

# Effects of High Glucose on the Production of Metalloproteinase and Tissue Inhibitor of Metalloproteinase by Cultured Human Mesangial Cells

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	<a href="http://hdl.handle.net/2297/8324">http://hdl.handle.net/2297/8324</a>

## 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

金沢大学医学部内科学第一講座 (主任: 小林健一教授)

和田 隆 志

(平成4年2月7日受付)

メサンギウム基質の拡大および糸球体基底膜の肥厚は、糖尿病性腎症に特徴的な組織学的所見である。このような糖尿病状態における腎の細胞外基質 (extracellular matrix, ECM) に対する分解系の調節因子については十分な検討がなされていない。腎の ECM は主としてⅣ型コラーゲン, フィブロネクチンおよびラミニンから構成されており, メタロプロテイナーゼ (matrix metalloproteinase, MMP) はこれらの基質を分解することが可能であり, 腎疾患における ECM 産生, MMP およびそのインヒビター (tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP) の分泌は, いずれもメサンギウム細胞が担っている可能性が示唆されている。そこで本研究では, 糖尿病状態での ECM の代謝を検討する目的で, ヒト培養メサンギウム細胞からの MMP および TIMP 分泌に与える糖濃度の影響を検討した。その結果, 無血清培地で培養されたヒト培養メサンギウム細胞から MMP および TIMP の産生が確認された。ゼラチン消化活性を有する分子量67, 52および46kDaの酵素は, ethylenediamine tetraacetic acid で阻害され, phenylmethanesulfonyl fluoride, N-ethylmaleimide および pepstatin A では阻害されないことより MMP と同定し, さらにウエスタンブロッティングにより 67kDa は MMP-2, 52および46kDa は MMP-1 であることが確認された。糖濃度 450mg/dl の培地で3日間培養した結果, MMP-2 の産生は, 100mg/dl 培地に比べ, ゼラチン消化活性で約60%の増加が認められた。MMP-3 は蛋白質レベルで測定感度以下であり, 遺伝子発現もみられなかった。一方, 450mg/dl 培地における TIMP の産生は 100mg/dl 培地で培養した細胞の約40%にまで低下していた。ノーザンブロッティングによる検討においても, 72時間高糖濃度で培養された細胞では, 100mg/dl 培地での約1/3の遺伝子発現を認めるのみであった。アミノフェニル酢酸水銀で活性化された培養上清のⅣ型コラーゲンに対する総酵素活性は, TIMP と結合するにもかかわらず, すべての培養上清で観察された。以上の結果より, 高糖濃度状態は MMP および TIMP の発現をそれぞれ独立して調節することで, ECM の蓄積に影響を与えているものと推測される。これらの調節因子の不均衡が, 糖尿病状態における糸球体 ECM の代謝に重要な役割を担っている可能性が示唆された。

**Key words** human mesangial cell, glucose, matrix metalloproteinase, tissue inhibitor of metalloproteinase

ヒト糸球体障害の発症進展機序として, 免疫学的異常, 代謝異常さらに腎内血行動態異常などが仮説として提唱されているが<sup>1)</sup>, そのいずれにおいても, 障害の進行過程においては細胞増殖および糸球体基底膜やメサンギウム基質を構成している細胞外基質 (extracellular matrix, ECM) の量的および質的異常が共通して存在し, その結果として ECM が蓄積し, 糸球体硬化に陥るものとされている<sup>2)</sup>。代謝異常である糖尿病性腎症は, その組織学的特徴は糸球体基底膜の肥厚およびメサンギウム領域の拡大であり, 年余の経過を経て糸球体硬化にいたり, 最終的に腎機能の低下をきたす<sup>3)</sup>。臨床的には, インスリン依存型糖尿病の80%以上に8-10年の経過で腎症が出現し, またインスリン非依存型糖尿病でも約20%が10年の経過で顕性腎症に陥

るとされている<sup>4)</sup>。糸球体の ECM は, 線維性タンパクのコラーゲン, 複合糖質のプロテオグリカンおよび接着タンパクのフィブロネクチン, ラミニンから構成されている<sup>5)</sup>。これらのうちヒト糖尿病性腎症では, 腎症の進展とともに, 糸球体のⅣ型コラーゲン, ラミニンの増加およびヘパリン硫酸プロテオグリカンの減少などの糸球体内 ECM の構成成分が変化することが報告されている<sup>6)</sup>。糖尿病ラットにおいても, Ⅳ型コラーゲン, ラミニンの増加が遺伝子レベルで確認されている<sup>7)</sup>。高糖濃度培地下での培養メサンギウム細胞における検討では, Ⅳ型コラーゲン, ラミニンおよびフィブロネクチンといった ECM 産生が亢進することが示されており<sup>8)</sup>, 糖尿病性腎症の病理学的所見を裏付けている。

Abbreviations: ECM, extracellular matrix; FBS, fetal bovine serum; MMP, matrix metalloproteinase; TIMP, tissue inhibitor of metalloproteinase; CM, conditioned medium; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; SDS, sodium dodecyl sulfate; TCA, trichloroacetic acid; TA, tannic acid; EDTA, ethylenediamine tetraacetic acid; SSPE, sodium chloride-sodium diphosphate-ethylenediamine tetraacetic

最近, 正常糸球体から糸球体基底膜を消化しうるシステンブロテイナーゼが産生されていること<sup>11)</sup>, さらに培養メサンギウム細胞が ECM の消化酵素であるメタロプロテイナーゼ (matrix metalloproteinase, MMP) およびそのインヒビター (tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP) を分泌することが報告されて以来<sup>12)</sup>, ECM 産生のみならず ECM の分解が着目されるようになってきている<sup>13)</sup>. このように ECM 代謝においては, メサンギウム細胞の関与が重要視されているが, 産生される MMP および TIMP の同定やその分泌調節機構については未だ解明されるには至っていない.

糖尿病性腎症の発症には糖代謝異常が大きく影響を与えていることが判明している<sup>14)</sup>. そこで本研究では, 糖濃度変化に対するメサンギウム細胞の反応を, MMP や TIMP の分泌調節機構の面より検討した.

### 対象および方法

#### I. メサンギウム細胞培養

ヒト腎臓の健常部腎皮質より Greenspon らのふるい法<sup>15)</sup>によりメサンギウム細胞を採取した. 腎皮質はハサミで細片とし, 150, 200, 106  $\mu$ m のふるいを通して糸球体を採取し, 16% ウシ胎児血清 (fetal bovine serum, FBS) (GIBCO, New York, USA), ペニシリン (GIBCO) 100U/ml, ストレプトマイシン (GIBCO) 100U/ml を含む RPMI1640 (GIBCO) 培地中にて, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 存在下で初代培養を開始した. 4週間の培養で紡錘形および星状細胞が増殖し始めた後, 継代培養に移行した. 早期継代中に D-バリン (D-valine) を含むダルベッコ変法イーグル培地 (Dulbecco's modified Eagle medium, Dulbecco's MEM, GIBCO) で一週間の培養を行ない, 線維芽細胞を除去した<sup>16)</sup>. これらの細胞はデスミン (desmin) 陽性, 第Ⅷ因子関連抗原陰性, Ia 抗原陰性よりメサンギウム細胞と同定した<sup>17)</sup>. この条件では上皮細胞, 内皮細胞およびマクロファージは増殖しない<sup>18)</sup>. 実験には 6-8 継代目の細胞を用いた.

#### II. 各種糖濃度でのメサンギウム細胞培養

メサンギウム細胞は糖濃度 200mg/dl の RPMI1640 培地下で単層形成が 80% になるまで増殖させ, 無血清 RPMI1640 培地 (糖濃度 200mg/dl, 0.2% ラクトアルブミンヒドロライゼート (SIGMA, St. Louis, USA) 含有) で 48 時間培養し, 静止状態とした. その後それぞれ糖濃度 100mg/dl, 200mg/dl, 450mg/dl のインスリンを含まない無血清 Dulbecco's MEM で 3 日間培養した. この培養上清 (conditioned medium, CM) を 3000rpm, 10 分間遠心し, -80°C で保存し, 以下の実験に供した.

#### III. 酵素活性の検討

##### 1. ゼラチンポリアクリルアミドゲル電気泳動 (gelatin polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)

ゼラチン (SIGMA) 0.8mg/ml を含む 8% ポリアクリルアミドゲル (polyacrylamide gel, PAG) を用い, CM を非還元状態にて Laemmli 法<sup>19)</sup> に従い電気泳動を施行した. 泳動後のゲルは, トリス-食塩-カルシウム (Tris-NaCl-Ca, TNC) バッファー (50mM Tris-HCl, 0.15M NaCl, 10mM CaCl<sub>2</sub>, 1  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub>, 0.02% NaN<sub>3</sub>, pH 7.5) で 30 分間洗浄した後, 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 (Coomassie brilliant blue) 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 (zymogram) とした<sup>20)</sup>. ゼラチン消化バンドは X 線フィルム (Kodak, New York, USA) に転写した後, デンシトメーターにかけ酵素活性を定量化した<sup>21)</sup>. 分子量標準試薬は SDS-PAGE molecular weight standards low & high (BIO-RAD, Richmond, USA) を用いた.

##### 2. 酵素抑制試験

ゼラチン-PAGE-ゲルに同一試量を 5 レーン泳動した後, 各レーンを切り離した. それぞれのゲルを TNC バッファーまたは MMP 阻害剤である ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) 20mM, セリンプロテイナーゼ (serine proteinase) 阻害剤である phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) 2mM, システンブロテイナーゼ (cysteine proteinase) 阻害剤の N-ethylmaleimide (NEM) 5mM およびアスパラギン酸プロテイナーゼ (aspartic proteinase) 阻害剤の pepstatin A (Pep A) 0.5mM を含む TNC バッファーで 37°C で 16 時間培養し, CM 中の酵素活性の特異性につき検討した.

##### IV. ウエスタンブロットング法

モルカット II (Millipore, Bedford, USA) を用いて 20 倍に濃縮した CM に, 等量の電気泳動用還元緩衝液 (0.5M Tris-HCl, 50% glycerol, 10% sodium dodecyl sulfate, SDS, 2-mercaptoethanol, pH 6.8) を加え, 95°C, 5 分間処理し, 泳動試料とした. SDS-PAGE は 8% PAG を用いて行ない, 分離された蛋白質を PVDF 膜 (アトー, 東京) に転写した. この膜をブロッキング用緩衝液 (3% スキムミルク (森永, 東京) 加 0.15M リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline, PBS)) に 3 時間浸透した後, 一次抗体として抗 MMP-1, -2, -3, -9 および抗 TIMP モノクローナル抗体を用い, 6 時間反応させた後, エンハンスケミルミネセンス (enhanced chemiluminescence, ECL) 法 (Amersham, Buckinghamshire, UK) にてイムノブロットングを施行した. 抗 MMP-1, -2, -3, -9 および抗 TIMP モノクローナル抗体は金沢大学医療技術短期大学部岡田保典博士より供与された.

##### V. IV 型および I 型コラーゲンの分解活性

IV 型コラーゲンの分解活性は Liotta らの方法<sup>22)</sup> に従い測定した. CM 中の潜在型 MMP を活性型 MMP とするため, 培養液上清 200  $\mu$ l に 1mM アミノフェニル酢酸水銀 (aminophenyl mercuric acetate, APMA) を添加し, 基質として [<sup>3</sup>H]-IV 型コラーゲン (NEN, Boston, USA) 50  $\mu$ l を加えさらに等量の反応用緩衝液 (100mM Tris-HCl, 0.2M NaCl, 100mM CaCl<sub>2</sub>, 0.02% NaN<sub>3</sub>, pH 7.6) を追加し, 37°C, 24 時間培養した. その後 1mg/ml のウシ血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA, SIGMA), 2% trichloroacetic acid (TCA) もしくは tannic acid (TA) を加え 4°C, 30 分間放置した後, 15000rpm で 4°C, 10 分間遠心した. 上清より 270  $\mu$ l を取り出しアクアゾール 2 (Amersham) を 10ml 添加し, シンチレーションカウンター LSC-1000 (アロカ, 東京) にて測定した. I 型コラーゲンの分解は [<sup>14</sup>C] I 型コラーゲンを基質として測定した. 測定は IV 型コラーゲン分解活性測定と同様に行ない, 最終段階の未消

acid; MOPS, 3-[N-Morpholino] propanesulfonic acid; BPB, bromophenol blue; PMSF, phenylmethanesulfonyl fluoride; NEM, N-ethylmaleimide; Pep A, pepstatin A; EIA, enzyme immunoassay; APMA, aminophenyl mercuric acetate; dCTP, deoxycytidine triphosphate; MEM, modified Eagle medium;

化コラーゲンの遠心除去には TCA, TA は添加していない。

#### VI. TIMP および MMP-3 蛋白濃度の測定

CM 中の TIMP と MMP-3 濃度は, Kodama らの方法<sup>29)</sup>に従い, 一段エンザイムイムノアッセイ (one-step enzyme immunoassay, EIA) により定量した。平底型マイクロプレートウェル (Micro Well Module) (Nunc, Roskilde, Denmark) にヒト TIMP または MMP-3 に対するモノクローナル抗体をコートし, 血清試料および抗体の Fab'-ペルオキシダーゼ複合体を加え, 室温にて30分間反応させ洗浄した後, o-phenylene diamine および H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を添加後室温にて30分間反応させ, その吸光度を測定し, 定量化した。

#### VII. メサンギウム細胞での TIMP および MMP-3 mRNA の発現

径 6cm のシャーレ 3 枚で培養したメサンギウム細胞より全 RNA を Chomczynski らの Guanidinium-phenol 法<sup>30)</sup>で抽出した。各検体毎に全 RNA 10 μg を負荷バッファー (loading buffer) (formamide, 10X 3-[N-Morpholino] propanesulfonic

acid (MOPS) バッファー, formaldehyde, 80% glycerol, bromophenol blue (BPB)) とともに 65°C, 15分処理し, 変性させた後, formaldehyde を含む 1% agarose gel で MOPS をバッファーとして電気泳動を行なった。次いで, 0.05M NaCl を用いたアルカリブロットング法により Hybond-N+膜 (Amersham) に RNA を転写させ固定した。この転写膜をプレハイブリダイゼーション溶液 (50% formaldehyde, 5X sodium chloride-sodium diphosphate-ethylenediamine tetraacetic acid (SSPE), 5X Denhardt 溶液, 0.1% SDS, 2.5mg/ml 熱変性サケ精子 DNA) 中で 45°C, 3時間以上ブロッキングを行なった後, 溶液を除去し, [<sup>32</sup>P]-デオキシシチジン 3リン酸 (deoxycytidine triphosphate, dCTP) 標識プローブ DNA を含むハイブリダイゼーション (5X SSPE, 50% formamide, 5X Denhardt 溶液, 0.5% SDS) 溶液を加えた。標識プローブと 45°C, 12時間反応させた後, 0.1% SDS を含む 2X SSPE にて 15分を 2回, 1X SSPE にて 30分間さらに 0.1X SSPE で 15分間 2回の洗浄を行なった。ハイブリダイゼーションの評価にはバイオイメー

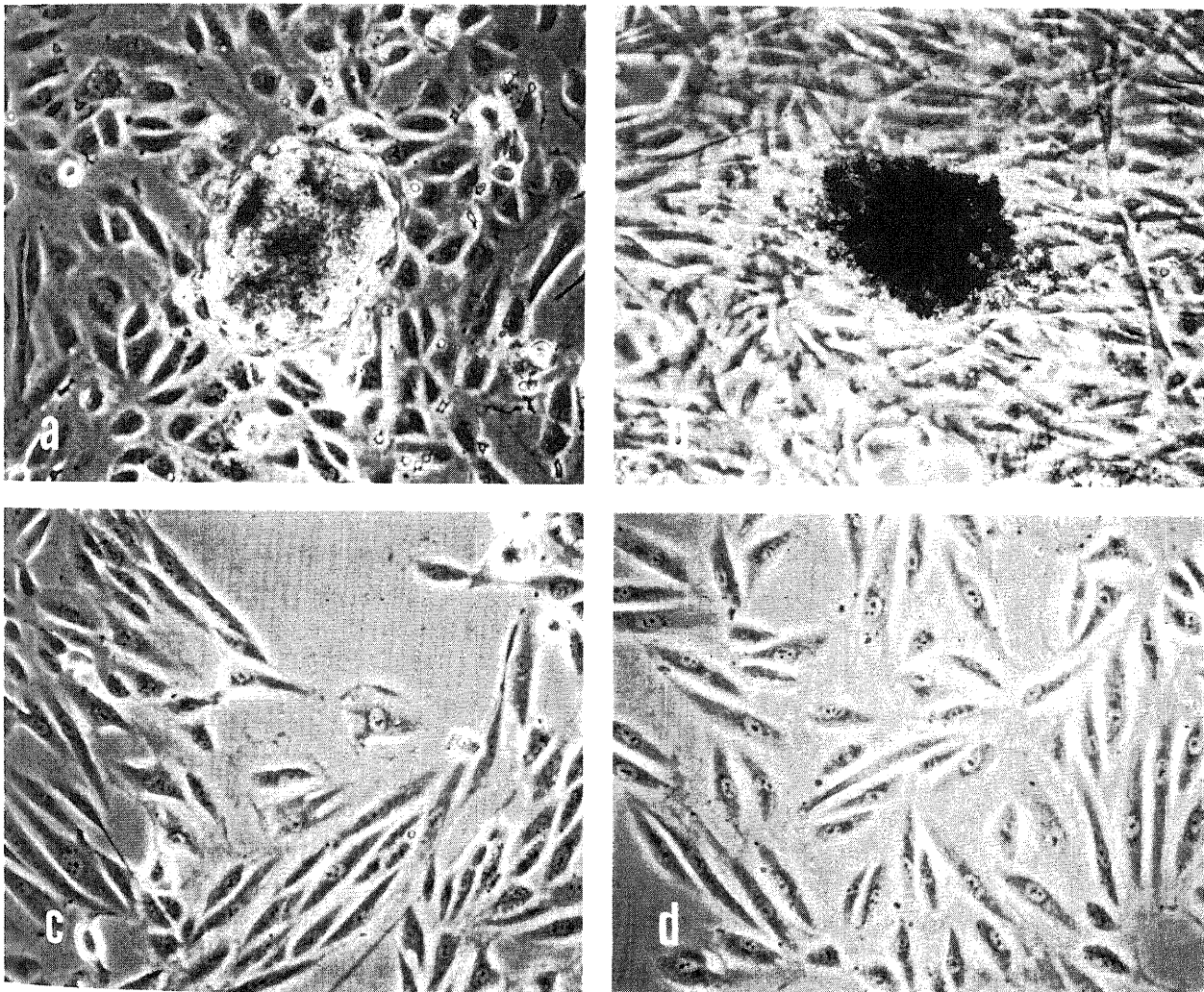


Fig. 1. Phase contrast microscopy of mesangial cells maintained on plastic dishes. Glomeruli and proliferative cells were seeded on plastic culture dishes and cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 16% FCS and antibiotics. Cellular outgrowths appeared within 7 days and epithelial cells survived in the cobblestone-like appearance in the primary culture (a), and consisted of strap-like cells growing in interwoven bundles (b). In subculture, cells had mainly stellate or fusiform shape (c). The cells were incubated in medium containing D-valine between the second and third passage (d).

ジ・アナライザー (Bio-Image Analyzer 100) (フジ写真, 東京) および-80℃で約7日間X線フィルム (Kodak) を露光したオートラジオグラフィを用いて行なった。なお, ヒト TIMP およびヒト MMP-3 cDNA は岡田保典博士より供与された。cDNA は deoxycytidine 5'-[ $\alpha^{32}$ P] triphosphate ([ $\alpha^{32}$ P] dCTP) (>3,000Ci/mmol) (Amersham) を標識基質としてマルチプライム DNA ラベリングシステム (Amersham) を用いて標識した。分子量標準試薬は 0.24-9.5kb RNA Ladder (Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, USA) を用いた。

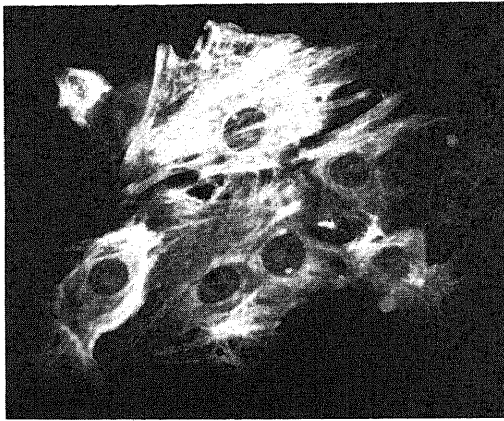


Fig. 2. Indirect immunofluorescent staining of desmin on cultured human mesangial cells. Anti-human desmin mouse monoclonal antibody was used for the first antibody and FITC-conjugated anti-mouse IgG goat antibody for the second antibody. Desmin presented on the stress fibers in mesangial cells.

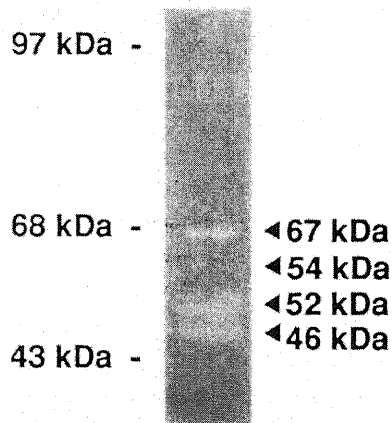


Fig. 3. Visualization of gelatinolytic activity of conditioned media from normal cultured human mesangial cells by zymogram. Conditioned media were subjected to electrophoresis in a gelatin-embedded polyacrylamide gel (8% acrylamide) under the non-reduced conditions. After a 16-hr incubation at 37°C gel was stained with Coomassie brilliant blue. Gelatinases with molecular weights of 67, 54, 52 and 46kDa were indicated. 97kDa, 68kDa and 43kDa: positions of molecular weight markers.

## 成 績

### 1. メサンギウム細胞培養

初代培養ではフラスコへの糸球体の付着を促すため, 一週間培地を交換せずに放置したところ, 図1a に示すように糸球体を中心として数石様の細胞が増殖してきた。2-3週目からは

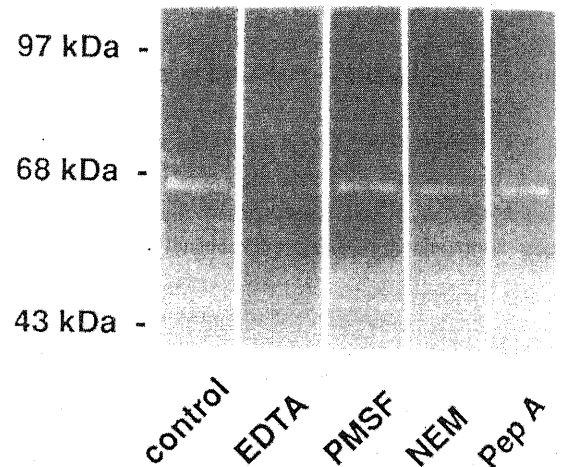


Fig. 4. Inhibition of metalloproteinases. The sliced gels were incubated for 16 hrs at 37°C in the buffer, the buffer containing 20mM EDTA, 2mM PMSF, 5mM NEM or 0.5 mM pepstatin A as described in materials and methods, indicating that these proteinases were metalloproteinases. 97kDa, 68kDa and 43kDa: positions of molecular weight markers.

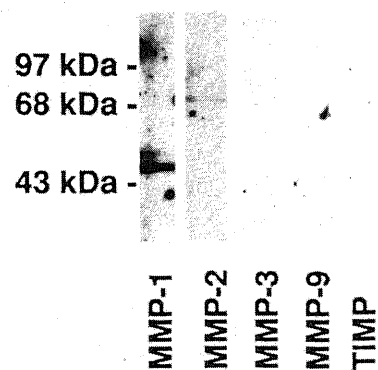


Fig. 5. Immunoblotting of MMPs and TIMP. Concentrated culture medium of cultured human mesangial cells was electrophoresed on a SDS polyacrylamide gel (10% acrylamide) under the reduced conditions. The proteins in the gel were then electrotransferred to a membrane and gelatinase was visualized using anti-MMP-1, -2, -3, -9 and TIMP monoclonal antibodies, showing that 59kDa-, 52kDa-gelatinases were MMP-1 and 72kDa-gelatinase MMP-2. 97kDa, 68kDa and 43kDa: positions of molecular weight markers.

紡錘形の細胞が増殖し始めた (図1b). 4週目で継代培養に移行した後は, 次第に紡錘形細胞の割合が増加してきた (図1c). 2継代目で線維芽細胞を除去するため, D-valine 含有培地で一週間培養を行なった. この時点ではほぼ均一の紡錘状または星状の細胞が得られた (図1d). これらの培養細胞はメサンギウム細胞の骨格線維抗原である desmin が陽性で (図2), 内皮細胞抗

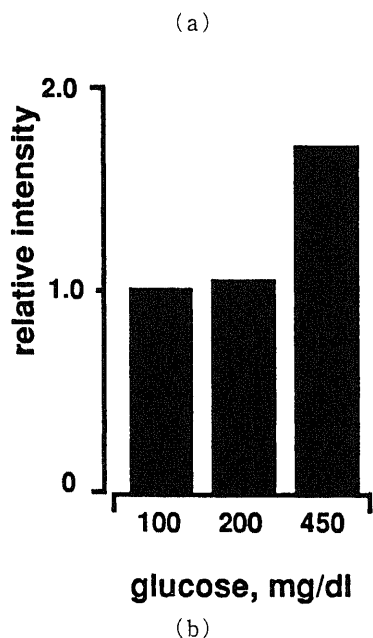
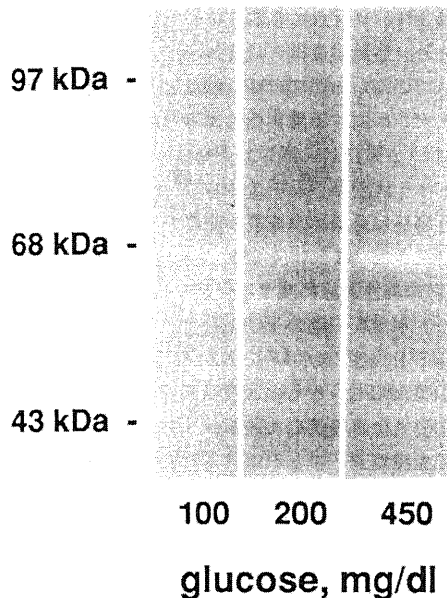


Fig. 6. Induction of gelatinases by exposing the cells to the high concentrations of glucose. Conditioned media from the cells under the various concentrations of glucose (100mg/dl, lane 1; 200mg/dl, lane 2; 450mg/dl, lane 3) were analysed on a gelatin zymogram 97kDa, 68kDa and 43kDa: positions of molecular weight markers. (a). Proteolytic activities were analysed by densitometry (b). Increased activities were observed according to the elevation of the glucose concentration.

原である第Ⅷ因子は陰性, マクロファージ抗原である Ia 抗原も陰性でありメサンギウム細胞と同一した.

## Ⅱ. メサンギウム細胞による MMP の産生

無血清培地で静止状態としたメサンギウム細胞を, さらに糖濃度 200mg/dl RPMI1640 無血清培地で3日間培養して得られた CM のザイモグラムを図3に示す. 非還元状態でのゼラチン-PAGE-ゲルでは, 67kDa, 54kDa, 52kDa および 46kDa に消化活性がみられ, 培養メサンギウム細胞がゼラチン消化酵素を産生していることが示された. この酵素活性は EDTA でのみ抑制され, PMSF, NEM および Pep A では阻害されず (図4), MMP と同定された. CM を還元状態で泳動した後のウエスタンブロッティングの結果では, 抗 MMP-1 抗体にて 59kDa および 52kDa の2本のバンドが得られ, 抗 MMP-2 抗体により 72kDa のバンドが観察された (図5). 今回の条件下では MMP-3, -9 および TIMP は検出されなかった. 非還元状態のザイモグラムで観察された 54kDa のバンドについてはウエスタンブロッティングでは相当するバンドは検出されなかった.

## Ⅲ. 糖濃度変化に対する培養メサンギウム細胞の反応

### 1. MMP の産生

培養メサンギウム細胞への培養液糖濃度の影響は, 静止状態のメサンギウム細胞をさらに糖濃度を 100mg/dl (浸透圧 310mOsm/l), 200mg/dl (浸透圧 324mOsm/l), 450mg/dl (浸透圧 344mOsm/l) と変化させた無血清 Dulbecco's MEM 培地で3日間培養した後の CM で検討した. ザイモグラムでは (図6a), いずれの糖濃度でも分子量 67kDa の MMP-2, また, 52kDa および 46kDa の MMP-1 に一致して酵素活性が認めら

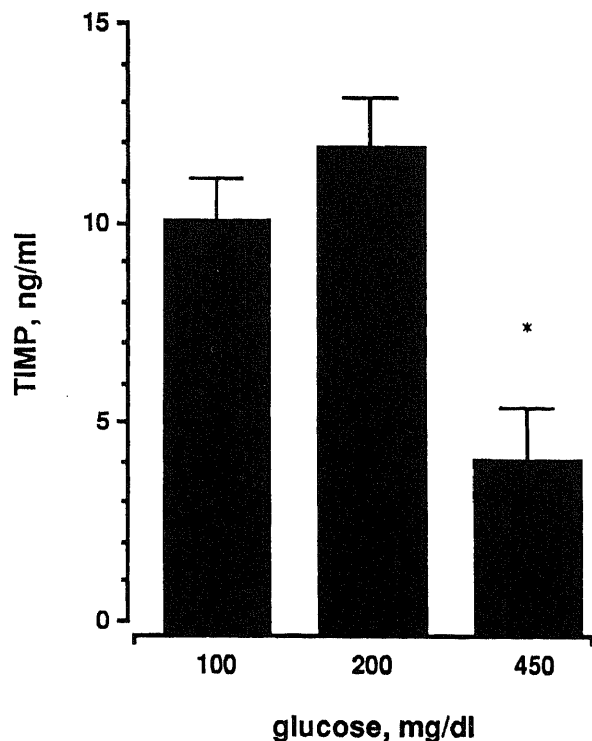


Fig. 7. Secretion of TIMP in response to glucose. TIMP levels in culture media from glucose-treated cells were measured in a sandwich enzyme immunoassay. Data are represented as mean + SE for three samples. \* significantly different from control (P < 0.05).

れた。糖濃度 450mg/dl での分子量 67kDa の活性は糖濃度 100mg/dl に比べ、約1.6倍と増強傾向がみられた (図6b)。CM 中の MMP-3 はザイモグラムおよび EIA では検出されなかった。また、MMP-3 cDNA を用いたノーザンブロットングにおいても MMP-3 mRNA に相当する 2.2kb のバンドは検出されなかった。

## 2. TIMP の産生

MMPs の抑制因子である TIMP の発現は、CM での EIA お

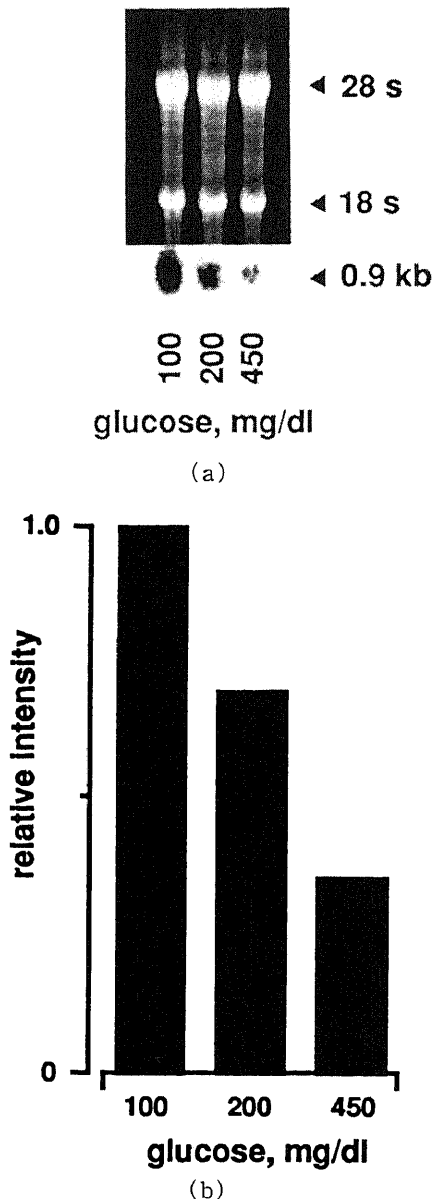


Fig. 8. Expression of TIMP in mesangial cells under glucose treatment. Northern blot analysis using a [ $^{32}$ P]-labeled cDNA probe for TIMP was performed (a). Densitometry of the data shown in (b). The expression of TIMP cDNA in 450mg/dl glucose medium was 35% of 100mg/dl glucose medium. 28s and 18s ribosomes as visualized by ethidium bromide staining. The size of hybridizing transcripts is indicated in kilobase.

よび mRNA の転写レベルで検討した。EIA の TIMP 濃度は糖濃度 450mg/dl 培地では  $4.4 \pm 1.4$  ng/ml と 100mg/dl 培地での  $10.4 \pm 1.1$  ng/ml に比べて有意に低下していた (図7)。同様な傾向は転写レベルでも認められた。図8a にみられるように TIMP cDNA を用いたノーザンブロットングでは 0.9kb にバンドが認められ、TIMP mRNA の表出は 100mg/dl の低糖濃度培地で最も高く、450mg/dl 培地ではその35%の発現を認めるのみであった (図8b)。

## 3. CM の酵素活性

APMA で活性化した CM のⅣ型コラーゲンに対する消化活性を図9に示す。いずれの糖濃度においても、コラーゲナーゼ活性が認められ、各糖濃度間には差がみられなかった。APMA が添加されていない対照では活性はほとんどみられなかった。Ⅰ型コラーゲンに対する酵素活性はみられなかった。

## 考 察

糖尿病性腎症は糸球体基底膜の肥厚およびメサンギウム領域の拡大を特徴とし、これは ECM の蓄積に起因するものとされている<sup>2)</sup>。糖尿病性腎症に関する従来の報告では、主に糸球体またはメサンギウム細胞の ECM 産生系に注目し検討されているが<sup>7)~9)</sup>、ECM 代謝の分解系である MMP および TIMP も重要な役割を果たしているものと推測される。糸球体由来の蛋白分解系に関しては、浸潤白血球がセリンプロテイナーゼを分泌して基底膜を破壊することが報告されているが<sup>20)</sup>、糖尿病性腎

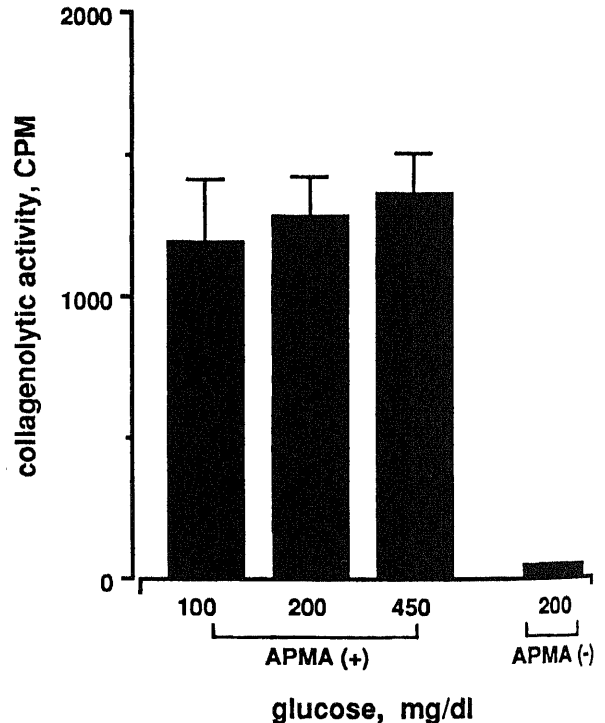


Fig. 9. Type IV-collagenolytic activity in conditioned media. Conditioned media were activated with APMA and incubated with [ $^3$ H]-type IV collagen. The reaction was carried out for 24 hr at 37°C and stopped by TCA. The mixture was centrifuged and the supernatant containing digested products were counted in scintillation counter. The collagenase activity showed little differences among the glucose concentrations.

症では組織学的に浸潤細胞に乏しく、外来細胞の関与は少ないものと思われる。糸球体の在来細胞として上皮細胞およびメサンギウム細胞が蛋白質分解酵素を分泌していることが知られているが<sup>12,28</sup>、糖尿病性腎症ではメサンギウム領域の増生が著明であることより、今回の研究ではメサンギウム細胞に注目し、その MMP および TIMP 産生を検討した。

本研究ではヒト培養メサンギウム細胞から分泌される蛋白質分解系のうち MMP-1, -2, -3, -9 およびそのインヒビターである TIMP につき検討を行なった。その結果、メサンギウム細胞より MMP-1, -2 および TIMP が産生されていることが確認され、糖濃度上昇につれ MMP-1, -2 の産生が160%前後と増加し、一方、TIMP の産生は減少しており、転写レベルでは約1/3に減じていた。これは、糖濃度環境に対し MMP と TIMP の分泌は独立して調節されていることを示している。このような培養条件下での MMP/TIMP 比の増大は結果として分解系の亢進を推測させるが、CM 中には MMP 活性因子が存在しないため MMP は潜在型のままであり、TIMP とは反応していないので CM の総合的な酵素活性は不明である。生体では放出された MMP はプラスミノゲンアクチベーター/プラスミン系により活性化されるが<sup>27,28</sup>、本研究では CM 中の MMP を APMA で活性化し、TIMP と 1 : 1 のモル比で結合させた後<sup>29</sup>、液相での N 型または I 型コラーゲンを基質として総合的な酵素活性を評価した。この結果、各糖濃度で N 型コラーゲンに対する酵素活性がみられ、TIMP 産生の減少および MMP 産生の増加により全体として ECM を分解する方向に調節されていることが裏付けられた。

糸球体内の ECM は主に N 型コラーゲン、フィブロネクチンおよびラミニンから構成されており、また、高糖ではそれらの産生が増加することが報告されていることより<sup>31,32</sup>、本実験では高糖状態で MMP-2, -3, -9 が増加するものと推測していた。しかし、MMP-1 および -2 の産生を確認し得たが、今回は MMP-3, -9 は検出されなかった。培養メサンギウム細胞では、正常のメサンギウム領域には認められない I 型、III 型コラーゲンを産生することが判明しており<sup>30</sup>、今回の MMP-1 産生はこれを分解するために呼応して分泌された可能性が推測される。MMP-3 はフィブロネクチン、ラミニンが反応基質であることに加え、MMP-1 と同じ染色体11に位置していることより<sup>33</sup>、MMP-1 と同時に MMP-3 も誘導されることが期待されたが、今回の条件ではその発現は認められなかった。この点に関しては、MMP-3 の測定感度の問題に加え、MMP-3 発現に要する培養期間の検討も必要であろう。

メサンギウム細胞の培養条件を高糖とすることは、その成育環境の種々の要素を変化させ、その結果 MMP や TIMP の分泌に影響を与えているものと考えられるが、その機序に関しては詳細は不明である。その第一の要素は、糖濃度変化による細胞内外の浸透圧変化である。今回の検討では、培養液中の糖濃度の変化に応じ培養液の浸透圧も310から344mOsm へと上昇していた。一方、細胞内では、高血糖状態では培養メサンギウム細胞中のソルビトール蓄積が糖濃度依存性に上昇し、細胞内外ともに浸透圧が上昇する結果、細胞膜障害が惹起される可能性が推測されている<sup>32</sup>。細胞内では代謝されない3-O-メチル-D-グルコースを浸透圧の対照として培養液中に添加したメサンギウム細胞での検討では、高糖状態で認められた ECM 産生の増加がみられなくなる<sup>9</sup>。これは単に糖による浸透圧の変化だけ

ではなく、メサンギウム細胞が ECM を産生する際には糖が細胞内にとりこまれ、さらに糖代謝系に供給される必要があるものと推測され、MMP や TIMP の蛋白合成に関しても同様の機構が作用しているものと考えられる。

次に非酵素的蛋白糖化の関与も MMP および TIMP 産生に大きい役割を有しているのであろう。糖尿病ではヘモグロビン A1c に代表されるように、種々の蛋白質の酵素を介さない糖化 (nonenzymatic glycosylation) が生ずることが知られている<sup>33</sup>。糖尿病ラットより単離した糸球体基底膜では糖化が有意に増加しており<sup>10</sup>、さらにこの糖化基底膜は MMP でも分解されにくいといわれている<sup>30</sup>。この結果、蓄積した糖化 ECM が、これを分解させるため MMP の産生を刺激する可能性はある。しかし、本実験のような3日間という短期間での培養では糖化した ECM の産生は少なく、糖尿病状態における程には役割は大きくないであろう。ただし、高糖培地において短期間で十分形成されうる初期糖化産物 (early glycosylation product) があり<sup>9</sup>、ECM がこの糖化に陥れば、正常環境と異なる情報を細胞内情報伝達系に送り、MMP や TIMP の産生に影響を与えるのであろう。

第三の可能性は接着因子であるインテグリンの関与である。細胞の機能を考えるうえで、細胞周囲の ECM と細胞間との接着そのものが細胞に与える情報は重要なものである<sup>34</sup>。培養細胞を種々のマトリックスで塗布したプレートで培養すると、細胞の増殖、分泌能が変化するが、これはインテグリンを介して細胞内情報伝達系が活性化されたためと考えられている<sup>35</sup>。高糖で ECM の産生が亢進していれば<sup>29,31,32</sup>、これがインテグリンを介して新たな細胞刺激となり MMP や TIMP の産生に影響するであろう。糸球体においても、 $\beta_1$ -インテグリンが糸球体上皮、内皮およびメサンギウム細胞に分布していることが報告され<sup>36</sup>、進行性糸球体疾患でメサンギウム細胞に  $\beta_1$ -インテグリンが増加していることが示されている<sup>37</sup>。

今回の検討では糖尿病状態の一つのモデルとして、高糖でのメサンギウム細胞の反応を検討した。しかし、これは必ずしも糖尿病のモデルとはいえない。糖尿病は非常に長期間をかけた代謝異常であるにもかかわらず、メサンギウム細胞は3日という短期間で大きな変化を呈したことは、単に正常細胞の反応を意味するものかもしれない。糖尿病状態に陥りすでに代謝異常をきたしている病的メサンギウム細胞であれば ECM の分解系は機能低下をきたしている可能性が考えられる。今後は、長期間にわたる高糖培養のメサンギウム細胞への影響、さらに生体における糖尿病性腎症での MMP や TIMP の代謝機能などの検討が必要と考えている。

## 結 論

ヒト培養メサンギウム細胞を用い、培養液糖濃度を変化させ、細胞外基質代謝に関わる MMP および TIMP の産生およびその調節機構を検討し、以下の結果を得た。

1. ヒト培養メサンギウム細胞から MMP-1, MMP-2 および TIMP の産生が確認された。
2. MMP の酵素活性はザイモグラムを用いた検討で、培養液上清中の糖濃度の上昇により約160%増加した。一方、TIMP は 450mg/dl 培地では 100mg/dl 培地に比べ、蛋白濃度で約40%に、また転写レベルで約1/3に減少していた。
3. 液相での N 型コラーゲンをを用いたコラーゲナーゼアッセイ



では RPMI1640 培地および各糖濃度の Dulbecco's MEM において、いずれにも IV 型コラーゲンに対するコラーゲナーゼ総活性がみられた。このことは、いずれの糖濃度でも MMP が TIMP に対し優位であることを示し、この条件下では ECM 分解に働いている可能性が示唆された。

以上の結果より、今回の条件下では培養液糖濃度を上昇させることにより、MMP および TIMP は ECM を分解する傾向にあることが示された。このバランスのくずれが、糖尿病性腎症におけるメサンギウム基質の増生および基底膜の肥厚をもたらすものと推測される。

#### 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恩師金沢大学医療技術短期大学部友杉直久助教授に心から感謝いたします。MMP, TIMP のモノクローナル抗体および cDNA を快く供与下さいました金沢大学医療技術短期大学部岡田保典助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腎・高血圧班の諸先生に深謝いたします。

なお、本論文の要旨は第34回日本腎臓学会総会(1991年、岡山)において発表した。

#### 文 献

- 1) Reddi, A. S. & Camerini-Davalos, R. A.: Diabetic nephropathy. An update. *Arch. Intern. Med.*, **150**, 31-43 (1990).
- 2) Killen, P. D.: Sclerosis: a glomerular response to injury. *Semin. Nephrol.*, **11**, 354-360 (1991).
- 3) Nishimura, S., Makino, H. & Ota, Z.: Three-dimensional ultrastructural changes of acellular glomerular basement membrane in various types of human glomerulonephritis. *Nephron*, **53**, 9-17 (1989).
- 4) Mogensen, C. M.: Microalbuminuria as a predictor of clinical diabetic nephropathy. *Kidney Int.*, **31**, 673-689 (1987).
- 5) Tung, P. & Levin, S. R.: Nephropathy in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Am. J. Med.*, **85** (Suppl 5A), 131-136 (1988).
- 6) Border, W. A., Okuda, S. & Nakamura, T.: Extracellular matrix and glomerular disease. *Semin. Nephrol.*, **9**, 307-317 (1989).
- 7) 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).
- 8) Ledbetter, S., Copeland, E. J., Noonan, D., Vogeli, G. & Hassell, J. R.: Altered steady-state mRNA levels of basement membrane proteins in diabetic mouse kidneys and thromboxane synthase inhibition. *Diabetes*, **39**, 196-203 (1990).
- 9) Ayo, S. H., Radnik, R. A., Glass II, W. F., Garoni, J. A., Rampt, E. R., Appling, D. R. & Kreisberg, J. I.: Increased extracellular matrix synthesis and mRNA in mesangial cells grown in high-glucose medium. *Am. J. Physiol.*, **260** (Renal Fluid Electrolyte Physiol. **29**), F185-F191 (1991).
- 10) Ayo, S. H., Radnik, R. A., Garoni, J. A., Glass II, W. F. & Kreisberg, J. I.: High glucose causes an increase in extracellular matrix proteins in cultured mesangial cells. *Am. J. Pathol.*, **136**, 1339-1348 (1990).
- 11) Baricos, W. H., Cortez, S. L., Le, Q. C., Zhou, Y., Dicarlo, R. M., O'Connor, S. E. & Shah, S. V.: Glomerular basement membrane degradation by endogenous cysteine proteinase in isolated rat glomeruli. *Kidney Int.*, **38**, 395-401 (1990).
- 12) Martin, J., Thomas, G. & Lovett, D. H.: Human mesangial cells secrete a GBM-degrading neutral proteinase and a specific inhibitor. *Kidney Int.*, **36**, 790-801 (1989).
- 13) Okada, Y., Tsuchiya, H., Shimizu, H., Tomita, K., Nakanishi, I., Sato, H., Seiki, M., Yamashita, K. & Hayakawa, T.: Induction and stimulation of 92-kDa gelatinase/type IV collagenase production in osteosarcoma and fibrosarcoma cell lines by tumor necrosis factor  $\alpha$ . *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **171**, 610-617 (1990).
- 14) Cohen, M. P., Urdanivia, E., Surma, M. & Wu, V. Y.: Increased glycosylation of glomerular basement collagen in diabetes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **95**, 765-769 (1980).
- 15) Krakowar, C. A. & Greenspon, S. A.: Localization of the nephrotoxic antigen within the isolated renal glomerulus. *Am. Med. Assoc. Pathol.*, **51**, 629-639 (1951).
- 16) Gilbert, S. F. & Migeon, B. R.: D-Valine as a selective agent for normal human and rodent epithelial cells in culture. *Cell*, **5**, 11-17 (1975).
- 17) Lovett, D. H., Sterzel, R. B., Kashgarian, M. & Ryan, J. L.: Neutral proteinase activity produced in vitro by cells of the glomerular mesangium. *Kidney Int.*, **23**, 342-349 (1983).
- 18) Striker, G. E. & Striker, L. J.: Biology of disease. Glomerular cell culture. *Lab. Invest.*, **53**, 122-131 (1985).
- 19) Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685 (1970).
- 20) Hibbs, M. S., Hasty, 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).
- 21) 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).
- 22) Liotta, L. A., Tryggvason, K., Garbisa, S., Robey, P. G. & Abe, S.: Partial purification and characterization of a neutral proteinase which cleaves type IV collagen. *Biochemistry*, **20**, 100-104 (1981).
- 23) Kodama, S., Iwata, K., Iwata, H., Yamashita, K. & Hayakawa, T.: Rapid one-step sandwich enzyme immunoassay for tissue inhibitor of metalloproteinases. *An*

- application for rheumatoid arthritis serum and plasma. *J. Immunol. Methods*, **127**, 103-108 (1990).
- 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) Baricos, W. H. & Shah, S. V.: Glomerular injury and proteolytic enzyme. *Semin. Nephrol.*, **11**, 327-331 (1990).
- 26) Yamabe, H., Chen, Y. P., Cambell, C., Johnson, R. & Couser, W. G.: Glomerular epithelial cells (GEC) produce a metalloenzyme proteinase capable of degrading glomerular basement membrane (GBM). *J. Am. Soc. Nephrol.*, **1**, 556 (1991).
- 27) Salo, T., Liotta, L. A., Keski-Oja, J., Turpeenniemi-Hujanen, T. & Tryggvason, K.: Secretion of basement membrane collagen degrading enzyme and plasminogen activator by transformed cells-role in metastasis. *Int. J. Cancer*, **30**, 669-673 (1982).
- 28) Tryggvason, K., Höyhtöy, M. & Salo, T.: Proteolytic degradation of extracellular matrix in tumor invasion. *Biochem. Biophys. Acta*, **907**, 191-217 (1987).
- 29) Okada, Y., Watanabe, S., Nakanishi, I., 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).
- 30) Striker, G. E., Killen, P. & Farin, F. M.: Human glomerular cells in vitro: isolation and characterization. *Transplant. Proc.*, **12** (Suppl 1), 88-99 (1980).
- 31) Spurr, N. K., Gough, A. C., Gosden, J., Rout, D., Proteous, D. J., Heyningen, V. V. & Docherty, A. J. P.: Restriction fragment length polymorphism analysis and assignment of the metalloproteinases stromelysin and collagenase to the long arm of chromosome 11. *Genomics*, **2**, 119-127 (1988).
- 32) Kikkawa, R., Umehara, K., Haneda, M., Arimura, T., Ebata, K. & Shigeta, Y.: Evidence of existence of polyol pathway in cultured rat mesangial cells. *Diabetes*, **36**, 240-243 (1987).
- 33) Brownlee, M., Vlassara, H. & Cerami, A.: Nonenzymatic glycosylation and pathogenesis of diabetic complications. *Ann. Intern. Med.*, **101**, 527-537 (1984).
- 34) Lubec, G. & Pollak, A.: Reduced susceptibility of nonenzymatically glycosylated glomerular basement to proteases: is thickening of diabetic glomerular basement membranes due to reduced proteolytic degradation? *Renal Physiol.*, **3**, 4-8 (1980).
- 35) Burridge, K., Fath, K., Kelly, T., Nuckolls, G. & Turner, C.: Focal adhesions: transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Annu. Rev. Cell Biol.*, **4**, 487-525 (1988).
- 36) Korhonen, M., Yläne, J., Laitinen, L. & Virtanen, I.: Distribution of  $\beta_1$  and  $\beta_3$  integrins in human fetal and adult kidney. *Lab. Invest.*, **62**, 616-625 (1990).
- 37) Kerjaschki, D., Ojha, P. P., Susani, M., Horvat, R., Binder, S., Hovorka, A., Hillemanns, P. & Pytela, R.: A  $\beta_1$ -integrin receptor for fibronectin in human kidney glomeruli. *Am. J. Pathol.*, **134**, 481-489 (1989).

**Effects of High Glucose on the Production of Metalloproteinase and Tissue Inhibitor of Metalloproteinase by Cultured Human Mesangial Cells** Takashi Wada, Department of Internal Medicine (I), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920 — J. Juzen Med Soc., **101**, 365 — 374 (1992)

**Key words** human mesangial cell, glucose, matrix metalloproteinase, tissue inhibitor of metalloproteinase

#### Abstract

Expansion of glomerular extracellular matrix (ECM) (glomerular basement membrane and mesangial matrix) is pathogenic of diabetic nephropathy. The regulatory factors during the disease states which govern the degradation of the ECM remain poorly understood. These structures consist primarily of type IV collagen, fibronectin and laminin, which are degraded by matrix metalloproteinases (MMP). A potential mechanism in renal disease could involve the production by mesangial cells of ECM, MMPs and its inhibitor. In this study, to elucidate the metabolism between production and degradation of ECM in the diabetic state, the effects of glucose on the induction of MMPs and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) from human mesangial cells were examined. Human mesangial cells cultured in serum-free medium secreted proteinases and TIMP. The proteinases consisted of gelatinolytic enzymes with molecular weights of 67, 52 and 46 kDa and were inhibited by ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), but not by phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), N-ethylmaleimide (NEM) or pepstatin A (Pep A), indicating that they were MMPs. The 67-kDa proteinase was confirmed as MMP-2, and both 52 and 46kDa were identified as MMP-1 by Western blotting. Three-day growth in 450 mg/dl glucose resulted in 160% increase in the synthesis of MMP-2 compared with cells grown in 100 mg/dl glucose, as judged by gelatinolytic activities. MMP-3 was detected in neither protein production nor gene expression. On the other hand, the production of TIMP by cells grown in 450 mg/dl glucose was decreased to 60% less than that of cells grown in 100 mg/dl glucose. Northern blot analysis of the steady-state mRNA of TIMP in high-glucose medium also indicated a one third-fold reduction of TIMP transcription after 72-hr treatment with 100 mg/dl glucose. Total proteinase activity against type IV collagen activated by 4-aminophenyl mercuric acetate was still observed in each conditioned medium in which TIMP is bound to activated MMPs. These findings suggest that a high glucose condition exerts a selective effect on ECM accumulation by modulating MMPs and TIMP expression in mesangial cells. The imbalance of these factors may play an important role in the turnover of the glomerular ECM in the diabetic condition.