<短 報>

肝類洞壁細胞による特異型IV型コラーゲン分解酵素の産生

丸山 勝也*¹ 岡崎 勲*² 柏崎 一男 藺田 巖
石井 裕正 土屋 雅春*³ 柴田 徹一 稲山 誠一*⁴

正常肝では肝類洞内皮細胞直下には基底膜は存在せず、血流と肝細胞の間で自由に物質交換が行なわれている。しかし肝硬変症では類洞内皮細胞および肝細胞に接して基底膜様物質の出現が観察される。この現象は「類洞の毛細血管化」と呼ばれ、血流と肝細胞間の物質交換を阻害し、さらに肝細胞障害をきたすという悪循環を生ずるため、肝線維化の不可逆性に重要な役割を果たしているものと推測される¹⁾。著者ら²⁾は基底膜の構成成分の一つであるIV型コラーゲンの特異的分解酵素活性を、ヒト肝ホモジネイト中で測定し、肝硬変症ではその活性が低下していることを見出し、これが基底膜形成ひいては肝線維化の不可逆性の一因となる可能性について報告した。

今回、肝におけるIV型コラーゲン分解酵素の産生細胞を明らかにする目的で、肝細胞および類洞壁細胞の単離培養を行ない、類洞壁細胞培養液中に本酵素活性を見出し、生化学的に本酵素の性状を検討したので報告する。

材料および方法：Wistar系ラットを用い、肝細胞および類洞壁細胞を既述の方法³⁾に従い分離、培養を行った。また一部の群には、30μg/mlのlipopolysaccharide (LPS)を培養液に添加した。IV型コラーゲン分解酵素活性の測定は培養液を60倍に濃縮して酵素材料とし、ヒト胎盤より抽出したIV型コラーゲンを基質として行った。

本酵素の精製は、濃縮培養液をAsahi pakGS-520のカラム2本を直列に用いたHPLCにより行った。さらに高活性を示した分画はGSW 3000のカラム2本を直列に使用したHPLCにて移動層はトリス塩酸(pH 7.6)で本酵素の分子量の測定を行った。また7.5% SDS-PAGEを用いたfluorographyにより、本酵素によるIV型コラーゲン分解パターンを検討した。

成績：3日間にわたる単離細胞の培養液中には、LPS添加の有無にかかわらずIV型コラーゲン分解酵素活性は検出されなかった。一方、類洞壁細胞培養液中には、3日間にわたりLPS添加の有無にかかわらず本酵素活性が検出された。

培養液をHPLC (GS-520)にてゲル濾過を行い、高活性を示した分画を採取し、分子量測定用のHPLC (GSW 3000)で分析したところ、本酵素の流出部位は分子量約38,000の位置に相当した。

IV型コラーゲンに対する本酵素の反応についての検討では、Fig. (a)に示す如く、IV型コラーゲン分解酵素はI型コラーゲンを分解出来なかったが、Fig. (b)に示す如く、IV型コラーゲンは酵素添加により分解を受け、基質に由来するバンドの下に、それぞれのバンドが限定分解を受けたことを示す新しいバンドの出現が認められた。本酵素活性はEDTAの添加によりほぼ100%阻害され、metalloproteinaseと考えられた。

考察：IV型コラーゲン分解酵素の存在は、白血球中^{4,5)}、および転移性腫瘍細胞の培養液中に確認されており、本酵素は基底膜の分解に重要な役割を果たしていることが容易に推測される。著者ら²⁾は、ヒト肝ホモジネイト中に本酵素が存在し、肝硬変症例で酵素活性が低下していることより、肝におけるIV型コラーゲン分解酵素活性の低下が、肝硬変症に至る肝線維症の不可逆性に関与していることを既に示した。すなわち、類洞直下の基底膜様物質の蓄積に本酵素が重要な役割を果たしている可能性について報告した。そして今回、ラット類洞壁細胞より本酵素の産生を証明したことにより、肝における本酵素の役割が肝硬変症の際、類洞直下に出現する基底膜形成に関与している可能性を明らかにし得た。

SDS-PAGEの分析によりFesslerら⁷⁾やLiottaら⁸⁾の報告と同様な特異的分解産物を生じたことより、本酵素は特異的IV型コラーゲン分解酵素であると推測された。今後IV型プロコラーゲンを基質として用いて、本酵素の反応特異性について検討を行う予定である。

索引用語：IV型コラーゲン分解酵素、肝線維化、類

*¹ 国立療養所久里浜病院臨床研究部

*² 慶大医学部衛生公衆衛生

*³ 同 内科消化器科

*⁴ 同 薬化学研究所有機化学部門

Fig. Substrate specificity of type IV collagen degrading enzyme produced by sinusoidal cells.

(a): SDS-PAGE reveals that substrate used for type IV collagen degrading enzyme assay can not be degraded by mammalian collagenase (second column from the left) which can degrade type I collagen (right column), and that type IV collagen degrading enzyme can not degrade type I collagen (center column). (b): Fluorography of the SDS-PAGE shows the limited digestion of type IV collagen by type IV collagen degrading enzyme (two columns of right side), that is, the appearance of new bands beneath the bands derived from type IV collagen substrate without enzyme (two columns of left side).

洞壁細胞

文 献: 1) Okazaki I, Tsuchiya M, Kamegaya K, et al: *Bibl Anat* 12: 476, 1973 2) Maruyama K, Okazaki I, Shigeta Y, et al: In: *Pathobiology of Hepatic Fibrosis*, Edited by Hirayama C. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1985, p131 3) Kashiwazaki K, Hibbs MS, Seyer JM, et al: *Gastroenterology* 90: 829, 1986 4) Mainardi CL, Dixit SN, Kang AH: *J Biol Chem* 255: 5435, 1980 6) Liotta LA, Abe S, Robey PG, et al: *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 2268, 1979 7) Fessler LI, Duncan KG, Fessler JH, et al: *J Biol Chem* 259: 9783, 1984 8) Liotta LA, Tryggvason K, Garbisa S, et al: *Biochem* 20: 100, 1981

troenterology 90: 829, 1986 4) Mainardi CL, Dixit SN, Kang AH: *J Biol Chem* 255: 5435, 1980 6) Liotta LA, Abe S, Robey PG, et al: *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 2268, 1979 7) Fessler LI, Duncan KG, Fessler JH, et al: *J Biol Chem* 259: 9783, 1984 8) Liotta LA, Tryggvason K, Garbisa S, et al: *Biochem* 20: 100, 1981

Production of type IV collagen degrading enzyme by sinusoidal cells in monolayer culture

Katsuya MARUYAMA^{*1}, Isao OKAZAKI^{*2}, Kazuo KASHIWAZAKI, Iwao SONODA, Hiromasa ISHII, Masaharu TSUCHIYA^{*3}, Tetsuichi SHIBATA and Seiichi INAYAMA^{*4}

^{*1} Clinical Research Unit, Kurihama National Hospital (kanagawa)

^{*2} Department of Preventive Medicine and Public Health, School of Medicine, Keio University (Tokyo)

^{*3} Department of Internal Medicine, School of Medicine, Keio University (Tokyo)

^{*4} Pharmaceutical Institute, School of Medicine, Keio University (Tokyo)