

培養牛水晶体上皮細胞のフィブリン溶解系における役割

福嶋 正博*, 石橋 達朗*, 猪俣 孟*, 居石 克夫**

*九州大学医学部眼科学教室, **九州大学医学部第1病理学教室

要 約

IOL表面でのフィブリン反応ならびに線溶過程に及ぼす水晶体上皮細胞の影響を検討するために、牛水晶体上皮細胞を培養し、培養液中に放出されたプラスミノゲン・アクチベーター (PA) とプラスミノゲン・アクチベーター・インヒビター (PAI) に関する検索を行った。培養牛水晶体上皮細胞はフィブリン溶解系の主要酵素である組織型 PA (t-PA) とそのインヒビターである1型プラスミノゲン・アクチベーター・インヒビター (1型 PAI) を産生放出していた。培養液中に放出された t-PA による PA 活性は1型 PAI により抑制され、培養液全体としての線溶活性は認められなかった。水晶体上皮細胞ではフィブリン溶解を促進する活性よりもむしろ抑制する活性が優位であると考えられた。(日眼会誌 95: 543-547, 1991)

キーワード: 培養水晶体上皮細胞, 組織型プラスミノゲン・アクチベーター (t-PA), プラスミノゲン・アクチベーター・インヒビター (PAI)

A Role of Cultured Bovine Lens Epithelial Cells
in the Fibrinolytic System

Masahiro Fukushima*, Tatsuro Ishibashi*, Hajime Inomata* and Katsuo Sueishi**

*Department of Ophthalmology, Faculty of Medicine, Kyushu University

**First Department of Pathology, Faculty of Medicine, Kyushu University

Abstract

The release of plasminogen activators (PAs) and plasminogen activator inhibitor (PAI) from cultured bovine lens epithelial cells was investigated, in an attempt to study the effect of lens epithelial cells on the fibrin deposit and fibrinolytic process on the surface of IOL. Cultured bovine lens epithelial cells released tissue plasminogen activator (t-PA) and type 1 plasminogen activator inhibitor (PAI-1). t-PA activity was completely inhibited by PAI-1. These findings suggest that lens epithelial cells cause suppression of fibrinolysis in the anterior chamber of the eye (Acta Soc Ophthalmol Jpn 95: 543-547, 1991)

Key words: Cultured bovine lens epithelial cell, Tissue plasminogen activator (t-PA), Plasminogen activator inhibitor (PAI-1)

別刷請求先: 812 福岡市東区馬出3-1-1 九州大学医学部眼科学教室 福嶋 正博

(平成2年7月6日受付, 平成2年10月16日改訂受理)

Reprint requests to: Masahiro Fukushima, M.D. Department of Ophthalmology, Faculty of Medicine, Kyushu University.

3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812, Japan

(Received July 6, 1990 and accepted in revised form October 16, 1990)

I 緒 言

眼内レンズ (IOL), とくに後房レンズ (PC-IOL) 移植術後にみられるフィブリン反応は, 近年注目されている術後合併症の一つである。フィブリンが IOL 表面, 水晶体囊, 虹彩後面に形成されると, IOL 上でのフィブリン膜形成による視力障害だけでなく, 瞳孔変形や, 重症例では瞳孔ブロックを引き起こす。その原因としては, 手術による侵襲¹⁾, 水晶体上皮細胞²⁾, IOL の素材³⁾など様々な因子が考えられている。

フィブリンは, 凝固系の諸因子が活性化されることにより形成される。このフィブリンを溶解する機構が線溶系で, 生体内においては凝固系と線溶系との動的バランスが保たれている⁴⁾。このバランスが壊れ凝固系が優位になると, 実際に生体内でフィブリンが形成される。前房内あるいは眼内レンズ表面におけるフィブリン反応においても同様の機序が考えられ, 凝固系だけでなく局所の線溶系の動態を検索することはフィブリン反応ならびに溶解における IOL 移植術後にみられる一連の生体反応を理解し解析する上で重要な意義を有する。

プラスミノーゲン・アクチペーター (PA) は線溶系活性化機構における重要な酵素であり, 組織型 PA (t-PA) とウロキナーゼ型 PA (u-PA) に大別される。また, プラスミノーゲン・アクチペーターの働きを抑制するプラスミノーゲン・アクチペーター・インヒビター (PAI) の存在が知られている⁵⁾。

今回われわれは水晶体上皮細胞の IOL 表面でのフィブリン反応ならびに線溶過程に及ぼす影響を細胞レベルで検討するために, 牛水晶体上皮細胞を培養し, 培養液中に放出されたプラスミノーゲン・アクチペー

ター (PA) とプラスミノーゲン・アクチペーター・インヒビター (PAI) に関する検索を行ったので報告する。

II 実験方法

材料: van Venrooij ら⁶⁾の方法 (explant method) に準じて, 牛水晶体上皮細胞を15%仔牛血清を含むダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) にて培養した。十分な細胞量を得るために, 実験には4代継代培養した細胞を用いた。

方法: 細胞が confluent になった状態で培養液を血清無添加の培養液に交換し, 24時間後に培養液中に放出された PA あるいは PAI を以下の方法にて検索した。

1. PA の種類の決定

Levin ら⁷⁾の方法に従い, フィブリンオートグラフィーを行った。採取した培養液60 μ l の10%SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い, 泳動後のポリアクリルアミドゲルを2%TritonX 100にて洗浄し, 0.1%フィブリンおよび7 μ g/ml のプラスミノーゲンを含む1%アガロースゲルの上にのせ37 $^{\circ}$ Cでインキュベートした。フィブリンはヒトフィブリンノーゲン (ミドリ十字) および精製牛トロンビン (持田製薬) を用いて作製した。プラスミノーゲンはリジナーセファロースアフィニティーカラム (Pharmacia Fine Chemicals) を用いてヒト血清より精製した⁸⁾。18時間インキュベート後, フィブリンアガロースゲルの溶解部位を観察して PA の分子量を決定した。また, PA の種類の免疫学的に決定するために5 μ g/ml の家兎抗ヒト t-PA IgG あるいは500 μ g/ml の家兎抗ヒト u-PA IgG をフィブリンアガロースゲルに加え, フィブリン溶解

PAの種類決定

Fibrin Autography

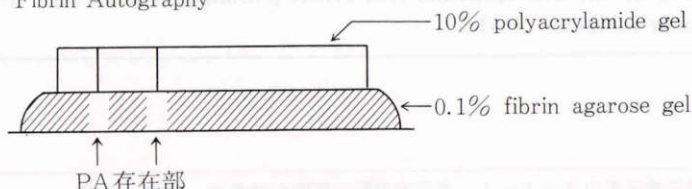


図1 フィブリンオートグラフィーの方法。0.1%フィブリンと7 μ g/ml のヒトプラスミノーゲンを含む1%アガロースゲルを作製し, その上に, 採取培養液60 μ l を10%SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動し, TritonX100にて洗浄してできたゲルをのせ, 37 $^{\circ}$ Cで18時間インキュベートした。泳動された PA の存在部位に一致してフィブリンアガロースゲルが溶解された。

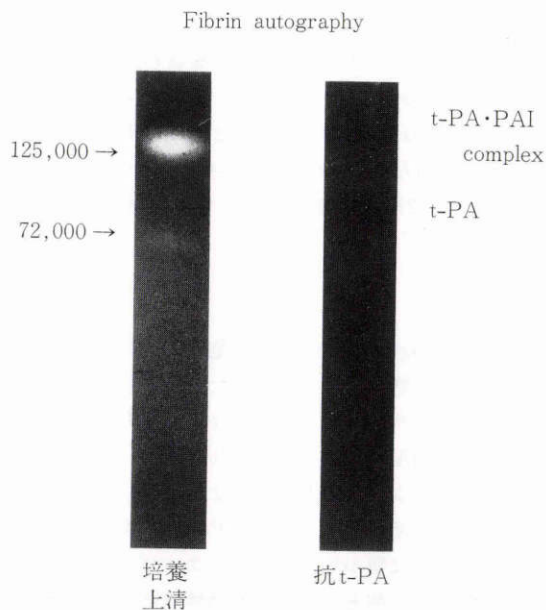


図2 採取培養液のフィブリンオートグラフィー
左レーン：分子量72,000, 125,000の部位でフィブリンアガロースゲルの溶解がみられる。右レーン：5 μ g/mlの家兎抗ヒト t-PA IgGを加えた時のフィブリンオートグラフィー。PA活性が抗体により抑制されフィブリン溶解が消失している。

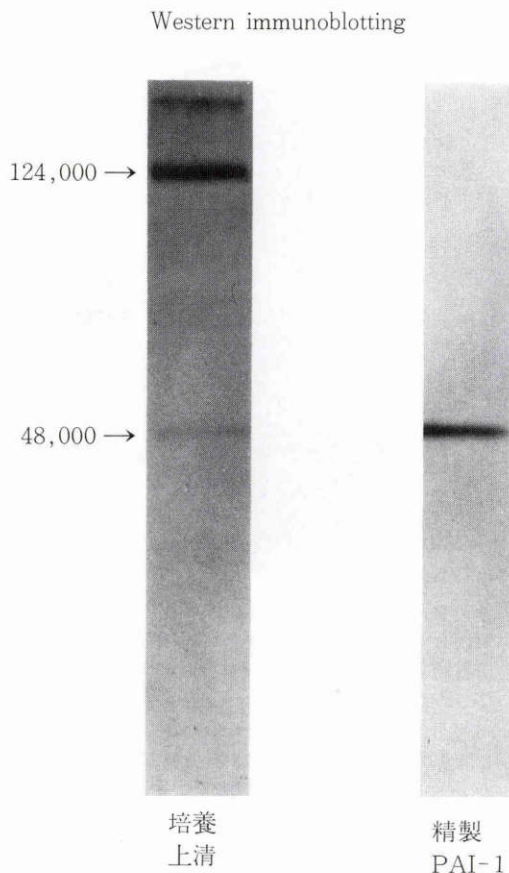


図3 ウェスタンブロッティングによる採取培養液中のPAIの存在。採取培養液を24%トリクロール酢酸にて濃縮してできたサンプルをヤギ抗ヒト PAI-1 IgGを用いたウェスタンブロッティングにて検索した。

左レーン：濃縮サンプルをアブライした時、分子量124,000, 48,000の部にPAI-1に特異的なバンドが認められた。分離ゲル上端のバンドは濃縮に伴う非特異的な凝集によるバンドと考えられる。右レーン：ヒト線維肉腫細胞 HT-1080の培養上清から精製したヒト PAI-1 (100ng) をアブライした。分子量48,000の部に特異的なバンドが認められる。

の変化を観察した(図1)。家兎抗ヒト t-PA IgG および家兎抗ヒト u-PA IgG は本教室で作製した抗体を用いた⁹⁾。

2. 培養液中の t-PA 濃度

培養液中の t-PA 濃度は、Bergusdorf ら¹⁰⁾の方法に準じて本教室で作製した ELISA⁹⁾にて測定した。測定限界は0.05ng/mlであった。

3. PAI の確認

採取培養液中の PAI の存在はヤギ抗ヒト PAI-1 IgG (Biopool 社)を用いたウェスタンブロッティング¹¹⁾を行って検索した。採取した培養液を24%トリクロール酢酸にて濃縮し、10%ポリアクリドアミド電気泳動後、泳動蛋白をニトロセルロース膜に転写し、上記抗体を用いた抗原抗体反応により PAI の存在を確認した。ヒト線維肉腫細胞 HT-1080の培養上清より精製した1型 PAI (PAI-1)¹²⁾ 100ng をアブライしコントロールとした。

4. フィブリンプレート法

プラスミノーゲンを含むフィブリンプレートの上に採取培養液30 μ lを置き、37℃で18時間インキュベート

後、フィブリンプレートの溶解の有無を観察して、培養液全体としての PA 活性の有無を検索した。コントロールとして0.5U/mlのヒト u-PA (持田製薬) 30 μ l によるフィブリンプレートの溶解を観察した。

III 結 果

1. PA の種類

培養液のフィブリンオートグラフィーでは分子量

Fibrin plate法

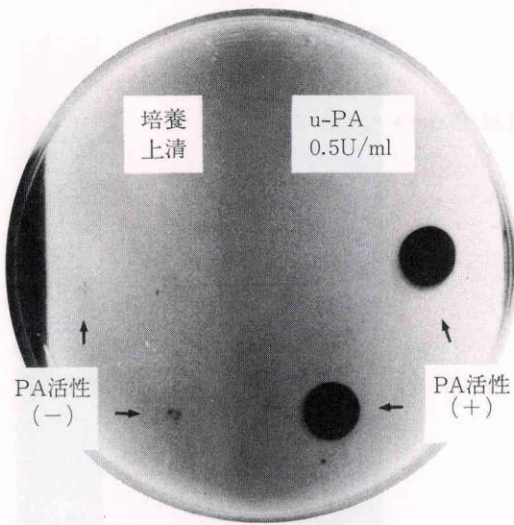


図4 フィブリンプレート法。プラスミノーゲンを含むフィブリンプレートの上に培養液30 μ lをおき37℃で18時間インキュベートした。培養液全体としてはPA活性は存在せずフィブリンプレートの溶解は見られない(左2個)。コントロールとしての0.5 U/mlのウロキナーゼはPA活性を有しフィブリンプレートを溶解した(右2個)。

72,000と125,000の部位でフィブリンアガロースゲルの溶解が認められた。家兎抗ヒトt-PA IgGをゲルに加えると、PA活性が抑制され溶解部位は消失した。したがって、これらの部位のPAはともにt-PA関連抗原で、72,000のものは未結合のt-PA、125,000のものは、次のPAIのウエスタンイムノブロッティングの結果と併せてt-PAとPAIとの複合体と考えられた(図2)。継代数の少ない2代目、3代目の細胞でも同様の結果が得られた。

2. 培養液中のt-PA濃度

採取培養液中のt-PA濃度は、 $0.41 \pm 0.05 \text{ ng/ml}$ ($n=5$)であった。

3. PAIの存在

ヤギ抗ヒトPAI-1 IgGを用いたウエスタンイムノブロッティングの結果、分子量48,000と124,000の部に反応バンドが認められた。48,000のバンドは精製1型PAIと分子量が同じであることから未結合の1型PAI、124,000のバンドはフィブリンオートグラフィーの結果よりt-PAに結合した1型PAIと考えられた(図3)。

4. フィブリンプレート法

採取培養液をプラスミノーゲンを含むフィブリンプレートの上においてインキュベートしてもフィブリンの溶解はみられず、培養液全体としてのPA活性は認められなかった(図4)。一方、コントロールの0.5 U/mlのu-PAでは明かなフィブリンの溶解が認められた。

IV 考 按

今回われわれは水晶体上皮細胞の線溶活性を培養牛水晶体上皮細胞を用いて検索した。実験結果を要約すると、培養牛水晶体上皮細胞はt-PAとその作用を抑制する1型PAIを産生放出していた。フィブリンオートグラフィーおよびELISAによるt-PA濃度の測定結果から、線溶活性を有するt-PAが培養液中に放出されている事は明かであったが、フィブリンプレート法では培養液全体としての線溶活性は認められなかった。これは放出されたt-PAの線溶活性がそのインヒビターである1型PAIにより抑制された事を示している。水晶体上皮細胞では線溶系に関していえばフィブリン溶解を促進する活性よりもむしろ抑制する活性が優位であると考えられる。

われわれはこれまでに、水晶体上皮細胞と同様に前房水に接している角膜内皮細胞がt-PAを主体としたPAと1型PAIを産生放出していることを報告した⁹⁾。そして、PAがPAIにくらべ優位に分泌され、プラスミノーゲンをプラスミンへと転化しフィブリン溶解を行うことを明かにした⁹⁾。角膜内皮細胞では、フィブリンが形成される様な病的状態において産生されるトロンビンによって、その線溶活性が促進される⁹⁾。したがって、IOL移植術後においても、角膜内皮細胞に機能障害がないことが過剰のフィブリン反応を防ぐために大切な事と考えられる。これに対し、水晶体上皮細胞は線溶促進活性よりはむしろ線溶抑制活性を有している事が今回の実験で示された。IOL移植術後のフィブリン形成と水晶体上皮細胞との関係が示唆されている²⁾が、IOL移植術後に水晶体上皮細胞が残存すると過剰のフィブリン反応を引き起こす一因子になると考えられる。

文 献

- 1) 坂西良彦, 沢 充, 清水晃幸: 後房レンズ移植術後のフィブリン析出について。その1. 計画的囊外法との比較。臨眼 41: 1323-1328, 1987。
- 2) 西 興史: 後房レンズ挿入術後早期に見られる腫

- 孔膜. 臨眼 41: 331—335, 1987.
- 3) **Galin MA, Turkish L, Chowchuvech E**: Detection removal, and effect of unpolymerized methylmethacrylate in intraocular lenses. *Am J Ophthalmol* 84: 153—159, 1977.
 - 4) **Colman RW, Marder VJ, Salzman EW**, et al: Overview of hemostasis, in Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW (ed): *Hemostasis and Thrombosis* (2nd ed), Philadelphia, JB Lippincott Company, 3—17, 1987.
 - 5) **Bachmann F**: Plasminogen activators, in Colman RE, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW (ed): *Hemostasis and Thrombosis* (2nd ed), Philadelphia, JB Lippincott Company, 318—339, 1987.
 - 6) **van Venrooij WJ, Groeneveld AA, Bloemendal H**, et al: Cultured calf lens epithelium. I. Methods of cultivation and characteristics of the cultures. *Exp Eye Res* 18: 517—526, 1974.
 - 7) **Levin EG, Loskutoff DJ**: Cultured bovine endothelial cells produce both urokinase and tissue-type plasminogen activators. *J Cell Biol* 94: 631—636, 1982.
 - 8) **Deutsch DG, Mertz ET**: Plasminogen: Purification from human plasma by affinity chromatography. *Science* 170: 1095—1096, 1970.
 - 9) **Fukushima M, Nakashima Y, Sueishi K**: Thrombin enhances release of tissue plasminogen activator from bovine corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30: 1576—1583, 1989.
 - 10) **Bergsdorf N, Nilsson T, Wallén P**: An enzyme linked immunosorbent assay for determination of tissue plasminogen activator applied to patients with thromboembolic disease. *Thromb Haemost* 50: 740—744, 1983.
 - 11) **Towbin H, Staehelin T, Gordon J**: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 4350—4354, 1979.
 - 12) **Andreasen PA, Nielsen LS, Kristensen P**, et al: Plasminogen activator inhibitor from human fibrosarcoma cells binds urokinase-type plasminogen activator, but not its proenzyme. *J Biol Chem* 261: 7644—7651, 1986.