

腹膜透析におけるマクロファージの p38 MAPK の意義の解明

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，マクロファージ

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，腹膜透析においては新規の因子である pleiotrophin¹や，線維化と関連する結合組織増殖因子（connective tissue growth factor）²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し，細胞増殖，遺伝子発現増加・減少，遊走などの生理作用を発揮する．申請者は，細胞内シグナルとして，アポトーシスやストレス応答に関与する p38 MAPK に着目した．マウス腹腔内にクロロヘキシジン（CG）を投与すると，腹膜中皮下線維層の肥厚に伴って，リン酸化 p38 MAPK の増加が認められる．令和 2 年度の本研究助成において「腹膜透析における MAPK ファミリーの役割の解明」で薬剤誘導性 p38 MAPK ノックアウトマウスを作製し，腹膜線維症における意義を解明しつつあるが，本研究ではマクロファージ特異的な p38 MAPK ノックアウトマウスを作製し，解析を行った．CG を投与したコントロールマウスは腹膜の肥厚を認めるが，マクロファージ特異的 p38 MAPK KO マウスでは腹膜の肥厚が約 40% 軽減していた．また腹膜の Emr1（F4/80）遺伝子発現が，CG 投与マクロファージ特異的 p38 MAPK KO マウスで CG 投与コントロールマウスより軽減する傾向を認めた．このことから，マクロファージの p38 MAPK は腹膜の炎症と線維化において一定の役割を果たすこと

が明らかとなった．

1 研究目的

本研究の目的は，腹膜透析における腹膜の機能的・形態的变化において，細胞内シグナルの一部である p38 MAPK の役割を明らかにすることである．全身とマクロファージにおける p38 MAPK に注目し，研究を行う．p38 MAPK はストレス応答，アポトーシス，細胞増殖など多彩な生理作用に関与し，生命体にとって必須のシグナルが腹膜透析時にどのように変化しているかを検討することは，他の組織との共通点と相違点を明確にすることができ，病態の機序解明に貢献する．

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．マクロファージ特異的に Cre リコンビナーゼを発現する LysMCre マウスを Jackson Laboratory より導入し，p38 MAPK floxed マウス（EMBL Mouse Biology Unit Pasparakis 先生との共同研究）と交配させることにより，マクロファージ特異的 p38 MAPK ノックアウト（LysM-p38 MAPK KO）マウスを作製する．このマウスに CG を投与することにより腹膜線維症を惹起し，これらマウスの腹膜線維化，炎症を検討し，腹膜透過性も検討する．先行しており薬剤誘導性全身性 p38 MAPK ノックアウトマウスとの差異を検討することにより，マクロファージの機能，マクロファージ以外

の機能についてより詳細に検討を行う。

コントロールマウス PBS 群 (n=9), LysM-p38 MAPK KO マウス PBS 群 (n=9), コントロールマウス/CG 群 (n=11), LysM-p38 MAPK KO マウス (n=11) を検討した。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¹⁾。コントロールマウスとして Cre リコンビナーゼを有さない 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。

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), Emr1, Il1b, Gapdh 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 LysM-p38 MAPK KO 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)。一方, PBS

投与群においては, コントロールマウス, LysM-p38 MAPK KO マウス両者において腹膜肥厚に差を認めなかった。

次に腹膜の Mapk14 (p38 MAPK), Emr1 (F4/80), Il1b mRNA 発現を解析した。CG 投与 LysM-p38 MAPK KO 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 発現は変化なく, マクロファージマーカーである F4/80 発現とインターロイキン 1 β 発現については低下する傾向を認めた。以上からマクロファージの p38 MAPK を欠失させることで, 腹膜の炎症が低下することが示唆された (図 2)。

以上から, マクロファージの p38 MAPK を欠失させると腹膜の線維化が軽減することが示された。

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

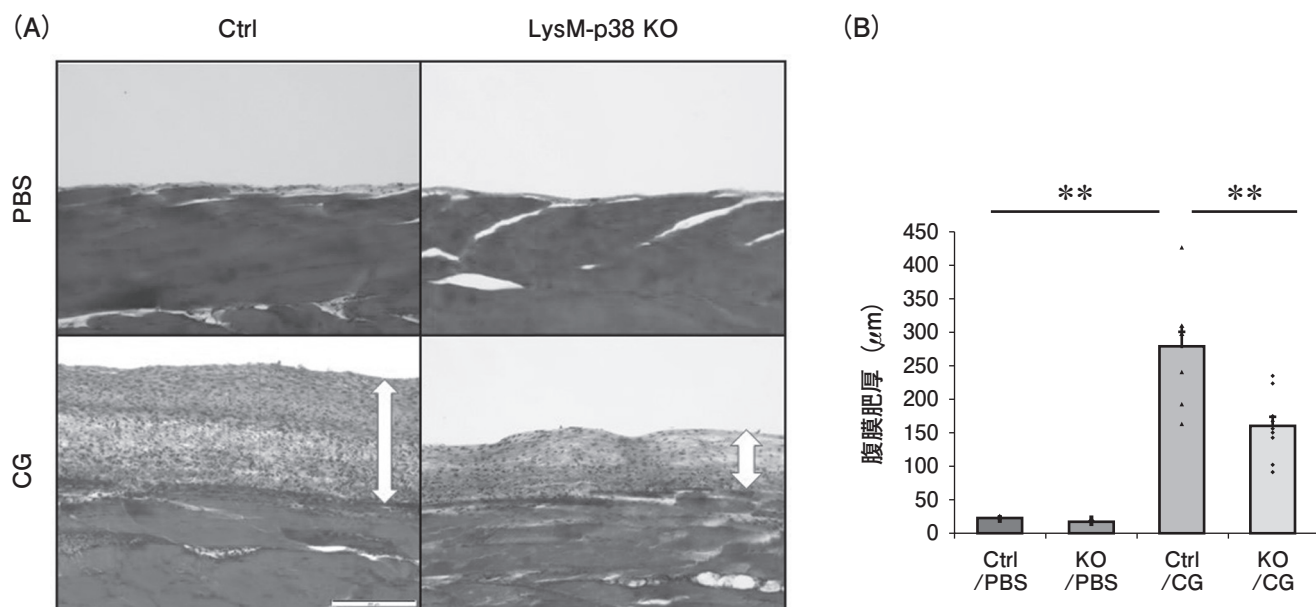


図 1 クロロヘキシジン投与マクロファージ特異的 p38 MAPK ノックアウトマウスの腹膜組織の腹膜肥厚

(A) コントロールマウス (Ctrl) もしくはマクロファージ特異的 p38 MAPK ノックアウトマウス (LysM-p38 KO) 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。 (B) 腹膜肥厚 (μm)。 ** P<0.01 (著者作成)

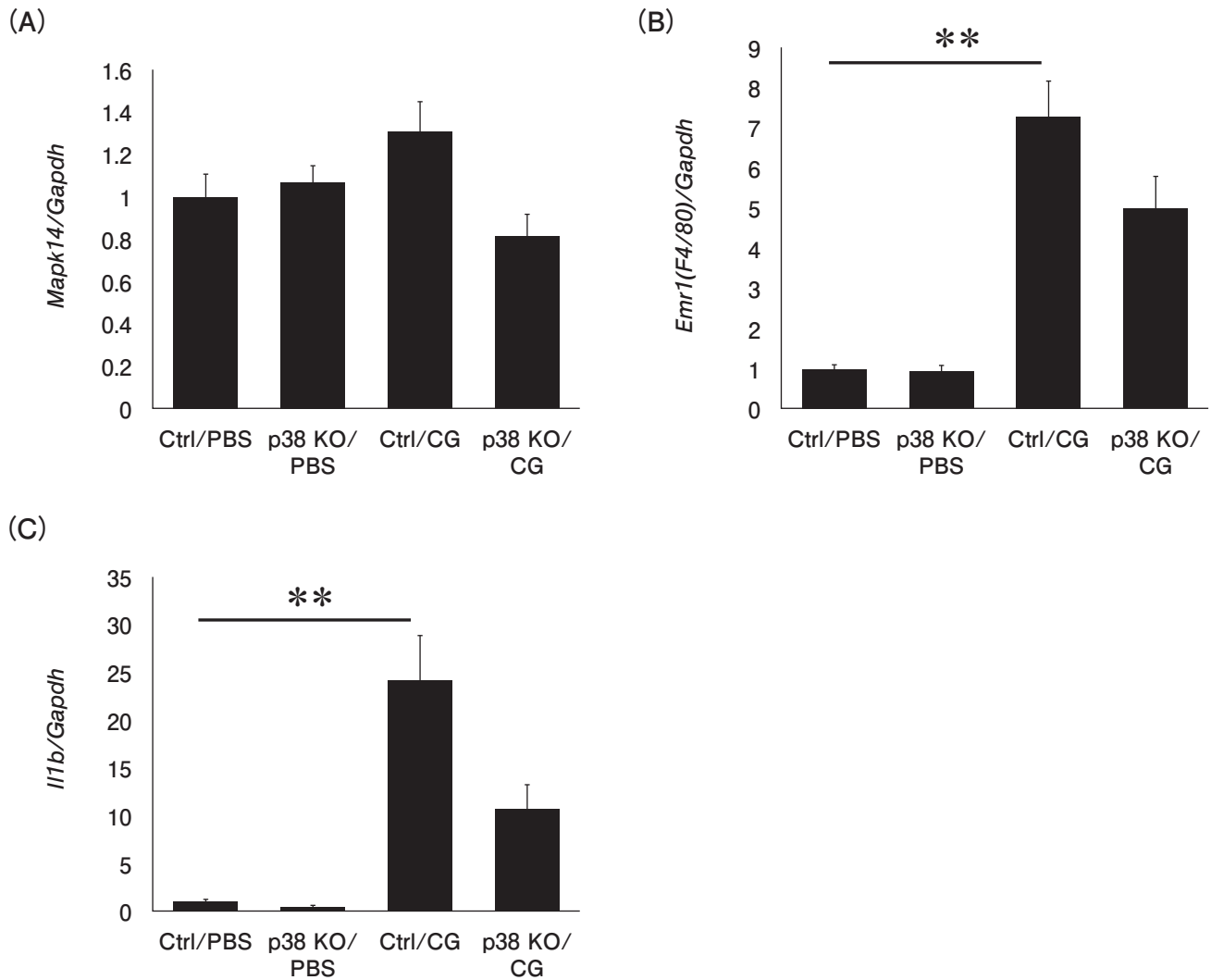


図2 腹膜組織の mRNA 発現

(A) p38 MAPK, (B) Emr1 (F4/80), (C) Il1b (interleukin-1 β) mRNA 発現. インターナルコントロールを GAPDH とした. コントロールマウス (Ctrl) もしくはマクロファージ特異的 p38 MAPK ノックアウトマウス (p38 KO) に 0.1% クロロヘキシジン (CG) もしくは PBS を週 3 回投与した 4 週間後の腹膜組織から抽出した RNA 発現. **P<0.01. (著者作成)

析における変化については不明な点が多い.

これまで全身性薬剤誘導性 p38 MAPK ノックアウトマウスでは CG による腹膜線維化が軽度であることを示してきた. しかしながら, 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ものの, 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, どの細胞の p38 MAPK が重要であるかについては不明であった. そのため本研究においてマクロファージの p38 MAPK に着目し, マクロファージ特異的 p38 MAPK ノックアウトマウスを使用した.

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. マクロファージ特異的 p38 MAPK ノックアウトマウスでは腹膜線維化が軽減した. 全身性薬剤誘導性 p38 MAPK ノックアウトマウスのデータと合わせ, 腹膜線維化においてマクロファージの p38 MAPK は重要な役割を果たすことが明らかとなった.

その他

令和 3 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：申告すべきものなし

inflammation and increased peritoneal permeability leading to peritoneal fibrosis. *Kidney Int* 2012; 81 (2) : 160-169.

- 2) Toda N, Mori K, Kasahara M, et al. : Deletion of connective tissue growth factor ameliorates peritoneal fibrosis by inhibiting angiogenesis and inflammation. *Nephrol Dial Transplant* 2018; 33 (6) : 943-953.

文 献

- 1) Yokoi H, Kasahara M, Mori K, et al. : Pleiotrophin triggers