

尿中 NRK49-F 細胞増殖促進活性の各種腎疾患の病態における役割

岡山大学医学部小児科学教室 (指導: 清野佳紀教授)

江 口 純 治

(平成 6 年 3 月 29 日受稿)

Key words : TGF- β , NRK49-F, colorimetric bioassay

緒 言

腎糸球体におけるメサンギウム基質やメサンギウム細胞の増加は、慢性糸球体疾患の特徴的組織像であり、その程度は予後を決定する重要な変化である。近年、種々の腎疾患における糸球体障害の発症・進展に、いくつかのサイトカインの関与が示唆されており、これらのサイトカインに関する研究が活発に行われているが、小児の臨床的検討の報告は少ない。

糸球体障害に関与していると考えられているサイトカインとしては、TGF- β (transforming growth factor- β)¹⁾²⁾, PDGF (platelet-derived growth factor)³⁾⁴⁾, Interleukin-6⁵⁾ 等がある。

その中でも TGF- β は、分子量 25kD の 2 量体のポリペプチドで、多くの細胞に対して増殖抑制因子としてはたらくほか、細胞外基質の蓄積、免疫能の抑制、単球の遊走促進など多彩な作用を有する成長因子である⁶⁾。抗 Thy-1 抗体型腎炎における研究¹⁾²⁾や、遺伝子導入技術を利用した研究⁷⁾から、TGF- β はメサンギウム基質の増加等を介して、糸球体障害に関与していると考えられている。

一方、このようなサイトカインの研究において、現在、分子生物学的アプローチが広く行われるようになってきたが、腎生検標本を用いた PCR (polymerase chain reaction) 法や in situ hybridization による研究結果は免疫組織化学的研究から予想される域を越えない。またこのような研究結果が、その糸球体障害の病因であるのか、二次的な変化であるのかを判断するには、

経過を追跡しなければならないが、腎生検標本でそれを行うことは、臨床的に、特に小児では困難である。

そこで、小児の腎疾患の発症、進展におけるサイトカインの関与を明らかにする目的で、尿中生理活性物質の検討を、TGF- β によって増殖が促進される正常ラット腎線維芽細胞 NRK49-F⁸⁾ の培養細胞系を用いた bioassay 系を構築し測定した。

対 象 と 方 法

1. 対 象

岡山大学小児科でフォロー中のネフローゼ症候群 (寛解期) 7 例 (ステロイド抵抗群 4 例, ステロイド反応群 3 例), 未治療の IgA 腎症 4 例, 発症から 6 ヶ月以上経過した紫斑病性腎炎 5 例, 先天性ネフローゼ症候群 1 例, 無症候性血尿 3 例, および腎機能や尿所見に異常の認められない正常小児 4 例を対象とした (表 1)。ネフローゼ症候群 7 例のうち、症例 1, 2, 4, 5 の 4 例 (ステロイド抵抗群 3 例, ステロイド反応群 1 例) が再発し、再発時についても検討した。

2. 検体の採取、保存

患者の早朝第一尿を、1500rpm10分で遠心分離し、沈渣が再浮遊しないように上清のみを採取して、-40℃で凍結保存した。なお、NRK49-F 細胞増殖活性の検査に使用する検体は、凍結前に 0.2 μ m のフィルター (DynaGard, Microgon 社) を通して滅菌処理を行い、無菌的に保存した。

表1 対 象

症例	年齢 (歳)	性別	診断名
1	4	男	ネフローゼ症候群 (ステロイド抵抗群)
2	15	女	ネフローゼ症候群 (ステロイド抵抗群)
3	6	男	ネフローゼ症候群 (ステロイド抵抗群)
4	7	男	ネフローゼ症候群 (ステロイド抵抗群)
5	13	男	ネフローゼ症候群 (ステロイド反応群)
6	6	男	ネフローゼ症候群 (ステロイド反応群)
7	19	男	ネフローゼ症候群 (ステロイド反応群)
8	6	男	紫斑病性腎炎
9	4	女	紫斑病性腎炎
10	12	男	紫斑病性腎炎
11	12	女	紫斑病性腎炎
12	14	男	紫斑病性腎炎
13	8	男	IgA腎症
14	15	女	IgA腎症
15	16	女	IgA腎症
16	8	女	IgA腎症
17	1	男	先天性ネフローゼ症候群
18	5	女	無症候性血尿
19	9	女	無症候性血尿
20	12	女	無症候性血尿
21	15	男	正常
22	15	男	正常
23	12	女	正常
24	12	男	正常

3. Colorimetric bioassay

96wellのマイクロプレート (Costar 社) に 1 wellあたり 4×10^3 個の NRK49-F 細胞 (JCRB 細胞バンクから入手) を播種し, 5% 仔ウシ血清 (FCS, Irvine 社) 加 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) で培養した。24時間後, 細胞を DMEM で洗浄し, その後患児尿検体 1% を含む無血清 DMEM に培地を変更してさらに 48 時間培養した。NRK49-F 細胞増殖活性が認められた場合, それが TGF- β 活性に基くものか否かを検討する目的で, 希釈尿に最終濃度 $5 \mu\text{g/ml}$ の抗 TGF- β 中和抗体 (R&D System 社) を添加し, 同様に培養した。培養終了後, Absher ら⁹⁾の方法を一部改変した Colorimetric bioassay を行い, 細胞増殖活性を測定した。まず培養液を除去してリン酸緩衝食水で細胞を洗浄し, ホルマリンで 30 分間固定した。10mM ほう酸ほう砂緩衝液 (pH8.5) で洗浄し, 1% メチレンブルーで 10 分間染色して, 大量の

水で十分に洗浄した。水を充分除去してエタノールと INHCl の等量混合液で細胞内のメチレンブルーを抽出し, 600nm の吸光度を測定 (ELISA READER, BIO RAD 社) した。培養開始 24 時間後から FCS を含有しない DMEM で培養した well の吸光度を基準値として, 各検体の well の吸光度の比 (proliferation index, PI) で増殖活性を評価した。尚, 各検体とも 6 個の well を使用して well 毎に PI を算出し, その平均をその検体の PI とした。

さらに, 1% FCS 含有 DMEM で同様に培養した well の吸光度を陽性対照とし, この PI が 2 以上の増殖促進活性を認める場合のみ検討対象とした。

統計学的処理は Student t-test を用い, $p < 0.05$ を有意差ありとした。

4. Western immunoblotting

上述の凍結保存検体 $10 \mu\text{l}$ に INHCl $3 \mu\text{l}$ を混和し, 室温で 10 分静置した後, INNaOH $3 \mu\text{l}$ を添

加して中和させた。

酸処理後の検体を Laemmli の方法¹⁰⁾に従って、SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) で蛋白質を分離した。即ち、検体16 μ lに同量のサンプル緩衝液 (62.5mM Tris-HCl, 10% glycerol, 3% SDS, 5% 2-mercaptoethanol, 0.1% Bromophenol blue, BPB) を加え、100℃ 1分の熱処理を行った。この溶液のうち20 μ lを11%の濃度のアクリルアミドゲルにかけ、ミニゲル電気泳動装置 (Mini-PROTEIN II; BIO RAD 社) を用いて通電した。BPB がゲル下端まで泳動されたところでゲルを取り出し、セミドライブロッティング装置 (LKB pharmacia 社) を用いてニトロセルロース膜 (Hybond-C; Amersham 社) に転写した。

次に蛋白の転写されたニトロセルロース膜に、一次抗体として抗 TGF- β 中和抗体を60分間、二次抗体としてビオチン化抗ニワトリ IgG (VECTOR 社) を30分間反応させた。ABC試薬 (Vecta-stain ABC; VECTOR 社) を添加した後、ECL (enhanced chemiluminescence) Western blotting detection kit (Amersham

社) で、Kodak X-OMAT film 上に抗原抗体反応を検出した。

結 果

1. 尿中 NRK49-F 細胞増殖促進活性

まず、今回行った bioassay 系の妥当性を検討するために、NRK49-F 細胞増殖促進活性が中等度であった尿検体における測定間及び測定内の変動係数 (coefficient of variation, CV) を算出した。測定間 CV は7.8%で、測定内 CV は9.2%であったことから、本 bioassay の結果は評価の対象となると考えられた。

1) ネフローゼ症候群

図1にネフローゼ症候群の PI を示した。

寛解期のネフローゼ症候群では、1例を除き増殖促進活性を認めなかった (平均 PI=1.06)。増殖促進活性を認めた1例 (PI=1.29) の抗 TGF- β 抗体添加時の PI は1.31で、抗体添加による活性低下は認められなかった。

再発の認められた4例 (ステロイド抵抗群3例、ステロイド反応群1例) では、再発時の尿全てに増殖促進活性を認めた (平均 PI=1.60)。

これら4例を組織学的に分類すると巣状糸球

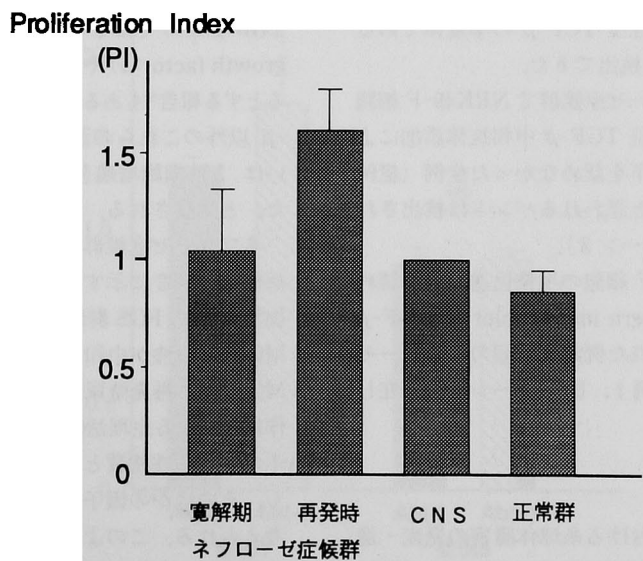


図1 ネフローゼ症候群の Proliferation Index

寛解期のネフローゼ症候群7例、再発時のネフローゼ症候群4例、先天性ネフローゼ症候群 (CNS) 1例、正常群4例について、各群の尿中 NRK49-F 細胞増殖促進活性を検討した。

体硬化症 (focal glomerular sclerosis, FGS) 2 例 (症例 2, 4) と微小変化群 (minimal change, MC) 2 例 (症例 1, 5) であった。この 2 群で抗 TGF- β 抗体添加による増殖促進活性の変化を比較した (図 2, 図 3)。その結果, FGS 群ではその活性が低下したのに対し, MC 群では抗体添加による低下は認められなかった。

先天性ネフローゼ症候群は 1 例のみであったが, PI=1.05 とほとんど増殖促進活性は認められなかった。

2) IgA 腎症及び紫斑病性腎炎

IgA 腎症では 4 例とも PI は 1 以下で増殖促進活性を認めなかったのに対し, 紫斑病性腎炎全例に増殖促進活性 (PI=1.04~1.44) を認めた。この活性は抗 TGF- β 抗体添加によって, 有意に低下 (平均 PI=1.01) した (図 4)。

3) 無症候性血尿および正常群

腎機能に異常の無いこれらの群の PI は 0.74~1.05 と増殖促進活性は認められなかった。

2. Western immunoblotting による検討

尿中 NRK49-F 細胞増殖促進活性を認めた症例で, 抗 TGF- β 中和抗体添加によって増殖活性の低下を認めたものは, 図 5 に示すように, Western immunoblot 法で, TGF- β によると考えられる 25kD のバンドが検出された。さらに, 検体によっては活性型 TGF- β の単量体である 12.5kD のバンドも検出できた。

寛解期のネフローゼ症候群で NRK49-F 細胞増殖活性を認め, 抗 TGF- β 中和抗体添加によって増殖活性の低下を認めなかった症例 (症例 5) では, TGF- β と思われるバンドは検出されなかった (図 5 レーン 3)。

一方, NRK49-F 細胞の増殖促進活性を認めなかったが, Western immunoblot で TGF- β のバンドが検出された例が寛解期のネフローゼ症候群に 1 例 (症例 1, 図 5 レーン 5) 存在した。

考 察

種々の腎疾患における糸球体障害の発症・進展に, TGF- β ¹⁾²⁾, PDGF³⁾⁴⁾, Interleukin-6⁵⁾ 等のサイトカインが関与していると考えられている。TGF- β に関しては, 抗 Thy-1 抗体型腎炎

で, メサンギウム基質の蓄積と並行して, 糸球体での TGF- β の発現が増加し²⁾, この基質の増加は, 抗 TGF- β 中和抗体を投与することによって, 著明に抑制されたと報告されている¹⁾。このように TGF- β が糸球体硬化に大きな影響を与えていることが, 実験動物では証明されているが, 人体で in situ hybridization や PCR 法等の分子生物学的研究を行うには, 限界がある。これらに対するアプローチとして, 今回, NRK49-F 細胞を用いた bioassay により, 尿中に排出される生理活性物質について検討した。

NRK49-F 細胞増殖促進活性は紫斑病性腎炎 5 例, ネフローゼ症候群再発時 4 例, および寛解期のネフローゼ症候群 1 例において認められた。これら 10 検体のうち, 7 例が抗 TGF- β 抗体によってその活性が中和されたこと, および Western immunoblot で 25kD のバンドが認められたことから, 尿中の NRK49-F 細胞増殖促進活性物質として TGF- β が考えられた。

一方, 増殖促進活性を認めなかったにもかかわらず, Western immunoblot で 25kD のバンドを認めた例が 1 例存在した。これは, 尿中に TGF- β が存在したにも関わらず NRK49-F 細胞の増殖刺激となり得なかったと考えられる。この原因としては, 1) NRK49-F 細胞の増殖には TGF- β だけではなく, TGF- α (transforming growth factor- α) や血清成分の共存が必要であるとする報告⁶⁾もあることから, この検体には TGF- β 以外のこれらの因子が欠乏していた, あるいは 2) 細胞増殖を抑制する因子が含まれていた, と推察される。

ネフローゼ症候群の再発時における増殖促進活性は, 図 2 に示すように, 抗 TGF- β 抗体添加によって, FGS 群は活性が低下したのに対し, MC 群は活性が中和されなかった。したがって, MC 群でも再発時尿に NRK49-F 細胞増殖促進作用を有する生理活性物質が排出されているが, その生理活性物質として TGF- β の関与は少なく, そのほかの因子が増殖促進活性を示したと考えられる。このように, 組織像によって, 抗 TGF- β 抗体添加による活性の変化に違いが認められたことから, これら 2 つの群のネフローゼ症候群再発に関わる成長因子に相違があること

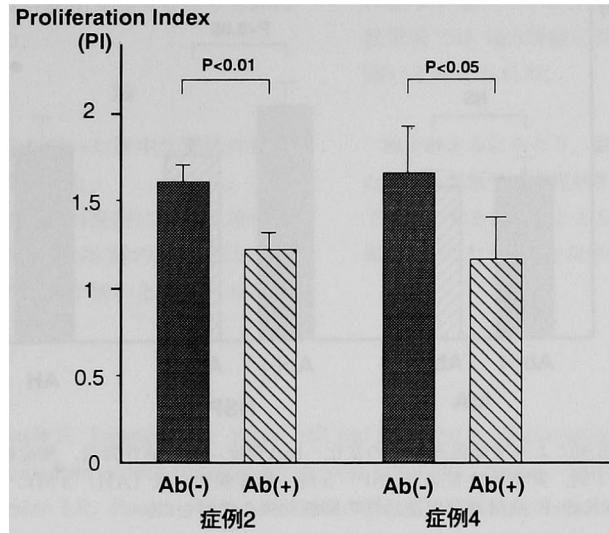


図2 抗 TGF- β 抗体添加による増殖促進活性の変化—FGS群
ネフローゼ症候群で再発を認めた FGS の2例各々について、抗 TGF- β 抗体添加による NRK49-F 細胞増殖促進活性の抑制効果を検討した。

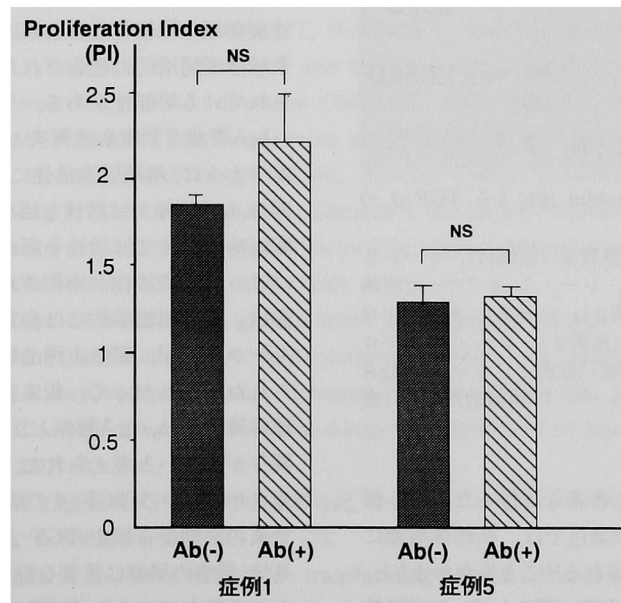


図3 抗 TGF- β 抗体添加による増殖促進活性の変化—MC群
ネフローゼ症候群で再発を認めた MC の2例各々について、抗 TGF- β 抗体添加による NRK49-F 細胞増殖促進活性の抑制効果を検討した。

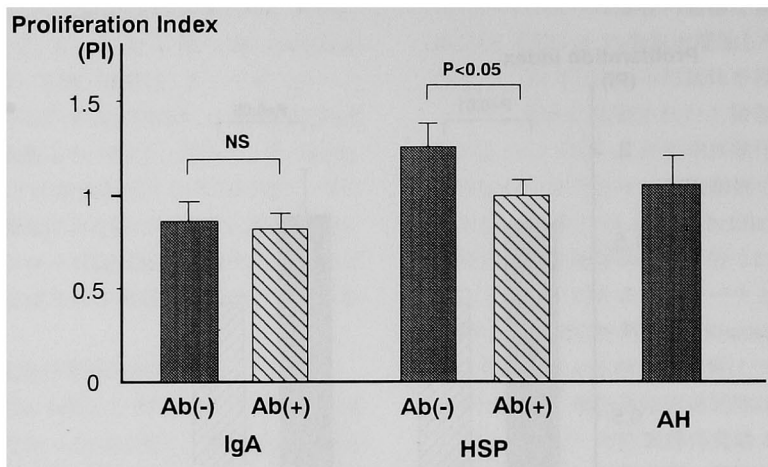


図4 抗 TGF- β 抗体添加による増殖促進活性の変化—IgA腎症, 紫斑病性腎炎, 無症候性血尿
IgA腎症 (IgA) 4例, 紫斑病性腎炎 (HSP) 5例, 無症候性血尿 (AH) 3例について, 抗 TGF- β 抗体添加による NRK49-F 細胞増殖促進活性の抑制効果を検討した。

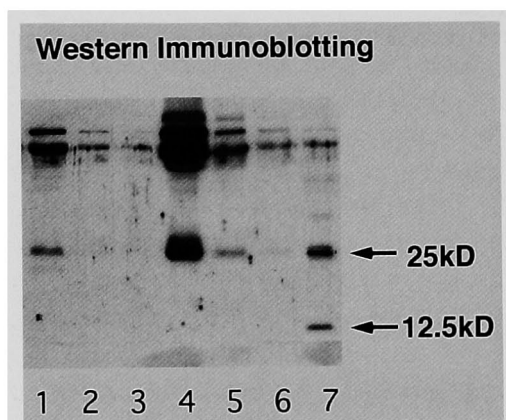


図5 Western immunoblot 法による TGF- β の検出

レーン1 紫斑病性腎炎 (症例11), レーン2 正常児 (症例21), レーン3 ネフローゼ症候群 (寛解期) (症例5), レーン4 ネフローゼ症候群 (再発時) (症例4), レーン5 ネフローゼ症候群 (寛解期) (症例1), レーン6 IgA腎症 (症例14), レーン7 紫斑病性腎炎 (症例12)。

が考えられる。さらに著者らが行った FGS 群における免疫組織化学染色では, 糸球体病変に TGF- β が高率に検出される¹¹⁾ことを合わせると, TGF- β が硬化病変の進展に関与している可能性も考えられる。一方, これらネフローゼ症候群再発時のように多量の尿蛋白が認められている

ときのこれらの尿中生理活性物質の起源として 1) 糸球体性蛋白尿としての尿中への漏出, 2) 尿細管性蛋白尿としての尿中への喪失, 3) 糸球体病変で局所的に産生されたものが尿中へ漏出, 等が考えられる。しかし, 今回同時に検討を行った先天性ネフローゼ症候群では増殖促進活性は認められなかった。したがって, 糸球体性蛋白尿や尿細管性蛋白尿によるものではなく, 糸球体で局所的に産生されたものが尿中に排出されている可能性がある。

IgA腎症と紫斑病性腎炎との比較でも, 図4に示すように, 増殖促進活性に相違が認められた。即ち, IgA腎症では活性を認めなかったのに対し, 紫斑病性腎炎では活性を認め, 抗 TGF- β 抗体によってその活性が中和された。この2つの疾患は, 病理組織学的には非常に類似しているにもかかわらず, 尿中生理活性物質に相違が認められた。したがって, 紫斑病性腎炎における糸球体障害では, IgA腎症と比較して, TGF- β の関与が大きいと考えられた。ウサギに腎炎を惹起させて尿中の TGF- β の経過をみた実験では, 腎炎の早期から尿中 TGF- β の活性が上昇したり¹²⁾, 発病の早期に重要な役割をしていると考えられる報告¹³⁾がある。TGF- β は本来組織修復に働くことから, 実験腎炎のように急性の変化のあったときに発現されるとすると, IgA腎症のよ

うな慢性の変化よりも紫斑病性腎炎のように、急性ないしは亜急性の変化で発現される可能性があると考えられた。

結 論

1. NRK49-F 細胞を用いた尿中生理活性物質の簡便な測定系を開発した。
2. ネフローゼ症候群の再発時における尿中生理活性物質の相違から、FGS 群の再発では、MC 群に比し TGF- β の関与が強いと考えられた。

3. IgA腎症と紫斑病性腎炎は、その発症、進展に関与するサイトカインに相違があり、紫斑病性腎炎では IgA腎症に比し、TGF- β の関与が強いと考えられた。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました岡山大学医学部小児科学教室清野佳紀教授に謹んで感謝の意を表するとともに、終始直接に御指導、御教示いただきました田中弘之先生に深謝致します。

文 献

- 1) Border WA, Okuda S, Languino LR, Sporn MB and Ruoslahti E: Suppression of experimental glomerulonephritis by antiserum against transforming growth factor β 1. *Nature* (1990) **346**, 371—374.
- 2) Okude S, Languino LR, Ruoslahti E and Border WA: Elevated expression of transforming growth factor- β and proteoglycan production in experimental glomerulonephritis. *J Clin Invest* (1990) **86**, 453—462.
- 3) Gesualdo L, Pinzani M, Floriano JJ, Hussan MO, Nugy NU, Schena SP, Emancipator SN and Abboud HE: Platelet derived growth factor expression in mesangial proliferative glomerulonephritis. *Lab Invest* (1991) **65**, 160—167.
- 4) Yoshimura A, Gordon K, Alpers CE, Floege J, Pritzl P, Ross R, Couser WG, Bowen-Pope DF and Johnson RJ: Demonstration of PDGF B-chain mRNA in glomeruli in mesangial proliferative nephritis by in situ hybridization. *Kidney Int* (1991) **40**, 470—476.
- 5) Horii Y, Muraguchi A, Iwano M, Matuda T, Hirayama T, Yamada H, Fujii Y, Dohi K, Ishikawa H, Ohmoto Y, Yoshizaki K, Hirano T and Kishimoto T: Involvement of IL-6 in mesangial proliferative glomerulonephritis. *J Immunol* (1989) **143**, 3949—3955.
- 6) Roberts AB and Sporn MB: The transforming growth factor- β s; in *Handbook of Experimental Pharmacology*, Sporn MB and Roberts AB eds, Springer-Verlag, Heidelberg (1990) pp419—472.
- 7) Isaka Y, Fujiwara Y, Ueda N, Kaneda Y, Kamada T and Imai E: Glomerulosclerosis induced by in vivo transfection of transforming growth factor- β or platelet-derived growth factor gene into the rat kidney. *J Clin Invest* (1993) **92**, 2597—2601.
- 8) Meager A: Assays for transforming growth factor β . *J Immunol Method* (1991) **141**, 1—14.
- 9) Absher M, Baldor L and Kelley J: A rapid colorimetric bioassay for transforming growth factor β (TGF- β) using a microwell plate reader. *J Immunol Method* (1991) **138**, 301—303.
- 10) Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. *Nature* (1970) **227**, 680—685.
- 11) 伊藤利幸, 田中弘之, 安井雅人, 山手智夫, 清野佳紀, 小林 晏: 小児ネフローゼ症候群の糸球体における TGF- β の発現. *日本腎臓学会誌* (1993) **35**, 535.
- 12) Noh JW, Wiggins R and Phan SH: Urine transforming growth factor- β activity is related to the degree of scarring in crescentic nephritis in the rabbit. *Nephron* (1993) **63**, 73—78.
- 13) Coimbra T, Wiggins R, Noh JW, Merritt S and Phan SH: Transforming growth factor- β production in anti-glomerular basement membrane disease in the rabbit. *Am J Pathol* (1991) **138**, 223—234.

NRK49-F cell proliferation activity of urine in renal diseases**Junji EGUCHI**

**Department of Pediatrics,
Okayama University Medical School,
Okayama 700, Japan
(Director : Prof. Y. Seino)**

To evaluate the roles of transforming growth factor- β (TGF- β) on the glomerular cell proliferation and sclerosis, a new colorimetric bioassay system for urinary excretion of TGF- β has been developed by using NRK49-F cell culture. The urinary TGF- β activity was detected by this method in focal glomerular sclerosis (FGS) and purpura nephritis but not in minimal change nephrotic syndrome and IgA nephropathy. The bioassayed TGF- β activity was confirmed by a blocking experiment using a neutralizing antibody and by Western immunoblotting. These findings suggest that TGF- β plays an important role in the progression of the glomerular lesions, in FGS and purpura nephritis.