

令和元年5月11日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09608

研究課題名(和文) 抗エリスロポエチン受容体抗体の測定系の開発と腎予後に及ぼす影響に関する基礎的検討

研究課題名(英文) Development of the measurement system of anti-erythropoietin receptor antibodies and the basic examination of these effect on renal outcome

研究代表者

原 章規 (Hara, Akinori)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：70507045

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：新規エリスロポエチン(EPO)阻害因子である抗EPO受容体抗体の測定系の開発を行うとともに、抗体の腎予後に及ぼす影響を検討した。ループス腎炎に続いて2型糖尿病性腎症を対象とした。抗体は腎生存率が小さいことと関連した。血圧や蛋白尿に加えて抗体を有することが腎予後に対する独立した危険因子であった。病理学的には、抗体は腎間質における細胞浸潤の割合が大きいことと関連した。培養尿細管上皮細胞を用いた実験の結果、抗体はEPOの抗炎症効果を一部抑制することにより間質炎症を増悪させる可能性が示された。これまでに測定法の改良に加え、マウス腎障害モデルを用いてEPOの臓器保護メカニズムについての検討を行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性腎臓病(CKD)において臨床的に有用なバイオマーカーの開発が求められている。近年、高齢化、肥満・糖尿病の増加など背景として末期腎不全のハイリスク者が増加している。末期腎不全は透析治療を余儀なくされるのみならず、高率に発症する心血管疾患による生命予後悪化およびそれに対する治療にかかる医療費負担が大きくなりやすい。したがって、患者予後改善および社会負担軽減のためCKDハイリスク群の診断法の向上および予後予測を可能とする方法の開発は重要な課題である。本研究で得られた成果である抗EPO受容体抗体の測定は、CKDにおける腎予後予測の補助を目的とした新たな臨床検査診断法となる可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：We developed the measurement system of autoantibodies to erythropoietin (EPO) receptor (EPOR) and performed the examination of these effect on renal outcome. Following lupus nephritis, we examined the effect of the antibodies in patients with type 2 diabetic nephropathy. A decrease in renal function was observed more frequently in patients with antibodies than in those without antibodies, and the presence of the antibodies together with well-known clinical parameters, including blood pressure and proteinuria, was a significant risk factor for end-stage renal disease. Pathologically, anti-EPOR antibodies were associated with increased levels of interstitial inflammation. Immunoglobulin G fractions containing anti-EPOR antibodies interfered the anti-inflammatory effect of EPO in a human tubular epithelial cells. Besides, we have improved the measurement system, and continued to examine the mechanism of organ protective effect of EPO using kidney disease models in mice.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：慢性腎臓病

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

貧血は日常診療で最も頻繁にみられるごくありふれた病態である。これまでの検討から、貧血は、がん・慢性腎臓病 (chronic kidney disease; CKD)・心不全を含む患者における生命予後および QOL と密接に関わることが明らかになっている。貧血の病態には鉄の利用障害に加えて、赤血球系前駆細胞の増殖障害や EPO の産生障害が考えられている。本病態を呈する CKD の治療に対して、赤血球造血刺激因子製剤 erythropoiesis stimulating agent (ESA) が 1990 年より実用化されている。しかしながら、ESA を用いた治療に反応の乏しい患者群が知られ、このような病態は EPO 低反応性あるいは EPO 抵抗性と呼ばれ、その病態解明は臨床的に重要な課題である。

EPO 低反応性の病態には種々の因子が関与している。その一つとして、1996 年に Casadevall らは EPO の活性を中和する作用を有する内因性の EPO に対する自己抗体、すなわち抗 EPO 抗体を認めた赤芽球癭 (pure red cell aplasia ; PRCA) の症例を報告した。その後、ESA の一つである遺伝子組み換えヒト EPO (rHuEPO) 製剤に対する自己抗体による赤芽球癭を発症した CKD 症例も報告された。また、全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus ; SLE) などの自己免疫疾患やリンパ増殖性疾患にも同抗体の存在が報告され、貧血との関与が示唆されてきた。この点において、我々は PRCA を合併した SLE 患者における抗 EPO 抗体の生物学的活性を試験管内の検討により明らかにした (Hara et al. Am J Hematol 2008)。

以上の病態解析に端を発して、EPO 低反応性に関与する新規の因子として、EPO 受容体に対する内因性の自己抗体、すなわち抗 EPO 受容体抗体が存在するという仮説を立て研究を進めてきた。その結果、SLE をはじめとする自己免疫疾患や CKD 患者の一部の血清中に抗 EPO 受容体抗体を見出した。さらに、抗 EPO 受容体抗体は、1) 細胞膜上の EPO 受容体と結合すること、2) ヒト EPO 依存性細胞株の増殖を濃度依存性に抑制することを確認した。また、ELISA 法による抗体の吸光度は患者骨髄中の赤芽球数や末梢血中網赤血球数と相関した (Hara, et al. Br J Haematol 2013)。

以上の結果より、申請者らが新規に同定した抗 EPO 受容体抗体の一部は EPO 作用の中和活性を有し、貧血に関与することが示唆された。また、申請者らによる最近の検討では、抗 EPO 受容体抗体を有する腎性貧血合併 CKD108 例では、抗体が陰性の症例に比して EPO 製剤の使用量は大きいことが判明した。これらの事実から、抗 EPO 受容体抗体は、臨床における ESA に対する治療応答性の予測を通じた個別化医療の発展に貢献できる可能性を秘めるとともに、貧血の病因・病態に関わる新たな因子として医学生物学的な知見として重要であると考えられた。

EPO 受容体は、赤血球系前駆細胞の他、腎臓や心臓血管系にも発現し、これらの臓器に対する直接の保護作用を有することが判明してきた。また、腎病変と心病変がお互いの病態をさらに増悪させる腎心連関機序の一部に EPO 作用の低下が示唆されている。申請者らの最近の検討により、抗 EPO 受容体抗体は、ループス腎炎の予後予測に加えて、糖尿病性腎症の予後も予測可能であることを明らかにしつつあった。

上述のように、抗 EPO 受容体抗体を測定することは、医学・医療上大きなメリットがあると推測された。一方で、測定系には改良の余地があった。具体的には、血清中に微量に存在する性質であることに由来する、測定ノイズ、および測定時間の長さ等である。将来の臨床応用を鑑みれば、これらの課題を克服し、同抗体を迅速かつ高精度で測定可能な系が必要である。また、本抗体が腎機能障害の進行にどのように関与しているのかも明らかにする必要があった。

2. 研究の目的

そこで、本研究では、申請者らが世界に先駆けて発見・報告した抗 EPO 受容体抗体の測定系をより迅速かつ高精度な系へと発展させ、その臨床評価を行うとともに、その臓器障害との関連を疾患モデル動物により検討することを目的とした。本研究により、貧血、ことに治療薬等に対する低反応性貧血の病因診断、腎臓病に伴う貧血 (腎性貧血) に対して使用されている ESA に対する治療応答性の予測、および臓器障害の進行の予測を通じた個別化医療を可能とする体外診断法の開発に繋がることが期待できると考えた。

3. 研究の方法

本研究では、抗 EPO 受容体抗体の迅速かつ高精度な測定を可能とする測定系として、従来の ELISA を改良する、抗 EPO 受容体抗体の臨床的意義について、CKD の病因別コホートを用いて、特に腎予後に及ぼす影響を検討する、腎臓病モデルマウスを用いて、EPO 機能の修飾が腎病変に及ぼす影響を基礎的に検討する。この際、生体内における EPO-EPO 受容体の動態評価や同在を確認するため、生体イメージングによる検討を加えた。具体的な方法は以下の通りである。

4. 研究成果

3 つのパートについて、各々以下に示す内容の成果が得られた。

(1) 抗 EPO 受容体抗体測定系の改良

従来の ELISA を改良してきた結果、抗体測定性能の維持・向上とともに、測定迅速化が可能となることが示唆された。1) 一次抗体反応条件、2) 二次抗体バッファーおよび3) 二次抗体濃度の3点を主な改良点とした。一次抗体反応として、改良後の二次抗体バッファーの条件下において、従来の4、24時間の反応時間で得られた吸光度と室温、2時間の反応時間で得られた吸光度は同等で相関が良好であった。さらに、至適濃度を検討した二次抗体濃度の条件下では、陽性例と陰性例の図り分け性能が同等以上であった。このように、バッファー等の条件を改良した ELISA の系を継続して用いることで今後の研究・開発が可能と考えられた。

続いて、1) 抗原固相化段階、2) 1次抗体反応段階および3) 二次抗体反応段階の3点の最適化を行った。抗原固相化段階では、固相抗原である可溶性 EPO 受容体の濃度を従来の5 µg/mL から、より低濃度の1 µg/mL として比較検討したところ、両群間で同等の結果が得られた。これより固相抗原の濃度の低濃度化が可能と判断された。1次抗体反応では、バッファーに10% FBS を加えたものを従来のバッファーと比較した。その結果、バックグラウンドを小さく抑えつつ、陽性サンプルを検出できることが判明した。この際、カットオフ値となる吸光度も0.3と設定できた。健常血清を追加して行った再現性試験では、感度100% (6/6)、特異度97.6% (40/41)となった。二次抗体反応では、抗体濃度を2,500倍に最終調整した。

さらに、1次抗体反応前ブロッキングでは、FBS にスクロースを添加したバッファーを作製した。1次抗体反応では、バッファーに10% FBS を加えたものを最終条件とした。この最終条件において、可溶性 EPO 受容体を測定系に添加することによる吸収試験を行った。その結果、陽性症例6例のうち1例を除いて抗原特異的な ELISA 吸光度値の低下がみられた。以上から、1例の除く陽性検体では、可溶性 EPO 受容体に特異的に反応する抗体を含むことが確認された。

(2) 抗 EPO 受容体抗体の臨床的意義

抗 EPO 受容体抗体の新たな臨床特性として、CKD 患者の腎予後に及ぼす影響について検討した。

はじめに、抗体が最も高頻度に見られたループ腎炎に着目した。対象とした46例において、抗体の陽性群では陰性群と比較して、疾患活動性が高く、推算糸球体濾過量(GFR)の-30%変化で定義した腎予後が不良であった。腎予後の予測因子を多変量解析で検討したところ、蛋白尿とGFR で規定される治療反応性に加えて、抗体価が独立した因子として選択された。組織学的には、抗体陽性群において活動性病変指数、特に糸球体における細胞性半月体の割合が高かった。

次に、透析導入の原因疾患の第1位として医学的・社会的に重要な糖尿病性腎症に着目した。腎予後の判明している2型糖尿病性腎症112例を対象として検討したところ、抗体陽性群では陰性群と比較して、腎累積生存率が小さいことが判明した。腎予後予測因子について多変量解析で検討したところ、血圧や蛋白尿に加えて抗体を保有することが独立した危険因子として選択された。なお、抗体陽性群では陰性群と比較して、腎間質における細胞浸潤の割合が大きいことが確認された。さらに、ヒト尿細管上皮細胞を用いた *in vitro* 実験において、高糖下における間質炎症に重要な役割を果たすケモカイン MCP-1 の発現に及ぼす EPO および抗体陽性患者から精製した IgG 分画の効果について検討した。結果、抗体は EPO の MCP-1 発現減弱効果を抑制することを介して間質炎症を増悪させる可能性が示された。以上より、抗体は CKD における腎予後予測の補助に資する新たな臨床検査診断法となる可能性が示された。

(3) 腎臓病モデルマウスを用いた EPO 機能の修飾が腎病変に及ぼす影響の基礎的検討

ヒト糖尿病性腎症の増悪に抗 EPO 受容体抗体が関連することが示唆される結果を踏まえ、糖尿病モデルマウスに腎虚血再灌流障害を惹起したときの EPO 機能について検討した。糖尿病モデルマウスである Akita マウスおよび対照マウスである C57BL/6J マウスを用いて片腎に虚血再灌流を行った。EPO もしくはカルバミル化 EPO 群には虚血再灌流30分前に薬剤を皮下投与した。評価項目として、2日目および7日目における腎障害の程度を血清クレアチニン値および腎病理所見で評価した。病理学的には、カルバミル化 EPO を投与した群において7日目の尿細管腔内デブリスが減少していた。腎機能には、EPO またはカルバミル化 EPO 投与による変化はみられなかった。なお、EPO またはカルバミル EPO 投与によるヘモグロビン濃度や血圧の上昇はみられなかった。次に、この系において、虚血30分前に放射性ヨードラベルを行った EPO を皮下投与し、経時的な EPO の体内動態を評価した。虚血再灌流直前と直後では両腎における放射線量に差は見られなかったが、再灌流50分後には障害腎における放射線量が増加することが確認された。

現在、内因性の EPO の腎障害時における腎保護効果について、骨髄以外の臓器・組織において EPO 受容体を発現しない EPOR レスキューマウスを用いて引き続き検討を行っている。

慢性腎臓病(CKD)において臨床的に有用なバイオマーカーの開発が求められている。近年、高齢化、肥満・糖尿病の増加など背景として末期腎不全のハイリスク者が増加している。末期腎不全は透析治療を余儀なくされるのみならず、高率に発症する心血管疾患による生命予後悪化およびそれに対する治療にかかる医療費負担が大きくなりやすい。したがって、患者予後改善および社会負担軽減のため CKD ハイリスク群の診断法の向上および予後予測を可能とする方法の開発は重要な課題である。本研究で得られた成果である抗 EPO 受容体抗体の測定は、CKD に

おける腎予後予測の補助を目的とした新たな臨床検査診断法となる可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

Yasuda H, Iwata Y, Nakajima S, Furuichi K, Miyake T, Sakai N, Kitajima S, Toyama T, Shinozaki Y, Sagara A, Miyagawa T, Hara A, Shimizu M, Kamikawa Y, Sato K, Oshima M, Yoneda-Nakagawa S, Kaneko S, Wada T. Erythropoietin signal protected HUVEC from high glucose induced injury. *Nephrology (Carlton)*. 2018 Oct 22. doi: 10.1111/nep.13518、査読有

Hara A, Furuichi K, Koshino A, Yasuda H, Tran T, Iwata Y, Sakai N, Shimizu M, Kaneko S, Nakamura H, Wada T. Clinical and pathological significance of autoantibodies to erythropoietin receptor in type 2 diabetic patients with chronic kidney disease. *Kidney Int Rep*. 2017;3(1):133-141. doi: 10.1016/j.ekir.2017.08.017、査読有

原 章規. 抗エリスロポエチン受容体抗体の測定とその臨床的特性 *臨床化学* 47:51-56, 2018、査読無

Hara A, Furuichi K, Yamahana J, Yasuda H, Iwata Y, Sakai N, Shimizu M, Kaneko S, Wada T. Effect of Autoantibodies to Erythropoietin Receptor in Systemic Lupus Erythematosus with Biopsy-proven Lupus Nephritis. *J Rheumatol* 2016, 43:1328-34. doi: 10.3899/jrheum.151430 査読有

原 章規、和田隆志. ESA 低反応性貧血 *臨床化学* 45:110-116, 2016、査読無

原 章規、和田隆志. 新しいエリスロポエチン阻害因子：抗エリスロポエチン受容体抗体の発見とその特性 *臨床病理* 65:100-105, 2017、査読無

〔学会発表〕(計 8 件)

原 章規、北川清樹、北島信治、遠山直志、岩田恭宜、坂井宣彦、清水美保、古市賢吾、和田隆志. ANCA 関連血管炎における抗エリスロポエチン受容体抗体の臨床的意義. 第 62 回日本リウマチ学会総会・学術集会 2018

原 章規、古市賢吾、和田隆志. 糖尿病性腎症の進展マーカー候補としての抗エリスロポエチン受容体抗体. 第 61 回日本腎臓学会学術総会 2018

Akinori Hara, Trang Thi Thu Tran, Kiyoki Kitagawa, Megumi Oshima, Shinji Kitajima, Tadashi Toyama, Yasunori Iwata, Norihiko Sakai, Miho Shimizu, Kengo Furuichi, Takashi Wada. Effect of autoantibodies to erythropoietin receptor in patients with anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *ASN Kidney Week* 2018

原 章規、越野瑛久、Trang Thi Thu Trang、上川康貴、篠崎康之、北島信治、遠山直志、岩田恭宜、坂井宣彦、清水美保、古市賢吾、和田隆志. 保存期糖尿病性腎症の ESA 反応性における抗エリスロポエチン受容体抗体の意義 第 60 回日本腎臓学会学術集会 2017

原 章規 抗エリスロポエチン受容体抗体の測定とその臨床的特性 第 57 回日本臨床化学会 年次学術集会 2017

Trang Thi Thu Tran, Akinori Hara, Kiyoki Kitagawa, Takashi Wada Clinical impact of anti-erythropoietin receptor antibodies in patients with anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. 7th CKD Frontier Meeting, 2018

原 章規. 新しいエリスロポエチン阻害因子：抗エリスロポエチン受容体抗体の発見とその特性 第 27 回日本臨床化学会 東海・北陸支部総会、第 35 回日本臨床検査医学会 東海・北陸支部例会 連合大会 2016

Hara A, Furuichi K, Koshino A, Iwata Y, Sakai N, Shimizu M, Wada T. Impact of anti-erythropoietin receptor antibodies in diabetic patients with chronic kidney disease. *Renal Week* 2016, Chicago, 2016

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

6 . 研究組織

(1)研究分担者：なし

(2)研究協力者：なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。