

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591482

研究課題名(和文) 補体制御因子の糖化より検討した被嚢性腹膜硬化症の病態解明と治療戦略

研究課題名(英文) Pathogenesis of encapsulating peritoneal sclerosis in the role of complement regulatory proteins and glycation

研究代表者

大澤 勲(Ohsawa, Isao)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：60407252

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：腹膜透析患者の腹膜中皮細胞と結合織では糖化現象が起きていて、C3、C4、MACの沈着があり、腹膜炎の既往がある症例ではMACの染色性が増強した。培養中皮細胞に血清を添加してもProperdin(P)の沈着は認めなかったが、factor H(H)、C3、MACの沈着を認めた。また血清添加前にPを添加すると、C3とMACの沈着が増強した。腹膜中皮細胞上ではPのHによる抑制を凌駕する作用により第二経路及びProperdin direct pathwayの活性化が起こると考えられた。以上より、腹腔内では恒常的に糖化が起きており、補体の活性化がEPS発症に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We explored the mechanisms of encapsulating peritoneal sclerosis (EPS) in the view point of advanced glycation end product (AGE) and complement activation. Peritoneal mesothelial cell and interstitium of peritoneum derived from the patients of peritoneal dialysis presented positive staining for AGE, C3, C4 and MAC. Especially in the specimens with the cases having peritonitis history, MAC staining were strong. In experimental model of mesothelial cell culture, deposition of factor H, C3 and MAC (properdin (P) was negative) were observed by adding normal human serum (NHS), however, the positive signal of C3 and MAC were enhanced by adding P before NHS. P might overwhelm H and leads complement alternative pathway activation on the surface of mesothelial cell. These results suggested that complement alternative pathway activation might involve the pathogenesis of EPS.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・感染症内科学

キーワード：糖化現象 被嚢性腹膜硬化症 補体 プロパージン C5b-9

1. 研究開始当初の背景

(1) 我が国の維持透析患者は 28 万人を越え増加の一途をたどっているが(平成 23 年データ)、血液透析の導入患者に対し腹膜透析導入(Peritoneal dialysis; PD)患者の占める割合は数%にすぎない。PD は患者自身もしくは家族などの介助で行える血液浄化法であるため、血液透析のように頻りに透析施設に通院する必要がなく、学業や仕事を続けながら行える Quality of Life (QOL) の高い治療である。また、透析施設の限られている山間部や遠隔地では、末期腎不全患者を救う方法として、なくてはならない治療法である。しかし、その導入にあたっては長期にわたる PD による生体への悪影響や合併症としての腹膜炎を繰り返すことによって、適切な治療法のない「被嚢性腹膜硬化症(Encapsulating peritoneal sclerosis, EPS)」を起こすことが最大の障壁となっている。

(2) EPS では、腹膜を内張りする中皮細胞の機能低下により腸管同士や腹壁と腸管の間で広範な癒着が起き、腸管運動が制限されることで腸閉塞を呈する。EPS を併発すると患者は突然の腹痛や嘔吐に悩まされ、頻回の入院による長期の禁食が必要となる。本邦の発症率は数%であるが、いったん発症すると難治性で、慢性的な栄養不足によって痩が込み、約 50%の症例が感染症などによって死に至る重篤な疾患である。よって PD の普及のためには、この EPS の克服こそが最重要課題となっている。

(3) EPS の発症機序はいまだ明確になっていないが、大きく分けてブドウ糖含有透析液に由来する細胞表面の機能性蛋白の変性(糖化:glycation)と、腹膜炎などによる腹膜中皮細胞への刺激が重要と考えられ、「two-hit theory」と呼ばれている。腹膜炎は通常、細菌や真菌感染が原因で発症し、PD 排液内に多数の白血球がみられ、抗菌薬やステロイド治療が奏功することから、腹腔内における感染防御や炎症が EPS の発症に重要な役割をなしていることに疑いはない。

(4) 現在、補体系には 3 つの経路(古典的経路・レクチン経路・第二経路)に加え Properdin direct pathway (PDP) の存在が知られている。いずれも感染防御機構として重要であるが、それぞれ、C1q、mannose-binding protein(もしくは ficolin)、C3 が病原体を認識し結合するオプソニン化作用と、それに続く病原体の細胞膜を貫通し死滅させる膜侵襲複合体(MAC; membrane attack complex)形成の役割は共通している。しかし、これらの系がひとたび自己の細胞を攻撃する状況になると、組織障害や自己免疫疾患の発症進行に寄与することになる。このように補体系は常に生体防御とともに自己の細胞を攻撃する可能性を秘めており、いかに補体系の働きをコントロールするかが、補体依存性の自己細胞障害を抑制する重要な

鍵となる。

(5) 我々は、従来より補体の視点から腎疾患の解明を行っており、炎症局所で産生する補体 C3 が組織障害を増悪させることや、高補体血症が病態へ影響すること、尿中補体制御因子の増加が病態を反映することなどを報告してきた。また近年では、PDP が自己の組織障害を起こすことをループス腎炎の腎生検組織を用いて世界で初めて証明した(Sato N et al. Lupus 2011)。一方、糖質や脂質代謝と補体の関連にも着目し、メタボリック症候群におけるアディポサイトカインとしての C3 産生(Ohsawa I et al. J Clin Lab Anal 2010)や糖尿病腎症患者の血清中の糖化物質処理機構の解明にも成果を出している。前述のように EPS の病態では糖化及び感染と補体系の強い関与が予想され、補体による腹膜中皮細胞の障害過程を明らかにすることが、EPS の発症機序の解明に不可欠である。EPS は現時点で禁食以外に有効な治療法のない疾患であるが、糖化抑制薬{ピリドキサミン(ビタミン B 6 化合物)、ベンフォチアミン(ビタミン B 1 誘導体)、リポ酸、など}は糖尿病の分野ですでに臨床応用がなされており、補体活性化抑制薬は、FOY、メシル酸ナファモスタット、C1-インヒビターが他の疾患で治療に用いられており、最近では、補体活性化経路の一部にターゲットを絞ったエクリズマブ(抗 C 5 ヒト化モノクローナル抗体)が夜間発作性血色素尿症や非定型溶血性尿毒症症候群に対し使用されている。我々の検討が進めば、EPS に対しこれらの治療薬を用いた積極的な治療ができる可能性がある。

2. 研究の目的

腹腔内の生体防御機構は補体や貪食作用などの自然免疫系が主力であるが、PD の重篤な合併症である EPS の発症機序とのかかわりについての解明は進んでいない。しかし、長期の PD や腹膜炎を繰り返す症例で発症頻度が高く、腹膜中皮細胞の糖化や補体系が EPS 発症に関与していると考えられる。今回我々の研究グループは、PD 患者における腹膜中皮細胞障害に対する補体系の関与を中心に解析し、最終的に EPS の克服につながる研究をすることを目的とした。特に C3 レベルの活性化を促進する properdin (P) とこれを抑制する factor H (fH) は細胞表面のヘパラン硫酸に結合し、自己の細胞表面で活性化と抑制のバランスを取っている可能性があり、細胞培養の実験では解明の重要な視点とした。

3. 研究の方法

(1) 腹膜組織の収集と検討

当院で治療中の PD 患者へ担当医よりインフォームド・コンセントを行い、承諾を得た後に PD の新規導入例 26 人と腹膜カテーテル除去症例(PD 終了時もしくは PD カテーテル入れ替え時) 27 人を対象に、手術時に腹膜組織

を採取しパラフィン固定し保存した。

(2) 腹膜組織の染色：パラフィン切片に hematoxylin-eosin 染色、periodic acid-Schiff 染色、Masson's trichrome 染色、AZAN 染色、PTAH 染色を行い、光学顕微鏡を用いて腹膜の性状を観察した。

(3) 補体の特殊染色：腹膜組織で補体の活性化が起きていることを検討するために、腹膜組織に対し酵素抗体法による補体(C3、C4)、MAC の沈着を観察した。

(4) 糖化現象の確認：腹膜の糖化を評価するために腹膜組織に対して Advanced Glycation End Products(AGE)の染色を行った。

(5) PD 排液の収集と検討：PD 排液の採取は患者来院時もしくは腹膜炎にて入院時に行い、20 人分採取できた。PD 排液は遠心分離を行い、沈渣を Giemsa 染色することにより炎症細胞の分画を調べた。次に、三つの補体経路による病原体認識能の測定のために当研究室の井下 (BMC Nephrol Vol.11, 34, 2010)がヒト血清対して用いた Wielisa®を用いて、PD 排液の病原体認識能を測定した。

(6) 培養細胞を用いた補体活性化の検討：腹膜中皮細胞による実験系の設定に先立ち、以前より我々が培養実験に用いている HK-2 細胞、すなわちヒト尿管上皮細胞 (PTEC: proximal tubular epithelial cell) を用いて補体活性化経路の検討を行った。PTEC には 5%及び 25%血清(NHS: normal human serum)を添加し、形態変化及び補体の沈着を FACS や細胞染色により評価した。更に細胞内の補体第 2 経路の成分の mRNA の発現を測定した。また補体による PTEC の Viability 評価は MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]を培養中に添加することで行った。

ヒト腹膜中皮細胞を培養し、上記 PTEC で行った実験条件を参考に同様の検討を行い、補体系活性化の関与を検討した。

4. 研究成果

(1) 腹膜組織の検討

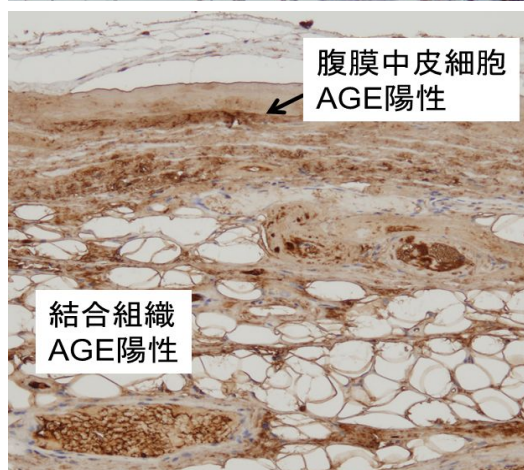
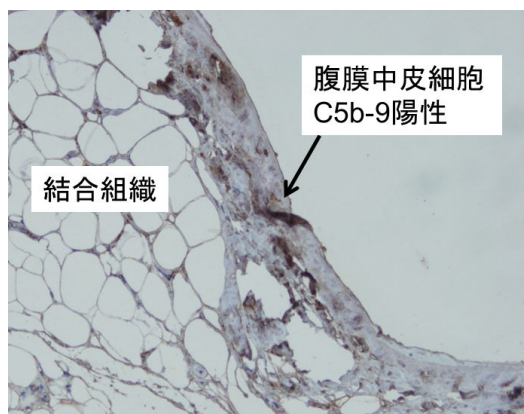
27 人中、17 例に少なくとも 1 回以上の細菌性腹膜炎の既往があった。今回の腹膜検体には真菌感染例は認めなかった。

PD 導入からの継続期間が長いほど、腹膜カテーテル除去時の腹膜の線維性肥厚から硬化性肥厚への移行と細動脈壁の肥厚・内腔狭小化が観察され、フィブリンや硝子様物質の増加が多く認められた。また特に腹膜炎歴のあるものでは、好中球分画の多い炎症細胞が組織内へ浸潤しており、病原体に対する生体防御反応が組織内で起こっていることが確認できた。

いずれの組織にも中皮細胞・中皮下結合組織・細動脈に C3、C4、MAC の沈着が認められた。

一方、腹膜炎の既往がある症例では中皮下

結合織に MAC (C5b-9) の強い染色性が認められ、補体による組織障害が起きていることが明らかとなった。



腹膜組織の染色では、補体活性化経路のすべて(古典的経路・レクチン経路・第 2 経路)の活性化が確認された。

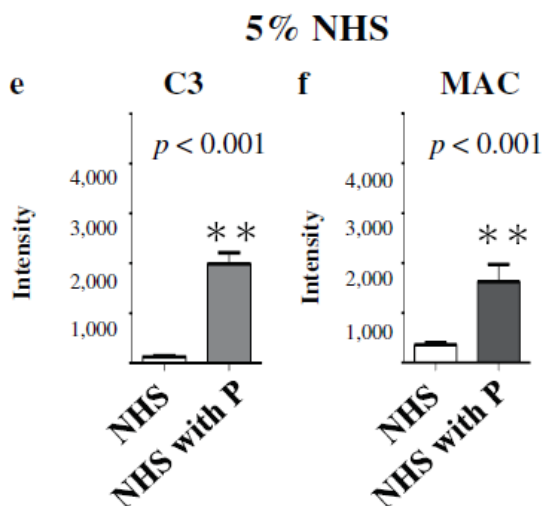
腹膜中皮細胞に AGE の染色が確認され、腹膜透析導入により中皮細胞や結合組織で糖化が亢進していることが確認された。

(2) PD 排液の検討：すべての患者は、ブドウ糖入りの腹膜透析液を使用しており、腹膜への糖の長期暴露を確認した。PD 排液中では腹膜炎歴のあるものでは好中球の割合が高かった。PD 排液の病原体認識能の測定では、繰り返し実験条件を工夫したが比較検討に値する十分な再現性が得られなかった。原因としては、PD 排液の組成、特にブドウ糖濃度が測定結果の再現性に悪影響を与えていたのではないかと推察した。今回 PD 排液由来の検体において、オプソニン化を確認することはできなかった。

(3) 培養細胞を用いた補体活性化の検討

PTEC を用いた補体活性化経路の検討
PTEC に 5%及び 25%NHS を添加して培養した。様々な培養条件を検討し、顕微鏡下で形態変化は認められずに viability の低下する培養時間 (3 時間) を実験条件に採用した。この時点では、細胞内の C3、C5、C9、P、fH、factor B の mRNA の発現増強は認められず、この条件下では PTEC が産生したり、破壊されることで細胞内から供給される補体の量は無視できると考えられ、その後の実験条件も統一し

て行った。
PTEC に NHS を添加して培養し、蛍光顕微鏡による観察と FACS による定量を行うと、細胞に補体 P、fH、C3、MAC の沈着が血清濃度依存的に認められ、血清由来の補体の沈着及び第 2 経路 (AP) の活性化が起きていることが示唆された。さらに、P、fH の単独添加では、それぞれが PTEC への濃度依存的な沈着を認めたが、両者混合添加では競合的な沈着は示さず、PTEC 上で P と fH が競合的に働くことはなかった。そこで培養細胞への NHS を添加する前に P を先行添加しておく、C3 及び MAC の沈着が増強する現象が観察された。



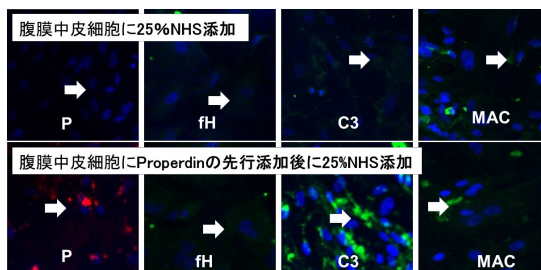
同様に P 欠損血清添加前に P を先行添加しても、C3 及び MAC の沈着は増強した。このことから、PTEC の細胞障害に対する AP の活性化の関与が示唆され、その起点として P が細胞表面に結合する PDP の活性化が更に補体活性化を増強する因子として重要であることが示唆された。このことは疾患の発症に PDP が関与することを基礎研究で明らかにしたことになり、P は fH による抑制を受けないことが分かったため、日本腎臓学会学術集会 (2013) World Congress of Nephrology (香港、2013) での口演発表と BMC Nephrology (2014) への紙面発表をすることができた。

ヒト腹膜中皮細胞に対する補体活性化の検討

5%から 25%の NHS 添加では、P の沈着は認めなかったが、fH のわずかな沈着を認め、C3 及び MAC の沈着を認めた。このことから腹膜中皮細胞上でも fH による AP の活性化は抑制しきれていないことがわかった。また現在、腹膜中皮細胞表面に P の結合するプロテオグリカンが存在するかは不明であるが、腹膜中皮細胞の補体依存性の障害には、PTEC に比べて PDP の関与は少ない可能性がある。

一方、NHS の添加前に P を添加すると、P の沈着とともに、C3 及び MAC の沈着が亢進した。以上をまとめると、EPS の発症に組織の糖化と補体の二つの経路 (AP、PDP) の活性化が関与していると考えられた。さらに fH は細胞表面にて C3 や P の活性化を抑えきれないことが分かった。PD 患者の腹腔内では恒常的

に炎症が起きており、浸潤した炎症細胞が腹膜局所で P を産生することにより、P が腹膜中皮細胞に結合し、PDP 活性化の起点になる可能性があると考えられた。



現在までに、以上の成果を日本腎臓学会学術集会 (ワークショップ「基礎から臨床につながる補体学」2013) J-CKD (2013) CKD フォーラム (2014) で発表することができた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6 件)

1. 長町誠嗣、大澤 勲、佐藤信之、他 7 名、Properdin has an ascendancy over factor H regulation in complement-mediated renal tubular damage、BMC Nephrol、査読有、2014 May 22;15:82.doi:10.1186/1471-2369-15-82
2. 鈴木日和、大澤 勲、長町誠嗣、他 9 名、Fluctuation of serum C3 levels reflects disease activity and metabolic background in patients with IgA nephropathy、J Nephrol、査読有、Vol.26, p708-715、2014、DOI: 10.5301/jn.5000278
3. 大澤 勲、長町誠嗣、他 11 名、Occurrence of reversible posterior leukoencephalopathy syndrome in a continuous ambulatory peritoneal dialysis patient、J Nephrol Ther、査読有、Vol.3, :4, 2013、doi.org/10.4172/2161-0959.1000130
4. 井下博之、大澤 勲、他 5 名、An analysis of functional activity via the three complement pathways during hemodialysis sessions: a new insight into the association between the lectin pathway and C5 activation、Clin Kidney J、査読有、Vol.5, p401-404, 2012、doi: 10.1093/ckj/sfs089
5. 増田敦美、大澤 勲、他 14 名、Effects of acetate-free citrate dialysate on glycoxidation and lipid peroxidation products in hemodialysis patients、Nephron Extra、査読有、Vol.2, p256-268, 2012、doi: 10.1159/000342258
6. 恩田紀更、大澤 勲、他 8 名、Excretion of complement proteins and its activation marker C5b-9 in IgA nephropathy in relation to renal

〔学会発表〕(計6件)

1. 大澤 勲、臨床に役立つ補体系の理解と腎疾患、CKD フォーラム、2014年3月14日、盛岡
2. 大澤 勲、補体からみた腎炎の病態、富山腎・高血圧講演会、2013年11月21日、富山
3. 長町誠嗣、大澤 勲、佐藤信之、他5名、The role of properdin in complement-mediated tubular damage、World Congress of Nephrology、2013年6月2日、香港
4. 長町誠嗣、大澤 勲、佐藤信之、他2名、尿細管障害における Properdin direct pathway 活性化の検討、日本腎臓学会、2013年5月13日、東京
5. 大澤 勲、ワークショップ 2「基礎から臨床につながる補体学」臨床検体における補体の解析、日本腎臓学会、2013年5月10日、東京
6. 大澤 勲、補体からみた腎疾患、J-Conference for kidney doctors(J-CKD)、2013年1月31日、東京

〔図書〕(計3件)

1. 大澤 勲、中外医学社、臨床検査基準値 express、補体価、C3、C4、2011年、p6-7
2. 大澤 勲、メジカルビュー社、補体への招待、プロペルジン、2011年、p200-204
3. 大澤 勲、メジカルビュー社、補体への招待、クリオグロブリン、2011年、p215-218

4. 研究組織

(1)研究代表者

大澤 勲 (OHSAWA, Isao)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号：60407252

(2)研究分担者

恩田紀更 (ONDA Kisara)
順天堂大学・医学部・助教
研究者番号：60465044

(3)連携研究者

佐藤信之 (SATO, Nobuyuki)
順天堂大学・医学部・助教
研究者番号：70621944

長町誠嗣 (NAGAMACHI, Seiji)
順天堂大学・医学部・大学院生