

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22590910

研究課題名（和文） 腹膜透析における新規バイオマーカーの開発と分子機序の解明

研究課題名（英文） Evaluation of novel biomarkers in peritoneal fibrosis

研究代表者

笠原 正登（KASAHARA MASATO）京都大学・医学系研・准教授

研究者番号：50393351

研究成果の概要（和文）：

腹膜線維化の過程で増加するpleiotrophin (PTN)の機能を検討した。PTNノックアウトマウスは、炎症細胞浸潤・炎症性サイトカインの低下とともに、腹膜透過性の亢進が軽減していた。ヒト腹膜透析排液中にPTNが含有されること、腹膜炎においてPTNが増加することを示した。腹膜透析排液中のNgal濃度に関する検討を行い、細菌性腹膜炎ではNgal濃度が10倍以上、被嚢性腹膜硬化症を発症した症例の腹水では100倍に増加する結果を得た。腹膜透析排液Ngalスコアは腹膜透析を100ヶ月以上受けている症例で高値を示した。

研究成果の概要（英文）：

We used PTN knockout mice to evaluate the role of pleiotrophin (PTN) in peritoneal fibrosis, and measured the concentration of PTN in the peritoneal effluents from peritoneal dialysis patients. We also measured the concentration of Ngal in peritoneal effluents.

1. Role PTN in peritoneal fibrosis using PTN knockout mice

PTN mRNA in the peritoneum of peritoneal fibrosis mice was gradually increased. PTN knockout mice with peritoneal fibrosis model reduced inflammatory cell migration and cytokines and peritoneal permeability compared with control mice

2. Measurement of PTN in peritoneal effluents and PTN mRNA in peritoneal tissues.

We could detect PTN in peritoneal effluents and showed increase of PTN in effluents from patients with peritonitis.

3. Measurement of Ngal in peritoneal effluents

Ngal concentration in peritoneal effluents from patients with bacterial peritonitis was 10 times higher than that from control patients. Ngal score (adjusted by internal control) was high in patients receiving PD more than 100 months.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：腹膜透析、腹膜中皮細胞、ノックアウトマウス、腹膜炎

1. 研究開始当初の背景

長期間の腹膜透析により、腹膜線維化が進行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。これまで、TGF- β やVEGFなどが腹膜線維症・硬化症発症に関与する可能性が想定されているが、病態進展における有意義なマーカーとしての意義や上記分子に拮抗する治療法については不明な点も多い。本研究は研究代表者が新規に腹膜における発現を同定した pleiotrophin (PTN) と、分化と炎症に関連する Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (Ngal) を中心に腹膜障害における新規バイオマーカーとしての意義とその分子機序解明を目的としたものである。腹膜線維症の進展により腹膜硬化症、被嚢性腹膜硬化症(EPS)が発症する可能性が増加し、EPS例では重篤な転帰をたどる症例も報告されている。そのリスク因子として、繰り返す腹膜炎、中皮細胞の脱落や細胞面積の増加、炎症性・線維化誘導性・血管新生因子の増加、Tリンパ球の浸潤などが報告されているが、不明な点も多い(Margetts et al. *Perit Dial Int* 2003; Kawaguchi et al. *Perit Dial Int* 2005; Yanez-Mo et al. *N Eng J Med* 2003)。

研究代表者は、長期腹膜透析による腹膜障害の新規バイオマーカーの候補として、薬剤による腹膜線維症モデルマウスで増加する遺伝子に着目した。Chlorhexidine gluconate(CG)を用いて腹膜線維症モデルマウスを作製し、腹膜における遺伝子発現の変化をAffymetrix 430 2.0 microarrayを用いて、網羅的に解析した。培養マウス腹膜中皮細胞で発現を認め、PBS投与マウスに比してCG投与マウスで4倍以上にシグナル強度が増加もしくは減少した遺伝子群を同定した。増加する遺伝子群の一つとして18kDaの分泌蛋白で

ある pleiotrophin (PTN) を同定した。PTNは細胞増殖作用を持ち、神経系の発生に重要な因子である。PTN mRNAは腹膜を含む腹壁でday21において22倍に発現亢進を認め、Western blotにてPTN発現は2倍に亢進していた。

マウス培養腹膜中皮細胞には、PTNの受容体であるreceptor protein tyrosine phosphatase β/ζ が発現しており、PTN刺激により細胞増殖亢進および遊走が認められた。

さらに、研究代表者は分担研究者の森とともに、急性腎障害マーカーである尿中Ngalに着目し、マウスおよび少数例のヒトにおいて、尿中Ngalが糖尿病性腎症の進行と共に増加し、アンジオテンシン受容体拮抗薬(ARB)の投与により減少することを明らかにしてきた(Kasahara, Mori et al. *Nephrol Dial Transplant* 2009; Kuwabara, Mori, Kasahara et al. *Kidney Int* 2009)。Ngalは腎においてIL-1 β とlipopolysaccharide (LPS)により強く誘導される(Cowland et al. *J Immunol* 2006)、さらには細菌性腹膜炎において鋭敏なマーカーであることが報告され(Leung et al. *J Clin Immunol* 2009)、炎症に関与することが示されている。

2. 研究の目的

(1) PTN KOマウスを用いた腹膜線維症におけるPTNの意義の検討

PTNの腹膜透析における意義を検討する。そのためにPTN KOマウスを用いて線維化・遺伝子発現およびperitoneal equilibration test (PET)を含む腹膜機能についての検討を行う。

(2) 腹膜透析患者における腹膜透析排液中のPTN、Ngalの検討

PTNとNgalが腹膜障害のマーカーや治療標的となりうる因子かについての検討を行う

ため、腹膜透析排液中の PTN と Ngal 濃度を測定する。

本研究において、PTN と Ngal の腹膜線維症の意義を *in vivo*, *in vitro* の両面の解析から明らかにすることを目的としている。

3. 研究の方法

(1) PTN KO マウスを用いた腹膜線維症の解析

腹膜線維症モデルマウスで誘導される PTN の意義を検討するために、PTN ノックアウト (KO) マウスに CG 投与をおこなった。PTN KO マウスの表現型はほぼ正常で、神経系において大脳の cortical layer の肥厚を認めるのみである (Muramatsu et al. Gene to Cells 2006)。腹膜組織中の IL-1 β , TNF- α , TGF- β , CTGF, COL1A1, fibronectin, COL4A1 mRNA 発現を real-time RT-PCR 法で解析した。また F4/80, CD3, Ki-67, Collagen4 の免疫染色を行った。さらに腹膜平衡機能テストを行い、腹膜透過性を評価した。

(2) ヒト腹膜透析排液および腹膜生検組織を用いた PTN 発現の検討

腹膜透析排液中の PTN 濃度測定は ProteinTech 社の rabbit anti-PTN 抗体を用いて Western blot 法により検討した。腹膜透析導入のチューブ挿入時ならびに終了時のチューブ抜去時に腹膜生検を行う。腹膜生検組織はそれぞれ RNA、蛋白、免疫組織化学用標本に分け、mRNA 発現は taqman RT-PCR を用いて解析する。

(3) 腹膜透析患者の透析排液中 Ngal の検討

腹膜透析液中に含まれる Ngal 濃度を BioPorto 社の ELISA キットを用いて測定した。腹膜透析液中 Ngal 濃度から算出される Ngal score を検討した。

4. 研究成果

(1) PTN KO マウスを用いた腹膜線維症の検討

CG により腹膜線維症を惹起すると、PTN mRNA および蛋白発現は経時的に増加を認め、3週および4週で同程度の増加を認めた。免疫組織化学法により腹膜線維症マウスでは腹膜中皮細胞、中皮下線維組織の線維芽細胞様の細胞および内皮細胞に認められた。

次に PTN KO マウスに CG 投与をおこなった。CG 投与 PTN KO マウスと CG 投与野生型 (WT) マウスの腹膜中皮下線維組織厚は同程度であった。mRNA 発現を検討したところ CG 投与 WT マウスは、CG 非投与 WT マウスに比して、炎症性サイトカインである IL-1 β , TNF- α の発現が亢進しているが、CG 投与 PTN KO マウスでは、約 50% 低下していた。CTGF, COL1A1, fibronectin 発現も CG 投与 PTN KO マウスでは、約 50% 低下していたが、腹膜中皮下組織の中心的な基質である COL4A1 発現は低下していなかった。このことから、PTN は特定の炎症および特定の細胞外基質産生に関与することが示された。

また、CG 投与 PTN KO マウスは CG 投与 WT マウスと比較して F4/80 陽性マクロファージの細胞浸潤数は変化なかったが、CD3 陽性 T 細胞浸潤数は低下していた。また細胞増殖も抑制されていた。最後に腹膜平衡機能検査を行ったところ、CG 投与 WT マウスで上昇した腹膜透過性は PTN KO マウスではベールレベルまで低下しており、PTN は腹膜透過性亢進に関与する因子であることが示された。

(2) ヒト腹膜透析排液および腹膜生検組織を用いた PTN 発現の検討

PD 排液中の PTN 濃度は、Western blot 法にて検出可能であり、細菌性腹膜炎症例において明らかな上昇を認めた。また、腹膜透析の腹

膜カテーテル抜去時に腹膜生検を行い、免疫組織化学法にて検討した。5年間の腹膜透析歴のある患者の腹膜組織では、中皮細胞および間質の細胞に陽性であった。

(3) 腹膜透析患者の透析排液中Ngalの検討

被嚢性腹膜硬化症の前駆病変としての腹膜の炎症・線維化と Ngal の関係を明らかにするために、腹膜透析排液の Ngal 濃度を測定した。同一症例においても透析液の種類・貯留時間などにより Ngal 値は大きく変動した。そこで補正法を考案した結果、同一症例ではほぼ一定の結果が得られるようになった。排液中 Ngal 補正值は被嚢性腹膜硬化症の症例で有意に高値であった。さらに細菌性腹膜炎では発症時にさらに高値を示し、抗生物質投与により経時的に濃度の低下を認めた。腹膜炎症状を有さない腹膜透析患者群において、排液中 Ngal 濃度自体は透析期間とは相関を示さなかったが、Ngal 補正值は有意な正の相関を示した。以上の結果より、排液中 Ngal は腹膜の慢性微小炎症を反映する可能性、被嚢性腹膜硬化症の発症と何らかの相関を示す可能性が示唆された。

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 7 件)

1. Yokoi H, Kasahara M, Mori K, Kuwabara T, Toda N, Yamada R, Namoto S, Yamamoto T, Seki N, Souma N, Yamaguchi T, Sugawara A, Mukoyama M, Nakao K. Peritoneal fibrosis and high transport are induced in mildly pre-injured peritoneum by 3,4-dideoxyglucosone-3-ene in mice. *Perit Dial Int.* 33:143-154, 2013. doi: 10.3747/pdi.2011.00033.

2. Nakao YM, Miyawaki T, Yasuno S, Nakao K, Tanaka S, Ida M, Hirata M, Kasahara M, Hosoda K, Ueshima K, Nakao K. Intra-abdominal fat area is a predictor for new onset of individual components of metabolic syndrome: METabolic syndRome and abdominaL ObesiTy (MERLOT study). *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 88:454-461, 2012. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3>

491080/

3. Ogawa Y, Mukoyama M, Yokoi H, Kasahara M, Mori K, Kato Y, Kuwabara T, Imamaki H, Kawanishi T, Koga K, Ishii A, Tokudome T, Kishimoto I, Sugawara A, Nakao K. Natriuretic peptide receptor guanylyl cyclase-A protects podocytes from aldosterone-induced glomerular injury. *J Am Soc Nephrol.* 23:1198-1209, 2012. doi: 10.1681/ASN.2011100985.

4. Kuwabara T, Mori K, Mukoyama M, Kasahara M, Yokoi H, Saito Y, Ogawa Y, Imamaki H, Kawanishi T, Ishii A, Koga K, Mori KP, Kato Y, Sugawara A, Nakao K. Exacerbation of diabetic nephropathy by hyperlipidaemia is mediated by Toll-like receptor 4 in mice. *Diabetologia.* 55:2256-2266, 2012. doi: 10.1007/s00125-012-2578-1.

5. Nakao YM, Teramukai S, Tanaka S, Yasuno S, Fujimoto A, Kasahara M, Ueshima K, Nakao K, Hinotsu S, Nakao K, Kawakami K. Effects of renin-angiotensin system blockades on cardiovascular outcomes in patients with diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis. *Diabetes Res Clin Pract.* 2012 Apr;96(1):68-75. doi: 10.1016/j.diabres.2011.11.025.

6. Yokoi H, Kasahara M, Mori K, Ogawa Y, Kuwabara T, Imamaki H, Kawanishi T, Koga K, Ishii A, Kato Y, Mori KP, Toda N, Ohno S, Muramatsu H, Muramatsu T, Sugawara A, Mukoyama M, Nakao K. Pleiotrophin triggers inflammation and increased peritoneal permeability leading to peritoneal fibrosis. *Kidney Int.* 81:160-169, 2012. doi: 10.1038/ki.2011.305.

7. Yokoi H, Kasahara M, Mukoyama M, Mori K, Kuwahara K, Fujikura J, Arai Y, Saito Y, Ogawa Y, Kuwabara T, Sugawara A, Nakao K. Podocyte-specific expression of tamoxifen-inducible Cre recombinase in mice. *Nephrol Dial Transplant.* 25:2120-2124, 2010. doi: 10.1093/ndt/gfq029.

[学会発表] (計 4 件)

1. K.Koga, M.Mukoyama, H.Yokoi, M.Kasahara, K.Mori, T.Kuwabara, H.Imamaki, T.Kawanishi, A.Ishii, K.P.Mori, Y.Kato, S.Ono, N.Toda, A.Sugawara, K.Nakao
Analyses of microRNAs targeting CTGF in peritoneal fibrosis mouse model
American Society of Nephrology
2012 年 11 月 2 日 San Diego, USA

2. H.Yokoi, M.Kasahara, M.Mukoyama, K.Mori, Y.Ogawa, T.Kuwabara, H.Imamaki, T.kawanishi, K.Koga, A.Ishii, Y.Kato, K.P.Mori, H.Muramatsu, T.Muramatsu, A.Sugawara, K.Nakao.
Pleiotrophin causes peritoneal inflammation and mesothelial cell proliferation in a mouse model of peritoneal fibrosis. World Congress of

nephrology

2011年4月11日 Vancouver, Canada

3. H.Yokoi, M.Kasahara, K.Mori, T.Kuwabara, R.Yamada, S.Namoto, T.Yamamoto, N.Seki, T.Yamaguchi, N.Souma, A.Sugawara, M.Mukoyama, K.Nakao

The role of 3,4-dideoxyglucosone-3-ene in peritoneal fibrosis

American Society of Nephrology

2010年11月18日 Denver, USA

4. H.Yokoi, M.Kasahara, K.Mori, T.Kuwabara, T.kawanishi, K.Koga, A.Ishii, K.Mori, Y.Kato, A.Sugawara, M.Mukoyama, K.Nakao

Atrial natriuretic peptide prevents peritoneal adhesion formation with inhibiting macrophage and CD3-positive cell infiltration

American Society of Nephrology

2010年11月18日 Denver, USA

〔図書〕(計0件)

なし

〔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1件)

名称: 腹膜癒着防止用医薬組成物

発明者: 中尾一和、横井秀基、向山政志、笠原正登、森潔、古谷真優美

権利者: 国立大学法人京都大学、第一三共株式会社

種類: 特許権

番号: 特許公開 2011-207867

取得年月日: 平成23年10月20日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

京都大学大学院医学研究科内分泌代謝内科

ホームページ

<http://www.kuhp.kyoto-u.ac.jp/~med2/index-jp.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笠原 正登 (KASAHRA MASATO)

京都大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号: 503933351

(2) 研究分担者

森 潔 (MORI KIYOSHI)

京都大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号: 60343232

(3) 連携研究者

横井 秀基 (YOKOI HIDEKI)

京都大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号: 90378779