

# 腹膜硬化症モデルラットにおけるヒト肝細胞成長因子 遺伝子導入腹膜中皮細胞の効果

松岡 稔明<sup>1</sup> 前田 裕弘<sup>3</sup> 松尾 晃樹<sup>1</sup> 内木 義人<sup>1</sup> 坂口 美佳<sup>1</sup>  
玉井 良尚<sup>2</sup> 長谷川 廣文<sup>2</sup> 船内 正憲<sup>1</sup> 金丸 昭久<sup>3</sup>

<sup>1</sup>近畿大学医学部内科学教室 (腎臓膠原病内科部門) <sup>2</sup>近畿大学医学部堺病院腎・透析科  
<sup>3</sup>近畿大学医学部内科学教室 (血液内科部門)

## 抄 録

背景：長期にわたる腹膜透析では腹膜線維化により腹膜機能が低下し、これが原因で腹膜透析を中止することがある。腹膜線維化には transforming growth factor-beta1 (TGF- $\beta$ 1) と hepatocyte growth factor (HGF) の不均衡が密接に関わっているとの報告がある。現在までにわれわれは、外因性 HGF が、高濃度グルコースや TGF- $\beta$ 1 による傷害を受けたヒト腹膜中皮細胞の増殖能を改善することを報告してきた。今回われわれは腹膜硬化症モデルラットにおける HGF の効果を検討した。方法：ラットに0.1%グルコン酸クロルヘキシジンを経口投与し、腹膜硬化症モデルラットを作成した。ラット腹膜中皮細胞にヒト HGF 遺伝子を導入して腹膜硬化症モデルラット腹腔内へ投与し、この時の組織学的変化を検討した。結果：腹膜硬化症モデルラットにおける腹膜の組織学的変化として、中皮細胞の脱落と線維芽細胞の増加、新生血管の増生を認めた。これらの変化はヒト HGF 遺伝子導入ラット腹膜中皮細胞を腹腔内投与することで抑制された。結論：ヒト HGF 遺伝子導入ラット腹膜中皮細胞の腹腔内投与により腹膜線維化が抑制された。

**Key words:** hepatocyte growth factor, 腹膜透析, 腹膜中皮細胞, transforming growth factor-beta1, 腹膜硬化症, 腹膜機能

## 緒 言

現在までにわれわれは、外因性 hepatocyte growth factor (HGF) が、高濃度 D-glucose や transforming growth factor-beta1 (TGF- $\beta$ 1) による傷害を受けたヒト腹膜中皮細胞の増殖能を改善することを報告してきた<sup>1</sup>。HGF は様々な細胞に対して、遊走能、抗アポトーシス、血管新生などの作用を持つサイトカインである<sup>2,3</sup>。そしてすでに肝硬変<sup>4</sup>や肺線維症<sup>5</sup>、心筋症<sup>6</sup>、糖尿病性腎症<sup>7</sup> などではその効果が実験的に認められている。長期にわたる腹膜透析 (CAPD) において腹膜線維症は一般的な合併症の一つであり、これが原因で腹膜機能が低下し、CAPD を中止することがある<sup>8,9</sup>。腹膜線維症は腹膜中皮細胞 (PMC) の減少と細胞外基質 (ECM) の増生をきたす<sup>10-12</sup>。この原因としては、透析液中の高濃度 D-glucose<sup>13-15</sup> や、低 pH 透析液への持続暴露<sup>16</sup>、

後期糖化生成物<sup>17,18</sup>、再発性の腹膜炎<sup>19</sup>などが挙げられるが、詳細は未だ明らかにはされていない。高濃度 D-glucose 負荷下での培養では様々な細胞で大量の TGF- $\beta$ 1 が細胞上清中に分泌されることが証明されている<sup>20-22</sup>。TGF- $\beta$ 1 は上皮系細胞の増殖抑制や ECM 増生など、多彩な機能を持つサイトカインであり<sup>23,24</sup>、様々な臓器における線維化に関与しているとされている<sup>25-27</sup>。そして臓器線維化には TGF- $\beta$ 1 と HGF の不均衡が密接に関わっているとの報告もある<sup>28-30</sup>。これらのことから、われわれは HGF が TGF- $\beta$ 1 による線維化の抑制に重要な役割を果たし、結果的に腹膜機能を改善するのではないかと仮定した。

これを明らかにするため、ラット腹膜中皮細胞 (RPMC) に full-length human HGF cDNA (pUCSR $\alpha$ /HGF) を遺伝子導入し、これを0.1%グルコン酸クロルヘキシジンを経口投与したラット腹腔内に注入し

て作成した腹膜硬化症ラット腹腔内に移入し、腹膜の組織学的変化と腹膜機能の変化を検討した。

## 方 法

### 動物

8週齢の Wistar rat (オス, 体重200-250 g) を使用した (Japan SLC, Shizuoka, Japan). 全ての実験は National Research Council Guidance に拠っておこなった。

### ラット腹膜中皮細胞の採取と培養

RPMC は Wistar rat の壁側腹膜より採取した<sup>31</sup>. 腹膜組織を37°Cの0.25%トリプシン, 0.02% EDTA (Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan) 溶液に30分間浸し, 得られた溶液を20°C, 1000 rpm で5分間遠心分離した. Cell pellet を type I collagen-coated plastic 6-well plates (Iwaki, Tokyo, Japan) に蒔き, 10% FCS (JRH Bioscience, Lenexa, KS, USA) 添加 DMEM (Gibco, Grand Island, NY, USA) に37°C, 5% CO<sub>2</sub> 条件下で2日間培養した. RPMC は敷石状の細胞配列と mouse anti-rat cytokeratin (Abcam, Cambridge, UK) と mouse anti-rat vimentin (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) でそれぞれ染色し, flow cytometer (FACS Calibur; Becton, Dickinson and Company, San Jose, CA, USA) にて同定したのち培養し, 3-5代目の RPMC を使用した. ラット腹膜中皮細胞への遺伝子導入

pUCSR $\alpha$ /HGF 遺伝子は中村敏一教授 (大阪大学医学部大学院未来医療開発組織再生医学科) よりご供与頂いた. RPMC への pUCSR $\alpha$ /HGF 遺伝子導入<sup>32-35</sup>にあたっては, jetPEI (Polyplus-transfection, Illkirch, France)<sup>36,37</sup> を使用した. 導入1日前に RPMC を type I collagen-coated 12-well plates (Iwaki) に蒔き, 10% FCS (JRH Bioscience) 添加 DMEM (Gibco) に37°C, 5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した. 150 mM の NaCl 溶液 (50  $\mu$ l) に pUC-SR $\alpha$ /HGF plasmid (2  $\mu$ g), jetPEI solution (4  $\mu$ l) をそれぞれ溶解し, vortex で混合し, これを type I collagen-coated 12-well plates に培養した RPMC に滴下し室温で30分間放置した. またコントロールとして RPMC へ pUC19 を pUCSR $\alpha$ /HGF と同様に遺伝子導入した. JetPEI による遺伝子導入率の確認には, green fluorescent protein (GFP; Clontech, Mountain View, CA, USA) を使用した. RPMC への GFP 遺伝子導入にあたっては, pUC-SR $\alpha$ /HGF 遺伝子の導入と同様に jetPEI を使用した. GFP を遺伝子導入した RPMC の観察は倒立蛍光顕微鏡 (FITC filter, 200倍, Nikon, Tokyo,

Japan) にておこなった.

### 増殖アッセイ

type I collagen-coated 96-well plates (Iwaki) に pUCSR $\alpha$ /HGF 導入 RPMC (SR $\alpha$ HGF 群), pUC19 導入 RPMC (pUC19 群), および non-transfected RPMC (control 群) をそれぞれ  $2 \times 10^4$  cells/well, 0.5% FCS (JRH Bioscience) 添加 DMEM (Gibco) (100  $\mu$ l) で培養した. 培養後6時間後に, D-glucose (6, 30, 60 mM) (Wako, Osaka, Japan) あるいは TGF- $\beta$ 1 (1, 10, 30, 100 pg/ml) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を負荷した. 負荷48時間後に Cell Titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega Corporation, Madison, WI, USA)<sup>38,39</sup> を20  $\mu$ l 添加した. 添加1時間後に microplate reader (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を用いて増殖能を計測した (波長490 nm).

### ELISA アッセイ

Human HGF と rat TGF- $\beta$ 1 濃度の測定は Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) kit (HGF; Human HGF Quantikine ELISA Kit, R&D Systems, Minneapolis, MA, USA, TGF- $\beta$ 1; BD OptEIA Human TGF- $\beta$ 1 ELISA Set, BD Biosciences, San Diego, CA, USA) を使用した. 腹膜硬化症モデルラットの作成

36匹の Wistar rats を使用した. 18匹には0.1%グルコン酸クロルヘキシジンおよび15%エタノール含有生理食塩水を1.5 ml/100 g 体重の割合で35日間連続投与した (CH 群)<sup>40</sup>. またコントロールとして18匹に生理食塩水を CH 群と同様に投与した (saline 群). CH 群, saline 群共に day 0, 7, 14, 21, 28, 35 に屠殺した. 壁側腹膜を buffered 10% フォルマリン (Wako) に固定し, パラフィン包埋した. 切片厚は4  $\mu$ m とし, 組織学的変化を hematoxylin-eosin 染色および Masson's trichrome 染色にて観察した. また腹膜線維化の評価には, 顕微鏡下に測定した submesothelial layer の厚さ, すなわち腹筋表面より腹膜腔までの厚さを用いた. saline 群における最大値が12  $\mu$ m であったため, 腹膜線維症は submesothelial layer の厚さが12  $\mu$ m 以上と設定した. ラット腹膜中皮細胞の生着確認

ラット腹膜腔へ移入した RPMC の生着確認に GFP を使用した. 10匹の Wistar rat を使用した. 5匹には0.1%グルコン酸クロルヘキシジンおよび15%エタノール含有生理食塩水を連日35日間腹腔内投与した (CH 群), 5匹には CH 群と同様に刺激して day35 に GFP-transfected RPMC ( $1 \times 10^6$  cells/1 ml) を腹腔内へ移入した (GFP 群). 移入4時間後

に壁側腹膜を採取し, buffered 10% フォルマリン (Wako) に固定し, パラフィン包埋した. また一部は蛍光染色用に, 固定せずに Tissue-Tek O.C.T. Compound (Sakura Finetechnical Co., Ltd., Tokyo, Japan) にて凍結した. 組織学的変化の観察は hematoxylin-eosin 染色にて行い, RPMC の生着確認は倒立蛍光顕微鏡 (FITC filter, 100倍, Nikon) にておこなった.

pUCSR $\alpha$ /HGF 導入ラット腹膜中皮細胞の腹腔内移入

20匹の Wistar rat を使用した. 5匹は0.1%グルコン酸クロルヘキシジンおよび15%エタノール含有生理食塩水を1.5 ml/100 g 体重の割合で35日間連続投与した (CH 群). Control 群として5匹には生理食塩水を CH 群と同様に投与した. 1.5 ml/100 g 体重の割合で35日間腹腔内投与した. CH+SR $\alpha$ HGF 群として5匹には CH 群と同様に刺激しつつ, 導入後48時間後の pUCSR $\alpha$ /HGF 導入 RPMC を週2回腹腔内移入 ( $1 \times 10^6$  cells/1 ml) した. また CH+pUC19 群 (5匹) では, CH+SR $\alpha$ HGF 群の対照として, 空ベクターである pUC19 を pUCSR $\alpha$ /HGF と同様に遺伝子導入した RPMC を腹腔内投与した. Day35 に屠殺し, 組織学的変化は hematoxylin-eosin 染色および Masson's trichrome 染色にて, 腹膜線維化は submesothelial layer の厚さを用いて評価した. また, HGF が血管新生に与える影響を検討するために新生血管数の変化を, hematoxylin-eosin 染色標本を用いて100倍の倍率で異なる6視野を観察した.

腹膜機能試験

32匹の Wistar rat を使用した. 各群 (CH 群, Control 群, CH+SR $\alpha$ HGF 群, CH+pUC19 群) 8匹ずつに day35 に2.5% D-glucose/10 ml を腹腔内投与し2時間後, 4時間後に屠殺し, 腹水量および腹腔内, 血清 D-glucose 濃度 (Glucose B-Test kit, Wako), 血清クレアチニン濃度を測定した.

統計学的処理

統計学的処理には Graphpad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) を用いた一元配置分散分析法 (One-way ANOVA) を行い, 検定は Student's *t* test を用いた.  $p < 0.05$  を統計学的に有意と判定した. 本文中の数値および図中の表示は標準誤差で表した.

結 果

pUCSR $\alpha$ /HGF 導入ラット腹膜中皮細胞による HGF 産生量の推移

培養上清中の HGF 濃度の変化を図1に示す.

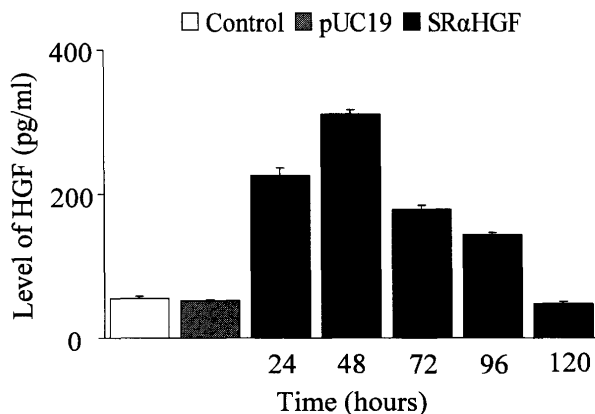


図1 pUCSR $\alpha$ /HGF 導入 RPMC の HGF 産生量の推移. pUCSR $\alpha$ /HGF 導入 RPMC を 6 mM D-glucose 下で培養し, 24, 48, 72, 96, 120時間後の上清中の HGF 濃度 (pg/ml) を測定した (ELISA). Control; RPMC. SR $\alpha$ HGF; pUCSR $\alpha$ /HGF 導入 RPMC. pUC19; pUC19 導入 RPMC. 平均値と標準誤差を示す.  $n=8$

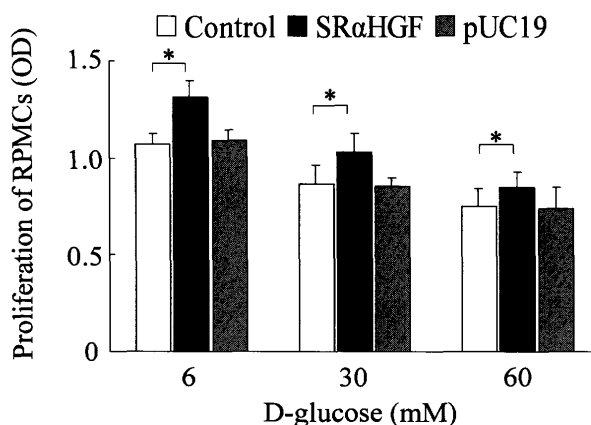


図2 a pUCSR $\alpha$ /HGF の導入が D-glucose 負荷下の RPMC 増殖能に与える影響. RPMC を D-glucose 負荷下 (6, 30, 60 mM) で48時間培養し, 増殖能の変化を観察した (CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay). Control; normal RPMC. SR $\alpha$ HGF; pUCSR $\alpha$ /HGF 導入 RPMC. pUC19; pUC19 導入 RPMC. 平均値と標準誤差を示す.  $n=8$  \* $p < 0.05$

SR $\alpha$ HGF 群において, HGF が最高濃度を示したのは導入後48時間後であった. 以後 HGF 濃度は時間依存性に減少し, 導入後120時間後には control 群とほぼ同濃度となった. PUC19 群の HGF 濃度は, control 群とほとんど変わらなかった (data not shown).

pUCSR $\alpha$ /HGF 導入がラット腹膜中皮細胞の増殖能に与える影響

Control 群, pUC19 群における RPMC の増殖能は D-glucose 濃度依存性に抑制されたが, SR $\alpha$ HGF 群では他の 2 群に比べて増殖能は各 D-glucose 濃度で有意に亢進した (図 2 a). TGF- $\beta$ 1

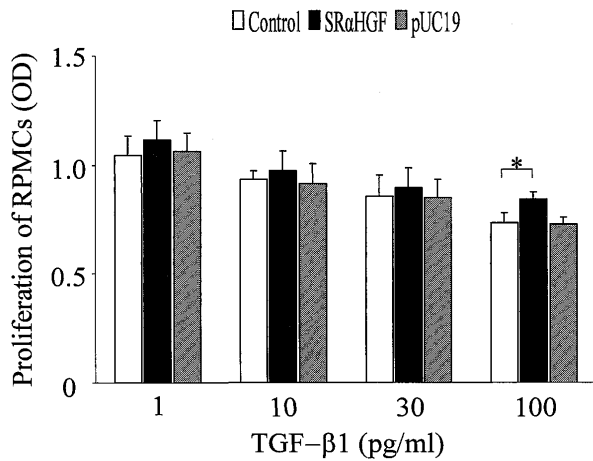


図 2 b pUCSR $\alpha$ /HGF の導入が TGF- $\beta$ 1 負荷下の RPMC 増殖能に与える影響。RPMC を TGF- $\beta$ 1 負荷下(1, 10, 30, 100 pg/ml)で48時間培養し, 増殖能の変化を観察した。(CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay). Control; normal RPMC. SR $\alpha$ HGF; pUCSR $\alpha$ /HGF 導入 RPMC. pUC19; pUC19 導入 RPMC. 平均値と標準誤差を示す。n=8 \*p<0.05

条件下においても RPMC の増殖能は TGF- $\beta$ 1 濃度依存性に抑制されたが, SR $\alpha$ HGF 群において他の 2 群に比べて有意に増殖能が亢進したのは TGF- $\beta$ 1 濃度が100 pg/ml の場合であった (図 2 b). pUCSR $\alpha$ /HGF 導入がラット腹膜中皮細胞による TGF- $\beta$ 1 産生に与える影響

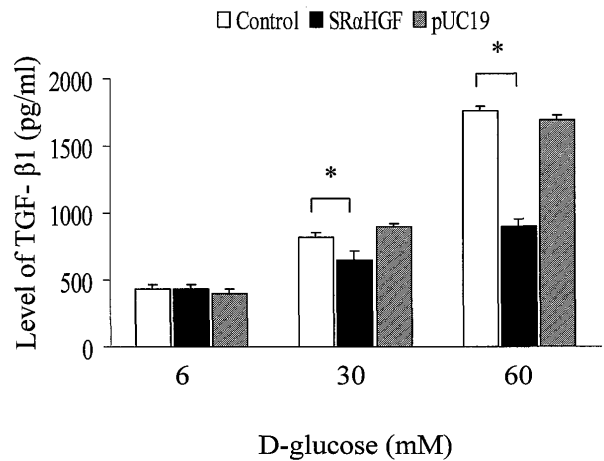


図 3 pUCSR $\alpha$ /HGF の導入が D-glucose 負荷下の RPMC の TGF- $\beta$ 1 産生に与える影響。RPMC を D-glucose 負荷下(6, 60 mM)で培養し, 48時間後の上清中の TGF- $\beta$ 1 濃度を測定した (ELISA). Control; normal RPMC. SR $\alpha$ HGF; pUCSR $\alpha$ /HGF 導入 RPMC. pUC19; pUC19 導入 RPMC. 平均値と標準誤差を示す。n=8 \*p<0.001

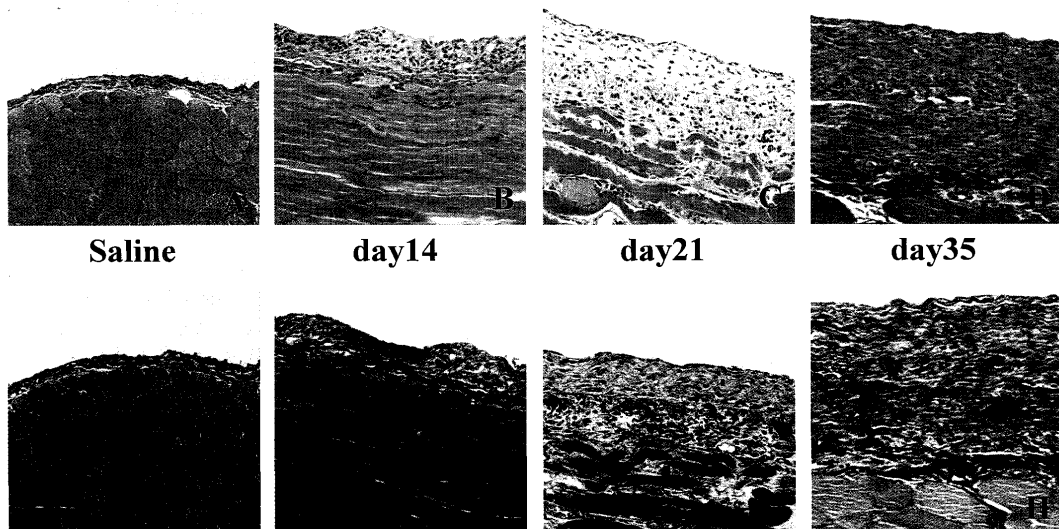


図 4 a 腹膜硬化症モデルラットにおける組織学所見の経時的变化。ラットに0.1%グルコン酸クロルヘキシジン, 15%エタノール含有生理食塩水を連日腹腔内投与した。Saline 群は生理食塩水を腹腔内に連日投与した。Saline 群; 大きな組織学的変化は認めない (A, E)。Day14; PMC の減少, submesothelial layer の中等度肥厚を認めた (B, F)。Day21; PMC は消失。線維芽細胞の増生, 細胞浸潤を認めた (C, G), day35; 線維芽細胞の著明な増生を認めた (D, H)。上段は hematoxylin-eosin 染色, 100倍, 下段は Masson's trichrome 染色, 100倍。

6 mM D-glucose 条件下では TGF- $\beta$ 1 産生量は各群で大きな違いはなかったが, 30 mM, 60 mM D-glucose 条件下では, SR $\alpha$ HGF 群において TGF- $\beta$ 1 産生量は著明に減少した (図 3).

グルコン酸クロルヘキシジンによる腹膜硬化症モデルラットの作成

CH 群では day35 で腹膜硬化症をきたした。肉眼学的所見として壁側腹膜の肥厚および腸管癒着, フィブリンによる腸管の繭状被囊, 肝縁鈍化, 腸間膜肥厚を認めた (data not shown)。組織学的変化として day14 で PMC の減少と submesothelial layer の中等度肥厚を認めた (図 4 a, panel B, F)。Day21 には PMC は消失し線維芽細胞の増生, 細胞浸潤を認め (図 4 a, panel C, G), day35 で線維芽細胞の著明な増生を認めた (図 4 a, panel D, H)。Saline 群では大きな組織学的変化は認めなかった (図 4 a, panel A, E)。Submesothelial layer の厚さは control 群  $9.88 \pm 0.79 \mu\text{m}$  に対して, CH 群では day7;  $42.65 \pm 9.25 \mu\text{m}$ , day14;  $67.50 \pm 8.07 \mu\text{m}$ , day21;  $85.11 \pm 14.56 \mu\text{m}$ , day28;  $114.00 \pm 15.18 \mu\text{m}$  と徐々に肥厚し, day35;  $152.26 \pm 21.23 \mu\text{m}$  であった (図 4 b)。

GFP 導入ラット腹膜中皮細胞による腹腔内生着確認

RPMC に対する GFP の導入率は  $50.5 \pm 8.5\%$  だった。両群ともに線維芽細胞の著明な増生を認めた。腹膜表面への単核球浸潤は GFP 群で認められ (図 5, panel B), CH 群では認めなかった (図 5, panel A)。また, GFP 群では蛍光顕微鏡下で腹膜表面に緑色発光が観察され, GFP-transfected RPMC が生着

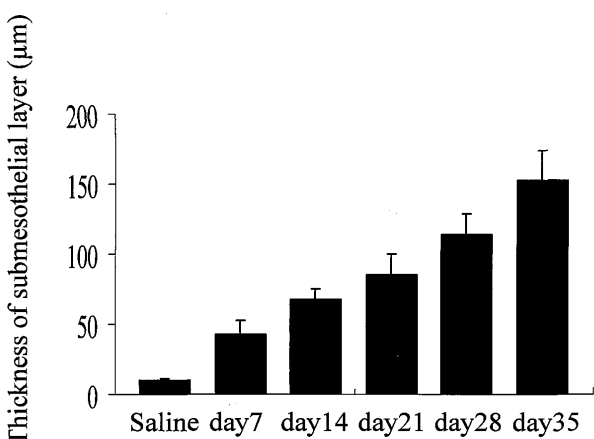


図 4 b 腹膜硬化症モデルラットにおける submesothelial layer 肥厚の推移。ラットに 0.1% グルコン酸クロルヘキシジン, 15% エタノール含有生理食塩水を連日腹腔内投与した。平均値と標準誤差を示す。n=3

していることが確認されたが (図 5, panel D), CH 群では認めなかった (図 5, panel C)。

pUCSR $\alpha$ /HGF 導入ラット腹膜中皮細胞の腹腔内移入

CH 群 (図 6 a, panel B, F), CH+pUC19 群 (図 6 a, panel D, H) の組織像では control 群 (図 6 a, panel A, D) に比べ著明な線維芽細胞の増生を認めた。CH+SR $\alpha$ HGF 群では線維芽細胞の増生は有意に抑制されたが, RPMC は剝離していた (図 6 a, panel C, G)。Submesothelial layer の厚さは CH 群  $152.26 \pm 21.23 \mu\text{m}$ , CH+SR $\alpha$ HGF 群  $87.50 \pm 18.07 \mu\text{m}$ , CH+pUC19 群  $147.26 \pm 12.23 \mu\text{m}$  であり, CH+SR $\alpha$ HGF 群で著明に抑制された (図 6 b)。また図 6 c に示すように, 新生血管数は SR $\alpha$ HGF 群では他の 2 群に比べ有意に減少した (SR $\alpha$ HGF 群;  $9.742 \pm 0.5736$ , CH 群;  $14.39 \pm 0.8068$ , pUC19 群;  $13.84 \pm 0.6084$ )。

腹膜機能試験

図 7 a に示すように腹水量は 2 時間後, 4 時間後

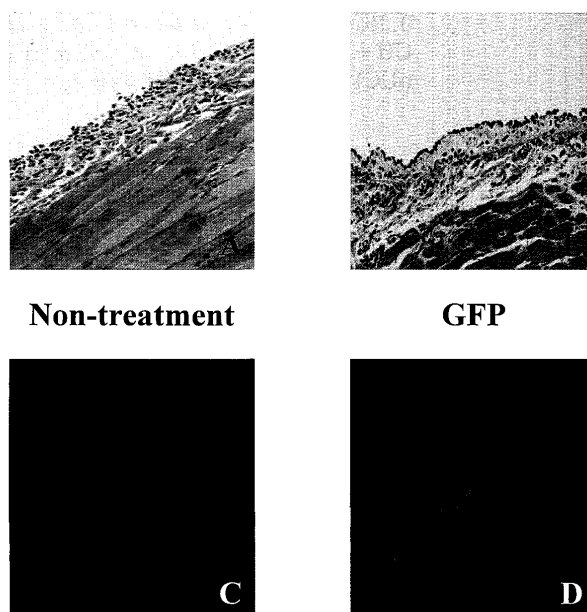


図 5 ラット腹膜中皮細胞の腹腔内生着確認。腹膜硬化症モデルラット腹腔内へ GFP 導入 RPMC を移入し, 4 時間後に観察した。CH; (A) 線維芽細胞の著明な増生を認めるが, 腹膜表面への単核球浸潤は認めない。(B) 腹膜表面に緑色発光は観察されない。GFP; (C) 線維芽細胞の著明な増生と腹膜表面への単核球浸潤を認める。(D) 腹膜表面に緑色発光が観察され, GFP-transfected RPMC の生着が確認できた。上段は hematoxylin-eosin 染色, 100倍, 下段は蛍光染色, 100倍。CH; 0.1% グルコン酸クロルヘキシジン, 15% エタノール含有生理食塩水を連日 35 日間腹腔内投与。GFP; GFP-transfected RPMC を腹膜硬化症モデルラット腹腔内へ day35 に移入。

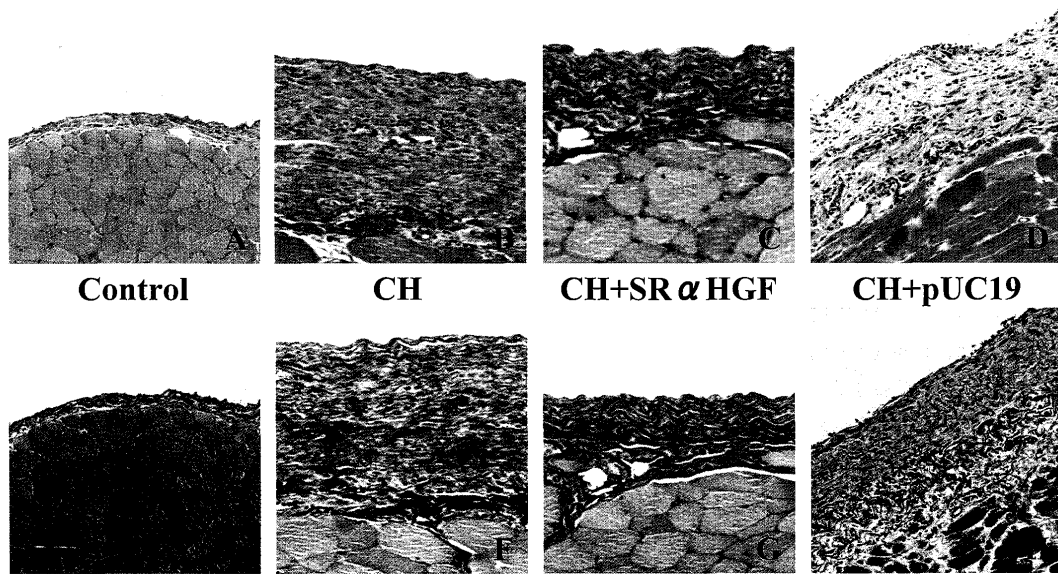


図6 a pUCSR $\alpha$ /HGF 導入ラット腹膜中皮細胞の腹腔内移入による組織学的変化。腹膜硬化症モデルラットに pUCSR $\alpha$ /HGF 導入 RPMC あるいは pUC19 導入 RPMC を腹腔内移入し, day35 に観察した。Control; 大きな組織学的変化は認めない (A, E)。CH; 線維芽細胞の著明な増生を認めた (B, F)。CH+SR $\alpha$ HGF; 線維芽細胞の増生は抑制された (C, G)。CH+pUC19; CH と同様の線維芽細胞の著明な増生を認めた (D, H)。上段は hematoxylin-eosin 染色, 100倍, 下段は Masson's trichrome 染色, 100倍。Control; no treatment, CH; 0.1%グルコン酸クロルヘキシジン, 15%エタノール含有生理食塩水を連日35日間腹腔内投与。CH+SR $\alpha$ HGF; CH に pUCSR $\alpha$ /HGF 導入 RPMC を腹腔内移入。CH+pUC19; CH に pUC19 導入 RPMC を腹腔内移入。

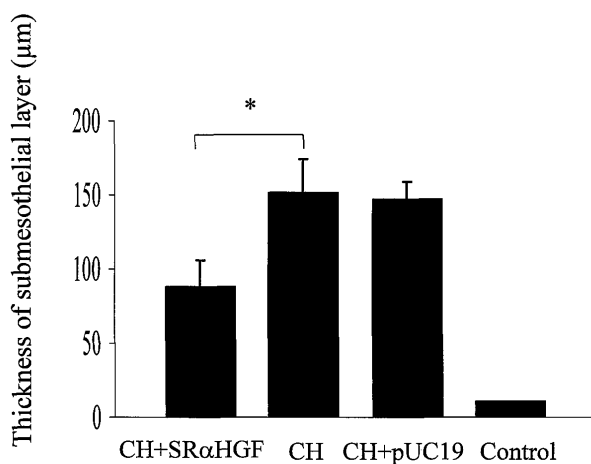


図6 b pUCSR $\alpha$ /HGF 導入ラット腹膜中皮細胞の腹腔内移入による submesothelial layer 肥厚の変化。腹膜硬化症モデルラットに pUCSR $\alpha$ /HGF 導入 RPMC あるいは pUC19 導入 RPMC を腹腔内移入し, day35 に観察した。Control; no treatment, CH; 0.1%グルコン酸クロルヘキシジン, 15%エタノール含有生理食塩水を連日35日間腹腔内投与。CH+SR $\alpha$ HGF; CH に pUCSR $\alpha$ /HGF 導入 RPMC を腹腔内移入。CH+pUC19; CH に pUC19 導入 RPMC を腹腔内移入。平均値と標準誤差を示す。n=5 \* $p$ <0.001

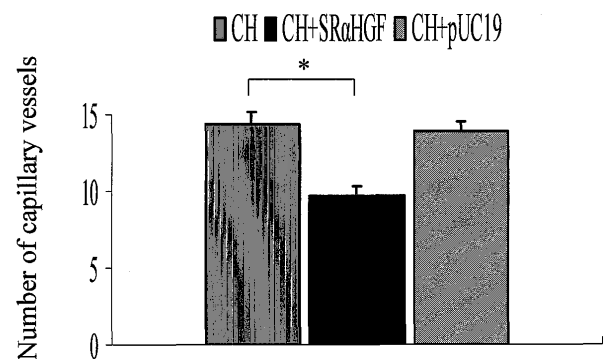


図6 c pUCSR $\alpha$ /HGF 導入ラット腹膜中皮細胞の腹腔内移入による新生血管数の変化。腹膜硬化症モデルラットに pUCSR $\alpha$ /HGF 導入 RPMC あるいは pUC19 導入 RPMC を腹腔内移入し, day35 に観察した。Control; no treatment, CH; 0.1%グルコン酸クロルヘキシジン, 15%エタノール含有生理食塩水を連日35日間腹腔内投与。CH+SR $\alpha$ HGF; CH に pUCSR $\alpha$ /HGF 導入 RPMC を腹腔内移入。CH+pUC19; CH に pUC19 導入 RPMC を腹腔内移入。平均値と標準誤差を示す。n=5 \* $p$ <0.05

共に CH+SR $\alpha$ HGF 群では CH 群, CH+pUC19 群に比べ増加した (control 群; 2 時間後 12.4 $\pm$ 1.6 ml, 4 時間後 11.3 $\pm$ 1.3 ml, CH 群; 2 時間後 3.8 $\pm$

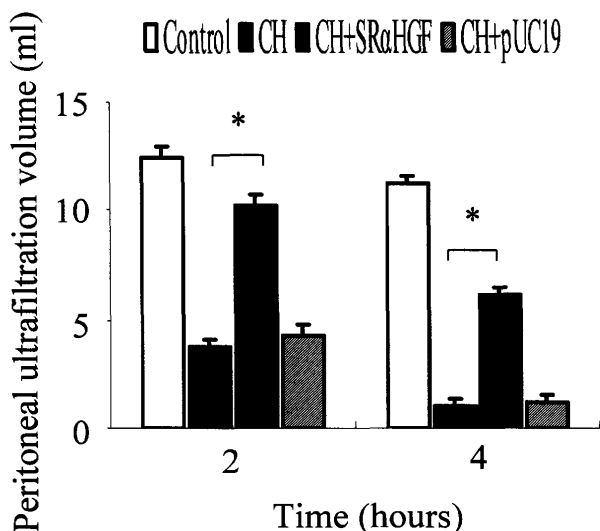


図 7 a pUCSRα/HGF 導入ラット腹膜中皮細胞の腹腔内移入による腹水量の変化。腹膜硬化症モデルラットに2.5% D-glucose を10 ml 腹腔内投与し、2 時間後、4 時間後の腹水量を測定した。Control; no treatment, CH; 0.1% グルコン酸クロルヘキシジン, 15% エタノール腹腔内投与。CH+SRαHGF; CH に pUCSRα/HGF 導入 RPMC を腹腔内移入。CH+pUC19; CH に pUC19 導入 RPMC を腹腔内移入。平均値と標準誤差を示す。n=8 \*p<0.05

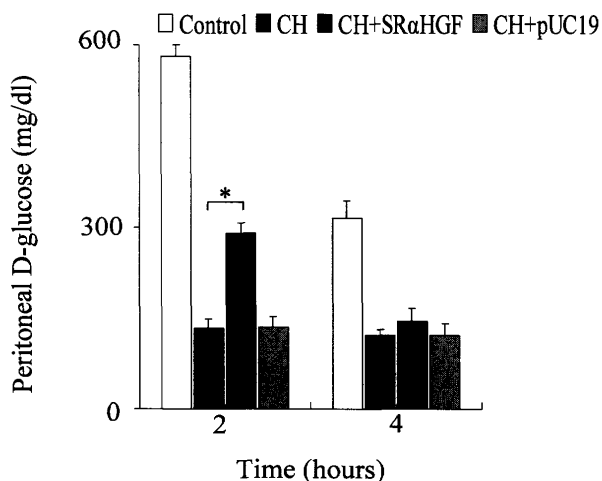


図 7 b pUCSRα/HGF 導入ラット腹膜中皮細胞の腹腔内移入による腹腔内 D-glucose 濃度の変化。腹膜硬化症モデルラットに2.5% D-glucose を10 ml 腹腔内投与し、2 時間後、4 時間後の腹腔内 D-glucose 濃度を測定した。Control; no treatment, CH; 0.1% グルコン酸クロルヘキシジン, 15% エタノール含有生理食塩水を連日35日間腹腔内投与。CH+SRαHGF; CH に pUCSRα/HGF 導入 RPMC を腹腔内移入。CH+pUC19; CH に pUC19 導入 RPMC を腹腔内移入。平均値と標準誤差を示す。n=8 \*p<0.05

0.5 ml, 4 時間 $1.1 \pm 0.2$  ml, CH+SRαHGF 群; 2 時間後 $10.7 \pm 0.9$  ml, 4 時間後 $6.2 \pm 0.7$  ml, CH+pUC19 群; 2 時間後 $4.2 \pm 0.8$  ml, 4 時間 $1.3 \pm 0.3$  ml)。また図 7 b に示すように 2 時間後の腹腔内 D-glucose 濃度は CH+SRαHGF 群で CH 群, CH+pUC19 群に比べ増加した (control 群;  $580.68 \pm 18.94$  mg/dl, CH 群;  $133.34 \pm 17.20$  mg/dl, CH+SRαHGF 群;  $290.31 \pm 15.20$  mg/dl, CH+pUC19 群;  $135.67 \pm 15.82$  mg/dl)。しかし 4 時間後の腹腔内 D-glucose 濃度は CH+SRαHGF 群, CH 群, CH+pUC19 群共に大きな差はなかった (control 群;  $314.78 \pm 28.42$  mg/dl, CH 群;  $121.87 \pm 20.01$  mg/dl, CH+SRαHGF 群;  $145.44 \pm 8.42$  mg/dl, CH+pUC19 群;  $121.65 \pm 18.65$  mg/dl)。血清 D-glucose 濃度, 血清クレアチニン濃度に関しては各群ともほぼ正常値内であった (data not shown)。

考 察

過去の報告によると透析液中の高濃度 D-glucose<sup>13-15</sup> や, 低 ph 透析液への持続暴露<sup>16</sup>, 後期糖化生成物<sup>17,18</sup>, 再発性の腹膜炎<sup>19</sup> などが腹膜硬化症の原因とされるが, その詳細は明らかではない。

松本らはマウスの慢性腎炎下において HGF が減少し, それに伴い TGF-β1 が増加する<sup>28</sup>, 外因性 HGF により TGF-β1 による線維化は抑制される<sup>29</sup>, HGF を中和抗体で中和することにより線維化が悪化する<sup>30</sup> と報告している。そして TGF-β1 は高濃度 D-glucose 条件下でヒト PMC でも産生される<sup>41,42</sup> という報告もある。またわれわれは過去に線維芽細胞は高濃度 D-glucose により増生をきたす<sup>43</sup> ことも報告している。今回の結果では D-glucose, TGF-β1 により RPMC の増殖能は抑制され, 高濃度 D-glucose 条件下での TGF-β1 産生の増加が認められた。これらのことから TGF-β1 は腹膜線維症の発症機序において重要な役割を担うと考えられる。RPMC への pUCSRα/HGF の導入により HGF 産生が確認され (図 1), pUCSRα/HGF の導入 RPMC が D-glucose あるいは TGF-β1 条件下でも増殖能は抑制されず, D-glucose による TGF-β1 産生が抑制されたことから, pUCSRα/HGF の導入により産生された HGF が TGF-β1 を阻害することで RPMC 増殖能が改善したと考えられた。

今回われわれは腹膜硬化症モデルラットを作成するにあたり, 非特異的な誘発方法として 0.1% グルコン酸クロルヘキシジンおよび 15% エタノールを使用した<sup>40</sup>。このモデルにおいて submesothelial layer は徐々に肥厚し, CAPD における腹膜線維症と同様の組織学的変化を示し, 腹膜機能の著明な悪化も認

めた。このためこのモデルはCAPD患者における腹膜線維症とは原因が異なるが、組織学的変化、腹膜機能共によく似通ったモデルであると考えられた。また、pUCSR $\alpha$ /HGFのRPMCへの遺伝子導入に関しては、現実にはHGF-HJV liposomesを利用した臓器線維化の抑制の試みがなされていたことからおこなった<sup>44-46</sup>。

図5ではGFP導入RPMCが腹膜表面に生着したことを示した。その後生着したRPMCは0.1%グルコン酸クロルヘキシジン、15%エタノール刺激の継続により剝離しており、HGFによるRPMCの再生を行うことはできなかった(図6a)。しかしpUCSR $\alpha$ /HGF導入RPMCの腹腔内移入によりsubmesothelial layerの肥厚は減少を示した(図6b)。これらは、腹膜表面に生着したRPMCがHGFを産生し、線維芽細胞の増生を抑制した結果と考えられる。

腹膜機能は図6c、図7a、7bに示したように部分的に改善した。腹膜機能の低下は血管新生の増加、腹膜表面積の低下、glucose浸透圧コンダクタンスの低下、リンパ管吸収の亢進などによるとされている<sup>47-49</sup>。この中でも血管新生の増加が最も腹膜機能低下に寄与するとされている<sup>50-53</sup>。図6cに示した血管新生の抑制はHGFの働きとは相反するが<sup>2,3</sup>、中村らの報告にはHGFがTGF- $\beta$ 1、VEGFの発現を抑制して血管新生を抑制するとあり<sup>54</sup>、今回の研究においても同様と推測される。新生血管の減少により、腹腔内D-glucose濃度が維持され(図7b)、その結果腹水量が増加した(図7a)と考えられた。

結論として、腹膜硬化症モデルラット腹腔へのpUCSR $\alpha$ /HGF導入RPMCの移入が腹膜線維化を抑制し、腹膜機能を部分的に改善した。これらの結果はpUCSR $\alpha$ /HGFがCAPD患者の腹膜線維症を抑制する効果的な治療法になる可能性があることを示している。

#### 謝 辞

本研究をまとめるにあたり御指導、御協力いただいた近畿大学医学部腎臓膠原病内科学教室、血液内科学教室、近畿大学医学部堺病院腎透析科、動物実験共同室の皆様には感謝いたします。また、pUCSR $\alpha$ /HGF遺伝子をご供与頂いた大阪大学医学部大学院未来医療開発組織再生医学科中村敏一教授、松本邦夫助教授にも感謝いたします。なお本研究は腹膜機能リサーチより研究費の助成を受けている。

#### 文 献

1. Matsuo K, Maeda Y, Naiki Y, Matsuoka T, Tamai Y, Yonekawa S, Sakaguchi M, Iwamoto I, Hasegawa H, Matsumoto K, Nakamura T, Kanamaru A (2005) Pos-

sible effects of hepatocyte growth factor for the prevention of peritoneal fibrosis. *Nephron Exp Nephrol* 99: 87-94

2. Matsumoto K, Nakamura T (1997) Hepatocyte growth factor (HGF) as a tissue organizer for organogenesis and regeneration. *Biochem Biophys Res Commun* 239: 639-644

3. Stella MC, Comoglio PM (1999) HGF: a multifunctional growth factor controlling cell scattering. *Int J Biochem Cell Biol* 31: 1357-1362

4. Kusumoto K, Ido A, Moriuchi A, Katsura T, Kim I, Takahama Y, Numata M, Kodama M, Hasuike S, Nagata K, Uto H, Inui K, Tsubouchi H (2006) Repeated intravenous injection of recombinant human hepatocyte growth factor ameliorates liver cirrhosis but causes albuminuria in rats. *Int J Mol Med* 17: 503-509

5. Dohi M, Hasegawa T, Yamamoto K, Marshall BC (2000) Hepatocyte growth factor attenuates collagen accumulation in a murine model of pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 162: 2302-2307

6. Taniyama Y, Morishita R, Aoki M, Hiraoka K, Yamasaki K, Hashiya N, Matsumoto K, Nakamura T, Kaneda Y, Ogiwara T (2002) Angiogenesis and antifibrotic action by hepatocyte growth factor in cardiomyopathy. *Hypertension* 40: 47-53

7. Kagawa T, Takemura G, Kosai K, Murata I, Ohno T, Takahashi T, Esaki M, Maruyama R, Fujiwara T, Ohashi H, Fujiwara H (2006) Hepatocyte growth factor gene therapy slows down the progression of diabetic nephropathy in db/db mice. *Nephron Physiol* 102: 92-102

8. Davies SJ, Phillips L, Griffiths AM, Russell LH, Naish PF, Russell GI (1998) What really happens to people on long-term peritoneal dialysis? *Kidney Int* 54: 2207-2217

9. Honda K, Nitta K, Horita S, Yumura W, Nihei H (1996) Morphological changes in the peritoneal vasculature of patients on CAPD with ultrafiltration failure. *Nephron* 72: 171-176

10. Mateijsen MA, van der Wal AC, Hendriks PM, Zweers MM, Mulder J, Struijk DG, Krediet RT (1999) Vascular and interstitial changes in the peritoneum of CAPD patients with peritoneal sclerosis. *Perit Dial Int* 19: 517-525

11. Coles GA, Topley N (2000) Long-term peritoneal membrane changes. *Adv Ren Replace Ther* 7: 289-301

12. Williams JD, Craig KJ, Topley N, Von Ruhland C, Fallon M, Newman GR, Mackenzie RK, Williams GT. Peritoneal Biopsy Study Group (2002) Morphologic Changes in the Peritoneal Membrane of Patients with Renal Disease. *J Am Soc Nephrol* 13: 470-479

13. Davies SJ, Phillips L, Naish PF, Russell GI (2001) Peritoneal Glucose Exposure and Changes in Membrane Solute Transport with Time on Peritoneal Dialysis. *J Am Soc Nephrol* 12: 1046-1051

14. Medcalf JF, Walls J, Pawluczuk IZ, Harris KP (2001) Effects of glucose dialysate on extracellular matrix



- production by human peritoneal mesothelial cells (HPMC): the role of TGF-beta. *Nephrol Dial Transplant* 16: 1885-1892
15. Fischereder M, Schroppe B, Wiese P, Fink M, Banas B, Schmidbauer S, Schlondorff D (2003) Regulation of glucose transporters in human peritoneal mesothelial cells. *J Nephrol* 16: 103-109
  16. Shao JC, Yorioka N, Nishida Y, Yamakido M (1999) Effect of pH and glucose on cultured human peritoneal mesothelial cells. *Scand J Urol Nephrol* 33: 248-256
  17. Honda K, Nitta K, Horita S, Yumura W, Nihei H, Nagai R, Ikeda K, Horiuchi S (1999) Accumulation of advanced glycation end products in the peritoneal vasculature of continuous ambulatory peritoneal dialysis patients with low ultra-filtration. *Nephrol Dial Transplant* 14: 1541-1549
  18. Nakamura S, Niwa T (2004) Advanced glycation end-products and peritoneal sclerosis. *Semin Nephrol* 24: 502-505
  19. Rampino T, Cancarini G, Gregorini M, Guallini P, Maggio M, Ranghino A, Soccio G, Dal Canton A (2001) Hepatocyte growth factor/scatter factor released during peritonitis is active on mesothelial cells. *Am J Pathol* 159: 1275-1285
  20. Rocco MV, Chen Y, Goldfarb S, Ziyadeh FN (1992) Elevated glucose stimulates TGF-beta gene expression and bioactivity in proximal tubule. *Kidney Int* 41: 107-114
  21. Ko SH, Hong OK, Kim JW, Ahn YB, Song KH, Cha BY, Son HY, Kim MJ, Jeong IK, Yoon KH. (2006) High glucose increases extracellular matrix production in pancreatic stellate cells by activating the renin-angiotensin system. *J Cell Biochem* 98: 343-355
  22. Kobayashi T, Inoue T, Okada H, Kikuta T, Kanno Y, Nishida T, Takigawa M, Sugaya T, Suzuki H (2005) Connective tissue growth factor mediates the profibrotic effects of transforming growth factor-beta produced by tubular epithelial cells in response to high glucose. *Clin Exp Nephrol* 9: 114-121
  23. Roberts AB, McCune BK, Sporn MB (1992) TGF-beta: regulation of extracellular matrix. *Kidney Int* 41: 557-559
  24. Duncan MR, Frazier KS, Abramson S, Williams S, Klapper H, Huang X, Grotendorst GR (1999) Connective tissue growth factor mediates transforming growth factor beta-induced collagen synthesis: down-regulation by cAMP. *FASEB J* 13: 1774-1786
  25. Bonniaud P, Margetts PJ, Ask K, Flanders K, Gauldie J, Kolb M (2005) TGF-beta and Smad3 signaling link inflammation to chronic fibrogenesis. *J Immunol* 175: 5390-5395
  26. Fedulov AV, Ses TP, Gavrisheva NA, Rybakova MG, Vassilyeva JG, Tkachenko SB, Kallner A, MacMillan JC (2005) Serum TGF-beta 1 and TNF-alpha levels and cardiac fibrosis in experimental chronic renal failure. *Immunol Invest* 34: 143-152
  27. Czaja MJ, Weiner FR, Flanders KC, Giambone MA, Wind R, Biempica L, Zern MA (1989) In vitro and in vivo association of transforming growth factor-beta 1 with hepatic fibrosis. *J Cell Biol* 108: 2477-2482
  28. Mizuno S, Matsumoto K, Kurosawa T, Mizuno-Horikawa Y, Nakamura T (2000) Reciprocal balance of hepatocyte growth factor and transforming growth factor-beta 1 in renal fibrosis in mice. *Kidney Int* 57: 937-948
  29. Mizuno S, Matsumoto K, Nakamura T (2001) Hepatocyte growth factor suppresses interstitial fibrosis in a mouse model of obstructive nephropathy. *Kidney Int* 59: 1304-1314
  30. Matsumoto K, Nakamura T (2002) Renotropic role and therapeutic potential of HGF in the kidney. *Nephrol Dial Transplant* 9: 59-61
  31. Hjelle JT, Golinska BT, Waters DC, Steidley KR, McCarroll DR, Dobbie JW (1989) Isolation and propagation in vitro of peritoneal mesothelial cells. *Perit Dial Int* 9: 341-347
  32. Nakamura T, Nishizawa T, Hagiya M, Seki T, Shimonishi M, Sugimura A, Tashiro K, Shimizu S (1989) Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature* 342: 440-443
  33. Tsuboniwa N, Morishita R, Hirano T, Fujimoto J, Furukawa S, Kikumori M, Okuyama A, Kaneda Y (2001) Safety evaluation of hemagglutinating virus of Japan-artificial viral envelope liposomes in nonhuman primates. *Hum Gene Ther* 12: 469-487
  34. Yo Y, Morishita R, Nakamura S, Tomita N, Yamamoto K, Moriguchi A, Matsumoto K, Nakamura T, Higaki J, Ogihara T (1998) Potential role of hepatocyte growth factor in the maintenance of renal structure: anti-apoptotic action of HGF on epithelial cells. *Kidney Int* 54: 1128-1138
  35. Mizui M, Isaka Y, Takabatake Y, Mizuno S, Nakamura T, Ito T, Imai E, Hori M (2004) Electroporation-mediated HGF gene transfer ameliorated cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney Int* 65: 2041-2053
  36. Kirby TO, Rivera A, Rein D, Wang M, Ulasov I, Breidenbach M, Kataram M, Contreras JL, Krumdieck C, Yamamoto M, Rots MG, Haisma HJ, Alvarez RD, Mahasreshti PJ, Curiel DT (2004) A novel ex vivo model system for evaluation of conditionally replicative adenoviruses therapeutic efficacy and toxicity. *Clin Cancer Res* 10: 8697-8703
  37. Anderson DG, Peng W, Akinc A, Hossain N, Kohn A, Padera R, Langer R, Sawicki JA (2004) A polymer library approach to suicide gene therapy for cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 16028-16033
  38. Kemper C, Chan AC, Green JM, Brett KA, Murphy KM, Atkinson JP (2003) Activation of human CD4+ cells with CD3 and CD46 induces a T-regulatory cell 1 phenotype. *Nature* 421: 388-392
  39. Persons DL, Yazlovitskaya EM, Cui W, Pelling JC

- (1999) Cisplatin-induced activation of mitogen-activated protein kinases in ovarian carcinoma cells: inhibition of extracellular signal-regulated kinase activity increases sensitivity to cisplatin. *Clin Cancer Res* 5: 1007-1014
40. Io H, Hamada C, Ro Y, Ito Y, Hirahara I, Tomino Y (2004) Morphologic changes of peritoneum and expression of VEGF in encapsulated peritoneal sclerosis rat models. *Kidney Int* 65: 1927-1936
41. Medcalf JF, Walls J, Pawluczyk IZ, Harris KP (2001) Effects of glucose dialysate on extracellular matrix production by human peritoneal mesothelial cells (HPMC): the role of TGF-beta. *Nephrol Dial Transplant* 16: 1885-1892
42. Naiki Y, Matsuo K, Matsuoka T, Maeda Y (2005) Possible role of hepatocyte growth factor in regeneration of human peritoneal mesothelial cells. *Int J Artif Organs* 28: 141-149
43. Naiki Y, Maeda Y, Matsuo K, Yonekawa S, Sakaguchi M, Iwamoto I, Hasegawa H, Kanamaru A (2003) Involvement of TGF-beta signal for peritoneal sclerosing in continuous ambulatory peritoneal dialysis. *J Nephrol* 16: 95-102
44. Ho-dac-Pannekeet MM, Atasever B, Struijk DG, Krediet RT (1997) Analysis of ultrafiltration failure in peritoneal dialysis patients by means of standard peritoneal permeability analysis. *Perit Dial Int* 17: 144-150
45. Rippe B, Rosengren BI, Venturoli D (2001) The peritoneal microcirculation in peritoneal dialysis. *Microcirculation* 8: 303-320
46. Rippe B, Venturoli D, Simonsen O, de Arteaga J (2004) Fluid and electrolyte transport across the peritoneal membrane during CAPD according to the three-pore model. *Perit Dial Int* 24: 10-27
47. Heimbürger O, Waniewski J, Weryński A, Tranaeus A, Lindholm B (1990) Peritoneal transport in CAPD patients with permanent loss of ultrafiltration capacity. *Kidney Int* 38: 495-506
48. Wideroe TE, Smeby LC, Mjaland S, Dahl K, Berg KJ, Wessel Aas T (1984) Long-term changes in transperitoneal water transport during continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Nephron* 38: 238-247
49. Slingeneyer A, Canaud B, Mion C (1983) Permanent loss of ultrafiltration capacity of peritoneum in long-term peritoneal dialysis. *Nephron* 33: 133-138
50. Smit W, van den Berg N, Schouten N, Aikens E, Struijk DG, Krediet RT (2004) Free-water transport in fast transport status: a comparison between CAPD peritonitis and long-term PD. *Kidney Int* 65: 298-303
51. Ueki T, Kaneda Y, Tsutsui H, Nakanishi K, Sawa Y, Morishita R, Matsumoto K, Nakamura T, Takahashi H, Okamoto E, Fujimoto J (1999) Hepatocyte growth factor gene therapy of liver cirrhosis in rats. *Nat Med* 5: 226-230
52. Ozawa S, Uchiyama K, Nakamori M, Ueda K, Iwahashi M, Ueno H, Muragaki Y, Ooshima A, Yamaue H (2006) Combination gene therapy of HGF and truncated type II TGF-beta receptor for rat liver cirrhosis after partial hepatectomy. *Surgery* 139: 563-73
53. Ono M, Sawa Y, Matsumoto K, Nakamura T, Kaneda Y, Matsuda H (2002) In vivo gene transfection with hepatocyte growth factor via the pulmonary artery induces angiogenesis in the rat lung. *Circulation* 106: 1264-1269
54. Nakamura S, Niwa T (2005) Pyridoxal phosphate and hepatocyte growth factor prevent dialysate-induced peritoneal damage. *J Am Soc Nephrol* 16: 144-150