

主論文の要約

**Expression of membrane complement regulators,
CD46, CD55 and CD59, in mesothelial cells of
patients on peritoneal dialysis therapy**

〔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解析〕

名古屋大学大学院医学系研究科 分子総合医学専攻
病態内科学講座 腎臓内科学分野

(指導：丸山 彰一 准教授)

清 祐実

【緒言】

腹膜透析（PD）の重要な課題に腹膜障害がある。これまで我々は、腹膜障害への補体の関与を、ラット腹膜炎モデルにおける補体活性化に伴う炎症の増悪、抗補体薬による腹膜障害抑制実験等で明らかにしてきた。また、ラット腹膜の膜補体制御因子（CRegs）の機能を抑制することにより腹膜障害が惹起されることから、腹膜における CRegs の重要性を報告した。一方で、ヒト腹膜における CRegs 発現の意義についてはこれまで十分な検討がなされていなかった。そこで本研究では PD 排液由来ヒト腹膜中皮細胞における膜補体制御因子の発現を解析し、PD 患者の臨床状況、腹膜障害等との関連につき検討を行った。

【対象および方法】

ヒト壁側腹膜検体において CRegs（CD46、CD55、CD59）の発現を免疫染色にて確認した。中皮細胞 cell line である MeT5A および大網由来初代培養ヒト腹膜中皮細胞における CRegs の発現を flow cytometry 法で確認した。名大病院・関連病院の PD 患者 50 名について PD 排液中の補体活性化産物を測定、患者背景との関連を調べた。また PD 患者 31 名の PD 排液中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 法で解析し、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 を ELISA 法で測定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。さらに 31 名中 23 名の PD 患者から得られた末梢血中 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 CRegs 発現との関連、腹膜機能との関連を解析した。また、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、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。

【結果】

PD 排液中補体活性化産物 sC5b-9 と、腹膜機能の指標である D/P Cre 値は正の相関を示した（ $p=0.0001$, Figure1）。ヒト壁側腹膜にて CRegs の発現を認め、MeT5A、大網由来初代培養細胞においても CRegs の発現を確認した（Figure2）。腹膜中皮細胞における CD55 の発現は、D/P Cre 値と負の相関を認め（ $p=0.003$, Figure3-B）、CD55 の発現とその mRNA 産生も有意に相関した（ $p=0.0001$, Figure4-H）。同一患者から得られた CD16b 陽性細胞（好中球）上の CRegs と腹膜中皮細胞上の CRegs 発現に相関は認めず、好中球における CD55 の発現と D/P Cre 値の相関も認めなかった（Supplementary Figure A）。PD 排液中 sC5b-9 濃度は、CD55 の発現と負の相関を認めた（ $p=0.030$, Figure4-A）。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、血清 C3・C4 濃度、PD 排液中 C3・C4 濃度、PD 排液中 IL-6、CA125 濃度等と CRegs の発現に相関は認められなかった。CD55 の発現差

が補体活性化に影響を及ぼしているかを検討するため、腹膜中皮細胞に対し血清曝露を行い C3 沈着を評価したところ、CD55 の発現が低い患者 (Patient1) は高い患者 (Patient2) と比較し、C3 陽性細胞数の割合が有意に増加していた ($p < 0.05$, Figure5-D)。

【考察】

ヒト腹膜中皮細胞において CRegs (CD46, CD55, CD59) の発現を確認した。PD 排液中補体活性化産物 sC5b-9 と、腹膜機能の指標である D/P Cre 値は正の相関を示し、腹膜透過性が亢進している患者では腹膜における補体活性も上昇していた。このように補体系制御に個人差を生じる背景として CRegs の発現に着目し検討を進めた。PD 患者の腹膜中皮細胞上における CD55 の発現は D/P Cre 値と負の相関を認め、CD55 の発現とその mRNA 産生も有意に相関しており、PD に関連する何らかの因子が CRegs 発現に影響を及ぼしている可能性が示唆された。CD55 と D/P Cre 値の相関については、CD16b 陽性細胞 (好中球) でも検討を行ったが、好中球では相関は見られず、腹膜中皮細胞に特有の変化である可能性が示唆された。CD55 の発現は排液中補体活性化産物 sC5b-9 と負の相関を示しており、CD55 発現の個人差が腹膜における補体系制御に影響を与えている可能性が考えられた。さらに CD55 の発現差のある PD 患者 2 症例について、腹膜中皮細胞に対し血清曝露を行い、C3 陽性細胞数を評価し補体活性を定量したところ、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おり、この結果も CD55 発現量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。

【結論】

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している可能性が示唆された。PD に関連した何らかの因子により CD55 の発現が変化し、局所で補体活性化を生じている可能性がある。しかし今回その調節因子については明らかになっておらず、今後の検討課題である。