のバランス (MMP/TIMP 比) と血管新生または腫瘍細胞浸潤・転移との相関性

細胞増殖などの生理学的・病態的過程においてみられる。血管新生には basic fibroblast growth factor (bFGF) などのサイトカインが重要な役割を演じるが、bFGF に対する EC の反応としては細胞増殖、EC の浸出増強および EC による PA や collagenase などのプロテアーゼ産生増強などが考えられる。EC によるプロテアーゼ産生は、血管周囲基質および stroma の破壊に重要である。この点、微小血管の EC は解剖学的バリアーである基底膜および間質 stroma を浸出するという点で、あたかも、前述の腫瘍細胞の態度と類似している。TIMP は *in vitro* で血管新生を抑制する¹⁹⁾ (図1)。ヒト骨髄 stroma 由来 TIMP は赤血球系幹細胞の分化を増強することが示唆されている²⁰⁾。

(3) EC による TIMP 産生に対するサイトカインの影響

IL-1 や TNF はヒト EC によるプロテアーゼ (アルカリ性 RNase) 産生を増強する²¹⁾が、MMP (collagenase) 産生は EGF または TNF ではほとんど増強されないが、EGF+TNF 添加により、増強される²²⁾。EGF は EC による TIMP 産生を高めるのに対し、TNF は高めず、EGF と TNF の両者添加により、はじめて TIMP 産生を高めることから、EGF は MMP/TIMP 比を低下させ、血管に対し防御的に作用するものと思われる。

筆者らも EC による TIMP 産生に対するサイトカインの影響につき検討した。ヒト臍帯静脈より、collagenase 処理により EC を分離培養し²³⁾、培養液に $1 \times 10^5/\text{ml}$ に浮遊、その 0.4ml を 24穴プレート (Falcon) に植えつけ、24時間前培養後、新鮮培養液 0.4 ml に置き換え、IL-1 β (大塚製薬, $2 \times 10^7 \text{U}/\text{mg}$, $1 \times 10^6 \text{U}/\text{ml}$)、TNF- α (大日本

製薬, $3 \times 10^6 \text{U}/\text{mg}$, $1 \times 10^6 \text{U}/\text{ml}$) (いずれもヒト・リコンビナント) を種々の濃度で加え、48時間培養後、上清を取り、 -80°C に保存した。

一方、RA 患者の人工膝関節手術時に軟骨組織を得、細切後、0.2% collagenase および 0.25% トリプシンにより、細胞を剥離させ、10% ウシ胎児血清添加 RPMI 1640 に浮遊させ、10 cm シャーレにて培養した²⁴⁾。増殖した軟骨細胞を $1 \times 10^5/\text{ml}$ に浮遊、24穴プレートに 0.4 ml ずつ植えつけ、3~5日間前培養後、上清をすて、新鮮培養液 0.4 ml に置き換え、これに前述の各サイトカインを加え、72時間培養後、上清を得た。

TIMP の測定は富士薬品工業の協力により、サンドウィッチ EIA により行った²⁵⁾。Kodama らは、ウシ歯髄の培養上清から collagenase インヒビターを単離し、これに対する monoclonal 抗体をマウスにて作成し²⁶⁾、ペプシン処理にて、F(ab')₂ フラグメントを得、これにペルオキシダーゼを結合させた直径 6.5 mm のポリスチレンボールに TIMP monoclonal 抗体 (0.1 mg/ml) を吸着させ、バッファーで洗浄後、希釈したサンプル 0.3 ml と上記ボールを 30°C 、60分反応、ボールを洗浄後、ペルオキシダーゼ標識抗体を加え、 30°C 、60分反応、洗浄し、発色反応を行い、反応停止後、450 nm で測定した²⁵⁾。

EC の TIMP 産生に対するサイトカインの影響をみると、IL-1 β および TNF- α いずれも、すべての濃度で対照に対し、TIMP 産生を有意に抑制した。一方、軟骨細胞では IL-1 β 33.3 U/ml 添加により、TIMP 産生は対照にくらべて有意に増強されたが、その他の IL-1 β 濃度では対照との間には有意な差はなかった。また、TNF- α 5,000 U/ml 添加により、軟骨細胞による TIMP 産生は対照にくらべて有意に低下した。一方、IL-6 を 100 U/ml 添加により、軟骨細胞の TIMP 産生は有意に増強されたが、その他の濃度ではなんら影響はみられなかった (表4)。以上の結果をまとめると (表5) のようになる。

前述のように、TNF- α は 100 U/ml の濃度では EC の TIMP 産生に対し、なんら影響を与えておらず、筆者らの成績でも 154 または 833 U/ml では影響を示さず、5,000 U/ml で抑制作用を示した。TIMP 測定でも、また、ほかのメディエーター測定でも、同じ細胞で、IL-1 および TNF- α

表4 血管内皮細胞および軟骨細胞による TIMP 産生とそれに対するサイトカインの影響

サイトカイン	TIMP 産生 (ng/ml) (m±SD)	
	血管内皮細胞	軟骨細胞
IL-1β (U/ml)	*4)	
0	2.0±0.2	40.2±11.5
5.6	1.63±0.12*3)	43.2±5.6
33.3	1.6±0.35*1)	55.2±2.6*2)
200	1.63±0.14*3)	37.5±5.6
TNF-α (U/ml)	*4)	
0	2.0±0.13	17.2±0.4
140	1.58±0.22*4)	15.9±5.4
833	1.33±0.2*3)	18.3±2.5
5,000	1.3±0.13*4)	13.8±3.3*1)
IL-6 (U/ml)		
0	—	16.8±2.6
2.8	—	16.0±2.9
16.7	—	16.5±2.9
100	—	23.0±3.4*3)

*1): p<0.05. *2): p<0.02. *3): p<0.01.

*4): p<0.001 (vs 0) (mean±SD) 各群とも n=6

表5 血管内皮細胞による TIMP 産生に対するサイトカインの影響

サイトカイン	TIMP 産生	
	血管内皮細胞	軟骨細胞
IL-1	↓	↑
TNF	↓	↓
IL-6		↑

はまったく逆の作用を示したり、また、同じサイトカインでも細胞が異なると、その作用も逆の作用を示したりするようである^{24,27)}。表4のように、サイトカイン無添加の状態では産生される TIMP 量を比較すると、EC にくらべ、軟骨細胞で 8.6 倍ないしは 20 倍高い TIMP 産生が認められた。EC は単層にて増殖するのに対し、軟骨細胞は重層を形成しながら増殖し、したがって、24穴プレート 1 穴当りの細胞数は EC が $6\sim 8\times 10^4$ 個、軟骨細胞が $1.5\sim 2\times 10^5$ 個であり、軟骨細胞のほうが約 3 倍多い。したがって、そのぶん TIMP 産生は高いと思われるが、実際には TIMP 産生量はさらに高かったため、ただたんに細胞数のみではなく、細胞 1 個当りの TIMP 産生量も軟骨

表6 血管内皮細胞による fibronectin(FN) 産生に対するサイトカインの影響

cytokines	FN (ng/ml) (m±SD)
IL-1β (U/ml)	
0	30.47±4.49
5.6	40.8±5.39*2)
33.3	30.54±4.49
200	36.12±5.15
TNF-α (U/ml)	
0	26.64±3.63
140	28.1±3.46
833	36.1±3.02*3)
5,000	40.8±5.39*3)
IL-6 (U/ml)	
0	29.0±2.31
2.8	33.3±5.92
16.7	34.7±4.64*1)
100	37.3±6.12*2)

EC were cultured with or without cytokines for 48 hrs and the supernatants were measured for FN by ELISA. *1): p<0.05. *2): p<0.01.

*3): p<0.001 (vs 0) (t-test). n=6 for each

細胞では EC よりも高いと考えざるをえない。

IL-1, TNF いずれも EC による TIMP 産生を抑制したことは、炎症細胞由来 IL-1・TNF および EC 由来 IL-1 などにより、血管傷害が起こる一機序であるかもしれない。IL-6 は軟骨細胞の TIMP 産生を高めたが、これはほかの報告²⁸⁾とも一致している。IL-6 は IL-1 と異なり、EC や軟骨細胞の増殖や collagenase 産生を増強しないことや、活性酸素やプロテアーゼ産生を抑制する²⁷⁾。したがって、腫瘍細胞増殖作用は別として、IL-6 はむしろ生体防御的に作用する場合が多いのではないかと考えられる。EC、ヒト培養滑膜細胞およびヒト培養軟骨細胞による TIMP 産生に対する、IL-1β, TNF-α および IL-6 の影響を比較すると、TNF-α はこれらすべての細胞において、TIMP 産生を抑制した²⁹⁾。

基質蛋白

血管においては基質蛋白の合成と分解が血管の再生・修復および新生と密接な関係がある。transforming growth factor-β (TGF-β) は、FN, collagen, PG などの基質蛋白 mRNA および合成・分

図2 血管炎における血管内皮細胞と基質蛋白, MMP および TIMP の関係とサイトカイン EC による基質蛋白または TIMP 産生を増強(↑) または抑制(↓)

泌を高める³⁰⁾. TGF- β は, プロテアーゼ合成を抑制するとともに TIMP 合成を高める³¹⁾ ことにより, 基質蛋白の分解を抑制しているとされる³²⁾.

筆者らは EC による FN 合成・分泌に対するサイトカインの影響につき, TIMP 測定用培養上清の FN も測定することにより検討した. その結果, IL-1 β , TNF- α および IL-6 いずれも EC による分泌を高めた(表5). ただ, これだけの成績からは, ELISA 法で測定された FN が合成分泌された FN そのものであるか, または, FN が切断されてできた subunit であるかについては不明である. 以上より, 血管における基質, MMP および TIMP とサイトカインの関係を, 血管炎という病態の点から推測すると図2のような仮説が考えられる.

おわりに

以上, EC による TIMP 産生の役割につき, 血管の生理・病態の点から述べた. TIMP を考えるうえで, MMP および基質蛋白も重要な関連因子であるため, 特に血管における MMP, TIMP, および基質蛋白の3者の関連性を文献的に考察した. ウン由来 EC は, TIMP のみでなく, TIMP に類似した MMP インヒビター(MI)を産生し³³⁾, この MI のクローニングがなされ³⁴⁾, 腫瘍細胞由来 TIMP-2 の構造も決定された³⁵⁾. また, ウ

ン由来 EC は, collagen・FN のような基質と, タイプ IV collagenase (gelatinase) および TIMP など, 基質・MMP・TIMP を同時に分泌している³⁶⁾.

EC の血管新生^{37,38)}や炎症³⁹⁻⁴⁴⁾における役割, およびその場合における EC とサイトカインとの関係, MMP 活性調節機構⁴⁵⁻⁴⁷⁾, 結合組織代謝と炎症⁴⁸⁾, 細胞外基質の分解と調節⁴⁹⁾などについては総説を参照されたい. 炎症, 血管新生, 腫瘍細胞の浸潤・転移などの病態における EC の役割については研究の進展が期待される.

文 献

- 1) 山本健二: 炎症とプロテアーゼ, 歯周治療の科学 (青野正男・編), 医歯薬出版, 1991, p 99-104.
- 2) Hayashi, T., Nakamura, T., Hori, H., Nagai, Y.: The degradation rates of type I, II and III collagens by tadpole collagenase. J. Biochem. 82: 809-815, 1980.
- 3) Okada, Y., Nagase, H., Harris, E.D.: A metalloproteinase from human rheumatoid synovial fibroblasts that digests connective tissue matrix components. Purification and characterization. J. Biol. Chem. 261: 14245-14255, 1986.
- 4) Okada, Y., Konomi, H., Yada, T., Kimata, K., Nagase, H.: Degradation of type IX collagen by matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) from human rheumatoid synovial cells. FEBS Lett. 244: 473-476, 1989.
- 5) Dean D.D., Martel-Pelletier, J., Pelletier, J.P., Howell, D.S., Woessner, J.F., Jr.: Evidence for metalloproteinase inhibitor imbalance in human osteoarthritic cartilage. J. Clin. Invest. 84: 678-685, 1989.
- 6) Shah, S.V., Baricos, W.H., Basci, A.: Degradation of human glomerular basement membrane by stimulated neutrophils. Activation of a metalloproteinase (s) by reactive oxygen metabolites. J. Clin. Invest. 79: 25-31, 1987.
- 7) Shingu, M.: Complement activation and vascular damage by hydrogen peroxide. The biological role of reactive oxygen species in skin. (ed. Hayaishi, O., Imamura, S.), University of Tokyo Press, 1987, p 189-195
- 8) Shingu, M., Yoshioka, K., Nobunaga, M., Yoshida, K.: Human vascular smooth muscle cells and endothelial cells lack catalase activity and are susceptible to hydrogen peroxide. Inflammation 9: 309-320, 1985.
- 9) Kobayashi, S., Nagai, Y.: Human leucocyte neutral proteases with special reference to collagen metabolism. J. Biochem. 84: 559-567, 1978.
- 10) Abe, S., Nagai, Y.: Interaction between tadpole collagenase and human α_2 -macroglobulin. Bio-

- chim. Biophys. Acta 278: 125-132, 1972.
- 11) Nagai, Y., Shinkai, H., Kawamoto, T.: The release of collagenase inhibitors from procollagen additional peptides by pepsin treatment. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B* 54: 140144, 1978.
 - 12) Shinkai, H., Kawamoto, T., Hori, H., Nagai, Y.: A complex of collagenase with low molecular weight inhibitors in culture medium of embryonic chick skin explants. *J. Biochem.* 81: 261-263, 1977.
 - 13) Kishi, J., Hayakawa, T.: Purification and characterization of bovine dental pulp collagenase inhibitor. *J. Biochem.* 96: 395-404, 1984.
 - 14) Stetler-Stevenson, W.G., Kruttsch, H.C., Liotta, L.A.: Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-2). A new member of the metalloproteinase inhibitor family. *J. Biol. Chem.* 264: 17374-17378, 1989.
 - 15) Herron, G.S., Banda, M.J., Clark, E.J., Gavrilovic, J., Werb, Z.: Secretion of metalloproteinases by stimulated capillary endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 261: 2814-2818, 1986.
 - 16) Declerck, Y.A., Laug, W.E.: Inhibition of tumor cell collagenolytic activity by bovine endothelial cells. *Cancer Res.* 46: 3580-3586, 1986.
 - 17) Okada, Y., Tsuchiya, H., Shimizu, H., Tomita, K., Nakanishi, I., Sato, H., Seiki, M., Yamashita, K., Hayakawa, T.: Induction and stimulation of 92-KDA gelatinase/type IV collagenase production in osteosarcoma and fibrosarcoma cells lines by tumor necrosis factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 171: 610-617, 1990.
 - 18) Kishi, J., Ogawa, S., Yamamoto, S., Hayakawa, T.: Purification and characterization of a new tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP-2) from mouse colon 26 tumor cells. *Matrix* 11: 11-16, 1991.
 - 19) Takigawa, M., Nishida, Y., Suzuki, F., Kishi, J., Yamashita, K., Hayakawa, T.: Induction and angiogenesis in chick yolk-sac membrane by polyamines and its inhibition by tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP and TIMP-2). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 171: 1264-1271, 1990.
 - 20) Hayakawa, T., Yamashita, K., Kishi, J., Harigawa, K.: Tissue inhibitor of metalloproteinases from human bone marrow stromal cell line KM 102 has erythroid-potentiating activity, suggesting its possibly bifunctional role in the hematopoietic microenvironment. *FEBS Lett.* 268: 125-128, 1990.
 - 21) Oribe, M., Shingu, M., Nobunaga, M.: Serum alkaline ribonuclease derived from vascular endothelial cells is raised in patients with rheumatoid vasculitis. *Ann. Rheum. Dis.* 45: 937-940, 1986.
 - 22) Mawatari, M., Kohno, K., Mizoguchi, H., Matsuda, T., Asoh, K., Damme, J.V., Welgus, H.G., Kuwano, M.: Effects of tumor necrosis factor and epidermal growth factor on cell morphology, cell surface receptors, and the production of tissue inhibitor of metalloproteinases and IL-6 in human microvascular endothelial cells. *J. Immunol.* 143: 1619-1627, 1989.
 - 23) Shingu, M., Hashimoto, Y., Johnson, A.R., Hurd, E.R.: The search for Fc receptors on human tissue and human endothelial cells in culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 167: 147-155, 1981.
 - 24) Ahmadzadeh, N., Shingu, M., Nobunaga, M.: The effect of recombinant tumor necrosis factor- α on superoxide and metalloproteinase production by synovial cells and chondrocytes. *Clin. Exp. Rheumatol.* 8: 387-391, 1990.
 - 25) Kodama, S., Yamashita, K., Kishi, J., Iwata, K., Hayakawa, T.: A sandwich enzyme immunoassay for collagenase inhibitor using monoclonal antibodies. *Matrix* 9: 1-6, 1989.
 - 26) Kodama, S., Kishi, J., Obata, K., Hayakawa, T.: Monoclonal antibodies to bovine collagenase inhibitor. *Collagen Rel. Res.* 7: 341-350, 1987.
 - 27) Tawara, T., Shingu, M., Nobunaga, M., Naono, T.: Effects of recombinant human IL-1B on production of prostaglandin E₂, leukotriene B₄, NAG and superoxide by human synovial cells and chondrocytes. *Inflammation* 15: 145-157, 1991.
 - 28) Lotz, M., Guerne P-A.: Interleukin-6 induces the synthesis of tissue inhibitor of metalloproteinases-1/erythroid potentiating activity (TIMP-1/EPA). *J. Biol. Chem.* 266: 2017-2020, 1991.
 - 29) 神宮政男, 児王修嗣, 延永 正: ヒト滑膜細胞, 軟骨細胞および血管内皮細胞の TIMP 産生に対するサイトカインの影響. *リウマチ・炎症トピックス*, 91, *メディカルレビュー*, 1991, p80-88.
 - 30) Roberts, A.B., Flanders, K.C., Kondaiha, K.: Transforming growth factor β : Biochemistry and roles in embryogenesis, tissue repair and remodeling, and carcinogenesis. *Rec. Prolg. Hormone Res.* 44: 157-197, 1988.
 - 31) Ten-Dijke, P., Hansen, P., Iwata, K.K., Peiler, C., Foulkers, J.G.: Identification of another member of the transforming growth factor type β gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 4715-4719, 1988.
 - 32) Roberts, A.B., Sporn, M.B.: Regulation of endothelial cell growth, architecture and matrix synthesis by TGF- β . *Am. Rev. Respir. Dis.* 140: 1126-1128, 1989.
 - 33) De Clerck, Y.A., Yean, T.D., Ratzkin, B.J., Lu, H.S., Langley, K.E.: Purification and characterization of two related but distinct metalloproteinase inhibitor secreted by bovine aortic endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 264: 17445-17453, 1989.
 - 34) Boon, T.C., Johnson, M.J., De Clerck, Y.A.,

- Langley, K.E.: cDNA cloning and expression of a metalloproteinase inhibitor related to tissue inhibitor of metalloproteinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 2800-2804, 1990.
- 35) Steler-Stevenson, W.G., Brown, P.D., Onisto, M., Levy, A.T., Liotta, L.A.: Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2) mRNA expression in tumor cell lines and human tumor tissues. *J. Biol. Chem.* 265: 13933-13938, 1990.
- 36) Unemori, E.N., Bouhana, K.S., Werb, Z.: Vectorial secretion of extracellular matrix proteins, matrix-degrading proteinases, and tissue inhibitor of metalloproteinases by endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 265: 445-451, 1990.
- 37) Mignatti, P., Tsuboi, R., Robbins, E., Rifkin, D.B.: *In vitro* angiogenesis on the human amniotic membrane: Requirement for basic fibroblast growth factor-induced proteinases. *J. Cell Biol.* 108: 671-682, 1989.
- 38) 松原 司: 血管新生とその調節, 炎症 10: 241-245, 1990.
- 39) Miossec, P., Cavender, D., Ziff, M.: Production of interleukin 1 by human endothelial cells. *J. Immunol.* 136: 2486-2491, 1986.
- 40) Broudy, V.C., Harlan, J.M., Adamson, J.W.: Disparate effects of tumor necrosis factor- α /cachectin and tumor necrosis factor- β /lymphotoxin on hematopoietic growth factor production and neutrophil adhesion molecule expression by cultured human endothelial cells. *J. Immunol.* 138: 4298-4302, 1987.
- 41) Bevilacqua, M.P., Pober, J.S., Wheeler, M.E., Cotran, R.S., Gimbrone, M.A.: Interleukin 1 acts on cultured human vascular endothelium to increase the adhesion of polymorphonuclear leukocytes, monocytes, and related leukocyte cell lines. *J. Clin. Invest.* 76: 2003-2011, 1985.
- 42) Gamble, J.R., Harlan, J.M., Klebanoff, S.J., Vadas, M.A.: Stimulation of the adherence of neutrophils to umbilical cord vein endothelium by human recombinant tumor necrosis factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 8667-8671, 1985.
- 43) Moser, R., Schlieffenbaum, B., Groscurth, P., Fehr, J.: Interleukin 1 and tumor necrosis factor stimulate human vascular endothelial cells to promote transendothelial neutrophil passage. *J. Clin. Invest.* 83: 444-455, 1989.
- 44) Ziff, M.: Role of endothelium in chronic inflammation. *Springer Semin. Immunopathol.* 11: 199-214, 1989.
- 45) Okada, Y., Nakanishi, I.: Activation of matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) and matrix metalloproteinase 2 (gelatinase) by human neutrophil elastase and cathepsin G. *FEBS Lett.* 249: 353-356, 1989.
- 46) Gruber, B., Marchese, M.J., Suzuki, K., Schwartz, L.B., Okada, Y., Nagase, H., Ramamurthy, N.S.: Synovial procollagenase activation by human mast cell tryptase dependence upon matrix metalloproteinase 3 activation. *J Clin Invest* 84: 1657-1662, 1989.
- 47) 早川太郎: コラゲナーゼとその活性調節機構, 日本骨代謝学会誌 7: 1-13, 1989.
- 48) 永井 裕: 間質細胞の活性化と炎症, 代謝 23: 881-887, 1986.
- 49) 早川太郎: 細胞外マトリックスの分解とその調節, 細胞外マトリックスのバイオサイエンスとバイオテクノロジー, (藤本大三郎・編), アイピーシー, 東京, 1989, p 192-219.