

腹膜損傷マーカーの探索

Investigation for damaged marker of the peritoneum

○ 伊藤正也(三重大・工) 宮本啓一(三重大・工) 堀内孝(三重大・工)

村田智博(三重大大学医学部附属病院) 石川英二(三重大大学医学部附属病院) 吉田利通(三重大・医)

Masaya Ito, Mie University Keiichi Miyamoto, Mie University Takashi Horiuchi, Mie University
Tomohiro Murata, Mie University Hospital Eiji Ishikawa, Mie University Hospital Toshimichi Yoshida, Mie University

Abstract: Human peritoneal mesothelial cells (HPMC) layering an inside of the peritoneal cavity are exposed to stresses due to bio-incompatible peritoneal dialysis solutions which contain high concentration of D-glucose and its degradation products (GDPs) at an unphysiological pH. 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, thus we analyzed overall protein expression, gene expression in fibrosis in this study. Peroxiredoxin 3 (antioxidant enzyme) controlled oxidation stress. HSP70 (Endoplasmic Reticulum (ER) chaperonin), Protein disulfide isomerase-A3 (ER disulfide bond adjustment factor) fold the damaged protein, activated transportation from ER. CK-9 (intermediate filament) decreased, and α -SMA (specific marker for epithelial to mesenchymal transition (EMT)) increased. It suggested that pH, high concentration of glucose and GDPs begin to influence it from intracellular transport.

Key Words: Peritoneal Dialysis Effluent, Human Peritoneal Mesothelial Cell, EMT, Proteome analysis

1. 緒言

腹膜透析液には過剰水分の除去のため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⁽¹⁾。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、上皮-間葉系形質変換(Epithelial to Mesenchymal Transition; EMT)の有無を測定した。また、それによって特異的に発現量が変化するタンパクを、二次元電気泳動を用いて網羅的に探索した。

2. 方法

1) 腹膜透析排液

三重大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 10 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 8 人、女性 2 人、平均年齢 68(35-74)才、透析期間 17.1(1-65)ヶ月である(平成 27 年 6 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, バクスター, 米国)及びピコデキストリン含有の酸性透析液(エクストラニール, バクスター, 米国)である。

Table.1 Information of peritoneal dialysis patients

Patient	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
CAPD										
Duration (months)	58-65	16-24	11-12	5	6-17	3-14	3-10	1	27	5
PD solution	①	①②	①③	①	①②③	①③	①③	①	①③	①

①Baxter dianeal N-PD2 1.5, ②Baxter dianeal N-PD2 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、形態を観察した。

3) 二次元電気泳動

PDE-HPMC をサブコンフルエントまで培養し、正常な玉石状形態のサンプルと線維芽様に変化した細胞から、タンパク抽出を行った。抽出後のタンパクを Pierce 660nm protein assay reagent を用いて定量し、各サンプル 150 μ g を用いて 18 \times 18 cm, pI=4-7, Mw=10-250kDa の条件で二次元電気泳動を行った。電気泳動後のゲルを撮影後、画像解析ソフト Progenesis を用いて発現タンパクの変動解析を行った。

4) MALDI-TOF-MS

二次元電気泳動後の発現変動解析の結果より特異的に発現量が変化したスポットを、切り出しをトリブシン処理によって抽出後、MALDI-TOF-MS を行った。その後、得られたスペクトルより Protein Pilot を用いてタンパク同定を行った。

5) 特異タンパク発現における遺伝子発現

二次元電気泳動・MALDI-TOF-MS の結果より同定されたタンパクのうち、玉石状から線維芽様に形質変換する際に関わっているとされる候補を既報^(1,2,3,4,5,6)の結果より推定した。候補遺伝子^(1,5,6)に対し、Real-time RT-PCR 法を用いて上記二つの細胞形態の間での遺伝子発現を定量・比較した。

3. 結果

1) PDE-HPMC の形態

培養シャーレに初期接着した PDE-HPMC は透析期間の長期化に伴い、線維芽様の細胞が多くなる傾向であった(Fig.1)。また、酸性透析液を使用したことのある場合に比べ、中性透析液のみの場合は、玉石状形態の割合が多い傾向にあった。

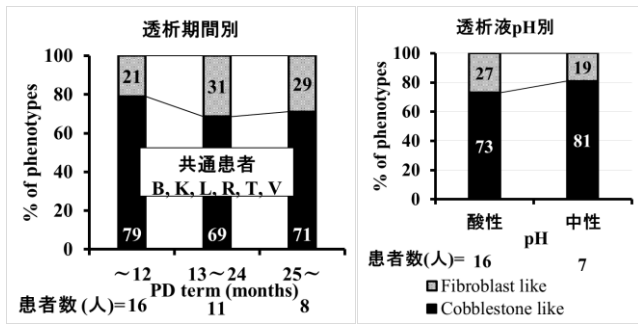


Fig.1 Percentage of Phenotypes

2) PDE-HPMC の形態の違いによる特異タンパク発現

玉石状から線維芽様に形質変換する際に、特異的に発現量が増加したタンパクを同定したところ、酸化ストレスが起り抗酸化に関わるタンパクが発現したことが分かった⁽²⁾。また、形質変換の際に小胞体からの輸送に関連するタンパクが大きく影響を受けていることが分かった^(3,4)(Table.2)。また、ケラチンフィラメントが減少し⁽¹⁾、アクチンフィラメント、特に間葉系マーカーとして知られている α -SMA⁽⁶⁾の発現が増加したことから中皮特性が減少したことが分かった。また、Cathepsin が減少したことにより、形質変換で受けたストレスによるアポトーシスが抑制されている⁽⁵⁾ことが分かった。

Table.2 Identified proteins (vs. Cobblestone)

A. 形質変換して 10 倍発現が上昇したタンパク

Peroxiredoxin-3	細胞内過酸化水素濃度を制御する還元酵素
HSP70	小胞体に常在する分子シャペロンで、タンパクのフォールディング・集合、ミスフォールドされたタンパクを分解するためのターゲティングに関連。
Protein disulfide isomerase-A3	小胞体に常在するタンパクのジスルフィド結合調節因子。小胞体からの輸送の活性化に関与したと考えられる。
α -SMA	間葉系マーカー

B. 形質変換して 10 倍発現が減少したタンパク

CK-9	低分子量におけるケラチンフィラメントの構成
Cathepsin D	リソソーム性アスバラギン酸プロテアーゼであり、アポトーシスや腫瘍細胞の増殖にも関与する

3) 特異タンパク発現における遺伝子発現

PDE-HPMC の玉石状形態と比べ、線維芽様形態のものでは、細胞間結合タンパクである E-cadherin^(1,5,6)が減少し、細胞間結合分子の減少に関連する転写因子として知られている Snail^(1,6)が 2.5 倍以上と著しく増加した。また、中皮マーカーとして知られている CK-18⁽¹⁾、間葉系細胞における中間径フィラメントとして知られている Vimentin^(1,5,6)は差が見られなかった(Fig.2)。遺伝子レベルにおいて、細胞骨格を構成する遺伝子に変化は見られなかった。

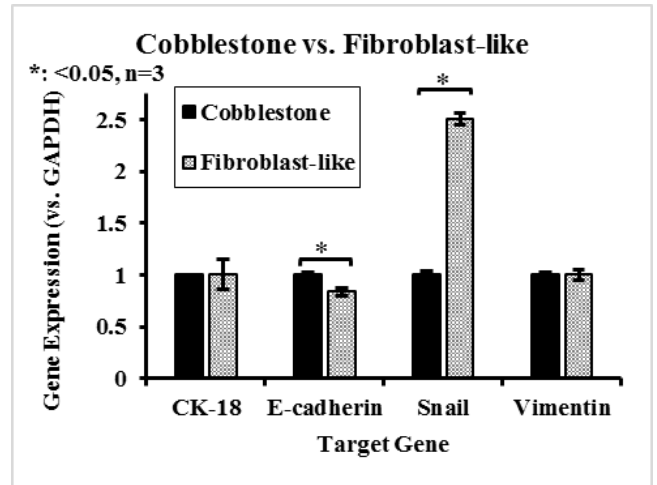


Fig.2 Gene Expression

4. 考察

PDE-HPMC の形態は、既報⁽¹⁾に比し有意に玉石状の形態を示した。これら既報の研究期間では、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、透析期間が長期化した際に線維芽様の割合が増加している傾向から、腹膜線維症などの合併症の減少に中性透析液が果たす役割は大きいとして、今後も観察していく必要があると考えている。

PDE-HPMC の玉石状から線維芽様への形質変換において、透析液に対するストレス応答として、抗酸化力が働き、同時に損傷したタンパクを修復し、過剰なアポトーシスを抑制したと考えられる^(1,2,3,4,5)。これは、低 pH の透析液の影響や透析液中の高濃度グルコースあるいはグルコース分解産物による過剰な酸化ストレスや毒性が透析期間の長期化に伴い、繰り返し HPMC がさらされてきたことによるものであると考えられる^(1,6)。二次元電気泳動の結果より、小胞体及び小胞体からリソソームへのゴルジによる輸送に対して傷害性があり、前駆体タンパクの合成・化学的修飾・その分類と輸送が正常に働かないことによる中間径フィラメントの減少、アクチンストレスファイバーの合成が起こったと考えられる^(1,3,4,7)。今後、小胞体からの輸送における損傷において、どのような機序で修復が行われているかを見る必要がある。

遺伝子レベルにおいて、透析を続けた際、細胞骨格まで影響が出ていなくても、線維化を促進する遺伝子発現が上昇し、細胞間結合の減少・線維芽様が進行する過程は進んでいるものと考えられる⁽⁶⁾。

5. まとめ

PDE-HPMC は透析期間の長期化に伴い、線維芽様になる傾向があることが示唆された。また、酸性透析液を使用した際と比較して中性透析液を使用した場合の方が形態を維持していた。

また、EMT を受けた PDE-HPMC は細胞内における輸送が変化しており、これが細胞骨格の変化や細胞間結合の減少と密接に関連しており、それらの初期段階が透析液による細胞内への傷害であると考えられる。今後、細胞内輸送の変化に伴う様々なタンパク発現の変化を追究し、それと腹膜透析液との関係を明らかにすることで、腹膜状態の変化をより早く検知できるように考えている。

参考文献

- (1) Yáñez-Mó M, *et al.* Peritoneal dialysis and epithelial-to-mesenchymal transition of mesothelial cells. *N Engl J Med* 2003, 348(5): 403-13
- (2) Jihong F, *et al.* Overexpression of peroxiredoxin 2 inhibits TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition and cell migration in colorectal cancer. *Mol Med Rep* 2014; 10(2): 867-73
- (3) Pierre-Simon B, *et al.* Heat shock proteins in fibrosis and wound healing: Good or evil? *Pharmacol Ther* 2014; 143: 119-32
- (4) Hassan D, *et al.* Secretion of ERP57 is important for extracellular matrix accumulation and progression of renal fibrosis, and is an early sign of disease onset. *J Cell Sci* 2013; 126(Pt 16): 3649-63
- (5) E Janda, *et al.* Raf plus TGF β -dependent EMT is initiated by endocytosis and lysosomal degradation of E-cadherin. *Oncogene* 2006; 25: 7117-30
- (6) Lijie H, *et al.* Serum Response Factor Accelerates the High Glucose-Induced Epithelial-to- Mesenchymal Transition (EMT) via Snail Signaling in Human Peritoneal Mesothelial Cells. *PLoS One* 2014; 9(10): e108593
- (7) T Yoshida, *et al.* Low cytoplasmic pH causes fragmentation and dispersal of the Golgi apparatus in human hepatoma cells. *Int J. Exp. Path* 1999; 80: 51-7