

論文内容の要旨

氏名	まつおかとしあき 松岡稔明			
学位の種類	博士(医学)			
学位記番号	医第933号			
学位授与の日付	平成19年3月22日			
学位授与の要件	学位規程第4条第1項該当			
学位論文題目	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			
論文審査委員(主査)	教授	金丸	昭久	
(副主査)	教授	植村	天受	
(副主査)	教授	義江	修	

【目的】

長期間にわたる腹膜透析では腹膜炎や、透析液中の高濃度グルコース、低 pH 透析液への暴露、後期糖化生成物 (AGEs) などにより腹膜が線維化する。腹膜の線維化は組織学的には中皮下結合織の線維性肥厚を示す腹膜線維症から腹膜中皮細胞の剥離と中皮下結合織の硬化性肥厚組織を示す腹膜硬化症へ進行していく。組織の線維化には transforming growth factor-beta1 (TGF- β 1) の関与が知られている。TGF- β 1 はグルコース負荷などにより様々な細胞で産生され、上皮系細胞の増殖抑制、細胞外基質の蓄積促進作用をもつ cytokine である。他方、抗線維化作用をもつ cytokine として hepatocyte growth factor (HGF) が挙げられる。HGF は上皮系細胞に対して細胞増殖、運動性亢進、形態形成促進作用を持ち、TGF- β 1 に対して拮抗的に働くことが報告されている。そして TGF- β 1 と HGF の不均衡が臓器の線維化に深く関与しているとの報告がある。これらのことから、われわれは腹膜線維化に対して HGF が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。

【方法】

ラット腹膜中皮細胞 (RPMC) に full-length human HGF cDNA (pUCSR α /HGF) を遺伝子導入した。これにグルコースあるいは TGF- β 1 を負荷し、RPMC の増殖能の変化を検討した。次にグルコン酸クロルヘキシジンを用いたラット腹腔内へ 35 日間投与して腹膜硬化症モデルラットを作成し、腹膜の組織学的変化を検討した。そして腹膜硬化症モデルラットに pUCSR α /HGF 導入 RPMC を週 2 回腹腔内移入し腹膜の組織学的変化を検討した。また腹膜機能のために腹膜硬化症モデルラットおよび pUCSR α /HGF 導入 RPMC 移入ラット腹腔内に 2.5% グルコースを注入し、2 時間後、4 時間後の腹推量と血清および腹腔内グルコース濃度を測定した。

【結果】

RPMC へ pUCSR α /HGF を導入することで HGF 産生が確認された。pUCSR α /HGF の導入 RPMC ではグルコースあるいは TGF- β 1 負荷下でも増殖能は抑制されず、グルコース負荷による TGF- β 1 産生は抑制された。次にグルコン酸クロルヘキシジンを使用した腹膜硬化症モデルでは、腹膜中皮細胞の剥離と中皮下結合織の線維性肥厚を認めた。そして pUCSR α /HGF 導入 RPMC の腹腔内移入では、中皮下結合織の線維性肥厚の抑制を認めた。また pUCSR α /HGF 導入 RPMC 移入ラットにおいて 2 時間後、4 時間後の腹水量と 2 時間後の腹腔内グルコース濃度が改善した。

【結論】

グルコースあるいは TGF- β 1 負荷による RPMC 増殖能の抑制は、pUCSR α /HGF 導入 RPMC では改善し、グルコース負荷下の RPMC による TGF- β 1 産生も抑制された。これは pUCSR α /HGF 導入 RPMC により産生された HGF が TGF- β 1 に対して拮抗的に働いたためと考えられる。今回、グルコン酸クロルヘキシジンによる腹膜硬化症が、腹膜透析における腹膜硬化症とは原因は異なるものの、類似した組織学的変化を示したことから腹膜硬化症モデルとして採用した。pUCSR α /HGF 導入 RPMC の腹腔内移入により中皮下結合織の線維性肥厚の抑制を認めたことから、pUCSR α /HGF 導入 RPMC により産生された HGF が腹膜線維化を抑制したと考えられる。また腹膜線維化の抑制により、腹膜機能が部分的にはあるが改善したと考えられた。これらの結果は、HGF が腹膜透析における腹膜線維化を抑制する効果的な治療法になる可能性があると考えられた。

論文審査結果の要旨

【背景】 連続携行式腹膜透析 (CAPD) は、腹腔内にカテーテルを挿入し 1 日に 4-5 回、1.5-2.0 ℓ の透析液を交換することで行う。この際、老廃物除去は腹膜を介した拡散を利用して行い、水分除去は浸透圧差 (限外濾過) を利用して行う。そして浸透圧差は腹膜透析液中に含まれるブドウ糖によって生じる。また、老廃物除去は透析液を貯留している時間に比例して除去量は増加するが、水分除去は浸透圧物質であるブドウ糖が血管およびリンパ管より吸収されるため、2-3 時間で最大となり、以後は減少傾向となる。長期にわたる CAPD では腹膜の線維化により限外濾過能が低下し、CAPD を離脱することがある。腹膜線維化は、組織学的には腹膜中皮細胞の脱落と線維芽細胞の増生、細胞外基質の増加、新生血管の増加により定義される。原因物質として透析液中の高濃度 D-glucose や終末糖化産物、low pH などが挙げられるが、腹膜線維化にいたるメカニズムは明らかにされていない。

【目的】 臓器の線維化には transforming growth factor-beta1 (TGF-β1) の関与が報告されているが、その中に TGF-β1 と hepatocyte growth factor (HGF) の不均衡が関与しているとの報告もある。HGF は分子量 85kDa のタンパク質で、c-Met 受容体を介して細胞増殖促進、細胞運動促進、抗アポトーシス、形態形成誘導、血管新生などの生理活性を發揮する。傷害に応じて動員され、様々な組織・臓器の再生・保護を担う cytokine である。現在までにわれわれは、高濃度 D-glucose 条件下において線維芽細胞が増生をきたすことや、HGF 添加によりヒト腹膜中皮細胞への傷害が回避できる現象を報告してきた。このため、HGF を補充し、TGF-β1 との均衡をとることで腹膜線維化が抑制できると仮定した。今回われわれは、HGFcDNA 導入ラット腹膜中皮細胞を腹膜硬化症モデルラット腹腔内に移入し、腹膜硬化症に及ぼす影響を検討した。【方法】 RPMC はラット壁側腹膜より採取継代し 3-5 代目を使用した。第 1 段階として、full-length human HGFcDNA を JetPEI 法にてラット腹膜中皮細胞 (RPMC) に遺伝子導入し HGF 産生量を測定した。次に HGFcDNA 導入 RPMC に D-glucose (6, 30, 60mM)、TGF-β1 (1, 10, 30, 100pg/ml) を負荷し、増殖能に及ぼす影響を観察した。また、HGFcDNA 導入 RPMC に D-glucose (6, 30, 60mM) を負荷した場合の TGF-β1 産生量の変化も観察した。第 2 段階として、グルコン酸クロルヘキシジン を 35 日間腹腔内注射して、腹膜硬化症モデルラットを作成した。各群 0, 1, 2, 3, 4, 5 週に屠殺し、壁側腹膜の組織学的変化を観察し、腹膜肥厚を測定した。第 3 段階として腹膜硬化症モデルラットに GFP 導入 RPMC を腹腔内移入し、着生するかを確認した。次に HGFcDNA 導入 RPMC を移入し、壁側腹膜の組織学的変化と、腹膜肥厚、新生血管数の変化を観察した。また腹膜機能試験としてモデルラット腹腔内に 2.5%

博士論文の印刷公表	公 表 年 月 日	出版物の種類及び名称
	平成 19 年 3 月 日 公表予定	出版物名 近畿大学医学雑誌 第 32 巻 第 1 号
	公 表 内 容	平成 19 年 3 月 日 発行予定
	全 文	

D-glucose 10mlを注入し、2、4時間後の腹腔内D-glucose濃度と腹水量の変化を観察した。

【結果】 HGF産生量は48時間で最大となり、96時間後まで持続した。D-glucose負荷下でのRPMC増殖能は、D-glucose濃度依存性に増殖能低下を認めたが、SR α HGF群ではD-glucose各濃度でControl群、pUC19群に比べ増殖能低下が有意に改善した。TGF- β 1負荷下でのRPMC増殖能は、TGF- β 1濃度依存性に増殖能低下を認めたが、SR α HGF群では他の2群に比べ増殖能が改善傾向にあり、TGF- β 1濃度が100pg/mlで有意な改善を示した。D-glucose負荷下でのTGF- β 1産生量は各群グルコース濃度依存性に増加したが、SR α HGF群では他の2群に比べTGF- β 1産生が有意に抑制された。グルコン酸クロルヘキシジンの腹腔内注射により腹膜は組織学的に、day14でRPMCの減少とsubmesothelial layerの中等度肥厚を認め、day21でRPMCの消失と線維芽細胞の増生、細胞浸潤を認め、day35に線維芽細胞の著明な増生を認めた。Saline群では大きな変化は認めなかった。腹膜肥厚は期間依存性に進行していた。GFP導入RPMCを腹腔内に移入したことで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導入RPMCの生着が確認された。HGFcDNA導入RPMCの腹膜硬化症モデルラット腹腔内移入では、CH群、pUC19群はControl群に比べ著明な線維芽細胞の増生を認めたが、SR α HGF群では線維芽細胞の増生は有意に抑制された。腹膜肥厚についてもSR α HGF群ではCH群、pUC19群に比べ有意に抑制されていた。新生血管数はSR α HGF群ではCH群、pUC19群に比べ有意に減少していた。腹膜機能試験においてSR α HGF群ではCH群、pUC19群に比べ2時間後の腹腔内D-glucose濃度が有意に維持されていた。腹水量に関しては、SR α HGF群ではCH群、pUC19群に比べ、2時間後、4時間後で有意に増加していた。

【考察】 D-glucose、TGF- β 1負荷によるRPMC増殖能の抑制は、RPMCへのHGF遺伝子導入によって改善した。グルコン酸クロルヘキシジンにより腹膜の線維化は期間依存性に増悪したが、HGFcDNA導入RPMCの腹腔内移入により改善した。また血管新生の抑制も認めた。また2時間後の腹腔内D-glucose濃度は上昇し、2時間後、4時間後の腹水量は増加した。つまり、HGFcDNA導入RPMCを腹膜硬化症モデルラット腹腔内に移入することで腹膜の線維化は抑制され、腹膜機能も部分的に改善した。これは、HGFcDNA導入RPMCが持続的にHGFを産生したことにより、TGF- β 1による線維化作用を抑制したためと考えられた。また、腹膜機能の改善は新生血管数の減少によるものと考えられた。

【結論】 pUCSR α /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示唆された。

氏名	ひじ かつ やす き 土方康基
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	医第934号
学位授与の日付	平成19年3月22日
学位授与の要件	学位規程第4条第1項該当
学位論文題目	Induction of significant cytotoxic activity for autologous leukemia cells : inverse correlation between cytotoxicity and FOXP3mRNA expression (自己白血病細胞に対する細胞障害活性の誘導 : 細胞障害活性とFOXP3mRNA発現に認められる負の相関)
論文審査委員 (主査)	教授 金 丸 昭 久
(副主査)	教授 奥 野 清 隆
(副主査)	教授 義 江 修