

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17706

研究課題名(和文)MMP-10の腹膜線維化における役割とその細胞内シグナルの解明

研究課題名(英文)The role of MMP-10 in peritoneal fibrosis

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)：腹膜劣化の機序解明を目的として、腹膜線維症マウスの腹膜で発現が上昇するMatrix metalloproteinase-10 (MMP-10)の役割を解析した。MMP-10ノックアウトマウス(MMP-10 KO)では腹膜線維化が軽減し、炎症細胞浸潤が低下していた。MMP-10 KOでは線維化マーカーに加え、炎症マーカーであるCcl2やEmr1発現も低下した。腹膜平衡機能試験では、両群間で腹膜透過性に差を認めなかった。MMP-10 KOから採取した腹膜中皮細胞をTNF- α 刺激を行ったところ、野生型マウスに比べ、Ccl2のmRNA発現が低下しており、in vivoの結果と合致した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腹膜透析の合併症である腹膜線維化進行機序解明を行った研究であり、透過性亢進に関与しないものの腹膜線維化に関連する液性因子を同定した。社会的意義としては腹膜透析長期継続へのバイオマーカー、標的因子の候補の一つである。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the mechanism of peritoneal fibrosis caused by long-term peritoneal dialysis, we analyzed the role of matrix metalloproteinase-10 (MMP-10), which is upregulated in the peritoneum fibrosis. Intraperitoneal administration of chlorhexidine to MMP-10 knockout mice reduced peritoneal fibrosis compared to wild-type mice. TGF- β and Col1a1 were decreased in chlorhexidine MMP-10 knockout mice. Ccl2 and Emr1 expression, which are involved in inflammation, were also decreased. To investigate the effect of MMP-10 on peritoneal permeability, we performed a peritoneal equilibrium test and found no difference in peritoneal permeability and water removal between wild-type and MMP-10 knockout mice treated with chlorhexidine. Furthermore, peritoneal mesothelial cells harvested from MMP-10 knockout mice as a primary culture system were examined with TNF- α stimulation. Expression of Ccl2 and TNF- α mRNA was decreased compared to wild-type mice, consistent with the in vivo results.

研究分野：腹膜透析

キーワード：中皮細胞 腹膜透析 炎症細胞 蛋白分解酵素

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腹膜透析は重要な腎代替療法の一つであり、在宅医療としても注目されているが、長期間の腹膜透析の継続にはいくつかの問題点がある。腹膜線維症は重要な合併症の一つであり、その後腹膜硬化症へと進展し、除水低下や腹膜癒着を惹起し CAPD 継続困難となる症例も多い。長期間の腹膜透析による腹膜機能の劣化と細胞外基質沈着を伴う炎症性腹膜肥厚が重要な病因となっている。研究者は以前、マウス腹腔内にクロロヘキシジン (CG) 投与し作製した腹膜線維症マウスの腹膜において pleiotrophin (PTN)が増加することを報告した (Yokoi, Toda et al. *Kidney Int* 81:160, 2012)。PTN ノックアウトマウスによる解析から PTN は線維化には関与しないが、炎症細胞の遊走、腹膜透過性亢進に関与することを報告した。線維化と腹膜透過性亢進のそれぞれの機序について興味を持ち、線維化に関連する因子である connective tissue growth factor (CTGF/CCN2)に着目し、薬剤誘導性全身性 CTGF/CCN2 ノックアウトマウスを使用して、CG による腹膜線維症マウスを作製したところ、CTGF/CCN2 ノックアウトマウスでは腹膜の線維化が軽減し、血管新生と腹膜透過性亢進が抑制されていることを報告した (Toda et al. *Nephrol Dial Transplant* 33:943, 2018)。これら 2 つの腹膜透析関連研究より、腹膜の線維化と血管新生に興味を持ち、今回の研究を考案した。

腹膜線維化進行過程において細胞外基質の産生と分解反応が同時に起こっており、研究者がこれまで CTGF/CCN2 の機能解析を行い産生系については詳細に解析を行ったが、生体における線維化形成の解析にはタンパク分解系の解析が不可欠と考えた。これまで Matrix metalloproteinase (MMP) の腹膜透析における意義として、主に MMP-2 と MMP-9 が解析されてきた。MMP-2 は腹膜線維化モデルラットの腹膜で増加することや腹膜透析液排液中に認められること (Hirahara et al. *Nephrol Dial Transplant* 19:1732, 2004) や、ヒト腹膜透析排液中の MMP-2 は腹膜透過性の指標である D/PCr とよく相関することが示されている (Hirahara et al. *Nephrol Dial Transplant* 22:560, 2007)。また MMP-9 ノックアウトマウスは TGF- β 過剰発現腹膜線維化マウスにおいて MMP-9 欠損は腹膜線維化が軽減することが報告されており、MMP-9 の作用として、血管新生を促進し、腹膜傷害性に作用することが報告された (Padwal et al. *Nephrol Dial Transplant* 32:50, 2017)。MMP-2 と MMP-9 は代表的な MMP であるが、その他の MMP においても腹膜線維症や血管新生に於いて重要な可能性があると想定した。そのため、以前に行った CG 誘導腹膜線維化マウス腹膜組織の遺伝子発現網羅的解析より、MMP ファミリーを抽出し発現変化を検討した。CG の代わりにリン酸バッファーを投与したコントロール群の発現レベルを 1 とし、CG 週 3 回投与 3 週後の腹膜においては MMP-10 の発現が最も増加率が高かった。今回 MMP-10 に着目した。また、内皮細胞の MMP-10 誘導において、細胞内分子として p38MAPK, ERK, JNK が関与する報告がある (de Lizarrondo et al. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32:1477, 2012)。これらの背景より MMP-2、MMP-9 以外で腹膜線維化、血管新生に関与する重要な MMP として MMP-10 は重要かという課題を明らかにすることとした。

2. 研究の目的

本研究の目的は以下の 2 点である。

- 1) 腹膜線維症モデルマウスの腹膜において MMP-10 の意義を MMP-10 ノックアウトマウスを用いて解析する。
- 2) 培養腹膜中皮細胞および線維芽細胞において MMP-10 発現の調節機序を解明する。

3 . 研究の方法

十二週齢の全身性 MMP-10 ノックアウトマウスに 0.1% CG/15% エタノール/85% PBS (0.01ml/gBW) の週 3 回腹腔内投与を 4 週間行った。コントロールとしてリン酸緩衝食塩水 PBS を投与した。投与 4 週後のマウスの腹膜の線維化をマッソン・トリクローム染色で評価した。中皮下線維組織内の SMA と MAC2 の免疫組織化学を行った。腹膜組織の mRNA 発現として TGF- β 、CTGF、Fibronectin、Col1a1、Ccl2/Mcp1 と Emr1 発現を検討した。腹膜平衡機能検査は、CG 投与もしくは PBS 投与 2 週後の MMP-10 KO マウスと野生型マウスに、4.25% グルコース液 3 mL を腹腔内投与し、2 時間後に回収して解析した。

MMP-10 ノックアウトマウス及び野生型マウスの腹壁組織を回収し、トリプシン/EDTA 処理により腹膜中皮細胞を初代培養系として採取した。培養腹膜中皮細胞に TNF- α 刺激(20 ng/mL)を行い、2 時間後に回収し Ccl2, TNF- α mRNA 発現を解析した。

4 . 研究成果

CG 投与 MMP-10 ノックアウトマウスの CG 投与野生型マウスに比して腹膜中皮下組織の線維化が軽度であった。クロロヘキシジン投与野生型マウスの腹膜組織においては腹膜中皮細胞および中皮下組織全体に MMP-10 発現が認められた。次に MMP-10 ノックアウトマウスに同様にクロロヘキシジンを腹腔内投与すると野生型に比べてマッソン・トリクローム染色で測定される腹膜中皮下組織厚が軽減した。免疫組織化学法で検討した結果、中皮下線維組織内の SMA とマクロファージ浸潤が低下していた。腹膜の TGF- β 、CTGF、Fibronectin、Col1a1 mRNA 発現はいずれもクロロヘキシジン MMP-10 ノックアウトマウスで低下していた。また、炎症に関わる Ccl2/Mcp1 と Emr1 mRNA 発現も低下していた。腹膜透過性亢進に MMP-10 が及ぼす影響を検討するために、腹膜平衡機能試験を行ったところ、クロロヘキシジン投与野生型、MMP-10 ノックアウトマウスで腹膜透過性・除水に差を認めず、MMP-10 は腹膜透過性に関与しないことが示唆された。

さらに MMP-10 ノックアウトマウスから腹膜中皮細胞を初代培養系として採取し、TNF- α 刺激 2 時間後の MMP10 KO マウス由来腹膜中皮細胞の mRNA 発現は、野生型マウス由来腹膜中皮膚細胞に比べ、Ccl2、TNF- α の mRNA 発現が低下していた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

| | |
|--|---------------------|
| 1. 著者名 Kinashi H, Toda N, Sun T, Nguyen TQ, Suzuki Y, Katsuno T, Yokoi H, Aten J, Mizuno M, Maruyama S, Yanagita M, Goldschmeding R, Ito Y. | 4. 巻 9 |
| 2. 論文標題 Connective tissue growth factor is correlated with peritoneal lymphangiogenesis. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Sci Rep | 6. 最初と最後の頁 12175 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-48699-9. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 該当する |

| | |
|--|--------------------|
| 1. 著者名 Toda N, Asada S, Komiya T. | 4. 巻 58 |
| 2. 論文標題 Brachiocephalic Vein Occlusion from a Tunneled Hemodialysis Catheter. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Intern Med | 6. 最初と最後の頁 3339 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2169/internalmedicine.3354-19. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|---|------------------|
| 1. 著者名 Yoko Obata, Miho Murashima, Naohiro Toda, Shuto Yamamoto, Yoshihiro Tsujimoto, Yasushi Tsujimoto, Hiraku Tsujimoto, Hidemichi Yuasa, Munekazu Ryuzaki, Yasuhiko Ito, Tadashi Tomo and Hidetomo Nakamoto | 4. 巻 6 |
| 2. 論文標題 Topical application of mupirocin to exit sites in patients on peritoneal dialysis: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Renal Replacement Therapy | 6. 最初と最後の頁 12 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|---|------------------|
| 1. 著者名 Naohiro Toda, Motoko Yanagita and Hideki Yokoi | 4. 巻 5 |
| 2. 論文標題 Urgent-start peritoneal dialysis after laparoscopic dialysis catheter implantation: a single-center experience | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Renal Replacement Therapy | 6. 最初と最後の頁 43 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 6件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 Toda N, Yanagita M, Yokoi H. |
| 2. 発表標題 Urgent-start peritoneal dialysis after laparoscopic dialysis catheter implantation. |
| 3. 学会等名 9th Asian pacific chapter meeting of the International Society for Peritoneal Dialysis (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年～2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Toda N, Obata Y, Tagawa M, Yamamoto S, Tsujimoto Y, |
| 2. 発表標題 Application of topical antibiotics ointment at the exit site of peritoneal dialysis patients. |
| 3. 学会等名 9th Asian pacific chapter meeting of the International Society for Peritoneal Dialysis (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年～2020年 |

| |
|-------------------------------------|
| 1. 発表者名 戸田尚宏 |
| 2. 発表標題 PD苦手意識払拭講座 |
| 3. 学会等名 第25回腹膜透析医学会学術集会・総会（招待講演） |
| 4. 発表年 2019年～2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Yokoi H, Osaki K, Kato Y, Toda N, Ishi A, Mori K P, Kosaki K, Kasahara M, Mukoyama M, Yanagita M. |
| 2. 発表標題 Matrix metalloproteinase-10 is a key molecule in aldosterone-induced glomerular injury in systemic guanylyl cyclase-A knockout mice |
| 3. 学会等名 WCN2019 (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年～2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Ishimura T, Ishii A, Osaki K, Toda N, Mori K P, Handa T, Yanagita M, Yokoi H |
| 2. 発表標題 Role of matrix metalloproteinase-10 in peritoneal fibrosis |
| 3. 学会等名 9th Asian pacific chapter meeting of the International Society for Peritoneal Dialysis (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年～2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Yokoi H, Ishimura T, Toda N; Yanagita M |
| 2. 発表標題 Evaluation of mechanism on peritoneal fibrosis using genetically modified mice |
| 3. 学会等名 9th Asian pacific chapter meeting of the International Society for Peritoneal Dialysis (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年～2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Ishimura T, Ishi A, Osaki K, Toda N, Mori K P, Handa T, Yanagita M, Yokoi H |
| 2. 発表標題 Deletion of Matrix Metalloproteinase-10 Ameliorates Peritoneal Fibrosis |
| 3. 学会等名 ASN2019 (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年～2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 横井秀基, 石村拓也, 戸田尚宏, 柳田素子 |
| 2. 発表標題 腹膜線維化・炎症に及ぼすCTGFとMMP-10の役割 |
| 3. 学会等名 第25回日本腹膜透析医学会学術集会・総会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2019年～2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 石村拓也, 石井輝, 大崎啓介, 戸田尚宏, 森慶太, 半田貴也, 柳田素子, 横井秀基 |
| 2. 発表標題 Matrix metalloproteinase-10欠損による腹膜線維化の抑制効果 |
| 3. 学会等名 第25回日本腹膜透析医学会学術集会・総会 |
| 4. 発表年 2019年～2020年 |

〔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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|