

中沢将之 論文内容の要旨

主 論 文

Involvement of Leptin in the Progression of Experimentally Induced Peritoneal Fibrosis in Mice
(マウス腹膜線維症進展におけるレプチンの関与)

中沢将之、小畑陽子、西野友哉、阿部伸一、中沢有香、阿部克成、古巢 朗、
宮崎正信、小路武彦、河野 茂

Acta Histochemica et Cytochemica 46 (2): 75-84, 2013

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科新興感染症病態制御学系専攻
(主任指導教員：河野茂教授)

緒 言

腹膜透析は末期腎不全患者に対する有益な治療法であり、血液透析と比較して残腎機能保持や循環動態安定などの利点がある。しかし長期にわたる腹膜透析は、腹膜の線維化を来し、腹膜機能低下につながることが知られている。また腹膜線維化を来すことで発症しうる被嚢性腹膜硬化症は予後不良な疾患であり、未だ有効な治療法が確立されていないため、腹膜透析療法普及の妨げとなっている。これらの背景より、腹膜透析を継続するうえで腹膜線維化を予防することは非常に重要である。

レプチンは主に脂肪細胞にて産生され、下垂体で食欲調節に関与するホルモンとして知られているが、最近の研究では、他の様々な末梢組織において炎症性サイトカインとしての役割も果たしていると考えられている。

今回我々は、マウス腹膜線維症モデルにおいて、レプチンが腹膜線維化進展にどのように関与しているのかを検討した。

対象と方法

雄6週齢 C57BL/6 マウスに 0.05% chlorhexidine gluconate (CG) / 15% エタノール液 (10 mL/kg) を週 3 回、3 週間腹腔内投与して腹膜線維症モデルを作成した (WT-CG 群)。またレプチン欠損マウス (ob/ob マウス) にも同様に CG を投与し ob/ob-CG 群とした。一方、コントロール群として 15% エタノール液 (10 mL/kg) を腹腔内に週 3 回、3 週間腹腔内投与したモデルも作成し、C57BL/6 マウスの群を WT-control 群、ob/ob マウスの群を ob/ob-control 群とした。CG 投与開始から 21 日目に壁側腹膜および血液、腹膜洗浄液を採取した。更に、C57BL/6 マウスに、皮下埋没型浸透圧ポンプにて CG 投与開始と同時に recombinant mouse leptin (0.45g/kg/day) を持続投与した群 (leptin 群) と

その代替として phosphate buffered saline (PBS)を投与した群(PBS 群)を作成した。CG 投与開始 2 週後に壁側腹膜を採取し、腹膜肥厚面積を比較した。腹膜の形態評価は、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、画像解析装置を用いて腹膜肥厚面積を半定量化した。線維化の評価はコラーゲン III の免疫組織化学染色を行い、陽性面積を画像解析装置で解析した。レプチンおよびレプチン受容体の腹膜組織での発現を確認するために、免疫組織化学染色を施行した。線維化に関与する因子として、線維芽細胞のマーカーである α -smooth muscle actin (α -SMA)、transforming growth factor- β (TGF- β) の発現を免疫組織化学で検討した。マクロファージのマーカーである F4/80 とその浸潤に関与する monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)、血管内皮細胞マーカーである CD31 と血管新生促進因子である vascular endothelial growth factor (VEGF) についても同様の手法を用いて検討した。免疫組織化学染色の陽性細胞数は、1 個体あたり顕微鏡倍率 200 倍でランダムに 10 視野を数えた。レプチンの血中および腹膜洗浄液中の濃度は ELISA 法にて測定した。それぞれの結果については各群間で比較し、Bonferroni/Dunn 法で統計解析を行った。

結 果

CG 投与により、血中および腹膜洗浄液中のレプチン濃度は有意に上昇し、正常マウスと比較して、CG 群では肥厚した腹膜組織にレプチン発現の増強を認めた。レプチン受容体は、正常マウスでは腹膜中皮細胞のみに発現していたが、CG 群では腹膜中皮細胞の他、肥厚した腹膜の線維芽細胞やマクロファージにも発現を認めた。

腹膜の形態は、コントロール群では一層の中皮細胞とわずかな結合組織を認めるのみで、正常マウスとの有意な差は認めなかった。一方、WT-CG 群では中皮下腹膜組織の顕著な肥厚を認めたが、ob/ob-CG 群では WT-CG 群と比較して有意に腹膜肥厚が抑制された。WT-CG 群では著明なコラーゲン III の蓄積を認め、 α -SMA および TGF- β 陽性細胞数の著明な増加が見られたが、ob/ob-CG 群では有意にその程度が抑制された。F4/80 および MCP-1、CD31 および VEGF についても、同様に WT-CG 群と比較し ob/ob-CG 群では有意に発現は抑制されていた。

また、leptin 群では、PBS 群と比べ有意に腹膜線維化の促進が認められた。

考 察

本研究では、CG 投与により、腹膜線維化が惹起されるとともに、腹腔内のレプチン産生が亢進することが明らかとなった。また、レプチン欠損マウスに CG を投与すると、マクロファージの浸潤や血管新生が抑制され、腹膜線維化の程度は軽減した。その一方で、レプチン投与にて腹膜肥厚が促進されたことから、レプチンが腹膜線維化進展に促進的に関与している可能性が示唆された。レプチンは、TGF- β を介した線維化、MCP-1 を介したマクロファージ浸潤、VEGF を介した血管新生のいずれにも関与し、各々を促進する作用を有することが報告されていることから、腹腔内のレプチン産生を抑制することで、腹膜線維化の進展抑制につながる可能性が考えられた。