

氏名	平 原 一 郎
(ふりがな)	(ひらはら いちろう)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	乙 第 号
学位審査年月日	平成31年1月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題名	ラット腹膜傷害におけるメチルグリオキサールによるグルタミン代謝の亢進  (Methylglyoxal-induced peritoneal damage during glutamine hypermetabolism in a peritoneal dialysis rat model)
論文審査委員	(主) 教授 矢野 貴人 教授 朝日 通雄 教授 樋口 和秀

### 学 位 論 文 内 容 の 要 旨

#### 《目的》

長期間、腹膜透析（PD）を施行すると、腹膜劣化により PD の継続が困難になるだけでなく、重篤な合併症である被嚢性腹膜硬化症（EPS）を引き起こす。健全な PD を施行するためには、腹膜劣化のメカニズムを明らかにすることが重要であるが、その機序はあまり分かっていない。これまでの腹膜劣化の *in vivo* 実験は、消毒剤の成分であるグルコン酸クロルヘキシジンを嚢嚢類の腹腔に投与して検討されてきたが、臨床との相違が指摘されていた。そこで臨床を反映した新しい動物モデルで腹膜劣化のメカニズムの解析を試みた。メチルグリオキサール（MGO）は、市販 PD 液の製造・加熱滅菌過程で生じるグルコース分解産物（GDP）であり、毒性が高いことが報告されている。そこで本研究では、ラットの腹腔に、MGO を添加した PD 液を投与して、腹膜傷害のメカニズムを解析した。

## 《方法》

ラットに対して、20 mM MGO を添加した PD 液を 21 日間腹腔内に注液して、腹膜傷害モデルを作製した。対照群には MGO を添加しない PD 液を同様に投与した。投与開始 22 日目に、MGO 無添加の PD 液を腹腔内に投与し、90 分後に排液を回収して、キャピラリー電気泳動－飛行時間型質量分析法にてメタボロームを調べた。排液中のマトリクスメタロプロテイナーゼ (MMP) はゼラチンザイモグラフィ法で解析した。腹膜組織はヘマトキシリンエオジン染色およびマッソントリクローム染色を行ない、組織の形態と線維化を観察した。腹膜における遺伝子発現は、リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応で解析した。

## 《結果》

対照群のラットでは、腹膜の表面は一層の中皮細胞で覆われていた。一方、MGO を含む PD 液の投与により、ヒト EPS 患者のように、腹膜表面では正常な中皮細胞は消失して中皮細胞の上皮間葉転換 (EMT) 由来と考えられる間葉細胞の著しい増殖が生じ、さらに腹膜組織への単核細胞の浸潤、微小血管の新生、線維化を伴った腹膜肥厚が確認された。また腹膜では、転写調節因子 myc やグルタミン代謝に関わる酵素であるグルタミン合成酵素 (GLUL)、グルタミナーゼ C (GAC)、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ (GDH) に加え、アミノ酸トランスポーターの構成因子である Solute carrier family 1 neutral amino acid transporter member 5 (SLC1A5)、SLC3A2、SLC7A5 の遺伝子発現が亢進した。MGO 投与群の PD 排液では、グルタミン酸をはじめとする多くのアミノ酸が増加し、コラーゲンを構成するグリシンやプロリン、アラニン、ヒドロキシプロリン、ヒドロキシリジン、さらには細胞外マトリクスの分解酵素である MMP-2 が高発現を示した。

## 《考察》

MGO を含んだ PD 液の腹腔内投与により、中皮細胞の EMT や間葉細胞の増殖を伴った腹膜組織傷害が生じた。また PD 排液中のグルタミン酸をはじめとするアミノ酸レベルが上昇し、腹膜における myc やグルタミン代謝に関わる酵素、アミノ酸トランスポーターの構成因子の遺伝子発現が亢進した。myc は転写調節因子として EMT を制御したり、グル

タミン代謝に関連した酵素やトランスポーターの発現誘導を介してアミノ酸代謝を亢進させて、細胞増殖を促進することが知られている。またグルタミンは GAC により異化されてグルタミン酸となり、さらに GDH により  $\alpha$ -ケトグルタル酸に変換された後、クエン酸回路を介してエネルギー産生やアミノ酸合成に消費される。一方、GLUL によりグルタミン酸とアンモニアからグルタミンが生成される。グルタミンは、SLC1A5 などのアミノ酸トランスポーターにより細胞内に取り込まれるが、逆に SLC7A5/SLC3A2 複合体を介して細胞外に排出されることが知られている。以上のことから、PD における腹膜劣化には、EMT やグルタミン代謝の亢進による細胞の活性化や増殖が密接にかかわっていると考えられる。また本腹膜傷害動物モデルにおいて、排液中の MMP-2 やプロリンをはじめとするコラーゲンの構成アミノ酸レベルが上昇した。コラーゲンは細胞外マトリクスの主成分であり、グリシンやプロリン、アラニン、ヒドロキシプロリンに富んでおり、プロリンやヒドロキシプロリンはコラーゲンの分解によって増加することが知られている。コラーゲンは炎症や組織の再構築時に MMP によって分解され、細胞内のプロリン濃度は MMP-2 レベルを反映することが報告されている。さらに MMP による細胞外マトリクスの分解で生じたプロリンはグルタミン酸に代謝され、エネルギー産生やアミノ酸合成に使われる。PD においても、MMP-2 による細胞外マトリクスの分解は、組織破壊による直接的な腹膜傷害に加えて、間葉細胞のプロリン代謝の亢進を介した細胞の活性化・増殖により、間接的にも組織傷害をもたらす可能性がある。

#### 《結論》

PD 液に含まれる MGO は、中皮細胞の EMT を誘導し、グルタミン代謝の亢進により間葉細胞の過剰な増殖を促して、腹膜傷害を助長させる可能性が示唆された。

(様式 乙9)

## 論文審査結果の要旨

腹膜透析 (PD) は末期慢性腎不全患者にとって重要な血液浄化療法であるが、その長期施行は腹膜劣化をもたらし、PD の継続を断念せざるを得なくなる。健全な PD を長期間施行するには腹膜劣化を防止することが重要であるにも関わらず、その詳細なメカニズムは明らかになっていない。この原因の一つとして、腹膜劣化を評価するための臨床を反映した適切な動物モデルがなかったことが挙げられる。本研究では、臨床を反映した新しい腹膜傷害動物モデルを作製して腹膜劣化の機序を解析した。すなわち市販の PD 液に含まれるメチルグリオキサール (MGO) をラットの腹腔に連日投与することにより、臨床で見られるような傷害腹膜組織像に似た病理所見を呈する動物モデルを作製した。このモデル動物では、臨床で観察される中皮細胞の上皮間葉転換 (EMT) が生じており、さらにメタボローム解析および遺伝子発現解析により、myc の発現やグルタミン代謝の亢進を介して、間葉細胞の増殖が促進されうることが明らかにした。また、このモデル動物の PD 排液中では、MMP-2 の高発現も見られた。MMP-2 は細胞外マトリクスの分解により直接腹膜を傷害することに加え、細胞外マトリクスの主要構成タンパク質であるコラーゲンを分解して、その構成アミノ酸であるプロリンを細胞に供給することで代謝を亢進して間葉細胞の活性・増殖を促し、その結果、腹膜劣化が助長される可能性が示された。

本研究は、臨床を反映したオリジナルな動物モデルを作製して検討を行い、PD においてグルタミン代謝の亢進を介して組織傷害が起こる可能性を示した。これらは腹膜劣化の新しいメカニズムを提唱したものであり、腹膜劣化の治療・予防戦略に貢献しうるものである。

以上により、本論文は本学学位規程第 3 条第 2 項に定めるところの博士 (医学) の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

大阪医科大学雑誌 第 77 卷 1-2 合冊号、70-79 頁、平成 30 年