

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17284

研究課題名（和文）ヒストン修飾による腹膜中皮細胞の老化を介した腹膜線維化の機序の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of peritoneal fibrosis via senescence of peritoneal mesothelial cells by histone modification

研究代表者

前田 和也（Maeda, Kazuya）

広島大学・病院（医）・専門研究員

研究者番号：60832540

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：末期腎不全における腹膜透析は臨床的に優れた治療法であるが、腹膜線維化による腹膜機能の低下のため長期継続は困難である。透析液中のブドウ糖への暴露によってストレス誘導性の腹膜中皮細胞の老化を引き起こすことが腹膜線維化の一因となっている。すなわち、腹膜中皮細胞の保護によって線維化を予防できれば、腹膜透析の長期継続が期待できる。

本研究では、細胞老化に関与するP16を治療標的とし、ヒストンのメチル化によるP16の転写活性が亢進することで、腹膜中皮細胞の老化が誘導されて腹膜線維化が進行すること、その阻害によって腹膜線維化を抑制されることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によってストレス誘導性の腹膜中皮細胞の老化を介した腹膜線維化の機序やその阻害薬によって腹膜線維化を抑制できることが明らかになった。今後将来的に臨床応用することで、これまでよりも腹膜透析の長期継続が可能になること、ひいては更なる普及率の向上に寄与することが期待される。腹膜透析の長期継続によって、患者のQuality of Lifeの維持が期待されるだけでなく、今後さらに高齢社会が進む中で、在宅療法を推進する社会的なニーズに応えるものと思われる。

研究成果の概要（英文）：Peritoneal dialysis is a clinically effective treatment for end-stage renal disease. However, long-term continuation of peritoneal dialysis is challenging due to the decline in peritoneal function caused by peritoneal fibrosis. Exposure to glucose in the dialysis solution can induce stress-induced aging of peritoneal mesothelial cells, contributing to peritoneal fibrosis. Therefore, by protecting peritoneal mesothelial cells, it may be possible to prevent fibrosis and enable long-term continuation of peritoneal dialysis.

In this study, we focused on P16, which is involved in cellular aging, and demonstrated that enhanced transcriptional activity of P16 through histone methylation induces aging of peritoneal mesothelial cells and progresses peritoneal fibrosis. It was revealed that inhibiting this process can suppress peritoneal fibrosis.

研究分野：Nephrology

キーワード：peritoneal fibrosis

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

末期腎不全では生命の維持のために腎代替療法を必要とする。本邦では血液透析患者が圧倒的に多く、腹膜透析患者は全体の3%程度に留まる。腹膜透析は血液透析と比較して循環器系への負担が少なく、残腎機能を保持しやすいという臨床的なメリットを有し、同時に通院回数が少なく、社会復帰に有利という社会的なメリットも享受できる。しかし、腹膜線維化が進行すると、透析の継続が困難に加えて、重篤な合併症である被嚢性腹膜硬化症を発症する危険性が高まるため、腹膜透析の治療期間は限定される。治療期間の制限や腹膜線維化によって重篤な合併症の危険があることが腹膜透析の普及率が低い原因の1つと考えられる。それゆえ、腹膜透析の普及率の向上や長期継続を可能にするためには、腹膜線維化の機序を解明し、有効な治療法を確立することが求められる。

腹膜線維化の機序の一因として透析液中のブドウ糖への暴露によって腹膜中皮細胞の老化が想定される。細胞老化はテロメアの短縮等によって不可逆的な細胞周期の停止が起こる現象であり、癌抑制遺伝子として知られる P16 は細胞老化に関与し、細胞周期を G1 期で停止させる。細胞へのストレスやダメージによってストレス誘導性細胞老化が進行すると、組織に老化した細胞が蓄積し、加齢そのものや加齢に関連した疾患の発症に関わる (Jan M. van Deursen. Nature. 2014)。老化細胞では P16 の発現が亢進して細胞周期が停止しているだけでなく、炎症性サイトカインや増殖因子などの生理活性因子を分泌して慢性炎症や線維化を惹起する。腹膜は表面を1層の中皮細胞に覆われており、中皮細胞が腹膜機能の維持に大きく関わっているが、透析液中のブドウ糖の刺激によって TGF- β 1 によるヒト腹膜中皮細胞の老化が促進すること (Ksiazek et al. Lab Invest. 2007)、老化した腹膜中皮細胞では P16 の発現が亢進していることがわかっている (Ksiazek et al. J Appl Physiol. 2006)。つまり、腹膜線維化の過程でも P16 を介したストレス誘導性の腹膜中皮細胞の老化の関与が想定される。

DNA 塩基配列の変化を伴わず、後天的な修飾により遺伝子発現が制御、維持される仕組みとしてエピジェネティクスがあり、その1つとしてヒストン修飾が挙げられる。腹膜を含む様々な臓器の線維化の過程においてヒストン修飾が関連することが報告されており、転写活性の制御が重要な治療ターゲットであることが示されている。

これまで腎臓の線維化の過程において腎線維芽細胞における TGF- β 1 は H3K4 のトリメチル化 (H3K4me3) を介して P16 の発現を誘導し、H3K4 メチル化酵素 Mixed-Lineage Leukemia 1 (MLL-1) 阻害薬の投与によって、H3K4me3 を低下させ P16 の発現を抑制すること、加えて虚血再灌流障害におけるストレス誘導性腎老化においても、MLL-1 阻害薬は P16 発現を抑制して、細胞老化や線維化が改善したことを明らかにしている。

上記を踏まえると、腹膜線維化の過程においてもヒストン修飾が P16 の発現を制御しており、特異的阻害薬によって P16 の発現を抑えることで腹膜線維化を改善できると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、TGF- β 1 が H3K4 メチル化酵素 MLL-1 の発現を亢進し、H3K4me3 による P16 発現の亢進を介して、腹膜線維化を進行させることを明らかにした上で、MLL-1 阻害薬による H3K4me3 の抑制が P16 の発現を低下させ、腹膜線維化を改善するかを検討することである。

3. 研究の方法

・マウス

グルコース分解産物であるメチルグリオキサール (MGO) によって TGF- β 1 が誘導され、腹膜線維化が進行することがわかっている。C57BL/6 マウスに MGO を3週間投与し、腹膜線維化マウスを作製する。免疫組織染色にて P16、H3K4me3 の発現を確認する。MGO マウスに MLL-1 阻害薬 (MM102) を投与し、組織学的に腹膜線維化に伴う腹膜肥厚や細胞浸潤の改善を確認する。同時に P16、H3K4me3 の抑制、間葉系マーカー (α -SMA) や細胞外マトリクス (Collagen) 、炎症性マーカー (TNF- α 、IL-1 β 、IL-6) の発現が低下していることを免疫組織染色や RT-PCR で評価する。

腹膜機能評価のために腹膜平衡試験を行う。高濃度 4.25% ブドウ糖透析液を腹腔内に一定時間貯留した後に排液し、小分子除去能 (D/P Cre)、限外濾過能 (D/D0 Glu) を評価する。

・ヒト腹膜中皮細胞

ヒト腹膜中皮細胞 (HPMC) において、TGF- β 1 刺激 (10ng/mL) によって MLL-1 による P16、H3K4me3 発現を誘導して細胞線維化が進行することを Western Blotting を用いて示す。また、MLL-1 阻害薬投与によって、H3K4me3、P16 発現が低下して細胞線維化が抑制されることを証明する。免疫沈降法による、p16 と H3K4me3 の関連性の評価を行う。

・ヒト腹膜透析患者

ヒトへの応用の可能性を検討するために、腹膜中皮細胞における MLL-1、P16 の発現を、非透析患者と腹膜透析患者で比較する。

4 . 研究成果

・マウス

これまでの研究によってメチルグリオキサールで刺激をした腹膜線維化マウスでは、P16 と H3K4me3 の発現が亢進していた。つまり腹膜の線維化に P16 による腹膜細胞の老化が関連していることが示唆された。

反対に、MLL-1 阻害薬を腹膜線維化マウスに投与することで、H3K4me3 を低下させ、P16 が低下した。結果として腹膜の肥厚や炎症細胞の浸潤が改善した。またマウス腹膜の炎症と線維化を抑制した

また、腹膜平衡試験においては腹膜透過性の亢進 (D/P BUN、D/Do Glu) が抑制され、形態学的だけではなく腹膜機能も改善していた。

これらより腹膜線維化マウスにおいて、P16 を介したストレス誘導性の腹膜中皮細胞の老化が線維化に関与しており、H3K4me3 による P16 の転写活性を制御することで腹膜線維化を改善することが示唆された。

・ヒト腹膜中皮細胞

MLL-1 阻害は HPMC の H3K4me3 と p16 発現を抑制した。同様に MLL-1 阻害は HPMC の細胞線維化を抑制した。免疫沈降法の結果から HPMC において、H3K4me3 は p16 遺伝子発現を直接制御した。

・ヒト腹膜透析患者

腹膜透析患者の HPMC では、H3K4me3、p16 の発現が亢進していた。

上記の結果より腹膜線維化のプロセスにおいて P16 の発現による腹膜中皮細胞の老化が関与すること、また、ヒストン修飾が P16 の発現を制御しており、特異的阻害薬によって P16 の発現を抑えることで腹膜線維化を改善することが示された。

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------