

機関番号：14101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650258

研究課題名(和文)再生医療に資する腹膜透析排液の資源化

研究課題名(英文)Resource recovery of peritoneal dialysis effluent derived cells for regenerative medicine

研究代表者

堀内 孝(Horiuchi, Takashi)

三重大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10201758

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：腹膜透析排液由来の細胞の約4%が接着細胞で、その97%が中皮細胞(CK-18陽性)であった。密度勾配遠心分離を1.02~1.07g/mLまでの5つの勾配で行い、分離後、細胞機能評価を行った。密度が1.05~1.07g/mLの細胞群では細胞面積が小さい；細胞間結合が強い；老化の程度が低い；抗酸化能が高いことが明らかとなった。二次元電気泳動とTOF-MASS解析から、密度分画別に発現タンパクの違いが存在することを明らかにした。高密度分画の細胞をさらに細かく精査することで、機能性を維持した細胞を分離できることが示唆され、細胞の密度分布が腹膜機能を評価する一手段になることが示された。

研究成果の概要(英文)：It was found that normal peritoneal mesothelial cells, epithelial-mesenchymal transition cells (EMT) and senescence cells are mixed 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, density distributions of peritoneal dialysis effluent derived HPMC(PDE-HPMC) were obtained, indicating that transepithelial resistance of those cells are different. According to these results a strategy which the normal cells can be separated from the cell populations by percoll density centrifugation method was established.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学

キーワード：腹膜透析 腹膜中皮細胞 再生医療 細胞分離 細胞老化

1. 研究開始当初の背景

【腎臓と腎不全】

腎臓は代謝老廃物の排泄、水分量や酸塩基の調整、造血ホルモンの合成など様々な機能を持っている。慢性腎炎や糖尿病などの疾病により腎臓機能が10%以下に低下すると、排泄すべきものが体内に蓄積し、死に至る。従って、生命を維持するため腎移植や透析療法が必要となる。

【腎機能の代替】

透析療法は血液透析と腹膜透析に分けられる。腹膜透析(Peritoneal Dialysis: PD)とは腹腔に挿入したカテーテルを介し、約2Lの透析液を腹腔に注入し、腹膜を介して、体内に蓄積した水、老廃物を取り除く治療方法である。一回に約6時間貯留し、排液と注液を一日に4回程度繰り返す。

【腹膜透析排液】

本邦の腹膜透析患者数は2012年12月現在で9,510人であり、慢性透析患者数の3.1%と非常に少ないが、腹膜透析排液の資源化の観点からみると決して少ない数ではない。1回2リットルの排液が1日4回計8リットル、1年に換算すると患者一人当たり約3000リットルにもなる。1リットルの排液から約50万個の細胞成分が得られ、その約3.5%が培養フラスコに接着可能な脱落した腹膜中皮細胞である(東、堀内ら、日本医工学治療学会誌、2011)。

2. 研究の目的

マクロファージを中心とする腹膜透析液排液中の細胞群から分離可能な有用細胞は腹膜中皮細胞とその前駆細胞である。この中には正常中皮細胞と形質変換した中皮細胞が混在しており、それらの細胞の1)分離、2)再生、3)増殖、4)保存技術の確立を目指す。これにより、後年腹膜劣化時の自己細胞移植用の細胞源に資することが可能となる。中皮前駆細胞、さらには体性幹細胞も

数桁低い存在確率であるが自己の再生医療用の細胞源として資源化を試みる。

3. 研究の方法

大きく分けると、排液採取、細胞分離、細胞のキャラクタリゼーションである。排液採取は本学医学部附属病院血液浄化療法部(分担:石川英二講師)において腹膜透析を受けている末期腎不全患者から三重大学倫理委員会の承認の下、定期的に腹膜透析排液を採取した。既に、ポリスチレン系細胞培養材料への接着細胞の分離とキャラクタリゼーションは進んでおり、非腹膜透析排液由来細胞(大網由来)と形態が同じでも性質が異なることを確認している。従って、本研究の重点実験項目は腹膜排液由来の細胞群から異常細胞の分離である。

(1) 腹膜透析排液由来の細胞(PDE-HPMC)の分離とキャラクタリゼーション

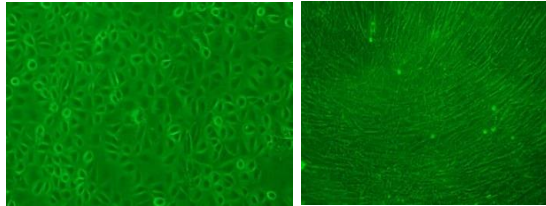
第一に腹膜透析排液由来の接着細胞のキャラクタリゼーションを行い、異常発現タンパクの同定を行った。以前よりデータとして積み上げている、老化指標SA- β -Gal、抗酸化指標DCFHなどの他、細胞抽出タンパクの二次元電気泳動から特定スポットを見つけ、その質量分析から未知の細胞分離マーカーを見つけることを試みた。細胞分離は密度勾配法を用いたが、その分離の成否は再度、細胞のキャラクタリゼーションを行うことで判定した。

① PDE-HPMCの分離および培養

三重大学医学部附属病院にて治療中の腹膜透析患者24名(男性19名、女性5名)の透析排液を用いて本研究を行った。年齢は平均68(35-86)歳で透析期間の平均は34(1-89)ヶ月であり、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。

②PDE-HPMC の形態の分類

プラスチックシャーレに接着後、増殖し、コンフルエントになった細胞の形態は典型的な上皮細胞の形態である玉石状と形質変換した紡錘状の細胞を含む混合型であった。



(A)玉石状形態 (B) 紡錘状形態

約88%は非腹膜透析患者の大網から分離した腹膜中皮細胞のような玉石状の形態を示したが、患者間での差は大きく腹膜透析による細胞応答が異なることが認識された。

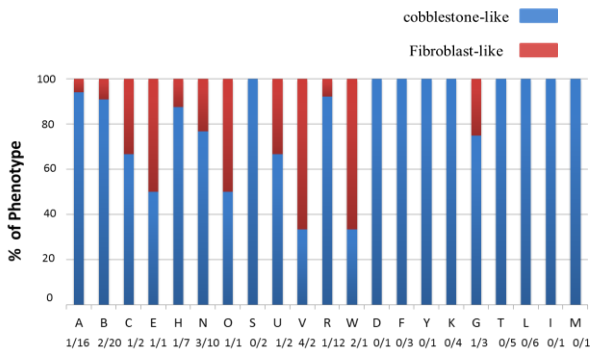


図1 患者ごとの細胞形態

③免疫蛍光染色による PDE-HPMC の Cytokeratin-18 タンパク発現

細胞培養プレートに接着した細胞の約97%はCK-18陽性であった。

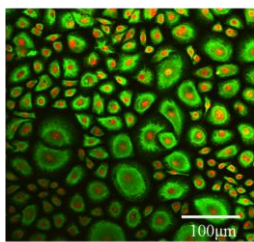


図2 CK18の免疫蛍光染色像

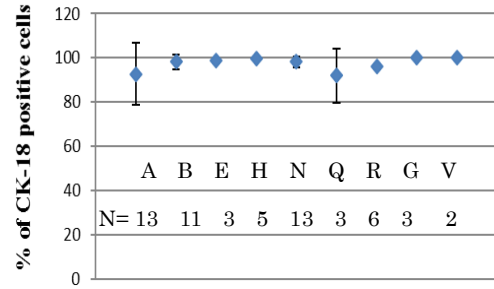


図3 患者別 Cytokeratin-18 タンパク発現

④PDE-HPMC の細胞内 ROS の測定

蛍光プローブ(DCFH-DA: 2', 7'-Dichloro dihydrofluorescein diacetate)を用いて、細胞内の ROS 生成状態を観察した。DCFH-DA は細胞膜を通過し細胞内に存在する酵素のエステラーゼによって DCFH へと脱アセチル化される。DCFH は ROS により速やかに酸化され蛍光物質の DCF を合成する。

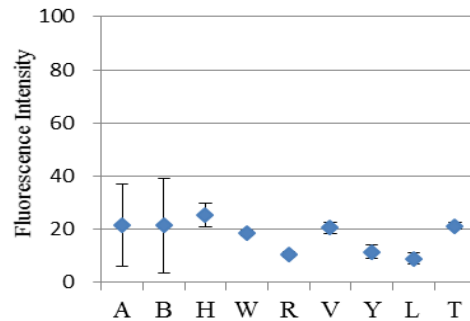


図4 患者別の抗酸化能測定

⑤膜間電気抵抗(TER)測定

細胞間結合力を測定する方法として細胞間に電気を流し、その抵抗値によって評価した。電圧検知用±20µA の交流矩形波電流を12.5Hz の低周波で流し、膜間の電圧を測定することでオームの法則より抵抗値を算出した。

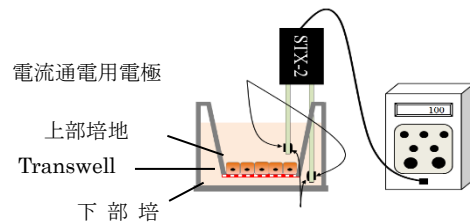


図5 膜間電気抵抗測定の概略図

PDE-HPMCのTER値はOM-HPMCとMSC(間葉系幹細胞)の中間の値をとることが示された。

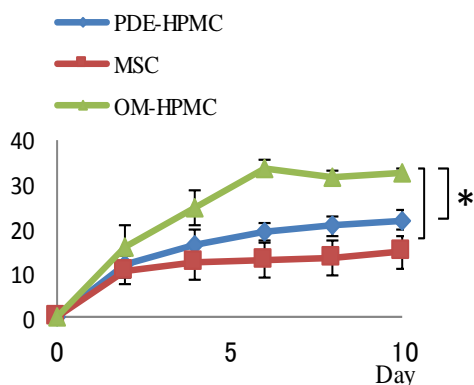


図6 TERの測定結果

⑥PDE-HPMCの細胞老化測定

老化細胞のpH 6.0におけるβ-Galactosidase活性の増加を利用し、それ反応する基質のX-Galを加え、X-Galの加水分解を触媒し、青色に呈色することで老化細胞の検出を行った。

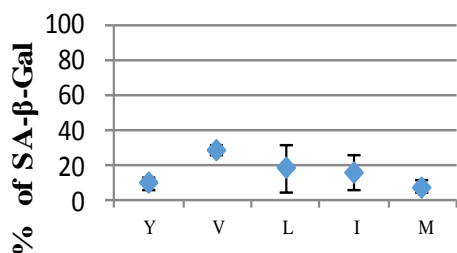


図7 患者別 SA-β-Gal 染色率

⑦二次元電気泳動

個々の患者が持つたんぱく質をpIと分子量の違いによって分離し、同定を行う。我々は透析期間の違いによる発現たんぱく質の相違を確認するために用いた。同定にはMALDI-TOF-MSを使用した。(誌面の都合でデータは割愛した)

(2) Percoll 密度勾配遠心分離による細胞分離

①密度溶液の調製、密度勾配の作成

Percoll原液を1.5M NaCl溶液で9:1混合しPercollストック溶液を作成し、その後、0.15M NaCl溶液で目的密度の溶液を作成した。各密度溶液を1mlずつ15ml遠心管に重層し、その

上に細胞懸濁液を播種し、遠心分離(2260rpm/10min)を行い、細胞数、細胞老化(SA-β-Gal)、抗酸化能(DCFH)を行った。

② PDE-HPMCの細胞密度分布

細胞のキャラクタリゼーションが異なる三名の患者細胞を用いた。患者別に細胞密度分布が異なることが見られた。

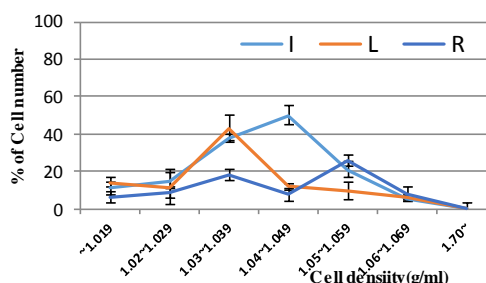


図8 患者別の細胞密度分布

③各分画の細胞形態と面積

密度が低い分画(~1.03g/ml)では、多くの肥大化した細胞が含まれ、密度が重い分画(1.05~1.07g/ml)ではきれいな玉石状の細胞が多く含まれることが確認された。また、細胞面積も、密度が重くなるほど細胞面積が小さくなる傾向が見られた。

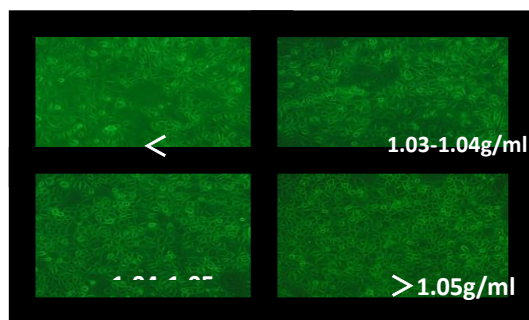


図9 密度勾配遠心分離後の細胞形態

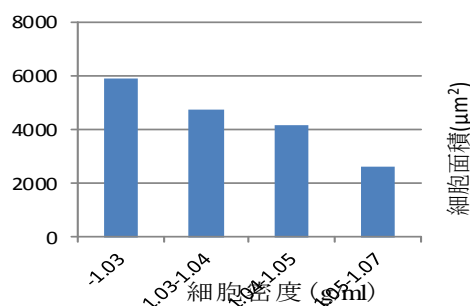


図10 Percoll 密度勾配遠心分離後の細胞面積

(4) 各分画の SA-β-Gal 染色

Percoll 密度勾配遠心分離した後に、各分画の SA-β-Gal 染色を行った。以下は三名の患者をまとめた結果となる。三名の患者と共に密度別に細胞老化の割合が異なって、また細胞密度が重くなるほど細胞の老化の割合が低くなる傾向が示された。

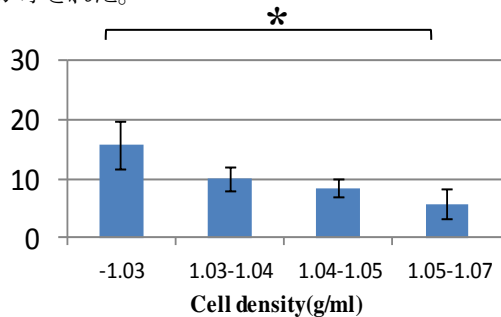


図11 Percoll 密度勾配遠心分離後の SA-β-Gal 染色(密度別)

(5) Percoll 密度勾配遠心分離後の DCFH 測定

Percoll 密度勾配遠心分離した後に、四つの分画 (~1.03g/ml、1.03~1.04g/ml、1.04~1.05g/ml、1.05~1.07g/ml)の過酸化水素による DCF 感受性-細胞内 ROS 測定を行った。患者間では同じ傾向が見られ、細胞密度分画ごとに蛍光強度が異なり、密度が低い分画 (~1.03g/ml)と重い分画(1.05~1.07g/ml)と蛍光強度が有意に異なることが示された。

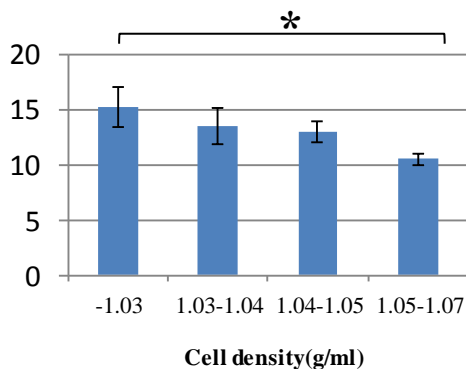


図12 Percoll 密度勾配遠心分離後の抗酸化測定

研究の総括

腹膜中皮細胞の基質接着性を利用すると、白血球や赤血球のような浮遊細胞を容易に除外でき、腹膜透析排液中に含まれる細胞群から接着細胞を約3%の存在確率で分離できた。この接着細胞の約97%が中皮細胞マーカーサイトケラチン18 (CK-18) 陽性であり、CK-18 陽性細胞の約88%が典型的腹膜中皮細胞の有する玉石状の形態であることが明らかとなった。しかし、percol 密度勾配遠心法で分画すると、これらの CK-18 陽性細胞群は 1.03~1.07g/ml の密度範囲で分布を持ち、その密度分布プロファイルは患者特異的であることが明らかとなった。高密度細胞群(密度 1.05g/ml 以上)は低密度細胞群(密度 1.03g/ml 以下)に比べ、細胞が小さく、低い細胞老化率、高い抗酸化能を示していることが示された。これらの性質は、患者に依存せず、密度依存的であることが示され、高密度細胞群を精査することで、再生医療に利用できる細胞群の確保が可能であることが明らかとなった。

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4件)

- 1.Y.Higashi, K.Abe, T.Kuzumoto, T.Hara, K.Miyamoto, T.Murata, E.Ishikawa, S.Nomura, T.Horiuchi. Characterization of peritoneal dialysis effluent-derived cells: Diagnosis of peritoneal integrity, J Artif Organs16(1):74-82, 2013 (査読あり)
- 2.阿部功児、葛本智淳、原拓也、叢秀娜、宮本啓一、村田智博、石川英二、野村信介、堀内孝 腹膜透析排液由来細胞の抗酸化能と老化、腹膜透析 p.178-180、2013。(査読なし)
- 3.原拓也、阿部功児、葛本智淳、叢秀娜、宮本啓一、村田智博、石川英二、野村信介、堀内孝 腹膜透析排液由来細胞の細胞間結

合、腹膜透析 p. 181-182、2013. (査読なし)
4.東 洋、阿部功児、宮本啓一、堀内孝. 不完全な細胞間結合と腹膜の再生、医工学治療 12:36-40、2013. (査読なし)

[学会発表] (計7件)

- 1.Abe K, Miyamoto K, Horiuchi T, et al: Anti-oxidative potential and cell senescence of peritoneal dialysis effluent derived cells. 2nd International Symposium for Sustainability by Engineering at MIU, Tsu, Mie, Nov.1-2, 2012.
- 2.阿部功児、宮本啓一、堀内孝、その他：腹膜透析排液由来細胞の抗酸化能と老化、第18回腹膜透析医学会学術集会・総会、徳島、2012年9月23日.
- 3.阿部功児、宮本啓一、堀内孝、その他：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、名古屋、2012年11月4日.
- 4.阿部功児、宮本啓一、堀内孝、その他：腹膜透析排液由来細胞の抗酸化能と老化、第50回日本人工臓器学会大会、福岡、2012年11月23-25日.
- 5.Hara T, Miyamoto K, Horiuchi T, et al: Intercellular Junction of Peritoneal Dialysis Effluent derived cells. 2nd International Symposium for Sustainability by Engineering at MIU, Tsu, Mie, Nov.1-2, 2012.
- 5.原拓也、宮本啓一、堀内孝、その他：腹膜透析排液由来細胞の細胞間結合、第18回腹膜透析医学会学術集会・総会、徳島、2012年9月23日.
- 6.原拓也、宮本啓一、堀内孝、その他：腹膜透析排液由来細胞を用いた腹膜診断への応用、第28回ライフサポート学会、名古屋、2012年11月4日.

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

堀内 孝 (Horiuchi, Takashi)
三重大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号：10201758

(2)研究分担者

宮本啓一 (Miyamoto, Keiichi)
三重大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号：70252343

野村信介 (Nomura, Shinsuke)
三重大学・医学部附属病院・客員教授
研究者番号：20198625

石川英二 (Ishikawa, Eiji)
三重大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：10362352

村田智博 (Murata, Tomohiro)
三重大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：90508532