

腹膜透析における p38MAPK を介した MMP-10 の役割解明

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

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。腹膜の線維化においては、細胞外基質産生と分解が同時に起こる。筆者は蛋白分解酵素に着目し、その中でも matrix metalloproteinase (MMP) を解析した。クロロヘキシジン (CG) 腹腔内投与による腹膜線維症マウスにおいて発現が著明に増加する MMP-10 の役割を検討することとし、MMP-10 ノックアウトマウスに CG を投与し腹膜線維化を惹起した。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腹膜の線維化が軽減しており、筋線維芽細胞の減少とマクロファージ浸潤の抑制が認められた。また、培養腹膜中皮細胞においては、MMP-10 を抑制すると、Transforming Growth Factor- β (TGF- β) は抑制されないものの、下流の connective tissue growth factor (CTGF) や I 型コラーゲンが抑制されており、MMP-10 は線維化を抑制する可能性が示唆され、MMP-10 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、腹膜線維症における線維化調節機構について細胞外基質分解機序とその細胞内シグナルの解明を目指すものである。細胞外基質調節について、MMP-10 に着目し、MMP-10 ノックアウトマウスを用いて CG による腹膜線維症を作製し、線維化、炎症に関係する遺伝子群の発現変化、血管の密度や VEGF 等、

血管透過性に関与する因子の発現変化、腹膜透過性の変化の評価を行った。

腹膜透析における MMP の作用として、TGF- β 過剰発現による腹膜障害は MMP-2 ノックアウトマウスでは改善せず、MMP-9 ノックアウトマウスでのみ改善する報告がある¹⁾。このように MMP ファミリーには固有の機能や重複性があることが想定される。本研究で着目した MMP-10 は発現変化が大きく、動脈硬化や糖尿病性腎症、線溶系活性化などの病態に関与していることが報告されており、腹膜線維化の関与を明らかにすることは意義がある。また p38 mitogen-activated protein kinase (p38MAPK) の MMP-10 発現に対する関与も検討する。

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。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。免疫組織化学法として、MMP-10、筋線維芽細胞マーカー (α -smooth muscle actin; α SMA)、マクロファージマーカー F4/80 とリン酸化 p38MAPK の染色を行った。

腹膜組織の mRNA 発現として、TGF- β 1, connective tissue growth factor (CTGF), collagen type 1 al-

pha 1 chain と chemokine ligand 2 (CCL2)/macrophage chemoattractant protein1 (MCP1) を検討した.

培養ヒト腹膜中皮細胞 Met5A に MMP-10 siRNA (5 nM) 遺伝子導入し, 48 時間後に TNF- α (20 ng/ml) 添加し, 2 時間後に RNA を回収し, MMP-10, COL1A1, CCL2, CTGF, TGF- β 1 mRNA 発現を解析した.

ヒト腹膜生検組織を用いた研究は「世界医師会ヘルシンキ宣言」に則り, 「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠した計画を, 京都大学大学院医学研究科医の倫理委員会の承認 (G562 号) を得て, 倫理指針ならびに計画書を遵守して行った. 対象患者より文書にて同意を得た. ヒト腹膜組織について MMP-10 発現を免疫組織化学法で検討した. 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ー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 発色させた.

3 結果

クロロヘキシジン投与にて MMP-10 発現は 220 倍に増加していた. MMP-10 ノックアウトマウスの MMP-10 発現は検出感度以下であった. MMP-10 ノックアウトマウスの CG 投与による腹膜線維症野生型 (WT) マウスは, 中皮下線維組織厚は 300 μ m であったが, CG 投与 MMP-10 ノックアウトマウスでは 135 μ m と 55% 減少していた (図 1). 次に腹膜線維症軽減機序を検討するために, 免疫組織化学法で筋線維芽細胞マーカーである α SMA 染色を行った. α SMA 陽性細胞数は WT マウスに比して MMP-10 ノックアウトマウスでは半分に減少しており, F4/80 陽性細胞数は約 30% 減少していた. リン酸化 p38MAPK は両群とも弱い発現を認めた. CG 投与 MMP-10 ノックアウトマウスは CG 投与 WT マウスに比して, TGF- β 1,

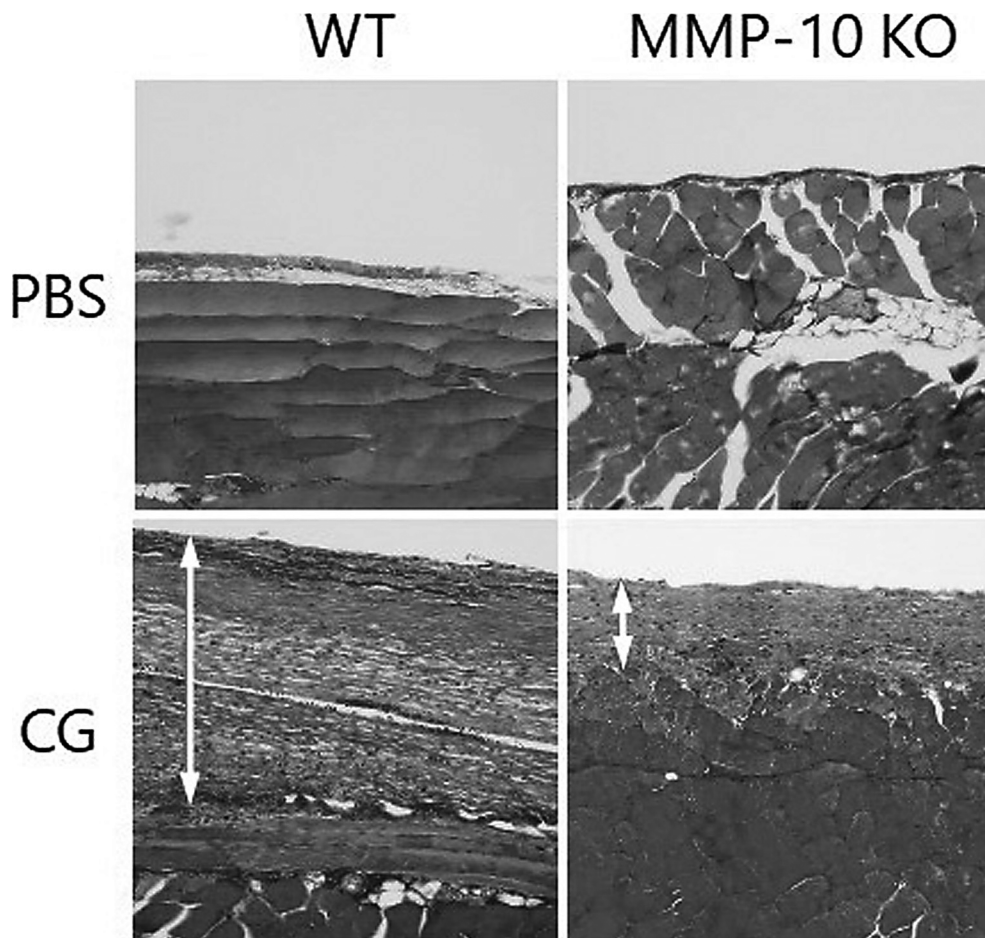


図 1 クロロヘキシジン投与マウスの腹膜組織

野生型 (WT) もしくは MMP-10 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. マッソントリクローム染色. 矢印は中皮下腹膜線維化組織厚を示す.

CTGF, COL1A1, CCL2 mRNA が有意に低下していた。

Met5A に MMP-10 siRNA を遺伝子導入すると、MMP-10 mRNA は約 50% 抑制され、TNF- α 刺激下において TGF- β 1 mRNA は変化しないものの、CTGF, COL1A1, CCL2 mRNA はいずれも抑制された。ヒト腹膜における MMP-10 免疫染色を少数施行したが発現レベルが低く評価が困難であった。

これらの結果から、MMP-10 阻害は腹膜の細胞外基質増加に対して抑制的に作用し、その機序としては TGF- β から CTGF 誘導系においてシグナル伝達を阻害している可能性が示唆される。

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おり、細胞外基質分解の主たる蛋白として MMP がある。

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マイクロアレイ解析を施行し、pleiotrophin を含む複数の遺伝子群が腹膜線維症モデルマウスの腹膜で発現が亢進することを報告してきた³⁾。そのアレイデータを再解析し、MMP の中では MMP-10 が最も増加割合が高く、50~100 倍程度発現亢進することを確認した。そのため MMP-10 に着目し、MMP-10 ノックアウトマウスを用いて CG による腹膜線維症を作製し、線維化、炎症に関係する遺伝子群の発現変化、血管の密度や VEGF 等血管透過性に関与する因子の発現変化評価を行うこととした。腹膜線維症の標的分子として MMP-10 に着目したのは新規である。

これまで報告されてきた MMP-2, MMP-9 との関連については、ともに腹膜障害で増加するが、TGF- β 過剰発現による腹膜障害は MMP-2 ノックアウトマウスでは改善せず、MMP-9 ノックアウトマウスでのみ改善する報告がある¹⁾。このように MMP ファミリーには固有な機能や重複性があることが想定される。MMP-10 は発現変化が大きく、また動脈硬化⁴⁾や糖尿病性腎症⁵⁾、線溶系活性化⁶⁾など様々な病態に関与することがすでに報告されており、腹膜の線維化にも関与することを想定した。

本研究において MMP-10 の阻害が腹膜線維化を抑制することを初めて示した。クロロヘキシジン投与により惹起される腹膜の線維化が 55% 低下したことから MMP-10 非依存的な経路も存在するが、MMP-10 に

よる経路の重要性が示唆される。MMP-10 はもともと 4 型コラーゲン、fibronectin などを分解する酵素⁷⁾であるが、蛋白分解酵素の作用のみでは MMP-10 阻害による腹膜線維化改善の機序を説明することは困難で、むしろ MMP-10 は細胞外基質増加系の活性化に関わっているという解釈のほうが論理的である。

マウスの腹膜線維症組織において、MMP-10 ノックアウトマウスは TGF- β 1, CTGF, CCL2 mRNA 発現が抑制されており、細胞外基質に関与する全体的な増殖因子、炎症が抑制されていた。また培養中皮細胞に MMP-10 siRNA による MMP-10 を抑制した系においては、TGF- β 1 は変化せずに CTGF, COL1A1, CCL2 mRNA 発現が抑制されたことから、TGF- β の下流因子の活性化に MMP が関与している可能性が示唆される⁸⁾。

今回の検討では、少数例のヒト腹膜組織を用いた免疫染色における MMP-10 の発現レベルが低く、ヒト腹膜組織に関しての十分な知見を得ることができず今後の課題である。

5 結 論

長期間の腹膜透析療法により腹膜線維化ならびに腹膜透過性の亢進が認められる。腹膜線維化モデルマウスにおいて MMP-10 発現は亢進し、MMP-10 を阻害することにより、腹膜線維化の抑制、腹膜組織の筋線維芽細胞の抑制、マクロファージ遊走の抑制が認められることから、腹膜線維化抑制に有用である可能性が考えられる。

その機序としては、培養中皮細胞において MMP-10 を阻害すると TGF- β には影響を及ぼさずに CTGF, COL1A1, CCL2 の低下を認めることから、TGF- β の下流の活性化経路に MMP-10 は影響する可能性が示唆された。

腹膜透析の開始もしくは終了時に採取したヒト腹膜生検組織の MMP-10 発現は、検討した症例では発現レベルが低く、今後 MMP-10 発現の意義について検討を重ねていく必要がある。

MMP-10 は基質分解作用の他、シグナル伝達系の活性化に関与する可能性が想定され、今後、腹膜透析において阻害することで腹膜の線維化ならびに透過性亢進に対して新規治療標的となりうる可能性が示唆された。

平成 30 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

文 献

- 1) Padwal M, Siddique I, Wu L, et al. : Matrix metalloproteinase 9 is associated with peritoneal membrane solute transport and induces angiogenesis through β -catenin signaling. *Nephrol Dial Transplant* 2017; 32 : 50-61.
- 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) Yokoi H, Kasahara M, Mori K, et al. : Pleiotrophin triggers inflammation and increased peritoneal permeability leading to peritoneal fibrosis. *Kidney Int* 2012; 81 : 160-169.
- 4) Montero I, Orbe J, Varo N, et al. : C-reactive protein induces matrix metalloproteinase-1 and -10 in human endothelial cells. Implications for clinical and subclinical atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 2006; 47 : 1369-1378.
- 5) Toni M, Hermida J, Goni MJ, et al. : Matrix metalloproteinase-10 plays an active role in microvascular complications in type 1 diabetic patients. *Diabetologia* 2013; 56 : 2743-2752.
- 6) Orbe J, Barrenetxe J, Rodriguez JA, et al. : Matrix metalloproteinase-10 effectively reduces infarct size in experimental stroke by enhancing fibrinolysis via thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor-mediated mechanism clinical perspective. *Circulation* 2011; 124 : 2909-2919.
- 7) Craig VJ, Zhang L, Hagood JS, et al. : Matrix metalloproteinases as therapeutic targets for idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2015; 53 : 585-600.
- 8) Dong H, Diao H, Zhao Y, et al. : Overexpression of matrix metalloproteinase-9 in breast cancer cell lines remarkably increases the cell malignancy largely via activation of transforming growth factor beta/SMAD signaling. *Cell Prolif* 2019; 52 : e12633.