

透析排液由来細胞の分画とキャラクタリゼーション

Fraction and Characterization With Peritoneal Dialysis Effluent Derived Cells

○ 叢秀娜 (三重大) 葛本智淳 (三重大) 西町早織 (三重大)

山口直也 (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)

Xiuna Cong, Mie University Tomoaki Kuzumoto, Mie University

Saori Nisimachi, Mie University Naoya Yamaguchi, 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: It was found that normal peritoneal mesothelial cells, Epithelial-Mesenchymal Transition cells(EMT), and senescence cells are contained in Peritoneal dialysis effluent. Therefore, we separated those cell populations by percoll density centrifugation method and performed characterization of each cell population. As a result, we got the density distribution of Peritoneal dialysis effluent derived HPMC(PDE-HPMC). In addition, it was revealed that transepithelial resistance of those cells are different. According to these result a policy which the normal cells can be separated from the cell populations by percoll density centrifugation method was established.

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

1. 緒言

腹膜透析排液中には正常腹膜中皮細胞(PDE-HPMC)、上皮間葉系形質変換(EMT)⁽¹⁾を起こした細胞、老化した細胞、細胞間結合が異なった細胞などが含まれていることが分かってきた⁽²⁾。昨年度の本学会で原らは培養 10 日後の大網由来の HPMC(OM-HPMC)と PDE-HPMC に TGF- β 1 を曝露すると膜間電気抵抗値が減少すること、その減衰値に 6 Ω の差を示した⁽²⁾こと、さらには、TER 値減衰後のプラトー値が異なることを報告した⁽³⁾。この結果は PDE-HPMC には由来の異なる腹膜中皮細胞が剥離、混合していることを示している。そこで、本研究では、PDE-HPMC の機能評価に加え、Percoll 密度勾配遠心分離法を用いて、細胞を分類し、それぞれの細胞群のキャラクタリゼーションを行った。

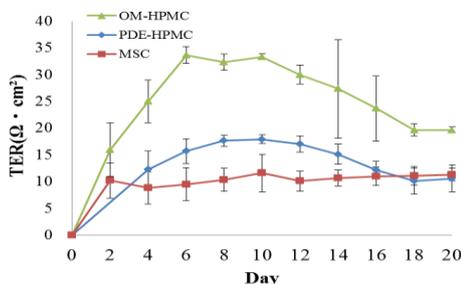


Fig.1 Transepithelial resistance of OM-HPMC, PDE-HPMC and MSC monolayer

2. 方法

2-1 腹膜透析排液

実験に使用した腹膜透析排液は、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から提供頂いた。腹膜透析患者は男性 14 人、女性 2 人の計 16 名、平均年齢 66 才、透析期間 24.2 ヶ月であった(2013 年 9 月現在)。使用透析液は Dianeal N-PD2 1.5、Dianeal N-PD2 2.5、Extraneal (Baxter 社)の 3 種を使用した。透析排液に 5mM EDTA /生理食塩水溶液を最終濃度 2.5mM になるよう添加し、50G で 10 分間遠心分離することで細胞を採取し、培養を行った⁽⁴⁾。

2-2 PDE-HPMC の Percoll 密度勾配遠心分離

Percoll 溶液を 0.15M NaCl 溶液で密度が 1.02g/ml から 1.07g/ml まで 0.01g/ml きざみで 5 段階の溶液を作り、各 1ml ずつを二層に重層し密度勾配を作成した。PDE-HPMC から細胞懸濁液を作成し、 20×10^4 個を各勾配に加え、2260rpm、20min で遠心分離し、中層の細胞を分取した。密度調整後、750rpm、5min で遠心分離し、細胞を計数した。

2-3 PDE-HPMC の密度による TER 測定

細胞間結合の評価法として、TER 測定を行った⁽⁵⁾。密度が 1.03g/ml と 1.05g/ml の二層の勾配に細胞懸濁液 1ml を加え、遠心分離(2260rpm, 20min)し、上層、中層、下層それぞれの細胞を Transwell(孔径 0.4 μ m ポリエステル膜)上に播種し、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。

3. 結果

3-1 PDE-HPMC の密度分布

図 2 に 3 名の患者から得られた PDE-HPMC の密度分布

を示す。PDE-HPMC の細胞密度分布が 1.02g/ml から 1.07g/ml までの範囲であることが示された。また、細胞密度分布が患者間で異なることが明らかとなり、その中に正常 HPMC が含まれている可能性が示唆された。

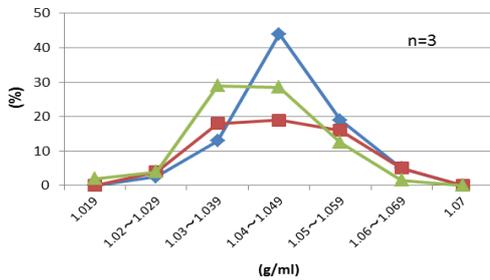


Fig.2 Cell density profile of PDE-HPMC

3-2 PDE-HPMC の密度勾配による分類後の TER 測定

図3に示すように密度により細胞の TER 値が異なることが明らかとなった。細胞密度が 1.03g/ml より軽い細胞の TER 値が一番低く、中間層にある細胞密度が 1.03g/ml から 1.05g/ml までの細胞の TER 値が高い傾向が得られた。これらの結果から密度分布をさらに細かく区分することで細胞間結合の異なる細胞群を判別できる可能性が示された。

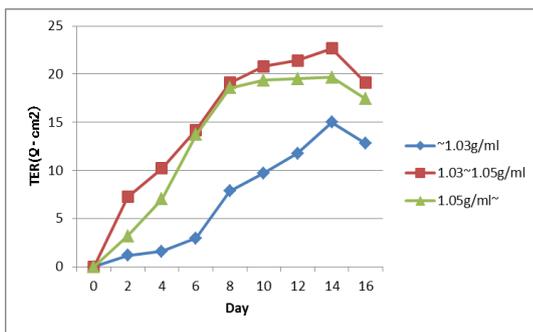


Fig.3 Transepithelial resistance of PDE-HPMC

4. 考察

PDE-HPMC の細胞密度分布が示されたことから正常細胞の分離ができることが示唆された。TGF- β 1 を曝露した際、OM-HPMC と PDE-HPMC の減衰値に 6 Ω の差を示したことで、さらには TGF- β 1 曝露後の TER 値減衰後のプラトー値が異なること、それらの保有する細胞間インターフェースの抵抗値、すなわち細胞間結合が異なっていることが示された。PDE-HPMC 中には臓器を覆う臓側腹膜由来の HPMC と腹壁を覆う壁側腹膜由来の扁平な HPMC が混在していること、さらには不完全な細胞結合を有する HPMC が含まれているため、Fig.1 のような TER 値の差が生じたのではないかと考えられる。また Fig.3 から密度により TER の値が異なることから臓側腹膜由来中皮細胞と壁側腹膜由来中皮細胞を分離できると考えられる。細胞間結合を維持している正常 HPMC を密度勾配遠心法により分画し、腹膜損傷部位へ自己移植する治療法に貢献できるものと思われる。

5. まとめ

PDE-HPMC は密度 1.02~1.07g/ml の範囲で分布を持ち、患者間で異なることが明らかとなった。この範囲の分画では、膜間電気抵抗値が異なることから、これらを指標とし

て、正常細胞の分離技術を確認できることが明らかとなった。

参考文献

- (1) Yáñez-Mó M, Lara-Pezzi E, Selgas, et al., Peritoneal dialysis and epithelial-to-mesenchymal transition of mesothelial cells. *N Engl J Med*, 348(5):403-13, 2003.
- (2) Higashi Y, Miyamoto K, Horiuchi T, et al., Characterization of peritoneal dialysis effluent-derived cells: diagnosis of peritoneal integrity. *J Artif Organs* 16(1):74-82, 2013.
- (3) 原 拓哉: 腹膜透析排液由来細胞の細胞間結合および腹膜機能診断への応用. 平成 24 年度 三重大学大学院工学研究科分子素材工学専攻修士論文 2013
- (4) Betjes MGH, Bos JH, Krediet RT, Arisz L, The Mesothelial Cells in CAPD Effluent and Their Relation to Peritonitis Incidence. *Perito Dial Int*, 11:22-26, 1991.
- (5) 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*, 9(4):241-50, 2006 .