

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461263

研究課題名(和文) 腹膜線維化における酸化ストレス依存的Wntシグナル伝達制御機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of oxidative stress-dependent Wnt signaling pathway in the peritoneal fibrosis

研究代表者

佐々木 環 (Sasaki, Tamaki)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：30187124

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：長期腹膜透析は、最終的に腹膜線維につながり腹膜機能不全および構造的変化を引き起こす。しかし、腹膜線維化の詳細なメカニズムは解明されていない。Wnt / カテニンシグナル伝達経路、内皮一酸化窒素合成酵素(eNOS)-NOシグナル伝達経路は、臓器の線維化の進行に寄与する。今回、腹膜の線維化過程において、二つの重要なメカニズムを示した。まず、酸化ストレス下で腹膜におけるWnt / カテニン経路は活性化され、腹膜の線維化を促進した。第二に、eNOSの-NOシグナル伝達経路の破壊は、創傷治癒を遅延させることにより、腹膜線維化を悪化させる。これらの結果は、腹膜線維症の予防のために有用な治療法になり得る。

研究成果の概要(英文)：Long-term peritoneal dialysis causes peritoneal dysfunction and structural alterations, eventually leading to peritoneal fibrosis. However, the detailed mechanisms underlying the peritoneal fibrosis process have not been elucidated. Activation of the wnt/ -catenin signalling pathway has been suggested to play a pivotal role in the development of organ fibrosis. Furthermore, the endothelial nitric oxide synthase (eNOS)-NO signalling pathway may have contributed to the progression of organ fibrosis. We found out two important mechanisms underlying peritoneal fibrosis. First, under oxidative stress, the Wnt/ -catenin pathway in the peritoneum is activated with an increase of TGF- , and mesothelial cells are transformed, accompanied by the effect on the cell cycle to promote peritoneal fibrosis. Second, disruption of the eNOS-NO signalling pathway exacerbates peritoneal fibrosis by delaying wound healing. These results may be a useful therapy for the prevention of peritoneal fibrosis.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：腹膜線維化 Wnt/ -cateninシグナル 酸化ストレス eNOS Klotho

1. 研究開始当初の背景

CAPD (腹膜透析) 療法は半透膜の性質を持つ生体の腹膜を使用する。そのため腹膜は生体不適合性の悪い透析液に曝露され、腹膜中皮細胞の露出・剥離や、最終的には組織線維症および機能的に限外濾過不全が引き起されることがある。この過程の詳細な機序は、解明されていない。加齢に伴う組織線維化は、様々な臓器で認められる。高齢マウスの骨格筋では一部が線維組織に置き換わる。そこでは、骨格筋が筋原性形質から線維形成性形質への形質変換が生じ、線維組織への変換が生じている。Brack らは、この転換が Wnt シグナル伝達経路の活性化と関連し、Wnt 阻害剤により線維化が抑制されることなどを明らかとした (Brack AS, Conboy MJ, Roy S, et al. Science 317:807-10, 2007)。この結果は、加齢に伴う組織線維化では、Wnt シグナル伝達経路が重要な役割を果たしている可能性を示している。Wnt シグナル伝達経路から腹膜の線維化に関する知見は、他臓器と比べて不十分である。

2. 研究の目的

本研究は、腹膜線維化進行機序・治療標的に対する我々の仮説「腹膜中皮細胞の Wnt/ β -catenin シグナル活性化に關する酸化ストレス制御は線維化進展に対する新たな治療法開発の標的となる」を証明するため検討を行った。

Wnt/ β -catenin シグナル伝達系と中皮細胞形質変換 (EMT): 腹膜の線維化は、腹膜機能低下の規定因子であり、中皮細胞形質変換 (EMT) は、線維化初期過程において重要な役割を果たしている。EMT 及び組織線維化には Wnt シグナル活性化が關する。主として腎遠位尿管で産生される抗老化蛋白 Klotho は Wnt 活性抑制作用を有することから、「Klotho 蛋白は腹膜線維化過程において Wnt シグナル系抑制により EMT を抑制し、線維化抑制に働き、腹膜保護作用を発揮する」との仮説を立て検証した。

Wnt/ β -catenin シグナル伝達系と腹膜線維化: マウス腹膜線維化モデルでの酸化ストレス変化に対する Wnt/ β -catenin シグナル伝達系変化と腹膜線維化の關連を明らかとする。既に Wnt/LacZ レポーターマウスを用い尿管結紮モデル腎線維化時に尿管細胞において Wnt シグナル伝達系が活性化していることを確認している。このマウスを用いて、腹膜線維化モデルに応用し検討した。

内皮型一酸化窒素合成酵素 (eNOS) -NO 経路と腹膜線維化: 末期腎不全患者では血管の内皮機能障害が随伴し、血管内皮障害・一酸化窒素 (NO) 産生低下が腎不全進展に一定の役割を担っていることを報告した。さらに、NO は EMT を抑制的に制御しており、NO の低下が諸臓器の創傷治癒を遅延させることも示されている。以上より、血管内皮機能障害に起因する eNOS-NO 経路の破綻が、腹膜 EMT を促進し腹膜肥厚・線維化を増悪させるかどうかを検討した。

3. 研究の方法

Wnt/ β -catenin シグナル伝達系と中皮細胞形質変換 (EMT): Klotho 過剰発現マウス (KLTg) 及び Wnt 制御下に β -galactosidase 遺伝子を発現するレポーターマウス (BAT-LacZ) を交配させ KLTg/LacZ マウスを作成した。長期留置ポートを皮下に埋設し、連日高糖濃度 (4.25%ブドウ糖含有) の透析液を 4 週間注入し、腹膜線維化を惹起するモデルを作成した (PD)。生理食塩水を注入するコントロールを対照とした (Saline) とした。線維化過程での Wnt シグナル系活性化と Klotho 蛋白の腹膜線維化に対する効果を検討した。

Wnt/ β -catenin シグナル伝達系と腹膜線維化: Wnt 制御下に β -galactosidase 遺伝子を発現する Wnt レポーターマウス (BAT-LacZ) を用いた。マウス腹腔内にカテーテルを挿入し、生理食塩水投与群 (Saline)、4.25%ブドウ糖含有 PD 液投与群 (PD) を設定し、連日注液を行った。一部のマウスには Wnt 阻害薬 (ICG001; 5 mg/kg/day) を同時に腹腔内投与した (Saline/ICG001 と PD/ICG001)。4 週間の投与後に屠殺し、腹膜組織を検討した。

内皮型一酸化窒素合成酵素 (eNOS) -NO 経路と腹膜線維化: eNOS 遺伝子欠損マウス (eNOSKO) 及び野生型 C57/BL6J マウス (WT) を使用した。腹膜剥離 (PS) による腹膜線維化モデルを作成し、対照群には偽手術 (sham) を施行した。WT-PF、WT-sham、eNOSKO-PF、eNOSKO-sham の 4 群を作成し 4 週間後に屠殺し評価した。さらに eNOS-NO 経路の下流に存在する可溶性グアニル酸シクラーゼ (sGC) 刺激薬 Bay41-2272 を投与し、eNOS-NO 経路活性化による腹膜障害抑制効果を検討した。

4. 研究成果

Wnt/ β -cateninシグナル伝達系と中皮細胞形質変換 (EMT): PD 液注入 28 日後に腹膜中皮細胞に一致して Wnt 活性化(LacZ 染色) (図 1)と中皮細胞 EMT(α -SMA 発現増加: data は省略)を認めた。

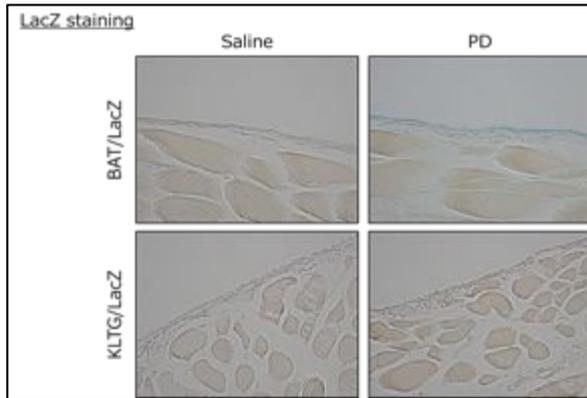


図 1 Wnt 活性化を示す LacZ 染色

また, PD 投与の腹膜組織では, Wnt シグナルの下流に存在する β -cateninの蛋白レベルでの発現量が増加しており, KLTG-LacZ の PD 投与群の腹膜組織では有意差をもって抑制されていた(図 2)。 β -catenin の標的遺伝子 (C-Myc, Cyclin D1) の発現量も増加していた (data は省略)。また, PD 投与の腹膜組織では, Wnt シグナルの下流に存在する β -cateninの蛋白レベルでの発現量が増加しており, KLTG-LacZ の PD 投与群の腹膜組織では有意差をもって抑制されていた(図 2)。 β -catenin の標的遺伝子 (C-Myc, Cyclin D1) の発現量も増加していた (data は省略)。

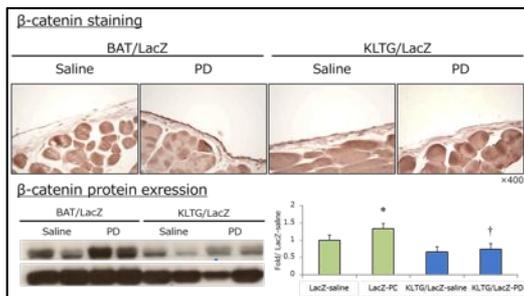


図 2 β -catenin の蛋白レベルでの発現とその局在

さらに PD 投与群では,癒着を伴う腹膜線維化の進行を認めたが, KLTG-LacZ の PD 投与では,線維化増悪が改善されていた (図 3)。

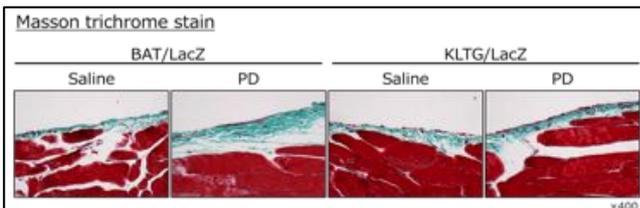


図 3 Masson 染色による腹膜組織障害の比較

Wnt/ β -cateninシグナル伝達系と腹膜線維化: PD 群で腹膜肥厚 (HE 染色) 及び線維化 (Masson 染色) の増悪を認めた。この腹膜組織変化は, PD/ICG001 投与群で抑制されていた (図 4)。

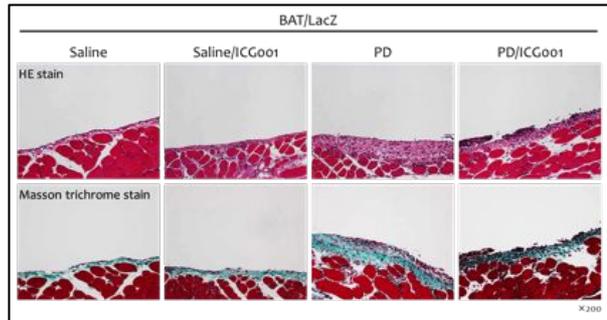
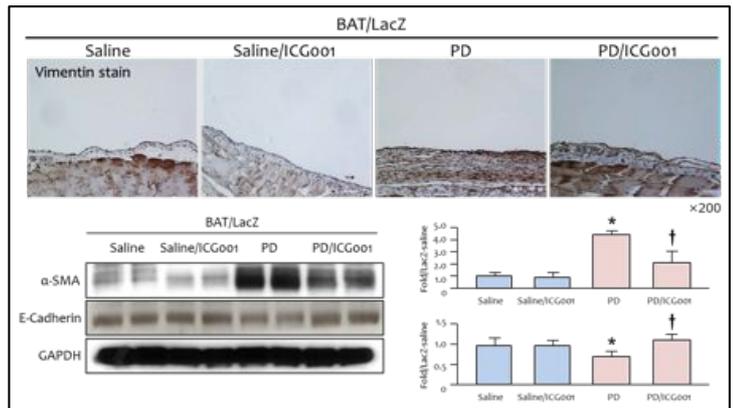


図 4 Masson 染色による腹膜組織障害の比較

さらに TGF- β の mRNA レベルでの発現量は, Saline 群に比して PD 群の腹膜組織で優位に増加しており PD/ICG001 投与群で抑制されていた (data は省略)。

EMT マーカーである α -SMA, vimentin および E-Cadherin を蛋白レベルで評価したところ Saline 群に比して PD 群の腹膜組織で優位に増加しており PD/ICG001 投与群で抑制されていた (図 5)。



* $p < 0.05$ versus LacZ-saline. † $p < 0.05$ versus LacZ-PD.

図 5 α -SMA, vimentin および E-Cadherin の発現

PD 投与群の腹膜中皮細胞に一致して Wnt 活性化 (β -gal 活性) を認めたが, PD/ICG001 投与群で抑制されていた。さらに PD 投与群で認められていた β -catenin 及び β -catenin 標的遺伝子 (Cyclin D1) の発現増加も PD/ICG001 投与群で抑制されていた (data は省略)。

内皮型一酸化窒素合成酵素 (eNOS) -NO 経路と腹膜線維化: WT-PS マウスの腹膜肥厚は, WT-sham マウスと比較して 3 日目で最大となり 7 日目には, 腹膜表層を被覆する中皮細胞下に線維化・肉芽形成を認めた。腹膜肥厚・線維化は, 14 日, 28 日目で経時的に徐々に消退した (図 6)。

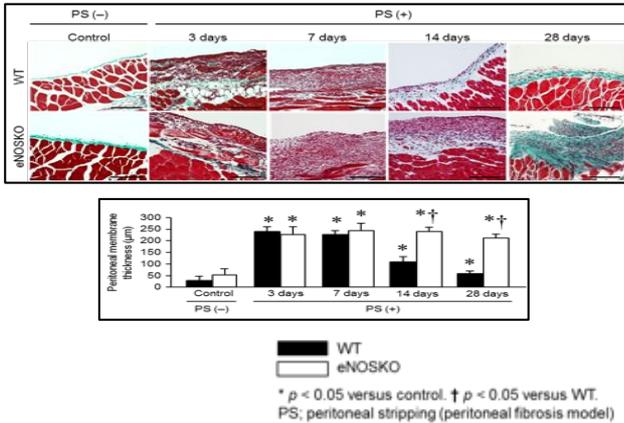


図 6 Masson 染色による腹膜組織の肥厚・線維化の比較

eNOSKO-PS マウスでは, WT-PS と比較して腹膜肥厚度はさらに増強しており肥厚腹膜組織に vimentin 陽性細胞数増加を認めた。また, Cytokeratin 陽性細胞の出現時期も WT-PS マウスに比較して遅延していた。eNOSKO マウスの腹膜肥厚及び線維化は, 増強しており間葉系細胞 (vimentin) 数の増加を認めた (data は省略)。 α -SMA および Collagen1a1 を mRNA レベルで評価したが, 腹膜組織学的評価と同様に eNOSKO マウスにおいてその発現量は増加し遷延していた (data は省略)。eNOS-NO 経路の下流に存在する可溶性グアニル酸シクラーゼ (sGC) 刺激薬 Bay41-2272 を腹腔内投与し, 腹膜間葉系細胞増殖及び腹膜肥厚・線維化を有意に抑制し, 野生型マウスと同程度の治癒過程を示した (図 7)。

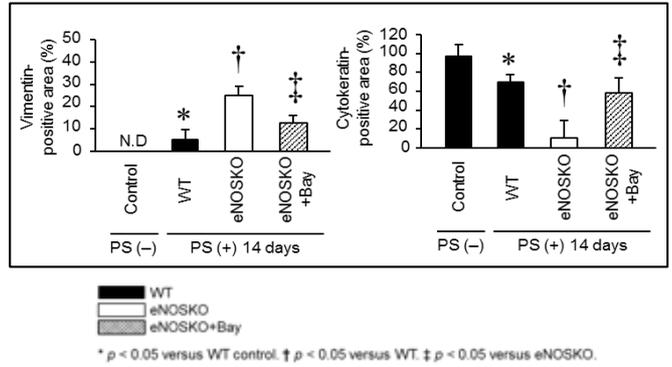
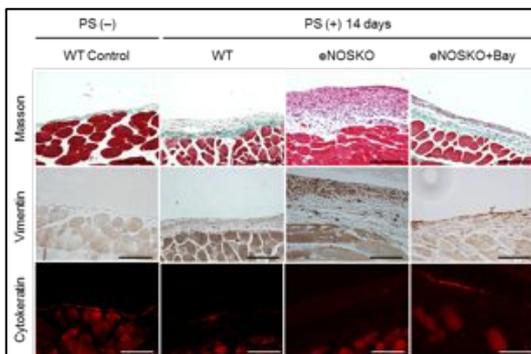


図 7 可溶性グアニル酸シクラーゼ (sGC) 刺激薬 Bay41-2272 投与による腹膜組織障害の比較

5. 考察 (まとめ)

酸化ストレス下では, 腹膜中皮細胞において Wnt/ β -catenin 経路が活性化し, TGF- β の増加, また中皮細胞形質変換, あるいは細胞周期への影響を介して腹膜線維化を促進する。eNOS-NO-cGMP の下流には, protein kinase (PKG) が存在しており, 同酵素は β -catenin を直接的にリン酸化しプロテアソーム系で分解することが報告されている。内皮機能障害に伴い, eNOS 経路が抑制され PKG 活性が低下した結果, β -catenin が蓄積し線維化が進展した可能性がある。すなわち, 腹膜における eNOS-NO 経路の活性化は, 腹膜線維化を減弱できる新たな治療ターゲットとなりうる。

6. 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 1 件)

Kadoya H, Satoh M, Nagasu H, Sasaki T, Kashiwara N. Deficiency of endothelial nitric oxide signaling pathway exacerbates peritoneal fibrosis in mice. Clin Exp Nephrol. 19: 567-75, 2015. doi: 10.1007/s10157-014-1029-3. 査読あり

〔学会発表〕(計 4 件)

角谷裕之、佐藤稔、佐々木環、柏原直樹。腹膜線維化過程における wnt/ β -catenin 経路抑制効果の検証。第 60 回日本透析医学会学術集会 2015 年 6 月 27 日 神奈川県横浜市 パシフィコ横浜

角谷裕之、佐藤稔、板野精之、内田篤志、佐々木環、柏原直樹。腹膜線維化進展過程における wnt/ β -catenin 経路活性化の関与の解明。第 58 回日本腎臓学会学

術総会 2015年6月5日 愛知県名古屋
市 名古屋国際会議場

Kadoya H, Satoh M, Sasaki T,
Kashihara N. Klotho Overexpression
Attenuates Peritoneal Fibrosis via
Suppression of Wnt/ β -Catenin
Signaling Pathway in Mice. ASN
KIDNEY WEEK 2014. 2014年11月
15日 Philadelphia, PA, USA
Pennsylvania Convention Center

角谷裕之、佐藤稔、佐々木環、柏原直
樹. wnt/ β -catenin シグナル死魚を介し
た Klotho 蛋白の腹膜保護効果の検討.
第57回日本腎臓学会学術総会 2014年
7月4日 神奈川県横浜市 パシフィコ
横浜

〔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
<http://www.kawasaki-jinzo.net/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者
佐々木 環 (SASAKI TAMAKI)
川崎医科大学・医学部・教授
研究者番号：30187124

(2) 研究分担者
藤本 壮八 (FUJIMOTO SOUHACHI)
川崎医科大学・医学部・講師
研究者番号：00319948

春名 克祐 (HARUNA YOSHISUKE)

川崎医科大学・医学部・講師
研究者番号：40341094

佐藤 稔 (SATO MINORU)
川崎医科大学・医学部・准教授
研究者番号：70449891