アンジオテンシンII (Ang II) によるメサンギウム細胞 (MC) の TGF- β 発現・活性化調節

——糸球体硬化機序における Ang IIの役割——

香美 祥二^{*1}・Wayne A. Border^{*2}・Nancy A. Noble^{*2}

要 旨

アンジオテンシンII (Ang II) は、メサンギウム細胞 (MC) の TGF- β 発現増加作用を介して、糸球体硬化に関与しているのではと仮説を立て実験を行った。培養 MC は Ang II刺激により、TGF- β や細胞外基質 (ECM) 成分の産生が mRNA と蛋白の両レベルで増加した。この Ang IIの MC 刺激作用は、培養上清への抗 TGF- β 抗体の同時添加により阻害された。ラットに miniosmotic pump を用い Ang IIを1週間持続投与したところ、糸球体の TGF- β と ECM 成分の発現がコントロールの約2倍に増加した。以上より、Ang IIは慢性腎炎や糖尿病性腎症において異常蓄積することが知られている ECM 成分の MC 合成を増加させた。そして、この刺激作用は MC の TGF- β の発現増加を介していることが示唆された。

緒 言

著明なメサンギウム基質の蓄積像は、糸球体硬化症に至る進行性腎炎に共通した組織学的所見である¹⁾²⁾。私たちは、ラット実験腎炎モデルを用いサイトカインの一つである Transforming growth factor- β (TGF- β) が糸球体硬化の発症に重要な因子であることを報告してきた^{3)~6)}。一方、一連の実験および臨床結果より腎内のレニン-アンジオテンシン系 (RAS) も糸球体血流動態のみならず糸球体の発育や硬化に重要な働きをしてことが示唆されている⁷⁾⁸⁾。すなわち、アンジオテンシン変換酵素阻害薬 (ACEI) や Ang IIレセプターアンタゴニストは、種々の腎炎モデルに見られる糸球体硬化や間質の線維化の発症を抑制し、また臨床的トライアルでも、ヒト腎炎の進行を遅らせるという報告が相次いでいる^{9)~14)}。さらに培養メサンギウム細胞 (MC) を用いた研究より、Ang IIは MC のコラーゲン (COL I) などの基質成分の生産を刺激することが示されている¹⁵⁾。

ごく最近、Ang IIが平滑筋細胞の TGF- β を含むサイトカイン群の発現を増加させることにより、細胞自身の機能 (増殖や肥大) を修飾しているという報告がなされた¹⁶⁾¹⁷⁾。TGF- β は、明らか

^{*1}国立療養所東徳島病院 小児科
(〒779-01 徳島県板野郡板野町大寺字大向北1-1)

^{*2}ユタ大学医学部腎臓内科

Angiotensin II regulates increase of TGF- β expression and activation by rat mesangial cells

Shoji Kagami^{*1}, Wayne A. Border^{*2}, Nancy A. Noble^{*2}

^{*1}Dept. of Pediatrics, Higashi Tokushima Hospital, Tokushima, Japan. ^{*2}Dept. of Nephrology, University of Utah, Utah, USA

Key Words : Angiotensin II
Glomerulosclerosis
TGF- β

に糸球体細胞外基質 (ECM) 成分の産生と沈着を高める強力な因子であり、そしてまた MC と平滑筋細胞の発生学的、組織学的、機能的類似性より¹⁸⁾、私たちは、Ang II は MC の TGF- β 発現増加作用を介して糸球体硬化に関与しているのではと仮説を立て実験を行った。

方 法

1) メサンギウム細胞 (MC) 培養

MC は 4~6 週齢 Sprague-Dawley ラットの腎臓より取り出した糸球体を用い、定法にしたがって培養、同定した。培養液は 18% fetal bovine serum (Hyclone Laboratory) 加 RPMI 1640 (Sigma) に 100 u/ml penicillin, 100 ug/ml streptomycin, 0.1 U/ml insulin, 25 mM Hepes を加えたものを用いた。実験には 5~9 代の MC を用いた。

2) 細胞増殖および蛋白合成の測定

24 well plate (Coster) にて confluent に達した MC を、48 時間無血清培養することにより増殖を停止した quiescent MC を得た。その後、MC を Ang II (Sigma) 10^{-6} M から 10^{-12} M の濃度で刺激し、48 時間後の増殖および蛋白合成能を、 3 H-thymidine (1 μ Ci/well) (Dupont), 35 S-methionine (100 uCi/well) (Dupont) をそれぞれハーベスト前 12 時間加えることにより測定した。

3) 35 S-methionine と 35 S-sulfate による代謝標識と免疫沈降法

Quiescent MC を Ang II 10^{-6} M にて 38 時間刺激した後、 35 S-methionine (100 uCi/well) と 35 S-sulfate (100 uCi/ml) をそれぞれ 12 時間添加することにより代謝標識した。同時に、Ang II の competitive inhibitor である saralasin (Sara) (Sigama) を coincubation しその影響を検討した。免疫沈降法は従来の方法に従い、抗フィブロネクチン (FN) 抗体 (Telios), 抗 I 型コラーゲン (COL I) 抗体 (Chemicon) をもちいて行った³⁾。バイグリカン (BG) 合成の変化は、 35 S-sulfate で代謝標識した培養上清を SDS-PAGE で泳動し分析した³⁾。

4) MC 培養上清中の潜在型ならびに活性型

TGF- β 蛋白の測定法

Quiescent MC を Ang II 10^{-6} M 存在下、48 時間培養し上清を得た。上清中の活性型 TGF- β 蛋白の測定は定法の mink lung epithelial cell (MV 1 Lv cell) を用いた bioassay にて行った¹⁷⁾。潜在型 TGF- β 蛋白は、培養上清を 10 NHC 1 にて酸処理し活性型に変換することにより測定した。TGF- β 蛋白測定の特異性は抗 TGF- β IgG 抗体 (R&D) とコントロール IgG (R&D) を用いた競合試験にて確認した。

5) mRNA レベルの測定

培養 MC あるいは単離ラット糸球体を 4 M guanidinium thiocyanate により溶解し、CsCl を用いた超遠心法にて total RNA を抽出した。Northern blot (NB) は 20 ug RNA/lane を 1.2% agarose gel で電気泳動した後、ナイロンフィルターに転写した。同一フィルターで特異的 cDNA probes と hybridization を繰り返し、フィルムに感光させ densitometer で定量し、mRNA レベルの変化を比較した。Hybridization に使用した cDNA probes は TGF- β_1 (MU 15), バイグリカン (P 16), I 型プロコラーゲン (P α 1 R 1), グリセルアルデヒド脱水素酵素 (ラット GAPDH) 等である^{19)~22)}。フィブロネクチン mRNA 検出のためには、ラットフィブロネクチン シークエンスに基づき作成した oligonucleotide probe を使用した。

6) In vivo での Ang II 持続投与法

Sprague-Dawley ラットの皮下に miniosmotic pump (Alzet) を移植し、Ang II (100 ng/min) を 1 週間持続投与した。その後、糸球体単離を行い、NB にて TGF- β_1 と I 型コラーゲンの発現変化を検索した。

結 果

1) Ang II による MC の TGF- β ならびに基質成分 mRNA 発現への作用

Quiescent MC に Ang II 10^{-6} M を添加し、経時的に MC の TGF- β や ECM 成分 (FN, COL I, BG) の発現変化を NB 法にて検討した (図 1)。MC の TGF- β mRNA シグナルは Ang II 刺激前

図1 Northern blot of mRNA from quiescent mesangial cells treated with 10^{-6} M Ang II for increasing times. A, TGF- β ; B, biglycan; C, fibronectin; D, collagen type I; and E, GAPDH.

ではごく弱く発現していたが、刺激後4時間目には3倍以上に増強し、8時間目には6倍となっていた。刺激後48時間目でも、なお3倍以上増加していた。TGF- β が強く発現誘導することが知られているBG, FN, COLIのmRNAレベルは刺激後8時間後より有意に増加し、48時間目はそれぞれ4.9, 4.3, 2.8倍であった。Ang IIの濃度変化に対するMCの反応を調べたところ、図2の如く、刺激後24時間目ではAng II 10^{-6} Mから 10^{-12} MまでそれぞれのmRNAシグナルは濃度依存性の増加を示した。Ang IIのレセプター結合のcompetitive inhibitorであるSara (10^{-5} M)と、Ang IIのcoincubationによりAng IIによる上述の

図2 Northern blot of dose dependency of mRNA levels in response to incubation of quiescent mesangial cells to Ang II. A, TGF- β ; B, biglycan; C, fibronectin; D, collagen type I; and E, GAPDH.

mRNA発現増強作用が抑制された(図3)。

2) Ang II刺激後のMC培養上清中のTGF- β 活性

Ang IIによるMCのTGF- β mRNA発現変化がTGF- β 蛋白の合成変化を伴っているかどうかをmink lung cell bioassayにて検定した(図4)。無刺激条件下のMC培養上清の活性型TGF- β 蛋白は平均0.24 ng/mlほどであるが、Ang II 10^{-8} Mを添加することにより2.9 ng/mlと有意に増加した。また、この増加したTGF- β 活性は、抗TGF- β 抗体のcoincubationにより完全に中和することができた。培養上清を酸性化することにより測定した全TGF- β 蛋白は、無刺激では平均2.1 ng/ml

図3 Northern blot of effect of effect of saralasin on Ang II-induced increases in mesangial cell mRNA. A, TGF- β ; B, biglycan; C, fibronectin; D, collagen type I; and E, GAPDH.

であり、一方、Ang II刺激後では全 TGF- β 蛋白が6.3 ng/ml と増加していた。以上より無刺激条件下の培養上清では全 TGF- β 蛋白のうち11%が活性型 TGF- β であり、Ang II刺激条件下では全 TGF- β 蛋白の45%が活性型を占めることとなる。つまり、Ang IIは潜在型と活性型 TGF- β 蛋白の生産増加のみならず、潜在型 TGF- β から活性型への変換も同時に促進していた。

3) Ang IIによる MC の ECM 成分合成への作用

Ang II (10^{-8} M) 刺激後、MC の ECM 成分の mRNA 発現変化に一致して FN(コントロールの4.1倍)、COL I (3.5倍)、BG (2.4倍) らの蛋白合成増加が見られ(図5)、これらの変化はやはり

図4 Effect of 10^{-8} M Ang II on TGF- β bioactivity before and after acidification of culture medium as measured by the standard MV1 bioassay. Open bar represent mean $\pm$ SD of TGF- β in culture supernatant from six mesangial cell cultures stimulated with and without 10^{-8} M Ang II. Hatched bars represent mean $\pm$ SD of TGF- β activities of the same culture supernatants after transient acidification to activate latent TGF- β . The black bar represents the mean $\pm$ SD of TGF- β activities in presence of both Ang II and neutralizing antibody to TGF- β .

Sala (10^{-5} M) との coincubation により抑制されていた。

4) Ang IIの MC 刺激作用への抗 TGF- β 抗体 coincubation の効果

Ang IIによる MC の ECM 成分の合成刺激作用が、オートクライン TGF- β 分泌作用を介しているかどうかを、抗 TGF- β 抗体 (100 μ g/ml) と同量のコントロール IgG を用いて調べた。図6の如く、Ang II (10^{-8} M) による ECM 成分 (FN, COL I, BG) の合成増加は抗 TGF- β 抗体の coincubation により有意に抑制された。しかし、コントロール IgG には、その作用は見られなかった。

5) Ang IIのラットへの持続投与

Ang II持続投与 (1週間) の結果、ラット糸球体の TGF- β と COL I の発現が、それぞれ1.7倍、1.8倍に増加した (図7)。

図5 Effect of Ang II on mesangial cell synthesis of extracellular matrix components. Mesangial cells cultures incubated with saralasin alone, Ang II, or Ang II and saralasin were radiolabeled with ^{35}S -methionine. Culture supernatants were used for immunoprecipitation of (A) fibronectin and (B) Collagen type I. C shows SDS-PAGE of ^{35}S -sulfate-labeled proteoglycans (BG and Decorin) from similar cultures.

考 察

私たちは従来より、TGF- β が、1)糸球体ECM合成促進、2)ECM レセプター発現促進、3)ECM 分解のバランスを司る protease/protease inhibitor の変化の誘導など総合的なECM蓄積作用を有していることより、糸球体硬化の最も重要な因子であると報告してきた^{3)~6)}。最近では、ヒト腎炎症例の検討でも、糸球体TGF- β 発現の程度とIgA腎症や他の糸球体疾患のメサンギウム

図6 Effect of coincubation of Ang II and neutralizing antibody to TGF- β on synthesis of extracellular matrix components. (A) fibronectin, (B) collagen type I, (C) BG and Decorin.

領域拡大の程度がよく相関することが明らかとなってきた²³⁾。

一方、Ang IIも同様に、糸球体硬化像を呈する種々の腎炎モデルや慢性腎炎患者の病的基質蓄積への関与が示唆されており、Ang II生産を阻止するACIEが糸球体硬化の発症を軽減したり、病変を改善させる結果さえも報告されている^{9)~14)}。

近年、Dzauらのグループは一貫として、心血管系リモデリングにおけるAng IIの局所作用は、TGF- β 等のサイトカイン群の発現調節を介している可能性を示してきた¹⁶⁾¹⁷⁾。また、Ang IIは培養MCのCOL I生産を刺激するとの報告もある¹⁵⁾。そこで私たちは、Ang IIは直接的にMCの

図7 Effect of continuous in vivo administration of 100 ng Ang II/min to normal rats for 1wk on glomerular mRNA for TGF- β and collagen type I (COLI).

TGF- β 発現を刺激し、ついで分泌亢進した TGF- β がオートクライン/パラクライン作用で MC 自身に働き基質合成を高めるとの仮説を立てた。今回は培養系の検討を中心に行ったが、この系では in vivo の Ang II 投与実験で問題となる糸球体内高血圧という血行力学的変化を無視でき都合である。

本実験の結果、Ang II は MC の TGF- β mRNA レベルを高め潜在型と活性型 TGF- β 蛋白の生産を増加させるだけでなく、潜在型 TGF- β から活性型への変換も同時に促進することが判明した。培養系の実験よりプラスミノゲンアクチベター (PA) の作用により産生されたプラスミンが潜在型 TGF- β の活性化を行う現象は良く知られている²⁴⁾。Ang II は培養平滑筋細胞の PA 産

生を高めるという報告もあり、MC においても同様の機序で Ang II が PA 生産を高め、結果として潜在型 TGF- β から活性型への転換を刺激しているのかもしれない²⁵⁾。

さらに、Ang II は MC の TGF- β 発現誘導を介して病的基質産生に関わっている可能性が示唆された。つまり、1) Ang II 刺激による MC の ECM 成分 (COL I, FN, BG) の mRNA 発現レベルは、TGF- β mRNA 発現増強後に増加しはじめる。2) MC 培養への Ang II と TGF- β 中和抗体の同時添加により、Ang II の ECM 成分の合成促進作用は抑制されていた。これらの結果は上述の仮説と合致しており、MC には Ang II 刺激により活性型 TGF- β 蛋白の産生分泌を亢進し、この生産増加した TGF- β が MC 自身の基質成分の合成沈着を促進するという molecular cascade が存在することを示唆している。

最近の分子生物学手法の発達に伴い、RAS に関わるすべての成分 (レニン、アンジオテンシノーゲン、アンジオテンシン変換酵素、Ang II レセプター) が腎糸球体、さらには MC という細胞単位で存在することが明らかとなっている⁷⁾⁸⁾²⁶⁾²⁷⁾。また糸球体硬化像を呈するいくつかの腎炎モデルでアンジオテンシノーゲン等を含む RAS の活性化も証明されている²⁸⁾²⁹⁾。糸球体硬化と糸球体 TGF- β 発現増加の関係は、あらゆる腎炎にみられる普遍的現象であることより糸球体 RAS の活性化と TGF- β 発現増加の間になんらかの因果関係の存在をうかがわせる。今回の in vivo 実験においても、Ang II の持続投与がラット糸球体の TGF- β や COL I の発現増加を引き起こすことから腎糸球体局所での Ang II 作用は TGF- β 発現調節に重要であると思われる。

以上より、高血圧や慢性腎炎等の病的状況下において、ひとたび全身性にあるいは腎局所で RAS が活性化されたなら、糸球体内高血圧と TGF- β の活性化の両作用が相乗的に働き、糸球体 ECM の蓄積や硬化の進行を促進するものと考えられる。

結 論

Ang IIは慢性腎炎や糖尿病腎症において異常蓄積することが知られている。ECM成分のMC合成を増加させた。そして、この刺激作用はAng IIによって誘導されるMCのTGF- β 発現増加を介していることが示唆された。このメカニズムはin vivoでも同様に働き、糸球体硬化の発症および進行に関与しているものと思われる。

文 献

- 1) Border W. A. : Distinguishing minimal-change disease from mesangial disorders. *Kidney Int.* 34 : 419-434, 1988.
- 2) Kagami S., Okada K., Funai M., Matui K, et al. : A monoclonal antibody (1G10) recognizes a novel human mesangial antigen. *Kidney Int.* 42 : 700-709, 1992.
- 3) Okada S., Languino L. R., Ruoslahti E. and Border W. A. : Elevated expression of transforming growth factor- β and proteoglycan production in experimental glomerulonephritis. Possible role in expansion of the mesangial extracellular matrix. *J. Clin. Invest.* 88 : 1067-1072, 1990.
- 4) Border W. A., Okada S., Languino L. R., Sporn M. B. and Ruoslahti E. : Suppression of experimental glomerulonephritis by antiserum against transforming growth factor- β 1. *Nature (Lond.)*, 346 : 371-374, 1990.
- 5) Tomooka S., Border W. A., Maeshall B. C. and Noble N. A. : Glomerular matrix accumulation is linked to inhibition of the plasmin protease system. *Kidney Int.* 42 : 1462-1469, 1992.
- 6) Kagami S., Border W. A., Ruoslahti E. and Noble N. A. : Coordinated expression of integrins and TGF- β induced matrix proteins in glomerulonephritis. *Lab. Invest.* 69 : 68-76, 1993.
- 7) Ichikawa I., and Harris R. C. : Angiotensin action in the kidney : Renewed insight into the old hormone. *Kidney Int.* 40 : 583-596, 1991.
- 8) Wolf G., and Neilson E. G. : Angiotensin II as a renal growth factor. *J. Am. Soc. Nephrol.* 3 : 1531-1540, 1993.
- 9) Lafayette R. A., G. Mayer., Park S. K and Meyer T. W. : Angiotensin II receptor blockade limits limits glomerular in jury in rats with reduced renal mass. *J. Clin. Invest.* 90 : 766-711, 1992.
- 10) Fogo A., Y. Yoshiyuki, A. D. Glick, Homma T. and Ichikawa I. Serial micropuncture analysis of glomerular function in two rat models of glomerular sclerosis. *J. Clin. Invest.* 82 : 322-339, 1988.
- 11) Diamond J. R., and Anderson S. : Irreversible tubulointerstitial damage associated with chronic aminonucleoside nephrosis. *Am. J. Pathol.* 137 : 1323-1332, 1990.
- 12) Keane W. F., Anderson S, Aurell M. de Zeeuw D, Narins R. G. and Povar G. : Angiotensin converting enzyme inhibitor and progressive renal insufficiency. *Ann. Intern. Med.* 111 : 503-516, 1989.
- 13) Ravid M., Savin H, Jutrin I, Bental T, Katz B. and Lishner M. : Long term stabilizing effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on plasma creatinine and on proteinuria in normotensivetype II diabetic patients. *Ann. Intern. Med.* 118 : 577-581, 1993.
- 14) Kakinuma Y., Kawamura T, Bills T, Yoshoka T, Ichikawa I. and Fogo A. : Blood pressure-independent effect of angiotensin inhibition on vascular lesions of chronic renal failure. *Kidney Int.* 42 : 46-55, 1992.
- 15) Homma T., Hoover R. L, Ichikawa I. and Harris R. C. : Angiotensin II induces hypertrophy and stimulates collagen production in cultured rat mesangial cell. *Clin. Res.* 38 : 358A, 1990.
- 16) Gibbons G. H., Pratt R. E. and Dzau V. J. : Vascular smooth muscle cell hypertrophy vs. hyperplasia. *J. Clin. Invest.* 90 : 456-461, 1992.
- 17) Itoh H., Mukoyama M, Gibbon R. E. and Dzau V. J. : Multiple autocrine growth factors modulate vascular smooth muscle cell growth responses to angiotensin II. *J. Clin. Invest.* 91 : 2268-2274, 1993.
- 18) Schlondorff D. : The glomerular mesangial cell : an expanding role for a specialized pericyte. *FASEB J.* 1 : 279-281, 1987.
- 19) Derynck R., Jarrett J. A, Chen E. Y. and Goeddel D. V. : The murine transforming growth factor- β precursor. *J. Biol. Chem.* 261 : 4377-4379, 1986.
- 20) Fisher L. W., Termine J. D, and Young M. F. : Deduced protein sequence of small proteoglycan I (Biglycan) shows homology with proteoglycan II (Decorin) and several nonconnective tissue proteins in a variety of species. *J. Biol. Chem.* 264 : 4571-4576, 1989.
- 21) Genovese C., Rowe D. and Kream B. : Construction of DNA sequences complementary to rat α 1 and α 2 collagen mRNA and their use in studying the regulation of type I collagen synthesis by 1,25-dehydroxyvitamin D. *Biochemistry* 23 : 6210-6216, 1984.
- 22) Fort P., Piechaczyk M, Sabrouy S. E, Dani C, Jeanteur P. and Blanchard J. M. : Various rat adult tissue express only one major mRNA species from the glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase multigenic family. *Nucleic acid Res.* 13 : 1431-1443, 1985.
- 23) Yosioka K., Takemura T, Murakami K, Okada M,

- Hino S, Miyasato H. and Maki. S. : Transforming growth factor- β protein and mRNA in glomeruli in normal and diseased human kidneys Lab Invest. 68 : 154-163, 1993.
- 24) Flaumenhaft R., Abe M, Mignatt P. and Rifkin D, B : Basic fibroblast growth factor-induced activation of latent transforming growth factor β in endothelial cells : regulation of plasminogen activator activity. J. Cell Biol. 118 : 901-909, 1992.
 - 25) Bell L., and Madri J. A. : Influence of the angiotensin system on endothelial and smooth muscle cell migration. Am. J. Pathol. 137 : 7-12, 1990.
 - 26) Paul M., Wagner J and Dzau V. J. Gene expression of the renin-angiotensin system in human tissues. Quantitative analysis by the polymerase chain reaction. J. Clin. Invest. 91 : 2058-2064, 1993.
 - 27) Sajid M., Graves K and Rajaraman S. : Mediator of progressive glomerular injury : Evidence for interplay of IL-1 β and angiotensin II (ANG-II). J. Am. Soc. Nephrol. 4 : 681, 1992.
 - 28) Correa-Rotter R., Hostetter T. H, Manivel C. and Rosenberg M. E. : Renin expression in renal ablation. Hypertension. 20 : 483-490, 1990.
 - 29) Anderson S., Jung F. F. and Ingelfinger J. R. : Renal renin-angiotensin system in diabetes : functional, immunohistochemical, and molecular biological correlations. Am. J. Physiol. 265 : F477-F486, 1993.