

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26750151

研究課題名(和文)透析膜におけるC3a・C5a産生の原因となる補体因子を特定する

研究課題名(英文) Identification of complement factor trigger production of C3a and C5a during hemodialysis

研究代表者

井下 博之 (INOSHITA, Hiroyuki)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：80646117

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：血液透析(HD)は、血液を体外に循環させ透析膜を通すことで血液を浄化し、末期腎不全患者の生命を維持している。しかしながら、その過程で発生する補体因子C3a・C5aは動脈硬化の一因となり、ひいては心血管死を招くため、その抑制が重要な課題となっている。本研究ではHD中のC3a・C5a産生を引き起こす補体因子の特定を第一の目的とした。HD患者20名の血清中のCH50(補体全体の活性化を示す指標)を計測したところ、健常人と比較してやや上昇傾向にあった。さらに6名の透析膜に付着した成分に対して質量分析を行い、結果、様々な補体因子が検出されており、透析中には補体が複雑に活性・抑制されていることが判明した。

研究成果の概要(英文)：Hemodialysis is a process of purifying the blood of a person whose kidneys are not working normally. During the hemodialysis, complement factor C3a and C5a which cause atherosclerosis and cardiovascular disease occur by activation between blood and dialyzer. In this study, we mostly aimed to identify specific molecules which mainly trigger the production of C3a and C5a. Proteins absorbed by dialyzer after hemodialysis (n=6) were analyzed by mass spectrometry. Various complement factors including complement factor H, is a member of the regulators of complement activation family, were detected. Our results show that complement regulatory factors may contribute to synthesize the C3a and C5a during hemodialysis.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：補体活性化 生体適合性 透析膜 血液透析 C3a・C5a

1. 研究開始当初の背景

血液透析は、血液を体外に循環させ透析膜を通すことで血液を浄化し、末期腎不全患者の生命を維持している。

しかしながら、その過程で発生する補体因子 C3a・C5a は動脈硬化の一因となり、ひいては心血管死を招くため、その抑制が重要な課題となっている。C3a・C5a は補体系の活性化を経て産生されるが、原因となる補体因子の特定には至っていない。

2. 研究の目的

(1)病態解明の必要性

末期腎不全(ESKD)に陥った患者の生命を維持するために血液透析(HD)が行われている。HDでは、体外に一時的に血液を取り出す必要があり、この血液は、透析膜や回路といった人工的素材への接触を余儀なくさせられる。

この接触は補体活性化をきたし、活性化産物である C3a・C5a によって急性期にはアナフィラキシーショックを引き起こし、慢性期には動脈硬化の一因となる。

日本透析医学会の集計では、2012 年末現在、約 30 万人もの ESKD 患者が HD を施行しており、死亡原因の約半数が動脈硬化による心血管死であることを考えると、透析患者の合併症管理において C3a・C5a は抑制されねばならない。

また、補体活性化は血液凝固・血栓形成とも相互に密接に関係している。C3a・C5a による血栓形成は透析膜の管空を詰らせ、性能劣化をまねいてしまい、さらには血液の流れを物理的に遮断してしまうことで、治療の中断につながる。

これらの事象は血液透析の現場において、透析患者の肉体的な負担や医療コストの面から、大きな問題となっている。

よって透析膜と血液の接触で発生する C3a・C5a を抑えることは HD 患者の生活の質(QOL)を高め、増大し続ける医療費を削減するうえでの最重要課題である。

(2)これまでの我々の研究から示唆されること

補体活性化経路には 3 通りの活性化経路が存在する。C1q の免疫複合体への認識・結合が引き金となる経路を古典的経路、生体防御レクチンが糖鎖を認識することにより始まる経路をレクチン経路と呼ぶ。

また、認識機構を持たず、C3 のチオエステル部位が加水分解を受けることにより活性化が生じる経路は副経路と呼ばれている。この 3 通りの活性化経路を介して共通の経路へと反応が続き、C3a・C5a が生じる。これまで血液が透析膜に接触した際の C3a・C5a 産生については主に副経路が関与しているとされてきた(Allergy, 2006;61:2)。

しかしながら、他の 2 経路についての解明は不十分であったことから、我々は HD 患者を

対象にした補体活性化経路の研究を進めてきた。

2010 年に我々は、特殊な ELISA を用いることにより、透析患者群(n=244)では健常群(n=204)と比較して 3 通りの補体経路活性化全てが亢進し、C3a・C5a が増加していることを明らかにした(BMC Nephrol. 2010;11:34)。そこでさらに研究を進め、2012 年には、この 3 つの経路のうち特にレクチン経路が、透析膜における C3a・C5a 産生と密接な関連があることを明らかにした(Clin Kidney J. 2012; 5:5)。

我々の一連の結果は、これまでは主に副経路が重要視されていた経緯からすると、非常に興味深いものである。と同時に、C3a・C5a 産生のメカニズムを解明するためには、3 つの補体経路の活性化に関与する全ての補体成分(C1q、C2、C4、C3a、C5a、B 因子、D 因子を含めた 14 種及び I 因子、H 因子を含めた液性調節因子 5 種)を対象に網羅的に解析し、補体活性化経路の動態を把握し、C3a・C5a 産生に深くかかわる補体成分を特定する必要があるとの結論に達した。

そこで我々は以下の研究を計画した。

HD 後の透析膜に付着した蛋白質を溶出した後、透析膜に付着していた補体因子を同定する。

の結果から補体活性化経路の動態を把握し、産生に関わる補体因子の候補を選定する。さらに候補蛋白質の中から C3a・C5a 産生に深く関与する補体因子を特定する。

将来的には、補体活性化を抑制した次世代型透析膜の開発を民間会社と共同で行う。

(3)当該分野における本研究の学術的な特色・独創的な点及び予想される結果と意義

研究の独創的特色は、HD 中における C3a・C5a 産生および補体活性化を、3 つの補体経路全てを解析する方法により解明する点である。

研究代表者は腎臓内科学講座に所属し、2009 年に東海大学工学部生命科学科の松下操教授と共同で新規補体活性測定法を開発し

(Inoshita H, Matsushita M, Ohsawa I, Tomino Y et al. J Immunol Method 2009) 臨床応用している。また 2013 年には松下教授と連名で補体活性化経路の測定法に関する著書(腎臓病実験法ハンドブック第 1 版;富野康日己編)を上梓している。松下教授は、生体防御レクチンをはじめとする補体学の第一人者であり、今回は連携研究者として補体活性化および C3a・C5a 産生に関する技術的な指導をしていただく。また、透析膜に関するデータの解釈をしていく。

また、我々順天堂大学には、研究室と同じ敷地内に、プロテオーム解析に必要な質量分析

器を初めとして、分子生物学に関するほとんどすべての実験が可能な実験設備が備えられた『生体分子研究部門』がある。

我々は、この施設を、24 時間自由に使える環境にある。よって我々のグループは本研究を遂行するための十分な研究成果と知識、研究施設を備えている。これらの利点を生かせば、期間内に目標を達成することは十分に可能である。

C3a・C5a の産生に関わる補体成分が特定されれば、社会に与える影響は大きく、補体活性化をより一段と軽減した次世代型透析膜の実現が可能となる。

これは透析膜の血栓形成を抑制することにもつながり、HD によって引き起こされるアナフィラキシーの予防もしくは症状の軽減化が期待できる。また、HD 患者における動脈硬化進展を抑制し、ひいては心血管病に対する治療によって膨大となっている医療費の削減にもつながる。

3. 研究の方法

(1)目標:透析膜に付着した補体成分を全て明らかにする。

順天堂大学医学部順天堂医院で維持 HD を施行されている、ESKD 患者 76 名 (トリアセテート膜 33 名・ポリスルホン膜 25 名・ポリエーテルスルホン膜 18 名)より採取した血清中の 3 つの補体経路活性化を特殊な ELISA(井下博之、松下操: [補体活性化経路の測定法] 腎臓病実験法ハンドブック第 1 版, 2013)を用いて測定し、活性化経路を確認する。

上記の血清を、患者それぞれが使用している未使用の透析膜(中空系になる前の紙状の形態)に反応させ、C3a・C5a 産生を ELISA を用いて、in vitro で確認するとともに定量化する。

上記 76 名の患者に使用した透析膜を十分に PBS で洗浄した後、回収する。その後 SDS バッファーを透析膜に通し、透析膜に付着した蛋白質を溶出する。

溶出した蛋白質を電気泳動で分離した後、ウェスタンブロットで補体成分 14 種(C1q、C2、C4、C3a、C5a、MBL、L-ficolin、H-ficolin、MASP1、MASP2、MASP3、sMAP、B 因子、D 因子)と液性補体制御因子 5 種(I 因子、H 因子、C1-inhibitor、Properdin、C4bp)の発現量を比較検討することにより、補体経路活性の動態を把握する。

C3a・C5a 産生に関与する補体成分の特定のため、原則的には発現量の多い補体成分から候補を選定していく。

またデータに対する信頼度を高めるため、の in vitro 実験結果との相関性を検証する。

(2)目標: C3a・C5a 産生に深く関与する補体成分の同定・新しい透析膜の開発にむけて

上記で候補となった補体成分の除去血清を作製し、透析膜に反応させ C3a・C5a 産生を in vitro(ELISA)で評価する。

C3a・C5a 産生に深く関与する補体成分であれば、その除去血清を用いた場合と、そうでない場合の C3a・C5a 産生の差は大きくなるはずである。

この方法により、C3a・C5a 産生に関与する補体成分を同定していく。リコンビナントを用いて再構成実験も行う。

また、C3a・C5a による血栓形成についても評価するため、FDP、D-dimer、トロンピン、プロトロンピン、組織プラスミノゲン活性化因子(t-PF)などの凝固・線溶系因子の産生を上記と同様の方法で検証する。

特定された補体因子が補体活性化経路をトリガーする分子であった場合は、補体経路活性化を抑制した透析膜を実現できる可能性が高いため、民間会社と協議していく。

4. 研究成果

まずはじめに、全体的な補体活性化を確認するために、順天堂大学医学部附属練馬病院で

症例(n=6)	検出された補体蛋白
No.1	Factor H
	C3
	C4b
	Factor B
	CFHR
No.2	Factor H
	Factor D
	C3
	CFHR
	C2
No.3	Factor H
	C3
	CFHR
	C4
	FB
No.4	CFHR
	Factor D
	Factor H
	Factor B
No.5	C2
	Factor H
	C3
	CFHR
	C4b
No.6	Factor B
	Factor H
	C3
	CFHR
	Factor D
	Factor B
	Factor B

維持透析をされている透析患者 20 名の血清中の CH50(補体全体の活性化を示す指標)を計測したところ、健常人 20 名と比較して、やや上昇傾向にあることが確認された。

C3a・C5a 産生に深く関与する補体成分を特定するため、現在維持透析を施行されている慢性腎不全患者の透析後の透析膜(n=6)を回収し、生理食塩水で十分に洗浄したのち、希釈した酢酸を通すことにより、透析膜に付着した蛋白質の回収に成功した。分光光度計による蛋白定量で確認している。

さらに上記の回収した蛋白質に対して、質量分析を行った(下記表図参照)。

補体系活性化に関連する蛋白質のうち、5 症例で補体制御因子である、Factor H が最上位に検出されていた。次に多く検出されたのは C3 や C4 であった。また、Factor H related protein(CFHR)や、Factor D など上位に認められた。これらの事柄から、透析中には様々な補体因子が複雑に活性・制御されていることが想定される。

また、透析膜の生体適合性を評価する上で、これまでに C3a や C5a が着目されていたが、制御因子である Factor H が性能評価指標となる可能性がでてきたのは非常に重要である。

さらに CFHR がすべての症例で検出されたことも興味深い。なぜなら、CFHR の機能の詳細については未だ明らかとなっておらず(恐らくは Factor H に競合的に作用すると考えられているが)、特に透析中での CFHR の働きについてはほとんど研究をされていない。今後は CFHR が透析患者においてどのような作用を及ぼしているのか、またそれは生体適合性と関連しているのかなどの評価を行っていく予定。

今後これらの補体因子を中心としてさらに解析を進め、アメリカ腎臓学会(Kidney Week)を含めた、国内外に成果を発表する。

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 3 件)

Shimamoto M, Ohsawa I, Suzuki H, Hisada A, Nagamachi S, Honda D, Inoshita H, Shimizu Y, Horikoshi S, Tomino Y. Impact of Body Mass Index on Progression of IgA Nephropathy Among Japanese Patients. J Clin Lab Anal. 2015;29(5):353-60. 査読有

Ohsawa I, Honda D, Nagamachi S, Hisada A, Shimamoto M, Inoshita H, Mano S, Tomino Y. Clinical manifestations, diagnosis, and treatment of hereditary angioedema: survey data from 94 physicians in Japan. Ann Allergy Asthma Immunol. 2015 Jun;114(6):492-8. 査読有

Honda D, Ohsawa I, Sato N, Inoshita H, Mano S, Tomino Y, Suzuki Y. Diminished capacity of opsonization and immune complex solubilization, and detection of anti-C1q antibodies in sera from patients with hereditary angioedema. Allergol Int. 2017. pii: S1323-8930(17)30041-2.

[学会発表](計 1 件)

D Honda, K Onda-Tsueshita, I Ohsawa, H Inoshita, S Horikoshi, Y Tomino. "Severe renal interstitial fibrosis can be a predictor of renal function in patients with lupus nephritis, especially in cases with the international society of nephrology/renal pathology society Class IV" Kidney Week アメリカ腎臓学会, 2015/11/5, San Diego, CA

[図書](計 0 件)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

井下 博之 (INOSHITA, Hiroyuki)

順天堂大学 医学部 助教

研究者番号 : 80646117

(2)研究分担者

()

研究者番号 :

(3)連携研究者

(4)研究協力者

大澤 勲 (OHSAWA, Isao)

順天堂大学 医学部 准教授

研究者番号 : 60407252

富野 康日己 (TOMINO, Yasuhiko)

順天堂大学 医学部 教授

研究者番号 : 60130077

本田 大介 (HONDA, Daisuke)

順天堂大学 腎臓内科学講座 大学院生

研究者番号 : 50790094