

新しい腎炎惹起物質 Megsin ならびに carbonyl stress と腎疾患との関わり

平成 11 年度愛知県透析医会研修報告

演者 東海大学総合医学研究所 宮田敏男講師

渡邊有三

はじめに

日本の透析患者数は 20 万人に達し、年間医療費も概算で一兆円程度にもなります。このような末期腎不全患者の透析導入を阻止すること、たとえ透析導入になっても合併症を予防することは、医療費削減の意味からも重要です。まず腎炎予防対策として、われわれ腎臓病学者はいまだにヒトの腎炎と類似の実験モデルも作成できていないという問題点があります。そこで、ヒトにおける腎炎惹起物質の可能性を持つ遺伝子である Megsin というものの研究の経緯とその未来について、宮田先生に概説していただきました。

2 番目の問題は透析導入を必要とする基礎疾患で、最も頻度が高い糖尿病性腎症にスポットをあてました。この糖尿病性腎症の進展に関連する有力な危険因子と考えられている nonenzymatic glycosylation の問題も carbonyl stress という新しい概念で近年論じられようとしています。そこで、この問題についても精力的に研究活動している宮田先生に概説していただきました。

この講演内容は日本透析医会雑誌の読者にも興味深い問題点だと思いますので、その講演内容を総説として報告したいと思います。

1 遺伝子情報としての Megsin の発見と腎炎との関連

1) Megsin 発見の経緯

進行性糸球体障害の中で重要な役割を果たす細胞

はメサンギウム細胞と考えられます。そこで、ヒトのメサンギウム細胞に発現している遺伝子を同定することにより、腎炎関連遺伝子がみつかるとはならないかとの発想から、mesangium genom project を行っています。まず、メサンギウム細胞から library を作成し、その中から 2,000 個のクローンを取り出し、ヒトのメサンギウムにしか発現していない遺伝子情報を検索しています。このクローンの sequence を解析すると、fibronectin が沢山含まれることがわかります。さらに翻訳された蛋白にどのような機能があるのかということコンピューター解析による類似蛋白から解析してみると、serine protease inhibitor (serpin) の機能と非常に似た蛋白を見つけることができました。この蛋白が serpin と似た構造を有していることに着目して、その蛋白を Megsin と命名しました。そして、その Megsin の c-DNA から genom をとってみると、その遺伝子は染色体の 18 番目の長腕にマップされることもわかりました。ちょうどその部分は serpin がクラスターをつくっているところですから、Megsin もそのような役割を生体内ではたしていることが推測されるわけで、メサンギウム基質の代謝回転を考える上で非常に面白い物質とわれわれは考えました。

2) Megsin は本当にメサンギウム特有か

次に重要なことは、この Megsin が本当にメサンギウムのみの特異的かということです。これを northern blot という手法で心臓・脳・腎臓などで検討しますと、培養メサンギウム細胞にしか発現していません。

腎臓全体の検討で発現が明らかでないのは、腎臓の中でメサンギウムが占める割合が小さいからと推論されます。次に PCR という手法で各種培養細胞を使って検討もしたのですが、この結果からもメサンギウムに特異的な遺伝子であることが確認されました。3 番目に行った仕事は in situ hybridization という手法で、組織上で遺伝子の発現をチェックするものです。この結果からも Megsin は糸球体であって尿細管にはないことが確認されています。実際、Megsin に対する抗体を作成し、ヒト腎組織で染色してみますとメサンギウムが染色されることも確認されています。ただ細胞が染まるのか基質が染まるのかについては、酵素電顕などの手法で今後確認していきたいと思っています。

さて、ヒトの遺伝子というものは DNA レベルではすべての細胞が同様に持っているわけですが、何故メサンギウム細胞のみに Megsin が発現するのかという問題について考えてみたいと思います。われわれは Megsin の上流に promotor を見つけています。ただ、この promotor は、Megsin とは異なる遺伝子を試験的に繋げてみて、メサンギウム細胞や線維芽細胞や血管内皮細胞に発現させると、メサンギウム細胞に繋がった状態のみで効率よく働いていることがわかります。つまり、メサンギウム細胞特有の核転写調節因子というものが働いていることが推測されるのです。このように細胞の DNA はすべての遺伝子を持っていますが、細胞毎にその発現は微妙にコントロールされているといっても過言ではないでしょう。

3) Megsin と腎炎との関連

それではこの Megsin が本当に腎炎で重要なのかという問題が起ってきます。ヒトの腎生検組織で Megsin の染色性を検討しますと、膜性腎炎や微小変化型ネフローゼ症候群では陽性になりませんが、メサンギウム細胞や基質の増殖が顕著な糖尿病性腎症や IgA 腎炎では陽性になることが判明しています。ただこれが原因なのか結果なのかということはまだ解明されていません。ラットの実験腎炎モデルでは、ラット特有の抗原である Thy-1 に対する抗体を 1 度注射するだけで典型的な腎炎変化が観察される Thy-1 腎炎という面白いモデルが確立されています。そして、この腎炎モデルでは抗体注射後 1 週間程度のメサンギウム細胞が最も増殖する時期に、ラット Megsin の発

現が最も高まることが解明されています。前述しましたように、Megsin は serpin の機能を有していると推測されます。serpin は蛋白分解酵素の阻害作用を有し、基質のリモデリングを抑制することが証明されています。現実的に serpin の仲間である plasminogen activator inhibitor-1 をどんどん産生するような transgenic mouse に bleomycin を投与すると肺線維症が起こることが確認されています。このような報告から、Megsin が IgA 腎炎とか糖尿病性腎症の糸球体硬化になんらかの関与をしていることが示唆されます。実際、サイトメガロウィルスの enhancer にこういう Megsin のプロモーターを含む unit をマウスに強制発現させると、まず糸球体肥大が起きること、ついでメサンギウム細胞数や基質の増加が確認されました。つまり、Megsin 1 つの遺伝子操作によって進行性腎障害モデルが作成されたのです。今後は、この遺伝子のノックアウトマウスで糖尿病性糸球体硬化はどうなるのか、serpin に対抗できるような薬剤はないかなどの研究を進めていきたいと考えています。

2 遺伝子とはまったく関係ない nonenzymatic glycosylation と腎臓病

1) 糖尿病性腎症と AGEs

今日のもう 1 つの話題は遺伝子とはまったく関係ない代謝の仕事です。糖尿病は血糖が高い状態が続きます。その結果として Maillard 反応が起こり、蛋白が糖で修飾された AGEs (advanced glycation end-products) ができるということは有名です。実際、試験管の中では pentosidine, carboxymethyllysine (CML), pyrrole などが産生されます。私は当初この様々な AGEs の抗体を使ってヒトの腎生検組織を染めてみました。すると、糖尿病性腎症の初期の段階で、メサンギウム基質の軽度拡大がある患者さんの組織では pentosidine や CML は染色されますが、pyrrole は間質には染色されますが糸球体は陰性です。この結果で私が最初に抱いた疑問は、高血糖が問題で AGEs が障害を与えるならば、なぜ pyrrole は染色されないのかということでした。

この疑問について考えている間に、これら AGEs にもその生成段階に若干の違いがあることがわかってきました。それは、糖化だけではなく酸化という状態により生成物が異なるということです。たとえば

pentosidine と CML は酸化反応がないと構造ができません。ですから、酸素の無い状態で幾ら蛋白とリボース・糖を混ぜてもこの2つはできません。一方 Pyrraline は酸素がなくても生成されます。つまり、糖尿病性腎症の典型的な部位に前2者があって pyrraline が無い理由は、おそらく酸化ストレスが原因ではないかという仮説を立てました。

2) 酸化ストレスと carbonyl compounds

酸化ストレスという状態は活性酸素というものが多く状態を示します。細胞は酸素を取り込み、効率よく燃焼させて生命活動を行っていますが、酸素の代謝過程で活性酸素ができます。この活性酸素は2通りの方法で蛋白を修飾します。1つは蛋白の methionine や tyrosine を直接修飾する方法です。もう1つは、糖・炭水化物・脂質などを修飾し、これが二次的に蛋白を修飾するという方法です。私達はこのような状況を carbonyl stress と名付けました。生体には活性酸素による障害を防御する機構が存在します。たとえば、superoxide dismutase (SOD) という酵素や glutathione 系、NADPH 系といったものです。その他にも細胞膜にある脂質も防御機構の1つです。これらが buffer として活性酸素を受け取ると、自らのレベルを下げる代わりに以下に述べるような様々な化合物 (glyoxal, arabinose, pentosidine, CML) を生成させ、前述した AGEs ができるわけです。また、アスコルビン酸もデヒドロアスコルビン酸に変性し蛋白を障害する可能性があります。脂質膜二重層の中心構成成分であるアラキドン酸も同様で、リポフスチンをつくります。hydroxynonenal といったアルツハイマー病との関連で注目されている物質もあります。これらの物質は「 $-C=O$ 」という構造を持つのが特徴ですが、糖由来のものは AGEs とよべても、それ以外のものは AGEs という呼称は相応しくありません。それで、glucose の G を lipid の L に変えて ALEs といった名前で最近はやばれています。

3) 糖尿病性腎症組織に carbonyl compounds は存在するか

さて、糖尿病性腎症組織に AGEs があるのは何故か。pyrraline が無いから糖化だけではない。酸化ストレスに起因するものならば、脂質やアミノ酸由来の

carbonic stress 産物も存在するだろうという仮説で、脂質由来の malondialdehyde, hydroxynonenal といった抗体を使って染色をすると、拡大したメサンギウムや結節に陽性所見が認められました。つまり、糖尿病では高血糖があるので AGEs と短絡的に考えやすいのですが、実際は糖だけでなく脂質・アミノ酸など酸化ストレス下で生成される構造体が病変部に存在し、なんらかの病的意義を示すと考えられます。ただ最近の知見ではイミダゾロンという AGEs の仲間 carbonyl 化合物でもあるのですが、これは酸化ストレス下では生成されません。しかし、このような物質も糖尿病の病変部に存在するので酸化ストレスのみですべてが説明できないことも明らかです。

4) carbonyl compounds の消去系は関与するか

そこで carbonyl 化合物を消去する系について考えてみます。最近注目されているのは methylglyoxal という carbonyl 化合物で、糖尿病患者に増加しているのですが、これが glutathione を介して代謝されていることが判明しました。そして、glyoxalase という酵素がこの過程に働くこともわかっています。この酵素は以前からその存在が知られていたのですが、その生体内における位置づけは不明でした。しかし、carbonyl 化合物消去系を司る酵素として、今後その重要性はまた注目されるでしょう。もう1つ注目すべきは glutathione の再生機構です。どうやって glutathione を再生するかということでは NADPH の役割が注目されています。NADPH は自らを NADP に変換することで glutathione reductase を活性化して還元型 glutathione を産生します。

これらの機構から糖尿病の病変部において glutathione や NADPH のレベルが低下していれば carbonyl 化合物の消去は困難となる可能性が示唆されます。実際、糖尿病では polyol 経路という代謝過程が働いています。高血糖があると aldose reductase という酵素のブドウ糖をソルビトールに変換します。このソルビトールは代謝されないので細胞浸透圧に影響を与え、糖尿病性末梢神経障害や網膜症の一原因とも考えられています。そして、この代謝過程で必要な補酵素が NADPH で、高血糖存在下では polyol 系が働き NADPH が減ってしまいます。このように糖尿病では様々な機構を通じて、酸化ストレスを防御する機

構に障害がある可能性が示唆されるのです。

5) AGEs 蓄積のまとめ

糖尿病患者において AGEs という最終産物が蓄積されていることは間違いのない事実です。ただ、この原因は単純なものではなさそうです。前述したように、糖化の問題だけではありません。2 番目に述べた酸化ストレスだけでもありません。3 番目に提起した局所における carbonyl 化合物消去系の低下も考えられますが、まだまだ幾つかの可能性がありえます。したがって、この一連の動きを総体的に評価する必要があると考えられます。

6) carbonyl stress とその展望

糖尿病性腎症の病変部に carbonyl 化合物が蓄積されていることは証明されました。つまり、病変部では carbonyl 化される状態が存在するのではないかと考え、carbonyl stress とわれわれは提唱しています。しかし、carbonyl stress が結果なのか、原因なのかはまだ決着していません。ただ in vitro の仕事では、培養メサンギウム細胞に carbonyl stress を与えると基質産生が増加することが証明されています。また、名古屋大学の中島教授等との共同研究で、carbonyl stress とシグナリングとの関係を MAP kinases をからめて行っていますが、今後も研究を続けていきたいと思っています。

さて、carbonyl stress を利用した予防的治療も今

後の重要な研究項目です。可能性としては、消去系を高める系の開発、もう 1 つはできた carbonyl 化合物を抑制する系ではないかと考えています。前者としては直接 glutathione を投与する、あるいは SH 基を持つ cystein の投与なども考えられます。aldose reductase inhibitor も興味ある薬剤の 1 つです。後者の観点からは aminoguanidine などが carbonyl 化合物をトラップする可能性がありますし、糖尿病薬として使用されている metoformin にもこのような作用がある可能性があります。最後に CAPD に使用される腹膜透析液は多量のブドウ糖を使用しています。この透析液が carbonyl stress にどのような影響を与えているかも今後注目したい領域です。

結 語

われわれが日常臨床の場で直面している慢性糸球体腎炎、さらには頻度が急上昇中の糖尿病性腎症の成因ならびに進展機構についての最新の考え方について概説していただきました。特に carbonyl stress の問題は、透析患者の重大な合併症である透析アミロイドーシスにも関与するということが証明されている新たな発見です。今後、このような酸化ストレスの解除ということがわれわれ臨床医の重要な使命となる日も遠くないと推測されます。

雑駁な「まとめ」で読者の方の十分の理解が得られなかった場合には、文責の渡邊の責任ですので、私宛にご批判の言葉をお伝え下さい。