

## 腹膜透析排液由来細胞の抗酸化能と老化

### Anti-Oxidative Potential and Cell Senescence of Peritoneal Dialysis Effluent Derived Cells

○ 阿部功児(三重大) 葛本智淳(三重大) 原拓也(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(三重大学医学部附属病院) 石川英二(三重大学医学部附属病院)

の村信介(鈴鹿回生病院) 友雅司(大分大学医学部附属病院)

Koji Abe, Mie University Tomoaki Kuzumoto, Mie University Takuya Hara, 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 Tadashi Tomo, Oita University Hospital

**Abstract:** Human peritoneal mesothelial cells (HPMC) layering an inside of the peritoneal cavity are exposed to oxidative stresses due to bio-incompatible peritoneal dialysis solutions which contain high concentration of D-glucose and its degradation products (GDPs). It has been reported that HPMC exists about 1.7~3.7% of all cells in the peritoneal dialysis effluent (PDE). We hypothesize that characteristics of PDE derived HPMCs reflect integrity of the peritoneal membrane, and thus we analyzed anti-oxidative potential, cellular senescence, and expression of specific protein in this study. About 20% cells showed cellular senescence, and about 27% cells expressed  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA as a specific marker for epithelial to mesenchymal transition (EMT)). There exist positive correlations between cellular senescence, expression of  $\alpha$ -SMA and anti-oxidative potential. It suggested that decrease of anti-oxidative potential due to high concentration of glucose and GDPs, advance cellular senescence and EMT.

**Key Words:** Peritoneal Dialysis Effluent, Human Peritoneal Mesothelial Cell, Oxidation, Anti-Oxidation, Cell Senescence

#### 1. 緒言

腹膜透析液には浸透圧勾配をもたせるために高濃度のグルコースが含まれている。従って、腹膜を構成する腹膜中皮細胞(Human Peritoneal Mesothelial Cells; HPMC)は透析液の高濃度グルコースやグルコース分解産物に起因する過剰な酸化ストレスを受けていると考えられる。その一部の細胞は形質変換や細胞老化を引き起こし排液中に離脱すると考えられる<sup>(1)</sup>。本研究では腹膜透析排液由来の腹膜中皮細胞(Peritoneal Dialysis Effluent derived HPMC; PDE-HPMC)が患者の腹膜の状態を反映すると考え、抗酸化能、細胞老化、上皮-間葉系形質変換(Epithelial to Mesenchymal Transition; EMT)の有無を測定した。また、抗酸化剤を添加した際の PDE-HPMC の抗酸化能力を測定した。

#### 2. 方法

##### 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 11 人の腹膜透析排液を実験に使用した。腹膜透析患者は男性 9 人、女性 2 人、平均年齢 68(49-83)才、透析期間 28.4(1-67)ヶ月である(平成 24 年 9 月現在)。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。

本研究期間に用いられた腹膜透析液は D-グルコース含有の中性透析液(ダイアニール N PD-2)及びイコデキストリン含有の酸性透析液(エクストラニール)である。後者の使用頻度は前者 3 に対し 1 である。

Table.1 Information of peritoneal dialysis patients

Patients ID	A	B	C	E	H	N	O	Q	R	S	T
Sex	M	M	M	M	M	M	F	F	M	M	M
Age	83	77	69	62	83	50	68	68	71	75	71
CAPD duration (month)	39-66	11-36	24-27	4	2-16	37-50	20	1-2	1-2	36	1
Dialysate	①② ③	①③	①③	①② ③	①③	①③	①③	①	①③	②	①
Number of peritonitis episode	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
Amount of dialysate	1500, 2000	1500, 2000	1500	1500	1500	1500, 2500	1500	1000	1500	1500	1500
Number of PDE collected	17	17	4	3	5	13	2	4	6	1	2

①Baxter dianeal N PD-2 1.5 ②Baxter dianeal N PD-2 2.5 ③Baxter extraneal

##### 2) PDE-HPMC の形態

透析排液から分離した全細胞は培養シャーレ上、10%FBS/M199 培地にて培養した。サブコンフルエントの状態にて位相差顕微鏡を用いて、ランダムに4ヶ所写真を撮影して形態を調査した。

##### 3) PDE-HPMC の細胞老化

PDE-HPMC をサブコンフルエントまで培養し、Senescence associated  $\beta$ -galactosidase (SA- $\beta$ -Gal)染色を行った。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陽性率を算出した。

##### 4) PDE-HPMC の抗酸化能測定

PDE-HPMC をサブコンフルエントまで培養し、100 $\mu$ M 過酸化水素負荷による DCFH (2', 7' -Dichlorodihydrofluorescein diacetate)の DCF 変換率により細胞の抗酸化能を判定した。観察は共焦点レーザー顕微鏡を用い、その後 Image J で輝度解析を行った。

また、抗酸化剤添加の実験ではアスコルビン酸と $\alpha$ トコフェロールの糖誘導体(Ascorbic Acid-2 Glucoside:AAG、Tocopherol monoglucoside: TMG)を培地に添加して1週間培養した後に上記と同様の操作で測定した。

### 5) PDE-HPMC の特異タンパク発現

PDE-HPMC をサブコンフルエントまで培養し、免疫蛍光染色により間葉系マーカーである  $\alpha$ -SMA を染色しランダムに4ヶ所撮影し、陽性率を算出した。

## 3. 結果

### 1) PDE-HPMC の形態

培養シャーレに初期接着した PDE-HPMC は約 88%のサンプルで腹膜中皮細胞に特徴的な玉石状の形態を示した。また、透析期間が長期に亘っても玉石状の形態を維持していた(Fig.1)。酸性透析液のみを使用していた既報<sup>(1)</sup>よりも非常に高い割合で玉石状の形態を示していた。

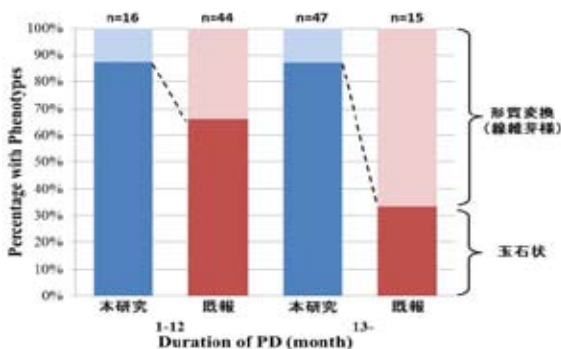


Fig.1 Percentage with Phenotypes

### 2) PDE-HPMC の細胞老化

PDEから遠心分離した細胞の中で培養用シャーレに接着した細胞を Passage 0 (P0)とし、P0での細胞老化陽性率は約 20%を示した。

### 3) 抗酸化剤添加時の PDE-HPMC の抗酸化能

抗酸化剤として AAG と TMG を培地中に添加し、1 週間培養した群では抗酸化能が上昇した結果が得られた。これは、抗酸化剤が細胞自身の抗酸化能をサポートしたものと考えられる(Fig.2)。

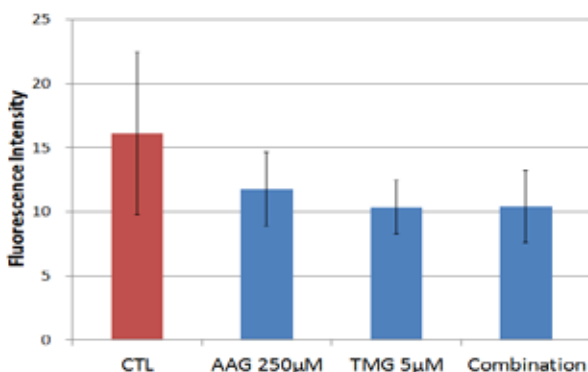


Fig.2 Fluorescence Intensity of Anti-Oxidative Potential by cultured supplement with antioxidant

### 4) PDE-HPMC の特異タンパク発現

接着し、PDE-HPMC と認められた細胞の特異タンパク発現を測定した。間葉系マーカーである  $\alpha$ -SMA は約 27% (2%~72%)

の細胞で発現した。これは、PDE-HPMC の中に EMT を受けた細胞も存在していることが示された。一方、上皮細胞マーカーである Cytokeratin-18 の陽性率は 98%であった。

### 5) 透析期間との関係

老化細胞と透析期間との間には中程度の正の相関性 ( $R=0.359$ )が見られた。また、抗酸化能測定と透析期間との間においても中程度の正の相関性 ( $R=0.555$ )が見られた。これら2つの相関性から、長期に亘り高濃度グルコースに曝されることで抗酸化能が減少し、老化細胞が増加することが示された。

## 4. 考察

PDE-HPMC の形態は、既報<sup>(1)</sup>に比し有意に玉石状の形態を示した。これら既報の研究機関では、酸性透析液のみを使用していたものであることから、中性透析液の腹膜温存効果を示す重要な知見である。さらに、透析期間が長期に亘っても玉石状を維持していることから、腹膜線維症などの合併症の減少に繋がっている可能性があり、今後も観察していく必要があると考えている。

このような中性化の効果が明らかになりつつあるが、透析期間との相関性から高濃度グルコースによる HPMC が過剰な酸化ストレスを受け、抗酸化能が減少し、細胞老化や EMT を引き起こしていることも少なからず生じていることも事実である。これら抗酸化能、細胞老化、 $\alpha$ -SMA の間にも相関性が見られ、それぞれが関連して作用していることが考えられる (Fig.3)。また、高濃度グルコースにより酸化ストレスを受けた細胞ではテロメア依存の複製老化でなくストレス性の細胞老化を引き起こすと以前に報告されている<sup>(3,4)</sup>。これからも、透析液により酸化ストレスが酸化障害を引き起こし、細胞老化を引き起こすことが示され、その結果として間葉系マーカーである  $\alpha$ -SMA の発現を誘導したと考えられる。

AAG, TMG が細胞内の抗酸化に寄与した理由として細胞膜に存在するアスコルビン酸トランスポーターやグルコーストランスポーターを経由する細胞内への取り込みが示唆されたが、今後の更なる検討が必要である。

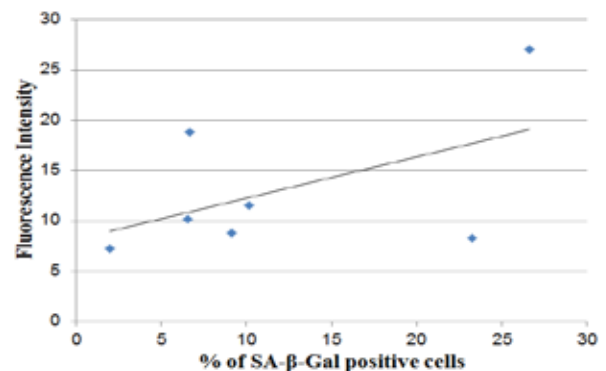


Fig.3 Relationship between Fluorescence Intensity and SA-β-Gal

## 5. まとめ

PDE-HPMC は約 88%のサンプルで腹膜中皮細胞特異的な玉石状の形態を示し、酸性透析液を使用した際と比較して形態を維持していた。また、その中には老化 HPMC や EMT を受けた HPMC が混在していることが示され、これらは密接に関連しており、それらの初期段階が酸化ストレスであると考えられる。そして、抗酸化剤が PDE-HPMC の抗酸化能をサポートすることが示された。今後、AAG, TMG 添加の際のメカニズムを追究し、さらに腹膜透析液の pH と細胞老化や EMT の関係性

を明らかにすることで、細胞老化や EMT を起こさない生体適合性に優れた新規の腹膜透析液や保護液の開発に貢献できると考えている。

#### 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* 2003, 348(5): 403-413
- (2) Betjes MG, Bos HJ, Krediet RT, Arisz L. The mesothelial cells in CAPD effluent and their relation to peritonitis incidence. *Perit Dial Int* 1991; 11:22-26.
- (3) Ksiazek K, Breborowicz A, Jörres A, Witoowski J. Oxidative stress contributes to accelerated development of the senescence phenotype in human peritoneal mesothelial cells exposed to high glucose. *Free Radic Biol Med* 2007; 42: 636-641
- (4) Ksiazek K, Passos JF, Olijslagers S, Saretzki G, Martin-Ruiz C, von Zglinicki T. Premature senescence of mesothelial cells is associated with non-telomeric DNA damage. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 362: 707-711