

48

助成番号 0048

抗胸腺細胞抗体(anti-thymocyte serum;ATS)腎炎において食塩摂取の多寡が TGF- β の細胞内伝達に及ぼす影響の検討

助成研究者：	山本 龍夫	(浜松医科大学 第一内科)
共同研究者：	菱田 明	(浜松医科大学 第一内科)
	藤垣 嘉秀	(浜松医科大学 第一内科)
	鈴木 洋行	(浜松医科大学 第一内科)
	戸川 証	(浜松医科大学 第一内科)

【目的】腎疾患における腎機能低下には transforming growth factor- β (TGF- β) の病的発現に起因する腎硬化性病変の進行が重要である。我々は平成 11 年度の助成研究で、血中や腎内のレニンの発現とは別の機序を介して、低塩分摂取下では糸球体の TGF- β 発現が低下し抗胸腺抗体 (anti-thymocyte serum ; ATS) 腎炎が軽減し、一方、高塩分摂取下では糸球体の TGF- β 発現は正常塩分摂取下とほぼ同程度の増加だが、TGF- β レセプター(T β R)の発現が著しく増加し、ATS 腎炎が悪化することを報告した。本研究では食塩摂取の多寡が ATS 腎炎の腎組織において特異型(Smad2、3)、共有型(Smad4)、抑制型(Smad6)の各種 Smad を介した TGF- β の細胞内信号伝達に及ぼす影響を検討した。

【方法】ラットを、A 群:正常塩分食(0.39% NaCl 食)、B 群: ATS 静注 7 日前に furosemide 2 mg/kg を腹腔内投与し低塩分食(0.03% NaCl 食)、C 群 : ATS 静注 14 日と 7 日前に deoxycorticosterone acetate 10 mg/kg を腹腔内投与し、高塩分食(正常塩分食、飲用水は 1%食塩水)で飼育し ATS を静注。ATS 静注前、3、7、14、28 日後に血圧、一日尿蛋白量、腎組織病変(PAS 染色)、腎組織の Smad3、4、6 の免疫染色、単離糸球体の培養上清の TGF- β 1(ELISA)とその蛋白抽出液の Smad2 量(ウエスタンブロット)を調べた。

【結果】平均動脈血圧は経過を通じ各群で有意差はなかった。A 群と B 群では、尿蛋白排泄は ATS 静注 3 日後に、また細胞外基質の増加を伴ったメサングウム増殖病変と糸球体の TGF- β 1 産生は 7 日後をピークとして一過性に増加したが、B 群で軽度であった。C 群では尿蛋白排泄、糸球体病変は高度であり 28 日後まで遷延した。A 群では、7 日目の糸球体で Smad2 は著明に減少し、Smad3 は糸球体内細胞の核では減少し細胞質では増加、Smad4 は核では著変なく細胞質では増加、Smad6 は細胞質で増加した。このような A 群の 7 日目の糸球体で見られる Smad2 の著しい減少は B 群や C 群でも同様に認められたが、A 群に比して B 群では 7 日目の Smad4 の糸球体内細胞の細胞質での増加が軽度であり、一方、病変が高度な C 群の糸球体では 7 日目にみられる Smad3 の減少がより強く、また Smad6 の増加は軽度であった。

【考察】ATS 腎炎糸球体では Smad2 を介する TGF- β の細胞内信号伝達とその後のユビキチン化、分解が極めて盛んであり、塩分負荷による糸球体病変の悪化、遷延化は Smad3 を介する TGF- β の細胞内信号伝達とその後のユビキチン化、分解の増加と、Smad6 による TGF- β の細胞内信号伝達の抑制の低下を伴うことが示唆された。

13

助成番号 0048

抗胸腺細胞抗体(anti-thymocyte serum;ATS)腎炎において食塩摂取の多寡が TGF- β の細胞内伝達に及ぼす影響の検討

助成研究者：山本 龍夫(浜松医科大学 第一内科)
 共同研究者：菱田 明(浜松医科大学 第一内科)
 藤垣 嘉秀(浜松医科大学 第一内科)
 鈴木 洋行(浜松医科大学 第一内科)
 戸川 証(浜松医科大学 第一内科)

1. 研究目的

各種腎疾患における腎機能障害は糸球体や尿細管間質での細胞外基質の病的蓄積による腎硬化性病変の進展によって進み、その蓄積には様々な細胞で細胞外器質の産生増加と細胞増殖の抑制作用を有する transforming growth factor- β (TGF- β) の発現が関与することが知られている[1]。近年、TGF- β の細胞内信号伝達は特異型の Smad2 や Smad3 と、共有型の Smad4 との複合体を介して伝えられること、また、Smad6、Smad7 は TGF- β の細胞内シグナル伝達の抑制制御に働く抑制型 Smad であることが明らかになっているが[2]、細胞外基質増加や細胞増殖抑制といった腎炎進行に深く関与する TGF- β の作用の発現に関し、これらの Smad が腎組織内でどのように発現調節され、機能しているかについては不明である。

我々は平成 11 年度の助成研究において、抗胸腺細胞抗体(anti-thymocyte serum; ATS)腎炎ラットを用い、高塩分食投与下では血圧上昇をみない段階で、正常塩分食投与に比して尿蛋白排泄量、糸球体の細胞増殖と細胞外基質の沈着が高度となり、かつ遷延し、糸球体の TGF- β レセプター(T β R)は type I、II、III いずれも著しく発現が増強すること、低塩分食投与下では尿蛋白排泄量や糸球体病変の程度は正常塩分食投与に比して軽く、その増加も一過性で、糸球体の TGF- β 1 の発現が低下する、というように塩分摂取の多寡が TGF- β 1 や T β R の発現の変化をきたして ATS 腎炎の進行に影響し、その増悪は血圧や血中および腎内のレニンの量とは比例しないことを報告した[3]。本研究ではさらに、塩分摂取量の多寡が ATS 腎炎の腎組織における TGF- β の細胞内信号伝達に及ぼす影響を明らかにするため、正常塩分食、高塩分食、低塩分食投与下で惹起した ATS 腎炎ラットの腎における特異型(Smad2、3)、共有型(Smad4)、抑制型(Smad6)の各種 Smad の発現を経時的に検討した。

2. 研究方法

雄 Wistar ラットを、A 群：正常塩分食(0.39% NaCl 食)で飼育、B 群：ATS を静注する

7 日前にフロセミド 2mg/kg を腹腔内投与し、以後、低塩分食(0.03% NaCl 食)で飼育、C 群: ATS を静注する 14 日前と 7 日前に deoxycorticosterone acetate 10mg/kg を腹腔内投与し、高塩分食(正常塩分食で飲用水は 1% 食塩水)で飼育、に分け、ATS を静注し、その後も同様の塩分食摂取下で飼育した。ATS 静注前および 3、7、14、28 日後に血圧測定、メタボリックケージによる 24 時間蓄尿を行った後、エーテル麻酔下で腎を PBS 灌流後に摘出した。各群において 1) 血圧測定、2) 一日尿蛋白排泄量の定量、3) PAS 染色による腎組織病変の病理学的検討、4) シービング法によって単離した糸球体を DMEM 培養液にて 24 時間培養し、上清中の総 TGF- β 1 の ELISA による定量、5) 腎組織の Smad3、Smad4、Smad6 蛋白を免疫染色し、糸球体内細胞のそれら Smad 陽性の核の数を数え、また細胞質の染色強度は 0~3 度にスコア一化、6) 単離糸球体より RIPA バッファーで蛋白を抽出し、ウエスタンブロットによる Smad2 蛋白の定量、を行った。

なお、TGF- β の Smad を介する細胞内信号伝達に關与する抑制型 Smad としては Smad7 の重要性が指摘されているが[4]、今回の研究ではラット腎の免疫染色やウエスタンブロットに利用できる適切な抗 Smad7 抗体が見つからず、抑制型は Smad6 のみの検討となった。また、Smad2 の検討についてはラット腎組織の免疫染色に利用できる適切な抗 Smad2 抗体が見つからなかったため、単離糸球体抽出液の Smad2 蛋白量をウエスタンブロットにより定量した。

3. 研究結果

3.1 血圧

各群の平均動脈血圧は ATS 腎炎惹起前から惹起後 28 日までで有意差は認めなかった。

3.2 尿蛋白排泄量

正常塩分食投与の ATS 腎炎ラット(A 群)の尿蛋白排泄は ATS 静注後 3 日目をピークに上昇し、以後漸減した。低塩分食投与の ATS 腎炎ラット(B 群)の尿蛋白排泄も 3 日目をピークとして一過性に上昇したが、その程度は A 群に比して有意に少なく、高塩分食投与の ATS 腎炎ラット(C 群)の尿蛋白排泄は 28 日目でも高値のまま持続した (Fig. 1)。

3.3 単離糸球体培養液中の TGF- β 1

単離糸球体の 24 時間培養液中の総 TGF- β 1 量は、ATS 腎炎発症後 7 日目をピークに一過性の増加をみたが、低塩分食摂取の B 群では正常塩分食摂取の A 群や高塩分食摂取の C 群に比してその増加は有意に軽度であった (Fig. 2)。

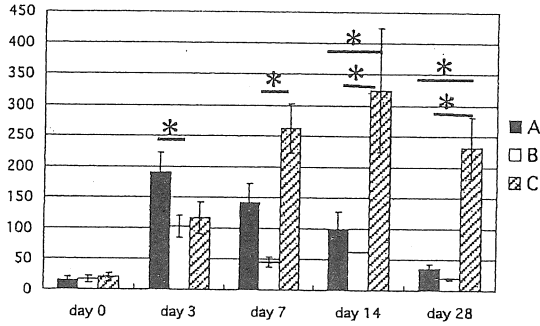


Fig. 1 Urinary protein excretion. Values are mean \pm SE. * $p < 0.05$

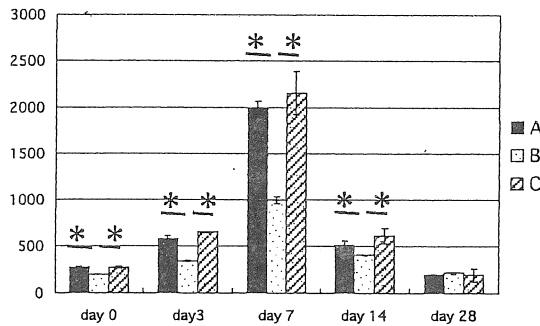


Fig. 2 The levels of total TGF- β 1 excreted in the culture media incubated with 1×10^4 glomeruli for 24 hr. Values are means \pm SE. * $p < 0.05$

3.4 腎組織病変

正常塩分食摂取のATS腎炎ラット(A群)では、ATS静注3日後でメサンギウム融解、糸球体系蹄の毛細血管瘤形成がみられ、7~14日目をピークとした一過性のメサンギウムの細胞増殖と細胞外基質の沈着増加が生じ、それらは28日目には軽減した。低塩分食摂取のB群では、A群に比してそれらの腎組織病変は経過を通して軽く、一方、高塩分食摂取のC群では腎組織病変の程度は強く、28日後でも病変は遷延する傾向がみられた(Fig. 3)。

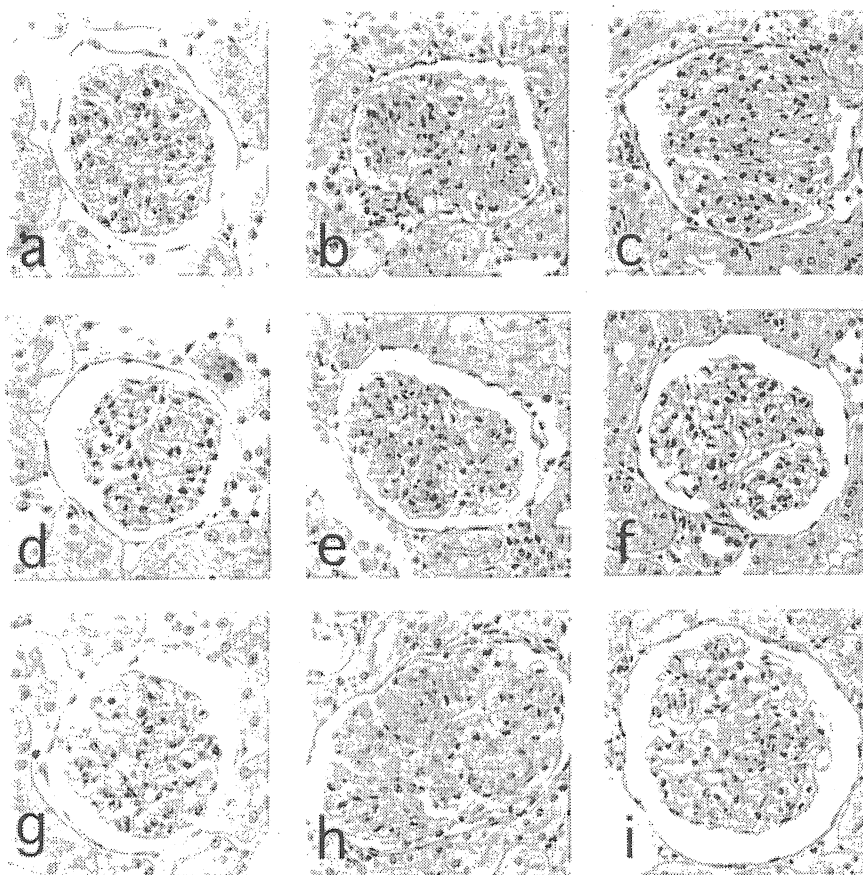


Fig. 3 Light micrographs of the kidneys of rats fed with normal salt diet (a to c), low salt diet (d to f), and high salt diet (g to i) before (a, d, g), and 7 (b, e, h) and 28 days (c, f, i) after ATS injection. The levels of proliferative glomerular lesions with mesangial matrix accumulation increased transiently 7 days after ATS injection in rats fed with normal and low salt diet, and were less severe in rats fed with low salt diet than those fed with normal salt diet. In contrast, the glomerular lesions were markedly severe and persisted in rats fed with high salt diet. (Periodic acid-Schiff stain, original magnification x 250)

3.5 腎組織の Smad3、Smad4、Smad6 蛋白の免疫染色

3.5.1 Smad3 蛋白

正常塩分食摂取の A 群における Smad3 蛋白は、ATS 腎炎発症前は糸球体内細胞の核と遠位尿細管の核と細胞質が主に染まり、糸球体内細胞の細胞質、近位尿細管細胞も軽度陽性であった。A 群と低塩分食摂取の B 群では ATS 腎炎発症 7 日後で糸球体内細胞の Smad3 陽性の核の数は減少し、糸球体内細胞の細胞質では Smad3 の染色性はやや増加した。一方、高塩分食摂取の C 群では 7 日目の糸球体で Smad3 陽性の核数、細胞質の Smad3 染色性は共に A 群、B 群よりも低下していた (Fig. 4, 5)。

3.5.2 Smad4 蛋白

すべての群で、ATS 腎炎発症前と 7 日後では糸球体内細胞の Smad4 陽性の核数には大きな変化はみられず、一方、糸球体内細胞の細胞質の Smad4 の染色性は 7 日目で増加する傾向がみられたが、低塩分食摂取の B 群では 7 日目の糸球体内細胞の細胞質の Smad4 染色性の増加は A 群、C 群に比して軽度であった。近位および遠位尿細管細胞の核と細胞質も Smad4 は弱陽性に染色された (Fig. 4, 5)。

3.5.3 Smad6 蛋白

Smad6 蛋白は正常塩分食摂取の A 群、低塩分食摂取の B 群では、腎炎発症 7 日後に糸球体内細胞の細胞質の Smad6 染色性が増加し、28 日後にはほぼ発症前の状態に戻った。高塩分食摂取の C 群では A 群や B 群の 7 日目の糸球体内細胞の細胞質にみられる Smad6 染色性の増加は軽度であり、Smad6 陽性の核数も少なかった。尿細管については発症前は近位細管細胞では細胞質と刷子縁、遠位細管細胞では細胞質の特に血管側が Smad6 陽性であり、発症後は近位尿細管では刷子縁も含めた染色性が減弱し、遠位尿細管は発症 7 日目では細胞質全体が陽性となり、28 日目では細胞質の尿腔側が軽度に陽性であった (Fig. 4, 5)。

3.6 単離糸球体の Smad2 蛋白のウエスタンブロット

ATS 腎炎惹起前に比し、糸球体の Smad2 蛋白量はすべての群で発症 7 日後に著明に減少した。28 日後では低塩分食摂取の B 群ではほぼ腎炎惹起前のレベルまで復帰し、正常塩分摂取の A 群と高塩分食摂取の C 群では腎炎惹起前の半分のレベルにまで復帰した (Fig. 6)。

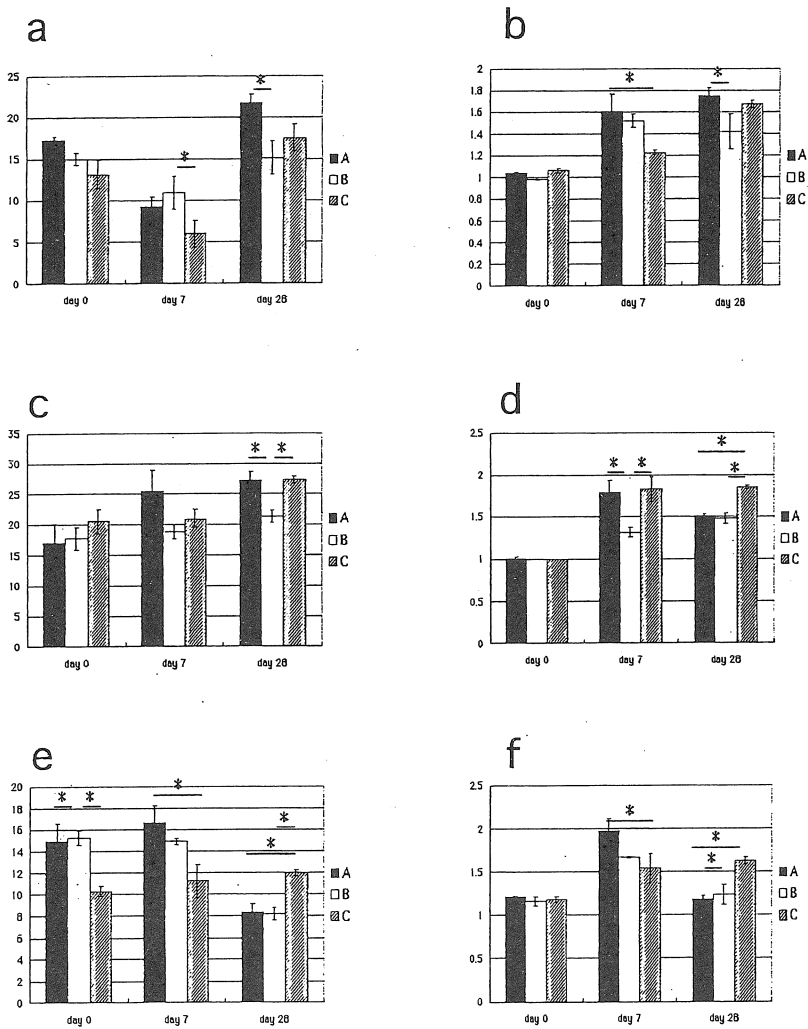


Fig. 4 The number of glomerular cell nuclei positive for Smad3 (a), Smad 4 (c), and Smad 6 (e) proteins and the immunohistochemical staining intensity of Smad3 (b), Smad4 (d), and Smad6 (f) proteins in glomerular cell cytoplasm. Values are mean \pm SE. *p<0.05

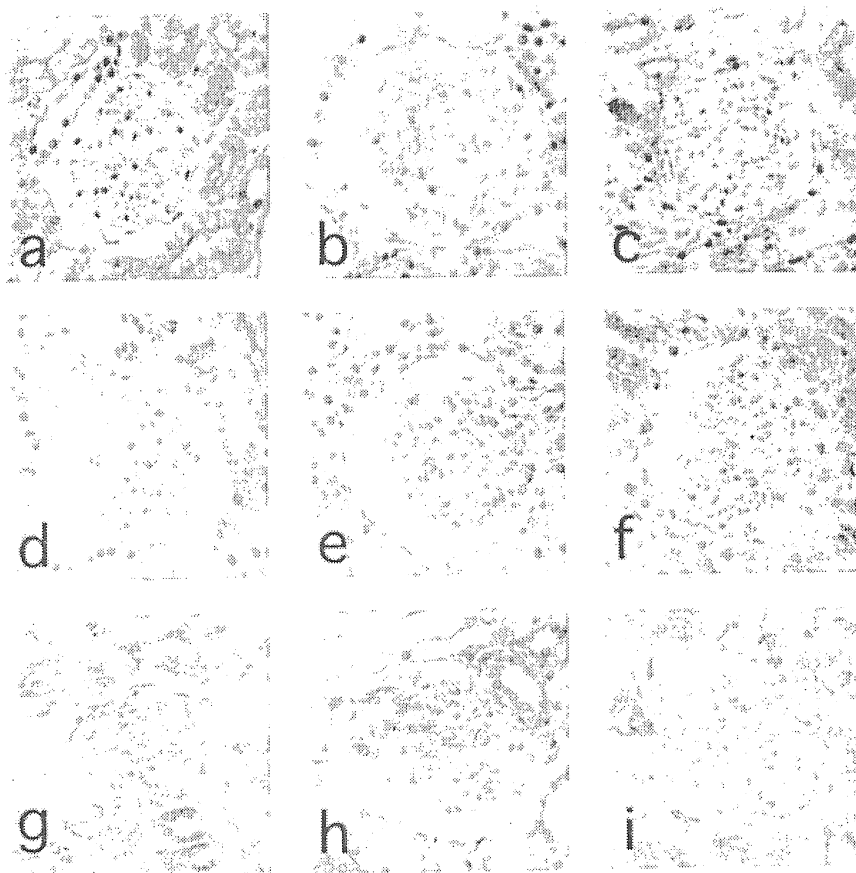


Fig. 5 Immunohistochemical demonstration of Smad3 (a to c), Smad4 (d to f), and Smad6 (g to i) in the kidneys of rats fed with normal salt diet before (a, d, g), and 7 (b, e, h) and 28 days (c, f, i) after ATS injection. In glomeruli 7 days after ATS injection, the number of nuclei positive for Smad3 decreased, while increased immunoreactivity for Smad3, Smad4, and Smad6 was noted in the cytoplasm. (Original magnification x 250)

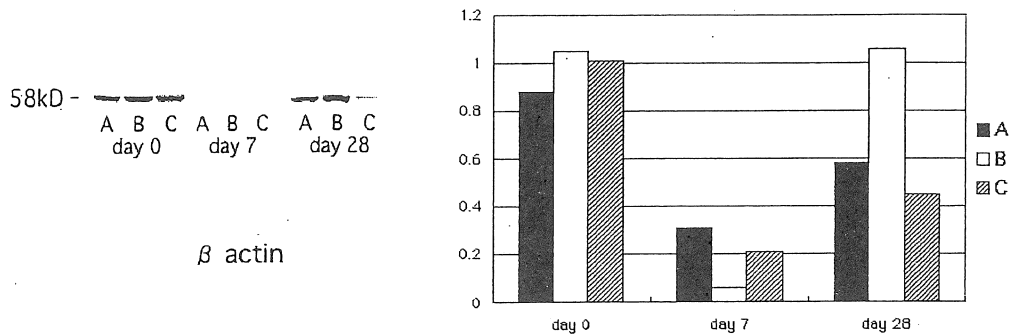


Fig. 6 Western blot analysis of Smad2 and β -actin in isolated glomeruli (left panel) and the densitometric ratio of Smad2/ β -actin in isolated glomeruli (right panel).

4. 考察

今回の検討により、1) 正常塩分食摂取の ATS 腎炎ラットでは、メサンギウムの細胞増殖と細胞外基質の沈着増加といった糸球体病変と糸球体内の TGF- β 1 の発現がピークとなる 7 日目において、特異型 Smad については Smad2 は糸球体で著明に減少し、Smad3 は糸球体内細胞の核では減少し細胞質では増加、共有型である Smad4 は糸球体内細胞の核では著変なく細胞質では増加し、抑制型の Smad6 は糸球体内細胞の細胞質で増加する、2) 糸球体病変が軽度で糸球体の TGF- β 1 の発現も少ない低塩分食摂取群の ATS 腎炎 7 日目の糸球体における各種 Smad は、正常塩分食摂取群に比して、Smad2 は同様に著しく減少するが、Smad3、Smad6 は有意な差はなく、糸球体内細胞の細胞質の Smad4 の増加は軽度である、3) 糸球体の病変、TGF- β 1 と T β R の発現のいずれもが強く[3]、かつ 28 日後でも遷延して認められる高塩分食摂取群の 7 日目の糸球体における各種 Smad の変化は、正常塩分食摂取群に比して、Smad2 は同様に著明に減少、Smad3 は糸球体内細胞の核、細胞質でより低下し、Smad4 は有意な差はなく、糸球体内細胞の細胞質の Smad6 の増加は軽度である、ことが明らかとなった。すなわち、糸球体の特異型と抑制型の各 Smad は、ATS 腎炎の経過で量的にも核・細胞質といった部位的にも変化し、ATS 腎炎糸球体における TGF- β の細胞内信号伝達には Smad を介した経路の関与が示唆された。各種 Smad の変化としては、ATS 腎炎惹起 7 日後の糸球体で、特異型 Smad2 の減少が正常塩分食摂取、低塩分食摂取、高塩分食摂取の各群に共通して最も著しく、また、高塩分食摂取群でみられる TGF- β 1 と T β R の発現が強く病変が高度な 7 日目の糸

球体では、正常塩分食摂取群に比して、特異型 Smad3 の減少がより強く、抑制型 Smad6 の増加は軽度であった。

ATS 腎炎の経過でこのような Smad の変化をきたす機序の詳細は今回の検討では明らかではないが、細胞表面の T β R から TGF- β の信号を受け取った特異型と共有型の Smad2/Smad4 や Smad3/Smad4 複合体が、核内へ移行し、それぞれの標的遺伝子に情報を伝え、その後、速やかにユビキチン化されてプロテオゾームで分解されるという一連の TGF- β の細胞内信号伝達が、これらの Smad を介して行われた結果として生じた変化であると考えられる。すなわち、経過中で TGF- β と T β R の発現が最も強い 7 日目の ATS 腎炎糸球体においてすべての群でみられる Smad2 の著しい減少は、そこでの Smad2 のユビキチン化と分解がすべての群で極めて盛んであることを示唆している。そして、もしこの Smad2 のユビキチン化と分解が、すべて Smad2 が標的遺伝子に信号伝達を行った後の出来事であるとする、ATS 腎炎 7 日目の糸球体では Smad3 に比して Smad2 を介する TGF- β の信号伝達が優位に行われていることを意味することになる。一方、高塩分食摂取群の 7 日目の糸球体では Smad3 がより強く減少しており、塩分負荷による ATS 腎炎の糸球体病変の悪化には Smad3 を介する信号伝達とその後のユビキチン化、分解の増加が関連している可能性が示唆される。このような Smad2 と Smad3 の差は、ATS 腎炎糸球体において Smad2/Smad4 複合体を介する TGF- β の細胞内信号の量や伝達内容が、Smad3/Smad4 複合体を介するものとは異なっていることを示すものかもしれない。実際、TGF- β によって発現が誘導される Smad7 の場合には、そのプロモーターへの Smad3/4 複合体の結合が重要であり、Smad2 の関与は低いことが報告されている[5]。

共有型の Smad4 については、特異型の Smad2、Smad3 とは異なり 7 日目の ATS 腎炎糸球体の核で明らかに変化がみられなかったが、それは ATS 腎炎糸球体で TGF- β の信号伝達に関与する Smad 複合体の構成比が特異型と共有型で 1:1 ではないか、あるいは特異型と共有型 Smad では信号伝達後にユビキチン化されて分解、消失する速度や割合に差があるのかもしれない。

最近、内田らは RNA protection assay によって ATS 腎炎とほぼ同等の抗 Thy-1 腎炎の 7 日目の糸球体における Smad6 mRNA の量は、発症前の 7 割ほどに減少すると報告している[6]。しかし、今回の検討では Smad6 蛋白は ATS 腎炎 7 日目で糸球体内細胞の細胞質で染色性が増加していた。組織内の静的な mRNA 量と蛋白量の相違はしばしばみられことであるが、糸球体での Smad6 蛋白の発現には何らかの転写後制御が働いているのかもしれない。糸球体病変が一過性で回復する正常塩分食摂取群や低塩分食摂取群では、ATS 腎炎 7 日目の糸球体内細胞の細胞質で抑制型の Smad6 が増加し、一方、糸球体病変が遷延化する高塩分摂取群の糸球体では Smad6 の増加が少ないことは、可逆性腎炎の治療課程において生じると思われる TGF- β の抑制制御に、糸球体内細胞での抑制型

Smad6 の増加による TGF- β の細胞内信号伝達の抑制機構が関与している可能性が示唆される。また、糸球体での Smad 蛋白のユビキチン化、分解、ターンオーバーの差は、ATS 腎炎の経過において糸球体内細胞に新たな TGF- β 刺激への反応性や細胞周期の制御の変化をもたらしているのかもしれない。

5. 今後の課題

まず、今回検討できなかった腎組織の Smad2、Smad7 の免疫染色、Smad7 の単離糸球体のウエスタンブロットによる検討が必要である。また、各種 Smad の mRNA 発現を real time PCR などの定量性のある方法で調べる必要がある。さらには、特異型と共有型 Smad 複合体の構成比の検討、Smad のユビキチン化と分解や、Smad の標的遺伝子への結合に関与する FAST-1 などの転写因子、p300 や CBP など転写共役因子、c-Ski や TGIF などの転写の共役抑制因子との関連の検討も必要である。

6. 文献

1. Border WA, Noble NA. Transforming growth factor- β in tissue fibrosis. *N Engl J Med* 1994, 331:1286-1292.
2. Antisano L, Warna JL. Smads as transcriptional co-modulators. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2000, 12:235-243.
3. 菱田明、山本龍夫、藤垣嘉秀、池谷直樹、宮地武彦、鈴木洋行. 糸球体腎炎における TGF- β 発現に及ぼすレニン系の影響。ソルト・サイエンス研究財団 平成 11 年度助成研究報告集 II 生理・食品・栄養系編 2000,99-109.
4. Nakao A, Afrakhte M, Moren A, Nakayama T, Christian JL, Heuchel R, Itoh S, Kawabata M, Heldin N-E, Heldin C-H, ten Dijke P. Identification of Smad7, a TGF- β -inducible antagonist of TGF- β signaling. *Nature* 1997, 389:61-635.
5. von Gersdorff G, Susztak K, Rezvani F, Bitzer M, Liang D, Bottinger EP. Smad3 and Smad4 mediate transcriptional activation of the human Smad7 promoter by transforming growth factor β . *J Biol Chem* 2000, 275:11320-11326.
6. Uchida K, Nitta K, Kobayashi H, Kawachi H, Shimizu F, Yumura W, Nihei H. Localization of Smad6 and Smad7 in the rat kidney and their regulated expression in the anti-Thy-1 nephritis. *Mol. Cell Biol. Res. Commun.* 2000, 4:98-105

Effects of salt intake on the intracellular signal transduction of TGF- β
in anti-thymocyte serum (ATS) nephritis

Tatsuo Yamamoto, Akira Hishida, Yoshihide Fujigaki, Hiroyuki Suzuki, Akashi
Togawa

First Department of Medicine, Hamamatsu University School of Medicine

Summary

Increased TGF- β expression has been shown to be involved in deterioration of renal function resulted from pathologic matrix accumulation in glomerulonephritis. This study was conducted to explore the effects of salt intake on the intracellular TGF- β signal transduction composed of the receptor-regulated Smads 2 and 3, the common mediator Smad4, and the inhibitory Smad6 in ATS nephritis. Rats were fed with low salt diet (0.03% NaCl chow; LS), normal salt diet (0.39% NaCl chow; NS), or high salt diet (0.39% NaCl chow and 1% NaCl as drinking water; HS). Furosemide 2 mg/kg was injected 7 days before ATS injection in LS and deoxycorticosterone acetate 10 mg/kg 14 and 7 days before ATS injection in HS. We studied the levels of blood pressure, proteinuria, renal lesions, TGF- β 1 (ELISA) and Smad2 (Western blot) in isolated glomeruli, and immunohistochemical staining for Smads 3, 4, and 6 in kidney tissues. The mean arterial blood pressure levels did not differ significantly among the groups. The levels of proteinuria, proliferative glomerular lesions with mesangial matrix accumulation, and glomerular TGF- β 1 expression increased transiently, peaked at day 7, in LS and NS, and were less severe in LS than NS. In contrast, they were markedly severe in HS. In NS glomeruli at day 7, Smad2 decreased remarkably, Smad3 decreased in the nuclei and increased in the cytoplasm, Smad4 did not change in the nuclei but increased in the cytoplasm, and Smad6 increased in the cytoplasm. The marked decrease of glomerular Smad2 was also noted in LS and HS. The increase of cytoplasmic Smad4 at day 7 was slight in LC, while the decrease of Smad3 was remarkable and the increase of Smad6 was slight in the glomeruli with severe lesions in HS at day 7. These data suggest that the intracellular TGF- β signal transduction through Smad2 followed by the proteolysis through the ubiquitin-proteasome pathway is predominant in ATS nephritic glomeruli and the increase of Smad3-mediated signaling and the decrease of Smad6-mediated signal inhibition could be involved in the aggravation and prolongation of ATS nephritis in HS.