

腹膜透析排液由来細胞の細胞間結合

Intercellular resistance of Peritoneal Dialysis Effluent Derived Cells

○ 原拓也 (三重大) 阿部功児 (三重大) 葛本智淳 (三重大)

叢秀娜 (三重大) 宮本啓一 (三重大) 堀内孝 (三重大)

村田智博 (三重大医学部附属病院) 石川英二 (三重大医学部附属病院)

の村信介 (鈴鹿回生病院)

Takuya Hara, Mie University Koji Abe, Mie University Tomoaki Kuzumoto, Mie University
Cong Xiu Na, Mie University Keiichi Miyamoto, Mie University Takashi Horiuti, Mie University
Tomohiro Murata, Mie University Hospital Eiji Ishikawa, Mie University Hospital
Shinsuke Nomura, Suzuka Kaisei Hospital

Abstract: In peritoneal dialysis (PD), solute permeability of peritoneal membrane has a decisive influence on an efficiency and continuation of this therapy. Since intercellular junction is one of the specific apparatus for mass transfer, we have employed measurement of transepithelial resistance (TER) as physical measurement of intercellular junction. In this study, was lower than that of the omental peritoneal mesothelial cells (OM-HPMC). TER values decreased as CAPD duration prolonged, accompanying inverse correlation between TER value and α -smooth muscle actin(α -SMA), a marker of EMT(epithelial to mesenchymal transition). It was suggested that TER measurement of PDE-HPMC become clinically relevant assay to reflect the peritoneum integrity of the peritoneal dialysis patients.

Key Words: Peritoneal Dialysis Effluent, Human Peritoneal Mesothelial Cell, Intercellular Junction, Transepithelial Resistance

1. 緒言

腹膜透析排液中の中皮細胞 (Peritoneal dialysis effluent derived HPMC: PDE-HPMC)の機能が腹膜の温存状態を反映するとの仮説を立て、腹膜機能診断への応用を目指している⁽¹⁻³⁾。本研究では、PDE-HPMCの細胞間結合状態を膜間電気抵抗 (Transepithelial resistance: TER)測定を用いて定量化し、その数値の持つ意味、そして臨床的意義との関連性について検討した。

2. 方法

2-1 腹膜透析排液

三重大学医学部附属病院血液浄化部で治療中の腹膜透析患者(男性9人,女性2人の計11名,平均年齢68才,透析期間28.4ヶ月(2012年9月現在))から腹膜透析排液を提供頂いた。本研究期間に使用した透析液はDianeal N-PD2 1.5, Dianeal N-PD2 2.5, Extraneal (Baxter社)の3種であった。透析排液に1M EDTA/生理食塩水溶液を最終濃度2.5mMになるよう添加し、50Gで10分間遠心分離することで細胞を採取した⁽³⁾。

2-2 PDE-HPMCのTER測定

細胞間結合(Fig.1)の結合評価法として、TER測定を行った。Transwell(孔径0.4 μ mポリエステル膜)上にPDE-HPMCを 1×10^5 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測定を行った(Fig.2)。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 $\pm 20\mu$ A, 12.5Hzの微弱な交流矩形波電流を流し、内側の電極で電圧を測定した。

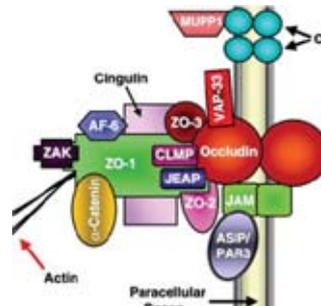


Fig.1 細胞間結合⁽⁴⁾

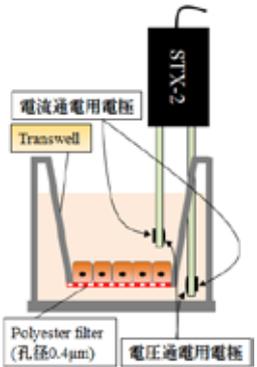


Fig.2 TER測定原理図

2-3 TGF- β 1による細胞間結合への影響

9日間Transwell上で培養しコンフルエント状態となったPDE-HPMCに対してGrowth Arrestを行い、10日目に細胞間結合を消失させる作用のあるTGF- β 1(10ng/mL)を曝露し、そのTER値の変化を観察した。

2-4 透析排液由来の接着細胞のタンパク発現

サブコンフルエントまで培養したPDE-HPMCに対して免疫蛍光染色を行い、中皮細胞マーカーであるCytokeratin-18 (CK-18)および、形質変換マーカーである α -SMAの染色を行った。細胞の写真を共焦点顕微鏡にて4ヶ所撮影し、その陽性率を算出した。

3. 結果

3-1 PDE-HPMCのTER測定

PDE-HPMCのTER値は $21 \pm 3\Omega \cdot \text{cm}^2$ を示し、大網由来の腹膜中皮細胞(OM-HPMC)のTER値($32 \pm 2\Omega \cdot \text{cm}^2$)⁽⁵⁾よりも34%ほど低いこと、細胞間結合が形成されていない間葉系幹細胞(MSC: $13 \pm 3\Omega \cdot \text{cm}^2$)に比べ、38%高いことが示された(Fig.3)。

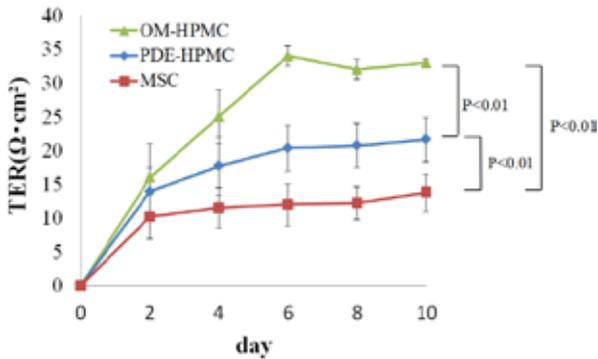


Fig.3 TER of OM-HPMC, PDE-HPMC and MSC monolayer.

3-2 TGF-β1 による細胞間結合への影響

培養 10 日後の PDE-HPMC に対して TGF-β1 を添加したところ、OM-HPMC は $13 \pm 1 \Omega \cdot \text{cm}^2$, PDE-HPMC は $7 \pm 3 \Omega \cdot \text{cm}^2$ の TER 値の減少がみられた (Fig.4).

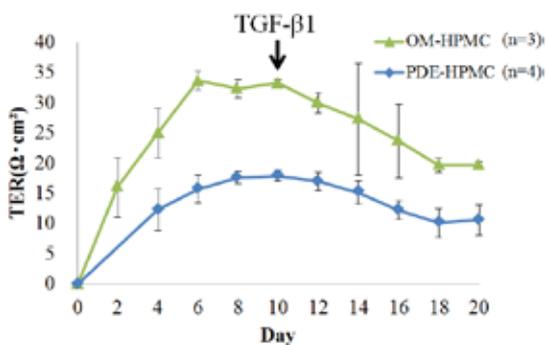


Fig.4 Effect of TGF-β1 on intercellular junction

3-3 PDE-HPMC の特異タンパク質発現

接着したサブコンフルエントの PDE-HPMC について特異タンパク質発現を調べた。接着した細胞のうち約 98% が中皮細胞マーカーである CK-18 陽性であったことから HPMC であることが示されたが、これらの細胞の約 27% の細胞は形質変換マーカーである α-SMA も陽性であった。TER 値と α-SMA 陽性率との間に負の相関 ($R=0.35$) がみられたことから、細胞間結合形成と上皮間葉形質変換 (epithelial to mesenchymal transition; EMT) との関連性が伺えた。

3-4 臨床データ (CAPD 継続期間) との関連性

CAPD 継続期間と α-SMA の陽性率との相関は見られなかったが、TER 値の間には中程度の逆相関 ($R=0.31$) がみられ、ある一定の CAPD 継続期間を過ぎると TER 値が著しく減少、即ち細胞間結合の損失が起こるといった傾向が得られた (Fig.5)。

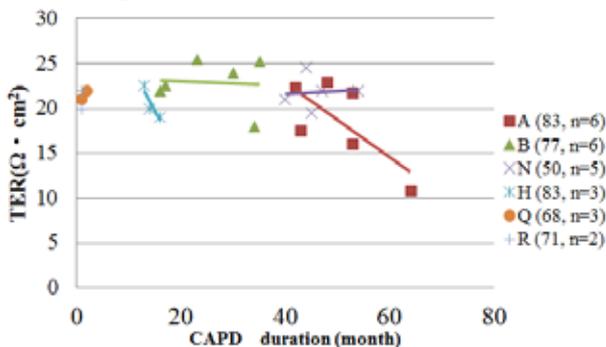


Fig.5 Relationship between CAPD duration and TER value.

4. 考察

Fig.4 において、TGF-β1 を添加した後の PDE-HPMC の減衰値は $7 \pm 3 \Omega \cdot \text{cm}^2$ であり、OM-HPMC の減衰値 ($13 \pm 1 \Omega \cdot \text{cm}^2$) より約 $6 \Omega \cdot \text{cm}^2$ 低い値であった。これより PDE-HPMC 中には、細胞間結合が損失している細胞が存在し、EMT を惹起した細胞が混在することが示唆された。また TGF-β1 を添加した際、OM-HPMC と PDE-HPMC がそれぞれ $20 \pm 1 \Omega \cdot \text{cm}^2$, $10 \pm 2 \Omega \cdot \text{cm}^2$ と異なるプラトー値を示したことから、PDE-HPMC 中には臓器を覆っている臓側腹膜と腹壁を覆っている壁側腹膜から剥離した HPMC が混在しているために、プラトー値に差が生じたと考えられる。また、TER 値と α-SMA 陽性率との間に負の相関 ($R=0.35$) がみられたことから細胞間結合形成能と EMT との強い因果関係が示された。

臨床データとの比較において、TER 値の減少が CAPD 継続期間 40 ヶ月を境に見られているが、個々の患者の使用透析液の違い (酸性や中性) が影響していることが考えられるため、今後も継続してデータを増やし、傾向を見ていく必要がある。

以上の結果から、TER は患者の腹膜機能を反映する客観的測定法となる可能性が明らかとなった。細胞間結合分子個々の局在性や可逆性、細胞特異性等不明な点が未だ多く更なる検討が必要である。

5. まとめ

PDE-HPMC の細胞間結合形成能は OM-HPMC よりも低下しており、PDE-HPMC には EMT が惹起され形質変換した異常な細胞だけではなく、臓側腹膜と壁側腹膜両側から剥離した正常な細胞の混在が明らかとなった。今後は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。

参考文献

- Higashi Y, et al. ,Characterization of Peritoneal Dialysis Effluent-derived Cells: Diagnosis of Peritoneal Integrity, J Artif Organs, 2012 (submitted)
- Hara T, et al. 腹膜透析排液由来細胞を用いた腹膜機能診断への応用, 第 18 回日本腹膜透析学会, 2012
- Abe K, et al. 腹膜透析排液由来細胞の抗酸化能と老化. 第28回ライフサポート学会, 2012
- Gemma.F,et al.:Occludin: Structure, junction and regulation, Advanced Drug Delivery Reviews, vol.57, pp.883-917, 2005
- Kaneda K, Miyamoto K, Nomura S, Horiuchi T, et al. Intercellular localization of occludins and ZO-1 as a solute transport barrier of the mesothelial monolayer, J Artif Organs, vol.9(4), pp.241-50, 2006 .