

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15994

研究課題名(和文) マイクロRNAを介した細胞間クロストークが腹膜繊維化に果たす役割の解明

研究課題名(英文) The role of microRNA-mediated signaling in peritoneal fibrosis

研究代表者

浜崎 敬文 (Hamasaki, Yoshifumi)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20617774

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：THP-1細胞から分化・活性化されたマクロファージにGLP-1受容体作動薬であるExendin-4 (Ex-4)を添加することで炎症性サイトカイン産生が抑制された。また、腹膜線維化モデルマウスにEx-4を投与し、腹膜線維化軽減、腹膜組織におけるPAI-1発現や炎症性サイトカインの発現が改善した。マクロファージに存在するGLP-1受容体を介した保護効果が期待され、そのメカニズムとしてマクロファージ由来のエクソソームに内在するマイクロRNAの発現変化を介した制御機構に着目し検討したが、Ex-4で有意な発現変化を認めるマイクロRNAの同定にはまだ至らず、今後の課題と思われた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病治療薬としても使用されているGLP-1受容体アゴニストが、腹膜透析の長期的弊害の一つである腹膜線維化を抑制する可能性が示唆され、腹膜透析の長期継続や腹膜線維化抑制の新規薬剤開発に貢献できる可能性がある。これがマクロファージ由来エクソソームに内在する特定のマイクロRNAを介した作用であることを示せば、組織線維化をもたらす炎症性疾患の制御に幅広く応用できる可能性があり、今後検討を継続したい。

研究成果の概要(英文)：In this study, treatment by GLP-1 receptor agonist Exendin-4 (Ex-4) ameliorated the production of inflammatory cytokines from M1 macrophages differentiated from THP-1 cells in vitro. Also, Ex-4 improved peritoneal fibrosis and reduced mRNA expressions such as PAI-1 and inflammatory cytokine in the peritoneal tissue of the peritoneal fibrosis model mice. These protective effects by Ex-4 were expected to be mediated via the GLP-1 receptor expressed on the surface of macrophages. Therefore, we focused on the mechanism through the change in expressions of microRNAs contained in the macrophage-derived exosomes. However, we have not yet identified microRNAs which show significant changes by Ex-4 treatment. Further investigation is needed to be continued to identify specific microRNA, contained in the macrophage-derived exosome, that mediates protective effect of Ex-4 against peritoneal fibrosis.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：腹膜線維化 マイクロRNA

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在、全世界には腎機能が低下し透析療法や腎移植を必要とする末期腎不全の患者は約 300 万人と推定され、わが国でも透析療法を要する患者は 32 万人にも昇り、国民約 400 人に一人が末期腎不全患者である。このような末期腎不全患者の治療法のひとつに腹膜透析 (PD; peritoneal dialysis) がある。PD は腹膜を介した拡散や浸透の原理を利用して体内から過剰な尿毒症性物質や体液を除去する治療である。PD は血液透析と比較して、残存する腎機能を長持ちさせ、心臓・血管への負荷が少なく、医療経済的に有利という医学的メリットがある。在宅治療であるため、治療満足度や生活の質も向上できる。^{1,2} しかし PD の普及率は低く、透析患者全体に占める割合は世界で 8%程度、わが国ではわずか 2.9%である。この大きな理由は、PD が長期に及ぶと腹膜の劣化 (腹膜線維化) をもたらし、腹膜機能不全を生じる点にある。また、腹膜の劣化に伴い、致死性の高い合併症である被嚢性腹膜硬化症を発症するリスクが上昇する。したがって、腹膜線維化のメカニズムの解明や治療ターゲットの同定は、腹膜線維化を抑制して一人でも多くの患者に PD の恩恵を享受できるようにするために急務である。

Plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) は、腹膜線維化に関連する因子として注目され、PD 排液中の PAI-1 は腹膜線維化や被嚢性腹膜硬化症のマーカーとなりうる と報告されている³。PAI-1 は腎など諸臓器の線維化にも重要な役割を果たしており、薬剤による PAI-1 抑制効果により腎線維化が改善することを我々は報告している。⁴ 腹膜組織における PAI-1 制御のメカニズムは明らかではない。

末期腎不全の最大の原因は糖尿病であり、糖尿病を有する末期腎不全患者は透析治療と並行して糖尿病治療薬による加療も行われる。糖尿病治療薬の一種であるインクレチン関連薬、すなわち GLP-1 受容体作動薬や DPP-4 阻害薬は、血糖値改善効果とは独立した臓器線維化改善効果が報告されている。⁵ GLP-1 受容体は正常腹膜組織には発現せず、腹腔内の単球/マクロファージに発現するため、腹腔内の単球/マクロファージの GLP-1 受容体を介した何らかのシグナルが腹膜組織に伝達され、腹膜中皮細胞の PAI-1 産生を抑制し、腹膜線維化が改善している可能性がある。すなわち、腹腔内単球/マクロファージと腹膜中皮細胞との間のクロストークが、腹膜線維化の制御に重要な役割を果たしている可能性がある。

我々は、腹膜線維化における単球/マクロファージと腹膜中皮細胞との間のシグナル伝達因子の候補として、Extracellular vesicles (EV; 細胞外小胞) に着目した。EV は細胞から放出された小胞で、その内部に核酸やタンパクを含み、細胞間の情報伝達に寄与すると考えられている。径 30-100nm の EV は Exosome と呼ばれ、培養細胞を用いた研究でマクロファージ由来の Exosome が血管内皮細胞の炎症性サイトカイン産生を惹起することが報告されている。⁶ Exosome とそこに内包される miRNA は、医学の様々な領域でバイオマーカー候補として注目され、PD では排液中の Exosome および miRNA が注目されている。^{7,8} 腹腔内単球/マクロファージ由来の Exosome を介するシグナルが腹膜中皮細胞に伝達され腹膜線維化が制御される可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では腹膜線維化モデルマウスを用いた in vivo 研究、および培養細胞 (THP-1 細胞) を用いた in vitro 研究を通じて、GLP-1 受容体アゴニストによって、単球/マクロファージや腹膜組織に対する抗炎症・保護効果、マクロファージ由来の Exosome に内包される miRNA の変化への影響、腹膜線維化改善効果がマクロファージ由来 Exosome 内の miRNA を介する作用である可能性、について検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞を用いた in vitro 実験

Human monocytic leukemia (THP-1) 細胞を 12 well プレートに 6×10^6 /ml の密度で撒き、Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) 10 ng/ml で 24 時間刺激しマクロファージ (M0) への分化を誘導した。さらに Lipopolysaccharide (LPS) 50 ng/ml で 4 時間刺激して活性化マクロファージ (M1) への分化を誘導した。THP-1 細胞の時点から M0、M1 に分化させるまでの間、GLP-1 受容体 (GLP-1R) アゴニストである exendin-4 (Ex-4) (Bachem, Bubendorf, Switzerland) を 100nM の終濃度で添加した群と非添加群に分け、THP-1、M0、M1 の各段階の GLP-1R の発現を定性 PCR 法で確認した。また、M1 における TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、MCP-1、CD80 の発現を定量 PCR で確認した。

上記と同様の細胞培養および刺激を 10cm dish を用いて行い、10cm dish 3 枚分から回収した上清を合わせて Exosome を単離・抽出した。Exosome の抽出方法は超遠心法を用いた。

⁹ 得られた Exosome 分画から蛋白を抽出し、抗 CD63 モノクローナル抗体 (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp., Osaka, Japan) を用いたウェスタンブロッティングで Exosome の存在を確認した。また、Exosome 分画から miRNeasy Mini Kit (QIAGEN Inc., Germantown, MD) を用いて miRNA を抽出した。

(2) 腹膜線維化モデルマウスを用いた in vivo 実験

8 週齢のメス野生型 C57BL/6 マウス (Tokyo Laboratory Animals Science, Tokyo, Japan) に 15% アルコール含有 0.1% グルコン酸クロルヘキシジン (CG) 溶液を 0.25ml ずつ 21 日間

隔日で腹腔内投与して腹膜線維化モデルマウスを作製した。¹⁰ このモデルマウスの CG 溶液投与開始と同日より Ex-4 (1nmol/kg/day) または溶媒を 21 日間 1 日 1 回腹腔内投与した。21 日目に腹膜機能の評価のための腹膜平衡試験を施行した。7%ブドウ糖液 6ml を腹腔内に注入・貯留し、20 分後に腹水を回収した。回収した排液と同時刻の採血検体を用いて、腹水ならびに血液中の BUN, Cr をそれぞれ酵素法、HPLC 法で測定した。D (腹水排液) と P (血漿) 中の BUN 比および Cr 比を算出した。また、腹膜平衡試験で回収した排液中の Exosome 分画を単離した。⁹ Exosome から miRNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて miRNA を抽出した。21 日目で腹膜組織を採材し、腹膜線維化の病理組織学的評価 (腹膜壁厚、 α -SMA、マクロファージマーカー F4/80) を行った。また、Real-time PCR を用いての腹膜組織中の PAI-1、TGF- β 、CTGF、TNF- α 、IL-6、MCP-1 の発現を評価した。

(3) In vitro および In vivo の Exosome 中の miRNA 発現の検討

In vitro および In vivo 実験で抽出した各 miRNA サンプルから一部のサンプルを選定し、Megaplex RT Primers, TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) を用いて cDNA 合成を行い、Megaplex PreAmp Primers, TaqMan PreAmp Master Mix (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) を用いて preamplification を行った。preamplification を行ったサンプルを用いて、TaqMan Array miRNA Card (Applied Biosystems, Foster City, CA) による miRNA 発現のアレイ解析を行った。Ex-4 投与群が非投与群と比較して 3 倍以上発現が変化し、In vitro および In vivo のいずれも同様の挙動をとり、腹膜線維化メカニズムに関係しうる候補 miRNA の絞り込みを試みた。絞り込んだ候補 miRNA について各サンプルの Taqman Small RNA Assays (ThermoFisher Scientific) を用いた cDNA 合成ならびにリアルタイム PCR による解析を行った。

4. 研究成果

(1) 培養細胞を用いた In vitro 実験

THP-1 および M0、M1 の Ex-4 投与群 (Ex-4 100nM) と非投与群において、GLP-1R の mRNA 発現を認めた。(Fig 1)

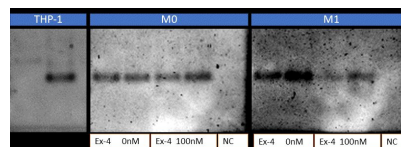


Fig 1 培養細胞の GLP-1R の発現

リアルタイム PCR による評価では、M1 細胞において、Ex-4 投与群は非投与群と比較して TNF- α 、IL-6、IL-1b、MCP-1 の発現が有意に低下した (Fig 2A-D, 各群 n=11, いずれも p<0.05)。M1 への分化誘導の程度は CD80 の発現に有意差が見られず同等であると考えられた (Fig 2E)。

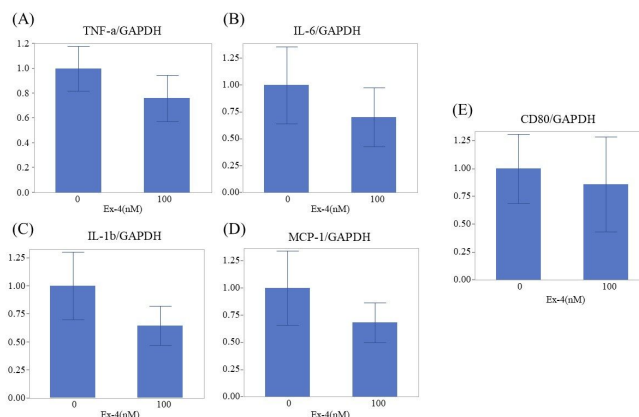
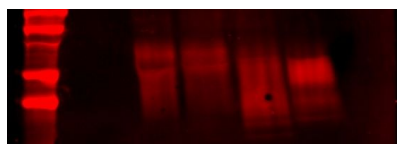


Fig 2 M1 細胞におけるサイトカイン発現



M ① ② ③ ④ ⑤

- ① M1超遠心後の上清(negative control)
- ② M1由来Exosome (Ex-4 0 nM)
- ③ M1由来Exosome (Ex-4 100 nM)
- ④ Hela細胞由来Exosome (positive control)
- ⑤ Platelet (positive control)

Fig 3 M1 培養上清より抽出した Exosome 分画の CD63 の発現

(2) モデル動物を用いた実験 In vivo 実験

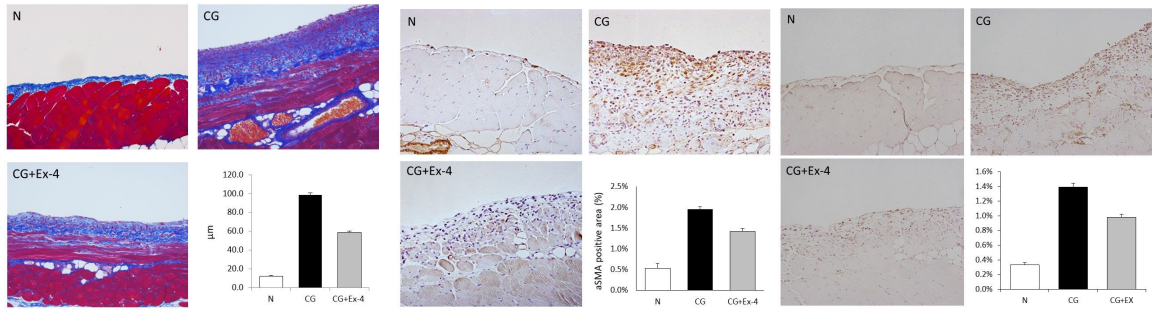


Fig 4 腹膜壁厚 (SMC 厚) の評価

Fig 5 SMA 発現の評価

Fig 6 F4/80 発現の評価

クロルヘキシジンアルコール (CG) 投与で腹膜線維化を誘発したモデルマウスに Ex-4 投与を行ったところ、腹膜の組織学的評価で、Ex-4 投与群は非投与群と比較して腹膜線維化の有意な軽減効果 (腹膜壁 (SMC) 厚、腹膜の SMA 発現、F4/80 陽性マクロファージ浸潤の軽減) を認めた (Fig 4-6、各群 n=9-11)。また、腹膜組織中の腹膜線維化促進に関わる遺伝子発現 (PAI-1、TGF- β 、CTGF) および炎症性サイトカイン (TNF- α 、IL-6、MCP-1) の有意な減少効果を認めた (Fig 7 各群 n=10)。Ex-4 の腹膜線維化抑制効果が期待された。

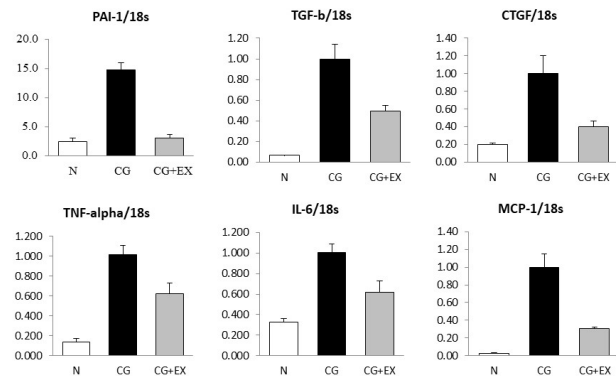


Fig 7 腹膜組織中の mRNA 発現の評価

腹膜機能を評価する腹膜平衡試験では、Ex-4 非投与群と投与群で D/P BUN, D/P Cr に有意差を認めず、腹膜組織と腹膜機能の変化との間に乖離を認めた (Fig 8、各群 n=10)。この理由として、腹膜組織中の VEGF-A の mRNA 発現は N、CG、CG+Ex-4 の 3 群で有意差を認めなかったことから、本モデルでは血管新生への影響が少な

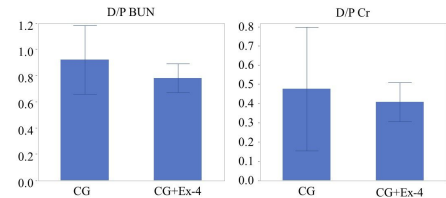


Fig 8 腹膜平衡試験の結果

(3) Exosome の miRNA 発現の検討

培養細胞実験で得られた THP-1 培養上清由来の Exosome、および、動物実験 (腹膜平衡試験) で得られた腹膜透析排液中の Exosome からそれぞれ抽出した miRNA の発現をアレイ解析した結果、miR-30a-3p, miR-30d, miR-18a, miR-145 を腹膜線維化に関連する miRNA の候補と考えた。これらの miRNA の発現を各サンプルで検討した (培養上清は各群 n=3-4、腹膜透析排液は各群 n=10) が、Ex-4 の投与によって培養上清および腹膜透析排液で同様の挙動を示しかつ Ex-4 非投与群と比較してその発現に有意差を認める miRNA は今回同定できなかった (Fig 9)。

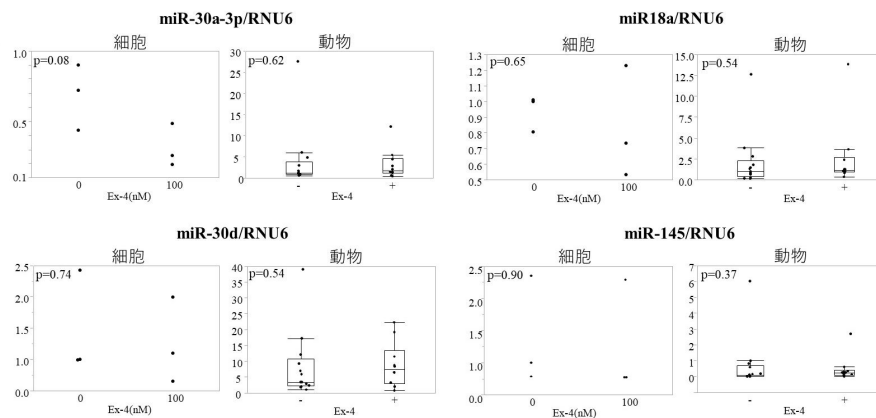


Fig 9 In vitro および In vivo の miRNA 発現解析

本研究では、in vitro で、Ex-4 投与で M1 マクロファージにおける炎症性サイトカインの発現が抑制された。in vivo では、Ex-4 による腹膜線維化の有意な軽減効果 (腹膜壁 (SMC) 厚、

腹膜の SMA 発現、F4/80 陽性マクロファージ浸潤の軽減)を認め、PAI-1 を含む腹膜組織中の腹膜線維化に関わる遺伝子発現の有意な減少を認めた。これらの結果から、GLP-1R アゴニストが抗炎症効果および腹膜線維化抑制効果を有する可能性が示唆された。

このメカニズムとしてマクロファージ由来の miRNA の寄与を考え、マクロファージ由来の培養上清中および腹膜線維化モデルマウスの腹膜透析排液のサンプルをそれぞれ用いて、培養細胞と動物実験に共通した挙動を示す miRNA を探索した。アレイ解析の結果から miR-18a, miR-30d, miR-30a-3p, miR-145 を候補 miRNA として検討したが、今回はこれらの候補 miRNA の中から Ex-4 投与で有意に変化する miRNA を同定することはできなかった。過去の報告ではこれらの miRNA と組織線維化との関係が報告され、本研究においても候補 miRNA として期待された。しかし、アレイ解析の結果に反してこれらの miRNA 候補について期待した結果は得られなかった。よりサンプル数を増やしたアレイ解析を行って候補 miRNA の絞り込みを行う必要があるのかもしれない。また、特に細胞培養上清から抽出できる Exosome の量がごく微量であったため、In vitro の miRNA 発現解析に十分なサンプル数、サンプル量が確保できていない可能性も考えられた。今回候補として挙がらなかったが腹膜線維化と関連する可能性がある他の miRNA (miRNA-21、-129-5p、-589 など) はマクロファージにおける発現は不明である。¹¹ これまでの本研究の実験結果から、腹膜線維化にマクロファージが関与している可能性は高いと思われるので未検討の miRNA に関しても今後引き続き検討を進めたい。In vitro および In vivo で発現が変化している miRNA を同定し、その塩基配列を持つ合成 miRNA を培養腹膜中皮細胞に導入して PAI-1 発現の変化を観察できれば、マクロファージ由来の miRNA が腹膜中皮細胞の PAI-1 発現を介する可能性が示唆されると考えられ、新たな腹膜線維化抑制の治療ターゲットになりうることを期待される。

引用文献

1. Kumar VA, Sidell MA, Jones JP, Vonesh EF. Survival of propensity matched incident peritoneal and hemodialysis patients in a United States health care system. *Kidney Int.* 2014;86(5):1016-1022.
2. Makkar V, Kumar M, Mahajan R, Khaira NS. Comparison of Outcomes and Quality of Life between Hemodialysis and Peritoneal Dialysis Patients in Indian ESRD Population. *J Clin Diagn Res.* 2015;9(3):Oc28-31.
3. Lopes Barreto D, Struijk DG, Krediet RT. Peritoneal effluent MMP-2 and PAI-1 in encapsulating peritoneal sclerosis. *Am J Kidney Dis.* 2015;65(5):748-753.
4. Hamasaki Y, Doi K, Maeda-Mamiya R, et al. A 5-hydroxytryptamine receptor antagonist, sarpogrelate, reduces renal tubulointerstitial fibrosis by suppressing PAI-1. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2013;305(12):F1796-1803.
5. Nagai T, Doi S, Nakashima A, et al. Linagliptin Ameliorates Methylglyoxal-Induced Peritoneal Fibrosis in Mice. *PLoS One.* 2016;11(8):e0160993.
6. Osada-Oka M, Shiota M, Izumi Y, et al. Macrophage-derived exosomes induce inflammatory factors in endothelial cells under hypertensive conditions. *Hypertens Res.* 2017;40(4):353-360.
7. Pearson LJ, Klaharn IY, Thongsawang B, et al. Multiple extracellular vesicle types in peritoneal dialysis effluent are prominent and contain known biomarkers. *PLoS One.* 2017;12(6):e0178601.
8. Erdbrugger U, Le TH. Extracellular Vesicles in Renal Diseases: More than Novel Biomarkers? *J Am Soc Nephrol.* 2016;27(1):12-26.
9. Théry C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol.* 2006;Chapter 3:Unit 3.22.
10. Tanabe K, Maeshima Y, Ichinose K, et al. Endostatin peptide, an inhibitor of angiogenesis, prevents the progression of peritoneal sclerosis in a mouse experimental model. *Kidney Int.* 2007;71(3):227-238.
11. Yanai K, Ishii H, Aomatsu A, Ishibashi K, Morishita Y. MicroRNAs in peritoneal fibrosis: a systematic review. *Discov Med.* 2018;26(145):271-280.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6 . 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	東邑 美里 (Tomura Misato)		
研究協力者	吉田 輝彦 (Yoshida Teruhiko)		