

平成 21 年 4 月 20 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19590942

研究課題名 (和文) 糸球体修復における内皮-メサンギウム細胞間情報伝達の解析

研究課題名 (英文) The role of mesangial-endothelial interactions in the repair process of glomerular injury

研究代表者 森岡 哲夫 (Morioka Tetsuo)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：00210146

研究成果の概要：

糸球体が傷害されたときには、内皮細胞とメサンギウム細胞が互いに情報を交換し合い修復していくと考えられる。この情報交換に異常があると修復がうまく進まず腎不全へと進行すると考えられる。細胞を電気化学的に結合するギャップ結合に注目し、修復時にどのように変化するかを検討した。ギャップ結合構成蛋白のコネキシンが傷害時に変化しておりコネキシンをターゲットにした腎炎治療戦略が考え得ることが明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：腎臓学

## 1. 研究開始当初の背景

慢性腎不全（腎死）に至る主な原因として慢性腎炎と糖尿病性腎症がある。いずれもメサンギウム基質の異常増加に端を発し、不可逆的な糸球体硬化病変形成に至る。糸球体硬化とは、種々の障害が加わった結果、糸球体毛細血管が圧迫狭窄され血流を通さなくなり、血管が退縮し線維芽細胞様細胞と細胞外基質によって置き換わった状態である。この糸球体硬化への進行過程を阻止する事が腎臓病学の最大の目標の1つである。

私たちはこれまでの検討結果から糸球体毛細血管の傷害修復に血管新生・再生が十分起こらないと糸球体の再構築に異常が生じ、硬化病変の形成促進をきたすという作業仮説

を立て、硬化モデルと治癒モデルにおける血管再生についての検討を行った。この結果、硬化モデルでは腎炎発症2週間時点での血管の再生が治癒モデルに比して悪く、一旦は治癒モデルと同程度には回復するが8週間には硬化へと至ってしまい、血管の再生不良が硬化へと至る可能性が大きいことを示した (Kidney International 2004)。また、糸球体が表面に出ている特殊ラット Munich-Wistar に抗Thy1抗体を静注し治癒モデルを作成し、生きたまま糸球体血流を観察できる生体共焦点レーザー顕微鏡により血流・血管壁の状態を検討したところ、組織切片上ではほとんど正常に近く回復しているように見える時点においても血管壁の不整

および血流の異常が認めら (Kidney Int 59:252-259, 2001)、硬化モデルにおいては一見正常に見える場合でも血流に乱れが生じていることが明らかになった (Kidney Int 2006)。このことは、単に内皮細胞の増殖のみでなく、機能的にも安定した血管の再生が治癒には必要である事を示していると考えられる。傷害からの回復時において糸球体毛細血管はどのような過程で再生されるだろうか。一般に血管新生の場合、内皮細胞が増殖しチューブを形成し、その後ペリサイトあるいは血管平滑筋がその周囲を覆う事により安定した血管に成熟する。糸球体毛細血管の場合は内皮細胞が増殖しその後、メサンギウム細胞が増殖あるいは遊走により内皮細胞と接着する事により安定した血管に修復されると考えらる。我々は内皮細胞とメサンギウム細胞の直接接触により、内皮細胞がメサンギウム細胞の増殖を制御することを報告しているが、細胞間の情報伝達が機能的に安定した糸球体血管修復に重要と考えられる。何らかの理由でこれらの情報伝達に破綻が起こった場合には、メサンギウム細胞などが過剰に増殖することにより毛細血管機能不全に陥り、糸球体硬化へと至ると想定される。この内皮細胞間、メサンギウム細胞間、内皮細胞-メサンギウム細胞間の情報伝達の詳細を明らかにする事により、糸球体硬化への進行を食い止める新たな方策を考え得る。

## 2. 研究の目的

本研究は、糸球体内皮細胞・メサンギウム細胞の機能制御機構を明らかにする事を目的とし、内皮細胞間、メサンギウム細胞間、メサンギウム-内皮細胞間の細胞接着に關与する因子 (特にギャップ結合関連タンパク) の動態を検討する事である

## 3. 研究の方法

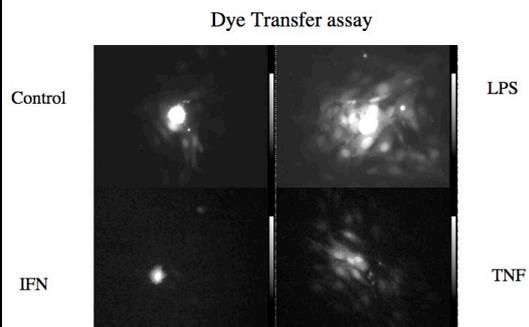
### 培養実験

ヒト糸球体内皮細胞は Cell System GE 社の Human Glomerular Microvascular Endothelial Cells をヒトメサンギウム細胞は既報 (Clinical and Experimental Immunology, 91, 510, 1993)の細胞を用いた。35mm dish に 1x10<sup>4</sup>/well で撒きコンフルエントになるまで培養する。LPS, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  を含んだメディウムに交換し 24 時間さらに培養する。24 時間後に Lucifer yellow を用いた色素拡散法でギャップ結合介在性細胞間結合能(GJIC)を検討し、コネキシン蛋白、mRNA の変化をウエスタンブロッティング法、real time RT-PCR で検討した。GJIC はガラスピペットを細胞内に侵入させ Lucifer Yellow を注入し 15 分後の周辺細胞への拡散状態を Argus Hisca を用いて観察した。Real time RT-PCR はロッシュの Universal Probe

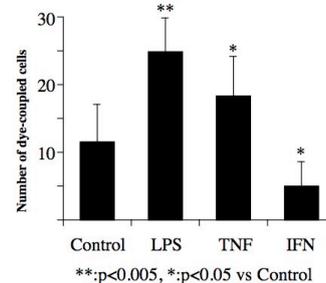
法を用いた。実験腎炎は Wistar Muich ラットにモノクローナル抗体 1-22-3 を 0.5mg/rat 静注し作成した。一部抗体静注後 30 分で片腎を摘出した 1 腎モデルも検討した (Kidney Int 61, 432, 2002)。静注後 3, 7, 14, 28 日で屠殺し組織像を光顕でコネキシンタンパクの局在を蛍光抗体法・免疫電顕で検討した。またコネキシンの変化は蛋白をウエスタンブロッティング法、mRNA を real time RT-PCR 法で検討した。

## 4. 研究成果

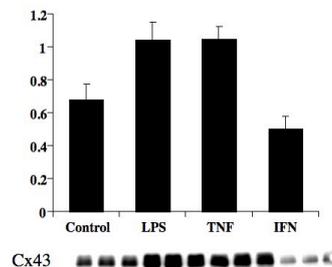
培養系を用いた検討では、ヒト糸球体内皮細胞を LPS, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  で刺激し、刺激後 24 時間でのギャップ結合の機能変化と、ギャップ結合構成蛋白コネキシン (Cx) 37, 40, 43 の変



Effect of cytokines to the GJIC

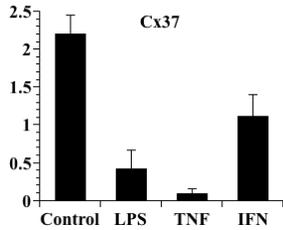
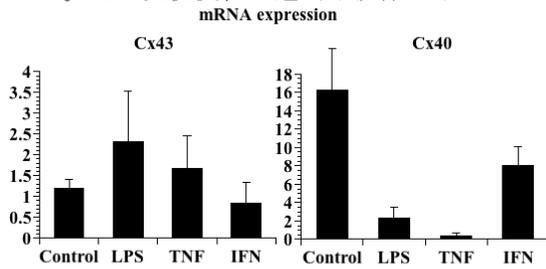


Effect of cytokines to the Expression of Cx43

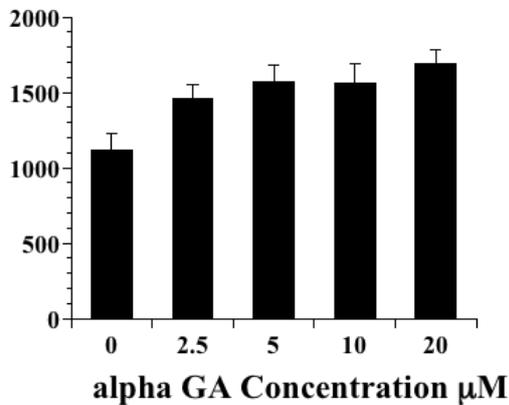


化を real time RT-PCR, 及びウエスタンブロッティング (WB) で検討した。LPS, TNF- $\alpha$  はギャ

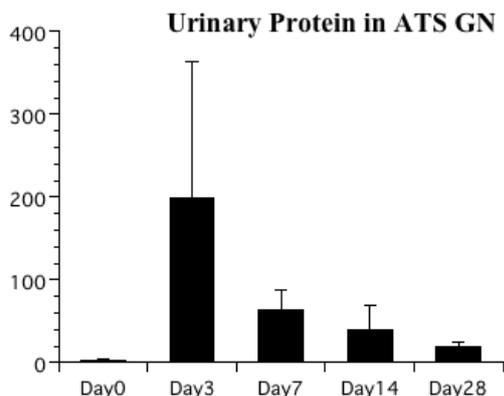
ップ結合の機能を増加させ、IFN- $\gamma$ は低下させた。Cxの発現変化は適当な抗体がなかった



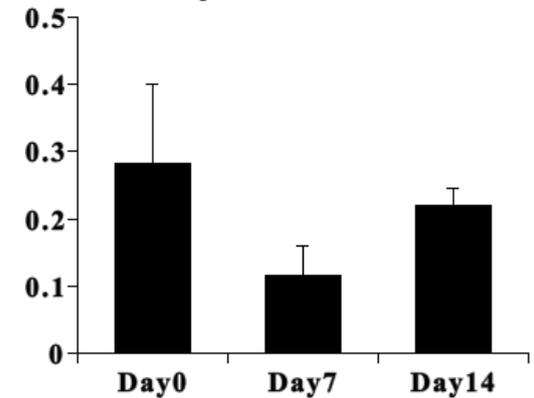
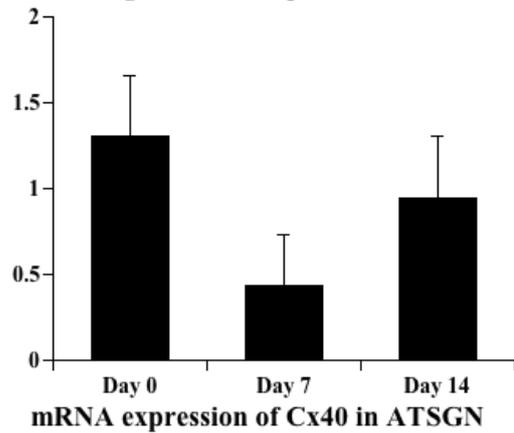
ためCx43のみの解析となったが、mRNAと同様にLPS, TNF- $\alpha$ , で増加し、IFN- $\gamma$ で減少した。mRNAの変化はCx43では蛋白発現の変化と同様な結果となったが、Cx37, 40ではLPS, TNF- $\alpha$ で減少し、IFN- $\gamma$ ではcontrolと差がなかった。これらからギャップ結合の機能変化は主にCx43の変化によると考えられた。ラットメサンギウム細胞を用いた実験では、ギャップ結合阻害薬のheptanolと $\alpha$ GAを培養系に加えると加えないものに比して増殖を亢進させることが認められた。



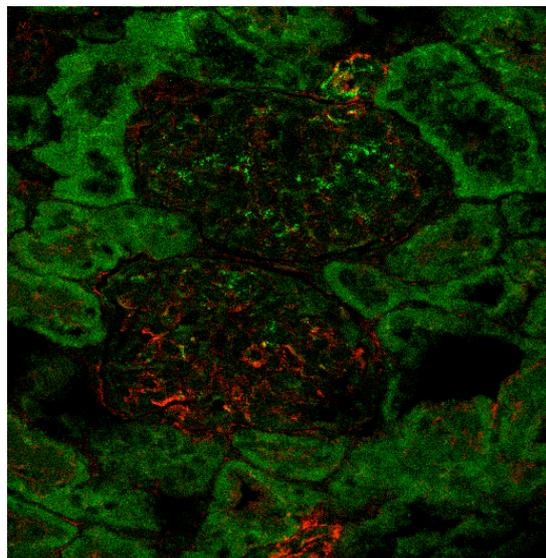
ラットメサンギウム(Mes)増殖性腎炎モデルを用いた検討ではギャップ結合構成蛋白であ



### Change of Cx40 expression in ATS GN



るCx40, 43の発現変化を検索した。蛍光抗体法ではCx40は糸球体Mes領域及び糸球体外Mes細胞に比較的強く発現していた。糸球体外では血管内皮細胞に発現が認められた。Cx43も同様の分布が認められた。免疫電顕法による検索ではCx40, 43ともにメサンギウムに発現が認められた。糸球体内皮細胞での発現内皮細胞-Mes細胞間の発現は確認できなかった。輸入輸出細動脈では血管平滑筋に発現が認められた。糸球体外血管では内皮細胞・平滑筋細胞に発現が認められた。可逆性実験腎炎モデ



ルではメサンギウム細胞融解が起こりメサンギウム細胞減少が見られる腎炎発症後3日及びメサンギウム細胞増殖が始まる7日目でメサンギウム細胞のコネキシンCx40, 43が減少していた。細胞増殖のピークを過ぎリモデルリングが始まると考えられる14日目にはCx40, 43の回復が認められた。メサンギウム細胞の増殖の指標とされる $\alpha$ 平滑筋アクチン(赤)とのコネキシン(緑)の二重染色によりCx40の発現と $\alpha$  SMAは逆相関を示していた。さらに不可逆性実験腎炎モデルでは14日目でのCx40の回復が認められなかった。これらから、コネキシン特にメサンギウム細胞のCx40が糸球体障害からの回復において細胞増殖に役割を果たすことが考えられた。このことから腎疾患においてコネキシンをターゲットとした治療戦略が考えられ、今後検討していく予定である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

1. Takamatsu M, Kondo S, Urushihara M, Shimizu M, Kinoshita Y, Morioka T, Oite T, Kobori H, Kagami S. Glomerular angiotensinogen protein is enhanced in pediatric IgA nephropathy. *Pediatric Nephrology* 2008 23 1257-1267 査読有り
2. Kikuchi T, Yoshida Y, Morioka T, Gejyo F, Oite T. Human voltage-dependent anion selective channel 1 is a target antigen for anti-glomerular endothelial cell antibody in mixed connective tissue disease. *Modern Rheumatology* 2008 18:570-577 査読有り
3. 森岡哲夫 腎糸球体内皮細胞の細胞特性—糸球体疾患における糸球体内皮細胞の役割— *日本腎臓学会誌* 2008 50:547-553 査読無し
4. Morioka T: Control of renin: Production, activation, secretion and renin receptor. In “Recent advances and new insight into the Renin-Angiotensin-Aldosterone system in the Kidney” *Koko-do Niigata Gejyo F ed* 2007 p1-8 査読無し
5. Yao J, Kitamura M, Morioka T, Oite T. Intercellular calcium wave in juxta glomerular apparatus. In “Recent advances and new insight into the Renin-Angiotensin-Aldosterone system in the Kidney” *Koko-do Niigata Gejyo F ed* 2007, p9-18 査読無し
6. Khan F, Yamakami K, Mahmood J, Li B, Kikuchi T, Kumagai N, Morioka T, Yoshizawa N, Oite T: Alterations of cell adhesion

molecules in human glomerular endothelial cells in response to nephritis-associated plasminogen receptor (NaPlr). *Nephron Experimental Nephrology* 2007 105 e53-e64 査読有り

7. Yao J, Oite T, Morioka T, Kitamura M. Gap junction in glomerular mesangial cells. *Journal of Membrane Biology* 2007 217, 123-130 査読有り

[学会発表] (計 5 件)

1. 森岡 哲夫 ヒト糸球体内皮細胞の GAP 結合細胞間連絡に対する LPS, TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  の及ぼす影響について  
第 51 回日本腎臓学会学術総会  
2008 年 5 月 31 日 福岡
  2. 佐藤 綾子 Thy-1 腎炎におけるギャップ結合阻害剤の局所投与による影響  
第 51 回日本腎臓学会学術総会  
2008 年 5 月 31 日 福岡
  3. 朴 紅蘭 糖尿病ラットにおける腎微小循環  
第 51 回日本腎臓学会学術総会  
2008 年 5 月 30 日 福岡
  4. 森岡 哲夫 Thy-1 腎炎における糸球体 Connexin40, 43 の発現動態変化について  
第 50 回日本腎臓学会学術総会  
2007 年 5 月 26 日 浜松
  5. Li bing, ARB treatment ameliorates progression of experimental glomerulonephritis  
第 50 回日本腎臓学会学術総会  
2007 年 5 月 26 日 浜松
- #### 6. 研究組織
- (1) 研究代表者  
森岡 哲夫 (Morioka Tetsuo)  
新潟大学・医歯学系・准教授  
研究者番号: 00210146
  - (2) 研究分担者  
朴紅蘭 (Piao Honglan)  
新潟大学・医歯学系・助教  
研究者番号: 40447644
  - (3) 連携研究者  
なし
  - (4) 研究協力者  
追手 巍 (Oite Takashi)  
新潟大学・医歯学系・教授  
研究者番号: 60018744
- 佐藤 綾子 (Sato Ayako)  
国立精神・神経センター (新潟大学・医歯学総合研究科・医科学修士課程大学院生)