

## 総 説

# メサンギウム細胞増殖に関する新たな制御因子と病変抑止に関する研究

土 井 俊 夫

徳島大学医学部臨床検査医学講座

(平成12年1月25日受付)

### 1. はじめに

我が国における慢性腎不全の患者数の増加は医学上のみならず膨大な医療費という社会的問題でもあり、現在1兆円が腎不全医療に必要とされている。この腎不全患者の特徴は透析導入患者の高齢化と原因疾患としての糖尿病の増加である。従って、これらの患者は透析導入後も種々の合併症をきたしやすく、予後も非常に悪い。この腎不全において、その病態進行の機序を解明し、それを抑止する事は腎臓病学における最も重要な命題である。一般に、この進行性腎障害は病理学的に糸球体硬化症を呈し、末期腎不全に陥る。その腎病変の進行増悪にはメサンギウム細胞増殖、メサンギウム硬化症およびメサンギウム細胞の形質変化が重要な機序として働いていると考えられている<sup>1,2)</sup>。これらの病態を解明し制御する事は、進行性腎障害の進展抑制における最も大切な手段である。この進行性腎障害の治療法確立を目指すにはその標的はメサンギウム細胞の増殖である。この報告では我々が見いだした新たな増殖因子である Growth Arrest Gene 6 (Gas 6) の腎障害進展における意義とメサンギウム細胞の増殖抑制を示すビタミンD誘導体の意義について報告する。

### 2. Growth Arrest Gene 6 (Gas 6)

Gas 6 は線維芽細胞の増殖を抑制させた時に強発現する因子として、クローニングされた。その構造は11 12 の  $\gamma$ -carboxyglutamate (Gla) 化ドメインがあり、Epidermal Growth Factor 様構造、Sex hormone-binding globulin (SHBG) 構造をもつビタミン K 依存性蛋白のひとつである。その構造は Protein S と類似性が報告されていた。この因子に対する受容体として最近同定された Axl, Rse, Mer という3つの異なるチロシンキナー

ゼの受容体があり、それらの Gas 6 に対する親和性は Axl が他の受容体と比較し非常に高いと報告されている。また、以前より腎炎にワーファリン治療が行なわれていたが、その詳細な機序は不明であった。ワーファリンはビタミン K 依存性で、Gla 化を特異的に阻害することより、その腎炎抑制の新たな機序にこの Gas 6 が関与しているか、又腎炎進展において Gas 6 が増殖因子として働いているかは興味ある事実である。本研究はメサンギウム細胞の増殖制御に関与する新たな因子である Gla 化蛋白である Gas 6 の役割を解明するものである。

### 3. Gas 6 の *in vitro* メサンギウム細胞における役割<sup>3)</sup>

樹立した培養マウスメサンギウム細胞を用い、その細胞培養上清中には Western blot 法で Gas 6 の存在を認めた。その受容体はメサンギウム細胞の細胞膜分画において Western blot 法で Axl の存在を認めたが、Rse は存在しなかった。従って、Gas 6 とその高親和性受容体である Axl がメサンギウム細胞において蛋白発現していることを証明した。

Gas 6 の添加 (500ng/ml) による Axl のリン酸化をみると、5分をピークに明らかな Axl のリン酸化を認めた。メサンギウム細胞の増殖を<sup>3</sup>H-thymidine incorporation (DNA 合成能) で調べると、Gas 6 の外来性の添加で濃度依存性に増殖亢進を認めた。またその Gas 6 による増殖活性は Axl の細胞外ドメイン (Axl-ECD) の添加で濃度依存性に抑制効果を認めた。次に Gas 6 による extracellular signal-regulated kinases (Erk) の活性化 (リン酸化) を検討すると、Gas 6 の添加により5分をピークに Erk のリン酸化がおこり、2 nd message の活性化がおこっている事が証明された。その Erk の活性化は Axl-ECD の添加で抑制効果を認めた。内因性の Gas 6 産生がおこり、メサンギウム細胞の増

殖に関与しているか検討すると、培養液中に Axl-ECD を添加する事により、増殖抑制が認められた。また、メサンギウム細胞にワーファリンを添加すると濃度依存性に増殖抑制効果を認め(図1)、その反応は Erk の活性化の抑制と一致していた。

これらの結果より *in vitro* メサンギウム細胞において Gas 6 が autocrine および paracrine 因子の増殖因子として働く役割をはじめて証明した。この効果はワーファリンの新たな作用機転に関与していることが判明した。

#### 4 . Gas 6 の *in vivo* における役割

Gas 6 の *in vivo* における役割を解析するために、ラットに対して抗 thy 1 腎炎を作成した。このモデルは mesangiolytic がおこり 8 日目には典型的な糸球体腎炎(細胞増殖と糸球体硬化症)を呈するようになる<sup>4)</sup>。その腎炎 3 日, 5 日, 8 日, 15 日目の腎組織より糸球体を単離し、蛋白および mRNA を分離した。Western blot 法では糸球体の Gas 6 の発現は 8 日目をピークとして腎炎モデルで著明に増加しており(図2)、蛍光抗体法でもメサンギウム領域で増加発現していた。その Gas 6 の糸球体での発現は mRNA レベルでも増強していた。一方、その受容体である Axl の糸球体発現は Gas 6 と同様に 8 日をピークに著明に増加していた。これらの結果より、*in vivo* においても Gas 6 が腎炎の増殖因子としての役割を果たしていることが証明された。

ワーファリンの *in vivo* における効果を検討するために、抗 thy 1 腎炎に対して凝固異常をきたさない低濃度のワーファリンを投与した。その結果、ワーファリン治療群では蛋白尿減少と伴って明らかな病変改善効果を

Warfarin inhibits mesangial cell proliferation

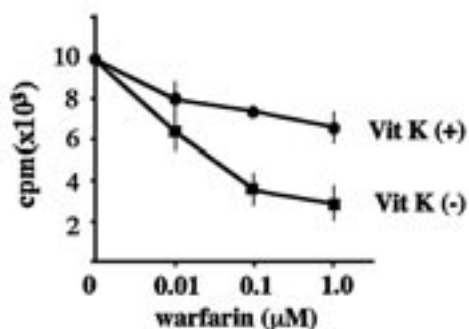


図1 . 培養メサンギウム細胞におけるワーファリン添加による増殖抑制とビタミン K による効果

Expression of Gas6 protein in the glomeruli of anti-thy 1.1 GN

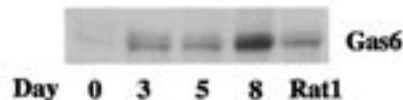


図2 . 抗 thy 1 モデルにおける糸球体の Gas 6 発現増強

認め、細胞増殖および糸球体硬化指数とも著明に低下した。また Axl-ECD の過剰を抗 thy 1 腎炎に投与すると、同様に組織病変の改善傾向を認めた。このように糸球体腎炎の発症・進展の制御機構における新たな増殖因子である Gas 6 の役割を *in vitro* および *in vivo* で解明し、その臨床における意義を明らかにした。その成果により腎炎の発症および進展の制御における新たな機構が明らかにされ、さらにヒト腎炎に対する臨床的意義を明白にした。

#### 5 . ビタミン D 誘導体の *in vitro* メサンギウム細胞および *in vivo* モデルにおける意義

ビタミン D は平滑筋細胞の増殖抑制をしめす。しかしビタミン D は生体では高カルシウム血症や高リン血症、高リン尿症など腎疾患の進行において増悪因子として作用する。一方、ビタミン D 誘導体であるマキシカルシトールはこれら高カルシウム血症や高リン血症などの副作用を非常にきたし難い分子であり、強力な細胞増殖抑制を示す可能性がある。この分子の腎疾患における役割を *in vitro* および *in vivo* で解明し、その臨床における意義を明らかにした。

培養メサンギウム細胞に対しマキシカルシトールを添加すると、 $10^{-8}$ M で明らかな DNA 合成の抑制を認めた<sup>5)</sup>。この分子を *in vivo* での検討を加えた<sup>6)</sup>。抗 thy 1 腎炎に対し、マキシカルシトールを投与した。その結果、8 日目および14日目ともに蛋白尿減少効果と糸球体細胞増殖の抑止および糸球体硬化症の著明な改善を認めた(図3)。そのマキシカルシトールの作用は硬化症における細胞外基質の重要な成分である I 型コラーゲンやIV型コラーゲンの著明な減少を示した。また平滑筋  $\alpha$  アクチンの減少を示した。これらの蛋白発現の変化は Real time polymerase chain reaction (PCR) で検索した糸球体

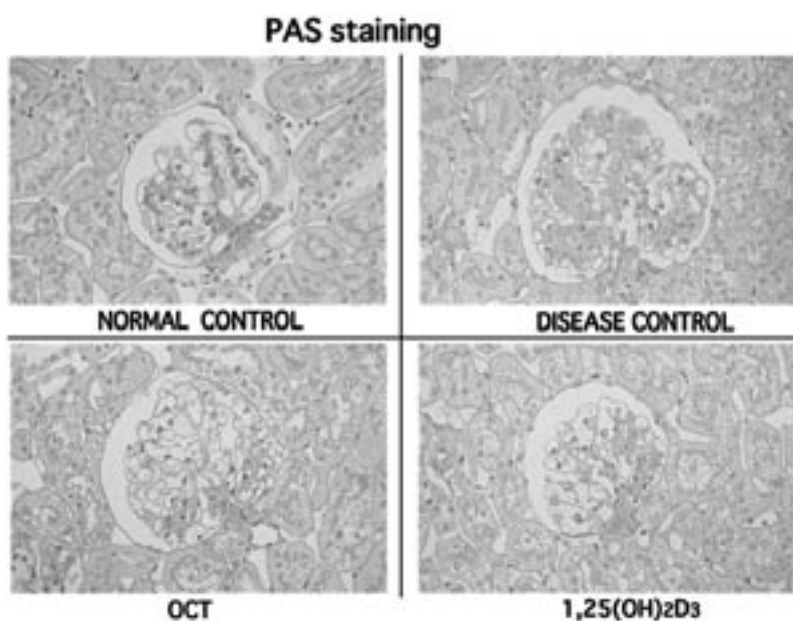


図3 . 抗 thy 1 モデルに対するマキシカルシトール投与の効果 ( 8 日 )  
 disease control : 抗 thy 1 腎炎, OCT : マキシカルシトール投与群, 1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> :  
 活性型ビタミン D 投与群 (高カルシウム血症をきたし, 栄養失調に陥り, 著明な体重  
 減少を認めた。)

mRNA レベルでの変化と相関していた。またこのモデルの硬化症進展には transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) が関与している事を蛍光抗体法および上述した Real time PCR 法で確認した。またマキシカルシトール投与は TGF- $\beta$  の発現を著明に抑制していた。このマキシカルシトールによる治療群では血中カルシウムやリンの異常を認めなかった。以上の事実よりマキシカルシトールが腎疾患の治療薬として新たな展開をもたらすと考えられる。

## 6 . おわりに

この発表では腎疾患の進展に関する新たな増殖因子である Gas 6 とその制御, また新たな細胞増殖の制御因子であるマキシカルシトールの腎疾患における役割を明らかにした。これらは実際の腎疾患治療に結びつく将来性

のある治療法として, 臨床検討も行っていく必要があると考えている。腎不全医療は透析療法で生命維持可能となったが, より重要なテーマはこの腎不全に陥る病態を解明し, 末期腎不全への進行を抑止することである。このことは今後の腎臓病学における最も大切な課題である。

## 文 献

- 1 . Klahr, S., Schreiner, G., and Ichikawa, I. : The progression of renal disease. *N. Engl. J. Med.*, 318 : 1657-1666, 1988
- 2 . Striker, L.J., Peten, E., Elliot, S., Doi, T., et al. : Heparin and peptide growth regulators. Effect on mesangial cell turn over. *Lab. Invest.*, 64 : 446-456, 1991
- 3 . Yanagita, M., Ishii, K., Ozaki, H., Arai, H., et al. : Mechanism of Inhibitory Effect of Warfarin on Mesangial Cell Proliferation. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 10 : 2503-2509, 1999
- 4 . Sunamoto, M., Kuze, K., Tsuji, H., Ohishi, N., et al. : Antisense oligonucleotides against collagen-binding stress protein HSP47 suppress collagen accumulation in experimental glomerulonephritis. *Lab. Invest.* 78 : 967-972, 1998
- 5 . Abe, H., Iehara, N., Utsunomiya, M., Kita, T., Doi, T. : A vitamin D analog regulates mesangial cell smooth muscle phenotypes in a transforming growth factor- $\beta$  type II receptor-mediated manner. *J. Biol. Chem.*, 274 : 20874-20878, 1999
- 6 . Makibayashi, K., Tatematsu, M., Hirata, M., Fukushima, N., et al. : A Vitamin D Analog Ameliorates Glomerular Injury on Rat Glomerulonephritis, Submitted.

## *A novel mechanism of growth regulation on mesangial proliferation*

*Toshio Doi*

*Department of Laboratory Medicine, The University of Tokushima School of Medicine, Tokushima, Japan*

### SUMMARY

Mesangial proliferation is a common feature of many glomerular diseases, therefore, understanding the regulatory mechanism is important for the treatment of glomerular diseases. The present study showed growth arrest gene-6 (Gas6) is a new autocrine growth factor of mesangial cells and warfarin inhibited mesangial proliferation by inhibiting  $\gamma$ -carboxylation of Gas 6 *in vitro* and *in vivo*. We also found vitamin D analog (22-oxa-calcitriol) is a new growth regulator for mesangial cells *in vivo*. These results indicate that these compounds have considerable potential for use as therapeutic strategy in the treatment of progressive glomerular disease.

Key words : Gas 6, 22-oxa-calcitriol, mesangial proliferation, Warfarin, vitamin K