

令和元年5月30日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16080

研究課題名(和文) 腹膜線維化と尿毒症腎 腹膜連関におけるCTGFの役割の検討

研究課題名(英文) The role of CTGF in peritoneal fibrosis and renal-peritoneal interactions

研究代表者

戸田 尚宏 (Toda, Naohiro)

京都大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：30760615

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)：腹膜透析の合併症である腹膜線維化を軽減するために、CTGFに着目した。CTGFは病的な状態で他の増殖因子の機能を調節し、細胞外基質増加や炎症を惹起する。我々は薬剤誘導性CTGFノックアウトマウス(Rosa-CTGF cKO)を作製し、腹膜線維化におけるCTGF抑制の検討を行った。腹膜線維化を惹起すると、腹膜肥厚に加え腹膜でのCTGF発現が亢進し、Rosa-CTGF cKOでは腹膜肥厚が改善し、腹膜における線維芽細胞の増殖が軽減していた。腹膜線維化で亢進した腹膜透過性がRosa-CTGF cKOでは軽減していた。腹膜線維化においてCTGF抑制は治療効果があることが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腹膜透析は在宅で生活できるなどの多くの利点を有するが、腹膜線維化によって治療中止を余儀なくされることがある。腹膜線維化は腹膜透析における最も重要な合併症である。CTGFの抑制は腹膜線維化を軽減するだけでなく、腹膜機能の改善も示した。抗CTGF中和抗体は肺線維症などの分野ですでに臨床試験が行われており、他の論文ではこの中和抗体で腹膜線維化が軽減することが示されている。腹膜透析におけるCTGF抑制は臨床応用につながりうると考える。

研究成果の概要(英文)：Connective tissue growth factor (CTGF) regulates the signalling of other growth factors and promotes fibrosis. CTGF is shown to be an aggravating factor in thickening peritoneum. To study the role of CTGF in peritoneal fibrosis of adult mice, we generated CTGF conditional knockout (cKO) mice. We induced peritoneal fibrosis in wild-type and Rosa-CTGF cKO mice.

Induction of peritoneal fibrosis in wild-type mice increased CTGF expression and produced severe thickening of the peritoneum. In contrast, CG-treated Rosa-CTGF cKO mice exhibited reduced thickening of the peritoneum. Peritoneal equilibration test revealed that the excessive peritoneal permeability by CG treatment was normalized by CTGF deletion. CG-treated Rosa-CTGF cKO mice exhibited a reduced number of SMA- and Ki67-positive cells in the peritoneum. These results indicate that a deficiency of CTGF can reduce peritoneal thickening and help to maintain peritoneal function.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：CTGF 腹膜透析 腹膜機能

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Connective tissue growth factor (CTGF)は病的な状態において TGF- β など他の増殖因子の機能を調節し、細胞外基質増加作用や炎症を惹起するなど様々な機能を有する増殖因子である。申請者の研究室では腎疾患における CTGF の意義について研究を行い、タモキシフェン誘導性に全身的に CTGF を欠損させることが可能な、薬剤誘導性 CTGF ノックアウトマウスを作製し抗糸球体基底膜腎炎において蛋白尿が軽減し、炎症細胞浸潤が軽減することを確認してきた。

長期間の腹膜透析では腹膜の線維化が生じ、除水不全や腹膜肥厚や癒着、最終的にはイレウス症状などを呈するようになる。CTGF は腹膜線維症・硬化症発症にも関与する可能性が想定されているが、腹膜線維症や腹膜機能低下に対する CTGF 抑制の意義は未だ明らかになっていない。更には腎不全患者では血中の CTGF が増加することや、血中の CTGF が他の臓器の線維化を促すこと、透析導入前の尿毒症が腹膜に線維化や炎症を来すことが知られており、CTGF を介した腎臓と腹膜の臓器関連が示唆される。

2. 研究の目的

本研究では、成体において CTGF 抑制が腹膜線維化や腹膜機能に与える影響を検討することを目的としている。薬剤誘導性 CTGF ノックアウトマウスに腹膜線維症を惹起して検討を行う。腹膜線維化において重要な役割を担うとされる、腹膜中皮細胞・線維芽細胞の CTGF を抑制して線維化の刺激に対する反応を培養実験においてその機序の解明を行う。また、ヒトの腹膜検体において透析導入前、透析離脱時の CTGF の発現について検討を行う。研究代表者は透析導入前の尿毒症に伴う腹膜の変化に着目しており、CTGF が関与するかの検討を行う。

3. 研究の方法

1) 全身性薬剤誘導性 CTGF ノックアウトマウス(Rosa-CTGF cKO)を用いた腹膜線維症における CTGF の意義

著者らが作製した CTGF floxed マウスと RosaCreERT2 マウスを交配し、3,6 週齢でタモキシフェンを経口投与して Rosa-CTGF cKO マウスを作製する。7 週齢の Rosa-CTGF cKO マウスにクロルヘキシジンを週 3 回 4 週間腹腔内投与を行い腹膜線維症を惹起する。腹膜における CTGF 発現に加え、炎症・線維化・血管新生を検討する。また、腹膜平衡機能検査(PET)を行い、腹膜機能の検討も行う。

(2) In vitro での腹膜中皮細胞、線維芽細胞の CTGF が腹膜線維化に与える影響の検討

培養中皮細胞や線維芽細胞を用いて、CTGF の siRNA をトランスフェクションし CTGF を抑制し、線維化刺激を行い検討を行う。また、Rosa-CTGF cKO マウスから腹膜中皮細胞、線維芽細胞のプライマリーカルチャーを作成し、高糖刺激時の性質の変化についてコントロールマウスからのプライマリーカルチャーと比べて検討を行い、腹膜障害における分子メカニズムの検討を行う。

(3) Rosa-CTGF cKO にアデニン腎症を惹起し、腎不全にモデルにおける腹膜変化に対する CTGF の意義の検討。

Rosa-CTGF cKO マウスにアデニン腎症を惹起し、腎不全モデルにおける CTGF の意義の検討を行う。更には、透析開始前の尿毒症が有意となる腹膜変化に、腎不全で増加する CTGF が関与するか、透析開始前の CTGF 抑制が腹膜や血管など他臓器の治療に繋がるかの検討を行う。

4. 研究成果

(1) 全身性薬剤誘導性 CTGF ノックアウトマウス(Rosa-CTGF cKO)を用いた腹膜線維症における CTGF の意義

初めに、野生型のマウスにクロルヘキシジンを投与し腹膜線維化を惹起し、その週数ごとの CTGF 発現の変化を検討したところ、週数を経るにつれて CTGF 発現が亢進することを確認した。

クロルヘキシジンを用いて腹膜線維化を惹起すると、コントロールマウスでは腹膜肥厚が生じた。また、肥厚した腹膜においては CTGF 発現の増加を認めた。Rosa-CTGF cKO マウスでは腹膜線維化モデルにおいて CTGF の mRNA 発現が約 95%減少し、腹膜肥厚も有意な改善を認めた。腹膜における CTGF 陽性細胞の多くは S100A4 陽性の線維芽細胞で有り、Rosa-CTGF cKO マウスではその S100A4、CTGF 陽性細胞の減少を認めた。同様に腹膜線維化で増加した α SMA 陽性細胞、Ki67 陽性細胞が、Rosa-CTGF cKO マウスでは有意に減少していた。更には CD31 陽性の新生血管の増加、VEGF 陽性細胞、Mac2 陽性細胞の増加も Rosa-CTGF cKO では軽快していた。以上のことから、腹膜線維化における CTGF 抑制は線維化のみならず、炎症細胞集簇・血管新生も軽減していることがわかった。

次いで腹膜機能を腹膜平衡機能検査を行い検討したところ、腹膜線維化を惹起すると腹膜透

過性亢進を示唆する D/P Urea の上昇、D/D0 glu の低下を認めるが、Rosa-CTGF cKO マウスではこの変化が有意に軽快していた。

腹膜線維症において CTGF を抑制することで、腹膜の肥厚を軽減するだけでなく、その機能も保持できることをノックアウトマウスを用いて示した。

(2) In vitro での腹膜中皮細胞、線維芽細胞の CTGF が腹膜線維化に与える影響の検討

培養中皮細胞である Met5A や線維芽細胞である NIH3T3 の CTGF を siRNA を用いて、CTGF を抑制し、TGFβ刺激を行い線維化マーカーや血管新生マーカーの変化を検討した。TGFβ刺激を行う各種マーカーは増加したが、CTGF を抑制してもその増加は改善されなかった。

(3) ヒト腹膜組織における CTGF 発現の検討

腹膜透析導入時、離脱時の腹膜組織を採取し、その CTGF 発現の検討を行った。尿毒症状態である導入時の腹膜において CTGF は中皮細胞にわずかに認めるのみであったが、離脱時の腹膜組織においては中皮化組織で CTGF 陽性の細胞が増加していた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

1. Erina Ono, Eiichiro Uchino, Keita P. Mori, Hideki Yokoi, Naohiro Toda, Kenichi Koga, Masato Kasahara, Takeshi Matsubara, Motoko Yanagita. Peritonitis due to Mycobacterium abscessus in peritoneal dialysis patients: Case presentation and minireview. *Renal Replacement Therapy* 2018 4:52, Published on: 10 December 2018
2. Toda N, Mukoyama M, Yanagita M, Yokoi H. CTGF in kidney fibrosis and glomerulonephritis. *Inflamm Regen*. 2018 Aug 6;38:14. doi: 10.1186/s41232-018-0070-0. eCollection 2018.
3. Arai H, Toda N, Kamimatsuse R, Nishioka K, Endo S, Akiyama S, Maruyama S, Matsubara T, Yokoi H, Yanagita M. A Refractory Case of Secondary Membranous Nephropathy Concurrent with IgG4-related Tubulointerstitial Nephritis. *Intern Med*. 2018 Oct 1;57(19):2873-2877.
4. Toda N, Mori K, Kasahara M, Koga K, Ishii A, Mori KP, Osaki K, Mukoyama M, Yanagita M, Yokoi H. Deletion of connective tissue growth factor ameliorates peritoneal fibrosis by inhibiting angiogenesis and inflammation. *Nephrol Dial Transplant*. 2018 Jun 1;33(6):943-953.
5. Kato Y, Mori K, Kasahara M, Osaki K, Ishii A, Mori KP, Toda N, Ohno S, Kuwabara T, Tokudome T, Kishimoto I, Saleem MA, Matsusaka T, Nakao K, Mukoyama M, Yanagita M, Yokoi H. Natriuretic peptide receptor guanylyl cyclase-A pathway counteracts glomerular injury evoked by aldosterone through p38 mitogen-activated protein kinase inhibition. *Sci Rep*. 2017 Apr 21;7:46624.
6. Toda N, Mori K, Kasahara M, Ishii A, Koga K, Ohno S, Mori KP, Kato Y, Osaki K, Kuwabara T, Kojima K, Taura D, Sone M, Matsusaka T, Nakao K, Mukoyama M, Yanagita M, Yokoi H. Crucial Role of Mesangial Cell-derived Connective Tissue Growth Factor in a Mouse Model of Anti-Glomerular Basement Membrane Glomerulonephritis. *Sci Rep*. 2017 Feb 13;7:42114.
7. Toda N, Yokoi H, Mori K, Mukoyama M. Production and Analysis of Conditional KO Mice of CCN2 in Kidney. *Methods Mol Biol*. 2017;1489:377-390.

8. Mori KP, Yokoi H, Kasahara M, Imamaki H, Ishii A, Kuwabara T, Koga K, Kato Y, Toda N, Ohno S, Kuwahara K, Endo T, Nakao K, Yanagita M, Mukoyama M, Mori K. Increase of Total Nephron Albumin Filtration and Reabsorption in Diabetic Nephropathy. J Am Soc Nephrol. 2017 Jan;28(1):278-289.

〔学会発表〕(計 3件)

Toda N, Kasahara M, Mori K, Ishii A, Mukoyama M, Yanagita M, Yokoi H,

Role of CTGF in Peritoneal Fibrosis in Mice.

16th Congress of the International Society for Peritoneal Dialysis (ISPD 2018)

May 5 2018 Vancouver Poster

戸田尚宏、森 潔、笠原正登、古賀健一、柴原孝成、松阪泰二、中尾一和、向山政志、柳田素子、横井秀基

CTGF の炎症・臓器線維化機序の解明～腎炎および腹膜硬化症モデルでの解明

第 21 回日本心血管内分泌代謝学会

2017 年 12 月 9 日 大阪 口演

戸田尚宏、笠原正登、森 潔、向山政志、柳田素子、横井秀基

腹膜線維化治療標的としての CTGF の検討

第 24 回日本腹膜透析医学会学術集会・総会

2018 年 10 月 7 日 大阪 口演

〔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：

国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

京都大学大学院医学研究科腎臓内科学ホームページ

<https://www.kidney-kyoto-u.jp/>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。