

ヒト腹膜中皮細胞の細胞外基質産生および細胞増殖に対する angiotensin II の影響について

桐林 慶* 頼岡徳在* 辰川自光**

* 広島大学大学院 医歯薬学総合研究科 病態制御医科学講座 ** 広島県透析連絡協議会

key words : ヒト腹膜中皮細胞, アンジオテンシン II, 細胞外基質, 細胞増殖

要 旨

CAPD 患者の腹膜線維症の発症, 進展における renin-angiotensin 系の役割を明らかにするため, 培養ヒト腹膜中皮細胞 (HPMC) の細胞外基質産生および細胞増殖に対する angiotensin II (Ang II) の影響について検討した. RT-PCR 法と Western blotting 法にて, HPMC に Ang II type 1 受容体の mRNA および蛋白の発現を認めた. real time-PCR 法では, Ang II 刺激 (10 nM) によって fibronectin mRNA は経時的に発現亢進し, 6 時間において control 群に比し 1.7 倍となった. ELISA 法では, Ang II 刺激 (10 nM) によって培養上清中 fibronectin 蛋白は経時的に分泌亢進を認め, 24 時間後において control 群に比し 1.5 倍となった. WST-1 法および ³H-thymidine incorporation 法では, Ang II 刺激 (10 nM) の 24 時間後において有意な細胞増殖能の亢進を認めた (それぞれ control 群に比し 1.2 倍, 1.6 倍). 以上より, CAPD 患者の腹膜線維症の発症, 進展機序の一つとして Ang II の関与が示唆された.

はじめに

CAPD が末期腎不全の腎代替療法として広く施行されるようになって 20 年以上が経過したが, 腹膜線維化による腹膜機能低下は今なお重要な問題である.

腹膜線維化に關与する病態として, 非生理的組成を持つ透析液の継続的な暴露¹⁾, 重症または再発性の感染性腹膜炎の既往²⁾が指摘されている. 病理組織学的にはヒト腹膜中皮細胞 (HPMC) 直下から線維化が生じてくること³⁾, また *in vitro* において HPMC が炎症性サイトカインの分泌能⁴⁾および細胞外基質 (ECM) の産生能を持つこと⁵⁾などから, HPMC がその発症, 進展において重要な役割を担っていると考えられている. しかし, その詳細な機序については未だ明らかにされていない.

一方, angiotensin II (Ang II) は強力な昇圧効果を持つ生理活性ペプチドとして古くから知られていたが, 近年では Ang II 受容体のサブタイプ (type 1, type 2) が同定され, 組織固有性に存在する renin-angiotensin 系 (RAS) を介して, ECM の産生⁶⁾, 細胞増殖⁷⁾, アポトーシス⁸⁾に關与するなど, 種々の細胞において様々な生理活性を持つことで再注目されている.

CAPD 患者の腹膜線維症と RAS の関連性を示す *in vivo* の研究には, angiotensin 変換酵素阻害薬 (ACEI) である enalapril がラットの PD モデルにおいて高濃度ブドウ糖による腹膜線維化を抑制したという報告⁹⁾, 同じく quinapril がマウスの被嚢性腹膜硬化症 (EPS) モデルにおいて有効であったとの報告¹⁰⁾, ラットの EPS モデルにおいて Ang II 受容体拮抗薬

(ARB)である olmesartan が有効であったとの報告¹¹⁾があるが、いずれも腹膜線維症に対する Ang II の直接関与についての言及は無く、これまで HPMC における Ang II 受容体の発現の有無、Ang II 刺激が HPMC に及ぼす影響について示す研究論文は無い。

本研究に先立ち、広島大学病院腎臓内科において PD 排液中 Ang II 濃度を測定したところ、腹膜炎発症時では平常時（8時間貯留後の排液）の30倍以上の高濃度（ 11.6 ± 2.8 pg/mL, $n=5 \rightarrow 352.4 \pm 85.5$ pg/mL, $n=5$ ）であった。そこでわれわれは、腹膜線維症の発症、進展機序における Ang II の関与について明らかにすることを目的とし、腹膜線維症に関連した培養 HPMC の細胞動態における異常として ECM 産生亢進を伴う細胞増殖が指摘されている¹²⁾ことを踏まえ、①HPMC に Ang II 受容体が存在するか、②Ang II 刺激で fibronectin の mRNA 発現および蛋白分泌が亢進するか、③Ang II 刺激で HPMC の細胞増殖能が亢進するかについて検討した。

1 方法

HPMC の単離は、転移や腹膜炎のない胃癌手術患者の大網から Stylianou ら¹³⁾の方法に従って行った。得られた HPMC はそれぞれサイトケラチン、ビメンチン、第 VIII 因子で免疫染色を行い、ほかの細胞の混入がないことを確認し、10% fetal calf serum (FCS) 添加培養液にて培養した2~3継代目の細胞を実験に使用した。なお、検体の採取にあたっては、広島大学大学院医歯薬学総合研究科倫理委員会の承認を得、事前に患者にインフォームドコンセントを行い、書面による承諾を得た。

1) HPMC における Ang II type 1 受容体の存在
HPMC における Ang II type 1 受容体の存在については、mRNA の発現を reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法で、蛋白の発現を Western blotting 法で確認した。

① RT-PCR 法

3×10^5 個の HPMC を 60 mm dish で培養し、subconfluent になったところで total RNA を Chomczynski ら¹⁴⁾の方法で抽出、定量した後、 $2 \mu\text{g}$ を ReverTra Ace (Toyobo) で逆転写し、得られた cDNA を鋳型として、primer を sense 5'-CTGAAT

AACTCACTGATGCC-3', antisense 5'-TAGGTAA TTGCCAAAGGGCC-3' とし、サーマルサイクラー PC-800 (Astec) を用いて 40 cycle の PCR を行った。PCR 産物は 1.5% アガロースゲルで電気泳動し、ethidium bromide で発色した。

② Western blotting 法

1×10^6 個の HPMC を T 75 flask で培養し、subconfluent になったところで PBS (-) による洗浄を行い、0.5 mL の RIPA buffer (cell signaling technology) を用いて cell lysate とし、BCA protein assay (Pierce) にて蛋白定量および濃度調節を行った後、Sample buffer, Laemmli (SIGMA) にて SDS 化した。10% SDS-PAGE にて $15 \mu\text{g}$ total protein/lane で電気泳動し、PVDF 膜 (Millipore) に転写した後、100% BLOCKACE (Dainippon Seiyaku) でブロッキングし、一次抗体に Ang II type 1 receptor rabbit polyclonal antibody (Santa cruz)、二次抗体に donkey anti rabbit antibody HRP labeled (Amersham Biosciences) を用いて、ECL kit (Amersham Biosciences) でバンドを検出した。positive control としてヒト臍静脈血管内皮細胞 (HUVEC) から同様に得られた cell lysate を用いた¹⁵⁾。

2) テスト培養液の調整

テスト培養液は 0.1% FCS 添加 Medium 199 (Invitrogen Life Technologies) を各種 Ang II 濃度 (0.1~1000 nM) に調整し、4°C 保存にて 24 時間以内に使用した。

3) realtime-PCR 法による fibronectin mRNA 発現の定量

3×10^5 個の HPMC を 60 mm dish で培養し、subconfluent になったところで培養液を 0.1% FCS 含有 Medium 199 とし、48 時間の培養にて growth arrest し、confluent であることを確認した後、各種 Ang II 濃度 (0.1~1,000 nM) のテスト培養液で培養した。Ang II 刺激開始 6 時間後に 1) と同様の方法で total RNA を抽出し、逆転写反応を行った。得られた cDNA を鋳型とし、Fast Start DNA Master SYBR Green I および Light Cycler quick system 350 S (Roche Diagnostics) を用いて real time-PCR

を施行した。なお、内部標準としては β -actinを用いた。primerは、fibronectin:sense 5'-GCCTGGTACAGAATATGTAGTG-3', antisense 5'-ATCCCAGCTGATCAGTAGGCTGGTG-3', β -actin:sense 5'-GCAAAGACCTGTACGCCAAC-3', antisense 5'-CTAGAAGCATTTGCGGTGGA-3'を用い、Light Cycler Software version 3.01にてfibronectin/ β -actin比を解析した。また、fibronectin mRNA発現量の経時変化については、Ang II刺激(10 nM)の3時間、6時間、12時間、24時間後においてtotal RNAを抽出し、同様にreal time-PCRを施行した。

4) ELISA法による培養上清中fibronectin蛋白の測定

24-well plateに 1×10^5 個/wellのHPMCを培養し、3)と同様にgrowth arrestした後、各種Ang II濃度のテスト培養液で培養した。Ang II刺激開始24時間後に培養上清を回収し、遠心分離した上清のfibronectin濃度をfibronectin, Human ELISA Kit (Biomedical Technologies)を用いて測定した。また、fibronectin蛋白分泌の経時変化については、Ang II刺激(10 nM)直前、12時間、18時間、24時間後において培養上清を回収し、同様に濃度を測定した。なお、ELISAの測定結果は、BCA protein assayにて定量した各wellのcell proteinにて補正し、ng/mg cell proteinにて表記した。

5) Ang II刺激によるHPMC増殖能の変化

96-well plateに 1×10^4 個/wellのHPMCを培養し、3)と同様にgrowth arrestした後、各種Ang II濃度のテスト培養液で培養した。

① WST-1法

各種Ang II濃度のテスト培養液による培養の24時間後におけるHPMCの増殖能を、WST-1 cell counting kit (Dojindo)を用いてplate reader EAR 400 (SLT Lab Instruments)にて吸光度(420 nm)で測定した。

② [3 H]-thymidine incorporation法

各種Ang II濃度のテスト培養液による培養の24時間後における[3 H]-thymidine (Amersham)の取り込みをliquid scintillation counter LSC 5100 (Aloka)によって測定した。

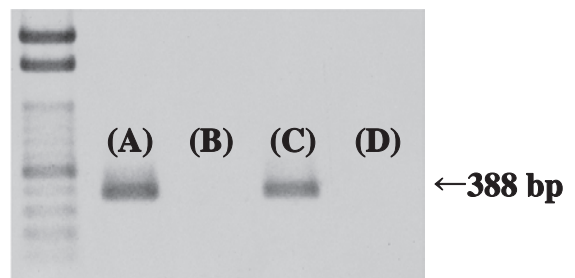
6) 統計解析

結果は3症例各3回の実験におけるmean+SEMで示した。解析にはANOVA (Tukey's post hoc test)を用い、 $p < 0.05$ にて統計的有意とした。

2 結果

RT-PCR法にて、HPMCにAng II type 1受容体のmRNAの発現を認めた(図1)。またWestern blotting法においても、同受容体の蛋白発現を認めた(図2)。

HPMCのfibronectin mRNAの発現量はAng II刺激によって濃度依存性に増加し、10 nMを頂点としてcontrol群(Ang II添加無し)との比較において1.7倍となった(1.70 ± 0.09 rate vs. control, $P < 0.05$) (図3)。また、fibronectin mRNA発現量の経時変化については、Ang II刺激(10 nM)の6時間後からcontrol群に対して有意な発現亢進を認



Cell type HUVEC HPMC
RT (+) (-) (+) (-)

図1 HPMCにおけるangiotensin II type 1受容体mRNAの発現(RT-PCR法)

angiotensin II type 1受容体mRNAの逆転写反応により得られたcDNAを鋳型としたPCR産物を矢印(388 bsp)の位置に認めた。

- (A): HUVEC (陽性 control)
(B): HUVECの陰性 control (逆転写反応無し)
(C): HPMC
(D): HPMCの陰性 control (逆転写反応無し)

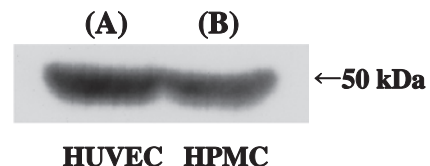


図2 HPMCにおけるangiotensin II type 1受容体蛋白の発現(Western blotting法)

抗ヒトangiotensin II type 1受容体抗体による検索にて、バンドは矢印(50 k Dalton)の位置に認めた。

- (A): HUVEC (陽性 control)
(B): HPMC

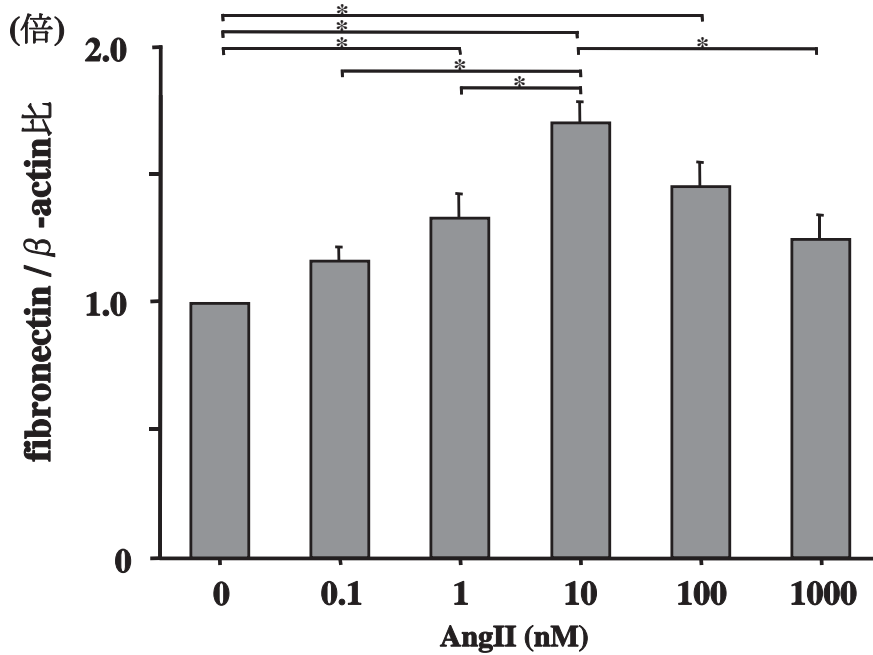


図3 各種濃度 angiotensin II 刺激による 6 時間後の fibronectin mRNA の発現量 (real time PCR 法)

0.1~1,000 nM の angiotensin II 刺激 (6 時間) にて, 10 nM を頂点として angiotensin II 濃度依存性に fibronectin mRNA 発現の亢進を認めた. (* P<0.05)

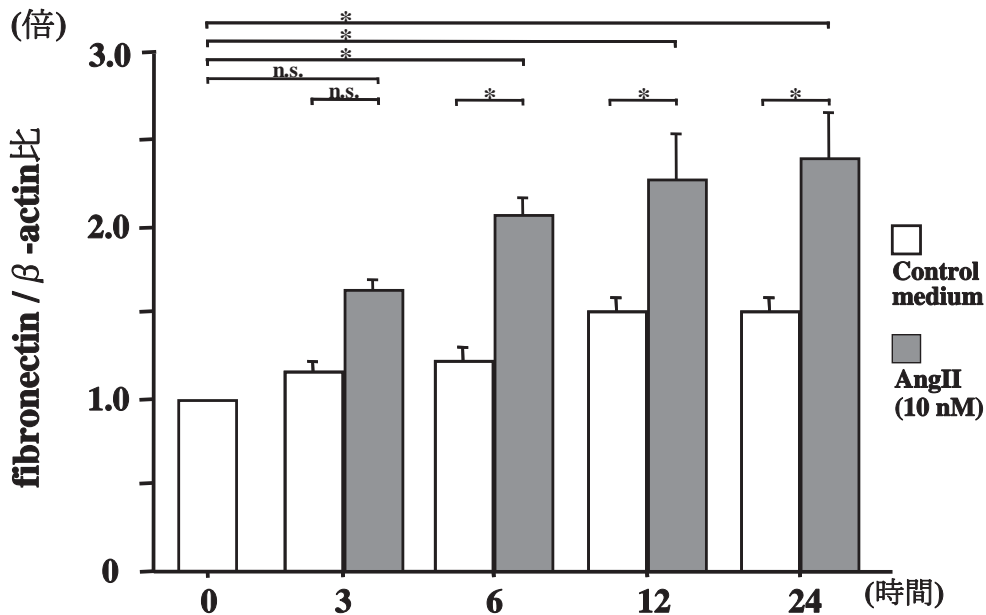


図4 angiotensin II 刺激 (10 nM) による fibronectin mRNA 発現量の経時的変化 (real time PCR 法)
Ang II 刺激 (10 nM) の 6 時間以降において, control 群に比し有意な fibronectin mRNA 発現の亢進を認めた. (* P<0.05)

め, 24 時間後まで有意に発現亢進の持続を認めた (図 4).

Ang II 刺激の 24 時間後における培養上清への fibronectin 蛋白の分泌量は, Ang II 濃度依存性に増加し, 10 nM を頂点として control 群との比較において 1.5 倍となった. (それぞれ 77 ± 5 ng/mg cell pro-

tein, 116 ± 26 ng/mg cell protein, $P < 0.05$) (図 5). また, fibronectin 蛋白分泌の経時的変化については, Ang II 刺激 (10 nM) の 18 時間後以降において control 群に対して有意な分泌亢進を認めた (図 6).

Ang II 刺激の 24 時間後における細胞増殖能は, WST-1 法および [3 H]-thymidine incorporation 法

(ng / mg cell protein)

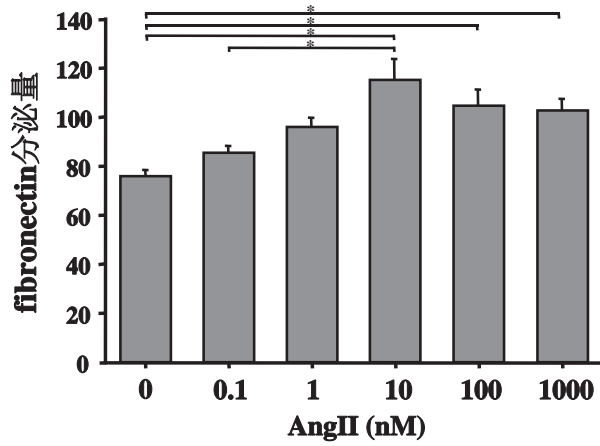


図5 各種濃度 angiotensin II 刺激による 24 時間後の培養上清中 fibronectin 蛋白の分泌量 (ELISA 法)

0.1~1,000 nM の angiotensin II 刺激 (24 時間) にて, 10 nM を頂点として有意な培養上清への fibronectin 蛋白の分泌亢進を認めた. (* P<0.05)

(ng / mg cell protein)

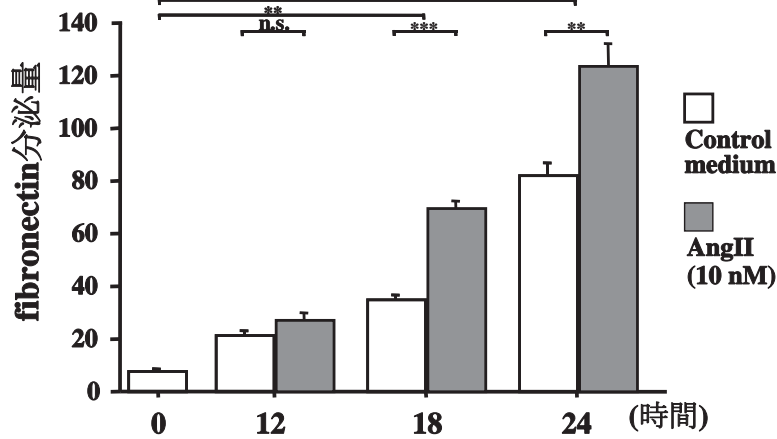


図6 angiotensin II 刺激 (10 nM) による上清中 fibronectin 蛋白分泌の経時的変化 (ELISA 法)

angiotensin II 刺激 (10 nM) の 18 時間以降において, control 群に比し, 培養上清における有意な fibronectin 蛋白の分泌亢進を認めた.

(* * P<0.01, * * * P<0.001)

(吸光度)

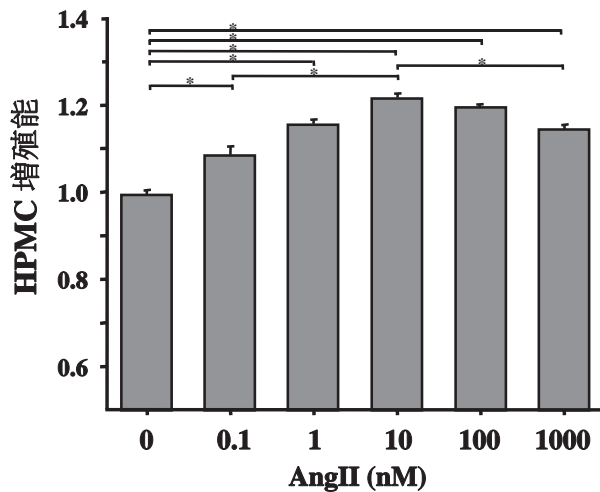


図7 各種濃度 angiotensin II 刺激による 24 時間後の HPMC の増殖能の変化 (WST-1 法)

0.1~1,000 nM の angiotensin II 刺激 (24 時間) にて, 10 nM を頂点として angiotensin II 濃度依存性に HPMC の増殖能亢進を認めた. (* P<0.05)

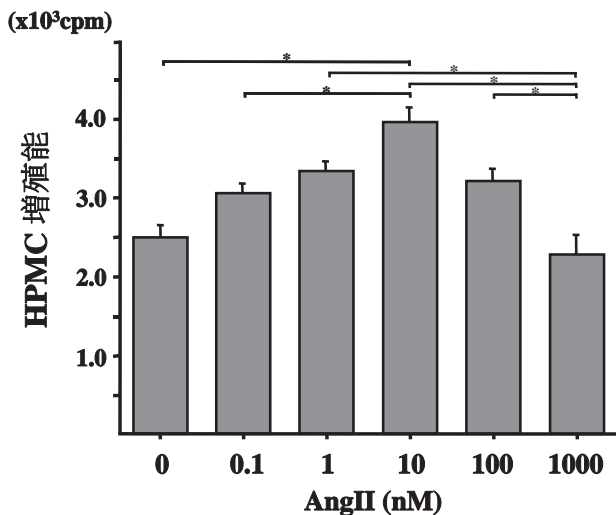


図8 各種濃度 angiotensin II 刺激による 24 時間後の HPMC の増殖能の変化 (^3H -thymidine incorporation 法)
0.1~1,000 nM の angiotensin II 刺激 (24 時間) にて, 10 nM を頂点として有意な HPMC の増殖能亢進を認めた. (* $P < 0.05$)

において Ang II 濃度依存的に増加し, 10 nM を頂点として control 群との比較において, それぞれ 1.22 ± 0.01 倍, 1.58 ± 0.08 倍となった (rate vs. control, $P < 0.05$) (図 7, 8).

3 考察

腹膜線維症の発症, 進展機序を解明するための様々な研究によって, HPMC に対する傷害因子として腹膜透析液中の高濃度ブドウ糖, 高浸透圧, 緩衝剤としての乳酸, 低 pH, 可塑剤, glucose degradation products (GDPs), advanced glycation endproducts (AGEs) などが関与していることがこれまでに明らかとなっている。それらの知見から, 新たな浸透圧物質として icodextrin を, また緩衝剤として重炭酸を用いた透析液が用いられるようになり, さらに GDPs, AGEs 濃度を抑えた中性透析液も臨床応用され, それぞれ一定の成果が得られている。しかし, 心血管系, 腎などの臓器における線維化に Ang II が大きく関与していることが多数報告され¹⁶⁾, ACEI および ARB の有用性が臨床的に証明されている現状^{17, 18)}とは対照的に, 腹膜線維症については Ang II の関与を示す研究論文がほとんど無い。そこでわれわれは腹膜線維化にも Ang II が関与しているという仮説を立て, HPMC に対する Ang II の影響について検討を行った。

まず, 細菌性腹膜炎患者の PD 排液中に 0.1~1 nM

という高濃度の Ang II が存在したことについては, これまで, 生理的条件下にあってヒト好中球 neutral protease がレニンおよび ACE 無しで血漿蛋白から Ang II を生成すること¹⁹⁾, 活性化された好中球の細胞膜表面に発現した cathepsin G が angiotensinogen または angiotensin I から直接 Ang II を産生すること²⁰⁾など, 好中球における Ang II 産生系について多くの報告があるため, 腹膜炎発症時に腹腔内に動員された活性化好中球による局所産生によるものと考えられた。また, 本研究で培養液に用いた Ang II 濃度 (0.1~1,000 nM) については, 腹膜透析液による希釈を考慮した上で, 妥当な濃度範囲と思われた。

これまで, 感染性腹膜炎においては, TGF- β を含む種々のサイトカイン産生の亢進²¹⁾によって ECM の産生亢進⁵⁾, HPMC から筋線維芽細胞への分化促進²²⁾が生じ, 腹膜の線維化が促進されるということがわかっている。それらに加えて, 本研究では Ang II 刺激により HPMC から fibronectin の mRNA 発現量と蛋白の分泌量が濃度依存性に増加すること, また同時に HPMC の細胞増殖能が亢進することを示したが, これらの変化は腹膜炎に伴う腹膜組織の傷害に対する修復の調整と組織のリモデリングに Ang II が関与していることを強く示唆している。感染性腹膜炎に伴う HPMC の傷害に対して, 局所産生された Ang II の作用が組織の修復機転となっていると仮定した場合, 過度あるいは長期に渡る Ang II 刺激によって過剰な ECM 産生および腹膜中皮細胞の分化, 増殖が促進され, その結果として腹膜組織に線維化をもたらしている可能性がある。これは, 腹膜炎を機転とした腹膜線維症の発症における Ang II の関与についての新たな知見であり, RAS を制御することが腹膜線維症の発症予防, 進展防止にとって有益な結果をもたらす可能性があることを示唆する。

また, 本研究によって, HPMC に Ang II type 1 受容体が存在することが示された。胸膜の中皮細胞において Ang II が type 1 受容体を介して細胞増殖能を亢進させること²³⁾, また種々の細胞において Ang II 刺激による ECM 産生亢進が type 1 受容体を介すること^{6, 24)}などから, HPMC においても Ang II 刺激によるそれらの変化が type 1 受容体を介することが推測されるが, この点については今後さらなる検討が必要である。

本研究では外因性に添加した Ang II が及ぼす HPMC への影響を示したが、これは腹腔表面に HPMC が存在している腹膜線維症の初期段階についての *in vitro* な検討であり、HPMC が脱落、消失する後期のモデルとはなりえない。腹膜線維症の後期における Ang II の関与については、異なるアプローチによる研究が必要と思われる。

結 語

本研究では、①HPMC には Ang II type 1 受容体が存在する、②Ang II 刺激により HPMC から fibronectin の mRNA 発現および蛋白分泌が亢進する、③Ang II 刺激により HPMC の増殖能が亢進することを示した。これらの結果は、早期の腹膜線維症における Ang II の関与を示唆しており、RAS を制御することが腹膜線維症の発症予防、進展防止に有益な結果をもたらす可能性があることを示唆する。

文 献

- 1) Nakamoto H, Kawaguchi Y, Suzuki H: Encapsulating peritoneal sclerosis in patients undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis in Japan. *Adv Perit Dial*, 18; 119, 2002.
- 2) Wong TY, Szeto CC, Lai KB, et al.: Longitudinal study of peritoneal membrane function in continuous ambulatory peritoneal dialysis: relationship with peritonitis and fibrosing factors. *Perit Dial Int*, 20; 679, 2000.
- 3) Williams JD, Craig KJ, Topley N, et al.: Morphologic changes in the peritoneal membrane of patients with renal disease. *J Am Soc Nephrol*, 13; 470, 2002.
- 4) Topley N, Williams JD: Role of the peritoneal membrane in the control of inflammation in the peritoneal cavity. *Kidney Int*, 48; S 71, 1994.
- 5) Perfumo F, Altieri P, Degl'Innocenti ML, et al.: Effects of peritoneal effluents on mesothelial cells in culture: cell proliferation and extracellular matrix regulation. *Nephrol Dial Transplant*, 11; 1803, 1996.
- 6) Eto H, Biro S, Miyata M, et al.: Angiotensin II type I receptor participates in extracellular matrix production in the late stage of remodeling after vascular injury. *Cardiovasc Res*, 59; 200, 2003.
- 7) Bouzeghrane F, Thibault G: Is angiotensin II a proliferative factor of cardiac fibroblasts? *Cardiovasc Res*, 53; 304, 2002.
- 8) Suzuki J, Iwai M, Nakagami H, et al.: Role of angiotensin II-regulated apoptosis through distinct AT 1 and AT 2 receptors in neointimal formation. *Circulation*, 106; 847, 2002.
- 9) Duman S, Gunal AI, Sen S, et al.: Does enalapril prevent peritoneal fibrosis induced by hypertonic (3.86%) peritoneal dialysis solution? *Perit Dial Int*, 21; 219, 2001.
- 10) Sawada T, Ishii Y, Tojimbara T, et al.: The ACE inhibitor, quinapril, ameliorates peritoneal fibrosis in an encapsulating peritoneal sclerosis model in mice. *Pharmacol Res*, 46; 505, 2002.
- 11) Imai H, Nakamoto H, Fukushima R, et al.: Role of adhesion molecules in the progression of peritoneal sclerosis. *Adv Perit Dial*, 19; 180, 2003.
- 12) Dobbie JW: Pathogenesis of peritoneal fibrosing syndromes (sclerosing peritonitis) in peritoneal dialysis. *Perit Dial Int*, 12; 14, 1992.
- 13) Stylianou E, Jenner LA, Davies M, et al.: Isolation, culture and characterization of human peritoneal mesothelial cells. *Kidney Int*, 37; 1563, 1990.
- 14) Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162; 156, 1987.
- 15) Muscella A, Marsigliante S, Carluccio MA, et al.: Angiotensin II AT1 receptors and Na⁺/K⁺ ATPase in human umbilical vein endothelial cells. *J Endocrinol*, 155; 587, 1997.
- 16) Schiffrin EL: Vascular and cardiac benefits of angiotensin receptor blockers. *Am J Med*, 113; 409, 2002.
- 17) Brilla CG, Funck RC, Rupp H: Lisinopril-mediated regression of myocardial fibrosis in patients with hypertensive heart disease. *Circulation*, 102; 1388, 2000.
- 18) Deferrari G, Ravera M, Deferrari L, et al.: Renal and cardiovascular protection in type 2 diabetes mellitus: angiotensin II receptor blockers. *J Am Soc Nephrol*, 13; S 224, 2002.
- 19) Wintroub BU, Klickstein LB, Watt KW: A human neutrophil-dependent pathway for generation of angiotensin II. Purification of the product and identification as angiotensin II. *J Clin Invest*, 68; 484, 1981.
- 20) Owen CA, Campbell EJ: Angiotensin II generation at the cell surface of activated neutrophils: novel cathepsin G-mediated catalytic activity that is resistant to inhibition. *J Immunol*, 160; 1436, 1998.
- 21) Lai KN, Lai KB, Lam CW, et al.: Changes of cytokine profiles during peritonitis in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Am J Kidney Dis*, 35; 644, 2000.

- 22) Yang AH, Chen JY, Lin JK: Myofibroblastic conversion of mesothelial cells. *Kidney Int*, 63; 1530, 2003.
- 23) Kuwahara M, Miyaji T, Tsubone H: Angiotensin II type 1 receptor-mediated increase in cytosolic Ca^{2+} and proliferation in mesothelial cells. *Eur J Pharmacol*, 388; 21, 2000.
- 24) Ardaillou R, Chansel D, Chatziantoniou C, et al.: Mesangial AT1 receptors: expression, signaling, and regulation. *J Am Soc Nephrol*, 10; S 40, 1999.