

機関番号：13301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790803

研究課題名（和文） 抗エリスロポエチン受容体抗体の同定とその臨床的意義

研究課題名（英文） Detection of anti-erythropoietin receptor autoantibodies in patients with anemia of chronic disease

研究代表者

原 章規 (HARA AKINORI)

金沢大学・附属病院・特任助教

研究者番号：70507045

研究成果の概要（和文）：エリスロポエチン(EPO)低反応性の貧血に関与する新規因子である抗 EPO 受容体抗体の同定を行い、さらにその臨床特性および生物学的活性を検討した。その結果、検討した患者血清の一部において抗 EPO 受容体抗体が陽性であった。試験内の検討では、抗体陽性の血清により EPO 依存性の赤芽球系細胞の増殖が抑制された。最も高頻度に検出された全身性エリテマトーデス症例の検討では、抗体陽性例は陰性例と比較して末梢血網赤血球数および骨髓赤芽球減少と相関した。以上より、貧血患者の一部に EPO 活性を阻害する抗 EPO 受容体抗体が認められることが判明した。

研究成果の概要（英文）：We examined the prevalence, clinical associations and pathogenic role of novel autoantibodies to the erythropoietin receptor (EPOR) in patients with anemia of chronic disease (ACD). As a result, serum anti-EPOR antibodies were detected in some patients, but in none of the healthy controls. Sera from patients with anti-EPOR antibodies inhibited EPO-dependent cell proliferation. Among SLE patients studied, anti-EPOR antibodies were associated with reticulocytopenia and a decrease in bone marrow erythroblasts. In conclusion, impaired erythropoiesis may be mediated by anti-EPOR antibodies, which functionally neutralize EPO activity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,900,000	570,000	2,470,000

研究分野：腎臓学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：蛋白質，トランスレーショナルリサーチ，内科，免疫学，臨床

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。近年この貧血が、がん・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きた。種々の貧血の中で、慢性的な

免疫機構の活性化を伴う患者に生じた貧血は、Anemia of chronic disease (ACD)と呼ばれている。ACDをきたす疾患として、自己免疫疾患、感染症、がん、CKDなどが含まれる。ACD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抑制やエリスロポエチン EPO の産生障害が考えられている。ACD

の治療に対しては 1990 年より EPO 製剤が実用化されている。実際、関節リウマチ (rheumatoid arthritis ; RA) や CKD 患者の約 95% は治療に反応し貧血が改善する。しかしながら、EPO 製剤を用いた治療に反応の乏しい患者群が知られており、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 は貧血や低酸素環境下で主として腎臓で産生される分子量 30.4k ダルトンの糖蛋白ホルモンである。産生・分泌された EPO は骨髄における赤血球系前駆細胞の分化を促進することにより赤血球の産生を刺激する。従って臨床的には EPO の作用不足あるいは低反応性の病態は、末梢血における網赤血球数減少および骨髄における赤芽球数減少をきたすことで認識される。

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。さらにその後、rHuEPO に対する自己抗体による赤芽球癭を合併した CKD 症例も報告された。その後、RA や全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus ; SLE) といった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。しかしながら、未だ EPO 低反応性に対する病態は十分に解明されていない。

EPO は EPO 受容体に結合しその作用を発揮する。ヒトにおける EPO の活性を抑制する EPO 受容体の遺伝子変異や免疫学的異常は知られていない。

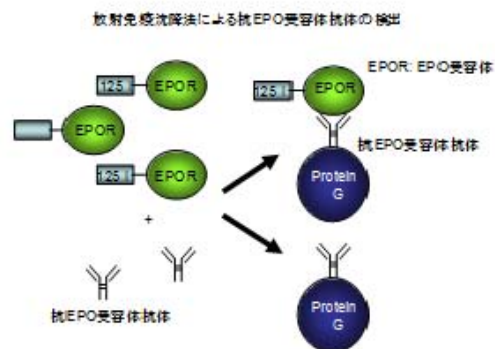
以上より、EPO の活性を機能的に中和する EPO 受容体に対する自己抗体、すなわち抗 EPO 受容体抗体が ACD の病態を呈する症例に存在すると仮説を立てた。

2. 研究の目的

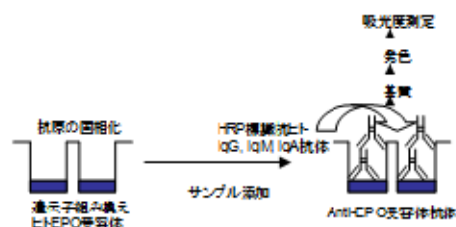
新規のエリスロポエチン (EPO) 活性阻害因子としての抗 EPO 受容体抗体の同定、臨床特性ならびに生物学的活性の機能解析を行った。

3. 研究の方法

腎臓病、全身性エリテマトーデス (SLE) を含む自己免疫性疾患、リンパ増殖性疾患患者を対象とした。患者血清を用い、抗 EPO 受容体抗体を放射免疫沈降法と ELISA 法にて測定した (図)。なお、ネガティブコントロールとして健康人血液を使用した。



ELISA法による抗EPO受容体抗体の検出



また、抗 EPO 受容体抗体陽性の血清については、*in vitro*にて EPO 依存性赤血球系前駆細胞株 (AS-E2) の増殖能に及ぼす影響を検討した。なお、この細胞株は抗 EPO 抗体を含む EPO 阻害物質の存在により増殖阻害を受けることが判明している。

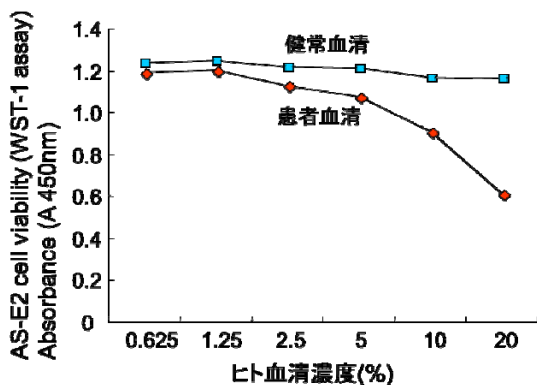
さらに、抗 EPO 受容体抗体の有無により SLE 患者を分け、2 群間の貧血プロファイルを含む臨床特性を比較検討した。

4. 研究成果

放射免疫沈降法と ELISA 法によるスクリーニング系を用いて解析した症例のうち、抗 EPO 受容体抗体は SLE において最も高頻度に見られ、その他の膠原病・自己免疫疾患やがん患者においても陽性例を認めた。

次に、同定した抗 EPO 受容体抗体の生物学的活性を検討する目的で、患者血清の AS-E2 の増殖に及ぼす影響を *in vitro*で検討した。検討の結果、スクリーニング系で抗 EPO 受容体抗体が陽性となった患者血清の一部は AS-E2 の EPO 依存性の増殖を濃度依存性に抑制することが判明した (図)。

(図) AS-E2 増殖抑制試験

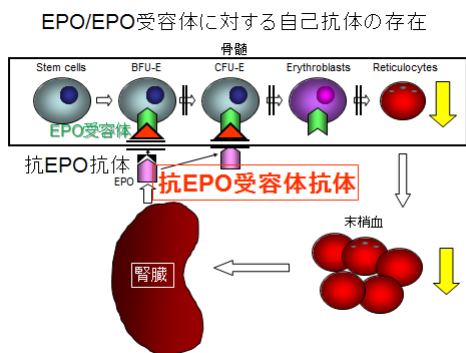


この結果から、一部の抗 EPO 受容体抗体は EPO-EPO 受容体の相互作用を抑制する機能を有することが示唆された。

さらに、生体内における抗 EPO 受容体抗体の貧血に対する意義を検討する目的で、本抗体を最も高頻度に認めた SLE 患者を 2 群に分けて臨床的検討を加えた。抗 EPO 受容体抗体の有無により、SLE 患者を 2 群に分けて検討した結果、抗体陽性群は陰性群と比較して、末梢血網赤血球数および骨髓赤芽球系前駆細胞数が低値であることが判明した。抗 EPO 受容体抗体の推移を追跡し得た SLE の代表例では、治療前の血清に抗 EPO 受容体抗体が陽性であり、かつ網赤血球数が低値の貧血を呈していた。診断後の治療により、抗 EPO 受容体抗体が陰性化するとともに、網赤血球数が増加し、貧血が改善した。以上の結果から、同定した抗 EPO 受容体抗体は生体内において生物学的活性を有することが示唆された。

上記の試験管内および臨床的検討の結果から、本研究で新規に同定しえた抗 EPO 受容体抗体の一部は ACD の病態に関与する可能性が示された (図)。

(図) 抗 EPO 受容体抗体の ACD への関与



本研究により、ACD における EPO 低反応患者の新たな病態が明らかになったと考えられる。さらに現在臨床応用されている遺伝子組換えヒト EPO 製剤 (rHuEPO) の効果を投与前に判定することを可能にすることで、CKD に伴う貧血、すなわち腎性貧血を中心とした ACD の治療におけるテイラーメイド医療が可能になる可能性が示された。

今回の知見は ACD の病因・病態および治療を考える上で重要な意味を持つ。特に rHuEPO に関してはわが国では 1990 年以降 CKD 患者の貧血治療に欠かせない治療薬であるが、高齢化や透析歴の長期化が進み、CKD 患者の病態や心不全を含む合併症は多様化し、今後ますます複雑な病態を呈してることが予想される。その病態の解明については決して十分に解明されているとはいえない。

EPO が効果を発現するためには赤芽球の増殖を促す環境を整える必要があるが、種々の原因でこの環境が悪化した場合には EPO が有効に作用しないと考えられている。その原因の一つに ACD の病態を高頻度にきたす自己免疫性疾患がある。その代表として PRCA や SLE における抗 EPO 抗体が挙げられる。1996 年に第一報がなされて以来、EPO 低反応性をきたす免疫学的原因として内因性 EPO および rHuEPO に対する自己抗体に注目が集まったが、EPO 受容体に対する抗体については国内外で検討されていない。またこの抗 EPO 受容体抗体が存在する場合には、相当の EPO ないし rHuEPO を投与してもその効果が期待されない。したがって、ACD における患者、特に rHuEPO を投与する患者群で抗 EPO 受容体抗体の同定がなされた場合、患者の EPO 応答性を投与前に予測し、個々の患者の特性に合わせた安全かつ効果的な治療計画を立てることができる。また抗 EPO 受容体抗体を積極的に取り除く、あるいは産生を抑制することを目的とした治療への応用に役立つ可能性がある。

今後は、抗 EPO 受容体抗体の生物学的特性について、さらに詳細な検討が必要であると考えられている。具体的には、患者血清中に同定された抗 EPO 受容体抗体の特異性である。今回のアッセイ系から、抗 EPO 受容体抗体にはサブクラス (IgG または IgM) が存在することが示唆されたが、血清から抗体を精製・抽出し、サブクラスごとに抗原である EPO 受容体との親和性の検討が必要であると考えている。また、EPO 受容体以外の血球増殖因子 (GM-CSF, IL-3 など) の受容体に及ぼす影響なども検討する予定である。

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1件)

① Hara A, Furuichi K, Yamauchi H, Kitagawa K, Sakai N, Higuchi M, Kaneko S, Wada T. Detection of autoantibodies to erythropoietin-erythropoietin receptor system in patients with anemia of chronic disease. J Am Soc Nephrol 20: 309A, 2009 (Abstract), 査読有

[学会発表] (計3件)

① Hara A, Hiroyuki Yamauchi, Kiyoki Kitagawa, Norihiko Sakai, Kengo Furuichi, Masato Higuchi, Shuichi Kaneko, Takashi Wada. Detection of autoantibodies to erythropoietin-erythropoietin receptor system in patients with anemia of chronic disease. ASN Renal Week 2009, 2009.10.29, San Diego Convention Center (USA)

② 原章規, 和田隆志. エリスロポエチン-エリスロポエチン受容体相互作用に関与する抗体の検出とその臨床的意義の検討. 第49回日本臨床化学会年次学術集会, 2009年9月20日, 長崎大学医学部(長崎県)

③ 原章規, 古市賢吾, 和田隆志. 貧血の新規機序としての抗エリスロポエチン受容体抗体の同定とその基礎的・臨床的特性の解析. 第56回日本臨床検査医学会学術集会, 2009年8月27日, 札幌コンベンションセンター(北海道)

[図書] (計1件)

① 原章規, 山内博之, 北川清樹, 坂井宣彦, 古市賢吾, 樋口正人, 和田隆志, ライフサイエンス出版, 第18回腎とエリスロポエチン研究会 Proceedings, 2010年, 93頁~94頁

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原 章規 (HARA AKINORI)
金沢大学・附属病院・特任助教
研究者番号: 70507045

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし