

## 腹膜透析排液由来細胞の細胞間結合と老化

## Intercellular Junctions and Cell Senescence of Peritoneal Dialysis Effluent Derived Cells

○ 原拓也 (三重大) 東洋 (三重大) 阿部功児 (三重大)

葛本智淳 (三重大) 宮本啓一 (三重大) 堀内孝 (三重大)

村田智博 (三重大) 石川英二 (三重大) の村信介 (三重大)

Takuya Hara, Mie University Yo Higashi, Mie University Koji Abe, Mie University

Tomoaki Kuzumoto, Mie University Keiichi Miyamoto, Mie University Takashi Horiuti, Mie University

Tomohiro Murata, Mie University Eiji Ishikawa, Mie University Shinsuke Nomura, Mie University

**Abstract:** Peritoneal dialysis effluent contains mesothelial cells as well as leukocytes. Human peritoneal mesothelial cells (HPMC) exist about 1.7~3.7% of all cells regardless of peritoneal dialysis periods. Because peritoneal dialysis effluent-derived HPMC (PDE-HPMC) are affected by glucose which is used as an integrant in dialysis fluid, glucose degraded products and pH, we classified PDE-HPMC to three types; 1) normal HPMC, 2) transformed HPMC, 3) senescent HPMC. It is thought that investigating each HPMC can be used as an assessment of peritoneal function. In addition, it is suggested that the necessity of treatments for remodeling intercellular junction because PDE-HPMC lose its junction.

**Key Words:** Peritoneal Dialysis, Human Peritoneal Mesothelial Cell, Intercellular Junction, Cell Senescence

## 1. 緒言

腹膜を構成する腹膜中皮細胞(Human Peritoneal Mesothelial Cell: HPMC)は透析液に含まれるグルコースやグルコース分解産物によって形質変換を受けることが示された<sup>(1)</sup>。その一部は細胞間結合を失い基底膜下に浸潤したり、透析液中に離脱するものと思われる。約5~20万個(全細胞の約1.7~3.7%)のHPMCが腹膜透析期間に関わらず腹膜透析排液中に存在することから<sup>(2)</sup>、透析排液中のHPMC(Peritoneal dialysis effluent derived HPMC: PDE-HPMC)の細胞数でなくその機能が腹膜の温存状態を反映するとの仮説を立てた。本研究ではPDE-HPMCの細胞間結合形成能、接着性、特異タンパク発現、細胞増殖能、細胞面積変化、細胞老化を測定し、臨床的意義を検討したので報告する。

## 2. 方法

## 1) 腹膜透析排液

三重大学医学部付属病院血液浄化部で治療中の腹膜透析患者7人の透析排液を実験に使用した。腹膜透析患者は男性6人、女性1人、平均年齢70±12才、透析期間26.5±17.5ヶ月であり、使用透析液はダイアニール N-PD2 1.5, ダイアニール N-PD2 2.5, エクストラニール(Baxter社)である(Table.1)。透析排液に5mM EDTA/生理食塩水溶液を最終濃度2.5mMになるように添加し、50Gで10分間遠心分離することで細胞を採取した。

Initial	A	B	C	E	H	N	O
Sex	M	M	M	M	M	M	F
Age	82	76	69	62	83	49	68
CAPD term (month)	53	24	24	4	14	47	20
Dialysate	①②	①	①	①②③	①③	①③	①
Peritonitis(time)	1	0	1	0	0	1	0
Amount of dialysate	1500~2000	1500, 2000	1500	1500	1500	1500, 2500	1500
Number of sample	11	9	4	3	4	9	2

透析液の種類

①ダイアニール N PD-2 1.5 ②ダイアニール N PD-2 2.5 ③エクストラニール (Baxter社)

Table.1 Information of peritoneal dialysis patients

## 2) 透析排液由来細胞の接着率・細胞増殖

透析排液から分離した全細胞は培養シャーレで培養し、位相差顕微鏡を用いて2,3日置きにランダムに4ヵ所選択して写真を撮影し細胞数を計数した。片対数座標上での細胞数と培養日数の直線関係より初期接着細胞数を外挿した。また直線近似の傾きより増殖率を算出した。

## 3) 透析排液由来の接着細胞のタンパク発現

接着細胞をサブコンフルエントまで培養し、免疫化学蛍光染色によって、中皮マーカーであるcytokeratin-18および間葉系マーカーであるα-SMAを染色しランダムに4ヶ所写真を撮影し、発現率を算出した。

## 4) 透析排液由来の接着細胞のTER測定

接着細胞の細胞間結合能の測定法として膜間電気抵抗測定(Transepithelial electrical resistance: TER測定)を行なった。トランスウェル(孔径0.4μmポリエステル膜)上に透析排液由来細胞を1×10<sup>5</sup> cells播種し、EVOMボルトオームメーターとSTX-2電極(World Precision Instruments, Inc., Sarasota, FL, USA)を用いてTER測定を行なった。STX-2電極は2本の電極で構成され、外側の電極から膜を介して±20μA, 12.5Hzの交流矩形波電流を流し、内側の電極で電圧を測定した。

## 5) 細胞面積と細胞老化

PDE-HPMCをコンフルエントまで培養し、細胞の写真を撮影し、ランダムに50個の細胞を選択して解析ソフトImageJを用いて細胞面積を測定した。

PDE-HPMCをサブコンフルエントまで培養し、Senescence associated β-galactosidase (SA-β-Gal)染色を行なった。位相差顕微鏡を用いて観察し、ランダムに4ヶ所写真を撮影して発現率を算出した。

## 3. 結果

## 1) 透析排液由来細胞の接着率

培養シャーレに初期接着した細胞は腹膜中皮細胞に特徴的な敷石状の形態を示し全細胞数に対する割合は約3%であった。この値はBetjesらの既報の値とほぼ同じであった。

残りの細胞の多くは血球系の細胞で白血球系細胞が主と思われる<sup>(2)</sup>。

## 2) 透析排液由来細胞のタンパク発現

接着、増殖が認められた細胞について特異タンパク質発現を調査した。接着した細胞の約 97%(85%~100%)が中皮細胞マーカーである cytokeratin-18 が陽性であったことから HPMC であることが示され、これらの細胞を PDE-HPMC とした。しかし、これらの細胞の約 31%(2%~63%)は間葉系マーカーである  $\alpha$ -SMA も陽性であり、上皮間葉変換 (Epithelial-to-mesenchymal transition: EMT)を受けた HPMC の存在も認められた。

## 3) PDE-HPMC の TER 測定

TER 測定によって PDE-HPMC の TER 値は  $21 \pm 3 \Omega \cdot \text{cm}^2$  であった。これは非腹膜透析組織由来 HPMC (nonPD-HPMC)と比較して約 34%低い値であり、nonPD-HPMC より PDE-HPMC は細胞間結合形成能が低下していることが示された。しかし間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cell: MSC) より高い抵抗値を示したことから細胞間結合の低下は見られるものの細胞間結合を消失していない細胞の混在が示唆された (Fig.1)。

## 4) PDE-HPMC の増殖能・細胞面積と細胞老化

PDE-HPMC は継代数 0~3 で増殖能が低下し、細胞面積が肥大することが示された。また PDE-HPMC は SA- $\beta$ -Gal 染色陽性細胞が  $8.5 \pm 8.1\%$ 認められ、腹膜から離脱した PDE-HPMC には EMT を受けた細胞だけでなく老化が進行した細胞も混在していることが示唆された。

## 4. 考察

PDE-HPMC の細胞間結合形成能が非腹膜透析患者由来の正常 HPMC と比較して低下している (Fig.1)理由として、EMT を惹起した細胞群や早期の細胞老化を生じた細胞群の混在があげられる。TER 測定値と間葉系マーカーである  $\alpha$ -SMA 発現率には負の相関 ( $R = -0.31$ )がみられたことから細胞間結合形成能と EMT との関連が示された (Fig.2)。しかしこれら PDE-HPMC の細胞間結合形成能は MSC よりも大きく、腹膜機能維持のための腹膜中皮細胞に特有な役割を果たしていることが示唆された。in vitro 実験において高濃度のグルコースが HPMC の細胞間結合能を低下させるという報告とあわせ<sup>(3)</sup>、細胞間結合の低下は透析排液への離脱だけでなく間質層へ浸潤し腹膜の肥厚させる原因としても考えられるため<sup>(4)</sup>、細胞間結合をより深く理解することが必要であり、細胞間結合の維持という面から新しい治療法の開発につながることを考えられる。

本実験結果より、PDE-HPMC の細胞間結合能の低下、間葉系マーカータンパク発現、細胞老化の進行を確認したことにより腹膜透析患者の腹膜機能の低下がもたらされると考えられる。

今後、PDE-HPMC の機能と患者の年齢、透析期間等といった臨床データとの相関を精査することによって、腹膜機能の無侵襲診断法として確立することを目指す。

## 5. まとめ

PDE-HPMC の細胞間結合形成能は非腹膜透析患者由来の正常 HPMC よりも低下しており、PDE-HPMC には(1)正常 HPMC、(2)形質変換した HPMC、(3)老化した HPMC が混在することによるものであることが示唆された。PDE-HPMC の機能を測定することで透析患者の腹膜機能の診断として応用できる可能性が示されただけでなく、腹膜を構成する細胞の細胞間結合をより深く調査することに

より、それらの機能を維持、回復できる腹膜透析技術の開発に貢献することができるものと考えている。

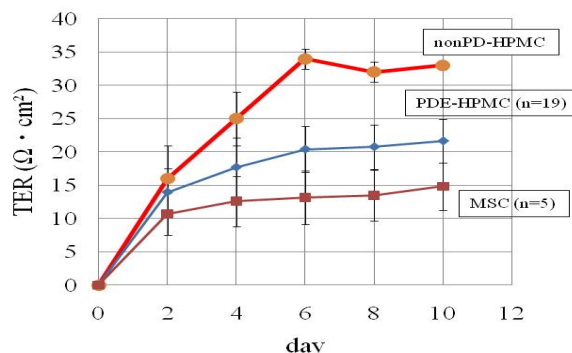


Fig.1 Transepithelial electrical resistance of nonPD-HPMC, PDE-HPMC and MSC monolayer.

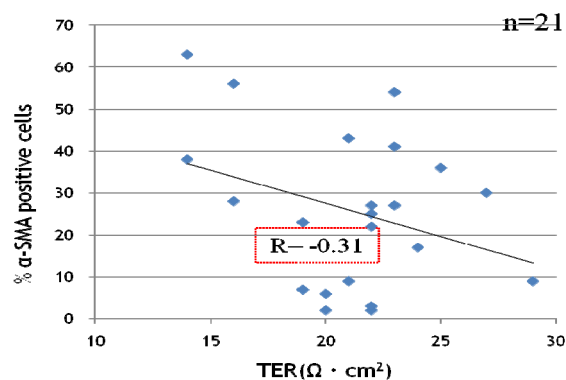


Fig.2 Relationship between  $\alpha$ -SMA and TER.

## 参考文献

- (1) Yáñez-Mó M, Lara-Pezzi E, Selgas R, Ramírez-Huesca M, Domínguez-Jiménez C, Jiménez-Heffernan JA, Aguilera A, Sánchez-Tomero JA, Bajo MA, Alvarez V, Castro MA, del Peso G, Cirujeda A, Gamallo C, Sánchez-Madrid F, López-Cabrera M, Peritoneal dialysis and epithelial-to-mesenchymal transition of mesothelial cells. *N Engl J Med*, vol.348(5), pp.403-13, 2003
- (2) Betjes MGH, Bos JH, Krediet RT, Arisz L, The Mesothelial Cells in CAPD Effluent and Their Relation to Peritonitis Incidence. *Perito Dial Int*, vol.11, pp.22-26, 1991
- (3) Ito T, Yorioka N, Yamamoto M, Kataoka K, Yamakido K, Effect of Glucose on Intercellular Junctions of Cultured Human Peritoneal Mesothelial Cells. *J Am Soc Nephrol*, vol.11, pp.1969-1979, 2000
- (4) Yamaguchi Y, Ishigaki T, Sano K, Miyamoto K, Nomura S, Horiuchi T, Three-dimensional invasion of epithelial-mesenchymal transition-positive human peritoneal mesothelial cells into collagen gel is promoted by the concentration gradient of fibronectin. *Perit Dial Int*, vol.31(4), pp.477-85, 2011