

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461252

研究課題名(和文) 腹膜透析における腹膜中皮細胞動態からみた腹膜硬化進展機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation the mechanism of progression on peritoneal sclerosis in peritoneal dialysis

研究代表者

喜多村 真治 (KITAMURA, SHINJI)

岡山大学・大学病院・講師

研究者番号：70467752

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：In Vitro試験では形態的、質的評価を行った。用いた細胞は腹膜中皮細胞で敷石状形態細胞(以下Epi細胞)及び線維芽様腹膜中皮細胞(以下Fib細胞)で行った。酸性刺激のみならず、糖刺激においてもEpi細胞の変化は乏しいが、Fib細胞が腹膜硬化に重要な働きを行うことが示唆された。次にIn Vivo試験ではEpi細胞上清では腹膜硬化モデルに比較し、有意に腹膜肥厚並びに腹膜癒着を改善したが、Fib細胞上清では反対に有意に腹膜肥厚並びに腹膜癒着の悪化が認められた。このことから、腹膜中皮細胞は分泌する液性因子も重要であることが示唆された。今後液性因子内のエクソソーム解析も行き、機序解明を目指したい。

研究成果の概要(英文)：In Vitro study, peritoneal mesothelial cells were performed the morphological and qualitative evaluation. The cells used were peritoneal mesothelial cells, with cobblestone morphologic cells (Epi cells) and fibroblast-like peritoneal mesothelial cells (Fib cells). From the result, it is suggested that Fib cells play an important role in peritoneal sclerosis although Epi cells change poorly not only in acidic stimulation but also in sugar stimulation.

In vivo study, Epi cell supernatant significantly improved peritoneal damage and peritoneal adhesion compared to the peritoneal sclerosis positive model, however in Fib cell supernatants, peritoneal deterioration were significantly observed. From these results, it is suggested that secreted factor from peritoneal mesothelial cells is also important. We will also conduct exosome analysis in secreted factors to aim for elucidation of its mechanism.

研究分野：腎臓内科、透析学、再生医療

キーワード：腹膜中皮細胞 腹膜透析 細胞療法

## 1. 研究開始当初の背景

現在、慢性腎不全に対する腎臓代替療法として、血液透析・腹膜透析・腎移植が行われているが、腎移植においてはドナー不足があり、施行される腎移植症例数は非常に少ないのが現状である。そのため現行の腎不全代替療法として、主に血液透析・腹膜透析がなされている。

その中で腹膜透析は残腎機能や QOL の観点から最初に透析導入するのに適している PD first という概念が提唱されている。その理由として腹膜透析は除水が緩徐なため残腎機能を保持しやすく、残腎機能保持が患者の水分制限の緩和など QOL の悪化抑制に働き、生命予後にも影響を与えられている。しかし、長期の腹膜透析となると腹膜機能の劣化により透析不足、除水不良などが進行し、腹膜透析継続不可となり、血液透析へと移行するといったことがある。そのため、現行の腹膜透析では約 5 年で血液透析への移行がなされることがある。その腹膜機能の劣化は、腎不全による尿毒症の合併症よりも、腹膜透析液による長期刺激による腹膜硬化が主因と考えられ、腹膜透析における原因として、低 PH (酸性)、GDPs (ブドウ糖分解産物)、浸透圧、乳酸などが考えられている。

一方、腹膜透析の経過において長期腹膜透析の負荷により腹膜中皮細胞が上皮-間葉移行 (epithelial mesenchymal transition: EMT) を起こし、腹膜中皮細胞が変化することが示されている (Maria Yanez-Mo et al., NEJM, 2003)。このことは、腹膜透析による長期腹膜中皮細胞への刺激が、腹膜中皮細胞の形質転換を起こし、腹膜劣化と密接に関連していることを示唆している。腹膜硬化は、腹膜中皮細胞障害により進行することが示唆されており、腹膜障害の中心になるのが、腹膜透析液による腹膜刺激である。

このような腹膜透析に対し、腹膜透析液の改良なども行われおり、腹膜劣化の大きな原因として言われている低 PH に対し、中性腹膜透析液が開発され、現在臨床使用されている。中性腹膜透析液に対する腹膜中皮細胞への影響について、酸性腹膜透析液に対し障害が少ないことは報告されている (Topley N et al, J Am Soc nephrol, 1996) また、ラットモデルにおいて、中性腹膜透析液は腹膜肥厚を抑制し (Ikehara O et al, NepronExp

Nephrol, 2005)、腹膜中皮細胞を用いた研究でも細胞生存率などは中性腹膜透析液の方は改善されることが報告されている (Tomo T et al, J Artif Organs, 2005)。

今回我々は、そのような腹膜障害に対し *In Vitro* にて腹膜中皮細胞の形態から判別した敷石状腹膜中皮細胞 (Epithelial like mesothelial cells: Epi Cells) および線維芽状腹膜中皮細胞 (Fibroblast like mesothelial cells: Fib cells) の動態が、中性腹膜透析液刺激または酸性腹膜透析液における相違を検討することにより、新たな腹膜障害機序の解明を行い、腹膜障害の重症化進展防止を目指すものである。腹膜障害に重要な働きをしている腹膜中皮細胞を用いて、酸性腹膜透析液や中性腹膜透析液による腹膜障害を *In Vitro* でモニタリングし、その data との相関を *In Vivo* モデルから採取した腹膜中皮細胞との動態とを比較し、*In Vitro* が *In Vivo* との相関を示すかの検討を行い、腹膜障害の解明と新たな評価系を確立するものである。

## 2. 研究の目的

腹膜透析における中性腹膜透析液・酸性腹膜透析液刺激による腹膜中皮細胞からみた腹膜硬化進展機序の解明

本研究は、慢性腎不全からの腎臓代替療法の一つである腹膜透析における腹膜劣化の原因である腹膜透析液刺激からみた腹膜硬化進展機序の解明を腹膜中皮細胞の動態を主として解明することである。腹膜透析は残腎機能や QOL の観点から優れた透析法であるが、その欠点として腹膜硬化が挙げられる。そのため、生体適合性の高い中性に調整された腹膜透析液が使用されているが、腹膜中皮細胞への詳細な影響の報告は少ない。今回我々は、腹膜中皮細胞の細胞工学的な手技を用いて、中性透析液、酸性透析液による腹膜中皮細胞への影響を検討する

## 3. 研究の方法

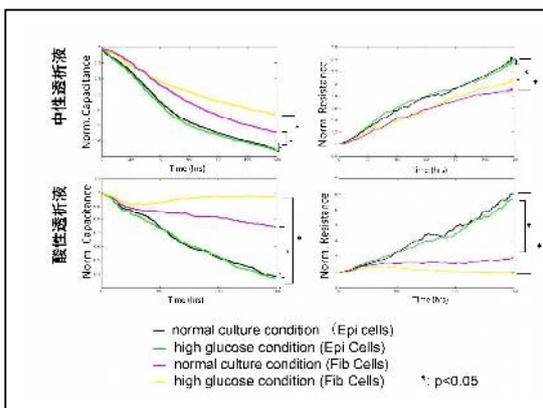
本研究は、腹膜中皮細胞を用いた腹膜劣化機能解明、並びに腹膜機能評価法の開発である。本研究の主な内容は二点あり、一つは *In Vitro* での腹膜透析液 PH の相違による腹膜中皮細胞動態解析を形態学的・形質的に、またリアルタイムにも評価を行い、Epi 細胞・Fib 細胞の増殖、形態的な変化、形質転換などの検討を行い、腹膜機能劣化の機序解明を行う。

二つ目には、一つ目で得られた内容と In Vivo での腹膜機能との相関を確認し、In Vitro と In Vivo での機序の相関を検討する。腹膜障害モデルを用いて、各種細胞の腹膜再生への影響を分泌因子の観点で検討する。In Vitro で得られた Epi 細胞・Fib 細胞の形質、動態と In Vivo での腹膜中皮細胞の動態変化を比較検討し、腹膜劣化進展機序の Vitro/Vivo 相関と解明を行う。

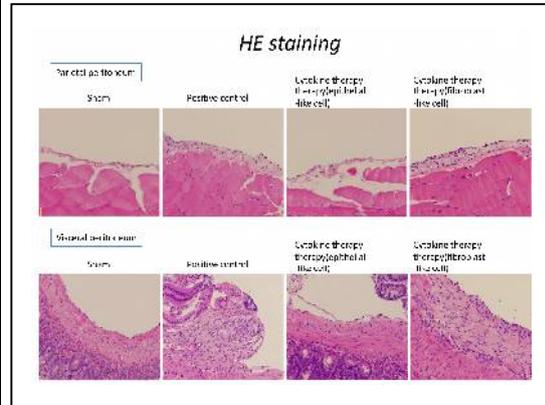
#### 4. 研究成果

本研究は、腹膜透析における中性腹膜透析液並びに酸性腹膜透析液による腹膜中皮細胞への影響を見た腹膜硬化進展機序解明を目指した研究である。

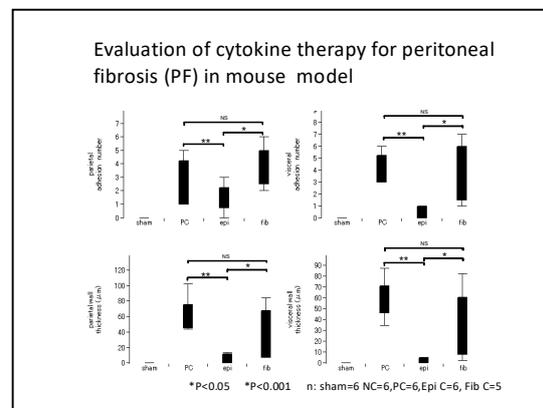
まず、In Vitro 試験では、腹膜中皮細胞を使用し、その形態的、質的評価を行った。用いた細胞は、腹膜中皮細胞で、敷石状形態細胞 (Epithelial like mesothelial cell: 以下Epi細胞) 及び線維芽様腹膜中皮細胞 (Fibroblast like mesothelial cells: 以下Fib細胞) で行った。それらの細胞を酸性腹膜透析液刺激下並びに中性腹膜透析液刺激下にて培養を行ったところ、酸性腹膜透析液下において、Epi細胞はFib細胞形態をとることがあり、質的には電位において、酸性透析液刺激で有意にキャパシタンスの増加並びにレジスタンスの低下が認められた。また、上記Epi細胞、Fib細胞で高濃度の糖濃度培養液下にて、酸性腹膜透析液、中性腹膜透析液刺激下で培養を行い評価したが、糖濃度が高度な培養液において、Epi細胞では有意な変化は認められなかったが、Fib細胞ではキャパシタンスの増加、レジスタンスの低下が認められ、さらに透過性の亢進が認められた。このことは、酸性刺激のみならず、糖刺激においてもEpi細胞の変化は乏しいが、Fib細胞が腹膜硬化に重要な働きを行うことが示唆された。



次にIn Vivo試験では、腹膜刺激による腹膜硬化モデルマウスを作製し、そのマウスにEpi細胞の培養上清並びにFib細胞培養上清を投与し、腹膜硬化の変化を検討した。結果、Epi細胞上清では腹膜硬化モデルに比較し、有



意に腹膜肥厚並びに腹膜癒着を改善したが、Fib細胞上清では反対に有意に腹膜肥厚並びに腹膜癒着の悪化が認められた。このことから、腹膜中皮細胞は分泌する液性因子も重要であることが示唆された。今後液性因子内のエクソソーム解析も行い、その機序解明を目指したい。



#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1件)

1. Inoue-Torii A, Kitamura S, Wada J, Tsuji K, Makino H. The level of urinary semaphorin3A is associated with disease activity in patients with minimal change nephrotic syndrome. *Int J Nephrol Renovasc Dis.* 2017 Jun 22;10:167-174. 査読有。doi: 10.2147/IJNRD.S132980. eCollection 2017.

〔学会発表〕（計 2 件）

1. The selected peritoneal mesothelial cell therapy is effective to prevent peritoneal fibrosis. Shinji Kitamura, Naoya Horimoto, Kenji Tsuji, and Jun Wada, 34<sup>th</sup> Congress of the International Society of Blood Purification International Conference Center Hiroshima, Sep 8<sup>th</sup>, 2016
2. 喜多村真治、腎臓病から透析までの包括的腎臓領域再生医療に向けて、日本透析医学会学術総会、大阪国際会議場、2016 年 6 月 12 日

〔図書〕（計 2 件）

1. 喜多村真治：腎再生、小児外科 49 巻 5 号、p 485-488、2017. 東京医学社
2. 成体腎臓幹細胞の新知見 喜多村真治、腎臓内科・泌尿器科 第三巻第二号、p 148-152、2016. 科学評論社

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

喜多村 真治 (KITAMURA, SHINJI)

岡山大学病院 腎臓・糖尿病・内分泌内科・講師

研究者番号：70467752

### (4) 研究協力者

辻 憲二 (TSUJI, KENZI)

鳥居 章子 (TORII, AKIKO)