

平成21年 3月30日現在

研究種目：基盤研究 (C)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19590217  
 研究課題名 (和文) 組織修復・再生過程における t-PA/t-PAR 系を介した蛋白分解活性制御の解析  
 研究課題名 (英文) Analysis of regulation by t-PA/t-PAR-mediate protease on regeneration system after tissue damage  
 研究代表者  
 松尾 理 (MATSUO OSAMU)  
 近畿大学・医学部・教授  
 研究者番号：40030879

研究成果の概要：作成した t-PAR 発現線維芽細胞は、t-PA 結合能と P1g 活性化能が増強した。また、この細胞は 37°C 条件下の感温性ポリマー上で接着・増殖し、25°C でシート上に剥離した。以上の結果より、細胞表面上の t-PA/t-PAR 系による蛋白分解活性を制御された t-PAR 発現細胞は、感温性ポリマー樹脂と組み合わせた新たな手法として組織損傷後の修復・再生への臨床応用が期待される。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

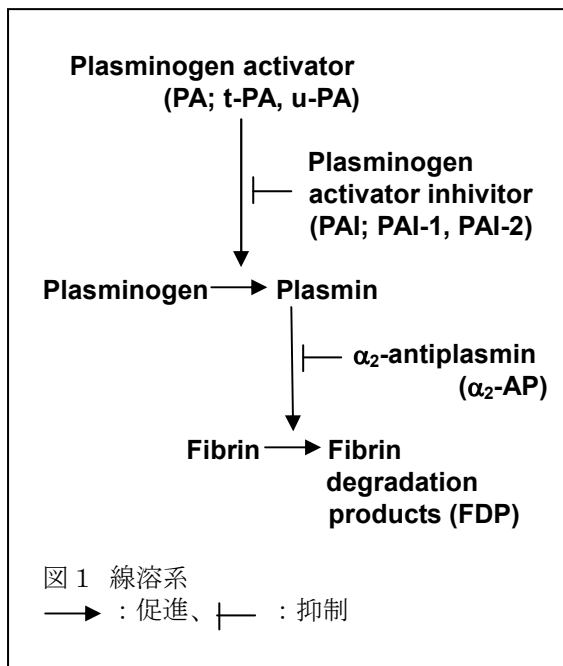
キーワード：組織再生、t-PA、t-PA 受容体、線溶系、蛋白分解

## 1. 研究開始当初の背景

線溶系は plasminogen activator (PA)/PA inhibitor (PAI) 系と plasmin/ $\alpha_2$ -antiplasmin ( $\alpha_2$ -AP) 系の 2 段階のプロテアーゼ・インヒビター系因子で構成され、血栓の主成分であるフィブリンを分解し血栓溶解反応を引き起こす (図 1)。Plasminogen (P1g) は酵素の前駆体として存在し、urokinase-type PA (u-PA) または tissue-type PA (t-PA) により plasmin に活性化される。また、線溶系因子は種々の細胞表面に受容体を持つことで血管外においても細胞周

囲での蛋白質分解に関与し、血管新生、創傷治癒、神経変性、癌細胞の増殖・浸潤・転移などのような、生体内の生理学的、病態生理学的に非常に多彩な現象に関わっていることが解明されつつある。

その中で、我々はヒト血管内皮細胞から新規な t-PA 受容体 (t-PAR) を発見し、生体内におけるその機能について解析してきた。その結果、t-PA/t-PAR 系は、血管内皮細胞周囲での蛋白分解活性の発現に重要であることを示唆した。また、それぞれの線溶系因子については、その遺伝子欠損 (KO) マウスを用い



て組織損傷後の修復・再生過程における機能について解析してきた。その結果、肝臓などの再生過程では、線溶系因子を中心とした蛋白分解活性の制御機構が重要であること示唆した。

一方、この組織再生の研究・応用に関して、生体適応性の医療材料の開発が目覚ましく発展している。その中で、最近注目されているのが、温度に対応して親水性と疎水性の性質を持つ感温性ポリマーである。このポリマーの応用の一つとして、温度変化による細胞の接着と剥離の現象である。感温性ポリマーは、ある温度で細胞を接着させ、目的の場所で温度変化により剥離させることが可能であると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、細胞上での蛋白分解活性を制御した細胞を、医療材料として使用可能な感温性ポリマー樹脂と組み合わせ、組織損傷後の修復・再生への応用を図る。つまり、ポリマー樹脂の温度感受性の性質を利用することによって、生体外でポリマーに吸着させた細胞を温度の異なる生体の損傷部位で剥離させ、損傷部位局所のみで細胞機能発現させ、修復・再生過程への関与を解析する。このように、本研究では、t-PA/t-PAR 系発現制御細胞による組織修復・再生過程の解析から細胞周囲での蛋白分解活性の制御機構の解明および応用を目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) t-PAR 発現線維芽細胞の作成

t-PAR 遺伝子は、細胞膜上で蛋白を発現できる pDisplay vector (Invitrogen) に挿入した。この vector の細胞への transfection は常法に従い Lipofectamine 2000 (Invitrogen 社) を用いて行った。線維芽細胞は、PAI-1WT および PAI-1KO マウスの皮下組織より当研究室で樹立化したものを用いた。

### (2) t-PAR 発現線維芽細胞の性質

線維芽細胞の t-PA 結合能は、分子相互作用解析装置 IAsys (Affinity Sensors) で検討した。また、細胞表面上での t-PA 活性と Plg 活性化能は、合成基質法 (t-PA 基質 ; S-2288、plasmin 基質 ; S-2251、積水メディカル) で検討した。細胞の増殖能は、WST-1 assay キット (TAKARA) を用いて測定した。

### (3) 感温性ポリマーに対する細胞の接着・剥離

t-PAR 発現線維芽細胞は、感温性ポリマー {poly (N-isopropylarylamide)} を固相化したシート上で培養し、37°C での接着性とその後 25°C での剥離性について検討した。

### (4) 細胞の感温性ポリマー上での機能

ポリマー上の細胞の機能は、t-PA 活性および Plg 活性化能、細胞増殖能について上記同様に測定した。さらに、ポリマー上で培養後、温度変化で剥離した細胞についてもその機能を同様に測定した。

### (5) マウス皮膚創傷治癒モデル

$\alpha_2$ -APKO とその野生型 ( $\alpha_2$ -APWT) マウスに対して、背部の皮膚を切開 (直径 6 mm) し、その後の治癒過程を観察した。また、治癒部位の血管新生と VEGF の遺伝子および蛋白発現について解析した。

## 4. 研究成果

### (1) t-PAR 発現線維芽細胞の作成

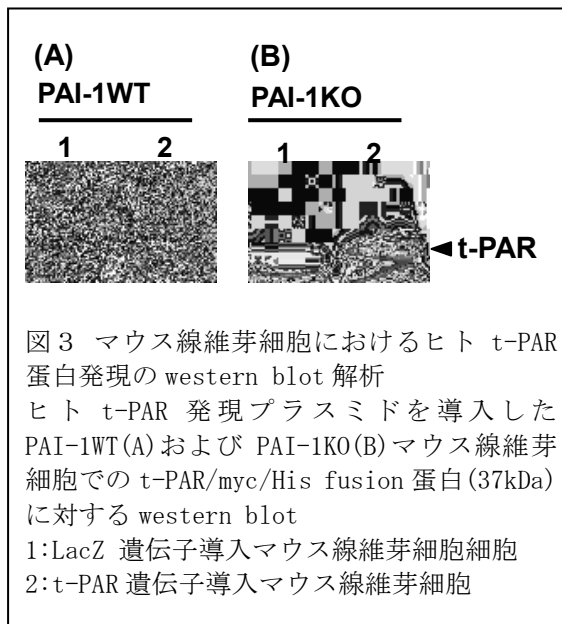
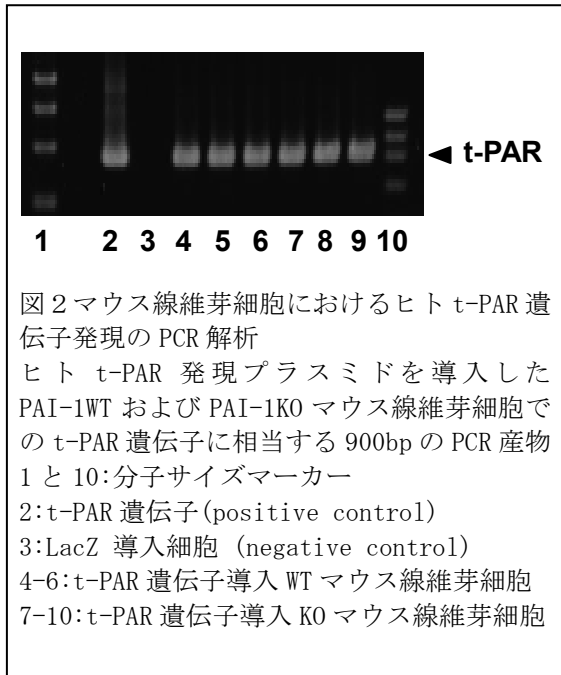
作成した PAI-1WT および PAI-1KO マウス由来の t-PAR 高発現線維芽細胞は、ヒト t-PAR 遺伝子 (図 2) および蛋白質 (図 3) の発現が確認された。

### (2) t-PAR 発現線維芽細胞の性質

PAI-1WT および PAI-1KO マウス由来の t-PAR 発現線維芽細胞は、control 細胞である LacZ 発現 plasmid を導入した線維芽細胞に比べ、t-PA に対し強く結合能を示した (図 4)。

t-PAR 発現線維芽細胞は、control 線維芽細胞に比べ、t-PA 依存性の t-PA 活性および Plg 活性化を増強させた (図 5)。その

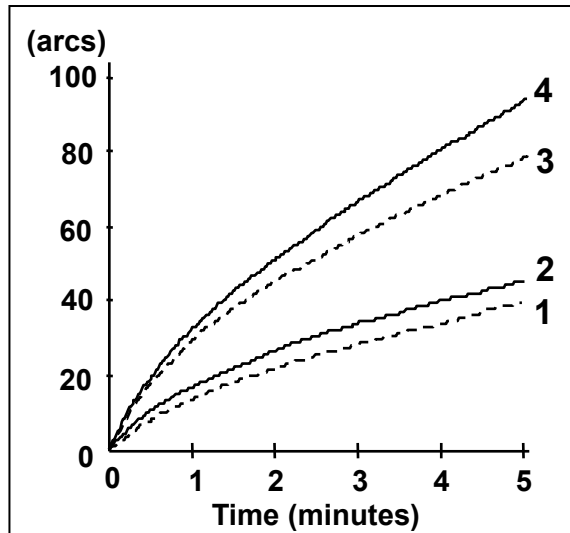
増強は PAI-1KO マウス由来の方が PAI-1WT マウス由来よりも強かった。



### (3) 感温性ポリマーに対する細胞の接着・剥離

t-PAR 発現線維芽細胞は、ポリマー固相化シート上に 37°C で接着した。また、t-PAR 発現線維芽細胞の培養 7 日目の細胞状態は、ポリマー上と通常培養用のプラスチック上ではほぼ同等の形体を示した (図 6)。  
t-PAR 発現細胞を 37°C で 24 時間培養後、

25°C にし経時的に顕微鏡下で細胞を観察した。固相化ポリマー上で培養した t-PAR 高発現線維芽細胞は、25°C で 30 分ごろからシート状に細胞がまとまって剥がれる現象が観察された。また、プラスチック上の細胞では、25°C で経時的に顕著な変化は観察されなかった。



### (4) 感温性ポリマー上の細胞の機能

ポリマー上での t-PAR 発現細胞の増殖能は、通常のプレート上とほぼ同等であった (図 7)。また、PAI-1KO マウス由来 (図 7 A) の t-PAR 発現線維芽細胞は、PAI-1WT 由来 (図 7 B) に比べ、72、96 時間の増殖が有意に増強していた。

t-PAR 発現細胞の t-PA 依存性 P1g 活性化能は、非発現細胞に比べ有意に増加していた。また、PAI-1KO マウス由来細胞 (図 8 A) の活性化能は、PAI-1WT 由来細胞 (図 8 B) より高かった。それらの効果は、ポリマープレートと通常プレートではほぼ同等であった。

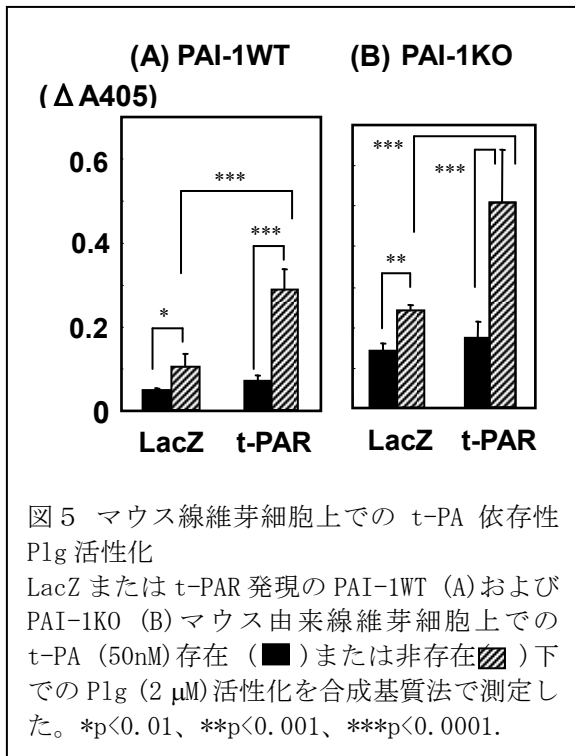


図5 マウス線維芽細胞上での t-PA 依存性 P1g 活性化  
LacZ または t-PAR 発現の PAI-1WT (A) および PAI-1KO (B) マウス由来線維芽細胞上での t-PA (50nM) 存在 (■) または非存在 (▨) 下での P1g (2 μM) 活性化を合成基質法で測定した。\*p<0.01, \*\*p<0.001, \*\*\*p<0.0001.

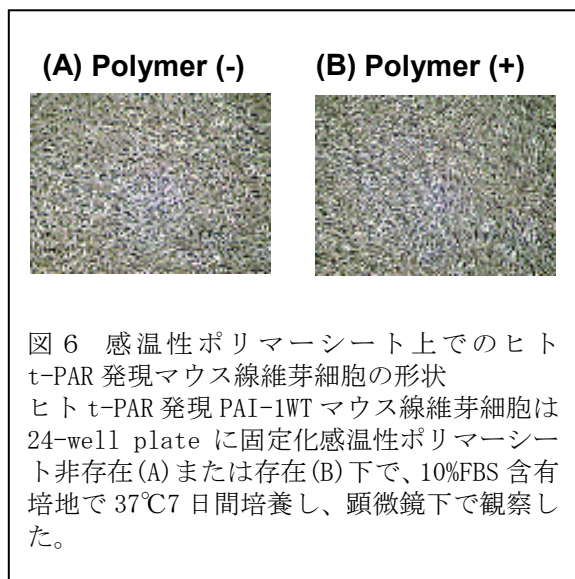


図6 感温性ポリマーシート上でのヒト t-PAR 発現マウス線維芽細胞の形状  
ヒト t-PAR 発現 PAI-1WT マウス線維芽細胞は 24-well plate に固定化感温性ポリマーシート非存在 (A) または存在 (B) 下で、10%FBS 含有培地で 37°C 7 日間培養し、顕微鏡下で観察した。

(5) マウス皮膚創傷治癒モデル

マウス背部皮膚の切開後の治癒は、 $\alpha_2$ -APKO マウスの方が  $\alpha_2$ -APWT マウスよりも有意に早かった。また、治癒部位の血管新生は、 $\alpha_2$ -APKO マウスの方が  $\alpha_2$ -APWT マウスよりも促進していた。治癒部位および皮膚由来線維芽細胞による VEGF 発現は、遺伝子および蛋白ともに  $\alpha_2$ -APKO マウスの方が  $\alpha_2$ -APWT マウスよりも有意に高かった。

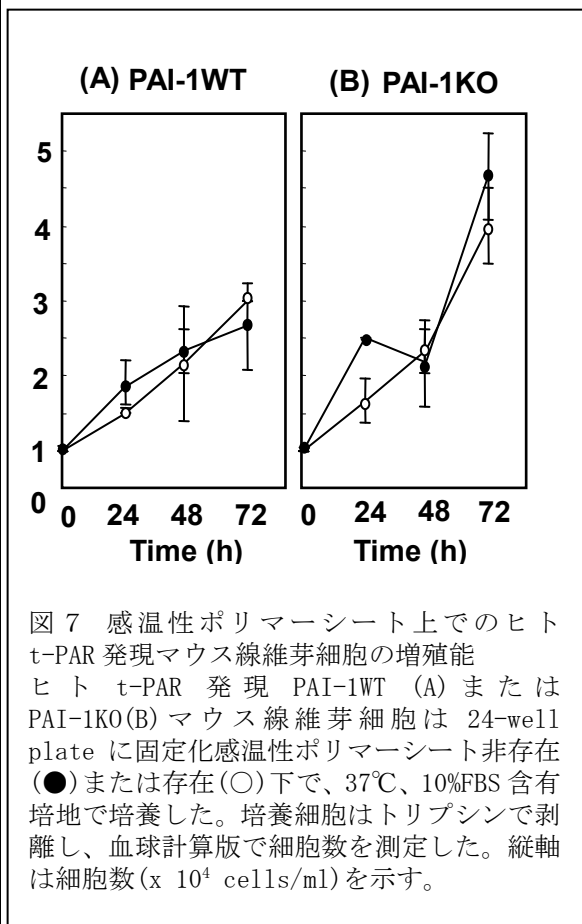


図7 感温性ポリマーシート上でのヒト t-PAR 発現マウス線維芽細胞の増殖能  
ヒト t-PAR 発現 PAI-1WT (A) または PAI-1KO (B) マウス線維芽細胞は 24-well plate に固定化感温性ポリマーシート非存在 (●) または存在 (○) 下で、37°C、10%FBS 含有培地で培養した。培養細胞はトリプシンで剥離し、血球計算版で細胞数を測定した。縦軸は細胞数 (x 10<sup>4</sup> cells/ml) を示す。

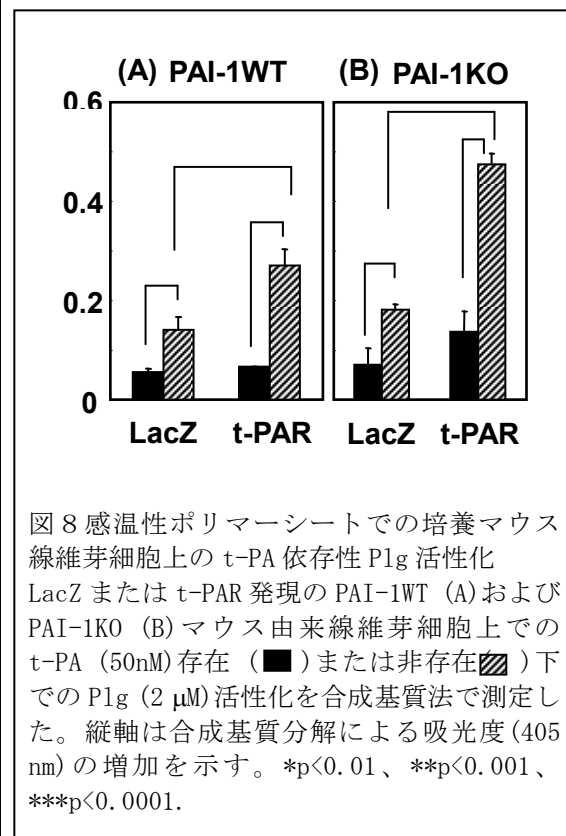


図8 感温性ポリマーシートでの培養マウス線維芽細胞上の t-PA 依存性 P1g 活性化  
LacZ または t-PAR 発現の PAI-1WT (A) および PAI-1KO (B) マウス由来線維芽細胞上での t-PA (50nM) 存在 (■) または非存在 (▨) 下での P1g (2 μM) 活性化を合成基質法で測定した。縦軸は合成基質分解による吸光度 (405 nm) の増加を示す。\*p<0.01, \*\*p<0.001, \*\*\*p<0.0001.

よって、マウス皮膚損傷モデルでは、その治癒過程に蛋白分解活性の重要性が示唆された。今後この系における感温性ポリマー上の t-PA 発現線維芽細胞の効果について検討する予定である。

以上の結果より、ヒト t-PA 発現マウス線維芽細胞は、感温性ポリマー上で十分な機能を発現し、温度変化によりシート上に脱着が可能であることが示唆された。この t-PA/t-PA 系による細胞上での蛋白分解活性制御細胞は、感温性ポリマー樹脂と組み合わせた新たな手法として組織損傷後の修復・再生への臨床応用が期待される。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 16 件)

1. Okada K, Ueshima S, Matsuo O, (他 7 名, 10 番目). Binding of plasminogen to hepatocytes isolated from injured mouse liver and nonparenchymal-cell-dependent proliferation of hepatocytes. *Blood Coagul Fibrinolysis* 19:503-511, 2008. 査読有
2. Kanno Y, Okada K, Matsuo O, (他 7 名, 9 番目). The absence of uPAR attenuates insulin-induced vascular smooth muscle cell migration and proliferation. *Thromb Res* 123:336-341, 2008. 査読有
3. Kanno Y, Okada K, Matsuo O, (他 7 名, 9 番目). The absence of uPAR is associated with the progression of dermal fibrosis. *J Invest Dermatol* 128:2792-2797, 2008. 査読有
4. Hou Y, Okada K, Matsuo O, (他 2 名, 5 番目). Alpha2-antiplasmin is a critical regulator of angiotensin II-mediated vascular remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28:1257-1262, 2008. 査読有
5. Li Y, Nagai N, Matsuo O, (他 16 名, 12 番目). VEGF-B inhibits apoptosis via VEGFR-1-mediated suppression of the expression of BH3-only protein genes in mice and rats. *J Clin Invest* 118:913-923, 2008. 査読有
6. Nagai N, Okada K, Matsuo O, (他 3 名, 6 番目). Urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) augments brain damage in a murine model of ischemic stroke. *Neurosci Lett* 432:46-49, 2008. 査読有
7. Mimuro J, Okada K, Matsuo O, (他 7 名, 10 番目). Unbalanced expression of ADAMTS13 and von Willebrand factor in mouse endotoxemia. *Thromb Res* 122:91-97, 2008. 査読有
8. 上嶋 繁, 岡田清孝, 松尾 理, (他 3 名, 6 番目). 線溶系: 血管外での新しい機能. *近畿大学医学会雑誌* 33:161-178, 2008. 査読無
9. 岡田清孝, 松尾 理. 肝再生と線溶系. *日本血栓止血学会誌* 19:216-225, 2008. 査読無
10. 永井信夫, 松尾 理. 神経系における線溶系因子の役割. *Int Review Thromb* 3:22-28, 2008. 査読無
11. Hou Y, Okada K, Matsuo O, (他 4 名, 7 番目). c-Myc is essential for urokinase plasminogen activator expression on hypoxia-induced vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* 75:186-194, 2007. 査読有
12. Matsuo O, Lijnen HR, Ueshima S, (他 2 名, 1 番目). A guide to murine fibrinolytic factor structure, function, assays, and genetic alterations. *J Thromb Haemost* 5:680-689, 2007. 査読有
13. Okada K, Ueshima S, Matsuo O, (他 4 名, 7 番目). Effect of staphylokinase-derived nonadecapeptide on the activation of plasminogen. *Thromb Haemost* 97:795-802, 2007. 査読有
14. Kawao N, Okada K, Matsuo O, (他 4 名, 7 番目). Plasmin decreases the BH3-only protein BimEL via the ERK1/2 signaling pathway in hepatocytes. *Biochim Biophys Acta- Mol Cell Res* 1773:718-727, 2007. 査読有
15. Otaki S, Ueshima S, Matsuo O, (他 4 名, 7 番目). Mesenchymal progenitor cells in adult human dental pulp and their ability to form bone when transplanted into immunocompromised mice. *Cell Biol Int* 31:1191-1197, 2007. 査読有
16. Kanno Y, Okada K, Matsuo O, (他 3 名, 6 番目).  $\alpha_2$ -antiplasmin is involved in the production of transforming growth factor  $\beta$ 1 and fibrosis. *J Thromb Haemost* 5:2266-2273, 2007. 査読有

[学会発表] (計 9 件)

1. 岡田清孝. 再生肝細胞上でのプロテアーゼ増幅系による肝再生制御機構の解析. 第 8 回日本再生医療学会総会, 2009 年 3 月 5 日, 東京.
2. 岡田清孝. 細胞性線溶と肝再生機構. 第 31 回日本血栓止血学会学術集会 2008 年 11 月 22 日, 大阪.
3. 岡田清孝. 新規ペプチドのプラスミノゲン活性化促進機序の解析. 第 31 回日本血栓止血学会学術集会, 2008 年 11 月

- 21日, 大阪.
4. 岡田清孝. マウス再生肝細胞上における蛋白分解カスケード制御機構の解析. 第31回日本血栓止血学会学術集会, 2008年11月21日, 大阪.
  5. 上嶋 繁. 血栓溶解療法の基礎. 第31回日本血栓止血学会学術集会, 2008年3月21日, 大阪.
  6. 河尾直之. 光化学刺激血栓モデルによる局所的肝傷害後の修復過程におけるプラスミノゲンの役割. 第31回日本血栓止血学会学術集会, 2008年11月21日, 大阪.
  7. 岡田清孝. 肝細胞上での蛋白分解カスケード増幅系による肝再生制御機構の解析. 第7回日本再生医療学会総会, 2008年3月13日, 名古屋.
  8. 河尾直之. 線溶系の肝再生過程への関与に対する肝細胞系での解析. 第15回日本病態生理学会大会, 2008年1月26日, 神戸.
  9. Okada K. Effect of synthetic peptides derived from staphylokinase on the activation of plasminogen. XXIst Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, 2007年7月9日, Geneva.

[図書] (計 2件)

1. Okada K, Ueshima S, Matsuo O. Role of fibrinolysis in hepatic regeneration. In: Recent Advances in Thrombosis and Hemostasis Tanaka K, Davie EW (eds), Tokyo, Springer Japan, 336-347, 2008.
2. 岡田清孝, 松尾 理. 凝固線溶系の新しい知見. In: 血栓塞栓症研究の新展開 (編集:高杉善弘、保田知生、松尾 理) 大阪, 近畿大学出版, 61-66, 2007.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1件)

名称: 血栓症発症予防および治療用物質  
発明者: 松尾 理、上嶋 繁、岡田清孝、石田知可子、白石浩平  
番号: 特願 2008-297312  
出願年月日: 平成 20 年 10 月 24 日  
国内外の別: 国内

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松尾 理 (MATSUO OSAMU)  
近畿大学・医学部・教授  
研究者番号: 40030879

(2) 研究分担者

上嶋 繁 (UESHIMA SHIGERU)  
近畿大学・農学部・教授  
研究者番号: 30193791  
岡田 清孝 (OKADA KIYOTAKA)  
近畿大学・医学部・講師  
研究者番号: 20185432  
河尾 直之 (KAWAO NAOYUKI)  
近畿大学・医学部・助教  
研究者番号: 70388510

(3) 連携研究者

なし