

ラット抗Thy1.1腎炎におけるマトリックスメタロプロテイナーゼ-2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/2297/9111

ラット抗 Thy1.1 腎炎におけるマトリックス メタロプロテイナーゼ-2 の発現

金沢大学医学部内科学第一講座 (主任: 小林健一教授)

久 田 幸 正

糸球体における細胞外基質 (extracellular matrix, ECM) の破壊や蓄積は, ECM に依存する糸球体の多くの機能の破壊を伴うものと考えられている。これは, ECM の量的および質的变化を伴う各種糸球体疾患の病態を理解する上で, ECM 代謝調節機構を解明することが重要な位置を占めていることを意味している。近年, マトリックスメタロプロテイナーゼ (matrix metalloproteinase, MMP) による ECM 分解系が腎疾患での ECM 代謝において重要な役割を果たしていることが推測されている。特に MMP-2 は糸球体 ECM の主要構成成分である IV 型膠原線維を分解することが可能であり, また糸球体固有細胞から分泌されるため注目されている。これまでの検討は糸球体障害の急性反応系におけるものが多いが, 慢性的に進行する糸球体硬化の進展過程における MMP の関与は明らかにされていない。今回 MMP-2 に注目し, 抗 Thy1.1 腎炎慢性期におけるその遺伝子および蛋白の発現ならびに酵素の活性化機構を検討した。抗 Thy-1.1 腎炎は 200g の雄性 Sprague-Dawley ラットに 0.7ml/100g 体重の抗 Thy1.1 血清を投与し作製した。この系では, メサンギウム基質の増生は第28病日をピークとし, 以後減少したが, 第60病日においても全糸球体の 31.2%—41.5% に硬化糸球体が残存していた。経時的に摘出した腎組織に対する免疫組織学的検討では, MMP-2 蛋白は第7病日より第60病日まで拡大したメサンギウム領域に持続して認められた。ゼラチンを基質としたザイモグラムの検討では, 68 kDa に加え活性型 MMP-2 である 62 kDa のバンドの酵素活性が, 第7病日には 6.8倍, 第60病日においても3.4倍で発現していた。正常および腎炎惹起後の糸球体より抽出した全 RNA を用いた逆転写-PCR (reverse transcription-PCR, RT-PCR) 法による MMP-2 遺伝子発現の検討では, 対照に比し第14病日に4.2倍, 第28病日に5.0倍, そして第60病日に2.0倍の発現が認められた。以上の結果より, MMP-2 は抗 Thy1.1 腎炎の経過中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, 慢性の糸球体障害のマトリックス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 anti-Thy1.1 glomerulonephritis, matrix metalloproteinase-2, glomerulosclerosis

メサンギウム基質あるいは糸球体基底膜を構成する細胞外基質 (extracellular matrix, ECM) は, 糸球体の構築の維持, 血液濾過, 物質輸送等の糸球体機能の維持の他に, 細胞の接着, 移動, 分化, 増殖等に重要な役割を果たしていることが推測されている¹⁾。この ECM の破壊や蓄積等の変化は, ECM に依存する糸球体の多くの機能の破壊を意味するため, その代謝調節機構の解明は ECM の変化を伴う各種糸球体疾患²⁾の病理理解に重要な位置を占めるものと考えられる。

従来 ECM の研究はその成分の量的および質的变化を対象に検討されてきたが, 近年その代謝を調節している種々の因子が解析され, ECM の代謝異常はその産生と分解のバランスの変化に病因を求めようようになってきている。これまで糸球体 ECM の産生系に関しては, トランスジェニックマウス³⁾や DNA 注入⁴⁾などの分子生物学的手法で増殖因子やサイトカインを糸球体局所で発現させることにより, ECM 成分が過剰に産生され糸球体が硬化に陥ることが示されている。このような ECM 産生系に対し, ECM を分解する種々のプロテイナーゼが

糸球体構成細胞および浸潤細胞から産生されることが明らかにされ, このプロテイナーゼによる ECM 分解系も腎疾患での ECM 代謝において重要な役割を果たしていることが推測されている⁵⁾。

このようなプロテイナーゼの中で, ECM を構成する IV 型膠原線維, ラミニン, フィブロネクチン, プロテオグリカン等を特異的に分解するマトリックスメタロプロテイナーゼ (matrix metalloproteinase, MMP) が注目され, 腎疾患における関与が推測されている。これまで MMP-1, 2, 3, 7, 9, 150 kDa-MMP 等多くの MMP の糸球体内発現が報告されているが^{6)~14)}, これは MMP の関与する糸球体 ECM の代謝調節制御の複雑性を示しているものと思われる。MMP-2 は従来の線維芽細胞を用いた研究ではハウスキーピング遺伝子と考えられていたが¹⁵⁾, 培養メサンギウム細胞が多量に MMP-2 を産生すること¹⁶⁾, またその産生がサイトカインや増殖因子に反応すること¹⁷⁾, さらに MMP-2 は糸球体基底膜 (glomerular basement membrane, GBM) に接するメサンギウム細胞表面や糸球体基底膜の断裂部

平成6年12月13日受付, 平成7年1月24日受理

Abbreviations: bFGF, basic fibroblast growth factor; ECM, extracellular matrix; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GBM, glomerular basement membrane; IL-1, interleukin-1; MMP, matrix metalloproteinase; PAM, periodic acid silver methenamine; PAS, periodic acid Schiff; PDGF, platelet-derived

に存在していることなどより¹⁰⁾, 糸球体 ECM の代謝における MMP-2 の役割が注目されている. しかし, これまでの腎における MMP-2 の検討は培養および動物実験を含め急性炎症を捉えたものが多い¹⁰⁾¹¹⁾ そこで今回の研究では, メサングウム基質

増生の残存するラット抗 Thyl.1 腎炎を作製し, 慢性的に進行する糸球体硬化の進展過程を検討した. その結果, 抗 Thyl.1 腎炎では糸球体硬化性病変の進展および修復過程において MMP-2 の発現が刺激されていることが明確になった. この結

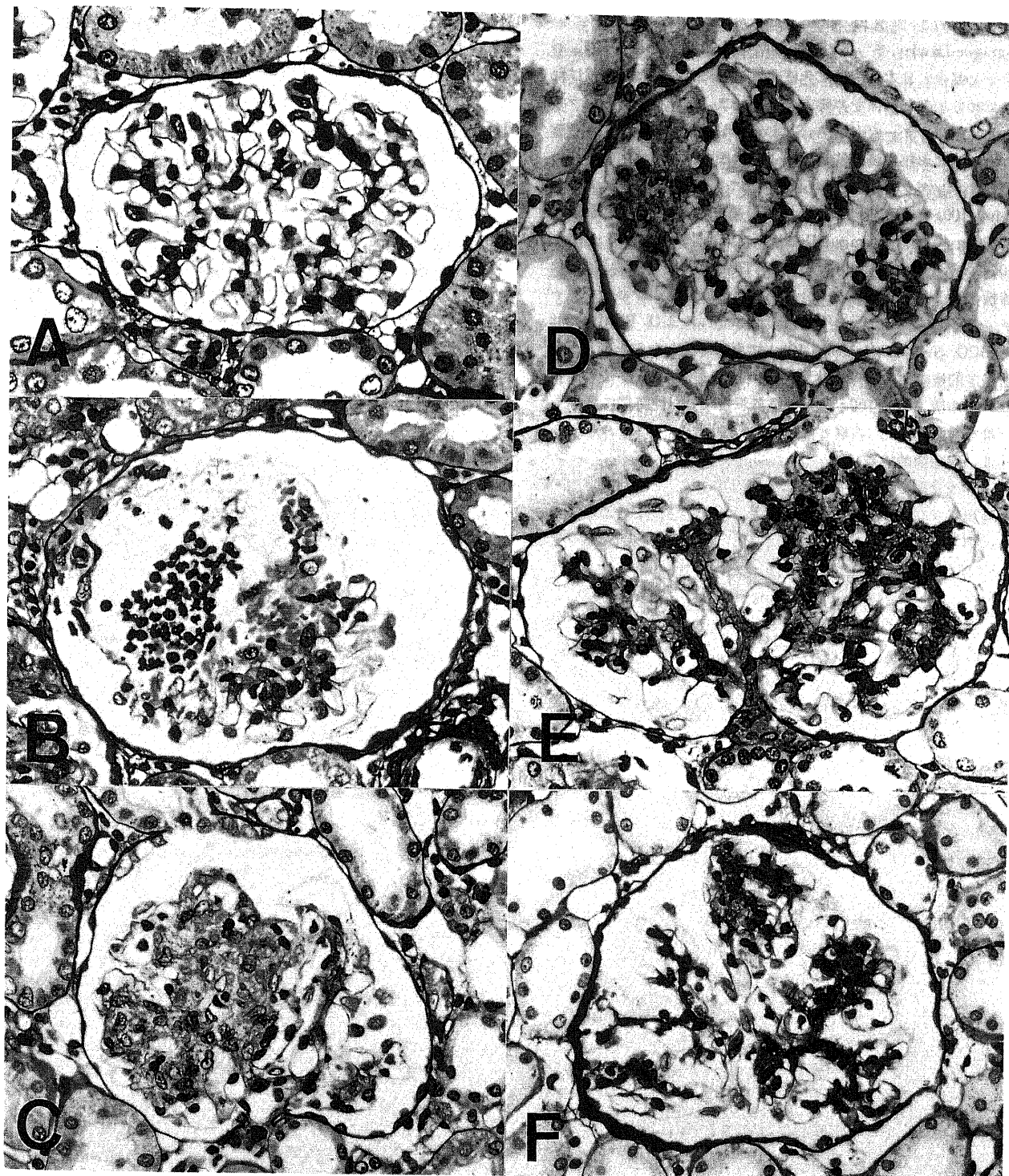


Fig. 1. Histological characterization of anti-Thyl.1 glomerulonephritis. A, normal rat. B and C, day 7; D, day 14; E, day 28; F, day 60. Glomerular lesions were characterized by marked mesangiolysis and polymorphonuclear leukocyte infiltration at day 7 (B). Cell proliferation was also seen at day 7 (C). Mesangial matrix expansion was observed at day 14 (D), 28 (E), and 60 (F). (PAM stain, original magnitude $\times 400$).

growth factor; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction; TIMP, tissue inhibitor of metalloproteinases; TGF- β , transforming growth factor- β ; TNC, Tris-NaCl-Ca

果は、MMP-2 による ECM の代謝調節機構の解明につながるものと考えられる。

対象および方法

1. ラット抗 Thy1.1 腎炎モデルの作製

抗 Thy1.1 血清は Yamamoto ら¹⁸⁾ の方法に準じて、Sprague-Dawley ラットの胸腺細胞を完全フロイントアジュバントと混合し日本白色兎に免疫することにより得た。血清は56℃で30分加熱し補体を非働化した後、ラット赤血球分画、ラットリバーパウダー (SIGMA, St. Louis, USA) による吸収操作を行った。なお抗血清の特異性および力価は、糸球体組織切片上でのメサンギウム細胞との反応性にて確認されており、また0.4ml/100g 体重の投与により腎炎惹起可能であった。本実験では200gの雄性 Sprague-Dawley ラットに、抗血清0.7ml/100g 体重を尾静脈より投与し、抗 Thy-1.1 腎炎を作製した。血清投与時より第0, 3, 7, 14, 28, 60病日に、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 (各群6匹)。また正常ウサギ血清0.7ml/100g 体重を経静脈投与し、同時期に腎摘出した群を対照とした (各群6匹)。

II. 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 (pH 7.2) にて固定後、4μm のパラフィン切片を作製し、HE, 過ヨウ素酸シッフ染色 (periodic acid Schiff, PAS), 過ヨウ素酸メセナミン銀染色 (periodic acid silver methenamine, PAM) の各染色を施行した。顕微鏡観察において、PAS, PAM 陽性物質によるメサンギウム領域の拡大を糸球体硬化と定義し、これまでの報告に基づき糸球体硬化の程度を半定量化した¹⁹⁾。すなわち PAS, PAM 陽性メサンギウム基質の糸球体に占める割合が0%, 0から25%以下, 25から50%以下, 50から75%以下, 75から100%のものをそれぞれ0, 1, 2, 3, 4度とスコア化し、同一スコアの糸球体数をそれぞれ N0, N1, N2, N3, N4 (N0+N1+N2+N3+N4=50) とし、以下の計算式にて各時相におけるマトリックススコアを得た。なお糸球体は径80μm以上のものについて検討した。

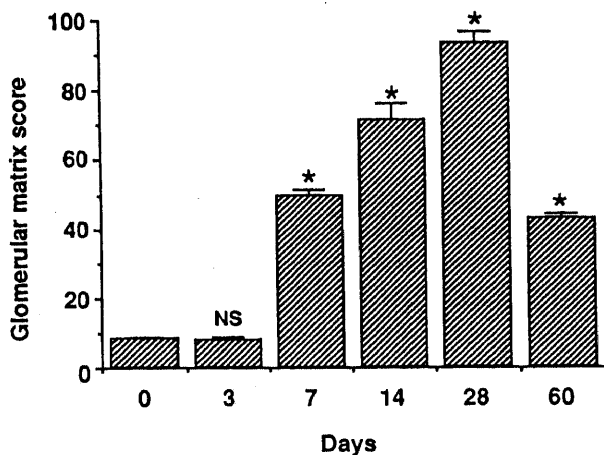


Fig. 2. The glomerular matrix score. Expanded extracellular matrix in mesangial area was semiquantitatively determined during the course of anti-Thy1.1 nephritis as glomerular matrix score. NS, not significantly different from normals; *, $p < 0.001$ vs. normal. Values are $\bar{x} \pm \text{SEM}$.

マトリックススコア

$$= [(0 \times N0 + 1 \times N1 + 2 \times N2 + 3 \times N3 + 4 \times N4) / 50] \times 100$$

マトリックススコア

$$= [(0 \times N0 + 1 \times N1 + 2 \times N2 + 3 \times N3 + 4 \times N4) / 50] \times 100$$

2. 免疫組織染色

MMP-2 の糸球体における局在は、パラフィン包埋標本上で一次抗体として抗ヒト MMP-2 マウスモノクローナル抗体 (金沢大学がん研究所分子免疫部門岡田保典教授より供与)、二次抗体としてビオチン標識抗マウス IgG ウサギ抗体を用いたストレプトアビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ法による免疫組織染色にて検討した。発色基質として 3, 3'-ジアミノベンチジンを用いた。なお、抗ヒト MMP-2 抗体のラット MMP-2 に対する交差反応性はウエスタンブロットにて確認した。

III. 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、150, 106, 63μm のふるいを用いたシービング法²⁰⁾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 8×10^3 /ml とし、24時間後に培養上清を得た。

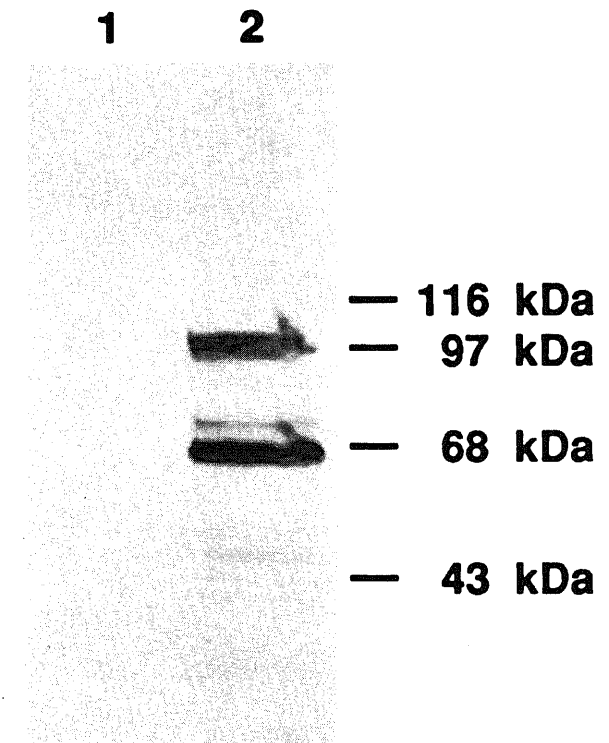


Fig. 3. Characterization of rat matrix metalloproteinase-2 in cultured medium of rat glomeruli. Lane 1, immunoblot of the proteins present in serum-free RPMI 1640; lane 2, immunoblot of the proteins present in conditioned medium obtained from normal isolated whole rat glomeruli cultured for 24 hrs in serum-free RPMI 1640. Antibody used was a monoclonal anti-human MMP-2.

IV. ギイモグラムでの MMP 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ギ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 Laemmli 法²¹⁾ に従い電気泳動を施行した。泳動後のゲルは、2.5% 続いて 1.5% のトリトン X-100 を含む Tris-NaCl-Ca (TNC) バッファー (50mM Tris-HCl, 0.15M NaCl, 10mM CaCl₂, 1μM ZnCl₂, 0.02% NaN₃, pH 7.5) でそれぞれ 30 分間洗浄した後、TNC バッファーで 37°C で 16 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、ギイモグラムとした²²⁾。ゼラチン消化バンドは X 線フィルムに転写した後、デントメーターにかけ酵素活性を定量化した²³⁾。なお、泳動時の分子量標準試薬は SDS-PAGE molecular weight standards low & high (BIO-RAD, Richmond, USA) を用いた。

V. 糸球体内 MMP-2 mRNA の発現の半定量

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 遺伝子発現を半定量化した。RT-PCR 法には GeneAmp RNA PCR キット (Perkin

Elmer Cetus, Norwalk, USA) 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 35ng/μl の全 RNA 2μl に 50μM ランダムヘキサマーを 1μl, 10mM dGTP, 10mM dATP, 10mM dTTP, 10mM dCTP を各 2μl, 50U/μl のモロニーマウス白血病ウイルス逆転写酵素 (Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase) を 1μl, 20U/μl RNase インヒビターを 1μl, 10×PCR バッファー (100mM Tris-HCl, pH 8.3, 500mM KCl) を 2μl, 25mM MgCl₂ を 4μl, 滅菌蒸留水を 1μl を加えた後室温にて 10 分間伸長反応を行い、その後逆転写酵素反応を 42°C 15 分間行った。次に 99°C 5 分間にて逆転写酵素を失活させた後、合成 cDNA に対する PCR 反応を行った。すなわち逆転写酵素反応を終了させたチューブに 5U/μl AmpliTaq DNA ポリメラーゼを 0.5μl, 10×PCR バッファーを 8μl, 25mM MgCl₂ を 4μl, 滅菌蒸留水 65.5μl を混合した後、ラット MMP-2 の特異的プライマー (センスプライマー: 5'-GTCTTCCCCTTCACTTTCCTG, アンチセンスプライマー: 5'-CGGAAGTTCTTGGTGTAGGTG) (500μg/ml) を各 1μl およびラットグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (glyceraldehyde-3-phosphate-

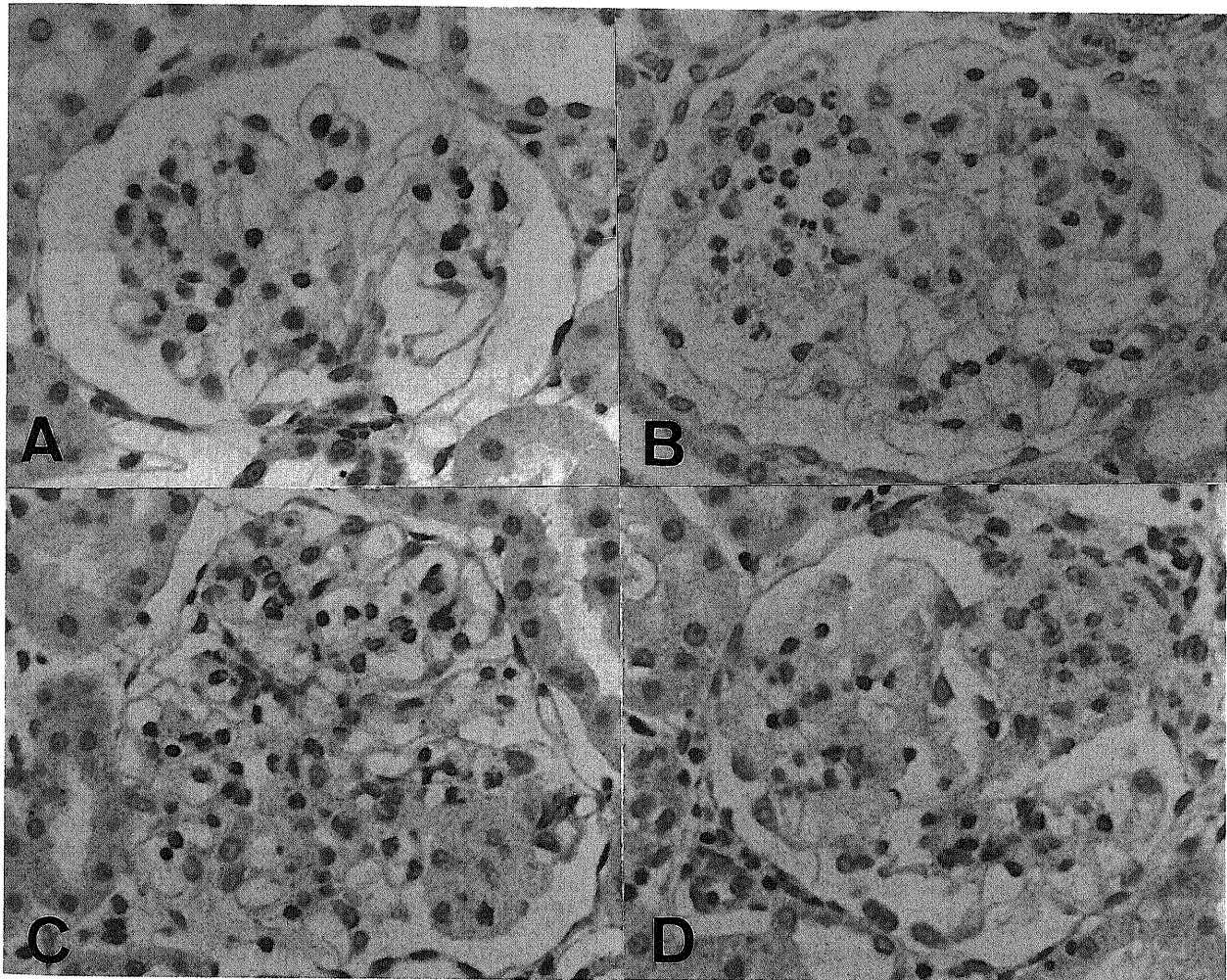


Fig. 4. Immunohistochemical localization of MMP-2 in rat glomeruli with early phase of anti-Thyl.1 glomerulonephritis. A, day 3; B, day 7; C, day 14; D, day 28. No significant expression of MMP-2 was detected at day 3 (A). There were very weak stainings for MMP-2 in glomeruli with mesangiolysis at day 7 (B). MMP-2 was detected in mesangial areas with cell proliferation at day 14 (C). MMP-2 was stained in crescent at day 28 (D). (Original magnitude $\times 400$).

dehydrogenase, GAPDH) プライマー (センスプライマー: 5'-CAGAACATCATCCCTGCATCC, アンチセンスプライマー: 5'-CACCTGTTGCTGTAGCCATA) (500 μ g/ml) 各 1 μ l を加え PCR 反応を行った。PCR 反応は94 $^{\circ}$ C 1分間, 55 $^{\circ}$ C 1分間, 72 $^{\circ}$ C 1分間の50サイクルを行った。PCR 産物は2%アガロースゲルを用いた電気泳動を行った後エチジウムブロマイドにより染色し, 塩基対数の確認を行なうとともに, さらにデントメーターにかけ各時期における mRNA 発現を抗血清投与前との相対値として半定量化した。予測される PCR 産物のサイズはラット MMP-2 が 248b.p., ラット GAPDH が 363b.p.である。

VI. 統計処理

マトリックススコアは対応のない t 検定にて検定した。また数値は平均 \pm 標準誤差で表した。

成 績

I. 組織所見

組織学的にみると, 抗 Thy1.1 腎炎惹起後第3病日には正常ラット糸球体 (図1A) と比較し軽度のメサンギウム融解を認めるのみであったが, 第7病日にはメサンギウム融解は著しく進行し, 一部の係蹄に嚢状拡大を伴った微小血管瘤を形成し, 多数の白血球浸潤を認めた (図1B)。また著明なメサンギウム細胞

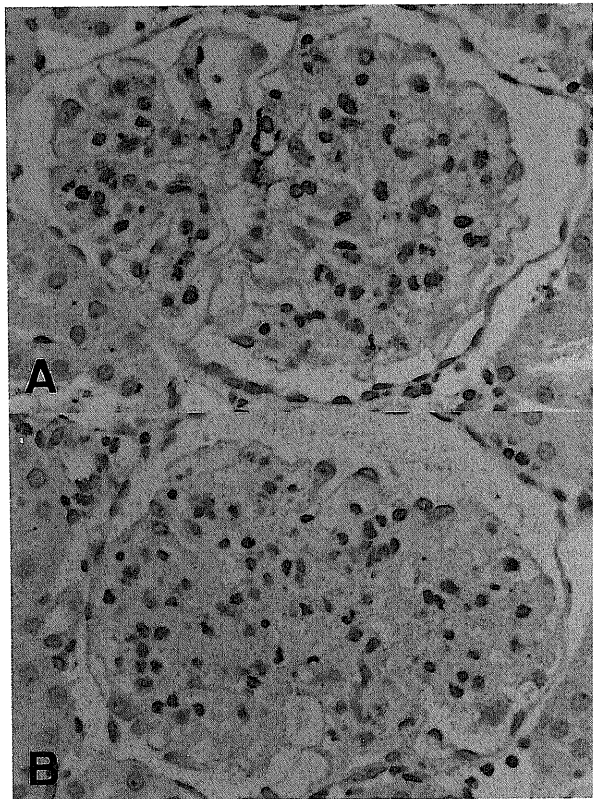


Fig. 5. Immunohistochemical localization of MMP-2 in rat glomeruli with chronic phase of anti-Thy1.1 glomerulonephritis. A, there were definite MMP-2 stainings in mild expanded mesangial areas at day 60. B, very few expressions of MMP-2 were seen in glomeruli with moderate mesangial matrix expansion at day 60. (Original magnitude \times 400).

の増殖を示す糸球体もみられた (図1C)。第14, 28病日にはメサンギウム細胞増殖に加え, メサンギウム基質の増加が認められた (図1D, E)。第60病日には, 多くの糸球体においてメサンギウム基質は減少していたが, 全糸球体の 31.2%–41.5% に硬化糸球体が残存していた (図1F)。マトリックススコアは第7病日以降の観察期間中有意に増加しており ($p < 0.001$, 図2), 第28病日にピークに達し, 以後減少していた。なお, 正常ウサギ血清投与例では組織学的変化は認められなかった。

II. 免疫組織染色

ラット糸球体培養液に対する抗ヒト MMP-2 マウスモノクローナル抗体を用いたウエスタンブロッティングでは, 66kDa, 68kDa, 72kDa, 100kDa の4つのバンドが認められ, 本抗体はラット MMP-2 に対する交差反応性を有していることが確認された (図3)。

この抗体を用いた免疫組織染色では, MMP-2 は正常ラット

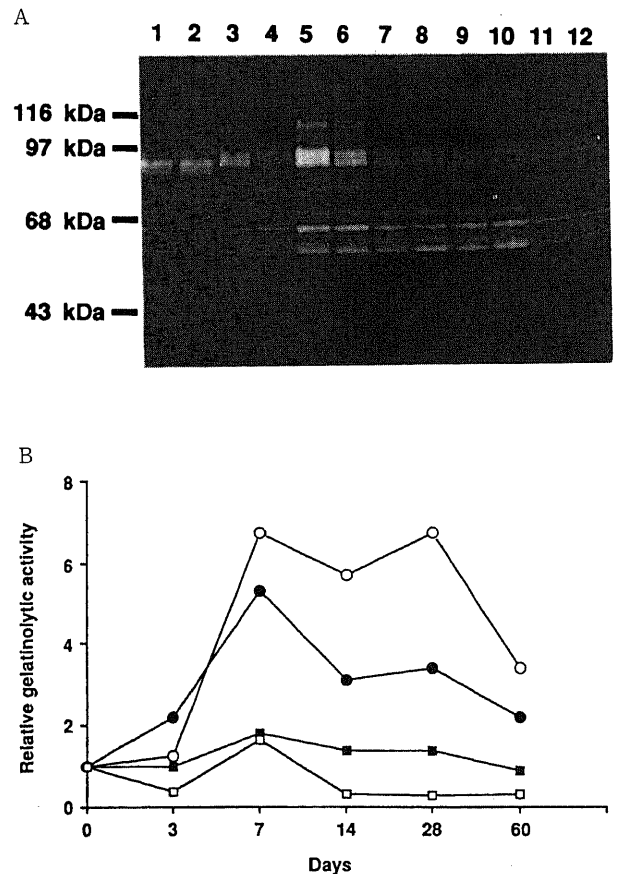


Fig. 6. Gelatinolytic activity of conditioned media from the cultured glomeruli with anti-Thy1.1 glomerulonephritis by zymogram. A, gelatinolytic activity of MMPs in cultured media. Conditioned media were obtained from isolated whole rat glomeruli cultured for 24 hrs in serum-free RPMI 1640. Lanes 1 and 2, conditioned media from day 0; lanes 3 and 4, day 3; lanes 5 and 6, day 7; lanes 7 and 8, day 14; lanes 9 and 10, day 28; lanes 11 and 12, day 60. B, time-course of gelatinolytic activity of MMPs. The degree of gelatinolytic activity was obtained by densitometric scan analysis of zymogram illustrated in panel A and calculated with respect to the control. ○, 62 kDa; ●, 68 kDa; ■, 72 kDa; □, 92 kDa.

および腎炎惹起後第3病日(図4A)には糸球体内の発現が認められなかったが、第7病日においては増生メサンギウム基質を中心として発現を49.5–58.8%の糸球体に認めた。これに対し、同病日のメサンギウム融解を認める糸球体においては発現していなかった(図4B)。以後第14病日(図4C)では55.4–68.9%の、また第28病日では68.2–88.5%の糸球体において、メサンギウム基質増生部位を中心にMMP-2が発現していた。細胞性半月体形成を認める糸球体では半月体にもMMP-2は発現していた(図4D)。第60病日の慢性期では、MMP-2の発現は27.4–45.3%の糸球体にみられ、第28病日までの初期相とは異なり軽度のメサンギウム基質増生部のメサンギウム細胞を中心にその発現を認めた(図5A)。一方、メサンギウム基質増生が中等度に残存している糸球体内にはMMP-2の発現は認められなかった(図5B)。正常ウサギ血清投与例では全経過においてMMP-2の糸球体内発現は認められなかった。

III. MMP のザイモグラム

ザイモグラムを用いたMMPの解析では、正常ラット糸球体培養上清において62, 68, 72kDaおよび92kDaの酵素活性が認

められた(図6A)。これら62, 68, 72kDaのバンドは、第7病日でそれぞれ6.8倍, 5.3倍, 1.8倍と最大となり、以後第28病日でそれぞれ6.8倍, 3.4倍, 1.4倍、第60病日においても62, 68kDaのバンドにはそれぞれ3.4倍, 2.2倍の酵素活性が認められた(図6B)。92kDaのバンドは、白血球浸潤に一致して第7病日に1.7倍に一過性に増強し、第14病日にはいずれも正常値以下にまで低下していた。また第7病日には100kDaおよび114kDaのバンドにも酵素活性が認められた。なお、正常ウサギ血清投与例では経時的な酵素活性の有意な変化は認められなかった。

IV. 糸球体内 MMP-2mRNA 発現の検討

RT-PCRによるMMP-2mRNAの発現を図7A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、腎炎惹起後第14病日に対照に比し4.2倍、第28病日で5.0倍、第60病日においても2.0倍の発現亢進が認められた(図7B)。正常ウサギ血清投与例では全経過においてMMP-2mRNA発現の変化は認められなかった。

考 察

今回作製した腎炎の特色は、従来の抗Thyl.1腎炎^{18,25)}に比し、抗血清の大量投与により硬化性病変の残存率を増加させた点である。この系では進行性の糸球体硬化には至らず、第28病日以降マトリックススコアは減少した。同一糸球体を経時的に観察することは不可能であるが、この現象は糸球体硬化に対する修復機転が働いていることを意味しているものと推測される。さらに今回の検討により、この腎炎の経過中、糸球体の硬化性病変の存在時期に一致して、MMP-2の発現が亢進していることが判明した。その発現は遺伝子レベルで確認された他、蛋白レベルでも糸球体内に染色され、また糸球体による培養上清中への産生も確認された。これは糸球体局所でMMP-2が産生されていることを意味しており、その発現が糸球体硬化に対する修復機転において重要な役割を果たしていることが推測された。

このMMP-2の発現は、免疫染色ではマトリックス増生部位のメサンギウム領域を中心として認められた。これまで抗Thyl.1腎炎の急性期においても、免疫電顕観察ではメサンギウム領域¹⁰⁾、またMMP-2mRNAの組織上での発現は増殖メサンギウム細胞に限局していることが報告されている²⁶⁾。これらはメサンギウム細胞が主たる産生細胞であることを推測させる。培養実験においてもメサンギウム細胞がMMP-2を産生することは確認されている¹⁵⁾。しかし培養実験では糸球体上皮細胞や内皮細胞もMMP-2を産生することが知られており¹¹⁾、産生細胞の解析には今後組織内ハイブリダイゼーションおよび免疫電顕により、組織上でのMMP-2発現の局在をより明らかにすることが必要と考えられる。

従来の抗Thyl.1腎炎の経過中には、メサンギウム融解やメサンギウム細胞増殖に伴い、インターロイキン-1(interleukin-1, IL-1)、血小板由来成長因子(platelet-derived growth factor, PDGF)、形質変換成長因子(transforming growth factor- β , TGF- β)、線維芽細胞成長因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)などのサイトカインや増殖因子が発現していることが確認されている^{27–30)}。これらの因子は、培養実験ではメサンギウム細胞におけるMMP-2産生の刺激または抑制因子である^{17,28)}。これらの因子が生体の病変部でどのように制御され、発

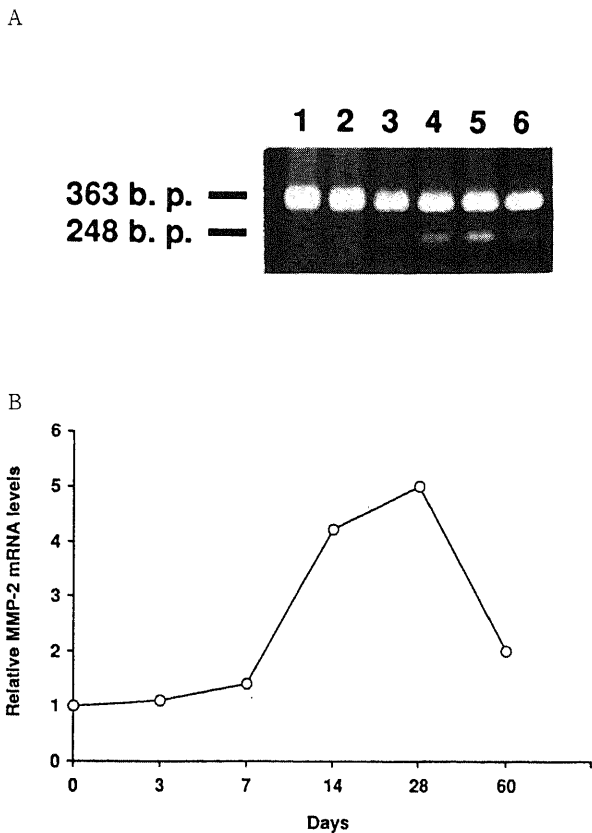


Fig. 7. Gene expression of matrix metalloproteinase-2 in rat glomeruli with anti-Thyl.1 glomerulonephritis. A, agarose gel electrophoresis followed by ethidium bromide staining. Total RNA extracted from isolated whole rat glomeruli was amplified by RT-PCR. Lane 1, day 0; lane 2, day 3; lane 3, day 7; lane 4, day 14; lane 5, day 28; lane 6, day 60. Expected size of RT-PCR product is 248 base pairs for rat MMP-2 and 363 base pairs for rat GAPDH. B, time-course of MMP-2 mRNA levels. The amount of MMP-2 RT-PCR products generated at each time points was obtained by densitometric scan analysis of ethidium bromide staining illustrated in panel A, and calculated with respect to the control.

現しているかは全く不明である。皮膚の創傷治癒の過程では様々の時相に PDGF, TGF- β , bFGF が複雑に関与しながら発現し、治癒を促進していることが示されている³¹⁾。今回の抗 Thyl.1 腎炎において MMP-2 の発現はマトリックスの増生時期を通じて認められたが、その発現の時相はこれまでの報告²⁹⁾にある TGF- β のそれと類似している。また組織内ハイブリダイゼーションによる抗 Thyl.1 腎炎急性期における検討では²⁸⁾、TGF- β の mRNA 発現亢進部位に一致して MMP-2 の mRNA 発現が亢進するとされていることより、培養実験系で MMP-2 を誘導する TGF- β が本腎炎において生体内でも MMP-2 の発現刺激となっていることが推測される。

MMP-2 は他の MMPs と同様にプロエンザイムの形で分泌されるため、酵素として機能するためには細胞外で活性化される必要があるが、今回免疫染色で検出した MMP-2 が活性型か潜在型かは不明である。プロ MMP-2 は N 末端が解離し Zn が開放されると活性化され、分子量も 64 または 62kDa と活性型になる。ザイモグラムにおいて第 7 病日以降に 68kDa のプロ MMP-2 の増加とともに、活性型と考えられる 62kDa の分子量のバンドが著明に認められたことは、糸球体局所においてプロ MMP-2 の活性化がすでに行われていることを示している。この活性型は対照ではほとんど認められていないことより、MMP-2 の活性化機構が炎症が惹起された糸球体に存在することを意味している。糸球体に限らず MMP-2 の活性化因子に関しては研究は少ない。Wong らはメサンギウム細胞の分泌したプラスミノゲンアクチベーターがプラスミノゲンを分解してプラスミンとし、これが同時に分泌された MMP-2 を活性化することを報告している³²⁾。しかし、MMP-2 は N-末端にセリンプロテイナーゼで切断されるアミノ酸配列を有していないためプラスミンでは活性化を受けないことも報告されており³³⁾、問題が残されている。一方、Brown らは細胞膜依存性の MMP-2 の活性化機構を報告しており³⁴⁾、また近年 Sato らはこの細胞膜表面に存在するプロ MMP-2 活性化酵素を同定し、膜型 MMP と名付けている³⁵⁾。糸球体固有細胞表面においてもこの膜型 MMP が MMP-2 の活性を制御している可能性が推測され、今後本腎炎においても ECM 代謝の引き金としての膜型 MMP の発現が注目される。

MMP-2 の活性を制御する因子として、MMP-2 の産生やプロ MMP-2 の活性化に加え、潜在型および活性型 MMP-2 と 1:1 のモル比で結合しこれらを不活化する作用を持つインヒビター (tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMP) の関与も重要なものと考えられる。癌細胞においては、相対的な TIMP の低下が転移能と強く相関し、逆に TIMP を投与することで転移が抑制されることより、MMP, TIMP のモル比の不均衡が ECM 代謝の方向性を規定しているものと考えられている^{36,37)}。糸球体硬化症の進展においても MMP と TIMP の比率が重要視されており、Carome らは正常ヒト糸球体に比べ硬化糸球体では TIMP-1, -2 の発現が増加していることより TIMP による MMP 活性の阻害が硬化につながるものと推測しており³⁸⁾、また Nakamura らは、ピューロマイシン腎症の糸球体硬化期には ECM の産生に加え MMP の産生も増加しているが、TIMP 産生がそれをさらに上まわっているため、結果として MMP 活性は抑制されているものと推測している³⁹⁾。抗 Thyl.1 腎炎の急性期では、TIMP の発現に変化が認められないとする報告もあるが¹⁰⁾、今回の腎炎におけるザイモグラムで

の 100kDa および 114kDa の酵素活性は、その分子量から MMP-2 および MMP-9 と TIMP との複合体の可能性があり、TIMP の発現を推測させる。しかし、ラット TIMP と交差反応する抗体がないため今回その確認はできなかった。また、抗 Thyl.1 腎炎の急性期には多くの多核白血球の浸潤も認められたが、多核白血球由来のエラスターゼやカタレプシン G は TIMP に作用し MMP の阻害活性を失活させることが知られており⁴⁰⁾、この時期には相対的に MMP-2 が活性化されていることが推測される。

今回のザイモグラムの検討において急性期に認められた 92kDa のバンドは、白血球浸潤に一致してその発現が増強していた。このバンドは、ウェスタンブロットでは確認されていないが、ラット培養メサンギウム細胞の検討において IL-1、腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor) 刺激により 92kDa バンドが誘導されないことより¹¹⁾、白血球由来のプロ MMP-9 と推測された。しかし、プロ MMP-9 の低分子化された活性型はザイモグラムでは確認できなかった。MMP-9 も IV 型膠原線維の分解酵素であるが、ECM の増生している第 14 病日以降はすでに低下しており、慢性期における MMP-2 に比し炎症前期の組織破壊の要素が大きいものと推測される。

以上のように、MMP や TIMP の様々な関与の結果として、腎炎の進展に伴い ECM は増加していたが、これはメサンギウム細胞の環境を大きく変化させているものと考えられる。ECM は細胞とインテグリンを介して接触しているが、ヒトメラノーマ細胞およびヒト線維肉腫細胞においては、ラミニンとの接着により IV 型膠原線維消化活性が増加すること⁴¹⁾、またファイブロンクチンレセプターをブロックすることでウサギ滑液線維芽細胞においては MMP-1 と MMP-3 の遺伝子発現が増強することも知られている⁴²⁾。これらのことは ECM そのものがその細胞膜レセプターを介して細胞に情報を伝達していることを示している。今回の検討において、マトリックススコアの増加時期に MMP-2 の発現が増強していること、蛋白レベルでもマトリックス増生部位に一致して MMP-2 が局在していることより、増生した ECM そのものから接着細胞へ情報伝達が行われ、ECM を消化するため MMP-2 産生が誘導されている可能性も考えられる。この点、腎炎においては、インテグリンのブロック実験はいまだ行われておらず、今後の課題と考えられる。

抗 Thyl.1 腎炎における MMP-2 に関しては急性期での ECM 破壊への役割が明らかにされているが¹⁰⁾、慢性期の修復あるいは硬化進展における役割は不明であった。今回 ECM の増加とともに MMP-2 の発現が亢進し、これがマトリックス増生部位に一致して発現しており、また ECM の減少とともに MMP-2 発現も減少してきたことは、慢性期の硬化糸球体の修復過程において MMP-2 が強く関与していることが明らかにされたものと思われる。今後 ECM, MMP, TIMP を含めた全体のバランスを検討することで糸球体硬化における ECM の産生および分解制御の詳細な機構がより明らかとなるものと考えられる。

結 論

メサンギウム基質増生の残存する抗 Thyl.1 腎炎を作製し、その慢性期における糸球体内 MMP-2 の発現を検討し、以下の成績を得た。

1. 抗 Thy1.1 腎炎において、メサンギウム基質の増生は第28病日をピークとし、以後減少したが、第60病日においても全糸球体の31.2-41.5%に硬化糸球体が残存した。

2. 抗 Thy1.1 腎炎の経過中、糸球体 ECM 増生部位のメサンギウム領域に MMP-2 蛋白の発現が確認された。しかし第60病日においては、軽度のメサンギウム基質増生部にはその発現を認めたが、中等度以上に残存している硬化糸球体には発現は認められなかった。

3. 抗 Thy1.1 腎炎から精製された糸球体の培養上清中には、MMP-2 が第7病日から持続的に分泌されており、これは62kDa で確認されるようにすでに一部は活性化されていた。

4. MMP-2 の遺伝子発現は抗 Thy1.1 腎炎の経過中、特に第14病日で対照に比し4.2倍、第28病日に5.0倍、第60病日に2.0倍の亢進が認められた。

5. 糸球体における MMP-2 の分泌量および遺伝子発現は、ECM 増生時期に一致して亢進しており、また ECM の減少とともにその発現も低下した。

以上の結果より、硬化糸球体における MMP-2 の発現が硬化病変の修復機序に大きな役割を演じているものと考えられた。

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表します。また終始直接の御指導を賜りました金沢医科大学腎臓内科友杉直久博士、金沢大学血液浄化療法部横山仁助教授に心から感謝いたします。抗 MMP-2 モノクローナル抗体を快く供与下さいました金沢大学がん研究所分子免疫部門岡田保典教授に深謝いたします。また終始御協力と御援助を頂いた第一内科第3研究室の諸先生方、および研究協力員の皆様に深謝いたします。

なお、本論文の要旨は、第27回米国腎臓学会(1994年, Orlando) および第37回日本腎臓学会総会(1994年, 千葉)において発表した。

文 献

- 1) Weber, M.: Basement membrane proteins. *Kidney Int.*, **41**, 620-628 (1992).
- 2) Border, W. A., Okuda, S. & Nakamura, T.: Extracellular matrix and glomerular disease. *Semin. Nephrol.*, **9**, 307-317 (1989).
- 3) Falk, R. J., Scheinman, J. I., Mauer, S. M. & Michael, A. F.: Polyantigenic expansion of basement membrane constituents in diabetic nephropathy. *Diabetes*, **32** (Suppl. 2), 34-39 (1983).
- 4) Striker, L. M. M., Killen, P. D., Chi, E. & Striker, G. E.: The composition of glomerulosclerosis. I. Studies in focal sclerosis, crescentic glomerulonephritis, and membranoproliferative glomerulonephritis. *Lab. Invest.*, **51**, 181-192 (1984).
- 5) Doi, T., Striker, L. J., Kimata, K., Peten, E. P., Yamada, Y. & Striker, G. E.: Glomerulosclerosis in mice transgenic for growth hormone. Increased mesangial extracellular matrix is correlated with kidney mRNA levels. *J. Exp. Med.*, **173**, 1287-1290 (1991).
- 6) Isaka, Y., Fujiwara, Y., Ueda, N., Kaneda, Y., Kamada, T. & Imai, E.: Glomerulosclerosis induced by in vivo transfection of transforming growth factor- β or platelet-derived growth factor gene into the rat kidney. *J.*

Clin. Invest., **92**, 2597-2601 (1993).

7) Davies, M., Martin, J., Thomas, G. J. & Lovett, D. H.: Proteinases and glomerular matrix turnover. *Kidney Int.*, **41**, 671-678 (1992).

8) Baricos, W. H. & Shah, S. V.: Proteolytic enzymes as mediators of glomerular injury. *Kidney Int.*, **40**, 161-173 (1991).

9) Nakamura, T., Ebihara, I., Osada, S., Takahashi, T., Yamamoto, M., Tomino, Y. & Koide, H.: Gene expression of metalloproteinases and their inhibitor in renal tissue of New Zealand Black/White F1 mice. *Clin. Sci.*, **85**, 295-301 (1993).

10) Lovett, D. H., Johnson, R. J., Marti, H. P., Martin, J., Davies, M. & Couser, W. G.: 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).

11) Watanabe, K., Kinoshita, S. & Nakagawa, H.: Gelatinase secretion by glomerular epithelial cells. *Nephron*, **56**, 405-409 (1990).

12) Johnson, R., Yamabe, H., Chen, Y. P., Campbell, C., Gordon, K., Baker, P., Lovett, D. & Couser, W. G.: Glomerular epithelial cells secrete a glomerular basement membrane-degrading metalloproteinase. *J. Am. Soc. Nephrol.*, **2**, 1388-1397 (1992).

13) Le, Q., Shah, S., Nguyen, H., Cortez, S. & Baricos, W.: A novel metalloproteinase present in freshly isolated rat glomeruli. *Am. J. Physiol. (Renal)*, **260**, F555-F561 (1991).

14) Marti, H. P., Mcneil, L., Thomas, G., Davies, M. & Lovett, D. H.: Molecular characterization of a low-molecular-mass matrix metalloproteinase secreted by glomerular mesangial cells as PCMP-1. *Biochem. J.*, **285**, 899-905 (1992).

15) Frisch, S. M. & Morisaki, J. H.: Positive and negative transcriptional elements of the human type IV collagenase gene. *Mol. Cell. Biol.*, **10**, 6524-6532 (1990).

16) Martin, J., Davies, M., Thomas, G. & Lovett, D. H.: Human mesangial cells secrete a GBM-degrading neutral proteinase and a specific inhibitor. *Kidney Int.*, **36**, 790-801 (1989).

17) Marti, H. P., Mcneil, L., Davies, M., Martin, J. & Lovett, D. H.: Homology cloning of rat 72 kDa type IV collagenase: cytokine and second-messenger inducibility in glomerular mesangial cells. *Biochem. J.*, **291**, 441-446 (1993).

18) Yamamoto, T. & Wilson, C. B.: Quantitative and qualitative studies of antibody-induced mesangial cell damage in the rat. *Kidney Int.*, **32**, 514-525 (1987).

19) Raij, L., Azar, S. & Keane, W.: Mesangial immune injury, hypertension, and progressive glomerular damage in Dahl ears. *Kidney Int.*, **26**, 137-143 (1984).

20) Krakowar, C. A. & Greenspon, S. A.: Localization of the nephrotoxic antigen within the isolated renal glomerulus. *Amer. Med. Ass. Pathol.*, **51**, 629 (1951).

21) Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during

- the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685 (1970).
- 22) Hibbs, M. S., Hastly, K. A., Seyer, J. M., Kang, A. H. & Mainardi, C. L.: Biochemical and immunological characterization of the secreted forms of human neutrophil gelatinase. *J. Biol. Chem.*, 260, 2493-2500 (1985).
- 23) Nakajima, M., Lotan, D., Baig, M. M., Carralero, R. M., Wood, W. R., Hendrix, M. J. C. & Lotan, R.: Inhibition by retinoic acid of type IV collagenolysis and invasion through reconstituted basement membrane by metastatic rat mammary adenocarcinoma cells. *Cancer Res.*, 49, 1698-1706 (1989).
- 24) Chomczynski, P. & Sacchi, N.: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytic. Biochem.*, 162, 156-159 (1987).
- 25) Floege, J., Johnson, R. J., Gordon, K., Iida, H., Pritzl, P., Yoshimura, A., Campbell, C., Alpers, C. E. & Couser, W. G.: Increased synthesis of extracellular matrix in mesangial proliferative nephritis. *Kidney Int.*, 40, 477-488 (1991).
- 26) Marti, H. P., Lee, L., Kashgarian, M. & Lovett, D. H.: Transforming growth factor- β 1 stimulates glomerular mesangial cell synthesis of the 72-kd type IV collagenase. *Am. J. Pathol.*, 144, 82-94 (1994).
- 27) Werber, H. I., Emancipator, S. N., Tykocinski, M. L. & Sedor, J. R.: The interleukin 1 gene is expressed by rat glomerular mesangial cells and is augmented in immune complex glomerulonephritis. *J. Immunol.*, 138, 3207-3212 (1987).
- 28) Iida, H., Seifert, R., Alpers, C. E., Gronwald, R. G. K., Phillips, P. E., Pritzl, P., Gordon, K., Gown, A. M., Ross, R., Bowen-Pope, D. F. & Johnson, R. J.: Platelet-derived growth factor (PDGF) and PDGF receptor are induced in mesangial proliferative nephritis in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 6560-6564 (1991).
- 29) Okuda, S., Languino, L. R., Ruoslahti, E. & Border, W. A.: Elevated expression of transforming growth factor- β and proteoglycan production in experimental glomerulonephritis. *J. Clin. Invest.*, 86, 453-462 (1990).
- 30) Floege, J., Eng, E., Lindner, V., Alpers, C. E., Young, B. A., Reidy, M. A. & Johnson, R. J.: Rat glomerular mesangial cells synthesize basic fibroblast growth factor. Release, upregulated synthesis and mitogenicity in mesangial proliferative glomerulonephritis. *J. Clin. Invest.*, 90, 2362-2369 (1992).
- 31) Pierce, G. F., Tarpley, J. E., Yanagihara, D., Mustoe, T. A., Fox, G. M. & Thomason, A.: Platelet-derived growth factor (BB homodimer), transforming growth factor- β 1, and basic fibroblast growth factor in dermal wound healing. Neovessel and matrix formation and cessation of repair. *Am. J. Pathol.*, 140, 1375-1388 (1992).
- 32) Wong, A. P., Cortez, S. L. & Baricos, W. H.: Role of plasmin and gelatinase in extracellular matrix degradation by cultured rat mesangial cells. *Am. J. Physiol.*, 263 (Renal fluid electrolyte physiol. 32), F1112-F1118 (1992).
- 33) Okada, Y., Morodomi, T., Enghild, J. J., Suzuki, K., Yasui, A., Nakanishi, I., Salvesen, G. & Nagase, H.: Matrix metalloproteinase 2 from human rheumatoid synovial fibroblasts. Purification and activation of the precursor and enzymic properties. *Eur. J. Biochem.*, 194, 721-730 (1990).
- 34) Brown, P. D., Levy, A. T., Margulies, I. M. K., Liotta, L. A. & Stetler-Stevenson, W. G.: Independent expression and cellular processing of Mr 72,000 type IV collagenase and interstitial collagenase in human tumorigenic cell lines. *Cancer Res.*, 50, 6184-6191 (1990).
- 35) Sato, H., Takino, T., Okada, Y., Cao, J., Shinagawa, A., Yamamoto, E. & Seiki, M.: A Matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature*, 370, 61-65 (1994).
- 36) Khokha, R., Waterhouse, P., Yagel, S., Lala, P. K., Overall, C. M., Norton, G. & Denhardt, D. T.: Antisense RNA-induced reduction in murine TIMP levels confers oncogenicity on Swiss 3T3 cells. *Science*, 243, 947-950 (1989).
- 37) Alvarez, O. A., Carmichael, D. F. & DeClerck, Y. A.: Inhibition of collagenolytic activity and metastasis of tumor cells by a recombinant human tissue inhibitor of metalloproteinases. *J. Natl. Cancer Inst.*, 82, 589-595 (1990).
- 38) Carome, M. A., Striker, L. J., Peten, E. P., Moore, J., Yang, C. W., Stetler-Stevenson, W. G. & Striker, G. E.: Human glomeruli express TIMP-1 mRNA and TIMP-2 protein and mRNA. *Am. J. Physiol.*, 264, (Renal fluid electrolyte physiol. 33), F923-F929 (1993).
- 39) Nakamura, T., Fukui, M., Ebihara, I., Tomino, Y. & Koide, H.: Low protein diet blunts the rise in glomerular gene expression in focal glomerulosclerosis. *Kidney Int.* 45, 1593-1605 (1994).
- 40) Okada, Y., Watanabe, S., Nakanishi, I., Kishi, J., Hayakawa, T., Watorek, W., Travis, J. & Nagase, H.: Inactivation of tissue inhibitor of metalloproteinases by neutrophil elastase and other serine proteinases. *FEBS Lett.*, 229, 157-160 (1988).
- 41) Turpeenniemi-Hujanen, T., Thorgeirsson, U. P., Rao, C. N. & Liotta, L. A.: Laminin increases the release of type IV collagenase from malignant cells. *J. Biol. Chem.*, 261, 1883-1889 (1986).
- 42) Werb, Z., Tremble, P. M., Behrendtsen, O., Crowley, E. & Damsky, C. H.: Signal transduction through the fibronectin receptor induces collagenase and stromelysin gene expression. *J. Cell. Biol.*, 109, 877-889 (1989).

Expression of Matrix Metalloproteinase-2 in Anti-Thy1.1 Glomerulonephritis in Rats Yukimasa Hisada, Department of Internal Medicine (I), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med Soc., **104**, 36—45 (1995)

Key words anti-Thy1.1 glomerulonephritis, matrix metalloproteinase-2, glomerulosclerosis

Abstract

Degradation and accumulation of glomerular extracellular matrix (ECM) has been observed to be followed by the pathological changes in glomerular structure and function. Studies on the regulatory mechanisms of ECM is very important to our understanding of the pathogenesis of glomerular injury having qualitative and quantitative changes of ECM. Recently it has been suggested that matrix metalloproteinases (MMPs) play an important role in the turnover of the glomerular ECM, especially MMP-2 which catalyze to cleave type IV collagen of a major component of glomerular ECM and is secreted from resident glomerular cells. Although many studies have been based on the acute phase of glomerular injury, the involvement of MMPs in chronic glomerular injury remain poorly understood. This study focused on the gene and protein expressions of MMP-2 and its activation during the chronic phase of anti-Thy1.1 glomerulonephritis. The nephritis was induced by intravenous injection of 0.7 ml/100g body weight of rabbit anti-Thy1.1 serum into 200g male Sprague-Dawley rats. The mesangial matrix expansion became maximal at day 28 and decreased thereafter. It still presented in 31.2-41.5% of total glomeruli at day 60 after the induction of nephritis. Immunohistochemical study showed that MMP-2 was expressed continuously in the expanded mesangial area from day 7 to day 60. By zymogram using gelatin-substrate SDS-PAGE, the gelatinolytic activity of not only 68kDa but also 62kDa, which may be activated MMP-2, increased from day 7 (6.8-fold) to day 60 (3.4-fold). By comparing the optical densities of MMP-2 reverse transcription-PCR (RT-PCR) products generated from total RNA extracted from normal and nephritic glomeruli, the relative ratio, nephritis/normal, was established to be 4.2-fold at day 14, 5-fold at day 28, and 2-fold at day 60. These results indicate that MMP-2 is produced and activated in glomeruli through the progression of nephritis and suggest that MMP-2 play an important role in the matrix remodeling process of chronic glomerular injury.