

牟田(井生)久美子 論文内容の要旨

主 論 文

SAHA suppresses peritoneal fibrosis in mice

(SAHA がマウスの腹膜線維化を抑制する)

井生久美子, 西野友哉, 小畑陽子, 北村峰昭, 小路武彦, 河野茂

Peritoneal Dialysis International, in press

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：泉川公一教授)

※主任指導教員が不在の場合は、教室主任代理を記入すること。

緒 言

長期の腹膜透析療法は腹膜中皮下組織の線維化を引き起こすが、その進展機序は現時点で明らかとなっておらず、有効な治療法は確立されていない。

エピジェネティクスは、遺伝子の塩基配列によらない遺伝情報の後天的な発現制御機構であり、中でもヒストンのアセチル化は一般に遺伝子の転写促進に働き、ヒストンアセチル化酵素 (HAT) とヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 活性のバランスにより遺伝子発現を調節している。ヒストンのアセチル化と癌の進行には関連があり、HDAC 阻害剤には癌の成長を抑制する作用があることが報告された。さらに近年、HDAC 阻害剤による、酸化ストレスや炎症性サイトカインの抑制を介した腎臓や心臓等の線維化抑制作用が報告されている。一方、腹膜線維化に対する HDAC 阻害剤の有用性を検討した報告はない。

本研究では、マウス腹膜線維症モデルにおいて、HDAC 阻害剤である suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) の腹膜線維化抑制効果について検討した。

対象と方法

10 週齢雄の ICR マウスに、0.1% chlorhexidine gluconate (CG) /15%エタノール液 (0.2ml/body) を 3 週間隔日腹腔内投与して腹膜線維症を惹起した。SAHA は、vehicle (dimethylsulfoxide:saline=1:1) に溶解し、CG 投与時より週 5 回連日皮下投与 (25mg/kg/day) を 3 週間行った。マウスは、①CG と vehicle を投与する群 (CG 群)、②CG と SAHA を投与する群 (CG+SAHA 群)、③15%エタノール液と vehicle を投与する群 (control 群)、④15%エタノールと SAHA を投与する群 (SAHA 群) に分け、以下の検討を行った。

CG 投与開始 3 週間後に壁側腹膜を採取し、その組織を 4%パラホルムアルデヒドで固定し、パラフィン包埋後 4 μ m の切片標本を作製した。また、採取した壁側腹膜の一部は、real-time RT-PCR に用いる検体として凍結保存した。腹膜線維化に関して Masson & Trichrome 染色を行い、画像解析ソフトを用いて腹膜中皮下組織の肥厚長を計測した。さらに、コラーゲン産生に関して type III collagen、線維芽細胞のマーカーとして fibroblast-specific protein-1 (FSP-1)、筋線維芽細胞のマーカーとして α -smooth muscle actin (α -SMA)、transforming growth factor- β (TGF- β) シグナルの活性化の指標として Smad2/3 のリン酸化、マクロファージのマーカーとして F4/80、血管のマーカーとして CD31 を免疫組織化学的に検討した。type III collagen は陽性面積を画像解析装置で解析し、その他の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 倍で無作為に 5 視野数えた。

TGF- β シグナルの標的遺伝子である I 型 collagen α 1 鎖 (COL1 α 1) mRNA、fibronectin mRNA、collagen tissue growth factor (CTGF) mRNA の発現は、real-time RT-PCR 法を用いて検討した。さらに、ヒストンアセチル化については蛍光抗体法で評価した。

線維化抑制因子については、bone morphogenetic protein-7 (BMP-7) の発現を蛍光抗体法で検討した。腹膜中皮下組織の総細胞数に対する BMP-7 陽性細胞数の割合を解析した。さらに real-time RT-PCR により BMP-7 mRNA の発現を検討した。

結 果

CG 投与により腹膜中皮下組織の肥厚を認め、SAHA 投与により腹膜中皮下組織の肥厚は軽減した。CG 群の腹膜中皮下組織では、びまん性に type III collagen の発現を認め、CG+SAHA 群では有意にその発現が減少していた。FSP-1、 α -SMA の陽性細胞数は、CG 群と比較し CG+SAHA 群で有意に減少した。線維化に重要な TGF- β シグナルのメディエーターであるリン酸化 Smad2/3 陽性細胞数は、CG 群で有意に増加し、CG+SAHA 群で減少した。TGF- β シグナルの標的遺伝子である COL1 α 1 mRNA、fibronectin mRNA、CTGF mRNA の発現も同様の傾向を示した。ヒストンアセチル化の程度は、CG 群と比較して CG+SAHA 群で増強していた。ヒストンアセチル化によって転写が促進される候補遺伝子として線維化抑制因子である BMP-7 の発現を調べたところ、SAHA 投与によりその発現が亢進していることが明らかとなった。また、F4/80 陽性細胞数と CD31 陽性血管数は、CG+SAHA 群で CG 群よりも有意に減少していた。

考 察

以上の結果から、マウス腹膜線維症モデルにおいて、HDAC 阻害剤である SAHA が線維化を抑制することが明らかとなった。その機序として、SAHA がヒストンアセチル化を亢進させ、BMP-7 の発現を促進することで TGF- β シグナルを抑制し、線維化を抑制すると考えられた。さらに、以前より報告されている SAHA の抗炎症作用、抗血管新生作用も腹膜線維化抑制に関与している可能性が示唆された。今回我々は、ヒストンアセチル化によって転写が促進される候補遺伝子として BMP-7 に着目したが、他の遺伝子の関与も可能性として考えられ、今後検討する必要があると思われた。

本研究の結果から、腹膜透析患者において、SAHA が腹膜線維化の治療に有用である可能性が示唆された。