

臓器の線維化における肥満細胞 K^+ チャネルの関与と、治療(予防)への応用

風間 逸郎

東北大学大学院医学系研究科生体システム生理学分野

概要 アレルギー反応の際に肥満細胞がヒスタミンなどを放出する過程(エクソサイトーシス)は、電気生理学的にも、継時的な細胞膜容量(membrane capacitance; C_m)の変化として捉えられる。そこでわれわれは、ラット腹膜由来肥満細胞に対し、本電気生理学的手法を用いることにより、抗アレルギー薬(Olopatadine, Ketotifen)やステロイド薬(Hydrocortisone, Dexamethasone)、一部の抗菌薬(Clarithromycin)が、組織のヒスタミン受容体に拮抗するだけでなく、肥満細胞におけるエクソサイトーシスの過程そのものを阻害することによって(“肥満細胞安定化作用”),より強力な抗アレルギー作用を発揮することを明らかにした。さらに、電子顕微鏡などの形態学的な解析方法も組み合わせて用いることにより、脂溶性の高いこれらの薬剤が肥満細胞膜の脂質二重層の間に入り込み、膜の曲率を変化させることで直接的に、またはイオンチャネルや受容体を介して間接的に、エクソサイトーシスの過程を阻害するメカニズムも明らかにした。

近年の報告によると、肥満細胞は、炎症性サイトカインや線維原性因子を放出することによって、組織の炎症や線維化にも関わることが明らかになりつつある。そこでわれわれはまず、尿毒症モデルラットの腹膜では、肥満細胞の活性化・増殖によって線維化が進行するメカニズムを明らかにしたうえで、本病態モデルに対し、抗アレルギー薬(Tranilast)の治療的投与を試みた。その結果、本薬剤が、腹膜局所における肥満細胞の活性・増殖を抑えることにより、腹膜線維化の進行を有意に抑制することを明らかにした。

1. 研究目的

“被嚢性腹膜硬化症”は、長期の腹膜透析に伴い、腹膜に線維化を来たす重篤な合併症である。しかし、その病態メカニズムの詳細については未だ明らかではなく、有効な治療法も確立されていない。腹膜組織には肥満細胞が多く存在し、ヒスタミンやロイコトリエンなどの化学伝達物質を放出する以外にも、TNF- α , basic FGF, TGF- β , VEGFなどの炎症性サイトカインや線維原性因子を産生することが知られている。近年では、肥満細胞膜に多く発現するカルシウム依存性カリウムチャネル($K_{Ca}3.1$)が、このような肥満細胞の活性に関わることが分かってきた。また、最近の研究によると、肝硬変や全身性強皮症、肺線維症など、腹膜以外の臓器が線維化を来す過程でも、肥満細胞の活性が関与することが示唆されているが、そのメカニズムの詳細は明らかでない。

そこで本研究ではまず、腎不全に伴う腹膜線維化の発

症・進行過程における肥満細胞の役割を調べ、さらに肥満細胞をターゲットとした線維化治療(予防)法(“肥満細胞安定化薬”など)の可能性についても検証する。

2. 研究方法

2. 1. 慢性腎不全モデルの作成と腹膜の解析

6週齢の雄SDラットに対し5/6腎摘術を施行後、8週の回復期間を置いて慢性腎不全モデルを作成した¹⁾。実験動物の取り扱いについては東北大学の定める「国立大学法人東北大学における動物実験等に関する規程」に準拠した。腹膜を摘出後にパラフィン固定し、肥満細胞のマーカーであるTryptaseの抗体染色またはトルイジンブルー染色を行い、肥満細胞の発現分布、および線維化のマーカー(Collagen III, α -SMA)の発現も調べた²⁾。肥満細胞活性については、本細胞が放出するとされる炎症性サイトカインや線維原性因子の発現を、リアルタイムPCR法を用

いて調べた。

2. 2. 薬剤投与実験

慢性腎不全モデルラットに対し、抗アレルギー薬である Tranilast を治療的に投与した。本薬剤の投与量については、過去の *in vivo* 実験での使用量に準拠し、全身性の副作用を生じない範囲内の最大量とした。投与終了後に腹膜を摘出し、Tranilast 非投与群の腹膜と比較した。

2. 3. 肥満細胞の単離

25 週齢以上の雄性 Wister rat の腹膜を、細胞外液 (NaCl, 145; KCl, 4.0; CaCl₂, 1.0; MgCl₂, 2.0; HEPES, 5.0 mM; BSA, 0.01%; pH 7.2) で洗浄し、洗浄液から肥満細胞を単離した。単離した後、Olopatadine や Ketotifen などの薬剤を含む細胞外液中に拡散し、細胞含有液とした。なお、本細胞を用いた以下の実験は、細胞採取後 8 時間以内に、室温 (22~24°C) 条件下で行った。

2. 4. 電気的細胞膜容量の測定

EPC-9 patch-clamp amplifier system (HEKA Electronics, Lambrecht, Germany) を用いたホールセル・パッチクランプ法によって電気的細胞膜容量 (membrane capacitance: Cm) を測定した³⁾。パッチパイペット内に電極内液 (K-glutamate, 145; MgCl₂, 2.0; HEPES, 5.0 mM; pH 7.2) を満たした時の電気抵抗は 4~6 MΩ であった。細胞外液中に浮遊させた肥満細胞に対してギガシールを作成した後、電極内に陰圧を加えて細胞膜の一部を破壊し、ホールセル・モードとした。内因性にエクソサイトーシスを誘発するために、電極内液中に GTP-γ-S 100 μM を加え、細胞膜の破壊と同時に、細胞内への灌流を開始した。測定には、Lock-in amplifier を用いて、800 Hz の正弦曲線の矩形波パルスで -80 mV の保持電位で補正した。電気的細胞膜容量 (Cm)、シリーズコンダクタンス (series conductance: G_s)、膜コンダクタンス (membrane conductance: G_m) を 90 秒間連続して記録した。なお測定中、アクセス抵抗 (series resistance: R_s) は 10 MΩ 以下に保った。

2. 5. 統計学的解析方法

得られたデータは、PulseFit software (HEKA Electronics, Lambrecht, Germany) 及び Excel 2013 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) を用いて解析した。また、Student の t test による両方向の分散分析を用いて統計学的有意差を検証した。p 値 0.05 以下で統計

学的に有意であると判断した。

3. 研究結果と考察

3. 1 腹膜における肥満細胞の活性・増殖と線維化の進行

腎不全ラットの腹膜では、コントロールに比べ、表面の中皮細胞層が破壊されており、その下の結合組織層が、増生した線維組織によって、有意に肥厚していた (図1A)。さらにこれらの腹膜ではコントロールに比べ、collagen III の発現分布が増加しており、α-SMA 陽性細胞数も有意に増加していたことから (図1B)、線維芽細胞の増殖に伴う、腹膜の線維化を来していると考えられた。

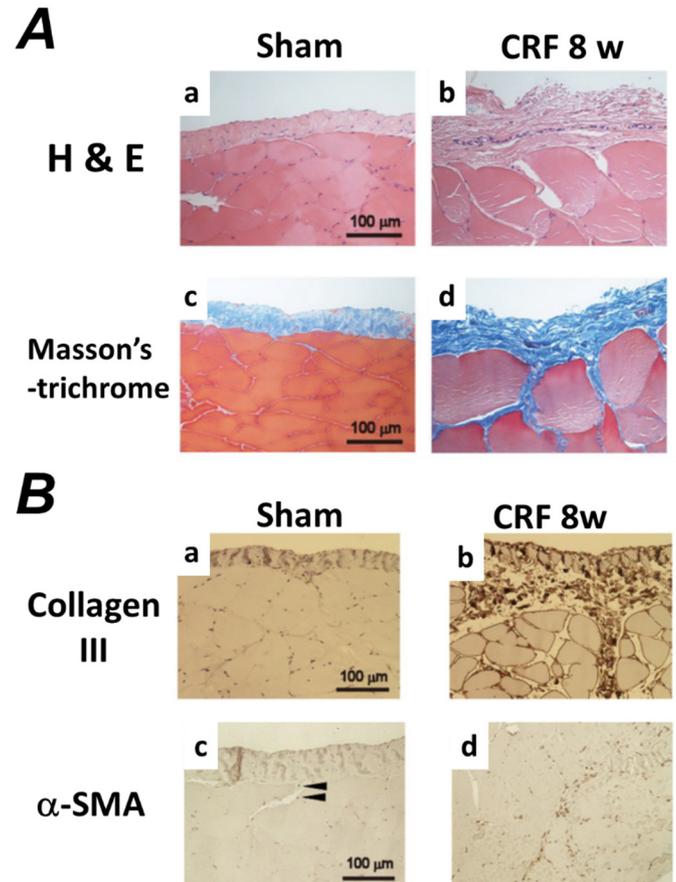


Figure 1. Progression of peritoneal fibrosis in chronic kidney disease.

(A) Increased fibrous tissue in the rat peritoneum with chronic renal failure (8 weeks after subtotal nephrectomy).

(B) Progression peritoneal fibrosis in CRF.

また、トリイズンブルー陽性の肥満細胞の数は、コントロールに比べ、腎不全ラットの腹膜で著しく増加していた(図2A)。そして、これらの細胞のほとんどが、細胞増殖マーカーであるKi-67によって共染色されたことから(図2B)、腎不全ラットの腹膜では、これらの肥満細胞が細胞増殖を来していると考えられた。さらに、腎不全ラット腹膜由来の肥満細胞では、コントロールに比べ、basic FGF や VEGF などの線維原性因子や炎症性サイトカインの発現が有意に増加していたことから、これらのラットの腹膜では、肥満細胞が活性化していると考えられた。

3.2 “肥満細胞安定化薬”による治療効果

われわれが先に行った *in vitro* 研究の結果、“肥満細胞安定化薬”として知られる Tranilast は、肥満細胞からの脱顆粒現象を有意に抑制した⁴⁾。そこで、腹膜線維化における肥満細胞の関与を明らかにするために、腎不全ラットに対して Tranilast を治療的に投与し、腹膜に対する効果を調べた。その結果、Tranilast 投与群では、非投与群に比べ、結合組織の肥厚が抑えられ、腹膜線維化の進行も有意に抑制されていた(図3)。従って、慢性腎臓病の腹膜では、肥満細胞の活性化・増殖によって、線維原性因子の産生が増加しており、それによる線維芽細胞の活性

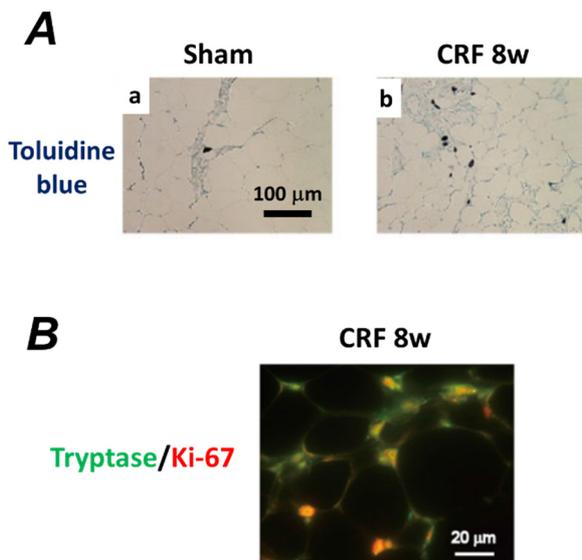


Figure 2. Proliferation of peritoneal mast cells in chronic kidney disease
(A) Increased mast cells in the rat peritoneum with chronic renal failure (8 weeks after subtotal nephrectomy).
(B) Proliferation of mast cells in the CRF rat peritoneum.

化・増殖を介して、腹膜の線維化が進行すると考えられた。

3.3 抗アレルギー薬が有する肥満細胞安定化作用についての電気生理学的検討

近年の報告によると、Olopatadine や Ketotifen などの抗アレルギー薬も、肥満細胞の活性を抑える可能性が示唆されている。しかし、これらの薬剤が、肥満細胞の“エクソサイトーシス”の過程そのものに対し、どのように作用するかについては、明らかになっていない。肥満細胞におけるエクソサイトーシスの過程では、分泌顆粒の細胞膜への融合に伴って、細胞膜の表面積が増加する。それによりこの過程は、電気生理学的にも、細胞膜容量; membrane capacitance (Cm) の継時的な増加として捉えられる。

そこで本研究では、肥満細胞のエクソサイトーシスの過程そのものに対する、抗アレルギー薬の効果を明らかにするために、olopatadine や ketotifen などの抗アレルギー薬の存在下で肥満細胞のエクソサイトーシスを誘発し、電気的細胞膜容量の変化を、パッチクランプ法を用いて測定した(図4)。

その結果、低濃度 olopatadine の存在下では、肥満細胞からの脱顆粒現象、およびエクソサイトーシスに伴う細胞膜容量の増加ともに、ほとんど抑制されなかった。しかし、高濃度 olopatadine の存在下では、肥満細胞からの脱顆

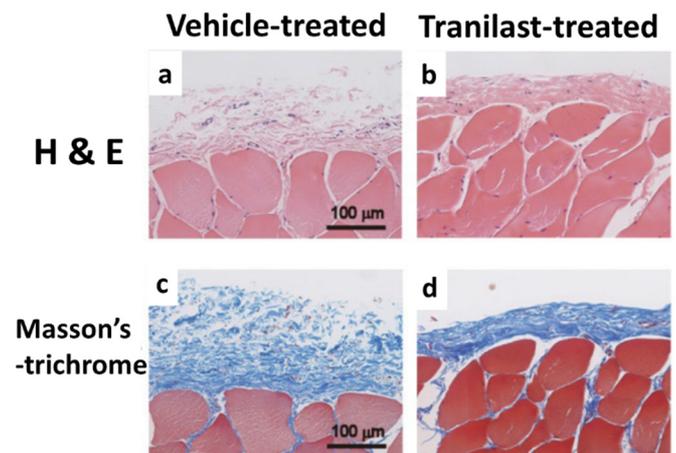


Figure 3. Effects of tranilast on the progression of peritoneal fibrosis
Decreased fibrous tissue in the CRF rat peritoneum with tranilast treatment.

粒現象, および細胞膜容量の増加とともに, ほぼ完全に抑制された。そこで, このエクソサイトーシスに伴う肥満細胞膜容量の増加分を定量化し, 異なる濃度の抗アレルギー薬の間で比較した。その結果, olopatadine や ketotifen はともに濃度依存性に, エクソサイトーシスに伴う細胞膜容量の増加を有意に抑制した(図4)。従ってこれらの薬剤は, 組織のヒスタミン受容体に拮抗するだけでなく, 肥満細胞におけるエクソサイトーシスの過程そのものを阻害することによって, “肥満細胞安定化作用”を発揮すると考えられた。

3. 4 日常診療頻用薬が有する肥満細胞安定化作用について

臨床的には, Olopatadine や Ketotifen などの抗アレルギー薬の他にも, ステロイド薬 (Hydrocortisone, Dexamethasone), 一部の抗菌薬 (Clarithromycin) も, 本来の薬理作用に加え, 抗アレルギー作用を有することが知られている。そこでわれわれは, 肥満細胞のエクソサイトーシスに対するこれらの薬剤の効果についても, 同様の

電気生理学的手法を用いて解析した。その結果, これらの薬剤はいずれも, 濃度依存性にエクソサイトーシスに伴う細胞膜容量の増加を抑制したことから, 高用量で用いれば, 肥満細胞安定化作用を発揮すると考えられた。

4. 結論および今後の課題

慢性腎臓病では, 腹膜由来肥満細胞の活性化・増殖によって, 腹膜の線維化が進行すると考えられた。肥満細胞安定化薬である Tranilast は, 肥満細胞の活性化・増殖を抑えることによって, 実際に, 腹膜線維化に対する治療効果を発揮した。従って, 肥満細胞安定化作用を有する抗アレルギー薬, 抗菌薬, ステロイド薬も, 腹膜線維化に対する治療薬として有用である可能性が高いと考えられた。今後は, 腎不全に伴う腹膜線維化だけでなく, 肝硬変, 全身性強皮症, 肺線維症など, 全身臓器線維化の発症・進行過程における肥満細胞の役割や, 本細胞膜に多く発現する $K_{Ca3.1}$ の関与など, そのメカニズムについても明らかにしていきたい。

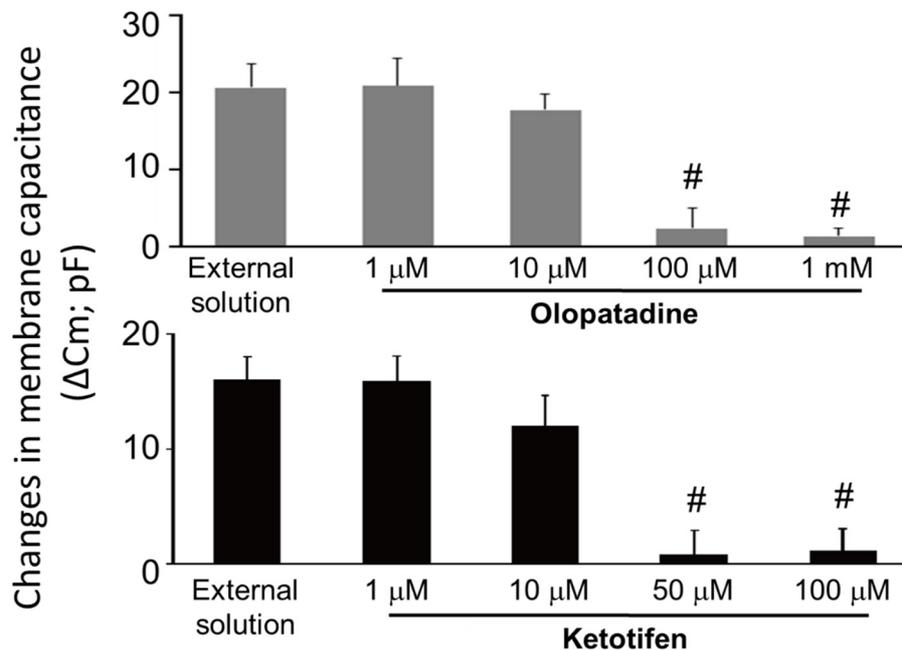


Figure 4. Effects of anti-allergic drugs on the increase in the membrane capacitance

(A) Olopatadine and (B) ketotifen dose-dependently suppressed the GTP- γ -S-induced increase in the membrane capacitance.

5. 文献

- 1) Baba A, Tachi M, Ejima Y, Endo Y, Toyama H, Saito K et al.: Less contribution of mast cells to the progression of renal fibrosis in Rat kidneys with chronic renal failure. *Nephrology (Carlton)* **22**: 159-67, 2017
- 2) Kazama I, Baba A, Matsubara M, Endo Y, Toyama H, Ejima Y: Benidipine Suppresses in situ Proliferation of Leukocytes and Slows the Progression of Renal Fibrosis in Rat Kidneys with Advanced Chronic Renal Failure. *Nephron Exp Nephrol* **128**: 67-79, 2014
- 3) Kazama I, Maruyama Y, Takahashi S, Kokumai T: Amphipaths differentially modulate membrane surface deformation in rat peritoneal mast cells during exocytosis. *Cell Physiol Biochem* **31**: 592-600, 2013
- 4) Baba A, Tachi M, Ejima Y, Endo Y, Toyama H, Matsubara M et al.: Anti-Allergic Drugs Tranilast and Ketotifen Dose-Dependently Exert Mast Cell-Stabilizing Properties. *Cell Physiol Biochem* **38**: 15-27, 2016

Therapeutic Usefulness of Mast Cell-Stabilizers in Chronic Kidney Disease

Itsuro Kazama

Department of Physiology, Tohoku University Graduate School of Medicine

Summary

Mast cells, which are also of hematopoietic origin, produce pro-inflammatory cytokines in addition to their exocytotic release of chemokines. Recent studies also revealed that mast cells produce fibroblast growth factors in certain pathological conditions, such as chronic inflammation, and thus facilitate the progression of organ fibrosis. Using rat models with chronic renal failure (CRF), we have recently demonstrated that mast cells do not increase, nor are they activated in the fibrotic kidneys of CRF. However, in the fibrotic peritoneum of CRF rats, they proliferated *in situ* and increased their activity to produce fibroblast-activating factors. Since treatment with tranilast, one of the potent mast cell-stabilizers, actually ameliorated the progression of peritoneal fibrosis, mast cells were thought to be responsible for the progression of peritoneal fibrosis in CRF.

According to previous patch-clamp studies, including ours, the exocytotic process in mast cells was continuously detected electrophysiologically by the changes in the membrane capacitance (C_m). In our recent patch-clamp study using rat peritoneal mast cells, anti-allergic drugs, such as olopatadine and loratadine, significantly suppressed the increase in the C_m and directly inhibited the process of exocytosis, indicating their high potency as “mast cell-stabilizers.” Morphologically, these drugs actually induced inward membrane bending of mast cells and counteracted the cellular surface deformation induced by exocytosis. Together with our *in vivo* evidence, the studies strongly suggested the therapeutic usefulness of targeting mast cells in the treatment of organ fibrosis with chronic diseases, in addition to the treatment for allergic disorders.