メサンギウム細胞および末梢血単核球による 血管透過性亢進因子の産生

飯島 一誠・吉川 徳茂・中村 肇

要 旨

血管透過性亢進因子 (VPF/VEGF) は強い血管透過性亢進作用、血管内皮細胞増殖作用および Monocyte 遊走、活性化作用を持つ約 40 kD の糖蛋白である。現在までに、種々の腫瘍細胞株や胎児血管平滑細胞などの正常細胞から VPF/VEGF が産生されることが報告されている。我々は、メサンギウム細胞 (MC) が血管平滑筋細胞と類縁の細胞であること、血液細胞由来の腫瘍細胞株である U 937 や HL 60 が VPF/VEGF を産生すると注目し、MC、末梢血単核球 (PBMC) および末梢血 T 細胞 (T-cell) による VPF/VEGF の産生およびその調節機構について検討した。Northern blotting および RT-PCR による解析では、ヒト培養メサンギウム細胞 (MC) が VPF/VEGF mRNA を発現しており、fetal calf serum,

phorbol ester (TPA) および transforming growth factor- β 1 によって VPF/VEGF mRNA の発現は亢進し、TPA による VPF/VEGF mRNA の発現亢進は dexamethasone により有意に抑制された。また、蛋白レベルでも MC による VPF/VEGF の発現が証明された。PBMC および T-cell も VPF/VEGF mRNA を発現していることが RT-PCR を用いた解析で明らかになった。半定量的 RT-PCR による解析で、PBMC による VPF/VEGF mRNA の発現は TPA による活性化に伴って増加した。T-cell でも同様に、TPA による活性化に伴って VPF/VEGF mRNA の発現が亢進した。さらに、抗 CD 3 抗体による T-cell receptor の刺激によって VPF/VEGF mRNA の発現が亢進した。すなわち、ある種の抗原やサイトカインによって PBMC や T-cell が活性化されると VPF/VEGF の産生が亢進することが示唆された。以上より、1) MC、PBMC および T-cell は VPF/VEGF を産生し、2) その産生は種々の Factor や抗原刺激によって修飾を受けることが明らかになった。これらの所見より、MC、PBMC および T-cell によって産生された VPF/VEGF が、糸球体腎炎で認められる糸球体基底膜の透過性亢進や糸球体への炎症細胞浸潤、

神戸大学医学部小児科学教室
(〒650 神戸市中央区楠町7-5-1)

Production of vascular permeability factor by cultured human mesangial cells and peripheral blood mononuclear cells

Kazumoto Iijima, Norshige Yoshikawa and Hajime Nakamura

Department of Pediatrics, Kobe University School of Medicine, Kobe, Japan

Key Words : 血管透過性亢進因子
メサンギウム細胞
末梢血単核球
T細胞

間質性腎炎や移植腎拒絶反応に見られる間質の浮腫や炎症細胞浸潤に関与している可能性が考えられた。

序 言

血管透過性亢進因子 (VPF/VEGF) は強い血管透過性亢進作用、血管内皮細胞増殖作用および Monocyte 遊走、活性化作用を持つ約 40 kD の dimeric heparin-binding glycoprotein である¹⁾²⁾。現在までに、ヒトの種々の腫瘍細胞株や胎児血管平滑筋細胞などの正常細胞から VPF/VEGF が産生されることが報告されている。我々は、メサンギウム細胞が血管平滑筋細胞と類縁の細胞であること、血液細胞由来の腫瘍細胞株である U 937 や HL 60 が VPF/VEGF を産生することに注目し、ヒト培養メサンギウム細胞 (MC)、末梢血単核球 (PBMC) および末梢血 T 細胞 (T-cell) による VPF/VEGF の産生およびその調節機構について検討した。

方法および成績

<MC による VPF/VEGF の産生とその調節機構>

ヒト VPF/VEGF cDNA プロブを用いた Northern blotting による解析で、MC では 3.7kb の転写産物を認めた。VPF/VEGF のすべてのアイソフォーム (VPF/VEGF₁₂₁, VPF/VEGF₁₆₅, VPF/VEGF₁₈₉, VPF/VEGF₂₀₆) を検出できる Oligonucleotide primers を用いた RT-PCR による解析では、MC は VPF/VEGF₁₂₁, VPF/VEGF₁₆₅, VPF/VEGF₁₈₉ の 3 つのアイソフォームの mRNA を発現していた。これらの所見より、MC は VPF/VEGF mRNA を発現していることが明らかになった。

MC の VPF/VEGF mRNA の発現は、Fetal calf serum および Phorbol ester (TPA) によって一過性に亢進した。また、Transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) は、少なくとも 24 時間は VPF/VEGF mRNA の発現を増加させた。一方、Dexamethasone (DEX) は TPA による VPF/VEGF mRNA の発現の亢進を有意に抑

制した。DEX は非刺激下の VPF/VEGF mRNA のレベルになんら影響をきたさなかったことより、上記の現象は DEX が VPF/VEGF mRNA の stability を低下させたのではなく、VPF/VEGF mRNA の発現を転写レベルで抑制したためと考えられた。抗 VPF/VEGF 抗体を用いた immunocytochemistry によって、MC が VPF/VEGF を産生し、TPA はその産生を一過性に増加させることが蛋白レベルでも明らかになった。

<PBMC および T-cell による VPF/VEGF の産生とその調節機構>

PBMC および T-cell による VPF/VEGF mRNA の発現とその調節機構に関しては、最近、我々が開発した GAPDH を internal control とした Semi-quantitative RT-PCR 法を用いて検討した。

PBMC は resting level で VPF/VEGF₁₂₁, VPF/VEGF₁₆₅, VPF/VEGF₁₈₉ の 3 つのアイソフォームの mRNA を弱く発現しており、TPA 処理により、一過性にその発現が亢進した。Immunomagnetic beads 法により PBMC から分離した T-cell は、resting level では、VPF/VEGF mRNA をほとんど発現していなかったが、やはり TPA 処理により VPF/VEGF₁₂₁, VPF/VEGF₁₆₅, VPF/VEGF₁₈₉ mRNA の発現亢進が認められた。また、T-cell を CD 4⁺T-cell と CD 8⁺T-cell に分けて VPF/VEGF mRNA の発現を検討したが、CD 4⁺T-cell, CD 8⁺T-cell ともに TPA による VPF/VEGF mRNA の発現亢進を認めた。さらに、抗 CD 3 抗体を用いて T-cell receptor を刺激すると、VPF/VEGF mRNA の発現亢進が認められた。以上より、抗原や何らかのサイトカインによる PBMC や T-cell 刺激により VPF/VEGF の産生が亢進する可能性が考えられた。

考察および結論

MC は VPF/VEGF mRNA を発現しているが、その転写産物のサイズは 3.7kb であり、以前の報告とほぼ一致する。Tischer らは、ヒト胎児血管平滑筋細胞において TPA が VPF/VEGF mRNA

NA の発現を亢進させると報告している³⁾。また、Dolecki と Connolly は U 937 において TPA と TGF- β が VPF/VEGF mRNA の発現を亢進させると報告している⁴⁾。今回の我々の研究では、FCS, TPA および TGF- β 1 によって、MC における VPF/VEGF mRNA の発現が亢進することが明らかになった。また、蛋白レベルでも TPA によって VPF/VEGF の産生が亢進することが明らかになった。近年、TGF- β や Protein kinase C を活性化させるサイトカインである Platelet-derived growth factor とメサンギウム増殖性糸球体腎炎との関連が報告されている⁵⁾⁶⁾。したがって、メサンギウム増殖性糸球体腎炎のような病的な状態では、MC による VPF/VEGF の産生が亢進し糸球体係蹄透過性亢進、Monocyte 遊走、活性化などが生じ、糸球体病変が進行していく可能性が考えられる⁷⁾。メサンギウム増殖性糸球体腎炎では、しばしばメサンギウム領域への T-cell や macrophage をはじめとする PBMC の浸潤が認められ、それらの細胞の大半は活性化された状態にあると考えられている。また、間質性腎炎や移植腎拒絶反応では、活性化 T-cell や macrophage の間質への浸透が認められる⁸⁾。本研究で明らかになったように、PBMC や T-cell の活性化に伴って VPF/VEGF mRNA の発現が亢進することから、上記のような病的な状態では、メサンギウム領域や間質に浸潤した T-cell や PBMC による VPF/VEGF の産生が亢進している可能性が考えられる。メサンギウム領域における VPF/VEGF 産生亢進は、糸球体基底膜の透過性亢進による蛋白尿や、メサンギウム領域への monocyte/macrophage の浸潤による糸球体障害を引き起こす可能性が考えられる。また、VPF/VEGF は血管内皮細胞増殖作用をもつことから、障害をうけた糸球体内皮細胞の修復に関与する可能性も考えられる。一方、間質へ浸潤した T-cell や PBMC による VPF/VEGF の産生亢進は、間質の細血管の透過性を亢進させ間質の浮腫を引き起こした

り、間質への monocyte/macrophage の浸潤を促進し、間質の繊維化を引き起こす可能性が考えられる⁹⁾。

今後、種々の腎疾患における VPF/VEGF の役割が明らかにされる必要がある。

文 献

- 1) Connolly DT, Olander JV, Heuvelman D, Nelson R, Monsell R, Siegel N, Haymore BL, Leimgruber R, Feder J : Human vascular permeability factor. Isolation from U 937 cells. *J Biol Chem* 264 : 20017-20024, 1989.
- 2) Clauss M, Gerlach M, Gerlach H, Brett J, Wang F, Familletti PC, Pantumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration. *J Exp Med* 172 : 1535-1545, 1990.
- 3) Tischer E, Mitchell R, Harutman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC, Abraham JA : The human gene for vascular endothelial growth factor : Multiple protein from are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem* 266 : 11947-11954, 1991.
- 4) Dolecki GJ, Connolly DT : Effects of a variety of cytokines and inducing agents on vascular permeability factor mRNA levels in U 937 cells. *BiochemBiophys Res Commun* 180 : 572-578, 1991.
- 5) Okuda S, Languino LR, Ruoslahti E, Border WA : Elevated expression of transforming growth factor- β and proteoglycan production in experimental glomerulonephritis. *J Clin Invest* 86 : 453-462, 1990.
- 6) Iida H, Seifert R, Alpers CE, Gronwald RKG, Phillips PE, Pritzl P, Gordon K, Gown AM, Ross R, Bowen-Pope DF, Johnson RJ : 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.
- 7) Iikima K, Yoshikawa, N, Connolly DT, Nakamura H : Human mesangial cells and peripheral blood mononuclear cells produce vascular permeability factor. *Kidney Int* 44 : 959-966, 1993.
- 8) Strutz F, Neilson EG : The role of lymphocytes in the progression of interstitial disease. *Kidney Int* 45 : S 106-110, 1994.
- 9) Nilolic-Paterson DJ, Lan HY, Hill PA, Atkins RC : Macrophages in renal injury. *Kidney Int* 45 : S 79-S 82, 1994.