

糖尿病性腎症でみられるIV型コラーゲン  
蓄積の分子生物学的説明

( 0 5 6 7 0 8 5 3 )

平成6年度科学研究費補助金(一般研究C)  
研究成果報告書

平成7年3月

研究代表者 吉川隆一  
(滋賀医科大学医学部  
助教授)

滋賀医科大学附属図書館



1994020697

は し が き

糖尿病性腎症で見られる糸球体IV型コラーゲン蓄積の機序を分子生物学的に解明する目的で行った研究である。

近年、糖尿病性腎症のために末期腎不全に陥り、透析療法に導入される患者数が増加の一途を辿っており、大きな医療的課題となっている。本症の本態は糸球体の硬化性病変であり、IV型コラーゲンを主体とした糖蛋白質の蓄積によってもたらされると考えられている。したがって、IV型コラーゲンの蓄積機序を解明することが糖尿病性腎症の成因を明らかにすることにつながると思われる、現在世界的にこの点に関する研究が行われている。

研究代表者は、既に糖尿病状態で腎糸球体メサンギウム細胞に多様な代謝異常の生じることを報告し、特に主要な細胞内情報伝達物質であるプロテインキナーゼC(PKC)の変異を強調してきた。最近、このPKCがIV型コラーゲンの遺伝子発現を増強させるとの成績が

報告され、前述した糖尿病性腎症における糸球体Ⅳ型コラーゲン蓄積との関連性が注目されている。

そこで、本研究ではPKCの変化がⅣ型コラーゲンの産生・分解経路に如何なる役割をはたしているかを検討し、Ⅳ型コラーゲン蓄積の機序の解明を試みた。

#### 研究組織

研究代表者 吉川隆一（滋賀医科大学  
医学部 助教授）

#### 研究経費

平成5年度	1,300千円
平成6年度	800千円
計	2,100千円

#### 研究発表

##### （1）学会誌等

① 宇津貴、吉川隆一、羽田勝計、繁田幸男

: 高糖濃度条件下培養メサンギウム細胞におけるプロテインキナーゼCの変化. 糖尿病

36: 343-348, 1993

② Kikkawa R, Haneda M, Uzu T, Koya D, Sugimoto T, Shigeta Y: Translocation of protein kinase C  $\alpha$   $\zeta$  and in rat mesangial cells cultured under high glucose conditions. Diabetologia 37: 838-841, 1994

③ 杉本俊郎、吉川隆一、羽田勝計、古家大祐、繁田幸男: 培養ラットメサンギウム細胞のMAPキナーゼ活性. 糖尿病記録号1993: 270-272, 1993

④ Sugimoto T, Kikkawa R, Haneda M, Shigeta Y: Atrial natriuretic peptide inhibits endothelin-I-induced activation of mitogen-activated protein kinase in cultured rat mesangial cells. Biochem Biophys Res Commun 195: 72-78, 1993

(2) 口頭発表

- ⑤ Haneda M, Sugimoto T, Koya D, Araki S, Togawa M, Kikkawa R, Shigeta Y : Abnormalities in protein kinase C and MAP kinase cascade in mesangial cells cultured under high glucose conditions. 4th International Symposium on Hypertension Associated with Diabetes Mellitus, Otsu, 1994
- ⑥ 澤田正史、吉川隆一、羽田勝計、古家大祐、前田士郎、宇津貴、杉本俊郎、繁田幸男 : ラット培養メサンギウム細胞における4型コラーゲン産生能に及ぼす細胞増殖因子および血管作働性物質の影響 第36回日本腎臓学会総会、1993

研究成果

糖尿病性腎症の糸球体ではIV型コラーゲンの蓄積が生じていることは剖検腎の検討により既に確認されているが、私共も培養実験系においてこのIV型コラーゲン蓄積を惹起させ

る要因として糖過剰（高血糖状態）が重要であることを既に報告した（*Diabetologia*, 1991）。しかも、等張性のマントールではIV型コラーゲン蓄積増加が見られないことから、糖（グルコース）の代謝異常に基づく変化（*metabolic effect*）であることが示唆された。

そこで、腎糸球体メサンギウム細胞を用いた培養実験系で、グルコースのどのような代謝変異がIV型コラーゲン蓄積に関与しているかを検討した。先ず、PKCアゴニストがIV型コラーゲンmRNAを増量させるとの米国のAyoらの報告があることから、高糖濃度条件下におけるPKCの変化を観察した。27.8mM(500mg/dl)のグルコース培地で3~5日間メサンギウム細胞を培養すると膜結合型のPKC活性が有意に増加しており、かつimmunoblottingによりPKC蛋白量も増加していることが認められた(①)。この際、PKCのisoformsとしては、alphaとzeta isoformsの膜結合蛋白量が特異的に増加していることが見いだされた(②)。

これまで他の細胞を用いた研究成績によると、PKC- $\alpha$ がdiacylglycerol(DG)により活性化され、下流に存在するmitogen-activated protein(MAP)キナーゼ活性を制御していることが知られている。そこで、メサンギウム細胞におけるMAPキナーゼを検討したところ、本細胞にもErk1, Erk2に相当するMAPキナーゼの存在すること、種々の血管作働性物質(ET-1, AII, IGF-1およびTPA)によりリン酸化(活性化)されることが判明した(③, ④)。しかも、高糖濃度条件下で培養したメサンギウム細胞でMAPキナーゼの活性化も生じているとの成績が得られた(⑤)。

次いで、ET-1, AII, TPA等のPKCを活性化し得るアゴニストをメサンギウム細胞に作用させた際のIV型コラーゲン産生量を観察したところ、有意な増加が認められた(⑥)。即ち、PKC, MAPキナーゼの活性化がIV型コラーゲン産生を増加させていることが推測され、糖尿病状態ではPKC, MAPキナーゼが共に活性上昇

を示すことから、これら因子を介した経路が重要な役割をはたしていることが示唆された。ただ、IV型コラーゲンのmRNAレベルの変化を検討したが、northern blottingにより明かな差を認めることはできなかつた。今後、トランスレーションのステップを含めIV型コラーゲン産生系に及ぼすグルコース効果の詳細な検討が必要となろう。

他方、IV型コラーゲン分解系の変化であるが、MMP-2, MMP-9と言った主要なIV型コラーゲン分解酵素がメサンギウム細胞に存在することは確認し得たが、高糖濃度条件でこれら活性およびmRNレベルが減弱するとの確証は得られなかつた。

以上の成績より、糖尿病性腎症で見られるIV型コラーゲン蓄積の機序として、グルコースによるPKCの活性化が重要であることが示唆された。



一  
 般 研 究 C  
 糖 尿 病 性 腎 症 で み ら れ る IV 型 コ ラ ー ゲ ン  
 蓄 積 の 分 子 生 物 学 的 解 明

0 5 6 7 0 8 5 3

吉川 隆一

滋 賀 医 科 大 学 医 学 部  
 平 成 7 年 3 月

滋賀医科大学附属図書館



1994020697