

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461240

研究課題名(和文) 被嚢性腹膜硬化症におけるTヘルパー細胞の役割の解明と新規治療法の開発

研究課題名(英文) Analysis of T helper (Th) responses in experimental peritoneal fibrosis with Th1/Th2/Th17 dominate mice

研究代表者

楊 景堯 (Yoh, Keigyou)

筑波大学・医学医療系・研究員

研究者番号：90323302

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、被嚢性腹膜硬化症の病態におけるTヘルパー(Th)細胞の役割解明を目的としている。研究代表者が開発したTh1/Th2/Th17細胞優位発現マウスに実験的腹膜硬化症モデルを誘導し、解析した。その結果、Th2細胞優位マウスは、腹膜の線維化がもっとも重度であった。一方、Th1細胞優位マウスはもっとも軽微であった。次に、Th1細胞優位発現マウスの腹水にて上昇が認められたIFN- γ を、腹膜の線維化を誘導した野生型マウスに投与したところ、線維化の緩和を確認した。本研究結果により、被嚢性腹膜硬化症に対し、新たにTh細胞およびサイトカインの制御による治療法の有効性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Encapsulating peritoneal sclerosis (EPS) is one of the most serious complications of long-term peritoneal dialysis. The purpose of this study was to clarify the roles of T helper (Th) (Th1/Th2/Th17) cells in the progression of peritoneum fibrosis (PF) in EPS. T-bet, GATA-3, and ROR γ t are Th1, Th2, and Th17 lineage commitment transcription factors, respectively. In this study, Th1-biased (T-bet transgenic (Tg)) mice, Th2-biased (GATA-3 Tg) mice, and Th17-biased (ROR γ t Tg), and wild-type mice were administered chlorhexidine gluconate (CG) intraperitoneally. CG-injected GATA-3 Tg mice developed marked PF. In contrast, CG-injected T-bet Tg mice only developed mild PF. Cytokines analysis in peritoneal fluid showed that IFN- γ was significantly increased in CG-injected T-bet Tg mice. Moreover, intraperitoneal administration of IFN- γ improved PF in GC-injected wild-type mice. Our results suggest that the regulation of Th cells and cytokines may alleviate the severity of experimental PF.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：被嚢性腹膜硬化症 Tヘルパー細胞 Th1細胞 Th2細胞

1. 研究開始当初の背景

本研究の目的は、被嚢性腹膜硬化症の病態進展における T ヘルパー (Th) 細胞の役割を解明することである。現在、日本における維持透析患者は 30 万人以上おり、医療費は 1 兆円以上にのぼる。腎不全代替療法としては、透析と腎移植があげられるが、日本では腎移植は年間 1598 例 (2014 年) とわずかにしか施行されておらず、ほとんどが透析療法である。透析療法として、血液透析と腹膜透析が行われているが、透析患者の約 97% が血液透析である。腹膜透析は在宅で施行可能であり、食事制限が比較的少なく、そして医療費が安価であるなどさまざまな利点が挙げられる。しかし、腹膜透析を選ぶ患者は少なく、原因として予後不良の被嚢性腹膜硬化症を発症することが挙げられている。被嚢性腹膜硬化症は腹膜透析施行に伴い、びまん性に肥厚した腹膜の広範な癒着により、間歇的ないし持続的にイレウス症状を呈する症候群である。被嚢性腹膜硬化症は確実な治療がなく、また腹膜透析離脱後にも発症するリスクがあるため、腹膜透析導入の大きな障害となっている。

被嚢性腹膜硬化症の発症原因としては、糖濃度、Glycation products、浸透圧、pH、乳酸代謝産物、酸化刺激、細菌感染等による内毒素、外毒素を含め様々な要因の関与が指摘されている。被嚢性腹膜硬化症の治療では、ステロイドが使用されるものの、その病態進展における免疫学的機序、とりわけ Th 細胞の関与は不明である。

Th 細胞は Th1、Th2、Th17 に分類され、それぞれ細胞性免疫、液性免疫またはアレルギー、および組織炎症に関わると考えられている。腹膜透析患者の腹膜炎における解析では、腹腔内に Th2 サイトカインの著明な産生も報告されている (Advancec in Peritoneal Dialysis 18、177、2002)。このように、腹膜透析患者では Th2 優位なバックグランドが存在しているとの報告がある。しかし、Th 細胞が被嚢性腹膜硬化症の発症にいかに関与するかについての検討はほとんどされていない。また、Th2 細胞は、これまでも様々な疾患の線維化に関与することが報告されているが、被嚢性腹膜硬化症の病態形成における報告はない。

2. 研究の目的

被嚢性腹膜硬化症に関する Th 細胞の研究が、あまり行えなかった理由としては、適したモデルマウスが存在していなかった点も挙げられる。研究代表者はこれまでに Th1/Th2/Th17 細胞分化を制御する転写因子 T-bet、GATA-3、ROR γ t が T 細胞特異的に発現するトランスジェニックマウスを作製し、それぞれ Th1/Th2/Th17 細胞優位発現マウスとしての有用性を報告している (Ishizaki、

Yoh et al.、J. Immunol. 2007; Yoh et al.、J. Am. Soc. Nephrol. 2003; Yoh et al.、Eur. J. Immunol. 2012)。さらに、これらのマウスを用いてさまざまな疾患モデルにおける Th 細胞の役割を明らかにしてきた。本研究では、Th1/Th2/Th17 細胞優位発現マウスに短期および長期の実験的被嚢性腹膜硬化症を誘導し、病態進展における Th1/Th2/Th17 細胞の役割を明確にすることが可能と考え、さらにこの結果を応用し、Th 細胞の制御による新規治療法の開発の可能性を図る。特定の Th 細胞が被嚢性腹膜硬化症に関与することを明確にできた場合、患者個々の Th 細胞バランスをあらかじめ評価し、腹膜透析治療を選択するか否かの判断に役立つことが期待できる。また、事前に Th 細胞バランスの改善を図り、被嚢性腹膜硬化症を予防することも可能と考える。被嚢性腹膜硬化症の新たな治療法開発に貢献し、これまで発症するリスクがあるゆえに敬遠されてきた腹膜透析の普及が進み、透析療法の選択肢の増加および透析医療における医療費の軽減に貢献できる可能性があるため、本研究の遂行の意義が大きいと考える。

3. 研究の方法

研究代表者が作製した Th1/Th2/Th17 細胞優位発現マウスに被嚢性腹膜硬化症モデルを誘導し、病態増悪に関わる Th 細胞を確定する。次に、関連するサイトカイン抗体を投与し効果を検討する。

(1) クロールヘキシジングルコネート投与による実験的被嚢性腹膜硬化症の誘導

研究代表者が作製した Th1 細胞優位発現マウス (T-bet トランスジェニックマウス)、Th2 細胞優位発現マウス (GATA-3 トランスジェニックマウス)、Th17 細胞優位発現マウス (ROR γ t トランスジェニックマウス) および野生型マウスにクロールヘキシジングルコネート (chlorhexidine gluconate、CG) を週 3 回、合計 3 週間投与し、実験的被嚢性腹膜硬化症を誘導する。投与方法は、10 週齢の各群マウスに 15% エタノール生食で溶解した 0.1% CG を 0.01ml/体重 (g) を腹腔内投与する。その後下記項目を評価した。また、各群同様に CG を加えない対照群も同様に実験した。

評価項目

投与期間内の体重変化比

肉眼的腸管所見

腹壁腹膜組織所見

腹壁腹膜における筋線維芽細胞評価

腹壁腹膜におけるマクロファージ評価

腹壁腹膜における III 型コラーゲン評価

腹腔内発現サイトカイン解析

上記解析により Th1、Th2、Th17 細胞優位発現マウス間での差異を検討し、関与する Th 細胞を明確に特定する。

(2) 特定 Th 細胞の制御を介した実験的被嚢性腹膜硬化症の治療の試み

上記の実験により、被嚢性腹膜硬化症を発症しやすい Th 細胞優位発現マウスを特定し、該当 Th 細胞の分化ないし産生サイトカインを抑制することにより病態改善を図る。

4. 研究成果

T-bet トランスジェニックマウス、GATA-3 トランスジェニックマウス、ROR γ t トランスジェニックマウス、および野生型マウスの 4 群に 0.1%CG(0.01ml/体重(g))を週 3 回投与し、3 週継続し評価した。

結果：

(1) 体重変化比：CG 投与群はいずれも非投与群と比較し体重比が低下しており、特に Th2 細胞優位の GATA-3 群(0.93 \pm 0.02)で非投与群との GATA-3 群(1.05 \pm 0.02)および他の CG 投与群(野生型(1.01 \pm 0.02)、T-bet 群(0.99 \pm 0.02)、ROR γ t 群(1.00 \pm 0.01))と比較して体重比が有意に低下していた。

(2) 肉眼的腸管所見：CG 投与の GATA-3 群では、腸管の拡張および癒着が顕著であった。また、実験した GATA-3 群の 10 匹中、3 匹は実験終了前に死亡した。

(3) 腹壁腹膜組織所見：CG 非投与群の 3 週間の経過では 4 群に有意な組織的所見の差は確認できなかったが、CG 投与群の終了時組織所見では、4 群いずれも腹膜の肥厚が認められ、特に GATA-3 群にて顕著であった。また、T-bet では比較的軽微であった。腹膜線維性の肥厚を測定したところ CG 非投与群は、野生型、T-bet 群、GATA-3 群、ROR γ t 群はそれぞれ 24.3 \pm 2.4 μ m、25.4 \pm 3.9 μ m、25.0 \pm 2.0 μ m、25.3 \pm 1.4 μ m であった。一方、CG 投与野生型、T-bet 群、GATA-3 群、ROR γ t 群では、それぞれ 114.5 \pm 9.0 μ m、76.3 \pm 16.9 μ m、145.3 \pm 16.5 μ m、and 104.2 \pm 11.5 μ m であった。CG 投与の GATA-3 群が他の投与群と比較し、有意に肥厚が認められた。一方非投与群では 4 群間で差は認められなかった。

(4) α -SMA 免疫染色：筋線維芽細胞のマーカーである α -smooth muscle actin (α -SMA)の 40 倍拡大率視野における染色面積を確認した。CG 非投与群は、野生型、T-bet 群、GATA-3 群、ROR γ t 群はそれぞれ 13.7 \pm 2.5 $\times 10^3 \mu$ m²、12.0 \pm 1.0 $\times 10^3 \mu$ m²、15.9 \pm 4.0 $\times 10^3 \mu$ m²、16.0 \pm 2.8 $\times 10^3 \mu$ m² であった。一方、CG 投与野生型、T-bet 群、GATA-3 群、ROR γ t 群では、それぞれ 77.7 \pm 5.2 $\times 10^3 \mu$ m²、51.4 \pm 8.6 $\times 10^3 \mu$ m²、124.3 \pm 29.2 $\times 10^3 \mu$ m²、71.2 \pm 19.7 $\times 10^3 \mu$ m² であった。CG 投与された GATA-3 群にて他の群と比較し強く染色が確認された。

(5) マクロファージ染色：マクロファージのマーカーを染色したところ、100 倍拡大率視野におけるマクロファージ数は、CG 非投与群は、野生型、T-bet 群、GATA-3 群、ROR γ t 群はそれぞれ 3.0 \pm 1.1、1.7 \pm 1.7、3.0 \pm 2.0、1.7 \pm 1.7 であった。一方、CG 投与野生型、T-bet 群、GATA-3 群、ROR γ t 群では、それぞれ 19.0 \pm 3.9、7.0 \pm 3.0、44.3 \pm 12.1、9.7 \pm 1.9 であった。CG 投与の GATA-3 群で増加が認められた。

(6) III 型コラーゲンの染色を 40 倍拡大率視野にて確認したところ、CG 非投与群は、野生型、T-bet 群、GATA-3 群、ROR γ t 群はそれぞれ 22.7 \pm 2.6 $\times 10^3 \mu$ m²、23.6 \pm 5.8 $\times 10^3 \mu$ m²、21.3 \pm 2.9 $\times 10^3 \mu$ m²、21.7 \pm 3.3 $\times 10^3 \mu$ m² であった。一方、CG 投与野生型、T-bet 群、GATA-3 群、ROR γ t 群では、それぞれ 106.7 \pm 26.5 $\times 10^3 \mu$ m²、47.1 \pm 12.9 $\times 10^3 \mu$ m²、117.8 \pm 14.3 $\times 10^3 \mu$ m²、62.0 \pm 16.4 $\times 10^3 \mu$ m² であった。CG 投与群の GATA-3 群がほかの群と比較し、高値を呈していた。

(7) 腹腔内サイトカインの評価：腹腔内のサイトカインを IL-4、IL-5、IL-13、IFN- γ について検討した。IL-4 および IL-5 については、有意差は認められなかった。IL-13 の検討では、CG 非投与群は、野生型、T-bet 群、GATA-3 群、ROR γ t 群はそれぞれ 1.3 \pm 0.8 pg/ml、0.7 \pm 0.5 pg/ml、1.0 \pm 1.1 pg/ml、0.8 \pm 0.7 pg/ml であった。一方、CG 投与野生型、T-bet 群、GATA-3 群、ROR γ t 群では、それぞれ 3.6 \pm 1.9 pg/ml、0.0 \pm 0.0 pg/ml、7.0 \pm 1.7 pg/ml、0.2 \pm 0.2 pg/ml を呈し、CG 投与 GATA-3 群において上昇が認められた。IFN- γ の結果では、CG 非投与群は、野生型、T-bet 群、GATA-3 群、ROR γ t 群はそれぞれ 0.3 \pm 0.2 pg/ml、2.9 \pm 0.5 pg/ml、0.8 \pm 0.5 pg/ml、1.2 \pm 0.2 pg/ml であった。一方、CG 投与野生型、T-bet 群、GATA-3 群、ROR γ t 群では、それぞれ 2.4 \pm 0.6 pg/ml、7.7 \pm 3.9 pg/ml、2.6 \pm 1.0 pg/ml、and 1.8 \pm 0.4 pg/ml と T-bet 群にて有意に上昇が認められた。

以上の結果より、GATA-3 Tg マウスは腹壁腹膜の肥厚、腹膜組織における α -SMA の発現、マクロファージの浸潤、III 型コラーゲンの発現がもっとも強く、T-bet Tg マウスがもっとも軽微であった。また、T-bet Tg の腹水を検討したところ、IFN- γ の高値を認めたため、IFN- γ が病態の改善に寄与していると考えられ、野生型マウスに CG とともに IFN- γ を投与した。

(8) IFN- γ 投与：生食のみ投与野生型、CG

投与野生型、CG および IFN- 両者投与野生型の腹膜肥厚はそれぞれ $18.9 \pm 1.4 \mu\text{m}$ 、 $126.5 \pm 5.7 \mu\text{m}$ 、 $74.3 \pm 4.9 \mu\text{m}$ を呈し、IFN- 投与による腹膜線維化の有意な緩和を確認することができた。

以上、本研究の結果から、実験的被嚢性腹膜硬化症の腹膜線維化の病態形成においては、Th2 細胞の関与が示唆された。一方、腹膜線維化の病態軽減には、Th1 細胞の役割が重要であることが明らかになった。本研究では、実験的被嚢性腹膜硬化症における病態形成における Th1 細胞、Th2 細胞の役割を明らかになったほか、Th1 細胞のサイトカインである IFN- 投与による病態改善の可能性も示した。

Th1 と Th2 サイトカインは線維化の過程においては、相反する役割を果たすことが報告されている (The Journal of Pathology、214、199、2008)。Th1 サイトカインである IFN- は線維化の抑制、Th2 サイトカインである IL-4、IL-13 は線維化の促進に關与する。本研究における腹腔内サイトカインの検討では、IFN- と IL-13 の有意な変動は確認できたが、IL-4 の有意な変動は認めなかった。IL-13 は肝臓線維化モデルにおいて線維化の促進に關与し、IL-13 阻害により線維化が軽減されることも報告されている (Journal of Immunology、164、2585、2000)。また、肺の線維化における IL-13 の役割が報告されている (The Journal of Clinical Investigation、103、779、1999)。しかし、腹膜硬化症における IL-13 の役割は不明であるため、本研究において、IL-13 の役割解明も試みた。IL-13 抗体を用いて、IFN- 投与と同様に、生食のみ投与野生型、CG 投与野生型、CG および IL-13 抗体両者投与野生型の腹膜肥厚の程度を検討したが、IL-13 抗体投与により病態が有意に改善することは確認できなかった (実験データ未提示)。IL-13 抗体投与においては、投与量の調整や時期などさらに検討する必要があると思われる。

また、本研究ではこれまで検討がなされていない腹膜線維化における Th17 細胞の役割も検討した。Th17 細胞のサイトカイン IL-17 はいくつかの疾患において線維化に関わることがすでに報告されているが、本研究ではその有意性を確認することはできなかった。これについては、今後さらに検討を追加する必要があると思われる。

腹膜透析における被嚢性腹膜硬化症の原因は多岐にわたるが、本研究にて用いたモデルでは、Th1 細胞および Th2 細胞の役割を明らかにすることができた。透析療法を受ける末期腎不全患者の免疫異常については、これまで多くの報告がなされおり、それに伴うサイトカイン産生が病態に關与していること

も考えられる。今後は、さらなる実験等により、これらの役割を明確にし、治療に寄与できるよう研究を進める必要があると考える。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

1. K. Yoh、 M. Ojima、 S. Takahashi. Th2-biased GATA-3 transgenic mice developed severe experimental peritoneal fibrosis compared with Th1-biased T-bet and Th17-biased ROR t transgenic mice. Experimental Animals、 64(4)、 353-362、 2015(査読あり)

DOI: 10.1538/expanim.15-0019

6. 研究組織

(1) 研究代表者

楊 景堯 (YOH KEIGYOU)

筑波大学医学医療系・研究員

研究者番号: 90323302