◆原 著◆

小児慢性腎炎における matrix metalloproteinase-9 の検討

中村 可奈^{*1}・島 雅昭^{*1}・山本 威久^{*2}・中島 滋郎^{*1}松本小百合^{*1}・志水 信彦^{*1}・平井 治彦^{*1}・岡田伸太郎^{*1}

要 旨

matrix metalloproteinase-9 (以下, MMP-9) は, ゼラチンをはじめ糸球体基底膜の主成分であるIV型 collagen やV型 collagen の分解活性を持つことが知られている。ヒト腎炎の病態における MMP-9 の役割については未だ明らかでない。今回我々は小児慢性腎炎16例を対象とし, 単離糸球体培養上清および尿中 MMP-9 を gelatin zymography 法と ELISA 法を用いて解析した。メサンギウム細胞増殖の程度により Focal 群と Diffuse 群に分けて検討したところ, Diffuse 群において糸球体培養上清および尿中 MMP-9 量は増加していた。また, 治療による尿蛋白量の減少に伴い, 尿中 MMP-9 も減少した。このことから, MMP-9 は小児慢性腎炎における糸球体基底膜障害に重要な役割を果たしているものと推察された。

序 言

matrix metalloproteinase (以下, MMP) は, 細胞外基質成分に対して高い特異性を示し, 細胞外基質分解

酵素の中で最も重要なものの1つである¹⁾。MMP は活性中心に Zn^{2+} を持ち, 前駆体 (proMMP) として分泌され, serine protease や他の MMP により活性化されるが, 活性化されると一般的に分子量が約10kD 減少する。一次構造の類似性と基質特異性によりコラゲナーゼ群, ゼラチナーゼ群, ストロメライシン群, pexin-like domain を欠く MMP-7 と MT-MMP 群の5群に分類される。このうちゼラチナーゼ群に属する MMP-9 (proMMP-9 の分子量92kD) は, 主に好中球およびマクロファージなどの炎症細胞により産生され, 間葉系細胞には見られないとされている。しかしながら, サイトカインや増殖因子で処理した間葉系細胞や癌細胞などの形質転換を起こした異常細胞からの産生は認められている²⁾。実験腎炎では, ラット Thy-1 腎炎で MMP-2 の関与を示唆する報告があり^{3,4)}, またラットハイマン腎炎において MMP-9 が糸球体基底膜障害に関与することが報告^{5,6)}されているが, これは MMP-2 と MMP-9 が糸球体基底膜の主成分であるIV型 collagen の分解活性を持つことに由来すると考えられる。一方, ヒト腎炎の病態における MMP の役割については未だ明らかでない。

今回, 小児慢性腎炎を対象とし, 初回腎生検時の糸球体培養上清および尿中 MMP-9 を解析し, 腎炎の組織病変の程度や病勢と MMP-9 の関連について検討した。

対 象

腎生検を施行した小児慢性腎炎16例で, その内訳は,

Key Words : 小児慢性腎炎
MMP-9
gelatin zymography 法
mesangial matrix

^{*1}大阪大学医学部 小児科
(〒565-0871 吹田市山田丘2-2)

^{*2}箕面市立病院 小児科
A role of matrix metalloproteinase-9 in patients with chronic glomerulonephritis in childhood.

Kana Nakamura^{*1}, Masaaki Shima^{*1}, Takehisa Yamamoto^{*2}, Shigeo Nakajima^{*1}, Sayuri Matsumoto^{*1}, Nobuhiko Shimizu^{*1}, Haruhiko Hirai^{*1}, Shintaro Okada^{*1}

^{*1}Department of Pediatrics, Osaka University, Faculty of Medicine

^{*2}Department of Pediatrics, Minoh Municipal Hospital

図1 小兒慢性腎炎患者の尿 zymogram
Focal 群 4 例, Diffuse 群 4 例の比較を示す。

表1 経過中の尿中 MMP-9

	尿中MMP-9 (ng/mgCr)
尿1	53.28
尿2	0
尿3	0

図2a IgA 腎症の1例の臨床経過

PSL: prednisolone, CPA: cyclophosphamide, AZA: azathioprine

IgA 腎症10例, 紫斑病性腎炎 3 例, メサンギウム増殖性腎炎 3 例である。これらの症例を腎炎のメサンギウム増殖の程度により Diffuse 群10例と Focal 群 6 例に分けて検討した。

方 法

1. 単離糸球体培養上清の検討

腎生検検体の一部より bacterial collagenase 処理をせず, 実体顕微鏡下で糸球体を単離した。1 well あたり 5 個の単離糸球体を0.1%BSA を添加した50 μ l の RPMI 1640中で72時間培養後, 上清を回収し, gelatin zymography 法にて MMP-9 を検討した。

図2b
糸球体培養上清および経過中の尿 zymogram

2. 尿の検討

患児の早朝第1尿を3,500回転で5分間遠心後, gelatin zymography 法および ELISA 法にて MMP-9 を検討した。白血球が1視野に5個以上見られた尿は対象から除外した。

3. gelatin zymography 法

検体10 μ lを同量の sample buffer と混和し, 1 mg/mlの gelatin を添加した10% acrylamide gel 内で展開した。2.5% Triton X 中でゲルを洗浄後, buffer (50 mM Tris - HCl (pH=8.0), 5 mM CaCl₂, 0.5 μ M ZnCl₂) 内で37°C, 24時間 incubate し, 0.25% Coomassie brilliant blue R を用いて30分間染色した。

結 果

糸球体培養上清の zymography における検討では, Focal 群の 6 例中 4 例に, Diffuse 群の10例中 9 例に MMP-9 を認めた。Focal 群に比し Diffuse 群での MMP-9 の lytic band は明瞭であった。

尿(図1)では、Focal 群においては全例 zymography と ELISA 法で MMP-9 を認めなかった。Diffuse 群では、zymography で10例中9例に MMP-9 を認め、ELISA 法にても4例で陽性であった。

また、治療による MMP-9 の変化をみるため、IgA 腎症の1例において経時的に尿を採取し、MMP-9 を検討した。症例は9歳男児で、治療当初1日尿蛋白量は3g程度認められていた。この例では治療開始早期の糸球体培養上清および尿1において MMP-9 を認めた(図2a, b)。副腎皮質ステロイド、免疫抑制剤、ジピリダモール、ワーファリンによるカクテル療法を施行し、尿蛋白は漸次減少した(図2a)。治療による尿蛋白の減少に伴い、zymography では尿中 MMP-9 の減少、消失をみとめ(図2b)、ELISA 法による測定でも MMP-9 は減少した(表1)。治療により寛解が得られた他の小児慢性腎炎症例においても尿中 MMP-9 の減少および消失がみられ、腎炎の病勢と MMP-9 はよく一致していた。

考 察

MMP-9 は糸球体基底膜の主成分であるIV型 collagen の分解活性を持つとされ、ヒト腎炎の進展にも何らかの関与をしているものと考えられるが、ヒト腎炎の病態において関連性を検討した報告は少ない⁹⁾。

尿管および尿道からの MMP-9 分泌はほとんどみられないと考えられ、糸球体培養上清で MMP-9 が認められたことより、尿中 MMP-9 は糸球体由来であると推察された。今回、MMP-9 分泌細胞に関しては同定し得ていないが、腎糸球体内に存在する細胞で MMP-9 分泌細胞は、メサングウム細胞、糸球体上皮細胞、マクロファージを含む浸潤白血球が考えられる。ヒトメサングウム細胞の培養上清中から92kD gelatinase を精製したとの報告⁷⁾、IL-1 や TPA による刺激で MMP-9 分泌が増加したとする報告⁸⁾もみられるので、何らかのサイトカインによる刺激を受けたメサングウム細胞が分泌している可能性が考えられる。また、ラットハイマン腎炎において糸球体上皮細胞が MMP-9 を産生したとする報告⁵⁾、その発現は最大尿蛋白の時期と一致したとする報告⁶⁾など、糸球体上皮細胞の分泌を示唆する報告も散見される。一方、慢性腎炎に浸潤マクロファージが関与しているとする報告は数多くみられ、糸球体固有細胞ではないこれらの浸潤細胞によって分泌されている可能性も否定できない¹⁰⁾。

今回、組織病変をメサングウム細胞増殖の程度により

Diffuse 群と Focal 群に分類して検討した結果、Diffuse 群で MMP-9 が多く認められたが、MMP-9 が細胞増殖に直接関与するという報告はなく、二次的な結果であると推察された。

また、IgA 腎症の1例において、治療後尿蛋白が減少し、尿中 MMP-9 も減少した症例を呈示したが、この1例以外にも治療の経過により尿中 MMP-9 の減少消失をみた症例を数例経験しており、尿中 MMP-9 は腎炎の病勢も反映するものと考えられた。

結 論

MMP-9 は小児慢性腎炎における糸球体基底膜障害およびメサングウム基質障害に重要な役割を果たしていることが推察された。

文 献

- 1) 高橋孝宗, 丸山直記: 細胞外基質一分解. 腎と透析 37(6): 1111-1115, 1994.
- 2) 永瀬秀明: プロテアーゼと生体機能. 7. マトリックスメタロプロテアーゼ 現代化学増刊 22, 東京化学同人, 東京 p 56~67, 1993.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) Watanabe, K., Kinoshita, S., Nakagawa, H.: Gelatinase secretion by glomerular epithelial cells. *Nephron.* 56: 405-409, 1990.
- 6) MacMillan, J.I., Riordan, J.W., Couser, W.G., Pollock, A.S., Lovett, D.H.: Characterization of a glomerular epithelial cell metalloproteinase as matrix metalloproteinase-9 with enhanced expression in a model of membranous nephropathy. *J. Clin. Invest.* 97: 1094-1101, 1996.
- 7) Sorbi, D., Fadly, M., Hicks, R., Alexander, S., Arbeit, L.: Captopril inhibits the 72 kDa and 92 kDa matrix metalloproteinases. *Kidney Int.* 44: 1266-1272, 1993.
- 8) Martin, J., Knowlden, J., Davies, M., Williams, J. D.: Identification and independent regulation of human mesangial cell metalloproteinases. *Kidney Int.* 46: 877-885, 1994.
- 9) Koide, H., Nakamura, T., Ebihara, I., Tomono, Y.: Increased mRNA expression of metalloproteinase-9 in peripheral blood monocyte from patients with Immunglobulin A nephropathy. *Am. J. Kid. Dis.* 28: 32-39, 1996.
- 10) Yoshioka, K., Takemura, T., Murakami, K., Okada, M., Yagi, K., Miyazato, H., Matsushima, K. and Maki, S.: In situ expression of cytokines in IgA nephritis. *Kidney Int.* 44: 825-833, 1993.