

平成30年6月24日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19187

研究課題名(和文) 腹膜透析排液を用いた腹膜劣化の新規バイオマーカーの同定

研究課題名(英文) Identification of novel effluent biomarkers for peritoneal deterioration in peritoneal dialysis

研究代表者

出居 真由美 (Idei, Mayumi)

順天堂大学・医学部・非常勤助教

研究者番号：40596623

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、腹膜透析における新規腹膜劣化指標を同定することを目的とした。ERC/mesothelinは腹膜や胸膜を覆う中皮細胞に限局して発現し、furin様プロテアーゼで切断された後、分泌型N-ERC/mesothelin(N-ERC)と膜結合型C-ERC/mesothelinに分かれる。ERC/mesothelinの腹膜劣化指標としての有用性を検討した結果、腹膜透析排液中のN-ERCは腹膜機能と正相関し、腹膜劣化を目的変数とした多変量解析において年齢、腹膜透析期間、GFRで調整後も有意な予測因子であった。以上より、腹膜透析排液中のN-ERCの腹膜劣化指標としての有用性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The peritoneal deterioration is associated with encapsulating peritoneal sclerosis which is the most serious complication of peritoneal dialysis. We identified novel biomarkers in peritoneal effluent to predict peritoneal deterioration in peritoneal dialysis. ERC/mesothelin is expressed in normal mesothelial cells, and is cleaved by a furin-like protease into two fragments: secreted N-ERC/mesothelin and membrane-bound C-ERC/mesothelin. We examined whether ERC/mesothelin predicts peritoneal deterioration. There were significant correlation between peritoneal function (D/P Cr) and N-ERC/mesothelin in peritoneal effluent. In multivariate analysis, N-ERC/mesothelin in peritoneal effluent was identified as an independent predictor of peritoneal deterioration even after adjusting for age, duration of peritoneal dialysis, and glomerular filtration rate. We concluded that N-ERC/mesothelin in peritoneal effluent predicts peritoneal deterioration.

研究分野：臨床検査

キーワード：慢性腎臓病 腹膜障害 腹膜透析 腹膜劣化 ERC/mesothelin

1. 研究開始当初の背景

腹膜透析は、末期腎不全の腎代替療法である。実際には、腹腔内に腹膜透析液を一定時間貯留し、腹膜を介して血中の老廃物や余分な水分を透析液に移動させて血液を浄化させる。2013年に実施された施設調査によれば、我が国では9,200人の患者が、腹膜透析を行っている。腹膜透析は、自己管理で行うため月1度の外来通院でよい。したがって、週3回、1回4時間を要する血液透析に比べると、腹膜透析のQOLは高い。しかし、腹膜透析の最大の問題点は、合併症である被嚢性腹膜硬化症が致死的にもかかわらず現在有効な治療法がないことである。被嚢性腹膜硬化症を回避するためには、被嚢性腹膜硬化症を引き起こす腹膜劣化を早期に発見し、被嚢性腹膜硬化症の発症を予防することが最も重要である。腹膜を頻回に直接観察することができれば、腹膜劣化の早期発見を確実に行うことができる。しかし、腹腔鏡検査は侵襲が大きすぎるため、頻回に行うことは不可能である。また、腹膜は腹腔内の臓器を覆う膜であり実質臓器でないことから、CTや超音波検査で腹膜劣化を早期に検出することは困難である。これらの理由から、腹膜を視覚的に観察する簡便で有用な検査がないのが現状である。

現在、腹膜劣化の評価には、腹膜機能の評価法である腹膜平衡試験が用いられている。腹膜平衡試験では、算出されるD/P Cr (腹膜透析排液中のCr濃度と血清Cr濃度の比)によって腹膜透過性を評価する。D/P Crにより分類されたHighカテゴリーの持続は、高度腹膜劣化と判断される(文献1)。しかし、腹膜平衡試験は検査に時間がかかることや単回の検査では被嚢性腹膜硬化症を予測できないという問題点がある。さらに、腹膜平衡試験は半年~1年に1度の頻度で行われるため、腹膜機能の変化を鋭敏に反映するとは言い難い。その他、腹膜劣化の指標として有用性が示唆されるものとして、腹膜透析排液中の中皮細胞診、腹膜透析排液中のCA125などがあるが、いずれも感度・特異度に問題がある(文献1)。

被嚢性腹膜硬化症の発症予防のために、簡便かつ正確で再現性の高い検査法を確立することが極めて重要な課題となっている。腹膜透析排液は、非侵襲的に簡便に採取できるため、腹膜透析患者に日常検査として行うのに最も適している。

腹膜劣化には、腹膜の慢性炎症、腹膜の線維化や血管新生、腹膜中皮細胞の剥離等が関与すると考えられている。ERC/mesothelinは、正常では胸膜や腹膜を覆う中皮細胞に局限して発現するGPIアンカー型蛋白質である。ERC/mesothelinの分子量は約71kDaであり、furin様プロテアーゼで切断された後、N末側の分泌型N-ERC/mesothelin(N-ERC)(約31kDa)と膜に結合したC-ERC/mesothelin(C-ERC)(約40kDa)の二つのフラグメントに分かれる。現在、ERC/mesothelinは、中皮

腫に特異性が高い血液バイオマーカーとして、悪性中皮腫の血液補助診断試薬として利用されている。一方、ERC/mesothelinは、正常の腹膜中皮細胞からも分泌されることから、腹膜透析患者においては、新規腹膜劣化指標となる可能性がある。腹膜透析排液中のERC/mesothelinが、鋭敏な腹膜劣化指標となれば被嚢性腹膜硬化症の予防に大きく貢献できると考え、本研究を計画した。

2. 研究の目的

本研究は、被嚢性腹膜硬化症の発症予防に重要な腹膜劣化を早期に発見するための簡便で鋭敏な新規腹膜劣化指標を同定するため、非侵襲的で簡便に採取できる腹膜透析排液を用いて、以下に列挙する4点を明らかにすることとした。

- (1) ERC/mesothelinは血清、腹膜透析排液、尿中で同じように分布をするのか。
- (2) 腹膜透析排液中のERC/mesothelinは腹膜機能と関連するのか。
- (3) 腹膜透析排液中のERC/mesothelinは腹膜劣化指標として有用であるのか。また、感度と特異度はどの程度か。
- (4) 一般臨床検査項目(生化学検査、免疫学的検査)で腹膜劣化指標となりうる項目はあるのか。その場合は、腹膜劣化指標として有用であるか。

3. 研究の方法

【対象】

当院に通院中で腹膜平衡試験を施行した腹膜透析患者26例(男性19例、女性7例、平均年齢 53 ± 12 歳、平均腹膜透析期間 14 ± 20 ヶ月)を対象とした。明らかな肺病変、腹膜炎、悪性腫瘍を合併する患者は、あらかじめ対象から除外した。腹膜平衡試験は半年から1年に1回施行し、全てのデータを解析対象とした。

対象患者は、腹膜平衡試験で算出されたD/P Crによって、さらにHigh、High Average、Low Average、Lowの4つのカテゴリーに分類した。

【方法】

(1) ERC/mesothelinの血清、腹膜透析排液、尿での分布の検証

腹膜平衡試験施行時に採取した血清、腹膜透析排液、尿中のERC/mesothelin(N-ERCおよびC-ERC)を測定し比較検討を行った。ERC/mesothelinの測定については、腹膜平衡試験時に採取された血液検体、腹膜透析排液検体、尿検体を $1500 \times g$ で5分間遠心分離した後、血清、腹膜透析排液検体および尿検体の上清を -80 で凍結保存し、後日測定した。

(2) 腹膜透析排液中のERC/mesothelinと腹膜機能の関係の検証

腹膜平衡試験で分類されたカテゴリー別

に血清及び腹膜透析排液中の ERC/mesothelin (N-ERC および C-ERC) を比較した。4 群間の比較には一元配置分散分析を用いた。次に、D/P Cr と、血清および腹膜透析排液中の ERC/mesothelin (N-ERC および C-ERC) の関係を Pearson の積率相関係数を用いて統計学的に検証した。

(3) 腹膜透析排液中の ERC/mesothelin の腹膜劣化指標としての有用性および感度・特異度の評価

腹膜平衡試験により分類された High カテゴリーを腹膜劣化群とし、腹膜劣化群と非腹膜劣化群で血清および腹膜透析排液中の ERC/mesothelin (N-ERC および C-ERC) を比較した。2 群間比較は t 検定を用いた。次に、腹膜劣化群を目的変数とした多変量解析を行い、腹膜劣化指標としての有用性を検証した。さらに、ROC 曲線を用いて、感度・特異度の評価を行った。

腹膜劣化指標としての有用性が示唆される腹膜透析排液中の CA125、IL-6、VEGF、ヒアルロン酸についても同様の評価を行い ERC/mesothelin と比較した。

(4) 一般臨床検査項目(生化学検査、免疫学的検査)で腹膜劣化指標となりうる項目の検索及び腹膜劣化指標としての有用性評価

一般臨床検査項目 (TP、ALB、BUN、Cr、UA、Na、K、Ca、P、Fe、T-bil、AST、ALT、LD、GT、ALP、CK、Amylase、膵リパーゼ、2MG、IgG、IgA、IgM、hs-CRP) について、腹膜平衡試験時に採取した血清及び腹膜透析排液中の濃度を測定し、腹膜機能との関係を検証した。さらに、腹膜平衡試験により分類された High カテゴリーを腹膜劣化群とし、腹膜劣化群を目的変数とした多変量解析を行い、腹膜劣化指標としての有用性を検討した。血液および腹膜透析排液検体は、1500 × g で 5 分間遠心分離した。血清中の一般臨床検査項目 (Amylase、膵リパーゼ、グロブリンは除く) 腹膜透析排液中の TP、UA、Cr、電解質については、腹膜平衡試験日に測定した。血清および腹膜透析排液検体の上清は、-80 で凍結結保存し、後日その他の検査項目 (膵リパーゼ等) を測定した。

【測定方法】

ERC/mesothelin は ELISA 法を用い、N-ERC と C-ERC を同時に測定した (N-ERC: Human N-ERC/Mesothelin Assay Kit-IBL、免疫生物研究所 (文献 2)、C-ERC: 樋野らが作成した Human C-ERC/Mesothelin ELISA system)。一般臨床検査項目 (生化学検査、免疫学的検査) については、自動分析装置を用いて、通常の検査法で測定を行った。膵リパーゼは酵素法 (Roche LIPC Lipase Colorimetric Reagent、Roche Diagnostics) Cr は酵素法 (アクアオート カイノス CRE-、カイノス) hs-CRP はラテックスネフェロメトリー

法 (Bering Nephrometer II、Siemens Healthcare Diagnostics)、2MG はラテックス凝集免疫比濁法 (BMG - ラテックス X 1「生研」、デンカ生研) を用いた。

CA125 は ECLIA 法 (Elecsys CA 125 II、Roche Diagnostics Japan) IL-6 は CLEIA 法 (ヒト IL-6 測定用カートリッジ、富士レピオ)、VEGF は ELISA 法 (Quantikine Human VEGF Immunoassay、R&D SYSTEMS)、ヒアルロン酸はラテックス凝集免疫比濁法 (エルピアエース HA、LSI メディエンス) で測定を行った。

4. 研究成果

(1) ERC/mesothelin の血清、腹膜透析排液、尿での分布の検証

腹膜透析排液、血清および尿中に ERC/mesothelin の 2 つの断端 (N-ERC および C-ERC) を検出した。

N-ERC については、血清 N-ERC 15.0 ± 15.5 ng/mL、腹膜透析排液中 N-ERC 31.8 ± 17.9 ng/mL であり、血清よりも腹膜透析排液中で有意に高値であった (図 1)。一方、C-ERC については、血清 C-ERC 9.4 ± 6.4 ng/mL、腹膜透析排液中 C-ERC 4.8 ± 2.5 ng/mL であり、腹膜透析排液中よりも血清で有意に高値であった (図 2)。

腹膜透析排液中の N-ERC は腹膜中皮細胞から分泌されているものを直接反映していることが示唆された。

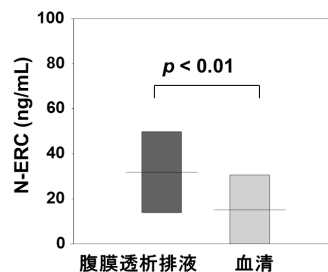


図 1. N-ERC の腹膜透析排液と血清濃度の比較

箱上端: 平均+1SD
箱下端: 平均-1SD

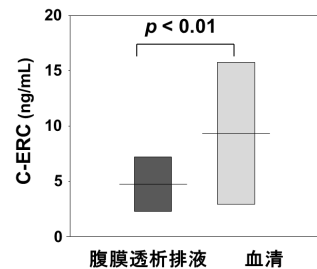


図 2. C-ERC の腹膜透析排液と血清濃度の比較

箱上端: 平均+1SD
箱下端: 平均-1SD

N-ERC と C-ERC の比較において、血清 N-ERC と血清 C-ERC は正相関を示し ($r = 0.52$, $p < 0.01$) 腹膜透析排液中の N-ERC と腹膜透析排液中の C-ERC も同様に正相関を示した ($r = 0.75$, $p < 0.01$)。

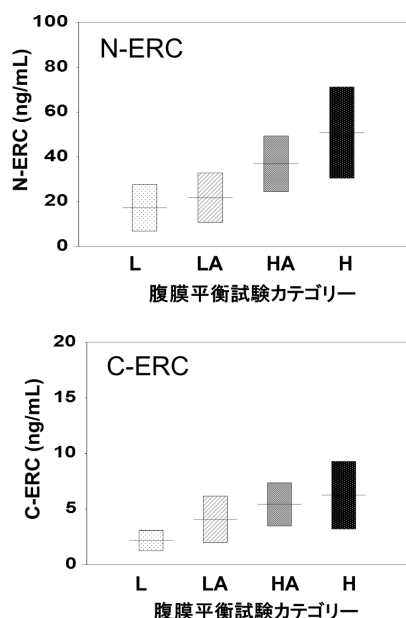
また、N-ERC と C-ERC の 1 日尿量および腹膜透析液への 1 日排泄量の比較において、N-ERC の 1 日尿量は 3.6 ± 4.4 ng/日、腹膜透析液への 1 日排泄量は 148 ± 46 ng/日であった。C-ERC の 1 日尿量は 7.2 ± 6.2 ng/日、腹膜透析液への 1 日排泄量は 30 ± 7 ng/日であった。N-ERC および C-ERC とともに、腹

膜透析液への1日排泄量は、1日尿量よりも有意に高値であった ($P < 0.01$)。

(2) ERC/mesothelin と腹膜機能の関係の検証

腹膜平衡試験におけるカテゴリー別の腹膜透析排液中の N-ERC は、High: 50.9 ± 20.4 ng/mL、High Average: 36.9 ± 12.4 ng/mL、Low Average: 21.8 ± 11.0 ng/mL、Low: 17.3 ± 10.4 ng/mL であった。腹膜透析排液中の C-ERC は、High: 6.2 ± 3.1 ng/mL、High Average: 5.4 ± 1.9 ng/mL、Low Average: 4.1 ± 2.1 ng/mL、Low: 2.2 ± 0.9 ng/mL であった (図3)。血清 N-ERC は、High: 10.6 ± 1.4 ng/mL、High Average: 22.5 ± 25.0 ng/mL、Low Average: 13.1 ± 8.2 ng/mL、Low: 8.4 ± 3.7 ng/mL であり、血清 C-ERC は、High: 11.0 ± 6.4 ng/mL、High Average: 10.9 ± 7.4 ng/mL、Low Average: 9.2 ± 6.4 ng/mL、Low: 4.9 ± 1.4 ng/mL であった。腹膜透過性の高いカテゴリーほど、腹膜透析排液中の N-ERC は高く ($p < 0.01$)、腹膜透析排液中の C-ERC も同様であった ($p < 0.01$)。一方、血清 N-ERC および血清 C-ERC はカテゴリー間の差は認められなかった (血清 N-ERC: $p = 0.28$ 、血清 C-ERC: $p = 0.36$)。

図3. 腹膜平衡試験カテゴリー別の腹膜透析排液中の N-ERC および C-ERC の比較



箱上端: 平均+1SD、箱下端: 平均 - 1SD

L: Low, LA: Low Average, HA: High Average, H: High

腹膜透析排液中の ERC/mesothelin と D/P Cr の相関について、腹膜透析排液中の N-ERC および C-ERC は、D/P Cr と正相関を示した (N-ERC: $r = 0.69$, $p < 0.01$ 、C-ERC: $r = 0.62$, $p < 0.01$)。血清 ERC/mesothelin と D/P Cr の相関について、血清 N-ERC は D/P Cr と有意な相関を示さなかったが ($r = 0.20$, $p =$

0.25)。血清 C-ERC は D/P Cr と正相関を示した ($r = 0.41$, $p = 0.02$)。

(3) 腹膜透析排液中の ERC/mesothelin の腹膜劣化指標としての有用性および感度・特異度の評価

腹膜劣化群と非腹膜劣化群の比較において、腹膜透析排液中の N-ERC は腹膜劣化群で有意に高値であり ($p < 0.01$)、C-ERC も同様に腹膜劣化群で有意に高値であった ($p = 0.03$)。血清 N-ERC および血清 C-ERC は、腹膜劣化群と非腹膜劣化群で有意な差は認められなかった。

腹膜劣化を目的変数とした多変量解析において、年齢、腹膜透析期間、GFR で調整後も腹膜透析排液中の N-ERC および C-ERC は有意な予測因子であり、腹膜劣化指標となることが示された。

腹膜劣化との関連が示唆される指標である腹膜透析排液中の IL-6、VEGF、CA125、ヒアルロン酸について、腹膜劣化を目的変数とした多変量解析において、年齢、腹膜透析期間、GFR で調整後も有意な予測因子であったのは、腹膜透析排液中の IL-6 であった。腹膜劣化 (腹膜平衡試験の High カテゴリー) を判別するカットオフ値は、N-ERC 28.9 ng/mL で感度 90%、特異度 65%、C-ERC 3.98 ng/mL で感度 80%、特異度 47%、IL-6 61.9 pg/mL で感度 80%、特異度 89%であった。

以上より、腹膜透析排液中の N-ERC の腹膜劣化指標としての有用性が示唆された。

(4) 一般臨床検査項目における腹膜劣化指標の検索及び腹膜劣化指標としての有用性の検討

一般臨床検査項目 (生化学検査、免疫学的検査) においては、腹膜透析排液中の腓リパーゼが、腹膜機能 (D/P Cr) と正相関を示し、腹膜劣化を目的変数とした多変量解析において、年齢、腹膜透析期間、GFR で調整後も有意な予測因子であった。これらの結果をまとめた英語論文は、研究期間内に世界臨床化学連合 (IFCC) の official journal である Clin Chim Acta に受理された (5. 主な発表論文等 [雑誌論文])。また、本研究課題を含む一連の業績が認められ、日本臨床化学会の若手育成シンポジウムの演者に選ばれてシンポジストとして発表した (5. 主な発表論文等 [学会発表])。

(1) ~ (4) の結果から、腹膜透析排液中の N-ERC は、腹膜中皮細胞から直接分泌されているものを反映している可能性が示唆された。また、腹膜透析排液中の N-ERC は、腹膜機能と正相関を示し、腹膜劣化を目的変数とした多変量解析において、年齢、腹膜透析期間、GFR で調整後も有意な予測因子であったことから、腹膜劣化指標としての有用性が示唆された。また、一般臨床検査項目では、腹膜透析排液中の腓リパーゼが腹膜劣化指標

として有用であることが示唆された。

<引用文献>

腹膜透析療法ガイドライン作成ワーキンググループ委員会編:2009年版日本透析医学会「腹膜透析ガイドライン」. 透析会誌 42:285-315, 2009
Sato T, Suzuki Y, Mori T, Maeda M, Abe M, Hino O, Takahashi K. Newly established ELISA for N-ERC/mesothelin improves diagnostic accuracy in patients with suspected pleural mesothelioma. Cancer Med 3:1377-84, 2014

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計5件)

Idei M, Tabe Y, Hamada C, Miyake K, Takemura H, Io H, Wakita M, Horii T, Tomino Y, Ohsaka A, Miida T. Pancreatic lipase activity in overnight effluent predicts high transport status in peritoneal dialysis patients. Clin Chim Acta 462:65-70, 2016. 査読有 (doi:10.1016/j.cca.2016.08.009)
Sasamoto K, Hirayama S, Kon M, Seino U, Ueno T, Nagao Y, Hirayama A, Isshiki M, Idei M, Yano K, Miida T. Changes in apolipoprotein E-containing high-density lipoprotein (HDL) have little impact on HDL-cholesterol measurements using homogeneous assays in normolipidemic and dyslipidemic subjects. Clin Chim Acta 470:56-63, 2017. 査読有 (doi:10.1016/j.cca.2017.04.018)
Isshiki M, Hirayama S, Ueno T, Ito M, Furuta A, Yano K, Yamatani K, Sugihara M, Idei M, Miida T. Apolipoproteins C-II and C-III as nutritional markers unaffected by inflammation. Clin Chim Acta 481:225-230, 2018. 査読有 (doi:10.1016/j.cca.2018.03.004)

[学会発表](計8件)

出居 真由美, 田部 陽子, 阿部 雅明, 濱田 千江子, 三宅 一徳, 樋野 興夫, 三井田 孝. 腹膜透析患者における N-ERC/mesothelin および C-ERC/mesothelin の検討. 第 63 回日本臨床検査医学会学術集会、神戸 (2016 年 9 月 1 日~9 月 4 日)
出居 真由美. 腹膜透析患者における腹膜透析排液を用いた新規腹膜劣化指標の検討. 第 57 回臨床化学会年次学術集会(若手育成シンポジウム)、札幌 (2017 年 10 月 6 日~10 月 8 日)
出居 真由美, 田部 陽子, 阿部 雅明, 濱田 千江子, 一色 美和, 三宅 一徳, 樋野 興夫, 三井田 孝. 腹膜透析排液中の

ERC/mesothelin と腹膜機能の関係. 第 64 回日本臨床検査医学会学術集会、京都 (2017 年 11 月 16 日~11 月 19 日)
Idei M, Tabe Y, Abe M, Hamada C, Miyake K, Hino O, Miida T. The clinical significance of ERC/mesothelin in peritoneal dialysis patients. The 29th World congress of World Association of Societies of Pathology and Laboratory Medicine WASPaLM 2017, Kyoto, Japan (11/15-11/18, 2017)

6. 研究組織

(1)研究代表者

出居 真由美 (IDEI, Mayumi)
順天堂大学・医学部・非常勤助教
研究者番号: 40596623