

# ヒト糸球体メサンギウム細胞特異的 遺伝子のクローニング

(研究課題番号 07457240)

平成7年度～平成8年度科学研究費補助金(基盤研究(B)(2))  
研究成果報告書

平成9年3月

研究代表者 宮田敏男

(名古屋大学医学部講師)

はしがき

研究組織

研究代表者：宮 田 敏 男 （名古屋大学医学部講師）

研究経費

平成7年度	6200 千円
平成8年度	800 千円
計	7000 千円

研究発表

学会発表

飯田喜康、宮田敏男、黒川清、前田憲志、大久保公  
策：QUALITATIVE AND QUANTITATIVE  
ANALYSIS OF GENES EXPRESSED IN CULTURED  
HUMAN GLOMERULAR MESANGIAL CELLS.  
1997 第回国際腎臓学会 5月25-29日 シドニー

名古屋大学図書	
和B	89664

# ヒト腎メサンギウム細胞に特異的に発現している蛋白遺伝子のクローニング

名古屋大学医学部

宮田敏男

## I. 目的

慢性糸球体腎炎により腎不全に陥り人工透析を行っている患者は、年々増加している。しかし、慢性糸球体腎炎の病因・病態については補体系、免疫複合体などの関与が示唆されてはいるが明らかではない。

腎臓は中胚葉系の中腎管より分岐した尿管芽と後腎組織より発達する。これに同じく中胚葉系由来の体循環系である血管が組み込まれる事により腎臓が完成される。メサンギウム細胞は腎臓組織では皮質に存在する濾過装置、腎糸球体の構成細胞の一つであり、原始毛細管壁の原始周皮細胞より分化したものと考えられ、係蹄壁を支持するような形で糸球体内に存在している(Fig. 1)。このメサンギウム細胞の機能としては、第一に周囲のメサンギウム基質と共に、糸球体の毛細血管壁を支持している事があげられる。また、メサンギウム細胞内には、アクチン、ミオシンが存在しており、アンジオテンシン II に反応し収縮する事により血行動態の調節を行っていると考えられている。アンジオテンシン II 以外にもバゾプレッシン、ノルエピネフリン、ヒスタミン、PAF、PDGF、トロンボキサン A2 などでも収縮する事が知られている。逆に、ドーパミン、cAMP、心房性ナトリウム利尿ペプチドにより、収縮が抑制される事も報告されている。さらに、貪食により免疫複合体などの異物を処理すると共に、処理した異物を MHC 分子と共に T 細胞などの免疫細胞に認識されるといった抗原提示能をも有しているといわれている。その他にメサンギウム細胞は各種生理活性物

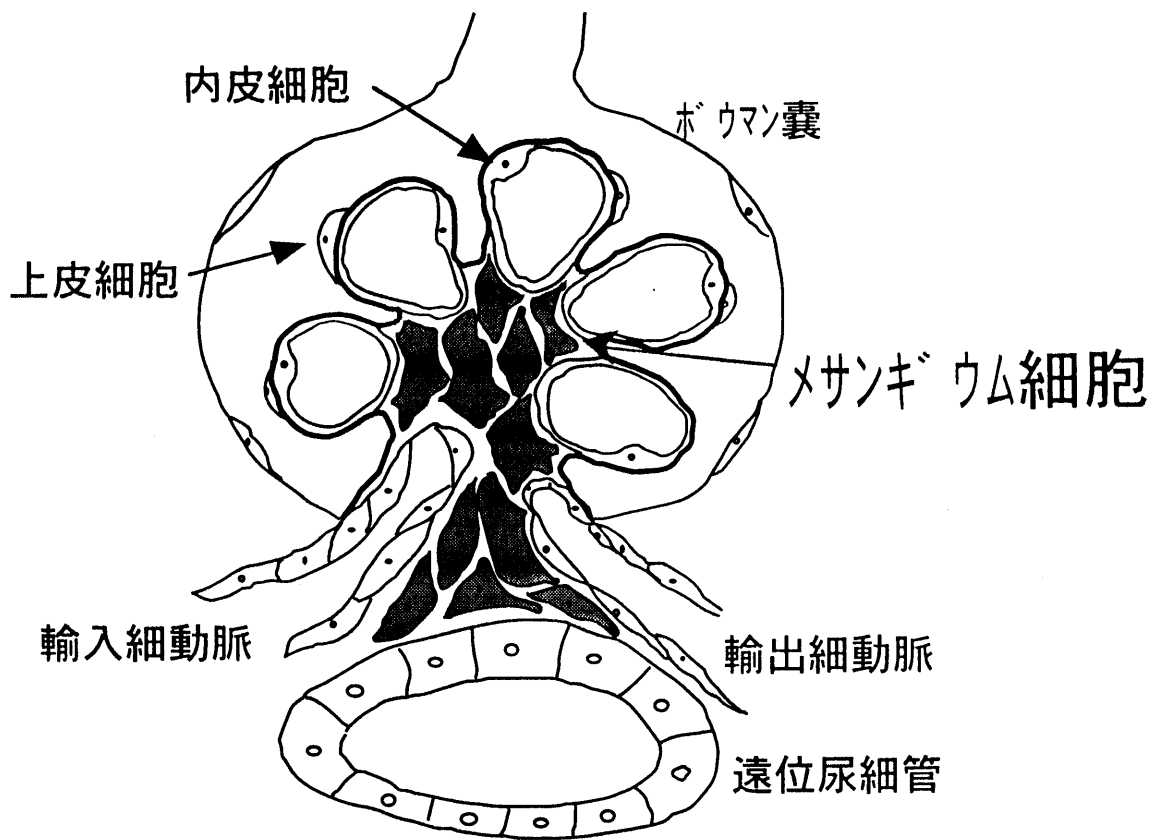


Fig. 1 ヒト腎糸球体の構造

質を産生し、正常環境、生理状態の維持を行っていると考えられている。この活性物質には、PAF、活性酸素、PDGF、IGF-Iなどの増殖因子、IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6などのサイトカイン、セリンプロテアーゼなどの酵素がある。正常腎においてはこれらの機能が調和を保ちながら機能しているが、病的状態に陥った場合には、この調和が乱れ細胞、基質の増殖を招き、糸球体硬化や糸球体の血行動態に変化をもたらす。また、各種生理活性物質により、局所において細胞の傷害や基質の分解が起こると考えられる。このようにメサンギウム細胞は、腎臓の生理機能維持に重要な役割を演じている細胞であり、糸球体腎炎、特にメサンギウム増殖性の腎炎の病態生理を考える上で非常に重要な細胞である。このためこのメサンギウム細胞を解析し、糸球体腎炎の病因を明らかにしていくことは、各種腎疾患の病態生理を明らかにしていく上で非常に重要であると考えら

れるが、現時点ではメサンギウム細胞の詳細な cell biology さえも明らか になっていない状態である。

本研究の目的はメサンギウム細胞の cell biology を明らかにする事 であり、ヒトメサンギウム細胞に 特異的に発現している蛋白の遺伝子構造をすべて明らかにしたいと考えている。ヒトメサンギウム細胞特異的蛋白の 遺伝子が得られれば、その蛋白を人工的に合成し、機能の解析を行い、また、この蛋白の正常及び各種腎疾患における発現を解析する事により、この蛋白の病態生理学的 意義が明らかにできると考えられる。さらには、糸球体腎炎の発症機序を解明し、腎疾患の診断 や治療への応用等の可能性についても研究を進めていきたい。

## II. 方法

### A. ヒト培養メサンギウム細胞(HMC)の確立

正常ヒト腎組織 (58 歳、男性、腎癌により摘出した腎臓の正常部分) を数ミリ大に細断後、75, 150, 200 メッシュを用いてシービングを行い、糸球体を分離した。分離した糸球体は 1% コラゲナーゼ溶液中で 37°C、20 分間反応させポウマン囊を取り除いた後、10% Nu-serum 添加 medium 199 中にて培養を行った。3 代まで継代した時点で、抗 Factor VIII 抗体、抗アクチン抗体、抗インテグリン抗体を用いてメサンギウム細胞の確認を行った。さらに、アンジオテンシン II に対する反応性も確認した。

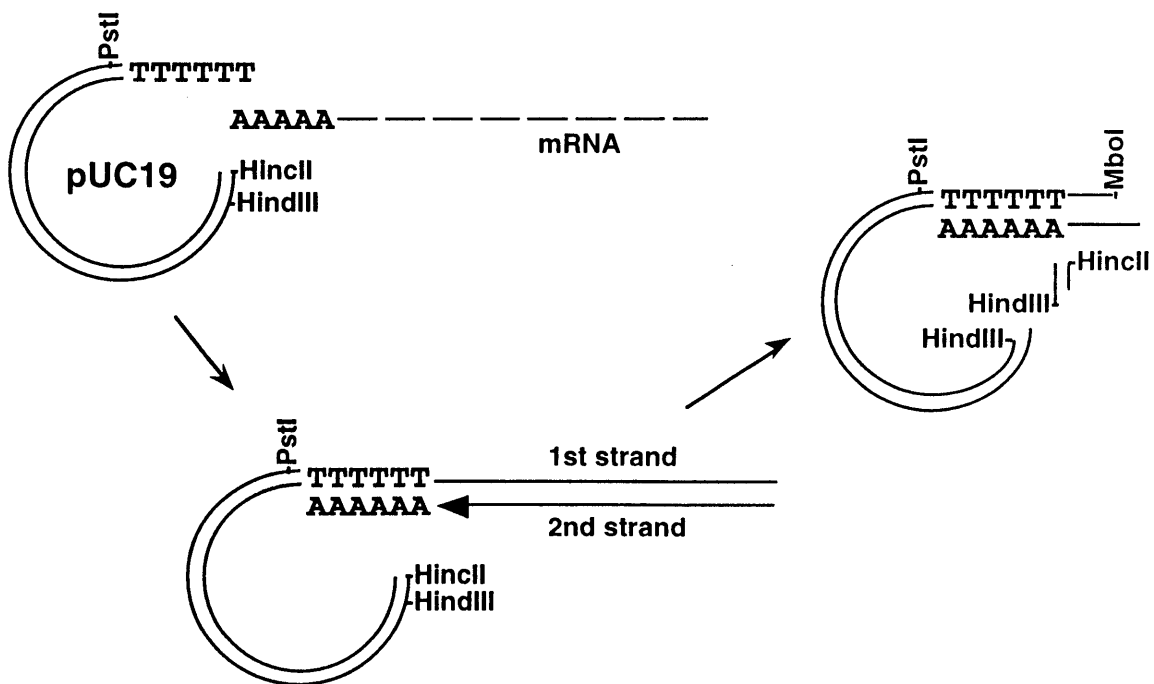
### B. HMC cDNA ライブラリーの作成及びその解析

HMC より全 RNA を抽出後、oligo dT カラムを用いて mRNA を分離した。この mRNA を鋳型とし、pUC19 改変ベクターを用いた oligo dT primed 3'-directed cDNA ライブラリーを作製した(Fig. 2)。岡山-Berg 法により dam 感受性大腸菌で

増幅した pUC19 を基に作成したベクタープライマーから、1st-strand cDNA を合成し後、ニックトランスレーションにより 2 本鎖 cDNA とした。次に cDNA のみを dam 感受性 4 塩基切断酵素 MboI で切断した。ベクターは MboI と対合末端を作る BamHI にて切断し、ライゲーションを行い cDNA を完成した。

また、HMC 特異的遺伝子のクローニング用の cDNA ライブラリーとして λgt10 ベクターを用いた full length cDNA ライブラリーも併せて作製した。Oligo dT primed 3'-directed cDNA ライブラリーから約 1200 クロオンを任意に抽出し、その塩基配列をオートシーケンサーを用いて解析した。得られた塩基配列は遺伝子データベース (NCBI) とのホモロジー検索を行い、各クロオンについて既知・未知及び発現頻度の確認を行った。

Fig. 2 3'-oriented cDNAライブラリーの作製



### C. HMC 特異的遺伝子の同定

既にヒトゲノムプロジェクトの一貫として cDNA プロジェクトが進んでおり、30 種類の細胞・組織（肝臓、肺、脳下垂体、線維芽細胞、血管内皮細胞、平滑筋細胞等）について、構成する遺伝子群の情報が得られている。これらの解析結果と、今回 HMC で得られた解析結果と比較・検討する事により、HMC に特異的な遺伝子のみを選別した。

### D. Full length cDNA のクローニング

上記で得られたクローンは HMC 特異的遺伝子の一部分（3'非翻訳領域）だけである為、得られたクローンをプローブとして full length cDNA ライブラリーのスクリーニング及び 5'RACE 法を用いて、full length cDNA のクローニングを行った。

## III. 結果

### A. HMC の同定

シービング法にて得られた細胞を 3 代まで継代した時点で、抗 Factor VIII 抗体、抗アクチン抗体、抗インテグリン抗体を用いて染色を行ったところ、得られた細胞は、抗アクチン抗体、抗インテグリン抗体（VLA-1, 3, 5）陽性、抗 Factor VIII 抗体陰性の細胞であった。また、アンジオテンシン II を加えることによって収縮することが確認された。これらの結果は現在までに確認されているメサンギウム細胞の特徴と一致することより、得られた培養細胞はメサンギウム細胞であると考えられた。この培養細胞を 6 代まで継代した後ライブラリーの作成に使用した。

### B. HMC 3'-directed cDNA ライブラリーの解析

無作為に抽出したクローンの内、cDNA 長が 20bp 以下のものを除いた 1197 クロ

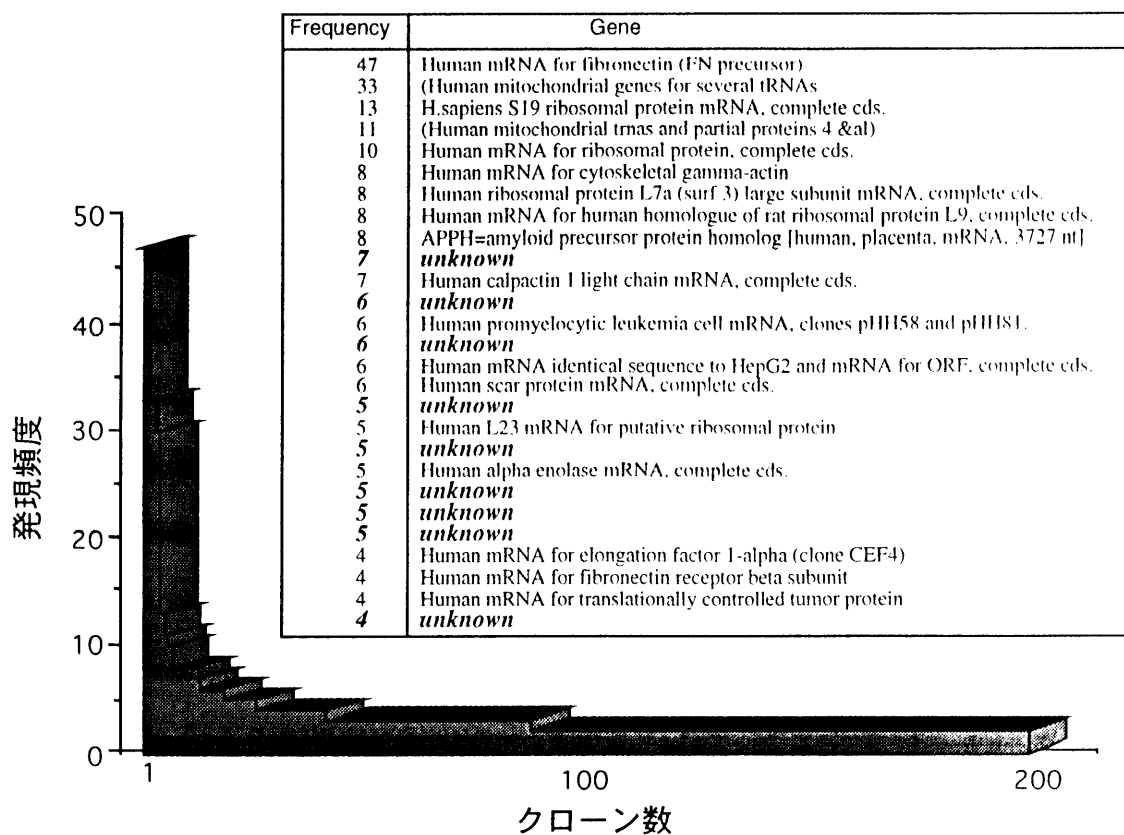


Fig. 3 ヒト培養メサンギウム細胞発現遺伝子の解析

ーンについて解析を行った。データバンクとの比較では、90%以上のホモロジーを有するクローンを同一クローンとみなし、また発現頻度はそのクローンの発現回数で表すこととした。解析を行った1197クローン中、発現頻度が3以上のクローンは79種類、396クローンであった。このうち47種類、277クローンが既知の遺伝子であり、残り32種類、119クローンが未知の遺伝子であることが明らかになった。既知のクローンをおおよその機能により分類したところ、細胞質に存在する或いは細胞内小器官に関連のある遺伝子(15種類、73クローン)、分泌蛋白の遺伝子(4種類、63クローン)、蛋白合成に関与する遺伝子(10種類、61クローン)が数多く検出された(表1)。また、HMCで最も発現頻度の高かったクローンはファイブロンネクチン(47クローン、全体の4.2%)であった(Fig. 3)。同様な手法で解析された他の組織・細胞の解析結果とHMCで得られた解析結果を比較検討したところ、HMCに特異的に発現している可能性のある遺伝



表1 ヒト培養メサンギウム細胞において発現が確認されたクローン（発現頻度 3 以上）

Cytoplasm & Organella

30	calcyclin / growth factor-inducible 2A9 / prolactin receptor-associated protein (PRA)
5	alpha-enolase / non-neuronal enolase
4	aldose reductase
4	a-L-fucosidase
3	ferritin L chain
3	SOD-2 manganese superoxide dismutase
3	UbA52 placental ubiquitin-52 amino acid fusion protein
3	dUTP pyrophosphatase (hdut)
3	TSE1=protein kinase A regulatory subunit
3	cystatin B
3	lysosomal membrane glycoprotein CD63
3	calcineurin A catalytic subunit
3	succinate dehydrogenase iron-protein subunit (sdhB)
3	52-kD SS-A / Ro autoantigen

---

73

Secretary

47	fibronectin (fn) 3' coding region and flank
8	APPH=amyloid precursor protein homolog
4	t-complex polypeptide 1 gene
4	plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1)

---

63

Protein synthesis

13	S19 ribosomal protein
8	L7a large ribosomal subunit component (L7a)
8	ribosomal protein L9
6	large subunit of ribosomal protein L21
6	ribosomal protein S4 (RPS4X) isoform
5	rpS8 ribosomal protein S8
5	L23 putative ribosomal protein
4	elongation factor 1-alpha (clone CEF4)
3	ribosomal protein L5
3	ribosomal protein L18 (RPL18)

---

61

表1 ヒト培養メサンギウム細胞において発現が確認されたクローン（発現頻度3以上）  
（続き）

Membrane

7	calpactin 1 light chain / cellular ligand of annexin II
5	CD24 signal transducer
4	fibronectin receptor beta subunit
3	transmembrane receptor protein
3	aminopeptidase N / CD13 encoding aminopeptidase N
<hr/>	
22	

Cytoskeleton

8	cytoskeletal gamma-actin
3	alpha-tubulin (b alpha 1)
<hr/>	
11	

Unclassified

6	alpha NAC
6	thymosin beta-4 / promyelocytic leukemia cell
6	ORF (complete cds) and HepG2 identical sequence
4	translationally controlled tumor protein
4	sui1 iso1
3	tunp transformation upregulated nuclear protein /
3	23 kD highly basic protein
3	insulinoma rig-analog encoding DNA-binding protein
3	MLN51
3	TEGT gene
3	mitoxantrone-resistance associated
3	CDC16Hs
<hr/>	
47	

子 10 クローンが得られたが、この 10 クローン中、6 クローンは未知の遺伝子であった(表 2)。

### C. HMC 特異的 full length cDNA のクローニング

HMC 特異的に発現している可能性の高い遺伝子 6 クローンの full length cDNA を得るため、 $\lambda$ gt10 full length cDNA ライブラリーのスクリーニング及び 5'RACE 法によるクローニングを行った。その結果、クローン No. 9422 は、セリンプロテアーゼインヒビター(serpin)ファミリーと DNA レベルで約 60%、アミノ酸レベルで約 35%のホモロジーを有するクローンであることが明らかになった。

## IV. 考察

これまで、メサンギウム細胞特異的蛋白を得るため、培養ヒトメサンギウム細胞を直接免疫し、それに対する抗体を得る試みがいくつかなされてきたが、デスミンなどの細胞骨格やファイブロンネクチンなどのメサンギウム基質に対する抗体が得られたのみで、メサンギウム細胞のマーカーとなるような特異的な抗体は得られてはいない。この様にヒトメサンギウム細胞特異的蛋白はこれまで得られていない。その理由の一つとして、これまでの方法が蛋白レベルからのアプローチであったことが考えられる。そこで我々は、遺伝子からのアプローチを試みた。

ヒト遺伝子の総数は種類にして数万から十数万と考えられているが、これら遺伝子は細胞のエネルギー産生や機能維持に不可欠な遺伝子(ハウスキーパー遺伝子)と個々の細胞の形質・特性を決定している特異的遺伝子に分類される。この総数十万の遺伝子の内、1つの細胞で働いている遺伝子は多数のハウスキーパー遺伝子と少数の特異的遺伝子であると考えられ、遺伝子構成は個々の細胞毎に異なっており、また遺伝子の発現強度(合成される蛋白量に相当)も遺伝子毎に異なっていると考えられる。そのため、個々の細胞毎に遺伝子構成を考え



るだけでなく、各種細胞・組織間で比較することにより、個々の細胞の特性を明らかにできると考えた。即ち、全く関連のない組織・細胞に共通に存在しているような遺伝子はハウスキーパー遺伝子と考えられるし、逆に単一の細胞・組織にしか発現しておらず発現頻度の高いような遺伝子は、その細胞を特徴づけるような遺伝子である可能性が高い。また、この方法では比較検討する組織・細胞が増えるほどより詳細な情報となる。実際の研究方法を考える上で重要なことは、メサンギウム細胞において発現している遺伝子の構成をバイアスが入らないような方法で正確に把握しなければならないということである。そのためにはバックグラウンドクローンがなく、mRNA の構成を忠実に反映した cDNA ライブラリーを作成し解析する必要がある。理想的には full-length cDNA ライブラリーを作成し、この 5' 側より全塩基配列を決定する事が最良であるが、これは実質的には不可能に近い。また、ランダムプライマーを用いた ライブラリーを作製し、部分塩基配列を決める手法も考えられるが、この方法では同一遺伝子の別々の部分を異なったクローンとして何度も認識してしまう可能性があり、その結果は mRNA の構成を忠実に反映しているとは考えられない。今回使用したライブラリーは、3'-directed cDNA ライブラリーである。このライブラリーでは、oligo dT ベクタープライマーを用いて cDNA の合成を行い、それを 4 塩基認識制限酵素 MboI で切断しライブラリーを作製している。ポリ A の上流の配列は、おおよそ由来する遺伝子と一義的に対応すると考えられているため、正確な遺伝子プロファイルの作製ができると考えられる。またこの場合、MboI の切断部位は、確率的には 256bp に 1 回の割合で出現すると考えられるため、5' 末端が欠けてしまったクローンなどによるバイアスを考える必要がなく、また cDNA の大きさもある程度揃っているため、大腸菌にトランスフォーメーションした際にもその導入効率に差がでにくく、忠実に mRNA の構成を反映したデータが得られると考えられた。

今回の解析の結果、HMC では蛋白合成に関与する遺伝子及び分泌蛋白の遺伝子発現が高く、中でも細胞外基質、ファイブロネクチン遺伝子の発現頻度が非

常に高い、つまり HMC ではファイブロネクチンの産生を初めとする蛋白合成が非常に活発に行われている可能性が明らかになった。また、30 種類の組織・細胞間での比較検討の結果からは、HMC 特異的と考えられる 6 種類の未知遺伝子を含む 10 種類の遺伝子が明らかになった。現在、この 6 種類の未知遺伝子 cDNA の全長のクローニングを行っているが、1 種類の遺伝子は serpin ファミリーに属する遺伝子の可能性が示唆されている。今後、これらのクローンが真に HMC 特異的であるかどうかについて、ノザンプロッティング或いは *in situ* ハイブリダイゼーションにより各種組織・細胞で確認を行い、メサンギウム細胞の特異的マーカーとなる蛋白を明らかにしていきたい。

## 参考文献

- 1) Gary E. Striker, Liliane J. Striker. Biology of Disease: Glomerular cell culture. *Laboratory Invest* 53: 122-131, 1985.
- 2) Frenando G. Cosio, Daniel D. Sedmak, N. Stanley Nahman, Jr. Cellular receptors for martiz proteins in normal human kidney and human mesangial cells. *Kidney Int* 38: 886-895, 1990.
- 3) Jean-Daniel Sraer, Colette Adida, Marie-Nöelle Peraldi, Eric Rondeau, Alain Kanfer. Species-specific properties of the glomerular mesangium. *J Am Soc Nephrol* 3:1342-1350, 1993.
- 4) Kousaku Okubo, Naohiro Hori, Ryo Matoba, Toshiyuki Niiyama, Kenichi Matsubara. A novel system for large-scale sequencing of cDNA by PCR amplification. *DNA Sequence-J DNA Sequencing Mapping* 2:137-144, 1991.
- 5) Kousaku Okubo, Naohiro Hori, Ryo Matoba, Toshiyuki Niiyama, Atsushi Fukushima, Yuko Kojima, Kenichi Matsubara. Large scale cDNA sequencing for analysis of quantitative aspects of gene expression. *Nature Genet* 2:173-179, 1992.
- 6) Kenichi Matsubara, Kousaku Okubo. CDNA analysis in tje human genome project. *Gene* 135:265-274, 1993.
- 7) Kenichi Matsubara, Kousaku Okubo. Identification of new genes by syastematic analysis of cDNAs and database construction. *Curent Opinion in Biotechnology* 4:672-677, 1993.