

Review

肺胞上皮細胞基底膜形成とサイトカイン

古山昭子, 持立克身
国立環境研究所

Effects of Cytokines on the Formation of Basement Membrane by Alveolar Epithelial Cells

Akiko FURUYAMA and Katsumi MOCHITATE

National Institute for Environmental Studies

Received, 30 November 2001; accepted, 5 March 2002.

Abstract: Basement membrane beneath alveolar epithelial cells is an essential architecture for expressing the function of alveolar epithelial cells in alveoli. The formation of the basement membrane is achieved by cooperation between alveolar epithelial cells and pulmonary fibroblasts. To investigate the mechanism of the basement membrane formation, we use alveolar tissue reconstruct consist of type II alveolar epithelial cells and/or pulmonary fibroblasts. TGF- β 1, which is a potent fibrogenic cytokine, upregulated the synthesis of basement membrane constitutes as well as type I collagen in type II alveolar epithelial cells. Alveolar epithelial cells succeeded to form a continuous basement membrane at 1 ng/ml of TGF- β 1. However, at 5 ng/ml of TGF- β 1, excess production of type I collagen obstruct the integration of basement membrane. Various fibrogenic and proinflammatory cytokines is possible to effect on the formation of basement membrane.

Key words: alveolar epithelial cells, basement membrane, TGF- β 1

基底膜 (basement membrane, basal lamina) は上皮細胞・内皮細胞・神経細胞などの直下に存在する、多種類の細胞外マトリックスが会合した膜状構造体の総称である。基底膜構造体は、形態的には lamina lucida, lamina densa, lamina fibroreticularis の3層から構成される¹⁾。Lamina densa は、透過型電子顕微鏡で電子線密度の高い、細く連続した構造体として観察される。基底膜の主な細胞外マトリックス成分である laminin, entactin (nidogen), type IV collagen, heparan sulfate proteoglycan が²⁾、同種分子あるいは分子間で相互に結合し難溶性の高分子複合体を形成して lamina densa を構成していると考えられている^{2),3)}。Lamina lucida は細胞基底面に接する電子線密度の低い部分である。Lamina fibroreticularis は type I collagen,

type III collagen, type V collagen, proteoglycans などから構成されるメッシュ状の部分で、基底膜と結合組織とを繋いでいる¹⁾。

外界に直接面している上皮細胞が細胞間に強固な接着構造 (tight junction, adherence junction) を形成することは、外界からの異物の侵入を妨げる防御機構となる上に、上皮細胞が apical, basal, lateral の極性を形成して細胞膜上のレセプターの再配置を促し、正常な物質代謝を維持するために重要である。基底膜はこのような上皮細胞の極性発現に貢献している⁴⁾。肺において、基底膜はガス交換の場である air-blood barrier を構成する I 型肺胞上皮細胞と血管内皮細胞を裏打ちする唯一の結合組織である。基底膜は柔軟で弾性に富む構造的足場となつて、肺胞上皮細胞の増殖・分化に影響を与えている^{5),6)}。肺胞上皮細胞に重要とされている基底膜であるが、これまでの研究は基底膜構造体を構成する分子としての機能ではなく、そのほとんどが単離された基底膜構成分子を用いた検討であった。さらに、基底膜の形成制御についてもいまだ明らかでない点が多い。これは、生化学的方法論あるいは遺伝子発現の情報だけでは、細胞外マトリックスのような難溶性で蓄積する構造体を解析

別刷請求先: 古山昭子 〒305-8506 茨城県つくば市小野川16-2 独立行政法人 国立環境研究所

Reprint requests to: Akiko Furuyama, PM 2.5 & DEP Research Project, National Institute for Environmental Studies, 16-2 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305-8506, Japan. Tel: +81-298-50-2521, Fax: +81-298-50-2574, e-mail: kawagoe@nies.go.jp

することに限界があることと、これまで *in vitro* の細胞培養で基底膜を形成できなかったことによる⁷⁾。我々の目標は *in vivo* の生命現象の解明であるが、肺胞上皮細胞とその基底膜を囲む環境ですら、きわめて複雑である。基底膜構造体の構築とその制御機構を解明するためには、発生や tissue remodeling の過程を詳細に観察し、基底膜構成分子やその分解・会合体形成を制御する遺伝子の発現や遺伝子産物の局在についての因果関係に関係する膨大な要因を考慮する必要がある。その点、細胞の環境と細胞間の相互作用を制御することが容易で、関連因子を絞り込むことが可能な *in vitro* の細胞培養系は有用である。我々は基底膜の構築の制御機構の解明に資するために、*in vitro* で肺胞基底膜の形成制御機構について検討を行ってきた。

基底膜は上皮細胞に接して存在しているため、基底膜は上皮細胞が分泌する基底膜構成分子から形成されていると考えられてきた。しかしながら、間葉系細胞が基底膜構成分子を分泌すること⁸⁾、肺胞でも entactin や laminin $\alpha 4$ chain などの基底膜構成分子は主に線維芽細胞にしか発現していないこと^{9),10)} から、肺線維芽細胞が肺胞上皮細胞の基底膜の形成に関与していることが示唆された。そこで、肺胞間質を模倣して肺線維芽細胞を

包埋した I 型コラーゲンゲル上にラット II 型肺胞上皮細胞¹¹⁾ を播種して培養することにより (Fig. 1 A), 肺胞上皮細胞直下に細く連続した基底膜を形成させることに成功した (Fig. 2)¹²⁾。免疫電顕により、この基底膜の lamina densa には laminin, entactin, type IV collagen, heparan sulfate proteoglycan が連続して集積していることが確かめられ、肺線維芽細胞の存在により *in vivo* の基底膜構造体とほぼ同等の基底膜が構築されていることが示された。このとき、肺胞上皮細胞とともに、肺線維芽細胞の周囲にも基底膜構成分子の沈着が認められたことから、肺線維芽細胞が肺胞上皮細胞に基底膜構成分子を供給することにより、基底膜形成を促進しているものと推測された。実際、基底膜粗抽出物である Matrigel や entactin と laminin-1 を添加して培養すると (Fig. 1 B), 基底膜構成分子は基底膜構造体に組み込まれて、肺胞上皮細胞単独でも I 型コラーゲン線維上で連続した基底膜を形成する¹³⁾。このように、肺線維芽細胞は基底膜構成分子を分泌することによって、肺胞上皮細胞の基底膜形成を制御しているのである。

他の結合組織の構築と同様に、基底膜構造体の形成には、基底膜構成分子の生合成だけでなく、matrix metalloproteinases (MMPs) による分解と tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs), plasminogen activator inhibitors (PAI), plasminogen

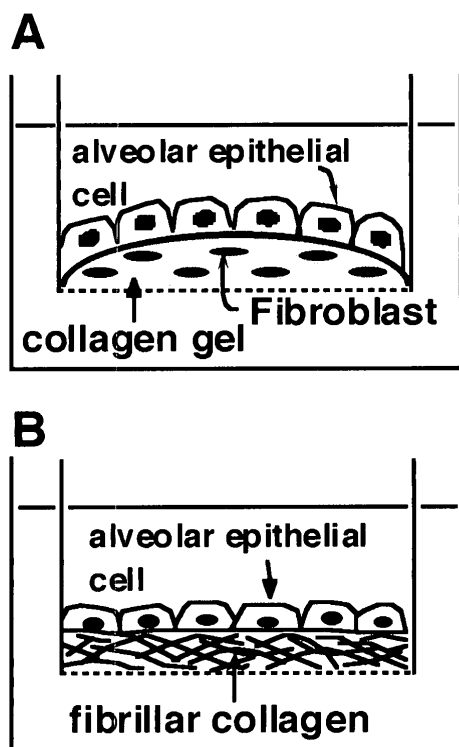


Fig. 1. Culture diagrams of alveolar type II epithelial cells and pulmonary fibroblasts.

Rat immortalized alveolar epithelial cells were seeded on fibroblasts-embedded type I collagen gels formed on porous membrane and cultured in DMEM with 1% FBS and 0.2 mM ascorbic acid 2-phosphate for 10 days (A). Alveolar epithelial cells were seeded on air-dried type I collagen gels in the presence of exogenous basement membrane constituents and/or cytokines (B).

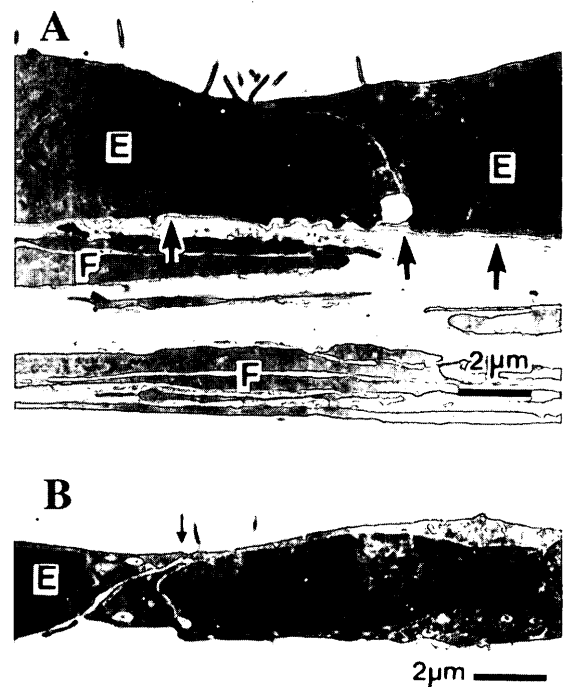


Fig. 2. Transmission electron micrographs of the extracellular matrix structure beneath alveolar epithelial cells cultured with pulmonary fibroblasts.

A continuous lamina densa (big arrows) is observed beneath alveolar epithelial cells in coculture of alveolar epithelial cells (E) and fibroblasts (F) (A) but not observed beneath alveolar epithelial cells cultured alone (B). Bars, 2 μ m.

activators (PA) などによる分解制御, 分子間の架橋, インテグリンなどの細胞接着分子による上皮細胞直下への anchoring や上皮細胞の増殖・分化・移動などの要素が複雑に関与する. そのような細胞機能全般に影響を及ぼす液性因子の1つがサイトカインである. サイトカインは細胞間の情報伝達を担う可溶性タンパク質の総称で, 多様な機能と構造を持つサイトカインは, その受容体の構造によりいくつかのファミリーに分類される¹⁴⁾. Interferon (IFN) や Interleukin-6 (IL-6) などは, class I・II 受容体と結合する. サイトカインが結合した受容体は, ホモあるいはヘテロの二量体または多量体に重合し, 受容体に結合している JAK 型チロシンキナーゼが活性化され, STAT あるいは Ras-MAPK 系の経路を介して遺伝子発現が誘導される. IL-1 の受容体である IL-1 R/TLR (toll like receptor) は, アダプター分子 Myd 88 を介して転写因子 NF- κ B ならびに JNK/p 38 シグナル伝達系を活性化する. Tumor necrosis factor (TNF) の受容体は, 三量体化されて活性化し, NF- κ B の活性化を介して細胞死や細胞増殖に関与する. 強い細胞走化性促進作用を持つケモカインの受容体は7回膜貫通ドメインを持ち G タンパク質に共役する¹⁵⁾. Fibroblast growth factor (FGF) などの増殖因子は, チロシンキナーゼ型受容体に結合し, Ras-MAPK 系を活性化することによりシグナル伝達する. Transforming growth factor- β (TGF- β) や BMP の受容体は serine/threonine kinase 活性を持ち, 転写因子 SMAD を活性化することで転写調節を行う. 細胞の増殖・分化・細胞死・運動性や機能制御はそれぞれのサイトカイン受容体からのシグナル伝達を介した遺伝子発現制御の結果である. さらに, あるサイトカインが paracrine または autocrine に別のサイトカインや受容体の発現を誘導するという, サイトカインネットワークの形成がサイトカインの作用の特徴である. また, 同一の細胞に複数のサイトカインが作用すると転写介在因子間の相互作用によりシグナルを増強または阻害するシグナルクロストークが存在するなど^{16),17)}, サイトカイン機能の全容を明らかにするのは容易ではない.

サイトカインは発生・組織傷害とその修復の各段階において作用している¹⁸⁾. 肺においても, 肺疾患に伴い分泌されるサイトカインが I 型コラーゲンや MMPs の生合成などに及ぼす影響については研究が進んでいる. しかしながら, 基底膜構成分子の生合成¹⁹⁻²¹⁾ や基底膜の形成に関する研究はほとんど報告されていない. さらに, これまで FGF-1 (acidic FGF), FGF-2 (basic FGF), FGF-7 (KGF)²²⁾, macrophage inflammatory cytokine-2 (MIP-2)²³⁾ が II 型肺胞上皮細胞の DNA 合成を促進すること, TNF- α がヒト肺胞上皮株細胞 A 549 cell の MMP-9 を分泌増加させる²⁴⁾ ことなどの報

告があるが, 肺胞上皮細胞の増殖や移動についての報告も少ない. 気道上皮細胞が炎症性細胞の遊走を促進するサイトカインを分泌することが明らかになり²⁵⁾, ヒト II 型肺胞上皮細胞や A 549 cell でもケモカインリセプター CXCR 4 が発現していることから²⁶⁾, 幅広いサイトカインについての検討が必要であると考えられる.

基底膜形成の研究を行う上で不可欠であるのは, 基底膜が構造体であるという認識である. サイトカインについても, 細胞外マトリックスの生合成・分解や肺胞上皮細胞と線維芽細胞の機能への検討に留まらず, 構造体の構築を形態学的に検討することが重要である. それを容易にしたのが前述の肺胞上皮細胞培養系であると考え, 基底膜形成へのサイトカインの影響を検討した. 糸球体上皮細胞で IV 型コラーゲンの mRNA を発現亢進する IL-6²⁷⁾, 線維芽細胞で IV 型コラーゲンの mRNA を発現亢進し²⁸⁾ 肺胞上皮細胞の遊走を促進する EGF²⁹⁾, 肺胞上皮細胞の遊走を阻害する IFN- γ ²⁹⁾ は基底膜形成に影響を及ぼさなかった (unpublished data). 一方, 肺線維症を促進する主要因と考えられている TGF- β 1 は¹⁸⁾, 組織傷害を受けた肺線維芽細胞や肺胞マクロファージから分泌が亢進する代表的サイトカインであり, 肺胞上皮細胞への影響についても最も研究が進んでいる³⁰⁾. TGF- β 1 は培養系での肺胞上皮細胞の基底膜形成を濃度依存的に促進 (1 ng/ml) または阻害 (5 ng/

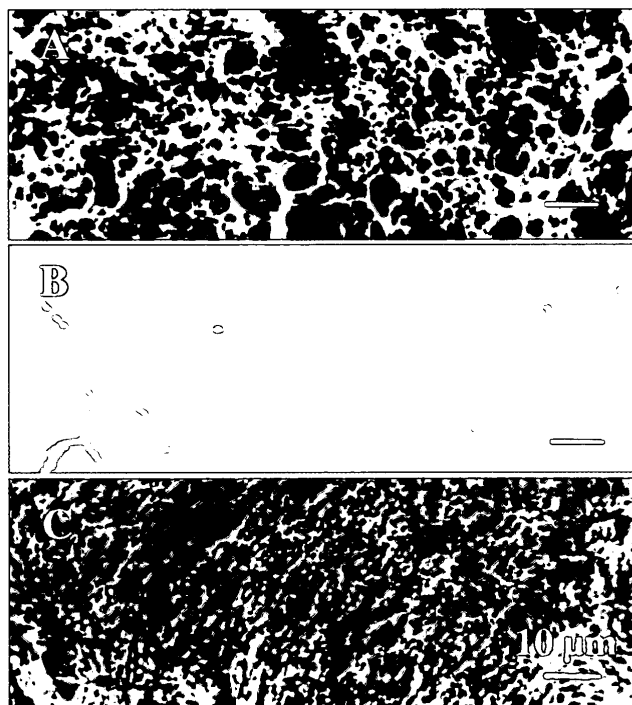


Fig. 3. Horizontal distribution of laminin-1 beneath alveolar epithelial cells cultured with TGF- β 1 examined with confocal laser scanning microscope.

Alveolar epithelial tissues cultured with 0 (A), 1 (B) or 5 ng/ml (C) of TGF- β 1 were stained with antibody to laminin-1, and then examined with a confocal microscope that focused beneath alveolar epithelial cells. Bars, 10 μ m.

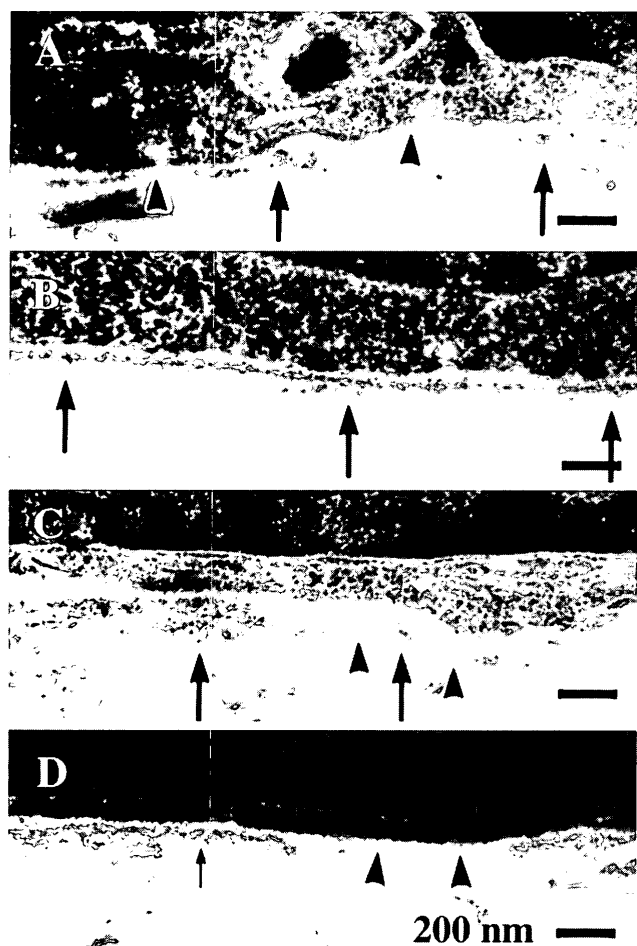


Fig. 4. Transmission electron micrographs of the extracellular matrix structure beneath alveolar epithelial cells cultured with TGF- β 1.

Alveolar epithelial cells were cultured with 0 (A), 1 (B) or 5 ng/ml (C) of TGF- β 1, and 100 ng/ml of TIMP-1 in the presence of 5 ng/ml of TGF- β 1 (D). A continuous lamina densa (big arrows) is observed only beneath the cells in the presence of 1 ng/ml of TGF- β 1. TIMP-1 could not attenuate the inhibition on the basement membrane formation by 5 ng/ml of TGF- β 1. Bars, 200 nm.

ml) した (Fig. 3)³¹⁾. TGF- β 1 の濃度に依存して、肺胞上皮細胞の主要基底膜構成分子の生合成が亢進したことが、1 ng/ml TGF- β 1 において連続した基底膜を形成させたものと考えられる。しかしながら、5 ng/ml TGF- β 1 基底膜構成分子の生合成亢進が認められたにもかかわらず基底膜形成が阻害された。この原因として基底膜構成分子の分解系の亢進の可能性を検討したが、MMP-2, TIMP-1, PAI-1 産生への影響はほとんどなく、基底膜が形成されない 5 ng/ml TGF- β 1 に 100 ng/ml の TIMP-1 を添加して培養しても、基底膜形成は回復しなかった (Fig. 4)。この 5 ng/ml TGF- β 1 による基底膜形成阻害に伴い、I 型コラーゲンと細胞性フィブロネクチンの生合成の亢進と細胞直下への顕著な沈着増加が認められた (Fig. 5)。本来 lamina fibroreticularis を構成すべき線維性コラーゲンの細胞直下での増加が基底膜構成分子の正常な集積を妨げているこ

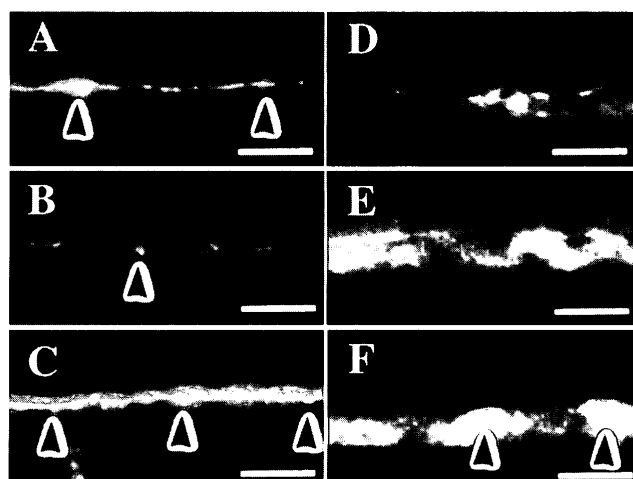


Fig. 5. Distribution of cellular fibronectin and type I collagen beneath alveolar epithelial cells cultured with TGF- β 1.

Cryostat sections from alveolar epithelial cells cultured with 0 (A, D), 1 (B, E) or 5 ng/ml (C, F) of TGF- β 1 were stained with cellular fibronectin (A, B, C) or type I collagen (D, E, F). Deposits of cellular fibronectin or type I collagen (arrow heads) were augmented beneath alveolar epithelial cells cultured with 5 ng/ml of TGF- β 1. Bars, 50 μ m.

とが推測された。基底膜構成分子の集積が、その他の細胞外マトリックスによって干渉されていることから、基底膜構成分子とその他の細胞外マトリックスの沈着のバランスにより基底膜の形成が影響を受けることが明らかになった。このように、構造体としての基底膜の形成研究には形態学的な観察手法と培養系を用いてはじめて明らかになる要因も多いと考えられる。また、5 ng/ml TGF- β 1 による基底膜形成阻害と不均一な基底膜様構造体の沈着は、肺線維化で観察される異常な基底膜と共通するところがあることから、この肺胞上皮細胞培養系で *in vivo* の病態を再現できる可能性を示唆している。

結 論

肺胞上皮細胞と肺線維芽細胞との関係は一方的な関係ではなく、基底膜の正常な形成と上皮組織の構築は線維芽細胞の活性を制御すると考えられる。肺の炎症時の肺胞上皮細胞の剝離や増殖と移動及び肺胞基底膜へのダメージと肺線維芽細胞が増殖活性化して、肺線維化または肺胞構造の破壊が進行することとの間に関連があることは、形態学的にはかなり以前から推測されている³²⁾。また、肺胞上皮細胞が肺線維芽細胞の増殖を制御することも報告されていることから³³⁾、サイトカインの基底膜形成制御機構については上皮細胞-間葉系細胞間相互作用を含めて考慮する必要がある。さらに、細胞機能や細胞外マトリックス構築の制御には、サイトカイン以外のホルモンや、メディエーターも関与していることは言うまでもない¹⁸⁾。また、endostatin などの例があるよう

に、細胞外マトリックスは必ずしも固相としてのみ機能するものではない³⁴⁾、FGFのようなヘパリン結合性のサイトカインは基底膜に結合して作用する³⁵⁾。蓄積的で持続的なシグナルを接する細胞にのみ限定して伝える細胞外マトリックスと、一過性で様々な刺激に対して速やかに広範囲にシグナルを伝えるサイトカインとが状況に応じて作用して細胞を囲む環境を整えることで、肺胞上皮細胞による基底膜形成も含めた複雑な生命の高次機能の形成と維持をしているものと思われる。細胞培養系における上皮細胞-間葉系細胞間相互作用と基底膜構築の検討は、慢性肺疾患の増悪機構を明らかにし、その治療の可能性を探るためにも有用であると考えられる。サイトカインによる上皮細胞-間葉系細胞間相互作用と細胞外マトリックス代謝制御の解明に関する研究が進行することを期待したい。

文 献

- Adachi, E., Hopkinson, I., and Hayashi, T. (1997) Basement-membrane stromal relationships: Interactions between collagen fibrils and the lamina densa. *Int. Rev. Cytol.* **173**, 73-156
- Yurchenco, P. D. and O'Rear, J. J. (1994) Basal lamina assembly. *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**, 674-681
- Adachi, E., Takeda, Y., Nakazato, K., Muraoka, M., Iwata, M., Sasaki, T., Imamura, Y., Hopkinson, I., and Hayashi, T. (1997) Isolated collagen IV retains the potential to form an 18-nm sided polygonal meshwork of the lamina densa. *J. Electron Microsc.* **46**, 233-241
- Pitkanen, O. M., Transwell, A. K., and O'Brodovich, H. M. (1995) Fetal lung cell-derived matrix alters distal lung epithelial ion transport. *Am. J. Physiol.* **268**, L 762-L 771
- Lwebuga-Mukasa, J. S. (1991) Matrix-driven pneumocyte differentiation. *Am. Rev. Respir. Dis.* **144**, 452-457
- Crouch, E. C., Martin, G. R., Brody, J. S., and Laurie, G. W. (1996) Basement membrane. In: Crystal, R. G. and West, J. B. (eds) *The Lung*. Lippincott-Raven, Philadelphia, pp. 53. 1-53. 23
- Geppert, E. T., Willoams, M. C., and Mason, R. J. (1980) Primary culture of rat alveolar type II cells on floating collagen membranes. *Exp. Cell Res.* **128**, 363-374
- Marinkovich, M. P., Keene, D. R., Rimberg, C. S., and Burgeson, R. E. (1993) Cellular origin of the dermal-epidermal basement membrane. *Dev. Dyn.* **197**, 255-267
- Senior, R. M., Griffin, G. L., Mudd, M. S., Moxley, M. A., Longmore, W. J., and Pierce, R. A. (1996) Entactin expression by rat lung and rat alveolar epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **14**, 239-247
- Pierce, R. A., Griffin, G. L., Mudd, M. S., Moxley, M. A., Longmore, W. J., Sanes, J. R., Miner, J. H., and Senior, R. M. (1998) Expression of laminin $\alpha 3$, $\alpha 4$, and $\alpha 5$ chains by alveolar epithelial cells and fibroblasts. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **19**, 237-244
- Clement, A., Steele, M. P., Brody, J. S., and Riedel, N. (1991) SV40T-immortalized lung alveolar epithelial cells display post-transcriptional regulation of proliferation-related genes. *Exp. Cell Res.* **196**, 198-205
- Furuyama, A., Kimata, K., and Mochitate, K. (1997) Assembly of basement membrane in vitro by cooperation between alveolar epithelial cells and pulmonary fibroblasts. *Cell Struct. Funct.* **22**, 603-614
- Furuyama, A. and Mochitate, K. (2000) Assembly of the exogenous extracellular matrix during basement membrane formation by alveolar epithelial cells in vitro. *J. Cell Sci.* **113**, 859-868
- 宮崎 篤編 (1998) サイトカインの機能を探る (イラスト医学 & サイエンスシリーズ 11), 羊土社, 東京
- Baggiolini, M., Dewald, B., and Moser, B. (1994) Interleukin-8 and related chemotactic cytokines-CXC and CC chemokines. *Adv. Immunol.* **55**, 97-179
- Kretzschmar, M., Doody, J., Timokhina, I., and Massague, J. (1999) A mechanism of repression of TGFbeta/Smad signaling by oncogenic Ras. *Genes Dev.* **13**, 804-816
- Ulloa, L., Doody, J., and Massague, J. (1999) Inhibition of transforming growth factor-beta/SMAD signalling by the interferon-gamma/STAT pathway. *Nature* **397**, 710-713
- 小出 輝, 林 利彦編 (2000) 細胞外マトリックス—基礎と臨床—, 愛知出版, 東京
- Richardson, C. A., Gordon, K. L., Couser, W. G., and Bomsztyk, K. (1995) IL-1 beta increases laminin B2 chain mRNA levels and activates NF-kappa B in rat glomerular epithelial cells. *Am. J. Physiol.* **268**, F 273-F 278
- Olsen, J., Lefebvre, O., Fritsch, C., Troelsen, J. T., Orian-Rousseau, V., Kedinger, M., and Simon-Assmann, P. (2000) Involvement of activator protein 1 complexes in the epithelium-specific activation of the laminin gamma 2-chain gene promoter by hepatocyte growth factor (scatter factor). *Biochem. J.* **347**, 407-417
- Aberdam, D., Virolle, T., and Simon-Assmann, P. (2000) Transcriptional regulation of laminin gene expression. *Microsc. Res. Tech.* **51**, 228-237
- Sannes, P. L., Khosla, J., Li, C. M., and Pagan, I. (1998) Sulfation of extracellular matrices modifies growth factor effects on type II cells on laminin substrata. *Am. J. Physiol.* **275**, L 701-L 708
- Driscoll, K. E., Hassenbein, D. G., Howard, B. W., Isfort, R. J., Cody, D., Tindal, M. H., Suchanek, M., and Carter, J. M. (1995) Cloning, expression, and functional characterization of rat MIP-2: a neutrophil chemoattractant and epithelial cell mitogen. *J. Leukocyte. Biol.* **58**, 359-364
- Lacherade, J. C., Van-De-Louw, A., Planus, E., Escudier, E., D'Ortho, M. P., Lafuma, C., Harf, A., and Delclaux, C. (2001) Evaluation of basement membrane degradation during TNF-alpha-induced increase in epithelial permeability. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **281**, L 134-L 143
- Ghaffar, O., Christodoulopoulos, P., and Hamid, Q. (2000) Cellular sources of chemokines in allergic diseases. In: Rothenberg, M. E. (ed) *Chemokines in Allergic Disease*. Marcel Dekker, pp. 403-424
- Murdoch, C., Monk, P. N., and Finn, A. (1999) Functional expression of chemokine receptor CXCR4 on

- human epithelial cells. *Immunology* **98**, 36-41
- 27) Osawa, H., Yamabe, H., Inuma, H., Miyata, M., Sasaki, T., Kaizuka, M., Tamura, N., Tsunoda, S., Fujita, Y., and Kanazawa, T. (1995) TGF-beta upregulates interleukin 6 production by rat glomerular epithelial cells in vitro. *Nephrol. Dial. Transplant.* **10**, 1592-1597
- 28) Grande, J. P., Melder, D. C., and Zinsmeister, A. R. (1997) Modulation of collagen gene expression by cytokines: stimulatory effect of transforming growth factor-beta1, with divergent effects of epidermal growth factor and tumor necrosis factor-alpha on collagen type I and collagen type IV. *J. Lab. Clin. Med.* **130**, 476-486
- 29) Lesur, O., Aarsalane, K., and Lane, D. (1996) Lung alveolar epithelial cell migration in vitro: modulators and regulation processes. *Am. J. Physiol.* **270**, L 311-L 319
- 30) Kumar, N. M., Sigurdson, S. L., Sheppard, D., and Lwebuga-Mukasa, J. S. (1995) Differential modulation of integrin receptors and extracellular matrix laminin by transforming growth factor-beta1 in rat alveolar epithelial cells. *Exp. Cell Res.* **221**, 385-394
- 31) Furuyama, A., Iwata, M., Hayashi, T., and Mochitate, K. (1999) Transforming growth factor-beta1 regulates basement membrane formation by alveolar epithelial cells in vitro. *Eur. J. Cell Biol.* **78**, 867-875
- 32) Crouch, E. (1990) Pathobiology of pulmonary fibrosis. *Am. J. Physiol.* **256**, L 156-L 184
- 33) Pan, T., Mason, R. J., Westcott, J. Y., and Shannon, J. M. (2001) Rat alveolar type II cells inhibit lung fibroblast proliferation in vitro. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **25**, 353-361
- 34) Sasaki, T., Fukai, N., Mann, K., Gohring, W., Olsen, B. R., and Timpl, R. (1998) Structure, function and tissue forms of the C-terminal globular domain of collagen XVIII containing the angiogenesis inhibitor endostatin. *EMBO J.* **17**, 4249-4256
- 35) Aviezer, D., Hecht, D., Safran, M., Eisinger, M., David, G., and Yayon, A. (1994) Perlecan, basal lamina proteoglycan, promotes basic fibroblast growth factor-receptor binding, mitogenesis, and angiogenesis. *Cell* **79**, 1005-1013