



Inhalation of urokinase-type plasminogen activator (uPA) reduces airway remodeling in a murine asthma model

倉本, 衣美

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2009-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲4649

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004649>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏 名	倉本 衣美
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学 位 記 番 号	博い第 4649 号
学位授与の 要 件	学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与の 日 付	平成 21 年 3 月 25 日

【 学位論文題目 】

Inhalation of urokinase-type plasminogen activator (uPA) reduces airway remodeling in a murine asthma model(ウロキナーゼの吸入により、マウス喘息モデルの気道リモデリングが改善する)

審 査 委 員

主 査	教 授	秋田 穂束
	教 授	熊谷 俊一
	教 授	平田 健一

背 景

気管支喘息は「気道の慢性炎症と可逆性気道狭窄および気道過敏性の亢進」と定義される。繰り返す気道炎症は気道構造の変化(リモデリング)を惹起し、気道狭窄の可逆性が障害される。特徴的な病理学的変化としては、不可逆的な気道の構造変化(気道の上皮下線維化、細胞外マトリックスの沈着、気管平滑筋肥大、杯細胞過形成)が挙げられる。線溶系(uPA/plasmin)には、血管新生、細胞遊走、線維化などの様々な生理学的機能を調節する働きがある。主に Tissue-type plasminogen activator (tPA) と urokinase type PA (uPA) の 2 つの調節因子があるが、血管外の作用で特に重要なのが uPA である。uPA は細胞内で plasminogen を活性化し、それにより直接あるいは間接的に細胞外マトリックスを分解し、様々な成長因子を活性化することに関わっていることが知られている。

線溶系の主な抑制酵素は、PAI (plasminogen activator inhibitor)-1 であり、線維化や細胞外マトリックスの沈着へと誘導する組織リモデリングにも重要な役割を果たしている。

線溶系の活性化が肺の線維化を抑制する報告がある。例えば、PAI-1 ノックアウトマウスや、uPA を投与された wild type マウスは肺傷害後の肺線維化に抵抗性である。その機序はまだはっきりとは解明されていないが、hepatocyte growth factor (HGF) の関与が報告されている。細胞外マトリックスからの HGF の放出を促進し、また線維化に関わる transforming growth factor (TGF)- β の機能を低下させるといわれている。

今回我々は、線溶系 (uPA/plasmin) を亢進させることによって、マウス喘息モデルでの気道リモデリングが軽減するとの仮説を立て、さらに線溶系の活性に伴う HGF の変化についても検討した。

方 法

【動物モデル】

6-8週齢メスの C57BL/6 マウス (wild type マウス、PAI-1 ノックアウトマウス) を用いた。以下の方法で気管支喘息モデルを作成し、whole body plethysmography (WBP) にて気道過敏性の評価を行った後、気管支肺胞洗浄液 (BALF) と肺パラフィン切片でのマッソン・トリクローム染色および各種免疫染色を行った。マッソン・トリクローム染色での構造変化(上皮下線維化)は、Image J ソフトを用い定量化し評価した。また肺ホモジネートで Hydroxyproline assay による肺線維化の評価を行った。

急性喘息モデル

50 μ g OVA にて感作後、day1 より 1% OVA を 1 日 30 分、連続 3 日間吸入し、急性喘息モデルを作成した。線溶系亢進モデルとして、500 IU/day の uPA を吸入させた OVA+uPA 群と、PAI-1 ノックアウト(-/-) マウスを用いた。

慢性喘息モデル

50 μ g OVA にて感作後、day1 より 1% OVA を 1 日 30 分、連続 3 週間吸入し、慢性喘息モデルを作成した。線溶系亢進モデルとして、day15~21 に 500 IU/day の uPA を吸入させた uPA 群と、PAI-1/-喘息群(PAI-OVA)を用いた。

慢性期ウロキナーゼ治療モデル

上記慢性喘息モデルにおいて 3 週間の OVA 吸入後、uPA を 1 週間吸入させ、治療効果を評価した。

【細胞モデル】

ヒト肺線維芽細胞 (WI-38 細胞株) を用い、線溶系を抑制する因子として Tranexamic acid (TXA)、 ϵ -aminocaproic acid (EACA) を添加し、一方線溶系を亢進させる因子として、uPA を添加後 TGF- β 1 で刺激を行い、ウェスタンブロット法により α -SMA 発現をみた。

結 果

線溶系活性群での BALF 中の線溶系活性は亢進する。

線溶系の亢進が喘息反応の改善に 影響を与えるかどうかをみるため、fibrin clot 法と、ELISA kit を用いた BALF 中の線溶系活性を測定した。いずれの方法においても、uPA を吸入させた wild type 喘息群 (OVA+uPA) と、PAI-1^{-/-}喘息群 (PAI-OVA) での BALF 中の線溶系活性は亢進していた。また、BALF 中 PAI-1 活性は wild type 喘息群 (OVA) で有意に亢進し、OVA+uPA 群では有意に抑制されていた。

線溶系亢進群での気道上皮下線維化は軽減する。

慢性喘息モデルにおける上皮下の線維化を評価するため、マッソン・トリクローム染色を行い、線維化面積を評価した。線溶系亢進群 (OVA+uPA、PAI-OVA) での上皮下線維化は喘息群 (OVA) と比べ、有意に軽減していた。

α -smooth muscle actin (α -SMA)発現は喘息群で増加し、線溶系亢進群では減少する。

肺線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化は、 α -SMA の発現で特徴づけられる。慢性喘息での線溶系活性の変化が筋線維芽細胞へ与える影響を評価するため、肺組織で α -SMA の免疫染色を行った。喘息群では、気管支・血管周囲の α -SMA の発現が増強していた。一方、線溶系亢進群 (OVA+uPA、PAI-OVA) では喘息群 (OVA) と比べ、著明に軽減していた。

線溶系亢進群では気道反応性が軽減する。

線溶系の変化が、OVA 暴露による生理学的変化にどのような影響を与えるかをみるため、慢性喘息モデルにて、OVA 最終吸入の 24 時間後に、whole body plethysmography (WBP) を用いて気道 反応性の評価を行った。線溶系亢進群 (OVA+uPA、PAI-OVA) のメサコリンに対する気道反応性は、喘息群 (OVA) と比較し有意に低下していた。

線溶系亢進群での BALF 中の HGF 発現は有意に亢進し、TGF- β 1 発現は有意に減弱する。

線溶系の亢進が、HGF 発現にどのような影響を与えるかをみるため、慢性喘息モデルでの BALF 中の HGF レベルをウェスタンブロット法と ELISA kit にて測定し、肺組織中での c-Met (HGF 発現のマーカー) の免疫染色を行った。HGF 発現は線溶系亢進群 (OVA+uPA、PAI-OVA) で喘息群 (OVA) と比べ著明に亢

進していた。

肺線維芽細胞での TGF- β 1 による筋線維芽細胞の分化は、線溶系の低下により増強し、線溶系の亢進により減弱する。

筋線維芽細胞の分化における線溶系の役割を調べるため、ヒト肺線維芽細胞を用いた。TXA、EACA 添加によって線溶系を低下させた群で α -SMA 発現は増強し、一方 PA 添加によって線溶系を亢進させた群では α -SMA 発現は減弱していた。

uPA の吸入は、完成された気道リモデリングも改善させる。

3 週間 OVA を吸入させ慢性喘息モデルを作成した後、1 週間後よりウロキナーゼ治療群として uPA を 1 週間吸入させた。マッソン・トリクローム染色、WBP での気道過敏性と Hydroxyproline assay による肺線維化の評価を行った。ウロキナーゼ治療群で、気道過敏性や気道上皮下線維化とさらに肺線維化も喘息コントロール群と比べ、有意に改善していた。

考 察

線溶系の活性化が肺線維化の進展に影響を与えることが知られている。例えば、PAI-1 過剰発現マウスや plasminogen 欠損マウスのような線溶系を傷害させた状態では、肺傷害後の線維化が増強するという報告がある。逆にPAI-1 欠損マウスや uPA を亢進させたような線溶系が亢進した状態では、肺線維化に対し保護的に働くといわれている。しかし慢性喘息における線溶系の役割について検討した報告は少ない。今回の実験では、uPA を吸入させることで、種々の喘息反応を軽減させようことを示した。

今回の検討で、uPA 吸入により wild type マウスでの uPA/PAI-1 バランスを変化させ、線溶系活性を修飾することによって、気道リモデリングを軽減させることが分かった。他に、PAI-1-/-マウスでは、Th2 反応が抑えられ Th1 優位に傾いているため気道炎症が軽減するという報告もある。気道過敏性には気道の炎症細胞浸潤と気道リモデリングの両方が関与するといわれるが、気道の線維化が気道過敏性の増加に最も大きく関わる。

Hattori らは、プレオマイシン肺線維症モデルで uPA の投与によって、HGF を介して線維化を抑制させるとした。肺腔での HGF の主な由来は肺泡マクロファージと間質の線維芽細胞で、線維芽細胞は他に PA も産生している。また線維芽細胞は、線溶系で不活型 HGF を活性型 HGF に分解して、細胞外マトリックス (ECM) から放出しているので、plasminogen の活性化は HGF の活性化を通して肺の線維化を抑制しているといえる。また Ito らは、HGF には TGF- β や Th2 サイトカインの発現を調節する機能があることを示した。TGF- β の抑制と HGF の増加は線維化の抑制に有効とされており、我々の、「uPA 活性の活性化が HGF/TGF- β バランスを修飾し気道リモデリングを軽減する」という仮説に合致する。

線維化病変での筋線維芽細胞の集簇は、ECM の沈着を増加させ、肺傷害後の構造リモデリングや血管/肺泡構造の破壊を引き起こす。筋線維芽細胞は一般に α -SMA の発現で示される。今回慢性喘息モデルにて、線溶系の活性化で α -SMA の発現が減弱していた。線維芽細胞を用いた in vitro でも、線溶系の変化が α -SMA の発現に影響を与えることが示され、uPA の活性化が、気道リモデリングにおいて筋線維芽細胞の分化に影響を与えることが分かった。

線溶系は喘息の気道リモデリングに重要な役割を果たしており、主に成長因子の活性化を介していることが考えられた。今回の我々の結果により、uPA の投与による線溶系の活性化が、慢性喘息に対する新たな治療法として有用である可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

受 付 番 号	甲 第 1985 号	氏 名	倉本 衣美
論 文 題 目 Title of Dissertation	Inhalation of urokinase-type plasminogen activator (uPA) reduces airway remodeling in a murine asthma model ウロキナーゼの吸入により、マウス喘息モデルの 気道リモデリングが改善する		
審 査 委 員 Examiner	主 査 秋田 穂東 Chief Examiner 副 査 平岡 健一 Vice-examiner 副 査 熊谷 俊一 Vice-examiner		
審 査 終 了 日	平成 21 年 2 月 18 日		

(要旨は 1, 0 0 0 字～2, 0 0 0 字程度)

線溶系には、血管新生、細胞遊走、線維化などの生理機能を調節する働きがある。主に Tissue-type plasminogen activator (tPA) と urokinase type PA (uPA) の 2 つの調節因子があるが、血管外の作用で特に重要なのが uPA である。uPA は細胞内で plasminogen を活性化し、それにより直接あるいは間接的に細胞外マトリックスを分解し、様々な成長因子を活性化する。線溶系の主な抑制因子は、PAI (plasminogen activator inhibitor)-1 であり、線維化や細胞外マトリックスの沈着へと誘導する組織リモデリングにも重要な役割を果たしている。

PAI-1 ノックアウトマウスや、uPA を投与された wild type マウスは肺傷害後の肺線維化に抵抗性である。その機序はまだ解明されていないが、hepatocyte growth factor (HGF) の関与が報告されている。細胞外マトリックスからの HGF の放出を促進し、また線維化に関わる transforming growth factor (TGF)- β の機能を低下させるといわれている。

今回われわれは、線溶系を亢進させることによって、マウス喘息モデルでの気道リモデリ

ングが軽減するとの仮説を立て、さらに線溶系の活性に伴う HGF の変化についても検討した。

6-8 週令メスの C57BL/6 マウス (wild type マウス、PAI-1 ノックアウトマウス) を用い、気管支喘息モデルを作成し、whole body plethysmography (WBP) にて気道過敏性の評価を行った後、気管支肺胞洗浄液 (BALF) と肺パラフィン切片でのマッソン・トリクローム染色および各種免疫染色を行った。まず急性喘息モデルとして、50 μ g OVA にて感作後、day1 より 1% OVA を 1 日 30 分連続 3 日間吸入させた。線溶系亢進モデルとして、500 IU/day の uPA を吸入させた OVA+uPA 群と、PAI-1 ノックアウト (-/-) マウスを用いた。fibrin clot 法と、ELISA 法で BALF 中の線溶系活性を測定した。いずれの方法においても、uPA を吸入させた wild type 喘息群 (OVA+uPA) と、PAI-1/- 喘息群 (PAI-OVA) での BALF 中の線溶系活性は亢進していた。また、BALF 中 PAI-1 活性は wild type 喘息群 (OVA) で有意に亢進し、OVA+uPA 群では有

意に抑制されていた。次に、気道リモデリングへの線溶系の影響をみるために、慢性期喘息モデルも作成した。感作後、day1より1% OVAを1日30分、連続3週間吸入し、慢性喘息モデルを作成した。線溶系亢進モデルとして、day15～21に500 IU/dayのuPAを吸入させたuPA群と、PAI-1^{-/-}喘息群 (PAI-OVA)を用いた。肺組織マッソン・トリクローム染色を行い、線維化面積を評価した。線溶系亢進群 (OVA+uPA、PAI-OVA)での上皮線維化は喘息群 (OVA)と比べ、有意に軽減していた。慢性喘息での線溶系活性の変化が筋線維芽細胞へ与える影響を評価するため、肺組織で α -SMAの免疫染色を行った。喘息群では、気管支・血管周囲の α -SMAの発現が増強していた。一方、線溶系亢進群 (OVA+uPA、PAI-OVA)では喘息群 (OVA)と比べ、著明に軽減していた。また線溶系亢進群 (OVA+uPA、PAI-OVA)のメサコリンに対する気道過敏性は、喘息群 (OVA)と比較し有意に低下していた。BALF中のHGFレベルをウェ

スタンプロット法とELISA法にて測定し、肺組織中でのc-Met (HGF発現のマーカー)の免疫染色を行った。HGF発現は線溶系亢進群 (OVA+uPA、PAI-OVA)で喘息群 (OVA)と比べ著明に亢進していた。筋線維芽細胞の分化における線溶系の役割を調べるため、ヒト肺線維芽細胞 (WI-38)を用いた細胞実験を行った。plasminogen inhibitor (TXA、EACA)の添加によって線溶系を低下させた群で α -SMA発現は増強し、一方uPA添加によって線溶系を亢進させた群では減弱していた。

3週間OVAを吸入させ慢性喘息モデルを作成した後、1週間後よりuPA治療群としてuPAを1週間吸入させた慢性期uPA治療モデルを作成した。uPA治療群で、気道過敏性や気道上皮下線維化と、さらに肺線維化も、喘息コントロール群と比べ有意に改善していた。

今回の実験では、uPAを吸入させることで種々の喘息反応を軽減させうることを示した。uPA吸入によりwild typeマウスでのuPA/PAI-1バ

ランスを変化させ、線溶系活性を修飾することによって、気道リモデリングを軽減させることが分かった。気道過敏性には気道の炎症細胞浸潤と気道リモデリングの両方が関与するといわれるが、気道の線維化が気道過敏性の増加に最も大きく関わる。今回の慢性喘息モデルにて、線溶系の活性化で α -SMAの発現が減弱していた。線維芽細胞を用いたin vitroでも、線溶系の変化が α -SMAの発現に影響を与えることが示され、uPAの活性化が、気道リモデリングにおいて筋線維芽細胞の分化に影響を与えることが分かった。

本研究は、喘息の気道リモデリングについて、その線溶系の役割を研究したものであるが、従来殆ど行なわれなかったuPAの吸入療法について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。