

主論文の要旨

**Long-term peritoneal dialysate exposure modulates
expression of membrane complement regulators in
human peritoneal mesothelial cells**

〔 長期の腹膜透析液曝露はヒト腹膜中皮細胞の
膜補体制御因子発現に影響を及ぼす 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 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 教授)

小林 和磨

【緒言】

腹膜透析 (PD) は在宅施行が可能で、血行動態などの生体環境の変化が比較的緩徐な腎代替療法である。PD 患者は尿毒症の状態であることに加え、腹膜透析カテーテルや腹膜透析液の刺激、腹膜炎の発症などにより経時的に腹膜機能が劣化していくことが知られているが、その病態には補体系が深く関わっている。補体系は自然免疫系として宿主における病原体の排除や恒常性の維持において重要な役割を担っているが、補体系の不適切な活性は局所的または全身的な炎症や障害を引き起こすことが知られている。そのため、補体系は適切に機能するように活性系と制御系の均衡を保つことで調整されている。腹膜中皮細胞には membrane complement regulator (CReg) の CD46, CD55, CD59 が広く発現しており、ヒトや動物モデルにおいて補体系の過剰な活性を防ぐことで腹膜の恒常性の維持に重要な役割を果たしていることが報告されている。これまで、横断的研究において CD55 の発現量が PD 患者の腹膜機能と相関することが明らかになっているが、PD を継続することによる CReg の経時的変化はまだ明らかでない。それゆえ、我々は 1 年間の PD 継続によるヒト腹膜中皮細胞 (HPMC) の CReg 発現の変化および腹膜透析液の各因子が HPMC の CReg 発現に与える影響について研究を行った。

【対象および方法】

研究は名古屋大学医学部附属病院の倫理委員会の承認を得て行われた。2006 年 8 月から 2019 年 2 月の間に PD を開始した患者 44 人の夜間貯留 PD 排液を遠心分離培養し HPMC を回収した。HPMC における CReg 及び mRNA の発現をそれぞれ flow cytometry 法及び RT-PCR 法にて測定し、臨床データと共に評価した。同時に、補体系最終産物の一つである sC5b-9 の腹膜透析排液中の濃度を ELISA 法で確認した。

次に、腹膜透析液のどの因子が CReg 発現の変化に寄与するかを調べるため、ヒト中皮細胞の cell line である Met-5A を用いて *in vitro* の実験を施行した。刺激は実際に使用される腹膜透析液を参考にブドウ糖濃度、浸透圧、乳酸、pH を調整した培地で行った。24 時間及び 72 時間の刺激を行い、CReg の発現を flow cytometry 法で評価した。

【結果】

1 年の経過で PD 患者の腹膜機能の指標である Dialysate-to-plasma creatinine concentration (D/P Cr) に有意な変化は認めなかった (Figure1)。1 年後の flow cytometry 法及び RT-PCR 法の評価において、HPMC の CD46 及び CD59 の発現は有意差を伴って増加していた (Figure2-A, C, Figure3-A, C)。CD55 は有意差を認めなかったが、増加傾向を認めた (Figure2-B, Figure3-B)。1 年後の排液中の sC5b-9 の濃度は有意に減少していた (Figure4)。

in vitro の実験において、72 時間後の評価で、ブドウ糖濃度を高くするにつれ CD46, CD55, CD59 が有意に多く発現した (Figure5-B, C, D)。これがブドウ糖そのものによる影響なのか浸透圧による影響なのかを確認するために、マンニトールを用いて浸透圧

を合致させた群を作製して検討を行った。まず、両群ともにコントロール群に比べ CD46, CD55, CD59 の有意な発現の増加を認めた (Figure5-F, G, H)。更に、CD55 と CD59 において、ブドウ糖群はマンニトール群に比して発現の有意な増加を認めた (Figure5-G, H)。CD46 においても有意差は認めなかったものの、同様の傾向を認めた (Figure5-F)。次に緩衝剤による影響を評価するために、乳酸単独及び重炭酸を用いて乳酸含有量を減らした重炭酸混合培地での 72 時間刺激を行ったところ、乳酸単独群はコントロール群に比べ CD46, CD55, CD59 発現の有意な増加を認めた (Figure6-B, C, D)。また、CD55 と CD59 において、重炭酸混合培地群は乳酸単独群に比べ、有意に発現が少なかった (Figure6-C, D)。CD46 においても有意ではないものの同様の傾向を認めた (Figure6-B)。最後に、現在日本で主流となっている中性化透析液の他に、過去、および海外で使用中的酸性透析液の影響を調べるため、pH 7.4 群と pH 5.0 群で比較したところ、24 時間後の評価にて pH 5.0 群で有意な CD46, CD55, CD59 発現の減少を認めた (Figure7)。

【考察】

1 年間の追跡で、HPMC における CReg 発現は増加し、PD 排液中の sC5b-9 は減少を認めた。この結果から、PD 患者では HPMC の CReg 発現増加が、腹腔内での過剰な補体系の活性を防いでいる可能性が考えられた。続いて行った腹膜透析液の各因子が CReg へ与える影響を検証した *in vitro* の実験では、ブドウ糖及び乳酸は CReg 発現を増加させ、酸性刺激は減少させることを明らかにした。

以前の我々の研究で、PD 患者の腹膜組織では、非 CKD 患者に比べ CReg 発現が減少することが示されている。また、PD 開始後の短期間において補体活性化産物である C3a、C5a、sC5b-9 は一時的に増加し、その後減少することが示されている。これらを考慮すると、本研究における CReg 発現の増加は 1 年間の PD 治療による尿毒症状態の改善に伴って起きたのかもしれない。また、*in vitro* の実験の結果からは、腹膜透析液に含有されるブドウ糖や乳酸が影響した可能性も考えられた。

従来国内で使用されてきた酸性透析液は、世界ではまだ主流であり、この酸性透析液が CReg 発現を減少させる可能性がこれまでの研究でも示されている。また、酸性透析液は長期 PD 治療患者において腹膜障害を引き起こし、重篤な合併症である被嚢性腹膜硬化症の危険因子であることも知られている。本研究において、これまでの報告と合致しない結果も認められたが、今回の研究の対象患者は主に中性化透析液を使用しており、CReg 発現への影響が従来の研究に比べ軽度であった可能性がある。また、患者間での結果にばらつきが認められたことから、CReg の発現は、腹膜炎や腹膜透析治療期間など様々な背景因子に応じて増加と減少の両方向性に变化する可能性が考えられた。

今回の研究の限界として、症例数が少なく、追跡期間も短いことが挙げられる。腹膜における補体系の恒常性維持に対して、長期 PD 治療が与える影響を明らかにするために、更なるデータの蓄積及び検討が必要である。

【結論】

PD 患者 HPMC において、経時的に CReg の発現が増加することが示された。その変化によって過剰な補体系の活性を抑制し、腹膜に保護的に働いている可能性が考えられた。腹膜透析液は CReg を増加・減少させる双方の因子を含んでいることが *in vitro* の検討で明らかになった。CReg の発現は一定ではなく、患者の腹腔内の状況に応じて変化し得ることが示唆された。

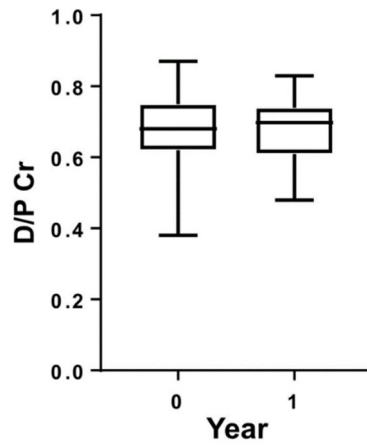


Figure 1
Dialysate-to-plasma creatinine ratio (D/P Cr) in patients on peritoneal dialysis. D/P Cr did not show any significant change during 1 year of observation.

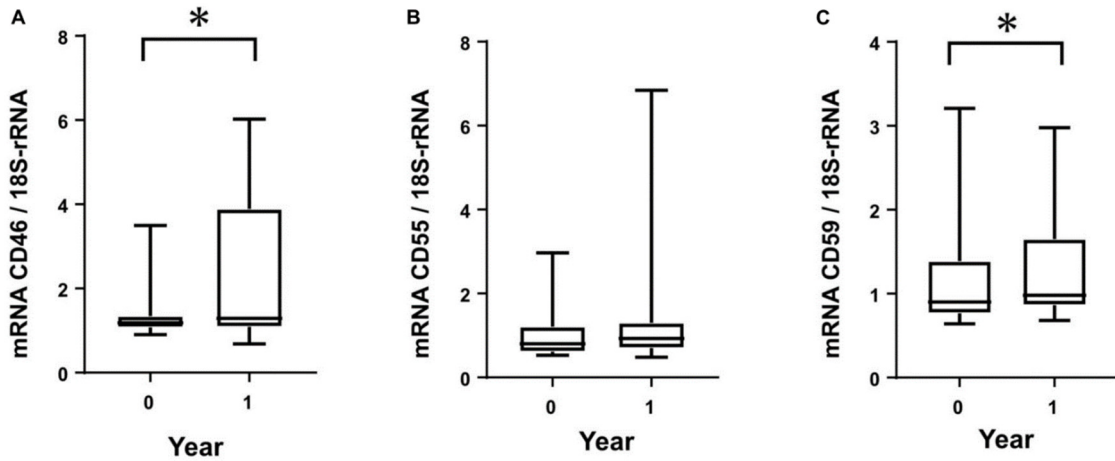


Figure 2
Expression of membrane complement regulators (CRegs) on human peritoneal mesothelial cells of PD patients during 1 year. Expressions of CRegs CD46 (A) and CD59 (C) were significantly increased during 1 year of observation. Expression of CReg CD55 (B) was not significantly changed. * $P < 0.05$.

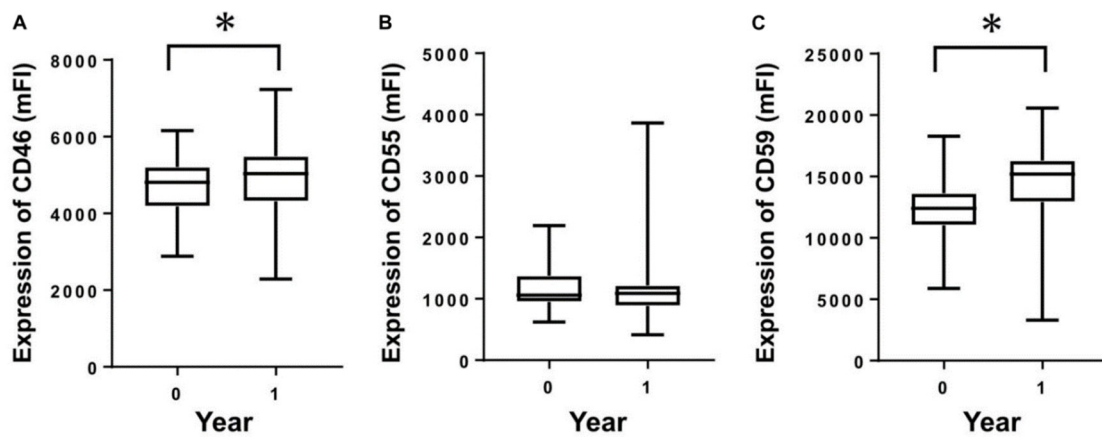


Figure 3
Membrane complement regulator (CReg) mRNA from human peritoneal mesothelial cells of PD patients during 1 year. Clear increases were seen for mRNA of CD46 (A) and CD59 (C), but not CD55 (B), during 1 year. * $P < 0.05$.

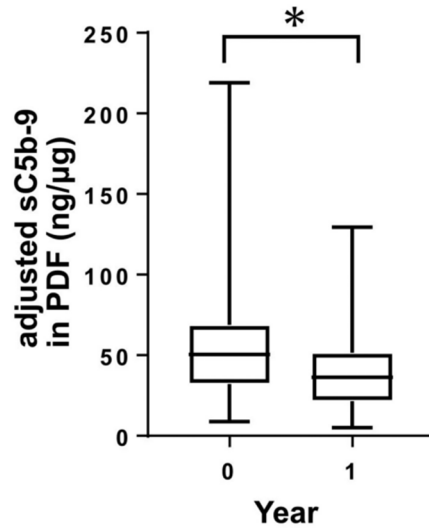


Figure 4
Levels of sC5b-9 in peritoneal dialysis (PD) fluid (PDF) from PD patients during 1 year. Levels of sC5b-9 in PDF significantly decreased during 1 year. * $P < 0.05$.

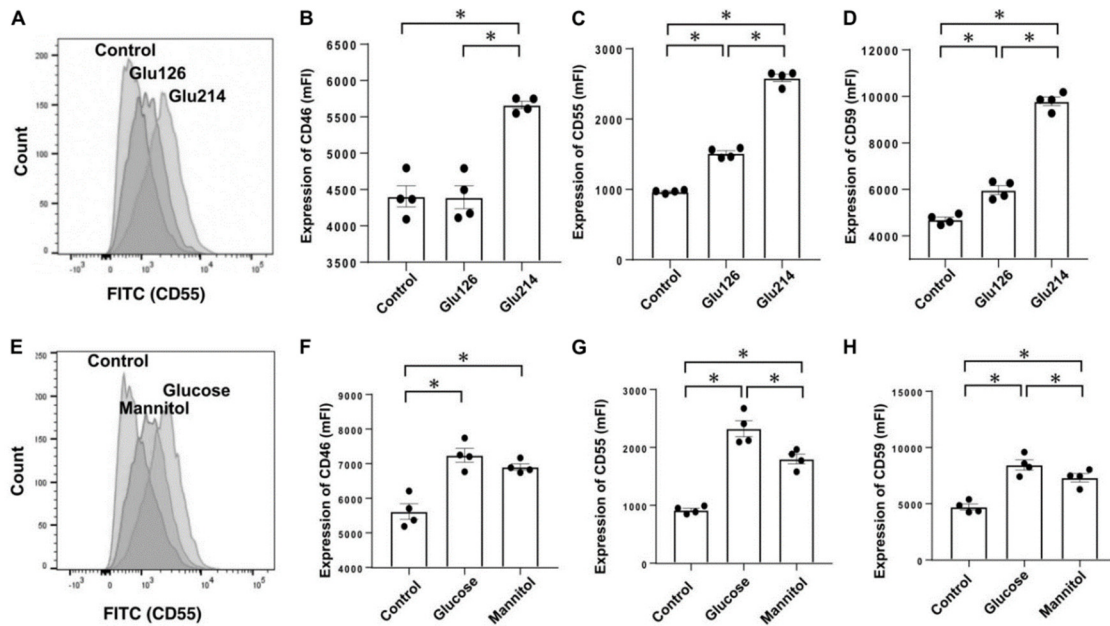


Figure 5
Expressions of membrane complement regulators (CREgs) of Met-5A cells stimulated with glucose and evaluation of osmotic effects. Expressions of CREgs in Met-5A cells increased dependent on glucose concentration (A–D). When the effects of osmolar stimulation were evaluated between 214 mOsm/L of glucose (equivalent glucose concentration to 2.5% glucose-based peritoneal dialysate) and the identical osmolality of mannitol, CD55 and CD59, but not CD46, were significantly increased with glucose, as compared to with mannitol. (A,E) Show sample histograms for CD55 expression stimulated with different concentrations of glucose-supplemented medium or control and stimulated with the same osmolality of glucose or mannitol, respectively. (B–D,F–H) Show changes in expressions of CD46, CD55, and CD59, respectively. Graph sets of panel (B–D,F–H) show results of stimulation with different concentrations of glucose and results of stimulation by glucose or mannitol at the same osmolality, respectively. * $P < 0.05$.

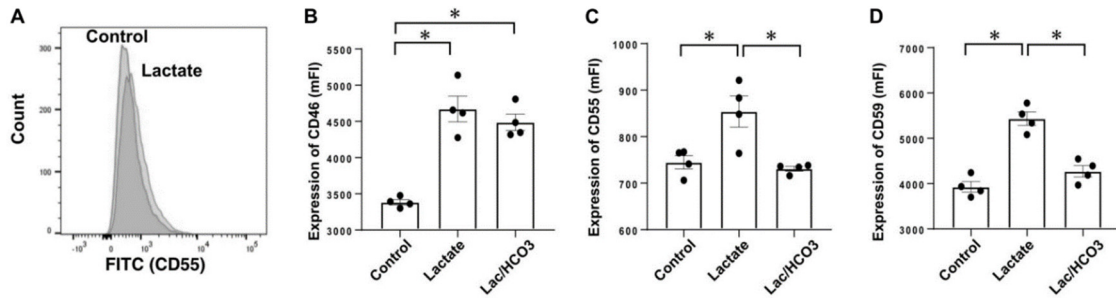


Figure 6

Expression of membrane complement regulators (CRegs) of Met-5A stimulated with lactate. (A) Shows a sample of histograms for expression of CD55 stimulated by sodium lactate-added culture medium and control medium. (B–D) Show that stimulation with lactate increased expressions of CRegs on the cell surface of MeT-5A cells, while co-stimulation with lactate and bicarbonate did not show any significant change. In the group stimulated with sodium lactate, the concentration of lactate was set at 40 mmol/L, while in the group stimulated with both bicarbonate and sodium lactate, the respective concentrations were set at 25 and 15 mmol/L in culture medium. Those concentrations were determined with reference to Dianeal-N dialysate solution and Reguneal dialysate solution. *P < 0.05.

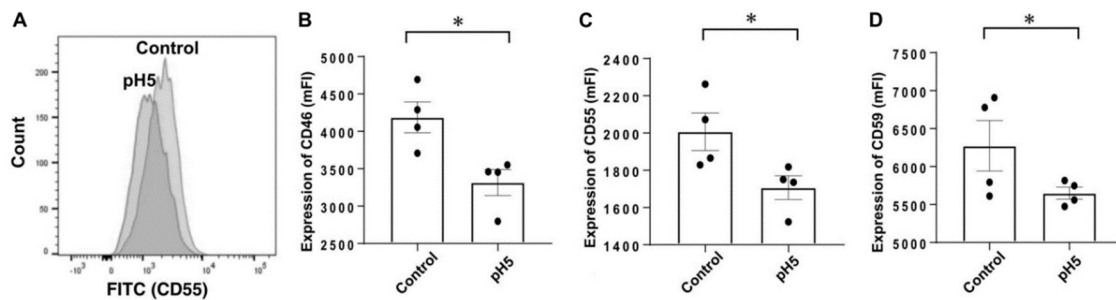


Figure 7

Expression of membrane complement regulators (CRegs) of Met-5A cells stimulated with acidic condition medium. (A) Shows a sample of histograms of expression for CD55 stimulated with pH 5.0-adjusted culture medium and control neutral medium (pH 7.4). (B–D) Show that stimulation with pH 5.0 acid medium decreased expression of CRegs on the cell surface of Met-5A. *P < 0.05.