

[研究助成論文]

高糖濃度下でのヒト腹膜中皮細胞と線維芽細胞における塩基性線維芽細胞増殖因子の役割と prednisolone の効果について

(平成 11 年度日本透析医会研究助成報告書)

頼岡徳在* 尾形 聡* 土谷晋一郎** 原田 知** 辰川自光**

要 約

CAPD 患者における腹膜線維症の発症・進行機序および予防法を検索するため、ヒト腹膜中皮細胞 (HPMC) とヒト腹膜線維芽細胞 (HPFB) を培養し、高糖濃度下でのこれら細胞における塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) の役割と prednisolone の効果について検討した。reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法と免疫細胞化学にて HPMC に糖質コルチコイド受容体を認めた。半定量 RT-PCR 法では高糖濃度下 (4.0%) でコントロール (0.1%) に比し 2.5 倍の bFGF mRNA の発現を認め、この効果は $1 \mu\text{M}$ の prednisolone で 85% 抑制された。同様に ELISA 法では上清の bFGF 蛋白は 1.5 倍に増加し、45% 抑制された。これらの prednisolone の効果は糖質コルチコイド受容体アンタゴニスト (RU486, $100 \mu\text{M}$) により減弱した。高糖濃度 (4.0%) 下 HPMC 上清は、HPFB 増殖能を 1.9 倍増加させ、この効果は prednisolone ($1 \mu\text{M}$) で 85% 抑制され、抗 bFGF 中和抗体 ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) で 136% 抑制された。

以上より、CAPD 患者の腹膜線維症発症原因の一つとして bFGF の関与が考えられたが、prednisolone により発症を予防できる可能性が示唆された。

はじめに

CAPD が末期腎不全の腎代替療法として登場して以来 20 年以上が経過したが、腹膜の線維化・硬化による腹膜機能低下は今なお重要な問題である。腹膜の線維化は、腹膜炎の有無にかかわらず導入後徐々に

進行する。しかしその発症・進行機序ならびに予防・治療法はまだ確立されたものはない。

そこで本研究では腹膜線維症の発症・進行機序および予防法を検索するため、

- ① ヒト腹膜中皮細胞 (HPMC) に糖質コルチコイド受容体が存在するか、
- ② 高糖濃度下で HPMC から塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) の発現が増加するか、
- ③ HPMC から分泌された bFGF はヒト腹膜線維芽細胞 (HPFB) を増殖させるか、
- ④ prednisolone は HPMC からの bFGF の発現を抑制し、HPFB の増殖を抑制できるか

について検討した。

1 方法

HPMC および HPFB の単離は、転移や腹膜炎のない胃癌手術患者の大網から Stylianou ら¹⁾ および Beavis ら²⁾ の方法に従い行った。得られた細胞はそれぞれサイトケラチン、ビメンチン、第 VIII 因子で免疫染色を行い、ほかの細胞の混入のないことを確認し、HPMC は 1-2 継代目、HPFB は 3-5 継代目の細胞を実験に使用した。なお、検体の採取にあたっては、広島大学医学部倫理委員会の承認を得ており、事前に患者にインフォームドコンセントを行い承諾を得た。

1) HPMC における糖質コルチコイド受容体

HPMC における糖質コルチコイド受容体の存在については mRNA の発現を RT-PCR 法で、蛋白の発現を免疫細胞化学で確認した。

RT-PCR 法：初代 HPMC 1×10^6 個を 60 mm の

dishes で培養し、sub-confluent になったところで total RNA を Chomczynski ら³⁾の方法で抽出した。reverse transcriptase (Rever Tra Ace, Toyobo) と RNase inhibitor (Promega Co.) で逆転写し、sense 5'-TGCAGCAGTGAAATGGGCAA-3', antisense 5'-CGGGGAATTCAATACTCATGGTC-3' の primer を用いて 95 °C 1 分, 56 °C 1 分, 72 °C 2 分, 40 cycle で PCR を行った。PCR 産物は 2% アガロースで電気泳動し、ethidium bromide で発色した。

免疫細胞化学：初代 HPMC 1×10^5 個を cytospin 法でスライドガラスに張り付け、冷アセトンで 10 分固定した。PBS で水和した後、0.3% 過酸化水素で内因性ペルオキシダーゼを処理した。一次抗体は rabbit polyclonal 抗ヒト糖質コルチコイド受容体抗体 (Santa Cruz Biotechnology Inc.) を使用し、Vector 社の kit を用いて avidin-biotin complex (ABC) 法を行い、発色は 3,3'-diaminobenzidine (DAB) で行った。

2) テスト液の調整

テスト液は 10% fetal calf serum (FCS) 添加 M199 培地に、ブドウ糖 (0.1, 1.5, 4.0%), prednisolone (10^{-2} , 10^{-1} , $1 \mu\text{M}$), 糖質コルチコイド受容体アンタゴニスト (RU486; $100 \mu\text{M}$) (Sigma) を用いて計 7 種作成し、4 °C に保存し 3 日以内に使用した。

3) RT-PCR 法による HPMC の bFGF mRNA 半定量

2 継代目の HPMC 1×10^6 個を 60 mm の dishes で培養し、sub-confluent になったところで 2) のテスト液を投与した。6 時間後に 1) と同様の方法で total RNA を抽出し、Maeda ら⁴⁾の方法で semi-quantitative RT-PCR 法を行った。Cycle 数は事前に cycle 数と PCR 産物量の標準曲線を primer 別に作り、25 cycle を採用した。Primer は、bFGF: sense 5'-ATGGCAGCCGGGAGCATCACCACG-3', antisense 5'-TCAGCTCTTAGCAGACATTGGAAG-3', β -actin: sense 5'-GATGCAGAAGGAGATCACTG-3', antisense 5'-AGTCATAGTCCGCCTAGAAG-3' とし、95 °C 1 分, 56 °C 1 分, 72 °C 2 分, 25 cycle で PCR を行った。PCR 産物は 2% アガロースで電気泳動し、

ethidium bromide で発色後、charge-coupled device imaging system (Densitograph AE-6900 MF; Atto) で density を測定し、bFGF/ β -actin 比を解析した。

4) HPMC からの bFGF 蛋白分泌量

24-well dish に 1×10^5 個/well の HPMC を培養し、sub-confluent になったところで各テスト液を投与した。24 時間後に上清を回収し、bFGF 濃度を R & D Systems 社の ELISA kit を用いて測定した。

5) HPMC 上清による HPFB 増殖能の変化

96-well dish で培養し、M199 無血清培地で増殖停止期にした HPFB (5×10^3 個/well) に、上記の 4) で回収した HPMC 上清を $200 \mu\text{l}$ /well ずつ投与した。66 時間後に $1 \mu\text{Ci}$ /well ずつ [³H]-thymidine (Amersham) を投与し、6 時間後に [³H]-thymidine 取り込み試験法で HPFB の増殖能を測定した。4.0% ブドウ糖で培養した HPMC の上清にはさらに bFGF 中和抗体 (10^{-1} , 1, 10 mg/ml, Wako) あるいはマウス IgG (10 mg/ml, Sigma) を添加し同様のことを行った。

6) 統計解析

結果は 3 症例それぞれ 3 回の mean \pm SEM で示し、Student t 検定および Mann-Whitney U 検定を施行した。

2 結果

RT-PCR 法では HPMC に糖質コルチコイド受容体の mRNA の発現を認めた (図 1)。また免疫細胞化学では、HPMC の核を中心に、一部細胞質にも糖質コルチコイド受容体蛋白の発現を認めた (図 2)。

HPMC の bFGF mRNA/ β -actin mRNA の発現量はコントロール (0.1% ブドウ糖) で 0.55 ± 0.05 (mean \pm SEM) であり、糖濃度依存的に増加し 4.0% ブドウ糖で 2.5 倍となった (1.37 ± 0.17) ($p < 0.01$)。この増加は $1 \mu\text{M}$ の prednisolone 添加により 85% 抑制されたが (0.69 ± 0.16) ($p < 0.05$)、prednisolone の効果は $100 \mu\text{M}$ の RU486 により減弱した (1.22 ± 0.14) ($p < 0.05$) (図 3)。

HPMC の bFGF 蛋白の分泌量はコントロール

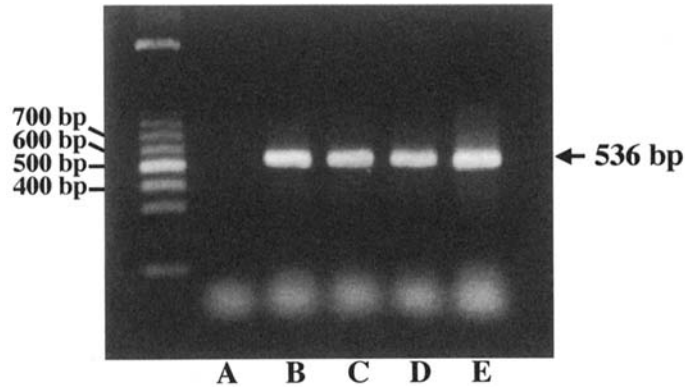


図1 RT-PCR法によるHPMCの糖質コルチコイド受容体 mRNA の発現

PCR産物は矢印(536 bp)の所に現れた。(A)陰性コントロール(逆転写してない抽出したRNA),(B)(C)(D)異なる3例の症例から単離したHPMC,(E)陽性コントロール(ヒト臍静脈血管内皮細胞(HUVEC))

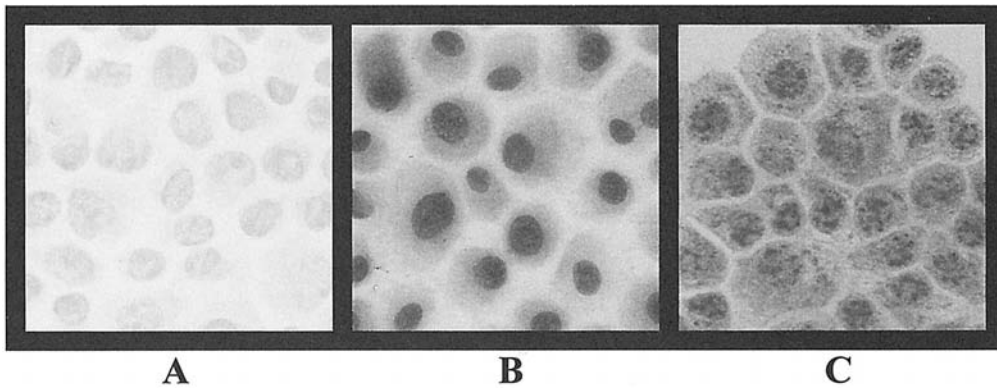


図2 免疫細胞化学(ABC法)による糖質コルチコイド受容体蛋白の発現
(A)陰性コントロール(一次抗体不使用).メチルグリーン核染色施行.
(B)HPMC
(C)陽性コントロール(HUVEC).(DAB,400倍)

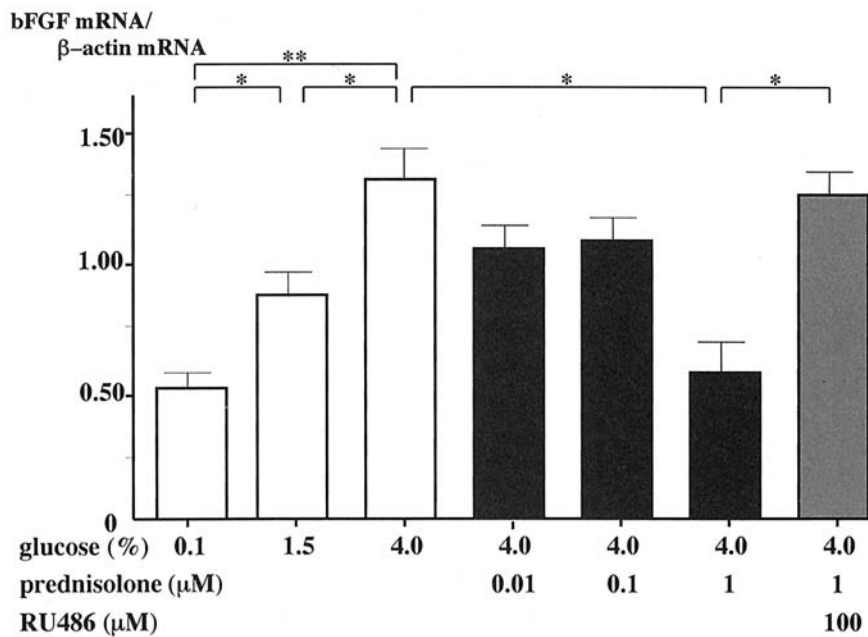


図3 各テスト液による6時間後のHPMC bFGF mRNA の発現
(* $P < 0.05$, ** $P < 0.001$)

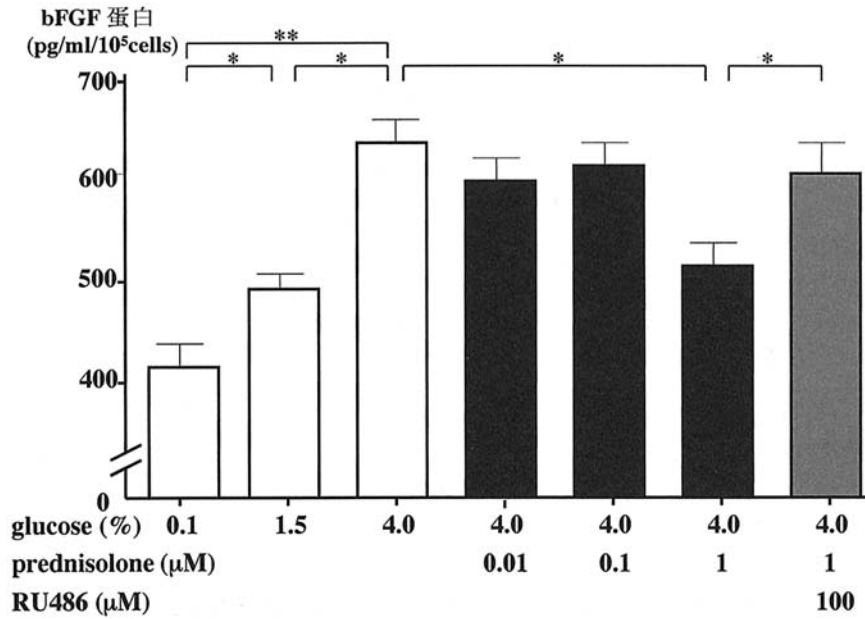


図4 各テスト液による24時間後の上清中 HPMC bFGF 蛋白の発現
(*P<0.05, **P<0.001)

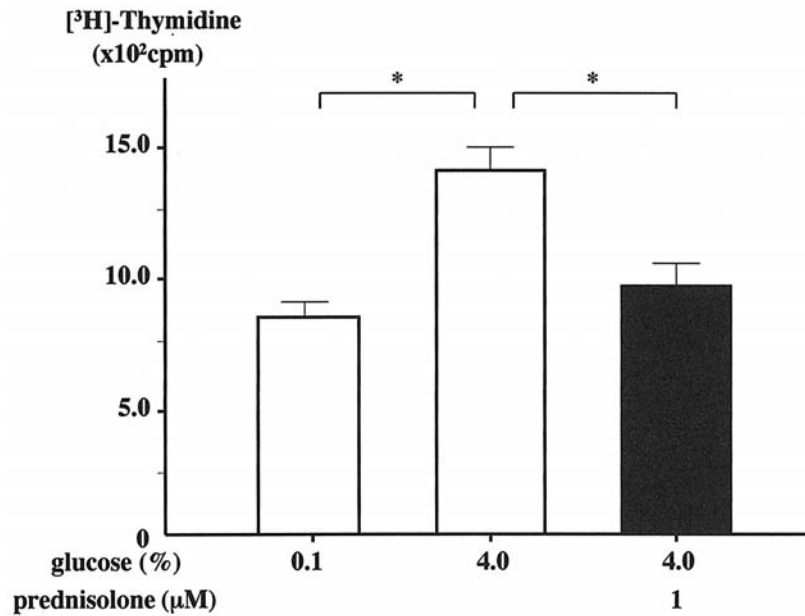


図5 各テスト液投与24時間後のHPMC上清によるHPFBの増殖能の変化
(*P<0.05)

(0.1% ブドウ糖) で 412 ± 35 pg/ml/ 10^5 cells であり, 糖濃度依存的に増加し 4.0% ブドウ糖で 1.5 倍となった (631 ± 29 pg/ml/ 10^5 cells) ($p < 0.01$). この増加は $1 \mu\text{M}$ の prednisolone 添加により 45% 抑制されたが (533 ± 25 pg/ml/ 10^5 cells) ($p < 0.05$), prednisolone の効果は $100 \mu\text{M}$ の RU486 により減弱した (587 ± 106 pg/ml/ 10^5 cells) ($p < 0.05$) (図4).

4.0% ブドウ糖液にて培養した HPMC の上清は

HPFB の増殖能をコントロールに比し 1.9 倍増加させ (14.8 ± 1.1 vs. $7.90 \pm 0.53 \times 10^2$ cpm/ 5×10^3 cells) ($p < 0.05$), この効果は $1 \mu\text{M}$ の prednisolone 添加により 85% 抑制された ($8.92 \pm 1.00 \times 10^2$ cpm/ 5×10^3 cells) ($p < 0.05$) (図5). また同様に抗 bFGF 中和抗体添加により濃度依存的に増殖能は抑制されたが (136% suppression at $10 \mu\text{g/ml}$, $6.77 \pm 0.59 \times 10^2$ cpm/ 5×10^3 cells) ($p < 0.01$), マウス IgG

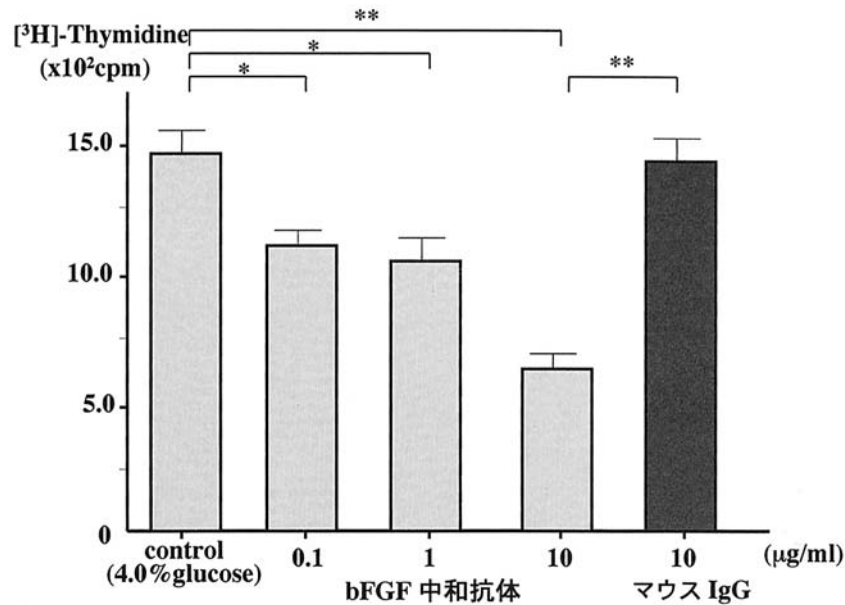


図6 bFGF 中和抗体添加による HPFB の増殖能の変化
(*P<0.05, **P<0.001)

の添加では有意な変化を認めなかった (10 μg/ml, $1.40 \pm 0.12 \times 10^2$ cpm/ 5×10^3 cells) (図6)。

3 考察

腹膜の線維化・硬化の予防には、CAPD 液、device など近年様々な改良がなされている。CAPD 液については、重曹使用による中性透析液の開発やグルコースポリマーの採用、device についてはツイン・バッグ・システムや紫外線による無菌的接続装置などがあげられる。しかし腹膜の線維化・硬化の予防に関する薬物療法の報告は少ない。

腹膜の線維化と bFGF の関係を示す報告は過去にいくつかあるが^{2, 5, 6)}、ブドウ糖濃度と bFGF の関係、bFGF を産生する細胞について示している論文はまだない。また、近年腹膜線維症発症の機序に TGF-β の重要性を強調するいくつかの論文があるが⁷⁻⁹⁾、bFGF の方が TGF-β よりも HPFB の増殖に強く作用するとの報告もあることから¹⁰⁾、われわれは腹膜線維症発症の機序について bFGF の役割を調べた。本研究では、高濃度のブドウ糖存在下で HPMC から bFGF の mRNA 発現量と蛋白の分泌量が濃度依存的に増加することを示したが、これは bFGF の分泌だけでなく生成も増加することを意味し、腹膜の障害に対する修復の調整とリモデリングに bFGF が関与していることが予想される。

糖質コルチコイドと bFGF の関係を示すいくつかの報告があるが、その結果について一定の見解はない。Peifley ら¹¹⁾は血管平滑筋細胞において heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor が bFGF mRNA の発現を誘導するが、この効果は糖質コルチコイドにより抑制されることを示した。しかし PC12 細胞では糖質コルチコイドが bFGF の発現を刺激するが、副腎、心臓、平滑筋、腎臓ではその効果は認められなかったと報告した¹²⁾。本研究では糖質コルチコイドは患者にとって有益であると考えられたが、臓器特異性と副作用については今後さらに詳細な検討が必要である。

糖質コルチコイドの作用には受容体が関与するが、その存在は、単球、メサングウム細胞、マクロファージ、ヒト臍静脈血管内皮細胞などで確認されているが¹³⁻¹⁶⁾、HPMC では確認されていない。今回、HPMC における糖質コルチコイド受容体は、核に強く発現し、細胞質に軽度認められた。これに関しては、ステロイドや FCS の存在下で、糖質コルチコイド受容体はステロイドと結合した後、細胞質から核内に移行することが知られており^{15, 17)}、今回の結果は細胞培養液に FCS が添加されているためと考えられる。

また、本研究では、HPMC が生成・分泌した bFGF が HPFB の増殖能を上昇させることを示したが、これは HPMC の存在する腹膜線維症の初期の段

階について示していることであり、HPMCが脱落し消失する後期のモデルとはなりえない。後期では増殖したHPFBが腹膜線維症の進行に大きく関与し、bFGFもそれに関与すると考えられるが、それは今後の研究課題である。

4 結 語

本研究では、

- ① HPMCには糖質コルチコイド受容体が存在する、
- ② 高濃度ブドウ糖によりHPMCのbFGFの発現が促進される、
- ③ HPMCから分泌されたbFGFはHPFBの増殖を促進する、
- ④ prednisoloneは糖質コルチコイド受容体を介して、HPMCのbFGFの発現を抑制し、HPFBの増殖を抑制する

ことを示した。これらの結果は腹膜線維症の発症にbFGFが関与しており、糖質コルチコイドが腹膜線維症の発症を予防する可能性があることを示唆する。

文 献

- 1) Stylianou E, Jenner LA, Davies M, et al: Isolation, culture and characterization of human peritoneal mesothelial cells. *Kidney Int*, 37; 1563, 1990.
- 2) Beavis MJ, Williams JD, Hoppe J, et al: Human peritoneal fibroblast proliferation in 3-dimensional culture: Modulation by cytokines, growth factors and peritoneal dialysis effluent. *Kidney Int*, 51; 205, 1997.
- 3) Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162; 156, 1987.
- 4) Maeda A, Hiyama K, Yamakido H, et al: Increased expression of platelet-derived growth factor A and insulin-like growth factor-1 in BAL cells during the development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Chest*, 109; 780, 1996.
- 5) Mlambo NC, Hylander B, Brauner A: Increased levels of transforming growth factor β 1 and basic fibroblast growth factor in patients on CAPD: a study during noninfected steady state and peritonitis. *Inflammation*, 23; 131, 1999.
- 6) Lai KN, Lai KB, Lam CWK, et al: Changes of

cytokine profiles during peritonitis in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Am J Kidney Dis*, 35; 644, 2000.

- 7) Kumano K, Schiller-Moran B, Hjelle JT, et al: Effects of high glucose levels on cell proliferation and TGF- β expression in cultured rat mesothelial cells [Abstract]. *J Am Soc Nephrol*, 4; 410, 1993.
- 8) Kumano K, Shimoda M, Hyodo T, et al: TGF- β suppresses peritoneal mesothelial cell growth and enhances fibronectin gene expression [Abstract]. *J Am Soc Nephrol*, 5; 461, 1994.
- 9) Ito T, Yorioka N, Yamamoto M, et al: Effect of glucose on intracellular junctions of cultured human peritoneal mesothelial cells. *J Am Soc Nephrol* (in press).
- 10) Fukasawa M, Campeau JD, Yanagihara DL, et al: Regulation of proliferation of peritoneal tissue repair cells by peritoneal macrophages. *J Surg Res*, 49; 81, 1990.
- 11) Peifley KA, Alberts GF, Hsu DKW, et al: Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor regulates fibroblast growth factor-2 expression in aortic smooth muscle cells. *Circ Res*, 79; 263, 1996.
- 12) Meisinger C, Zeschnigk C, Grothe C: In vivo and in vitro effect of glucocorticoids on fibroblast growth factor (FGF)-2 and FGF receptor 1 expression. *J Biol Chem*, 271; 16520, 1996.
- 13) Cronstein BN, Kimmel SC, Levin RI, et al: A mechanism for the antiinflammatory effects of corticosteroids: The glucocorticoid receptor regulates leukocyte adhesion to endothelial cells and expression of endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 and intercellular adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89; 9991, 1992.
- 14) Spahn JD, Szeffler SJ, Surs W, et al: A novel action of IL-13: Induction of diminished monocyte glucocorticoid receptor-binding affinity. *J Immunol*, 157; 2654, 1996.
- 15) Yan K, Kudo A, Hirano H, et al: Subcellular localization of glucocorticoid receptor protein in the human kidney glomerulus. *Kidney Int*, 56; 65, 1999.
- 16) Salkowski CA, Vogel SN: Lipopolysaccharide increases glucocorticoid receptor expression in murine macrophages: A possible mechanism for glucocorticoid-mediated suppression of endotoxicity. *J Immunol*, 149; 4041, 1992.
- 17) Picard D, Yamamoto KR: Two signals mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor. *EMBO J*, 6; 3333, 1987.