

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 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790985

研究課題名（和文） 小児の腹膜硬化症におけるインテグリンの役割の解明

研究課題名（英文） The role of integrin for pediatric peritoneal sclerosis

研究代表者

須賀 健一 (SUGA KENICHI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・非常勤講師

研究者番号：70511335

研究成果の概要（和文）：腹膜硬化症モデルラットで腹膜の細胞外基質蛋白(ECM)の蓄積とともに各種インテグリンの発現が増強した。Tumor growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) で培養線維芽細胞を刺激すると ECM の増加とともにインテグリンの発現が増強した。以上より TGF- $\beta$  により誘導される腹膜線維芽細胞のインテグリンの発現増強が異常な ECM 再構築などに関与し、腹膜硬化症の発症・進展に関連することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The extracellular matrix (ECM) and integrins increased on the encapsulating peritoneal sclerosis (EPS) model rat. ECM proteins and integrins increased when tumor growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) stimulated the cultured peritoneal fibroblasts. These results suggest that integrins enhanced by TGF- $\beta$  might contribute EPS development through the abnormal ECM remodeling.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：小児医学分野

科研費の分科・細目：小児科・腎臓

キーワード：インテグリン、腹膜硬化症、小児

1. 研究開始当初の背景

我が国の小児腎移植はドナー不足の問題もありまだ十分とはいえず、腎移植待機のために長期の腹膜透析管理を余儀なくされる場合が多い。腹膜透析が長期になると腹膜の線維性肥厚に伴う透析効率の低下及び重篤な合併症である被嚢性腹膜硬化症 (EPS) の発症は重大な問題となる。腹膜硬化症は透析液による刺激などで慢性炎症が腹膜に惹起され、腹膜中皮細胞が脱落し、腹膜中皮下組織で線維芽細胞の増殖、炎症細胞の浸潤、細胞外基質蛋白 (ECM) の産生亢進を介して腹膜肥厚が起こり、また腹膜構成細胞の接着機能亢進に

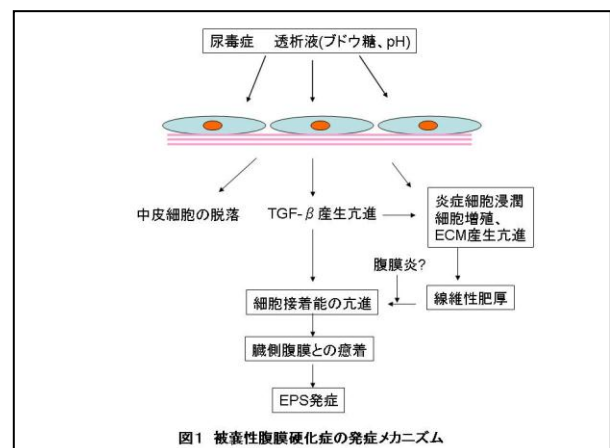
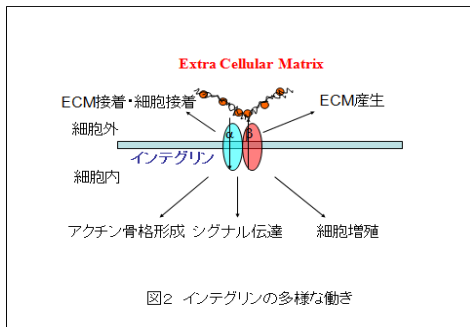


図1 被嚢性腹膜硬化症の発症メカニズム

より癒着を来たすものと考えられている。しかし詳細なメカニズムに関しては未だ不明な点が多い。一方、細胞外基質受容体インテグリンは ECM への細胞接着、ECM からの情報伝達及び細胞増殖・細胞機能の変化に関与している。腹膜線維化の過程におけるインテグリンの発現変化や役割に関しては不明である。



## 2. 研究の目的

腹膜硬化症の発症及び進行における腹膜でのインテグリンの発現と機能を明らかにして、腹膜硬化症の進展メカニズムについて研究する。

## 3. 研究の方法

### (1) 腹膜硬化症ラットの作成

0.1%クロルヘキシジン+15%エタノール  
1.5ml/100g 体重を1週間3回腹腔内投与することにより腹膜硬化症モデルを作成する。

### (2) 腹膜硬化症でのインテグリン発現の免疫組織学的検討

ヘマトキシリン・エオジン染色及び Periodic Acid-Schiff 染色を行い、腹膜中皮細胞の剥離や腹膜中皮下結合織の肥厚の有無を検討する。

次に酵素抗体法(ABC法)を用いてインテグリンの発現の変化を検討する。線維化を促進するサイトカイン Tumor growth factor- $\beta$

(TGF- $\beta$ ) の発現、コラーゲン I やファイブロネクチンなどの ECM 蛋白発現についても検討する。インテグリン関連接着斑蛋白(Hic-5)、細胞骨格蛋白( $\alpha$ SMA 等)の免疫染色も行い、インテグリンの情報伝達機能を類推する。

### (3) 腹膜硬化症ラットのインテグリン蛋白の発現の検討

腹膜硬化症ラットの腹膜をホモジナイズして検体を採取して、ウェスタンブロット法で各種インテグリン蛋白や ECM 蛋白、細胞接

着斑蛋白の発現を検討する。

### (4) 培養線維芽細胞でのインテグリンの発現の検討

腹膜構成細胞である腹膜線維芽細胞を培養し、線維化を促進するサイトカイン Tumor growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) で刺激して、インテグリン、コラーゲン I の蛋白発現の変化についてウェスタンブロット法を用いて検討する。

### (5) TGF- $\beta$ 刺激による培養線維芽細胞の機能変化の検討

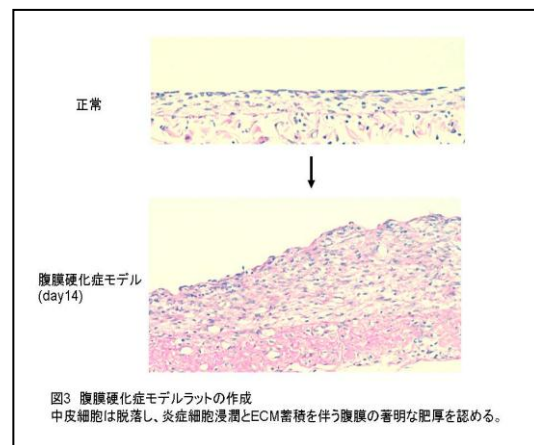
培養線維芽細胞を TGF- $\beta$  で刺激し、コラーゲンゲル収縮能、スクラッチアッセイを用いて細胞遊走能の変化を検討した。さらにインテグリン発現の変化についてフローサイトメトリー法を用いて検討した。

### (6) 培養腹膜中皮細胞のインテグリンの発現に関する検討

もう一つの腹膜構成細胞である腹膜中皮細胞を培養し、TGF- $\beta$  で刺激し、 $\alpha$ SMA の発現、コラーゲン産生能、インテグリンの発現に関して検討した。

## 4. 研究成果

(1) 0.1%クロルヘキシジン+15%エタノールを腹腔内投与して作成した腹膜硬化症ラットでは腹膜の中皮細胞が脱落して、中皮下組織では線維芽細胞が増生して、ECM 蛋白が増加した。マクロファージなどの炎症細胞の浸潤が見られた。



### (2) 免疫組織学的検討

腹膜硬化症ラットの腹膜では正常と比較して、腹膜中皮細胞の剥離や腹膜中皮下結合織の肥厚が観察された。ECM 蛋白の Collagen I ファイブロネクチンの染色が増強すると

ともに  $\alpha 1 \beta 1$  インテグリン、 $\alpha 5 \beta 1$  インテグリンの発現も増強していた。細胞接着斑蛋白 Hic-5 の発現も増加した。TGF- $\beta$  および間葉系のマーカーである  $\alpha$  SMA 染色も増加していた。

(3) 腹膜硬化症ラットの腹膜を採取し、ウェスタンブロット法を行った。正常と比較すると  $\beta 1$  インテグリンの発現増加が見られた。コラーゲン I、ファイブロネクチン蛋白も増加していた。 $\alpha$  SMA の発現も増強していた。細胞接着斑蛋白の Hic-5 の発現も増加していた。

(4) TGF- $\beta$  で培養腹膜線維芽細胞を刺激してウェスタンブロット法でインテグリン蛋白の発現の変化などを検討した。TGF- $\beta$  刺激によって時間依存性、容量依存性に線維芽細胞の  $\alpha$ -SMA の発現が増強した。また、同様に  $\alpha 1 \beta 1$  インテグリン及び  $\alpha 5 \beta 1$  インテグリンの発現も増強した。細胞接着斑蛋白 Hic-5 の蛋白発現も TGF- $\beta$  刺激によって増強した。

#### (5) TGF- $\beta$ 刺激による培養線維芽細胞の機能変化の検討

培養線維芽細胞を TGF- $\beta$  で刺激すると、コラーゲンの収縮能が容量依存性に増加した。またスクラッチアッセイにおいて TGF  $\beta$  を加えると、線維芽細胞の遊走能の増加が観察された。蛍光抗体方法でインテグリン抗体を加えてフローサイトメトリーで発現を検討したところ、TGF- $\beta$  で刺激することによって培養線維芽細胞の  $\alpha 1 \beta 1$  インテグリン及び  $\alpha 5 \beta 1$  インテグリンの発現が増強した。

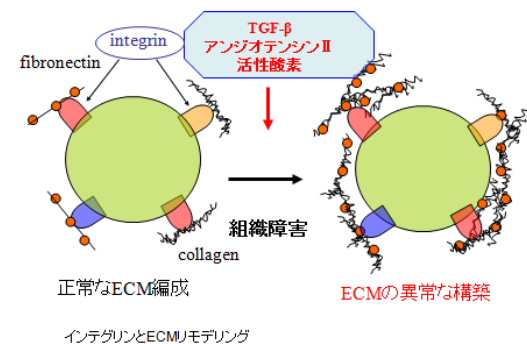
#### (6) 培養腹膜中皮細胞のインテグリンの発現に関する検討

培養腹膜中皮細胞を TGF- $\beta$  で刺激したところ Western Blot で間葉系のマーカーの  $\alpha$  SMA の発現が見られ、上皮間葉転換 (Epithelial mesenchymal transition EMT) が起こっているものと考えられた。さらに TGF- $\beta$  刺激後の培養上清を調べるとコラーゲン I 蛋白の増加が見られた。 $\alpha 5 \beta 1$  インテグリンの発現も増強していた。

以上の結果から腹膜硬化症の発症および進展の過程で TGF- $\beta$  の産生が亢進しており、この過剰な TGF- $\beta$  によって誘導される  $\beta 1$  インテグリンの発現が増強した腹膜線維芽細胞の形質変化が生じ、 $\alpha$  SMA を発現する筋線維芽細胞に変化して Collagen I を中心とした異常な ECM 産生が亢進しているものと考え

られた。さらに TGF- $\beta$  の刺激後にコラーゲンの収縮能が高まっていたことから、この  $\beta 1$  インテグリン発現が強くなった phenotype の線維芽細胞は異常な ECM リモデリングを生じることが示唆された。一方中皮細胞は TGF- $\beta$  刺激で EMT を引き起こし、 $\alpha$ -SMA 陽性の Fibroblast 様の細胞に変化し、 $\beta 1$  インテグリンの発現を増強させて ECM 産生を増強するようになった。In vitro のデータのみであるが、中皮細胞はアポトーシスを起こして脱落するのみでなく一部は EMT を起こして間葉系細胞に変化して腹膜の線維化に寄与している可能性が示唆された。

インテグリンは細胞内への情報伝達や形質の変化の制御にも働いていると考えられるが、 $\alpha$ -SMA 陽性を示す間葉系の形質を維持するよう働くと考えられる細胞斑蛋白 Hic-5 もインテグリンの発現増強に応じて、腹膜硬化症



の腹膜組織で発現増強していたことも興味深い。インテグリンからの情報伝達を受けて発現が増強される Hic-5 も組織学的マーカーあるいは治療標的となりうる可能性が示唆された。

アンジオテンシン受容体拮抗薬の腹膜透析投与が腹膜硬化症モデルで実験的に試みられているが、アンジオテンシン受容体拮抗薬はアンジオテンシン II を介して TGF- $\beta$  の産生を抑制すると言われており、これによってインテグリンの発現が抑制されて、過剰な ECM 産生・異常な ECM の再構築が抑えられているメカニズムも関与している可能性が示され、今後の検討課題としたい。

インテグリンを標的とした治療実験や抑制実験あるいは過剰発現実験が今回の検討では行っていないために  $\beta 1$  インテグリンが腹膜硬化症の進行に相関していることを示した段階にとどまっている。

腹膜硬化症の発症メカニズムは未だ不明な点が多く、透析液の工夫やステロイド投与など治療も限られているため、さらに研究・

知見の集積によって、より安全で効率的な腹膜透析管理が行われるようになることが望ましい。

#### 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 0 件)

[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 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

須賀 健一 (SUGA KENICHI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス

研究部・非常勤講師

研究者番号 : 7051335

: