炎症組織のコラーゲン分解制御におけるプロテアーゼの役割

鈴木一夫・中川秀夫・鶴藤 丞*

Regulation of collagen breakdown by proteinases in granulation tissue

Hideo Nakagawa • Kazuo Suzuki • Susumu Tsurufuji*

増殖型炎症では、しばしば肺線維症や関節リウマチにおけるパンススの形成などにみられるように、組織の線維化が認められる。一般に線維症は、コラーゲン線維の蓄積による組織硬化であり、したがって炎症組織におけるコラーゲン分解の制御機構を解明することは、線維症の病因解明や薬物療法、また組織破壊防止に重要であると考えられる。

炎症組織のコラーゲン分解には、コラーゲナーゼのほか、中性プロテアーゼの関与が考えられる。そこで、炎症組織のコラーゲン分解制御におけるプロテアーゼの役割について検討した。

方 法

(1) *in vitro* コラーゲン分解系

ラット (Sprague Dawley, 雄, SPF, 体重160~180g) の背部皮下に空気 7 ml を注入し、空気嚢を作製する。翌日、この空気嚢内へ2%カラゲニン溶液 4 ml を注射することにより、炎症を惹起した。その7日後、肉芽組織を無菌下で摘出し、1×1 cm の切片にし、これを95% O₂-5% CO₂ 気相下で serum free の Dulbecco's MEM で培養する。

(2) コラーゲン分解の指標

肉芽組織片の培養によって集めたmediumはSunada, Nagai の方法¹⁾に従って2倍容量の dioxane を加えて遠心し、その上清の一定量を 6 N 塩酸で加水分解する。これを dioxane-soluble hydroxyproline (D-S Hyp) として Prockop らの方法²⁾で定量し、肉芽組織コラーゲン分解の指標とした。67% の dioxane にはコラーゲン分子やα鎖が不溶であり、分子量5万以下のコラーゲン分解産物が可溶である¹⁾。

(3) 薬物処理

肉芽組織のコラーゲン分解に対する各種のプロテアーゼ・インヒビターの影響は、培養4日目の medium に

インヒビターを無菌的に加え、24時間培養後の medium 中の dioxane-soluble hydroxyproline を定量することにより検討した。

(4) 酵素の分離、精製

コラーゲン分解に関与する酵素であるコラーゲナーゼ、ゼラチナーゼの分離、精製は、培養3日目の medium を60%飽和硫酸で分画後、Sephadex G-150 によるゲル濾過、さらに DEAE-sephacel カラムクロマトグラフィーにより行った。各フラクションのコラーゲンおよびゼラチン分解活性は、合成基質である peptide P (DNP-Pro-Gln-Gly-Ile-Ala-Gly-Gln-DArg) および fluorescein-gelatin を基質にして測定した。

結 果

(1) SH 化合物 および 金属プロテアーゼ・インヒビターの影響

肉芽組織の培養で分解されたコラーゲン量を、medium 中の D-S Hyp を指標として測定した結果、培養1~2日目では分解されたコラーゲン量の変動が大きい、3~5日にかけてはほぼ一定のコラーゲンが分解されることがわかった。本実験系におけるコラーゲン分解が、コラーゲナーゼやゼラチナーゼのインヒビターで抑制されるか否かを検討するために、cysteine, D-penicillamine や EDTA・3 Na を培養4日目の medium へ加え、24時間培養した。

その結果、EDTA・3Na, cysteine および D-penicillamine がいずれも 10 mM の濃度でそれぞれ86, 76, 79%のコラーゲン分解抑制を示した。この結果は、肉芽組織の *in vitro* コラーゲン分解系におけるコラーゲン線維の分解には、コラーゲナーゼやゼラチナーゼが関与していることを示すものと考えられる。

(2) 炎症組織の培養 medium からのコラーゲナーゼ、ゼラチナーゼの分離、精製

培養3日目の medium を硫酸分画後、Sephadex G-150 でゲル濾過すると、peptide P および F-gelatin 分解活性の高い peak A (分子量 22 K) および peak B (分子量 9.5 K) を得た。この両者をさらに DEAE-sephacel column にかき精製し、この2つの酵素をⅡ型コラーゲン (ラットの腱より精製) およびゼラチン (Ⅰ型コラーゲンを 50°C, 15分処理) に 20°C で作用させた後、SDS-ディスク電気泳動で検討した。

* Department of Biochemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University 東北大学薬学部生化学教室

その結果, peak A の酵素はゼラチンのみに, peak B の酵素はゼラチンとコラーゲンの両方に対して分解活性を示した.

以上のことより, peak A の酵素はゼラチナーゼ, peak B の酵素はコラーゲナーゼを含むものと考えられる. このコラーゲナーゼおよびゼラチナーゼは, medium 中に不活性型として存在し, 活性発現には 4-aminophenyl mercuric acetate による活性化が必要であった.

(3) セリンプロテアーゼ・インヒビターの影響

われわれは, すでに *in vivo* 実験系で炎症組織のコラーゲナーゼ活性化には, プラスミンやカテプシン G などプロテアーゼが関与していることを示唆する結果を得ている³⁾. そこで, セリンプロテアーゼ・インヒビターの肉芽組織 *in vitro* 培養系におけるコラーゲン分解に対する影響を検討した.

プラスミン, トリプシン, キモトリプシン, カテプシン G などに阻害活性をもつ ϵ -amino-n-caproic acid n-hexyl ester は 10 mM で 41% と, 有意なコラーゲン分解の抑制を示した ($P < 0.01$). また, カテプシンのほかにトリプシン, プラスミンやカリクレインを阻害する leupeptin も 10 mM でコラーゲン分解を抑制する傾向を示した.

一方, プラスミンを直接阻害しない ϵ -amino-n-caproic acid は, コラーゲン分解にまったく影響を与えなかった. なお, EACA hexyl ester, EACA, leupeptin はいずれもコラーゲナーゼに対する直接阻害作用はない.

一方, 高分子のプロテアーゼ・インヒビターの影響について検討した結果, soybean trypsin inhibitor は 500 $\mu\text{g/ml}$ で 45% と, 有意なコラーゲン分解の抑制を示し

た ($P < 0.02$). また, カリクレインの阻害剤である aprotinin も 2,300 U で, 有意なコラーゲン分解の抑制を示した ($P < 0.02$).

考 察

肉芽組織の培養系を確立して, 炎症組織におけるコラーゲン分解の制御機序を検討した. その結果, 培養 medium から分離したコラーゲナーゼ (分子量 9.5 K), ゼラチナーゼ (分子量 21K) はいずれも不活性型であることが明らかになった. また, 各種のセリンプロテアーゼ・インヒビターを培養 medium に加えることにより, 炎症組織のコラーゲン分解が抑制された.

これらの結果は, 炎症組織のコラーゲン分解では不活性型コラーゲナーゼ, ゼラチナーゼの活性化段階が重要であり, この段階が炎症組織のコラーゲン分解を制御しているものと推測される.

この不活性型コラーゲナーゼ, ゼラチナーゼの活性化に関与していると考えられるプロテアーゼとして, インヒビター実験の結果より, カテプシン G, プラスミン, カリクレインなどが考えられるが, 実際に不活性型コラーゲナーゼ, ゼラチナーゼの活性化を行っているプロテアーゼの解明は, 今後の問題点である.

文 献

- 1) Sunada, H., Nagai, Y.: J. Biochem. 87: 1765, 1980.
- 2) Kivirikko, K.I., Laitinen, O., Prockop, D.J.: Anal. Biochem. 19: 249, 1967.
- 3) Nakagawa, H., Isaji, M., Hayashi, M., Tsurufuji, S.: J. Biochem. 89: 1081, 1981.