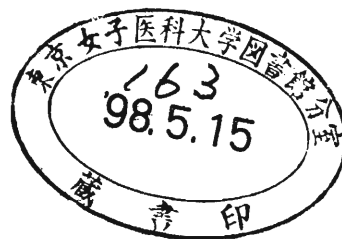

加齢に伴い発症する腎症の 分子生物学的解析

研究課題番号
08671304

平成8、9年度科学研究費補助金
(基盤研究C2) 研究成果報告書

平成10年3月



研究代表者 湯村和子

(東京女子医科大学・内科学・助教授)



はしがき

加齢に伴い種々の臓器において機能の低下が認められるようになる。このような機能低下はヒトに限らず実験動物においても同様に観察される。しかし観察する種によって差異が存在する。例えばヒトにおける動脈硬化に起因する腎硬化症などは我々が日常用いるラットやマウスでは観ることが無い。このような動物種を用いる利点として動脈硬化以外の要因の解析が可能となることである。本研究では生涯に渡る腎臓への侵襲の中で最も大きな因子である炎症が加齢に伴い発症する腎硬化症の成立にどのように関連しているかを解析することを目的としている。本研究で明らかにされて事実を基に老化に起因する臓器の機能低下が解決されることを期待して研究を遂行した。

最後に本研究への援助を頂いた文部省に感謝します。

平成10年3月3日

研究代表者 湯村和子

研究組織

研究代表者：湯 村 和 子（東京女子医科大学医学部助教授）

研究分担者：新 田 孝 作（東京女子医科大学医学部助手）

研究分担者：丸 山 直 記（東京都老人総合研究所分子病理
部門研究部長）

研究経費

平成8年度 1、180千円

平成9年度 700千円

計 1、880千円

研究発表

(1) 学会誌

1. 新田孝作、内田啓子、本田一穂、松上桂子、江藤洋子、名取恭子、湯村和子、二瓶 宏
糸球体内皮細胞とメサンギウム細胞の相互作用に対するerythropoietinの影響 : endothelin-1を介する増殖制御
日腎会誌 39: 777-782, 1997

2. Keiko Uchida, Shinichi Uchida, Kosaku Nitta, Wako Yumura and Hiroshi Nihei
Regulated expression of endothelin converting enzymes in glomerular endothelial cells. Journal of American Society of Nephrology 8: 580-585, 1997

3. 湯村和子
ループス腎炎における血漿交換療法の有用性
日本アフエレシス学会雑誌 16: 372-378, 1997

4. 本田一穂、湯村和子、小林英雄、内藤 隆、内田啓子、新田孝作、二瓶 宏
SLEやクリオグロブリン血症などの免疫複合体病
腎と透析 43: 489-494, 1997

5. Wako Yumura, Kousaku Nitta, Hiroyuki Ozu, Kyouko Natori, Yoko Eto, Akira Kawashima and Hiroshi Nihei
Effect of prednisolone therapy on serum concentrations of soluble interleukin-2 receptor in patients with IgA nephropathy.
Clin. Exper. Nephrol. 1: 212-215, 1997

6. 内田啓子、湯村和子
アレルギー性薬剤性間質性腎炎
医学のあゆみ 180: 66-69, 1997
7. 新田孝作、内田啓子、筒井貴朗、湯村和子、二瓶 宏
糸球体上皮細胞障害とサイトカイン
腎と透析 43: 219-222, 1997
8. Yasunori Utsunomiya, Toshiyuki Imasawa, Aya Abe, Keita Hirano, Tetsuya Kawamura, Ryuji Nagasawa, Tetsuya Mitarai, Naoki Maruyama and Osamu Sakai
Bacterial superantigen enhances cytokine production by T-helper lymphocyte subset-2 cells and modifies glomerular lesions in experimental immunoglobulin A nephropathy.
Clinical and Experimental Nephrology 1: 83-91, 1997
9. Ryuji Nagasawa, Kouichi Kanozawa, Tetsuya Mitarai, Masaki Inagaki and Naoki Maruyama
Unique phosphorylation of vimentin filaments in glomerular epithelial cells in culture and in disease
Nephron 77: 373-377, 1997
10. 丸山直記、井上明彦
腎疾患とアポトーシス
現代医療 29: 125-128, 1997
11. 丸山直記
ヒトの寿命と活動性
体育の科学 47: 319-322, 1997

- 1 2. 丸山直記、藤田敬子
老化制御の分子機構
現代医療 30: 449-452, 1998

(2) 口頭発表

1. 内田啓子、江藤洋子、堀田茂、新田孝作、湯村和子、二瓶宏
ピューロマイシン腎症におけるVascular endothelial growth factor (VEGF)の発現とその意義
第40回日本腎臓学会総会
新潟市 1997年5月14~16日
2. 湯村和子、名取恭子、内田啓子、若井幸子、川島朗、新田孝作、二瓶宏
ループス腎炎患者へのミゾリピン長期投与の検討
第40回日本腎臓学会総会
新潟市 1997年5月14~16日
3. 筒井貴朗、新田孝作、内田啓子、江藤洋子、湯村和子、二瓶宏
ラット培養メサンギウム細胞の増殖・細胞外基質産生におけるニトラジロールの影響について
第40回日本腎臓学会総会
新潟市 1997年5月14~16日
4. 井上明彦、藤田敬子、下澤達雄、長澤龍司、長澤俊彦、丸山直記
Senescence marker protein 30 (Ca²⁺ 結合蛋白質) の腎臓における発現と機能
第40回日本腎臓学会学術総会
新潟市 1997年5月14~16日

5. 叶澤孝一、長澤龍司、御手洗哲也、蒔田紀子、松田昭彦、磯田和雄、丸山直記、稲垣昌樹
リン酸化vimentin特異抗体による糸球体疾患の病態解析
第40回日本腎臓学会学術総会
新潟市 1997年5月14～16日
6. 長澤龍司、今澤俊之、蒔田紀子、丸山直記、御手洗哲也、磯田和雄
ddYマウス由来自己反応性ヘルパーT細胞による蛋白尿の誘導
第40回日本腎臓学会学術総会
新潟市 1997年5月14～16日
7. 今澤俊之、宇都宮保典、川村哲也、酒井 紀、大野典也、長澤龍司、御手洗哲也、丸山直記
IgA腎症自然発症ddYマウスの腎症の成因に関する同種骨髄移植による検討
第40回日本腎臓学会学術総会
新潟市 1997年5月14～16日
8. 酒井 毅、高橋孝宗、川村哲也、酒井 紀、御手洗哲也、白沢卓二、丸山直記
糸球体上皮細胞障害におけるIL4/Jak3キナーゼの関与
第40回日本腎臓学会学術総会
新潟市 1997年5月14～16日
9. 蒔田紀子、長澤龍司、今澤俊之、下澤達雄、井上明彦、叶澤孝一、丸山直記、御手洗哲也、磯田和雄
メサングウム細胞におけるc-fosの細胞外基質産生に及ぼす影響:
transgenic mouse を用いた検討
第40回日本腎臓学会学術総会
新潟市 1997年5月14～16日

10. 丸山直記
腎構成細胞の増殖機構をめぐって
第77回北大阪腎疾患カンファレンス
大阪市 1997, 4.12

11. 丸山直記
第23回埼玉腎臓研究会
特別講演「老化と腎：基礎医学からのアプローチ」
大宮市 1997, 10.18

12. 長澤龍司、御手洗哲也、加藤 仁、笠原成彦、磯田和雄
vimentin のリン酸化部位特異抗体の腎疾患モデルへの応用
第39回日本腎臓学会学術総会
倉敷市 1996年5月30～6月1日

13. 長澤龍司、蒔田紀子、笠原成彦、加藤 仁、笠原成彦、松田昭彦、
御手洗哲也、磯田和雄、丸山直記
IgA高産生性を誘導するT,B細胞相互作用-ddYマウス由来自己反応性T
細胞クローンによる解析-
第39回日本腎臓学会学術総会
倉敷市 1996年5月30～6月1日

14. 蒔田紀子、長澤龍司、叶澤孝一、渡部晃久、広瀬 悟、御手洗哲也、
磯田和雄
IgA腎症の発症における自己免疫形質の関与-NZW/ddY交配による自己
免疫の顕性化-
第39回日本腎臓学会学術総会
倉敷市 1996年5月30～6月1日

15. 松村 治、長澤龍司、加藤 仁、御手洗哲也、磯田和雄、高橋孝宗、川村哲也、酒井 紀、白沢卓二、丸山直記
T細胞抗原受容態b鎖 (TCR-b)遺伝子多型とIgA腎症の予後
第39回日本腎臓学会学術総会
倉敷市 1996年5月30～6月1日
16. 酒井 毅、高橋孝宗、平野景太、川村哲也、酒井 紀、御手洗哲也、白沢卓二、丸山直記、横山峰彦
腎間質繊維機序に関する検討-osteopontin (OPN)の関与-
第39回日本腎臓学会学術総会
倉敷市 1996年5月30～6月1日
17. 内田啓子、新田孝作、湯村和子、二瓶 宏、丸山直記
エンドセリン変換酵素 (ECE-2)の糸球体内皮細胞での発現とその調節
第39回日本腎臓学会学術総会
倉敷市 1996年5月30～6月1日

遺伝子の転写は当該遺伝子の発現調節領域に結合するDNA結合蛋白により制御されている。それらの内で良く知られたものとしてはc-fos蛋白やc-jun蛋白を始めとした癌遺伝子産物がある。丸山らはこれまでにラットの肝臓において加齢に伴いc-fos遺伝子およびc-jun遺伝子の発現が増加することを発見している。c-fosおよびc-junは AP-1という安定したヘテロダイマーを形成し特定の遺伝子の発現調節領域、特にTPA responsive element (TRE)に結合し、その遺伝子の発現を上昇させたり、あるいは抑制する。先の研究においてもTREを持つ遺伝子の上昇は認められたが、TREを持たない遺伝子の発現増加は認められなかった。加齢に伴う腎糸球体硬化症では特にメサンギウム細胞における細胞外基質の発現とメサンギウム領域における沈着が極めて重要と考えられている。そのようなメサンギウム細胞における細胞外基質の発現は炎症により増加することが知られており、高等生物個体が生涯にわたり生じる炎症が糸球体硬化症の原因の一つと見なすことができる。この炎症もまた時にc-fosの発現を亢進する。

本研究では腎臓においても加齢（老化）に伴い肝臓と同様の現象が観察されるかを検証し、c-fos遺伝子の発現がメサンギウム細胞における細胞外基質 laminin B1の発現を増強させるのかを検討した。さらに高齢者における高血糖状態がc-fosの発現にどのように影響するのかを検討した。その結果これらの2つの要因は腎糸球体における細胞外基質の発現に重要な影響を与えることを明らかにした。

【方法】

1) 培養メサンギウム細胞の樹立

以下のマウス・ラットより樹立した。

- ① c-fos transgenic mouse (C57BL/6 mouse back ground)
- ② C57BL/6 mouse
- ③ Wister rat

樹立した培養メサンギウム細胞は全てactinとdesminが陽性、keratinとfactor VIIIが陰性であることを確認した。

2) ratメサンギウム細胞へのc-fos遺伝子導入

full lengthのmouse c-fos cDNAをsense方向で発現ベクターpcDNA3に挿入した。controlとしてantisense方向でもpcDNA3に挿入した。精製後のベクター

をlipofectinを用いてメサングウム細胞に遺伝子導入し、G418存在下で培養して stable transfectantを得た。これらのtransfectantについては10から20継代の細胞を実験に使用した。

3) 細胞培養

メサングウム細胞をsubconfluent (60-70%) になるまで培養し、RPMI1640 (10 mM glucose)に交換し24時間培養した。その後10 mM glucoseあるいは30 mM glucoseを含んだRPMI1640培養液に交換してglucose濃度の影響を解析した。

4) 蛍光抗体法

培養液交換後、4時間後の細胞をパラフォルムアルデヒド及びサポニン処理後に1次抗体としてrabbit anti-c-fos immunoglobulin、次に2次抗体としてbiotinylated goat anti-rabbit IgG、3次抗体としてavidin-labeled FITCを各々反応させて染色した。

5) 共焦点レーザー顕微鏡による核蛋白の定量化

共焦点レーザー顕微鏡 (MRC-1000) でレーザー10~30%、アイリス0.3~6.0 mm、ゲイン1200 voltの条件でc-fos抗体による反応程度をヒストグラムを用いて算出した。

6) 細胞外基質代謝laminin B1の検討

Northern hybridizationによりlaminin B1の発現レベルを解析した。

【結果】

1) 加齢に伴うc-fosの発現増加

週齢の増加に伴うrat腎臓におけるc-fosの発現増加をNorthern hybridizationにより検討した。c-fosは4週齢における発現に比較して55あるいは110週齢において明らかな増加を示していた (図1)。対照の β -actinの発現には変化がなかった。

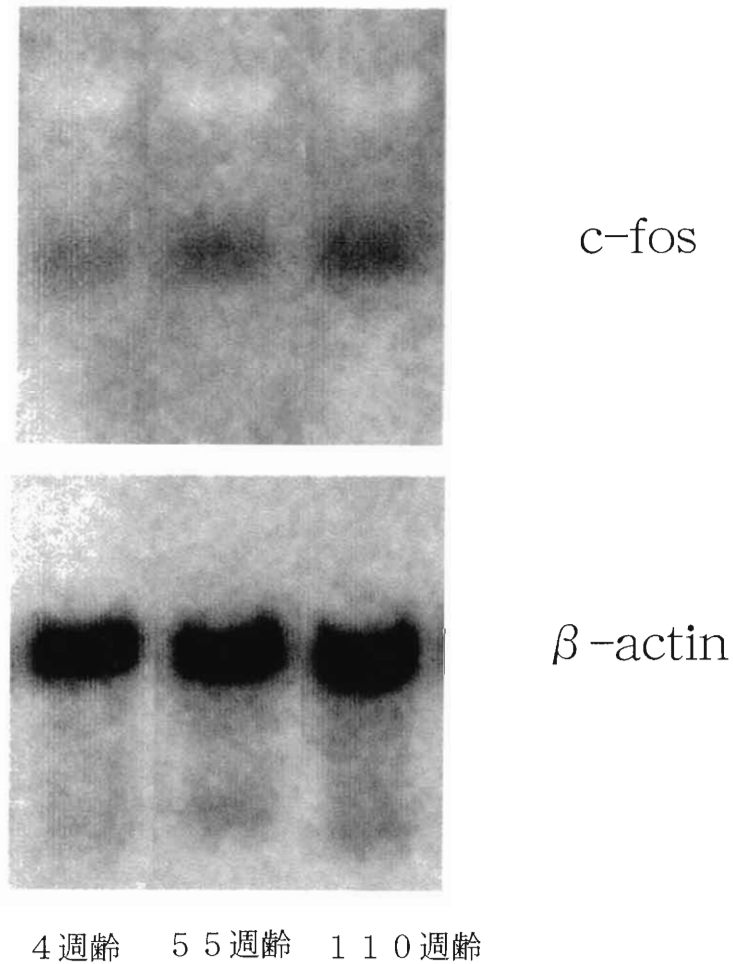


図1. 加齢に伴うc-fosの発現増加

次に、このc-fosの発現増加が腎臓構成細胞のいずれであるのかを免疫組織学的に検討した。その結果、メサンギウム細胞がc-fosの発現増加の中心であることが明らかとなった。Wister ratの腎系球体において加齢に伴うc-fosの発現の変化を免疫組織学的に解析したところ、加齢に伴い主にメサンギウム細胞にfos蛋白の発現が増加した。1.7週齢のrat腎系球体では殆ど認められないが5.5及び9.0週齢では明らかな発現の増加が認められた（図2）。

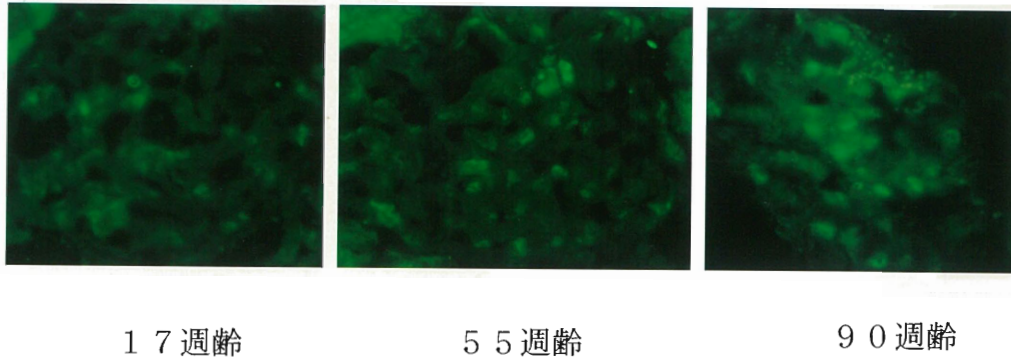


図2. 加齢に伴うc-fos蛋白の増加

2) 培養メサンギウム細胞を用いたc-fos発現とglucoseの影響の解析

c-fos transgenic mouseから樹立された培養メサンギウム細胞株 (c-fos TG) におけるc-fosの発現を検討した。対照には通常のC57BL/6マウス由来のメサンギウム細胞株 (con TG) を用いた。con TGを10 mM glucose存在下で4時間培養した場合には、c-fosは核及び細胞質に認められた。核における発現は弱く、細胞質と同程度であった (図3A)。一方同じ条件でc-fos TGを培養するとc-fosは主に核に存在し、その蛍光強度はcon TGに比してはるかに顕著であった (図3B)。

一般に高濃度のglucose存在下で培養するとc-fosの発現が増強することが知られている。con TGと30 mMのglucoseで培養して10 mM glucose存在下のc-fos TGとc-fosの発現を比較したが明らかな差は認められ無かった (図3C)。同様に30 mM glucose存在下でc-fos TGを培養しても10 mM glucose存在下と同様の染色性が観察され (図3D)、c-fos TGではc-fosの発現がfullに発現していると考えられる。核における蛍光強度を共焦点レーザー顕微鏡で測定した。10 mM glucose存在下のc-fos TGは30 mM glucose存在下でcon TG培養した場合と同程度のc-fos発現が認められた (図4)。

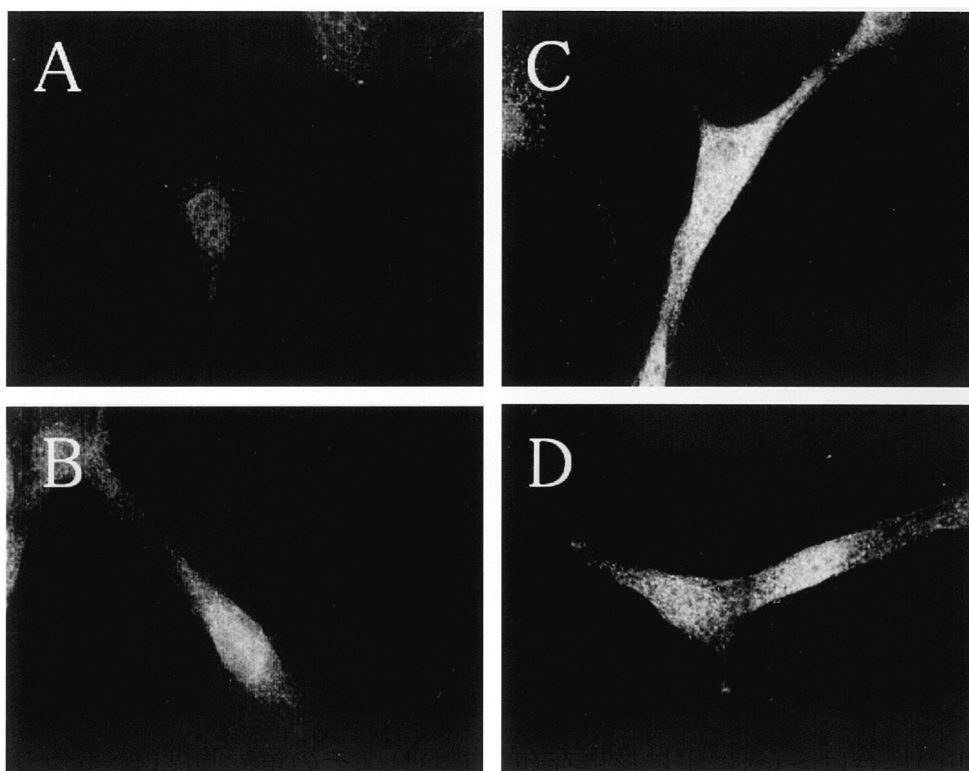


図3. 各種培養条件下におけるc-fos蛋白の発現

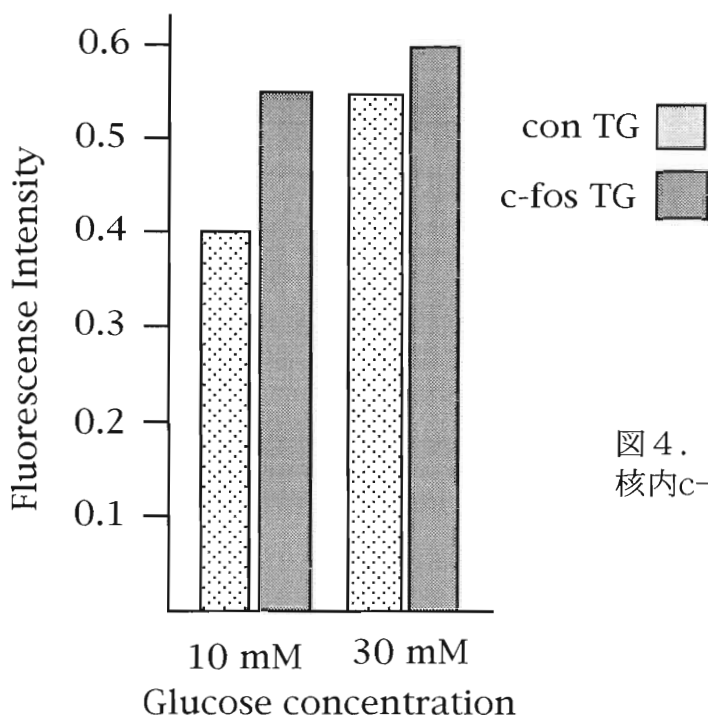


図4. 各種Glucose濃度による核内c-fos蛋白の発現量の変化

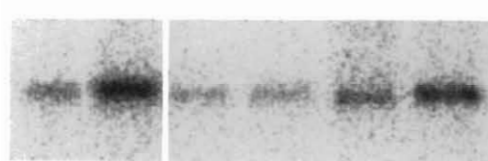
次にc-fos cDNA (c-fos TF) あるいはc-fos cDNA antisense (c-fos ANTTF) を移入したratメサングウム細胞におけるc-fos発現を比較した。c-fos ANTTFを10 mM glucose存在下で4時間培養した場合にはc-fosは主として核に認められたが、その発現は弱かった。また細胞質にもわずかに発現が認められた。c-fos TFの場合はc-fosは主に核に存在しており、その蛍光強度はc-fos ANTTFに比してはるかに強かった。また細胞質にも点状に発現が認められた。

c-fos ANTTFを30 mM glucose存在下で培養した場合には、10 mM glucose存在下に比して核内、細胞質内に発現の増強が認められたが、その程度は10 mM glucose存在下のc-fos TFよりもはるかに弱かった。また30 mM glucose存在下でc-fos TFを培養しても10 mM glucose存在下の場合と同様の染色性が認められ、核内におけるc-fos発現は、これ以上増強しなかった。核部分の蛍光強度を共焦点レーザー顕微鏡で測定した。10 mM glucose存在下のc-fos TFは30 mM glucose存在下でc-fos ANTTFを培養した以上のc-fos発現が認められた。

3) 細胞外基質lamininB1の発現におよぼすc-fosの効果

10 mM glucoseあるいは30 mM glucose存在下における各種メサングウム細胞における細胞外基質laminin B1の発現をNorthern hybridization法で検討した(図5)。その結果、c-fos TG, c-fos TF共に10 mM glucoseにおける

laminin B1遺伝子発現量は30 mM glucose存在下における対照細胞とほぼ同程度であった。



1 2 3 4 5 6

30 mM Glucose

1. C57BL/6

2. C57BL/6
(c-fos antisense)

10 mM Glucose

3. C57BL/6

4. C57BL/6
(c-fos antisense)

5. C57BL/6
(c-fos TG)

6. C57BL/6
(c-fos sense)

図5. c-fosによるlaminin B1遺伝子発現の亢進

【考察】

本研究において糸球体メサンギウム細胞におけるc-fos遺伝子産物が増強すると、この遺伝子産物の単独作用で、細胞外基質laminin B1遺伝子が増強することを示した。従来、様々な糸球体疾患においてc-fos発現が増強することが知られているが、この遺伝子単独の作用でメサンギウム細胞にどのような変化が生じるかは明確になっていない。c-fos transgenic mouseにおける検討ではメサンギウム領域の軽度の拡張が認められるが、このtransgenic mouse自体がT細胞系やB細胞系の重篤な免疫不全を示すために、様々なサイトカインが脱制御状態にあり、その影響を受けてメサンギウム細胞は変化を生じている可能性がある。このc-fos transgenic mouseはH-2プロモーターを有したものであるにもかかわらず約50%のmouseにおいては腎臓でc-fos発現が認められていない。この理由は不明であるが、我々が樹立したc-fos TGはcon TGに比較して大量のc-fos蛋白が核内に存在しH-2プロモーターが有効に作用していると考えられた。このc-fos蛋白はc-jun蛋白と細胞内で安定なヘテロダイマー（AP-1）を形成することが知られている。AP-1はDNA上のTPA responsive element（TRE）と強い親和性で結合して、TREを発現調節領域を持つ遺伝子の発現を増強する。このようなTREと結合作用を持つのはc-fosとc-junのヘテロダイマーのみならず、c-fos同士ホモダイマーやc-jun同士ホモダイマーが知られている。本研究で我々が作製したc-fosを過剰に発現するメサンギウム細胞では過剰なc-fosが細胞内でどのようなダイマーを形成しているのかは不明であるが、TREを介してlaminin B1などの細胞外基質遺伝子の発現を活性化したものと思われる。c-fos TG, c-fos TF共に10 mM glucoseにおけるlaminin B1遺伝子発現量は各々の対照細胞が30 mMという高糖下におかれたのと同程度に増加していた。この結果から正常血糖下でメサンギウム細胞内にc-fos発現量が増加すると、その発現量に応じてlaminin B1遺伝子発現量を増強させることが示唆される。メサンギウムに過剰に発現されたc-fosはlaminin B1を始めとする細胞外基質産生を亢進し、その結果として糸球体硬化が悪化する可能性がある。よって本研究の結果は老化に伴った糸球体硬化にc-fos発現が重要な役割を果たしている可能性を示唆している。