

腹膜透析時の細胞外基質リモデリングにおける CTGF と MMP-10 のクロストーク

横井秀基

京都大学大学院医学研究科腎臓内科学

key words : 腹膜透析, 腹膜線維症, 蛋白分解酵素, CTGF, MMP-10

要 旨

腹膜透析療法において、長期腹膜透析による腹膜機能不全は重大な問題である。腹膜線維化進行においては単に細胞外基質の増加のみではなく、分解を含めた細胞外基質のリモデリングが必要である。申請者はこれまで connective tissue growth factor (CTGF) と matrix metalloproteinase-10 (MMP-10) に着目し、解析をすすめてきた。CTGF ノックアウトマウスはクロルヘキシジン (CG) による腹膜線維症が軽度なことを報告しており、また MMP-10 ノックアウトマウスは CG による腹膜線維化も軽度であることを見出している。CTGF は細胞外基質産生作用を、MMP-10 は細胞外基質分解作用という相反する活性を持つにもかかわらず、表現型が似ていることから両者のクロストークについて解析を行った。

筆者は誘導型全身性 CTGF ノックアウトマウスに CG を負荷したところ、CG 投与野生型マウスに比較して MMP-10 発現が低下することを示した。また CG 投与 MMP-10 ノックアウトマウスは、CG 投与野生型と比して線維化の軽減とともに、CTGF 発現の低下が認められた。

これらの結果から、CTGF と MMP-10 は腹膜線維化において vicious cycle を形成し、この系の抑制は腹膜線維化抑制に有用である可能性が示唆された。

1 目 的

本研究の目的は、MMP-10 ノックアウトマウスにお

いて CG による腹膜線維化が軽度である機序を解明するため、CTGF と MMP-10 のクロストークに着目し、CTGF ノックアウトマウスと MMP-10 ノックアウトマウスを用いてそのクロストークを明らかにすることである。CTGF は腹膜の線維化、血管新生に関与することが示されているが¹⁾、腹膜線維化が進行する際には足場としての細胞外基質のリモデリングが必要である。CTGF が MMP-10 を誘導することは、CTGF の増殖、細胞外基質増加、血管新生、遊走などの作用において、CTGF の作用を介在する可能性を想定させる。

一方、MMP-10 発現が CTGF 誘導にどのような影響を及ぼすかはまったく不明である。MMP-10 が CTGF を直接的・間接的に誘導するのであれば、MMP-10 と CTGF で vicious cycle を形成することになり、腹膜透析患者の血中や腹膜透析液中の MMP-10 や CTGF を測定することにより病態の把握ができる可能性があり、またこの vicious cycle に介入することにより病態進行を阻止できる可能性もある。

本研究の目的としては、CTGF ノックアウトマウスと MMP-10 ノックアウトマウスを用いて、それぞれ MMP-10、CTGF 発現や活性に及ぼす影響について解析することとした。

2 方 法

動物実験は京都大学動物委員会のガイドラインに沿って立案し、同委員会の承認を得て施行した。

全身でタモキシフェン誘導性 Cre リコンビナーゼを発現する Rosa-CreERT2 マウスと CTGF floxed マウ

スを交配させ、double mutant マウスに3週と6週齢時にタモキシフェン (0.2 mg/gBW) を経口投与3日を連日行い、全身のCTGFを欠損させる¹⁾。7週齢時より0.1% クロロヘキシジン/15% エタノール/85% PBSを週3回4週間腹腔内投与する²⁾。コントロールマウスとしてRosa-CreERT2 (-) のCTGF floxed マウスを用いた。vehicleとしてPBSを投与した。腹膜を回収してMMP-10の免疫染色を行った。4% PFAで固定した腹膜組織をパラフィン包埋し、切片をクエン酸バッファ下で沸騰させ抗原賦活しR&D社のヤギ抗MMP-10抗体で反応させ、続いてJackson Laboratory社 peroxidase ラベル抗ヤギ抗体を反応させ、DAB発色をさせた。

12週齢の全身でMMP-10を欠損したMMP-10ノックアウトマウスに0.1% CG/15% エタノール/85% PBS (0.01 mL/gBW) の週3回腹腔内投与を4週間行った²⁾。コントロールとしてリン酸緩衝食塩水PBSを投与した。投与4週後のマウスの腹膜の線維化をマッソン・トリクローム染色で評価した。免疫蛍光法として、CTGFの染色を行った。薄切したパラフィン包埋腹膜切片をクエン酸バッファ下で沸騰させ抗原賦活

しSantaCruz社の抗CTGF抗体で反応させ、その後FITC-抗ヤギ抗体を反応させ、観察を行った。腹膜組織のmRNA発現として、CTGFを検討した。

3 結果

野生型マウスにCG投与すると腹膜中皮下組織の肥厚を認め、誘導型全身性CTGFノックアウトマウスではCG投与群で腹膜中皮下組織肥厚が軽減していた。免疫染色においてCG投与野生型マウスはMMP-10の増加を認め、特に中皮細胞と中皮下線維化領域に増加を認めた。一方、誘導型全身性CTGFノックアウトマウスではMMP-10は中皮細胞では認められるが、中皮下組織のMMP-10は低下を認めた (図1)。

次に全身性MMP-10ノックアウトマウスにCG投与を行った。CG投与MMP-10ノックアウトマウスのCG投与野生型マウスに比して腹膜中皮下組織の線維化が軽度であった。免疫蛍光染色でCTGF染色を行ったところ、CG投与野生型マウスではCTGFは中皮細胞と中皮下線維組織に増加を認めた。一方、CG投与MMP-10ノックアウトマウスではCTGF染色の低下を認めた (図2)。

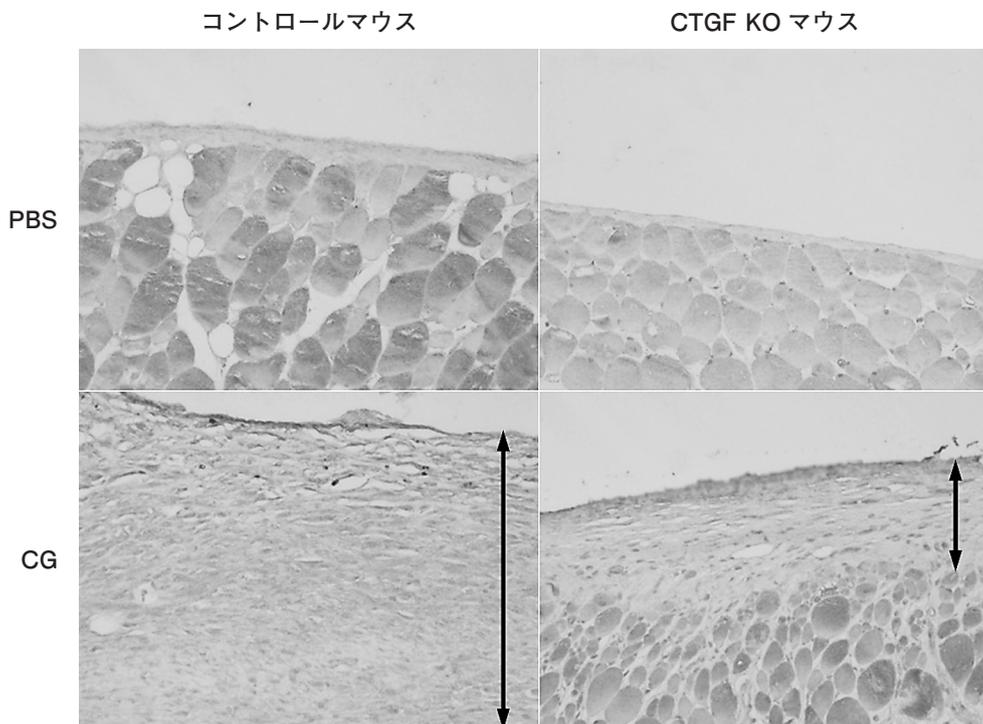


図1 クロロヘキシジン投与誘導型全身性CTGFノックアウトマウスの腹膜組織のMMP-10発現

コントロールマウスもしくは誘導型全身性CTGFノックアウト (KO) マウスに、PBSもしくは0.1%クロロヘキシジン (CG) を週3回投与した4週間後の腹膜組織、MMP-10免疫染色。矢印は中皮下腹膜線維化組織厚を示す。

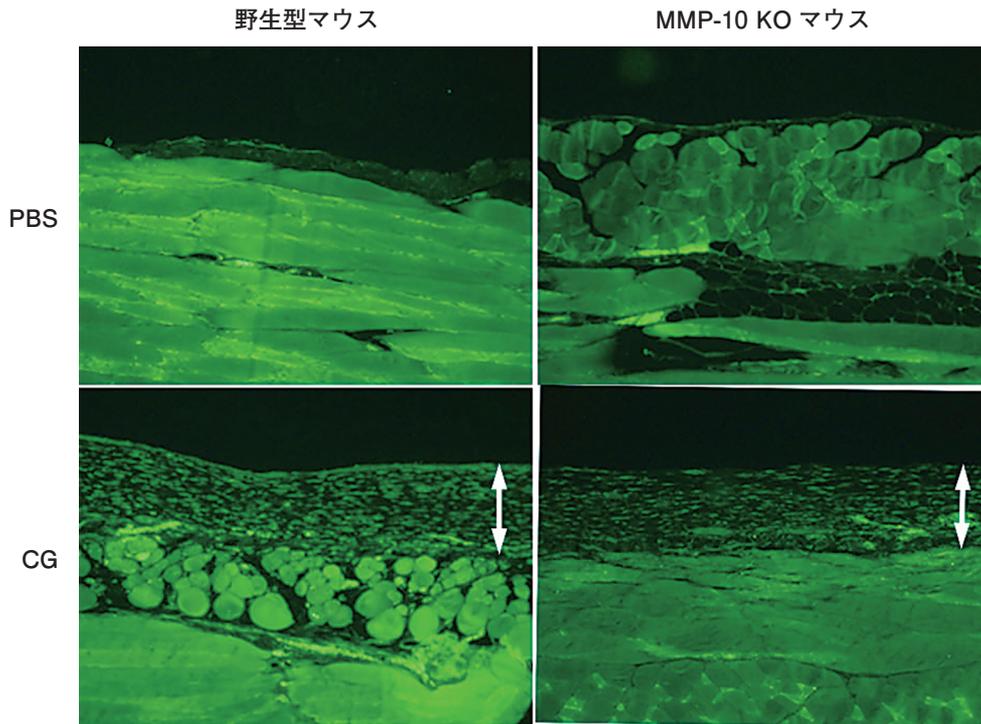


図2 クロロヘキシジン投与全身性 MMP-10 ノックアウトマウスの腹膜組織の MMP-10 発現
野生型もしくは MMP-10 ノックアウト (KO) マウスに、PBS もしくは 0.1% クロロヘキシジン (CG) を週 3 回投与した 4 週間後の腹膜組織、CTGF 免疫蛍光染色。矢印は中皮下腹膜線維化組織厚を示す。

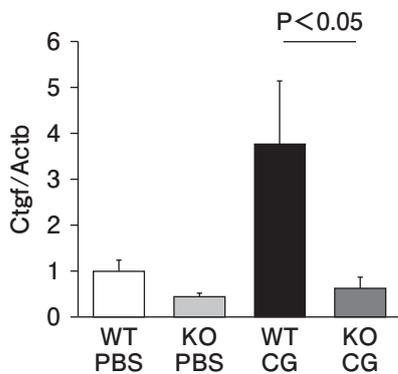


図3 クロロヘキシジン投与全身性 MMP-10 ノックアウトマウスの腹膜組織の CTGF mRNA 発現

次に MMP-10 ノックアウトマウスの腹膜の CTGF mRNA 発現を解析した。CG 投与野生型マウスでは CTGF 発現は 3.7 倍に増加したが、CG 投与 MMP-10 ノックアウトマウスでは、ほぼベースレベルまで CTGF 発現が低下していた (図 3)。

これらの結果から、*in vivo* において CTGF 阻害は腹膜の MMP-10 を抑制し、また MMP-10 阻害は腹膜の CTGF 発現を阻害することを明らかにした。CTGF/MMP-10 系は腹膜線維化において vicious cycle を形成する可能性が示唆された。

4 考 察

腹膜線維化進行過程においては細胞外基質産生と分解が同時に生じている。筆者らは過去に CG による腹膜線維症モデルマウスにおいて、誘導型全身性 CTGF ノックアウトマウスが腹膜線維症を軽減させることを報告した¹⁾。CTGF は細胞外基質を増加させる増殖因子である。一方、筆者らは、細胞外基質を分解する MMP-10 に着目し、CG 投与 MMP-10 ノックアウトマウスは腹膜線維症が軽減することを示してきた。CTGF と MMP-10 の二つの因子をそれぞれ阻害することにより腹膜線維症が軽減することから、これら 2 因子におけるクロストークに着目した。

CG 投与誘導型全身性 CTGF ノックアウトマウスにおいて腹膜の MMP-10 が低下することを示した。CG 投与誘導型全身性 CTGF ノックアウトマウスは腹膜の炎症やマクロファージ浸潤が低下することを報告してきた¹⁾。また腹膜中皮細胞において、TNF- α 刺激は MMP-10 を誘導することを認めていることから³⁾、炎症性のサイトカインの減少を介して、腹膜の MMP-10 が減少したことが推測される。

CG 投与 MMP-10 ノックアウトマウスにおける腹膜

線維化軽減機序について解析を進めている。CG 投与 MMP-10 ノックアウトマウスは CG 投与野生型マウスに比して、fibronectin 発現や炎症に関連する Ccl2, Emr1 発現が低下している。今回 CTGF 発現についても低下していることを示した。CG 投与野生型マウスでは CTGF 発現の増加に伴って、MMP-10 の増加、さらに CTGF 発現と vicious cycle を形成している可能性が示唆される。しかしながら、今回 MMP-10 の CTGF 増加機序については解明できておらず、今後の解析が必要である。

5 結 論

長期間の腹膜透析療法により腹膜線維化の亢進が認められる。腹膜線維化モデルマウスにおいて CTGF と MMP-10 発現は亢進し、CTGF を阻害することで MMP-10 を抑制でき、また MMP-10 を阻害することにより腹膜線維化の抑制、CTGF の抑制が認められた。今後、この機序を解明することで腹膜透析において vicious cycle を阻害することによる腹膜の線維化抑制となりうる可能性が示唆された。

令和元年度日本透析医会公募研究助成により得られ

た成果は、現在原著論文として投稿準備中のため、二重投稿となることを避け、本報告書ではその概要を総説的に記載した。

利益相反

奨学寄附金：バクスター株式会社，田辺三菱製薬株式会社，第一三共株式会社

講演料：田辺三菱製薬株式会社，アストラゼネカ株式会社

文 献

- 1) Toda, Mori K, Yokoi H, et al. : Deletion of connective tissue growth factor ameliorates peritoneal fibrosis by inhibiting angiogenesis and inflammation. *Nephrol Dial Transplant* 2018; 33 : 943-953.
- 2) Ishii Y, Sawada T, Shimizu A, et al. : An experimental sclerosing encapsulating peritonitis model in mice. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16 : 1262-1266.
- 3) Gao C, Cheng X, Lam M, et al. : Signal-dependent regulation of transcription by histone deacetylase 7 involves recruitment to promyelocytic leukemia protein nuclear bodies. *Mol Biol Cell* 2008; 19 : 3020-3027.