

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591240

研究課題名(和文) 腹膜線維症の再生治療における中皮細胞移植療法の確立

研究課題名(英文) Establishment of mesothelial transplantation therapy in peritoneal fibrosis

研究代表者

関口 嘉 (Sekiguchi, Yoshimi)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：50599892

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)：クロールヘキシジンによる腹膜線維化ラットを作成し、このラットに通常腹膜組織の修復に中心的な役割を果たす中皮細胞を外部から腹腔内に移植する事で組織再生が促される事を確認する検討を行った。しかしながら、中皮細胞移植によってむしろ組織線維化が悪化し、組織の修復が遅延する結果であった。中皮細胞移植による再生阻害機序を検討した結果、移植された中皮細胞自体が傷害腹膜組織に存在する炎症性サイトカインや各種成長因子によってRAS/MAPK系が刺激されることで、形質転換を起こし線維芽細胞様の形質となり自らさらに炎症性サイトカインや線維化促進因子を合成分泌することで腹膜組織障害を悪化させることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We hypothesized that intra-peritoneal injected mesothelial cells which usually played a central role in the restoration of the peritoneum tissue may accelerate peritoneal repair in chlorhexidine-induced peritoneal fibrosis rats. However, mesothelial transplantation aggravated peritoneal fibrosis and delayed the restoration of tissue.

According to the results, we analyzed serial morphological changes of peritoneum and transplanted mesothelial cells and expression of inflammatory cytokines and growth factors in peritoneum. Transplanted mesothelial cells transformed to fibroblastic cells stimulated by inflammatory cytokines and various growth factors in injured peritoneal tissue through activation of RAS/MAPK system. And then they secreted by oneself more inflammatory cytokines and fibrosis promoting factors and aggravated peritoneal fibrosis.

研究分野：透析療法

キーワード：腹膜透析 細胞移植 組織再生 中皮細胞 腹膜線維化

1. 研究開始当初の背景

(1) 長期の腹膜透析(PD)患者では持続的な腹膜透析液への曝露や細菌感染のために、腹膜中皮細胞の脱落、中皮細胞下間質の線維性肥厚と血管病変などの組織学的変化をきたし、腹膜硬化症を呈する。腹膜硬化症が進展し被嚢性腹膜硬化症(EPS)を呈すると致死率が高く、PDの継続が困難となる。

(2) 単層構造からなる腹膜中皮細胞は、腹膜の解剖学的な防御壁であると同時に腹膜透過性を制御する生理学的な主要構造である。PD 施行時には、非生理的な組成をもつ腹膜透析液への直接曝露により中皮細胞の脱落と再生が持続的に生じており、腹膜中皮細胞の移植は腹膜劣化の予防に効果的と考えられている。

(3) 一方、炎症や TGF- $\beta$  の刺激によって、中皮細胞が間葉系様細胞に形態変化し組織の線維化が進行する可能性も示唆されている。

以上の事から、我々は以下の仮説を立て研究を行うこととした。

中皮細胞移植の目的は、Hepatocyte growth factor (HGF)などの成長因子を分泌する中皮細胞の機能によって傷害腹膜を再生することを目的とする。

移植中皮細胞は、再生腹膜組織の表層に必ずしも存在しなくても成長因子やサイトカイン等の分泌機能を有する。

移植中皮細胞は、炎症環境下において傷害腹膜の悪化を助長する。

移植中皮細胞の炎症環境下での悪影響の機序としては、以下の2点が推察される。

(ア) 移植細胞自身が transforming growth factor- $\beta$ (TGF- $\beta$ ) や vascular endothelial growth factor(VEGF)などを分泌する。

(イ) 移植細胞が分化・増殖して線維芽細胞となり、傷害腹膜の悪化を助長する。

移植中皮細胞の形質転換を抑制するとが、中皮細胞移植の効果を向上する方法である。

2. 研究の目的

中皮細胞移植による傷害腹膜再生効果の評価とその効率の向上を図ることを目的とする。

移植細胞の傷害腹膜組織再生への効果

移植環境下での移植中皮細胞の生着状態の評価

移植後腹膜の継時的炎症性サイトカインならびに成長因子発現状態の評価

3. 研究の方法

腹膜線維症ラットの腹腔内に腹膜中皮細胞を投与し、障害腹膜を再生する治療法を確立する。

【研究期間の検討事項】

1) 新たな腹膜線維症モデルラットの作製

2) 腹膜中皮細胞の腹腔内投与の効果と腹腔(腹膜)環境との関連性の検討

移植時期

中皮細胞移植による傷害腹膜の再生機序への影響機序の検証

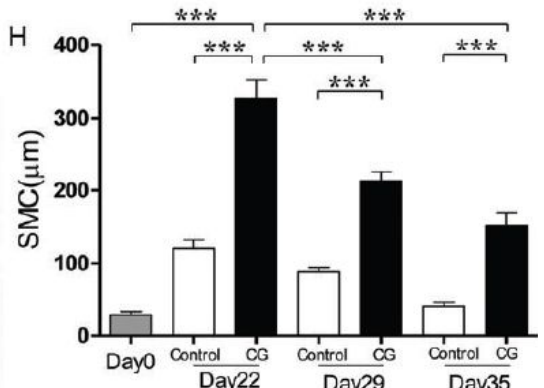
a. 血管網構築効果、

b. 間質の量・質的变化(間質肥厚の軽減、構成コラーゲン・マトリックスの変化)

3) 組織再生を促す中皮細胞の体外増殖法の確立

4. 研究成果

1) ヒトの維持腹膜透析患者の腹膜傷害に近似した腹膜傷害モデルとして、持続シリンジポンプ(Alzet pumps)を用いて、クロールヘキシジンを持続的に腹腔内投与し腹膜線維化モデルラットを作製し、組織変化(間質(SMC)の厚み)を病理学的に評価し、腹膜線維化モデルとして有用であることを確認した。

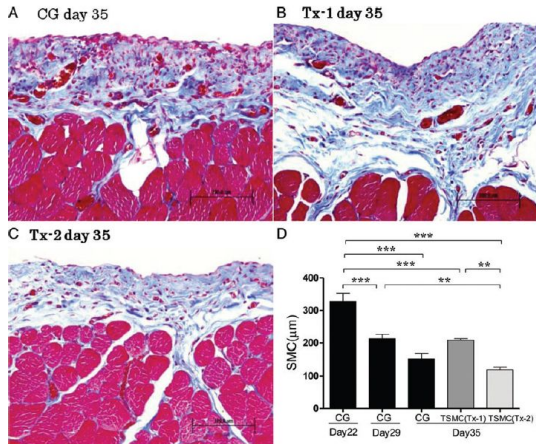


2) 腹膜線維化ラットの腹腔内に温度感受性SV40 T抗原トランスジェニックラット由来中皮細胞(非増殖中皮細胞)をクロールヘキシジン刺激終了からの時期を変えて移植し、傷害腹膜の移植後の組織学的変化を非移植群と比較検討した。

クロールヘキシジン刺激直後に中皮細胞を移植した群(TX-1)と非移植群の組織を35日目



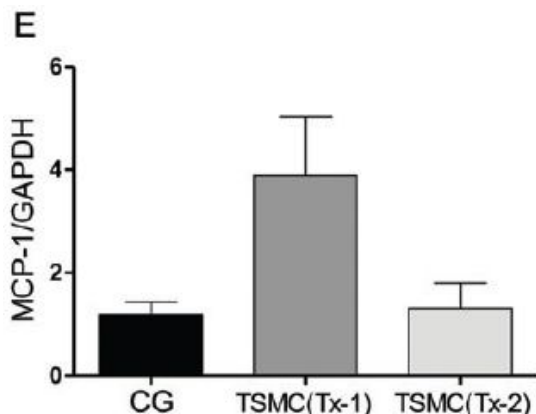
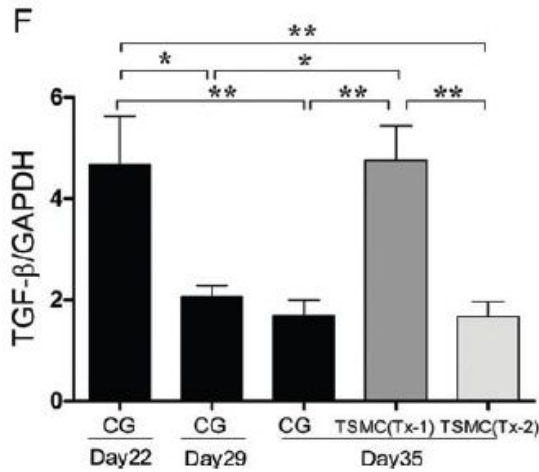
目に比較したところ、中皮細胞を移植した群の腹膜組織は肥厚し強い細胞浸潤を認めた。クロールヘキシジンの刺激後1週間たった時点で中皮細胞を移植した群(TX-2)での35日目の腹膜は、非移植群と同程度の肥厚であ



り、中皮細胞移植の効果を得られず、むしろ炎症の強い状態で中皮細胞を移植することは組織再生を遅延させる可能性が示唆された。

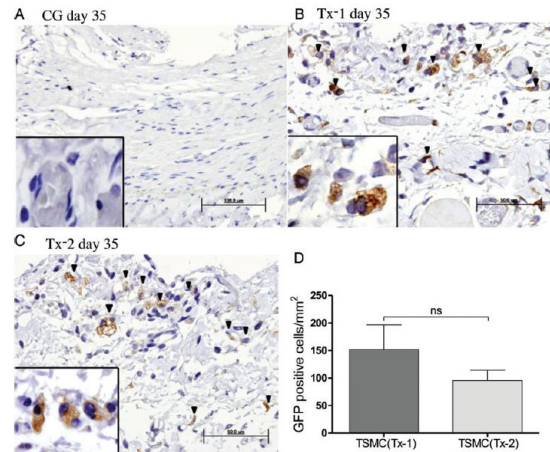
2) 中皮細胞移植による傷害腹膜の再生機転への影響機序の検証として、組織内の炎症性サイトカイン並びに各種成長因子の発現を確認したところ、クロールヘキシジン刺激中止直後と同程度の強い TGF- $\beta$  の発現が、Tx-1 群で確認され、さらに炎症細胞も強く誘導されており、組織内の炎症と線維化が移植細胞によって惹起されていることが明らかとなった。25 日目の移植細胞を確認したところ、Tx-1 でより多くの移植細胞が生存していた。

組織内の間葉系細胞を vimentin で染色したところ、Tx-1 群が Tx-2 群や非移植群に比較

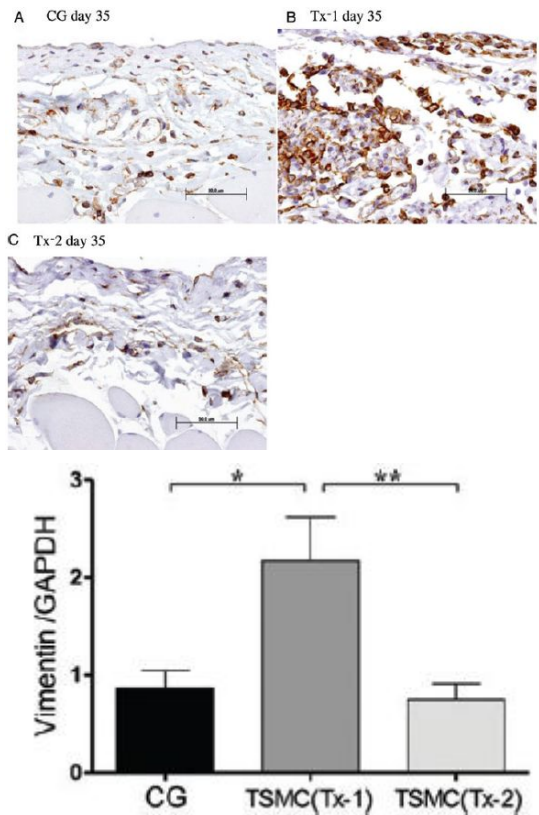


にして明らかに強く陽性を示す細胞が多数確認された。

本来移植した中皮細胞は形質転換によって vimentin 陽性となることから移植中皮細胞に惹起された間葉系細胞の形質転換が示唆されたため、その機序として Ras/MAPK 系の



関与を検討した。この結果、Tx-1 群で形質転換をしめす snail の発現が亢進しており、さらに Ras/MAPK 系の B-raf ならびに ERK-1 の

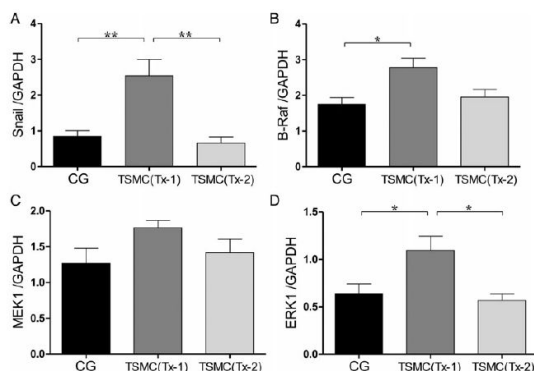


発現が亢進していた。

これらの事から、移植中皮細胞は炎症下組織においては自らが形質転換して、炎症性サイトカインならびに線維化関連因子を合成分泌することで炎症をさらに増悪させ、組織の修復を遅延させる可能性が確認された。

3) これらの結果を踏まえ、形質転換を抑制した状態での中皮細胞移植法の確立が必要であることから、今後同教室で行い有効性が確認された脂肪幹細胞移植との比較検討から、中皮細胞の形質転換抑制法の確立を目的

とする研究を引き続き行うこととした。



## 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1件)

Sekiguchi Y, Hamada C, Ro Y, Nakamoto H, Inaba M, Shimaoka T, Io H, Koyanagi I, Aruga S, Inuma J, Kaneko K, Hotta Y, Margetts PJ, Mochizuki H, Horikoshi S, Tomino Y. Differentiation of bone marrow-derived cells into regenerated mesothelial cells in peritoneal remodeling using a peritoneal fibrosis mouse model. J Artif Organs. 査読有、2012 Sep;15(3):272-82. doi: 10.1007/s10047-012-0648-2

Reo Kanda, Chieko Hamada, Kayo Kaneko, Takanori Nakano, Keiichi Wakabayashi, Kazuaki Hara, Hiroaki Io, Satoshi Horikoshi and Yasuhiko Tomino. Paracrine effects of transplanted mesothelial cells isolated from temperature-sensitive SV40 large T-antigen gene transgenic rats during peritoneal repair, Nephrol Dial Transplant. 査読有、(2014) 29: 289-300, doi: 10.1093/ndt/gft397

[学会発表](計5件)

神田怜生、濱田千江子. 中皮細胞移植による腹膜線維症おn再生治療の確立 移植中皮細胞のパラクライン効果の検証 2012年6月1日~6月3日、日本腎臓学会、日本、東京

神田怜生、濱田千江子. 中皮細胞移植による腹膜線維症の再生治療の確立、2012年6月22日~6月24日日本透析学会総会、札幌、北海道

神田怜生、濱田千江子. 中皮細胞移植による腹膜線維症の再生治療の確立 移植中皮細胞のパラクライン効果 .2012年9月22日~9月23日、日本腹膜透析医学会、徳島、徳島

神田怜生、濱田千江子. Effect of Transplanted mesothelial cells during

peritoneal repair using temperature-sensitive SV40 large T antigen gene transgenic rat mesothelial cells. 欧州透析移植学会.2012年5月24日~5月27日、パリ、フランス

Reo Kanda, Chieko Hamada : Effect of Transplanted mesothelial cells during peritoneal repair using temperature-sensitive SV40 large T antigen gene transgenic rat mesothelial cells. 2013年5月18日~5月21日、欧州透析移植学会、トルコ、イスタンブール

Reo Kanda, Chieko Hamada. Effect of Transplanted mesothelial cells during peritoneal repair using temperature-sensitive SV40 large T antigen gene transgenic rat mesothelial cells.2013年5月31日~6月4日.国際腎臓学会.香港、中国

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

関口 嘉 (SEKIGUCHI, Yoshimi)  
順天堂大学・医学部・助教  
研究者番号：24591240

(2)研究分担者

濱田 千江子 (HAMADA, Chieko)  
順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号： 50291662

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：