

腹膜透析患者由来ヒト腹膜中皮細胞における膜補体制御因子の発現

水野正司*1,2 清 祐実*2 井口大旗*2 坂田史子*1,2 鈴木康弘*1,2 伊藤恭彦*1,2

*1 名古屋大学大学院医学系研究科腎不全総合治療学寄附講座 *2 同 腎臓内科

key words : 腹膜透析, 補体, 腹膜障害, 腹膜中皮細胞

要 旨

腹膜透析 (PD) の重要な課題に腹膜障害がある。これまでわれわれは腹膜障害への補体の関与を、ラットを用いて、腹膜表層に膜補体制御蛋白 (CReg) が豊富に存在していること、腹膜上の CReg の機能が妨げられると補体活性系の制御異常による腹膜炎の惹起や腹膜炎の増悪に関わることを報告してきた。PD が、ラット腹膜の CReg の発現の異常を発生する可能性についても示した。このように、実験動物における CReg 発現の重要性を過去に報告してきたが、ヒトでは十分な検討がなされていなかった。このため、本研究では、PD 患者の腹膜生検組織および PD 排液由来ヒト腹膜中皮細胞初代培養細胞を用いて、ヒト腹膜でも三つの CReg (CD46, CD55, CD59) が豊富に発現していること、および PD が腹膜中皮細胞上の CReg の発現に与える影響を PD 患者の臨床状況と比較して解析した。結果は、CD55 発現の程度が、腹膜機能の一つの指標として使用される D/P creatinine と相関していることがわかった。また、発現の影響は細胞表面での補体活性化制御に実際に影響を与えている可能性も示した。

1 緒 言

腹膜透析 (PD) は、腎代替療法の中で在宅医療として扱われる透析療法である。近年、高齢化が進んで

いることで、透析を含む在宅における医療行為が今後の医療のあり方として注目を集めている。在宅医療としての PD の問題点の一つに、種々の理由で長期にわたっての継続が困難なことがあげられ、その代表的な原因の一つに腹膜機能低下があげられる。PD に関連した腹膜機能障害は、長期 PD 施行や酸性液使用、腹膜炎の発生などにより発生・進展していると考えられるが、これらに炎症の関与が多かれ少なかれあると考えられる。自然免疫の一つとして重要な役割を果たす補体活性系は、炎症反応一般に関わっている可能性が様々な実験モデルで示されている¹⁾。

われわれは、腹膜障害の発生・進展について、この補体活性・制御系の関係に着目して、腹膜障害の動物モデルの作成と解析を行ってきた^{2~4)}。しかし、これまでのところ実際の PD 患者の腹膜における補体活性・制御系への影響についてはほとんどわかっていない。このため、本研究の目的として、第一に PD 患者の腹膜生検組織を用いて、ヒトの膜補体制御蛋白 (CReg) である CD46, CD55, CD59 の腹膜における発現を確認した。次に、これまでの動物実験でその重要を示してきた腹膜に発現している CReg について、PD 排液由来腹膜中皮細胞を用いて、PD 患者の腹膜の中皮細胞の CReg 発現を調べた。CReg の発現に影響を受けていたため、さらに CReg 発現への影響により補体の活性化が中皮細胞自体に与える可能性があるのかどうかについても検討を行った。

2 対象・方法

2-1 検体および臨床検査データの収集

名古屋大学医学部附属病院で、腹腔鏡手術、もしくは開腹術にて、早期胃がんのために医学的必要性で胃と大網切除を行った非腎不全 (CKD) 患者の切除大網から、健常人の腹膜中皮初代培養細胞の作製を行った。PD 患者の腹膜中皮細胞上の CReg 発現評価を目的として、当院および関連病院に通院中の 31 名の PD 患者の腹腔内貯留透析液排液由来の腹膜中皮初代培養細胞の作製を行った。コントロールにはヒト中皮細胞 cell line である MeT5A 細胞を用いた。

ヒト壁側腹膜上の CReg の分布免疫組織化学的手法を用いて、腹膜上の CReg の分布を確認するために、短期間の PD 歴、かつ社会的理由で PD を離脱しカテーテル抜去を行った際に採取したヒト壁側腹膜生検組織を脱パラフィン化して、免疫組織染色を行った。さらに、上記 31 名の PD 患者中 23 名の患者採血から、全身流血中の白血球上の CReg を調べる目的で採血を行った。これらの検体および臨床検査データの採取については、名古屋大学医学部附属病院の生命倫理委員会の承認を得たうえで、各患者の承諾を得て行った。

2-2 非 CKD 患者における大網由来腹膜中皮細胞の

CReg 発現と壁側腹膜組織上の CReg の分布

大網由来初代培養ヒト腹膜中皮細胞およびヒト中皮細胞 cell line である MeT5A 細胞において、三つの CRegs (CD46, CD55, CD59) の発現を flow cytometry 法で確認した。また、上記生検腹膜について、抗 CD46, 抗 CD55, 抗 CD59 を用いて免疫染色を行い、生検腹膜で、腹膜表層の中皮細胞を中心に CRegs の発現の確認を行った。それぞれの染色のコントロールには isotype が一致した抗体を用いた。

2-3 PD 患者の腹膜中皮細胞上の CReg の発現, および,

PD 排液中の補体成分, IL-6, CA125 の測定

名大病院・関連病院の PD 患者 31 名の PD 排液から得た初代培養腹膜中皮細胞を用いて、膜補体制御因子の発現を flow cytometry 法で、その mRNA の発現を real-time PCR 法にて解析した。同時に採取した PD 排液中の C3, C4, sC5b-9, IL-6, CA125 の濃度を、ELISA 法 (Quidel, Assaypro LLC, R & D system) で測

定した。各濃度は、含有される蛋白量によって補正して使用し、これらの結果と患者の臨床データとの関連を解析した。

2-4 PD 患者の流血中好中球における CReg の発現

上記の 31 名の PD 患者の中で、同意の得られた 23 名の PD 患者から得た末梢血中 CD16b 陽性細胞 (好中球) における CRegs の発現を、flow cytometry 法で解析し、腹膜中皮細胞上の CReg および臨床データとの関連を解析した。

2-5 ヒト血清負荷による補体活性化検査

CD55 の発現量に差を認める 2 名の患者から得た初代培養腹膜中皮細胞に対し、補体関連物質を含む血清負荷を行い⁵⁾、細胞表面に付着した C3 を IF にて染色し、任意の 10 視野における C3 陽性中皮細胞の割合を測定し補体活性を定量した。

3 結果

3-1 非 CKD 患者における大網由来腹膜中皮細胞の

CReg 発現と壁側腹膜組織上の CReg 分布

非 CKD 患者の三つの CReg (CD46, CD55, CD59) の発現について、flow cytometry 法にて、いずれも蛋白レベルで発現していることを確認した。これらは、ヒト中皮 cell line である MeT5A 細胞と比べても同様レベルでの発現であった。また、生検で得たヒト壁側腹膜についても、同様に免疫染色法で、腹膜表層の中皮細胞や小血管に CD46, CD55, CD59 の発現を認めた (図 1)。

3-2 ヒト PD 患者の腹膜中皮細胞における CReg の

発現と D/P creatinine (D/P Cre) との関係

腹膜中皮細胞における CD55 の発現は、腹膜機能の指標である D/P Cre と負の相関を認め ($p < 0.01$, 図 2), CD55 の発現とその mRNA 産生も有意に相関した ($p < 0.005$)。一方で、CD46 と CD59 の発現とは相関しなかった。このため、以下については CD55 との関係に焦点をあてて実験を行った。

3-3 PD 排液中の C3, C4, sC5b-9 濃度, および IL-6,

CA125 濃度と、腹膜中皮細胞の CD55 の発現との関係 PD 排液中 sC5-9 濃度は、CD55 の発現と負の相関

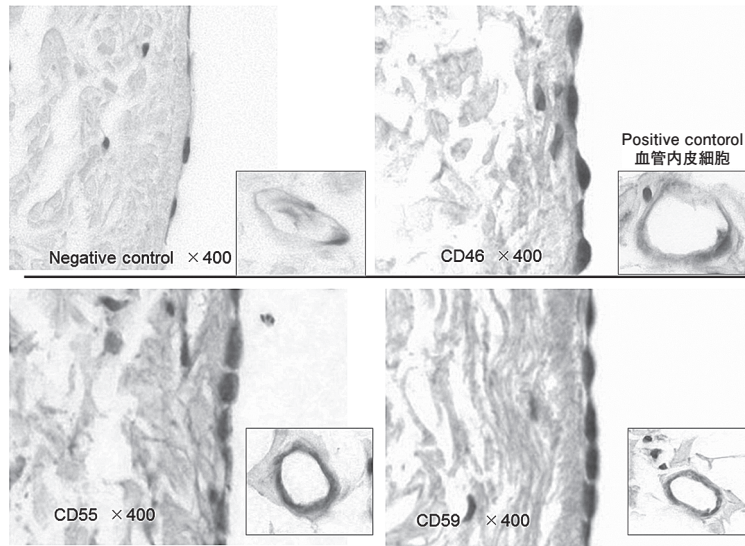


図1 腹壁腹膜の膜補体制御蛋白 (CD46, CD55, CD59) の発現
 腹膜表層の中皮細胞に三つの膜補体制御蛋白 (CD46, CD55, CD59) の分布が確認された。また、腹膜下層血管にも分布が確認できた。

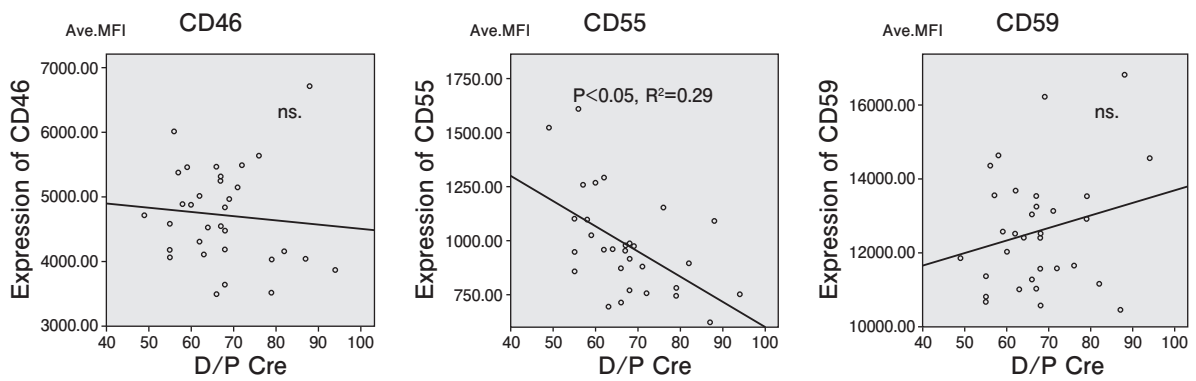


図2 中皮細胞の膜補体制御蛋白, CD46, CD55, CD59 の発現と D/P クレアチニン (D/P Cre) の関係
 腹膜中皮細胞の CD55 の発現と D/P Cre に相関がみられた。

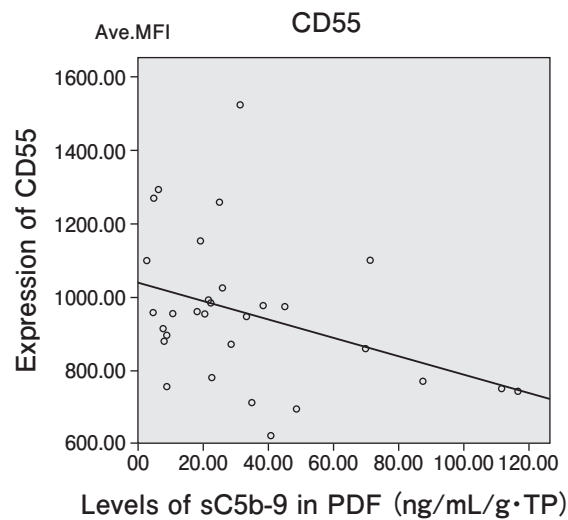


図3 中皮細胞の CD55 発現と PD 排液の補体活性化産物 sC5b-9 の関係
 PD 患者腹膜排液由来の腹膜中皮初代培養細胞上の CD55 の発現は排液中の sC5b-9 濃度と逆相関していた (p < 0.05)。

を認めた ($p < 0.05$, 図 3). 一方で, 血清 C3 および C4 濃度, PD 排液中 C3 および C4 濃度, PD 排液中 IL-6, CA125 濃度等と CD55 の発現に相関はなかった. また, 腹膜中皮 CD55 の発現は, 年齢, 性別, 糖尿病の有無, イコデキストリン液 (酸性液) 使用の有無, PD 期間, 腹膜中皮細胞における CD55 の発現との相関は見られなかった. PD 患者の腹膜中皮細胞上の CD55 と, その CD16b 陽性細胞 (好中球) 上の CD55 との発現には, 相関は認められなかった (data not shown).

3-4 ヒト PD 患者腹膜中皮細胞の CD55 発現の差と, 補体活性系制御への影響

ヒト PD 患者の腹膜中皮細胞の CD55 の発現差が, 中皮細胞上での補体活性化に影響を及ぼすかどうかを検討するため, ヒト血清曝露後の C3 沈着の程度を評価したところ, CD55 の発現が低い患者は高い患者と比較したところ, 中皮細胞数の中で C3 陽性細胞の割合が有意に増加していた ($p < 0.05$).

4 考察

炎症と補体の関係は, これまで様々な局面で報告されてきている. PD に関わる組織障害についても, 炎症の関与が考えられるため, 補体に関わっている可能性がある. しかし, これまで PD 患者に関わる補体活性系に関わる報告は少なく, 自然免疫をはじめ生体内で恒常性維持のために重要な位置を占める補体⁶⁾の, PD 治療の影響については不明な点が多い^{7,8)}.

本研究では, ヒト大綱由来中皮細胞, ヒト腹膜組織, および PD 排液中の腹膜中皮細胞において, 三つの CReg (CD46, CD55, CD59) が豊富に発現していることを確認した. さらに, PD 患者によって, PD 排液由来の腹膜中皮初代培養細胞の CRegs の発現が異なること, CReg の中でも特に CD55 の発現が PD 排液中の補体活性化産物である sC5b-9 濃度と負の相関を認めたことから, CD55 発現の個人差が腹膜における補体系制御機能に影響を与え, 結果として C5b-9 濃度に影響した可能性が示唆された. このため, PD 患者排液由来の腹膜中皮初代培養細胞を用いて CD46, CD55, CD59 との関係調べたところ, CD55 が腹膜機能の指標の一つである D/P Cre の発現と逆相関していることを確認した. さらに CD55 の発現差のある

PD 患者について, CD55 の発現量が機能的に影響しているかどうかを, 血清曝露後の C3 陽性細胞数で評価したところ, CD55 の発現が低い患者では C3 陽性細胞数の割合が有意に増加していた. この結果も CD55 発現の違いが補体系制御に影響を与えていることを支持する結果であると考えられた.

また, 腹膜中皮細胞上の CD55 発現の変化が, 腹腔局所的なものか, それとも全身に及んでいるのかを比較するために, 同じ PD 患者の腹膜中皮細胞の CD55 の発現や D/P Cre と流血中の好中球の CD55 発現を比較したところ, 好中球の CD55 発現とは相関なく, 今回観察された中皮細胞上の CD55 の変化は腹腔内局所の環境で発生している可能性が示唆された.

5 結語

腹膜中皮細胞の CD55 発現に個人差を認め, 腹膜における補体系制御に影響を及ぼす可能性が示唆された. CD55 の発現は, D/P Cre との相関より, 腹膜機能の予測因子になりうると考えられる. CD55 は PD に関連するなんらかの因子の影響を受け発現が変化している可能性が考えられるが, 今回, 調節因子については特定できておらず, 今後検討を要する.

謝辞

本研究の一部は, 平成 24 年度日本透析医会公募研究助成によって施行された. 研究内容の一部, もしくはすべてを, 日本腎臓学会学術集会, 補体シンポジウム, The 14th European Complement in Human Disease および文献 9 として発表した.

文献

- 1) Mizuno M, Morgan BP : The possibilities and pitfalls for anti-complement therapies in inflammatory diseases. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, 3; 85-94, 2004.
- 2) Mizuno M, Ito Y, Mizuno T, et al. : Zymosan, but not LPS, developed severe and progressive peritoneal injuries accompanied with complement activation in peritoneal dialysate fluid in a rat peritonitis model with mechanical scraping. *J Immunol*, 183; 1403-1412, 2009.
- 3) Mizuno T, Mizuno M, Okada N, et al. : Specific collaboration between rat membrane complement regulators Crry and CD59 protects peritoneum from damage by autologous complement activation in peritoneal dialysate fluid. *Nephrol Dial Transplant*, 26; 1821-1830, 2011.

- 4) Mizuno M, Ito Y, Mizuno T, et al. : Membrane complement regulators protect against fibrin exudation in a severe peritoneal inflammation model in rats. *Am J Physiol Renal Physiol*, 302; F1245-F1251, 2012.
- 5) Mizuno T, Mizuno M, Imai M, et al. : Anti-C5a complementary peptide ameliorates acute peritoneal injuries induced by neutralization of Crry and CD59. *Am J Physiol Renal Physiol*, 305; F1603-F1616, 2013.
- 6) Barbano G, Cappa F, Prigione I, et al. : Peritoneal mesothelial cells produce complement factors and express CD59 that inhibits C5b-9-mediated cell lysis. *Adv Perit Dial*, 15; 253-257, 1999.
- 7) Young GA, Kendall S, Brownjohn AM : Complement activation during CAPD. *Nephrol Dial Transplant*, 8; 1372-1375, 1993.
- 8) Tang S, Leung JC, Chan L, et al. : Regulation of complement C3 and C4 synthesis in human peritoneal mesothelial cells by peritoneal dialysis fluid. *Clin Exp Immunol*, 136; 85-94, 2004.
- 9) Sei Y, Mizuno M, Suzuki Y, et al. : Expression of membrane complement regulators, CD46, CD55 and CD59, in mesothelial cells of patients on peritoneal dialysis therapy. *Mol Immunol*, 65; 302-309, 2015.