

令和元年6月21日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19482

研究課題名(和文)系球体腎炎・腎臓病の発症進展における銅含有酵素を介した酸化ストレスの影響

研究課題名(英文) Effects of oxidative stress mediated by copper-containing enzymes in the progression of kidney disease

研究代表者

酒巻 裕一 (Sakamaki, Yuichi)

新潟大学・医歯学総合研究科・特任助教

研究者番号：70529742

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：CKDで慢性炎症と関連する銅含有酵素セルロプラスミン(Cp)ならびに銅、亜鉛を調査した。後ろ向き横断研究で、維持血液透析中を対象とし、血清Cp値と、体重・平均ヘモグロビン当たりエリスロポエチン抵抗性指数(ERI)、ならびに検査項目との関連を検討した。血液透析患者においてCp25.5以上でERIが高い傾向を示し、またERI 20以上ではCp高値であった。重回帰分析でCpを従属変数としたとき、hsCRP、フェリチンが正の独立変数、ALBが負の独立変数として関連した。

また、血液透析患者において、血清銅と亜鉛は正の相関を示した。亜鉛欠乏患者は47%に認められ、同時に銅低値の傾向であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本検討ではERIとCpの関連を示したことに加え、hsCRP、ALBとCpの関連を認めたことから、血液透析患者と慢性炎症と関係をCpも関連し得ることが示唆された。Cpにはエリスロポエチン低反応性を含めた多面的な関係が示唆される。

また、亜鉛欠乏症の血液透析患者は同時に銅も低値の傾向である可能性を認めた。血液透析患者への大量の亜鉛補充療法が見直されているが、本検討からは治療後に銅欠乏が生じるリスクが考えられた。

研究成果の概要(英文)： We investigated that the copper-containing enzyme ceruloplasmin (Cp), copper and zinc in HD patients. In a retrospective, cross-sectional study, we examined the relationship between serum Cp and erythropoietin resistance index (ERI), and laboratory examinations of patients of maintenance hemodialysis. In hemodialysis patients, ERI tended to be higher at Cp 25.5 or higher, and Cp was higher at ERI 20 or higher. When Cp was as a dependent variable in multiple regression analysis, hsCRP, ferritin was associated as a positive independent variable, and ALB was associated as a negative independent variable.

And, in hemodialysis patients, serum copper and zinc showed a positive correlation. Zinc-deficient patients were found in 47%, with a trend towards low copper.

研究分野：腎臓病一般

キーワード：銅 セルロプラスミン 慢性腎臓病 血液透析 亜鉛

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

1. 研究開始当初の背景

銅は必須微量元素の一つで、胃・十二指腸・小腸上部から少なくとも1日0.5~1.0mgが吸収され、肝臓でセルロプラスミン(以下 **Cp**)を合成し、骨格筋、脳を含む全身に運ばれ、体内には総計70mg以上存在する。胆道系に1日0.9mgを排泄し、一方で尿中排泄は1日10~40µgと微量である。広く食品群に含まれることから通常の食生活で不足することはないが、銅を十分に含まない中心静脈栄養・経管栄養、上部消化管・小腸切除ならびに炎症性腸疾患による消化液喪失・吸収障害、また過剰な亜鉛による腸管からの銅吸収の競合阻害によって、6~30か月後に銅欠乏症を招くとされる¹⁾。

銅は **Cp** を含め銅含有酵素の活性中心に結合して、生体内で抗酸化作用により酸化ストレスから蛋白、脂質、DNAを保護する様々な生理活性をもたらす。**Cp** は分子量132,000の2グロブリン糖蛋白質でアミノ酸1046残基から構成され、6原子の銅と含有する。フェロキシダーゼ活性を認め鉄輸送に関わり抗酸化作用を有する。またIL-6によっても誘導される急性期糖蛋白質で、感染、炎症、外傷などでも上昇する。肝臓で産生される循環型のほか、選択的スプライシングを受け細胞表面に局在するGPIアンカー型が脳astrocyteのほか、脾、肺、精巣、胎盤に存在する。**Cp** ノックアウトマウス、またヒト無**Cp** 症はヘモクロマトーシス様の鉄過剰症、錐体外路症状、糖尿病を呈する。

銅欠乏症による貧血の機序として、**Cp** のフェロキシダーゼ活性が低下し鉄の酸化(Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+})が障害・トランスフェリン結合の低下・輸送障害、ミトコンドリアのcytochrome C oxidaseの活性低下による赤血球成熟障害、Superoxide dismutase 1の減少により血球膜よりフリーラジカルが除去できず赤血球寿命が短縮する、などが想定されている¹⁾。慢性腎臓病(以下CKD)における腎性貧血に関連して、銅欠乏はエリスロポエチン製剤低反応性の一因として考慮されるが、根拠となる報告は高度の銅欠乏例に限られており、その際の血清**Cp** 値は測定感度以下に達するほどである。

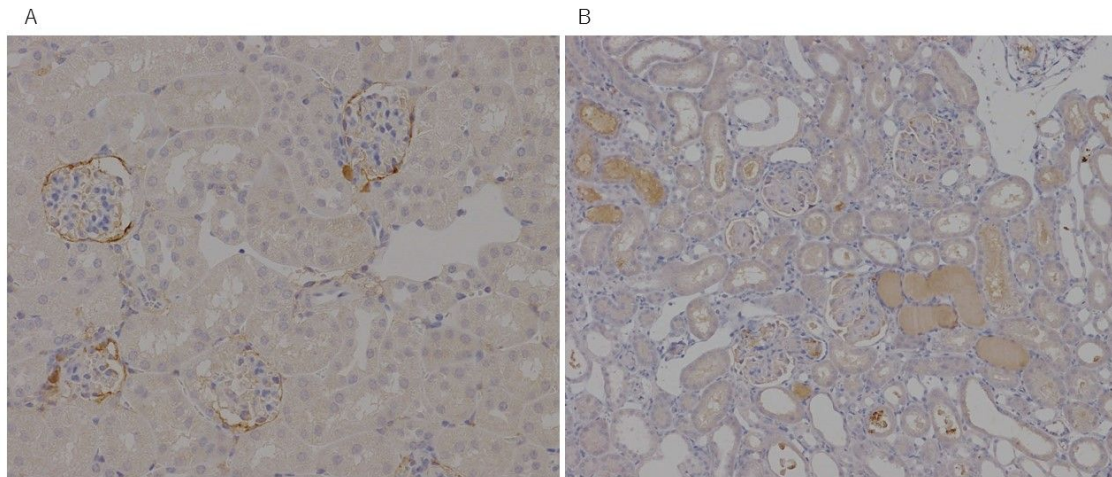
<糸球体腎炎と**Cp** の関連>

私共は、銅欠乏による汎血球減少症を合併したネフローゼ症候群・慢性腎不全の1例を経験した¹⁾。症例は70歳代の男性で、胃下垂全摘術後、絞扼性イレウスによる小腸切除後、短腸症候群にて在宅中心静脈栄養を続けていた。2年前に尿蛋白、尿潜血を認めたが、この後2年間、微量元素製剤を中断されてしまった。2年後に原因不明の高度の蛋白尿・ネフローゼ症候群と腎機能障害から腎不全を呈し、血液透析に導入された。また汎血球減少を合併し、最大量のエリスロポエチン製剤に低反応で頻回の赤血球輸血を要した。血液透析導入6か月後に初めて銅欠乏を指摘され微量元素投与による補充を開始したところ、約1か月間で速やかに汎血球減少は軽快し、エリスロポエチン製剤は6分の1量まで減量できた。

興味深いことに、本例は過去5か月間腎不全から無尿であったが、銅補充を開始後に尿量が徐々に回復してきた。残念ながら本例は肺炎から死亡したが、病理解剖で腎糸球体に分節性硬化病変を認め、ネフローゼ症候群の原因と考えられた。検索したところ、少なくとも4例の類症の報告があり、うち1例は腎病理で分節性硬化を認めた²⁾。銅欠乏、並びに銅補充が腎疾患・尿蛋白の増悪寛解に関連する可能性があり、その病態に**Cp** を含む銅含有酵素が腎局所において関連するかもしれない。

過去の報告で、老齢、食餌負荷モデルラットにおいて、加齢に伴い**Cp** が主に腎糸球体ボウマン嚢上皮細胞において発現が増強し、同時に尿中に**Cp** が増加することが報告されている³⁾。またヒトにおいてはこれまで、早期糖尿病性腎症⁴⁾、IgA腎症⁵⁾、ループス腎炎

⑥における尿中 **Cp** の増加が報告され、腎疾患のバイオマーカーとしての可能性が検討された。そこで、筆者は腎炎モデルマウスにおける **Cp** の発現を免疫染色によって検討した。正常マウスでは既報と同様に腎糸球体ポウマン嚢上皮細胞に **Cp** はよく染色されたが(図 **A**)、抗糸球体基底膜抗体腎炎モデルマウスではポウマン嚢上皮の染色性が減弱した(図 **B**)。



ポウマン嚢上皮の **Cp** がポウマン腔・糸球体局所の抗炎症作用をもたらすが、腎炎モデルでは **Cp** の発現低下が病変の増悪に関連するかもしれない。しかし、正常ヒト腎糸球体には **Cp** の発現は免疫染色では確認されていない(**The Human Protein Atlas**)。

< 血清セルロプラスミン値と慢性炎症 >

Cp は **IL-6** によっても誘導され、感染、炎症、外傷などでも上昇する。慢性腎臓病患者において、血清 **Cp 25.5 mg/dL** 以上の高値群は **25.5** 未満の低値群と比較して心血管疾患(**CVD**)の発症が増加していた(ハザード比 **1.35, 95%CI 1.0-1.82**)⁷⁾。また、小児紫斑病腎炎患者において血清 **Cp** 値は上昇し総酸化ストレス状態と相関していた⁸⁾。そこで血清 **Cp** は急性期糖蛋白質で増加するのみならず、慢性腎臓病(以下 **CKD**)患者において慢性炎症状態を反映しないかと考えた。血清 **Cp** は急性期糖蛋白質で増加するのみならず、**CKD** 患者において慢性炎症状態を反映しないかと考えた。**CKD** 患者の重要な合併症である腎性貧血において、治療薬であるエリスロポエチン製剤への低反応性と炎症の関連が考慮される。

2. 研究の目的

血清 **Cp** と、**CKD** の合併症である腎性貧血の治療薬であるエリスロポエチン製剤への低反応性が関連しないか、炎症との関連を検討する。

3. 研究の方法

CKD ステージ **G5D** 期の血液透析患者を対象に、血清 **Cp** 値と腎性貧血のエリスロポエチン低反応性の関連を調査した。研究は新潟大学倫理審査委員会の承認を得て(承認番号 **2017-0235**)、**UMIN** に登録した(試験 **ID:UMIN000029682**)。全ての研究対象者は文書による同意を得た。研究方法は後ろ向き横断研究で、維持血液透析中で腎性貧血を治療中の患者を対象とした。透析前血清 **Cp** 値と、過去 **12** 週間の透析前検査から算出した体重・

平均ヘモグロビン当たりエリスロポエチン抵抗性指数(ERI)($\mu\text{g}/\text{kgBW}/\text{g}/\text{dL}/\text{week}$)、ならびに血液透析の定期検査項目との関連を検討した。統計解析ソフトはJMP13®を用いた。

4. 研究成果

対象の患者背景は141名(男85名)、年齢68.3+-13.8歳、透析期間中央値6.2年(最小0.2年、最大44.5年)、糖尿病49名(34.7%)であった(Table1)。

【Table 1-1. baseline clinical characteristics】

Patients, n	142
Age, y	68.3 +- 13.8
Duration dialysis, y	6.623 (median) (min 0.2, max 44.5)
Male, n (%)	85 (60)
Diabetic nephropathy, n (%)	52 (37)
Past history of CVD, n (%)	
None	67 (47)
Angina or MI	31 (21)
Cerebral infarction	17 (12)
Cerebral hemorrhage	12 (8)
PAD	26 (18)
Past history of malignancy, n (%)	19 (19)
Body mass index, kg/m^2	22.9 +- 3.9

【Table 1-2. baseline clinical characteristics】

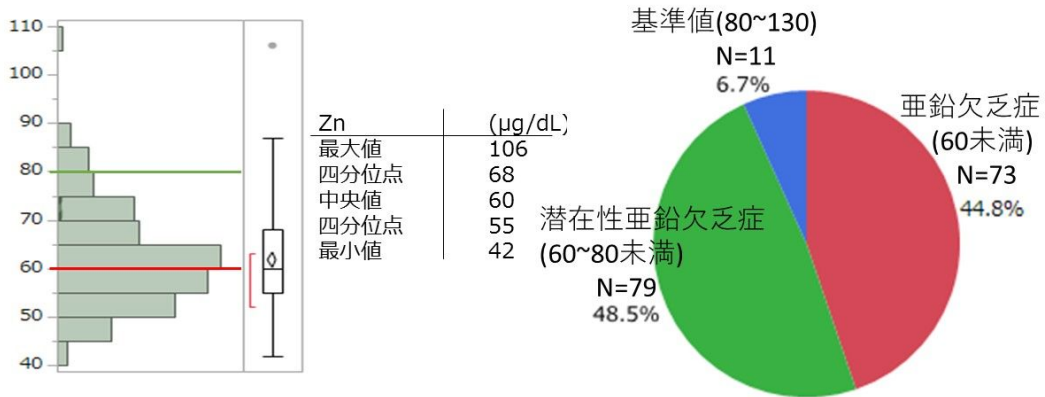
Patients, n	142
Body mass index, kg/m^2	22.9 +- 3.9
Mean hemoglobin, g/dL	11.1 +- 0.8
Darbepoetin dose, $\mu\text{g}/\text{week}$	19.4 +- 14.2
Erythropoietin resistance index(ERI) (200:1) IU/week/g/dL/kgBW	6.87 +- 5.93
Fe, $\mu\text{g}/\text{dL}$	70.2 +- 23.4
TIBC, $\mu\text{g}/\text{dL}$	244.8 +- 39.3
TSAT, %	22.0 +- 5.4
intravenous iron preparations (for last 3months), mg	103 +- 122
Serum albumin, mg/dL	3.6 +- 0.3
hsCRP, ng/mL	743.5 (median) (min 50, max 79700)
Cu, $\mu\text{g}/\text{dL}$	86.4 +- 20.2
Zn, $\mu\text{g}/\text{dL}$	61.7 +- 10.7
Ceruloplasmin, mg/dL	22.6 +- 4.6

Cp 25.5 で 2 群に分けたとき、Cp 高値群(N=28)は ERI 9.11+-8.83 で、Cp 低値群(N=114)の ERI 6.32+-4.86 より高い傾向を示した (P = 0.07)。ERI > 20 を ESA 低反応性と定義した時、ERI>20 群(N=4)では Cp 30.5 +- 9.9 で ERI < 20 群(N=138)の Cp 22.3 +- 4.2 より高値を示した(p < 0.05)。分散分析で ERI と Cp は弱い相関を示した(p < 0.01、自由度調整 R2 乗 0.062)。興味深いことに、CVD 既往の有無で Cp を比較すると、CVD 既往あり群の Cp(中央値 24, 21-26)は既往なし群(中央値 21, 18-24)より高値であった(p < 0.01)。また、ステップワイズ法による重回帰分析(p < 0.001、自由度調整 R2 乗 0.350)では Cp を従属変数としたとき、検査項目 hsCRP(標準化 0.308)、フェリチンが正の独立変数(標準化

0.235、**ALB** が負の独立変数(標準化 **-0.239**)として関連した。

昨今、血液透析患者の低亜鉛血症に対する高用量亜鉛投与が見直され⁸⁾、さらに高用量亜鉛投与による低銅血症による貧血・血球障害の報告があることから、亜鉛と銅の関連を再調査した。亜鉛欠乏症は **73 名(44.8%)**に認めた(図 C)。

(C)血液透析患者の血清亜鉛濃度



低亜鉛血症と **ERI** には有意な差を認めなかった。亜鉛と銅の関連を調べ、回帰分析で亜鉛と銅は正の相関を示した ($Zn(\mu\text{g/dL}) = 53.8 + 0.091 \cdot Cu(\mu\text{g/dL})$ 、自由度調整 **R² 乗 0.0263, p<0.05**)。Zn を従属変数とする重回帰分析では、血清亜鉛を説明し得る有意な因子として、**Alb**、**Cu**、無機リン、鉄が選択された (**Table 2**)。

(Table 2)血清亜鉛濃度と 臨床検査値の関連

	単変量		多変量	
	相関係数(r)	p値	標準化係数(β)	p値
総蛋白	0.2686	0.0005		
Alb	0.3529	<0.0001	0.2915	0.0001
ChE	0.2320	0.0030		
iP	0.2300	0.0032	0.1723	0.0131
Mg	0.1650	0.0359		
Fe	0.2180	0.0052	0.2511	0.0005
TIBC	0.1775	0.0234		
銅	0.2228	0.0042	0.2991	<0.0001
			自由度調整R ²	0.2637
			p値	<0.0001

(結果のまとめ)

本検討では **ERI** と **Cp** の関連を示したことに加え、臨床検査項目 **hsCRP**、**ALB** と **Cp** の関連を認めたことから、血液透析患者における慢性炎症の病態に、**Cp** も関連し得ることが示唆された。また血液透析患者における **CVD** の既往と **Cp** が関連する可能性が初めて示された。**Cp** にはエリスロポエチン低反応性を含めた多面的な生物学的意義が示唆さ

れる。

あわせて、本検討では血液透析患者の亜鉛と銅の正の相関を示した。亜鉛と銅は腸管で共同的に吸収されるが、**亜鉛欠乏症の血液透析患者は、同時に銅も低値の傾向である可能性が示された。大量の亜鉛補充療法後に、銅欠乏が生じるリスクが考えられた。**

本研究の限界として、横断研究であり因果関係を直接証明することはできなかったことが挙げられる。また、集団の平均 **ERI** が過去の腎性貧血の研究より低い点も今後の検討が必要であろう。より **ERI** の高い集団では慢性炎症を認める患者が多いことが想定され、ひいては **Cp** 高値と **ERI** 低下とのより強い関連性を示せた可能性がある。

(引用文献)

文献リスト:

- 1) **Sakamaki Y, Goto K, Watanabe Y, et al. Nephrotic syndrome and end-stage kidney disease accompanied by bicytopenia due to copper deficiency. Intern Med. 2014, 53:2101-6**
- 2) 平瀬 伸尚, 安部 康信, 牟田 耕一郎ら。多彩な臨床症状を示した銅欠乏症の 1 例 **1993; 82:275-276** 日内会誌
- 3) **J.E. Wiggins, Goyal M, Wharram BL, et al, Antioxidant ceruloplasmin is expressed by glomerular parietal epithelial cells and secreted into urine in association with glomerular aging and high-calorie diet. J Am Soc Nephrol. 2006, 17:1382-7**
- 4) **Narita T, Hosoba M, Kakei M, et al. Increased urinary excretions of immunoglobulin g, ceruloplasmin, and transferrin predict development of microalbuminuria in patients with type 2 diabetes. Diabetes care. 2006, 29:142-144**
- 5) **PG Moon Lee JE, You S, et al. Proteomic analysis of urinary exosomes from patients of early IgA nephropathy and thin basement membrane nephropathy. Proteomics 2011, 11:2459-2475**
- 6) **Brunner HI, Bennett MR, Mina R, et al. Association of noninvasively measured renal protein biomarkers with histologic features of lupus nephritis. Arthritis Rheum. 2012, 64:2687-97.**
- 7) **Kennedy DJ, Fan Y, Wu Y, et al. Plasma ceruloplasmin, a regulator of nitric oxide activity, and incident cardiovascular risk in patients with CKD. Clin J Am Soc Nephrol. 2014;9:462-7**
- 8) 永野伸郎、伊藤恭子、大石裕子ら 透析患者の血清亜鉛濃度と分布の実態-低亜鉛血症と関連する因子- **2018, 51:369-377, 透析会誌**

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

1. 腎臓病と銅含有セルロプラスミンとの関連、酒巻裕一 , 青柳竜治 , 成田一衛, **2018, 7;114-117 別冊 BIO Clinica**

[学会発表](計 3 件)

1. 血液透析患者の亜鉛欠乏症と栄養状態 酒巻裕一 , 青柳竜治 , 成田一衛 . 第 **64** 回日本透析医学会学術集会・総会 **2019** 年
2. 血清セルロプラスミン値とエリスロポエチン抵抗性指数が関連する 酒巻裕一 , 青柳竜治 , 成田一衛, . 第 **61** 回日本腎臓学会学術総会 **2018** 年
3. 血液透析患者の貧血治療に関する病院情報システムと連携した治療支援システム開発の試み 吉岡 友基, 林 政雄, 酒巻 裕一ら . 第 **61** 回日本腎臓学会学術総会 **2018** 年