

マウス腹膜線維症モデルにおける コンドロイチン硫酸の線維化抑制効果

阿部伸一 小畑陽子 西野友哉

長崎大学病院腎臓内科

key words : コンドロイチン硫酸, 腹膜線維症, NF- κ B, グルコン酸クロルヘキシジン

要 旨

【背景】腹膜透析 (PD) は, 末期腎不全患者の有用な治療法である. しかし長期にわたる PD は, 炎症や血管新生などを介して腹膜線維症を惹起しうる. 一方コンドロイチン硫酸 (CS) はグリコサミノグリカンの一種であり, 生物の様々な組織に存在する. 最近の報告では, CS が NF- κ B の抑制を介した抗炎症作用を有するとされ, 炎症性腸疾患モデルや関節炎モデル動物においてその病勢を抑制したとする報告もある.

【目的】グルコン酸クロルヘキシジン (CG) によるマウス腹膜線維症モデルにおいて, CS の腹膜線維化抑制効果を検討する.

【方法】10 週齢の雄 ICR マウスを, control 群 (N = 10), CS 群 (N = 10), CG 群 (N = 10), CG + CS 群 (N = 10) の 4 群に分類して比較した. CG は週 3 回隔日で 3 週間, 腹腔内投与した. CS は 500 mg/kg/日を連日経口投与した. 3 週後に腹膜組織を採取し, 形態学的変化を Masson & Trichrome 染色で検討した. 炎症・線維化関連因子や, mitogen-activated protein kinase (MAPK) のリン酸化について免疫組織化学法で検討した. また活性化した NF- κ B の局在を Southwestern 組織化学法で検討した. 腹膜透過性の評価のため, 腹膜機能平衡試験 (PET) を行った.

【結果】control 群と比較し, CG 群では腹膜中皮下組織の著明な肥厚を認めた. CG 群と比較し, CG +

CS 群では中皮下腹膜組織の肥厚が有意に抑制された. また, α -SMA・リン酸化 Smad 2/3・F4/80・リン酸化 MAPK の陽性細胞数は有意に減少していた. CG 群と比較し, CG + CS 群では Southwestern 組織化学法において陽性細胞数の有意な減少を認め, NF- κ B の活性化が抑制されている事が示唆された. PET では, CG 群と比較し CG + CS 群で D/PCr が低い傾向にあった.

【結論】CS は抗炎症作用を介した腹膜線維化抑制効果を有しており, 腹膜線維症に対する有効な治療法の一つとなりうる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数は 30 万人を超えるが, そ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 (EPS) の問題がある¹⁾. 腹膜線維症は, 進行すると腸管の癒着などを伴い, EPS へ進展することが知られ, 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ではなく, 有効な治療法は確立されていない.

一方コンドロイチン硫酸 (CS) は近年, ERK1/2 や P38MAPK などの MAP kinase のリン酸化を抑制する

ことにより NF- κ B の核内移行を抑制し、抗炎症作用を有するという報告がなされている²⁾。動物実験においても、CS の経口投与が NF- κ B の活性化を抑制することで関節リウマチや炎症性腸疾患、動脈硬化に有効であるとの報告がなされている³⁻⁵⁾。腹膜透析による腹膜線維化には、腹膜炎や AGEs などによる NF- κ B の関与が示唆されており⁶⁾、CS の NF- κ B 活性化抑制効果により、腹膜線維化を抑制できる可能性が考えられる。

腹膜線維化に対する、経口投与における CS の有用性を検討した報告はこれまで存在せず、本研究では CS の腹膜線維化抑制効果について検討した。

2 研究方法

- ① グルコン酸クロロヘキシジン (CG) 投与によりマウス腹膜線維化モデルを作成し、CS 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。CS は水に溶解して 500 mg/kg の用量を、CG 投与時より連日、胃管により経口投与した。

腹腔内/経口投与物質の組み合わせにより、以下の 4 群を作製した。

- CG と水を投与する群 (CG 群)

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

- ② CG 投与開始 3 週間後に peritoneal equilibration test (PET) を行い、その後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。CS の腹膜透過性亢進への影響を評価するため、PET を行った。PET は、麻酔下に 10 ml の 2.5% PD 液を腹腔内に注入し、1 時間後に排液を回収した後、D/P クレアチニンを測定した。
- ③ Masson & 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 CS が抑制するとされる、ERK1/2, P38MAPK のリン酸化について、リン酸化 ERK1/2 およびリン酸化 P38MAPK の腹膜における発現を免疫組織化学法で評価し、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。
- ⑤ 活性化した NF- κ B の局在を、Southwestern 組織化学法にて評価し、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。
- ⑥ マクロファージの腹膜中皮下組織への誘導および増生について、MCP-1 および F4/80 について免疫組織化学法にて評価し、顕微鏡倍率 200 倍に

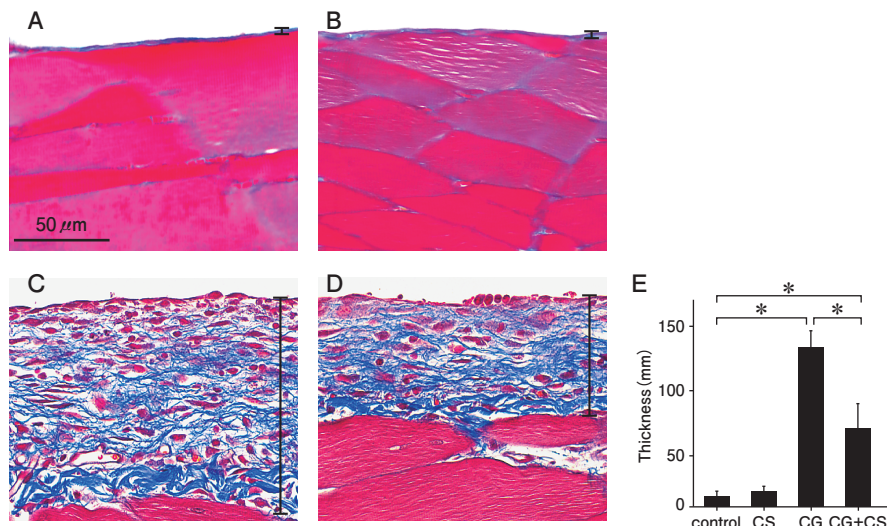


図1 腹膜組織の Masson & Trichrome 染色

(A) Control 群および (B) CS 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) CG+CS 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 \pm 標準誤差で表示した。*は $p < 0.05$ を示す。

て1視野中の陽性細胞数をカウントした。MCP-1については、PET時に回収した排液中のMCP-1濃度をELISA法にて測定した。

- ⑦ TGF- β シグナルの活性化について、リン酸化Smad2/3を免疫組織化学法で評価し、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。
- ⑧ 線維化関連因子として、線維芽細胞に発現するマーカーの一つである α -SMAを免疫蛍光抗体染色法で評価した。観察は蛍光顕微鏡 (LSM 5 PASCAL; Carls Zeiss Co., Ltd., Germany) を用いた。
- ⑨ 血管新生因子として、PET時に回収した排液中のVEGFの濃度をELISA法にて測定すること

で評価した。

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+CS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CS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。

CSが抑制するとされる、MAPkinaseのリン酸化について、リン酸化ERK1/2およびリン酸化P38MAPKを免疫組織化学法で評価した。リン酸化ERK1/2およびリン酸化P38MAPKは、CG群の肥厚した腹膜中皮下組織でびまん性に発現を認め、CG+CS群では有意にその発現が減少していた (図2)。Southwestern

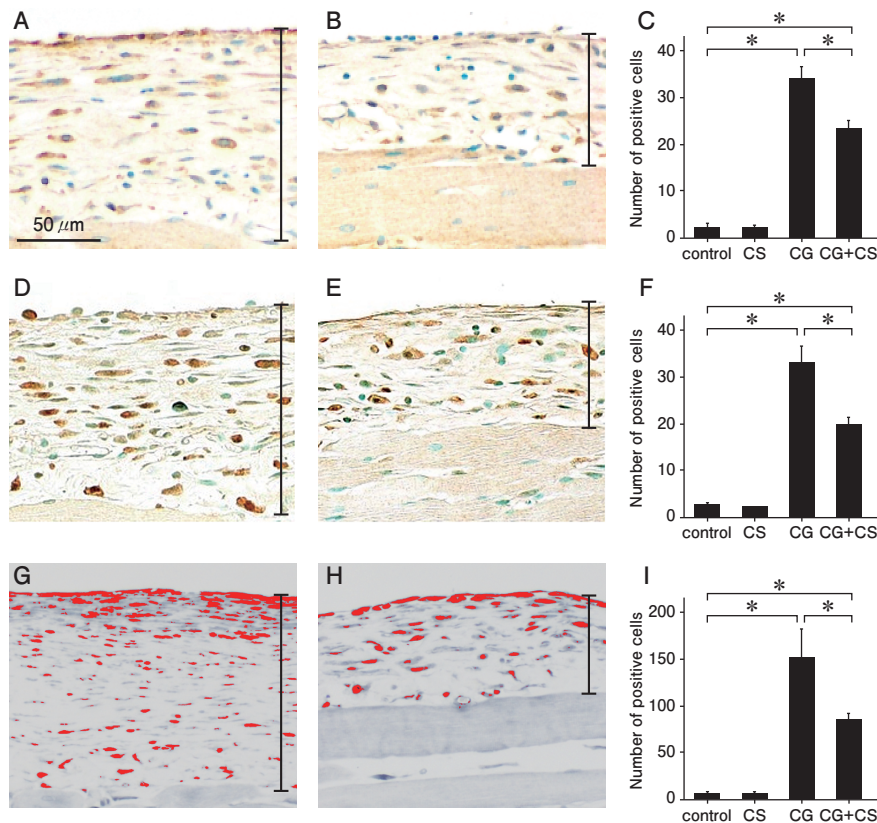


図2 リン酸化P38MAPK、リン酸化ERK1/2の免疫組織化学法およびSouthwestern組織化学法の解析

(A) CG群ではリン酸化P38MAPK陽性細胞が著明に増加した。(B) CS群では、リン酸化P38MAPKの発現は抑制された。(C) 棒グラフはリン酸化P38MAPK陽性細胞数を示す。(D) CG群で、リン酸化ERK1/2陽性細胞数は増加した。(E) CG+CS群で、リン酸化ERK1/2陽性細胞数は減少した。(F) 棒グラフはリン酸化ERK1/2陽性細胞数を示す。(G) (H) 活性化NF- κ Bに対するSouthwestern組織化学法は、画像解析ソフトにより着色し評価した。赤色の部分を陽性細胞としてカウントした。(G) CG群で、NF- κ Bが活性化した細胞の増殖を認めた。(H) CG+CS群で、NF- κ Bが活性化した細胞数は減少した。(I) 棒グラフは活性化NF- κ Bに対するSouthwestern組織化学法陽性細胞数を示す。(A) (B) (D) (E) (G) (H) 200倍; 写真中の棒線は中皮下結合組織の肥厚を示す。(C) (F) (I) 値は平均値 \pm 標準誤差で表示した。*は $p < 0.05$ を示す。

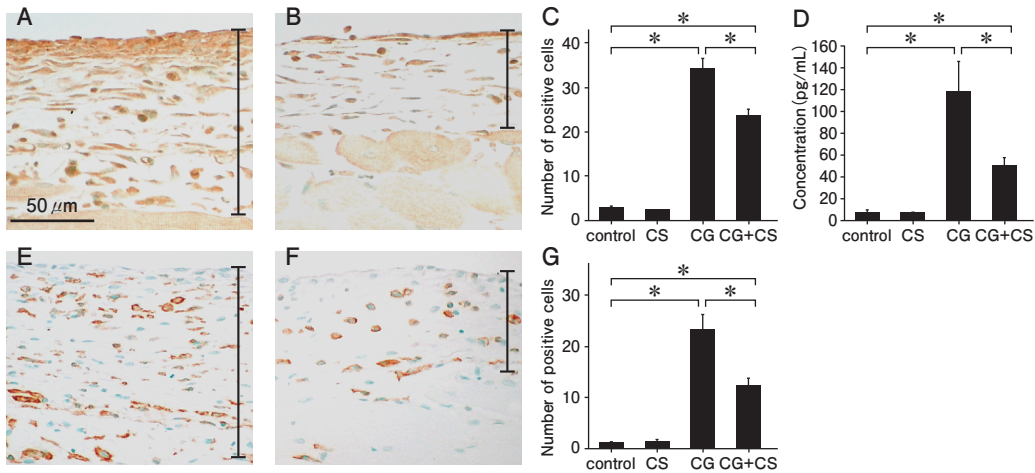


図3 MCP-1, F4/80 に対する免疫組織化学的解析, および PET 排液中の MCP-1 濃度の ELISA 法による解析

(A) CG 群では MCP-1 陽性細胞が著明に増加した。(B) CG+CS 群で, MCP-1 陽性細胞の有意な減少を認めた。(C) 棒グラフは MCP-1 陽性細胞数を示す。(D) 棒グラフは, PET 排液中の MCP-1 濃度を示す。control 群と比較し, MCP-1 濃度は有意に上昇したが, CS 投与により MCP-1 濃度は低下した。(E) CG 群で, F4/80 陽性マクロファージは増加した。(F) CG+CS 群で, F4/80 陽性マクロファージは有意に減少した。(G) 棒グラフは F4/80 陽性細胞数を示す。(A) (B) (E) (F) 200 倍; 写真中の棒線は中皮下結合組織の肥厚を示す。(C) (D) (G) 値は平均値 ± 標準誤差で表示した。*は p<0.05 を示す。

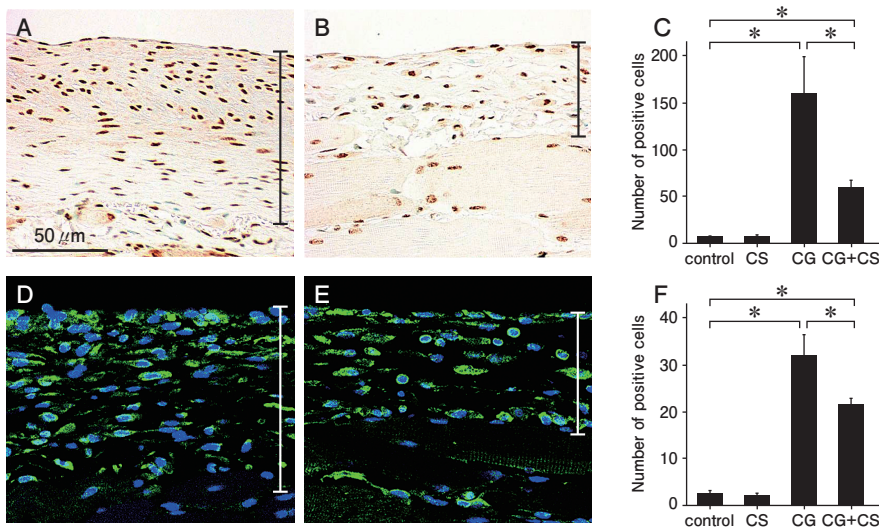


図4 リン酸化 Smad2/3, α-SMA の免疫組織化学的解析

(A) CG 群では, 多くのリン酸化 Smad2/3 陽性細胞を肥厚した腹膜中皮下結合組織で認めた。(B) CG+CS 群で, リン酸化 Smad2/3 陽性細胞数は有意に減少した。(C) 棒グラフはリン酸化 Smad2/3 陽性細胞数を示す。(D) CG 群で, α-SMA 陽性細胞数は増加した。(E) CG+CS 群で, α-SMA 陽性細胞数は減少した。(F) 棒グラフは α-SMA 陽性細胞数を示す。(A) (B) (D) (E) 200 倍; 写真中の棒線は中皮下結合組織の肥厚を示す。(C) (F) 値は平均値 ± 標準誤差で表示した。*は p<0.05 を示す。

組織化学法では, CG 群において NF-κB が活性化した細胞が多数存在していたのに対し, CG+CS 群ではその有意な減少を認めた (図2)。

マクロファージの誘導および増生について, MCP-1 および F4/80 について免疫組織化学法にて評価した。

MCP-1, F4/80 双方とも, 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, CS 投与により有意にその発現が抑制されていた (図3)。PET 排液中の MCP-1 濃度は, control 群と比較して CG 群で有意に上昇していたが, CS 投与により有意に低下

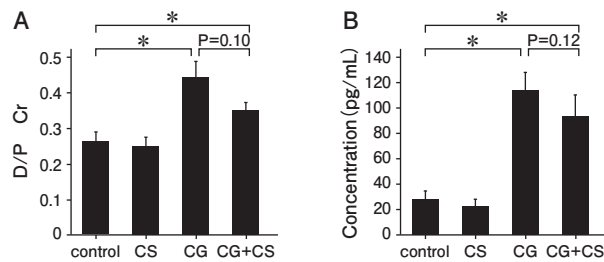


図5 PET および PET 排液中の VEGF 濃度の ELISA 法による解析

(A) 棒グラフは、各群の D/P クレアチニン値を示す。control 群と比較し、CG 群において D/P クレアチニンの有意な上昇を認めた。一方、CG+CS 群では CG 群と比較し、D/P クレアチニンが低下する傾向にあった。(B) 棒グラフは、排液中の VEGF 濃度を示す。control 群と比較し、CG 群で PET 排液中の VEGF 濃度は有意な上昇を認めた。CG 群と比較し、CG+CS 群では低い傾向にあった。(A) (B) 値は平均値 ± 標準誤差で表示した。*は $p < 0.05$ を示す。

した。

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法で評価した。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+CS 群では陽性細胞の減少を認めた (図 4)。筋線維芽細胞のマーカーである α -SMA の免疫蛍光抗体染色法では、CG 群に比べて CG+CS 群では陽性細胞数が有意に減少した (図 4)。以上の結果より、CS が腹膜線維化を抑制することが明らかとなった。

CS の腹膜透過性亢進に対する効果を評価するため、PET を行った。control 群と比較し、CG 群において D/P クレアチニンの有意な上昇を認めた。一方、CG+CS 群では CG 群と比較し、D/P クレアチニンが低下する傾向にあった (図 5)。血管新生因子であり、腹膜透過性亢進に関与するとされる VEGF の PET 排液中濃度について、ELISA 法を用いて評価した。control 群と比較し、CG 群で PET 排液中の VEGF 濃度は有意な上昇を認めた。CG 群と比較し、CG+CS 群では低い傾向にあった (図 5)。

以上の結果から、マウス腹膜線維症モデルにおいて、CS 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、CS の MAPK リン酸化の抑制と、NF- κ B 活性化の抑制による抗炎症作用の関与が考えられた。VEGF の発現や腹膜透過性亢進には、炎症以外に虚血やレニン-アンギオテンシン系の活性化の関与などが示唆されている。今回の研究において、腹膜透過性亢進の抑制効果や PET 排液中の VEGF 濃度の抑制効果が不十分であった原因として、CS の虚血や RAS に対する効果は、抗炎症作用ほど強力ではない可能性が考

えられた。

今後の課題として、CG 投与開始後に CS 投与を行う治療的介入には効果があるかどうか検討が必要である。また本実験で使用された CS は、変形性関節症に対して、ヨーロッパにおいて SYSDOA (symptomatic slow acting drug for osteoarthritis) として使用される用量よりも多い。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、腹膜透析患者において使用する場合の適用量の検討が必要である。

4 結論

マウス腹膜線維症モデルにおいて、CS の線維化抑制効果が示唆された。

CS 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ってなされた。

文 献

- 1) Kawaguchi Y, Hasegawa T, Kubo H, et al. : Current issues of continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Artif Organs*, 19 (12); 1204-1209, 1995.
- 2) du Souich P, Garcia AG, Verges J, et al. : Immunomodulatory and anti-inflammatory effects of chondroitin sulphate. *J Cell*

- Mol Med, 13(8A); 1451-1463, 2009.
- 3) Bauerova K, Ponist S, Kuncirova V, et al. : Chondroitin sulfate effect on induced arthritis in rats. *Osteoarthritis Cartilage*, 19(11); 1373-1379, 2011.
 - 4) Hori Y, Hoshino J, Yamazaki C, et al. : Effects of chondroitin sulfate on colitis induced by dextran sulfate sodium in rats. *Jpn J Pharmacol*, 85; 155-160, 2001.
 - 5) Herrero-Beaumont G, Marcos ME, Sanchez-Pernaute O, et al. : Effect of chondroitin sulphate in a rabbit model of atherosclerosis aggravated by chronic arthritis. *British Journal of Pharmacology*, 154; 843-851, 2008.
 - 6) Kihm LP, Wibisono D, Muller-Krebs S, et al. : RAGE expression in the human peritoneal membrane. *Nephrol Dial Transplant*, 23(10); 3302-2206, 2008.

参考 URL

- ‡1) 「日本透析学会ホームページ」 <http://docs.jsdt.or.jp/overview/index.html>, 2014