

マウス腹膜線維症モデルにおける HDAC 阻害剤の線維化抑制効果

牟田久美子

長崎大学大学院医歯薬総合研究科

key words : ヒストン修飾, 腹膜線維化, SAHA, エピジェネティクス

要 旨

【背景】長期の腹膜透析療法は、腹膜中皮下組織の線維化を引き起こすが、その機序は明らかになっていない。一方エピジェネティクスは、遺伝子の塩基配列によらない遺伝情報の後天的な発現制御機構であり、中でもヒストンアセチル化は遺伝子の転写を促進することが知られている。近年、ヒストンアセチル化が種々の臓器の線維化に関与していることが明らかとなり、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤がその抑制に有効であると報告されているが、腹膜線維化に対する効果は検証されていない。

【目的】クロールヘキシジングルコネート (CG) 投与による腹膜線維症モデルマウスを作成し、HDAC 阻害剤の suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) の線維化抑制効果を検討する。

【方法】ICR マウスの腹腔内に CG を 3 週間隔日投与して腹膜線維化を惹起した。さらに CG 投与時より SAHA あるいは vehicle を連日皮下投与した。3 週間後に腹膜を採取し、Masson & Trichrome 染色で線維化を評価し、線維化関連因子やヒストンアセチル化については免疫組織化学あるいは real-time RT-PCR で検討した。

【結果】CG 投与により腹膜中皮下組織の肥厚を認めた。SAHA 投与によって腹膜中皮下組織の肥厚は軽減した。fibroblast-specific protein-1 (FSP-1) や α -smooth muscle actin (α SMA) といった線維化関連因子の陽性

細胞数は、CG+vehicle 群に比べて CG+SAHA 群では減少した。ヒストンアセチル化の程度は、CG+vehicle 群と比較して CG+SAHA 群で軽減していた。ヒストンアセチル化によって転写が促進される遺伝子として線維化抑制因子である bone morphogenetic protein 7 (BMP-7) の発現を調べたところ、SAHA 投与によりその発現が亢進していることがあきらかとなった。

【結語】腹膜線維症の治療として、SAHA の臨床応用の可能性が示唆された。

1 研究目的

現在、我が国の慢性透析患者の中で腹膜透析患者の占める割合は約 3% と、1 万人に満たない程度である¹⁾。腹膜透析療法の普及を妨げている一因として、長期間の腹膜透析に伴う腹膜線維症や被嚢性腹膜硬化症の問題がある¹⁾。これらの疾患は生命予後に関わる大きな問題であり、その発症を抑制する治療が必要である。しかし現時点では、腹膜透析による腹膜線維化の進展機序は明らかとなっておらず、有効な治療法は確立されていない。

一方、エピジェネティクスは、近年、癌や生活習慣病といった後天的な多因子疾患に、その異常が重要な役割を果たしている可能性が追究されている²⁾。エピジェネティクスのひとつであるヒストンのアセチル化は遺伝子の転写促進に働き、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ (HAT) と HDAC 活性のバランスにより遺伝子発現を調節している³⁾。このバランスの崩壊

が癌の進行に関わり、HDAC 阻害剤には癌の成長を止める抗癌作用があることが報告された⁴⁾。さらに近年、HDAC 阻害剤が腎臓や心臓等の線維化を抑制するという報告が散見されるようになった^{5,6)}。

腹膜線維化に対する HDAC 阻害剤の有用性を検討した報告はこれまで存在しない。腹膜線維化において HDAC 阻害剤の有用性を示すことができれば、腹膜線維化の進展機序の解明や今後の治療法確立に有益となりうる。本研究では HDAC 阻害剤である SAHA の腹膜線維化抑制効果について検討した。

2 研究方法

①CG 投与によりマウス腹膜線維症モデルを作製し、

SAHA の投与を行った。

具体的には、雄 10 週齢の ICR マウスに、15% エタノール液に溶解した 0.1% CG を 0.2 ml/body、隔日腹腔内投与して腹膜線維化を惹起した。SAHA は、vehicle (dimethylsulfoxide : saline = 1 : 1) に溶解して 25 mg/kg の用量を、CG 投与時より週 5 回連日皮下投与した。

以下の 4 群を作成した。

- CG と vehicle を投与する群 (CG 群)
- CG と SAHA を投与する群 (CG+SAHA 群)
- CG の希釈液である 15% エタノール液と vehicle を投与する群 (Control 群)
- 15% エタノール液と SAHA を投与する群 (15%

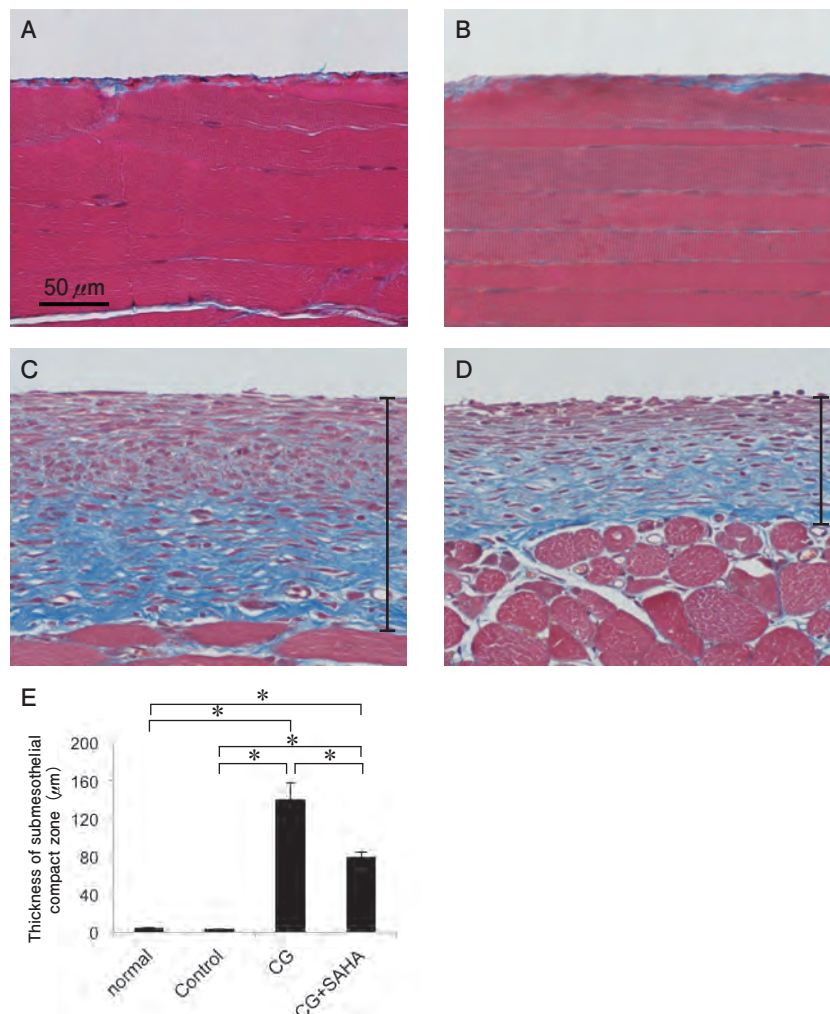


図 1 腹膜組織の Masson's trichrome 染色

(A) 正常のマウスでは、単層の中皮細胞が腹膜表面を覆っていた。(B) control 群の腹膜組織は正常で、中皮下結合組織の肥厚を認めなかった。(C) CG 群のマウスの腹膜組織は、中皮下結合組織の著明な肥厚を示し、多くの細胞浸潤を認めた。(D) SAHA 群では、中皮下結合組織の肥厚が抑制された。(A~D) 200 倍；写真中の棒線は中皮下結合組織の肥厚を示す。(E) 棒グラフは中皮下結合組織の肥厚を示す。値は平均値±標準誤差で示した。*は $p < 0.05$ を示す。

ethanol in saline + SAHA 群)

②CG 投与開始 3 週間後に、マウスを屠殺し壁側腹膜を採取して、パラフィン切片を作成した。

③Masson & Trichrome 染色を行い、画像解析ソフトを用いて、腹膜中皮下組織肥厚の程度を解析した。

④線維化について FSP-1 と α SMA, コラーゲン産生因子に関して Type III collagen, TGF- β シグナルの活性化について Smad 2/3 リン酸化の免疫組織化学で評価した。FSP-1, α SMA, リン酸化 Smad 2/3 は顕微鏡倍率 200 倍にて 1 視野中の陽性細胞数のカウントを行い、Type III collagen に関しては、陽性面積を画像解析ソフトで評価した。

⑤TGF- β シグナルの標的遺伝子である I 型 collagen α 1 鎖 (α CoL1 α 1), fibronectin, collagen tissue growth

factor (CTGF) の発現を、real-time RT-PCR で評価した。

⑥ヒストンアセチル化について免疫蛍光抗体法で評価した。観察は蛍光顕微鏡 (LSM 5 PASCAL; Carls Zeiss Co., Ltd., Germany) を用いた。

⑦線維化抑制因子について、BMP-7 の免疫蛍光抗体法で評価した。BMP-7 陽性細胞数を、腹膜中皮下組織の総細胞数に対する割合で評価した。さらに、real-time RT-PCR により BMP-7 の mRNA の発現を検討した。

⑧マクロファージの増生については F4/80, 新生血管については CD31 の免疫組織化学で評価し、顕微鏡倍率 200 倍にて 1 視野中の陽性細胞数をカウントした。

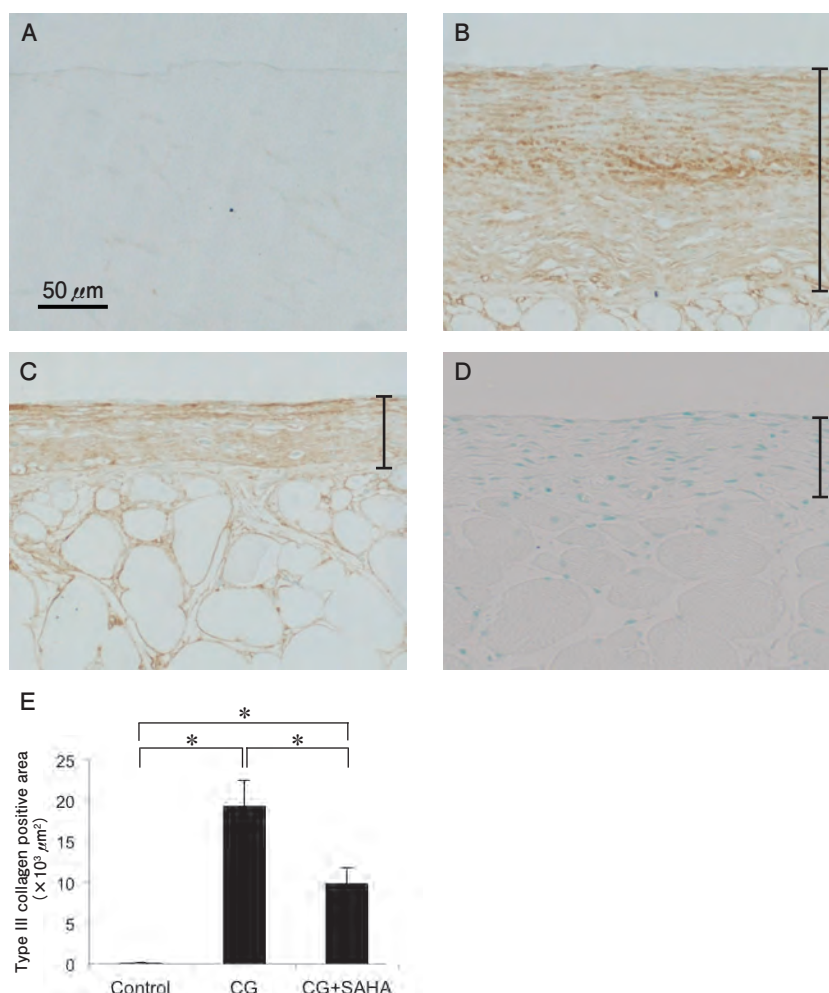


図 2 type III collagen の免疫組織化学的解析

(A) control 群では、中皮下結合組織での type III collagen の発現は正常マウスと同程度だった。(B) CG 群では、type III collagen は中皮下結合組織でびまん性に発現した。(C) CG + SAHA 群では、type III collagen の発現が明らかに減少した。(D) ネガティブコントロールとして、CG + SAHA 群の腹膜組織を正常 IgG で反応させた。(A~D) 200 倍；写真中の棒線は中皮下結合組織の肥厚を示す。(E) 棒グラフは type III collagen 陽性面積を示す。値は平均値 \pm 標準誤差で表示した。*は $p < 0.05$ を示す。

3 結果と考察

CG 群では腹膜中皮下組織の肥厚を認め、多くの細胞浸潤がみられた。一方、CG+SAHA 群では腹膜中皮下組織の肥厚が有意に軽減し、浸潤する細胞数も減

少していた (図 1)。Control 群や 15% ethanol in saline+SAHA 群では腹膜組織はほぼ正常で、腹膜中皮下組織の肥厚は認めなかった。コラーゲン蓄積について、type III collagen の免疫組織化学では、CG 群の腹膜中皮下組織でびまん性に発現を認め、CG+SAHA

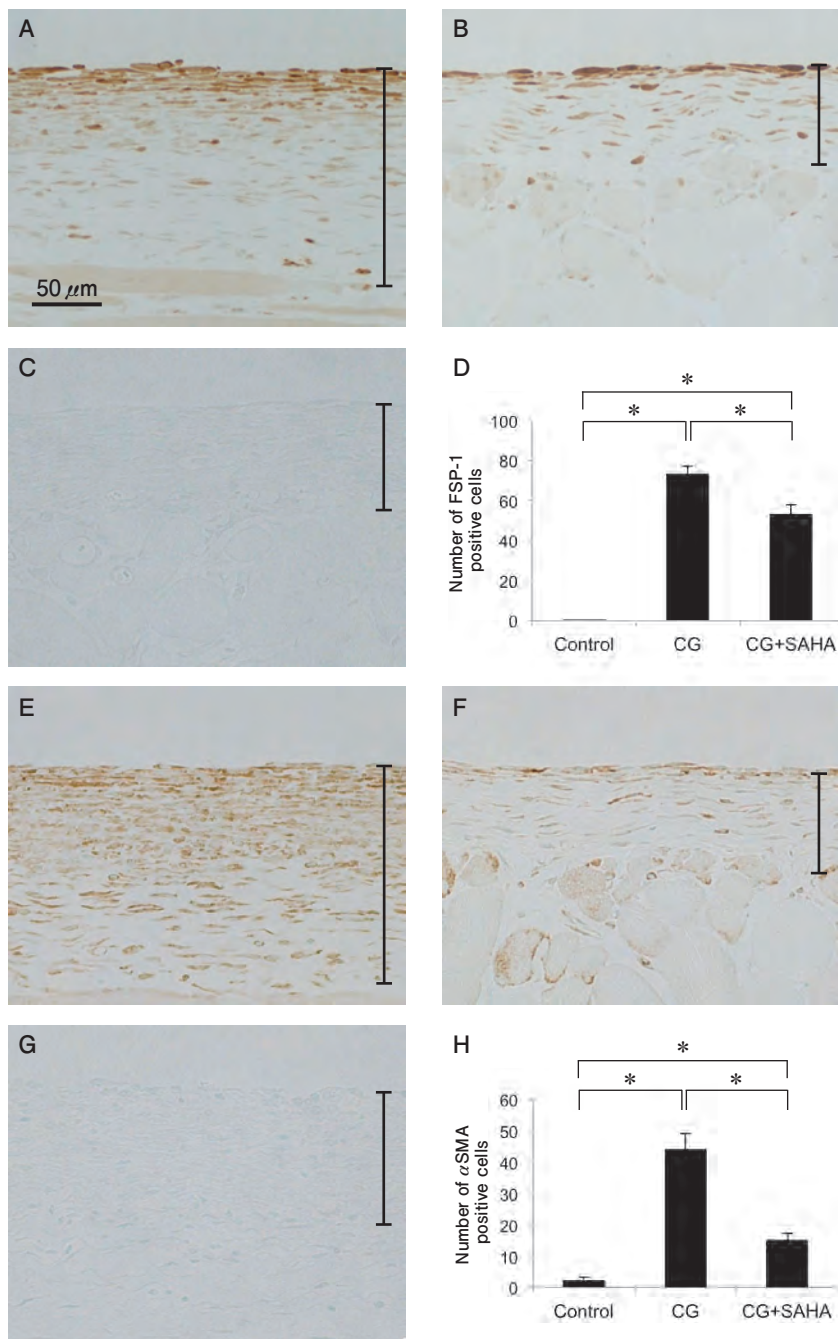


図 3 FSP-1 と α SMA の免疫組織化学的解析

(A) CG 群では FSP-1 陽性細胞数が著明に増加した。(B) CG+SAHA 群では、FSP-1 の発現は抑制された。(C) ネガティブコントロールとして、CG+SAHA 群の腹膜組織を正常 IgG で反応させた。(A~C) 200 倍：写真中の棒線は中皮下結合組織の肥厚を示す。(D) 棒グラフは FSP-1 陽性細胞数を示す。値は平均値 \pm 標準誤差で表示した。*は $p < 0.05$ を示す。(E) CG 群で、 α SMA 陽性細胞数は増加した。(F) CG+SAHA 群で、 α SMA 陽性細胞数は減少した。(G) ネガティブコントロールとして、CG+SAHA 群の腹膜組織を正常 IgG と反応させた。(E~G) 200 倍：写真中の棒線は中皮下結合組織の肥厚を示す。(H) 棒グラフは α SMA 陽性細胞数を示す。値は平均値 \pm 標準誤差で表示した。*は $p < 0.05$ を示す。

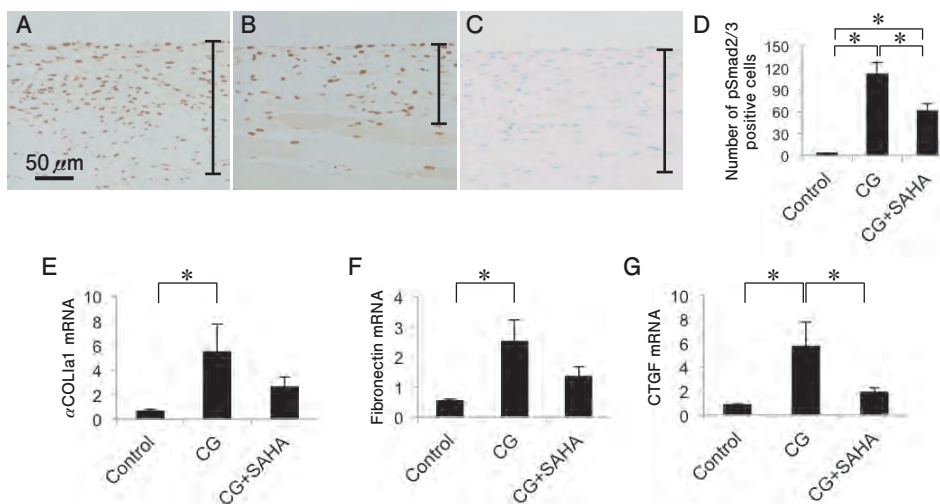


図4 Smad 2/3 リン酸化の免疫組織化学的解析と TGF- β 依存性線維化関連因子の遺伝子発現

(A) CG 群では、多くの Smad2/3 リン酸化陽性細胞を肥厚した腹膜中皮下結合組織で認めた。(B) CG+SAHA 群で、Smad2/3 リン酸化陽性細胞数は有意に減少した。(C) ネガティブコントロールとして、CG+SAHA 群の腹膜組織を正常 IgG で反応させた。(A~C) 200 倍；写真中の棒線は中皮下結合組織の肥厚を示す。(D) 棒グラフは Smad 2/3 リン酸化陽性細胞数を示す。値は平均値 \pm 標準誤差で表示した。*は $p < 0.05$ を示す。(E) αCOL1a1 遺伝子の発現は real-time RT-PCR により、コントロールの β -actin に対する比で測定した。値は control 群に対する比 \pm 標準誤差で示した。*は $p < 0.05$ を示す。(F) *fibronectin* 遺伝子の発現は real-time RT-PCR により、コントロールの β -actin に対する比で測定した。値は control 群に対する比 \pm 標準誤差で示した。*は $p < 0.05$ を示す。(G) *CTGF* 遺伝子の発現は real-time RT-PCR により、コントロールの β -actin に対する比で測定した。値は control 群に対する比 \pm 標準誤差で示した。*は $p < 0.05$ を示す。

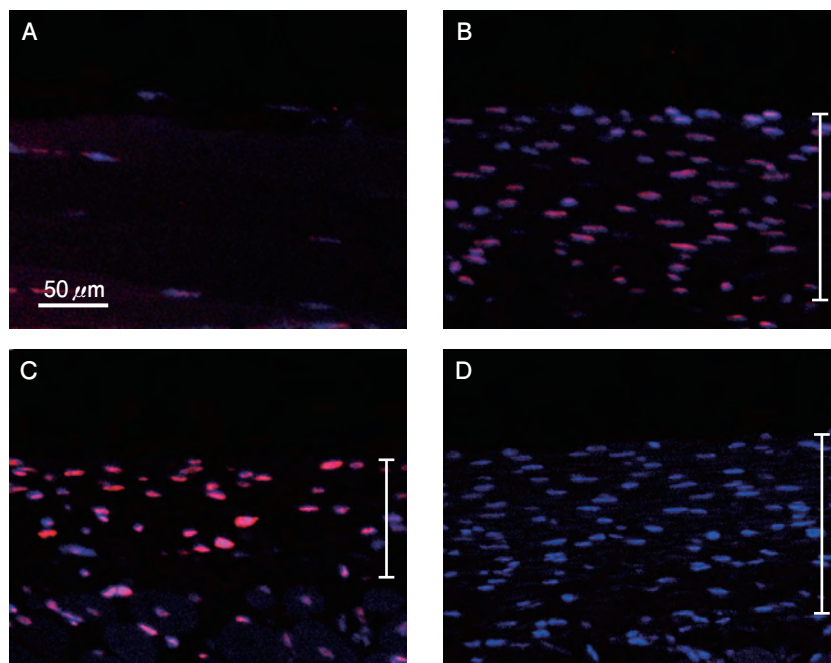


図5 アセチル化 H3K9 の免疫組織化学的解析

(A) control 群の腹膜の細胞ではヒストンアセチル化の程度が低かった。(B) CG 群では、肥厚した腹膜中皮下結合組織で中等度のヒストンアセチル化を示した。(C) CG+SAHA 群では、ヒストンアセチル化の程度が CG 群よりも上昇傾向を示した。(D) ネガティブコントロールとして、CG+SAHA 群の腹膜組織を正常 IgG で反応させた。(A~D) 200 倍；写真中の棒線は中皮下結合組織の肥厚を示す。

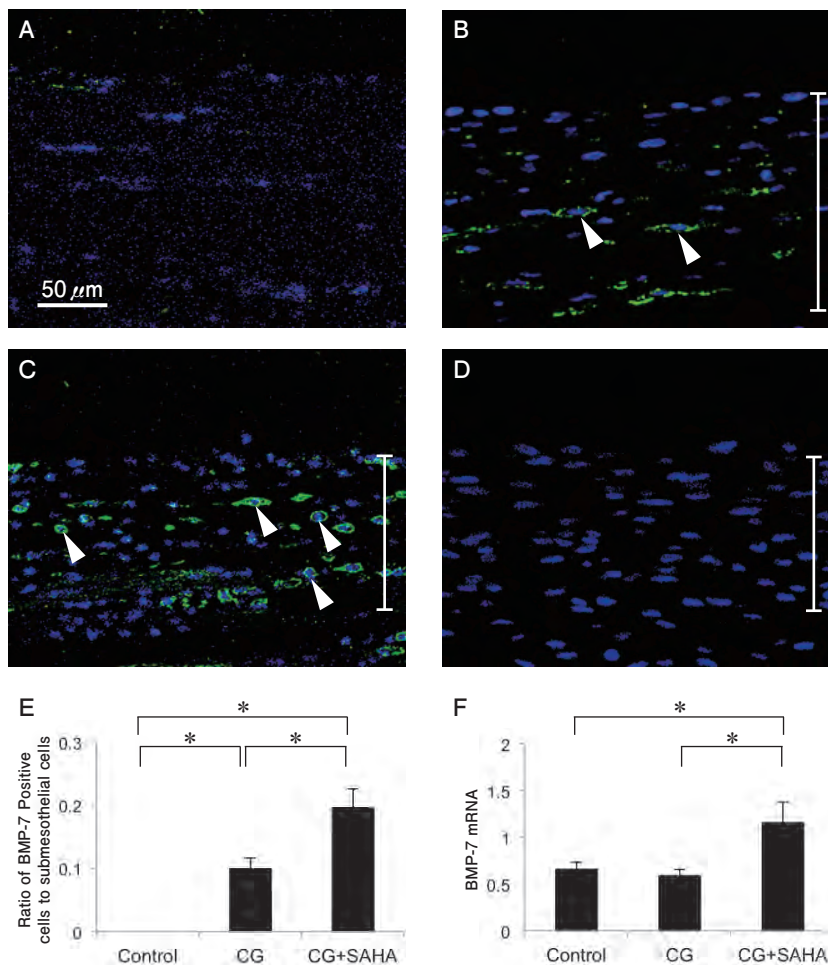


図6 BMP-7の免疫蛍光抗体法

(A) control群では、BMP-7陽性細胞は腹膜でほとんど認めなかった。(B) CG群は腹膜中皮下結合組織で数個のBMP-7陽性細胞を認めた。(C) CG+SAHA群では、BMP-7陽性細胞が増加した。(D) ネガティブコントロールとして、CG+SAHA群の腹膜組織を正常IgGで反応させた。(A~D) 200倍；写真中の棒線は中皮下結合組織の肥厚を示す。(E) 棒グラフはBMP-7陽性細胞数を示す。値は平均値±標準誤差で表示した。*は $p < 0.05$ を示す。(F) *BMP-7*遺伝子の発現はreal-time RT-PCRにより、コントロールの β -actinに対する比で測定した。値はcontrol群に対する比±標準誤差で示した。*は $p < 0.05$ を示す。

群では有意にその発現が減少していた(図2)。線維芽細胞のマーカであるFSP-1の発現を免疫組織化学で評価すると、CG群では陽性細胞数がcontrol群と比較して著明に増加しており、SAHA投与により有意にその発現が抑制されていた(図3)。筋線維芽細胞のマーカである α SMAの免疫組織化学では、CG群に比べてCG+SAHA群では陽性細胞数が有意に減少した(図3)。以上より、SAHAが腹膜線維化を抑制することが明らかとなった。

線維化に重要なTGF- β シグナルについて評価するため、TGF- β シグナルのメディエーターであるSmad2/3のリン酸化を免疫組織化学で評価した。CG群ではcontrol群と比較して有意に陽性細胞が増加してお

り、CG+SAHA群では陽性細胞の減少を認めた(図4)。さらに、TGF- β シグナルの標的遺伝子である α CoL1 α 1, fibronectin, CTGFの発現をreal-time RT-PCRで調べたところ、CG群ではcontrol群と比較して有意にこれらのmRNAの発現が増加していた。一方CG+SAHA群では、 α CoL1 α 1, fibronectin, CTGFのmRNA発現が低下する傾向を認めた。以上より、SAHA投与はTGF- β シグナルを抑制することが示唆された(図4)。

ヒストンアセチル化を免疫蛍光抗体法で評価すると、肥厚した腹膜中皮下組織の細胞で、CG群と比較してCG+SAHA群では、ヒストンアセチル化の程度が強い陽性細胞を多く認めた(図5)。SAHA投与により

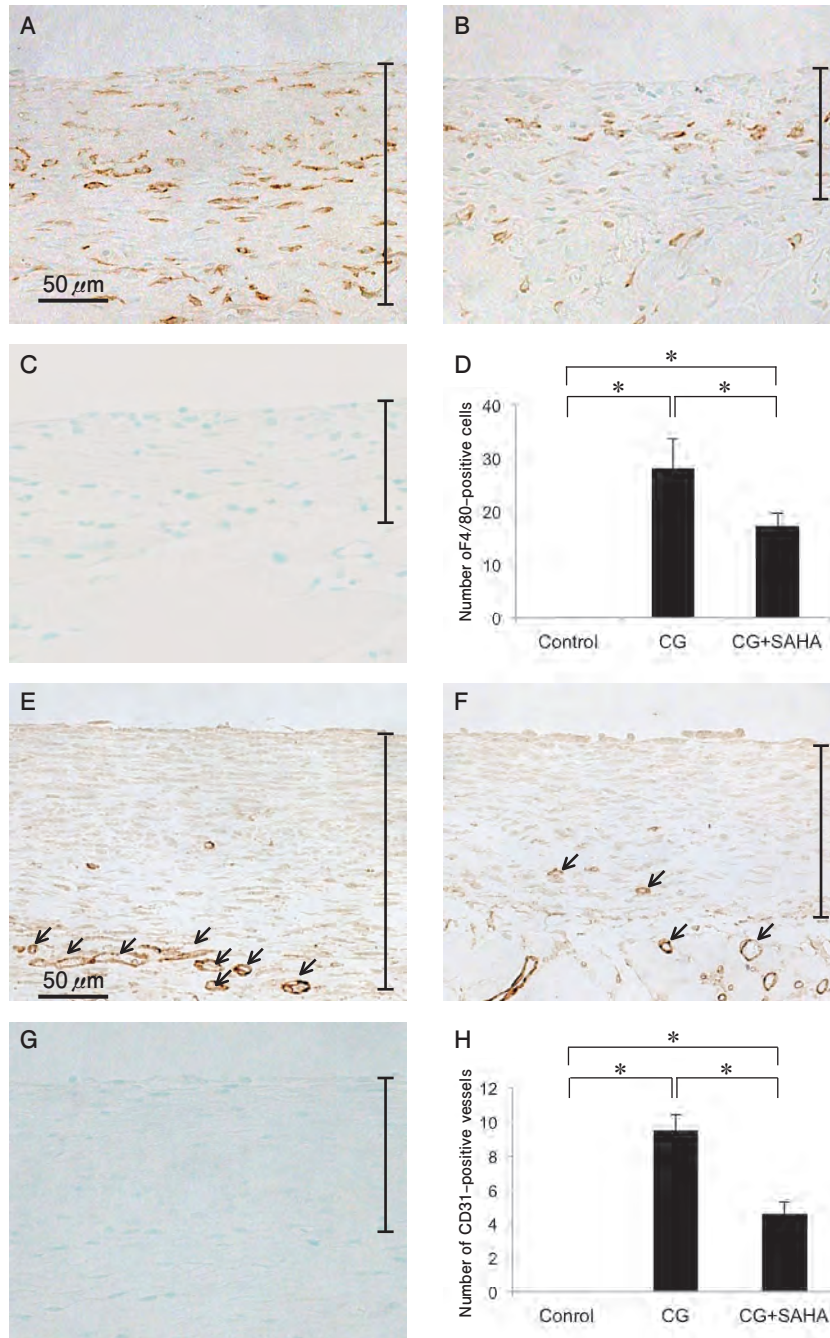


図7 F4/80とCD31の免疫組織化学的解析

(A) CG 群では、肥厚した腹膜中皮下結合組織で多くの F4/80 陽性細胞を認めた。(B) CG+SAHA 群では、F4/80 陽性細胞が有意に減少した。(C) ネガティブコントロールとして、CG+SAHA 群の腹膜組織を正常 IgG で反応させた。(A~C) 200 倍；写真中の棒線は中皮下結合組織の肥厚を示す。(D) 棒グラフは F4/80 陽性細胞数を示す。値は平均値 ± 標準誤差で表示した。*は p<0.05 を示す。(E) CG 群では、CD 31 陽性血管の数が著明に増加した。(F) CG+SAHA 群では CD 31 陽性血管数が減少した。(G) ネガティブコントロールとして、CG+SAHA 群の腹膜を正常 IgG で反応させた。(E~G) 200 倍；写真中の棒線は中皮下結合組織の肥厚を示す。(H) 棒グラフは CD 31 陽性血管数を示す。値は平均値 ± 標準誤差で表示した。*は p<0.05 を示す。

ヒストンアセチル化が亢進することが示唆された。

HDAC 阻害剤投与によるヒストンアセチル化亢進によって転写が促進される因子として、線維化抑制因子である BMP-7 の発現を検討した。免疫蛍光抗体法

では、肥厚した腹膜中皮下組織で CG 群でも BMP-7 陽性細胞をいくつか認めたものの、CG+SAHA 群では有意に BMP-7 陽性細胞が増加していた (図 6)。BMP-7 mRNA の発現は CG 群と比べて CG+SAHA 群

で有意に増加していた (図 6)。以上より、SAHA 投与は BMP-7 の発現を促進することが示された。

さらに、以前より報告されている SAHA の抗炎症作用や抗血管新生作用についても検討した。免疫組織化学で、マクロファージのマーカーである F4/80 陽性細胞と血管のマーカーである CD 31 陽性血管は、CG+SAHA 群で CG 群よりも有意に減少していた (図 7)。つまり、SAHA が腹膜線維化抑制効果を発揮する機序として、ヒストンアセチル化亢進作用以外に、その抗炎症作用や抗血管新生作用の関与も示唆された。

以上の結果から、マウス腹膜線維症モデルにおいて、HDAC 阻害剤の SAHA は線維化を抑制することが明らかとなった。その機序として、SAHA のヒストンアセチル化亢進による BMP-7 の発現促進と抗炎症作用、抗血管新生作用の関与が考えられた。

今後の課題として、CG 投与開始後に SAHA 投与を行う治療的介入には効果があるかどうか、また本実験で使用された SAHA の投与量は臨床適応とされる用量の約 3 倍であり、今回のモデルマウスでは明らかな副作用は認めなかったものの腹膜透析患者で使用する場合の適用量はどのくらいか等、検討が必要である。

4 結 論

マウス腹膜線維症モデルにおいて、HDAC 阻害剤

の SAHA の線維化抑制効果が示唆された。

SAHA 投与により長期間の腹膜透析が可能になった場合、透析患者の社会的活動時間の増加、就労者の場合は就労時間の延長、高齢で寝たきりに近い患者の場合は在宅治療の期間が延長できること、特に心不全を伴うような腎不全患者の生命予後の改善などが期待できる。また本邦における末期腎不全患者で腹膜透析を選択する患者の割合も増加して、医療費の抑制が可能となるかもしれない。

この研究は、平成 24 年度日本透析医会公募研究助成によるものである。

文 献

- 1) Kawaguchi Y, et al. : *Artif Organs*, 19(12); 1204-1209, 1995.
- 2) Dwivedi RS, et al. : *Kidney Int*, 79(1); 23-32, 2011.
- 3) Wiech NL, et al. : *Curr Top Med Chem*, 9(3); 257-271, 2009.
- 4) Marks P, et al. : *Nat Rev Cancer*, 1(3); 194-202, 2001.
- 5) Pang M, et al. : *Am J Physiol Renal Physiol*, 297(4); F996-1005, 2009.
- 6) Iyer A, et al. : *Br J Pharmacol*, 159(7); 1408-1417, 2010.

参考 URL

- ‡1) 日本透析学会ホームページ. <http://docs.jsdt.or.jp/overview/index.html>, 2012