

平成30年6月20日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19457

研究課題名(和文) マウス腹膜線維症モデルにおける、合成レチノイドAm80の線維化抑制効果

研究課題名(英文) Synthetic retinoid Am80, an inhibitor of Kruppel-like factor 5 suppresses the progression of peritoneal fibrosis in a mouse experimental model

研究代表者

牟田 久美子 (MUTA, Kumiko)

長崎大学・病院(医学系)・助教

研究者番号：10728546

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：Kruppel-like factor 5 (KLF5)は細胞増殖や血管新生を調節する転写因子である。合成レチノイン酸の特異的アゴニストであるAm80はKLF5の発現を抑制する。今回我々はマウス腹膜線維症モデルでのKLF5の発現を調べ、Am80投与による腹膜線維化抑制効果について検討した。chlorhexidine gluconate (CG)の腹腔内投与により腹膜線維症モデルマウスを作成し、CG開始と同時にAm80の経口投与を連日行った。研究の結果、腹膜線維症モデルにおけるKLF5の関与が示唆され、Am80はKLF5の発現抑制を介して腹膜線維化の抑制に有用な可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Kruppel-like transcription factor 5 (KLF5) is a transcription factor regulating biochemical process of cell proliferation, angiogenesis and differentiation. It has been recently reported that Am80, a synthetic retinoic acid receptor specific agonist, inhibits the expression of KLF5. In the present study, we examined the expression of KLF5 in fibrotic peritoneum induced by chlorhexidine gluconate in mouse, and evaluated that Am80, an inhibitor of KLF5, can reduce peritoneal fibrosis.

Our results indicate the involvement of KLF5 in the progression of experimental peritoneal fibrosis and suggest that Am80 may be a potentially useful for the prevention of peritoneal fibrosis through inhibition of KLF5 expression.

研究分野：腎臓内科

キーワード：腹膜透析 Kruppel-like factor 5 Am80

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 腹膜透析 (PD) は腹膜に形態学的、機能的な変化を引き起こす<sup>1</sup>。長期 PD 患者の腹膜の組織学的変化は著明な腹膜線維化と collagen の蓄積を特徴とする<sup>2,3</sup>。特に一部の患者では最も重篤な合併症のひとつである致死率の高い被嚢性腹膜硬化症 (EPS) を発症することがある<sup>4</sup>。PD 患者の腹膜線維化の機序についてはまだ解明されておらず、有効な治療法はない。

(2) Krüppel-like factor 5 (KLF5) は Krüppel 型の転写因子であり、細胞増殖や細胞周期の制御に関与している<sup>5-7</sup>。病的状態においては障害血管、動脈硬化病変の活性化された平滑筋細胞や線維芽細胞に発現していることが報告されており、心血管系のリモデリングへの関与が示唆されている<sup>8</sup>。また、KLF5 が線維芽細胞の増殖や活性化を介して組織の線維化に関与していることが *in vivo*、*in vitro* の実験で報告されている<sup>9-11</sup>。

(3) 一方、Am80 は近年新規に合成された合成レチノイドで、前骨髄球性白血病の治療薬として認可されている薬剤である。この Am80 が前述の KLF5 の発現と転写活性を阻害し、インヒビターとして働くことが知られている<sup>11,12</sup>。

## 2. 研究の目的

今回我々はクロルヘキシジン (CG) 誘発腹膜線維症モデルにおいて KLF5 の発現およびそのインヒビターである Am80 の抗線維化効果を検討した。

## 3. 研究の方法

ICR マウスに 0.1%CG を週 3 回腹腔内投与し腹膜線維症モデルを作成した。CG 投与開始時より Am80 1mg/kg を毎日経口投与し、コントロール群には溶媒であるメチルセルロースのみを同様に投与した。3 週間後屠殺を行い、腹膜組織を採取して KLF5 や

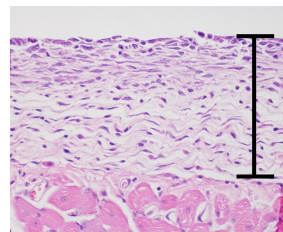
collagen III、TGF- $\beta$ 、筋線維芽細胞マーカーである  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA)、コラーゲン産生に必要な分子シャペロンである heat shock protein 47 (HSP47) など線維化に関与する因子の発現を、免疫組織化学を用いて比較検討した。また屠殺前に簡易の腹膜平衡試験を行い、腹膜機能透過性を検討した。方法は、8ml の透析液を腹腔内に投与し、1 時間後に透析液を回収した。回収した液量を測定した。同時に心臓穿刺による採血を行った。回収した透析液と血清のクレアチニン (Cr) 値を測定した。

## 4. 研究成果

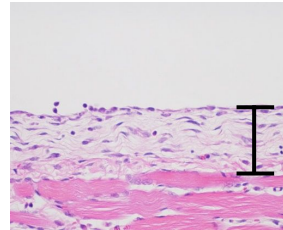
### 【結果】

(1) 正常マウスの腹膜組織では KLF5 の発現を認めなかった。CG 投与群では肥厚した腹膜中皮下組織で KLF5 の発現が亢進した。Am80 投与により、KLF5 の発現が減少し、腹膜肥厚や Collagen III 陽性面積が CG 投与群と比べて有意に抑制された。

Hematoxylin Eosin 染色：

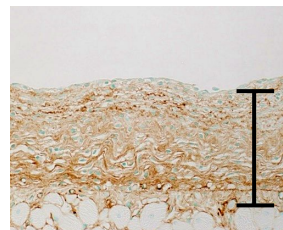


CG 投与群



Am80 投与群

免疫組織化学 (Collagen III)：

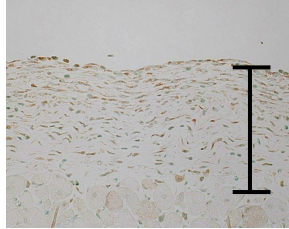


CG 投与群



Am80 投与群

免疫組織化学 (KLF5) :



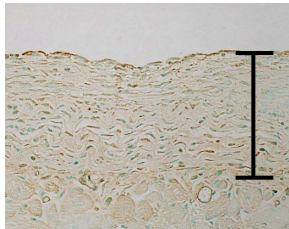
CG 投与群



Am80 投与群

(2) TGF- $\beta$  陽性細胞数、 $\alpha$ -SMA 陽性細胞数、HSP47 陽性細胞数は、CG 投与群と比較して Am80 投与群で有意に減少した。HSP47 は腹膜中皮細胞や紡錘形の線維芽細胞と推測される細胞で陽性だった。

免疫組織化学 (TGF- $\beta$ ) :



CG 投与群



Am80 投与群

免疫組織化学 ( $\alpha$ -SMA) :



CG 投与群



Am80 投与群

免疫組織化学 (HSP47) :



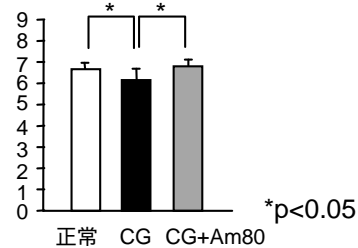
CG 投与群



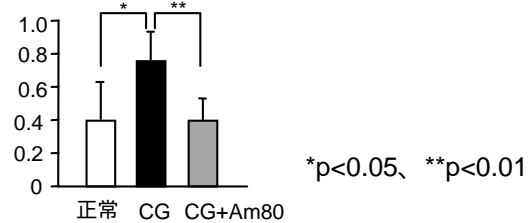
Am80 投与群

(3) 腹膜平衡試験では、正常マウスに比べ CG 投与群では排液量は減少し、排液・血清 Cr 比の有意な上昇を認め、腹膜透過性の亢進が示唆された。Am80 投与群では排液量、排液・血清 Cr 比共に正常マウスと差を認めなかった。

透析液排液量 :



透析量/血清 Cr :



(4) 以上の結果をまとめると、

CG 誘発腹膜線維症モデルにおいて線維化腹膜組織に KLF5 の発現を認めた。

合成レチノイド Am80 の投与により、有意

に腹膜線維化を抑制することができた。

Am80 投与群では、線維化腹膜における KLF5 の発現抑制とともに、TGF- $\beta$ 、 $\alpha$ -SMA、HSP47 陽性細胞数の減少を認めた。

CG モデルマウスでは腹膜透過性の亢進を認めしたが、Am80 投与群では認めなかった。

#### 【考察】

本研究の結果は、KLF5 が腹膜線維化進行に重要な役割を果たすことを示唆している。

これまでの報告で KLF5 は血管平滑筋細胞の表現型の調節に関わる転写因子であり、その発現は血管リモデリングや動脈硬化で増加し、平滑筋細胞が増殖、遊走して細胞外基質産生亢進へ導くとされる<sup>10,13,14</sup>。我々は Am80 による KLF5 の抑制が、腹膜の筋線維芽細胞とみなされる $\alpha$ -SMA 陽性細胞を有意に減少させることを示した。線維化した腹膜組織には活性化した線維芽細胞や筋線維芽細胞が存在し、細胞外基質を産生することが知られている<sup>15</sup>。腹膜の線維芽細胞での KLF5 の発現が筋線維芽細胞への分化を促し、collagen III のような細胞外基質産生亢進による腹膜線維化に寄与しているのかもしれない。

TGF- $\beta$ は細胞外基質の産生を促し、臨床的な疾患での線維化の中心的なメディエーターとされる<sup>16</sup>。線維化した腹膜組織では TGF- $\beta$ は線維芽細胞や中皮細胞、マクロファージで発現する<sup>17</sup>。今回の研究で、TGF- $\beta$ は CG 投与群の肥厚した腹膜組織に豊富に発現し、Am80 による KLF5 の抑制を介して TGF- $\beta$  の発現は減少した。KLF-5 は TGF- $\beta$ 遺伝子転写を調節するため、KLF5 が TGF- $\beta$ 発現促進によって腹膜線維化に関与していることが示唆された。線維芽細胞の活性化が Am80 による KLF5 の抑制を介して抑えられているのは、TGF- $\beta$ 抑制により腹膜の線維化は軽減され、腹膜透過性は保たれると想定している。

今回の研究では CG の腹腔内投与により腹膜線維化を惹起した。CG による腹膜線維化

は、長期の PD 患者で観察される腹膜硬化と同様ではない<sup>18</sup>。EPS の機序は完全には解明されていないためモデルを作成することは難しい。ただ我々の CG による腹膜線維化モデルは、TGF- $\beta$ や Collagen III、HSP47、 $\alpha$ -SMA の発現増加という、ヒトの腹膜硬化でも重要な病理学的特徴を示す。よって、マウスで認める病理学的特徴はヒトにおいても価値のあるものと考えられる。腹膜平衡試験でみられた CG による腹膜線維化モデルでの透過性亢進は、長期 PD 患者でよくみられる特徴である。

今回の研究結果より、腹膜線維症モデルにおける KLF5 の関与が示唆された。Am80 は KLF5 の発現抑制を介して腹膜線維化の抑制に有用な可能性がある。

#### <引用文献>

1. Afthentopoulos IE, Passadakis P, Oreopoulos DG, Bargman J. Sclerosing peritonitis in continuous ambulatory peritoneal dialysis patients: one center's experience and review of the literature. *Adv Ren Replace Ther. United States*1998;157-67.
2. Gandhi VC, Humayun HM, Ing TS, et al. Sclerotic thickening of the peritoneal membrane in maintenance peritoneal dialysis patients. *Arch Intern Med* 1980;140:1201-3.
3. Williams JD, Craig KJ, Topley N, et al. Morphologic changes in the peritoneal membrane of patients with renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:470-9.
4. Coles GA, Topley N. Long-term peritoneal membrane changes. *Adv Ren Replace Ther* 2000;7:289-301.
5. Bieker JJ. Kruppel-like factors: three fingers in many pies. *J Biol Chem* 2001;276:34355-8.
6. Dang DT, Pevsner J, Yang VW. The biology of the mammalian Kruppel-like

family of transcription factors. *Int J Biochem Cell Biol* 2000;32:1103-21.

7. Black AR, Black JD, Azizkhan-Clifford J. Sp1 and kruppel-like factor family of transcription factors in cell growth regulation and cancer. *J Cell Physiol* 2001;188:143-60.

8. Nagai R, Shindo T, Manabe I, Suzuki T, Kurabayashi M. KLF5/BTEB2, a Kruppel-like zinc-finger type transcription factor, mediates both smooth muscle cell activation and cardiac hypertrophy. *Adv Exp Med Biol* 2003;538:57-65; discussion 6.

9. Watanabe N, Kurabayashi M, Shimomura Y, et al. BTEB2, a Kruppel-like transcription factor, regulates expression of the SMemb/Nonmuscle myosin heavy chain B (SMemb/NMHC-B) gene. *Circ Res* 1999;85:182-91.

10. Hoshino Y, Kurabayashi M, Kanda T, et al. Regulated expression of the BTEB2 transcription factor in vascular smooth muscle cells: analysis of developmental and pathological expression profiles shows implications as a predictive factor for restenosis. *Circulation* 2000;102:2528-34.

11. Shindo T, Manabe I, Fukushima Y, et al. Kruppel-like zinc-finger transcription factor KLF5/BTEB2 is a target for angiotensin II signaling and an essential regulator of cardiovascular remodeling. *Nat Med* 2002;8:856-63.

12. Fujiu K, Manabe I, Ishihara A, et al. Synthetic retinoid Am80 suppresses smooth muscle phenotypic modulation and in-stent neointima formation by inhibiting KLF5. *Circ Res* 2005;97:1132-41.

13. Sun R, Chen X, Yang VW. Intestinal-enriched Kruppel-like factor (Kruppel-like factor 5) is a positive

regulator of cellular proliferation. *J Biol Chem* 2001;276:6897-900.

14. Manabe I, Nagai R. Regulation of smooth muscle phenotype. *Curr Atheroscler Rep* 2003;5:214-22.

15. Io K, Nishino T, Obata Y, Kitamura M, Koji T, Kohno S. SAHA Suppresses Peritoneal Fibrosis in Mice. *Perit Dial Int* 2015;35:246-58.

16. Pohlert D, Brenmoehl J, Löffler I, et al. TGF-beta and fibrosis in different organs - molecular pathway imprints. *Biochim Biophys Acta* 2009;1792:746-56.

17. Nishino T, Miyazaki M, Abe K, et al. Antisense oligonucleotides against collagen-binding stress protein HSP47 suppress peritoneal fibrosis in rats. *Kidney Int* 2003;64:887-96.

18. Park SH, Kim YL, Lindholm B. Experimental encapsulating peritoneal sclerosis models: pathogenesis and treatment. *Perit Dial Int* 2008;28 Suppl 5:S21-8.

## 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 0 件 )

[ 学会発表 ] ( 計 1 件 )

第 47 回日本臨床分子形態学会 2015/9/18  
牟田久美子 ; マウス腹膜線維症モデルにおける、Kruppel-like factor 5 (KLF5) 阻害剤の合成レチノイド Am80 による線維化抑制効果、長崎県長崎市

[ 図書 ] ( 計 0 件 )

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

牟田 久美子 (MUTA, Kumiko)

長崎大学・病院 (医学系)・助教

研究者番号：10728546

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし

### (4)研究協力者

なし