

9335 腎Na排泄調節機構としてのメサンギウム細胞機能の異常発生機転に関する研究

助成研究者:藤原 芳廣(大阪大学 医学部)

共同研究者:上田 尚彦, 金田 安史(大阪大学)

今井 圓裕, 越智 聡(大阪大学)

和田 晃, 鎌田 武信(大阪大学)

腎Na排泄調節機構としてのメサンギウム細胞機能の異常発生機転に関する研究

—腎内in vivo遺伝子導入による糸球体局所レニン—アンジオテンシン系活性化のメ

サンギウム細胞増殖に与える影響に関する検討—

藤原芳廣、上田尚彦、金田安史*、今井圓裕**、越智 聡***、和田 晃、鎌田武信

(大阪大学医学部第一内科、細胞生体工学センター*、栄養学**、健康体育部***)

ナトリウムの排泄は腎臓の重要な機能の1つであり、慢性糸球体腎炎や他の原疾患による糸球体硬化ではこの体内Naの恒常性を維持する腎の機能が障害される。従って糸球体硬化の原因である糸球体細胞の増殖と細胞外基質の蓄積を促進する因子を明らかにし、制御することが腎不全の防止に不可欠である。今回われわれはレニン—アンジオテンシン系についてHVJ-リポソーム法によるin vivo遺伝子導入をおこない腎糸球体硬化に対する直接作用を検討した。レニン、アンジオテンシノーゲン遺伝子を腎に導入したラットでは血圧や血清・尿電解質などに有意の変化は認めなかったが、組織学的に糸球体メサンギウム基質の増加がみられ、間質型コラーゲンの出現をみた。これらのことからレニン—アンジオテンシン系は糸球体硬化において直接の促進因子として働くことが示された。

9335 腎Na排泄調節機構としてのメサンギウム細胞機能の異常発生機転に関する研究

助成研究者:藤原 芳廣(大阪大学 医学部)

共同研究者:上田 尚彦, 金田 安史(大阪大学)

今井 圓裕, 越智 聡(大阪大学)

和田 晃, 鎌田 武信(大阪大学)

目的

腎糸球体メサンギウム細胞の増殖とそれに伴うメサンギウム基質の増加は進行性のヒト慢性糸球体腎炎で高頻度に観察される病理組織所見であり、慢性糸球体腎炎での尿中Na排泄低下の原因の1つとされている。すなわちメサンギウム細胞はその収縮による限外濾過係数(Kf)の低下により、糸球体濾過値(GFR)を低下させ、メサンギウム細胞増殖があるとアンジオテンシンIIによる細胞収縮反応を介したKf低下が増幅されGFRの過剰な低下反応が起こり尿中Na排泄の低下をきたすことが考えられている。さらにメサンギウム細胞はメサンギウム基質の産生、分解を担うとされているが、メサンギウム細胞の増殖や本細胞に対する何らかの刺激によりメサンギウム基質の異常蓄積から糸球体硬化をきたしてその結果、有効濾過面積の不可逆的な低下によるGFRの一層の低下をきたして最終的に体内Naの恒常性を維持する腎機能の廃絶をきたす。従ってメサンギウム細胞の増殖とメサンギウム基質の産生を惹起する因子をあきらかにしその制御法を開発することが慢性腎炎におけるNa貯留に有効な治療法につながると考えられる。従来メサンギウム細胞の増殖、基質産生を促進する因子の研究は培養メサンギウム細胞を用いたin vitroの実験によりなされてきた。その結果主要な血管作働性物質であるアンジオテンシンIIが培養メサンギウム細胞の増殖のみならず細胞外基質の産生や代謝を促進すること、また腎炎においてその関与が注目されているインターロイキン6やTGF- β などのサイトカインの分泌を刺激することを我々を初めとして多くの研究者が報告している。しかし培養メサンギウム細胞により得られた知見が必ずしもin vivoでもあてはまるかどうか疑問であった。In vivoにおけるこれらの因子とりわけアンジオテンシンIIの関与については様々な直接的、間接的な方法による研究がなされている。まずJohnsonらはsystemic blood pressureの中等度の上昇をきたす量のアンギオ

テンシンIIをラットに投与することにより腎血管系および糸球体に硬化病変をひきおこすことを報告した。またヒト慢性腎不全や5/6腎摘などラット糸球体硬化モデルに対するアンギオテンシン変換酵素阻害剤の効果についての多数の報告はアンギオテンシンIIが硬化病変の進展を促進することを間接的に示している。しかしながらアンギオテンシンIIの全身投与の場合、全身の循環動態の変化を介して間接的に糸球体病変をきたしたことも考えられ、またアンギオテンシン変換酵素阻害剤の効果についてもアンギオテンシンIIの関与を間接的に示唆するにすぎない。最近我々はHVJリポソーム法による糸球体内での蛋白過剰発現系を開発し、PDGF、TGF- β を過剰発現させてそれによってひきおこされる糸球体病変を検討した (Isaka, Y. et al., J Clin. Invest. 92, 2597-2601, 1994)。そこでこの方法を用いてレニン、アンギオテンシノーゲン遺伝子を直接腎に導入し糸球体でアンギオテンシンIIの過剰状態を作った。レニン、アンギオテンシノーゲンの過剰発現により糸球体細胞のphenotypic changeとそれにとまうと考えられる間質型コラーゲンの出現がみられ、アンギオテンシンIIが糸球体硬化病変をひきおこすことが示唆された。

方法

1. 発現ベクターの作製

ヒトプロレニン、アンギオテンシノーゲンのcDNA全長を発現ベクターpUC-CAGGSのXho IIに挿入した。この発現ベクターはサイトメガロウイルスエンハンサーおよびニワトリ β アクチンのプロモータを持つ。作製したヒトプロレニンのcDNAを含む発現ベクターをリン酸カルシウム法にてNRK細胞に導入したところ、培養液中にプロレニンおよびレニン蛋白、活性が検出された。

2. HVJリポソームの調製およびラット腎への遺伝子導入

HVJリポソームはkanedaraの方法に従って作製した。Phosphatidylserine, phosphatidylcholine, cholesterolの混合物と発現ベクター、核蛋白HMG-1を混和し、短時間超音波処理をしてリポソームを作製した。リポソームに不活化したセンダイウイルス(HVJ)を加え、ショ糖勾配遠心によりHVJ-リポソームを調製した。遺伝子はプロレニン、アンギオテンシノーゲンのcDNAを含む発現ベクターを1:1に混じたものを使用した。コントロール群としてはこれらのcDNAのかわりにchloramphenicol acetyltransferase (CAT)のcDNAを入れたベクターを用いた。

8週令の雄性SDラットを麻酔し、開腹して腹部大動脈、左腎動脈を露出し、左腎動脈にカテーテルを挿入しHVJ-リポソームを注入した。術後3、5、7日目に血圧測定、代謝ケージによる時間尿採取、採血をおこない血清電解質、尿素窒素、クレアチニン、尿蛋白、電解質濃度を分析した。

3. 組織学的検索

術後3、5、7日後ラットを屠殺し腎を2%パラホルムアルデヒド固定し、薄切してH E染色、P A S染色をおこない組織変化を観察した。免疫組織化学的検討は抗ヒトレニンモノクローナル抗体を用いたABC法および抗 α -smooth muscle cell actin抗体、抗ラットI、III、IV型コラーゲン抗体を用いた蛍光抗体法でおこなった。

結果

1. 導入遺伝子の発現

ヒトプロレニン遺伝子を導入3日後、ラット右腎を2%パラホルムアルデヒドで灌流固定して薄切し抗ヒトレニンモノクローナル抗体を用いたABC法にて免疫組織化学的にヒトレニン蛋白を証明した。図1に示すように約3-4割の糸球体にヒトレニンが検出された。糸球体以外の血管や尿細管にはレニンは証明されなかった。用いた抗体はヒト活性型レニンに特異的であるため傍糸球体装置など内在性のレニンは染色されていない。

2. 血液、尿生化学的成績

プロレニン、アンギオテンシノーゲン遺伝子を導入したラットではC A T遺伝子を導入したラットと比較して血圧、尿量に差を認めなかった（表1）。ヒトプロレニン、アンギオテンシノーゲン遺伝子を腎に導入して3日後、5日後、7日後にラットをdecapitationにて屠殺し、血液を採取、血清電解質濃度、尿素窒素、クレアチニンおよびレニン活性、レニン濃度を測定した。また代謝ケージで時間尿を採取し、尿中蛋白、クレアチニン、電解質を測定した。遺伝子導入後のヒトレニン濃度はレニン群、C A T群とも感度以下であり、またP R Aはレニン群、C A T群で差を認めなかった。また血清Na、K、Cl濃度とも両群で差を認めなかった。さらに尿中蛋白排泄量は両群とも術直後一過性に増加するが3日目以降は正常レベルとなり明らかな蛋白尿の発現は認めなかった。

3. 組織学的変化

プロレニン、アンギオテンシノーゲン遺伝子導入群において、7日目の腎組織で一部の糸球体のメサンギウム基質の軽度の増加を認めた（図2）。これに対してC A T群ではこのような変化は認めず正常腎の組織像と異ならなかった（図3）。変化は約3-4割の糸球体でみられ、この比率は免疫組織化学でヒトレニン蛋白の陽性率とおおむね一致していた。糸球体の細胞数は両群とも正常腎と同じで有意の差を認めなかった。尿細管、間質、血管壁には形態学的な変化を認めなかった。

ヒトおよび実験動物の糸球体硬化ではメサンギウム基質の増加は本来の基質成分であるIV型コラーゲンやフィブロネクチンなどの他、通常糸球体にはみられないI型、III

型コラーゲンといった間質型コラーゲンの増加をみることが知られている。そこでレニン、アンジオテンシノーゲン遺伝子導入ラットの腎について糸球体のメサンギウム基質に含まれるコラーゲンのタイプを特異的な抗体を用いて調べた。C A T群では通常みられるIV型コラーゲンのみがみられたが、間質型コラーゲンはみられなかった。これに対してレニン、アンジオテンシノーゲン群ではIV型コラーゲンの他I型およびIII型コラーゲンの出現をみとめた（図4）。

またヒトの糸球体腎炎およびThy1腎炎などの実験腎炎では糸球体メサンギウム細胞に通常みられない α -smooth muscle cell actinが出現し、メサンギウム細胞が形質転換して増殖、基質過剰産生をきたすと考えられている。そこでメサンギウム細胞の形質転換の指標として α -smooth muscle cell actinの出現をレニン、アンジオテンシノーゲン遺伝子導入腎で検討した。図5に示すようにC A T遺伝子導入群では α -smooth muscle cell actinは平滑筋細胞がある輸出入細動脈にのみ存在し、糸球体内には証明されないが、レニン、アンジオテンシノーゲン群では糸球体内にも α -smooth muscle cell actin蛋白がみとめられる。すなわちレニン、アンジオテンシンの過剰発現によりメサンギウム細胞の形質転換がおり、通常みられない間質型コラーゲンの産生をおこしたと結論づけられた。

考察

アンジオテンシンIIのナトリウム貯留作用についてはさまざまな機作が考えられる。すなわちアンジオテンシンIIは直接腎尿細管に作用してNaの再吸収を促進すること、また副腎皮質よりのアルドステロン分泌を刺激して、遠位尿細管でのNa-K交換を促進することによりNa、体液の貯留をきたすとされている。これらは生理的なNa調節であるが病的な状態である糸球体腎炎ではその多くにメサンギウム細胞の増殖がみられ、アンジオテンシンIIによる本細胞の収縮が糸球体濾過係数の減少を介して糸球体濾過の低下をきたし、Na、水の体内貯留をおこすことがわれわれや他の研究者により明らかにされている。さらにアンジオテンシンIIは培養メサンギウム細胞の増殖を促進すること、またコラーゲンやフィブロネクチンなどの細胞外基質の産生を促進することが報告され、in vitroでのアンジオテンシンIIのメサンギウム細胞増殖因子としての知見が多数得られている。一方Johnsonらはin vivoでのアンジオテンシンIIの効果をみるためアンジオテンシンIIの全身投与を試みた。その結果、アンジオテンシンIIが糸球体硬化病変を惹起することが示唆された。しかし彼らの実験では、中等度の血圧の上昇がみられるため、糸球体の組織変化が全身循環状態の変化に伴って起こった可能性も考えられる。今回の我々の実験でレニン、アンジオテンシノーゲン遺伝子を腎に直接導入して糸球体にこれらの蛋白を過剰発現させ、メサンギウム基質の増加が起こることが分かった。このレニン、アンジオテンシノーゲンを腎内過剰発現させたラットの血圧に

有意の変化を認めずまたレニンの血中レベルも上昇しておらず、これらの蛋白過剰発現は腎内に限局したものであることがわかる。従ってレニン-アンギオテンシン系による糸球体硬化病変の発現はアンギオテンシンIIの糸球体細胞への直接作用と考えられる。今回の研究ではレニン-アンギオテンシノーゲン遺伝子の腎への導入で糸球体細胞の増殖は認めなかった。アンギオテンシンIIは培養メサンギウム細胞では細胞増殖刺激因子となるがその作用は血小板由来増殖因子などに比べ弱く、また生体内ではTGF- β やNOなどのメサンギウム細胞の増殖をin vitroで抑制するサイトカインなど複雑な因子の修飾を受けることが考えられる。このためレニン-アンギオテンシノーゲン遺伝子導入腎では糸球体細胞数の増加が有意に観察されなかった可能性がある。

ヒトの慢性糸球体腎炎や実験腎炎、糸球体硬化症ではメサンギウム細胞に α -smooth muscle cell actinの発現や基質成分としては間質型コラーゲンの出現をみる事が知られている。これらは本来正常の糸球体ではみられないもので病的な糸球体ではメサンギウム細胞など糸球体細胞の形質が変化し増殖および細胞外基質の過剰産生がおこっていると考えられている。今回のわれわれの実験結果ではレニン-アンギオテンシン系の過剰状態によりメサンギウム細胞に α -smooth muscle cell actinの発現がみられ、アンギオテンシンIIがメサンギウム細胞の形質転換をおこしうること、そしてこの形質転換したメサンギウム細胞により間質型コラーゲンが産生されることが示唆された。

これらの結果は糸球体硬化症に対するアンギオテンシン変換酵素阻害剤による治療の分子生物学的な根拠付けとなり、またさらにin vivo遺伝子導入法の応用により遺伝子療法などのあらたな治療法の開発に役立つと考えられる。

今後の課題

1. レニン-アンギオテンシン系阻害剤の効果の検討

プロレニン、アンギオテンシノーゲン遺伝子導入により惹起された糸球体硬化性病変は糸球体内のアンギオテンシンII過剰状態によると考えられる。最近、糸球体には局所的なレニン-アンギオテンシン系が存在することが知られており、今回われわれが行った実験は糸球体局所でのレニン-アンギオテンシン系を人為的に賦活化した系であるともいえる。そこで局所レニン-アンギオテンシン系のメサンギウム基質増加の機序をさらにあきらかにするため、また糸球体硬化の予防薬としての効果を検討するためレニン、アンギオテンシノーゲン遺伝子導入ラットに対してレニン阻害剤や、アンギオテンシン変換酵素阻害剤を投与して、メサンギウム細胞の形質転換、間質型コラーゲンの生成に対する効果をみる。

2. 遺伝子導入を利用したレニン-アンギオテンシン系の阻害による糸球体硬化の防止

今回のわれわれの結果からもレニン-アンギオテンシン系の抑制が糸球体硬化進展

を防止することが期待されるため、遺伝子導入を用いた新しい糸球体腎炎の治療法の開発をめざす。Thy-1腎炎や4/5腎摘ラットなどの糸球体腎炎、糸球体硬化症モデルに対してアンギオテンシノーゲンのアンチセンスcDNAをHVJリボソーム法によって導入し病変の抑制効果があるかどうかを検討する。またレニン、アンギオテンシンの遺伝子の一部を改変し活性を持たない蛋白を過剰発現させ実験腎炎に対して抑制効果があるかどうかを検討する。

表1 ヒトレニン、アンギオテンシノーゲン遺伝子導入の血圧に対する影響

(平均血圧、mmHg)

	CAT群	レニン、アンギオテンシノーゲン群
第0日	103 ± 5.4	101 ± 6.8
第3日	88 ± 16	88 ± 13
第6日	98 ± 4.5	100 ± 19

図1 レニン、アンギオテンシノーゲン遺伝子導入ラットにおけるレニン蛋白の発現

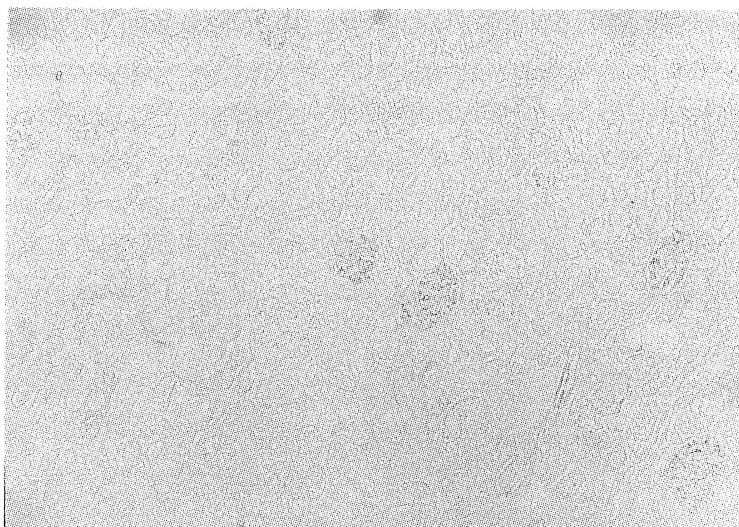
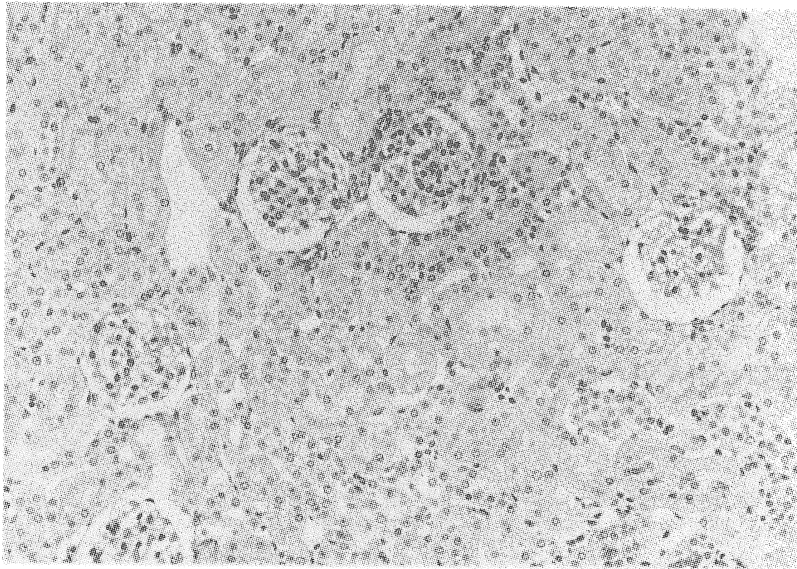
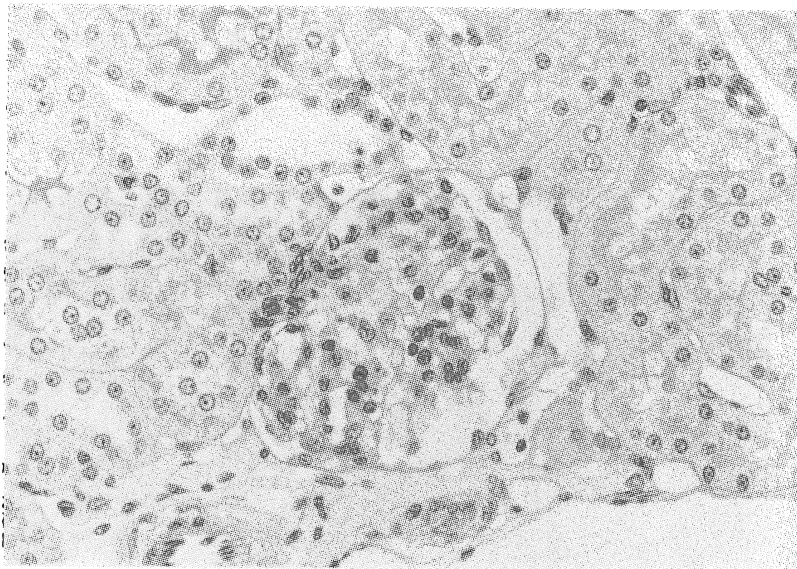


図2 レニン、アンギオテンシノーゲン遺伝子導入ラットの腎組織変化



x 1 0 0



x 4 0 0

図3 CAT遺伝子導入ラットの腎組織

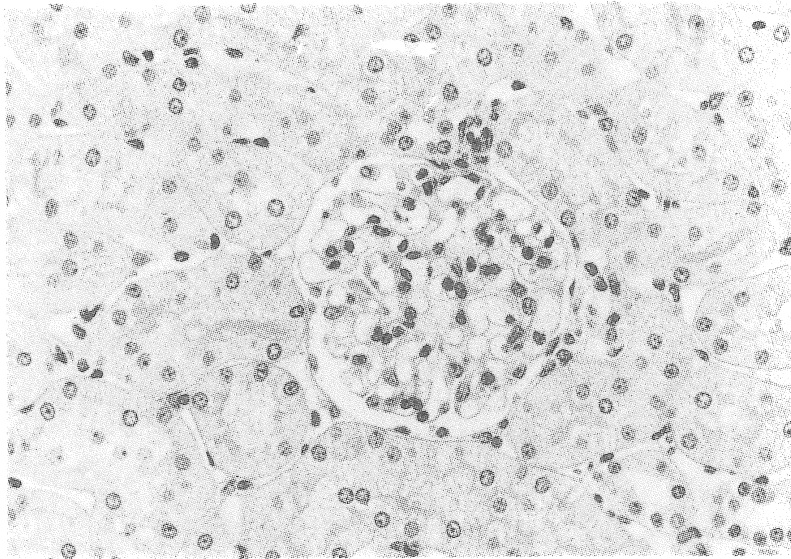
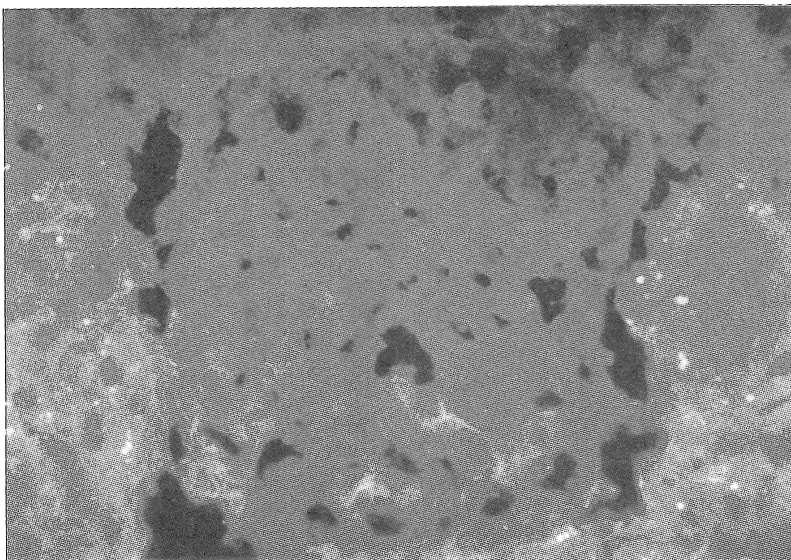


図4 レニン、アンギオテンシノーゲン遺伝子導入ラットにおける間質型コラーゲン

a. I型コラーゲン



b. III型コラーゲン

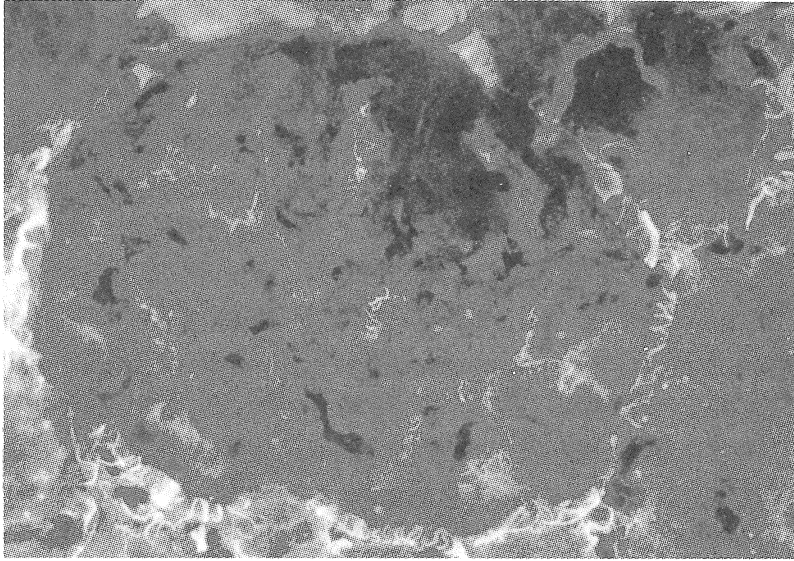
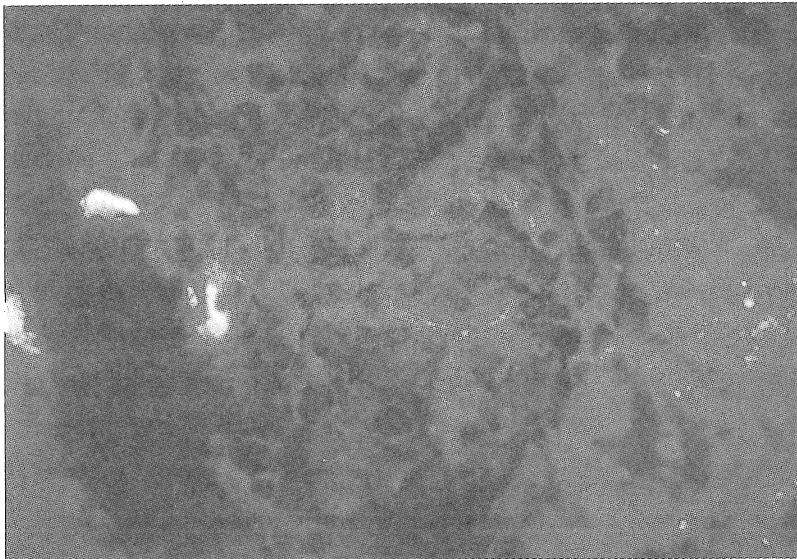


図5 レニン、アンギオテンシノーゲン遺伝子導入ラットの腎糸球体における α -smooth muscle cell actinの発現



Sodium Excretion and the Disorder of Mesangial Cell Function
---Mesangial expansion induced by in vivo gene transfection of renin and
angiotensinogen

Yoshihiro Fujiwara, Naohiko Ueda, Yasufumi Kaneda, Enyu Imai, Satoshi
Ochi, Akira Wada, Takenobu Kamada
Osaka University School of Medicine, First Department of Medicine

Summary

The handling of sodium is one of the most important functions of kidney. Renal sodium excretion is regulated by various biological active substances. Among them, angiotensin II (AII) is a potent peptide which promotes sodium retention. Furthermore, an increasing body of evidence suggests that AII contributes to the development of glomerulosclerosis resulting in the disorder of excretion of sodium from kidney. Nevertheless, it still remains to be elucidated whether AII directly induces sclerotic change in glomeruli. To explore this issue, we studied the induction of glomerular change by in vivo gene transfection of renin-angiotensin system. The expression vectors containing cDNA for human renin or angiotensinogen were constructed. These plasmids were introduced into rat kidney via renal artery by HVJ-liposome method. Blood pressure, blood- and urine-analyses and glomerular histology were examined on days 3, 5 and 7 after the introduction. Blood pressure did not change after gene transfer. There were no significant changes in plasma renin activity or renal function during 7-days experiment. The expansion of mesangial matrix was observed in the transfected kidneys on days 5 and 7 without associating hypercellularity. Qualitative analysis of accumulated matrix by immunohistochemistry using specific antibodies revealed the increase in type I and III collagens which did not exist in normal glomeruli. Furthermore, α -smooth muscle cell actin which is known to appear in various types of glomerulonephritis was seen in glomerular cells of transfected kidney. These results suggest that AII directly acts on the glomerular cells to lead phenotypic change and overproduction of mesangial matrix by these cells.