モノカインによるメサンギウム細胞の増殖促進

山本 格・矢尾板永信・川崎克俊・木原 達*

Promotion of mesangial cell proliferation by monokines An involvement of monokines in proliferation of mesangial cells was studied in experimental mesangial cell proliferative glomerulonephritis model and in culture. Anti-rat thymocyte serum (ATS) recognized Thy-1.1 (-like) molecules on the glomerular mesangial cells and an intravenous administration of ATS in rats induced glomerular hypercellular lesion 4-7 days later. The glomerular lesion was composed mainly of proliferating mesangial cells as defined by immunofluorescence staining for Thy-1.1 or desmin and less of infiltrating monocytes and lymphocytes as characterized by presence of leucocyte common or Ia antigen.

The promotion of mesangial cell proliferation in the glomeruli of ATS-administered rat kidneys was supported by enhancement of ^3H thymidine uptake in the glomerular cells in culture and by increase of Thy-1.1 mRNA content in the glomerular RNA. The glomeruli from the ATS-administered rats released interleukin 1 (IL-1) and tumor necrosis factor (TNF) activities in culture medium and had more IL-1 β mRNA than control rat glomeruli. Recombinant human IL-1 β and TNF enhanced proliferation of quiescent rat mesangial cells in culture in the simultaneous presence of low concentration of fetal bovine serum or platelet-derived growth factor, as was the case with insulin.

These results indicate that monocytes/macrophages infiltrating in glomeruli with glomerulonephritis could release monokines, such as IL-1 or TNF and these cytokines could promote proliferation of mesangial cells.

Tadashi Yamamoto・Eishin Yaoita・Katsutoshi Kawasaki・Itaru Kihara*

* Department of Pathology, Institute of Nephrology, Niigata University School of Medicine, Asahimachi 1, Niigata 951, Japan

key words: interleukin 1, tumor necrosis factor, proliferation, mesangial cell

慢性に進行し腎不全に陥るいわゆる慢性腎炎の多くは、組織学的に糸球体メサンギウム細胞の増殖とメサンギウム基質の増加に特徴づけられ、メサンギウム増殖性糸球体腎炎に分類されている¹⁾。メサンギウム細胞は、糸球体の輸入・輸出動脈の平滑筋細胞と連続した細胞で糸球体の毛細血管を支持している。そのうえ、細胞質はアクチンに富み、糸球体毛細血管基底膜との間に接着構造を持ち、アンジオテンシンⅡなどの血管平滑筋収縮物質で収縮することから、生理学的にも糸球体微循環や濾過などの調節に重要な役割を演じていると考えられている²⁾。メサンギウム増殖性糸球体腎炎におけるメサンギウム細胞と基質の過剰な増加は、構造的に糸球体毛細血管腔を圧迫し、糸球体濾過面積を減少させるとともに、メサンギウム細胞の生理学的機能も障害し、糸球体濾過障害、最終的には腎不全へと進展させる重要な要因と推定される³⁾。

近年、糸球体メサンギウム細胞の培養法が確立し⁴⁾、メサンギウム細胞を増殖させる因子が追求され、各種増殖因子やサイトカインが培養メサンギウム細胞の増殖を促進することが示されている⁵⁻⁸⁾。しかし、生体内でメ

サンギウム細胞の増殖を促進している因子やその機構、さらにはメサンギウム基質の産生調節機構はまったく不明である。

そこで筆者らは、ラットのメサンギウム細胞増殖型糸球体腎炎モデルを用いて生体内でメサンギウム細胞の増殖促進に関与する因子の解析を試みた。ラットのメサンギウム細胞は、細胞表面にThy-1.1(様)分子を持ち、末梢血中のT細胞はこの分子を持っていない⁹⁾。そのため、モノクローナル抗ラットThy-1.1抗体やThy-1.1(様)分子を認識するウサギ抗ラット胸腺細胞抗体(anti-thymocyte serum ATS)をラットに投与すると選択的にメサンギウム細胞が傷害され、つづいてメサンギウム細胞の増殖が起こることが示されている¹⁰⁻¹³⁾。

本稿では、このモデルにおけるメサンギウム細胞の増殖に単球やマクロファージなどに由来するサイトカインのうち、interleukin 1 (IL-1) と tumor necrosis factor (TNF) が関与しているか否かを検討した。その結果、メサンギウム細胞が増殖している糸球体には、単球、マクロファージ系細胞の浸潤があり、糸球体でのIL-1、TNF産生が高く、これらのサイトカインは培養メサンギウム細胞の増殖を促進することが明らかになった。

* 新潟大学医学部腎研究施設病理形態学部門

材料と方法

(1) メサングウム細胞増殖型糸球体腎炎モデル^{10,11)}

6~7 週齢の雌 Lewis ラットに ATS 0.5 ml/100 g 体重を静注し、4~7 日後に腎を摘出し、組織学的、細胞生物学的検索に供した。対照として正常ウサギ血清 (normal rabbit serum, NRS) を同量静注したラットを用いた。

ATS は、ウサギに完全フロイントアジュバントに混じった Lewis ラット胸腺細胞 2×10^5 個を皮下免疫し、2 週後に 1×10^6 個の胸腺細胞を静脈内に追加免疫し、1 週後の血清から作成した。血清は蛍光抗体法でラット胸腺組織およびラット腎糸球体メサングウムへの特異的結合価の高いものを選び、熱非働化後 1/10 容量の Lewis ラット末梢血液細胞およびラット肝ホモジェネートで 3 回ずつ吸収したものを ATS として用い、NRS も同様の処理をしたのち使用した。

(2) 組織学的検索

腎組織は、光顕、電顕、蛍光抗体法で検索した。糸球体の細胞増殖性病変を定量的に比較するため、PAS 染色された光顕組織切片上で血管極と尿管極が同時にみられる糸球体を選び、糸球体 1 個当たりの細胞核数を数えた。電顕では、増殖性病変を構成する細胞と病変の局在を検索した。蛍光抗体法では増殖している細胞の核を認識する抗 proliferating cell nuclear antigen (PCNA) 抗体¹⁴⁾ (Dr. E.M. Tan, Scripps Clinic and Research Foundation, USA より供与)、白血球系細胞の同定にはモノクローナル抗ラット leucocyte common (LC) antigen 抗体 (OX1, Sera Lab., England)、抗ラット Ia 抗体 (OX6, Sera Lab.) を用い、それぞれ糸球体内陽性細胞数を数えた。メサングウム細胞は、モノクローナル抗 desmin 抗体 (ペーリンガー・マンハイム山之内)、抗ラット Thy-1.1 抗体 (OX7, Sera Lab.) を用いて同定した。

(3) 糸球体内の細胞増殖

ATS または NRS 投与 4 日後のラット腎よりメッシュ法で糸球体を単離し、10% 牛胎児血清 (FBS) 添加 RPMI 1640 培養液に 5×10^3 /ml に浮遊した。24 穴培養プレートに 1 ml/穴ずつ糸球体浮遊液を入れ、培養 4 日、7 日後に ^3H チミジン ($5 \mu\text{Ci}/\text{穴}$) を加え 24 時間後に 0.01% トリプシン-0.01% EDTA で糸球体細胞を剥がし、セルハーベスターで糸球体および細胞をガラスフィルター上に集め、 ^3H チミジンの取り込みを β カウンターで測定した。その際、糸球体上皮細胞を傷害し、その増殖を抑制するために puromycin aminonucleoside (AN), $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ で糸球体を 24 時間処理した群もつくった¹⁵⁾。

つぎに糸球体内のメサングウム細胞の増加を Thy-1 mRNA 量を指標に dot blot hybridization で検討した。ATS または NRS 投与 7 日目のラット腎糸球体より

図 1 mesangial proliferative glomerular lesion induced 4 days later by intravenous injection with ATS (PAS stain)

図 2 major type (M) of cells constituting the mesangial hypercellular lesion has a clear large nucleus and plenty of rough endoplasmic reticulum. Monocytes (Mo) and lymphocytes (L) are occasionally observed in the mesangium and the capillary lumen. E: endothelial cell

guanidine isothiocyanate/cesium chloride 法で RNA を抽出し、ニトロセルロース膜上に $2.5 \mu\text{g}/\text{dot}$ ブロットした。対照としてラット胸腺細胞および LPS (*E. coli* O 55, B 5, $10 \mu\text{g}/\text{ml}$) で 6 時間刺激したラット腹腔マクロファージから抽出した RNA を $2.5 \mu\text{g}/\text{dot}$ から倍々希釈してブロットした。ラット Thy-1 cDNA¹⁶⁾ (守内哲也博士、東海大学より供与) を ^{32}P でラベルしたプローブで dot blot hybridization を行い、autoradiogram を densitometer で定量化した。

図3 Immunohistochemical characterization of the mesangial proliferative lesion

The mesangium was stained with monoclonal anti-rat Thy-1.1 and anti-desmin antibodies. There were several nuclei labeled with anti-PCNA antibody and a few cells labeled with monoclonal anti-LC antibody.

表1 quantitative analysis of mesangial hypercellular lesion

	glomerular cell counts	PCNA(+) cell	LC(+) cell	Ia(+) cell
ATS	64.3 ± 5.7*	6.06 ± 0.33*	3.56 ± 0.32*	3.43 ± 0.22*
NRS	50.6 ± 6.0	0.08 ± 0.01	0.42 ± 0.11	0.55 ± 0.11

Numbers are total cells in a glomerulus in histology section and immunofluorescence-positive cells in cryostat section, mean ± SD. *statistically significant ($p < 0.01$, Student's t test)

(4) 糸球体の IL-1, TNF 産生

ATS または NRS 投与 7 日後のラットより糸球体を単離培養し、培養 24 時間後の上清中の IL-1, TNF 活性をそれぞれ C3H/He J マウス胸腺細胞を用いた co-mitogenic assay¹⁷⁾ と L929 細胞傷害試験¹⁸⁾ で測定した。また、糸球体の IL-1 β mRNA 量をマウス IL-1 β cDNA (Dr. D.J. Noonan, Scripps Clinic and Research Foundation, USA より供与) プローブを用いた dot blot hybridization 法で上述同様に定量した。

(5) IL-1, TNF による培養メサンギウム細胞の増殖

ラット糸球体を単離、培養し、3 回 subculture し均一な細胞を得た。この細胞は紡錘形をしており、desmin, Thy-1.1 を有するが LC, Ia 抗原はなくメサンギウム細胞と同定された¹⁹⁾。この細胞を 10% FBS 添加培養液に 5×10^4 /ml に調整し、96 穴プレートに 100 μ l/穴入れ 2 日間培養した。その後、培養液を 0.5% FBS 添加培養液置換し、6 日間培養し、quiescent な細胞とし、さらに FBS 無添加培養液、5% FBS 添加培養液、0.5 ng/ml 血小板由来増殖因子 (PDGF, 宝酒蔵) 100 μ l/穴に置換した。そこに、5 ng/ml のリコンビナントヒト IL-1 β (大塚製薬より供与)、10 ng/ml の TNF (大日本製薬より供与)、0.5 U/ml のウシインシュリン (ノボ社) を 100 μ l/穴加え、24 時間後に ^3H チミジンの 0.5 μ Ci/穴添加し、24

時間後の ^3H チミジンのメサンギウム細胞内への取込みを β カウンターで測定した。

結 果

ATS 投与 4 日後の腎組織を光顕で観察すると、糸球体にメサンギウム中心の増殖性病変がみられた (図 1)。

電顕では、メサンギウム増殖性病変を構成する主たる細胞は明瞭な核小体を持つ大きな明るい核と発達した粗面小胞体を持つ細胞であることが示された (図 2)。この細胞は、後述の免疫組織学的特徴からメサンギウム細胞と考えられた。メサンギウム増殖性病変は、ATS 投与初期のメサンギウム融解 (mesangiolysis)、その部位への血漿成分、赤血球、白血球の浸潤、フィブリン形成などにつづいて融解されたメサンギウムを細胞が置き換る格好で出現する。そのため、ATS 投与 4 日後のメサンギウム増殖性病変の近傍にはしばしば mesangiolysis 病変が残っていた。

また、数は少ないが、浸潤してきた単球やリンパ球もメサンギウム増殖性病変の細胞増加の構成員であった (図 2)。この糸球体を蛍光抗体法で検索すると、増殖性病変を構成する細胞は Thy-1.1 と desmin が陽性であったことから、メサンギウム細胞と考えられた。また、PCNA 陽性細胞の存在は糸球体内での活発な細胞増殖

図4 Tritiated thymidine uptake in glomerular cells at day 4 and 7 in culture.

The glomeruli isolated from ATS- or NRS- administered rat kidneys were treated with or without puromycin aminonucleoside (*AN, 10 μ g/ml) during the first 24 hours in culture. (mean $\pm$ SD)

図5 Densitometrical measurement of Thy-1.1 and IL-1 β mRNA by dot-blot hybridization using rat Thy-1.1 and mouse IL-1 β cDNA probes. RNA was extracted from glomeruli of rats which received ATS or NRS 7 days earlier, rat thymocytes or rat peritoneal macrophages stimulated with LPS for 6 hours. Density of the glomerular RNA dot (2.5 μ g/dot) on the autoradiogram was compared with that of sequentially diluted (1/1-1/64) thymocyte or macrophage RNA as a standard (2.5-0.04 μ g/dot).

を示し、少数の LC, Ia 陽性細胞は、メサングウム増殖性病変に浸潤した単球やリンパ球と考えられた(図3)。

光顕標本で、糸球体の全細胞数、蛍光抗体法標本で PCNA, LC, Ia 陽性細胞数を数えた結果を表1に示した。対照ラット糸球体に比し全細胞数, PCNA, LC, Ia 陽性細胞数ともに有意に ATS 投与ラットでは増加していた。

糸球体の増殖活性を培養系で検討すると、AN を処理しない糸球体細胞への ^3H チミジンの取り込みは培養4

図6 IL-1 and TNF bioactivities in the 24-hour culture medium of glomeruli isolated from rats given ATS or NRS 7 days earlier.

As a control, culture medium of rat peritoneal macrophages stimulated with LPS for 24 hours (Mac, 1:10 dilution) was used. *statistically significant ($P < 0.01$ vs control Student's t -test)

図7 effect of IL-1 β (2.5 ng/ml), TNF (5 ng/ml) or insulin (0.25 U/ml) on the proliferation of quiescent rat mesangial cells in the absence or presence of FBS (2.5%) or PDGF (0.25 ng/ml) in culture. (mean $\pm$ SD)

日目、7日目ともに ATS 投与ラットで有意($p < 0.01$)に高かった。 ^3H チミジンの糸球体細胞への取り込みは対照ラットで AN 処理で強く抑制されたが、ATS ラットでは特に培養7日目でほとんど抑制されておらず、この糸球体でメサングウム細胞の増殖が促進されていることが示された(図4)。

Thy-1 cDNA プローブを用いた dot blot hybridization でも ATS 投与ラットの糸球体 RNA に明らかな Thy-1 mRNA の増加が認められ、その量は胸腺細胞の約 1/20 量であった(図5)。

糸球体培養上清中の IL-1, TNF 活性は ATS 投与ラット糸球体が対照に比し有意に高かった(図6)。これは

IL-1 β cDNA プローブを用いた dot blot hybridization でも示された(図5)。

つぎに、IL-1 β , TNF がメサングウム細胞の増殖を促進するか否かを培養系で検討した。Quiescent の培養メサングウム細胞を IL-1 β , TNF 単独で刺激しても増殖促進はほとんどみられなかった(図7)。しかし、PDGF (0.25 ng/ml)や FBS(2.5%)存在下では両サイトカインともに有意($p < 0.01$)に ^3H チミジンのメサングウム細胞への取り込みを促進した。この促進効果はインシュリンと同様であった。

考 察

いくつかのヒト糸球体腎炎や実験モデルにおいて、糸球体に単球-マクロファージ系細胞の浸潤していることが示されている²⁰⁻²²⁾。また、この細胞は活性酸素などの炎症メディエーターを放出し、糸球体を傷害することがわかっている²³⁾。

一方、細胞間相互作用にサイトカインが重要な役割を演じており、単球-マクロファージ系細胞は、LPS などの刺激で IL-1 や TNF を産生、放出する²⁴⁾。これらの産生は、immune complex でも促進されることから²⁵⁾、immune complex が沈着し、単球-マクロファージ系細胞が浸潤している糸球体腎炎では、IL-1 や TNF が産生され、なんらかの役割を演じている可能性がある。筆者らは、ラットのメサングウム細胞増殖型腎炎モデルを用い糸球体への単球の浸潤と糸球体内での IL-1, TNF の産生亢進を示した。

IL-1, TNF は、それぞれリンパ球活性化因子、腫瘍壊死因子として発見されたが、リンパ系細胞以外の細胞に作用し、また、つくられることがわかっている。IL-1, TNF は線維芽細胞の増殖を促進し^{26,27)}、さらに、IL-1 がメサングウム細胞の増殖も促進することが示された^{28,29)}。筆者らの研究はそれを確認し、さらに IL-1 と類似の広い生物活性を持つ TNF も IL-1 同様にメサングウム細胞の増殖を促進することを示した。また、IL-1 や TNF は quiescence に静止したメサングウム細胞の増殖を促進する際、増殖因子の competence factor である PDGF が相乗的に働いたことから、インシュリン同様 progression factor であると考えられた³⁰⁾。

今後は、ヒトのメサングウム増殖性腎炎での増殖因子、その産生細胞、さらにメサングウム基質産生を促進する機構などが解明されなければならない。

文 献

- 1) Churg, J. et al.: Renal disease, Classification and atlas of glomerular disease. Igaku-Shoin, Tokyo, 1982, p 1-19.
- 2) Blantz, R.C., Gabbai, F.B., Wilson, C.B.: Pathophysiological effects of immune renal injury. In: Nephrology edited by Davison AM. Bailliere Tindall, London, 1988, p453-461.
- 3) Brenner, B.M.: Hemodynamically mediated glomerular injury and the progressive nature of kidney disease. Kidney Int. 23: 647-655, 1983.
- 4) Kreisberg, J.J., Karnovsky, M.J.: Glomerular cells in culture. Kidney Int. 23: 439-447, 1983.
- 5) Nakashima, Y., Hirose, S., Hamashima, Y.: Proliferation of cultured rabbit renal glomerular cells stimulated by platelet factor. Acta Pathol. Jpn. 30: 1-7, 1980.
- 6) Shultz, P.J., DiCorleto, P.E., Silver, B.J., Aboud, H.E.: Mesangial cells express PDGF mRNAs and proliferate in response to PDGF. Am. J. Physiol. 255: F674-684, 1988.
- 7) Conti, F.G., Stricker, L.J., Lesniak, M.A., MacKay, K., Roth, J., Stricker, G.E.: Studies on binding and mitogenic effect of insulin and insulin-like growth factor I in glomerular mesangial cells. Endocrinol. 122: 2788-2795, 1988.
- 8) Harris, R.C., Hoover, R.L., Jacobson, H.R., Badr, K.F.: Evidence for glomerular actions of epidermal growth factor in the rat. J. Clin. Invest. 82: 1028-1039, 1988.
- 9) Acton RT, Morris RJ, Williams AF: Estimation of the amount and tissue distribution of rat Thy-1.1 antigen. Eur. J. Immunol. 4: 598-602, 1974.
- 10) Yamamoto, T., Yamamoto, K., Kawasaki, K., Yaoita, E., Shimizu, F., Kihara, I.: Immunoelectron microscopic demonstration of Thy-1 antigen on the surfaces of mesangial cells in the rat glomerulus. Nephron 43: 293-298, 1986.
- 11) Ishizaki, M., Masuda, Y., Fukuda, Y., Sugisaki, Y., Yamanaka, N., Masugi, Y.: Experimental mesangioproliferative glomerulonephritis in rats induced by intravenous administration of anti-thymocyte serum. Acta Pathol. Jpn. 36: 1191-1203, 1986.
- 12) Bagchus, W.M., Hoedemaeker, P.J., Rozing, J., Bakker, W.W.: Glomerulonephritis induced by monoclonal anti-Thy-1.1 antibodies. A sequential histologic and ultrastructural study in the rat. Lab. Invest. 55: 680-687, 1987.
- 13) Yamamoto, T., Willson, C.B.: Quantitative and qualitative studies of antibody-induced mesangial cell damage in the rat. Kidney Int. 32: 514-525, 1987.
- 14) Takahashi, Y., Fishwild, D., Tan, E.M.: Characterization of proliferating cell nuclear antigen recognized by autoantibodies in lupus sera. J. Exp. Med. 159: 981-992, 1984.
- 15) Fishman, J.A., Karnovsky, M.J.: Effects of the aminonucleoside of puromycin on glomerular epithelial cells *in vitro*. Am. J. Pathol. 118: 398-407, 1985.
- 16) Moriuchi, T., Chang, H.-C., Denome, R., Silver, J.: Thy-1 cDNA sequence suggests a novel regulatory mechanism. Nature 301: 80-82, 1983.
- 17) Mizel, S.B.: Studies on the purification and structure function relationships of murine lym-

- phocyte activating factor(s) (Interleukin 1). Mol. Immunol. 17: 571-577, 1980.
- 18) Aggarwal, B.B., Kohr, W.J., Hass, P.E., Moffat, B., Spencer, S.E., Henzel, W.J., Bringman T.S., Nedwin G.E., Goeddel, D.V., Harkins, R.N.: Human tumor necrosis factor. Production, purification and characterization. J. Biol. Chem. 260: 2345-2354, 1985.
 - 19) Yaoita, E., Kazama, T., Kawasaki, K., Miyazaki, S., Yamamoto, T., Kihara, I.: *In vitro* characteristics of rat mesangial cells in comparison with aortic smooth muscle cells and dermal fibroblasts. Virchows Arch [Cell Pathol.] 49: 285-294, 1985.
 - 20) Hooke, D.H., Hancock, W.W., Gee, D.C., Kraft, N., Atkins, R.C.: Monoclonal antibody analysis of glomerular hypercellularity in human glomerulonephritis. Clin. Nephrol. 22: 163-168, 1984.
 - 21) Ferrario, F., Castiglione, A., Colasanti, G., Barbiano, Di Belgioso, G., Stertoli, S., D'Amico, G., Nava, S.: The detection of monocytes in human glomerulonephritis. Kidney Int. 28: 513-519, 1985.
 - 22) Schreiner, G.F., Cotran, R.S., Pardo, V., Unanue, E.R.: A mononuclear cell component in experimental immunologic glomerulonephritis. J. Exp. Med., 147: 369-389, 1978.
 - 23) Boyce, N.W., Tipping, P.G., Holdsworth, S.R.: Glomerular macrophages produce reactive oxygen species in experimental glomerulonephritis. Kidney Int. 35: 778-782, 1989.
 - 24) Le, J., Vilcek, J.: Biology of disease. Tumor necrosis factor and interleukin 1: Cytokines with multiple overlapping biological activities. Lab. Invest. 56: 234-248, 1987.
 - 25) Vissers, M.C.M., Fantone, J.C., Wiggins, R., Kunkel, S.L.: Glomerular basement membrane-containing immune complexes stimulate tumor necrosis factor and interleukin-1 production by human monocytes. Am. J. Pathol. 134: 1-6, 1989.
 - 26) Schmidt J.A., Mizel, S.B., Cohen, D., Green I.: Interleukin 1, a potential regulator of fibroblast proliferation. J. Immunol. 128: 2177-2182, 1982.
 - 27) Sugarman, R.J., Aggarwal, B.B., Has, P.E., Figari, I.S., Palladino, M.A., Jr., Shepard, H.M.: Recombinant human tumor necrosis factor - α : Effects on proliferation of normal and transformed cells *in vitro*. Science 230: 943-945, 1985.
 - 28) Lovett, D.H., Ryan, J.L., Sterzel, R.B.: Stimulation of the mesangial cell proliferation by macrophage interleukin 1. J. Immunol. 131: 2830-2836, 1983.
 - 29) Ooi, B.S., MacCarthy, E.P., Hsu, A.: β -endorphin amplifies the effect of interleukin-1 on mouse mesangial cell proliferation. J. Lab. Clin. Med. 110: 159-163, 1987.
 - 30) Stiles, C.D., Capone, G.T., Scher, C.D., Antoniadis, H.N., Van Wyk J.J., Pledger W.J., Dual control of cell growth by somatomedins and platelet-derived growth factor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 1279-1283, 1979.