

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09739

研究課題名(和文) 腹膜線維化の修復メカニズムの検討～エピモルフィンの役割を中心に～

研究課題名(英文) Involvement of epimorphin in the repair of peritoneal fibrosis model in mice

研究代表者

山田 宗治 (Yamada, Muneharu)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：10625164

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、上皮の形態形成因子であるエピモルフィンが腹膜線維化修復作用および腹膜機能保護作用があるかについて解析を行い、腹膜透析の合併症である腹膜線維化に対する治療ターゲットとしての可能性の有無について検討することを目的とした。クロルヘキシジン腹腔内投与による腹膜線維化モデルの解析および正常ラット線維芽細胞による培養細胞実験からエピモルフィンの腹膜線維化修復および腹膜保護作用がある可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腹膜透析は残腎機能の保持に優れた非常に有用な腎代替療法であるが、長期継続により腹膜機能が低下し血液透析に移行せざるを得ない。本研究によってエピモルフィンが腹膜保護作用を持つ可能性が示され、今後さらに液性因子等の詳細な機序を検討することにより、腹膜線維症に対する早期からの治療介入や腹膜線維化に対する新規治療となる可能性が期待される。

研究成果の概要(英文)：Long term peritoneal dialysis (PD) is accompanied by functional and histopathological alterations in the peritoneal membrane, leading to peritoneal fibrosis (PF) that results in discontinuation of PD. Mechanism of PF remains to be fully elucidated and there is no effective therapy available. Epimorphin is a mesenchymal protein that not only regulates morphogenesis in organ development but is implicated in tissue repair. We found weak expression of epimorphin in submesothelial compact zone (SCZ) in normal mice peritoneum. The epimorphin expression, however, was stronger in SCZ in chlorhexidine gluconate-induced peritoneal fibrosis model in mice. Furthermore, we found that epimorphin suppressed the TGF- β 1-induced upregulation of α -smooth muscle actin and platelet-derived growth factor receptor- α , which were the pro-fibrotic phenotypic markers, in rat fibroblast cells in vitro. Taken together, epimorphin might be a therapeutic target for fibrotic diseases of the peritoneum.

研究分野：腎臓内科

キーワード：腹膜透析 エピモルフィン 腹膜線維化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

間葉系細胞は、種々の可溶性因子、細胞外マトリックスや細胞表面蛋白を産生または分泌することによって、組織修復に重要な役割を果たしている。syntaxin-2 と呼ばれるエピモルフィン は、間葉系細胞由来の膜蛋白として研究分担者である平井らによってマウスの胎生期細胞から同定された。エピモルフィンは、細胞内と細胞外での挙動が異なるユニークな蛋白で、細胞内では他の syntaxin ファミリーと同様、細胞内小胞輸送に関与するが、非古典的経路によって細胞外に分泌された場合には、上皮成長因子受容体やインテグリンなどを介して形態形成因子として作用する。皮膚、毛包、肺、小腸、乳腺、膵臓、肝臓など多くの上皮組織における発生時の形態形成に関与する一方、マウスの肺傷害や肝傷害、ヒトでの間質性肺炎などの病態においては組織修復へ関与することが示唆されている。我々も腎線維化修復期におけるエピモルフィンの関与を報告した。このようにエピモルフィンは、組織での形態形成に関与するだけでなく、上皮組織の修復における間葉系のレギュレーターとしても機能していると考えられる。

腹膜透析は、血液透析と比較し、時間的拘束が少ないこと、食事制限がより緩やかであること、穿刺がないことや循環器系への負担が少なく残腎機能の維持に優れていることなどの多くのメリットを有している。しかしながら腹膜透析の長期継続により、腹膜中皮細胞の傷害・脱落、中皮下線維組織の肥厚、筋線維芽細胞の増加、新生血管の出現などを伴う腹膜の形態学的変化をもたらす。その結果、除水能の低下や透過性の亢進など腹膜の機能低下が問題となり、腹膜透析の中止を余儀なくさせられる。さらには被嚢性腹膜硬化症(Encapsulating Peritoneal Sclerosis : EPS) という重篤な予後不良の合併症が重大な問題となってくる。この合併症が腹膜透析療法の普及を妨げる理由の一つとなっている。そのため長期の腹膜透析における腹膜劣化の防止や腹膜傷害機序の解明が、強く求められている。この腹膜傷害から腹膜線維化への進展・発症には細胞外マトリックスを過剰に産生する筋線維芽細胞が重要な役割を果たしている。腎臓における筋線維芽細胞の由来については、様々な仮説が提唱されてきたが現在は系譜追跡実験や病理学的なアプローチにより線維芽細胞に由来するものが主体と考えられている。腹膜線維化における筋線維芽細胞の由来についても、これまで腹膜中皮細胞からの形質転換が注目されていたが、最近腹膜中皮下の線維芽細胞が筋線維芽細胞の主な起源であったとの報告がされた。しかしながら、すべてが線維芽細胞由来ではなく、少なくとも 2 種類以上の発生学的起源をもつ細胞から構成されていると考えられている。また形質転換には線維芽細胞と解剖学的に近接する腹膜中皮細胞とのかわりも示唆され、傷害時に浸潤した炎症細胞や傷害された線維芽細胞や腹膜中皮細胞から分泌される液性因子とのクロストークが重要な役割を果たすとされる。いずれにしても筋線維芽細胞への形質転換を抑制することが、腹膜の線維化抑制、つまり腹膜機能の保持へとつながることが期待される。臓器傷害後の組織修復は発生期の組織形態形成の過程を模倣するものと考えられ、胎生期において間葉上皮転換 (Mesenchymal-Epithelial Transition ; MET) に関与するエピモルフィンが MET を誘導することで腹膜傷害後の組織修復に関与する可能性がある。我々が以前報告した腎線維化の修復においてもエピモルフィンが MET を誘導し、線維化腎の修復に関与していたことから腹膜傷害後の修復期におけるエピモルフィンの作用を解析することにより、腹膜線維化の治療法につながる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、エピモルフィンが腹膜線維化の修復作用および腹膜機能に対する保護作用があるかについて解析を行い、腹膜透析の合併症である腹膜線維化に対する治療のターゲットとしての可能性を検討することである。

3. 研究の方法

腹膜線維化のモデルとして、chlorhexidine gluconate(CG)投与マウス (8 週齢 C57Bl6 マウスに 0.1%CG/15%エタノール/生食を 10ml/kg・BW、週 3 回、3 週間投与) を作成した。エピモルフィンの発現を CG 投与マウスモデルにおいて検討し、さらにエピモルフィンの腹膜での局在を各種マーカーとの多重免疫蛍光染色法で検討した。

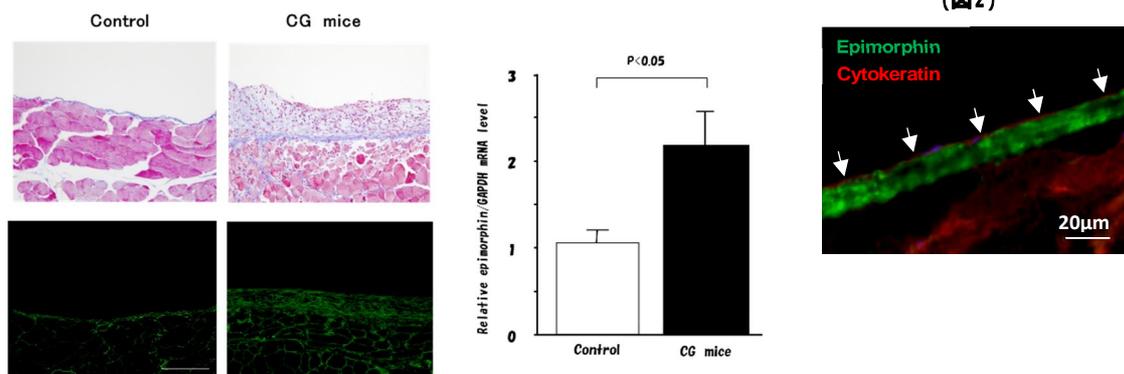
腹膜線維化モデルマウスの修復期におけるエピモルフィン発現の変化と線維化関連因子の解析を行った。腹膜線維化修復モデルマウスとして、研究と同様の方法で 2 週間の CG 投与を行い、投与終了後経時的に修復過程を観察する系を使用した。CG 投与終了後 3 日、7 日、28 日、42 日目に屠殺し、経時的に組織およびエピモルフィン・線維化関連因子の発現を解析した。発現解析は採取した腹膜から RNA を抽出し、リアルタイム PCR 法によって検討した(計各 N=5)。リアルタイム PCR 法は TaqMan® Gene Expression Assay(Applied Biosystems)を用いて mRNA 発現 (エピモルフィン : syntaxin-2 / collagen I / TGF- β 1 / α -SMA / MMP-2 / MMP-9 / GAPDH) を検討した。

培養ラット線維芽細胞に TGF- β 、エピモルフィンおよび双方を添加し、形態学的変化の観察とリアルタイム PCR による α -SMA と PDGFR- β の発現解析を行った。

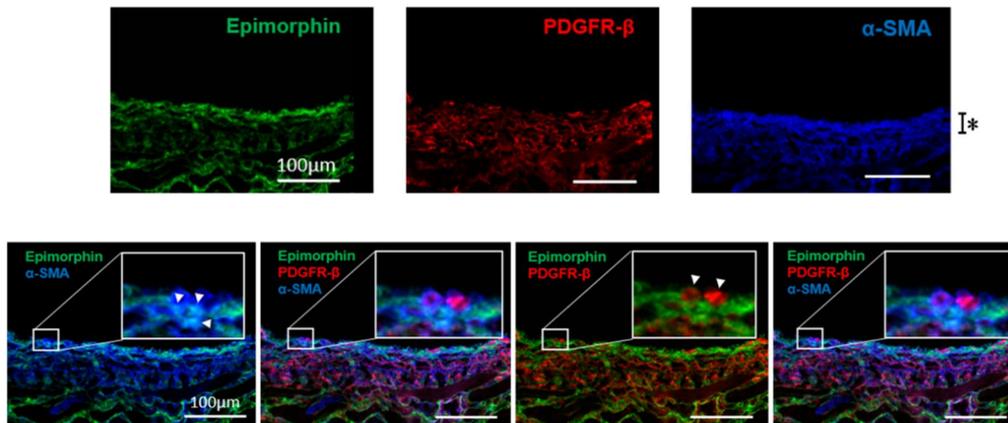
4. 研究成果

CG 投与による腹膜線維化モデルマウスでは、対照群マウスと比較し Masson's trichrome 染色で中皮下の線維性肥厚を認め、その病変・程度に一致してエピモルフィンの発現亢進を認めた (図 1 左)。mRNA 発現においても亢進が確認された (図 1 右)。エピモルフィンの発現はサイトケラチンとの二重免疫蛍光染色において腹膜中皮細胞ではなく中皮細胞下の submesothelial compact zone に観察された (図 2)。PDGFR- β および α -SMA との多重免疫染色の検討では、PDGFR- β とは一致せず、 α -SMA と多くの部分での一致を認めた (図 3)。

CG 投与マウスの腹膜における組織変化とエピモルフィンの発現変化 (図 1)



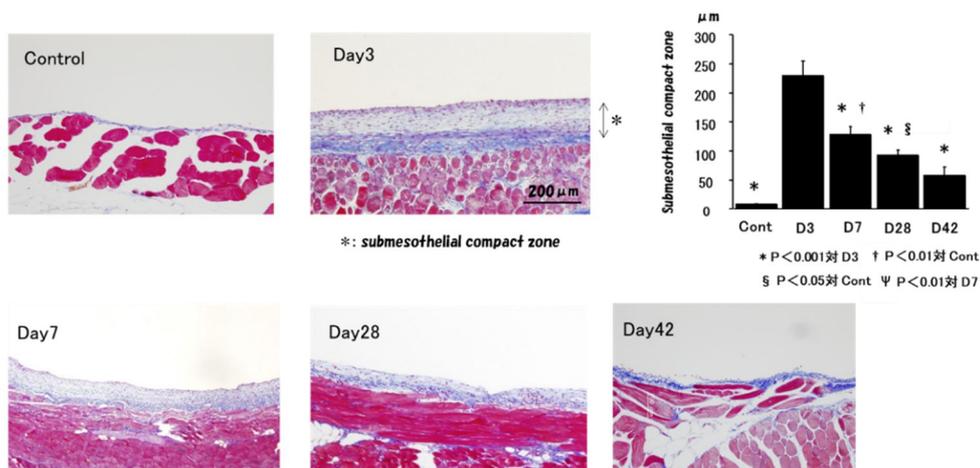
CG 投与マウス腹膜における epimorphin、PDGFR- β 、 α -SMA の発現 (図 3)



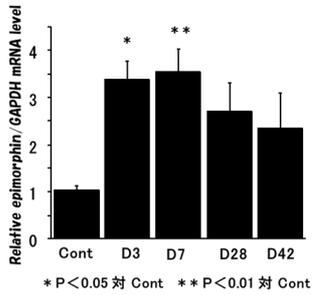
*: submesothelial compact zone

修復過程を観察する系では、Masson's trichrome 染色による組織学的検討において経時的な改善傾向を示したが 42 日後においても腹膜中皮下の線維性肥厚は軽度残存していた (図 4)。エピモルフィン発現は CG 投与終了後 7 日目にピークを認め、以降経時的な低下を認めた (図 5)。線維化関連マーカーである α -SMA、TGF- β 、collagen I および MMP-2 mRNA 発現は経時的な低下傾向を示したのに対し (図 6、7)、MMP-9 mRNA 発現は投与終了後 28 日目にピークを認めた (図 7)。

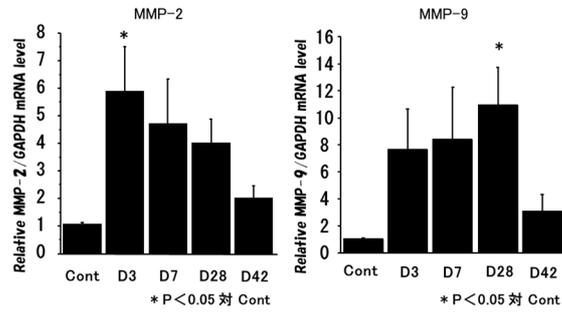
Masson's trichrome 染色による腹膜組織の経時変化 (図 4)



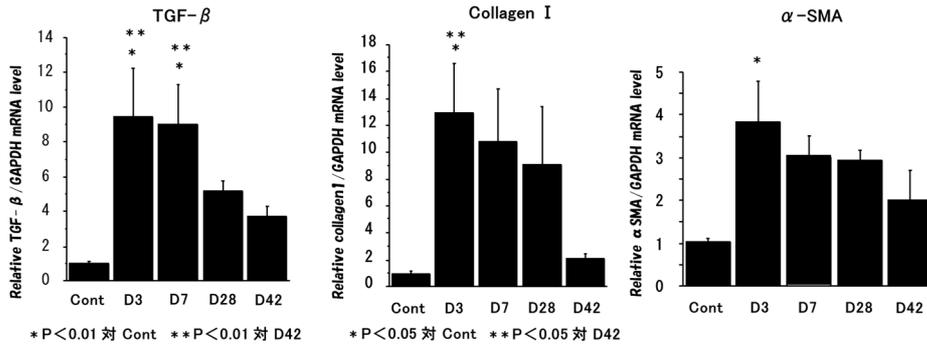
Epimorphin発現の経時的変化(図5)



MMP-2、MMP-9発現の経時的変化(図7)

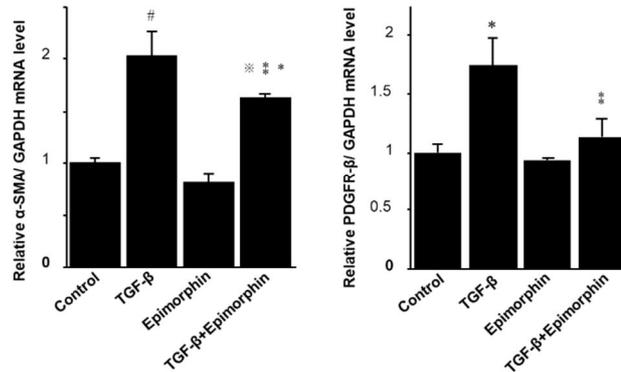
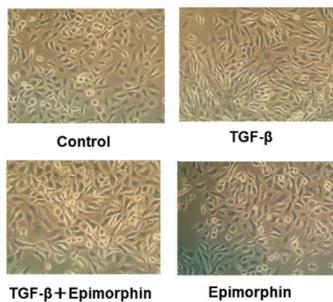


TGF-β、Collagen I、α-SMA発現の経時的変化(図6)



培養ラット腎線維芽細胞に TGF-β とエピモルフィンを共添加した群では TGF-β 単独添加群と比べ、紡錘形への形態学的変化が抑制された(図8)。α-SMA と PDGFR-β の mRNA 発現解析では、TGF-β 添加による α-SMA と PDGFR-β の発現増強がエピモルフィンにより有意に抑制された(図8)。

(図8)



5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6 . 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	平井 洋平 (Hirai Yohei) (00397572)	関西学院大学・理工学部・教授 (34504)	
研究分担者	尾田 高志 (Oda Takashi) (90531187)	東京医科大学・医学部・教授 (32645)	