

表 題 腹膜線維症におけるインフラマソームの役割の解明

論文の区分 博士課程

著 者 名 菱田 英里華

担当指導教員氏名 長田 太助 教授

所 属 自治医科大学大学院医学研究科  
地域医療学系 専攻  
腎尿路疾患学 分野  
腎臓内科学

2019年1月10日申請の学位論文

## 目次

略語一覧	1
1. はじめに	1
2. 実験材料と方法	5
2-1. 使用動物	
2-2. PF モデルの作成	
2-3. 組織学的解析	
2-4. 免疫組織学的解析	
2-5. Real-time RT-PCR	
2-6. 腹腔内洗浄液の解析	
2-7. 腸間膜の肉眼的評価	
2-8. 骨髄移植モデルの作成	
2-9. 細胞培養	
2-10. ウェスタンブロット法	
2-11. 細胞死アッセイ	
2-12. 酸化ストレス測定	
2-13. 統計学的解析	
3. 結果	16

3-1.	PF モデルにおける NLRP3 インフラマソームの発現	
3-2.	PF モデルにおける NLRP3, ASC 欠損の影響	
3-3.	PF モデルにおける炎症性サイトカインおよび線維化マーカーの発現	
3-4.	PF モデルにおける炎症細胞浸潤	
3-5.	PF モデルにおける骨髄由来細胞 ASC の影響	
3-6.	PF モデルにおける血性腹水とフィブリン沈着	
3-7.	血管内皮細胞における酸化ストレス、細胞死、炎症性サイトカイン IL-1 $\beta$ の評価	
4.	考察	35
5.	今後の課題	39
6.	おわりに	42
7.	謝辞	
8.	引用文献	43

### 略語一覧

ASC: apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain

AGE: advanced glycation end-products

ANOVA: one-way analysis of variance

BSA: bovine serum albumin

BMDMs: bone marrow derived macrophages

BMT: bone marrow transplantation

cDNA: complementary deoxyribonucleic acid

DAB: 3, 3 -diaminobenzidine

DCFDA: 2',7' -dichlorofluorescein diacetate

EMR1: EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1

EPS: encapsulating peritoneal sclerosis

FBS: fetal bovine serum

GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

GDPs: glucose degrading products

HE: hematoxyline-eosin

HRP: horseradish peroxidase

HUVECs: human umbilical vein endothelial cells

IL-1 $\beta$ : interleukin-1 beta

IL-6: interleukin-6

IL-18: interleukin-18

LPS: lipopolysaccharide

LysM: Lysozyme M

Ly6G: lymphocyte antigen 6 complex locus G6D

MCP-1: monocyte chemoattractant protein-1

MGO: methylglyoxal

MLVECs: mouse lung vascular endothelial cells

MMP: matrix metalloproteinase

NAC: N-Acetyl-Cysteine

NLRP3: nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor (NLR) family  
pyrin domain-containing 3

PBS: phosphate buffered saline

PAI-1: plasminogen activator inhibitor-1

PD: peritoneal dialysis

PF: peritoneal fibrosis

PTAH: phosphotungstic acid hematoxylin stain

PVDF: polyvinylidene difluoride

Real-time RT-PCR: real-time reverse transcription polymerase chain reaction

RNA: ribonucleic acid

ROS: reactive oxygen species

SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

TBS-T: tris-buffered saline with tween 20

TGF- $\beta$ : transforming growth factor beta

TNF- $\alpha$ : tumor necrosis factor alfa

VE-cadherin: vascular endothelial-cadherin

WT: wild-type

## 第1章 はじめに

腹膜透析（Peritoneal Dialysis: PD）は自宅で実施可能でQOL維持に繋がる有用な腎代替療法である。世界でおよそ200,000人の末期腎不全患者がPD療法を受けており、全透析患者の約11%に相当する。本邦でも慢性透析患者数は年々増加しており、2016年度に329,609人に到達した。しかし、PD患者数は緩徐に減少しており、透析全人口に占める割合は2.7%（9021人）と低い(1)。特に本邦においてPDが普及しない理由はいくつか挙げられる。繰り返す腹膜炎や体液管理不良は、PD離脱に繋がり、普及率に影響を及ぼす(2)。PDの重篤な合併症である被嚢性腹膜硬化症

（Encapsulating Peritoneal Sclerosis: EPS）の存在も、PDの普及を妨げる大きな要因の一つである(3)。

PDの長期継続は、腹膜機能不全を伴う腹膜の線維化（= 腹膜線維症；PF）をきたす(4, 5)。長期PD施行例は、稀ではあるが、腸管の被膜形成（abdominal cocoon）を形成し、EPSに進展しうる（図1）。EPSの致死率は25-55%と非常に高いが、EPSに対する確立された有効な治療法は未だ存在しない。そのため、本邦ではEPSを回避するため、長期PD例あるいは腹膜炎罹患後の例で腹膜劣化の進行が疑われる場合のPD中止基準がガイドラインで定められている(6)。このことが、PDの普及率低下に影響を大きく及ぼしている。



**図 1 EPS 進行例における abdominal cocoon の肉眼的所見**

EPS 進行例の外科手術時における肉眼的所見の写真。(左図) 臓側腹膜は肥厚し、線維状の繭 (fibrous cocoon)を形成し、腸管全体を覆っている。(右図) 腸管を覆う線維性の臓側腹膜を剥離している最中の写真。文献(7)より引用。

EPS における腹膜の病理学的所見の特徴は、腹膜血管からの血漿滲出物によるフィブリン沈着である(8, 9) (図 2)。また、近年の報告では、生体適合性の低い PD 液や感染により誘導される「炎症」が腹膜線維症の発症機序に関与していることが示されている(9, 10)。

従来型の PD 液の加熱滅菌により、グルコース分解産物 (GDPs)が産生されることが知られている。GDPs のうち代表的な物質として、アセトアルデヒド、ホルムアルデヒド、グリオキサール、メチルグリオキサールが挙げられる。これらの物質のうち、特にメチルグリオキサール (Methylglyoxal; MGO)は毒性が高く、酸化ストレス(11)や腹膜傷害(12, 13)を惹起することが知られている。また、MGO は血管透過性や凝固活性に関与する VEGF の産生を促す。MGO 腹腔内投与はラットやマウスにおいて腹膜線維化を誘導する動物モデルとして頻用されている(12, 13)。しかし、MGO により誘導される腹膜線維症の詳細な発症機序に関しては未だ解明されていない。

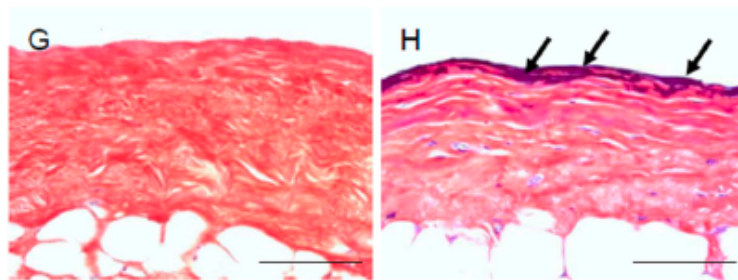


図2 EPS症例における腹膜の病理学的所見

EPS症例における壁側腹膜組織のPTAH染色像。(左図:G)正常腹膜。(右図:H)PTAHで染色される青色の沈着物がフィブリンである(矢印)。文献(14)より引用。

近年、無菌性炎症(病原体が存在しない状態で誘発される炎症)の惹起経路がインフラマソーム(inflammasome)を介することが数々の報告で示されている。インフラマソームは炎症性サイトカインであるIL-1 $\beta$ の分泌を制御する複合体である(15-17)。インフラマソームはこれまでに幾つかの経路が報告されているが、なかでもNLRP3インフラマソームは最も研究されており、無菌性炎症の病態に関与することが示されている。NLRP3インフラマソームは、パターン認識受容体NLRP3、アダプター分子ASC、Caspase-1から構成される細胞内タンパク複合体である(18)。危険シグナルが細胞により認識され、NLRP3インフラマソームが活性化し、前述の複合体を形成すると、活性化したCaspase-1はpro-IL-1 $\beta$ (前駆体)を切断し、mature IL-1 $\beta$ (成熟型)に変換する。この成熟型IL-1 $\beta$ は生体内において炎症と組織傷害を誘発する(図3)。



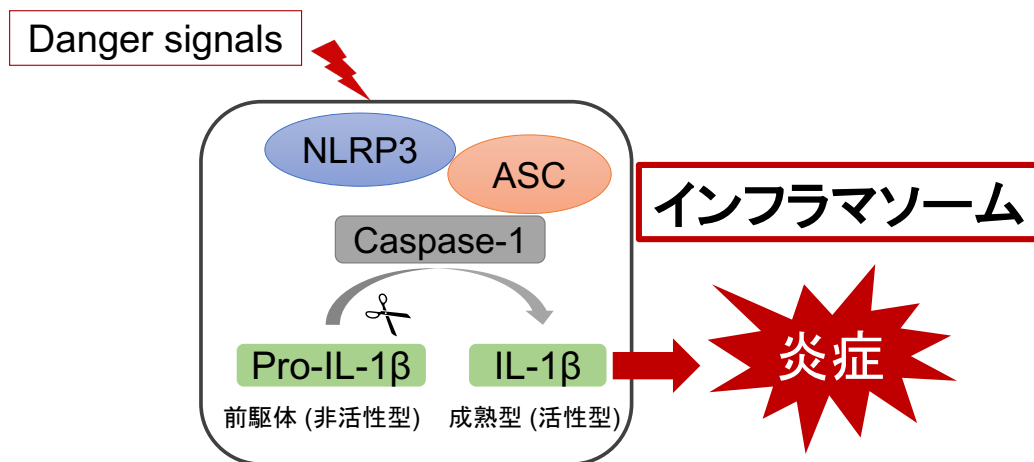


図3 NLRP3 インフラマソームの活性化機序

炎症性サイトカイン IL-1 $\beta$  は、細胞内では前駆体の Pro-IL-1 $\beta$  として存在し、活性を持たない。細胞外 ATP、ヒアルロン酸、尿酸結晶などの自己内在性の危険信号 (Danger signals)によって、NLRP3、ASC、Caspase-1 が複合体を形成する。この複合体を NLRP3 インフラマソームと呼ぶ。この蛋白複合体の形成により、Caspase-1 が活性化されると、Pro-IL-1 $\beta$  が切断され、成熟型の IL-1 $\beta$  に変換する。この成熟型 IL-1 $\beta$  が、細胞外に分泌されることにより、生体内で強力な炎症を惹起する。

我々の研究グループでは、心血管病や腎臓病などの無菌性炎症の病態に NLRP3 インフラマソームが関与することをこれまでに報告している(19-22)。その他、痛風、偽痛風、アスベスト、シリコーシス、アルツハイマー病、メタボリック症候群、2型糖尿病などにおいても、NLRP3 インフラマソームがこれらの疾患における無菌性炎症の病態で重要なメディエーターであることが数々の報告で示されている(23)。NLRP3 インフラマソームは線維化の病態においても関与していることが我々を含めた複数の研究室から報告されている(21, 22, 24, 25)。興味深いことに、NLRP3 は、上記インフラマソームの活性化機序とは異なる経路で線維化の病態に関与するとの報告もある。Wang らは、NLRP3 は TGF- $\beta$  により誘導される尿細管

上皮細胞の上皮間葉転換の経路に寄与し、インフラマソームとは独立して腎線維化を促進すると報告した(26)。

一方、Hautem らは、NLRP3 インフラマソーム由来の IL-1 $\beta$  が、PD の合併症である細菌性腹膜炎において、腹膜劣化に伴う組織学的変化と腹膜機能低下に重要な役割を持つサイトカインであると報告した(27)。しかし、PD 腹膜線維症における NLRP3 インフラマソームの役割は未解明である。

以上より、自然炎症経路であるインフラマソーム活性化を介した炎症が腹膜線維症の進展に寄与しているとの仮説に至った。前述の MGO 腹膜線維症モデルを用いて腹膜の炎症・線維化におけるインフラマソームの関与を検討した。

## 第 2 章 実験材料と方法

### 2-1. 使用動物

本研究における全ての動物実験は自治医科大学動物実験委員会で承認されている (承認番号: 17151)。実験動物として、野生型 (wild-type; WT) マウス (日本 SLC、東京より購入)、NLRP3 欠損 (NLRP3<sup>-/-</sup>) マウス (Dr. Vishva M.Dixit (Genentech) の好意により提供)、ASC 欠損 (ASC<sup>-/-</sup>) マウス (信州大学 谷口俊一郎教授の好意により提供)、IL-1 $\beta$  欠損 (IL-1 $\beta$ <sup>-/-</sup>) マウス (東京理科大学 岩倉洋一郎教授の好意により提供)を用いた。NLRP3<sup>-/-</sup>, ASC-KO<sup>-/-</sup>マウスおよび IL-1 $\beta$ <sup>-/-</sup>マウスは、以前の報告に記載された方法に従い作成され、12 世代以上 C57BL/6J マウスとバッククロスを行った。

ASC<sup>+/+</sup>マウスを用いた実験は C57BL/6J と交配の上、Littermate を作成し、購入 B6 マウスと同様の結果が得られることを確認した。

ASC<sup>fl/fl</sup>マウスは homologous recombination (遺伝子相同組替え)により ASC 遺伝子領域の両端に loxP 配列を導入し作製した。LysM<sup>Cre/+</sup>マウスは Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME より購入した。この LysM<sup>Cre/+</sup>マウスは、骨髄由来細胞 (単球・マクロファージ・好中球)において特異的に発現する Lysozyme M (LysM)をコードする Lyz2 遺伝子座に組換え酵素 Cre を knock-in することにより作製された。最終的に、ASC<sup>fl/fl</sup>マウスと LysM<sup>Cre/+</sup>マウスを交配させることにより、骨髄由来細胞において特異的に ASC を欠損したマウス (ASC<sup>fl/fl</sup>; LysM<sup>Cre/-</sup>)を作製した。

上記のマウスの遺伝子背景は全て C57BL/6J であり、8-12 週の雌性マウスを用いた。マウスは温度、湿度、及び明暗時間 (それぞれ 12 時間のサイクル)を一定にした環境下において、自由飲水・自由摂食下にて飼育した。

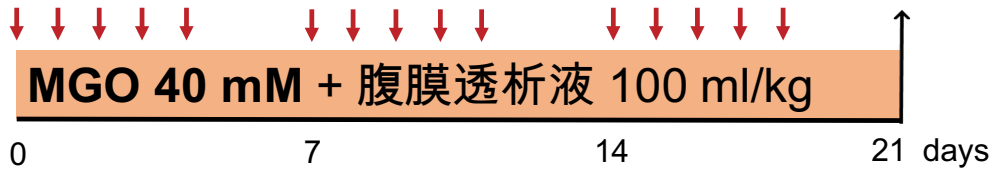
## 2-2. PF モデルの作成

8~12 週齢の雌性マウスを使用した。PF モデルは既知の報告に従い(28-30)、40 mM に濃度調節した Methylglyoxal (MGO) 溶液 (Sigma-Aldrich Corp., Saint Louis, MO, USA)を含む腹膜透析液 (PDF: 100 mL/kg)を週 5 日、合計 3 週間、腹腔内へ注射を行い、作製した (図 4)。注射針は 27G 針(テルモ、東京、日本)を使用し、腹腔内投与部位は右下腹部に局限した。腹膜透析液の組成は 2.5% glucose, 100 mM NaCl, 35 mM sodium lactate, 2 mM CaCl<sub>2</sub> and 0.7 mM MgCl<sub>2</sub> (ミッドペリック 250; テルモ)であった。

C57BL6/J



週5日間連続, 合計3週間投与



対照群: 腹膜透析液のみ投与

図4 本研究における MGO 腹膜線維症モデルのプロトコール

### 2-3. 組織学的解析

マウスをイソフルランで麻酔後、頸静脈から採血を行った。皮膚を剥離した後、注射部位と反対側 (左側)の壁側腹膜を筋肉ごと採取した。組織は PBS で洗浄後、4%パラホルムアルデヒドにて一晩固定し、パラフィン包埋した。腹膜組織切片は 3  $\mu\text{m}$  厚で作成し HE 染色と Masson's Trichrome 染色を行い、腹膜肥厚度を測定した。400 倍視野下に無作為に 5ヶ所撮影した後、1 視野あたり無作為に 5ヶ所、腹膜の肥厚度を測定し、計 25ヶ所の腹膜肥厚度の平均値を 1 サンプル分の腹膜中皮下層肥厚度とした。各群内のマウス腹膜中皮下層肥厚度の平均値を計算し、その群における腹膜中皮下層肥厚度とした。その他、PTAH 染色を行い、フィブリン沈着の程度を評価した。

撮影と解析は、FSX-100 (オリンパス、東京、日本)および Adobe Photoshop CS software (ver. 8, Adobe Systems Inc., San Diego, CA)を用いた。

## 2-4. 免疫組織学的解析

免疫組織学的解析では、はじめに白血球マーカーである CD45、マクロファージマーカーである F4/80、好中球マーカーである Ly6G、リンパ球マーカーである CD3 の検出を行った。

CD45、F4/80、Ly6G、CD3 染色については、組織切片を脱パラフィン、Target Retrieval Solution (Dako, CA, USA)で抗原賦活、3%過酸化水素水で内因性ペルオキシダーゼブロックを行った。その後、正常ヤギ血清と1% BSA でブロッキングを行い、ラット CD45 抗体 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ)、ラット F4/80 抗体 (AbD Serotec, Raleigh, NC)、ラット Ly6G 抗体 (BioLegend, San Diego, CA)、ラット CD3 抗体 (eBioscience, San Diego, CA)を 4°C, overnight でインキュベートした。ヒストファイン シンプルステイン マウス MAX-PO (Rat) (ニチレイバイオサイエンス、東京、日本)を室温で1時間反応させ、DAB substrate kit で発色させた。

全てヘマトキシリンを用いて、対比染色を行い、脱水・透徹後封入した。陰性コントロールとして、同じ動物種のIgG抗体 (Vector Laboratories, Burlingame, CA)を用いて陽性細胞が存在しないことを確認した。

各種染色スライドは、FSX-100 (オリンパス) を用いて撮影し、解析を行った。400倍で無作為に抽出した5視野を撮影した後、Adobe Photoshop CS software (ver. 8, Adobe Systems Inc.)を用いて陽性細胞数を計測した。

免疫蛍光二重染色では、一次抗体としてラット F4/80 抗体 (AbD Serotec, Raleigh, NC)、ラビット ASC 抗体(31)、ラビット CD34 抗体 (Abcam, Cambridge, UK)、二次抗体として Alexa 594, Alexa 548, Alexa 488 標識抗 IgG 抗体 (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)を用いた。一次抗体にラビット CD34 抗体を用いた際は、一次抗体反応後に Biotin 標識抗ウサギ

IgG 抗体、Dylight 488 ストレプトアビジン (Vector Laboratories)の順に反応させ、Biotin 抗体添加前にビオチン・アビジンブロッキング (Vector Laboratories) を施行した。

同一動物種の一次抗体を用いた免疫蛍光二重染色では、過去の報告に基づき(32)、第1の一次・二次抗体と第2の一次・二次抗体の反応前後に正常ウサギ血清と AffiniPure Fab Fragment donkey anti-rabbit IgG 抗体 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. West Grove, PA) 40  $\mu$  g/ml を用いてブロッキングを行い、交差反応を防いだ (図5)。

蛍光染色用封入剤である ProLong Gold Anti-fade mountant (Thermo Fisher Scientific)で封入を行った。共焦点蛍光顕微鏡 FV-10i (オリンパス)を用い、撮影と解析を行った。

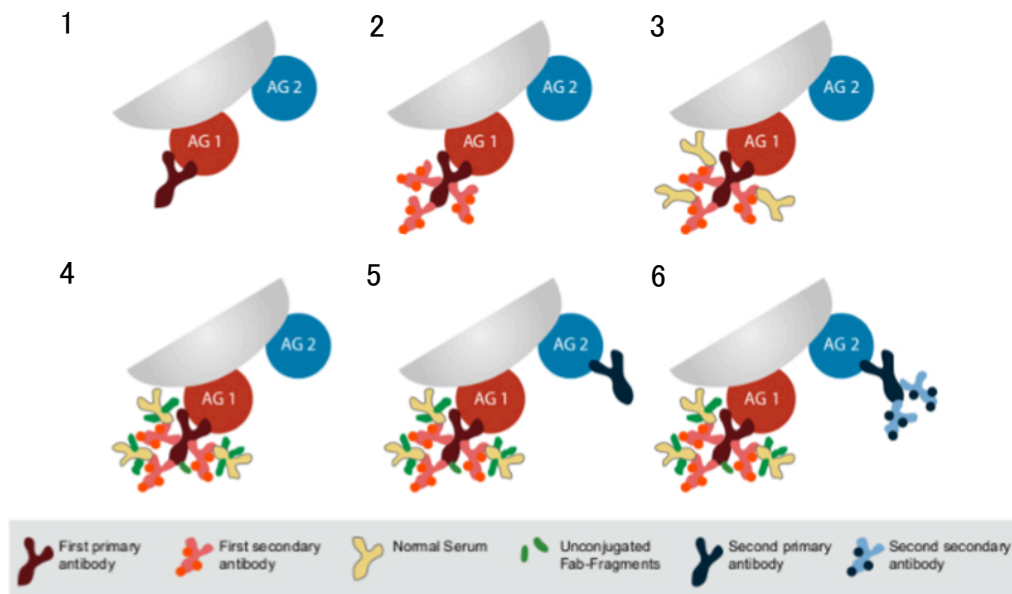


図5 同一動物種抗体を用いた免疫染色法

1. 第1のラビット由来一次抗体を反応させる。 2. 第1の2次抗体を反応させる。 3. 正常ウサギ血清を反応させ、第1の2次抗体の開放されたパラトープに結合させる。 4. 一価の Fab フラグメントを添加し、第1の二次抗体に反応させる。この操作により、第

- 2の2次抗体が第1の2次抗体に結合するのを防ぐ。5. 第2の1次抗体を反応させる。
6. 第2の2次抗体を反応させる。文献(33)より図を引用、一部改変。

## 2-5. Real-time RT-PCR

腹膜組織 (壁側腹膜、臓側腹膜)より ISOGEN (ニッポン・ジーン、東京、日本) を用いて RNA を抽出した。まず、ISOGEN 下で腹膜組織をホモジェナイズし、クロロホルムを加えて遠心し、RNA を水相に、DNA と蛋白質を有機層に分離した。水相にイソプロパノールを加えて RNA を沈殿させ、エタノールにて洗浄して RNA を抽出した。次に Superscript VILO™ cDNA Synthesis Kit (life technologies, MD, USA) を用いて逆転写を行い、cDNA とした。逆転写は 25°C、10 分、続いて 42°C、60 分で反応させ、85°C、5 分保温して反応を停止させた。合成した cDNA は SYBR Premix Ex Taq II (タカラバイオ、滋賀、日本)、Thermal Cycler Dice Real Time Systems II (タカラバイオ)を用いて mRNA を検出した。PCR 条件は 95°C、30 秒の前反応後、2-step PCR (95°C、5 秒)、アニーリング・伸長反応 (60°C、30 秒)を 40 サイクルとして行った。内部標準 (GAPDH を使用) に対する目的の mRNA の比を  $\Delta\Delta Ct$  法を用いて計算した。結果は、WT マウス、またはコントロールマウスの vehicle 群に対する割合で示した。

Name	5' -3' sequence	
	Forward primer	Reverse primer
NLRP3	CGAGACCTCTGGGAAAAAGCT	GCATACCATAGAGGAATGTGATGTACA
ASC	GCTGAGCAGCTGCAAACGAC	ACTTCTGTGACCCTGGCAATGAG
Caspase-1	GATGGCACATTTCCAGGACTGA	TGTTGCAGATAATGAGGGCAAGAC
IL-1 $\beta$	TGAAGTTGACGGACCCCAA	TGATGTGCTGCTGTGAGATT
IL-6	ACAACCACGGCCTTCCCTACTT	CACGATTTCCAGAGAACATGTG
TNF- $\alpha$	CCCCAAAGGGATGAGAAGTTC	GCTTGTCACCTCGAATTTGAGAA
MCP-1	GGCTCAGCCAGATGCAGTTAAC	GCCTACTCATTGGGATCATCTTG
F4/80	CCTGGACGAATCCTGTGAAG	GGTGGGACCACAGAGAGTTG
IL-18	CAGGCCTGACATCTTCTGCAA	TCTGACATGGCAGCCATTGT
Collagen Type 1	GAGCGGAGAGTACTGGATCG	GTTCTGGCTGATGTACCAGT
Collagen Type 3	CCCAACCAGAGATCCCAT	GAAGCACAGGAGCAGGTGTAGA
TGF- $\beta$	GCAACATGTGGAACCTACCAGA	GACGTCAAAAGACAGCCACTCA
MMP-2	GACATACATCTTTCAGGAGACAAG	TCTGCGATGAGCTTAGGGAAA
MMP-9	CCTGGAACCTCACACGACATCTTC	TGGAAACTCACACGCCAGAA
PAI-1	GACACCCTCAGCATGTTTCATC	AGGGTTGCACTAAACATGTCAG
TIMP-1	GTAAGGCCTGTAGCTGTGCC	AGGTGGTCTCGTTGATTCT
GAPDH	TGTGTCCGTCGTGGATCTGA	TTCGTGTTGAAGTCGCAGGAG

表 1 プライマー配列

## 2-6. 腹腔内洗浄液の解析

マウスをイソフルランで麻酔後、頸静脈から採血を行い、皮膚を剥離した後、18Gサーフロー針 (テルモ) を留置し、生理食塩水を2 ml注入後、腹腔内洗浄液を回収した。腹腔内洗浄液は4°C, 1000 rpm, 10 minの条件で遠心した後、全自動血球計算機 Celltac  $\alpha$  (日本光電、東京、日本) を用いて白血球、赤血球数を測定した。

## 2-7. 腸間膜の肉眼的評価

以下の解析方法は、申請者が独自に開発した評価法である。マウスをイソフルランで麻酔後、頸静脈から採血を行い、壁側腹膜を採取した後、



綿棒で腸管を右側に寄せ、上腸間膜動脈の付近で鑷子にて切断し、腸管を摘出した。PBS で軽く洗浄しキムワイプで水分を拭き取った後、黒色ボードの上に載せ、綿棒を用いて丁寧に腸管膜を露出した。綿棒で腸間膜を損傷せず、かつ腸間膜の面積が最大限となるよう伸長させた後、写真撮影した。腸間膜の面積は Adobe Photoshop CS software (ver. 8, Adobe Systems Inc.) を用いて定量化を行った。

## 2-8. 骨髄移植モデルの作成

マウスの大腿骨と腓骨を取り出し、キムワイプで毛、皮膚、筋肉を除去した後、Antibiotic Antimycotic Solution (Sigma) 入り Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Wako, Japan) に室温で 10 分間浸し殺菌した。下肢骨の両端を切除し、PBS でフラッシュし骨髄細胞を回収した。赤血球は低張性の ACK buffer を加え溶血させた。その後 PBS で 2 回洗浄し、細胞懸濁液を準備した。6 週齢のレシピエントマウスに 9 Gy のガンマ線全身照射を行った後、ドナー 1 匹あたり  $2 \times 10^6$  cells の骨髄細胞を尾静脈経由で移植した。また、この方法は、green fluorescent protein (GFP) トランスジェニックマウスを用いた予備検討において、移植 8 週後の末梢血細胞では 90%以上が GFP 陽性細胞であることをフローサイトメトリー法にて確認している(19, 31)。このプロトコールに従い、以下に示す計 3 種類の骨髄移植モデルを作製した。

<ドナー>    <レシピエント>    <キメラマウスの表記>

Wild type	Wild type	WT to WT
Wild type	ASC <sup>+/+</sup>	WT to ASC <sup>+/+</sup>
ASC <sup>+/+</sup>	Wild type	ASC <sup>+/+</sup> to WT

## 2-9. 細胞培養

マウス骨髄由来マクロファージ (BMDMs)は、過去の文献に基づいて作製した(20)。具体的には、マウスから骨髄細胞を採取し、10% ウシ胎仔血清 (fetal bovine serum: FBS)と 15% L929 培地を添加した RPMI-1640 (Sigma-Aldrich)を用いて 37°C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーション下で 7 日間培養することにより、BMDM に分化させた。

初代マウス肺血管内皮細胞 (MLVECs)は 8-10 週齢の雄性マウスの肺組織から採取した。過去の文献を参考に以下の方法で分離した(34)。右心室を介して PBS で肺組織を灌流した後、肺組織を採取し、Lung Dissociation Kit (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)を用いて肺組織の細胞懸濁液を作製した。抗 CD45 magnetic beads で negative selection、抗 CD31 magnetic beads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)で positive selection を行い、MLVECs (CD31<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>)を採取した。MLVECs は 20% ウシ胎仔血清 (FBS)、50µg/ml endothelial cell growth supplement (Sigma-Aldrich)、50µg/ml ヘパリン (Sigma-Aldrich)、5 µM SB431542 (R&D Systems, Minneapolis, MN)、1% 抗生剤を添加した DMEM (Thermo Fisher Scientific) 培地を用いてゲラチンコートしたプレート下で 72-96 時間、培養した。血管内皮細胞は、敷石上の形態と VE-cadherin の発現により同定した。HUVECs (Human umbilical vein endothelial cells)は ScienCell Research Laboratories (CA, USA)より購入した。培地は Endothelial Cell Growth Medium (PromoCell, Heidelberg, Germany)に Endothelial Cell Growth Supplement (PromoCell)、10%ウシ胎仔血清 (fetal bovine serum: FBS)を添加して培養した。継代数は 4-7 とした。

## 2-10. ウェスタンブロット法

BMDMs と MLVECs の細胞抽出液は RIPA buffer (20 mM Tris, 2.5 mM EDTA, 1% Triton X, 10% glycerol, 1% deoxycholic acid, 0.1% SDS, 50 mM NaF, and 10 mM  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ )を用いて抽出した。細胞抽出液に NuPAGE LDS sample buffer (Thermo Fisher Scientific)を加えて 70°C、10 分間、処理した。この処理したサンプルを SDS-PAGE で分離し、PVDF 膜に転写した。PVDF 膜を 5%スキムミルク/TBS-T で室温 2 時間ブロッキングした後、1 次抗体を 4°C、overnight でインキュベートした。続いて horseradish peroxidase (HRP) 標識 2 次抗体を室温で、1 時間インキュベートした。検出は、Western BLoT Ultra Sensitive HRP Substrate (タカラバイオ) を用いて化学発光させ、Amersham 680 (GE healthcare Life Sciences, NJ, USA) で撮影した。一次抗体は ASC、VE-cadherin (Abcam)、 $\beta$ -actin (Sigma-Aldrich)、二次抗体は HRP-goat anti-rabbit IgG (Cell Signaling Technology Inc., Boston, MA) と HRP-goat anti-mouse IgG (Cell Signaling)をそれぞれ使用した。

## 2-13. 細胞死の評価

死細胞のみを染色する SYTOX Green 試薬 (Thermo Fisher Scientific)を用いて評価した。HUVECs 及び MLVECs を 96 well plate にて 24 時間培養した後、SYTOX Green を 1: 50000 の濃度に希釈した培地に交換した。SYTOX Green 含有培地交換 30 分後に至適濃度の MGO を添加し、Spark® (TECAN, Männedorf, Switzerland)を用いて 37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で継続的に蛍光強度を測定した。

## 2-12. 酸化ストレス測定

ROS に対する蛍光プローブは DCFDA (Abcam) を用いた。HUVECs 及び MLVECs を 96 well plate にて 24 時間培養した後、DCFDA 20  $\mu$ M を 45 分 インキュベートした。続いて DCFDA を含む溶液を除去して 1x Buffer で洗浄後、MGO 含有 1x Buffer を添加し、Spark<sup>®</sup> (TECAN, Männedorf, Switzerland) を用いて CO<sub>2</sub> インキュベーター下で継時的に蛍光強度を測定、もしくは FV10i (Olympus) で観察した。

## 2-13. 統計学的解析

数値データは、平均値 $\pm$ 標準誤差で表示した。独立 2 群間の比較には t 検定を、多群間比較には ANOVA と Turkey-Kramer test (多重比較検定；事後比較) を用いた。データが正規分布しない場合は、ノンパラメトリック検定として Mann-Whitney U test と Kruskal-Wallis test を用いて解析した。統計解析は GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, San Diego, CA) を用いて行い、 $p < 0.05$  を統計学的に有意差ありと判断した。

## 第3章 結果

### 3-1. PFモデルにおけるNLRP3インフラマソームの発現

MGO 40 mM を含む腹膜透析液 100 ml/kg を週あたり連続 5 日間、合計 3 週間、WT マウスに腹腔内投与した。このモデルにおける線維化の程度を、壁側腹膜の Masson's Trichrome 染色にて評価した。壁側腹膜の中皮下層はコントロール群と比較し、経時的に肥厚した (図 6 A, B)。次に、RT-PCR 法を用いて壁側腹膜におけるインフラマソームの遺伝子発現を評価したところ、MGO 投与により NLRP3, ASC, Caspase-1, IL-1 $\beta$  の発現は経時的に上昇し、21 日目において vehicle 群と比較し統計学的有意差に達した (図 6C)。線維化に関与する増殖因子である TGF- $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ) の発現も同様、14 日目と 21 日目において vehicle 群と比較し有意に上昇した。さらに、臓側腹膜の線維化も評価するため、腸間膜の肉眼所見を評価したところ、腸間膜面積は経時的に収縮した (図 6D, E)。MGO 群では腸管同士の癒着の所見がみられる個体も一部存在し、ヒト EPS に類似する所見と考えられた。壁側腹膜と同様、臓側腹膜における遺伝子発現も vehicle 群と比較し上昇する傾向が見られた (図 6F)。

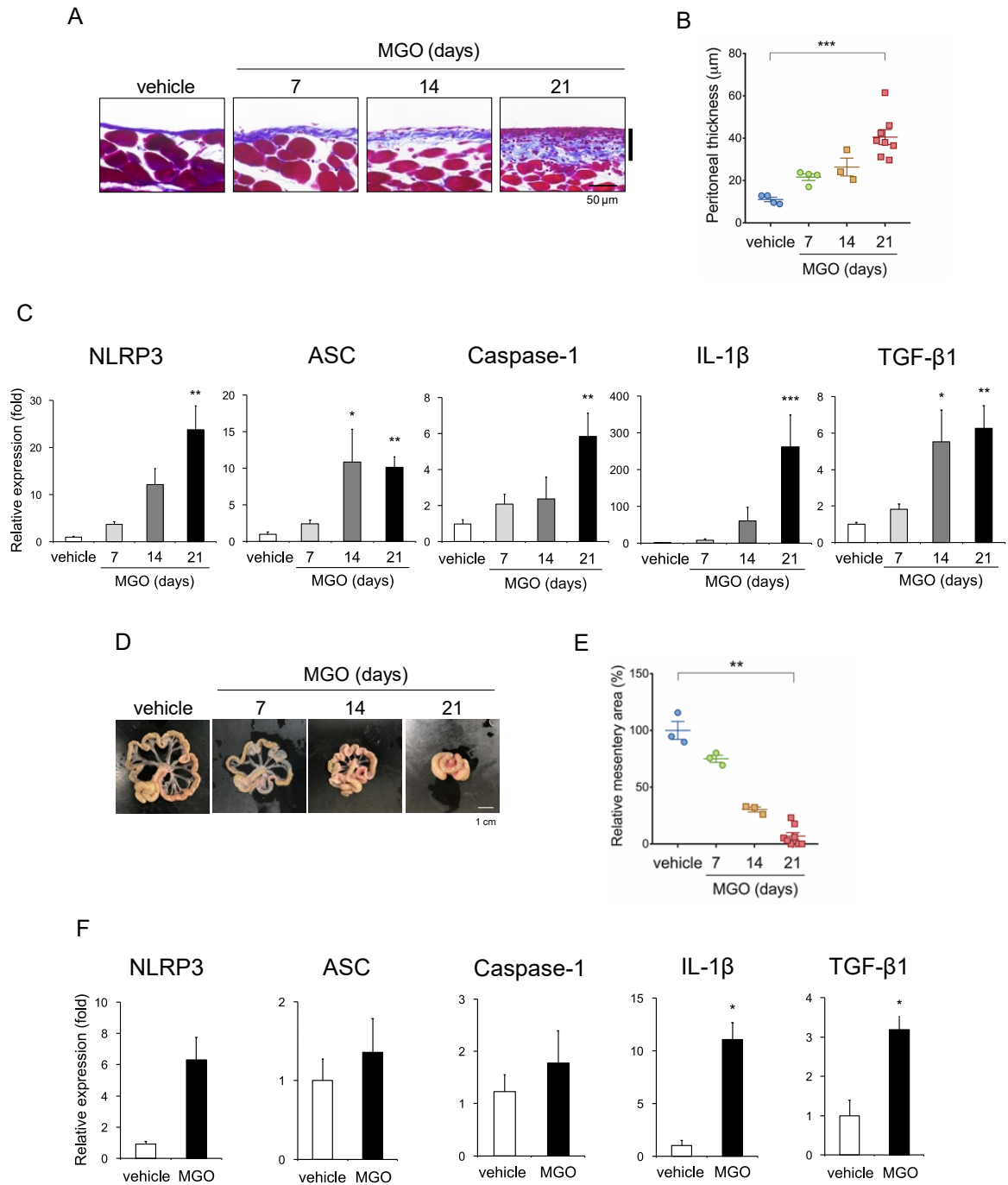
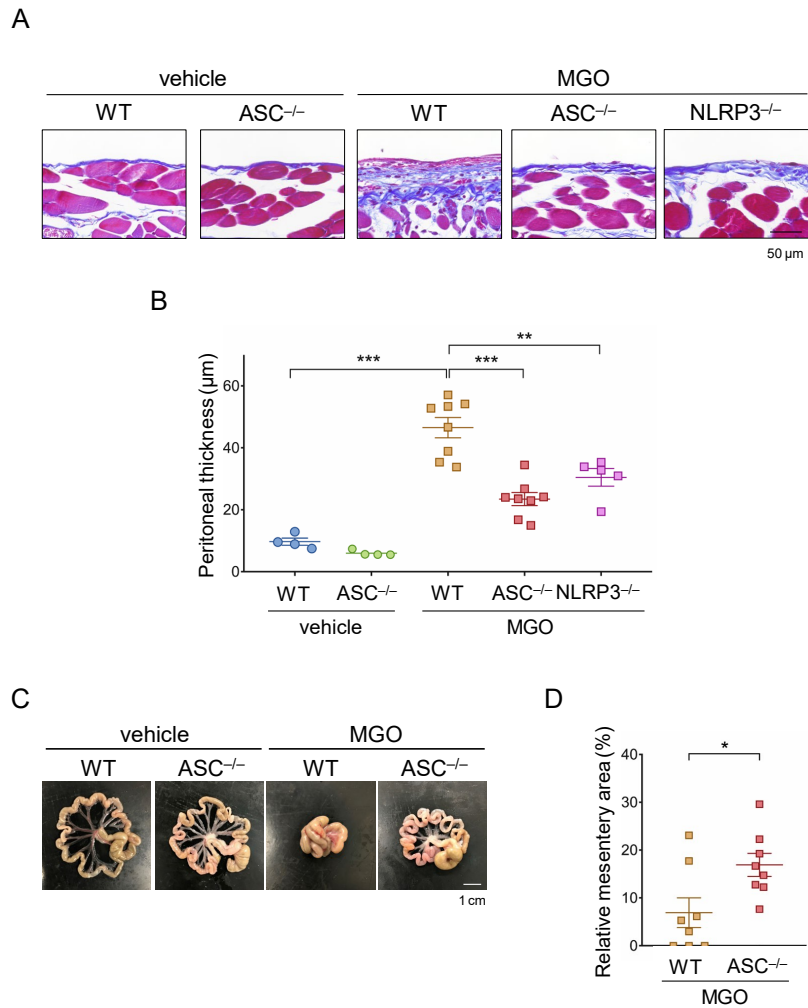


図 6. MGO 誘導性 PF モデルにおいてインフラソームの発現は亢進する

WT マウスに MGO または vehicle を一定期間投与し、PF モデルを作成した。(A) 壁側腹膜の Masson's Trichrome 染色像。腹膜の肥厚度を黒色下線で示した。(B) 腹膜肥厚度の定量化グラフ。(C) Real-time RT-PCR 法で壁側腹膜組織中の NLRP3, ASC, caspase-1, IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$  の mRNA 発現を解析した (n = 3-8)。(D) 腸間膜の肉眼所見。E) 腸間膜面積の定量化グラフ。vehicle 群を 100%とした際の縮小率を示した。(F) 臓側腹膜における NLRP3, ASC, caspase-1, IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$  の mRNA 発現を示した (day 14, n=3)。数値データは平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。 $*p < 0.05$ 、 $**p < 0.01$ 。

### 3-2. PF モデルにおける NLRP3, ASC 欠損の影響

腹膜線維症における NLRP3 インフラマソームの役割を解析するため、NLRP3<sup>-/-</sup>マウスと ASC<sup>-/-</sup>マウスを用いて MGO 腹膜線維症モデルを複製し、腹膜の線維化を評価した。MGO 投与 21 日目において、壁側腹膜の肥厚は WT マウスと比較し、NLRP3<sup>-/-</sup>マウスと ASC<sup>-/-</sup>マウスで有意に抑制された (図 7A, B)。以下、WT マウスと線維化の程度に関して最も有意差があった ASC<sup>-/-</sup>マウスを中心に解析を進めた。壁側腹膜の所見と同様、MGO 投与による腸間膜面積の縮小は WT マウスと比較し ASC<sup>-/-</sup>マウスで有意に改善された (図 7C, D)。これらの所見から、MGO 腹膜線維症における NLRP3 インフラマソームの関与が示唆された。



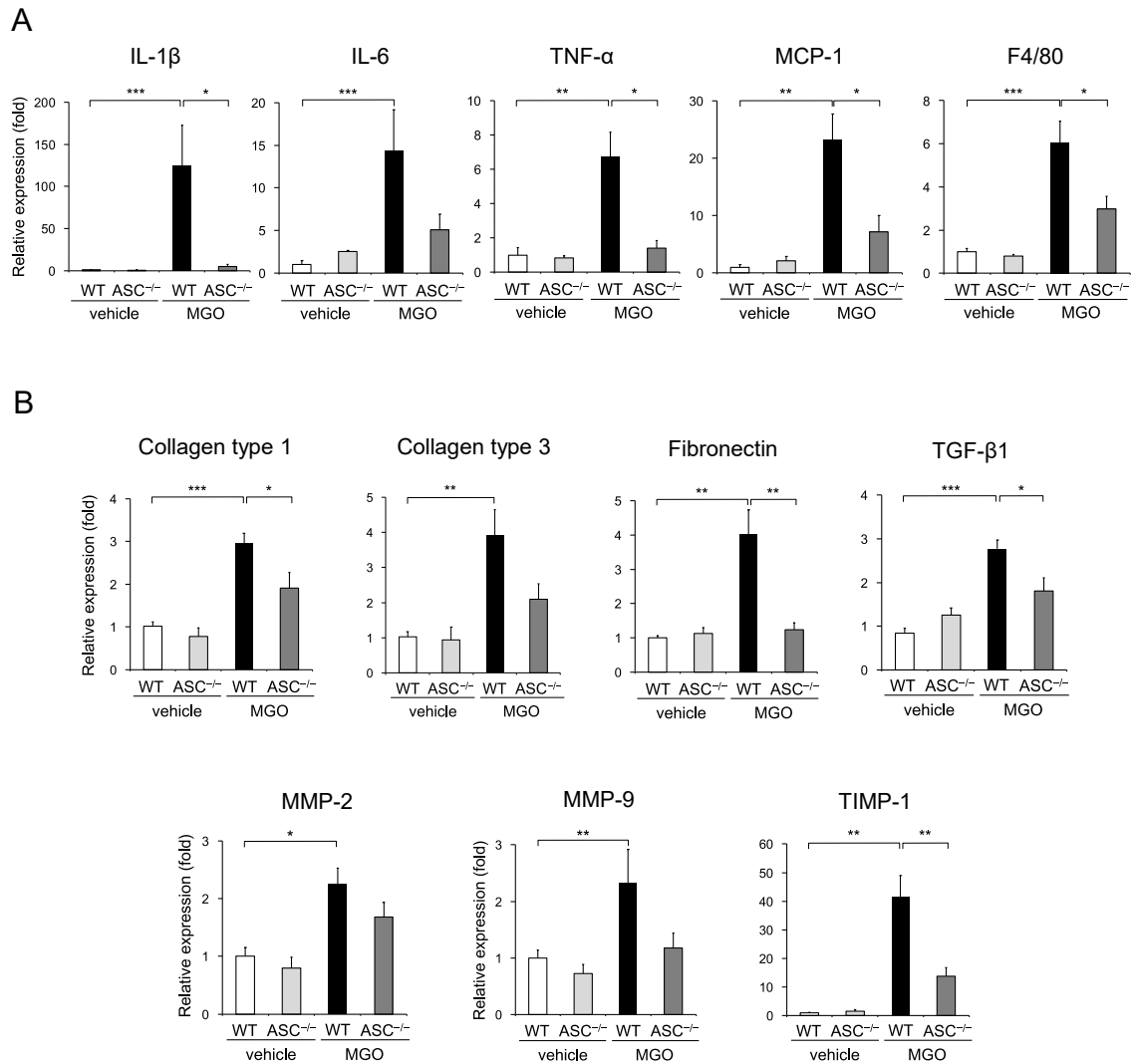
### 図 7. NLRP3, ASC 欠損は PF モデルにおいて腹膜線維化を抑制する

WT, NLRP3<sup>+</sup>, ASC<sup>+</sup>マウスに MGO または vehicle を 21 日間投与し、PF モデルを作成した。(A) 壁側腹膜の Masson's Trichrome 染色像。(B) 腹膜肥厚度の定量化グラフ。(C) 腸間膜の肉眼所見。(D) 腸間膜面積の定量化グラフ。vehicle 群を 100%とした際の縮小率を示した。数値データは平均値±標準誤差で示した。\* $p < 0.05$ 、\*\* $p < 0.01$ 。

### 3-3. PF モデルにおける炎症性サイトカインおよび線維化マーカーの発現



腹膜の線維化過程においても炎症反応は関与することが知られているため(10, 35)、壁側腹膜の炎症性サイトカインの遺伝子発現を解析した。炎症性サイトカイン IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , MCP-1, F4/80 (マクロファージマーカー)の発現は MGO 投与 21 日目における WT マウスの壁側腹膜において有意に上昇した (図 8A)。これらの発現は ASC<sup>+/+</sup>マウスの壁側腹膜において有意に抑制もしくは減少する傾向を示した。細胞外基質マーカー Collagen type 1、Collagen type 3、Fibronectin、線維化促進サイトカイン TGF- $\beta$ 、細胞外基質分解酵素 MMP-2、MMP-9、TIMP-1 の発現も MGO 投与 21 日目における WT マウスの壁側腹膜において有意に上昇した (図 8B)。これらの発現は炎症性サイトカインと同様、ASC<sup>+/+</sup>マウスの壁側腹膜において有意に抑制もしくは減少する傾向を示した。これらの所見から、MGO 腹膜線維症モデルにおいてインフラマソームは炎症と線維化反応に関与することが示唆された。

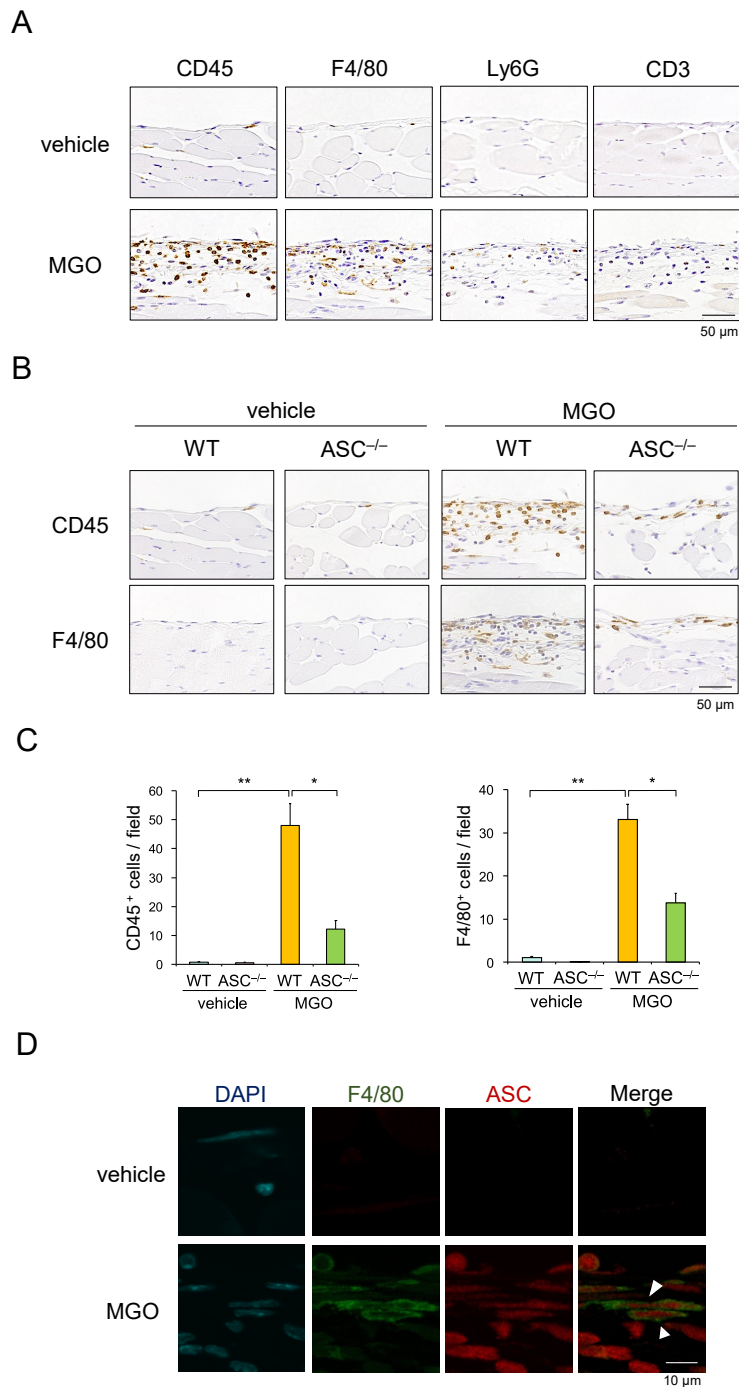


### 図 8. ASC 欠損は炎症と線維化反応を抑制する

WT, NLRP3<sup>+</sup>, ASC<sup>-/-</sup>マウスに MGO または vehicle を 21 日間投与し、PF モデルを作成した。(A) Real-time RT-PCR 法で壁側腹膜組織中の IL-1β, IL-6, TNF-α, MCP-1, F4/80 の発現の mRNA 発現を解析した (n = 3-8)。(B) 壁側腹膜組織中の Collagen type 1, Collagen type 3, Fibronectin, TGF-β, MMP-2, MMP-9, TIMP-1 発現の mRNA 発現を解析した。数値データは平均値±標準誤差で示した。\**p* < 0.05、\*\**p* < 0.01。

### 3-4. PF モデルにおける炎症細胞浸潤

NLRP3 インフラマソームは主に炎症細胞、特にマクロファージにおいて発現が認められることから(16, 21)、壁側腹膜組織を用いて血球細胞の免疫染色を施行した。MGO 投与 21 日目において WT マウスの壁側腹膜中皮下層に浸潤する CD45 (白血球マーカー), F4/80 (マクロファージマーカー)陽性細胞数は有意に増加した。一方、Ly6G (好中球マーカー), CD3 (リンパ球マーカー)陽性細胞は CD45, F4/80 陽性細胞と比較すると浸潤の程度は顕著ではなかった (図 9A, B)。MGO 投与により壁側腹膜に浸潤する CD45, F4/80 陽性細胞は ASC<sup>+</sup>マウスで有意に抑制された (図 9C)。さらに、MGO 群の腹膜組織像において中皮下層に浸潤する F4/80 陽性細胞と ASC の共局在化を蛍光免疫染色にて確認した (図 9D)。以上の結果により、腹膜線維症では、マクロファージのインフラマソームがどのような役割を担っているかについて、次に検討することにした。



**図 9. ASC 欠損は炎症細胞浸潤を抑制する**

WT, ASC<sup>+</sup>マウスに MGO または vehicle を 21 日間投与し、PF モデルを作成した。(A) WT マウスにおける壁側腹膜組織を用いて CD45, F4/80, Ly6G, CD3 の免疫染色を施行し

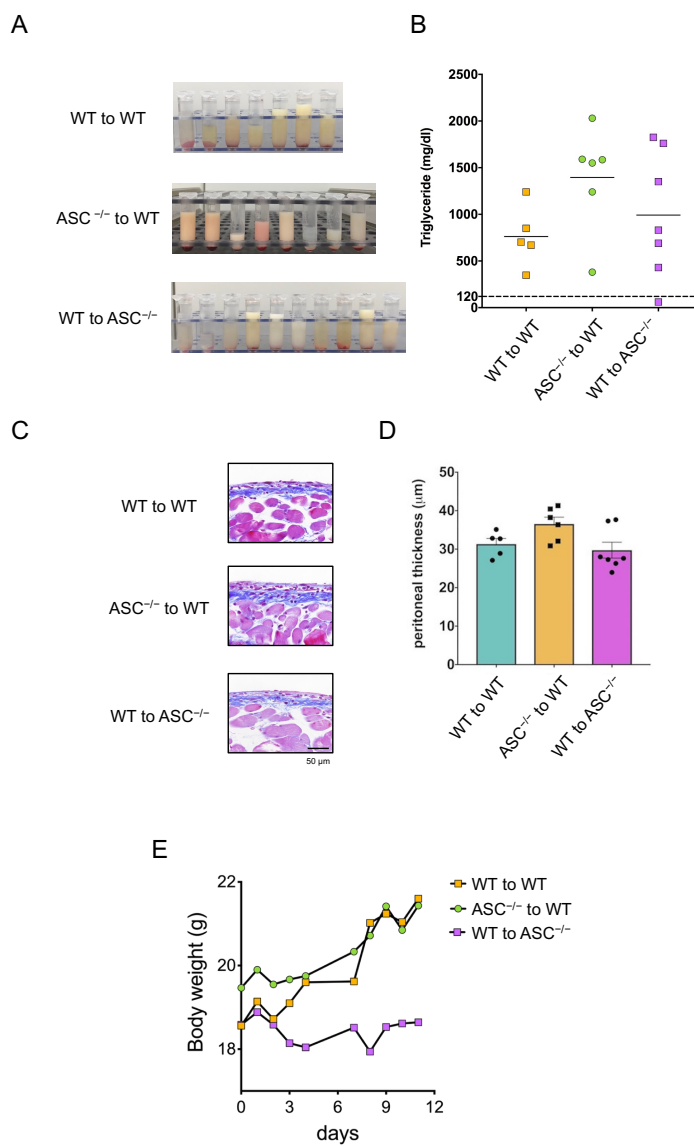
vehicle 群と比較した。(B) WT, ASC<sup>+</sup>マウスにおける壁側腹膜組織を用いて CD45, F4/80 の免疫染色を施行した。(C) 壁側腹膜に浸潤する CD45, F4/80 陽性細胞数を定量化した (n=4)。(D) WT マウスにおける F4/80, ASC の共局在化を蛍光免疫染色で示した。DAPI (青), F4/80 (緑), ASC (赤)。数値データは平均値±標準誤差で示した。\**p* < 0.05、\*\**p* < 0.01。

### 3-5. PF モデルにおける骨髄由来細胞 ASC の影響

マクロファージにおけるインフラマソームがどの程度、腹膜線維化に影響するのかを評価するため、骨髄移植 (BMT)モデルと骨髄由来細胞特異的 ASC 欠損マウスを用いた。はじめに、BMT マウス((WT to WT), (WT to ASC<sup>+</sup>), (ASC<sup>+</sup> to WT))を作製の上、このマウスを用いて MGO 腹膜線維症モデルを誘導した。しかし、前述のモデルに MGO を投与すると白色調の腹水が出現した (図 10A)。これは想定外であったが、この腹水中のトリグリセライドを測定すると、生理的に観察される値を大幅に超えており、乳糜腹水と考えられた (図 10B)。乳糜腹水は、乳白色のリンパ液が腹腔内に漏出する病態であり、原因はリンパ管の閉塞・損傷であるとされている(36)。代表的な原疾患として悪性腫瘍や外傷、放射線照射が挙げられ、腹水中のトリグリセライドが 110 mg/dl 以上であることにより診断される(36)。動物実験において乳糜腹水をきたした報告例はこれまでにない。本実験において乳糜腹水が誘発された原因として、放射線照射と MGO 投与によるリンパ管損傷の影響が最も考えやすい。

上記 BMT モデルにおいて腹膜の線維化の程度を評価したが、各群間で腹膜肥厚度に有意差はみられなかった (図 10C-D)。また、レシピエントが WT マウスの群では、大量の腹水出現により MGO 投与に伴い体重が顕著に増加したが、レシピエントが ASC<sup>+</sup>マウスの群では有意な体重増加は

みられなかった(図 10E)。この注目すべき現象が起こる原因として、レシピエントが  $ASC^{-/-}$  マウスの場合、リンパ管が放射線照射や MGO による傷害を受けにくく、乳糜腹水の程度が抑制される、との仮説を立てている。以上の結果より、BMT モデルを用いて骨髄由来細胞の関与を評価するのは、乳糜腹水の発生の有無が絡んでくるため解釈が難しく、これ以上の検討が不可能であった。



### 図 10. 骨髄移植モデルに MGO を投与すると乳糜腹水が誘発される

BMT モデルマウスに MGO を合計 3 週間腹腔内投与した (A) 各群における腹腔内洗浄液の代表的写真 (B) 腹腔内洗浄液中のトリグリセライドの測定値を示したグラフ。ほぼ全例において乳糜腹水の基準である 110mg/dl を超えている。(C) 壁側腹膜の Masson's Trichrome 染色像。(D) 腹膜肥厚度の定量化グラフ。(E) day 0-12 における体重推移グラフ。数値データは平均値±標準誤差で示した。

次に、Cre-LoxP 遺伝子改変マウスの手法を用いて骨髄由来細胞特異的 ASC 欠損マウス ( $ASC^{f/f}; LysM^{Cre/+}$ ) を作製した。 $ASC^{f/f}; LysM^{Cre/+}$  マウスから採取した骨髄由来マクロファージ (BMDM) における ASC の発現は、 $ASC^{f/f}; LysM^{Cre/-}$  マウスから採取した BMDM と比較し 32% に低下していた (図 11A)。同様に  $ASC^{f/f}; LysM^{Cre/+}$  マウスから採取した BMDM における ASC の蛋白発現も  $ASC^{f/f}; LysM^{Cre/-}$  マウスと比較し抑制されていることを western blotting 法で確認した (図 11B)。しかし、骨髄由来細胞特異的 ASC 欠損は腹膜線維化を抑制しなかった (図 11C, D)。さらに、腹膜における IL-1 $\beta$ 、Collagen type1、Fibronectin の遺伝子発現は  $ASC^{f/f}; LysM^{Cre/+}$  マウスと  $ASC^{f/f}; LysM^{Cre/-}$  マウス間で有意差を認めなかった。以上の結果より、MGO 腹膜線維症の発症過程における骨髄由来細胞インフラマソームの関与は小さいと考えられた。

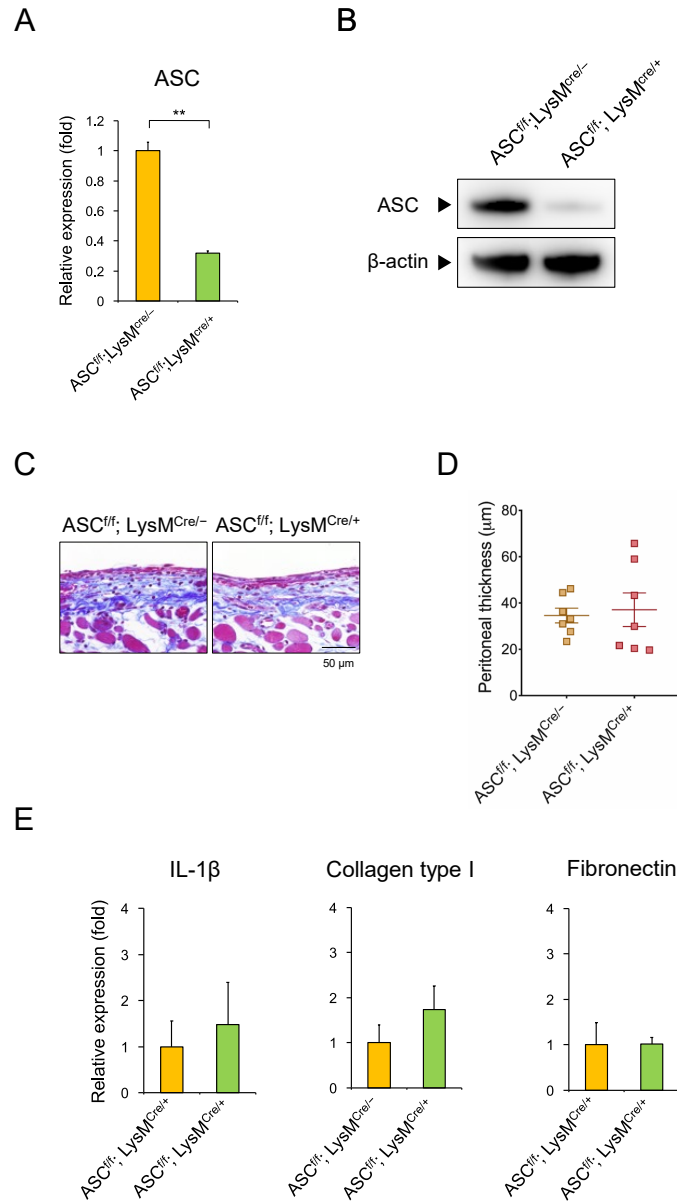


図 11. マクロファージ特異的 ASC 欠損は腹膜線維化に影響しない

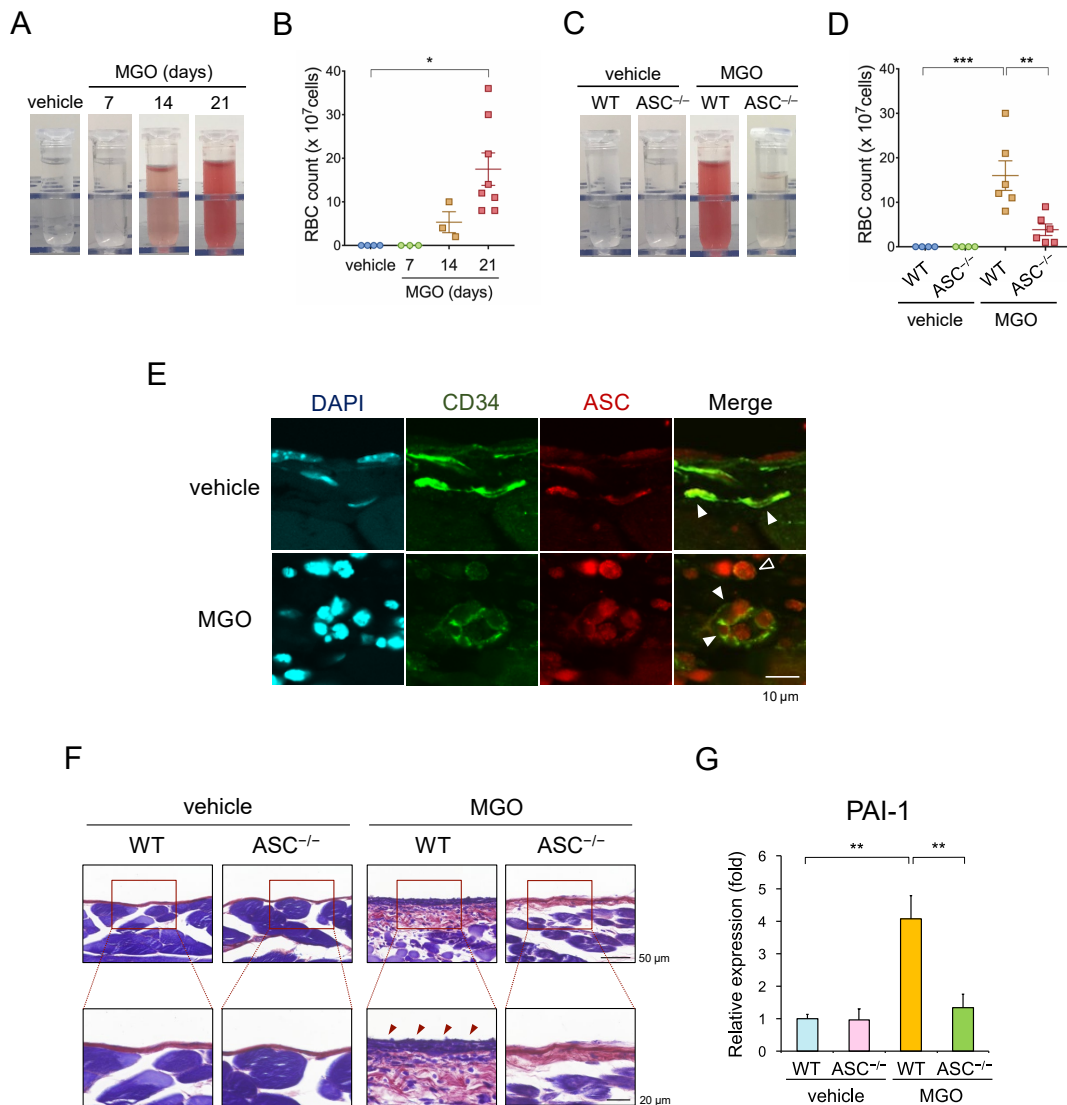
(A, B) ASC<sup>fl/fl</sup>; LysM<sup>Cre/-</sup>マウスと ASC<sup>fl/fl</sup>; LysM<sup>Cre/+</sup>マウスから分離した骨髄由来マクロファージ (BMDM)における(A) mRNA 発現 (B) 蛋白発現をそれぞれ Real-time PCR 法、Western Blotting 法を用いて評価した。(C-E) ASC<sup>fl/fl</sup>; LysM<sup>Cre/-</sup>マウス, ASC<sup>fl/fl</sup>; LysM<sup>Cre/+</sup>マウスに MGO または vehicle を 21 日間投与し、腹膜線維症モデルを作成した。(C) 壁側腹膜の Masson's Trichrome 染色像。(D) 腹膜肥厚度の定量化グラフ。(E) 壁側腹膜組織におけ



る IL-1 $\beta$ , Collagen type 1, Fibronectin における mRNA 発現。数値データは平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。\* $p < 0.05$ 、\*\* $p < 0.01$ 。

### 3-6. PF モデルにおける血性腹水とフィブリン沈着

過去の報告において、腹膜線維症や EPS における血管傷害の重要性が示されている(14, 37)。MGO 腹膜線維症モデルにおいても、MGO 投与により血性腹水が誘発され、継時的に増悪することを確認した (図 12A)。腹腔内洗浄液中に含まれる赤血球数は継時的に増加し、21 日目で統計学的有意差に達した (図 12B)。さらに、MGO 投与による腹腔内出血は ASC<sup>+</sup>マウスにおいて抑制された (図 12C, D)。以上の結果より、血管内皮傷害が示唆されたため、WT マウスの腹膜において血管内皮マーカーである CD34 と ASC の蛍光免疫染色を施行したところ、両マーカーの共局在化を認めた (図 12E)。MGO は WT マウスの腹膜においてフィブリン沈着も誘発し、それらの所見は ASC<sup>+</sup>マウスで抑制された (図 12F)。同様に、内皮障害マーカーである PAI-1 の遺伝子発現も MGO 群の腹膜組織において有意に上昇し、ASC<sup>+</sup>マウスで抑制された (図 12G)。これらの所見より、血管内皮傷害が MGO 腹膜線維症の発症に関与することが示唆された。



## 図 12. ASC 欠損は腹腔内出血とフィブリン沈着を抑制する

(A-D) WT もしくは ASC<sup>+</sup>マウスに MGO または vehicle を一定期間投与し、PF モデルを作成した。(A) WT マウスの腹腔内洗浄液の代表的写真。(B) WT マウスの腹腔内洗浄液中に含まれる赤血球数の定量グラフ (n=3-8)。(C) WT, ASC<sup>+</sup>マウスの腹腔内洗浄液の代表的写真。(D) 腹腔内洗浄液中の赤血球数の定量グラフ (n=3-8)。(E) WT 壁側腹膜における CD34 (緑)と ASC (赤)の二重蛍光免疫染色像。▲は内皮細胞、△は浸潤マクロファージをそれぞれ示している。(F) WT マウスの壁側腹膜におけるフィブリン沈着を評価するための PTAH 染色像。各群の代表的写真を示した。(G) 壁側腹膜における PAI-1 の

mRNA 発現を示した (day 21, n=3-8)。数値データは平均値±標準誤差で示した。\* $p < 0.05$ 、\*\* $p < 0.01$ 、\*\*\* $p < 0.001$ 。

### 3-7. 血管内皮細胞における酸化ストレス、細胞死、IL-1 $\beta$ の評価

これまでの *in vivo* の実験結果より、血管内皮傷害の重要性が示唆されたため、次に血管内皮細胞を用いた *in vitro* の系で検討した。過去の報告において最も実験に使用されているヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVECs) と ASC 欠損の影響を確認するためマウス初代肺血管内皮細胞 (MLVECs) を用いた。MGO (1 mM) は HUVECs において継時的に細胞死を誘導した (死細胞のみを染色する SYTOX 試薬を用いて評価) (図 13A, B)。次にインフラマソームの活性化により成熟型として分泌される炎症性サイトカイン IL-1 $\beta$  の血管内皮細胞における影響を検討するため、HUVECs に MGO と IL-1 $\beta$  の共刺激を行ったところ、MGO 投与により誘導される血管内皮細胞死における IL-1 $\beta$  の相乗効果が示された (図 13B)。次に、MGO は酸化ストレス(ROS)を誘導することが知られているため(11)、DCFDA 蛍光試薬を用いて ROS の評価を行い、MGO は HUVECs において ROS を誘導することを見出した (図 13C)。さらに、MGO 誘導による細胞死は抗酸化剤 NAC により有意に抑制された(図 13D)。次に ASC 欠損による血管内皮細胞死の影響を検討するため、WT マウスと ASC<sup>-/-</sup>マウスから MLVECs を採取した。MLVECs がそれぞれ血管内皮細胞に特異的なマーカーである VE-cadherin を発現しており、WT マウスから採取した MLVECs が ASC を発現していることを Western Blotting 法にて確認した (図 13 E)。HUVECs と同様、WT 由来の MLVECs において MGO は細胞死を誘導し、ASC<sup>-/-</sup>由来の MLVECs で細胞死の程度は有意に抑制された (図 13F, G)。

最後に、腹膜線維化におけるインフラマソームの関与を評価するため、IL-1 $\beta$ <sup>+</sup>マウスを使用した。NLRP3<sup>+</sup>, ASC<sup>+</sup>マウスと同様、MGO 投与により誘導される腹膜の線維性肥厚は IL-1 $\beta$ <sup>+</sup>マウスで有意に抑制された (図 13H, I)。以上より、MGO 腹膜線維症モデルにおいて、NLRP3 インフラマソームの活性化により誘導される IL-1 $\beta$  の重要な役割が示唆された。

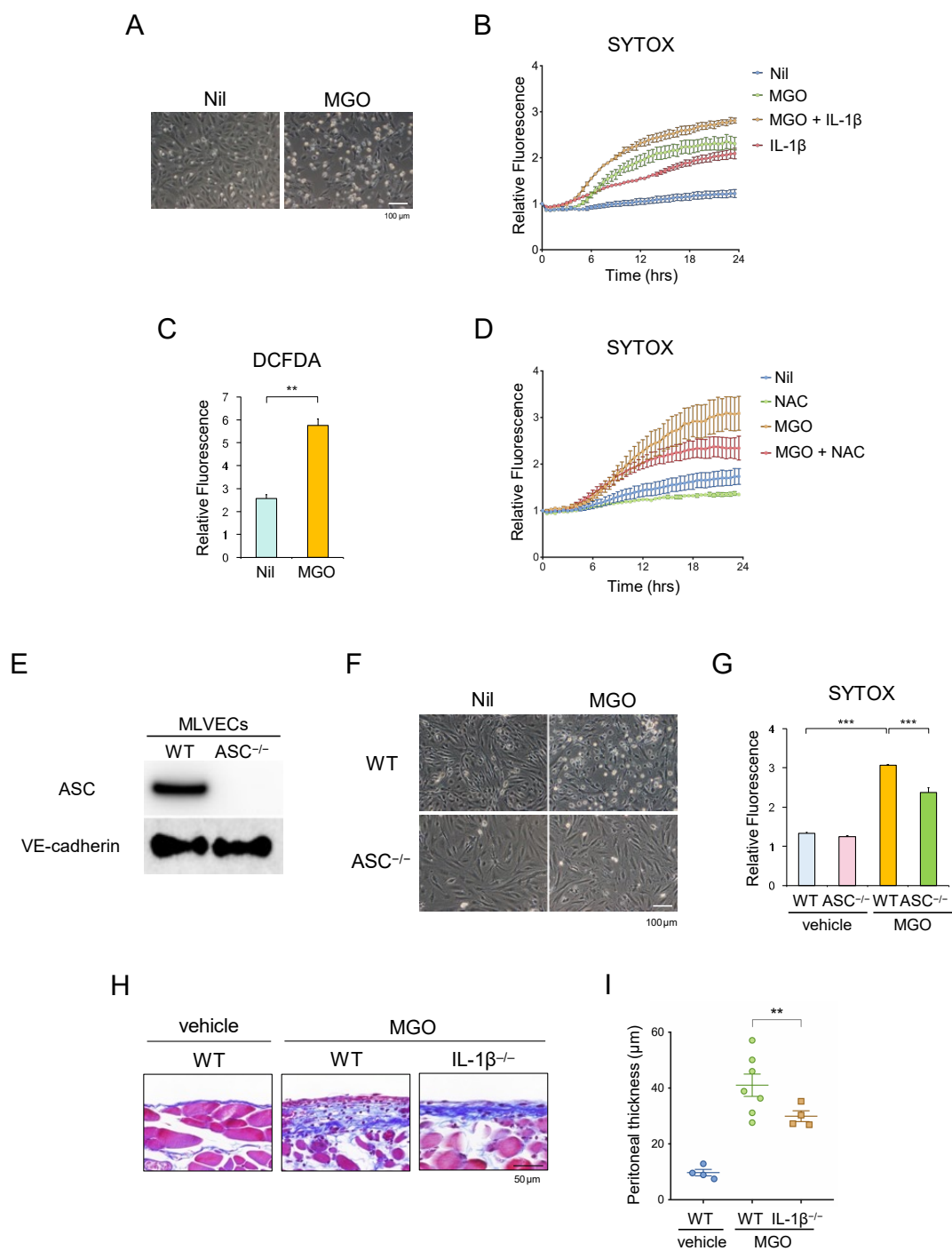


図 13. 血管内皮細胞における酸化ストレス、細胞死、IL-1 $\beta$  の関与  
 (A) HUVECs を MGO 1mM で 24 時間反応させた際の HUVECs の代表的な細胞写真 (スケールバー; 100  $\mu$ m) (B) HUVECs に MGO 1mM, IL-1 $\beta$  を添加し、SYTOX Green 蛍光試薬

を反応させ、マイクロプレートリーダーにて蛍光強度を 30 分間隔で測定し、細胞死の継時的変化を評価した(n=4)。(C) HUVECs を 1mM MGO で 3 時間刺激後、酸化ストレス (ROS)を DCFDA probe で検出し、マイクロプレートリーダーにて測定した(n=4)。(D) HUVECs を 1mM MGO、25 mmol/L NAC で刺激し、SYTOX Green 蛍光試薬を反応させ、マイクロプレートリーダーにて 30 分間隔で測定し、細胞死の継時的変化を評価した(n=4)。(E) MLVECs における VE-cadherin, ASC,  $\beta$ -actin の発現を Western blotting 法で検出した。(F-G) WT, ASC<sup>+</sup>マウスから採取した MLVECs を MGO 1mM で 12 時間刺激した後、SYTOX Green 蛍光試薬を反応させた。(F) MLVECs の代表的な写真。(G) SYTOX Green の蛍光強度をマイクロプレートリーダーにて測定した(n=4)。(H-I) WT, IL-1 $\beta$ <sup>+</sup>マウスに MGO もしくは vehicle 液を 21 日間投与した。(H) 壁側腹膜の Masson's Trichrome 染色像。(I) 腹膜肥厚度の定量化グラフ。数値データは平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。 $*p < 0.01$ 、 $**p < 0.001$ 。

## 第4章 考察

本研究の結果から得られた所見は以下の通りである。1) MGO 投与により腹膜におけるインフラマソーム関連分子の遺伝子発現は亢進した。2) MGO は壁側腹膜と臓側腹膜の線維化を誘導し、NLRP3, ASC 欠損マウスにおいて線維化の程度は有意に抑制された。3) ASC 欠損は炎症性サイトカインと線維化因子を抑制し、マクロファージの浸潤を抑制した。しかし、マクロファージ特異的 ASC 欠損は腹膜の線維化を抑制しなかった。4) MGO は腹腔内出血、フィブリン沈着、PAI-1 の発現を誘導し、これらの所見は全て ASC 欠損により抑制された。5) 細胞実験において、MGO は酸化ストレスを介して血管内皮細胞死を誘導し、ASC 欠損によりその程度は抑制された。6) 腹膜線維化は IL-1 $\beta$  欠損マウスにおいても抑制された。以上の結果より、腹膜線維症の発症機序における NLRP3 インフラマソームの関与が示唆された。本研究は、腹膜の無菌性炎症と線維化における NLRP3 インフラマソームの重要性を示した初めての報告である。

生体適合性の低い PD 液の腹腔内長期暴露は、細胞ストレスと組織障害を誘発し、無菌性炎症を引き起こす。腹腔内における無菌性炎症の持続は、腹膜の線維化を誘導し、一部の患者では致死率の高い EPS を発症する(7, 10)。しかし、これらの病態に関する詳細な発症機序は未だ解明されていない。

PD 関連腹膜線維症の病態を解析するための動物モデルとして、1. クロロヘキシジン投与 2. グルコース含有酸性透析液投与 3. MGO 投与、が報告されている(35)。これらの全てのモデルは、腹膜線維症の病理学的所見の特徴である腹膜中皮下層の肥厚、炎症細胞浸潤、血管新生を誘導する。しかし、消毒薬として使用されるクロロヘキシジンと異なり、従来型の透

析液には MGO を含む GDPs を含んでおり、臨床を反映するモデルと考えられる。一方、グルコース含有酸性透析液も臨床で使用される透析液であるが、線維化を誘導するために 6~8 週間の腹腔内投与が必要である。

MGO は合計 2~3 週間投与で線維化が誘導できるため、実施可能かつ臨床を反映するモデルとして適切と考え、今回の解析に使用するモデルとして採用した。

また、過去の報告で認められる腹膜の病理学的所見に加えて、肉眼的に腸間膜の収縮と癒着を誘発することを本研究で新たに見出した。この所見は、EPS の臨床所見である腸管の被囊、繭玉形成 (abdominal cocoon) に相当する。実際、Yamahatsu らは腹腔鏡による早期診断と治療が EPS 患者の死亡率を改善したと報告しており(38)、PD 患者における腸間膜の肉眼所見は臨床面においても重要な所見である。

近年、腹膜線維症の発症過程において炎症細胞、特にマクロファージの重要性が提唱されている(39, 40)。さらに、NLRP3 インフラマソームは主に炎症細胞で役割を担っていると考えられていることから(16, 21)、骨髄由来細胞特異的 ASC 欠損マウスを用いて MGO 腹膜線維症モデルを作製し表現型を解析した。しかし、骨髄由来細胞特異的 ASC 欠損は MGO により誘導される腹膜の炎症と線維化を抑制しなかった。Huen らはマクロファージ特異的 TGF- $\beta$  欠損は腎虚血再灌流障害や閉塞性腎症に伴う腎線維化を抑制しなかったと報告しており(41)、これは我々の所見を支持する。さらに、尿細管特異的 Keap1 欠損は腎虚血再灌流障害における腎障害と線維化を改善したにも関わらず、骨髄由来細胞特異的 Keap1 欠損は腎虚血再灌流障害における腎障害と線維化を抑制しなかったとの報告も存在し(42)、線維化の過程で骨髄由来細胞以外の細胞が関与している可能性も十分考えられる。



次に、腹膜線維症の病態における血管内皮細胞の役割に着目した。その理由を以下に二つ挙げる。

① *in vivo* において血管内皮傷害を示唆する所見 (フィブリン沈着、血性腹水、PAI-1 上昇)

本研究において MGO 投与は、腹膜フィブリン沈着、血性腹水、PAI-1 の発現上昇など、血管内皮傷害を示唆する所見を認めた。腹膜フィブリン沈着と腸管の被嚢化は、EPS の最も特徴的な所見である(7)。フィブリンは腹膜の血管からの血漿滲出物に由来すると考えられている(43)。血性腹水は EPS 患者においてよく観察される臨床所見の一つである(7)。線溶系を阻害する重要な因子の一つとして知られている PAI-1 の値は、PD 期間に比例して上昇することが知られている(44)。さらに、PD 排液中の PAI-1 の値は、非 EPS 患者群と比較し EPS 患者群において有意に上昇するとの報告も存在する(44, 45)。

② PD における血管内皮傷害の重要性を示す報告

血管内皮傷害と血管新生は腹膜線維症や EPS における特徴的な所見として知られている。Williams らは、腹膜組織における中皮下層の肥厚と血管新生は PD 期間に比例して上昇すると報告している(37)。Tawada らは、血管傷害とフィブリン沈着は EPS 発症を予測する所見であると述べている(14)。近年の研究では、血管内皮細胞においても NLRP3 インフラマソーム由来の無菌性炎症が惹起されうるとの報告もある(46)。

以上の理由より、申請者は本研究において腹膜の血管内皮細胞に着目した。最初に *in vivo* において WT マウスから採取した腹膜の蛍光免疫染色を施行し、CD34 陽性血管内皮細胞において ASC が共発現していることを示した。次に、*in vitro* の実験において、ヒト初代血管内皮細胞 (HUVECs)を用いて、MGO が ROS 産生を介して細胞死を継時的に誘導す

ることを示した。MGO が ROS を誘導することは既に複数の研究で示されている(11, 47)。また、MGO は、細胞死を誘導することも幾つかの既報で示されており(48-50)、本研究結果と矛盾しない。

そして、マウス初代血管内皮細胞を用いて MGO による血管内皮細胞死は ASC 欠損により有意に抑制されることを示した。次に、インフラマソーム活性化により成熟型に変換され、細胞外に分泌される炎症性サイトカイン IL-1 $\beta$  に着目した。血管内皮細胞において IL-1 $\beta$  刺激が細胞毒性をきたすことは他研究においても示されているが(51, 52)、MGO と IL-1 $\beta$  の二つが同時に存在すると細胞死が増強されることを示したのは本研究が初めてである。

以上より、PD 関連腹膜線維症において、内皮由来の NLRP3 インフラマソームが PD 関連腹膜線維症の発症において重要な役割を担っていることが示唆された (図 14)。

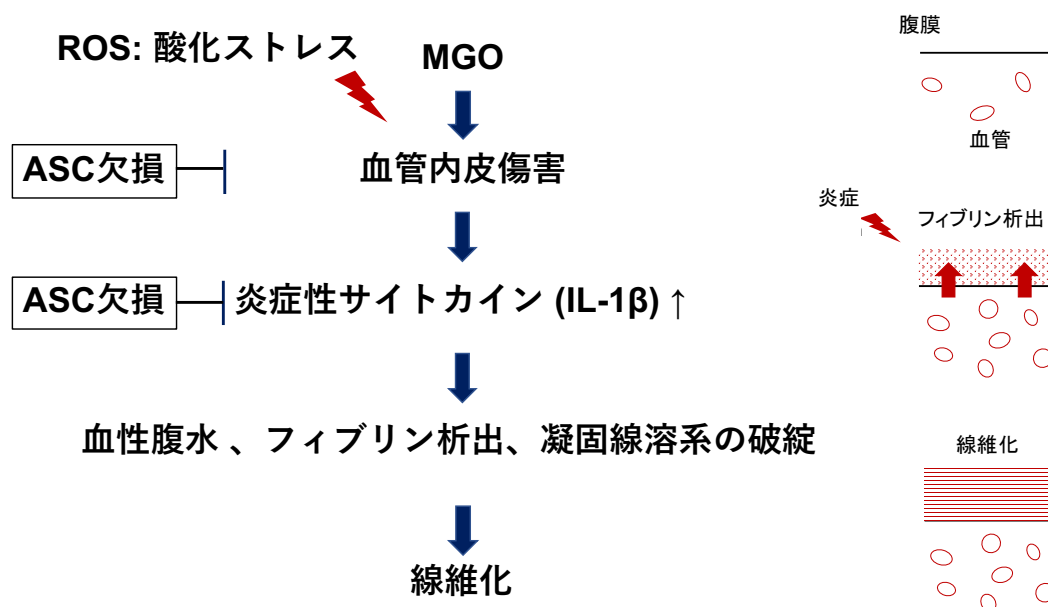


図 14. PD 腹膜線維症の発症機序

## 第6章 今後の課題

本研究の課題としては以下の点が挙げられる。

### ① 腹膜線維症における血管内皮細胞の寄与度と他細胞の関与

申請者は本研究において MGO 腹膜線維症モデルにおける血管内皮細胞の役割を示したが、血管内皮細胞において NLRP3 インフラマソーム構成分子を欠損したマウスを用いた腹膜線維症モデルの解析ができなかったため、今後の検討課題である。現在、VE-cadherin-Cre もしくは Tie2-Cre マウスと flox-ASC マウスを交配させ、血管内皮特異的 ASC 欠損マウスの作製を進めている。将来的には、これらのコンディショナルノックアウトマウスで腹膜線維症モデルを作製し、詳細に検討を加える必要があると考える。また、本病態における中皮細胞や組織に常在する線維芽細胞 (resident fibroblasts) の関与も否定はできない。実際、平原らはラットにおける MGO 腹膜線維症において間葉系細胞様中皮細胞 (mesenchymal-like mesothelial cells) が出現し、MGO 刺激に伴い中皮細胞において上皮間葉転換に関連するマーカーが有意に上昇すると報告している(12)。また最近 Ko らはヒト中皮細胞において TGF- $\beta$  誘導性上皮間葉転換は NLRP3 インフラマソームを介すると報告した(53)。今後、腹膜線維症における NLRP3 インフラマソームの役割について上記の内容を含めた発展的な解析を追加していくことが必要である。

### ② MGO がインフラマソームを活性化する機序

本研究ではインフラマソーム欠損マウスを用いた解析を行うことにより、腹膜線維症におけるインフラマソームの重要な役割を示した。しか

し、*in vitro* では血管内皮細胞やマクロファージに MGO 刺激を行っても成熟型 IL-1 $\beta$  は産生されなかった。

インフラマソーム活性化のためには2つのシグナルが必要とされている(17)。1つ目のシグナルは Toll-like receptor を介して NF- $\kappa$ B の転写因子を活性化することにより、pro-IL-1 $\beta$  を誘導する。2つ目のシグナル (危険シグナル : Danger signal)は NLRP3 インフラマソームを活性化することにより pro-IL-1 $\beta$  を切断し、成熟型の IL-1 $\beta$  へ変換する。そこで、LPS (lipopolysaccharide)でプライミングを行い pro-IL-1 $\beta$  を誘導した後に、2つ目のシグナルとしてマクロファージと血管内皮細胞に MGO 刺激を行ったが、成熟型の IL-1 $\beta$  は検出されなかった。しかし、*in vivo* では MGO 由来の AGE (advanced glycation end-products)をマウスに投与すると腎障害を誘導し、腎組織においてインフラマソームが活性化することを示した報告がある(54)。生体内では MGO 単独ではなく他経路を介したインフラマソーム活性化機序が存在する可能性があるが、それを示した報告はこれまでに存在せず、今後さらに検討していくべきであろう。

### ③ MGO が誘導する細胞死の種類

本研究では、死細胞のみを染色する SYTOX 蛍光試薬を用いて評価した。しかし、この SYTOX 試薬を用いた解析では、MGO が誘導する細胞死の種類は不明である。過去の報告では、MGO が誘導する細胞死の多くはアポトーシス (apoptosis)であることが示されており(48-50)、フローサイトメトリー法を用いた解析では、7-AAD 陽性のネクローシス (necrosis)細胞も認められている。しかし、MGO が Caspase-1 に依存したプログラム細胞死であるパイロトーシス (pyroptosis)を誘導した報告はこれまでに存在しない。MGO 投与により血管内皮細胞において活性型 Caspase-1 が分

泌されるかどうか Western Blotting 法で検討してみたが、MGO 刺激により成熟型 Caspase-1 は検出されなかった。近年、上述のアポトーシスやパイロトーシス以外に、ネクロプトーシス (necroptosis)、オートファジー (autophagy)、フェロトーシス (ferroptosis) など、様々な種類の細胞死の存在が知られている(55)。今後は MGO が誘導する細胞死の様式についても検討が望ましい。

#### ④インフラマソームをターゲットとした腹膜線維症の治療法開発

インフラマソームをターゲットとした治療として、IL-1 阻害薬 (Anakinra, Canakinumab, Rilonacept) を用いた治療が挙げられる。既に Hautem らはマウスを用いた実験において Anakinra は LPS や大腸菌による腹膜炎に伴う腹膜組織変化や腹膜機能不全を改善することを報告している(27)。無菌性炎症に伴う腹膜線維化における IL-1 受容体拮抗薬の効果については報告がなく、今後の検討課題と考える。

## 第7章 おわりに

MGO 腹膜線維症モデルにおいて ASC 欠損は腹膜の炎症・線維化のみならず、ヒト EPS の症例に特徴的とされる腸間膜の癒着や血性腹水、フィブリン沈着の所見を改善した。さらに、ASC 欠損は MGO により誘導される血管内皮細胞死と酸化ストレスを抑制し、腹膜線維症の病態に寄与することが示唆された。本研究成果が腹膜線維症における病態解明と新規治療薬への開発に繋がることが期待される。

### 謝辞

本研究を行う機会を与えて頂き、学位論文を提出するにあたり、ご指導を頂いた自治医科大学内科学講座腎臓内科学部門教授 長田太助先生、自治医科大学分子病態治療研究センター 炎症・免疫研究部教授 高橋将文先生に深く感謝いたします。

また研究計画や遂行につきまして、並ならぬご指導とご尽力を頂きました自治医科大学炎症・免疫研究部の皆様に厚く御礼申し上げます。日々の研究生活を支えて下さいました自治医科大学内科学講座腎臓内科学部門の皆様にも深く感謝申し上げます。

## 引用文献

1. 政金 生人, 谷口 正智, 中井 滋, 土田 健司, 和田 篤志, 尾形 聡, 長谷川 毅, 濱野 高行, 花房 規男, 星野 純一, 後藤 俊介, 水口 潤, 山本 景一, 中元 秀友. わが国の慢性透析療法の現況 (2016年12月31日現在). *日本透析医学会雑誌* 51: 1-51, 2018.
2. 中山昌明. 腹膜透析療法の現状と治療の位置づけ. *日本透析医学会雑誌* 38: 1157-1163, 2005.
3. Kawaguchi, Y., Saito, A., Kawanishi, H., Nakayama, M., Miyazaki, M., Nakamoto, H., and Tranaeus, A. Recommendations on the management of encapsulating peritoneal sclerosis in Japan, 2005: diagnosis, predictive markers, treatment, and preventive measures. *Peritoneal dialysis international : journal of the International Society for Peritoneal Dialysis* 25 Suppl 4: S83-95, 2005.
4. Jain, A. K., Blake, P., Cordy, P., and Garg, A. X. Global Trends in Rates of Peritoneal Dialysis. *Journal of the American Society of Nephrology* 23: 533-544, 2012.
5. Devuyst, O., Margetts, P. J., and Topley, N. The pathophysiology of the peritoneal membrane. *J Am Soc Nephrol* 21: 1077-1085, 2010.
6. Working Group Committee for Preparation of Guidelines for Peritoneal Dialysis, J. S. f. D. T., and Japanese Society for Dialysis, T. 2009 Japanese Society for Dialysis Therapy guidelines for peritoneal dialysis. *Ther Apher Dial* 14: 489-504, 2010.
7. Moinuddin, Z., Summers, A., Van Dellen, D., Augustine, T., and Herrick, S. E. Encapsulating peritoneal sclerosis-a rare but devastating peritoneal

- disease. *Front Physiol* 5: 470, 2014.
8. Kawaguchi, Y., Kawanishi, H., Mujais, S., Topley, N., and Oreopoulos, D. G. Encapsulating peritoneal sclerosis: definition, etiology, diagnosis, and treatment. International Society for Peritoneal Dialysis Ad Hoc Committee on Ultrafiltration Management in Peritoneal Dialysis. *Peritoneal dialysis international : journal of the International Society for Peritoneal Dialysis* 20 Suppl 4: S43-55, 2000.
  9. Honda, K., and Oda, H. Pathology of encapsulating peritoneal sclerosis. *Peritoneal dialysis international : journal of the International Society for Peritoneal Dialysis* 25 Suppl 4: S19-29, 2005.
  10. Zhou, Q., Bajo, M. A., Del Peso, G., Yu, X., and Selgas, R. Preventing peritoneal membrane fibrosis in peritoneal dialysis patients. *Kidney Int* 90: 515-524, 2016.
  11. Miyazawa, N., Abe, M., Souma, T., Tanemoto, M., Abe, T., Nakayama, M., and Ito, S. Methylglyoxal augments intracellular oxidative stress in human aortic endothelial cells. *Free Radic Res* 44: 101-107, 2010.
  12. Hirahara, I., Ishibashi, Y., Kaname, S., Kusano, E., and Fujita, T. Methylglyoxal induces peritoneal thickening by mesenchymal-like mesothelial cells in rats. *Nephrol Dial Transplant* 24: 437-447, 2009.
  13. Hirahara, I., Kusano, E., Yanagiba, S., Miyata, Y., Ando, Y., Muto, S., and Asano, Y. Peritoneal injury by methylglyoxal in peritoneal dialysis. *Peritoneal dialysis international : journal of the International Society for Peritoneal Dialysis* 26: 380-392, 2006.
  14. Tawada, M., Ito, Y., Hamada, C., Honda, K., Mizuno, M., Suzuki, Y., Sakata, F., Terabayashi, T., Matsukawa, Y., Maruyama, S., Imai, E., Matsuo, S., and



- Takei, Y. Vascular Endothelial Cell Injury Is an Important Factor in the Development of Encapsulating Peritoneal Sclerosis in Long-Term Peritoneal Dialysis Patients. *PLoS One* 11: e0154644, 2016.
15. Takahashi, M. NLRP3 inflammasome as a novel player in myocardial infarction. *Int Heart J* 55: 101-105, 2014.
  16. Karasawa, T., and Takahashi, M. Role of NLRP3 Inflammasomes in Atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb* 24: 443-451, 2017.
  17. He, Y., Hara, H., and Nunez, G. Mechanism and Regulation of NLRP3 Inflammasome Activation. *Trends Biochem Sci* 41: 1012-1021, 2016.
  18. Anders, H. J., and Muruve, D. A. The inflammasomes in kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 22: 1007-1018, 2011.
  19. Kawaguchi, M., Takahashi, M., Hata, T., Kashima, Y., Usui, F., Morimoto, H., Izawa, A., Takahashi, Y., Masumoto, J., Koyama, J., Hongo, M., Noda, T., Nakayama, J., Sagara, J., Taniguchi, S., and Ikeda, U. Inflammasome activation of cardiac fibroblasts is essential for myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circulation* 123: 594-604, 2011.
  20. Usui, F., Shirasuna, K., Kimura, H., Tatsumi, K., Kawashima, A., Karasawa, T., Hida, S., Sagara, J., Taniguchi, S., and Takahashi, M. Critical role of caspase-1 in vascular inflammation and development of atherosclerosis in Western diet-fed apolipoprotein E-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun* 425: 162-168, 2012.
  21. Usui, F., Shirasuna, K., Kimura, H., Tatsumi, K., Kawashima, A., Karasawa, T., Yoshimura, K., Aoki, H., Tsutsui, H., Noda, T., Sagara, J., Taniguchi, S., and Takahashi, M. Inflammasome activation by mitochondrial oxidative stress in macrophages leads to the development of angiotensin II-induced

- aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 35: 127-136, 2015.
22. Komada, T., Usui, F., Shirasuna, K., Kawashima, A., Kimura, H., Karasawa, T., Nishimura, S., Sagara, J., Noda, T., Taniguchi, S., Muto, S., Nagata, D., Kusano, E., and Takahashi, M. ASC in renal collecting duct epithelial cells contributes to inflammation and injury after unilateral ureteral obstruction. *Am J Pathol* 184: 1287-1298, 2014.
  23. Guo, H., Callaway, J. B., and Ting, J. P. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nat Med* 21: 677-687, 2015.
  24. Komada, T., Usui, F., Kawashima, A., Kimura, H., Karasawa, T., Inoue, Y., Kobayashi, M., Mizushina, Y., Kasahara, T., Taniguchi, S., Muto, S., Nagata, D., and Takahashi, M. Role of NLRP3 Inflammasomes for Rhabdomyolysis-induced Acute Kidney Injury. *Sci Rep* 5: 10901, 2015.
  25. Anders, H. J., and Schaefer, L. Beyond tissue injury-damage-associated molecular patterns, toll-like receptors, and inflammasomes also drive regeneration and fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 25: 1387-1400, 2014.
  26. Wang, W., Wang, X., Chun, J., Vilaysane, A., Clark, S., French, G., Bracey, N. A., Trpkov, K., Bonni, S., Duff, H. J., Beck, P. L., and Muruve, D. A. Inflammasome-independent NLRP3 augments TGF-beta signaling in kidney epithelium. *J Immunol* 190: 1239-1249, 2013.
  27. Hautem, N., Morelle, J., Sow, A., Corbet, C., Feron, O., Goffin, E., Huaux, F., and Devuyst, O. The NLRP3 Inflammasome Has a Critical Role in Peritoneal Dialysis-Related Peritonitis. *J Am Soc Nephrol* 28: 2038-2052, 2017.
  28. Kitamura, M., Nishino, T., Obata, Y., Furusu, A., Hishikawa, Y., Koji, T., and Kohno, S. Epigallocatechin gallate suppresses peritoneal fibrosis in

- mice. *Chemico-biological interactions* 195: 95-104, 2012.
29. Terabayashi, T., Ito, Y., Mizuno, M., Suzuki, Y., Kinashi, H., Sakata, F., Tomita, T., Iguchi, D., Tawada, M., Nishio, R., Maruyama, S., Imai, E., Matsuo, S., and Takei, Y. Vascular endothelial growth factor receptor-3 is a novel target to improve net ultrafiltration in methylglyoxal-induced peritoneal injury. *Laboratory Investigation* 95: 1029-1043, 2015.
  30. Nagai, T., Doi, S., Nakashima, A., Irifuku, T., Sasaki, K., Ueno, T., and Masaki, T. Linagliptin Ameliorates Methylglyoxal-Induced Peritoneal Fibrosis in Mice. *PLoS One* 11: e0160993, 2016.
  31. Yajima, N., Takahashi, M., Morimoto, H., Shiba, Y., Takahashi, Y., Masumoto, J., Ise, H., Sagara, J., Nakayama, J., Taniguchi, S., and Ikeda, U. Critical role of bone marrow apoptosis-associated speck-like protein, an inflammasome adaptor molecule, in neointimal formation after vascular injury in mice. *Circulation* 117: 3079-3087, 2008.
  32. Lewis Carl, S., Gillete-Ferguson, I., Ferguson, D. G. J. J. o. H., and Cytochemistry. An indirect immunofluorescence procedure for staining the same cryosection with two mouse monoclonal primary antibodies. 41: 1273-1278, 1993.
  33. Ansorg, A., Bornkessel, K., Witte, O. W., and Urbach, A. Immunohistochemistry and multiple labeling with antibodies from the same host species to study adult hippocampal neurogenesis. *J Vis Exp*: 2015.
  34. Beederman, M., Lamplot, J. D., Nan, G., Wang, J., Liu, X., Yin, L., Li, R., Shui, W., Zhang, H., Kim, S. H., Zhang, W., Zhang, J., Kong, Y., Denduluri, S., Rogers, M. R., Pratt, A., Haydon, R. C., Luu, H. H., Angeles, J., Shi, L. L., and He, T. C. BMP signaling in mesenchymal stem cell differentiation

- and bone formation. *J Biomed Sci Eng* 6: 32-52, 2013.
35. Kitamura, M., Nishino, T., Obata, Y., Ozono, Y., Koji, T., and Kohno, S. New insights into therapeutic strategies for the treatment of peritoneal fibrosis: learning from histochemical analyses of animal models. *Acta Histochem Cytochem* 47: 133-143, 2014.
  36. Aalami, O. O., Allen, D. B., and Organ, C. H. Chylous ascites: A collective review. *Surgery* 128: 761-778, 2000.
  37. Williams, J. D., Craig, K. J., Topley, N., Von Ruhland, C., Fallon, M., Newman, G. R., Mackenzie, R. K., and Williams, G. T. Morphologic changes in the peritoneal membrane of patients with renal disease. *J Am Soc Nephrol* 13: 470-479, 2002.
  38. Yamahatsu, A., Hamada, C., Kaneko, K., Io, H., Nakata, J., and Tomino, Y. Long-term outcome of encapsulating peritoneal sclerosis (EPS) patients in a single center. *Clin Exp Nephrol* 19: 961-967, 2015.
  39. Bellon, T., Martinez, V., Lucendo, B., del Peso, G., Castro, M. J., Aroeira, L. S., Rodriguez-Sanz, A., Ossorio, M., Sanchez-Villanueva, R., Selgas, R., and Bajo, M. A. Alternative activation of macrophages in human peritoneum: implications for peritoneal fibrosis. *Nephrol Dial Transplant* 26: 2995-3005, 2011.
  40. Kushiya, T., Oda, T., Yamada, M., Higashi, K., Yamamoto, K., Oshima, N., Sakurai, Y., Miura, S., and Kumagai, H. Effects of liposome-encapsulated clodronate on chlorhexidine gluconate-induced peritoneal fibrosis in rats. *Nephrology Dialysis Transplantation* 26: 3143-3154, 2011.
  41. Huen, S. C., Moeckel, G. W., and Cantley, L. G. Macrophage-specific deletion of transforming growth factor-beta1 does not prevent renal fibrosis

- after severe ischemia-reperfusion or obstructive injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 305: F477-484, 2013.
42. Nezu, M., Souma, T., Yu, L., Suzuki, T., Saigusa, D., Ito, S., Suzuki, N., and Yamamoto, M. Transcription factor Nrf2 hyperactivation in early-phase renal ischemia-reperfusion injury prevents tubular damage progression. *Kidney Int* 91: 387-401, 2017.
43. Nakayama, M. The plasma leak-to-response hypothesis: a working hypothesis on the pathogenesis of encapsulating peritoneal sclerosis after long-term peritoneal dialysis treatment. *Peritoneal dialysis international : journal of the International Society for Peritoneal Dialysis* 25 Suppl 4: S71-76, 2005.
44. Lopes Barreto, D., Struijk, D. G., and Krediet, R. T. Peritoneal effluent MMP-2 and PAI-1 in encapsulating peritoneal sclerosis. *Am J Kidney Dis* 65: 748-753, 2015.
45. Barreto, D. L., Coester, A. M., Struijk, D. G., and Krediet, R. T. Can effluent matrix metalloproteinase 2 and plasminogen activator inhibitor 1 be used as biomarkers of peritoneal membrane alterations in peritoneal dialysis patients? *Peritoneal dialysis international : journal of the International Society for Peritoneal Dialysis* 33: 529-537, 2013.
46. Chen, Z., Martin, M., Li, Z., and Shyy, J. Y. Endothelial dysfunction: the role of sterol regulatory element-binding protein-induced NOD-like receptor family pyrin domain-containing protein 3 inflammasome in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 25: 339-349, 2014.
47. Baden, T., Yamawaki, H., Saito, K., Mukohda, M., Okada, M., and Hara, Y. Telmisartan inhibits methylglyoxal-mediated cell death in human vascular

- endothelium. *Biochem Biophys Res Commun* 373: 253-257, 2008.
48. Phalitakul, S., Okada, M., Hara, Y., and Yamawaki, H. Vaspin prevents methylglyoxal-induced apoptosis in human vascular endothelial cells by inhibiting reactive oxygen species generation. *Acta Physiol (Oxf)* 209: 212-219, 2013.
  49. Figarola, J. L., Singhal, J., Rahbar, S., Awasthi, S., and Singhal, S. S. LR-90 prevents methylglyoxal-induced oxidative stress and apoptosis in human endothelial cells. *Apoptosis* 19: 776-788, 2014.
  50. Vulesevic, B., McNeill, B., Giacco, F., Maeda, K., Blackburn, N. J. R., Brownlee, M., Milne, R. W., and Suuronen, E. J. Methylglyoxal-Induced Endothelial Cell Loss and Inflammation Contribute to the Development of Diabetic Cardiomyopathy. *Diabetes* 65: 1699-1713, 2016.
  51. Kimura, H., Gules, I., Meguro, T., and Zhang, J. H. Cytotoxicity of cytokines in cerebral microvascular endothelial cell. *Brain research* 990: 148-156, 2003.
  52. Wang, D., Wang, Q., Yan, G., Qiao, Y., Sun, L., Zhu, B., Tang, C., and Gu, Y. High glucose and interleukin 1beta-induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells involves in down-regulation of monocarboxylate transporter 4. *Biochemical and biophysical research communications* 466: 607-614, 2015.
  53. Ko, J., Kang, H. J., Kim, D. A., Ryu, E. S., Yu, M., Lee, H., Lee, H. K., Ryu, H. M., Park, S. H., Kim, Y. L., and Kang, D. H. Paricalcitol attenuates TGF-beta1-induced phenotype transition of human peritoneal mesothelial cells (HPMCs) via modulation of oxidative stress and NLRP3 inflammasome. *FASEB J*: fj201800292RR, 2018.

54. Yeh, W. J., Yang, H. Y., Pai, M. H., Wu, C. H., and Chen, J. R. Long-term administration of advanced glycation end-product stimulates the activation of NLRP3 inflammasome and sparking the development of renal injury. *The Journal of nutritional biochemistry* 39: 68-76, 2017.
55. Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., Alnemri, E. S., Altucci, L., Amelio, I., Andrews, D. W., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Antonov, A. V., Arama, E., Baehrecke, E. H., Barlev, N. A., Bazan, N. G., Bernassola, F., Bertrand, M. J. M., Bianchi, K., Blagosklonny, M. V., Blomgren, K., Borner, C., Boya, P., Brenner, C., Campanella, M., Candi, E., Carmona-Gutierrez, D., Cecconi, F., Chan, F. K., Chandel, N. S., Cheng, E. H., Chipuk, J. E., Cidlowski, J. A., Ciechanover, A., Cohen, G. M., Conrad, M., Cubillos-Ruiz, J. R., Czabotar, P. E., D'Angiolella, V., Dawson, T. M., Dawson, V. L., De Laurenzi, V., De Maria, R., Debatin, K. M., DeBerardinis, R. J., Deshmukh, M., Di Daniele, N., Di Virgilio, F., Dixit, V. M., Dixon, S. J., Duckett, C. S., Dynlacht, B. D., El-Deiry, W. S., Elrod, J. W., Fimia, G. M., Fulda, S., Garcia-Saez, A. J., Garg, A. D., Garrido, C., Gavathiotis, E., Golstein, P., Gottlieb, E., Green, D. R., Greene, L. A., Gronemeyer, H., Gross, A., Hajnoczky, G., Hardwick, J. M., Harris, I. S., Hengartner, M. O., Hetz, C., Ichijo, H., Jaattela, M., Joseph, B., Jost, P. J., Juin, P. P., Kaiser, W. J., Karin, M., Kaufmann, T., Kepp, O., Kimchi, A., Kitsis, R. N., Klionsky, D. J., Knight, R. A., Kumar, S., Lee, S. W., Lemasters, J. J., Levine, B., Linkermann, A., Lipton, S. A., Lockshin, R. A., Lopez-Otin, C., Lowe, S. W., Luedde, T., Lugli, E., MacFarlane, M., Madeo, F., Malewicz, M., Malorni, W., Manic, G., Marine, J. C., Martin, S. J., Martinou, J. C., Medema, J. P., Mehlen, P., Meier, P., Melino, S., Miao, E.

A., Molkenstin, J. D., Moll, U. M., Munoz-Pinedo, C., Nagata, S., Nunez, G., Oberst, A., Oren, M., Overholtzer, M., Pagano, M., Panaretakis, T., Pasparakis, M., Penninger, J. M., Pereira, D. M., Pervaiz, S., Peter, M. E., Piacentini, M., Pinton, P., Prehn, J. H. M., Puthalakath, H., Rabinovich, G. A., Rehm, M., Rizzuto, R., Rodrigues, C. M. P., Rubinsztein, D. C., Rudel, T., Ryan, K. M., Sayan, E., Scorrano, L., Shao, F., Shi, Y., Silke, J., Simon, H. U., Sistigu, A., Stockwell, B. R., Strasser, A., Szabadkai, G., Tait, S. W. G., Tang, D., Tavernarakis, N., Thorburn, A., Tsujimoto, Y., Turk, B., Vanden Berghe, T., Vandenabeele, P., Vander Heiden, M. G., Villunger, A., Virgin, H. W., Vousden, K. H., Vucic, D., Wagner, E. F., Walczak, H., Wallach, D., Wang, Y., Wells, J. A., Wood, W., Yuan, J., Zakeri, Z., Zhivotovsky, B., Zitvogel, L., Melino, G., and Kroemer, G. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell death and differentiation* 25: 486-541, 2018.