

ラット糖尿病性腎症モデルにおけるマトリックスメ タロプロテアーゼ-2および型マトリックスメタロプロ テアーゼ-1の発現

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9466

ラット糖尿病性腎症モデルにおけるマトリックスメタロプロテアーゼ-2および膜型マトリックスメタロプロテアーゼ-1の発現

金沢大学医学部医学科内科学第一講座 (主任: 小林健一教授)

清水 美 保

糖尿病性腎症の糸球体硬化の進展過程, ならびに血管内皮細胞の障害におけるマトリックスメタロプロテアーゼ (matrix metalloproteinases, MMP) の関与を明らかにする目的で, 自然発症インスリン非依存型糖尿病モデルラットである Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) ラットを用いて MMP-2 の発現, 活性化と, その活性化酵素である膜型マトリックスメタロプロテアーゼ-1 (membrane-type 1 MMP, MT1-MMP) の発現を検討した。OLETF ラットおよび対照ラットである Long-Evans Tokushima Otsuka (LETO) ラットに 30mg/kg のモノクロタリン (monocrotaline, MCT) を 36 週齢より 4 週毎に 3 回投与した群 (MCT 群) と, 同量の生理食塩水のみを投与した群 (生食群) の計 4 群を作製し 50 週齢まで観察した。OLETF 生食群の尿アルブミン排泄量は, 36 週, 46 週, 50 週のいずれの週齢においても LETO 生食群に比し有意に増加していた。組織学的に OLETF 生食群の糸球体硬化スコアは, 40 週齢, 50 週齢とも LETO 生食群に比し有意に増加していた。MCT 群において糸球体硬化スコアは, LETO ラットでは差を認めなかったが, OLETF ラットでは経時的に有意な増加を示し, 50 週齢では OLETF 生食群と比較しても有意に増加していた。加えて OLETF・MCT 群では, メサンギウム融解と糸球体係蹄内皮細胞の腫大を認め, 一部の糸球体には結節類似病変を認めた。免疫組織化学的検討では, OLETF ラットの MMP-2 および MT1-MMP 蛋白はメサンギウム基質増生部のメサンギウム細胞を中心に発現しており, メサンギウム基質の増生が高度の糸球体でより強い発現を認めた。また, OLETF・MCT 群においては, 係蹄上皮細胞にも MMP-2, MT1-MMP の発現を認めた。ゼラチンを基質としたザイモグラムの検討では, 糸球体培養上清中に 68kDa, 72kDa に加え活性型 MMP-2 である 62kDa のバンドを認め, 50 週齢におけるその酵素活性は, LETO 生食群と比べて, LETO・MCT 群で 2.3 倍, OLETF 生食群で 4.8 倍, OLETF・MCT 群で 5.5 倍に亢進していた。さらに組織内酵素活性検出法では, 50 週齢の OLETF・MCT 群でメサンギウム領域に MMP 活性を認めた。糸球体より抽出した全 RNA を用いた逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応 (reverse transcription-PCR, RT-PCR) 法による MMP-2, MT1-MMP, MMP 阻害因子 (tissue inhibitor of MMP, TIMP)-2 およびファイブロネクチン遺伝子発現の検討では, 50 週齢の LETO・MCT 群, OLETF 生食群, OLETF・MCT 群で, LETO 生食群に比し MMP-2 はそれぞれ 15.8 倍, 2.8 倍, 18.1 倍, MT1-MMP は 1.9 倍, 1.1 倍, 2.8 倍で発現していた。また TIMP-2 はそれぞれ 1.4 倍, 1.1 倍, 2.2 倍, ファイブロネクチンは 2.2 倍, 2.2 倍, 3.0 倍で発現していた。以上の結果より, MMP-2, MT1-MMP は糖尿病性腎症の糸球体硬化の進展過程ならびに血管内皮細胞の障害時に糸球体において産生および活性化されていることが示され, MMP, TIMP と糸球体 ECM 成分の発現の変化が, 糖尿病性腎症の糸球体 ECM の修復過程において重要な役割を演じていることが示唆された。

Key words diabetic nephropathy, glomerulosclerosis, matrix metalloproteinase-2, membrane-type 1 matrix metalloproteinase, nodular lesion

糸球体基底膜 (glomerular basement membrane, GBM) およびメサンギウム基質から成る糸球体細胞外基質 (extracellular matrix, ECM) は糸球体の構築ならびに選択的透過性などの機能の維持の他に, インテグリン等を介する細胞との接着にもとづく細胞内シグナル伝達物質の活性化や増殖因子を局所に貯蔵することによって, 細胞の増殖, 分化や発生, 形態形成などの制御にも重要な役割を果たしていることが推測されている¹⁾²⁾。

正常状態では ECM はその産生と分解のバランスが厳密に制御されているが, このバランスに破綻が生ずることにより, GBM の破壊やメサンギウム融解といった ECM の破壊性病変が起り, 一方では慢性腎障害に伴い ECM が蓄積し糸球体硬化および間質線維化に至ると考えられている¹⁾²⁾。

糖尿病性腎症は組織学的に糸球体 GBM の肥厚とメサンギウム基質の増加を特徴とし, これらの ECM は腎症の進展とともに

平成 11 年 11 月 24 日受付, 平成 12 年 1 月 18 日受理

Abbreviations : AGE, advanced glycation endproducts; ECM, extracellular matrix; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GBM, glomerular basement membrane; IGF, insulin-like growth factor; MMP, matrix metalloproteinase; MT-MMP, membrane-type matrix metalloproteinase; MCT, monocrotaline; NIDDM, non-insulin-

に増加するのみならず、その構成成分が変化することが知られている³⁾。糖尿病性腎症の進展機序には、アンジオテンシンⅡ、エンドセリン-1、プロスタグランジン、キニン、心房性ナトリウム利尿ペプチド、一酸化窒素などの血管作動性物質による糸球体高血圧ならびに過剰濾過を伴った血行動態異常；高血糖による終末糖化産物 (advanced glycation endproducts, AGE)、ポリオール代謝経路、プロテインキナーゼCなどの代謝性の異常；および高血糖による形質変換成長因子 (transforming growth factor, TGF)- β 、血小板由来成長因子 (platelet-derived growth factor, PDGF)、インスリン様成長因子 (insulin-like growth factor, IGF)-1などのサイトカイン産生異常などが関与している⁴⁾⁵⁾。これらの異常はメサングウム細胞の増殖と形質変化を誘導し、ECM産生を亢進することにより、びまん性硬化を形成すると考えられている。一方、結節性硬化は、過ヨウ素酸メセナミン銀染色 (periodic acid silver methenamine, PAM) 濃染性で不規則な網状構造を示し、おもにⅣ型膠原線維の増生により形成されるⅠ型結節と、PAM淡染性の類同心円層状構造を示し、主としてⅥ型膠原線維の増生により形成されるⅡ型結節の2型が存在する。Ⅰ型結節はびまん性病変が糸球体末梢部で増生することにより形成され、Ⅱ型結節はメサングウム融解により嚢状に拡大した糸球体の再構築過程で形成されることが臨床例の解析により指摘されているが、その分子機構は十分には解明されていない^{6)~9)}。ところで、Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) ラットは、自然発症インスリン非依存型糖尿病 (non-insulin-dependent diabetes mellitus, NIDDM) のモデル動物で、肥満、高インスリン血症を伴い、遅発性の高血糖を生じるヒトNIDDMと極めて近い病態を示す¹⁰⁾。加えて、その腎組織病変と糸球体ECM成分の変化はヒト糖尿病性腎症に認められる変化と類似しており、糖尿病性腎症におけるECM代謝を検討するうえで有用なモデルと考えられている¹¹⁾¹²⁾。

かかるECM代謝において注目されているマトリックスメタロプロテアーゼ (matrix metalloproteinase, MMP)-2は主としてメサングウム細胞から分泌され、糸球体ECMの主要成分であるⅣ型膠原線維、ラミニン、ファイブロネクチン等の分解に中心的な役割を果たしている¹³⁾。MMP-2は他のMMPと同様に酵素活性を持たない潜在型MMPとして産生され、その活性はMMP阻害因子 (tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP) によって阻害される¹⁴⁾。MMP-2は他の潜在型MMPとは異なる特殊な活性化機構を有しており、セリンプロテアーゼでは活性化されず、膜型マトリックスメタロプロテアーゼ (membrane type-MMP, MT-MMP) により活性化されることが知られている¹⁵⁾。現在まで5種類のMT-MMP (MT1, 2, 3, 4, 5-MMP) が同定されており、MT4-MMP以外はMMP-2活性化能を有することが知られている¹⁶⁾。特にMT1-MMPは細胞膜表面での活性化機構が明らかにされているが¹⁷⁾、糸球体ECM代謝における役割は未だ不明である。

そこで本研究では、糖尿病性腎症のびまん性糸球体硬化と結節性病変の形成におけるMMP-2とMT1-MMPの役割を解明する目的で、血管内皮細胞障害作用を有することが知られているモノクロタリン (monocrotaline, MCT)¹⁸⁾をOLETFラットに投

与してメサングウム融解を惹起することにより結節性病変の作製を試み、その過程におけるMMP-2の発現、活性化とMT1-MMPの発現を検討した。

対象および方法

I. 実験プロトコール

36週齢の雄性OLETFラットと、対照として週齢の一致したLong-Evans Tokushima Otsuka (LETO) ラットを用いた (大塚製薬 (株) 徳島研究所より供与)。MCT (Sigma, St. Louis, USA) を1N HCl, 1N NaOHおよび蒸留水を用いて2%溶液に調整し¹⁸⁾、30mg/kgをLETOおよびOLETFの肩甲間部に36週齢より4週毎に3回皮下注射した群 (以下、MCT群) と、同量の生理食塩水のみを3回投与した群 (以下、生食群) の計4群 (OLETF・MCT群, OLETF生食群, LETO・MCT群, LETO生食群) を作製した。同様の実験を2回行い、各群18匹、8匹、11匹、10匹とし、OLETF・MCT群は40, 44, 46および50週齢、OLETF生食群, LETO・MCT群, LETO生食群は40および50週齢にジエチルエーテル吸入麻酔下に、生理食塩水50ml およびRPMI 1640 (Gibco, New York, USA) 10ml で腎を灌流したのち摘出し、組織学的検査および糸球体精製に供した。

II. 尿アルブミンの測定

36, 46および50週齢に代謝ゲージにて24時間蓄尿した尿の一部を用いて200×g, 5分間、室温で遠心し細胞成分を除去した後、上清を-40℃で測定まで保存した。測定はELISA法 (Nephra, Exocell, Inc., Philadelphia, USA) にて行い、一日尿アルブミン排泄量として表した。

III. 病理学的検査

1. 光学顕微鏡的観察

腎組織を10%リン酸緩衝ホルマリン (pH7.2) にて固定後、4 μ m のパラフィン切片を作製し、過ヨウ素酸シッフ染色 (periodic acid Schiff, PAS), PAMの各染色を施行した。光顕観察において、PAS陽性物質によるメサングウム領域の拡大を糸球体硬化と定義し、糸球体硬化の程度を半定量化した。すなわち糸球体にほとんど変化が認められないもの、糸球体の一部にPAS陽性域の拡大が認められるもの、糸球体全般にPAS陽性域の拡大が認められるもの、PAS陽性域が拡大して糸球体末梢部に達し血管腔の狭小化を伴うもの、硬化および硝子化糸球体、をそれぞれ0, 1, 2, 3, 4度とスコア化し、20個以上の糸球体を観察の上、同一スコアの糸球体数をそれぞれN0, N1, N2, N3, N4とし、以下の計算式にて各群の糸球体硬化スコアを得た⁸⁾。糸球体硬化スコア = $[(0 \times N0 + 1 \times N1 + 2 \times N2 + 3 \times N3 + 4 \times N4) / (N0 + N1 + N2 + N3 + N4)] \times 100$

2. 免疫組織染色

腎組織の一部をドライアイス・アセトンで冷却したn-ヘキサンにより凍結後、クリオスタットTissue-Tekシステム (Miles, Naperville, USA) により6 μ m に薄切した。ウェスタンブロットにてラットMMP-2およびMT1-MMPに対する交差反応性が確認されている抗ヒトMMP-2マウスモノクローナル抗体 (42-5D11, 富士薬品工業, 高岡) および抗ヒトMT1-MMPマウスモ

dependent diabetes mellitus; PAM, periodic acid silver methenamine; PAS, periodic acid Schiff; PDGF, platelet-derived growth factor; RT-PCR, reverse transcription-PCR; TIMP, tissue inhibitor of metalloproteinase; TGF, transforming growth factor

ノクローナル抗体 (113-5B7, 富士薬品工業) を用いた間接アビチン-ビオチンアルカリフォスファターゼ法 (Vectastain ABC-AP kit, Vector Lab, Burlingame, USA) による免疫組織染色にて, MMP-2, MT1-MMP の腎組織における発現を検討した。なお, 内因性アルカリフォスファターゼ活性はレバミゾール添加により阻害した。

3. 電子顕微鏡的観察

腎組織の一部を 2.5% グルタルアルデヒドにて前固定し, 4% オスミウム酸にて後固定した後, エポック 812 (応研商事, 東京) に包埋し薄切した。酢酸ウラニール, クエン酸鉛により二重染色した後, 電子顕微鏡 (日立 H600 型, 東京) で観察した。

IV. 摘出腎からの糸球体精製および培養

摘出腎から腎皮質のみを分離後細片とし, 250, 150, 106 μ m のふるいをを用いたシービング法¹⁹⁾により糸球体を採取した。95% 以上に純化された単離糸球体を, ペニシリン (Gibco) 100U/ml, ストレプトマイシン (Gibco) 100U/ml および 0.2% ラクトアルブミン (Sigma) を含む 2ml の RPMI 1640 無血清培地で培養した。糸球体数は 3×10^4 /ml とし, 24 時間後に培養上清を得た。

V. ザイモグラムならびに組織内酵素活性検出法での MMP 酵素活性の評価

MMP の分子量および産生量はゼラチンの消化活性で示すザイモグラムで評価した。ゼラチン (Sigma) 0.8mg/ml を含む 8% ポリアクリルアミドゲルを用い, 培養上清を非還元状態にて電気泳動を施行した²⁰⁾。泳動後のゲルは, 2.5% のトリトン X-100 を含む Tris-NaCl-Ca (TNC) 緩衝液 1 [50mM Tris-HCl (pH7.4), 0.15M NaCl, 10mM CaCl₂, 1 μ M ZnCl₂, 0.02% NaN₃] で 30 分間, 2 回洗浄した後, TNC 緩衝液 1 で 37°C で 24 時間培養し, ゼラチンを消化させた。ゲルはクマシーブリリアントブルーで染色した後, 脱色し, ゼラチン消化バンドとして表出させ, ザイモグラムとした²¹⁾。各バンドのゼラチン分解能を画像解析用プログラム NIH Image 1.56 を用いて解析し, それぞれの輝度を定量化した。なお, 泳動時の分子量標準試薬は Prestained SDS-PAGE Standards Low Range (Bio-Rad, Richmond, USA) を用いた。

組織内での MMP 酵素活性の検出は Okada ら²²⁾の方法に基づいて行った。酵素基質として, MMP-2 により切断されると青色蛍光を発する合成ペプチド NFF-2 (MOCAc-Arg-Pro-Lys-Pro-Tyr-Ala-Nva-Trp-Met-Lys(Dnp)-NH₂) (ペプチド研究所, 大阪) を用いた²³⁾。上記基質をジメチルスルホキシド (Sigma) に溶解し 1mM とした後, TNC 緩衝液 2 [50mM Tris-HCl (pH7.4), 0.15M NaCl, 10mM CaCl₂, 0.02% NaN₃, 0.05% Brij 35], 2mM アミノフェニル酢酸水銀 (Sigma) を加え, 最終 500 μ M, 全量 20 μ l に

調整した。凍結切片上で, 37°C 48 時間反応させた後, 蛍光顕微鏡 (オリンパス AX-80, 東京) を用いて, U-MWU 帯域フィルターを通して観察した。

VI. 糸球体内 MMP-2, MT1-MMP, TIMP-2, ファイブロネクチン mRNA 発現

1. プライマー

ラット MMP-2, MT1-MMP, TIMP-2, ファイブロネクチンおよびグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase, GAPDH) の各 cDNA 塩基配列より, 表 1 に示すオリゴヌクレオチドプライマーを設計し, 実験に供した。

2. 逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (reverse transcription-PCR, RT-PCR) 法

単離糸球体より全 RNA をグアニジン-フェノール法²⁴⁾によって抽出し, RT-PCR 法にて MMP-2, MT1-MMP, TIMP-2, ファイブロネクチンの遺伝子発現を半定量化した。RT-PCR 法には RNA PCR キット (AMV) Ver.2.1 (宝酒造, 京都) を用いた。まずランダムヘキサマーを上流プライマーとした逆転写酵素反応を行い, cDNA を合成した。すなわち, 1 μ g の総 RNA を鋳型として逆転写酵素にて cDNA を合成し, 次に各 mRNA に特異的なプライマーを用いて, Taq DNA ポリメラーゼにて PCR 反応

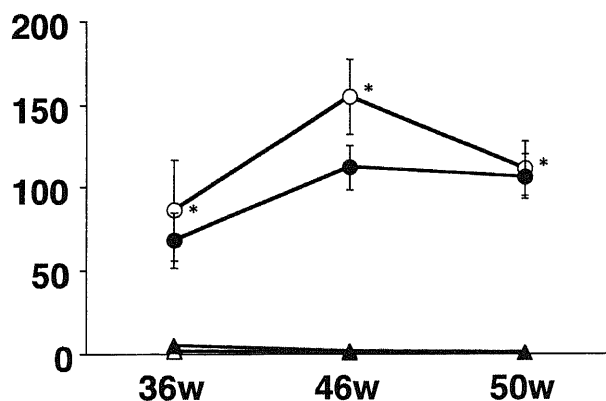


Fig. 1. Urinary albumin excretion. Results from saline-injected LETO rats (Δ), saline-injected LETO rats ($\blacktriangle$), saline-injected OLETF rats ($\circ$), and MCT-injected OLETF rats ($\bullet$) are shown. Urinary albumin excretion significantly increased in saline-injected OLETF rats compared with saline-injected LETO rats, but did not change by the injection of MCT. * $p < 0.01$ vs. saline-injected LETO rats by one-factor ANOVA.

Table 1. Primers used for RT-PCR analysis

Gene	Sense primers	Anti-sense primers	Product size
ラット MMP-2	5'-GTCTTCCCCTTCACTTTCCTG-3'	5'-CGGAAGTTCCTTGGTGTAGGTG-3'	248bp
ラット MT1-MMP	5'-GACTGAGATCAAGGCCAATG-3'	5'-TGTCATTCCCATTTAGATCC-3'	398bp
ラット TIMP-2	5'-CCAAAGCAGTGAGCGAGAAGGA-3'	5'-CAGGAAGGGATGTCAAAGCTGG-3'	206bp
ラット ファイブロネクチン	5'-AGATCAAGGCCAATG-3'	5'-GCTGGATGGAAAGATTACTC-3'	294bp
ラット GAPDH	5'-CAGAACATCATCCCTGCATCC-3'	5'-CACCTGTGCTGTAGCCATA-3'	363bp

を行った。PCR反応は、熱変性を94℃で1分間、アニーリングを55℃で1分間、DNAの伸長を72℃で1分間とし、これを1サイクルとしてMMP-2は40サイクル、MT1-MMPは40サイクル、TIMP-2は35サイクル、ファイブプロネクチンは35サイクルで行った。得られたPCR産物は2%アガロースゲルにて電気泳動し、エチジウムブロマイドにて染色後、塩基対数の確認を行った。さらに各バンドの輝度をNIH Image 1.56を用いて画像解析し、35サイクルで増幅したGAPDHを対照として半定量化した。

Ⅶ. 統計処理

各群間の比較は一元配置分散分析およびクラスカル・ワリ

ス順位検定で行った。危険率 (p) が0.05以下をもって有意差と判定した。なお、数値は平均±標準誤差で示した。

成 績

I. 尿アルブミン排泄量

LETO生食群の尿アルブミン排泄量は、36週齢 1.5 ± 0.5 mg/日、46週齢 1.2 ± 0.1 mg/日、50週齢 1.0 ± 0.3 mg/日であった。OLETF生食群の尿アルブミン排泄量は、36週齢 86.6 ± 30.6 mg/日、46週齢 155.0 ± 22.7 mg/日、50週齢 112.0 ± 16.4 mg/日と、いずれの週齢においてもLETO生食群より有意

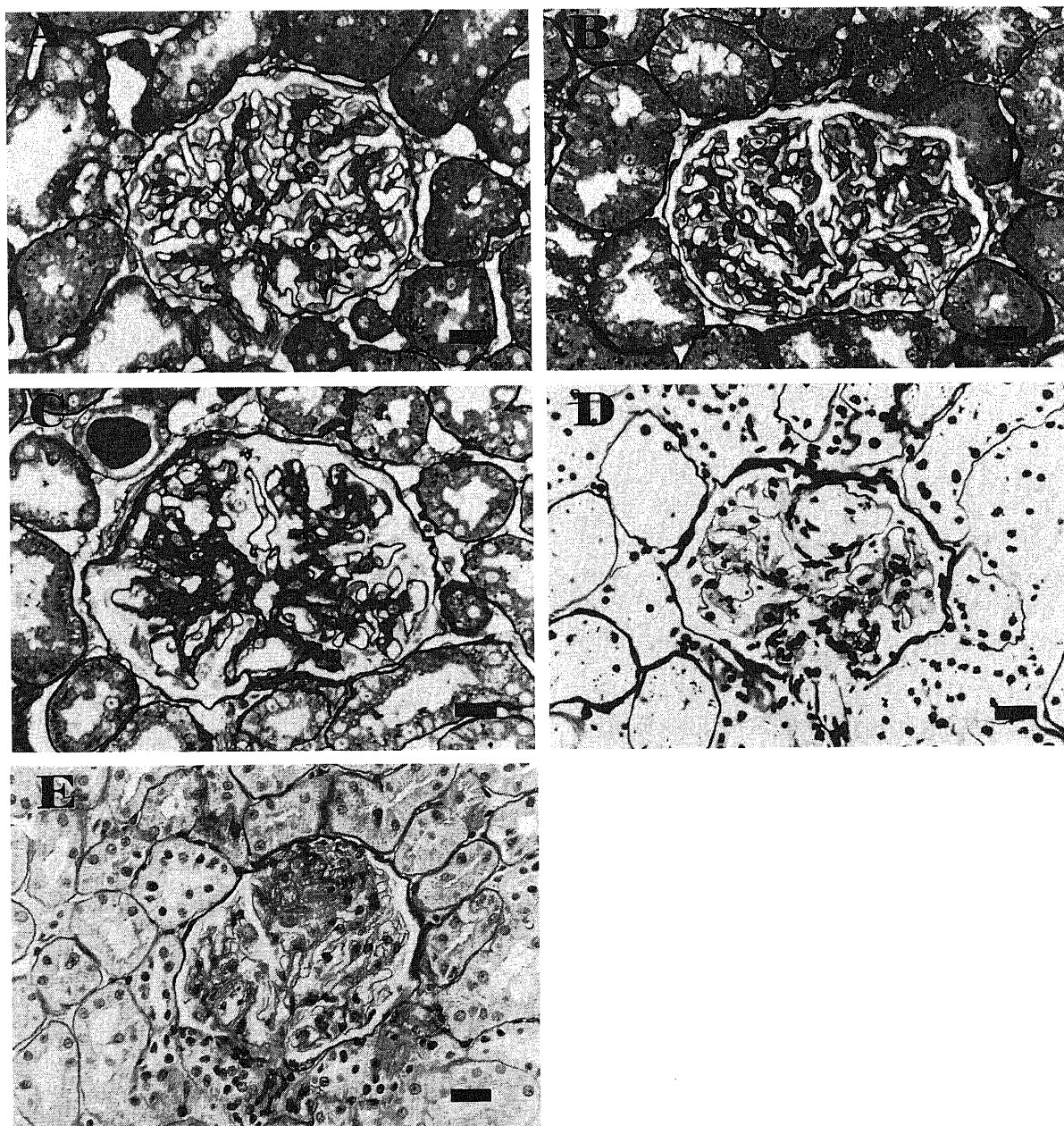


Fig. 2. Light micrographs of the renal tissues. Histopathological examination was performed using renal tissues obtained from a saline-injected LETO rat (A), MCT-injected LETO rat (B), saline-injected OLETF rat (C), and MCT-injected OLETF rat (D, E) at the age of 50 weeks. Mesangial expansion was not seen in LETO rats (A, B). The increase of mesangial expansion was evident in a saline-injected OLETF rat (C). Mesangiolysis (D) and diffuse glomerulosclerosis associated with nodular mesangial expansion (E) resembling human diabetic nodular lesion were seen in a MCT-injected OLETF rat. A, B, C, D, PAM stain; E, PAS stain. Scale bar indicates 20 μ m.

に増加していた (いずれも $p<0.01$)。一方, LETO・MCT群の尿アルブミン排泄量は, 36週齢 $5.1 \pm 1.1\text{mg/日}$, 46週齢 $1.3 \pm 0.2\text{mg/日}$, 50週齢 $0.8 \pm 0.3\text{mg/日}$ であり, LETO生食群との間に差を認めなかった。OLETF・MCT群の尿アルブミン排泄量も, 36週齢 $68.4 \pm 16.4\text{mg/日}$, 46週齢 $112.4 \pm 13.5\text{mg/日}$, 50週齢 $106.8 \pm 13.2\text{mg/日}$ と, いずれの週齢においても OLETF生食群との間に差を認めなかった (図1)。

II. 組織所見

LETOラットでは生食群, MCT群ともに組織学的変化を認めなかった (図2A, 図2B)。一方, 生食群のOLETFラットではメサンギウム基質の拡大が顕著となり (図2C), MCT群のOLETFラットでは, メサンギウム基質の増生に加えて, メサンギウム融解 (図2D)と糸球体係蹄内皮細胞の腫大を認め (図3), 一部の糸球体には結節類似病変を認めた (図2E)。これを糸球体硬化スコアで検討すると, LETO生食群では40週齢 13.3 ± 3.3 , 50週齢 2.9 ± 1.8 であった。OLETF生食群の糸球体硬化スコアは, 40週齢 166.7 ± 23.3 , 50週齢 154.0 ± 28.4 と, いずれの週齢においても LETO生食群より有意に増加していた (いずれも $p<0.01$)。一方, LETO・MCT群の糸球体硬化スコアは, 40週齢 27.5 ± 11.1 , 50週齢 8.6 ± 4.6 であり, LETO生食群との間に差を認めなかったのに対し, OLETF・MCT群の糸球体硬化スコアは, 40週齢 140.0 ± 17.3 , 44週齢 160.0 ± 4.1 , 46週齢 205.0 ± 18.5 , 50週齢 219.3 ± 6.0 と経時的に有意な増加を示し ($p<0.05$), 50週齢ではOLETF生食群と比較しても有意に増加していた ($p<0.01$) (図4)。

III. 免疫組織染色

50週齢の糸球体内でのMMP-2蛋白とMT1-MMP蛋白の発現

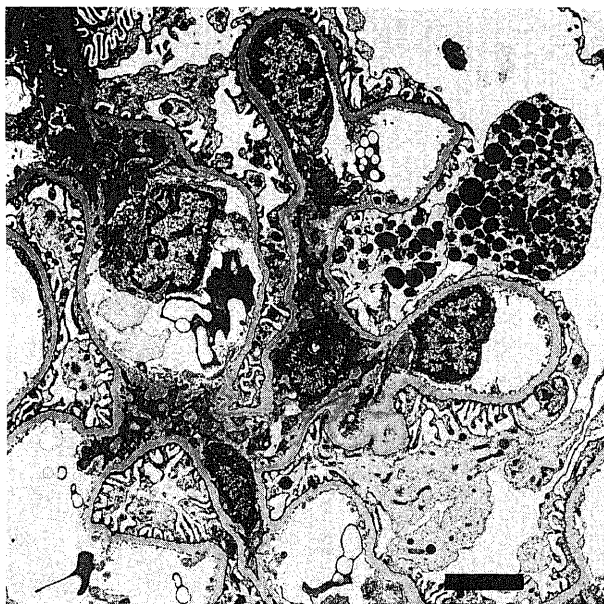


Fig. 3. Representative electron micrograph of the glomeruli. Electron micrographical analysis was performed on the glomeruli from a MCT-injected OLETF rat at the age of 50 weeks. Scale bar indicates $0.5 \mu\text{m}$.

を免疫組織化学的に評価した。LETO生食群, LETO・MCT群では, メサンギウム領域に軽微なMMP-2, MT1-MMPの発現を認めた。OLETF生食群では, 増生したメサンギウム基質部のメサンギウム細胞を中心にMMP-2, MT1-MMP発現の増加を認め, これらはメサンギウム基質の増生が高度の糸球体により強く発現していた。OLETF・MCT群では, メサンギウム基質増生部位におけるMMP-2, MT1-MMPの発現がさらに増加し, 分節状の硬化性病変を認める糸球体においては分節状硬化部にも発現が認められた。さらにOLETF・MCT群では, メサンギウム領域に加えて係蹄上皮細胞にもMMP-2, MT1-MMPの発現を認めた (図5A, 図5B)。

IV. MMPのザイモグラムならびに組織内酵素活性検出

ザイモグラムを用いたMMPの解析では, LETO生食群の糸球体培養上清において, それぞれ中間型MMP-2, 潜在型MMP-2に相当する68kDa, 72kDaに加えて活性型MMP-2である62kDaの酵素活性を認めた (図6A)。これら62, 68, 72kDaのバンドは, LETO生食群に比しLETO・MCT群でそれぞれ2.3倍, 2.3倍, 3.8倍, OLETF生食群で4.8倍, 2.7倍, 4.6倍, OLETF・MCT群で5.5倍, 3.1倍, 6.3倍の発現を認めた (図6B)。組織内酵素活性検出法では, MMPの酵素活性を, OLETF・MCT群においてメサンギウム領域に認めた (図7)。

V. 糸球体内MMP-2, MT1-MMP, TIMP-2, ファイブロネクチンmRNA発現の検討

RT-PCRによるMMP-2, MT1-MMP, TIMP-2, ファイブロネクチンmRNAの発現を図8Aに示した。各レーンにおけるGAPDHとの比により半定量化すると, LETO生食群に比し, LETO・MCT群, OLETF生食群, OLETF・MCT群では,

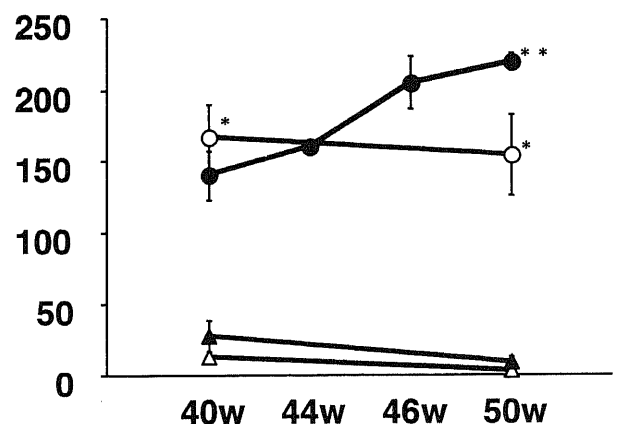


Fig. 4. The glomerular matrix score. Expanded extracellular matrix in mesangial area was semiquantitatively determined in each group of rats as glomerular matrix score. Results from saline-injected LETO rats (Δ), MCT-injected LETO rats ($\blacktriangle$), saline-injected OLETF rats ($\circ$), and MCT-injected OLETF rats ($\bullet$) are shown. Glomerular matrix score significantly increased in saline-injected OLETF rats compared with saline-injected LETO rats. The injection of MCT after the age of 36 weeks markedly increased the glomerular matrix score in OLETF rats compared with saline-injected OLETF rats at the age of 50 weeks. * $p<0.01$ vs. saline-injected LETO rats; ** $p<0.01$ vs. saline-injected OLETF rats by Kruskal-Wallis rank test.

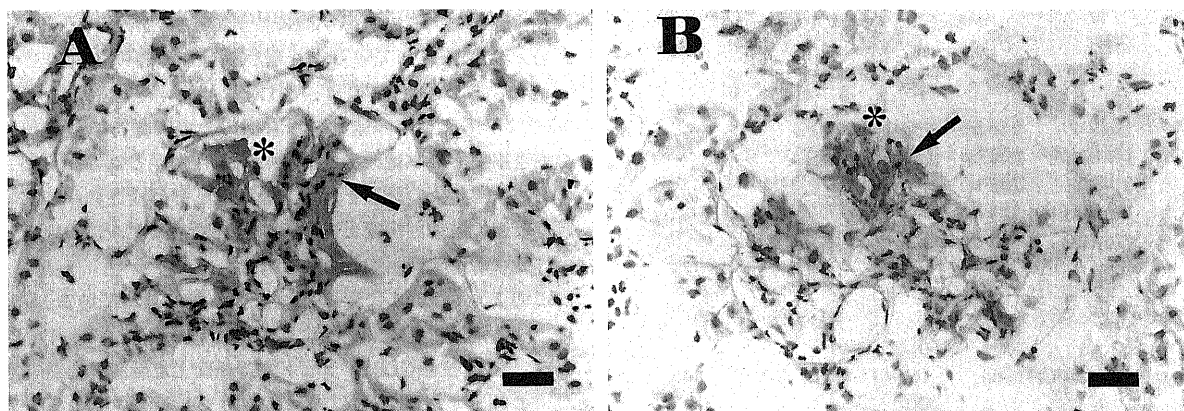


Fig. 5. Immunohistochemical localization of MMP-2 and MT1-MMP protein in a MCT-injected OLETF rat at the age of 50 weeks. Immunohistochemical analyses were performed as described in Material and Methods using anti-MMP-2 (A) and anti-MT1-MMP (B) murine monoclonal antibodies. MMP-2 and MT1-MMP protein were observed in the mesangial cells of the expanded mesangial areas (arrows) and the glomerular visceral epithelial cells (asterisks). Scale bar indicated 20 μ m.

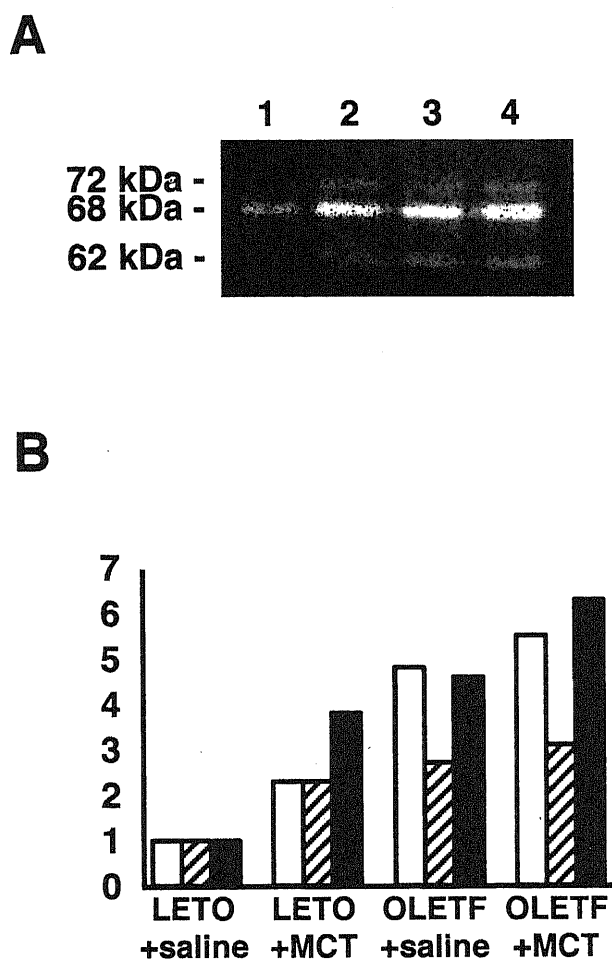


Fig. 6. Gelatinolytic activity of MMP-2. Conditioned media obtained from isolated glomeruli from each group of rats at the age of 50 weeks cultured for 24 hr in serum-free RPMI 1640 was subjected to gelatin zymography. (A) Polyacrylamide gel containing gelatin shown are representative of electrophoresis followed by coomassie brilliant blue staining. Lane 1, conditioned media from saline-injected LETO rats; lane 2, MCT-injected LETO rats; lane 3, saline-injected OLETF rats; and lane 4, MCT-injected OLETF rats. (B) Analysis of gelatinolytic activity of MMP-2. Values are expressed as *n*-fold of increase vs. saline-injected control LETO rats. □, 62 kDa; ▨, 68 kDa; ■, 72 kDa.

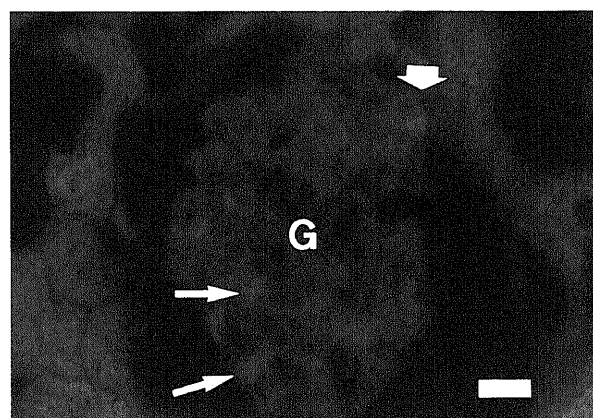
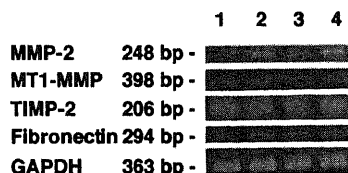


Fig. 7. Enzymatic activities of MMP in the renal tissues. *In situ* detection method of MMP activities was performed on renal tissues obtained from a MCT-injected OLETF rat at the age of 50 weeks. Blue fluorescent deposits (arrows) resulting from cleavage of MOCac-Arg-Pro-Lys-Pro-Tyr-Ala-Nva-Trp-Met-Lys (Dnp)-NH₂ were observed in the mesangial areas. G, Glomerulus. Scale bar indicates 20 μ m.

MMP-2mRNAは、それぞれ15.8倍、2.8倍、18.1倍、MT1-MMPmRNAは、1.9倍、1.1倍、2.8倍の発現を認めた。またTIMP-2mRNAは、それぞれ1.4倍、1.1倍、2.2倍、フィブロネクチンmRNAは、2.2倍、2.2倍、3.0倍で発現していた(図8B)。

A



B

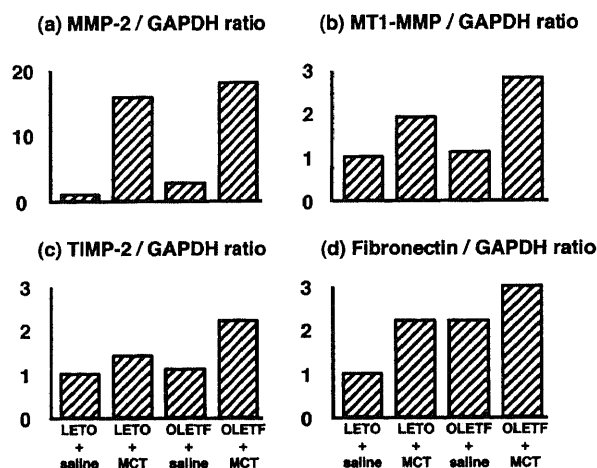


Fig. 8. Gene expression of MMP-2, MT1-MMP, TIMP-2, fibronectin, and GAPDH analyzed by semiquantitative RT-PCR. Total RNA fractions were extracted from isolated glomeruli in each group of rats at the age of 50 weeks. (A) Agarose gels shown are representative of electrophoresis followed by ethidium bromide staining. Lane 1, saline-injected LETO rats; lane 2, MCT-injected LETO rats; lane 3, saline-injected OLETF rats; and lane 4, MCT-injected OLETF rats. Expected size of RT-PCR products is 248 base pairs for rat MMP-2, 398 base pairs for rat MT1-MMP, 206 base pairs for rat TIMP-2, 294 base pairs for rat fibronectin, and 363 base pairs for rat GAPDH. (B) Quantitation of MMP-2, MT1-MMP, TIMP-2, and fibronectin mRNA levels. The bands are quantified corrected with GAPDH expression. Values are expressed as *n*-fold of increase vs. saline-injected control LETO rats. (a) MMP-2; (b) MT1-MMP; (c) TIMP-2; (d) fibronectin.

考 察

今回の検討ではOLETFラットにMCTを投与して血管内皮細胞障害を惹起することにより、メサンギウム融解ならびに結節性病変を作製する試みを行った。その結果、MCT投与OLETFラットにはびまん性糸球体硬化に加えて、メサンギウム融解を伴うヒト糖尿病性腎症のII型結節に類似した病変が認められた。ところで、Sprague-Dawleyラットに60mg/kgのMCTを1回注射することにより作製されるMCT腎症では、メサンギウム融解の後、障害部の修復と糸球体の再構築が生じ、結節性硬化という経過はとらないことが吉田ら¹⁸⁾により報告されている。したがって、今回OLETFラットにみられた結節類似病変は、メサンギウム融解後の修復過程において糖尿病状態が加わることで異なる形態をとったことが推測された。但し、今回作

製した結節性病変は組織学的にヒト糖尿病性腎症にみられるII型結節⁸⁾⁹⁾に類似しているが、層状構造が不鮮明であり必ずしも同一ではない。同様に、SHR/N-cpラット、KKマウス、NZOマウスなど他の糖尿病性腎症のモデル動物に認められる結節性病変もヒト糖尿病性腎症の結節性病変とは異なるとされており²⁵⁾、年余の経過を経て、繰り返して形成されるヒト糖尿病性腎症の結節性病変と同一の病変を動物モデルにおいて短期に作製することは困難と考えられた。

このようなECM代謝に関与すると考えられているMMP-2は、今回免疫染色により増生したメサンギウム領域を中心に局在し、MCT投与OLETFラットでは係蹄上皮細胞にも認められた。これまでLenzら²⁶⁾は培養実験で主としてメサンギウム細胞がMMP-2を産生しているが、糸球体上皮細胞、内皮細胞にもMMP-2の産生が認められることを報告しており、Suzukiら²⁷⁾はヒト糖尿病性腎症の組織内ハイブリダイゼーションで、メサンギウム細胞、糸球体上皮細胞、糸球体内皮細胞、ボウマン囊上皮細胞のMMP-2発現を報告している。よって今回の成績もこれらの報告に一致するものと考えられる。

さらに今回の検討により、OLETFラットでは糸球体硬化性病変の増加に伴ってMMP-2の遺伝子発現と、ザイモグラムで示される酵素活性が亢進しており、MCTの投与によってこれらはさらに亢進することが判明した。これまでの高糖濃度下での培養メサンギウム細胞のMMP-2産生と酵素活性に関する検討では、亢進²⁸⁾、抑制²⁹⁾あるいは不変³⁰⁾と、糖濃度や培養期間により成績が異なるが、これは高糖状態のみでは必ずしもMMP-2の発現が刺激されないことを示している。これまで糖尿病性腎症の進展にはTGF- β ³¹⁾、PDGF³²⁾、IGF-1³³⁾、上皮成長因子(epidermal growth factor)³⁴⁾など種々のサイトカイン、増殖因子が関与することが知られている。これらの因子によるMMP-2誘導の可能性に関して、MMP-2はTGF- β によって発現が誘導されることが知られている³⁵⁾。TGF- β は糖尿病性腎症の進展に中心的な役割を果たしており、今回検討したOLETFラット¹¹⁾の他、ストレプトゾトシン誘発糖尿病ラット³⁶⁾、糖尿病BBラット³⁷⁾、NODマウス³⁷⁾などのモデル動物の腎皮質や単離糸球体ではTGF- β の発現が糖尿病発症初期から増強していることが報告されている。ヒト糖尿病性腎症でもTGF- β が過剰に発現、産生されていることが報告されており³⁸⁾、このようなTGF- β の高発現がMMP-2の発現刺激となった可能性が推測される。さらに、MMP-2の発現は細胞基質間接着や細胞間接着によっても影響を受けることが報告されている³⁹⁾。これまでの糖尿病動物モデルにおけるMMP-2の検討では、Reckelhoffら⁴⁰⁾が8週齢のストレプトゾトシン誘発糖尿病ラットの単離糸球体でMMP-2の酵素活性が低下していることを報告しているが、短期の観察のためメサンギウム基質の増加はみられていない。一方、今回の検討では、糸球体硬化性病変の増加に伴ってMMP-2の発現が亢進しており、免疫染色でもECMの増生部位を中心にMMP-2の局在を認めたことより、増加したECMがMMP-2の発現を誘導した可能性も推測される。このMMP-2発現の意義については、抗Thy1.1腎炎の慢性期のモデルでは硬化糸球体の修復過程においてMMP-2の発現が刺激されていることが報告されており⁴¹⁾、MMP-2が糖尿病性腎症の糸球体硬化の過程で、増生したECMの分解に関与していることが示唆された。

ところで、Lovettら⁴²⁾は抗Thy1.1腎炎の免疫電顕観察で

MMP-2 がメサンギウム融解と GBM の断裂部に存在することも示しており、糖尿病性腎症の II 型結節がメサンギウム融解を介して形成される過程では、局所的に発現した MMP-2 がメサンギウムの脆弱化に関与している可能性も考えられる。しかし、免疫染色ではプロペプチド領域を認識する抗体を用いているため、潜在型 MMP-2 と活性型 MMP-2 の両者を検出している。加えて生体における MMP の活性発現は産生、潜在型 MMP の活性化、TIMP などのインヒビターによる活性型 MMP の阻害の 3 段階で調節されている。したがって、生体内での MMP の機能の解析には、活性型酵素と内因性阻害因子のバランスによって決まる組織局所の MMP 活性を直接観察できる組織内酵素活性検出法²²⁾⁴³⁾により、組織上での MMP の酵素活性の局在を確認することが必要と考えられ、今回合成基質を用いて検討した。これにより MCT 投与 OLETF ラットのメサンギウム領域において MMP の酵素活性を確認した。

この MMP-2 の活性化に関して、MT1-MMP の発現を検討したが、免疫染色では MT1-MMP は増生したメサンギウム領域と係蹄上皮細胞に認められ、これらは MMP-2 の局在に一致していた。Kazes ら⁴⁴⁾は培養メサンギウム細胞が MT1-MMP を産生することを報告し、Hayashi ら⁴⁵⁾は抗 Thyl.1 腎炎の組織内ハイブリダイゼーションで MT1-MMP の発現がメサンギウム領域に認められたことを報告している。しかし、現在のところ糸球体上皮細胞が MT1-MMP を産生することは確認されておらず、今後培養実験や組織内ハイブリダイゼーション、免疫電顕観察などでその局在をより明らかにすることが必要と考えられた。今回の OLETF ラットの MT1-MMP の遺伝子発現は対照ラットと同程度であったが、MCT 投与によりその発現は OLETF ラットでより増加を示した。この MT1-MMP の遺伝子ならびに増生したメサンギウム領域での発現増加は、MMP-2 の産生発現と対応し、組織修復へ関与している可能性が示唆された。さらに、糖尿病性腎症では I 型、III 型膠原線維などの間質型膠原線維がメサンギウム領域に増加することが知られている³⁾¹²⁾が、MT1-MMP はそれ自身でこれらの間質型膠原線維の分解能を有しており⁴⁶⁾、糖尿病性腎症の糸球体 ECM 代謝に、MMP-2 活性化を介する他に直接関与している可能性も推測された。

ところで MMP-2 の活性を制御する因子として、これまで述べてきた MMP-2 の産生や潜在型 MMP-2 の活性化に加え、その阻害作用を有する TIMP の関与も重要と考えられる。TIMP は 4 種類の分子種 (TIMP-1, 2, 3, 4) から構成され、いずれも分泌型 MMP と 1 : 1 の複合体を形成してその活性を阻害するが、特に TIMP-2 が MMP-2 活性を強く阻害することが知られている⁴⁷⁾。加えて TIMP-2 は MT1-MMP による潜在型 MMP-2 の活性化を介するが、TIMP-2 の発現が増強すると逆に MT1-MMP の触媒活性を阻害し潜在型 MMP-2 の活性化を二重に阻止する役割も果たすことが最近報告されている⁴⁸⁾。これまで糖尿病性腎症においては、MMP-2/TIMP-2 比の低下を示した報告が多く²⁹⁾⁴⁹⁾、ECM 分解系の抑制が推測されてきた。しかし今回の検討では、MCT 投与に対して OLETF ラットでは LETO ラットを上まわる TIMP-2 の発現増加を認めたものの、その増加の程度は MMP-2 に比して軽度 (MMP-2 18.1 倍、TIMP-2 2.2 倍) であり、組織内酵素活性検出法でも活性型 MMP の局在が確認されたことより、全体として基質の分解へ作用していることが推測された。

今回 ECM の代表として検討したファイブロンクテンの遺伝子発現は、OLETF ラットにおいて増加していた。高糖濃度下

では IV 型膠原線維、ファイブロンクテン、ラミニンなどの産生が遺伝子ならびに蛋白レベルで増加することが報告されている⁵⁰⁾。また Kushiro ら¹²⁾は間接蛍光抗体法による観察で、OLETF ラットのメサンギウム領域には、ファイブロンクテン、III 型、VI 型膠原線維が増加しているが、特に分節状の硬化病変部には著明な VI 型膠原線維の増加が認められることを報告しており、これはヒト糖尿病性腎症の II 型結節⁸⁾⁹⁾との類似性を推測させる。VI 型膠原線維は生体内で腎糸球体や角膜に存在し、角膜では MMP-2 が VI 型膠原線維を分解することが報告されているが⁵¹⁾、糸球体内においてかかる VI 型膠原線維を基質とするプロテアーゼは現在まで発見されておらず、生体内で分解されにくい VI 型膠原線維が増加することが、結節性硬化の形成に関与している可能性が推測される。また、Mott ら⁵²⁾は AGE 化された IV 型膠原線維が MMP-3 や MMP-9 により分解されにくくなることを報告しており、糖尿病性腎症の糸球体硬化には、ECM の産生亢進のみならず AGE などにより修飾された ECM の分解能の低下も関与していると考えられる。

最後に糖尿病性腎症に関する今回の成績ならびにこれまでの報告をまとめると、ECM 分解系に関して多くの報告は、糸球体での MMP の発現低下と TIMP の発現亢進が ECM 分解系を抑制し、糖尿病性腎症における ECM 蓄積の一因となっている可能性を指摘してきた。しかし、今回の検討により試験管内における成績に加えて、糸球体上での MMP 活性が確認されたことから、TIMP による阻害を上まわる MMP 活性の存在が示された。よって糖尿病性腎症においては、このような ECM 分解系を上まわる ECM 産生系の量的ならびに質的变化により、結果として硬化性病変が増加する可能性が示唆された。実際、Fioretto ら⁵³⁾は膵移植により、糖尿病性腎症のびまん性病変と I 型の結節性病変が改善したことを報告しており、その修復過程において MMP-2 および MT1-MMP が重要な役割を果たしていると推測される。

結 論

自然発症インスリン非依存型糖尿病モデルである OLETF ラットの糸球体硬化ならびに血管内皮細胞障害時における糸球体内 MMP-2 および MT1-MMP の発現を検討し、以下の成績を得た。

1. OLETF ラットでは LETO ラットに比し尿アルブミン排泄量の増加を認めた。
2. OLETF ラットではメサンギウム基質の増生が LETO ラットに比し増加しており、MCT 投与によりメサンギウム融解と糸球体係蹄内皮細胞の腫大を認め、一部の糸球体には結節類似病変を認めた。
3. OLETF ラットの MMP-2 および MT1-MMP 蛋白の発現は、メサンギウム基質増生部のメサンギウム細胞を中心に認め、メサンギウム基質の増生が高度の糸球体でその発現が増強していた。さらに、OLETF ラットでは MCT 投与により係蹄上皮細胞にも MMP-2, MT1-MMP の発現を認めた。
4. 糸球体培養上清中には MMP-2 が分泌されており、これはザイモグラムにおいて 62kDa で確認されるように一部は活性化されていた。OLETF ラットにおいてこの活性型 MMP-2 の酵素活性の増加を認め、これは MCT 投与による血管内皮細胞障害が加わることに伴ってさらに増加しており、組織内酵素活性検出法ではメサンギウム領域にその酵素活性を認めた。

5. OLETF ラットにおいては糸球体での MMP-2, MT1-MMP, TIMP-2, およびファイブロネクチンの遺伝子発現がいずれも増加しており, MCT 投与によりこれらはさらに増加したが, なかでも MMP-2 の発現が 18.1 倍とより亢進していた。

以上の結果より, 糖尿病性腎症の糸球体硬化の進展過程ならびに血管内皮細胞の障害時に糸球体において, ECM 増生に一致して MMP-2, MT1-MMP の産生および MMP-2 の活性化が亢進していることが示され, 硬化性病変の修復機序に関与していることが示唆された。

謝 辞

稿を終えるに臨み, 御指導と御校閲を賜りました恩師小林健一教授に深甚なる謝意を捧げるとともに, 終始直接の御指導・御教示を賜りました血液浄化療法部横山仁助教授, 第一内科和田隆志博士, 久田幸正博士に心より感謝致します。さらに本研究に際し, 組織内酵素活性検出法の御指導を賜りました大阪医科大学第二病理学教室岡田仁克助教授, OLETF ラットを供与下さいました大塚製薬 (株) 徳島研究所, ならびに御協力と御援助を戴きました第一内科第三研究室の諸先生方, 研究協力員の皆様に深謝致します。

なお, 本論文の要旨は, 第 31 回米国腎臓学会 (1997 年, San Antonio) および第 42 回日本腎臓学会総会 (1999 年, 横浜) において発表した。

文 献

- 1) Weber M. Basement membrane proteins. *Kidney Int* 41: 620-628, 1992
- 2) Border WA, Okuda S, Nakamura T. Extracellular matrix and glomerular disease. *Semin Nephrol* 9: 307-317, 1989
- 3) Ziyadeh FN. The extracellular matrix in diabetic nephropathy. *Am J Kidney Dis* 22: 736-744, 1993.
- 4) Parving HH. Renoprotection in diabetes: genetic and non-genetic risk factors and treatment. *Diabetologia* 41: 745-759, 1998
- 5) Cooper ME. Pathogenesis, prevention, and treatment of diabetic nephropathy. *Lancet* 352: 213-219, 1998
- 6) Kimmelstiel P, Wilson C. Intracapillary lesions in the glomeruli of the kidney. *Am J Pathol* 12: 83-97, 1936
- 7) Saito Y, Kida H, Takeda S, Yoshimura M, Yokoyama H, Koshino Y, Hattori N. Mesangiolysis in diabetic glomeruli: its role in the formation of nodular lesions. *Kidney Int* 34: 389-396, 1988
- 8) 内藤毅郎. 糖尿病性結節性病変の亜型とその形成機序. 十全医会誌 98: 614-621, 1989
- 9) 池田謙三. 糸球体内層状結節性病変の膠原線維組成, 形成機序および疾患特異性. 十全医会誌 101: 528-535, 1992
- 10) Kawano K, Hirashima T, Mori S, Saitoh Y, Kurosumi Y, Natori T. Spontaneous long-term hyperglycemic rat with diabetic complications. Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) strain. *Diabetes* 41: 1422-1428, 1992
- 11) Fukuzawa Y, Watanabe Y, Inaguma D, Hotta N. Evaluation of glomerular lesion and abnormal urinary findings in OLETF rats resulting from a long-term diabetic state. *J Lab Clin Med* 128: 568-578, 1996
- 12) Kushihiro M, Shikata K, Sugimoto H, Ikeda K, Horiuchi S, Makino H. Accumulation of N sigma- (carboxy-methyl) lysine and changes in glomerular extracellular matrix components in Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rat: a model of spontaneous NIDDM. *Nephron* 79: 458-468, 1998

- 13) Harendza S, Pollock AS, Mertens PR, Lovett DH. Tissue-specific enhancer-promoter interactions regulate high level constitutive expression of matrix metalloproteinase 2 by glomerular mesangial cells. *J Biol Chem* 270: 18786-18796, 1995
- 14) Bode W, Fernandez-Catalan C, Grams F, Gomis-Ruth FX, Nagase H, Tschesche H, Maskos K. Insights into MMP-TIMP interactions. *Ann N Y Acad Sci* 878: 73-91, 1999
- 15) Sato H, Takino T, Okada Y, Cao J, Shinagawa A, Yamamoto E, Seiki M. A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumor cells. *Nature* 370: 61-65, 1994
- 16) Will H, Hinzmann B. cDNA sequence and mRNA tissue distribution of a novel human matrix metalloproteinase with a potential transmembrane segment. *Eur J Biochem* 231: 602-608, 1995
- 17) Seiki M. Membrane-type matrix metalloproteinases. *APMIS* 107: 137-143, 1999
- 18) 吉田雅治, 木村常雄, 福富一弘, 前村千穂子, 長沢俊彦. 実験的ラット・モノクローリン腎症. 日腎誌 2: 109-114, 1986
- 19) Krakowar CA, Greenspon SA. Localization of the nephrotoxic antigen within the isolated renal glomerulus. *Am Med Assoc Pathol* 51: 629, 1951
- 20) Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685, 1970
- 21) Hibbs MS, Hasty KA, Seyer JM, Kang AH, Mainardi CL. Biochemical and immunological characterization of the secreted forms of human neutrophil gelatinase. *J Biol Chem* 260: 2493-2500, 1985
- 22) Okada Y, Aikawa M, Sugiyama S, Libby P. A novel method for *in situ* detection of proteinase activities using fluorescent substrates. (投稿中)
- 23) Nagase H, Fields CG, Fields GB. Design and characterization of a fluorogenic substrate selectively hydrolyzed by stromelysin 1 (matrix metalloproteinase-3). *J Biol Chem* 269: 20952-20957, 1994
- 24) Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159, 1987
- 25) Velasquez MT, Kimmel PL, Michaelis OE 4th. Animal models of spontaneous diabetic kidney disease. *FASEB J* 4: 2850-2859, 1990
- 26) Lenz O, Striker LJ, Jacot TA, Elliot SJ, Killen PD, Striker GE. Glomerular endothelial cells synthesize collagens but little gelatinase A and B. *J Am Soc Nephrol* 9: 2040-2047, 1998
- 27) Suzuki D, Miyazaki M, Jinde K, Koji T, Yagame M, Endoh M, Nomoto Y, Sakai H. *In situ* hybridization studies of matrix metalloproteinase-3, tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and type IV collagen in diabetic nephropathy. *Kidney Int* 52: 111-119, 1997
- 28) 和田隆志. ヒト培養メサンギウム細胞によるマトリックスメタロプロテイナーゼ (MMP) およびそのインヒビター (TIMP) 産生に対するグルコースの影響. 十全医会誌 101: 365-374, 1992
- 29) Caenazzo C, Garbisa S, Onisto M, Zampieri M, Baggio B,

- Gambaro G. Effect of glucose and heparin on mesangial alpha 1 (IV) COL and MMP-2/TIMP-2 mRNA expression. *Nephrol Dial Transplant* 12: 443-448, 1997
- 30) McLennan SV, Yue DK, Turtle JR. Effect of glucose on matrix metalloproteinase activity in mesangial cells. *Nephron* 79: 293-298, 1998
- 31) Ziyadeh FN, Han DC. Involvement of transforming growth factor-beta and its receptors in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Kidney Int* 60: S7-11, 1997
- 32) Inaba T, Ishibashi S, Gotoda T, Kawamura M, Morino N, Nojima Y, Kawakami M, Yazaki Y, Yamada N. Enhanced expression of platelet-derived growth factor-beta receptor by high glucose: involvement of platelet-derived growth factor in diabetic angiopathy. *Diabetes* 45: 507-512, 1996
- 33) Segev Y, Landau D, Marbach M, Shehadeh N, Flyvbjerg A, Phillip M. Renal hypertrophy in hyperglycemic non-obese diabetic mice is associated with persistent renal accumulation of insulin-like growth factor I. *J Am Soc Nephrol* 8: 436-444, 1997
- 34) Gilbert RE, Cox A, McNally PG, Wu LL, Dziadek M, Cooper ME, Jerums G. Increased epidermal growth factor in experimental diabetes related kidney growth in rats. *Diabetologia* 40: 778-785, 1997
- 35) Marti HP, Lee L, Kashgarian M, Lovett DH. Transforming growth factor-beta 1 stimulates glomerular mesangial cell synthesis of the 72-kd type IV collagenase. *Am J Pathol* 144: 82-94, 1994
- 36) Sharma K, Jin Y, Guo J, Ziyadeh FN. Neutralization of TGF-beta by anti-TGF-beta antibody attenuates kidney hypertrophy and the enhancement extracellular matrix gene expression in STZ-induced diabetic mice. *Diabetes* 45: 522-530, 1996
- 37) Sharma K, Ziyadeh FN. Renal hypertrophy is associated with up-regulation of TGF-beta 1 gene expression in diabetic BB rat and NOD mouse. *Am J Physiol* 267: F1094-1101, 1994
- 38) Yamamoto T, Nakamura T, Noble NA, Ruoslahti E, Border WA. Expression of transforming growth factor-beta is elevated in human and experimental diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 1814-1818, 1993.
- 39) Takahashi K, Eto H, Tanabe KK. Involvement of CD44 in matrix metalloproteinase-2 regulation in human melanoma cells. *Int J Cancer* 80: 387-395, 1999
- 40) Reckelhoff JF, Tygart VL, Mitias MM, Walcott JL. STZ-induced diabetes results in decreased activity of glomerular cathepsin and metalloproteinase in rats. *Diabetes* 42: 1425-1432, 1993
- 41) 久田幸正. ラット抗Thy1.1腎炎におけるマトリックスメタロプロテナーゼ-2の発現. *十全医会誌* 104: 36-45, 1995
- 42) Lovett DH, Johnson RJ, Marti HP, Martin J, Davies M, Couser WG. Structural characterization of the mesangial cell type IV collagenase and enhanced expression in a model of immune complex-mediated glomerulonephritis. *Am J Pathol* 141: 85-98, 1992
- 43) Nakamura H, Ueno H, Yamashita K, Shimada T, Yamamoto E, Noguchi M, Fujimoto N, Sato H, Seiki M, Okada Y. Enhanced production and activation of progelatinase A mediated by membrane-type 1 matrix metalloproteinase in human papillary thyroid carcinomas. *Cancer Res* 59: 467-473, 1999
- 44) Kazes I, Delarue F, Hagege J, Bouzahir-Sima L, Rondeau E, Sraer JD, Nguyen G. Soluble latent membrane-type 1 matrix metalloproteinase secreted by human mesangial cells is activated by urokinase. *Kidney Int* 54: 1976-1984, 1998
- 45) Hayashi K, Osada S, Shofuda K, Horikoshi S, Shirato I, Tomino Y. Enhanced expression of membrane type-1 matrix metalloproteinase in mesangial proliferative glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 9: 2262-2271, 1998
- 46) Ohuchi F, Imai K, Fujii Y, Sato H, Seiki M, Okada Y. Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules. *J Biol Chem* 272: 2446-2451, 1997
- 47) Howard EW, Banda MJ. Binding of tissue inhibitor of metalloproteinases 2 to two distinct sites on human 72-kDa gelatinase: identification of a stabilization site. *J Biol Chem* 266: 17972-17977, 1991
- 48) Higashi S, Miyazaki K. Reactive site-modified tissue inhibitor of metalloproteinase-2 inhibits the cell-mediated activation of progelatinase A. *J Biol Chem* 274: 10497-10504, 1999
- 49) Del Prete D, Anglani F, Forino M, Ceol M, Fioretto P, Nosadini R, Baggio B, Gambaro G. Down-regulation of glomerular matrix metalloproteinase-2 gene in human NIDDM. *Diabetologia* 40: 1449-1454, 1997
- 50) Nahman NS Jr, Leonhart KL, Cosio FG, Hebert CL. Effects of high glucose on cellular proliferation and fibronectin production by cultured human mesangial cells. *Kidney Int* 41: 396-402, 1992
- 51) Myint E, Brown DJ, Ljubimov AV, Kyaw M, Kenney MC. Cleavage of human corneal type VI collagen alpha 3 chain by matrix metalloproteinase-2. *Cornea* 15: 490-496, 1996
- 52) Mott JD, Khalifah RG, Nagase H, Shield CF 3rd, Hudson JK, Hudson BG. Nonenzymatic glycation of type IV collagen and matrix metalloproteinase susceptibility. *Kidney Int* 52: 1302-1312, 1997
- 53) Fioretto P, Steffes MW, Sutherland DE, Goetz FC, Mauer M. Reversal of lesions of diabetic nephropathy after pancreas transplantation. *N Engl J Med* 339: 69-75, 1998

The Expression of Matrix Metalloproteinase-2 and Membrane-Type 1 Matrix Metalloproteinase in Diabetic Nephropathy in Rat. Miho Shimizu, Department of Internal Medicine (I), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8641 — J. Juzen Med Soc., **109**, 60 — 70 (2000).

Key words diabetic nephropathy, glomerulosclerosis, matrix metalloproteinase-2, membrane-type 1 matrix metalloproteinase, nodular lesion

Abstract

To clarify the role of matrix metalloproteinase (MMP) in the sclerotic process and endothelial cell injury in diabetic nephropathy, this study focused on the glomerular expression and enzymatic activity of MMP-2 and membrane-type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP), which activate specifically proMMP-2, in the Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rat, a model of spontaneous non-insulin-dependent diabetes mellitus. Monocrotaline (MCT) (30 mg/kg body weight) or only saline were injected subcutaneously 3 times every 4 weeks in 36-week-old OLETF rats and control Long-Evans Tokushima Otsuka (LETO) rats. Urinary albumin excretion significantly increased in both OLETF rats injected with or without MCT compared with the control LETO rats. Mesangial matrix expansion also significantly increased in OLETF rats compared with the control LETO rats. In addition, mesangiolysis and diffuse glomerulosclerosis associated with nodular mesangial expansion resembling human diabetic nodular lesions were observed only in MCT-injected OLETF rats. Under immunohistochemical analysis, MMP-2 and MT1-MMP proteins were detected in the mesangial cells of the expanded mesangial areas in OLETF rats, and also in the glomerular visceral epithelial cells in MCT-injected OLETF rats. Gelatin zymography revealed gelatinolytic bands at 62 kDa, as well as 68 and 72 kDa in the cultured supernatants of isolated glomeruli. The activated form of MMP-2 (62 kDa) increased 2.3-fold in MCT-injected LETO rats, 4.8-fold in saline-injected OLETF rats, and 5.5-fold in MCT-injected OLETF rats compared with control saline-injected LETO rats. Methods allowing *in situ* detection of MMP activities, showed enzymatic activities in the mesangial areas in a MCT-injected OLETF rat. To investigate the gene expression of MMP-2, MT1-MMP, tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-2 and fibronectin, total RNA was extracted from isolated glomeruli and analyzed by reverse transcription-PCR. MMP-2 and MT1-MMP messenger RNA increased 15.8-fold and 1.9-fold in MCT-injected LETO rats, 2.8-fold and 1.1-fold in saline-injected OLETF rats, and 18.1-fold and 2.8-fold in MCT-injected OLETF rats compared with control saline-injected LETO rats. The level of TIMP-2 and fibronectin mRNA also increased 1.4-fold and 2.2-fold in MCT-injected LETO rats, 1.1-fold and 2.2-fold in saline-injected OLETF rats, and 2.2-fold and 3.0-fold in MCT-injected OLETF rats compared with control saline-injected LETO rats. These observations indicate that MMP-2 and MT1-MMP are produced and activated in glomeruli through the progression of diabetic glomerulosclerosis and endothelial cell injury, and that the alteration of MMP, TIMP and ECM components play an important role in the remodeling process of glomerular matrix in diabetic nephropathy.