

3) 血管内皮細胞による周細胞の機能抑制

—— 糸球体をモデルとして ——

新潟大学医学部附属腎研究施設分子病態学分野

追手 巍・斎藤 真子
村上 修一Regulation of Pericyte Function by Vascular Endothelial Cells
— In the Glomerulus as a Representative Microvasculature —

Takashi OITE, Mako SAITO and Shūichi MURAKAMI

*Department of Cell Biology, Institute of Nephrology,
Niigata University School of Medicine*

In the glomerulus, the endocapillary region is a closed space surrounded by the glomerular basement membrane comprised of a capillary lumen, endothelial cells, mesangial cells and mesangial matrix. Here, we will present experimental data showing the significance of communication circuits between vascular endothelial cells and mesangial cells. Finally, we will introduce our working hypothesis that loss of morphological and functional regulation by endothelial cells leads to mesangial cell dysfunction, followed by the pathological changes such as proliferation, enhanced extracellular matrix synthesis or deposition in the endocapillary region.

Key words: mesangial cells, vascular endothelial cells, loss of functional regulation,
glomerular sclerosis

メサンギウム細胞, 血管内皮細胞, 機能制御破綻, 糸球体硬化症

はじめに

糸球体は代表的な微小循環系器官である。ここには“endocapillary”と呼ばれる特異的な閉鎖領域が存在する。この領域は血管腔、内皮細胞、メサンギウム細胞（一種の血管周細胞）、基底膜様基質より構成される。腎機能不全に至る糸球体硬化症は、基質のこの領域への病的沈着としてとらえることができ、原発性糸球体腎炎、糖尿病性腎症において、この糸球体硬化症への過程を阻止することが現在の腎臓病学における最大目標となっている。

私どもは、この endocapillary における細胞—細胞、細胞—細胞外基質間の生理的、物理的相互作用の障害がメサンギウム細胞機能の制御破綻を引き起こし、最終的には糸球体硬化病変形成に至るという作業仮説を最近、提唱した¹⁾。この仮説を証明してゆくためには、糸球体硬化症へ至る解析し易い動物実験モデルと、細胞、分子レベルで検討できる混合培養を含めた細胞培養法、および細胞生物学的手法が必要となってくる。本シンポジウムでは私どものプロジェクトが行っている strategy の一端を紹介したい。

Reprint requests to: Takashi OITE,
Department of Cell Biology,
Institute of Nephrology,
Niigata University School of Medicine,
Asahimachi-dori 1-757,
Niigata City, 951, JAPAN.

別刷請求先: 〒951 新潟市旭町通1-757
新潟大学医学部附属腎研究施設分子病態学分野
追手 巍

材料および方法

糸球体メサンギウム細胞（M細胞）の培養法：ヒト，ラットの腎皮質を細切し，sieving法で単離糸球体採取し，初代培養する²⁾。1カ月ほど経代培養し，ほぼ均一な細胞集団（位相差所見，平滑筋アクチンの存在）となった細胞をM細胞とした。

血管内皮細胞（E細胞）の培養法：臍帯静脈内皮細胞の培養法は既報のごとく行った³⁾。ラットの血管内皮細胞の培養法は最近私どもが開発した方法⁴⁾によった。

M，E細胞の混合培養法：ヒト，およびラットの双方の系とも既報のごとく，両者の細胞接着の有無の影響を検討できる培養法³⁾を用いた。

Thy-1.1 cDNA transfectionによる反応エピトープの検討：全長，約1.5KbのマウスThy-1.1 cDNAをリン酸カルシウム法を用いてCOS細胞にtransfectしThy-1.1分子を発現させた⁵⁾。

発現された蛋白分子の蛋白学的，免疫組織学的検討：培養M細胞上のThy-1.1はRIPA bufferで可溶化し，western blot法で検索した⁵⁾。M細胞，COS細胞上の蛋白分子の発現は蛍光抗体法，共焦点レーザー顕微鏡，一部は超高圧電子顕微鏡（岡崎，国立生理研）を用いて検索した⁵⁾⁶⁾。

細胞内イノシトール・リン脂質およびCa⁺⁺イオンの測定：培養M細胞に各種の単クローン抗体（抗Thy-1.1抗体を含めた）を培養系に添加し，経時的に測定した⁷⁾。

結 果

(1) 血管内皮細胞と混合培養した時のメサンギウム細胞の増殖能について検索した。両者の細胞を接触した状態で培養すると，M細胞の増殖は培養後3日目まで優位に抑制されていた。この抑制現象はE細胞特異的で，繊維芽細胞では認められず，E細胞とも接触のない状態では認められない。この抑制現象の一部にはTGF-betaが関与していた⁴⁾。

(2) 培養ラットM細胞上には，in vivoと同様にThy-1.1抗原が存在する⁵⁾。Thy-1.1抗原に対する2種類の単クローン抗体，OX-7と1-22-3抗体を用いて，関連抗原の局在を検索した。蛍光抗体法では両抗体ともM細胞の表面に顆粒状に染色された。OX-7は細胞表面のみならず細胞外物質とも反応していた⁵⁾。

(3) E細胞と接触した状態でM細胞を混合培養し，Thy-1.1抗原の局在を検討した。OX-7はM細胞単独

regulation by ECM and/or EC

(+) ----- stable,
(like physiological state in vivo)

(-) ----- stimulated,
(like pathological state in vivo)

図1 Mesangial Cell Behavior in vitro

で培養した時と同様の局在を示したが，1-22-3はE細胞との接触面に強く染色された。このことは免疫染色標本を共焦点レーザー顕微鏡，および超高圧電子顕微鏡で観察し，確認された⁵⁾。

(4) M細胞Thy-1.1分子の一部が内皮細胞との接着分子として存在しうることが判明した。次にこの分子の機能を知る目的で，反応エピトープの異なることが予想される上述，2種類の単クローン抗体と反応後のM細胞の細胞内情報伝達機構を検討してみた。OX-7に比べて，1-22-3抗体との反応後のほうがOX-7の場合より，細胞内イノシトール3リン酸および細胞内Ca⁺⁺は明らかに上昇していた⁷⁾。

(5) 1-22-3，OX-7のThy-1.1対応エピトープの検索はCOS細胞発現系で現在検討中である⁵⁾。

考 察

癌細胞の増殖，炎症破壊巣の修復，器官発生の際，新生あるいは再生される血管が重要な役割を演じていることは以前より想定されていた。しかしその細胞・分子レベルでの解析はいまだ端緒についたばかりといえる。私どもも微小循環系の代表である糸球体において，不可逆的に進行する硬化病変形成過程に血管（内皮細胞）の役割に注目し，図1の作業仮説をたて仕事を進めている¹⁾。

本研究に用いたThy-1.1特異エピトープに対する単クローン抗体，1-22-3をラットに2回投与ないし片腎摘出後1回投与すると，メサンギウム溶解を経て進行性糸球体硬化病変が高率に形成されることも明らかとなっている⁸⁾⁹⁾。ごく最近になり腎摘モデルで血管内皮細胞障害が硬化病変形成に先行することが確認された¹⁰⁾。またM細胞が平面培養系に移されると，増殖性腎炎時のメサンギウム細胞と同様に平滑筋アクチンを発現してすることも報告されている¹¹⁾。このことは私どもの作業仮説，すなわち血管内皮細胞によるメサンギウム細胞制御機構破綻が糸球体硬化症に至るという考え方を支持するものである。このような考え方は他の微小循環系，例えば眼球網膜，air-blood，air-brain障壁，胎盤におけ

る増殖，硬化病変形成を理解する上でも役に立つものと思われる。しかし，血管周細胞の本来もっている異常な（？）機能が血管内皮細胞により制御されているという魅力的な仮説も，実証されるにはまだまだ長い道のりを歩む必要がある¹²⁾。

引用文献

- 1) Oite, T., Saito, M. and Morioka, T.: Modulation of mesangial cell behavior by communication circuits between extrinsic and intrinsic cells or cells and matrices. In "Recent Advances in Molecular Nephrology", edited by Arakawa, M., Nakagawa, Y., Kohkodo, Niigata, pp 98~112, 1995.
- 2) Morita, T., Oite, T., Kihara, I., Yamamoto, T., Hara, M., Naka, A. and Ono, S.: Culture of isolated glomeruli from normal and nephritic rabbits. I Characterization of outgrowing cells. *Acta Pathol. Jpn.*, **30**: 917~926, 1980.
- 3) Saeki, T., Morioka, T., Arakawa, M., Shimizu, F. and Oite, T.: Modulation of mesangial cell proliferation by endothelial cells in coculture. *Am. J. Pathol.*, **139**: 949~957, 1991.
- 4) Oite, T., Suzuki, Y., Morioka, T., Saito, M. and Shimizu, F.: Efficient isolation of rat aortic endothelial cells by elimination of contaminating cells with a monoclonal antibody. *Microvasc. Res.*, **50**: 113~118, 1995.
- 5) Oite, T., Saito, M., Suzuki, Y., Arai, T., Morioka, T. and Shimizu, F.: A specific Thy-1 molecular epitope expressed on rat mesangial cells. *Exp. Nephrol.*, in press, 1996.
- 6) 追手 巍，森岡哲夫，有井達夫：糸球体における内皮細胞とメサングウム細胞の接着様式。生理学研究年報，**16**: 297~298, 1995.
- 7) Narisawa-Saito, M., Kimura, S., Fujiwara, N., Oite, T., Shimoji, K. and Shimizu, F.: Thy-1-mediated phosphatidylinositol turnover in cultured rat glomerular mesangial cell. *J. Cell. Physiol.*, in press, 1996.
- 8) Kawachi, H., Iwanaga, T., Toyabe, S., Oite, T. and Shimizu, F.: Mesangial sclerotic change with persistent proteinuria in rats after two consecutive injections of monoclonal antibody 1-22-3. *Clin. exp. Immunol.*, **90**: 129~134, 1992.
- 9) Cheng, Q.L., Orikasa, M., Morioka, T., Kawachi, H., Chen, X.M., Oite, T. and Shimizu, F.: Progressive renal lesions induced by administration of monoclonal antibody 1-22-3 to unilaterally nephrectomized rats. *Clin. exp. Immunol.*, **102**: 181~185, 1995.
- 10) Lee, L.K., Meyer, T.W., Pollock, A.S. and Lovett, D.H.: Endothelial cell injury initiates glomerular sclerosis in the rat remnant kidney. *J. Clin. Invest.*, **96**: 953~964, 1995.
- 11) Floege, J., Redeker, H.R. and Johnson, R.J.: Glomerular cells in vitro versus the glomerulus in vivo. *Kid. Int.*, **45**: 360~368, 1994.
- 12) 追手 巍：糸球体細胞機能—内皮細胞，腎と高血圧（猿田享男，塩之入洋編），腎と透析，臨時増刊号（39巻）pp 29~34，中外医学社。

司会（岡田） 大変ありがとうございました。

では，内藤先生お願いします。

司会（内藤） では，後半の進行をさせていただきます。腎研病理の藤中先生には，「実験腎炎における白血球集積機序—CD8 陽性のリンパ球による糸球体内皮細胞の ICAM-1 発現促進—」についてご発表をお願いします。どうぞ。