

ヒト腹膜中皮細胞における高グルコース刺激による TGF- β 1 産生は FOS 発現により誘導される

心石敬子 中島 歩 土井盛博 正木崇生

広島大学病院腎臓内科

key words : ヒト腹膜中皮細胞, 高グルコース, DNA マイクロアレイ, TGF- β 1, FOS

要 旨

背景：高グルコース刺激により，transforming growth factor-beta1 (TGF- β 1) が誘導されることは知られているが，その機序はまだ完全には明らかでない。本研究の目的は，ヒト腹膜中皮細胞 (HPMC) で高グルコース刺激による TGF- β 1 産生に関与する遺伝子を究明することである。

方法：DNA マイクロアレイ解析を用いて，通常グルコースと比較して高グルコース刺激により発現量が3倍以上に増加する遺伝子を選定した。それらの遺伝子のうち，遺伝子オンロジー解析で生物学的プロセスの regulation of transcription and being DNA-dependent に分類される転写関連遺伝子を抽出した。その後，small interfering RNA (siRNA) による RNA 干渉を行い，TGF- β 1 mRNA 発現量や TGF- β 1 蛋白産生への関与を検討した。

結果：DNA マイクロアレイ解析で，51 遺伝子が刺激により発現量が3倍以上に増加した。そのうち遺伝子オンロジー解析で13 遺伝子を選出し，quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) で発現量の増加を確認できたものは9 遺伝子であった。9 遺伝子のうち高グルコース刺激による TGF- β 1 mRNA 発現量増加が RNA 干渉で抑制されたものは，MDS1 and EVI1 complex locus (MECOM)，FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B (FOSB)，FBJ

murine osteosarcoma viral oncogene homolog (FOS)，および activating transcription factor 3 (ATF3) の4 遺伝子であった。そのうち TGF- β 1 蛋白産生増加を抑制したのは FOS のみであった。

結語：HPMC において，FOS は高グルコース刺激による TGF- β 1 産生に関与しており，FOS 発現を抑制することは腹膜線維化の治療目標となりうる。

緒 言

腹膜中皮細胞は腹膜のホメオスタシス維持に重要な役割を果たしているが，腹膜透析 (PD) 液中の非生体適合性物質により障害を受ける¹⁾。PD 液による持続的な腹膜障害は，病理学的には腹膜からの中皮細胞剥離，細胞外基質の過度の堆積と血管新生を特徴とする中皮下線維化を引き起こす。これらの構造的な変化により，臨床的には小分子物質輸送率が増加して限外濾過不全となるだけでなく，被嚢性腹膜硬化症の進展にも関与する²⁾。

グルコースは PD 液の浸透圧物質として使用されているが，炎症性サイトカインの増加にも関連しており，高グルコース (HG) 誘導性の transforming growth factor-beta1 (TGF- β 1) 産生は，上皮間葉移行 (EMT)，線維芽細胞の増殖や細胞外基質蛋白の沈着など，多くの前線維化イベントを誘導する^{3,4)}。しかし，グルコースによる腹膜線維化の正確な経路は明らかでない。グルコース刺激によって24時間以降で TGF- β 1

High glucose promotes TGF- β 1 production by inducing FOS expression in human peritoneal mesothelial cells

Department of Nephrology, Hiroshima University Hospital

Keiko Kokoroishi

Ayumu Nakashima

Takao Masaki

mRNA 発現が増加するが、複数の転写因子が TGF- β 1 発現に関連すると考えられる⁵⁻⁷⁾。本研究の目的は、ヒト腹膜中皮細胞 (HPMC) で HG 誘導性 TGF- β 1 産生に関連する遺伝子を明らかにすることである。

1 方法

HPMC は非尿毒症、非糖尿病で腹膜炎と腹膜播種がなく、待機的な腹部手術を受ける患者の大網から単離し、第2から3継代を使用した。10% FCS を含む M199 培養液に 100 U/mL のペニシリンと 100 μ g/mL のストレプトマイシン、2 mmol/L の L グルタミンを加えたものをコントロール (グルコース濃度 0.1% : NG) として使用し、刺激用の培養液はコントロールに D グルコースを添加してグルコース濃度を 4% (HG) にしたものを使用した。HPMC は 6 well plate でサブコンフルエントまで培養し、その後 NG か HG 培養液に変更して 1~48 時間培養した。

DNA マイクロアレイは、3 人のドナーから採取した HPMC を、NG または HG 培養液で 3 時間培養して RNA を抽出して解析を行った。NG 群と HG 群の遺伝子発現分析を GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Expression arrays で比較した。

RNA 干渉は HPMC を 6 well plate で 50% コンフルエントまで成長させ、目的遺伝子別の stealth siRNA または Silencer Negative Control #1 siRNA を Lipofectamine 2000 を用いて導入した。24 時間後に通常の培養液に変更し、HPMC が 80% コンフルエントになった時点でグルコース刺激を開始した。目的遺伝子の抑制効果は、3 時間刺激の検体で、quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) を行って確認した。RNA 干渉後の TGF- β 1 への影響を、NG または HG 培養液で 3 および 24 時間刺激後に、mRNA 発現量を qPCR で、また 24 および 48 時間刺激後に培養液上清を回収して TGF- β 1 蛋白濃度を enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) で測定した。mRNA 発現量は 18s RNA で補正し、蛋白濃度は HPMC 溶解液の総蛋白量で補正した。

HPMC の FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog (FOS) 蛋白の発現はウエスタンブロットで測定した。1 次抗体としてラビットポリクローナル抗 c-Fos 抗体とラビットポリクローナル抗アクチン抗体をそれぞれ 1 : 500 と 1 : 200 に希釈して使用し、2 次

抗体は goat anti-rabbit IgG-HRP を使用した。結果はアクチンで補正した。

動物モデルは 12 週齢のオスの C57BL/6 マウスを用い、グルコース濃度を 4% に調整した PBS 2 ml (n=5) または PBS のみ 2 ml (n=5) を 1 日 2 回、7 日間腹腔内投与した。投与と反対側の壁側腹膜検体を採取し、10% ホルマリンで固定してパラフィン包埋後に 4 μ m の切片標本を作製してマウス腹膜中皮細胞の免疫組織化学染色を行った。1 次抗体として、ラビットポリクローナル抗 Fos 抗体とラビットポリクローナル抗 TGF- β 1 抗体を使用した。中皮細胞の Fos と TGF- β 1 の陽性域は、倍率 400 倍で無作為に捕捉した 5 視野を測定した。

2 統計学的分析

測定値は平均値 \pm 標準偏差で示し、Tukey's *post hoc* test または Student's *t*-test による分析で統計学的有意差を評価して $P < 0.05$ を統計学的有意差とした。

3 結果

HPMC の HG 刺激による TGF- β 1 合成については、TGF- β 1 mRNA レベルでは刺激 12 時間までは変化が見られないが、24 時間では刺激前と比較して有意に増加した (図 1a)。培養液上清中の TGF- β 1 蛋白濃度は刺激 24 時間では変化はないが、48 時間では NG と比較して HG で 1.4 倍に増加した (図 1b)。

DNA マイクロアレイ解析では、51 遺伝子が NG 群と比較して HG 群で 3 倍以上に発現量が増加した。それらのうち転写機能に関連する遺伝子に着目し、遺伝子オントロジー解析で生物学的プロセスの regulation of transcription and being DNA-dependent に分類される 13 遺伝子 (表 1) についてさらに検討した。

マイクロアレイ結果を確認するために、選出した遺伝子の発現を qPCR で測定し、9 遺伝子 (MDS1 and EVI1 complex locus (MECOM), early growth response 1 (EGR1), FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B (FOSB), nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2 (NR4A2), FOS, chromosome 5 open reading frame 41 (C5orf41), Kruppel-like factor 5 (KLF5), cysteine-serine-rich nuclear protein 1 (CSRNP1), activating transcription factor 3 (ATF3)) は HPMC の 3 時間 HG 刺激で発現量が増加した (図

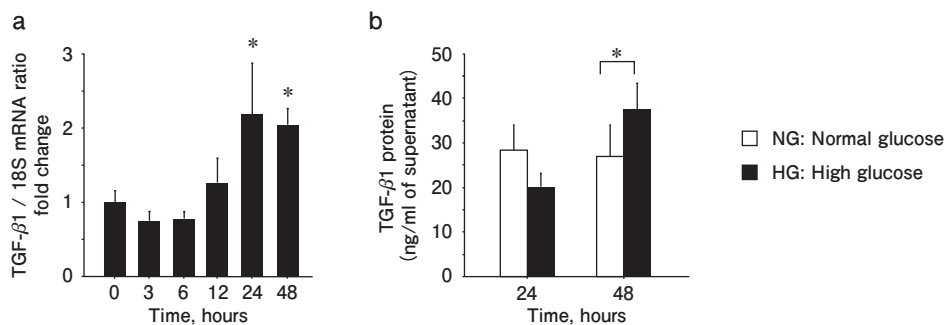


図1 HPMC 高グルコース刺激による TGF-β1 産生への影響

(a) TGF-β1 mRNA 発現の経時的変化, (b) 培養液上清中の TGF-β1 蛋白レベル. (mean ± SD, n=6, * : P<0.001)

表1 HPMC 高グルコース刺激により発現が増加した遺伝子 (DNA マイクロアレイ解析)

Gene Symbol	Gene Title	Fold change
SIX4	SIX homeobox 4	13.86
MECOM	MDS1 and EVI1 complex locus	12.49
EGR1	early growth response 1	11.12
FOSB	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B	9.41
TLE4	transducin-like enhancer of split 4	9.22
SIX1	SIX homeobox 1	8.53
NR4A2	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2	8.53
FOS	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	6.02
C5orf41	chromosome 5 open reading frame 41	5.75
KLF5	Kruppel-like factor 5 (intestinal)	5.72
ZBTB1	zinc finger and BTB domain containing 1	5.71
CSRNP1	cysteine-serine-rich nuclear protein 1	4.44
ATF3	activating transcription factor 3	3.65

2a). SIX homeobox 4 (SIX4), transducin-like enhancer of split 4 (TLE4), SIX homeobox 1 (SIX1) および zinc finger and BTB domain containing 1 (ZBTB1) の mRNA 発現量の増加は 3 倍未満であった (図 2b).

qPCR で HG 刺激による発現増加を確認した遺伝子と TGF-β1 産生との関連を評価するため, 9 遺伝子それぞれの RNA 干渉による TGF-β1 mRNA 発現への影響を調べた. コントロールと比較して MECOM, FOSB, FOS および ATF3 の RNA 干渉により, HG 誘導性 TGF-β1 mRNA 増加が 24 時間刺激でそれぞれ 45.2%, 42.0%, 35.7%, 25.8% と有意に抑制された. その一方, EGR1, NR4A2, C5orf41, KLF5 および CSRNP1 の RNA 干渉では, TGF-β1 mRNA 発現の抑制は見られなかった (図 3).

MECOM, FOSB, FOS および ATF3 の TGF-β1 蛋白発現への影響を評価するために, 四つの遺伝子の RNA 干渉後に, NG または HG で 24~48 時間刺激した HPMC 培養液上清中の TGF-β1 蛋白濃度を ELISA

で測定した. 10% FCS 含有 M199 培養液中の TGF-β1 蛋白濃度をあらかじめ測定し, HG 刺激による変化量を比較した. 四つの遺伝子のうち, RNA 干渉後に 48 時間刺激後の培養液上清中の TGF-β1 蛋白濃度増加が抑制されたものは FOS のみであった (図 4).

HPMC の HG 刺激による FOS mRNA 発現および蛋白量の経時的変化を, qPCR およびウエスタンブロットで測定した. FOS mRNA レベルは 3 時間刺激で 22 倍以上に増加し, その後減少して 24 時間では刺激前のレベルに戻った (図 5a). FOS 蛋白は HG 刺激 2 時間で増加し始め, 3 時間でピークとなり大幅に減少した (図 5b). さらに RNA 干渉後では HG 3 時間刺激での FOS 蛋白増加が強く抑制されることを確認した (図 5c).

マウス HG 腹腔内投与モデルで, 腹膜中皮細胞における FOS および TGF-β1 の発現を検討した. コントロール群で FOS 発現は中皮細胞の細胞質に認められたが, HG 投与群では発現量が 2 倍多かった. 同様に,

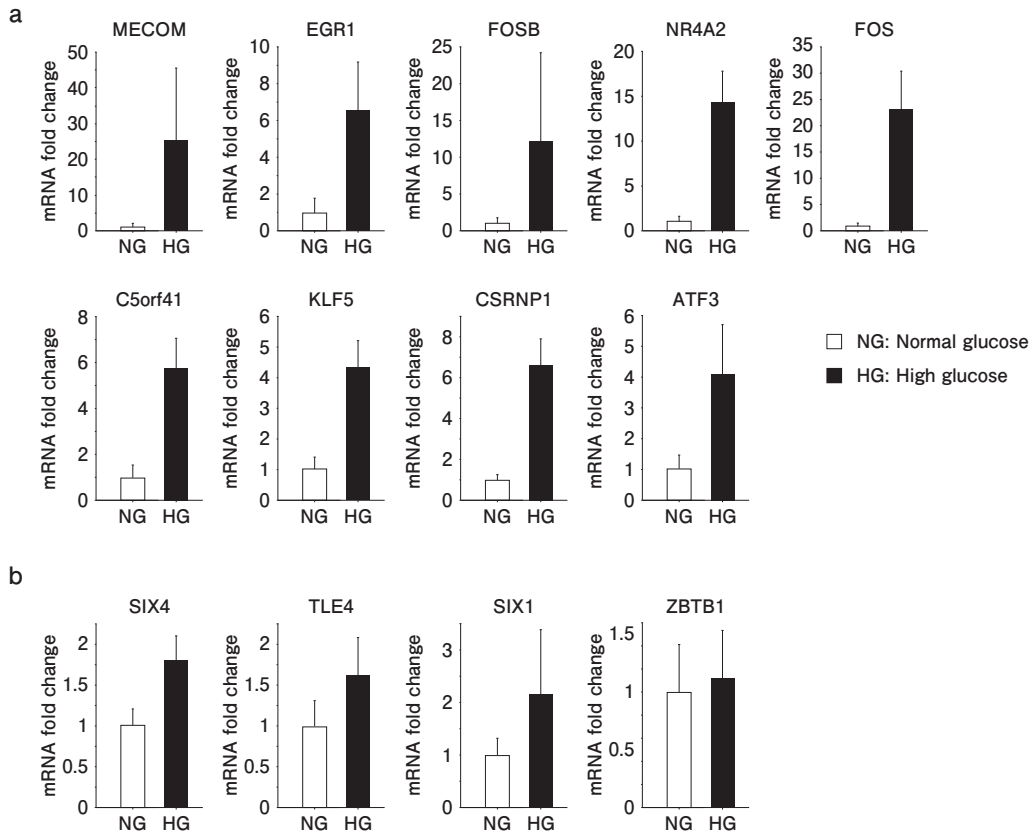


図2 HPMC 高グルコース刺激により変動する遺伝子の mRNA 発現測定

(a) 3 時間刺激で発現が 3 倍以上に増加した遺伝子, (b) 3 倍までは増加しなかった遺伝子. (mean \pm SD, n = 6)

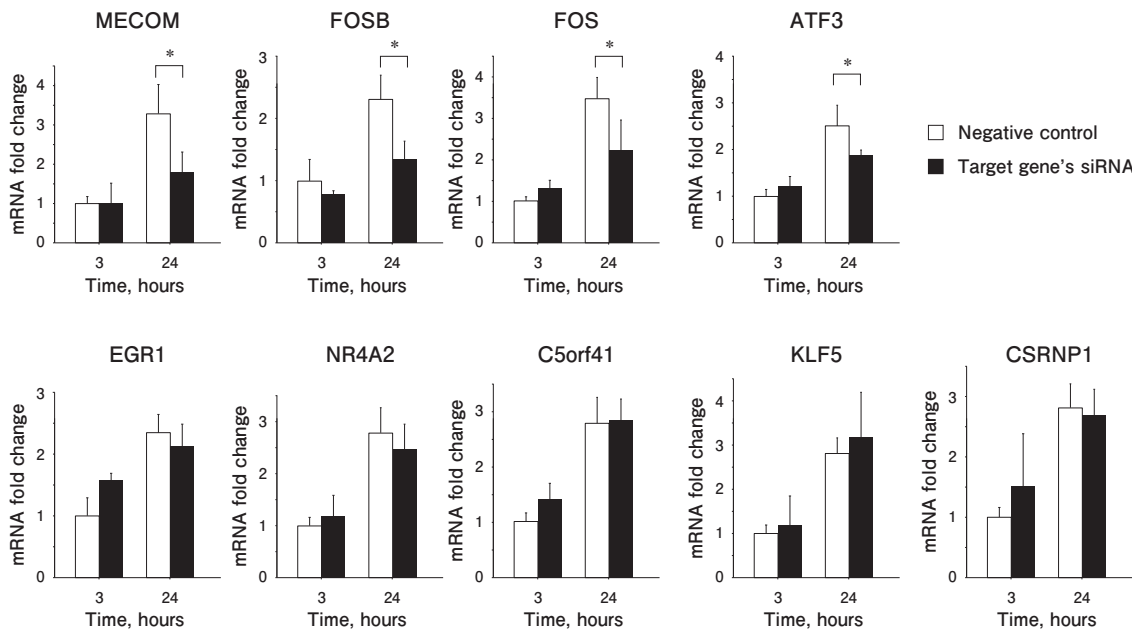


図3 siRNA の HPMC 高グルコース誘導性 TGF- β 1 mRNA 発現への影響

(mean \pm SD, n = 6, * : $P < 0.001$)

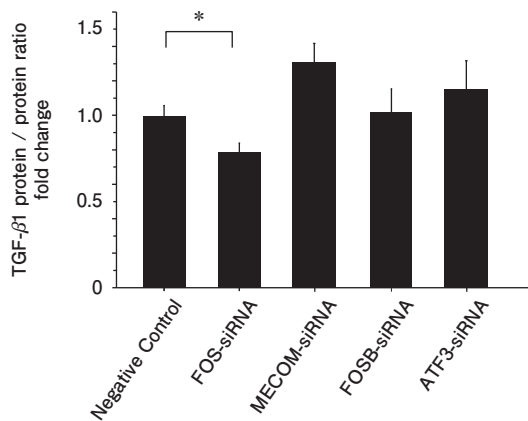


図4 siRNAのHPMC高グルコース誘導性TGF-β1蛋白発現への影響
RNA干渉後、高グルコース培養液で48時間刺激し、培養液上清中のTGF-β1蛋白濃度の変化量をネガティブコントロールと比較。(mean ± SD, n=6, * : P<0.001)

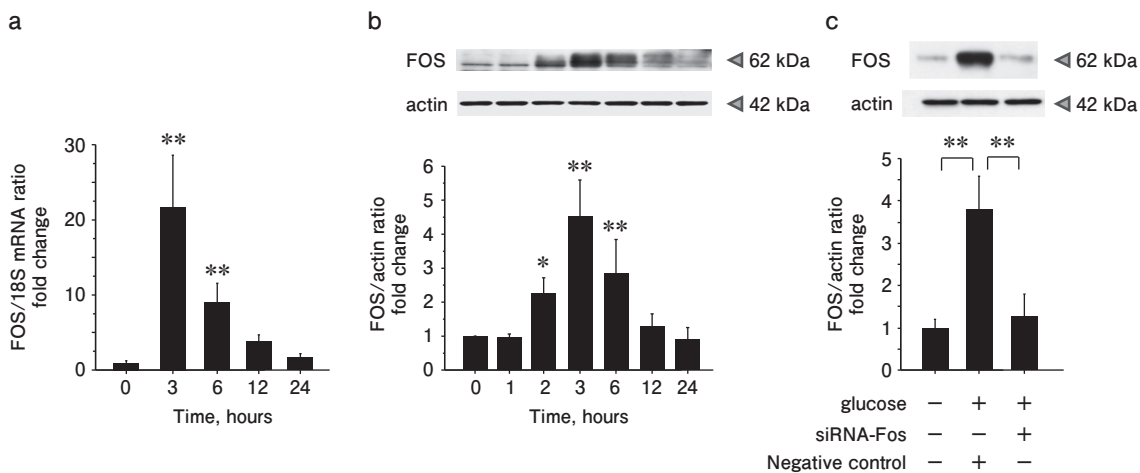


図5

(a) HPMC高グルコース刺激によるFOS mRNA発現の経時的変化, (b) HPMC高グルコース刺激によるFOS蛋白の経時的変化, (c) FOS-siRNAによるFOS蛋白の変化. 高グルコース3時間刺激で測定。(mean ± SD, n=6, * : P<0.05, ** : P<0.001)

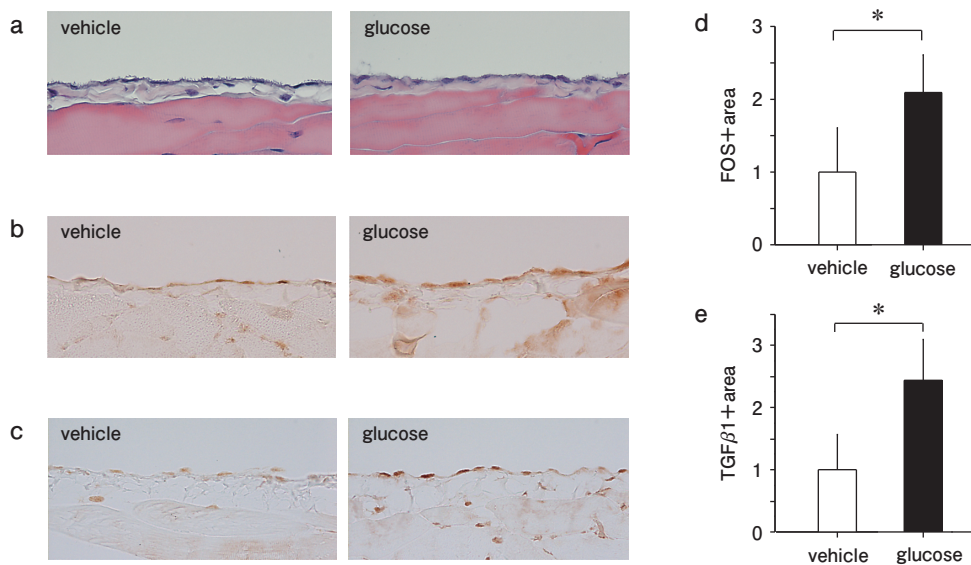


図6 壁側腹膜の組織学的および免疫組織化学的評価

(a) HE染色, (b) FOS免疫染色, (c) TGF-β1免疫染色. (倍率240倍) (d)(e) FOSおよびTGF-β1陽性画素数計測 (mean ± SD, n=5, * : P<0.001 versus vehicle group).

TGF- β 1 も中皮細胞の細胞質に発現が認められ、HG 群では 2.4 倍に増加した (図 6)。

4 考察

本研究で、HPMC における HG 誘導性 TGF- β 1 産生増加は FOS 発現を介しており、他の遺伝子は TGF- β 1 産生には関連する可能性が低いことが明らかになった。またマウスの HG 腹腔内投与では、中皮細胞に FOS と TGF- β 1 の増加がみられた。FOS は activator protein-1 (AP-1) 複合体の主要構成要素であり、FOS, JUN, ATF や Maf ファミリーなどに属する蛋白質で二量体を形成し、DNA に結合することで転写を促進する因子である。研究結果より、AP-1 が TGF- β 1 誘導に重要な役割を果たしており、FOS 発現を阻害することが腹膜線維化の治療標的となりうることが示唆された。

我々の研究では、HPMC での HG 誘導性 TGF- β 1 mRNA および蛋白について示したが、これまでの研究でメサンギウム細胞⁵⁾、近位尿細管上皮細胞⁸⁾、内皮細胞⁹⁾でも HG 誘導性 TGF- β 1 産生を認めることが報告されており、HG 刺激による TGF- β 1 産生は HPMC だけでなく他の細胞でも見られることを意味している。近年では、TGF- β 1 は HPMC の細胞表現型が間葉系細胞に変形し¹⁰⁾、過剰な細胞外基質蛋白の産生³⁾をきたす上皮間葉移行 (EMT) を誘導することが示されている。EMT にはいくつかのサイトカインや成長因子が関与しているが、TGF- β 1 は最も重要な EMT を誘導する成長因子である¹¹⁾。これらのことから、HG 誘導性 TGF- β 1 産生は腹膜線維化の進展に中心的役割を果たしており、TGF- β 1 産生を抑制することで長期間 PD の施行が可能となると考えられる。

HPMC における HG 誘導性活性酸素 (ROS) が TGF- β 1 mRNA および蛋白を誘導することが報告されており、L グルコースや非代謝性グルコールアナログである 3-O メチルグルコースでは ROS 産生を生じないこと、グルコース輸送体阻害剤により HG による ROS 産生が抑制されることから、TGF- β 1 合成の増加は高浸透圧ではなくグルコース取り込みによって引き起こされることが示されている^{12,13)}。FOS は HG 刺激による TGF- β 1 産生に関連する遺伝子であり、HG による ROS 産生が FOS の増加を介して TGF- β 1 発現増加に関与しているかもしれない。

Wei らは、グルコース代謝が HG による ROS 産生に関与し、extracellular signal-regulated kinase (ERK) 経路を増強させることを報告しており¹⁴⁾、また他のいくつかの研究でも様々な細胞においても mitogen-activated protein kinase (MAPK) 経路を介した FOS 発現が示されている^{15,16)}。我々の以前の研究でも、HPMC における HG 刺激反応性の 30 分をピークとする ERK リン酸化亢進を報告している¹⁷⁾。横山らは、ERK1/2 阻害により FOS 発現の誘導が十分に抑制されることを明らかにしており¹⁸⁾、ERK 活性化は FOS 発現の上流エフェクターであると示している。これらの結果から、HG 誘導性 ROS による FOS 発現の増加は ERK 活性化を介している可能性が示唆される。

HG は細胞内ジアシルグリセロール (DAG) を増加させ、プロテインキナーゼ C (PKC) 活性化を引き起こすこと、また PKC 活性化が FOS 遺伝子発現を刺激することも報告されている¹⁹⁾。我々のデータでは FOS mRNA と蛋白は 3 時間でピークとなったが、Ha らの報告では、HG 誘導性 [³H] DAG レベル増加と PKC 活性は 8 時間でみられている¹⁹⁾。したがって、PKC 活性化は FOS の産生に直接的には関与しないが、転写活性の増加や mRNA 安定化に関与することが報告されており²⁰⁾、間接的に TGF- β 1 産生にも関連しているかもしれない。

upstream stimulatory factors 1 and 2 (USF1 and 2), nuclear factor (NF)- κ B, AP-1 や stimulating protein 1 (Sp1) など、いくつかの転写因子が TGF- β 1 調整に関与することが報告されている⁵⁻⁷⁾。我々の研究では、HPMC においては FOS のみが HG と TGF- β 1 の間を介することが明らかになった。この結果から、AP-1 が HG 誘導性 TGF- β 1 産生に関連する転写因子であると推察された。さらに、AP-1 は増殖、生存、分化、アポトーシス、細胞遊走や転写など多くの細胞プロセスを制御しており²¹⁻²³⁾、FOS 発現を抑制することで AP-1 転写を阻害し、腹膜線維化の治療目標となりうることを示唆される。

結 語

FOS は HPMC の HG 誘導性 TGF- β 1 産生に関与する。

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) Witowski J, Wisniewska J, Korybalska K, et al. : Prolonged exposure to glucose degradation products impairs viability and function of human peritoneal mesothelial cells. *J Am Soc Nephrol*, 12; 2434-2441, 2001.
- 2) Fussioeller A : Histomorphological and functional changes of the peritoneal membrane during long-term peritoneal dialysis. *Pediatr Nephrol*, 23; 19-25, 2008.
- 3) Kumano K, Shimoda M, Hyodo T, et al. : The role of TGF-beta; in growth inhibition of peritoneal mesothelial cells in high-glucose dialysate. *Perit Dial Int*, 15; S93-S95, 1995.
- 4) Lv ZM, Wang Q, Wan Q, et al. : The role of the p38 MAPK signaling pathway in high glucose-induced epithelial-mesenchymal transition of cultured human renal tubular epithelial cells. *PLoS One*, 6; e22806, 2011.
- 5) Weigert C, Brodbeck K, Sawadogo M, et al. : Upstream stimulatory factor (USF) proteins induce human TGF- β 1 gene activation via the glucose-response element-1013/-1002 in mesangial cells : up-regulation of USF activity by the hexosamine biosynthetic pathway. *J Biol Chem*, 279; 15908-15915, 2004.
- 6) Nagarajan RP, Chen F, Li W, et al. : Repression of transforming-growth-factor- β -mediated transcription by nuclear factor κ B. *Biochem J*, 348; 591-596, 2000.
- 7) Weigert C, Sauer U, Brodbeck K, et al. : AP-1 proteins mediate hyperglycemia-induced activation of the human TGF- β 1 promoter in mesangial cells. *J Am Soc Nephrol*, 11; 2007-2016, 2000.
- 8) Yung S, Lee CY, Zhang Q, et al. : Elevated glucose induction of thrombospondin-1 up-regulates fibronectin synthesis in proximal renal tubular epithelial cells through TGF- β 1 dependent and TGF- β 1 independent pathways. *Nephrol Dial Transplant*, 21; 1504-1513, 2006.
- 9) McGinn S, Poronnik P, King M, et al. : High glucose and endothelial cell growth: novel effects independent of autocrine TGF- β 1 and hyperosmolarity. *Am J Physiol Cell Physiol*, 284; C1374-C1386, 2003.
- 10) Ueno T, Nakashima A, Doi S, et al. : Mesenchymal stem cells ameliorate experimental peritoneal fibrosis by suppressing inflammation and inhibiting TGF- β 1 signaling. *Kidney Int*, 84; 297-307, 2013.
- 11) Willis BC, Borok Z : TGF- β -induced EMT : mechanisms and implications for fibrotic lung disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 293; L525-L534, 2007.
- 12) Ha H, Lee HB : Effect of high glucose on peritoneal mesothelial cell biology. *Perit Dial Int*, 20; S15-S18, 2000.
- 13) Lee HB, Yu MR, Song JS, et al. : Reactive oxygen species amplify protein kinase C signaling in high glucose-induced fibronectin expression by human peritoneal mesothelial cells. *Kidney Int*, 65; 1170-1179, 2004.
- 14) Wei J, Shi Y, Hou Y, et al. : Knockdown of thioredoxin-interacting protein ameliorates high glucose-induced epithelial to mesenchymal transition in renal tubular epithelial cells. *Cell Signal*, 25; 2788-2796, 2013.
- 15) Pardo VG, Boland R, de Boland AR : $1\alpha,25(\text{OH})_2$ Vitamin D₃ stimulates intestinal cell p38 MAPK activity and increases c-Fos expression. *Int J Biochem Cell Biol*, 38; 1181-1190, 2006.
- 16) Smith ER, Smedberg JL, Rula ME, et al. : Disassociation of MAPK activation and c-Fos expression in F9 embryonic carcinoma cells following retinoic acid-induced endoderm differentiation. *J Biol Chem*, 276; 32094-32100, 2001.
- 17) Katsutani M, Ito T, Masaki T, et al. : Glucose-based PD solution, but not icodextrin-based PD solution, induces plasminogen activator inhibitor-1 and tissue-type plasminogen activator in human peritoneal mesothelial cells via ERK1/2. *Ther Apher Dial*, 11; 94-100, 2007.
- 18) Yokoyama K, Hiyama A, Arai F, et al. : C-Fos regulation by the MAPK and PKC pathways in intervertebral disc cells. *PLoS One*, 8; e73210, 2013.
- 19) Ha H, Yu MR, Lee HB : High glucose-induced PKC activation mediates TGF- β 1 and fibronectin synthesis by peritoneal mesothelial cells. *Kidney Int*, 59; 463-470, 2001.
- 20) Winzen R, Kracht M, Ritter B, et al. : The p38 MAP kinase pathway signals for cytokine-induced mRNA stabilization via MAP kinase-activated protein kinase 2 and an AU-rich region-targeted mechanism. *EMBO J*, 18; 4969-4980, 1999.
- 21) Shaulian E, Karin M : AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol*, 4; E131-E136, 2002.
- 22) Sherwood DR, Butler JA, Kramer JM, et al. : FOS-1 promotes basement-membrane removal during anchor-cell invasion in *C. elegans*. *Cell*, 121; 951-962, 2005.
- 23) Milde-Langosch K : The Fos family of transcription factors and their role in tumourigenesis. *Eur J Cancer*, 41; 2449-2461, 2005.