

腹膜機能低下および腹膜硬化進展機序に関する研究

—腹膜中皮細胞と AGEs の関連—

(平成十年度日本透析医学会研究助成報告書)

頼岡徳在* 西田陽司* 邵金昌* 辰川自光** 原田 知** 土谷晋一郎**

要 約

今回われわれは腹膜組織に蓄積する Advanced glycation end products (AGEs) が CAPD 患者の腹膜機能低下の一因であるという仮説に基づき、AGEs 刺激に対する培養ヒト腹膜中皮細胞 (HPMC) の viability の変化および HPMC からの細胞外基質, cytokine の産生について検討した。その結果、AGEs による 6, 48 時間刺激後の培養 HPMC において、AGEs 濃度依存性に viability の低下が認められた。さらに 48 時間刺激後の HPMC 培養上清中 type I-C procollagen, fibronectin, basic-FGF の濃度は、刺激した AGEs 濃度依存性に有意な上昇を示した。以上より、AGEs は腹膜中皮細胞の viability を低下させ、細胞外基質および basic-FGF などを産生させることにより腹膜硬化を誘導すると考えられた。

はじめに

長期 CAPD 患者の問題点の一つとして、腹膜機能低下があげられる。その原因として頻回の腹膜炎、高糖濃度および低 pH 透析液の長期使用が考えられているが¹⁾、未だその詳細は解明されていない。ところで腹膜機能維持において腹膜中皮細胞は重要な役割を担っており、CAPD 患者の腹膜硬化の中期から後期においては腹膜組織から腹膜中皮細胞が剥離・消失し、結合組織層の fibrin 析出、浮腫がみられ、腹膜機能が低下することが報告されている²⁾。

Advanced glycation end products (AGEs) は、非酵素的糖化蛋白であり、老化との関連が論じられて

いる³⁾。さらには、糖尿病における動脈硬化促進因子、および糖尿病性腎症における糸球体硬化の原因の一つと考えられ、病態生理学的意義が注目されている⁴⁾。また近年、CAPD 患者の腹膜組織において血管壁を中心に結合組織、中皮細胞下層に AGEs の沈着が証明されている⁵⁾。以上より、AGEs は限外濾過などの腹膜機能保持に重要な役割を有する腹膜中皮細胞に対しても重大な影響を及ぼすと考えられるが、未だ腹膜中皮細胞に対する AGEs の影響についての報告はみられない。

そこで今回われわれは、腹膜組織に蓄積する AGEs が CAPD 患者における腹膜機能低下の原因の一つであるという仮説に基づき、ヒト腹膜中皮細胞 (HPMC) の AGEs 刺激に対する viability の変化について検討した。さらに、AGEs 刺激に対する HPMC からの細胞外基質、cytokine の産生を検討した。

1 方 法

1) AGEs の調整

AGEs は bovine serum albumin (BSA) 4.0 g に 50 mM glucose-6 phosphate, 1.5 mM phenylmethanesulfonyl fluoride, 0.5 mM EDTA を加え 37°C にて 16 週間インキュベーションし作成した。作成した AGEs は、SDS-PAGE より BSA の分子量サイズ (66.4 Kda) 以上の高分子サイズにバンドとして検出された。また AGEs polyclonal antibody および carboxymethyl lysine (CML) monoclonal antibody を用いた ELISA による測定において強い反応

が認められた。以上のようにわれわれが作成した AGEs は, CML を主にエピトープとして有することが確認できたが, CML 以外の成分を有することも示唆された。

2) HPMC の調整

腹部手術時に取り出したヒト大網から HPMC を単離し, 10% FCS 含有 Ham's F-12 培地にて培養した。3 継代目の pure HPMC を 1% FCS 含有 Ham's F-12 培地にて 24 時間培養し細胞を静止期に近づけた。その後, 各種濃度 AGEs (0, 3.0, 14.5, 30, 145, 725 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を添加刺激し, 6 時間後, 48 時間後における HPMC の細胞増殖態度を ^3H -TdR 取り込み法にて検討した。さらに 48 時間後における細胞培養上清中の細胞外基質成分 (type I-C procollagen, fibronectin, type IV collagen) および basic FGF, TGF- β の蛋白濃度を ELISA 法にて測定した。

2 結果

1) AGEs 刺激培養後の HPMC viability

AGEs による 6 時間刺激後の培養 HPMC の viability は, AGEs 濃度 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に比し, AGEs 濃度 145 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の刺激において有意に低下が認められた。また, AGEs による 48 時間刺激後の培養 HPMC の viability は, AGEs 濃度依存性に 6 時間後よりさら

に強い低下が認められた (図 1)。

2) HPMC 培養上清中の細胞外基質成分および成長因子濃度

培養 48 時間後の type I-C procollagen の培養上清中濃度は, AGEs 濃度 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上で有意な上昇を示した (図 2)。Fibronectin の培養上清中濃度は, AGEs 濃度依存性に有意な上昇がみられた (図 3)。さらに培養 48 時間後 basic-FGF 濃度は, AGEs 濃度依存性に有意な上昇を示した (図 4)。

なお, type IV collagen および TGF- β 濃度については有意な上昇はみられなかった。

3 考察

CAPD 患者は透析液からブドウ糖が吸収されることにより脂質代謝異常など様々な代謝異常を来しやすと考えられている⁶⁾。その上酸化ストレスも受けており⁷⁾, AGEs が産生されやすい状態であることが予測される。さらに腎排泄機能の荒廃により血液中 AGEs 濃度が健常人と比較して高値を示すことが報告されている⁸⁾。また CAPD 開始から 3 カ月を経過すれば腹膜組織に AGEs の沈着が認められることが報告されている。その部位は血管壁が最も強く, その他結合組織, 腹膜中皮層下などにも沈着が認められている⁹⁾。さらに PD 排液中からも AGEs が確認され

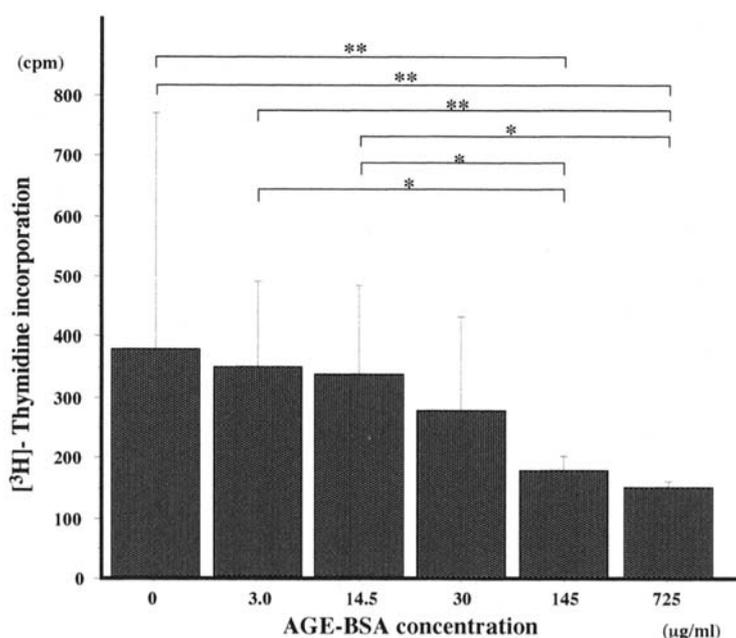


図 1 各種 AGEs 濃度における 48 時間刺激後の HPMC viability

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (one way ANOVA)

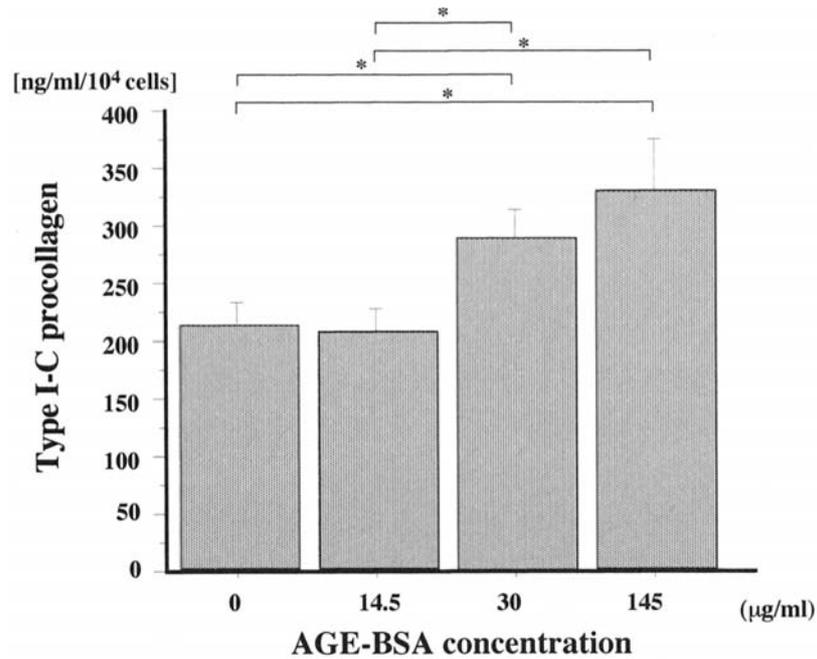


図2 各種 AGEs 濃度における 48 時間刺激後の HPMC 培養上清中 type I-C procollagen 濃度
* $p < 0.001$ (one way ANOVA)

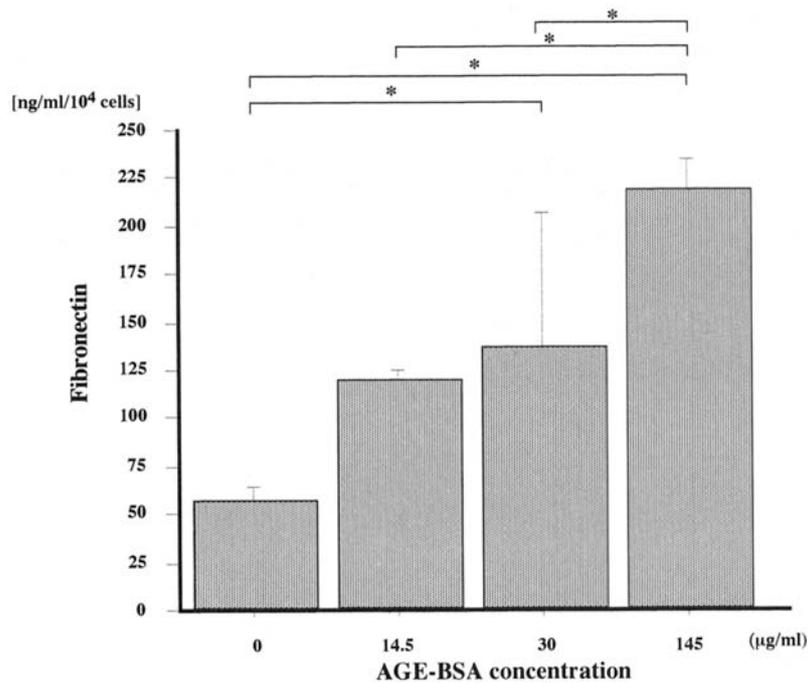


図3 各種 AGEs 濃度における 48 時間刺激後の HPMC 培養上清中 Fibronectin 濃度
* $p < 0.001$ (one way ANOVA)

ている¹⁰⁾ ことより, AGEs が血液中から腹腔内に漏出する際に腹膜組織に trap される可能性に加えて透析液中ブドウ糖の連続的接触により腹膜組織蛋白が糖化された可能性がある。以上より, CAPD 患者の腹膜組織には AGEs が沈着・蓄積しやすい状態にあることが推測される。中でも腹膜中皮細胞は PD 液による AGEs との接触の機会が最も多く, 影響を受けや

すいと考えられる。

今回のわれわれの成績から AGEs 刺激により腹膜中皮細胞は, 細胞外基質成分や他の cytokine を産生することが明らかとなった。腹膜中皮細胞は, 高糖濃度刺激および TGF- β によっても細胞外基質を分泌することが証明されており¹¹⁾, 腹膜硬化との関与が示唆されている。さらに腹膜炎を起こすことにより TNF-

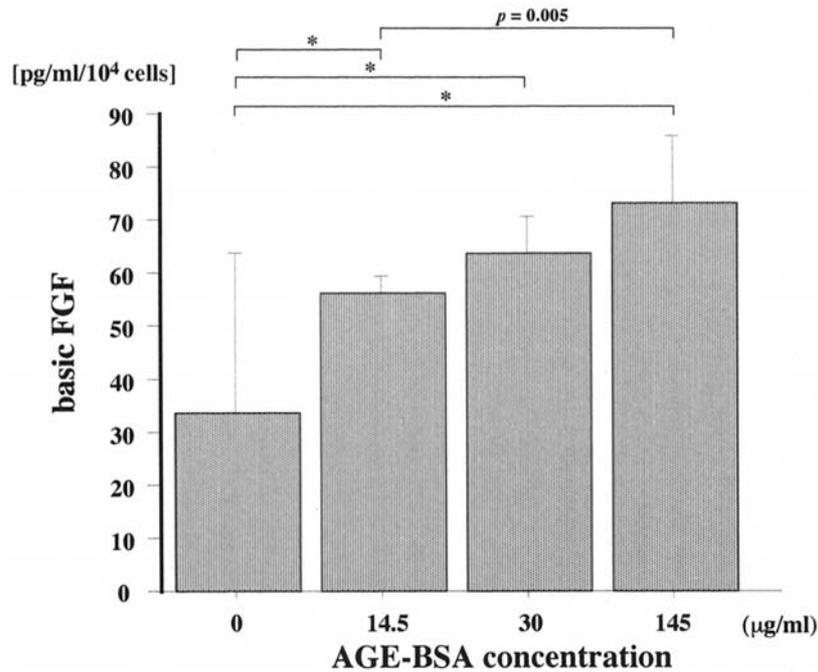


図4 各種 AGEs 濃度における 48 時間刺激後の HPMC 培養上清中 basic FGF 濃度
* $p < 0.001$ (one way ANOVA)

α , IL-1 β , IL-6 など炎症性 cytokine が腹腔内, 血液中内に誘導され, それらを介し腹膜硬化へと進展していく可能性も報告されている^{12, 13}). なお腹膜中皮細胞は糖濃度依存性に TGF- β mRNA を発現することが報告されている¹⁴) が, 今回の成績では, AGE 刺激による腹膜中皮細胞からの TGF- β 産生はみられなかった。

以上より, CAPD における腹膜線維化初期においては, AGEs 刺激により腹膜中皮細胞から分泌された fibronectin, type I, III, IV collagen など細胞外基質の増生や, b-FGF による線維芽細胞の増生により, 腹膜の線維性組織変化が生じてくると推測される。さらに線維化中期から腹膜硬化性変化の時期になれば, AGEs により腹膜中皮細胞は障害され, 基底膜から剥離・消失する。その後, 腹膜中皮細胞から産生された b-FGF や他の成長因子により結合組織に増生されていた線維芽細胞が AGEs によりさらに刺激を受け, 各種 mediator を分泌し, autocrine, paracrine にて細胞外基質を大量産生し, 腹膜組織の硬化性変化へと進展していくことが推測される。この間, もし腹膜炎を合併すれば, TNF- α , IL-1 β , MCP-1 など炎症性 cytokine の影響により線維芽細胞から細胞外基質がさらに多く産生され, 腹膜硬化進展にさらに拍車がかかると考えられる。

今後は腹膜中皮細胞と線維芽細胞との相互作用を検討していくことが必要と思われる。

結 語

AGEs は腹膜中皮細胞の viability を低下させ, 細胞外基質や basic-FGF などの成長因子を産生させることにより CAPD の腹膜硬化初期において腹膜硬化へと誘導させる物質と考えられ, 腹膜機能に悪影響を及ぼすものと考えられる。

文 献

- 1) Breborowicz A, Rodela H, Karoń J, et al: In vitro simulation of the effect of peritoneal dialysis solution on mesothelial cells. *Am J Kidney Dis*, 29; 404, 1997.
- 2) Dobbie JW, Lloyd JK, Gall CA: Categorization of ultrastructural changes in peritoneal mesothelium, stroma and blood vessels in uremia and CAPD patients. *Adv Perit Dial*, 6; 3, 1990.
- 3) Vlassara H, Bucala R, Striker L: Pathogenic effects of advanced glycosylation: biochemical, biologic, and clinical implications for diabetes and aging. *Lab Invest*, 70; 138, 1994.
- 4) Bucala R, Vlassara H: Advanced glycosylation end products in diabetic renal and vascular disease. *Am J Kidney Dis*, 26; 875, 1995.
- 5) Nakayama M, Kawaguchi Y, Yamada K, et al: Immunohistochemical detection of advanced glycosylation end-products in the peritoneum and its possible

- pathophysiological role in CAPD. *Kidney Int*, 51; 182, 1997.
- 6) Wheeler DC: Abnormalities of lipoprotein metabolism in CAPD patients. *Kidney Int*, 50 (suppl 56); s41, 1996.
- 7) Miyata T, Wada Y, Cai Z, et al: Implication of an increased oxidative stress in the formation of advanced glycation end products in patients with end-stage renal failure. *Kidney Int*, 51; 1170, 1997.
- 8) Degenhardt TP, Grass L, Reddy S, et al: The serum concentration of the advanced glycation end-product N-(carboxymethyl) lysine is increased in uremia. *Kidney Int*, 52; 1064, 1997.
- 9) Yamada K, Miyahara Y, Hamaguchi K, et al: Immunohistochemical study of human advanced glycosylation end-products (AGE) in chronic renal failure. *Clin Nephrol*, 42; 354, 1994.
- 10) Lamb E, Cattell WR, Dawnay A: Glycated albumin in serum and dialysate of patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Clin Sci*, 84; 619, 1993.
- 11) Kumano K, Shimoda M, Hyodo T, et al: The role of TGF- β in growth inhibition of peritoneal mesothelial cells in high-glucose dialysate. *Perit Dial Int*, 15 (suppl); s93, 1995.
- 12) Holmes CJ: CAPD-associated peritonitis: An immunological perspective on causes and intervention. *Contrib Nephrol*, 86; 73, 1990.
- 13) Topley N, Machenzie R, Jorres A, et al: Cytokine networks in continuous ambulatory peritoneal dialysis: Interactions of resident cells during inflammation in the peritoneal cavity. *Perit Dial Int*, 13 (suppl 2); s282, 1992.
- 14) Wang T, Chen YG, Ye RG, et al: Effect of glucose on TGF- β 1 expression in peritoneal mesothelial cells. *Adv Perit Dial*, 11; 7, 1995.