

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591245

研究課題名(和文)PHSRNペプチドによる腹膜再生機構の薬理学的解明と臨床応用

研究課題名(英文)Elucidation of the peritoneal regeneration mechanism by the PHSRN peptide and its clinical application

研究代表者

田村 雅仁(TAMURA, Masahito)

産業医科大学・大学病院・准教授

研究者番号：40330980

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：腹膜透析では腹膜透析液中に含まれる高糖濃度が腹膜障害を引き起こすため、長期にわたって治療を継続することが困難である。我々は培養腹膜中皮細胞において高糖濃度が細胞接着分子のインテグリンを阻害することにより、中皮細胞の創傷治癒を阻害することを報告した。さらに、ラット腹膜透析モデルにおいてインテグリン活性化ペプチドPHSRNの腹腔内投与により腹膜中皮細胞の再生を改善させることも報告した。その機序としてPHSRNは5-1インテグリンを刺激しFAK-p130Casを含む細胞内伝達経路を介した細胞遊走能を増強することで創傷治癒(腹膜中皮再生、肉芽組織吸収)が亢進すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Long-term peritoneal dialysis (PD) is associated with the development of functional and structural alterations of the peritoneal membrane, and is eventually limited by reduced efficacy. We have shown that high glucose concentrations inhibit FAK-mediated migration of mesothelial cells, and that dialysates containing high glucose concentrations cause peritoneal damage by inhibiting wound healing of the mesothelial cell monolayer. We also showed that an integrin-activating peptide, PHSRN, ameliorates inhibitory effects of conventional peritoneal dialysis fluids on peritoneal wound healing. We elucidated that PHSRN recovers glucose-induced inhibition of cell motility and phosphorylation of focal adhesion kinase and its downstream p130Cas.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：腹膜透析 慢性腎不全 透析液 生体適合性

1. 研究開始当初の背景

(1) 慢性糸球体腎炎に加え近年の糖尿病性腎症の増加による慢性腎不全患者数の増加のため、我が国では毎年約3万人以上にも及ぶ新規の透析導入があり、約30万人が維持透析療法を受けている。透析療法には血液透析と腹膜透析があり、特に在宅医療である腹膜透析はQOLが高く心血管系への負担も少ないなど様々な利点がある。しかし、腹膜透析の長期継続は腹膜線維化や腹膜中皮細胞脱落、血管新生といった組織学的変化をもたらすため (Williams JD. *J Am Soc Nephrol* 13: 470, 2002)、腹膜透析普及の障害となっている。この腹膜組織の異常なリモデリングは限外濾過不全などの腹膜機能低下につながり、腹膜透析の継続を断念する原因となる。本研究では腹膜の組織学的変化につながる要因を軽減する方法を開発し、より長期間の腹膜透析継続を可能とすることを目標とするため、腎不全医療において重要な意義があると考えた。

(2) 腹膜透析患者における腹膜組織の劣化の原因として、腹膜炎などの急性腹膜障害の既往や透析液に含まれる非生理的物質への慢性暴露などが挙げられる。我々は腹膜中皮細胞を用いて透析液に含まれる高濃度のブドウ糖がインテグリンを介した創傷治癒過程を阻害することを報告した (Tamura M. *Kidney Int.* 63: 722, 2003)。最近、インテグリン活性化ペプチドである PHSRN は糖尿病モデルラットにおいて皮膚の創傷治癒を促進することや、ラット角膜上皮細胞の遊走を促進し角膜潰瘍の治癒過程を促進することが報告された (Livant DL. *J Clin Invest* 105: 1537, 2000, Kimura K. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48: 1110, 2007)。また、インテグリンシグナル伝達経路を抑制する PTEN は FAK や PI3K に対して抑制作用を持ち、FAK/PI3K/Akt 経路を阻害することで創傷治癒、接着、アポトーシスを制御することも我々は報告してきた (Tamura M. *Science*. 280: 1614, 1998, Gu J, Tamura M. *J Cell Biol.* 143: 1375, 1998, Tamura M. *Cancer Res.* 59: 442, 1999, Podsypanina K, Tamura M. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96: 1563, 1999, Tamura M. *J Biol Chem.* 274: 20693, 1999, Gu J, Tamura M. *J Cell Biol.* 146: 389, 1999, Tamura M. *J Natl Cancer Inst.* 91: 1820, 1999)。

さらに、我々はインテグリンによる細胞内情報伝達系の活性化が PDGF などの成長因子による細胞内情報伝達系とも密接にクロストークし相乗的に働くことも報告してきた (Tamura K, Tamura M. *J Cardiovasc Pharm.* 38: S59, 2001, Tamura K, Tamura M. *Life Sci.* 72: 1049, 2003, Kanegae K, Tamura M. *Nephrol Dial Transplant.* 20: 2080, 2005)。これら

のことは腹膜障害でみられる細胞外基質の異常なリモデリングは、インテグリンとの相互作用により様々な細胞生物学的な変化を引き起こしていることを示唆している。我々はインテグリン活性化ペプチド PHSRN により腹膜障害を抑制することを報告したが (Miyamoto T, Tamura M. *Nephrol Dial Transplant.* 25:1109-1119, 2010)、臨床応用に向けてこの機序をさらに検討する必要がある。しかしながら、PHSRN ペプチドが実際に腹膜透析時の腹膜に与える影響はこれまで報告されていない。我々が作成したマウス腹膜透析モデルにおいて、PHSRN ペプチドがどのような影響を与え実際に腹膜障害の進展を抑制するのかを検討することは、腹膜障害の治療に当たり重要な意義があるものと考えられる。

2. 研究の目的

腹膜透析では腹膜透析液中に含まれる高糖濃度が腹膜障害を引き起こすため、長期にわたって治療を継続することが困難である。我々は培養腹膜中皮細胞において高糖濃度が細胞接着分子のインテグリンを阻害することにより、中皮細胞の創傷治癒を阻害することを報告した (Tamura M. *Kidney Int.* 63:722, 2003)。さらに、ラット腹膜透析モデルにおいてインテグリン活性化ペプチド PHSRN の腹腔内投与により腹膜中皮細胞の再生を改善させることも報告した (Miyamoto T, Tamura M. *Nephrol Dial Transplant.* 25:1109, 2010)。今回の研究は、PHSRN ペプチドの臨床応用に向け、PHSRN ペプチドの腹膜障害抑制機序の解明や副作用の確認、最適な投与方法の検討などを行うことを目的とする。

3. 研究の方法

腹膜剥離処理を施しラット壁側腹膜に腹膜障害を惹起し四群 (1:バッファ群、2:3.86%ブドウ糖酸性透析液群、3:透析液 + PHSRN 群、4:透析液+HSPNR 群) にわけ各液 20ml を連日腹腔内注入した。1、3、6、9、12 日後に壁側腹膜を採取し障害部位の経時的組織変化を HE 染色、免疫組織化学法 (HBME-1, ED-1, CD31, SMA)、蛍光免疫組織化学法 (5 インテグリン、サイトケラチン) で検討した。ラット腹膜中皮細胞 (RPMC) 及びラット線維芽細胞 (NRK) を使用して PHSRN が細胞遊走、細胞増殖、ヒアルロン酸分泌に与える影響をそれぞれ Wound healing assay 法、Cell proliferation assay 法、ELISA 法で検討した。さらに、インテグリンを介した細胞遊走、接着において中心的な役割を果たす Focal adhesion kinase (FAK) のリン酸化を Western blot 法で、FAK を介した細胞内伝達経路の下流に存在する p130^{Cas} 蛋白のリン酸化を免疫沈降法で検討した。

4. 研究成果

(1) 腹膜創傷モデルの作成：剥離処置により腹膜中皮細胞層が消失し、一定の創傷作成が可能であることを確認した。

(2) 腹膜中皮細胞への影響：剥離6日後において HBME-1 陽性腹膜中皮細胞の再生は透析液群 (53.3% ± 6.5%) ではバッファ群 (53.3 ± 6.5%) と比較し遅延していたが PHSRN 含有透析液群 (51.7% ± 9.6%) では遅延効果が有意に軽減した。

(3) 腹膜中皮下層への影響：9 日後も同様の結果が得られた。中皮下組織では6日後に透析液群と比較しバッファ群では単位面積当たりの細胞数及び ED-1 陽性マクロファージ数が増加していたが 12 日後には中皮下組織の肥厚度、細胞数、ED-1 陽性、CD31 陽性血管数、SMA 陽性細胞数が有意に減少しており透析液群における創傷治癒過程の遅延が観察された。

(4) PHSRN ペプチドの効果：PHSRN 群では中皮下組織においても透析液群と比較し創傷治癒の改善が示唆された。

(5) 培養ラット腹膜中皮細胞 (RPMC) とラット線維芽細胞 (NRK) での検討：RPMC 及び NRK において PHSRN は 2.5% ブドウ糖による腹膜中皮細胞の遊走能阻害作用を軽減した。

(6) 細胞接着関連分子への影響：PHSRN は 2.5% ブドウ糖による FAK、p130^{Cas} 蛋白のリン酸化抑制を有意に軽減した。一方、PHSRN は RPMC の増殖及びヒアルロン酸分泌には影響を与えなかった。コントロールペプチドである HSPNR 群は上記すべての実験において透析液群または 2.5% ブドウ糖群と有意差を認めなかった。

(7) まとめ：インテグリン活性化ペプチド PHSRN が従来型腹膜透析液による腹膜創傷治癒遅延を軽減することにより腹膜障害後の腹膜組織再生に有効であることが本研究により初めて示された。PHSRN は 5 1 インテグリンを刺激し FAK-p130^{Cas} を含む細胞内伝達経路を介した細胞遊走能を増強することで創傷治癒 (腹膜中皮再生、肉芽組織吸収) が亢進すると考えられた。研究の限界は PHSRN 投与の長期効果及び腹膜機能の検討を行っていない点と考えられる。本研究の結果は腹膜障害後の創傷治癒に焦点を当てることによる腹膜劣化の新たな予防戦略の開発につながる可能性を示唆する。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計16件)

Nakayama M, Ishida M, Ogiwara M, Hanaoka K, Tamura M, Kanai H, Tonozuka Y, Marshall MR: Social functioning and socioeconomic changes after introduction of regular dialysis treatment and impact of dialysis modality: a multi-center

survey of Japanese patients. Nephrology (Carlton), in press. 査読あり

Chien-Chia Wu V, Kaku K, Takeuchi M, Otani K, Yoshitani H, Tamura M, Abe H, Lin FC, Otsuji Y. Aortic root geometry in patients with aortic stenosis assessed by real-time three-dimensional transesophageal echocardiography. J Am Soc Echocardiogr. 27(1):32-41, 2014、査読あり

Muraoka Y, Sonoda S, Kashiyama K, Kamezaki F, Tsuda Y, Araki M, Tamura M, Takeuchi M, Abe H, Okazaki M, Otsuji Y. Coronary arterial remodeling and out-stent plaque change after drug-eluting stent implantation. Circ J. 77(2):363-71, 2013、査読あり

Haruki N, Takeuchi M, Yoshitani H, Otani K, Kuwaki H, Iwataki M, Abe H, Tamura M, Okazaki M, Otsuji Y. Immediate amelioration of mechanical pulsus alternans by adaptive servo-ventilation therapy. Heart Lung Circ. 22(4):300-302, 2013、査読あり

Kamezaki F, Sonoda S, Nakata S, Muraoka Y, Okazaki M, Tamura M, Abe H, Takeuchi M, Otsuji Y. Association of seasonal variation in the prevalence of metabolic syndrome with insulin resistance. Hypertens Res. 36(5):398-402, 2013、査読あり

Kohno R, Abe H, Akamatsu N, Tamura M, Takeuchi M, Otsuji Y, Benditt DG. Subclinical Tonic-Clonic Epileptic Seizure Detected by an Implantable Loop Recorder. Int Heart J. 54(5):289-291, 2013、査読あり

Wu VC, Takeuchi M, Kuwaki H, Iwataki M, Nagata Y, Otani K, Haruki N, Yoshitani H, Tamura M, Abe H, Negishi K, Lin FC, Otsuji Y. Prognostic Value of LA Volumes Assessed by Transthoracic 3D Echocardiography: Comparison With 2D Echocardiography. JACC Cardiovasc Imaging. 6(10):1025-1035, 2013、査読あり

Wu VC, Takeuchi M, Otani K, Haruki N, Yoshitani H, Tamura M, Abe H, Lin FC, Otsuji Y. Effect of Through-Plane and Twisting Motion on Left Ventricular Strain Calculation: Direct Comparison between Two-Dimensional and Three-Dimensional Speckle-Tracking Echocardiography. J Am Soc Echocardiogr. 26(11):1274-1281, 2013、査読あり

Minamiguchi H, Oginosawa Y, Kohno R, Tamura M, Takeuchi M, Otsuji Y, Abe H: A 2:1 AV Rhythm: An Adverse Effect of a Long AV Delay during DDI Pacing and Its Prevention by the Ventricular Intrinsic Preference Algorithm in DDD Mode. Pacing Clin

Electrophysiol, 35: e189-e192, 2012、査読あり

Minamiguchi H, Abe H, Kohno R, Oginosawa Y, Tamura M, Takeuchi M, Nagatomo T, Otsuji Y. Incidence and characteristics of far-field R-wave sensing in low right atrial septum pacing. *Circ J*, 76: 598-606, 2012、査読あり

Iwataki M, Takeuchi M, Otani K, Kuwaki H, Haruki N, Yoshitani H, Tamura M, Abe H, Otsuji Y. Measurement of Left Atrial Volume from Transthoracic Three-Dimensional Echocardiographic Datasets Using the Biplane Simpson's Technique. *J Am Soc Echocardiogr*. 25(12):1319-1326, 2012、査読あり

Otani K, Takeuchi M, Kaku K, Haruki N, Yoshitani H, Eto M, Tamura M, Okazaki M, Abe H, Fujino Y, Nishimura Y, Levine RA, Otsuji Y. Evidence of a vicious cycle in mitral regurgitation with prolapse: secondary tethering attributed to primary prolapse demonstrated by three-dimensional echocardiography exacerbates regurgitation. *Circulation*, 126(11 Suppl 1): S214-21, 2012、査読あり

Kamezaki F, Sonoda S, Nakata S, Kashiyama K, Muraoka Y, Okazaki M, Tamura M, Abe H, Takeuchi M, Otsuji Y. Proposed cutoff level of waist circumference in Japanese men: evaluation by homeostasis model assessment of insulin resistance levels. *Intern Med*, 51(16): 2119-2124, 2012、査読あり

Nakai H, Kaku K, Takeuchi M, Otani K, Yoshitani H, Haruki N, Tamura M, Okazaki M, Abe H, Tsutsumi A, Levine RA, Otsuji Y. Different influences of left ventricular remodeling on anterior and posterior mitral leaflet tethering. *Circ J*. 76(10): 2481-2487, 2012、査読あり

Matsumoto M, Tamura M, Miyamoto T, Furuno Y, Kabashima N, Serino R, Shibata T, Kanegae K, Takeuchi M, Abe H, Okazaki M, Otsuji Y. Impacts of icodextrin on integrin-mediated wound healing of peritoneal mesothelial cells. *Life Sci*, 90(23-24): 917-923, 2012、査読あり

Hayashi M, Takamatsu I, Kanno Y, Yoshida T, Abe T, Sato Y; for the Japanese Calciphylaxis Study Group. A casecontrol study of calciphylaxis in Japanese end-stage renal disease patients. *Nephrol Dial Transplant*, 27: 1580-1584, 2012、査読あり

〔学会発表〕(計 1 1 件)

Tamura M: Biocompatibility and efficacy of icodextrin. 7th Congress of

the International Society for Hemodialysis. 2014 年 4 月 27-27 日、Okinawa Convention Center (Okinawa, Ginowan)

Kuma A, Tamura M: Induction of kidney fibrosis by fibronectin synthesis via WNT signaling. The 2014 American Society for Cell Biology Meeting. 2014 年 12 月 7-7 日、Philadelphia (USA)

Tamura M, Miyamoto T, Serino R, Furuno Y, Bando K, Fujimoto Y, Kuma A, Hasegawa E, Otsuji Y: Effects of Peritoneal Dialysis Using Icodextrin Dialysis Solution in Patients with Chronic Renal Failure Complicated by Refractory Congestive Heart Failure. 46th Annual Meeting of American Society of Nephrology. 2013 年 11 月 5-10 日、Atlanta (USA)

Miyamoto T, Matsumoto M, Tanaka H, Hasegawa E, Kuma A, Fujimoto Y, Bando K, Serino R, Kabashima N, Otsuji Y, Tamura M: Plasma Pentraxin-3 Levels Are Associated with Risk of Nutritional Status in Hemodialysis Patients. 46th Annual Meeting of American Society of Nephrology. 2013 年 11 月 5-10 日、Atlanta (USA)

Kuma A, Miyamoto T, Serino R, Kabashima N, Tamura M, Otsuji Y: Participation of WNT Protein in Acute Kidney Injury. 46th Annual Meeting of American Society of Nephrology. 2013 年 11 月 5-10 日、Atlanta (USA)

Kuma A, Tamura M, Hasegawa E, Fujimoto Y, Bando K, Miyamoto T, Serino R, Kabashima N, Otsuji Y: Effect of Adaptive Servo Ventilation Treatment for Chronic Heart Failure in Patients with Chronic Kidney Disease. 46th Annual Meeting of American Society of Nephrology. 2013 年 11 月 5-10 日、Atlanta (USA)

Komatsu H, Sato Y, Miyamoto T, Nakata T, Nishino T, Tamura M, Tomo T, Miyazaki M, Fujimoto S: Effect Of Tonsillectomy Plus Steroid Pulse Therapy On Clinical Remission Of IgA Nephropathy With Mild Proteinuria: A Multicenter Study. 46th Annual Meeting of American Society of Nephrology. 2013 年 11 月 5-10 日、Atlanta (USA)

Tamura M, Matsumoto M, Miyamoto T, Knaegae K, Furuno Y, Serino R, Kabashima N, Otsuji Y: Protective effects of icodextrin on inter-cellular adhesion molecule-1 expression via protein kinase C in human endothelial cells. 49th ERA-EDTA Congress. 2012 年 5 月 24-27 日、Paris (France)

Furuno Y, Tsutsui M, Norishita T, Shimokawa H, Otsuji Y, Yanagihara N, Kabashima N, Serino R, Kanegae K, Miyamoto T, Nakamata J, Ishimatsu N,

Tamura M: Novel vasculoprotective role of nitric oxide synthase (NOS) system in mice: Involvement of NOS system in bone marrow-derived vascular progenitor cells. 49th ERA-EDTA Congress. 2012年5月24-27日、Paris (France)

Ishimatsu N, Miyamoto T, Morimoto H, Nakamata J, Baba R, Kanegae K, Serino R, Kabashima N, Otsuji Y, Doi Y, Tamura M: Pentraxin 3 expression in a rat model of continuous peritoneal dialysis. 49th ERA-EDTA Congress. 2012年5月24-27日、Paris (France)

Nakamata J, Morimoto H, Baba R, Ishimatsu N, Miyamoto T, Kanegae K, Serino R, Kabashima N, Otsuji Y, Doi Y, Tamura M: High glucose peritoneal dialysate induces apoptosis through endoplasmic reticulum stress in peritoneal mesothelial cells. 49th ERA-EDTA Congress. 2012年5月24-27日、Paris (France)

〔図書〕(計1件)

田村雅仁、宮本哲、芹野良太：全人力・科学力・透析力 for the people、透析医学、医薬ジャーナル社、2014年、720 (165-169)

〔その他〕

ホームページ等

http://www.uoeh-u.ac.jp/kouza/2nai/intro_j.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

田村雅仁 (TAMURA, Masahito)
産業医科大学・大学病院・准教授
研究者番号：40330980

(2)研究分担者

芹野良太 (SERINO, Ryota)
産業医科大学・大学病院・講師
研究者番号：00309957

宮本哲 (MIYAMOTO, Tetsu)
産業医科大学・医学部・非常勤医師
研究者番号：30611305

椛島成利 (KABASHIMA, Narutoshi)
産業医科大学・大学病院・非常勤医師
研究者番号：80279322