

# 阿部 陽子 論文内容の要旨

## 主 論 文

TNP-470, an angiogenesis inhibitor, suppresses the progression of peritoneal fibrosis in mouse experimental model

(血管新生阻害薬 TNP-470 によるマウス腹膜硬化症の進行抑制)

吉雄 陽子、宮崎 正信、阿部 克成、西野 友哉、古巢 朗、水田 陽平、  
原田 孝司、大園 恵幸、小路 武彦、河野 茂

Kidney International・66 巻 1677-1685 2004年

長崎大学大学院医学研究科新興感染症病態制御学系専攻

(主任指導教授：河野 茂教授)

### 緒 言

腹膜透析は末期腎不全に対する治療の一つであるが、長期間施行すると腹膜肥厚や中皮細胞の脱落などの変化をもたらす腹膜硬化症を合併してくる。近年、肥厚した腹膜組織では血管の異常や血管数の増加が認められることや、腹膜透析患者の腹腔内液中に血管内皮細胞成長因子 (VEGF) が高濃度含まれていることが報告されている。そのため、血管新生が腹膜硬化症の病態に関与しているのではないかと考えられる。

血管新生は癌や慢性炎症など様々な病態でみられ、血管新生阻害による治療が検討されている。TNP-470 は血管新生阻害効果を有し、これまで角膜の血管新生、関節炎、原発癌や転移癌の治療薬として実験に用いられてきた。

今回我々は、クロルヘキシジン・グルコネート (CG) により腹膜硬化症を惹起し、その進行において TNP-470 がどのような効果をもつか検討した。

### 対象と方法

#### 動物モデル

ICR マウスに 0.1% CG/15% エタノール液を 10ml/kg 腹腔内へ隔日投与して腹膜硬化症を惹起した (CG 群)。また CG 投与と同時に TNP-470 を週 2 回、20mg/kg 皮下投与した (CG+TNP-470 群)。さらに 15%エタノール液のみ腹腔内投与した群 (コントロール群)、TNP-470 単独投与群及び CG 投与に TNP-470 の溶解液のみを投与した群も作成した。CG・TNP-470 投与開始から 8 日目と 16 日目にと殺し、腹膜組織を採取した。

## 染色及び解析

ヘマトキシリン・エオジン染色及び以下の免疫組織化学染色を行った。1) 抗マウス CD31 抗体；内皮細胞のマーカー、2) 抗  $\alpha$ -SMA 抗体；筋線維芽細胞のマーカー、3) 抗 3 型コラーゲン抗体、4) 抗 HSP47 抗体；コラーゲン産生に必須な分子シャペロン、5) 抗 PCNA 抗体；増殖細胞のマーカー、6) 抗 VEGF 抗体、7) 抗 F4/80 抗体；マウスマクロファージ(M $\phi$ )のマーカー、8) 抗 Cdk2 抗体；細胞増殖周期のマーカー。更に CD31 と PCNA の二重染色も行った。

コンピューター解析ソフト (Win ROOF) を用いて腹膜組織の厚さを測定した。また各免疫染色の陽性細胞数を 400 倍の視野下で数えた。

## 結 果

### 形態学的変化

正常の腹膜組織は一層の中皮細胞とわずかの結合組織で構成されているが、CG 群では中皮下組織の著明な肥厚と細胞数増加を認めた。一方 CG+TNP-470 群では、腹膜肥厚は有意に抑制されていた。コントロール群と TNP-470 単独投与群の腹膜組織に変化はなかった。また TNP-470 溶解液を投与した群では CG 群と同程度の腹膜肥厚を認めた。

### 免疫染色

CG 群では CD31 陽性血管及び VEGF 陽性細胞の著明な増加を認めたが、TNP-470 投与では増加は抑制されていた。また CG 群でみられた  $\alpha$ -SMA 陽性細胞数と HSP47 陽性細胞数の増加及び著明な 3 型コラーゲンの沈着も、TNP-470 投与により抑制されていた。

更に CG 群では M $\phi$  を多数認めたが、TNP-470 投与群ではその数は減少していた。PCNA 陽性細胞は、CG 群では増加していたが、TNP-470 投与により減少していた。CD31 と PCNA の二重染色の結果、CG 群では陽性細胞を多数認めたが、TNP-470 投与群では有意に減少していた。Cdk2 染色でも同様の結果であった。

## 考 察

今回 CG 投与による腹膜硬化症モデルにおいて、TNP-470 投与は血管及び線維芽細胞の増加を抑制し、コラーゲン沈着も抑制したため、TNP-470 の腹膜硬化に対する進行抑制効果が示され、また血管新生が腹膜硬化の進展に関与している可能性が示された。

CG 投与群では腹膜肥厚に伴い細胞増殖を認めたが、TNP-470 投与は細胞増殖を抑制し、更に腹膜肥厚も抑制していたことから、腹膜の肥厚過程においてこれら細胞増殖が深く関与していると考えられる。

慢性炎症では炎症と血管新生が密接な関係にある。炎症部位では血管が増生して

おり、また血管内皮細胞における接着因子の発現は炎症細胞の浸潤を促し、サイトカイン分泌によりさらに炎症を促進する。故に血管増生を抑制し、血管内皮細胞の増殖を抑制することで炎症が抑制できると考えられる。今回、TNP-470 投与により Mφの浸潤が抑制されたのはこのためと考える。

また TNP-470 投与により筋線維芽細胞の増殖抑制も認めたが、最近の実験により TNP-470 の作用は血管内皮細胞以外の細胞にも認められることがわかってきた。このため TNP-470 投与による  $\alpha$ -SMA 細胞数やコラーゲン沈着の減少などの変化は、筋線維芽細胞増殖抑制効果によるものであるかもしれない。

TNP-470 の腹膜硬化抑制効果は、1) 血管新生阻害 2) 筋線維芽細胞の増殖抑制という二つのメカニズムによるものと考えられる。