

実験腎障害モデルにおけるテネシンの発現

徐 義之, 佐々木 環, 丹田 信也, 加藤 博孝, 八田 秀一,
齋木 豊徳, 大澤 源吾

テネシンは、癌・器官形成・創傷治癒に関係する細胞外基質として知られ、組織内における炎症などの変化に反応して発現することが知られている。我々は、腎障害モデルラットを作成し、糸球体および間質でのテネシンの発現場所、時期に注目して検討をおこなった。その結果、テネシンは直接障害された場所に発現するとともに、場合によって直接障害された場所とやや離れて発現し、可逆的モデルでは回復とともに消失し、不可逆的な糸球体障害モデルでは糸球体とボウマン嚢との癒着病変に持続的な発現が観察された。テネシンの発現は障害の範囲を示すとともに、一過性の発現は障害の修復に、癒着病変での持続的な発現は over healing として不可逆的な病変の形成に関与することが示唆された。

(平成8年10月23日採用)

The Expression of Tenascin in Various Experimental Kidney Diseases

Yoshiyuki JYO, Tamaki SASAKI, Nobuya TANDA, Hiroataka KATO,
Hidekazu HATTA, Toyonori SAIKI and Gengo OSAWA

Tenascin (TN) was first reported to be expressed in the dense mesenchyme surrounding developing organs, such as the mammary gland, teeth, and kidney during embryogenesis. TN, a large glycoprotein, is an important extracellular matrix in tissue injury. Immunohistochemically, the distribution of TN in the kidneys has been studied during embryogenesis, and in normal glomeruli and various glomerular diseases. In this immunohistochemical study, we investigated the expression of TN in the kidney in various experimental models; i. e., in anti-Thy 1.1 glomerulonephritis (GN), acute ischemic renal injury, puromycin aminonucleoside nephropathy (PAN) and spontaneous diabetic WBN/Kob nephropathy. In anti-Thy 1.1 GN, the expression of TN was observed in the periglomerular areas during the mesangiolytic phase (mainly day 2 after disease induction), and in the mesangial areas during the mesangial proliferative phase (mainly day 7). In acute ischemic renal injury due to bilateral renal artery clamping, the expression was observed around the injured tubules (mainly day 2 after disease induction). This expression decreased during the recovery phase (mainly day 7). In PAN and diabetic nephropathy in WBN/Kob rats, the expression was mainly observed in the adhesive lesion. In the reversible model, transient expression of TN is considered to be

indicative of areas of injury. In the irreversible model, continuous expression of TN is considered to be indicative of a course of irreversible renal failure including glomerulosclerosis. (Accepted on October 23, 1996) *Kawasaki Igakkaishi* 22(3): 197-202, 1996

Key Words ① Tenascin ② Immunohistochemistry
③ Various experimental kidney diseases

はじめに

テネイシン (tenascin: TN) は、1986年に Chiquet らによって、癌胎児特異性細胞外基質として報告された¹⁾。分子量は190-250 kD、蛋白の基本構造は、N末端の central globule 構造から順に heptad 構造、EGF 様反復配列、Fibronectin type 3 型反復 (FN-3) 配列が並び、C末端の Fibrinogen 様構造よりなる。TN の特徴は、癌・胎児期や創傷治癒過程に一過性に発現し、正常時ではほとんど認められない点である。その発現の分子機構はまだ明らかにされていないが、組織内局所に起こった炎症などの変化に反応して発現することが推測されている。免疫組織化学的に見ると TN は常に上皮ではなく間質側に認められ、mRNA の発現も間質細胞がほとんどである^{1)~4)}。

Truong らは、TN について正常ヒト糸球体の細胞外基質の構成成分として、また病的状態での糸球体内での発現増加、正常培養メサンギウム細胞での産生などを報告^{5),6)}している。

今回我々は、各種腎障害モデルラットでの、糸球体と間質での TN の発現場所、時期に注目してその生理的意義を検討した。

実験動物モデル

実験動物作成に使用したラットは、雄性 Wistar strain ラット (体重180~200 g) (日本クレア、大阪) で、代謝ゲージにおいて飼育し自由に水、食事を与えた。動物モデルの作成、処分はエーテル麻酔下でおこなった。

メサンギウム増殖性糸球体腎炎モデルである抗 Thy 1.1 腎炎は shimizu らの報告⁷⁾にしたが

い、OX-7 (clone MRC OX-7 Cedarlane, Canada) 体重 100 g あたり 0.25 mg を尾静脈から静注し、メサンギウム破壊病変 (2日目) とメサンギウム増殖病変 (7日目) 形成時期に処分した。急性虚血性腎障害モデルは、両腎の腎動脈を1時間結紮により作成し、2日目と7日目に処分した。puromycin aminonucleoside (PA) 腎障害モデルは、PA (Sigma, USA) を体重 100 g あたり 1.5 mg を連続5日間皮下注射し、25日目に処分した。

自然発症糖尿病モデルラットの雄 WBN/Kob ラット (静岡動物飼育センター、静岡) は、既に報告されている硬化病変が観察される生後60週⁸⁾にて処分した。

なお、本実験は川崎医科大学動物実験委員会の承認を受け (No.95-119, 1995年)、川崎医科大学の動物実験指針に基づき実施された。

免疫組織化学

ラットはエーテル麻酔下に開腹・開胸し心尖部より4%パラホルムアルデヒド (paraformaldehyde: PFA) 約 200 ml にて全身を灌流の後、両側腎臓を摘出して更に4時間4% PFA に浸透固定、アルコール系列で脱水後パラフィン包埋をおこなった。

約 2 μm の切片を作成し脱パラフィン後、TN に対する免疫組織化学は抗テネイシンポリクローナル抗体 (筑波ライフサイエンスセンター; 日下部氏より供与) を一次抗体として用いて以下のようにおこなった。

内因性 peroxidase を1% H₂O₂ methanol で30分間非特異反応をブロックした後、一次抗体を tris 緩衝液 (0.15 M, pH 7.4) で200倍に希釈し、室温で2時間反応させた。次いで avidin-

biotin complex 法 (Vector, Burlingame, USA) で反応させた後, 3, 3-diaminobenzidine tetrahydrochloride にて発色させた. 陰性コントロールは, 一次抗体の代わりに PBS を反応させた.

結 果

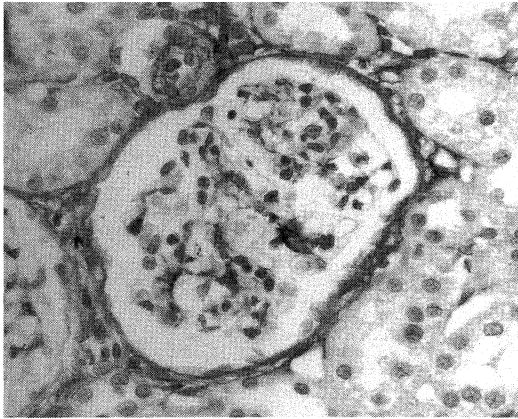
正常ラットでの TN の分布は, 一部糸球体周囲と皮髄境界部や髄質での間質に染色が観察された (未発表データ).

メサンギウム増殖性糸球体腎炎モデルでは, メ

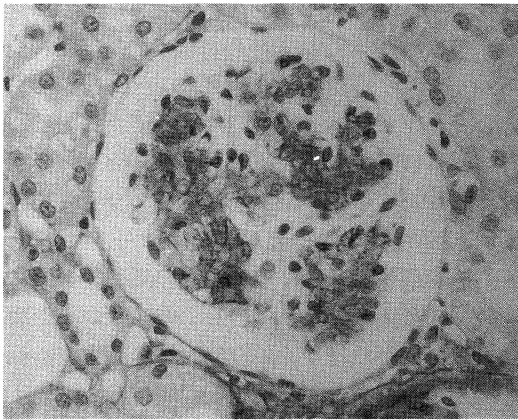
サンギウム破壊病変 (2 日目) の糸球体において, Bowman 嚢周囲に TN を認めた. メサンギウム増殖病変 (7 日目) の糸球体では Bowman 嚢周囲の TN は消失し, メサンギウム領域に発現を認めた (Fig. 1).

急性虚血性腎障害モデルは, 2 日目には障害尿細管周囲に発現を認めたが, 回復した 7 日目には消失していた (Fig. 2).

PAN 腎障害モデル, あるいは自然発症糖尿病病モデルラットの雄 WBN/Kob ラットは, 癒着病変部の Bowman 嚢を中心に発現を認めた (Figs. 3, 4).



A

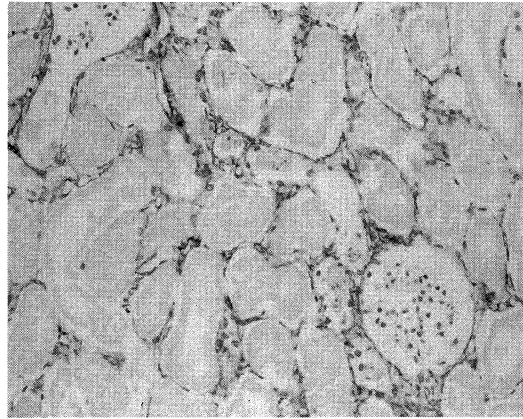


B

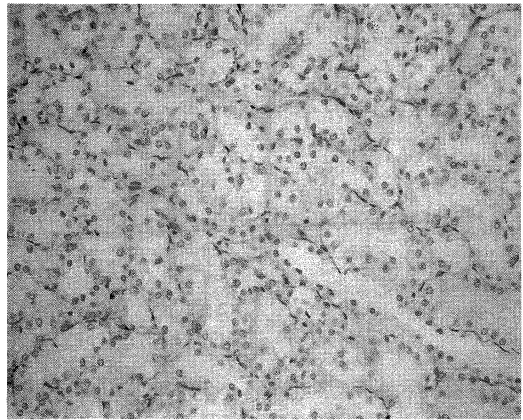
Fig. 1. Immunohistochemical staining of Tenascin (TN) obtained from rats with anti-Thy 1.1 glomerulonephritis

A: Staining of TN was observed in periglomerular areas on day 2. ($\times 400$)

B: Staining of TN was observed in mesangial areas on day 7. ($\times 400$)



A



B

Fig. 2. Immunohistochemical staining of TN obtained from rats with bilateral renal arterial clamping for one hour.

A: Staining of TN was observed in peritubular areas on day 2. ($\times 100$)

B: Staining of TN was not observed in the renal cortex on day 7. ($\times 100$)

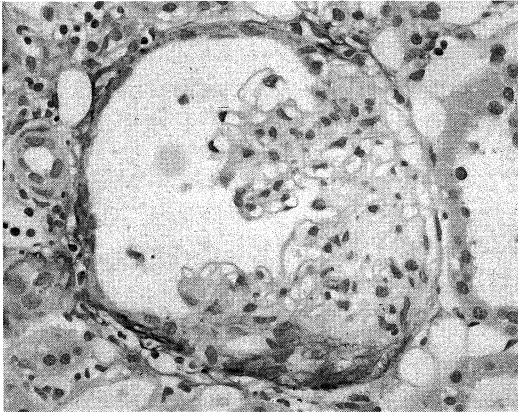


Fig. 3. Immunohistochemical staining of TN obtained from rats with puromycin aminonucleoside nephropathy. Staining of TN was observed in the Bowman's capsule of an adhesive lesion. ($\times 400$)

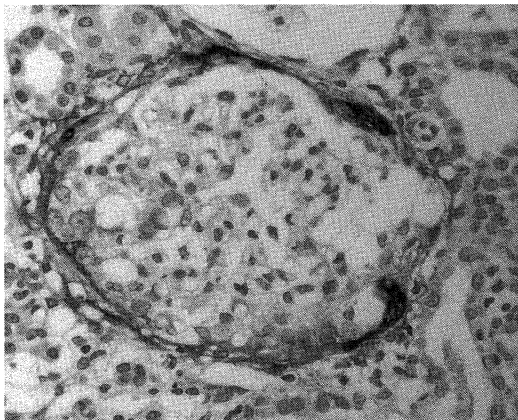


Fig. 4. Immunohistochemical staining of TN was obtained from non-insulin dependent diabetes mellitus model-male WBN/Kob rats 60 weeks after birth. Staining of TN was observed in the Bowman's capsule of an adhesive lesion. ($\times 400$)

考 察

細胞接着蛋白の一つである TN は、その発現時期と発現部位が極めて限定された特異な細胞外基質成分で、いろいろな組織形態形成に関与していると考えられている。腎臓において発生過程での TN の局在は、mesenchymal condensate から S 字期に認められ、成熟とともに随質部の間質に局限するとされている⁹⁾。これは今回の

我々の使用した抗体での検討の結果と一致している。しかし、Truong らの正常糸球体のメサンギウム基質に存在し、培養メサンギウムからの産生を認めた報告⁵⁾⁶⁾とは異なる。これは、TN は isoform が多く存在することや抗体特異性の問題の可能性も考えられるが、その詳細については現在のところ不明である。更に病的状態では、メサンギウム細胞、内皮細胞、糸球体上皮細胞からの産生を報告しているが、その意義や機序についての言及はされていない。我々のメサンギウム増殖性腎炎モデルでの検討では、メサンギウム破壊時、メサンギウム領域よりむしろ Bowman 囊周囲に TN の存在を認め、その後のメサンギウム細胞増殖による再生時には、Bowman 囊周囲の TN は消失しメサンギウム領域に TN の発現を認めた。この結果は必ずしも TN が障害部位の初期に発現するとの考え方を支持するものではなく、また Bowman 囊周囲の染色性は、メサンギウム破壊が強い糸球体で観察され、糸球体破壊により液性因子流出による TN 発現誘導の可能性も示唆される。虚血性腎障害モデルにおいても、障害尿細管の周囲の間質部にいち早く TN の存在を認め、近位部の障害されていない尿細管では認められず限局して存在した。Floege らは、糸球体上皮細胞の障害のマーカーとしての TN の意義について報告している¹⁰⁾が、我々の PA 腎症による検討では、障害された糸球体上皮細胞には観察されず、癒着病変部に限局して観察された。また自然発症糖尿病動物でもメサンギウム領域より管外性の癒着病変部を中心に強く観察された。我々は、この癒着病変は糸球体上皮細胞の基底膜剥離に連続して形成されると報告している¹¹⁾が、剥離した基底膜からは多くの液性因子の漏出が推測される。同時に存在した尿細管間質部の病変にも TN の発現を認めた。

以上より、TN は障害部位にいち早く出現するとのこれまでの考え方だけでなく、障害部位周囲に一時的に、あるいは不可逆的病変部では継続して存在し、障害の及ぶ範囲を規定する様に観察された。TN は、いくつかのサイトカインや

成長因子より誘導されることが報告されている¹²⁾。我々は、塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor : FGF2) が TN を誘導している可能性を PA 腎症モデルで報告している¹³⁾ が、中尾らは TN のノックアウトマウスで腎障害モデルの回復が悪いこと、あるいは間質細胞浸潤との関連を報告している¹⁴⁾。TN の発現意義やその発現調節機構の解明は、糸球体障害進行防止につながる可能性があり、今後の詳細な検討が必要と考える。

結 語

TN は障害の及ぶ範囲を規定するかの如く出

現し、可逆的な障害では回復とともに消失したが、不可逆的な障害では発現は持続していた。その発現には何らかの液性因子の関与が推測された。

稿を終えるにあたり、抗テネシンポリクローナル抗体を供与してくださいました 筑波ライフサイエンスセンター 日下部守昭先生に慎んで感謝いたします。また、本研究は平成 8 年度文部省科学研究費 (642-3533) および川崎医科大学プロジェクト研究費 (8-504) の援助を受けており、併せて深謝いたします。

なお、本論文の要旨は第38回日本腎臓学会総会 (1995 年、東京) で報告した。

文 献

- 1) Chiouet M : Tenascin : An extracellular matrix protein involved in morphogenesis of epithelial organs. *Kidney Int* 41 : 629-639, 1992
- 2) Chiquet-Ehrismann R : What distinguishes tenascin from fibronectin? *FASEB J* 4 : 2598-2604, 1990
- 3) Ericson HP, Bourdon MA : Tenascin : An extracellular matrix protein prominent in specialized embryonic tissue and tumors. *Annu Rev Cell Biol* 5 : 71-92, 1989
- 4) Sakakura T, Kusano I : Tenascin in tissue perturbation repair. *Acta Pathol Jpn* 41 : 247-258, 1991
- 5) Troung LD, Pindur J, Barrios R, D Agati V, Lechago J, Suki W, Majesky M : Tenascin is an important component of the glomerular extracellular matrix in normal and pathological conditions. *Kidney Int* 45 : 201-210, 1994
- 6) Troung LD, Majesky MW, Pindur J : Tenascin is synthesized and secreted by rat mesangial cells in culture and is present in extracellular matrix in human glomerular disease. *J Am Soc Nephrol* 4 : 1771-1777, 1994
- 7) Shimizu A, Kitamura H, Masuda Y, Ishizaki M, Sugisaki Y, Yamanaka N : Apoptosis in the repair process of experimental proliferative glomerulonephritis. *Kidney Int* 47 : 114-121, 1995
- 8) 佐々木環, 佐藤哲也, 大澤源吾 : 自然発症糖尿病モデル. *腎と透析* 37 : 719-724, 1994
- 9) Aufderheide E, Chiquet-Ehrismann R, Ekblom P : Epithelial-mesenchymal interactions in the developing kidney lead to expression of tenascin in the mesenchyme. *J Cell Biol* 105 : 599-608, 1987
- 10) Floege J, Alpers CE, Sage EH, Pritzl P, Godon K, Johnson RJ, Couser WG : Markers of complement-dependent and complement-independent glomerular visceral cell injury in vivo : Expression of antiadhesive proteins and cytoskeletal changes. *Lab Invest* 67 : 486-497, 1992
- 11) Osawa G, Sasaki T, Sato T, Tamai H, Nomura S, Ishimatsu T : Role of glomerular epithelial cells in progression of renal disease, in Churg KS (ed) : *Asian Nephrology*. Oxford University, 1994, pp270-278
- 12) Tucker RP, Hammarback JA, Jenrath DA, Mackie EJ, Xu Y : Tenascin expression in the mouse : in situ localization and induction in vitro by bFGF. *J Cell Sci* 104 : 69-76, 1993

- 13) Sasaki T, Jyo Y, Tamai H, Nohno T, Ito N, Osawa G : The role of basic fibroblast growth factor in glomerular adhesive lesions. (Abstr) J Am Soc Nephrol 5 : 821, 1994
- 14) Nakao N, Yoshiki A, Hiraiwa N, Kusakabe N : Tenascin in an important matrix protein during the healing process of murine mesangial proliferative glomerulonephritis (abstr) . J Am Soc Nephrol 6 : 903, 1995