

# 培養メサンギウム細胞の産生 Extracellular Superoxide Dismutase(EC-SOD)と細胞外基質

山田晴生\*<sup>1</sup> 足立哲夫\*<sup>2</sup> 山田裕一\*<sup>3</sup> 三竿幸子\*<sup>1</sup>  
鈴木啓介 渡辺一司 北川 渡 三浦直人  
楊 朝隆 佐久間正人 西川和裕 普天間新生  
今井裕一

Extracellular-superoxide dismutase production in mesangial cell growing  
in extracellular matrix

Harutaka YAMADA\*<sup>1</sup>, Tetsuo ADACHI\*<sup>2</sup>, Yasukazu YAMADA\*<sup>3</sup>, Sachiko MISAO\*<sup>1</sup>,  
Keisuke SUZUKI, Hitoshi WATANABE, Wataru KITAGAWA, Naoto MIURA,  
Cyouryu YOU, Masahito SAKUMA, Kazuhiro NISHIKAWA, Arao FUTENMA, and Hirokazu IMAI

\*<sup>1</sup>Nephrology and Rheumatology Division of Internal Medicine, Aichi Medical University, Aichi,

\*<sup>2</sup>Laboratory of Clinical Pharmaceutics, Gifu Pharmaceutical University, Gifu,

\*<sup>3</sup>Department of Genetics, Institute for Developmental Research, Aichi Human Service Center, Aichi, Japan

To study the protective function against oxygen radicals in the mesangial area, we assessed extracellular superoxide dismutase(EC-SOD) production in mesangial cells(MCs) *in vitro*. These cells have a major protective function against oxygen radicals in the extracellular space. In two different kinds of culture conditions : “growth medium” with fetal cow serum, and “differentiation medium” with reduced growth factor, and four extracellular matrixes ; type I collagen, type IV collagen, laminin and fibronectin, were added to the MC culture. With the difference in the culture media, differentiation medium induced EC-SOD hyper-production associated with the both of the slowing down of cell proliferation and the suppression of IL-6 and IL-8 production. With difference in the extracellular matrix, the presence of type VI collagen and laminin promoted higher production of EC-SOD than fibronectin and type I collagen. Type IV collagen and laminin associated with the physiological condition of the glomeruli promoted EC-SOD production compared with the presence of type I collagen and fibronectin dominantly located in pathological condition. Suppression of EC-SOD production in growth medium along with MC proliferation and chemokine hyper-production compared with production in differentiation medium might mimic reduction of the protective capacity against oxygen radical toxicity during mesangial proliferation in the glomerular nephritis. MC proliferation with type I collagen and fibronectin might enhance oxygen radical toxicity in the glomeruli, and accelerate glomerular sclerosis through the suppression of EC-SOD production.

Jpn J Nephrol 2005 ; 47 : 32-37.

**Key words** : reactive oxygen species, mesangial cell, extracellular matrix, chemokine

## 緒 言

活性酸素が慢性腎疾患進展および維持透析合併症発症に

重要な役割を果たしていることが明らかとなっている。生体内には活性酸素に対する防御機構の一つとして, superoxide dismutase(SOD)が存在して酸化ストレスから細胞を

防御している。SODのアイソザイムとして細胞内にはCu, Zn-SODが、ミトコンドリアにはMn-SODが、細胞外にはextracellular superoxide dismutase(EC-SOD)が存在する<sup>1)</sup>。特にCu, Zn-SODは家族性筋萎縮性側索硬化症の原因遺伝子として注目され、酸化ストレスが神経細胞の細胞死に重要な役割を果たしていることが示された<sup>2)</sup>。一方、細胞外・血管内にはアルブミン、セロプラスミンなど酸素ラジカルを非酵素的に消去する活性を持つ物質が大量に存在する<sup>3)</sup>。それに反して、細胞外・血管外ではこれらの物質が乏しい環境である。このような場合にはEC-SODが酸素ラジカルのストレス軽減に重要な役割を果たしているものと思われる<sup>4)</sup>。EC-SODは、細胞外においてヘパラン硫酸プロテオグリカンに結合して存在し、血管内では血管内皮細胞のヘパラン硫酸に結合して、活性化好中球の内皮細胞への接着の際の酸素ラジカルから血管壁を防御していると推定されている<sup>5)</sup>。

Cu, Zn-SOD, Mn-SODが体内のあらゆる細胞に普遍的に分布しているのに対して、EC-SODは線維芽細胞、グリア細胞、骨芽細胞で産生が確認されている<sup>1)</sup>。分布についてもヘパラン硫酸・ヘパリン結合能が存在することから、細胞外、特に血管外の細胞外基質に結合して分布している<sup>6)</sup>。また、ヘパリン自身がEC-SOD産生へ促進的に働くことから、産生・分布には細胞外基質と密接な関連があることが想像される<sup>8)</sup>。また、われわれは以前に培養条件下で腎メサンギウム細胞、線維芽細胞がEC-SODを産生し、内皮細胞、上皮細胞、尿細管細胞は産生しないことを確認した<sup>9)</sup>。EC-SODは細胞外における活性酸素の消去に重要な役割を果たしているが、その制御機構については明らかではない。EC-SODの産生・制御には細胞内cAMPが重要な役割を果たしており、メサンギウム細胞の産生するEC-SODもcAMPが重要な役割を果たしていることが明らかとなっている<sup>9)</sup>。

本稿ではメサンギウム細胞の増殖・細胞外基質がEC-SOD産生にどのような影響を及ぼしているかを検討した。

## 対象と方法

培養メサンギウム細胞を使用して、その増殖、培養上清中のEC-SOD, IL-6, IL-8濃度を検討した。

### 1. メサンギウム細胞の分離

糸球体は、49歳、男性で腎癌のときに摘出された腎臓の健常部分をメッシュ法で分離した。分離した糸球体は10%FCSを含むMEM培地を使用してフラスコに培地と

ともに培養され、メサンギウム細胞の増殖を待つて継代培養した<sup>10)</sup>。

### 2. 細胞の培養と培地

メサンギウム細胞は継代培養され、3~4代の細胞を6ウエルのシャーレを用いて実験に供した。細胞の増殖維持には増殖培地としては10%ウシ胎児血清を含むD-MEM培地を使用した。また、ウシ胎児血清を含まず、ヒト上皮細胞増殖因子5 $\mu$ g、塩基性線維芽細胞増殖因子1 $\mu$ gを含むMCDB131培地475mlを調整して分化培地として使用して比較検討した。Liらの論文を参考に培地に使用した試薬はBD Bioscience社より購入して使用した<sup>11)</sup>。また、細胞外基質の種類とメサンギウム細胞の機能を検討するため、通常の培養プレート以外にcollagen IV, laminin fibronectin collagen Iをcoatingしたプレートを用意し比較検討した。

### 3. EC-SODの測定とケモカインIL-6, IL-8の測定

EC-SODおよびIL-6, IL-8は特異的な抗体を使用したサンドイッチエンザイムイムノアッセイを使用して測定した。

EC-SODはヒトEC-SODにのみ結合する抗体であり、他のアイソザイム; Cu, Zn-SOD, Mn-SODとは全く交差反応を示さない。

IL-6, IL-8はAnti-IL-6, Human, Mouse-Mono Kit (ENDOGEN Inc), Anti-IL-8, Human, Mouse-Mono Kit (ENDOGEN Inc)を使用して測定した。

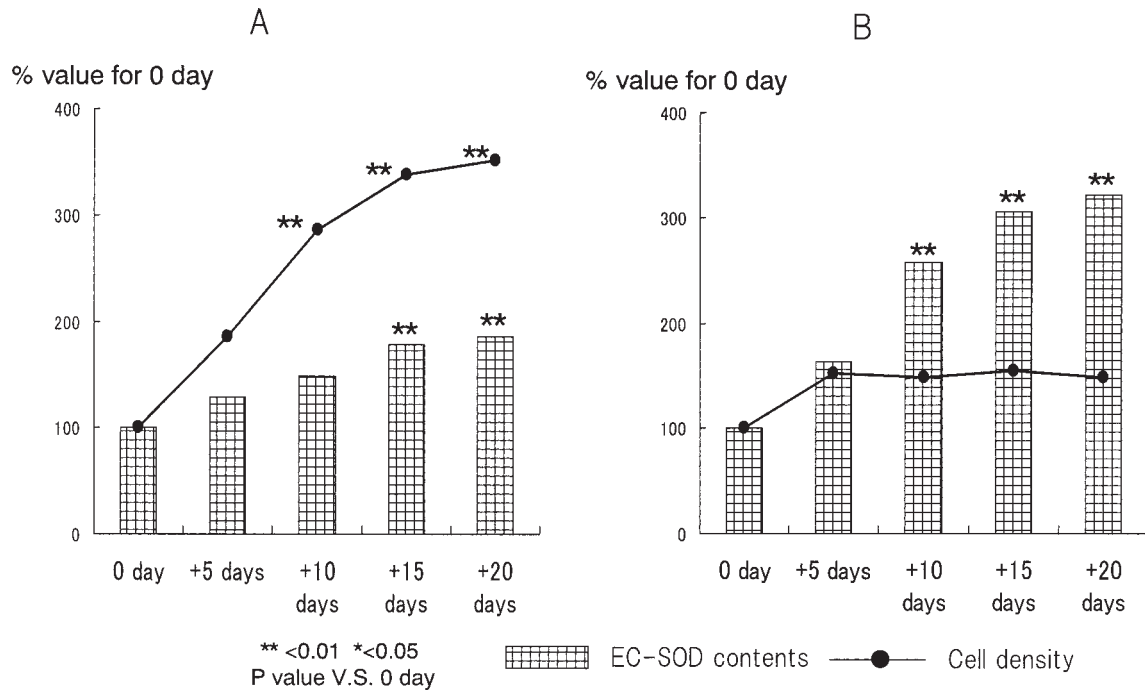
### 4. 測定値の評価と検定

測定には1検体につき6個ウエルのシャーレを使用し、その平均値を使用して値を得た。また、同じ実験を2回以上繰り返して再現性を確認した。平均値の検定には多重比較検定を使用した。

## 結 果

### 1. 増殖培地と分化培地でのメサンギウム細胞の増殖とEC-SOD

増殖培地と分化培地でのメサンギウム細胞増殖とEC-SOD産生について検討した。通常の培養プレートで増殖培地を使用して、メサンギウム細胞は15日ではほぼconfluentな状態となることが確認できた。次に、増殖培地で細胞密度が500/cm<sup>2</sup>に到達するまで培養後、増殖培地のまま培養を続けた場合(A)と分化培地にmediumを交換した場合(B)について、その後の細胞増殖とEC-SOD産生の結果をFig. 1に示す。細胞密度が500/cm<sup>2</sup>に到達した日



**Fig. 1. MC growth and EC-SOD production in growth medium (A) and differentiation medium (B)**  
Differentiation medium induced EC-SOD hyper-production associated with the suppression of cell growth.

を 0 day として増殖培地で培養した場合(A)に比べ、分化培地(B)では細胞が live な状態のまま増殖は抑制され、EC-SOD の産生は増強した。Fig. 1 には示さなかったが、細胞外基質による増殖率、EC-SOD 産生、細胞の形態に有意な違いを認めなかった。

## 2. 細胞外基質の違いによるメサンギウム細胞産生 EC-SOD

次に、細胞外基質によるメサンギウム細胞の増殖と EC-SOD 産生の関連を検討した。増殖培地で細胞密度が 500/cm<sup>2</sup> に到達するまで培養した細胞を、増殖培地のまま培養を続けた場合(A)と分化培地に medium を交換した場合(B)について、細胞外基質による EC-SOD 産生の違いを検討しその結果を Fig. 2 に示す。

500/cm<sup>2</sup> に到達した日を 0 day として増殖培地で培養した場合(A)に比べ、増殖因子を減少させた分化培地(B)では EC-SOD の産生増加を認めた。また、細胞外基質の種類による EC-SOD 産生の影響を検討した結果、type IV collagen, laminin では type I collagen fibronectin に比べて著しい産生増加を認めた。

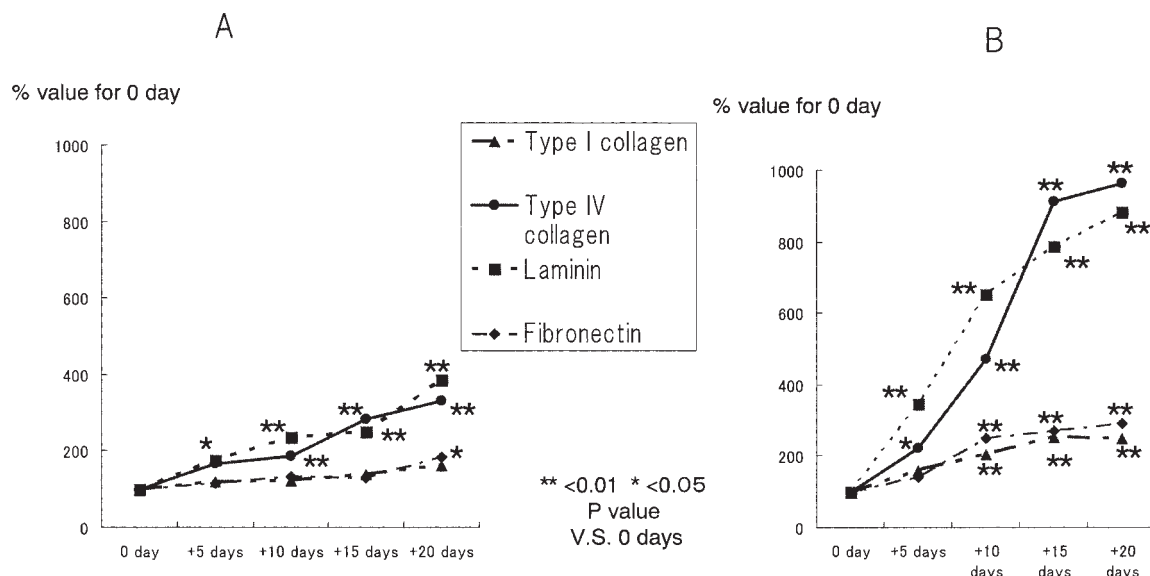
## 3. Type IV collagen の存在下で MCs 産生 EC-SOD とケモカイン

Type IV collagen の存在下で細胞密度が 5,000/cm<sup>2</sup> に到達するまで培養した細胞を、分化培地に medium を交換

し、培養上清中の EC-SOD とケモカイン産生の動態を検討した。前実験と同様に増殖培地から分化培地に変更した結果、EC-SOD の産生は著しく増加した。一方、ケモカインの産生は増殖培地で培養中は産生を認めたが、分化培地で培養中は産生が抑制された。EC-SOD とケモカインの産生はちょうど対称な形を示した (Fig. 3)。

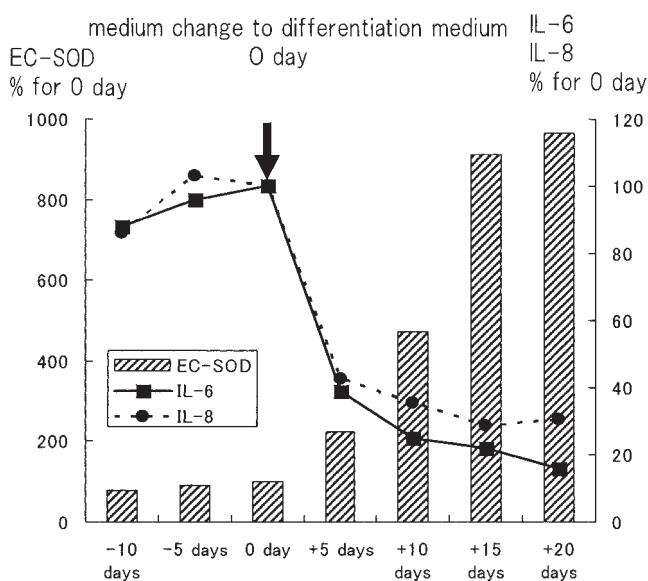
## 考 察

メサンギウム細胞の増殖は IgA 腎症をはじめ多くの腎疾患で認められ、その増殖に様々なサイトカインの関与が示されている。細胞の増殖には IL-6, IL-8 が、細胞外基質の産生には TGF- $\beta$  が関与し、これらのサイトカインは腎炎の際に糸球体内皮細胞、上皮細胞で産生されメサンギウム細胞の増殖を誘導する。それとともに、メサンギウム細胞自身がこれらのサイトカインを分泌することで細胞の増殖を促進する<sup>12~15)</sup>。腎糸球体での活性酸素の産生源として血管内皮細胞、上皮細胞、メサンギウム細胞が知られている。そのなかでもメサンギウム細胞は免疫複合体、フォルボールエステル、ピューロマイシンの刺激により酸素ラジカルを大量に放出することから、メサンギウム細胞は糸球体のフリーラジカル産生に中心的な役割を果たしているものと推定される<sup>16~20)</sup>。



**Fig. 2. EC-SOD production in growth medium(A) and differentiation medium(B) under an extracellular matrix ; collagen I, collagen VI, laminin, fibronectin**

The existence of collagen VI or laminin promoted EC-SOD production more than collagen I or fibronectin.



**Fig. 3. EC-SOD production and chemokine production in differentiation medium in the presence of type IV collagen**

Proliferation medium promoted cell growth and chemokine production, and suppressed EC-SOD production. Differentiation medium promoted EC-SOD production, and suppressed chemokine production more than proliferation medium.

腎において、酸素ラジカルに対する防御機構としては Cu, Zn-SOD, catalase, GPX などが尿細管を中心とした細胞内に非常に豊富に存在している。これに対して EC-SOD は、初代培養細胞で尿細管細胞、内皮細胞では産生

されず、線維芽細胞、メサンギウム細胞で産生されることが明らかとなっている<sup>9)</sup>。このことから、腎糸球体において細胞外で酸素ラジカルの重要な役割を果たしている酵素としては細胞外型の SOD である EC-SOD と推定され、細胞外で主にヘパラン硫酸に結合して分布しているものと想像される。われわれは以前に線維芽細胞、メサンギウム細胞において m-RNA の発現と EC-SOD 産生、その上清中への分泌などを検討した。その結果、m-RNA と上清中の蛋白濃度との間には強い正の相関を認めため、以降の検討では上清中の EC-SOD 濃度を対象とした。これら従来の研究結果の多くは細胞が増殖状態にある培養条件下での EC-SOD 産生を検討しているのに対して、本研究ではメサンギウム細胞機能と EC-SOD 産生を検討した。

糸球体腎炎の病態において、免疫学的機序、非免疫学的機序を含めてメサンギウム細胞増殖が複雑に関与している。本研究ではそのなかでもメサンギウム細胞の増殖という形態的特徴に注目して *in vivo* での再現を試みた。本研究から、増殖培地で細胞増殖が促進した状態では、分化培地に比べ EC-SOD 産生が鈍化していることが明らかとなった。また、分化培地下では細胞の phenotype が変化し増殖が鈍化した状態のまま EC-SOD の産生を増加させた。このことは、生体で腎疾患に伴う糸球体メサンギウム細胞増殖が EC-SOD 産生能を減弱させていることを示し、フリーラジカル生成を増加させている可能性があることを示唆している。このメサンギウム細胞増殖が慢性腎炎

における糸球体病変の指標として重要な指標となっていることは、形態的な細胞増殖のみならず、機能的に酸素ラジカルに対する抵抗性が減弱していることと反映していると推察された。

通常の糸球体ではメサンギウム領域には laminin, fibronectin が、メサンギウム細胞に接して係蹄壁には type IV collagen が分布する<sup>21)</sup>。一方、慢性糸球体腎炎ではメサンギウム領域に fibronectin の発現増強, type I collagen の沈着が観察される。fibronectin は糖尿病性腎症の糸球体に沈着を認め、組織像の悪化とともに沈着が増強することが知られている<sup>22-24)</sup>。また、type I collagen の発現は糸球体硬化とともに著しく増加することから、腎硬化の指標ともなっている。

本研究では、通常の糸球体で有意に認められる laminin, type IV collagen の存在下では糸球体の EC-SOD 産生が促進され、fibronectin, type I collagen の存在下では促進を認めなかった。このことは、病的状態でメサンギウム領域に認められることが多い fibronectin, type I collagen がメサンギウム細胞の EC-SOD の産生を抑制し、病的状態下で糸球体に対するフリーラジカルの障害を促進していることが示唆された。

メサンギウム細胞はサイトカイン類のみならず、周囲の細胞外基質によりその性質を変化させる<sup>15,25)</sup>。laminin, type IV collagen の存在が細胞を分化させる方向に働いた可能性がある。この細胞外基質によるメサンギウム細胞の分化促進が EC-SOD の産生増加を誘導したことが想像される。この検証のためには、メサンギウム細胞の分化マーカーである alpha-smooth muscle actin 発現、フリーラジカル産生などをより精密に検証する必要があり、今後、明らかにしたい。

メサンギウム細胞の機能を制御する因子として、細胞外基質とともに糸球体局所におけるケモカインの産生が細胞の増殖に重要な役割を果たしていることが明らかとなっている。以前にわれわれが培養メサンギウム細胞の EC-SOD 産生を明らかにする際、プレドニゾロンの存在が EC-SOD の産生を刺激し、同時に IL-6, IL-8 などケモカインの産生を抑制することを明らかにした<sup>9)</sup>。また、このケモカインと EC-SOD 産生の制御には cAMP が関与していることが判明した<sup>9)</sup>。本研究から、増殖培地の存在下では細胞増殖とケモカイン産生が促進された状態であったのが、増殖因子を低下させた分化培地の存在下では、ケモカインの産生抑制、メサンギウム細胞増殖鈍化とともに EC-SOD の産生が促進された。これは、増殖培地の存在

下でのメサンギウム細胞増殖とケモカイン産生増加がヒト腎炎におけるメサンギウム細胞増殖に類似した病態であり、分化培地下の増殖抑制されたメサンギウム細胞が正常なメサンギウム細胞の状態を模倣していることが想像される。糸球体でのメサンギウム増殖とケモカイン産生増加が EC-SOD 産生の減弱に伴う局所での酸素ラジカルの障害を増強していることが推定された。

従来から、実験腎炎モデル、臨床的な腎炎に活性酸素障害が関与していることが指摘されてきた。この証明には、酸素ラジカルのスカベンジャー投与による障害の軽減、または組織から酸素ラジカル副反応生成物を検出することで間接的に酸素ラジカルの組織障害への関与を証明してきた。これに対して、本研究では腎炎の直接的な指標であるメサンギウム細胞の増殖、ケモカイン産生能と酸素ラジカルを消去する酵素である EC-SOD の産生の関係を検討してきた。この結果、糸球体腎炎におけるメサンギウム増殖が酸素ラジカルに対する抵抗性を減弱させている可能性が示され、腎炎における活性酸素の役割をメサンギウム細胞の機能から検討することができた。

## まとめ

メサンギウム細胞の増殖した状態と細胞が live で増殖抑制された状態を比較した。その結果、増殖抑制した状態に伴う EC-SOD 産生の増加を確認した。また、細胞外基質 laminin, type IV collagen の存在下では fibronectin, type I collagen に比べ EC-SOD 産生促進を認めた。また、増殖した状態から増殖抑制された状態ではケモカインの産生抑制と EC-SOD 産生増加を確認した。

## 謝 詳

この研究に多大な助言をいただいた愛知医科大学細菌学川井信先生に深謝致します。

## 文 献

1. Marklund SL. Extracellular superoxide dismutase in human tissues and human cell lines. *J Clin Invest* 1984 ; 74 : 1398-1403.
2. Wong PC, Pardo CA, Borchelt DR, Lee MK, Copeland NG, Jenkins NA, Sisodia SS, Cleveland DW, Price DL. An adverse property of a familial ALS-linked SOD1 mutation causes motor neuron disease characterized by vacuolar degeneration of mitochondria. *Neuron* 1995 ; 14 : 1105-

- 1116.
3. Atanasiu RL, Stea D, Mateescu MA, Vergely C, Dalloz F, Briot F, Maupoil V, Nadeau R, Rochette L. Direct evidence of caeruloplasmin antioxidant properties. *Mol Cell Biochem* 1998 ; 189 : 127-135.
  4. Stralin P, Kalisson K, Johansson BO, Marklund SL. The interstitium of the human arterial wall contains very large amounts of extracellular superoxide dismutase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995 ; 15 : 2032-2036.
  5. Adachi T, Marklund SL. Interactions between human extracellular superoxide dismutase C and sulfated polysaccharides. *J Biol Chem* 1989 ; 264 : 8537-8541.
  6. Kalisson K, Sandstrom J, Edlund A, Marklund SL. Turnover of extracellular-superoxide dismutase in tissues. *Lab Invest* 1994 ; 70 : 705-710.
  7. Sandstrom J, Kalisson K, Edlund T, Marklund SL. Heparin-affinity patterns and composition of extracellular superoxide dismutase in human plasma and tissues. *Biochem J* 1993 ; 294 : 853-857.
  8. Adachi T, Hara H, Yamada H, Yamazaki N, Yamamoto M, Sugiyama T, Futenma A, Katagiri Y. Heparin-stimulated expression of extracellular-superoxide dismutase in human fibroblasts. *Atherosclerosis* 2001 ; 159 : 307-312.
  9. Yamada H, Adachi T, Fukatsu A, Misao S, Yamada Y, Aoki T, Miura N, Sakuma M, Nishikawa K, Futenma A, Kakumu S. Extracellular superoxide dismutase and glomerular mesangial cells : its production and regulation. *FEBS Letters* 2002 ; 519 : 77-81.
  10. Davies M. The mesangial cell : a tissue culture view. *Kidney Int* 1994 ; 45 : 320-327.
  11. Li X, Tsai P, Wieder ED, Kribben A, Van Putten V, Schrier RW, Nemenoff RA. Vascular smooth muscle cells grown on Matrigel. A model of the contractile phenotype with decreased activation of mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 1994 ; 269 : 19653-19658.
  12. Sharma K, Ziyadeh FN. Hyperglycemia and diabetic kidney disease. The case for transforming growth factor-beta as a key mediator. *Diabetes* 1995 ; 44 : 1139-1146.
  13. Isaka Y, Fujiwara Y, Ueda N, Kaneda Y, Kamada T, Imai E. Glomerulosclerosis induced by *in vivo* transfection of transforming growth factor-beta or platelet-derived growth factor gene into the rat kidney. *J Clin Invest* 1993 ; 92 : 2597-2601.
  14. Ruef C, Kashgarian M, Coleman DL. Mesangial cell-matrix interactions. Effects on mesangial cell growth and cytokine secretion. *Am J Pathol* 1992 ; 141 : 429-439.
  15. Banas B, Luckow B, Moller M, Klier C, Nelson PJ, Schadde E, Brigl M, Halevy D, Holthofer H, Reinhart B, Schlondorff D. Chemokine and chemokine receptor expression in a novel human mesangial cell line. *J Am Soc Nephrol* 1999 ; 10 : 2314-2322.
  16. Gaertner SA, Janssen U, Ostendorf T, Koch KM, Floege J, Gwinner W. Glomerular oxidative and antioxidative systems in experimental mesangioproliferative glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 2002 ; 13 : 2930-2937.
  17. Martinez-Salgado C, Eleno N, Tavares P, Rodriguez-Barbero A, Garcia-Criado J, Bolanos JP, Lopez-Novoa JM. Involvement of reactive oxygen species on gentamicin-induced mesangial cell activation. *Kidney Int* 2002 ; 62 : 1682-1692.
  18. Huwiler A, Boddingtonhaus B, Pautz A, Dorsch S, Franzen R, Briner VA, Brade V, Pfeilschifter J. Superoxide potentially induces ceramide formation in glomerular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001 ; 284 : 404-410.
  19. Racardo SD, Bertram JF, Ryan GB. Reactive oxygen species in puromycin aminonucleoside nephrosis : *in vitro* studies. *Kidney Int* 1994 ; 45 : 1057-1069.
  20. Aoyagi K, Akiyama K, Tomida C, Gotoh M, Hirayama A, Takemura K, Ueda A, Nagase S, Koyama A, Narita M. Imaging of hydroperoxides in a rat glomerulus stimulated by puromycin aminonucleoside. *Kidney Int* 1999 ; 71 (Suppl) : 153-155.
  21. Scheinman JI, Foidart JM, Gehron-Robey P, Fish AJ, Michael AF. The immunohistology of glomerular antigens. *Clin Immunol Immunopathol* 1980 ; 15 : 175-189.
  22. Isono M, Cruz MC, Chen S, Hong SW, Ziyadeh FN. Extracellular signal-regulated kinase mediates stimulation of TGF-beta and matrix by high glucose in mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* 2000 ; 11 : 2222-2230.
  23. Weston BS, Wahab NA, Roberts T, Mason RM. Bacitracin inhibits fibronectin matrix assembly by mesangial cells in high glucose. *Kidney Int* 2001 ; 60 : 1756-1764.
  24. Weigert C, Brodheck K, Brosius FC 3rd, Huber M, Lehmann R, Friess U, Facchin S, Aulwurm S, Haring HU, Schleicher ED, Heilig CW. Evidence for a novel TGF-beta-independent mechanism of fibronectin production in mesangial cells overexpressing glucose transporters. *Diabetes* 2003 ; 52 : 527-535.
  25. Kitamura M, Mitarai T, Nagasawa R, Maruyama. Differentiated phenotype of glomerular mesangial cells in nodular culture. *N Am J Physiol* 1996 ; 270 : F614-622.