

腹膜透析における MAPK ファミリーの役割の解明

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, p38 MAPK

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。研究者は腹膜機能不全に関連する因子とその役割を解析し、これまで腹膜透析に connective tissue growth factor (CTGF) や matrix metalloproteinase-10 (MMP-10) が腹膜透過性亢進に関与することを示してきた。これらの増殖因子は細胞の受容体に結合し、細胞内シグナルを伝達する。細胞内シグナルには複数の機構が存在するが、細胞増殖や遊走に関わる MAPK (mitogen-activated protein kinases) ファミリー、特に p38 MAPK に着目して解析を行った。

誘導型全身性 p38 MAPK ノックアウトマウスを作製し、クロロヘキシジン (chlorhexidine; CG) 腹腔内投与したところ、CG 投与野生型マウスと比較して、腹膜中皮組織下線維組織の肥厚が軽減することを認めた。腹膜組織より抽出した RNA 発現を検討したところ、有意ではないものの I 型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖と α SMA 発現が誘導型全身性 p38 MAPK ノックアウトマウスで低下傾向であった。コントロールマウスの肥厚した腹膜組織において、リン酸化 p38 MAPK 発現は浸潤マクロファージと中皮細胞および線維芽細胞で発現が増加することを認めた。これらの結果から、p38 MAPK は腹膜線維化の増悪因子であることを示した。

1 研究目的

本研究の目的は、腹膜透析における MAPK ファミ

リー特に p38 MAPK の役割を解明することである。p38 MPAK を含む MAPK ファミリーは細胞増殖、遺伝子発現変化、細胞遊走作用など多彩な作用を伝達する¹⁾。研究者はこれまで腎疾患における p38 MAPK の意義を明らかにしてきた。しかしながら腹膜透析における p38 MAPK の意義の検討としては、CG による腹膜線維症が p38 MAPK 阻害薬で改善することが示されているが、阻害効率が明らかではなく、ほぼ完全に p38 MAPK を阻害した表現型については不明であった。そのため、タモキシフェン誘導型全身性 p38 MAPK ノックアウトマウスを作製し、CG を投与することによる腹膜組織の変化、炎症、RNA 発現変化を検討することを本研究の目的とする。

2 研究方法

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型 Cre リコンビナーゼを発現する Rosa-CreERT2 マウスと MAPK14 (p38 MAPK) 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日連日行い¹⁾、全身の p38 MAPK を欠損させる。各群 10 匹ずつ検討した。7週齢時より 0.1% クロロヘキシジン (CG)/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 p38 MAPK floxed マウスを用いた。腹膜を回収してマッソントリクローム染色とリン酸化 p38 MAPK 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、切片のマッソントリクローム染色を行った。別に腹膜を OCT 包埋し、薄切切片を Cell signaling 社のウサギ抗 phosphorylated p38 MAPK 抗体で反応させ、続いて Jackson Laboratory 社 Rhodamine ラベル抗ウサギ抗体を反応させた。

CG 投与後のノックアウトマウスとコントロールマウスの腹膜組織より RNeasy (Qiagen 社) を用いて RNA を抽出し、Mapk14 (p38 MAPK), Col1a1, Acta2, Actnb の TaqMan プローブを用いて real-time RT-PCR

を施行し mRNA 発現解析を行った。

3 研究結果

コントロールマウスに CG 投与すると腹膜中皮下組織の肥厚を認めた。一方、CG 投与誘導型全身性 p38 MAPK 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 (図 1)。免疫染色において CG 投与コントロールマウスはリン酸化 p38 MAPK の増加を認め、特に中皮細胞と中皮下線維化領域ならびにマクロファージを含む炎症細胞

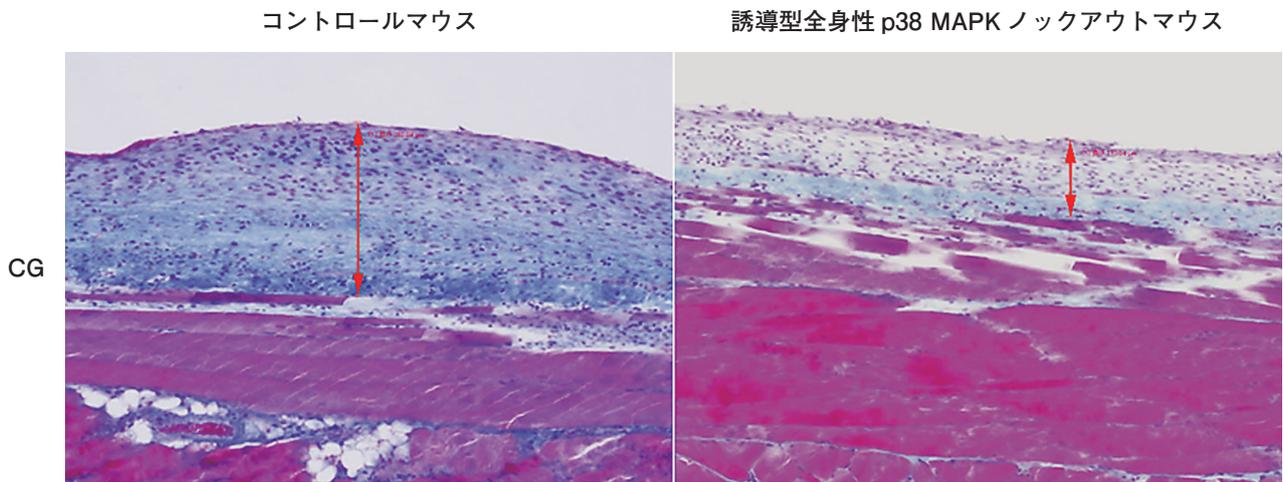


図 1 クロロヘキシジン投与誘導型全身性 p38 MAPK ノックアウトマウスの腹膜組織の腹膜肥厚

コントロールマウスもしくは誘導型全身性 p38 MAPK ノックアウト (KO) マウスに 0.1% クロロヘキシジン (CG) を週 3 回投与した 4 週間後の腹膜組織の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。CG 投与誘導型全身性 p38 MAPK ノックアウトマウスの腹膜肥厚は軽減していた。(著者作成)

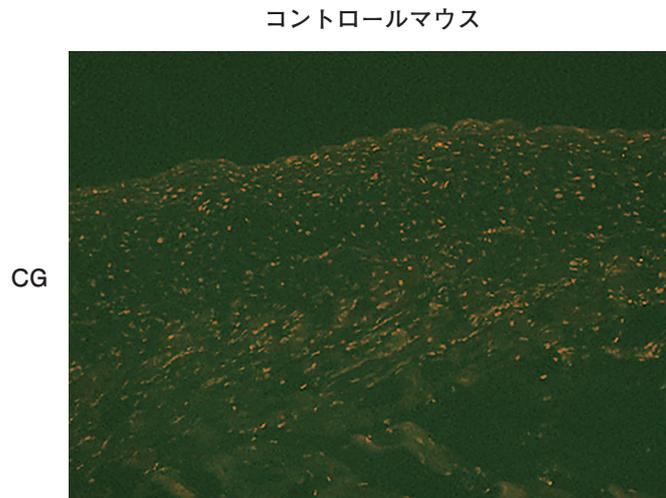


図 2 クロロヘキシジン投与コントロールマウスの腹膜組織のリン酸化 p38 MAPK 発現
コントロールマウスに 0.1% クロロヘキシジン (CG) を週 3 回投与した 4 週間後の腹膜組織。リン酸化 p38 MAPK は中皮細胞と中皮下線維化領域ならびにマクロファージを含む炎症細胞に増加を認めた。(著者作成)

に増加を認めた (図 2)。一方, 誘導型全身性 p38 MAPK ノックアウトマウスでは全体にリン酸化 p38 MAPK の低下を認めた。

次に腹膜の Mapk14 (p38 MAPK), Col1a1, Acta2 mRNA 発現を解析した。CG 全身誘導性 p38 MAPK ノックアウトマウス腹膜は CG コントロールマウス腹膜と比較して, p38 MAPK 発現は 50% 程度の低下を認めるもののばらつきが大きく有意差を認めず, また Col1a1 と α SMA の平均値は 30% 程度低下するものの, こちらも有意差を認めなかった。

これらの結果から, p38 MAPK の抑制により腹膜線維化が抑制されることが明らかとなった。

4 考察

腹膜線維化進行過程においては炎症と増殖因子により細胞外基質産生が生じている。炎症性サイトカインである IL-1 β や IL-6, また線維化に関わる増殖因子の代表である TGF- β などは細胞の受容体に結合し, その下流の一つとして MAPK ファミリーを活性化する。MAPK ファミリーは ERK, p38 MAPK, JNK からなりそれぞれに異なった働きを果たすが, 腹膜透析における変化については不明な点が多い。

本研究において主に p38 MAPK の働きを解析する目的で薬剤誘導型全身性 p38 MAPK ノックアウトマウスを使用した。これは, p38 MAPK ノックアウトマウスは胎生期に死亡するためである²⁾。P38 MAPK の局在についてはユビキタスに発現していると考えられているが, CG による腹膜線維化モデルでは腹膜中皮細胞と線維芽細胞, マクロファージを含む炎症細胞に発現が多く認められた。今回の検討では, 誘導型全身性 p38 MAPK ノックアウトマウスは腹膜の線維化が軽減することが認められた。この機序については, 解

明できていないことも多く, 線維化に関連する遺伝子発現においては傾向は認めるものの, 有意差が認められなかった。また切断効率については 100% 近い切断ができておらず, 切断効率の問題もありうることを示唆される。今後炎症の変化や, どの細胞の p38 MAPK が重要などかについての検討をさらに進めていく必要がある。

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リン酸化 p38 MAPK は亢進する。誘導型全身性 p38 MAPK ノックアウトマウスでは腹膜線維化が軽減した。リン酸化 p38 MAPK は中皮細胞, 線維芽細胞, 炎症細胞で発現が増加し, 今後, この機序を解明することで腹膜の線維化抑制となりうる可能性が示唆された。

令和 2 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。

利益相反自己申告: 奨学寄附金なし, 講演料 アストラゼネカ

文 献

- 1) Kumar S, Boehm J, Lee JC : p38 MAP kinases : key signaling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2003; 2 : 717-726.
- 2) Adams RH, Porras A, Alonso G, et al. : Essential role of p38alpha MAP kinase in placental but not embryonic cardiovascular development. *Mol Cell* 2000; 6 : 109-116.