

## 2) 糸球体腎炎の慢性進行機序の解明

新潟大学医学部第二内科学教室 成田 一衛・近藤 大介  
 永井 雅昭・中山 均  
 後藤 真・竹田 徹朗  
 坂爪 実・斉藤 亮彦  
 中川 洋一・荒川 正昭

## Molecular Mechanisms of Progressive Glomerular Injury

Ichiei NARITA · Daisuke KONDOH · Masaaki NAGAI  
 Hitoshi NAKAYAMA · Shin GOTO · Tetsuro TAKEDA  
 Minoru SAKATSUME · Akihiko SAITO  
 Yoichi NAKAGAWA and Masaaki ARAKAWA

*Department of Medicine II,  
 Niigata University School of Medicine.*

In order to elucidate the molecular mechanisms, in which acute and basically self-limited glomerular injury advance to chronic and progressive glomerulosclerosis, we tried to identify genes expressed predominantly in the kidney of chronic and progressive glomerulosclerosis but less in acute and transient glomerulonephritis. Progressive glomerulosclerosis was induced in male Sprague-Dawley rats by unilateral nephrectomy followed by monoclonal anti-Thy1.1 antibody (OX-7) injection (Nx). Control rats were sham operated and injected with OX-7 (Sham) to induce acute and transient glomerulonephritis. Urinary protein measurement and morphological examinations were performed until 6 months after the disease induction. In Nx rats, proteinuria increased with time and mesangial expansion was accompanied by interstitial fibrosis, whereas, in Sham rats, transient proteinuria peaked at 1 week and mesangiolysis was followed by mesangial hypercellularity which was dissolved spontaneously after 4 weeks. Four weeks after the induction of the chronic (Nx) and acute (Sham) glomerulonephritis, before any remarkable histological difference between both groups was evident, mRNAs were isolated from kidney cortex of the groups and used for cDNA synthesis. By subtraction hybridization of cDNAs from Nx with an excess amount of those from Sham, we isolated and characterized several genes expressed predominantly in the Nx group. These included genes that encode serine protease inhibitors, ligands for cytokines, osteopontin, and those for *de novo* protein synthesis as well

Reprint requests to: Ichiei NARITA,  
 Department of Medicine II,  
 Niigata University School of Medicine  
 Niigata City, 951-8510 JAPAN

別刷請求先: 〒951-8510 新潟市旭町通1-757  
 新潟大学医学部第二内科 成田 一衛

as those with unknown function. Osteopontin expression was immunohistologically found to be upregulated in Nx at 4 weeks after the disease induction, whereas no remarkable expression was found in the Sham group. In conclusion, we have identified genes expressed predominantly in chronic glomerulosclerosis but less in acute glomerulonephritis. These genes may play important roles in the process which promotes initial glomerular injury to result in chronic and progressive glomerulosclerosis.

Key words: Nephrectomy, Anti-thy1.1 antibody, glomerulosclerosis, cDNA subtraction, Osteopontin  
片腎摘出, 抗 thy 1.1 抗体, 糸球体硬化, cDNAサブトラクション, オステオポンチン

## はじめに

糸球体硬化の定義は一般的に、原因や病理組織像の異なる各種の糸球体疾患が、不可逆性に進行して終末像を呈するに至る過程において、共通に見られる糸球体病変と理解されている。その病理学的特徴は、メサンギウム領域における基質の増加であり、それに糸球体構成細胞の萎縮・変性・脱落が加わった状態であると考えられている<sup>1)</sup>。

様々な原因により糸球体初期病変 (initial glomerular injury) が生じるが、その原因が完全に消失すれば、糸球体病変は自然に寛解することは、多くの動物実験モデルやヒトの溶連菌感染後急性糸球体腎炎の経過などが示唆している。この一連の過程において、糸球体障害を繰り返して起こしたり、あるいは血行動態学的な異常を加えることによって、メサンギウム細胞の増殖や基質の増加が非可逆的に進行して、糸球体硬化が進行していくことが、実験的糸球体腎炎モデルにおいて、確認されている<sup>2)</sup>。この進行過程においては、脂質代謝異常、T-細胞の機能異常、糸球体内の過凝固、あるいは TGF- $\beta$  や PDGF などの growth factor が重要な役割を果たしていることが知られている<sup>2)-7)</sup>。

本来、急性・一過性の経過を呈する糸球体の炎症が、どのような機序で慢性・進行性の経過を示すのか、その分子レベルの詳細な機序は不明である。

本稿では、上記のような観点に基づいて、最近私たちが行った実験を紹介し、考察を加えたい。

## 方 法

私たちは、糸球体硬化の実験モデルを作成して、慢性進行性の経過を決定する機序を分子レベルで解明することを目的として、以下の実験を行った。

実験モデルとして、Sprague-Dawley ラットに片腎摘出 (nephrectomy)、あるいはコントロールとして疑似手術 (sham operation) を行い、1時間後にマウス抗ラット Thy 1.1 モノクローナル抗体 (Ox7) を静注した (それぞれ Nx 群, Sham 群とする)。1週, 3週, 5週, 3カ月, 6カ月後に尿蛋白を定量し、1, 3および6カ月後に開放腎生検を行った。Nx 群と Sham 群間の組織学的な差異が明らかに認められる以前に、その後の慢性進行性の経過を決定づける要因を解明するため、1カ月の時点における両群の腎皮質における発現 mRNA を cDNA subtraction 法を用いて解析した。両群において著しく発現量に差のある mRNA が、糸球体腎炎の慢性化の鍵を握っている可能性があると考えられる。

cDNA subtraction は Clontech 社のキットを使用して行った<sup>8)</sup>。Nx 群, Sham 群の腎皮質から抽出した RNA を鋳型として cDNA を合成し、これを 4 base カッターである RsaI で消化して遺伝子断片の mixture とした。まず、Nx 群を2つに分けて、各々に、2種類の43塩基で合成された adaptor 1と2を結合した。それぞれに、Sham 群から得た cDNA を過剰量 (今回の実験では150倍量) を混合し、ハイブリダイズさせた。この際、過剰量の driver を加えているため、多くの Nx 群 cDNA は Sham 群 cDNA と結合した状態になると考えられるが、Nx 群に特異的かあるいは著しく発現量が多いものは、1本鎖のままか、Nx 群 cDNA 同士が結合する。次に、それぞれの試料を混合して second hybridization を行った。この結果、両端に異なる adaptor 1と2を持ったものが出来る。すなわち、前述までの操作で、Nx 群に特異的に発現する遺伝子のみが、2種類の異なる adaptor を両端に持つ状態になる。両端をそろえた後、各々の adaptor

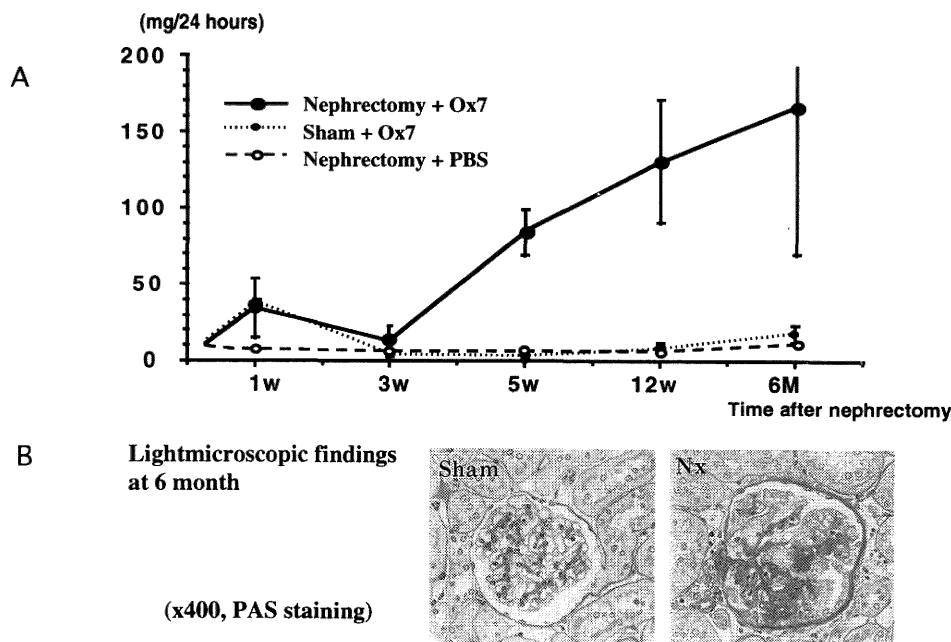


図1 Urinary protein excretion

の一部を primer として PCR を行い、非特異反応を減らすため、adaptor の別の部分を primer として、もう一度 PCR を行った。その結果、Nx 群に特異的かあるいは著しく発現量が多いものだけが指数関数的に増幅される。

これらの増幅された遺伝子断片を、T-ベクターに挿入してクローニングし、部分塩基配列を決定した後、GenomeNet on-line service を介した BLAST プログラムを用いて、既知の遺伝子データベースとのホモロジー検索を行った。

## 結 果

図1Aに尿蛋白の経過を示す。Sham群では、1週をピークに一過性に尿蛋白排泄量が増加し、3週でほぼ正常レベルに回復した。一方Nx群では、1週をピークに尿蛋白が増加し、3週ではSham群と同様に正常に近いレベルまで一度低下するが、その後再び蛋白尿が増加し、6カ月まで進行性に増加した。片腎摘出のみをおこなったラットでは、6カ月の時点まで蛋白尿は認められなかった。

1カ月目の光顕像では、Sham群に比較して、Nx群で糸球体サイズがやや増大しているようであるが、メサンギウム基質の増加は同じ程度に見られた。また両群と

も、間質の線維化はみられず、少なくとも光顕レベルでは明らかな差はなかった。6カ月目の光顕像(図1B)では、Sham群は、メサンギウム基質の増加が減少し、ほぼ正常な組織像に回復していたが、Nx群では、メサンギウム基質はさらに増加し、一部に完全に硬化した糸球体もみられた。

以上の実験モデルを用いて、組織学的な差異が明らかでない発症1カ月の時点で、両群のラットの腎皮質ホモジェネートからRNAを抽出し、mRNAから二本鎖cDNAを合成した。これを4baseカッターであるRsa I (GT/AC)で消化して断片化したものを用いて、サブトラクションを行って、発現量に差のある遺伝子を検出しそれをクローニングして塩基配列を決定した。

図2に、subtractionの結果を示す。レーン3は、同時に行ったコントロール実験で、平滑筋細胞のcDNAに、500分の1量の分子量マーカーを混合したものと平滑筋細胞のcDNAとを同じようにsubtractした。分子量マーカーの872bpと603bpのバンドとほぼ同じ位置のバンドが、明瞭に増幅されている。レーン1がtesterから150倍過剰量のdriverをsubtractして得たバンドである。約900bpから300bpの範囲に17本以上のバンドを認めた。得られた各々のバンドをゲルから抽出し、Tベクターにligateし、クローニングを

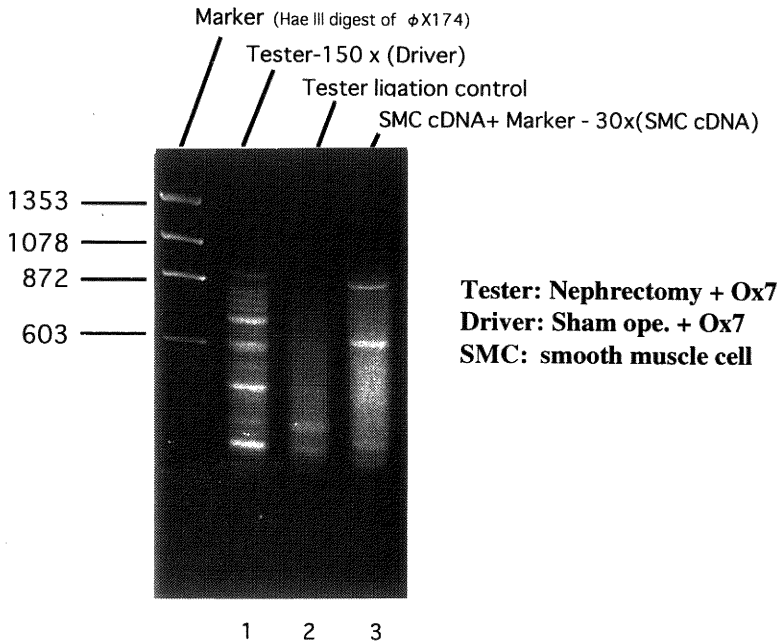


図2 cDNA subtraction hybridization; Second PCR

表1 Reported cDNA sequences identical to some clones isolated in this study

Clone	Reported cDNAs	Clone	Reported cDNAs
1.3	GTP-binding proteins	10.4	Contrapsin-like protease inhibitor related protein (CPi-26)
2.2	Rat cytochrome P-450 IVA 2 (CYP4A2)	11.1	ATP synthase a chain
4.4	Rattus norvegicus ninjurin 1	13.3	Rattus norvegicus espin mRNA Transferrin (TF) gene, exon 1
5.3	Signal recognition particle receptor beta subunit	14.4	Osteopontin
6.1	Heavy metal tolerance protein Lactoferrin	16.1	Elongation factor-1 alpha (EF-1a)
8.1	Stratagene mouse lung 937302	17.2	Rat F alloantigen mRNA 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase

\*There was no reported cDNA sequence with already known function identical with clone 3, 7, 9, 12, 15.

行い、部分塩基配列を決定した。さらに、コンピューター上で塩基配列データベースに、今回得られた塩基配列と同一の既知のものが登録されているか否かを検索した。

得られた17クローンのうち、3, 7, 9, 12, 15のクローンは既知の塩基配列ではなかった。クローン14.4はosteopontinと同一の塩基配列であった(表1)。

Osteopontinは、骨形成に深く関与している分泌糖-

リン酸化蛋白として同定されたが、1986年にcDNAがクローニングされて以来、腎、内耳、血管平滑筋、免疫系細胞などに発現することが知られている。これらの細胞や組織における詳細な機能は不明であるが、近年様々な腎疾患モデルにおける発現が報告されている<sup>9)-12)</sup>。

腎における機能としては、単球-マクロファージ系の免疫系細胞の chemoattractant として MCP-1 や I

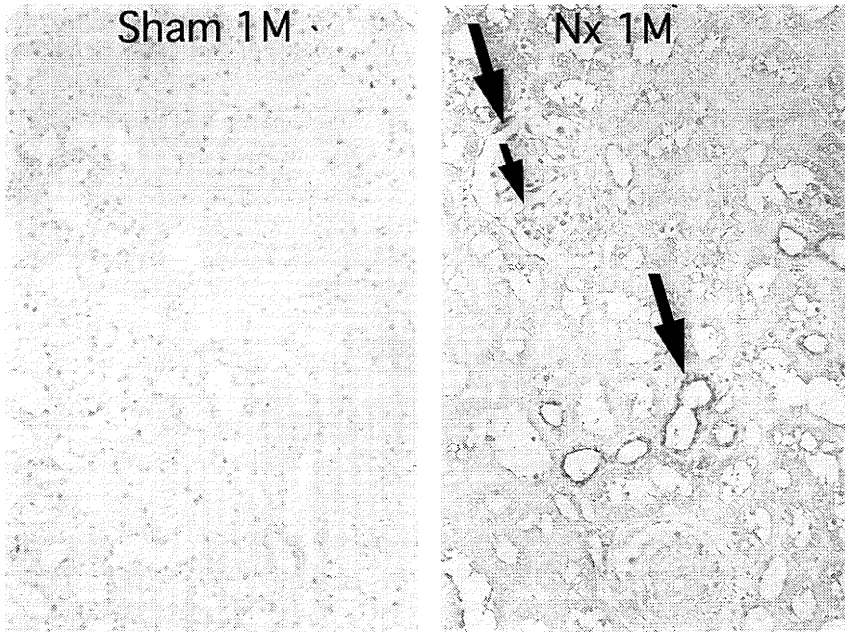


図3 Immunohistological staining for osteopontin

CAM-1よりも早期に一過性に発現が上昇することが知られており、特に腎間質の線維化に重要な役割を果たしている可能性が指摘されている。また一方で、inducible No synthase を抑制することにより、機械的ストレスに対する防御因子としての役割も推定されている。

1カ月目の生検標本について、osteopontin に対する特異抗体を用いてABC法でその局在を検討した(図3)。Nx群で、遠位尿管上皮細胞の管腔側、ボウマン嚢上皮細胞に明らかな陽性所見を認めた。Sham群では、遠位尿管の一部にごくわずかに陽性である他は、陰性であった。また、Nx群で、糸球体上皮細胞や近位尿管上皮細胞にもわずかに陽性と思われる所見を認めたが、今後、免疫電顕などを用いて、細胞内局在について、さらに詳細な検討を加える必要がある。

### 考 察

本稿の最初に述べたように、糸球体硬化は、一般的な理解としては、各種糸球体疾患に共通した、進行性に終末像に至る過程であり、その病理学的な特徴はメサンギウム基質の増加で、それに糸球体構成細胞の萎縮・変性・脱落が加わっている<sup>1)</sup>。この不可逆性の糸球体硬化に進行する過程においては、糸球体障害の原因の如何に関わ

らず、ある程度共通の因子が働いていると考えられている。それらのなかには、レニン-アンジオテンシン系をはじめとする糸球体の血行動態学的異常、TGF- $\beta$ やPDGFなどのサイトカイン・成長因子、あるいは凝固線溶系因子などの様々な分子が含まれ、さらにそれらに対する糸球体構成細胞の反応の特性が、糸球体硬化の進行に重要な役割を果たしていると考えられる<sup>2)-7)</sup>。

私たちは、糸球体障害がどのようなメカニズムで不可逆性を獲得し、糸球体硬化に至るのかを明らかにする目的で今回の研究を行った。その結果、可逆性モデル(Sham群)と不可逆性モデル(Nx群)の間において、少なくとも顕微鏡レベルで組織学的な差異が明らかになる以前に、腎皮質においていくつかの遺伝子の発現量に差があることが明らかであった。これらの発現量が上昇した遺伝子群は、おそらく片腎摘出操作による血行動態学的異常によって転写活性が上昇したものと考えられる。この血行動態の変化がどのように遺伝子の転写を調節しているのか、あるいは今回の実験で単離された各々の遺伝子が、慢性・進行性病変の形成において果たす機能や詳細な意義付けは、現時点では明かではない。それぞれの遺伝子産物が腎障害進展の原因なのか、あるいは二次的に発現量が上昇しているだけなのか、今後さらに詳細に検討する必要がある。

また、TGF- $\beta$ やPDGFなどに代表される、糸球体障害の進展に重要であることが知られている既知の因子が同定されなかった理由も明らかではない。おそらく、mRNAを抽出した発症後1カ月の時点で、それらの発現量に著しい差が（少なくとも今回の実験に用いた系で検知しうるほどには）無かったためと考えられる。すなわち、150倍過剰量のdriverをtesterにハイブリダイズしているため、理論上、150倍以上の発現量の差がないと検知されないことになる。しかし、クローニングの段階でそれらの重要な遺伝子を失っている可能性も否定できず、これについても今後の検討課題である。

### 参 考 文 献

- 1) Zollinger, H.U. and Mihatsch, M.J.: Glomerulonephritic contracted kidney (Nonclassifiable glomerulonephritis, End-stage kidney). In Renal Pathology in Biopsy (Zollinger, H.U. and Mihatsch, M.J. eds.) pp 311~316 Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, 1978.
- 2) Wardle, N.: Glomerulosclerosis: the final pathway is clarified, but can we deal with the triggers? [editorial]. Nephron. 73: 1~7, 1996.
- 3) Johnson, R.J.: Cytokine networks and the pathogenesis of glomerulonephritis [editorial]. Journal of Laboratory & Clinical Medicine. 121: 190~192, 1993.
- 4) Gabbai, F.B., De Nicola, L. Peterson, O.W. and Obagi, S. et al: Renal response to blood pressure elevation in normal and glomerulonephritic rats. Journal of the American Society of Nephrology. 7: 2590~2599, 1996.
- 5) Heidland, A., Ling, H., Vamvakas, S. and Paczek, L.: Impaired proteolytic activity as a potential cause of progressive renal disease. Mineral & Electrolyte Metabolism. 22: 157~161, 1996.
- 6) Border, W.A. and Noble, N.A.: TGF-beta in kidney fibrosis: a target for gene therapy. Kidney International. 51: 1388~1396, 1997.
- 7) Ortiz, A., Gomez-Chiarri, M., Alonso, J. and Bustos, C. et al: The potential role of inflammatory and fibrogenic cytokines in the glomerular diseases. Journal of Lipid Mediators & Cell Signalling. 9: 55~74, 1994.
- 8) Von Stein, O.D., Thies, W.G. and Hofmann, M.: A high throughput screening for rarely transcribed differentially expressed genes. Nucleic Acids Res. 25: 2598~2602, 1997.
- 9) Lopez, C.A., Hoyer, J.R., Wilson, P.D. and Waterhouse, P. et al: Heterogeneity of osteopontin expression among nephrons in mouse kidneys and enhanced expression in sclerotic glomeruli. Laboratory Investigation. 69: 355~363, 1993.
- 10) Giachelli, C.M., Pichler, R., Lombardi, D. and Denhardt, D.T. et al: Osteopontin expression in angiotensin II-induced tubulointerstitial nephritis. Kidney International. 45: 515~524, 1994.
- 11) Eddy, A.A. and Giachelli, C.M.: Renal expression of genes that promote interstitial inflammation and fibrosis in rats with protein-overload proteinuria. Kidney International. 47: 1546~1557, 1995.
- 12) Madsen, K.M., Zhang, L., Abu Shammat, A.R. and Siegfried, S. et al: Ultrastructural localization of osteopontin in the kidney: induction by lipopolysaccharide. Journal of the American Society of Nephrology. 8: 1043~1053, 1997.

司会 ありがとうございます。質問はございますか。

追手 二つありますが、1つは、PKC セオリーが最近糖尿病性腎症でかなり注目されていますが、STZのモデルで、今、インヒビターは手にはいるのですが、実際に吉川先生が使われている程度に in vivo で効くのか、in vitro で効くのはわかりますが。

成田 私は実際にやったことがないので何ともいえませんが、先生はどうお考えですか。

追手 僕もやったことないで。もうひとつ、OX7とネフレクトミーをかねたものなのですが、最初の蛋白尿は、ネフレクトミーをした群とシャムをやった群とほとんど同じですが、一ヶ月くらい経つとぐっと変わってきます。僕は、清水先生のモデルも同じなのですが、あそこでシャムをしているということは二つ腎臓があるのですね。静注している量は同じなのですね。ということはネフレク群の抗体結合量は倍になっているということですね。

成田 おっしゃる通りで、やり直す必要があると思います。先に抗体を静注しておいてネフレクトミーをする方が正しかったと思います。

司会 先生が留学して勉強したユタス大学のボーダー

教授は、TGF $\beta$ の役割を強調していますが、先生が今日発表された実験結果との関係はいかがですか。

成田 実は最初のお話のハイグルコースの実験は一部、ボーダーの研究室で行った実験で、タイムコースのデータを出したときに、ボーダーが渋い顔をしたのを思い出しますが、ボーダーのところでは、TGF $\beta$ が PAI-1 のアップレギュレーションを起こすという仮説がありました。実際に私がやってみますと、ハイグルコースでは PAI-1 が先に動いてきますので、ボーダーと私の間では決着が付いていません。

追手 先生やボーダー先生は TGF $\beta$ の活性と expression の程度を同じ意味としてとらえているのでしょうか。つまり、たくさん expression があったときは活性が高いということですか。

成田 はいそうです。基礎データがあったのですが、メッセージが多いときは活性も高いということです。フリーな TGF $\beta$ とそうでない TGF $\beta$ の比率はどんな状況でもほとんど一定でした。

追手 先生がやったサブトラクションの一月を選んだ理由はなんですか。

成田 正常に戻った時点で、その後に慢性化を決定づける何かが起こるとして、一月を選びました。現在は一週間でのサブトラクションをやり直しています。

司会 ありがとうございます。ここで、基礎的な話題を終わりにして、実際の治療のお話に入りたいと思います。まず、小児の糸球体腎炎について、早川先生にお話をお願いします。

### 3) 糸球体腎炎に関する clinical research の進歩

#### —小児 IgA 腎症の治療に関する最近の傾向—

新潟大学医学部小児科学教室 早川 広史・奥川 敬祥  
冠木 直之・笠原多加幸  
大久保総一郎・内山 聖  
国立療養所新潟病院小児科 富沢 修一

#### Recent Therapy of IgA Nephropathy in Childhood.

Hiroshi HAYAKAWA, Takayoshi OKUGAWA, Naoyuki KABUKI  
Takayuki KASAHARA, Soichiro OKUBO and Makoto UCHIYAMA

*Department of Pediatrics,  
Niigata University School of Medicine*

Shuichi TOMIZAWA

*Department of Pediatrics,  
Niigata National Sanatorium & Hospital*

The most important prognostic factors are early diagnosis and early treatment in child IgA nephropathy. Recently, steroid, anticoagulant drug; heparin, immuno suppressive

---

Reprint requests to: Hiroshi HAYAKAWA, M.D. 別刷請求先: 〒945-8585 柏崎市赤坂町 3-52  
Department of Pediatrics, Niigata National 国立療養所新潟病院小児科 早川 広史  
Sanatorium & Hospital  
3-52, Akasaka-chou, Kasiwazaki-City  
945-8585, Japan.